

Aktivitätsbasierte Sondenmoleküle zur Untersuchung der Aktivität Flavin-abhängiger Oxidasen und zum Zielprotein-Profil von Monoaminoxidase-Inhibitoren**

Joanna M. Krysiak, Johannes Kreuzer, Peter Macheroux, Albin Hermetter, Stephan A. Sieber*
und Rolf Breinbauer*

Professor Herbert Waldmann zum 55. Geburtstag gewidmet

Aktivitätsbasiertes Protein-Profil (ABPP) hat sich als nützliche chemische Proteommethode etabliert, mit der es möglich ist, komplexe Ligand-Protein-Wechselwirkungen in ihrer nativen Umgebung zu untersuchen.^[1] Die Verwendung von kleinen aktivitätsbasierten Sondenmolekülen zur Untersuchung der Enzymaktivität innerhalb zellulärer Systeme hat zur Identifizierung und funktionellen Charakterisierung von Proteinen geführt, die bei Krebs,^[2] Signaltransduktion,^[3] mikrobieller Pathogenese und Virulenz,^[4] Virus-Gast-Interaktionen^[5] und anderen biologischen Prozessen eine Rolle spielen. Bisherige ABPP-Studien haben aber fast ausschließlich auf Enzymklassen mit wohltabestierten katalytischen Mechanismen abgezielt, deren nukleophile Reste im aktiven Zentrum mit der aktivitätsbasierten Sonde kovalente Bindungen eingehen können (z.B. Serinhydrolasen,^[6] Cystein-^[7] oder Threoninproteasen^[8] usw.). Daraus ergibt sich für

das ABPP die wichtige Herausforderung, neuartige Sondenmoleküle zur Verfügung zu stellen, mit denen Enzymklassen mit komplexeren katalytischen Aktivitäten, wie z.B. Kinasen,^[3,9] Transferasen^[10] und Oxidoreduktasen,^[11] zugänglich gemacht werden und damit ein breiterer Proteombereich abgedeckt werden kann. Wir präsentieren erstmals eine neuartige Klasse von aktivitätsbasierten Sondenmolekülen für eine wichtige Gruppe von Oxidoreduktasen, nämlich Flavin-abhängige Oxidasen.

Flavin-abhängige Enzyme katalysieren eine ganze Reihe von Reaktionen, wie Oxidationen, Monooxygenierungen, Dehydrierungen, Reduktionen und Halogenierungen, was sie unentbehrlich für viele zelluläre Prozesse macht.^[12] Flavin-abhängige Oxidasen repräsentieren eine komplexe Untergruppe, die mit molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor ein breites Spektrum an Molekülen oxidiert.^[13] Aufgrund ihrer intrinsischen strukturellen Diversität, der Vielfalt an akzeptierten Substraten und dem Fehlen von konservierten Resten im aktiven Zentrum entziehen sie sich der funktionellen Annotierung durch etablierte genomische, strukturelle oder Proteomanalysen.^[14] ABPP hingegen könnte eine einfache und nützliche Alternative für das globale Profiling dieser Enzyme darstellen. Wir hielten es für möglich, selektive aktivitätsbasierte Sondenmoleküle herzustellen, die auf dem Prinzip der Bindung von oxidativ aktivierte Sonden zum Flavin-Cofaktor beruhen, dem einzigen intrinsischen Element des allen Flavin-abhängigen Oxidasen gemein ist.^[15]

Wir präsentieren die Entwicklung und biologische Validierung dieser neuartigen chemischen Proteomik-Strategie für Flavin-abhängige Oxidasen, bei dem wir einen markierungsfreien Ansatz für die In-situ-Enzymmarkierung in lebenden Zellen verfolgen. Durch anschließende Zellyse gefolgt von Klick-Chemie^[16] werden Fluoreszenzmarker eingeführt, mit denen die Enzymaktivitäten mittels Gelektrophorese und Fluoreszenz-Scanning bestimmt werden können. Die Identität der markierten Enzyme wird mithilfe einer LC-MS-basierten Analyseplattform bestimmt (Abbildung 1A).

Wir überprüften unser ABPP-Design an Monoaminoxidase als repräsentatives Beispiel von Flavin-abhängigen Oxidasen, um den neuen Markierungsmechanismus an einem wohlbekannten Target zu validieren. Monoaminoxidase^[17] (MAO, EC 1.4.3.4) sind FAD-haltige Enzyme, lokalisiert in der äußeren mitochondrialen Membran, die die oxidative Deaminierung einiger wichtiger Neurotransmitter im zen-

[*] J. M. Krysiak, Prof. Dr. R. Breinbauer
Institut für Organische Chemie, Technische Universität Graz
Stremayrgasse 9, 8010 Graz (Österreich)
E-Mail: breinbauer@tugraz.at
J. Kreuzer, Prof. Dr. S. A. Sieber
Center for Integrated Protein Science CIPSM, Department für
Chemie, Institute of Advanced Studies IAS, Technische Universität
München, Lichtenbergstraße 4, 85747 Garching (Deutschland)
E-Mail: stephan.sieber@tum.de
Prof. Dr. P. Macheroux, Prof. Dr. A. Hermetter
Institut für Biochemie, Technische Universität Graz
Petersgasse 12, 8010 Graz (Österreich)

[**] Wir danken Prof. D. E. Edmondson (Emory University, Atlanta) für Monoaminoxidasen, Prof. Dr. W. Berger (Medizinische Universität Wien) für humane Zelllinien und Prof. Dr. R. Zimmerman (Universität Graz) für die Benutzung seiner Zellkultureinrichtung. Wir danken Mona Wolff für exzellente wissenschaftliche Unterstützung. J.M.K. wurde vom Österreichischen Wissenschaftsfonds (FWF) im Projekt W901-B05 DK Molekulare Enzymologie unterstützt. S.A.S. dankt der DFG (SFB 749, FOR 1406) und dem ERC (Starting Grant) für Unterstützung. J.M.K. dankt Milagros Aldeco, Dr. Alexandra Binter, Dr. Ute Stemmer und Venugopal Gudipati für hilfreiche Diskussionen.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Synthese und Charakterisierung von Verbindungen, biochemische Assays, Proteomvorberitung und -markierung) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201201955> zu finden.

 Die Wiederverwertung dieses Beitrags ist gestattet in Übereinstimmung mit den Geschäftsbedingungen, die unter <http://angewandte.de/open> aufgeführt sind.

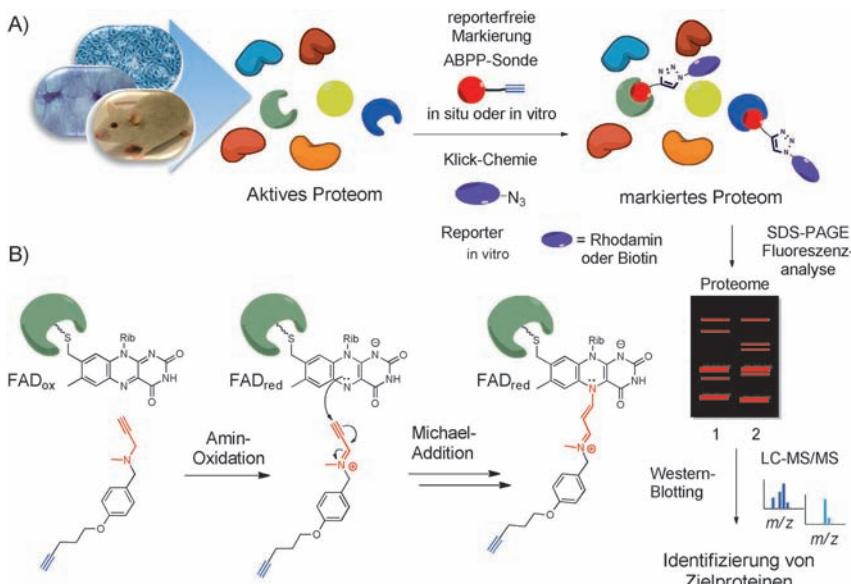


Abbildung 1. A) Identifizierung der Zielproteine mithilfe von ABPP. B) Markierung der aktivitätsbasierten Sonden zur Bestimmung von Monoaminoxidasen (FAD-abhängige Oxidasen).

tralen Nervensystem (CNS) wie Serotonin, Norepinephrin, Dopamin und xenobiotischer Amine katalysiert. In Menschen kommen zwei Isoformen der Monoaminoxidasen vor, nämlich MAO A und MAO B,^[18] die auf zwei verschiedenen Genen^[19] des X-Chromosoms codiert sind und unterschiedliche Substratselektivitäten und Inhibitorschwierigkeiten aufweisen,^[18] obwohl sie ein hohes Ausmaß an Sequenzidentität (70 %) zeigen.^[19] Die Aufklärung der Kristallstrukturen für beide Isoenzyme MAO A^[20] und MAO B^[21] ermöglichte ein detailliertes Bild der strukturellen Besonderheiten in den aktiven Zentren, die die unterschiedlichen Substrat- und Inhibitorschwierigkeiten erklären.^[20,22] Darüber hinaus bestätigten sie die kovalente Verknüpfung^[23] des Isoalloxazin-Rings des FAD-Cofaktor über eine 8α-(S-Cysteinyl)-Verknüpfung zu einem Cys-Rest.^[24] Aufgrund ihrer Beteiligung im Katabolismus und der Regulation von Neurotransmittern spielen Monoaminoxidasen eine essentielle Rolle in der Entwicklung und normalen Funktion des Gehirns. Mutationen des MAO-A-Gens werden mit aggressivem Verhalten in Verbindung gebracht,^[25] während altersbedingte Erhöhung der Expression von MAO A im Herz^[26] und MAO B in neuronalem Gewebe^[27] mit der Entwicklung von kardiovaskulären^[28] und neurodegenerativen Erkrankungen^[29] assoziiert werden. Folglich werden MAO-Inhibitoren in der klinischen Praxis zur Behandlung von Depression, Parkinson's Krankheit, Angstzuständen und anderen mentalen Krankheiten eingesetzt.^[30]

Wir planten und synthetisierten einen kleinen Satz an neuartigen Aktivitätssonden (Abbildung 2A) auf der Basis der bekannten irreversiblen MAO-Inhibitoren Pargylin und Deprenyl (Abbildung 2B). Diese Inhibitoren wurden für die funktionelle und biochemische Charakterisierung von Monoaminoxidasen verwendet und sind nützliche Medikamente in klinischer Anwendung.^[31,32] Beide Inhibitoren weisen eine N-Propargylamin-Einheit auf, die für die irre-

versible Enzyminhibition durch die Bildung eines kovalenten Addukts verantwortlich ist, wie durch Kristallstrukturen von MAO mit acetylenischen Inhibitoren wie Deprenyl, Clorgylin oder Rasagilin eindeutig nachgewiesen werden konnte.^[20,33] Im ersten Schritt des Inhibitormechanismus wird durch den FAD-Cofaktor das Amin katalytisch zu einem Iminium-Ion oxidiert, wodurch sich ein reaktiver Michael-Akzeptor bildet, der vom N(5)-Atom des Isoalloxazin-Rings nukleophil angegriffen wird und dabei das kovalente Addukt bildet. Wir rechneten damit, dass unsere von diesen Inhibitoren abgeleiteten aktivitätsbasierten Sonden nach dem gleichen Markierungsmechanismus wirken sollten (Abbildung 1B).

Die Synthese der ABPP-Sonden begann mit der Einführung der Propargylamin-Gruppe durch reduktive Ami-

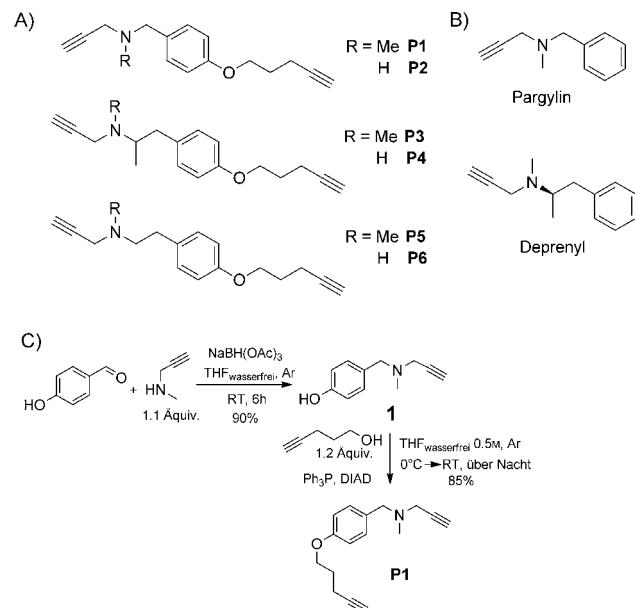


Abbildung 2. Design und Synthese von ABP-Sonden für Monoaminoxidasen (MAO). A) Strukturen des durch irreversible MAO-Inhibitoren inspirierten Satzes an Sonden. B) Strukturen der irreversiblen MAO-Inhibitoren: Pargylin (unspezifisch), Deprenyl (spezifisch für MAO B). C) Syntheseroute für Sonde P1.

nierung. Mitsunobu-Reaktion mit 4-Pentin-1-ol ermöglichte die Anknüpfung eines Alkin-terminierten Alkyl-Linkers unter milden Bedingungen, womit die gewünschten Sondenmoleküle erhalten wurden (Abbildung 2C). Strukturelle Diversität wurde durch Variation des Substitutionsmusters der Aminogruppe und die unterschiedlichen Längen und Strukturen des Kohlenstoffgerüstes zwischen reaktiver Gruppe und Arylring erzielt.

Durch Bestimmung der IC_{50} -Werte der synthetisierten Verbindungen in einem gekoppelten Amplex-Red-Peroxidase-Assay und Vergleich mit den zugrundeliegenden Inhibitoren (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen) konnten wir feststellen, inwieweit die Modifikation von Pargylin und Deprenyl durch den Alkin-Linker ihre MAO-Inhibitionseigenschaften verändern würde. Erfreulicherweise führten die in den Sonden vollzogenen Strukturänderungen zu keinen wesentlichen Veränderungen der Inhibitionseigenschaften. Sonde **P3**, eine racemische Version von Deprenyl mit einem Alkin, zeigte eine verringerte Inhibition von MAO B, während die auf Pargylin basierende Sonde **P1** sogar eine Verbesserung des IC_{50} -Wertes im Vergleich zur Stammstruktur zeigte.

Nachdem wir gezeigt hatten, dass unser Sondendesign die Voraussetzung zur Inhibition erfüllt, untersuchten wir ihre Verwendung *in vitro* unter Verwendung von humander Monoaminoxidase, die in *Pichia pastoris* exprimiert worden war. Rekombinante humane MAO-Präparationen wurden mit den entsprechenden Sonden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, und nachfolgend unter Cu^{+1} -katalysierter Alkin-Azid-Cycloaddition (Klick-Chemie, CC)^[16] mit einem TAMRA-Azid markiert (Abbildung S2 A). In-Gel-Fluoreszenzscanning wurde zum Nachweis der Markierungsergebnisse eingesetzt (Abbildung 3).

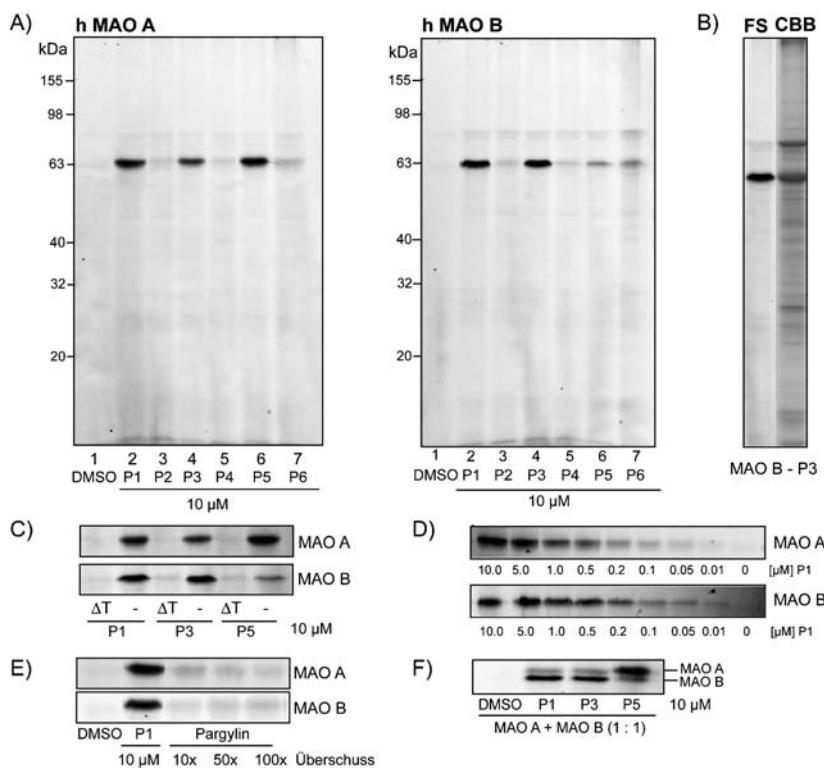


Abbildung 3. SDS-PAGE-Fluoreszenzanalyse der Markierung von Monoaminoxidase A und B *in vitro*. A) Screening der Alkinsonden **P1–6** mit MAO A und MAO B. B) Vergleich von Fluoreszenzscanning (FS) und Coomassie-Brillantblau(CBB)-Färbung der Markierung von MAO B durch Sonde **P3**. C) Markierung von MAO A und MAO B nach Hitzedenaturierung (6 min bei 96 °C) (rechts) und ohne Hitzedenaturierung (links) des Enzyms. D) Konzentrationsabhängige Markierung von MAO A und MAO B durch Sonde **P1**. E) Kompetitive Markierung von MAO A und MAO B mit Pargylin und Sonde **P1**. F) Markierung einer Mischung von beiden MAO-Isoformen mit Sonde **P1, P3** und **P5**.

In diesen orientierenden Versuchen konnten wir zeigen, dass beide MAO-Isoformen als das Hauptziel von den drei Sonden **P1, P3** und **P5** (Abbildung 3 A und B) mit leicht unterschiedlicher Isoformpräferenz (Abbildung 3 F) bei niedrigen Konzentrationen bis zu 100 nm (Abbildung 3 D) markiert werden. Interessanterweise besitzen alle im Screening als aktiv identifizierten Sonden (**P1, P3, P5**) eine tertiäre Amin-Einheit mit Methylsubstituenten, was auf die Wichtigkeit dieses Fragments zur effizienten Markierung hindeutet. Die strukturellen Analoga ohne Methylsubstituent an der Aminogruppe (**P2, P4, P6**) zeigten nur schwache Signale, die suggerieren, dass eine sekundäre Aminogruppe die Wechselwirkung zwischen Sonde und Protein mindert oder ein ungünstiges Redoxverhalten bedingt. Das Markierungsereignis bleibt vollständig aus, wenn das Protein vor dem Inkubieren mit der Sonde durch Hitze denaturiert worden ist (Abbildung 3 C), womit belegt wird, dass eine spezifische Markierung nur mit aktivem Enzym vollzogen wird. In Konkurrenzexperimenten konnten wir zeigen, dass unsere ABPP-Sonden mit MAO-spezifischen Inhibitoren um dieselbe Bindungsstelle (Flavin-Cofaktor) im aktiven Zentrum konkurrieren, da Pargylin die Enzymmarkierung durch Sonde **P1** vollständig unterdrückt (Abbildung 3 E). Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass das entwickelte ABPP-System ein effektives Werkzeug für das Profilieren der Enzymaktivität von beiden MAO-Isoformen *in vitro* darstellt. Dies motivierte uns, die Aktivität und Selektivität der besten Sonden **P1** und **P3** für die Untersuchung von Aktivitätsprofilen der Monoaminoxidasen in komplexeren biologischen Proben zu überprüfen. Darauf hinaus waren wir neugierig, ob diese Sonden in der Lage wären, auch andere Flavin-abhängige Enzyme zu adressieren.

Zunächst untersuchten wir die allgemeinen Markierungseigenschaften der Sonden **P1** und **P3** mit verschiedenen Organhomogenaten von Mäusen (Herz, Lunge, Gehirn). Interessanterweise waren die einzigen spezifischen Banden nur in der unlöslichen Fraktion von Mäusehirnlinsaten sichtbar (Abbildung S3). Sonde **P1**, abgeleitet vom unspezifischen MAO-Inhibitor Pargylin, markierte zwei Proteine im Bereich von 60 kDa, während Sonde **P3**, abgeleitet vom MAO-B-spezifischen Inhibitor Deprenyl, nur ein Protein markierte, das mit der unteren Bande der Markierung durch **P1** identisch war. Die Markierung erfolgte dosisabhängig und war auch noch bei Konzentrationen von 100 nm sichtbar (Abbildung S3 B). Bedeutsamerweise entsprachen einerseits die Mobilität der markierten Banden denen von MAO A (obere Bande) und MAO B (untere Bande) (Abbildung S3 C), andererseits unterblieb die Markierung, wenn das Lysat zuerst mit

einem Überschuss an MAO-Inhibitoren inkubiert worden war (Abbildung S3D).

Vor dem Hintergrund, dass Pargylin und Deprenyl in der Untersuchung und Behandlung von CNS-Krankheiten (z.B. Deprenyl in der Parkinson-Therapie)^[32] eingesetzt werden, betrachteten wir eine humane Gehirn-Krebszelllinie (RAEW genannt), die aus einem an einem Glioblastom-Multiform-(GBM)-Tumor erkrankten Patienten isoliert worden war, als ein geeignetes Testsystem für die Targetvalidierung.^[34] Wir bestimmten die Cytotoxizität der Sonden **P1** und **P3** in eukaryotischen Zelllinien (GBM-Modell, DBTRG-05MG) und stellten fest, dass die Zellen im für unsere ABPP-Experimente benötigten Konzentrationsbereich weiterhin vital waren (Abbildung S4).

In-situ-Markierung von GBM-Zellen ergab, dass beide Sonden **P1** und **P3** zwei Banden im Bereich von 63 kDa als Hauptproteintargets markierten, wobei sich Sonde **P3** als viel effektiver erwies (Abbildung 4A). Eine Konzentration der Sonde **P3** von 50 µM war ausreichend, um Sättigung in der Bindung zu erreichen, während noch höhere Konzentrationen die Markierung der viel schwächeren unteren Bande nicht weiter verstärkten. Wichtig zu erwähnen ist, dass bekannte MAO-Inhibitoren die Markierung durch die Sonde **P3**

verhinderten, was darauf hinwies, dass es sich bei diesen beiden Proteinen um MAO A (60.5 kDa)^[35] und MAO B (59.4 kDa)^[35] handeln könnte. Um eine eindeutige Zuordnung der markierten Proteine treffen zu können, führten wir eine quantitative Proteomanalyse mit einem trifunktionellen Reporter-Linker (Biotin-TAMRA-Azid, Abbildung S2B) durch, der an Sonde **P3** unter CC-Bedingungen angeknüpft wurde, um Visualisierung, Anreicherung und nachfolgende Identifikation mittels Massenspektrometrie zu ermöglichen.^[4e] Analyse der Peptidfragmente mithilfe des SEQUEST-Algorithmus identifizierte MAO A mit etwa 40% Proteinabdeckung (obere Bande der Fluoreszenz-SDS-PAGE). Leider erwies sich die Anreicherung der unteren Proteinbande auf Avidin-Beads als nicht ausreichend. Dieses Protein konnte jedoch eindeutig als MAO B durch Western-Blotting mittels spezifischen Anti-MAO-B-Antikörpern identifiziert werden (Abbildung 4C).

Diese Markierungsexperimente mit lebenden Gehirnzellen zeigen, dass die kovalent bindenden Inhibitoren Pargylin und Deprenyl sehr selektiv mit MAO A und B, aber nicht mit anderen Zielproteinen reagieren. Diese außerordentliche Selektivität ist durch den einzigartigen „Selbstmord“-Inhibierungsmechanismus bedingt, der für diese Enzymfamilie maßgeschneidert wurde. Dieser Befund steht im Gegensatz zu anderen ABPP-Studien, die eine Reihe von Off-Targets für klinisch verwendete, kovalent wirkende Medikamente identifiziert haben.^[36]

Die vom MAO-B-spezifischen Inhibitor Deprenyl abgeleitete Sonde **P3** zeigte in der In-vitro- und In-situ-Markierung unterschiedliche Isozympräferenz. In Experimenten mit rekombinanten Proteinen markierte diese Sonde beide MAO-Isoformen, in Übereinstimmung mit Studien, die auf einen Verlust der MAO-B-Spezifität bei höheren Konzentrationen hindeuten.^[37] **P3** zeigte jedoch eine höhere Bindungsaffinität zu MAO B (Abbildung 3F), was sich auch im Mausgehirnextrakt zeigte, bei dem nur die untere Bande, sehr wahrscheinlich MAO B, markiert wurde (Abbildung S3A). Interessanterweise band dieselbe Sonde in menschlichen Gehirnzellen bevorzugt an MAO A. Dieses bemerkenswerte Ergebnis kann durch die Tatsache erklärt werden, dass die Aktivität von MAO A in intakten Zellen viel höher als für das gereinigte Enzym ist, das bekanntermaßen bei Raumtemperatur instabil ist und seine Aktivität schnell verliert.^[38] Weiters könnte man vermuten, dass die Topologie der äußeren mitochondrialen Membran (MOM) die Zugänglichkeit der Sonde zum Enzym beeinflussen könnte. Jüngste Studien zeigten,^[39] dass MAO A in intakten Rattenlebermitochondrien und intakten humanen Plazentazellen an der cytosolischen Seite lokalisiert ist,^[40] während sich MAO B im Intermembranraum befindet,^[39] was für die Sonde MOM-Permeabilität notwendig machen würde.^[41] Andererseits korreliert die schwache Markierung von MAO B sehr gut mit der in einigen kultivierten Gehirnzellen gefundenen niedrigeren Aktivität von MAO B,^[42] obwohl beide MAO-Isoformen im menschlichen Gehirn in ähnlichem Ausmaß exprimiert werden.^[43]

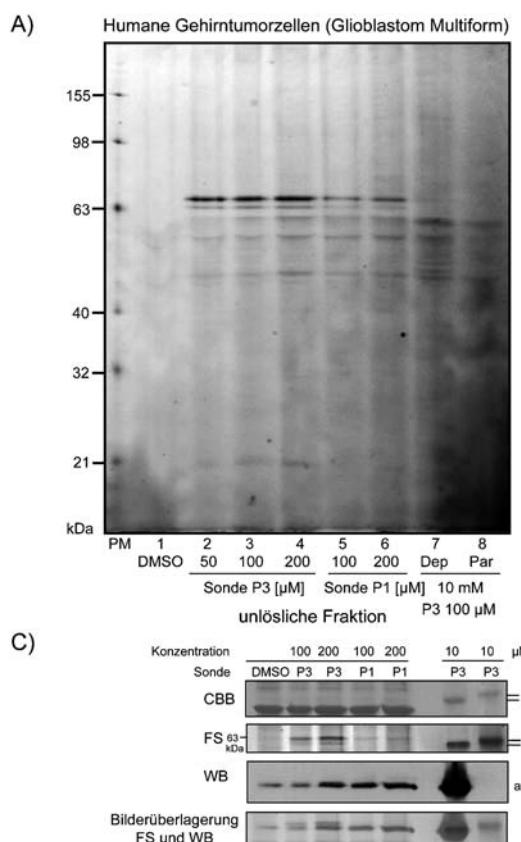


Abbildung 4. A) In-situ-ABPP-Markierung von humanen Gehirn-Krebszelllinien (unlösliche Fraktion, für das gesamte Proteom siehe Abbildung S5) mit Sonden **P1** (Spuren 5 und 6) und **P3** (Spuren 2–4). Kompetitive Markierung mit MAO-Inhibitoren Deprenyl (Dep) und Pargylin (Par) und Sonde **P3** (Spuren 7 und 8). B) Vergleich von Fluoreszenzscanning und CBB-Färbung der Markierung durch Sonde **P3**. C) Identifizierung der unteren Bande durch Western-Blotting (WB) mit spezifischen Anti-MAO-B-Antikörpern.

Zusammengekommen unterstreichen diese Resultate die Bedeutung von In-situ-Studien zur Enzymaktivität, die offensichtlich nicht einfach von der beobachteten Enzymhäufigkeit abhängt, sondern durch viele dynamische Prozesse reguliert wird, die nur in intakten lebenden Zellen stattfinden.

Zusammenfassend haben wir die ersten aktivitätsbasierten Sonden präsentiert, die auf Flavin-abhängige Oxidasen abzielen. Wir konnten ihre Nützlichkeit in ABPP-Studien mit Gewebepräparaten und lebenden Zellen vor allem in der Beschreibung der Aktivität von Monoaminoxidinasen zeigen. Der außergewöhnliche Markierungsmechanismus sorgt für eine exzellente Selektivität dieser Sondenmoleküle, die es uns erlaubte, die Off-Target-Wechselwirkungen des klinisch genutzten Medikaments Deprenyl zu untersuchen, für das wir zeigen konnten, dass es ausschließlich mit MAO A und B reagiert. Wir sind überzeugt, dass durch sorgfältige Optimierung der Kernstruktur unserer Sonden die Anwendungsbreite unseres chemoproteomischen Ansatzes erweitert werden kann, die zum einen zu einer noch höheren Spezifität bzw. andererseits zu einem breiteren Spektrum an erreichbaren Flavinoxidasen führen wird. In unseren Labors werden gegenwärtig Anstrengungen in dieser Richtung unternommen.

Eingegangen am 12. März 2012
Online veröffentlicht am 11. Juni 2012

Stichwörter: Aktivitätsbasierte Sonden · Deprenyl · Flavin-Cofaktor · Monoaminoxidinasen · Proteomik

- [1] Übersichtsartikel: a) W. P. Heal, T. H. Tam Dang, E. W. Tate, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 246–257; b) T. Böttcher, M. Pittscheider, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2740–2759; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2680–2698; c) B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 383–414; d) M. J. Evans, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3279–3301.
- [2] D. K. Nomura, M. M. Dix, B. F. Cravatt, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 630–638.
- [3] C. H. S. Lu, K. Liu, L. P. Tan, S. Q. Yao, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 28–39.
- [4] a) A. W. Puri, P. J. Lupardus, E. Deu, V. E. Albrow, K. C. Garcia, M. Bogyo, A. Shen, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1201–1211; b) T. H. Dang, L. de La Riva, R. P. Fagan, E. M. Stork, W. P. Heal, C. Janoir, N. F. Fairweather, E. W. Tate, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 279–285; c) A. W. Puri, M. Bogyo, *ACS Chem. Biol.* **2009**, *4*, 603–616; d) I. Staub, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 13400–13409; e) T. Böttcher, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 4677–4680; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 4600–4603.
- [5] D. R. Blais, N. Nasheri, C. S. McKay, M. C. Legault, J. P. Pezacki, *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 89–99.
- [6] a) G. M. Simon, B. F. Cravatt, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 11051–11055; b) Y. Liu, M. P. Patricelli, B. F. Cravatt, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 14694–14699.
- [7] a) D. Kato, K. M. Boatright, A. B. Berger, T. Nazif, G. Blum, C. Ryan, K. A. Chehade, G. S. Salvesen, M. Bogyo, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 33–38.
- [8] a) B. I. Florea, M. Verdoes, N. Li, W. A. van der Linden, P. P. Geurink, H. van den Elst, T. Hofmann, A. de Ru, P. A. van Veelen, K. Tanaka, K. Sasaki, S. Murata, H. den Dulk, J. Brouwer, F. A. Ossendorp, A. F. Kisselley, H. S. Overkleef, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 795–801; b) J. Clerc, B. I. Florea, M. Kraus, M. Groll, R. Huber, A. S. Bachmann, R. Dudler, C. Driessens, H. S. Overkleef, M. Kaiser, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2638–2643.
- [9] a) H. Shi, X. M. Cheng, S. K. Sze, S. Q. Yao, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 11306–11308; b) M. P. Patricelli, A. K. Szardenings, M. Liyanage, T. K. Nomanbhoy, M. Wu, H. Weissig, A. Aban, D. Chun, S. Tanner, J. W. Kozarich, *Biochemistry* **2007**, *46*, 350–358; c) Y. Liu, N. Jiang, J. Wu, W. Dai, J. S. Rosenblum, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 2505–2511; d) Y. Liu, K. R. Shreder, W. Gai, S. Corral, D. K. Ferris, J. S. Rosenblum, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 99–107.
- [10] a) O. Obianyo, C. P. Causey, J. E. Jones, P. R. Thompson, *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6*, 1127–1135; b) G. C. Adam, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20*, 805–809.
- [11] a) D. Rotili, M. Altun, A. Kawamura, A. Wolf, R. Fischer, I. K. H. Leung, M. M. Mackeen, Y. Tian, P. J. Ratcliffe, A. Mai, B. M. Kessler, C. J. Schofield, *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 642–654; b) A. T. Wright, J. D. Song, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 10692–10700.
- [12] a) V. Joosten, W. J. H. van Berkel, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 195–202; b) L. de Colibus, A. Mattevi, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2006**, *16*, 722–728; c) V. Massey, *FASEB J.* **1995**, *9*, 473–475.
- [13] A. Mattevi, *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31*, 276–283.
- [14] a) P. Macheroux, B. Kappes, S. E. Ealick, *FEBS J.* **2011**, *278*, 2625–2634; b) O. Dym, D. Eisenberg, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1712–1728.
- [15] a) S. O. Mansoorabadi, C. J. Thibodeaux, H. Liu, *J. Org. Chem.* **2007**, *72*, 6329–6342; b) V. Massey, *Biochem. Soc. Trans.* **2000**, *28*, 283–296.
- [16] a) A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 535–546; b) V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 2708–2711; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596–2599; c) C. W. Tornøe, C. Christensen, M. J. Meldal, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064.
- [17] a) C. Binda, A. Mattevi, D. E. Edmondson, *Int. Rev. Neurobiol.* **2011**, *100*, 1–11; b) D. E. Edmondson, C. Binda, J. Wang, A. K. Upadhyay, A. Mattevi, *Biochemistry* **2009**, *48*, 4220–4230; c) T. Nagatsu, *Neurotoxicology* **2004**, *25*, 11–20; d) J. C. Shih, K. Chen, M. J. Ridd, *Annu. Rev. Neurosci.* **1999**, *22*, 197–217.
- [18] J. P. Johnston, *Biochem. Pharmacol.* **1968**, *17*, 1285–1297.
- [19] A. W. Bach, N. C. Lan, D. L. Johnson, C. W. Abell, M. E. Bembenek, S. W. Kwan, P. H. Seeburg, J. C. Shih, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988**, *85*, 4934–4938.
- [20] L. De Colibus, M. Li, C. Binda, A. Lustig, D. E. Edmondson, A. Mattevi, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 12684–12689.
- [21] C. Binda, P. Newton-Vinson, F. Hubálek, D. E. Edmondson, A. Mattevi, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, *9*, 22–26.
- [22] F. Hubálek, C. Binda, A. Khalil, M. Li, A. Mattevi, N. Castagnoli, D. E. Edmondson, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 15761–15766.
- [23] a) D. E. Edmondson, C. Binda, A. Mattevi, *Neurotoxicology* **2004**, *25*, 63–72; b) B. P. Zhou, D. A. Lewis, S. W. Kwan, C. W. Abell, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23653–23660.
- [24] Kovalente Verknüpfung des Flavin-Cofaktors wurde nur für ca. 11% aller bekannten Flavoproteine beschrieben.^[14a, 15a] einschließlich einiger humaner Flavinoxidasen.^[15a] Unsere ABPP-Methode ist jedoch nicht allein auf solche Enzyme beschränkt, da z.B. durch Einbau eines Photonetzbildners in die ABPP-Sonde sowohl eine kovalente Verknüpfung mit dem Flavin-Cofaktor (spezifische Markierung durch die reaktive Gruppe) und zum Protein (unspezifische Bindung durch den Photonetzbildner) erreicht werden kann. Für Beispiele zur Anwendung von Photonetzbildnern in ABPP, siehe: a) P. P. Geurink, L. M. Prely, G. A. van der Marel, R. Bischoff, H. S. Overkleef, *Top. Curr. Chem.* **2012**, *324*, 85–113; b) J. Eirich, R. Orth, S. A. Sieber, J.

- Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12144–12153; c) C. M. Salisbury, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2184–2194.
- [25] a) R. McDermott, D. Tingley, J. Cowden, G. Frazetto, D. D. P. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 2118–2123; b) H. G. Brunner, M. Nelen, X. O. Breakefield, H. H. Ropers, B. A. van Oost, *Science* **1993**, *262*, 578–580.
- [26] A. Maurel, C. Hernandez, O. Kunduzova, G. Bompard, C. Cambon, A. Parini, B. Frances, *Am. J. Physiol.* **2003**, *284*, H1460–H1467.
- [27] J. S. Fowler, J. Logan, N. D. Volkow, G. J. Wang, *J. Mol. Imaging Biol.* **2005**, *7*, 377–387.
- [28] a) N. Kaludercic, A. Carpi, R. Menabò, F. Di Lisa, N. Paolocci, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2011**, *1813*, 1323–1332.
- [29] M. J. Kumar, D. G. Nicholls, J. K. Andersen, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 46432–46439.
- [30] a) C. Binda, E. M. Milczeck, D. Bonivento, J. Wang, A. Mattevi, D. E. Edmondson, *Curr. Top. Med. Chem.* **2011**, *11*, 2788–2796; b) M. Bortolato, K. Chen, J. C. Shih, *Adv. Drug Delivery Rev.* **2008**, *60*, 1527–1533; c) M. B. H. Youdim, D. E. Edmondson, K. F. Tipton, *Nat. Rev. Neurosci.* **2006**, *7*, 295–309.
- [31] Ein fluoreszenzmarkiertes Pargylinderivat wurde für die Untersuchung der Membranumgebung von MAO beschrieben: R. R. Rando, *Mol. Pharmacol.* **1977**, *13*, 726–734.
- [32] K. Magyar, *Int. Rev. Neurobiol.* **2011**, *100*, 65–84.
- [33] C. Binda, M. Li, Y. Herzig, J. Sterling, D. E. Edmondson, A. Mattevi, *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1767–1774.
- [34] Die Zellen aus klinischem Material wurden für unsere Untersuchungen gewählt, da sie sehr gut mit dem nativen Zustand von humanen Gehirnzellen vergleichbar sind, obwohl im Prinzip die Enzymaktivität durch den Tumorzustand verändert sein könnte. Vergleichende Genomhybridisierungsanalysen (von Prof. W. Berger durchgeführt) zeigten keine signifikanten Veränderungen des Spiegels der MAO-A- und MAO-B-Gene in diesen Zellen. Sie ähneln gesunden menschlichen Gehirnzellen bezüglich der Aktivität der MAO-Enzyme.
- [35] C. Binda, J. Wang, M. Li, F. Hubálek, A. Mattevi, D. E. Edmondson, *Biochemistry* **2008**, *47*, 5616–5625.
- [36] Kürzlich zeigten Yao et al., dass ein handelsübliches Medikament (Tetrahydrolipstatin, Orlistat) eine ganze Reihe von Lipasen im gastrointestinalen Trakt und die Fettsäuresynthase (FAS) adressiert. Durch strukturelle Veränderungen von Orlistat konnte die Selektivität zu FAS nicht wesentlich verbessert werden. Siehe: a) P.-Y. Yang, K. Liu, C. Zhang, G. Y. J. Chen, Y. Shen, M. H. Ngai, M. J. Lear, S. Y. Yao, *Chem. Asian J.* **2011**, *6*, 2762–2775; b) P.-Y. Yang, K. Liu, M. H. Ngai, M. J. Lear, M. R. Wenk, S. Y. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 656–666.
- [37] B. Ekstedt, K. Magyar, J. Knoll, *Biochem. Pharmacol.* **1979**, *28*, 919–923.
- [38] M. Li, F. Hubálek, P. Newton-Vinson, D. E. Edmondson, *Protein Expression Purif.* **2002**, *24*, 152–162.
- [39] J. Wang, D. E. Edmondson, *Biochemistry* **2011**, *50*, 2499–2505.
- [40] T. D. Buckman, M. S. Sutphin, S. Eiduson, *Mol. Pharmacol.* **1984**, *25*, 165–170.
- [41] O. Schmidt, N. Pfanner, C. Meisinger, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 655–667.
- [42] a) T. Nakano, T. Nagatsu, H. Higashida, *J. Neurochem.* **1985**, *44*, 755–758; b) M. Hawkins, Jr., X. O. Breakefield, *J. Neurochem.* **1978**, *30*, 1391–1397.
- [43] J. S. Fowler, R. R. MacGregor, A. P. Wolf, C. D. Arnett, S. L. Dewey, D. Schlyer, D. Christman, J. Logan, M. Smith, H. Sachs, *Science* **1987**, *235*, 481–485.