

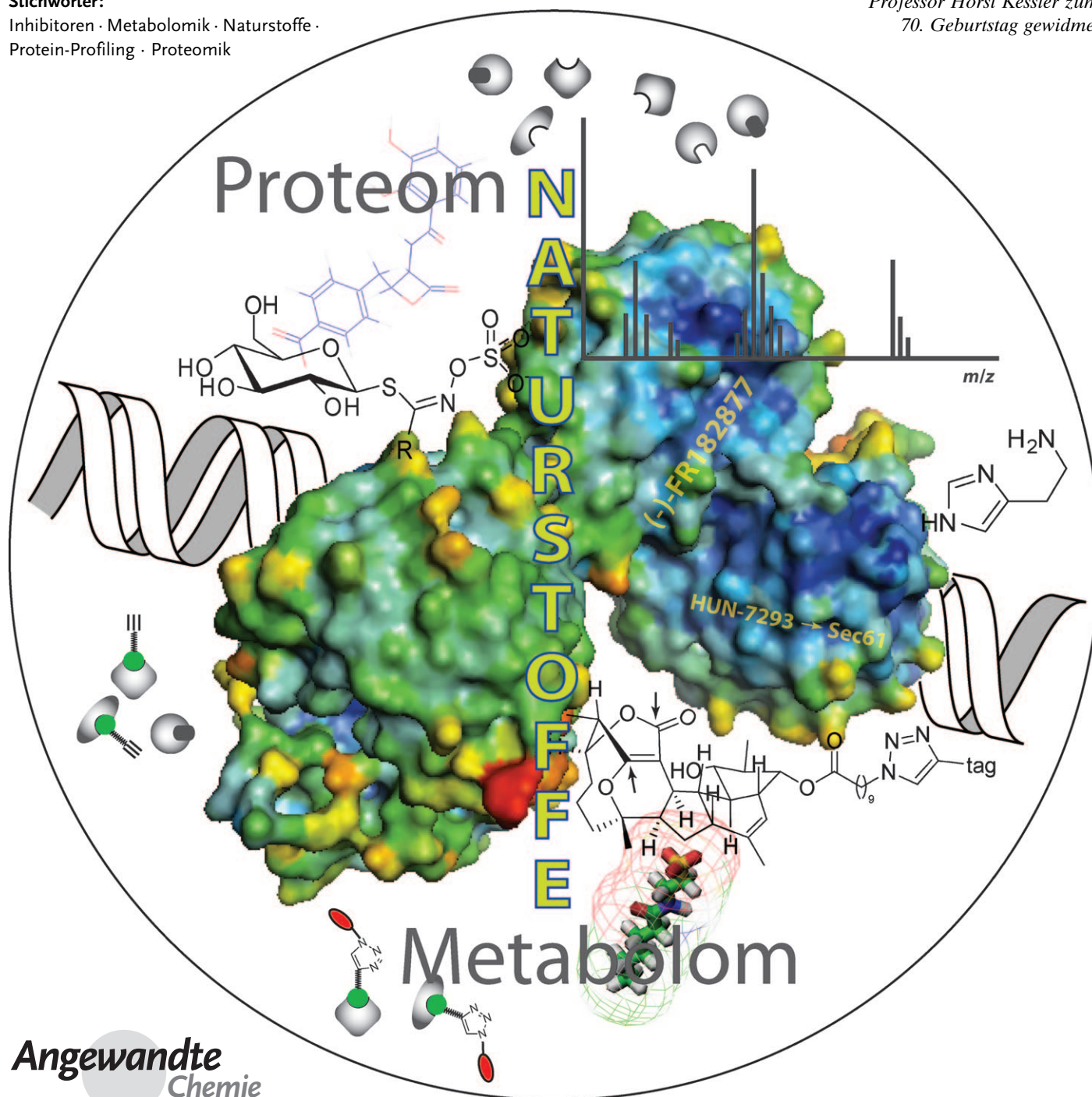
Naturstoffe und ihre biologischen Angriffsziele: proteomische und metabolomische Markierungsstrategien

Thomas Böttcher, Maximilian Pitscheider und Stephan A. Sieber*

Stichwörter:

Inhibitoren · Metabolomik · Naturstoffe · Protein-Profilung · Proteomik

Professor Horst Kessler zum
70. Geburtstag gewidmet



Das aktivitätsbasierte Protein-Profilierung (ABPP) hat sich zu einer ausgereiften Standardmethode für die schnelle, empfindliche und selektive Identifizierung von Enzymaktivitäten und Inhibitoren in Proteomen entwickelt. Mit naturstoffbasierenden Sonden lassen sich die Angriffsziele (targets) vieler bislang uncharakterisierter Moleküle leicht in komplexen Proteomen aufklären und so ihre genaue Funktion und der Wirkmechanismus verstehen. Zum anderen dienen Naturstoffsonden und ihre Derivate als pharmakologische Leitstrukturen, die essenzielle Komponenten in der Zelle hemmen und in biologischen Assays ihre Wirksamkeit zeigen. Da die komplexen regulatorischen Prozesse einer Zelle mehr umfassen als nur Transkription, Translation und Aktivierung, ist es entscheidend, auch die Produkte des aktiven Proteoms – die Metaboliten und Bindungspartner einzelner Enzyme und Proteine – zu identifizieren. Dabei sind Methoden nötig, mit denen sich das chemisch komplexe Metabolom charakterisieren lässt. In den letzten Jahren gab es hierzu eine Reihe interessanter Ansätze, mit denen eine globale Untersuchung von Enzym-Metabolit-Paaren jetzt zum ersten Mal möglich ist.

1. Einleitung

Die Komplexität und Vielfalt des Lebens spiegelt sich im molekularen Bauplan einer jeden Zelle wider. Dabei werden wesentliche Funktionen von Proteinen ausgeführt, die in der Desoxyribonukleinsäure (DNA) durch die Abfolge der Nukleobasen in den Genen verankert sind. Die DNA wird in der Zelle zunächst in Boten-Ribonukleinsäure (mRNA) umgeschrieben (Transkription), die dann als Matrize für die Synthese von Proteinen (Translation) dient. Mit dem großen Erfolg von zahlreichen Genomsequenzierungsprojekten der vergangenen Jahre konnte eine Vielzahl von eukaryotischen und prokaryotischen Genomen aufgeklärt werden, darunter das menschliche und die der wichtigsten Krankheitserreger. Die große Herausforderung der nun anbrechenden postgenomischen Ära besteht darin, der Vielzahl von uncharakterisierten Genen eine Bedeutung zuzuordnen und ihre potenzielle Rolle in der Krankheitsentstehung zu verstehen.^[1] Für dieses ambitionierte Vorhaben ist eine Reihe moderner Methoden notwendig, die gerade in den letzten Jahren durch zahlreiche Fortschritte auf den Gebieten der Chemie, Biologie und Analytik erst möglich geworden sind. Da nicht die Gene, sondern die durch sie codierten Proteine die relevanten physiologischen Aufgaben in der Zelle verrichten, ist ihre fehlgeleitete Expression und Regulation die unmittelbare Ursache für die Entstehung von Krankheiten. Um zu verstehen, welche Rolle einzelne Gene oder Proteine in diesen Prozessen spielen, vergleicht man das Expressionsmuster, d.h. die Menge an mRNA (Genomics) oder an Proteinen (Proteomics), zwischen gesunden und kranken Zellen.^[2–6]

Da in vielen Fällen Proteine weiteren Regulationsprozessen unterliegen, korreliert die Menge an einem Protein mitunter nicht mit seiner Aktivität und der damit verbundenen physiologischen oder pathologischen Funktion (Abbil-

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	2741
2. Prinzipien des aktivitätsbasierten Protein-Profilierung (ABPP)	2743
3. Naturstoffe und privilegierte Strukturen	2745
4. Metabolit-Profilierung	2752
5. Zusammenfassung und Ausblick	2756

dung 1). Diese Regulation ist insbesondere bei Enzymen wichtig, deren degradative katalytische Prozesse, wie z.B. Proteolyse, eine Bedrohung für die Funktionsfähigkeit der Zelle darstellen. Die Aktivität von Proteasen und vielen anderen Enzymen wird daher durch eine Reihe post-transla-

tionaler Prozesse reguliert (Abbildung 1).^[7] In erkrankten Zellen hingegen können diese regulatorischen Prozesse außer Kontrolle geraten. Bei Krebs- und Alzheimer-Erkrankungen wird z.B. Proteasen eine entscheidende Rolle im Fortschreiten der Krankheit zugewiesen.^[8–11] Da die Methoden auf dem Gebiet der Proteomik nur die Menge, d.h. wie viel des jeweiligen Enzyms die Zelle herstellt, aber nicht die Aktivität eines Enzyms erfassen können, ist keine direkte Aussage über deren jeweilige Funktion möglich. Um diese Einschränkungen zu umgehen, wurde vor ungefähr 10 Jahren ein neues chemisch-proteomisches Verfahren maßgeblich von Cravatt^[12,13] und Bogoy^[7,14] unter dem Namen „aktivitätsbasiertes Protein-Profilierung“ (ABPP) etabliert. Wegbereitend für die heutige ABPP-Technik war die Forschung der Gruppen um Walker^[15] und Powers.^[16,17]

Ein besonders leistungsfähiges Anwendungsgebiet des ABPP besteht in der Aufklärung der zellulären Angriffsziele von Naturstoffen.^[18] Naturstoffe bieten ein großes Spektrum an biologischen Aktivitäten und sind die Grundlage einer Vielzahl zugelassener Arzneimittel. Neben der Isolierung, Strukturaufklärung und Totalsynthese ist in der modernen Naturstoffforschung vor allem die Kenntnis der molekularen Angriffsziele und der Wirkungsmechanismen von zentralem Interesse. Soll ein Naturstoff als Arzneimittel zugelassen werden, ist es wichtig, den genauen Wirkort und auch alle möglichen weiteren Ziele in der Zelle aufzuklären, die zu

[*] T. Böttcher, M. Pitscheider, Prof. Dr. S. A. Sieber
Center for Integrated Protein Science Munich CiPS
Department Chemie und Biochemie
Technische Universität München
Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
Fax: (+49) 89-289-13319
E-Mail: Stephan.sieber@tum.de

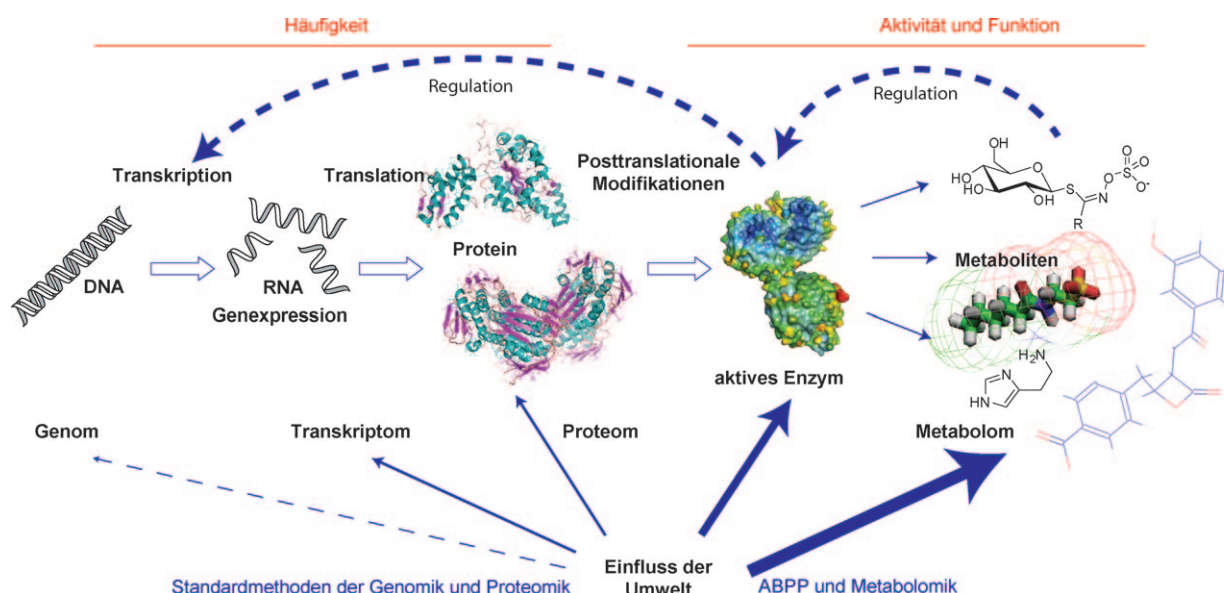


Abbildung 1. Zelluläre Wechselwirkungen bei der Regulation von Proteinen und Metaboliten. Die entscheidenden Informationen über Aktivität und Funktionen dieser Biomoleküle können mit den klassischen Methoden der Molekularbiologie nicht erfasst werden und bedürfen daher neuer Strategien wie ABPP und Metabolit-Profiling.

möglichen Nebenwirkungen führen können. Bisher verwendete Verfahren beruhten hauptsächlich auf Studien zur In-vitro-Wechselwirkung einzelner Naturstoffe mit einer Auswahl an isolierten Standardenzymen, z.B. Kinasen. Dieses Verfahren hat den Nachteil, dass zum einen nur ein Bruchteil der in der Zelle vorkommenden Proteine mit dem Wirkstoff zur Interaktion gebracht wird und zum anderen keine physiologischen Bedingungen (z.B. Regulation der Aktivität) wie in einer intakten Zelle nachgeahmt werden können. Da gerade in den letzten Jahren vermehrt Naturstoffe für ABPP zur Aufklärung ihrer Angriffsziele eingesetzt wurden, soll dieses interessante Forschungsthema einer der Schwerpunkte dieses Aufsatzes sein.

Um die Komplexität einer Zelle, ihre Regulation und auch die Entwicklung von Krankheiten vollständig verstehen zu können, spielen neben DNA, RNA und Proteinen auch kleine Moleküle, sogenannte Metaboliten, eine entscheidende Rolle. Das Metabolom (die Gesamtheit aller Metaboliten) ist das Produkt von Netzwerken enzymatischer Reaktionen in Zellen, was sich in einer hohen chemischen Diversität mit z.B.

Peptiden, Zuckern, Lipiden und Nukleosiden widerspiegelt. Somit entspricht das Metabolom einer Momentaufnahme der Produkte aus dem fein regulierten Netzwerk an Enzymaktivitäten eines Organismus, das sich aus der Wechselbeziehung mit seiner aktuellen Umwelt ergibt (Abbildung 1). Das Metabolom spielt eine essenzielle Rolle in vielen Signaltransduktionskaskaden. Daher ist eine genaue strukturelle Aufklärung aller Metaboliten sowie das Verständnis ihrer Funktion in zellulären Netzwerken eine fundamentale Aufgabe der gegenwärtigen Forschung. Im Unterschied zu RNA und Proteinen sind Metaboliten strukturell diverse Moleküle, die keine direkte Verknüpfung mit dem genetischen Code aufweisen und meist nicht aus einer definierten Auswahl an monomeren Bausteinen aufgebaut sind. Daher ist die Entwicklung einer universellen Methode zur Charakterisierung des Metaboloms – im Gegensatz zum Genom und Proteom – erschwert. Die Entwicklung neuer Methoden auf diesem Gebiet erlaubt es jetzt, die metabolischen Substrate einzelner Enzyme zu bestimmen und damit eine genauere Kenntnis über ihre Funktion zu erhalten.^[19] In den letzten Jahren



Thomas Böttcher studierte Chemie und Biochemie an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) in München. Er führte seine Bachelorarbeit an der Ruhr-Universität Bochum bei Prof. G. von Kiedrowski durch und erhielt 2006 seinen B.Sc. an der LMU. Im gleichen Jahr schloss er sich der Gruppe von Dr. S. A. Sieber an und begann seine Promotion mit einem Stipendium der Studienstiftung des deutschen Volkes. Seine Forschung umfasst die Entwicklung naturstoff-basierter Sonden und deren Anwendung als ClpP-Inhibitoren. Zusammen mit S. A.

Sieber wurde er 2008 mit dem Innovationspreis der BioRegionen in Deutschland ausgezeichnet.



Maximilian Pitscheider, geboren 1983 in München, erhielt 2008 seinen M.Sc. in Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), wo er unter der Anleitung von Dr. S. A. Sieber forschte. Gegenwärtig arbeitet er in der gleichen Gruppe an seiner Dissertation, wobei er sich mit der Entwicklung von Michael-Akzeptor-basierten Sonden und der Untersuchung von Naturstoffen für den Einsatz im aktivitätsbasierten Protein-Profiling befasst.

konnte so eine Reihe wichtiger Entdeckungen von Enzym-Metabolit-Paaren gemacht werden, die eine leistungsfähige Ergänzung zum ABPP für die Aufklärung und Funktion physiologischer und pathologischer Vorgänge an der Schnittstelle von Proteom und Metabolom darstellen.^[19,20] Dieses Thema bildet den zweiten Schwerpunkt dieses Aufsatzes.

2. Prinzipien des aktivitätsbasierten Protein-Profilings (ABPP)

2.1. Sondendesign und Proteommarkierung

ABPP ist im Laufe der Zeit zu einem komplementären proteomischen Ansatz avanciert, mit dem es möglich ist, die Aktivität, Funktion und Regulation von Enzymen *in vitro* und zusätzlich *in vivo* zu studieren. Der Schlüssel bei dieser Methode ist ein interdisziplinärer Ansatz bestehend aus Chemie, Biologie und Analytik, mit dessen Kombination kleine Moleküle, die eine hohe Affinität für die aktiven Zentren einzelner Enzymklassen aufweisen, mit einem Marker zur Visualisierung (Fluoreszenzfarbstoff) oder Anreicherung (Biotin) versehen werden. Diese kleinen Sonden binden nur in das freie aktive Zentrum des Zielenzyms, was eine einfache Visualisierung und Identifikation mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Fluoreszenzdetektion ermöglicht. Enzyme, deren aktives Zentrum blockiert und somit unzugänglich für kleine Moleküle ist, werden von den Sonden nicht gebunden und visualisiert, was einen wichtigen Unterschied zum klassischen Proteomikansatz darstellt. Mit ABPP wurde in den vergangenen Jahren eine Reihe von bahnbrechenden Entdeckungen bezüglich der Aktivität von pathogeneseassoziierten Enzymen, deren funktioneller Charakterisierung und der Entwicklung möglicher Inhibitoren erzielt. Grundsätzlich besteht eine Sonde aus drei Elementen (Abbildung 2A). Das erste Element bildet die reaktive Gruppe, die speziell auf die Reaktion mit einem bestimmten aktiven Zentrum zugeschnitten ist. So sind z.B. die von Cravatt et al. eingeführten Fluorophosphonat-Sonden (FP-Sonden) ein herausragendes Beispiel für einen selektiven Inhibitor, der ausschließlich Enzyme der Serinhydrolase-Familie angreift, einer Enzymfamilie, die über 1 % der in eukaryotischen Zellen exprimierten Proteine ausmacht.^[21–24]

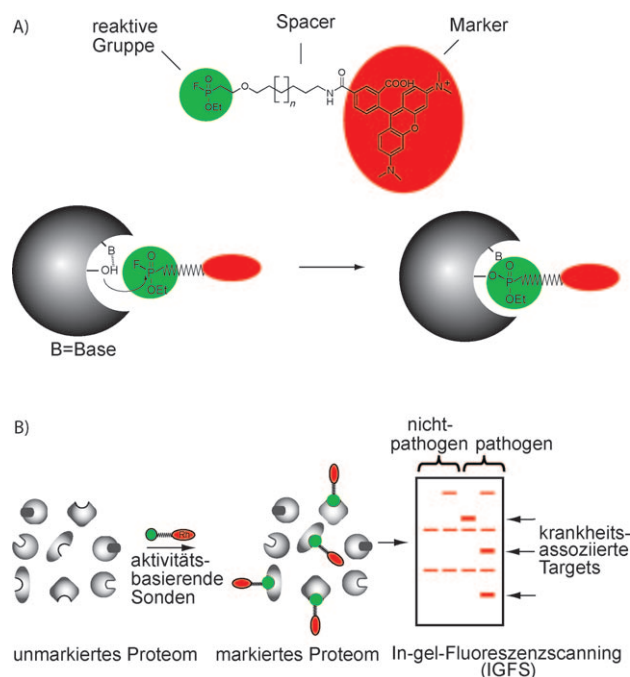


Abbildung 2. A) Aufbau einer Sonde und B) Verlauf eines klassischen ABPP-Experiments. Rh = Rhodamin.

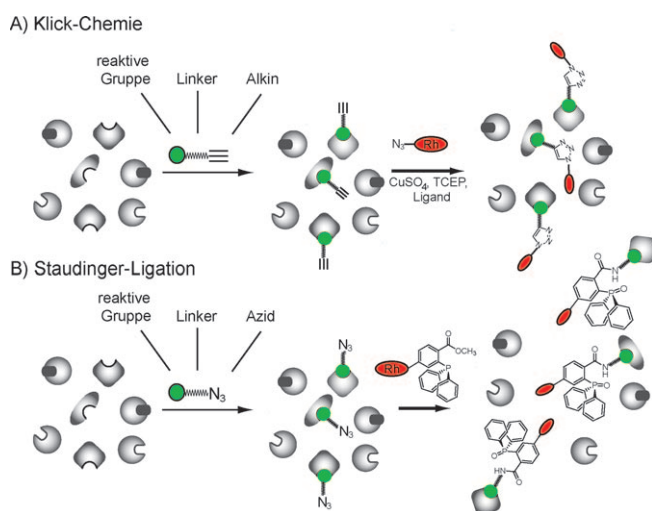
Gebunden an diese reaktive Gruppe ist ein Spacer (das zweite Element einer Sonde), üblicherweise eine kurze hydrophobe Alkyl- oder eine eher hydrophile Polyethylenglycolkette, die die reaktive Gruppe vom Marker (tag) trennt. Die Hydrophobie des Spacers sollte sich dabei an den Eigenschaften des Zielenzyms orientieren und kann durch spezielle Derivatisierung auf unterschiedliche Präferenzen der Substratbindetaschen zugeschnitten werden. Das dritte Element einer Sonde ist der Marker, der zur Anreicherung, Identifizierung und Visualisierung der Zielproteine dient. Ursprünglich eingesetzte radioaktive Marker wurden aufgrund ihrer umständlichen und gefährlichen Handhabung weitgehend durch Biotin- und Fluoreszenzmarker, wie etwa Tetramethylrhodamin (TAMRA), ersetzt. Zusätzlich erleichtern Biotinmarker durch die Bindung von Avidin die Markierung und ermöglichen eine massenspektrometrische Charakterisierung durch Proteinanreicherung über Avidin-Beads. In einem klassischen Markierungsexperiment werden ausgewählte Sonden mit Proteomen, beispielsweise aus zwei verschiedenen pathogenen Stadien, inkubiert. Während der Inkubation binden die fluoreszierenden Sonden direkt an die aktiven Zentren der gewünschten Zielproteine. Analytische Verfahren, wie etwa die SDS-Gelelektrophorese kombiniert mit bildgebenden Verfahren der Fluoreszenzaufnahme ermöglichen schließlich eine schnelle vergleichende Analyse von Zell- oder Gewebezuständen, die auf eine krankheitsassoziierte Enzymaktivität hindeuten können (Abbildung 2B). Diese pathogenitätsassoziierten Enzyme können darauf intensiver untersucht werden und zukünftig als Zielproteine in der Therapie oder Diagnostik dienen. In diversen Fällen konnten über die Wechselwirkung von Sonden mit ihren Zielenzymen wichtige Targets für Krebs-, Infektions- und Stoffwechselkrankheiten identifiziert werden (Abschnitt 3.2).



Stephan A. Sieber studierte Chemie an den Universitäten Marburg und Birmingham (Großbritannien). Nach der Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. M. Marahiel in Marburg wechselte er für einen einjährigen Forschungsaufenthalt an die Harvard Medical School in Boston (USA) in die Arbeitsgruppe von Prof. C. T. Walsh. Nach der Promotion im Jahre 2004 wechselte er an das Scripps Research Institute, La Jolla (USA), in die Arbeitsgruppe von Prof. B. Cravatt. Von Mitte 2006 an arbeitete er als unabhängiger Arbeitsgruppenleiter einer Emmy-Noether-Nachwuchsgruppe an der LMU München. Seit Oktober 2009 ist er Inhaber des Lehrstuhls für Organische Chemie II der TU München.

2.2. Bioorthogonale Chemie für In-vivo-Experimente

Die nötige Verwendung kovalent gebundener, sterisch anspruchsvoller Marker hatte den Anwendungsbereich des ursprünglichen ABPP eingeschränkt. Durch ihre geringe Zellpermeabilität konnte in der Regel nur in Zelllysaten gearbeitet werden. Zelllysate haben den Nachteil, dass durch die Zerstörung von Organellen und verschiedenen Zellkompartimenten häufig Aktivatoren oder Inhibitoren freigesetzt werden, die die Aktivität von Enzymen beeinflussen.^[25] Dieses Problem konnte durch die Einführung von bioorthogonalen Reaktionen, z.B. der Cu^I-katalysierten Huisgen-[3+2]-Azid-Alkin-Cycloaddition (Klickreaktion, CC, Schema 1 A) oder der Staudinger-Ligation (SL, Schema 1 B) zwi-



Schema 1. Unterschiedliche Prinzipien der Klickreaktion (A) und Staudinger-Ligation (B) in der ABPP. TCEP = Tris(2-carboxyethyl)phosphan.

schen Aziden und Methylester-modifizierten Triphenylphosphanen, gelöst werden.^[26–31] Diese orthogonalen Reaktionen zeigen eine geringe Reaktivität gegenüber anderen Biomolekülen wie der DNA oder unmarkierten Proteinen und lassen sich problemlos in wässrigen Medien durchführen. Somit ist es möglich, Proteine in lebenden Zellen über zellpermeable kleine Sonden zu markieren und nach anschließendem Zellaufschluss mit dem jeweiligen Marker zu versehen.^[32–34]

2.3. Analytische Methoden im ABPP

Über die Zeit haben sich mehrere Methoden zur Detektion und Identifikation markierter Proteine entwickelt, die als komplementär anzusehen sind. Eine der wohl ausgereiftesten und häufigst verwendeten analytischen Methoden für das ABPP ist das „In-Gel-Fluoreszenzscanning“ (IGFS). Hierbei wird das mit fluoreszierenden ABPP-Sonden markierte Proteom über SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt. Zur Identifizierung der Fluoreszenzbanden wird in der Regel eine Affinitätsanreicherung über Biotin–Avidin vorgeschaltet. Die Banden werden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten

und nach tryptischem Verdau über gekoppelte Flüssigchromatographie/Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert. In den vergangenen Jahren ist zusätzlich eine Reihe gelfreier Methoden entwickelt worden, um verschiedenen Ansprüchen wie z.B. Erhöhung der Empfindlichkeit oder simultane Bestimmung der Bindeposition einer Sonde in einem Enzym zu genügen.^[35–37] Unter anderem sind hier die „tandem orthogonal proteolysis“ (TOP)-Methode,^[36] Antikörper-basierende Methoden^[35,38] sowie zweidimensionale LC-MS/MS-Identifikationsverfahren (MudPIT)^[39] zu erwähnen.

2.4. Reaktive Gruppen und Spezifität von ABPP-Sonden

Eine Vielzahl reaktiver Gruppen wurden als Leitmotive für die Entwicklung von ABPP-Sonden eingesetzt, unter anderem Fluorophosphonate,^[21–23] Sulfonate,^[40] α -Chloracetamide,^[41,42] Michael-Akzeptoren^[43–45] sowie Epoxide, Vinylsulfone, Diazomethylketone, α -Halogenketone und Acyloxymethylketone.^[46–52] Sonden, die diese reaktiven Gruppen enthalten, binden kovalent in das aktive Zentrum von Enzymen und ermöglichen durch ihren Reaktionsmechanismus bereits eine Abstufung und Differenzierung von Enzymklassen (Abbildung 3). Während Fluorophosphonate hoch spe-

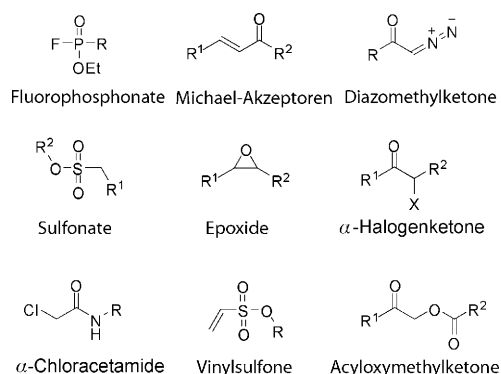


Abbildung 3. Beispiele reaktiver Gruppen in ABPP-Sonden.

zifisch mit Enzymen der Serinhydrolasefamilie reagieren, zeigen Epoxide, Vinylsulfone, Diazomethylketone, α -Halogenketone und Acyloxymethylketone eine deutliche Präferenz für Cysteinproteasen. Sulfonate, α -Chloracetamide und Michael-Akzeptoren reagieren weitgehend ungerichtet und können je nach Struktur und Seitengruppen der Sonde mit einer Vielzahl verschiedener Enzymklassen mit aktiven Zentren geeigneter Nukleophilie reagieren. Hierbei ist es auch möglich, durch die Dekoration die Reaktivität entsprechend einzuschränken und auf die Ansprüche bestimmter Zielenzymklassen zu optimieren. So konnten z.B. reaktive Michael-Akzeptoren wie Zimtaldehyde^[44,45] oder Arylvinyllsulfonate und Arylsulfone^[53] erfolgreich für die Markierung von Phosphatasen eingesetzt werden.

Sonden mit einem Hydroxamat-Motiv gehen über den Chelateffekt zu zweiwertigen Zinkionen im aktiven Zentrum von Metalloproteasen eine hoch spezifische Wechselwirkung ein. Obwohl diese reversibel erfolgt, lassen sich Hydroxamate

als ABPP-Sonden verwenden. Über ein photoreaktives Vernetzungsreagens (crosslinker) wie Benzophenon oder Diazirine können die entsprechenden Sonden nach UV-Bestrahlung eine kovalente Bindung zu ihren Zielenzymen aufbauen und damit eine beständige Markierung dieser Proteine erreichen.^[54,55] Mit diesen Sonden konnte die Familie der Metalloproteasen, die an vielen Krebserkrankungen beteiligt sind, untersucht werden.^[55,56]

Diese Beispiele zeigen die große Bandbreite möglicher reaktiver Gruppen und ihren Einsatz zur zielgerichteten Markierung von Enzymen. Viele Naturstoffe weisen bereits eine dieser reaktiven Gruppen wie z.B. Epoxide oder Michael-Akzeptoren auf. Für ihre spezifische biologische Wirkung ist in der Regel ihre fein abgestimmte Dekoration maßgeblich. Doch auch reversibel bindende Naturstoffe können unter präparativer Einführung einer der zuvor beschriebenen reaktiven Gruppen oder eines photoreaktiven Vernetzungsreagens in ABPP-Sonden verwandelt werden, die es anschließend ermöglichen, die Zielproteine eines Wirkstoffs oder deren Lokalisierung im komplexen Proteom eines Organismus aufzuspüren. Für eine detaillierte Übersicht der ABPP-Sonden, die nicht auf Naturstoffen beruhen und in diesem Aufsatz daher nicht ausführlich besprochen werden können, sei auf Artikel in der Literatur verwiesen.^[13,57–60]

3. Naturstoffe und privilegierte Strukturen

Obwohl Naturstoffe mit etwa 60% den Großteil aller zugelassenen pharmakologisch wirksamen Substanzen bilden, sind viele ihre Zielorte und Wirkmechanismen bislang unbekannt.^[61–63] Naturstoffe mit biologischer Aktivität weisen in der Regel eine fein abgestimmte Reaktivität gegenüber ihren natürlichen molekularen Zielorten auf. Sie binden dabei hoch spezifisch und selektiv an einige ausgewählte Zielstrukturen, wie Proteine, Nukleinsäuren oder deren Komplexe. Die Wechselwirkung von Naturstoffen mit ihren Zielproteinen reichen von relativ schwachen Protein-Ligand-Wechselwirkungen bis zu sehr stabilen kovalenten Modifikationen. In einigen Naturstoffen liegen hoch reaktive Gruppen vor, die auf den ersten Blick kaum kompatibel mit den vielen möglichen Reaktionspartnern eines lebenden Organismus erscheinen. Durch ihre jeweilige Dekoration werden diese Stoffe jedoch in ihrer Reaktivität entsprechend angepasst, sodass sie meist eine hoch spezifische Wirkung durch Inhibition einiger weniger Enzyme im Zielorganismus ausüben können.^[64]

Da Naturstoffe über Jahrmillionen der Evolution auf ihre jeweilige Wirkung optimiert wurden, stellen ihre reaktiven oder hoch affinen Zentralelemente (z.B. β -Lactonring, Penam-Grundgerüst) privilegierte Strukturen dar, die für eine Anwendung als molekulare Werkzeuge oder pharmakologische Wirkstoffe besondere Relevanz aufweisen.^[18,61–63] Die fein abgestimmte Reaktivität dieser Stoffe bildet eine vielversprechende Basis, um diese systematisch durch die Synthese von Derivaten zu untersuchen und zu modulieren. Dies ermöglicht es, bedarfsgerechte Veränderungen ihrer Selektivität vorzunehmen oder gänzlich neue Zielproteine zu

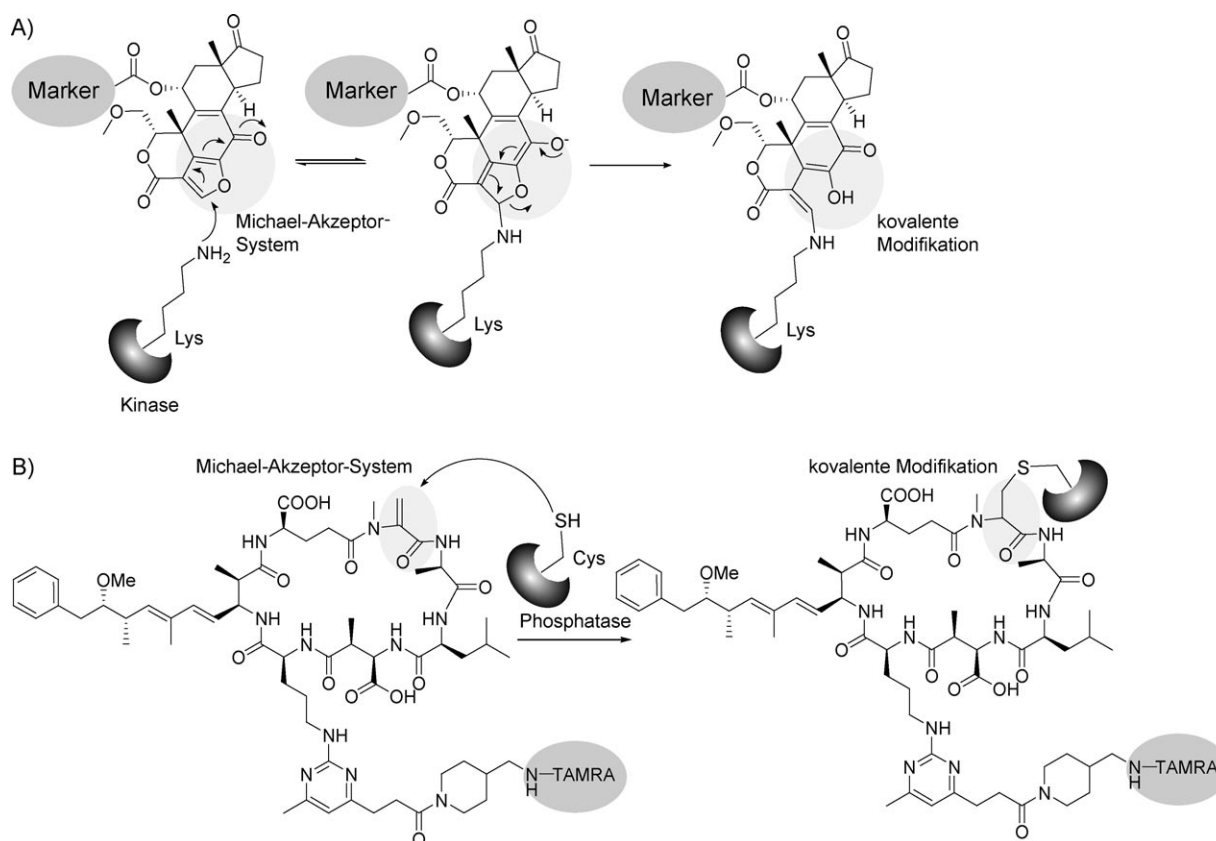
erschließen. In diesem Abschnitt sollen ABPP-Sonden, die auf Naturstoffen und deren Derivaten basieren oder unter Ausnutzung ihrer privilegierten Strukturen entwickelt wurden, vorgestellt und ihre biologischen Anwendungsmöglichkeiten erläutert werden. Einige der im nachfolgenden beschriebenen Strukturen weisen eine spezifische Affinität für bestimmte Enzyme oder Enzymklassen auf, andere hingegen markieren Zielstrukturen über verschiedene Enzymklassen hinweg. So vielfältig wie die Bindungspräferenzen dieser Naturstoffe sind, so unterschiedlich sind auch ihre Anwendungsmöglichkeiten, die von der Leitstruktur zum Wirkstoffdesign über die Identifikation der Zielstrukturen bekannter Stoffe bis zur Verwendung als molekulare Werkzeuge reichen.

3.1. ABPP-Sonden basierend auf Naturstoffen und privilegierten Strukturen

Um einen Naturstoff oder eine Verbindung mit privilegiertem Strukturtyp in eine ABPP-Sonde zu überführen, müssen zwei Voraussetzungen gewährleistet sein. Es muss entweder bereits eine intrinsische Reaktivität des Naturstoffs vorliegen, die eine kovalente Verknüpfung der Sonde mit den Zielproteinen ermöglicht, oder es muss durch ein Vernetzungsreagens diese Reaktivität künstlich eingeführt werden (Abschnitte 2.1 und 2.4). Die zweite wesentliche Voraussetzung ist eine Reportergruppe (z.B. Fluoreszenzmarker, siehe Abschnitt 2.1) zur Detektion.

3.1.1. Wortmannin

Wortmannin ist ein Naturstoff aus der Gruppe der Furanosteroide, der als Metabolit von dem Schimmelpilz *Penicillium wortmannii* gebildet wird. Zahlreiche Studien belegten für Wortmannin eine Wirkung als potenter Inhibitor von Enzymen der Phosphoinositid-3-kinase (PI-3K)-Superfamilie^[65,66] und bei höheren Konzentrationen auch von mit PI-3K verwandten Enzymen wie mTOR und DNA-PK.^[67] Die Inhibition dieser Enzyme erfolgt über die kovalente Modifikation des konservierten katalytisch aktiven Lysinrests in deren aktivem Zentrum durch das elektrophile Michael-Akzeptor-System von Wortmannin. Da die Regulierung der Aktivität von Enzymen der PI-3K-Familie bei diversen Arten von Krebserkrankungen versagt und diese konstitutiv aktiv sind, wurde die Antitumorwirkung von Wortmannin und seinen Derivaten primär auf die Inhibition von PI-3-Kinasen zurückgeführt.^[68] Das Potenzial von Wortmannin als pharmakologische Leitstruktur und zur Untersuchung zellulärer Regulationsvorgänge inspirierte die Entwicklung von Wortmannin-abgeleiteten ABPP-Sonden (Schema 2 A). Über eine Veresterung mit einer deacetylierten Alkoholseitenkette an C11 des Wortmannin-Grundgerüsts wurden Fluoreszenzmarker (BODIPY und Rhodamin) angebracht und so die Bindungspartner von Wortmannin sowie dessen Derivaten in Lysaten und lebenden Zellen untersucht. Hierbei konnten Yee et al. die hohe Reaktivität von Wortmannin gegenüber PI-3-Kinasen und mit ihren verwandten Enzymen bestätigen.^[69] Daneben wurden von Liu et al. über einen ähnlichen



Schema 2. Naturstoffbasierende Sonden mit einem Michael-Akzeptor-System als reaktiver Gruppe. A) Mechanismus der Markierung von Kinasen durch eine Wortmannin-Sonde und B) von Phosphatasen durch eine Microcystin-Sonde.

aktivitätsbasierende Ansatz Polo-like-Kinase 1 (Plk1) und Polo-like-Kinase 3 (Plk3) als zelluläre Angriffsziele von Wortmannin identifiziert.^[70,71] Auch hier erfolgte die kovalente Bindung über einen Angriff eines konservierten Lysinrests am elektrophilen Gerüst von Wortmannin, in diesem Fall jedoch in der ATP-Bindetasche der Polo-like-Kinasen.^[71] Da in Krebszellen auch eine fehlerhafte Überaktivierung von Polo-like-Kinasen vorliegt, ist es wahrscheinlich, dass Wortmannin seine pharmakologische Wirkung neben PI-3-Kinasen teilweise auch über Polo-like-Kinasen ausübt. Diese Resultate verdeutlichen den Wert von ABPP für die Untersuchung von molekularen Angriffszielen und in pharmakologischer Hinsicht unerwünschten Nebenzielen potenter Naturstoffe im komplexen Proteom von Lebewesen.

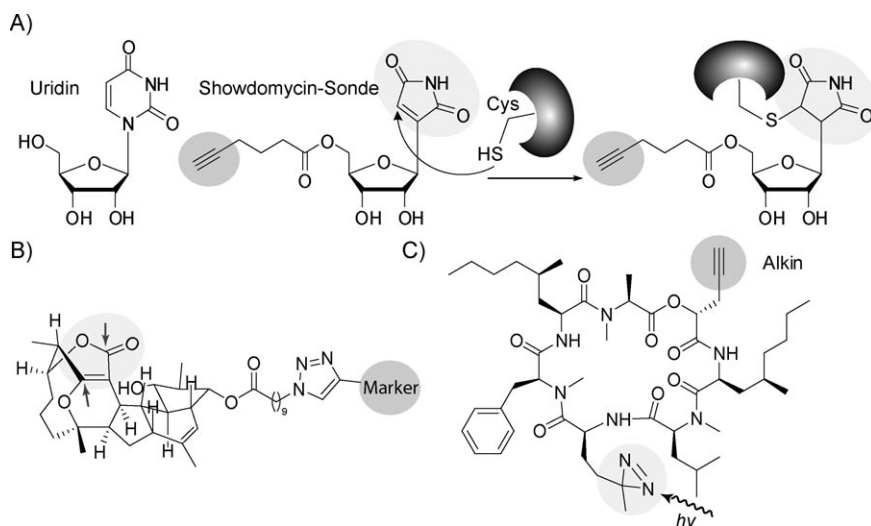
3.1.2. Microcystine

Ähnlich wie Wortmannin weisen auch Microcystine ein reaktives Michael-Akzeptor-System auf. Microcystine sind nicht-ribosomal synthetisierte cyclische Heptapeptide, die als Cyanotoxine von Cyanobakterien produziert werden und bei Algenblüten durch ihre Toxizität zur Gefährdung von Menschen und Tieren führen. Microcystine sind als Inhibitoren der Serin/Threonin-Proteinphosphatasefamilien PP1 und PP2A bekannt und zeigen Potenzial als mögliche Krebstherapeutika.^[72] Über einen konservierten Cysteinrest im aktiven Zentrum der Enzyme kann ein nukleophiler Angriff an das Michael-Akzeptor-System von Microcystin erfolgen, was

zu einer kovalenten Bindung des Inhibitors führt (Schema 2B).^[73] Durch Kondensation eines 1,3-Diketons mit einem Argininrest in einem der Microcysteine (Microcystin-LR), der sich für die Affinität gegenüber Phosphatasen als nicht entscheidend erwies, konnten Shreder et al. Rhodamin als Fluoreszenzmarker einführen und somit eine Microcystin-Sonde für ABPP etablieren.^[74] In Zelllysaten von Jurkat-Zellen (T-Lymphozyten) konnte damit die spezifische Bindung von Microcystin-LR an verschiedene Proteinphosphatasen nachgewiesen werden. Die Methode wurde darüber hinaus erfolgreich angewendet, um die Veränderung der Aktivität von Phosphatasen in Zellen zu untersuchen, die mit dem Phosphataseinhibitor Calyculin A vorbehandelt waren.

3.1.3. Showdomycin

Bei dem Nukleosidanalogen Showdomycin handelt es sich um einen antibiotisch aktiven Naturstoff, der aus dem Actinobakterium *Streptomyces showdoensis* isoliert wurde.^[75] Die strukturelle Verwandtschaft von Showdomycin zu Uridin und Pseudouridin macht es zu einem potenziellen Wechselwirkungspartner mit entsprechenden Uridin- oder Pseudouridin-bindenden Enzymen.^[76,77] Statt des Pyrimidins in 1'-Position der Ribose weist Showdomycin eine reaktive Maleimideinheit auf. An diese können nukleophile Thiole, wie sie Cysteine im aktiven Zentrum oder den Substratbindetaschen einiger Enzyme darstellen, addiert werden (Schema 3 A). Böttcher und Sieber entwickelten eine Showdomy-



Schema 3. A) Die Showdomycin-Sonde als Uridinnukleosidanalogen reagiert durch Addition von Mercaptogruppen mit Proteinen. B) Sonde auf Basis von FR182877 mit zwei reaktiven Gruppen (Pfeile) und C) Sonde auf Basis von HUN-7293 mit einem photoaktivierbaren Diazirin zur kovalenten Verknüpfung mit seinen Zielproteinen und einem Alkin-Marker für Klickreaktionen.

cin-Sonde unter Modifikation der freien primären 5'-OH-Gruppe durch einen Hexinoylrest.^[78] Die Anwendung dieser Sonde auf lebende Gram-positive und Gram-negative pathogene Bakterien und anschließende Identifikation der molekularen Angriffsziele ergab eine Reihe von essenziellen Enzymen aus den beiden Klassen der Oxidoreduktasen und Transferasen, deren kumulative Ausschaltung den antibiotischen Effekt von Showdomycin erklären dürfte.^[78] Besonders interessante Zielstrukturen waren die für die Zellwandbiosynthese entscheidenden Enzyme MurA1 und MurA2. Weiterhin konnten einige wesentliche Unterschiede in der Aktivität von virulenzassoziierten Enzymen zwischen verschiedenen pathogenen und nicht-pathogenen Stämmen aufgedeckt werden, was den Wert dieser Sonde als Werkzeug in der Erforschung der Pathogenesevorgänge verdeutlicht.

3.1.4. FR182877

Bei Cyclostreptin (–)-FR182877 handelt es sich um einen komplexen Naturstoff mit einer Reihe interessanter pharmakologischer Wirksamkeiten, unter anderem gegen Krebszellen. Die Struktur dieses Naturstoffs bietet für Reaktionen mit seinen Angriffszielen im Proteom zwei elektrophile Gruppen, einen Michael-Akzeptor mit gespanntem Olefin am Brückenkopfatom sowie eine Lactoneinheit. Die Wirkung von Cyclostreptin in der Unterbrechung des Zellzyklus wurde auf seine Interaktion mit den Mikrotubuli zurückgeführt, den Proteinfilamenten, die in der Zellteilung die korrekte Aufteilung der Chromosomen bewirken.^[79,80] Um weitere mögliche Angriffsziele zu identifizieren, synthetisierten Adam et al. (–)-FR182877 und modifizierten dieses über eine freie Alkoholgruppe mit Rhodamin sowie zur Anreicherung von Bindungspartnern mit einem Rhodamin/Biotin-Linker (Schema 3B).^[81] Hierbei wurde in den Proteomen aus verschiedenen Mausgeweben Carboxylesterase-1 als Hauptangriffsziel von (–)-FR182877 identifiziert. Dieses war be-

reits bei einer 100fach niedrigeren Konzentration vollständig gebunden, als für die Wirkung auf Mikrotubuli berichtet wurde. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass nur das natürliche Cyclostreptin (–)-FR182877, nicht aber (+)-FR182877 Carboxylesterase-1 inhibiert. Da Carboxylesterasen in diversen Krebsarten fehlerhaft reguliert sind, sind Cyclostreptin und von ihm abgeleitete Sonden zugleich interessante pharmakologische Leitstrukturen und diagnostische Werkzeuge. Durch ABPP konnte somit ein weiterer Bindungspartner eines Naturstoffs identifiziert werden, der möglicherweise einen wesentlichen Beitrag an dessen pharmakologischem Wirkungsspektrum haben könnte.

3.1.5. HUN-7293

HUN-7293 ist ein fungales Cyclopeptid, das die Expression von vaskulärem Zelladhäsionsmolekül (VCAM) inhibiert. Im Unterschied zu den zuvor beschriebenen Inhibitoren bindet HUN-7293 jedoch reversibel, sodass keine kovalente Bindung zwischen Inhibitor und Zielproteinen vorliegt, was deren Identifikation erschwert. MacKinnon et al. synthetisierten daher eine Photoaffinitätssonde mit Photo-Leucin im Grundgerüst des Cyclopeptids als Ersatz für Leucin, welches über seine photoreaktive Diazirinegruppe nach UV-Bestrahlung eine kovalente Verknüpfung mit den Bindungspartnern von HUN-7293 eingehen kann (Schema 3C).^[82] Zur Visualisierung wurde ein Propargylrest eingeführt, der nach UV-induzierter Reaktion der Sonde mit einer Proteomfraktion des endoplasmatischen Retikulums mit Rhodaminazid über die Klickreaktion verknüpft wurde. Als Bindungspartner des Inhibitors wurde Sec61 α identifiziert, das ist der strukturelle Kern des Sec61-Translokationskanals, der im endoplasmatischen Retikulum am Beginn des Sekretionsweges aller Proteine steht. Durch ABPP konnten hierbei ein direkter Nachweis des molekularen Angriffsziels von HUN-7293 und eine Erklärung für dessen Wirkungsweise erzielt werden.

3.1.6. β -Lactone

Eine weitere Art kleiner, moderat elektrophiler Heterocyclen, die als ABPP-Sonden eingesetzt wurden, sind die β -Lactone. Ihr elektrophiles Ringsystem kann durch entsprechend nukleophile Gruppen im aktiven Zentrum von Enzymen in Position C2 oder C4 angegriffen werden und dabei unter Ringöffnung eine kovalente Bindung mit ihren Zielenzymen eingehen. Obwohl einige β -Lactone wie Obafluorin^[83] oder Hymeglusin^[84] mit antibiotischer Aktivität und Lipstatin^[85] bzw. Tetrahydrolipstatin^[86] als Inhibitoren der pankreatischen Lipase mit medizinischer Anwendung beschrieben sind, war lange Zeit über das natürliche Spektrum an Zielenzymen von β -Lactonen in bakteriellen und eukary-

otischen Proteomen relativ wenig bekannt. Um diese Frage zu beantworten, synthetisierten Böttcher und Sieber eine kleine biomimetische Bibliothek aktivitätsbasierender *trans*- β -Lacton-Sonden mit diversen Seitengruppen in C3-Position und einem Alkin in C4-Position, welches nach Markierung der Sonden im Proteom über die Klickreaktion mit einer fluoreszierenden Reportergruppe modifiziert werden konnte.^[87] In Anlehnung an natürlich vorkommende β -Lactone wurden aromatische und aliphatische Seitengruppen mit unterschiedlicher Länge und Substitutionsgrad eingesetzt (Abbildung 4 A).

In-vitro-Versuche mit bakteriellen Proteomen ergaben eine selektive Markierung von über 20 Enzymen aus vier verschiedenen Enzymklassen mit unterschiedlichen Präferenzen je nach Substitution der Sonden. Auch wenn die natürlichen Substrate dieser Enzyme und die von ihnen katalysierten Reaktionen sehr unterschiedlich sind, so ist allen markierten Enzymen ein nukleophiler Cystein- (Cys) oder Serinrest (Ser) im aktiven Zentrum gemeinsam. Einige der identifizierten Ziele, darunter resistenz- und virulenzassoziierte Enzyme wie die bakterielle caseinolytische Proteinprotease (ClpP), sind von besonderem Interesse und werden unter den biologischen Anwendungen (Abschnitt 3.2.1.2) näher beschrieben.

Aktivitätsbasierende Sonden mit einem Peptidgerüst, einem β -Lactonring als reaktiver Einheit und Biotin als Reportergruppe wurden zur Untersuchung des Proteoms von *Arabidopsis thaliana* verwendet. Hierbei wurde in vitro eine Peptidtransglutaminase (RD21) identifiziert, die für die N-termi-

nale Markierung von PsbP, einem Protein des Photosystems II, zuständig ist.^[88]

In einer weiteren Studie wurde Clasto-Lactacystin (Omu-ralid), ein β -Lacton, das als aktiver Metabolit des potenten Proteasominhibitors Lactacystin in situ gebildet wird,^[89] als [³H]-Sonde eingesetzt, um die α -Kette mit ihrem katalytisch aktiven Threoninrest als Angriffsziel dieses Naturstoffs zu identifizieren.^[90]

3.1.7. β -Lactame

Neben den β -Lactonen sind auch die strukturell eng verwandten β -Lactame privilegierte Strukturen mit einer reaktiven elektrophilen Einheit. Sowohl in der Pharmakologie als auch in der angewandten Medizin stellen sie seit der Entdeckung von Penicillin durch Alexander Fleming eine der wichtigsten antibiotisch aktiven Naturstoffgruppen dar. Ihre antibakterielle Wirkung beruht auf der Inhibition von Penicillin bindenden Proteinen (PBPs), die als essenzieller Bestandteil der Zellwandbiosynthese die Verknüpfung des Zellwandbausteins Peptidoglycan katalysieren. Verschiedene PBPs weisen hierbei eine unterschiedliche Affinität für bestimmte β -Lactame auf und bilden einen wesentlichen Ansatzpunkt für die evolutionäre Anpassung der Bakterien auf den enormen Selektionsdruck durch Antibiotikabehandlungen.^[91] Die Erforschung von PBPs ist daher von zentralem Interesse, um die Vorgänge der Resistenzbildung verstehen und neue wirksame β -Lactam-Antibiotika entwickeln zu können. Daher wurden bereits früh β -Lactam-Sonden mit

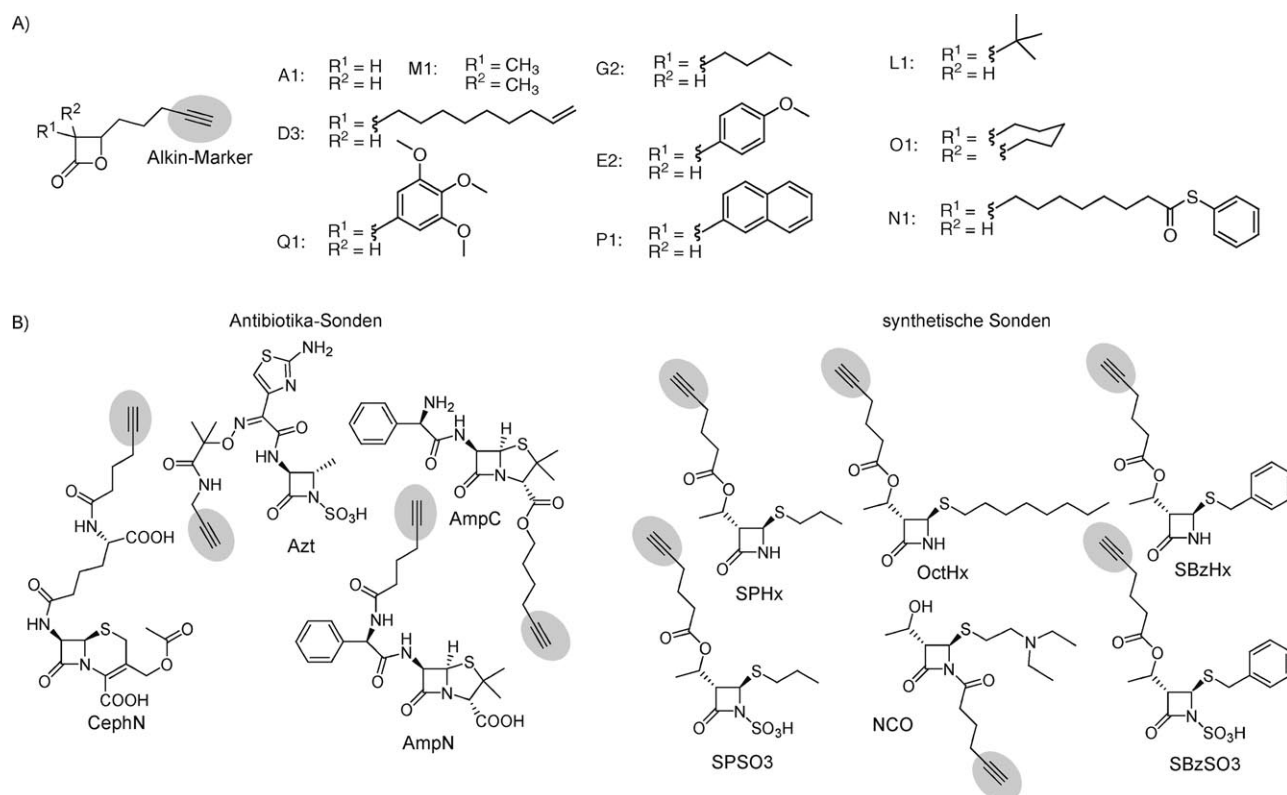
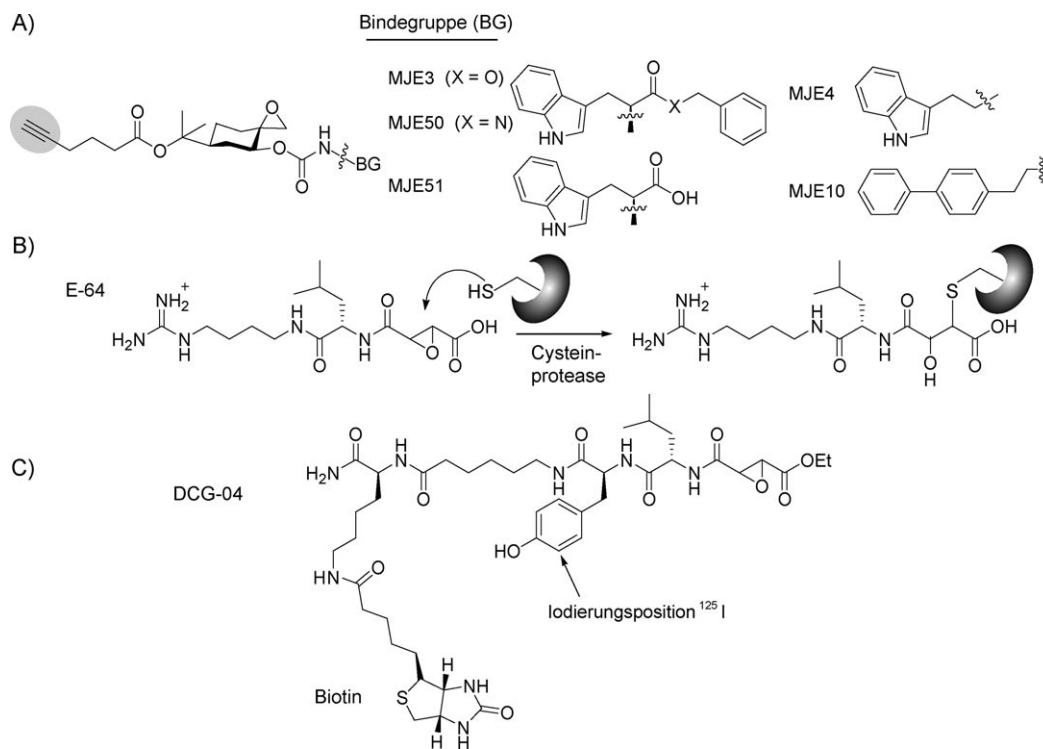


Abbildung 4. A) Biomimetische Bibliothek von β -Lacton-Sonden. B) Sonden als Derivate der bekannten Antibiotika Ampicillin (AmpC und AmpN), Cephalosporin (CephN) und Aztreonam (Azt) sowie einige davon abgeleitete synthetische Sonden.

radioaktiven oder fluoreszierenden Reportergruppen eingesetzt, um aktive PBPs in bakteriellen Membranfraktionen visualisieren zu können.^[92,93] Wesentliche Nachteile dieser Methoden sind im Fall der radioaktiven Reportergruppen der zeitliche und technische Aufwand und im anderen Fall die Größe des angehängten Fluoreszenzmarkers, der die spezifische Bindung im aktiven Zentrum und die Zellpermeabilität der Sonden für In-situ-Studien negativ beeinflusst. Staub und Sieber verwendeten daher β -Lactam-Sonden mit einem kurzen Alkinrest, um PBPs und bislang unbekannte Zielenzyme in situ in lebenden Bakterienzellen detektieren und identifizieren zu können.^[94] Mit einer Sondenbibliothek, von natürlichen β -Lactamen konventioneller Antibiotika abgeleitet war, konnten diverse PBPs mit unterschiedlichen Präferenzen der Sonden markiert werden, während synthetische β -Lactam-Sonden zusätzliche Zielstrukturen, darunter auch eine resistenzassoziierte β -Lactamase abdeckten (Abbildung 4B). In einer Folgestudie konnten wesentliche Unterschiede in den Enzymaktivitäten des Pathogens *Staphylococcus aureus* und einem multiresistenten Stamm (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*, MRSA) aufgezeigt werden.^[95] Hierbei wurden neben bereits bekannten resistenzassoziierten Enzymen auch bislang unbekannte Proteine als Bindungspartner identifiziert, die daraufhin als Enzyme mit β -Lactamase-Aktivität charakterisiert werden konnten. Dies verdeutlicht den Wert von aktivitätsbasierenden Sonden als Werkzeuge zu Identifikation und Charakterisierung neuer Zielenzyme, was besonders im Hinblick auf pathogene Bakterien zur Entwicklung neuer Strategien bei der Suche nach Leitstrukturen für neue Medikamente von Nutzen sein könnte.

3.1.8. Spiroepoxide

Einige Naturstoffe weisen eine elektrophile Spiroepoxid-Einheit als reaktive Gruppe in ihrer Molekülstruktur auf. Hierzu gehören unter anderem die Antibiotika und antitumoraktiven Substanzen Fumagillin,^[96] Luminacin D^[97] und FR901464.^[98] Für Fumagillin konnte bereits durch eine biotinylierte Sonde die Methioninaminopeptidase 2 (MetAP-2) als Angriffsziel im Proteom von eukaryotischen Zellen identifiziert werden.^[99] Auf Basis dieser Naturstoffe stellten Evans et al. 1-Oxaspiro[2.5]octan-Sonden mit einem Alkin-Linker her, die zur Visualisierung und Anreicherung der Zielenzyme durch bioorthogonale Klickreaktionen mit Rhodamin und Rhodamin/Biotin-Reportergruppen modifiziert werden können.^[100] Diese Grundstruktur der Sonden wurde durch zusätzliche variable Seitengruppen modifiziert, die verschiedene sterische und elektronische Präferenzen der Substratbindetaschen ihrer Zielenzyme abdecken sollten (Schema 4A). Bei einem pharmakologischen Aktivitätstest der Sondenbibliothek gegen eine Brustkrebszelllinie wurde eine Sonde (MJE3) gefunden, die eine besonders herausragende Effektivität aufwies. Um das molekulare Angriffsziel dieser Sonde zu ermitteln, wurden lebende Zellen in situ mit der Sondenbibliothek behandelt. Nach Zellaufschluss und Klickreaktion wurden die markierten Ziele der Sonden auf einem Fluoreszenzgel (SDS-PAGE) visualisiert. Es zeigte sich, dass nur bei der Sonde MJE3 die Bande eines 26-kDa-Proteins vorhanden war, während diese bei den anderen strukturverwandten Sonden fehlte und alle anderen von MJE3 markierten Banden im Proteom auch von anderen Verbindungen der Sondenbibliothek abgedeckt wurden. Die



Schema 4. Sonden mit Epoxygruppen als reaktivem Motiv: A) naturstoffbasierende Spiroepoxidsonden mit diversen Substituenten; B) Mechanismus der Inhibition von Cysteinproteasen durch E-64; C) eine von E-64 abgeleitete Sonde mit Biotin und radioaktivem ^{125}I -Marker.

massenspektrometrische Identifikation der Bande ergab das Enzym Phosphoglyceratmutase 1 (PGAM1), das jedoch nur in lebenden Zellen markiert werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass weitere Faktoren in der lebenden Zelle an der Bindung der Spiroepoxidsonde beteiligt sind, die im In-vitro-Proteom nicht zur Verfügung stehen, was den Wert von In-situ-Studien bei ABPP verdeutlicht. Vorausgehende Studien ergaben bereits Hinweise auf eine mögliche Rolle von PGAM1 in der Proliferation von Krebszellen.^[101] Durch ABPP konnte in diesem Fall ein neuer pharmakologisch aktiver Inhibitor zusammen mit seinem Angriffsziel im Proteom identifiziert werden.

3.1.9. Epoxide

Neben den Spiroepoxiden sind auch nicht-anellierte Epoxide als reaktive Einheiten von Naturstoffen bekannt. Diese Elektrophile reagieren bevorzugt mit nucleophilen Mercaptogruppen im aktiven Zentrum von Cysteinproteasen (Schema 4B). Zu dieser Klasse von Naturstoffen zählt auch das Epoxysuccinylpeptid E-64 (L-trans-Epoxysuccinyl-L-leucyl-amido(4-guanidino)butan), das aus dem Schimmelpilz *Aspergillus japonicus* isoliert wurde.^[102] Dieses ist als kovalenter Inhibitor diverser Cysteinproteasen, unter anderem von Cathepsinen B, H und L bekannt, die eine entscheidende Rolle im programmierten Zelltod (Apoptose) und bei der Proliferation und Invasion von Krebszellen spielen.^[46,103] Andere Proteasenfamilien wie Serinproteasen oder Metalloproteasen hingegen werden durch E-64 nicht inhibiert. Greenbaum et al. etablierten ABPP-Sonden auf Basis von E-64 mit unterschiedlichen Reportergruppen wie dem Radionuklid ¹²⁵I, Biotin und dem Fluorophor BODIPY (Schema 4C).^[104,105] Diese Sonden erwiesen sich als wertvolle analytische Plattform zur funktionellen Analyse von Cathepsinen.

Epoxomycin, ein weiteres Epoxypeptid mit anti-inflammatorischer und Antitumor-Aktivität, wurde mit einem Biotinlinker als Sonde modifiziert und zur Untersuchung der Bindungspartner in Proteomen von Mauszelllinien herangezogen. Hierbei konnten vier katalytisch aktive Untereinheiten des Proteasoms als molekulare Zielstrukturen in lebenden Zellen identifiziert werden.^[106,107]

Auch Trapoxin ist ein Naturstoffepoxid, bei dem es sich im Gegensatz zu den linearen Epoxypeptiden wie Epoxomycin und E-64 jedoch um ein Cyclotetrapeptid handelt. Es wurde aus dem Pilz *Helicoma ambiens* isoliert und als Antitumor-substanz und effizienter Inhibitor der Histondeacetylierung beschrieben.^[108] Durch Kombination von isotope markierten [³H]- und [¹²⁵I]Trapoxin-Sonden sowie eines an einer Festphase immobilisierten Trapoxinderivats konnte erstmals eine Histondeacetylase als Angriffsziel von Trapoxin detektiert und charakterisiert werden.^[109]

3.2. Biologische Anwendungen

Naturstoffe weisen ein breites Spektrum biologischer Effekte und pharmakologischer Anwendungsmöglichkeiten auf. In der Form von ABPP-Sonden stellen sie ein enormes

Potential zum einen als molekularbiologische Werkzeuge, zum anderen aber auch als Instrumente und Leitstrukturen der Wirkstoffforschung dar. Die abgestufte Reaktivität von Naturstoffen bietet eine Möglichkeit der selektiven Markierung von aktiven Enzymen in komplexen Proteomen. Dadurch lassen sich pathogeneseassoziierte Enzymaktivitäten in Proteomlysaten und lebenden Zellen erforschen oder diagnostische Profile von Krankheiten oder deren Erregern erstellen. Wie durch diverse β -Lacton-^[87] und β -Lactam-Sonden^[94] sowie eine Showdomycin-Sonde^[78] gezeigt wurde, lassen sich pathogene und nicht-pathogene Bakterien durch die Aktivitätsprofile ihrer Proteome differenzieren. Hierbei ergaben sich teilweise erhebliche Unterschiede in den Aktivitäten virulenz- und resistenzassoziierter Enzyme, was eventuell eine neue Identifikations- und Charakterisierungsmethode pathogener sowie multiresistenter Bakterienstämme anhand ihrer Proteomsignatur ermöglicht.

Da eine aktivitätsbasierte Markierung die Bindung der Sonde in das aktive Zentrum eines Enzyms voraussetzt, wird mit jeder markierten Zielstruktur zugleich eine potenzielle Inhibitorleitstruktur identifiziert. Eine erfolgreiche Sonde kann somit direkt oder nach weiterer struktureller Optimierung in der Wirkstoffforschung eingesetzt werden. Es besteht also ein fließender Übergang von ABPP-Sonden in ihrer Verwendung als Werkzeuge der Molekularbiologie und als Mittel zur Erforschung pharmakologischer Wirkstoffe.

Klassische Methoden zur Wirkstoffsuche testen in der Regel eine Bibliothek von Naturstoffen und deren Derivate gegen einzelne pharmakologisch interessante Zielenzyme oder gegenüber einem Pathogenese-Modellsystem (z. B. Krebszellen) und selektieren aus dieser Bibliothek vielversprechende Wirkstoffkandidaten heraus. Dieses Vorgehen hat jedoch erhebliche Nachteile. Im ersten Fall werden viele positive Resultate durch Stoffe erhalten, die entweder unspezifisch an ein Enzym binden oder aber im komplexen Proteom eines Organismus eine Präferenz für völlig andere Zielproteine aufweisen. Im zweiten Fall sind die molekularen Ziele zunächst unbekannt, und es ist möglich, dass die Wirksamkeit durch eine ungerichtete Reaktivität oder Toxizität bedingt ist, die den potenziellen Wirkstoff für einen therapeutischen Einsatz disqualifiziert. Weiterhin können hierbei aussichtsreiche Leitstrukturen leicht übersehen werden, wenn diese ohne vorhergehende pharmakokinetische Optimierung eingesetzt werden und durch zu geringe Zellpermeabilität oder zu raschen Abbau im Organismus keine Wirkung zeigen.

Aktivitätsbasierende Sonden umgehen diese Probleme. Sie ermöglichen es, die molekularen Angriffsziele eines Naturstoffs im komplexen Proteom oder sogar direkt im lebenden Organismus zu untersuchen und somit sowohl dessen Haupt- als auch Nebenangriffsziele zu charakterisieren. Besonders für die zielgerichtete Strukturoptimierung zur Bindung eines bestimmten Proteins ist dieser Ansatz reizvoll.^[110] Es ist allerdings zu bemerken, dass dieser Ansatz vorwiegend für kovalent bindende Naturstoffe gilt, während für viele reversibel bindende pharmakologisch aktive Stoffe, die für die Pharmaindustrie von Interesse sind, durch den Bedarf an Vernetzungsreagentien eine etwas eingeschränkte Anwendbarkeit gegeben ist. Weiterhin erleichtert die Anwendung von

ABPP-Sonden auch die Suche nach Wechselwirkungen der jeweiligen Naturstoffe mit Proteinen im menschlichen Organismus, was entscheidend für die frühzeitige Erkennung und Vermeidung potenzieller Nebenwirkungen in der Medikamentenentwicklung ist.

In diesem Abschnitt sollen die beiden Aspekte der Anwendung von naturstoffbasierten ABPP-Sonden als Werkzeuge und Wirkstoffe beleuchtet werden. Da beide Aspekte eng miteinander verflochten sind, werden diese im Folgenden in den jeweils übergeordneten Themengebieten besprochen.

3.2.1. Menschliche Erkrankungen

3.2.1.1. Krebs

Das große Potenzial von ABPP-Sonden für die Erforschung der Krebsentstehung konnte bereits eindrucksvoll mit vollsynthetischen Fluorophosphonat(FP)- und Hydroxamat-Sonden für die selektive Analyse von Serinhydrolase-^[39,111] und Metalloproteaseaktivitäten^[55] demonstriert werden. Auch Naturstoffsonden können hierbei einen wesentlichen Beitrag leisten. So konnte mit Sonden auf der Basis von E-64 (Abschnitt 3.1.9) die Rolle der Cystein-Cathepsin-Familie in pankreatischen Inselzelltumoren von transgenen RIP1-Tag2-Mäusen untersucht werden. Anlass dazu gab die von Joyce et al. entdeckte Hochregulierung der Genexpression dieser Cysteinproteasen, vor allem der Cathepsine B, C, L und Z während der Tumorgenese.^[8] Die Aktivität der Cathepsine konnte durch die Markierung mit E-64-Sonden im Proteom direkt bestätigt werden. Die In-vivo-Applikation einer fluoreszenten zellpermeablen E-64(BODIPY)-Sonde ermöglichte durch konfokale Mikroskopie die Lokalisierung der Cathepsinaktivität im Gewebe und in Tumorzellen. Stark erhöhte Aktivitäten wurden bei angiogenen Blutgefäßen und der invasiven Front der Karzinome gefunden. In Kombination mit chemischen Knockouts durch einen von E-64 abgeleiteten Breitbandinhibitor für Cathepsine konnte diesen eine entscheidende Rolle in der Angiogenese, der Proliferation und dem invasiven Tumorwachstum zugewiesen werden. Cathepsine könnten somit als potenzielle pharmakologische Ziele und E-64 als mögliche Leitstruktur bei der Suche nach neuen Medikamenten zur Krebsbehandlung dienen.

Weitere Naturstoffsonden wie FR182877, Microcystine und Wortmannin, die in Zusammenhang mit der Krebsforschung stehen, wurden bereits in Abschnitt 3.1 besprochen.

3.2.1.2. Infektionskrankheiten

Nicht nur bei Krebserkrankungen spielen Proteasen eine entscheidende Rolle. Auch am Lebenszyklus des Protozoen *Plasmodium falciparum*, des Erregers der Malaria, ist eine Vielzahl essenzieller Proteasen beteiligt, die attraktive Angriffsziele für die medikamentöse Behandlung darstellen.^[112] Um eine dieser Proteaseklassen detaillierter zu untersuchen, verwendete Greenbaum et al. eine Cysteinprotease-spezifische Sonde auf Basis von E-64 (Abschnitt 3.1.9).^[113] Eine systematische aktivitätsbasierende Studie der verschiedenen Stadien im Lebenszyklus des Parasiten ergab Falcipain 1 als einzige aktive Cysteinprotease im Merozoitenstadium während der Zellinvasion in die Erythrozyten. Die Aktivitäten

von Falcipain 2/3 hingegen lagen in anderen Stadien (Trophozoit und Schizont) stark erhöht vor. In einem kompetitiven Auswahlverfahren wurden kleine Epoxysuccinylpeptide als Inhibitoren für Falcipain 1 eingesetzt und deren Affinität und Selektivität durch die Konkurrenz der Inhibitoren mit der E-64-Sonde eingestuft. Der potenteste Inhibitor von Falcipain 1 vermochte die Invasion von *Plasmodium* in die Erythrozyten und damit einen essenziellen Schritt im Lebenszyklus des Parasiten zu unterbinden.

In einer anderen Studie wurde von Hang et al. eine Azid-modifizierte E-64-Sonde eingesetzt, um die Aktivität von Cathepsin B in eukarotischen Zellen während einer Infektion mit *Salmonella typhimurium* zu untersuchen.^[114] Hierbei wurde durch die E-64-Sonde markiertes Cathepsin B im Proteom primärer Makrophagen durch Staudinger-Ligation (Abschnitt 2.2 und Schema 1 B) zur Visualisierung modifiziert. Dabei zeigte sich, dass keine Aktivität der Cysteinprotease Cathepsin B mehr in den Vakuolen der Wirtszellen vorlag, die Salmonellen internalisiert hatten, während nicht-pathogene *E. coli* keine Beeinträchtigung der Proteaseaktivität in den Vakuolen bewirkten und in diesen verdaut wurden. Dies weist auf eine mögliche Rolle der Inhibition von Cathepsin B für das Überleben und die Virulenz der Bakterien bei intrazellulärer Infektion von *S. typhimurium* hin.

Pathogene Bakterien wie *Staphylococcus aureus* stellen durch die Entwicklung von multiresistenten Stämmen eine zunehmende Bedrohung für den Menschen dar. Die Suche nach neuen Angriffszielen in pathogenen Bakterien sowie die Entwicklung neuer Wirkstoffe ist daher im Kampf gegen Infektionskrankheiten von primärem Interesse.

Mit einer Bibliothek biomimetischer β -Lacton-Sonden konnten Böttcher und Sieber Inhibitoren für die caseinolytische Proteinprotease (ClpP), eine konservierte Serinprotease, die für die Virulenz vieler pathogener Bakterien entscheidend ist, identifizieren.^[87,115] Obwohl aus Knockout-Mutanten bereits bekannt war, dass ClpP bei der Infektion eine zentrale Rolle in der Regulation der Ausschüttung von Toxinen und anderen Virulenzfaktoren spielt und daher als Angriffsziel für die Behandlung von Infektionskrankheiten vorgeschlagen wurde, war bislang kein spezifischer Inhibitor bekannt.^[116] Die Behandlung lebender *S. aureus*-Kulturen mit einem strukturoptimierten β -Lacton führte unter anderem zur vollständigen Ausschaltung der extrazellulären hämolysischen und proteolytischen Aktivität und einer erheblichen Verringerung der Produktion lebensbedrohlicher PTSA-Toxine, auch bei multiresistenten (MRSA) und virulenten Stämmen.^[110,117]

Vor kurzem konnte dieser Ansatz auf das Pathogen *Listeria monocytogenes* ausgeweitet werden, wobei ein signifikanter Rückgang der Virulenz und des intrazellulären Wachstums in Mausemakrophagen nachgewiesen wurde.^[110]

Die Ausschaltung von ClpP als zentralem Regulator der Virulenz pathogener Bakterien bietet somit eine attraktive Methode, die es ermöglicht, die Pathogene zu „entwaffnen“, und die dem Immunsystem die Möglichkeit gibt, diese zu eliminieren. Biomimetische β -Lactone können hierbei als potente Leitstrukturen und ihre entsprechenden ABPP-Sonden als wichtige Werkzeuge bei der Entwicklung eines pharmakologischen Wirkstoffs dienen.

4. Metabolit-Profiling

Bei der Entstehung von Krankheiten wie Krebs oder bakteriellen Infektionen spielt die genau abgestimmte Regulation der Aktivität aller Enzyme eines Proteoms oder deren Störung eine entscheidende Rolle, deren Untersuchung mit den Methoden der klassischen Proteomik nicht möglich ist. ABPP-Sonden auf Naturstoffbasis können helfen, diese Lücke zu schließen. Doch neben der Regulation der Enzymaktivitäten sind auch die Produkte der von ihnen katalysierten biochemischen Reaktionen von fundamentaler Bedeutung. Neben den normalen Produkten des Primärstoffwechsels umfassen diese Metaboliten unter anderem Mediatoren für Entzündungsvorgänge, Signalstoffe, Toxine und Antibiotika sowie eine Vielzahl therapeutisch und diagnostisch interessanter kleiner Moleküle. Letztlich sind auch die Naturstoffe selbst, die als ABPP-Sonden beschrieben wurden, Metaboliten bestimmter Organismen. Als Produkte der Gesamtheit aller untereinander vernetzten biochemischen Reaktionen in einem Organismus sind sie das direkte Resultat des Zusammenwirkens des aktiven Proteoms. Während die Proteomanalyse durch ABPP-Sonden mit den heute verfügbaren Genom- und Proteomdatenbanken mittlerweile gut etabliert ist, befindet sich die Erforschung des Metaboloms – die Metabolomik – noch am Anfang. Dennoch wurden auch hier bereits große Erfolge erzielt, die in diesem Abschnitt dargestellt werden.

4.1. Funktionelle Charakterisierung der über ABPP identifizierten Enzyme

Da die Aktivität von Enzymen oftmals einen direkten Einfluss auf die Regulation und Diversität des Metaboloms hat, ist die Aufklärung der Enzymsubstrate eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis, die Diagnose und die Bekämpfung von Krankheiten. Bisher wurde hauptsächlich versucht, die Substrate von Enzymen durch In-vitro-Untersuchungen mit Substanzbibliotheken zu identifizieren. Nachteile dieses Verfahrens sind die begrenzte Diversität dieser Bibliotheken, die nur bereits bekannte Strukturen beinhalten, sowie die Vernachlässigung von wichtigen regulatorischen Faktoren wie z. B. post-translationalen Modifikationen, die nur in lebenden Zellen auftreten und in In-vitro-Assays nicht berücksichtigt werden.^[20] Obwohl die In-vivo-Interaktion von Metaboliten mit

Enzymen wesentlich komplexer und methodisch schwieriger zu erfassen ist, gab es in den vergangenen Jahren eine Reihe vielversprechender Ansätze.^[1,19,20,118–121]

Ähnlich wie beim ABPP werden Untersuchungen im Metabolom oftmals im vergleichenden Modus durchgeführt. Auf diese Weise lassen sich sehr leicht Profile von kleinen Molekülmetaboliten erstellen, deren Auftreten sich mit dem Ausschalten eines bestimmten Enzyms korrelieren lässt. Somit wurden in der Vergangenheit bereits einige wichtige Erkenntnisse über die Funktionen von regulatorisch bedeutsamen Enzymen erhalten, die zuvor über ABPP identifiziert wurden. Prinzipiell lässt sich die Methode des Metabolit-Profiling in zwei konzeptionelle Ansätze unterteilen (Abbildung 5). Der gerichtete Ansatz beschränkt sich auf die Charakterisierung einer bestimmten Metabolitenklasse, die bereits eine Kenntnis der Enzymfunktion voraussetzt. Dabei werden einzigartige chemische Merkmale wie NMR-aktive Atome (³¹P), Molekülmassen und Fragmentierungsmuster herangezogen, was einen Zuwachs an Empfindlichkeit in der Detektion und Quantifizierung mit sich bringt.^[120,122] Der zweite Ansatz ist ungerichtet, d. h., hier werden Metaboliten in ihrer gesamten Breite untersucht, was allerdings auf Kosten der Empfindlichkeit geht.^[1,19,20,118] Aufgrund der größeren methodischen Breite, die es prinzipiell erlaubt, alle Metabolitensubstrate eines uncharakterisierten Zielenzyms bestimmen zu können, möchten wir uns im Folgenden auf die Besprechung des ungerichteten „discovery metabolite profiling“ (DMP) beschränken.

4.2. Metabolit-Profiling zur Aufklärung von Enzymfunktionen

Im Unterschied zu anderen LC-MS-basierenden Metabolitanalyseverfahren, bei denen man isotope markierte Moleküle als interne Standards zusetzt, operiert DMP als

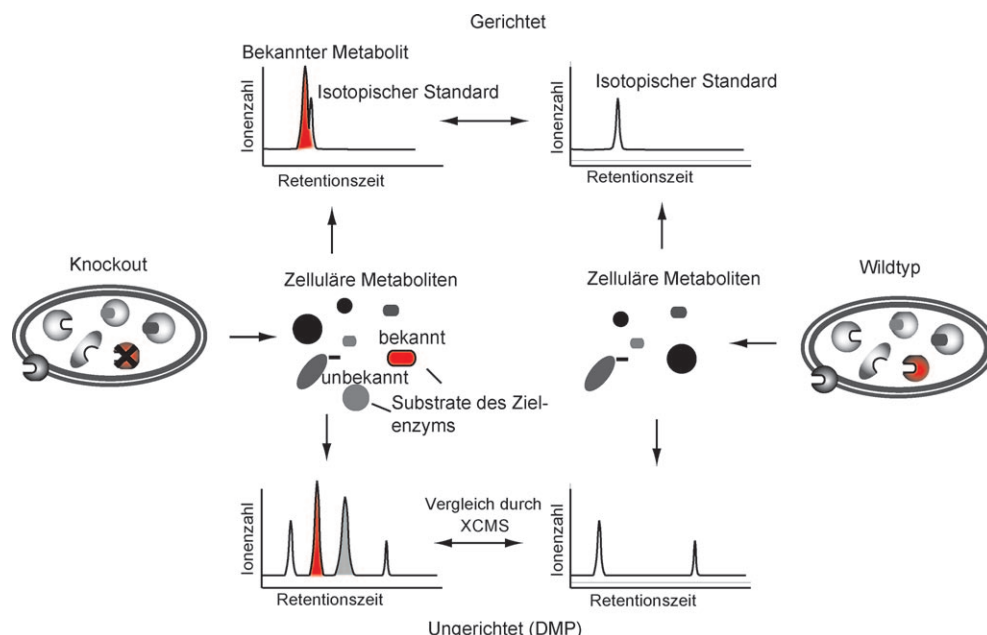


Abbildung 5. Prinzipien der gerichteten und ungerichteten (DMP) Metabolomanalyse. Während es mit der gerichteten Variante massenspektrometrisch nur möglich ist, bekannte Metabolitsubstrate einzelner Enzyme zu identifizieren, können mit der ungerichteten DMP-Methode auch unbekannte Metaboliten detektiert werden.

eine globale ungerichtete Methode, die Metaboliten anhand ihrer absoluten Massenionenintensitäten in einem breiten Massenbereich quantifiziert und somit auf die Verwendung von internen Standards verzichten kann.^[1,19,20,118] Um die Molekülmassen und relativen Häufigkeiten solcher Metaboliten zu bestimmen, die als Konsequenz einer Enzyminhibition auftreten und damit Aufschluss über die Substrate und die Funktion des jeweiligen Enzyms geben, wird eine eigens für diese Methode entwickelte Software mit dem Namen XCMS verwendet.^[123] XCMS detektiert, vergleicht, quantifiziert (basierend auf den Signalfächern) und ordnet statistisch Massenpeaks durch den paarweisen Vergleich von unterschiedlichen LC-MS-Chromatogrammen (Enzym mutiert vs. Enzym intakt). DMP ermöglicht somit die Identifizierung von sowohl bekannten als auch unbekannten Metaboliten, was diese Methode gerade für Anschlussexperimente zur Charakterisierung von Enzymen interessant macht, die über ABPP identifiziert wurden, deren genaue Funktion aber unklar ist.

DMP wurde erstmals von Cravatt und Mitarbeitern in der Untersuchung von Metaboliten im Zentralnervensystem eingesetzt. Bei diesen Studien sollten die Metabolitensubstrate des Enzyms Fettsäureamid-Hydrolase (FAAH) ermittelt werden.^[118] Aus genetischen und chemischen Inhibitionsstudien mit FAAH ist bekannt, dass dessen Inaktivierung antidepressive, antiinflammatorische und schlaffördernde Wirkungen mit sich bringt.^[124–126] Aus diesem Grund handelt es sich bei FAAH um ein sehr interessantes medikamentöses Angriffsziel, weswegen die Folgen seiner Inaktivierung auf den Metabolitenstoffwechsel genau untersucht werden müssen. Aus vorhergehenden Studien war bereits bekannt, dass FAAH viele Lipide, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, z.B. das Cannabinoid *N*-Arachidonoylethanolamin (Anandamid), abbaut (Abbildung 6). Ob auch andere Metaboliten des Zentralnervensystems (ZNS; bestehend aus Gehirn und Rückenmark) Substrate für FAAH darstellen, war allerdings unbekannt. Daher wurde DMP im direkten Vergleich von Metabolitenextrakten aus den Gehirnen und dem Rückenmark von Mäusen, die das Enzym FAAH enthalten (Wildtyp), mit solchen, in denen das Enzym genetisch ausgeschaltet ist (Knockout), angewendet.^[118] Die Metabolome wurden jeweils durch eine Extraktion des ZNS-Gewebes mit organischen Lösungsmitteln gewonnen, über

eine HPLC separiert und anschließend deren Massen mittels Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) im Positiv- und Negativmodus über einen Bereich von 200–1200 kDa bestimmt. Im Falle des FAAH-Knockouts wurde über DMP eine Reihe von Lipiden, darunter freie Fettsäuren, Phospholipide und Ceramide identifiziert, deren relative Mengen sich im Knockout nicht verändern. Drastische Änderungen hingegen wurden erwartungsgemäß für das bereits bekannte FAAH-Substrat Anandamid und weitere *N*-Acylethanolamine (NAEs) beobachtet. Interessanterweise zeigten sich aber auch stark erhöhte Werte für eine Klasse bisher uncharakterisierter Metaboliten im Knockout-Gewebe. Die wahre Herausforderung des DMP-Ansatzes besteht allgemein darin, die Identitäten solcher unbekannten Substrate aufzuklären. Dabei ist es meistens hilfreich, wenn es erste Anhaltspunkte über die Zusammensetzung und Beschaffenheit des Moleküls gibt, sowie darüber, in welchem biologischen Kontext es auftritt. Im Falle der unbekannten FAAH-Substrate wurde mittels präparativer HPLC eines der Moleküle isoliert und über hochauflösende Massenspektrometrie eine molekulare Summenformel vorhergesagt. Zusammen mit massenspektrometrischen Fragmentierungsstudien konnte ein Muster erkannt werden, das auf die Präsenz einer Taurin-Einheit und einer sehr langen Fettsäure hinwies. Um die genaue Identität bestimmen zu können, mussten im Anschluss mehrere synthetische Derivate mit unterschiedlichen Fettsäuren hergestellt und mit den natürlichen Metaboliten verglichen werden. Tatsächlich stimmten natürliche und synthetische *N*-Acyltaurine (NATs) sowohl in der Retentionszeit wie auch im Fragmentierungsmuster überein, was deren Identität eindeutig belegte (Abbildung 6). Weitergehende Untersuchungen mit DMP in den Geweben von Mäuselebern und Nieren zeigten, dass auch in diesen Organen hohe Mengen an NATs als Konsequenz eines genetischen oder chemischen FAAH-Knockouts auftreten, was zum ersten Mal die große Bedeutung von FAAH in der Regulation von NATs in peripheren Organen verdeutlichte.^[127] Bei der anschließenden Suche nach der physiologischen Bedeutung von NATs zeigte sich, dass diese kleinen Signalmoleküle in der Lage sind, TRP-Calciumkanäle (TRP = transient receptor potential) zu aktivieren.

Krebszellen stehen schon lange im Verdacht, signifikante Veränderungen in ihrer metabolischen Zusammensetzung im Vergleich mit gesunden Zellen vorzunehmen, welche ihre malignen Eigenschaften unterstützen. In vorangegangenen ABPP-Untersuchungen haben Cravatt und Mitarbeiter durch die Verwendung von FP-Sonden (Abschnitt 2.4) Enzymaktivitäten entdeckt, die in aggressiven menschlichen Krebszelllinien und primären Tumoren vorkommen.^[111,128,129] Unter diesen Enzymen stach besonders eines hervor (KIAA1363), das in aggressiven Zelllinien mehrerer Tumore wie Brust-, Haut- und Eierstockkrebs aktiv gewesen ist. Um die genaue Funktion dieses Enzyms studieren zu können, wurde über kompetitives ABPP ein potenter und selektiver Inhibitor des Enzyms gefunden, was in Folgeuntersuchungen ermöglichte, das Enzym durch Zugabe des Inhibitors auszuschalten und so einen chemischen Knockout zu erzeugen.^[128] Eine vergleichende DMP-Analyse zwischen KIAA1363-inhibierten und nicht-inhibierten Krebszellen zeigte, dass dieses uncharakte-

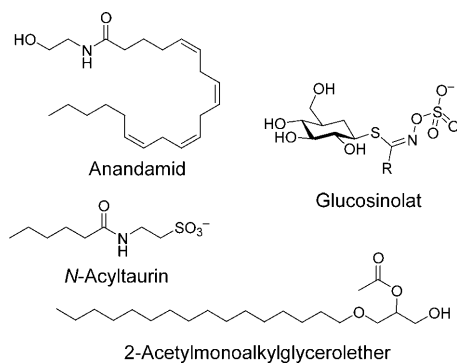


Abbildung 6. Molekülstrukturen von einigen untersuchten Metaboliten.

rierte Enzym eine ungewöhnliche Klasse neutraler Lipide reguliert, die sogenannten Monoalkylglycerolether (MAGEs) (Abbildung 6).^[130] Weitergehende Untersuchungen mit dem Enzym bestätigten dann tatsächlich seine katalytische Rolle als 2-Acetyl-MAGE-Hydrolase, die große Mengen an MAGEs in Krebszellen produziert. Darüber hinaus führte die Inaktivierung von KIAA1363 zu einem Rückgang in der Migrationsfähigkeit und im Wachstum von Krebszellen, was dieses Enzym zu einem interessanten pharmakologischen Angriffsziel macht. DMP konnte somit auch in diesem Beispiel als erfolgreiche ABPP-Anschlussmethode zur funktionellen Charakterisierung wichtiger pathogeneseassoziiierter Enzyme eingesetzt werden.

Dass DMP nicht nur auf die Untersuchung von kleinen hydrophoben Molekülen wie Lipiden oder Steroiden begrenzt ist, zeigten Sagathelian und Mitarbeiter in einer kürzlich erschienenen Arbeit, bei der die Funktion des Enzyms Dipeptidyl-Peptidase 4 (DPP4) in der Niere von Mäusen näher untersucht wurde.^[131] DPP4 reguliert Peptidhormone und spielt eine Rolle bei der Entstehung von Diabetes. Um alle möglichen Peptidsubstrate dieses Enzyms aufzuklären, wurden die Metabolitenextrakte aus dem Nierengewebe von Mäusen, die einen genetischen DPP4-Knockout aufweisen, mit denen von unveränderten Wildtyp-Mäusen verglichen. Zwei Peptide mit charakteristischen DPP4-Schnittstellen tauchten in erhöhten Mengen im Metabolom der Knockout-Mäuse und deren zugehörigen, durch DPP4 verursachten Spaltprodukten in den Wildtyp-Mäusen auf. Diese Ergebnisse belegen, dass MS-basierte Methoden auch zur Identifikation von Peptidmetaboliten und der Aufklärung ihrer physiologischen Funktion geeignet sind.

Wie diese Beispiele eindrucksvoll belegen, ist DMP eine leistungsfähige technologische Plattform, die es ermöglicht, einzelnen Enzymen, deren physiologische oder pathologische Bedeutung mittels ABPP ermittelt wurde, Substrate zuzuweisen und somit die genaue zelluläre Funktion aufzuklären. Neben DMP haben Saito und Mitarbeiter ein weiteres ungerichtetes Verfahren zur Bestimmung von Enzymsubstraten etabliert.^[119] Der Hauptunterschied zu DMP ist, dass bei dieser Methode, die den Namen „metabolic enzyme and reaction discovery by metabolite profile analysis and identification (MERMAID)“ trägt, eine Kapillarelektrophorese dem Massenspektrometer vorgeschaltet ist (CE-MS), was eine bessere Trennung und Empfindlichkeit im Vergleich zur LC-Methode bedingt. Da über Kapillarelektrophorese nur geladene Moleküle getrennt werden können, ist diese Technologie für ungeladene und nicht-ionisierbare Metaboliten ungeeignet. MERMAID wurde bisher nur in vitro zur Charakterisierung bis dato unbekannter *E. coli*-Enzyme eingesetzt. Dazu wurden die rekombinanten Enzyme mit einer breiten Mischung an kommerziell erhältlichen Metaboliten inkubiert und anschließend Veränderungen in der Metabolomzusammensetzung mittels CE-MS detektiert. Metaboliten, deren Konzentration abnimmt, sind mögliche Substrate des Zielenzyms, während Metaboliten, deren Konzentration zunimmt, mögliche Produkte der Enzymreaktion sind. Auf diese Weise gelang es den uncharakterisierten *E. coli*-Enzymen YbhA, YbiV und YihU Phosphotransferase-, Phosphatase- bzw. Dehydrogenaseaktivitäten zuzuweisen. Diese

vielfersprechenden Ergebnisse lassen auf eine Anwendung der Methode auch in vivo hoffen.

Ungerichtete Metabolomuntersuchungen können auch mit den Ergebnissen von Genexpressionsprofilen kombiniert werden, was die Identifikation von Protein-Metabolit-Paaren ermöglicht. So gelang es Hirai et al. in *Arabidopsis* simultan die zeitabhängigen Veränderungen des Transkriptom über DNA-Mikroarrays mit den Veränderungen des Metaboloms über Massenspektrometrie als Konsequenz eines herbeigeführten Schwefelmangels zu korrelieren.^[132] Unter diesen Schwefelmangelbedingungen konnte gezeigt werden, dass eine Klasse von Sulfotransferasen am Metabolismus von Glucosinolat (GLS) beteiligt ist, was durch Anschlussstudien mit rekombinanten Sulfotransferasen und GLS bewiesen wurde (Abbildung 6). Diese Ergebnisse veranschaulichen in Abgrenzung zu den oben besprochenen Beispielen, wie die Integration von Metabolom-Daten mit Transkriptom-Daten die Funktion uncharakterisierter Enzyme aufklären kann.

Dass neben kleinen Molekülen auch Proteine als Substrate von bestimmten Enzymen eine wichtige Rolle in Signaltransduktionskaskaden spielen können, zeigt das Beispiel der Apoptose. Die besondere Herausforderung besteht darin, solche Proteine zu identifizieren, die über die für apoptotische Proteolysekaskaden zuständigen Caspasen gespalten werden. In einem neuen Verfahren mit dem Namen PRO-TOMAP ist es Cravatt und Mitarbeitern gelungen, aus einer Kombination von SDS-PAGE und LC-MS/MS auch die topographischen Informationen der Proteolyse zu berücksichtigen, was vorherige Methoden nicht vermochten (Abbildung 7).^[133,134] Der Arbeitsablauf dieser Technik beginnt mit der vergleichenden SDS-Gelelektrophorese von apoptotischen und normalen Proteomen. Die unterschiedlichen Gelbahnen werden darauf in einheitliche Fragmente geschnitten und nach tryptischem Verdau lösliche Peptide durch LC-MS/MS analysiert. Durch diese massenspektrometrische Sequenzierung der gesamten Proteine lassen sich bei guter Sequenzabdeckung topographische Aussagen über die Schnittstellen der Proteasen machen. Mit dieser Methode ließen sich 91 charakterisierte und 170 uncharakterisierte Proteinsubstrate aufdecken, die während der Apoptose gespalten werden. Da die Methode zur Untersuchung von proteolytischen Spaltungen allgemein geeignet ist, ist ihre Anwendung nicht auf Apoptose beschränkt, sondern kann z.B. auch zur Untersuchung der Proteinsubstrate eines bestimmten Enzyms durch Vergleich eines Knockout-Proteoms (chemische oder genetische Inhibition des Enzyms) mit dem Wildtyp-Proteom herangezogen werden.

Die bisher aufgezeigten Beispiele befassen sich mit der Charakterisierung und Aufklärung von Enzymen, die spezifische Substrate in einem katalytischen Prozess umsetzen und so auf vielfältige Weise für essenzielle Funktionen der Zelle, wie z.B. Signalkaskaden und Apoptose, zuständig sind. Neben diesen Enzymen gibt es aber auch eine Reihe weiterer Proteine in Zellen, die Metaboliten binden, aber nicht prozessieren. Um auch solche Protein-Metabolit-Interaktionen (PMIs) genauer studieren zu können, haben Saghatelian und Mitarbeiter einen neuen Ansatz etabliert, mit dem erfolgreich die Bindungspartner verschiedener Lipid-bindender Proteine identifiziert wurden (Abbildung 8).^[135] Dazu wird das zu

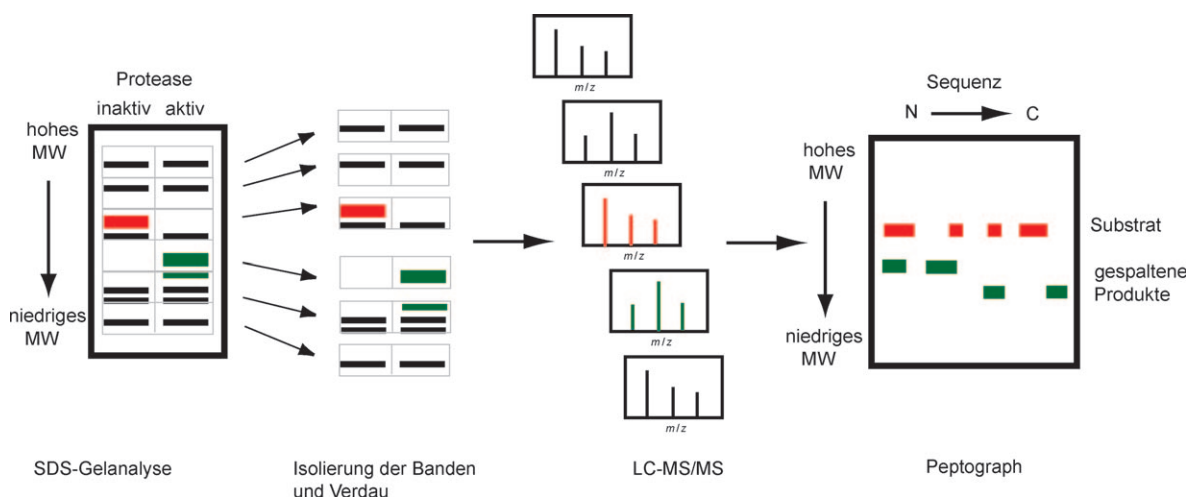


Abbildung 7. Prinzip des PRoTOMAP-Verfahrens. Die Methode beginnt mit der vergleichenden SDS-Gelelektrophorese von apoptotischen und normalen Proteomen. Die unterschiedlichen Gelbahnen werden darauf in einheitliche Fragmente geschnitten, und nach tryptischem Verdau werden die löslichen Peptide durch LC-MS/MS analysiert. Durch diese massenspektrometrische Sequenzierung der gesamten Proteine lassen sich bei guter Sequenzabdeckung topographische Aussagen über Schnittstellen der Proteasen machen.

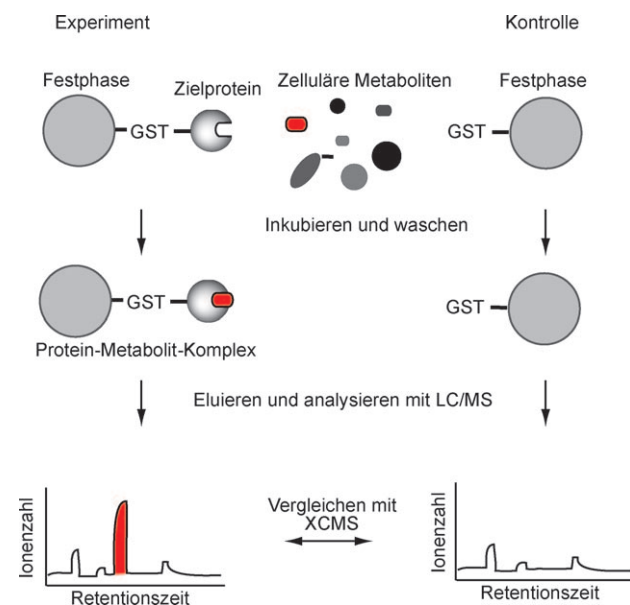


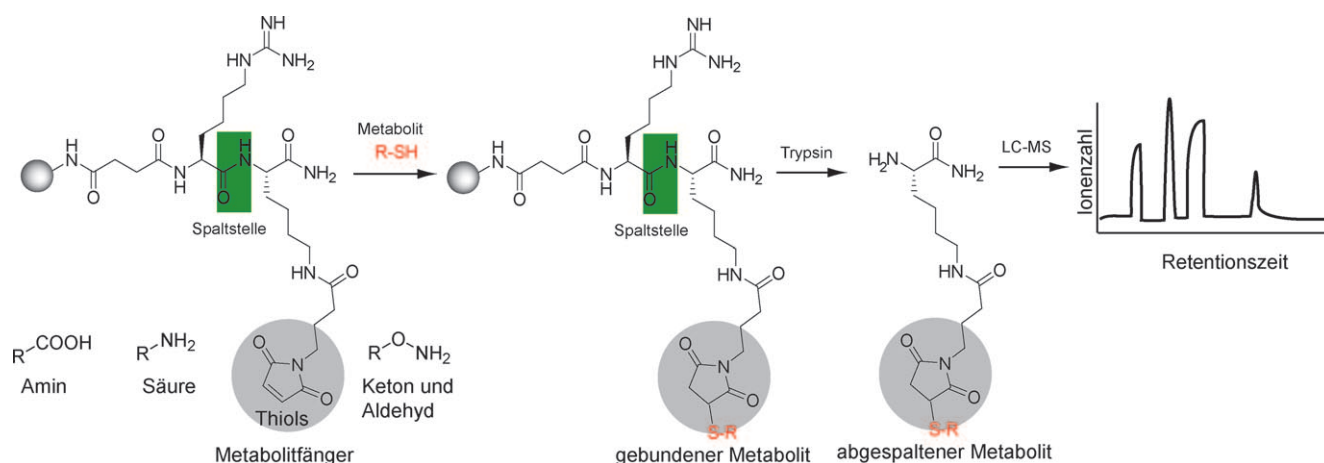
Abbildung 8. Identifikation der Bindungspartner von Lipid-bindenden Proteinen. Das zu charakterisierende Protein wird an fester Phase gebunden und mit den zugehörigen zellulären Metabolitenextrakten inkubiert. Der Protein-Metabolit-Komplex wird anschließend von der festen Phase abgespalten und der angereicherte Metabolit über DMP identifiziert.

charakterisierende Protein an fester Phase gebunden und mit den zugehörigen zellulären Metabolitenextrakten inkubiert. Der Protein-Metabolit-Komplex wird anschließend von der festen Phase abgespalten und der angereicherte Metabolit durch DMP identifiziert. Auf diese Weise gelang es, die Interaktionspartner des fettsäurebindenden Protein 2 (FABP2), das mit Stoffwechsel- und kardiovaskulären Erkrankungen in Zusammenhang steht, und der Lipidtransferdomäne StarD3 aufzuklären. Vorteile dieser Methode sind nicht nur, dass Metabolit-Protein-Interaktionen aufgeklärt werden, sondern

auch Metaboliten, deren Konzentrationen in der Zelle gering sein können, über diesen Ansatz isoliert und angereichert werden, was ihre Identifikation und Strukturbestimmung erleichtern kann.

4.3. Chemosensitive Sonden zur gezielten Anreicherung und Identifikation von Metaboliten

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellen Metaboliten eine chemisch inhomogene Klasse von Molekülen dar, die sich in ihren physikochemischen Eigenschaften wie Polarität, Masse und Stabilität sehr stark voneinander unterscheiden. Schätzungen besagen, dass in der Zelle 4000 bis 20000 unterschiedliche Metaboliten vorkommen. Um die Identitäten und Funktionen dieser Metaboliten aufklären zu können, wäre es – ähnlich wie im Falle des eingangs besprochenen ABPP – von großem Nutzen, einen gerichteten methodischen Ansatz zur gezielten Markierung, Anreicherung und Identifikation einzelner Metabolitenklassen zu entwickeln. Einen ersten Schritt in diese Richtung haben Cravatt und Carlson durch die Entwicklung spezifischer Sonden unternommen, die es ermöglichen, Metaboliten basierend auf gemeinsamen chemischen Motiven zu binden. Diese Methode wurde unter dem Namen „metabolite enrichment by tagging and proteolytic release“ (METPR) etabliert (Schema 5).^[136,137] Dazu wurde ein fester Träger mit einer Reihe unterschiedlicher Metabolit-Fänger derivatisiert. Zu diesen zählen chemische Einheiten wie Maleimid zur Bindung Thiol-haltiger Metaboliten, ein Alkoxyamin zur Bindung von Ketonen und Aldehyden, ein primäres Amin zur Bindung von voraktivierten Säuren im Metabolom und eine *N*-Hydroxysuccinimid-(NHS)-aktivierte Säure zur Bindung von Aminen. Diese vier Funktionalitäten tragen bereits zu einer beträchtlichen Abdeckung potenziell zu bindender Metaboliten mit geeigneter chemischer Funktionalisierung bei. Die Metabolit-Fänger sind Bestandteil eines Linkers, der zwei weitere essenzielle



Schema 5. Prinzip des METPR-Verfahrens. Ein fester Träger wird mit einer Reihe unterschiedlicher Metabolit-Fänger derivatisiert. Diese Metabolit-Fänger sind Bestandteil eines Linkers, der zwei weitere essenzielle Funktionalitäten vereint. Zum einen weist er eine Erkennungssequenz auf, die es nach Zugabe der Protease Trypsin ermöglicht, gebundene Metaboliten von der Festphase abzuspalten und so für die Detektion mittels MS zugänglich zu machen. Damit auch solche Metaboliten detektiert werden können, die normalerweise zu klein für die direkte Identifikation durch MS sind, wird über die reaktive Gruppe ein Massen-Marker eingebaut, der das Molekulargewicht des zu identifizierenden Metaboliten erhöht.

Funktionalitäten vereint. Zum einen weist er eine Erkennungssequenz auf, die es nach Zugabe der Protease Trypsin ermöglicht, gebundene Metaboliten von der Festphase abzuspalten und so für die Detektion mittels MS zugänglich zu machen. Damit auch solche Metaboliten detektiert werden können, die normalerweise zu klein für die direkte Identifikation über MS sind, wird über die reaktive Gruppe ein Massen-Marker eingebaut, der das Molekulargewicht des zu identifizierenden Metaboliten erhöht.^[136] Nachdem die Methode mit einigen Testsubstanzen etabliert wurde, konnten die Autoren die Leistungsfähigkeit ihres Ansatzes auch in komplexen Zellmetabolomen demonstrieren. Die Summe aller Metabolit-Fänger konnte die beträchtliche Anzahl von ca. 300 unterschiedlichen Molekülen abdecken. Des Weiteren wurde die Zusammensetzung des Metaboloms einer Brustkrebszelllinie mit und ohne Zugabe des Antioxidans *N*-Acetyl-L-cystein mit der METPR-Methode verglichen. *N*-Acetyl-L-cystein fängt in der Zelle reaktiven Sauerstoff ab, indem es die Konzentration von kleinen Thiol-haltigen Molekülen erhöht, weswegen der Maleimid-Fänger für diese Art von Untersuchung am geeignetsten erschien. Die Auswertung der vergleichenden Studien mithilfe der Software XC-MS ergab einen starken Anstieg der Cystein- und Glutathion-Konzentration in den mit dem Antioxidans behandelten Zellen. Zusätzlich wurden 17 andere Verbindungen detektiert, die ebenfalls stark in ihrer Konzentration erhöht waren. Die noch verbleibende Herausforderung dieser sowie der gesamten Metabolit-Profilierung-Technologie besteht in einer schnellen und zuverlässigen Strukturaufklärung der identifizierten Metaboliten anhand ihrer Massendaten.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In den letzten 10 Jahren hat sich ABPP zu einer ausgereiften Standardtechnologie zur schnellen, empfindlichen und selektiven Identifikation von Enzymaktivitäten und zugehö-

rigen Inhibitoren in komplexen Proteomen entwickelt. Heute existiert eine große Bandbreite chemischer Sonden, die zur Untersuchung vieler wichtiger Enzymklassen herangezogen werden können und somit einen entscheidenden Beitrag zur funktionellen Charakterisierung vieler Krankheiten wie z.B. Krebs, Infektionen und Stoffwechselerkrankungen leisten. Innerhalb der ABPP-Technologie spielen Naturstoffe eine herausragende Bedeutung. Die hier gezeigten Beispiele verdeutlichen, dass sich mit naturstoffbasierenden Sonden zum einen die Angriffsziele vieler bislang uncharakterisierter Moleküle einfach in komplexen Proteomen aufklären und so ihre genaue Funktion und Wirkmechanismus verstehen lassen. Zum anderen dienen Naturstoffsonden und ihre Derivate als pharmakologische Leitstrukturen, die essenzielle Zielstrukturen in der Zelle hemmen und in biologischen Assays ihre Wirksamkeit zeigen. Eine der Herausforderungen für die Zukunft besteht nun darin, die Bandbreite der chemischen Sonden auszubauen, um so auch andere Proteinklassen wie z.B. Rezeptoren, Ionenkanäle und Strukturproteine untersuchen zu können.

Da die komplexen regulatorischen Prozesse einer Zelle mehr umfassen als nur Transkription, Translation und Aktivierung, ist es entscheidend, auch die Substrate und Bindungspartner einzelner Enzyme und Proteine zu identifizieren. Dabei sind Methoden nötig, mit denen sich das chemisch komplexe Metabolom, das schätzungsweise aus bis zu 20000 unterschiedlichen Molekülen besteht, charakterisieren lässt. In den letzten Jahren gab es hierzu eine Reihe interessanter Ansätze, von denen z.B. das DMP eine geeignete massenspektrometrische Plattform zur ungerichteten globalen Untersuchung von Enzym-Metaboliten darstellt. Eine der großen methodischen Hürden ist die strukturelle Charakterisierung von identifizierten Metabolitmassen, die in vielen Fällen ein Höchstmaß an Intuition erfordert und kein standardisiertes Vorgehen wie im Falle von Proteinsequenzen erlaubt. Eine der Herausforderungen auf diesem Gebiet ist daher der Aufbau von Datenbanken, in denen Massen- und

Fragmentierungsmuster einen schnelleren Zugang zur Aufklärung der Identität von einzelnen Metaboliten ermöglichen sollten.

In jüngster Zeit haben sich weitere Methoden etabliert, mit denen sich in Abgrenzung zu den etablierten Verfahren wie Genomics, Proteomics und Metabolomics auch andere Aspekte der zellulären Regulation untersuchen lassen. Ein bis dato vernachlässigter Aspekt ist z.B. die reichhaltige Modifikationsbandbreite der Transfer-RNA (tRNA), die neben den vier Standardnukleosiden Adenosin, Cytidin, Guanosin und Uridin über ungefähr weitere 95 bekannte Modifikationen verfügt. Um zu verstehen, wie diese modifizierten Nukleoside die Translation und Funktion der tRNA beeinflussen, haben Carell und Mitarbeiter einen chemisch-massenspektrometrischen Ansatz entwickelt, bei dem zunächst modifizierte Basen synthetisch aufgebaut und mit einem Schweratom markiert werden.^[138] Diese Standardbasen werden dann zu den präparierten tRNA-Extrakten zugefügt und dienen als interner Standard zur massenspektrometrischen Quantifizierung. Die Leistungsfähigkeit wurde bereits mit einer Auswahl an modifizierten Basen in menschlichen Zelllinien und tierischem Gewebe gezeigt. Interessanterweise zeigten sich starke Variationen im Muster der modifizierten tRNA-Nukleoside in Krebszelllinien und nicht-entarteten Zellen, was einen Ausblick auf weitere intensive Untersuchungen in diesem bisher vernachlässigten Gebiet gibt.

Mit dieser Bandbreite an etablierten und neuen Methoden lässt sich erahnen, in welcher Dimension und Geschwindigkeit sich die verbliebenen Geheimnisse der zellulären Regulation und Funktion in der Zukunft weiter aufklären lassen. Der technologische Fortschritt der vergangenen Jahre besonders auf dem Gebiet der Massenspektrometrie hat diese Entwicklung beschleunigt und wird auch zukünftig für den Erfolg dieser chemisch-biologischen Ansätze maßgeblich sein.

Wir danken Prof. Dr. Thomas Carell und seiner Arbeitsgruppe für die großzügige Unterstützung und das exzellente Arbeitsumfeld. Ebenso bedanken wir uns für die Förderung durch das Emmy-Noether-Programm der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), den DFG-Sonderforschungsbereich SFB 749, ein Stipendium der Römer-Stiftung, den Fonds der chemischen Industrie und das Center for Integrated Protein Science Munich CiPS^M. T.B. bedankt sich für ein Stipendium bei der Studienstiftung des deutschen Volkes.

Eingegangen am 24. September 2009

- [1] A. Saghatelian, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 130.
- [2] A. Pandey, M. Mann, *Nature* **2000**, *405*, 837.
- [3] C. A. Harrington, C. Rosenow, J. Retief, *Curr. Opin. Microbiol.* **2000**, *3*, 285.
- [4] W. J. Ansorge, *Nat. Biotechnol.* **2009**, *25*, 195.
- [5] M. L. Fournier, J. M. Gilmore, S. A. Martin-Brown, M. P. Washburn, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3654.
- [6] R. Aebersold, M. Mann, *Nature* **2003**, *422*, 198.
- [7] M. Fonovic, M. Bogoy, *Expert Rev. Proteomics* **2008**, *5*, 721.

- [8] J. A. Joyce, A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraud, F. Y. Tsai, D. C. Greenbaum, J. H. Hager, M. Bogoy, D. Hanahan, *Cancer Cell* **2004**, *5*, 443.
- [9] B. F. Sloane, S. Yan, I. Podgorski, B. E. Linebaugh, M. L. Cher, J. Mai, D. Cavallo-Medved, M. Sameni, J. Dosescu, K. Moin, *Semin. Cancer Biol.* **2005**, *15*, 149.
- [10] D. J. Selkoe, *Trends Cell Biol.* **1998**, *8*, 447.
- [11] K. S. Vetrivel, G. Thinakaran, *Neurology* **2006**, *66*, S69.
- [12] M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279.
- [13] B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 383.
- [14] M. Fonovic, M. Bogoy, *Curr. Pharm. Des.* **2007**, *13*, 253.
- [15] B. M. Cullen, I. M. Halliday, G. Kay, J. Nelson, B. Walker, *Biochem. J.* **1992**, *283*, 461.
- [16] A. S. Abuelyaman, D. Hudig, S. L. Woodard, J. C. Powers, *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 400.
- [17] C.-M. Kam, A. S. Abuelyaman, Z. Li, D. Hudig, J. C. Powers, *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 560.
- [18] C. Drahl, B. F. Cravatt, E. J. Sorensen, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 5936; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 5788.
- [19] A. Saghatelian, B. F. Cravatt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 62.
- [20] A. Saghatelian, B. F. Cravatt, *Life Sci.* **2005**, *77*, 1759.
- [21] M. P. Patricelli, D. K. Giang, L. M. Stamp, J. J. Burbaum, *Proteomics* **2001**, *1*, 1067.
- [22] Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14694.
- [23] D. Kidd, Y. Liu, B. F. Cravatt, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4005.
- [24] J. C. Powers, J. L. Asgarian, O. D. Ekici, K. E. James, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 4639.
- [25] A. Baruch, D. A. Jeffery, M. Bogoy, *Trends Cell Biol.* **2004**, *14*, 29.
- [26] V. V. Rostovtsev, J. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- [27] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007.
- [28] C. P. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030.
- [29] C. W. Tornøe, C. Christensen, M. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- [30] E. M. Sletten, C. R. Bertozzi, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7108; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6974.
- [31] M. Köhn, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 3168; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 3106.
- [32] A. E. Speers, G. C. Adam, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4686.
- [33] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535.
- [34] J. M. Baskin, J. A. Prescher, S. T. Laughlin, N. J. Agard, P. V. Chang, I. A. Miller, A. Lo, J. A. Codelli, C. R. Bertozzi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 16793.
- [35] G. C. Adam, J. J. Burbaum, J. W. Kozarich, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1363.
- [36] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10018.
- [37] N. Jessani, S. Niessen, B. M. Mueller, B. F. Cravatt, *Cell Cycle* **2005**, *4*, 253.
- [38] S. A. Sieber, T. S. Mondala, S. R. Head, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 15640.
- [39] N. Jessani, S. Niessen, B. Q. Wei, M. Nicolau, M. Humphrey, Y. Ji, W. Han, D. Y. Noh, J. R. Yates III, S. S. Jeffrey, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 691.
- [40] G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 805.
- [41] K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1523.
- [42] K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 7568; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7408.
- [43] E. Weerapana, G. M. Simon, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 405.

- [44] E. J. Moran, S. Sarshar, J. F. Cargill, M. M. Shahbaz, A. Lio, A. M. M. Mjalli, R. W. Armstrong, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 10787.
- [45] M. Pitscheider, S. A. Sieber, *Chem. Commun.* **2009**, 3741.
- [46] A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, M. A. Brown, H. Kirschke, C. G. Knight, M. Tamai, K. Hanada, *Biochem. J.* **1982**, *201*, 189.
- [47] A. J. Barrett, A. A. Kembhavi, K. Hanada, *Acta Biol. Med. Ger.* **1981**, *40*, 1513.
- [48] J. T. Palmer, D. Rasnick, J. L. Klaus, D. Bromme, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3193.
- [49] E. Shaw, *Methods Enzymol.* **1994**, *244*, 649.
- [50] E. Shaw, H. Angliker, P. Rauber, B. Walker, P. Wikstrom, *Biomed. Biochim. Acta* **1986**, *45*, 1397.
- [51] D. H. Pliura, B. J. Bonaventura, R. A. Smith, P. J. Coles, A. Krantz, *Biochem. J.* **1992**, *288*, 759.
- [52] M. Fonovic, S. H. Verhelst, M. T. Sorum, M. Bogoy, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1761.
- [53] S. Liu, B. Zhou, H. Yang, Y. He, Z. X. Jiang, S. Kumar, L. Wu, Z. Y. Zhang, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8251.
- [54] A. Saghatelian, N. Jessani, A. Joseph, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 10000.
- [55] S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 274.
- [56] M. Uttamchandani, J. Wang, J. Li, M. Hu, H. Sun, K. Y. Chen, K. Liu, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 7848.
- [57] D. A. Jeffery, M. Bogoy, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 87.
- [58] J. W. Kozarich, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, *7*, 78.
- [59] A. E. Speers, B. F. Cravatt, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 41.
- [60] S. A. Sieber, T. Böttcher, I. Staub, R. Orth, *Comprehensive Natural Product Chemistry*, 2. Aufl., Elsevier, Amsterdam, **2009**.
- [61] G. M. Cragg, D. J. Newman, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **1997**, *60*, 52.
- [62] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 215.
- [63] D. J. Newman, G. M. Cragg, K. M. Snader, *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1022.
- [64] R. Breinbauer, I. R. Vetter, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3002; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2878.
- [65] A. Arcaro, M. P. Wymann, *Biochem. J.* **1993**, *296*, 297.
- [66] H. Yano, S. Nakanishi, K. Kimura, N. Hanai, Y. Saitoh, Y. Fukui, Y. Nonomura, Y. Matsuda, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 25846.
- [67] B. Vanhaesebroeck, S. J. Leever, K. Ahmadi, J. Timms, R. Katso, P. C. Driscoll, R. Woscholski, P. J. Parker, M. D. Waterfield, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 535.
- [68] N. T. Ihle, R. Williams, S. Chow, W. Chew, M. I. Berggren, G. Paine-Murrieta, D. J. Minion, R. J. Halter, P. Wipf, R. Abraham, L. Kirkpatrick, G. Powis, *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 763.
- [69] M. C. Yee, S. C. Fas, M. M. Stohlmeyer, T. J. Wandless, K. A. Cimprich, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29053.
- [70] Y. Liu, K. R. Shreder, W. Gai, S. Corral, D. K. Ferris, J. S. Rosenblum, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 99.
- [71] Y. Liu, N. Jiang, J. Wu, W. Dai, J. S. Rosenblum, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 2505.
- [72] N. R. Monks, S. Liu, Y. Xu, H. Yu, A. S. Bendelow, J. A. Moscow, *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 587.
- [73] R. W. MacKintosh, K. N. Dalby, D. G. Campbell, P. T. Cohen, P. Cohen, C. MacKintosh, *FEBS Lett.* **1995**, *371*, 236.
- [74] K. R. Shreder, Y. Liu, T. Nomanhboy, S. R. Fuller, M. S. Wong, W. Z. Gai, J. Wu, P. S. Leventhal, J. R. Lill, S. Corral, *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 790.
- [75] H. Nishimura, M. Mayama, Y. Komatsu, H. Kato, N. Shimaoka, Y. Tanaka, *J. Antibiot.* **1964**, *17*, 148.
- [76] K. R. Darnall, L. B. Townsend, R. K. Robins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *57*, 548.
- [77] S. Roy-Burman, P. Roy-Burman, D. W. Visser, *Cancer Res.* **1968**, *28*, 1605.
- [78] T. Böttcher, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.*, eingereicht **2009**.
- [79] B. Sato, H. Nakajima, Y. Hori, M. Hino, S. Hashimoto, H. Terano, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 204.
- [80] R. M. Buey, E. Calvo, I. Barasoain, O. Pineda, M. C. Edler, R. Matesanz, G. Cerezo, C. D. Vanderwal, B. W. Day, E. J. Sorensen, J. A. Lopez, J. M. Andreu, E. Hamel, J. F. Diaz, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 117.
- [81] G. C. Adam, C. D. Vanderwal, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Angew. Chem.* **2003**, *115*, 5638; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2003**, *42*, 5480.
- [82] A. L. MacKinnon, J. L. Garrison, R. S. Hegde, J. Taunton, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14560.
- [83] A. A. Tymiak, C. A. Culver, M. F. Malley, J. Z. Gougoutas, *J. Org. Chem.* **1985**, *50*, 5491.
- [84] D. C. Aldridge, D. Giles, W. B. Turner, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1971**, *23*, 3888.
- [85] E. K. Weibel, P. Hadvary, E. Hochuli, E. Kupfer, H. Lengsfeld, *J. Antibiot.* **1987**, *40*, 1081.
- [86] P. Hadvary, H. Lengsfeld, H. Wolfer, *Biochem. J.* **1988**, *256*, 357.
- [87] T. Böttcher, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4677; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4600.
- [88] Z. Wang, C. Gu, T. Colby, T. Shindo, R. Balamurugan, H. Waldmann, M. Kaiser, R. A. van der Hoorn, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 557.
- [89] M. Groll, E. P. Balskus, E. N. Jacobsen, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14981.
- [90] G. Fenteany, R. F. Standaert, W. S. Lane, S. Choi, E. J. Corey, S. L. Schreiber, *Science* **1995**, *268*, 726.
- [91] A. Zapun, C. Contreras-Martel, T. Vernet, *FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, *32*, 361.
- [92] D. A. Preston, C. Y. Wu, L. C. Blaszcak, D. E. Seitz, N. G. Halligan, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 718.
- [93] G. Zhao, T. I. Meier, S. D. Kahl, K. R. Gee, L. C. Blaszcak, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1124.
- [94] I. Staub, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13400.
- [95] I. Staub, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6271.
- [96] C. M. McCowen, M. E. Callender, J. F. Lawlis, Jr., *Science* **1951**, *113*, 202.
- [97] T. Wakabayashi, R. Kageyama-Kawase, N. Naruse, Y. Funahashi, K. Yoshimatsu, *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 591.
- [98] H. Nakajima, Y. Hori, H. Terano, M. Okuhara, T. Manda, S. Matsumoto, K. Shimomura, *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 1204.
- [99] N. Sin, L. Meng, M. Q. Wang, J. J. Wen, W. G. Bornmann, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 6099.
- [100] M. J. Evans, A. Saghatelian, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1303.
- [101] M. Engel, S. Mazurek, E. Eigenbrodt, C. Welter, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 35803.
- [102] K. Hanada, M. Tamai, M. Yamagishi, S. Omura, J. Sawada, I. Tanaka, *Agric. Biol. Chem.* **1978**, *42*, 523.
- [103] T. Nomura, N. Katunuma, *J. Med. Invest.* **2005**, *52*, 1.
- [104] D. Greenbaum, K. F. Medzihradszky, A. Burlingame, M. Bogoy, *Chem. Biol.* **2000**, *7*, 569.
- [105] D. Greenbaum, A. Baruch, L. Hayrapetian, Z. Darula, A. Burlingame, K. F. Medzihradszky, M. Bogoy, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 60.
- [106] N. Sin, K. B. Kim, M. Elofsson, L. Meng, H. Auth, B. H. Kwok, C. M. Crews, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2283.
- [107] L. Meng, R. Mohan, B. H. Kwok, M. Elofsson, N. Sin, C. M. Crews, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 10403.
- [108] M. Kijima, M. Yoshida, K. Sugita, S. Horinouchi, T. Beppu, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 22429.
- [109] J. Taunton, J. L. Collins, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10412.
- [110] T. Böttcher, S. A. Sieber, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1260.

- [111] N. Jessani, Y. Liu, M. Humphrey, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 10335.
- [112] P. J. Rosenthal, *Emerging Infect. Dis.* **1998**, 4, 49.
- [113] D. C. Greenbaum, A. Baruch, M. Grainger, Z. Bozdech, K. F. Medzihradsky, J. Engel, J. DeRisi, A. A. Holder, M. Bogyo, *Science* **2002**, 298, 2002.
- [114] H. C. Hang, J. Loureiro, E. Spooner, A. W. van der Velden, Y. M. Kim, A. M. Pollington, R. Maehr, M. N. Starnbach, H. L. Ploegh, *ACS Chem. Biol.* **2006**, 1, 713.
- [115] T. Böttcher, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14400.
- [116] A. Michel, F. Agerer, C. R. Hauck, M. Herrmann, J. Ullrich, J. Hacker, K. Ohlsen, *J. Bacteriol.* **2006**, 188, 5783.
- [117] T. Böttcher, S. A. Sieber, *ChemBioChem* **2009**, 10, 663.
- [118] A. Saghatelian, S. A. Trauger, E. J. Want, E. G. Hawkins, G. Siuzdak, B. F. Cravatt, *Biochemistry* **2004**, 43, 14332.
- [119] N. Saito, M. Robert, S. Kitamura, R. Baran, T. Soga, H. Mori, T. Nishioka, M. Tomita, *J. Proteome Res.* **2006**, 5, 1979.
- [120] S. Rochfort, *J. Nat. Prod.* **2005**, 68, 1813.
- [121] E. J. Want, B. F. Cravatt, G. Siuzdak, *ChemBioChem* **2005**, 6, 1941.
- [122] A. Rohde, K. Morreel, J. Ralph, G. Goeminne, V. Hostyn, R. De Rycke, S. Kushnir, J. Van Doorsselaere, J. P. Joseleau, M. Vuylsteke, G. Van Driessche, J. Van Beeumen, E. Messens, W. Boerjan, *Plant Cell* **2004**, 16, 2749.
- [123] C. A. Smith, E. J. Want, G. O'Maille, R. Abagyan, G. Siuzdak, *Anal. Chem.* **2006**, 78, 779.
- [124] G. Gobbi, F. R. Bambico, R. Mangieri, M. Bortolato, P. Campolongo, M. Solinas, T. Cassano, M. G. Morgese, G. Debonnel, A. Duranti, A. Tontini, G. Tarzia, M. Mor, V. Trezza, S. R. Goldberg, V. Cuomo, D. Piomelli, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 18620.
- [125] A. H. Lichtman, C. C. Shelton, T. Advani, B. F. Cravatt, *Pain* **2004**, 109, 319.
- [126] S. Huitron-Resendiz, M. Sanchez-Alavez, D. N. Wills, B. F. Cravatt, S. J. Henriksen, *Sleep* **2004**, 27, 857.
- [127] A. Saghatelian, M. K. McKinney, M. Bandell, A. Patapoutian, B. F. Cravatt, *Biochemistry* **2006**, 45, 9007.
- [128] D. Leung, C. Hardouin, D. L. Boger, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 687.
- [129] D. K. Nomura, D. Leung, K. P. Chiang, G. B. Quistad, B. F. Cravatt, J. E. Casida, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 6195.
- [130] K. P. Chiang, S. Niessen, A. Saghatelian, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 1041.
- [131] D. M. Tagore, W. M. Nolte, J. M. Neveu, R. Rangel, L. Guzman-Rojas, R. Pasqualini, W. Arap, W. S. Lane, A. Saghatelian, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, 5, 23.
- [132] M. Y. Hirai, M. Klein, Y. Fujikawa, M. Yano, D. B. Goodenowe, Y. Yamazaki, S. Kanaya, Y. Nakamura, M. Kitayama, H. Suzuki, N. Sakurai, D. Shibata, J. Tokuhisa, M. Reichelt, J. Gershenzon, J. Papenbrock, K. Saito, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 25590.
- [133] G. M. Simon, M. M. Dix, B. F. Cravatt, *ACS Chem. Biol.* **2009**, 4, 401.
- [134] M. M. Dix, G. M. Simon, B. F. Cravatt, *Cell* **2008**, 134, 679.
- [135] R. Tagore, H. R. Thomas, E. A. Homan, A. Munawar, A. Saghatelian, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14111.
- [136] E. E. Carlson, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, 129, 15780.
- [137] E. E. Carlson, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2007**, 4, 429.
- [138] T. Brückl, D. Globisch, M. Wagner, T. Carell, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 8074; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 42, 7932.