

Benzoylphosphonat-basierte, photoaktive Phosphotyrosinpeptidimetika zur funktionellen Modulierung von Proteintyrosinphosphatasen und hochspezifischen Markierung von SH2-Domänen**

André Horatscheck, Stefan Wagner, Jutta Ortwein, Boo Geun Kim, Michael Lisurek, Samuel Beligny, Anja Schütz und Jörg Rademann*

Die Phosphorylierung von Tyrosinresten ist eine wichtige posttranskriptionale Modifizierung von Proteinen und reguliert die Aktivität zahlreicher Signaltransduktionswege, z. B. in stark proliferierenden Zellen. Phosphotyrosinreste sind an Membranrezeptoren,^[1] Adapterproteinen,^[2] Enzymen^[3] und Transkriptionsfaktoren lokalisiert.^[4] Sie werden durch Proteintyrosinphosphatasen (PTPs) und Phosphotyrosinbindungsdomänen erkannt, wie der src-Homologiedomäne Typ 2 (SH2-Domäne), die zuerst im humanen Sarkomprotoonkogen, src, beschrieben wurde.^[5] Die zeitlich und räumlich aufgelöste Analyse der Expression von Phosphotyrosinbindungsstellen und ihrer Aktivität ist von zentraler Bedeutung für die präzise Beschreibung der zellulären Aktivierung.

Photoaktivierbare, chemische Sonden wurden bereits intensiv für die Identifizierung von Interaktionspartnern kleiner Moleküle in biologischen Systemen eingesetzt.^[6] Normalerweise bestehen derartige Sonden aus einer bioaktiven Ligandenkomponente und einer photoaktiven Markierung, die einen Arylazid-, Diazirin- oder Benzophenonrest enthält. Für die Adressierung von Phosphotyrosinbindungsstellen wurden mehrere bioisostere Gruppierungen beschrieben.^[5]

Benzylphosphonate,^[7] Phenyldifluormethylphosphonate^[8] und Isothiazolidinone^[9] haben breitere Verwendung gefunden. Kürzlich haben wir selbst einige Phosphotyrosin nachahmende Fragmente für die Entwicklung von hochspezifischen PTP-Inhibitoren angewendet,^[10] die durch eine Variation des dynamischen Ligationsscreenings gefunden wurden.^[11] Darüber hinaus wurden kovalent modifizierende Moleküle, die direkt die aktiven Taschen von PTP binden, als Aktivitäts-basierte Sonden vorgeschlagen, allerdings mit begrenzter Selektivität und Spezifität.^[12]

Hier wird ein konzeptionell unterschiedliches Verfahren zur Herstellung neuer, kovalent bindender Proteinsonden beschrieben, die auf die aktiven Taschen Phosphotyrosin bindender Proteine gerichtet sind. Benzoylphosphonate der allgemeinen Struktur **1** wurden als Bioisostere des Phosphotyrosinrests entworfen und sollten in der Lage sein, an Phosphotyrosinerkennungsstellen als Phosphotyrosinmimetika zu binden. Aufgrund der Carbonylgruppe, die direkt benachbart zur Phosphonsäure lokalisiert ist, wurde vermutet, dass Verbindungen der Struktur **1** durch die Bestrahlung mit Licht aktiviert werden und reaktive Radikale erzeugen können,^[13] die möglicherweise ihr Zielprotein kovalent modifizieren und dadurch dessen Aktivität modulieren können (Schema 1). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Benzoylphosphonate **1a,b** über eine Arbuzow-Acylierung von Triethylphosphit aus den entsprechenden Säurechloriden hergestellt und mit Trimethylsilylbromid (TMSBr) entschützt.^[14] Das UV-Spektrum von **1a** in Wasser zeigte den $\pi\pi^*$ -Übergang bei 368 nm mit einem Extinktionskoeffizienten ϵ von $96 \text{ cm}^{-1} \text{M}^{-1}$.^[15] Bestrahlung von **1a,b**, gelöst in 2-Propanol und Wasser, einem Lösungsmittelgemisch, das zur Abgabe von Wasserstoffradikalen fähig ist,^[16] lieferte eine Halbwertszeit von ca. 20 min. Hauptprodukte der Bestrahlung von **1a,b** unter diesen Bedingungen waren die isomeren Photodimere *meso*-**2a,b** und *rac*-**2a,b**, den *meso*- und den racemischen Diolen, die durch die Rekombination des monomeren Radikalzwischenprodukts gebildet wurden. In geringer Menge wurden die Benzaldehyde **3a,b** und Benzoesäuren **4a,b** als Nebenprodukte der Photoreaktion von **1a,b** gefunden.

Ohne Bestrahlung waren **1a,b** in 2-Propanol/Wasser stabil. Bestrahlung in einem Lösungsmittel wie Wasser, das nicht als Wasserstoffradikaldonor fungiert, führte nur zur langsamen Zersetzung des Benzoylphosphonats und lieferte kein Vernetzungsprodukt. Die Zugabe des Tetramethylpiperidinyl-N-oxtradikals (TEMPO) unterdrückte die Bildung von Photodimerisierungsprodukten in 2-Propanol/Wasser

[*] M. Sc. S. Wagner,^[+] Dipl.-Ing. J. Ortwein, Prof. Dr. J. Rademann
Medizinische Chemie, Institut für Pharmazie
Universität Leipzig
Brüderstraße 34, 04103 Leipzig (Deutschland)

E-Mail: rademann@uni-leipzig.de

Homepage: <http://www.uni-leipzig.de/agrademann>

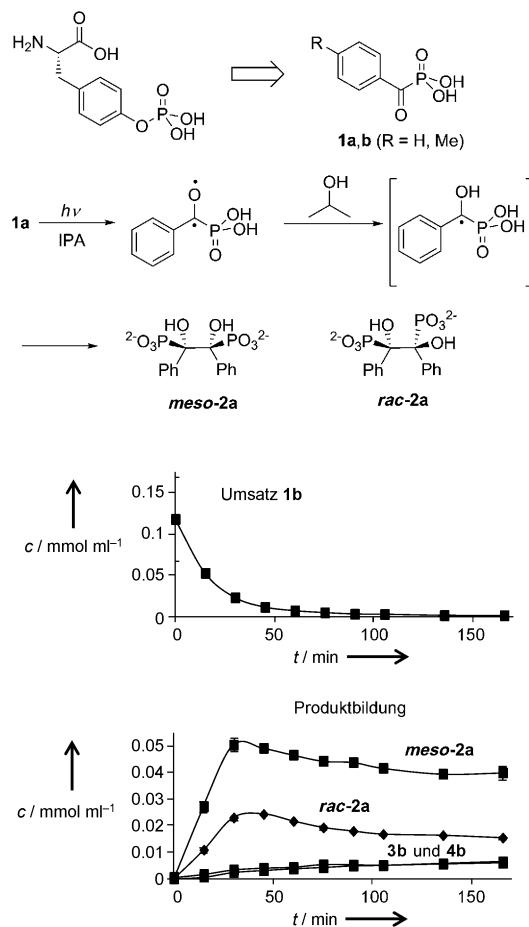
Dr. A. Horatscheck,^[+] Dr. B. G. Kim, Dr. M. Lisurek, Dr. S. Beligny,
Prof. Dr. J. Rademann
Abteilung für Medizinische Chemie
Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)

A. Schütz
Helmholtz Protein Production Facility
Max-Delbrück Center für Molekulare Medizin
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen und sind in der alphabetischen Reihenfolge ihrer Nachnamen aufgeführt.

[**] Wir bedanken uns für Unterstützung vonseiten der DFG (FOR 806, SFB 765) und von der Investitionsbank Berlin, ProFit-Projekt 10143721. MptpA wurde von Dr. Matthew Groves, EMBL-HH, bereitgestellt, STAT5b von Dr. Anne Diehl, FMP, unter Verwendung eines von Prof. Thorsten Berg, Leipzig, zur Verfügung gestellten Klons. Wir danken Natalja Erdmann, Janett Tischer und Tracy Dornblut für exzellente technische Unterstützung.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201201475> zu finden.



Schema 1. Oben: Photoaktivierung und Photovernetzung der Benzoylphosphonate **1a,b** als Phosphotyrosinbioisostere. IPA = 2-Propanol. Unten: Produkte der Reaktion des Ausgangsmaterials **1b** wurden durch LC/MS quantifiziert. **3b**: 4-Methylbenzaldehyd, **4b**: 4-Methylbenzoësäure.

vollständig. Durch Mercaptane wie Dithiothreitol und Glutathion wurde die Effizienz der Dimerisierung verringert.^[17] Die Produkte der Photodimerisierung wurden ausgehend von 4-Methylbenzoylphosphonat (**1b**) wegen der besseren Retention auf der RP-18-Säule quantifiziert (Schema 1, unten). Die Halbwertszeit von **1b** lag bei 15 min. Nach 40 min Bestrahlung wurden mehr als 90 % des wiedergewonnenen Materials in den beiden Dimeren *meso*- und *rac*-**2b** gefunden. Das Verhältnis der beiden Dimere zueinander war 2:1 zugunsten des kinetisch und thermodynamisch bevorzugten *meso*-Produkts. Um zu prüfen, ob eine Vernetzung des Benzoylphosphonats **1a** mit Peptiden möglich war, wurde das Modellpeptid FKIAG-NH₂ in Gegenwart von **1a** 4 h lang bestrahlt. LC/ToF-MS-Messungen offenbarten nur bei Bestrahlung die Bildung eines Benzoyladdukts, das durch die Vernetzung von **1a** und die nachfolgende Eliminierung von phosphoriger Säure gebildet worden sein könnte. Es ist unklar, ob die Eliminierung von phosphoriger Säure während der Bestrahlung im Puffer oder während der Ionisierung im Massenspektrometer stattfand.

Als Nächstes wurde das Benzoylphosphonat **1a** in Gegenwart der Phosphotyrosinbindungtaschen von Proteinty-

rosinphosphatase A aus *Mycobacterium tuberculosis* (MptpA) und dem die SH2-Domäne enthaltenden Transkriptionsfaktor STAT5b untersucht, die als Modellproteine fungierten. Docking-Experimente ließen auf bevorzugte Wechselwirkungen mit der P-Schleife von MptpA schließen, ähnlich denen, die für Phosphotyrosin vorhergesagt worden sind (Abbildung 1 A). Docking-Experimente mit der SH2-Domäne von STAT5b (modelliert ausgehend von einer Kristallstruktur von STAT5a) deuten ebenfalls auf eine Bindung hin (Abbildung 1 B). In beiden Fällen agierte die Carbonylgruppe als Wasserstoffbrückenakzeptor für eine Aminosäureseitenkette eines Asparaginsäure- oder Asparaginrests.

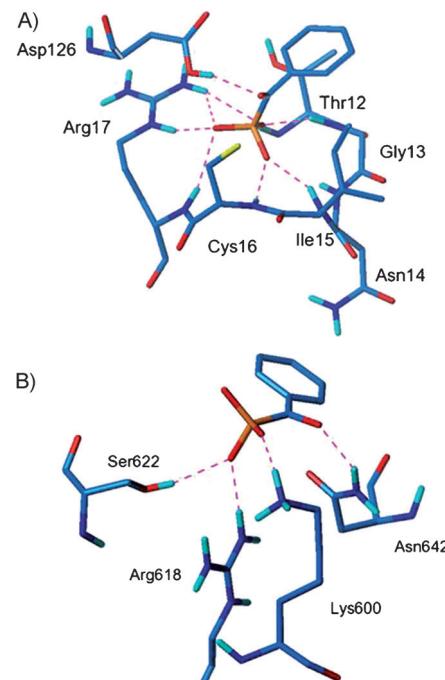
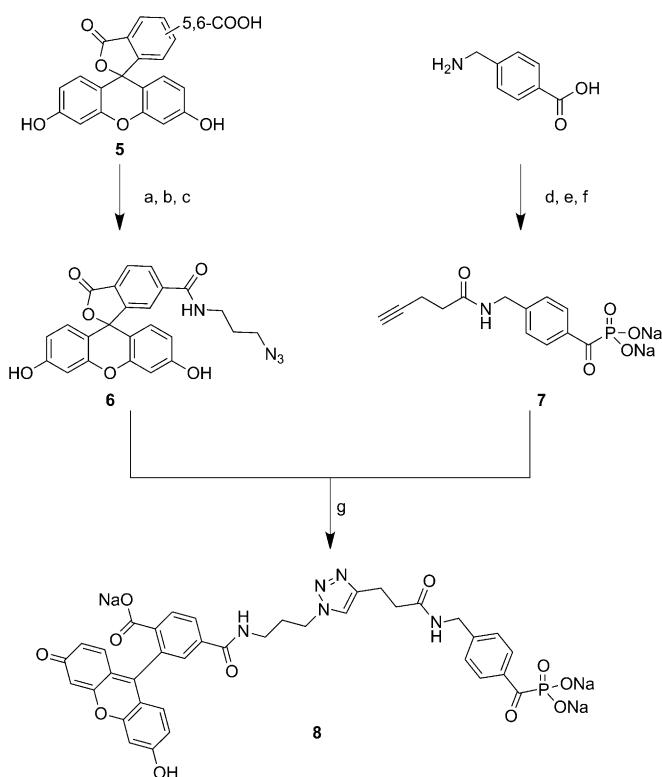


Abbildung 1. Docking-Experimente mit Benzoylphosphonat **1a** in der Phosphotyrosinbindungtasche der Proteintyrosinphosphatase A von *Mycobacterium tuberculosis* (MptpA) (A) und der SH2-Domäne von STAT5b (modelliert ausgehend von STAT5a; B).

Die Bindungsvorhersagen für die Phosphatase MptpA wurden durch das Messen der inhibitorischen Aktivität von **1a** verifiziert. Unter Verwendung von *p*-Nitrophenylphosphat (*p*NPP) als Substrat wurde die Enzymreaktion von MptpA kolorimetrisch bei 405 nm über die Detektion des Nitrophenolataniions verfolgt. **1a** inhibierte MptpA mit $IC_{50} \approx 1 \text{ mM}$. Wenn man berücksichtigt, dass der K_M -Wert für *p*NPP bei 2.3 mM liegt, entspricht dieser IC_{50} -Wert einem K_I -Wert von 186 μM unter Annahme eines kompetitiven Inhibitionsmodus.^[18] 45-minütige Bestrahlung von **1a** mit dem Protein MptpA in Tris(hydroxymethyl)-aminomethan(Tris)-Puffer und die anschließende Messung der PTP-Aktivität resultierten in einem verminderten IC_{50} -Wert von 84 μM , was auf die Desaktivierung der Phosphatase durch das bestrahlte Benzoylphosphonat hindeutet. Die Bestrahlung der Phosphatase und des Substrats allein veränderte die Aktivität nicht.

Zusätzlich wurde die Bindung des Benzoylphosphonats **1** an eines seiner Zielproteine unter Verwendung eines Fluoreszenz-markierten Derivats untersucht, um ein Vernetzungsprodukt nachzuweisen (Schema 2). Ausgehend von 4-



Schema 2. Herstellung von Fluorescein-markiertem Benzoylphosphonat **8**. Reaktionsbedingungen: a) Isobutyrilchlorid, Pyridin, CH_2Cl_2 , 0°C , 85%; nach Isomerentrennung wurde das 6-Isomer in 41% Ausbeute erhalten; b) 3-Azidoprop-1-ylamin, DCC, HOEt, THF, 88%; c) TFA, 60°C , 93%; d) Pent-4-inoyl-OSu, Na_2CO_3 , 87%; e) 1. $(\text{COCl})_2$, [DMF], CH_2Cl_2 ; 2. $\text{P}(\text{OBn})_3$, Toluol, 75%; f) TFA, 0°C , 92%; g) 1. **6**, **7**, NaAsc, CuSO_4 , $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$, basisch gepufferte HPLC; 2. Amberlite-IR-120-Kationentauscher, Na^+ -Form, H_2O , 40%. Asc = Ascorbat, DCC = *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid, HOEt = 1-Hydroxybenzotriazol, OSu = 1-Oxysuccinimid, TFA = Trifluoressigsäure.

Aminomethylbenzoësäure wurde das Pentinsäureamid **7** des 4-Aminomethylbenzoylphosphonats in drei Stufen hergestellt (siehe Hintergrundinformationen). Dipolare Cycloaddition mit dem 6-Fluoresceinylcarboxamid des 3-Azidoprop-1-ylamins **6** lieferte das Triazol **8** unter Kupfer(I)-Katalyse.^[19] **8** wurde zunächst als photoaktiver Inhibitor von PTP1B untersucht (Abbildung 2 A). Durch 45 min Bestrahlung wurde die Inhibition durch **8** von $\text{IC}_{50} = 1 \text{ mm}$ auf $28 \mu\text{M}$ verstärkt. Als nächstes wurden Vernetzungsprodukte von **8** mit der Proteintyrosinphosphatase PTP1B bei unterschiedlichen Konzentrationen in Tris-Puffer generiert und anschließend mit Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) getrennt (Abbildung 2 B,C). Fluoreszenz-markiertes PTP1B wurde bei einer Konzentration der Verbindung **8** von $125 \mu\text{M}$ und höher gefunden. Die Fluoreszenzintensität korrelierte mit den Konzentrationen des eingesetzten Fluoreszenzmarkers und des Proteins und belegte die kova-

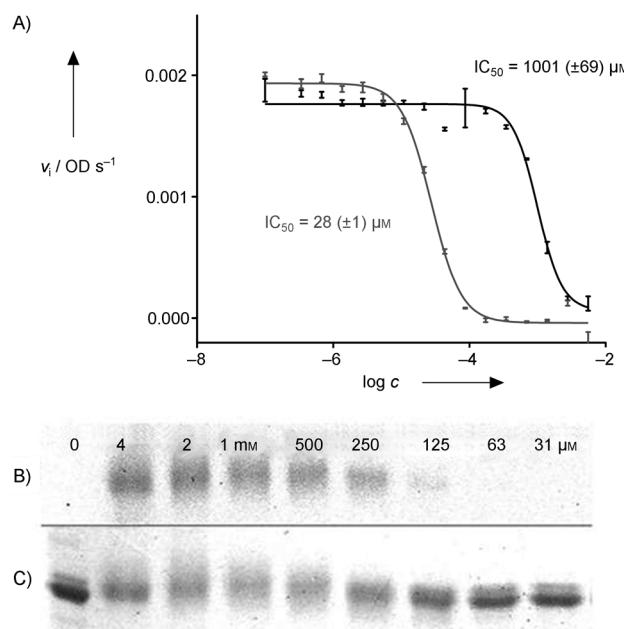
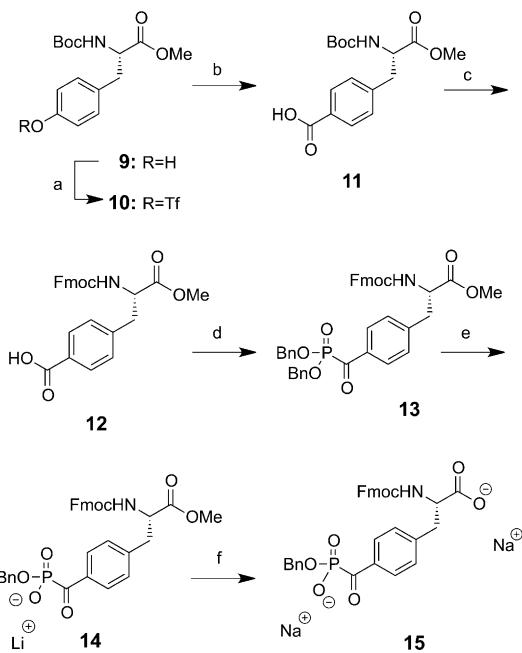


Abbildung 2. A) Inhibition (IC_{50} -Werte) von Proteintyrosin-Phosphatase PTP1B mit Benzoylphosphonat **8** im enzymatischen pNPP-Assay mit (grau) und ohne Bestrahlung (schwarz). OD = optische Dichte (405 nm), v_i = Anfangsgeschwindigkeit. Unten: B) Fluoreszenz von PTP1B mit **8** in der Gelelektrophorese (PAGE) nach Bestrahlung über 45 min detektiert. C) Das gleiche Gel, gefärbt mit Coomassie (zeitabhängige Experimente siehe Abbildung S5 (SI)).

lente Modifizierung von PTP1B. Zum Vergleich wurde das Gel mit Coomassie eingefärbt, um das gesamte Protein sichtbar zu machen. Fluoreszierende Proteinbanden konnten nur nach Bestrahlung in Gegenwart von **8** detektiert werden. Der Grad der kovalenten Proteinmodifizierung wurde bei drei Bestrahlungszeiten (20, 40, 60 min) und je bei drei Konzentrationen (0.25, 0.5 und 1 mm) untersucht, und die Proteinfluoreszenz nahm über die Zeit zu (siehe Abbildung S5 der Hintergrundinformationen (SI)). Längere Bestrahlungszeiten und höhere Sondenkonzentrationen führten jedoch zu einer Defokussierung der Proteinbande; daher waren kürzere Bestrahlung und geringere Sondenkonzentrationen vorteilhaft.

Phosphotyrosin(pTyr)-haltige Peptide sind die natürlichen und in vielen Fällen äußerst potente Liganden der Phosphotyrosinrezeptoren. Daher wurde vermutet, dass der Einbau von Benzoylphosphonat in Peptide in Form der nichtnatürlichen Aminosäure 4-(Phosphonocarbonyl)phenylalanin (pcPhe) eine Strategie sein könnte, um die Affinität, Vernetzungseffizienz und Spezifität des photoaktiven Phosphotyrosinesters zu seinen Zielproteinen zu erhöhen (Schema 3). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde eine Synthese von *N*-Fmoc-4-(*O*-Benzylphosphonocarbonyl)phenylalanin (**15**) als Baustein für die direkte Integration des Benzoylphosphonats in Peptide entworfen (Schema 3).

Enantiomerenreiner *N*-Boc-L-Tyrosinmethylester **9** wurde zunächst mit *N*-Phenylbis(trifluormethylsulfonimid) sulfonyliert und lieferte *N*-Boc-*O*-Triflyltyrosinmethylester **10**.^[20] Dieser wurde unter Einsatz von gasförmigem Kohlenmonoxid und Palladiumacetat mit 1,3-Bis(diphenylphospho-

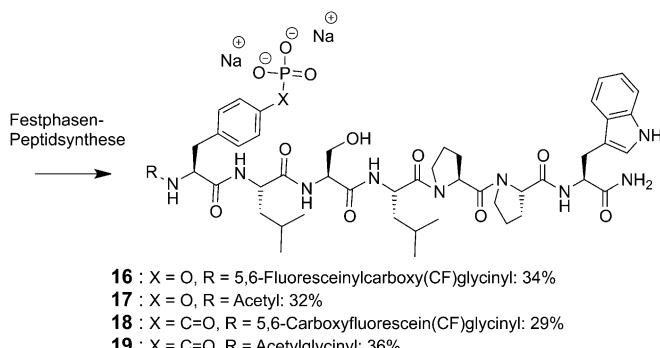


Schema 3. Reaktionsbedingungen: a) *N*-Phenylbis(trifluoromethylsulfonyl)imid, Et₃N, CH₂Cl₂, 0°C, 96%; b) dppp, Pd(OAc)₂, CO(g), DIPEA, DMF/H₂O 3:1, 70°C, 89%; c) TFA, CH₂Cl₂; FmocOSu, Na₂CO₃, Aceton/H₂O, 0°C, 87%; d) (COCl)₂, DMF, CH₂Cl₂; P(OBu)₃, Toluol, 75%; e) LiBr, MeCN; f) Subtilisin Carlsberg, wässr. NH₄HCO₃, pH 8; Amberlite IR-120, Na⁺-Form, H₂O, 89%. Bn = Benzyl, Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, DIPEA = Diisopropylethylamin, dppp = 1,3-Bis(diphenylphosphanyl)propan, Fmoc = 9-Fluorenylmethyloxycarbonyl, Fmoc-OSu = Fmoc-1-Oxysuccinimid.

nyl)propan als Katalysator in einer Ausbeute von 89% carboxyliert.^[21] Der erhaltene *N*-Boc-4-Carboxyphenylalaninmethylester **11** wurde mit TFA am Stickstoffatom entschützt und dann erneut mit Fmoc-Succinimid geschützt. Dabei entstand das Benzoesäurederivat **12**, das als Carbonsäurechlorid aktiviert und in einer Michaelis-Arbuzow-Acylierung von Tribenzylphosphorit verwendet wurde, wodurch das *O,O'*-(Dibenzylphosphonocarbonyl)-Derivat des *N*-Fmoc-Phenylalaninmethylesters, **13**, erhalten wurde.^[22] Da das Dibenzylphosphonat **13** schnell durch Piperidin^[23] gespalten wurde – also unter Bedingungen, die für die Fmoc-Entschützung verwendet werden – wurde mit Lithiumbromid eine nukleophile Monodebenzylierung von **13** durchgeführt, die das Monobenzylphosphonat **14** erzeugte.^[24] Dieses monobenzylgeschützte Benzoylphosphonat war unter den basischen Bedingungen der Fmoc-Entschützung ausreichend stabil. Als Nächstes wurde der Methylester **14** enzymatisch mit Subtilisin Carlsberg („Alkalase“) bei pH 8 verseift.^[25] Die beiden Säuregruppen des Moleküls wurden mithilfe eines Natrium-beladenen Amberlite-IR-120-Ionenaustauscherharzes in die Natriumsalze überführt, wodurch der *N*-Fmoc-geschützte 4-(*O*-Benzylphosphonocarbonyl)phenylalanin-Baustein **15** zur Verwendung in der Peptidfestphasensynthese erhalten wurde. Der Ionenaustausch war essenziell, um ein stabiles Produkt **15** ($[\alpha]_{D25^\circ\text{C}} = +25.0^\circ$, $c = 1.0$, H₂O) zu erhalten, das über Monate ohne Racemisierung oder Hydrolyse der Carbonyl-Phosphonat-Bindung aufbewahrt werden konnte.

Als erstes Zielprotein für photoaktive Phosphotyrosinpeptidmimetika wurde das Protein STAT5b ausgewählt, das eine Phosphotyrosin erkennende SH2-Domäne enthält. Im zellulären Kontext wird STAT5 an einem Tyrosinrest überwiegend durch die JAK2-Kinase^[26] phosphoryliert. Das Protein bindet an einige Rezeptoren, darunter die Erythropoietin-^[26,27] und Interleukin-2-Rezeptoren,^[26,28,29] was die Bildung und Dimerisierung von Phospho-STAT5 zur Folge hat.^[26,29,30] Phospho-STAT5-Dimere werden in den Zellkern transportiert, wo sie als Transkriptionsfaktoren agieren. Konstitutive Aktivierung oder Überexpression von STAT5 wurde für einige Leukämieformen nachgewiesen. Für unsere Experimente wurde STAT5b als Konjugat mit dem als Aufreinigungsmarker fungierenden Maltosebindungsprotein (MBP) rekombinant exprimiert und lieferte ein Proteinkonstrukt von 120 kDa.^[14]

Einige von STAT5 bindenden Proteinen abgeleitete Phosphotyrosinpeptide wurden synthetisiert und als Liganden von STAT5 getestet. Für Bindungsstudien wurden die Peptide N-terminal mit 5,6-Carboxyfluorescein (CF) markiert. Das Octapeptid *N*-CF-Gly-pTyr-Leu-Ser-Leu-Pro-Pro-Trp-NH₂ (**16**) aus der β-Untereinheit des GM-CSF-Rezeptors wurde als potentester Ligand von STAT5 identifiziert und zeigte im Fluoreszenzpolarisationsassay eine Dissoziationskonstante (K_D) von 42 nm (Schema 4, Tabelle 1). Das N-



Schema 4. Synthese der Phosphotyrosinpeptide **16** und **17** sowie der entsprechenden 4-(Phosphonocarbonyl)phenylalanin-Derivate **18** und **19** zur Anwendung in Bindungsassays und für die kovalente Photomarkierung von Proteinen.

acetylierte Derivat von **16**, Peptid **17**, war in der Lage, mit **16** um die Bindung an STAT5 mit einem K_1 -Wert von 604 nm zu konkurrieren. Benzoylphosphonat **1a** zeigte einen IC_{50} -Wert von 840 μM , entsprechend einem K_1 -Wert von 326 μM .^[31] Bestrahlung der Sonde führte zu einer signifikanten Steigerung der gemessenen Affinität zu $IC_{50} \approx 457 \mu\text{M}$ nach 4 h (Tabelle 2).

Als Nächstes wurden die 4-(Phosphonocarbonyl)peptide **18** ($R = N$ -Carboxyfluoresceinylglycinyl) und **19** ($R = N$ -Acetylglycinyl), die hypothetischen, photoaktiven Mimetika der Phosphotyrosinpeptide **16** und **17** synthetisiert (Schema 4). Fmoc-geschützte Aminosäurebausteine wurden dazu durch Diisopropylcarbodiimid/HOBt-Aktivierung an Rinkamidlinker gekuppelt. Der geschützte 4-(Phosphonocarbonyl)-Baustein **15** und die folgende Aminosäure wurden

Tabelle 1: Bindungsaffinitäten Phosphotyrosin- und Benzoylphosphonat-basierter Peptide zu STAT5b.^[a]

Peptide	K_D , K_I
16	CF-GpYLSLPPW-NH ₂
17	Ac-pYLSLPPW-NH ₂
18	CF-GpcFSLPPW-NH ₂
19	Ac-GpcFSLPPW-NH ₂

[a] Ohne Bestrahlung. K_I -Werte wurden mit einer Gleichung von Nikolovska-Coleska et al.^[31] aus IC_{50} -Werten berechnet. pcF=4-(Phosphonocarbonyl)phenylalanin.

Tabelle 2: IC_{50} -Werte von Benzoylphosphonat **1** gegen MptpA, PTP1B und STAT5b vor und nach Bestrahlung.

	ohne Bestrahlung	mit Bestrahlung
MptpA (1a)	993 (± 46) μM	84 (± 9) μM ^[a]
STAT5b (1a)	840 (± 126) μM	457 (± 47) μM ^[b]
PTP1B (1a)	ca. 4 mM	8.9 (± 0.3) μM
PTP1B (8)	1001 (± 69) μM	28 (± 1) μM

[a] 45 min Bestrahlung. [b] 240 min Bestrahlung.

nach Aktivierung mit *O*-(Benzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-tetrafluoroborat (TBTU) und DIPEA gekuppelt. Die Kupplung verlief mit hoher Effizienz, wie ein negativer Kaisertest anzeigen. Nach Einbau von **15** wurden die anschließenden Fmoc-Entschützungen mit 2% 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) in DMF durchgeführt^[32] (1 min, 10 min), um die partielle Spaltung des Phosphonats zu vermeiden.^[33] Abspaltung der Peptide **18** und **19** vom Harz wurde mit reiner TFA durchgeführt. Thiolnukleophile wurden an diesem Punkt vermieden, da sie zur Bildung von Dithioketalen führten. Nach der Abspaltung wurde die TFA im Stickstoffstrom entfernt, und die Rohpeptide wurden in wässrigem NH_4HCO_3 gelöst. Die Aufreinigung mithilfe von HPLC erfolgte in basischem Ammoniumhydrogencarbonatpuffer bei pH 8 und lieferte die Peptide **18** und **19** in Ausbeuten von 29 bzw. 36%. Die Produkte waren unter leicht basischen und neutralen Bedingungen stabil. Um intramolekulare Photoreaktionen der synthetisierten Peptidsonden **18** und **19** auszuschließen, verglichen wir ihre Photostabilität ohne das Zielprotein.

Die Proben wurden in 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure(HEPES)-Puffer bei 4°C bestrahlten und nach verschiedenen Zeiten mithilfe von HPLC analysiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Danach wurde die Bindung von **18** an STAT5-Protein untersucht, und im Fluoreszenzpolarisationsassay wurde ein K_D -Wert von 0.9 μM bestimmt (Tabelle 1). Die Bindung von **19** wurde im Verdrängungsexperiment mit **16** evaluiert, und ein K_I -Wert von 11 μM ($IC_{50}=28 \mu\text{M}$) wurde gemessen. Nach Bestrahlung konnte eine signifikante, zeitabhängige Abnahme des gemessenen IC_{50} -Werts beobachtet werden, die in $IC_{50}=13 \mu\text{M}$ nach 4 h resultierte, während der inhibitorische Effekt von **17** unverändert blieb.

Nachdem die Erkennung der Peptide **18** und **19** durch das MBP-STAT5b-Proteinkonstrukt belegt worden war, wurde das Photovernetzungspotenzial des Liganden erforscht. Zu

diesem Zweck wurden Proteinlösungen mit dem 4-(Phosphonocarbonyl)phenylalaninpeptid unterschiedlicher Konzentrationen in HEPES-Puffer in Mikrotiterplatten mit 384 Vertiefungen mit transparentem Boden bei 365 nm von unten mit einem Transilluminator bestrahlt. Die erhaltenen Proteinlösungen wurden mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese analysiert. Lediglich bestrahlte Proben wiesen eine Fluoreszenzbande auf. Die Gele wurden zur Kontrolle mit Coomassie angefärbt. Die Proteinmenge und die Form der Proteinbanden wurden durch die Bestrahlung nicht verändert. Die Markierung wurde mit einem Lumi-Imager quantifiziert und war konzentrationsabhängig in Bezug auf das Protein und das photovernetende Peptid **18** (siehe Abbildungen 3A sowie S6, S7 (SI)).

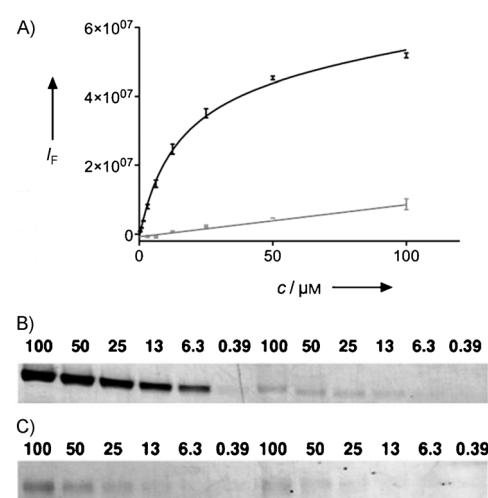


Abbildung 3. Experimente zur Verifizierung der Spezifität der Photomarkierung von MBP-STAT5b mit dem photoaktiven Mimetikum **18**. A) Photomarkierungsexperimente unter Variation der Sondenkonzentration von **18** bei gleichen Konzentrationen von STAT5b (schwarz) und von BSA (grau), quantifiziert auf dem SDS-Polyacrylamidgel (invertierte Fluoreszenz und Coomassie-Bilder des Gels siehe Abbildungen S8 und S9 (SI)). B) Photomarkierung von MBP-STAT5b bei unterschiedlichen μM -Konzentrationen von **18** ohne (links) und mit Denaturierung (rechts) des Proteins mit 6 M Harnstoff (siehe Abbildungen S10 und S11 (SI)). C) Photomarkierung von BSA ohne (links) und mit Proteindenaturierung (rechts) durch 6 M Harnstoff (siehe Abbildungen S10 und S11 (SI)).

Die Photomarkierungseffizienz, definiert als die Sondenkonzentration bei halbmaximaler Markierung, lag bei 18 μM . Die Zeitabhängigkeit der Photomarkierung wurde über 120 min bei verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Bei niedriger Konzentration (2.5 μM) des photoaktiven Reagens **18** wurde über die gesamte Zeitspanne eine nahezu lineare Zunahme beobachtet, wohingegen die Proteinfluoreszenz bei hoher Konzentration (40 μM) nach 20–30 min gesättigt war (Abbildungen S14–S16 (SI)).

Im Unterschied dazu resultierte die Bestrahlung von **18** in Gegenwart von Rinderserumalbumin (BSA) als Kontrollprotein ohne Phosphotyrosinerkennungsstellen in unspezifischer Markierung, die nicht gesättigt wurde und auch bei sehr

hohen Konzentrationen der photoreaktiven Sonde linear zunahm (Abbildungen 3A sowie S8, S9 (SI)).

Zusätzlich wurde die Spezifität der Photomarkierung durch die Denaturierung des Zielproteins mit 6M Harnstoff verifiziert (Abbildungen 3B,C sowie S10, S11 (SI)). Nur korrekt gefaltetes STAT5b wurde kovalent modifiziert, denaturiertes STAT5, BSA und denaturiertes BSA wurden nicht markiert. Schließlich wurde die Spezifität der Photomarkierung durch die Verwendung des nichtfluoreszierenden, Phosphotyrosin-haltigen Kontrollpeptids **17** als kompetitives Moleköl weiter erhärtet, das die Photomarkierung mit **18** konzentrationsabhängig unterdrückte, während es keine Wirkung auf die unspezifische Photomarkierung zeigte (Abbildung 4 sowie S12, S13 (SI)).

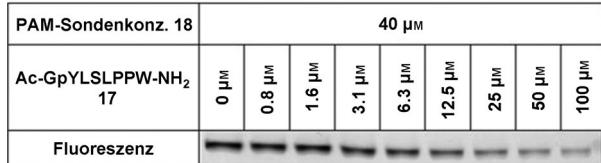
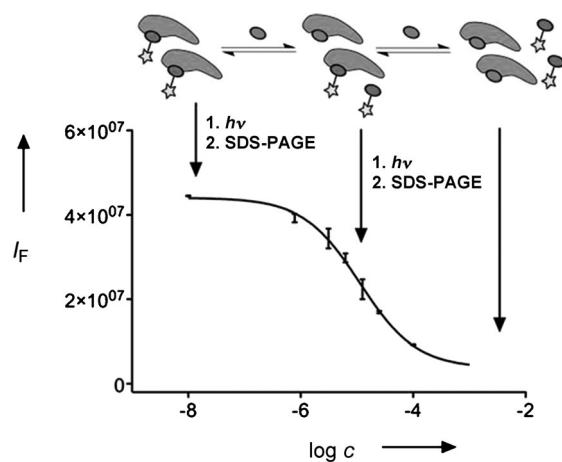


Abbildung 4. Kompetitive Verdrängung der PAM-Sonde **18** (PAM = photoaktives Mimetikum) durch das acetylierte Phosphotyrosinpeptid **17** resultierte in der Unterdrückung der Markierung. Die Photomarkierung wurde aus dem invertierten Fluoreszenzbild des SDS-Polyacrylamid-Gels quantifiziert (vollständiges Fluoreszenzbild siehe Abbildung S12 (SI), Coomassie-Kontrollfärbung siehe Abbildung S13 (SI)).

Wir haben hier demonstriert, dass Benzoylphosphonate photoaktive Bioisostere von Phosphotyrosinresten sind. Ebenso wurde bewiesen, dass 4-(Phosphonocarbonyl)phenylalanin-haltige Peptide photoaktive Mimetika von nativen Phosphotyrosinpeptiden sind. Die bioisosteren Fragmente und Peptidmimetika binden beide reversibel an Phosphotyrosin erkennende Proteindomänen. Bei Bestrahlung mit Licht führte die Photoaktivierung der Benzoylphosphonate zur funktionellen Desaktivierung und kovalenten Modifizierung der Zielproteine STAT5b, PTP1B und MptpA. Der Grad der kovalenten Markierung korrelierte mit den Konzentrationen und der Bestrahlungszeit. Besonders wichtig ist es, dass die Phosphotyrosinpeptidmimetika ihre Zielproteine

mit hoher Spezifität für die Phosphotyrosinbindungsstasche markierten. Die photochemische Ligationsreaktion wurde konzentrationsabhängig gesättigt, und die Markierung konnte durch Denaturierung des Proteins und die Verwendung von nativem Phosphotyrosinpeptid als kompetitivem Liganden unterdrückt werden.

Nach unserer Kenntnis ist diese Arbeit das erste Beispiel eines photoaktiven Bioisosters, also einer chemischen Entität, die eine photovernetzende Aktivität mit einer biomimetischen Funktion in derselben bioisosteren Gruppe vereint. Photoaktive Bioisostere könnten Anwendungen in der funktionellen Zellbiologie, Bioanalytik und Proteomforschung finden.

Eingegangen am 22. Februar 2012,
veränderte Fassung am 31. Mai 2012
Online veröffentlicht am 21. August 2012

Stichwörter: Phosphotyrosin-Isostere · Photoaffinitätsmarkierung · Photochemie · Proteine · Proteintyrosinphosphatasen

- [1] M. A. Lemmon, J. Schlessinger, *Cell* **2010**, *141*, 1117–1134.
- [2] T. Pawson, J. D. Scott, *Science* **1997**, *278*, 2075–2080.
- [3] a) A. Kamat, G. Carpenter, *Cytokine Growth Factor Rev.* **1997**, *8*, 109–117; b) J. D. Bjorge, A. Jakymiw, D. J. Fujita, *Oncogene* **2000**, *19*, 5620–5635; c) B. G. Neel, H. Gu, L. Pao, *Trends Biochem. Sci.* **2003**, *28*, 284–293.
- [4] D. E. Levy, J. E. Darnell, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 651–662.
- [5] a) T. R. Burke, Z. Yao, D. Liu, J. Voigt, Y. Gao, *Biopolymers* **2001**, *60*, 32–44; b) M. A. T. Blaskovich, *Curr. Med. Chem.* **2009**, *16*, 2095–2176.
- [6] a) Y. Hatanaka, Y. Sadakane, *Curr. Top. Med. Chem.* **2002**, *2*, 271–288; b) M. Thérien, K. Skorey, R. Zamboni, C. S. Li, C. K. Lau, T. LeRiche, V. Linh Truong, D. Waddleton, C. Ramachandran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14*, 2319–2322; c) M. Sydnes, M. Kuse, M. Kurono, A. Shimomura, H. Ohinata, A. Takai, M. Isobe, *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 1747–1755.
- [7] a) I. Marseigne, B. P. Roques, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 3621–3624; b) S. M. Domchek, K. R. Auger, S. Chatterjee, T. R. Burke, Jr., S. E. Shoelson, *Biochemistry* **1992**, *31*, 9865–9870.
- [8] a) T. R. Burke, Jr., M. S. Smyth, A. Otaka, M. Nomizu, P. P. Roller, G. Wolf, R. Case, S. E. Shoelson, *Biochemistry* **1994**, *33*, 6490–6494; b) T. R. Burke, Jr., H. K. Kole, P. P. Roller, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1994**, *204*, 129–134; c) T. R. Burke, Jr., *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, *6*, 1465–1471.
- [9] a) A. Combs et al., *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 6544–6548; b) P. J. Ala et al., *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 32784–32795.
- [10] M. F. Schmidt, M. Groves, J. Rademann, *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2640–2646.
- [11] a) M. Schmidt, A. Isidro-Llobet, A. El-Dahshan, M. Lisurek, J. Tan, R. Hilgenfeld, J. Rademann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 3319–3323; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 3275–3278; b) M. Schmidt, A. El-Dahshan, S. Keller, J. Rademann, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 6464–6467; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 6346–6349; c) M. Schmidt, J. Rademann, *Trends Biotechnol.* **2009**, *27*, 512–521.
- [12] D. Krishnamurthy, A. M. Barrios, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 375–381.
- [13] Photodimerisierung von Ketophosphonatestern: K. Terauchi, H. Sakurai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1970**, *43*, 883–890.

- [14] G. D. Kishore Kumar, D. Saenz, G. L. Lokesh, A. Natarajan, *Tetrahedron Lett.* **2006**, *47*, 6281–6284.
- [15] Spektren von Ketophosphonatestern: K. Terauchi, H. Sakurai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1969**, *42*, 821–823.
- [16] J. N. J. Pitts, R. L. Letsinger, R. P. Taylor, J. M. Patterson, G. Recktenwald, R. B. Martin, *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 1068–1077.
- [17] Der gleiche Effekt wurde für Benzophenon beschrieben: S. Cohen, W. Sherman, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 1642–1647.
- [18] Y. Cheng, W. H. Prusoff, *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099–3108.
- [19] a) M. Meldal, C. W. Tornøe, C. Christensen, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057–3064; 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.
- [20] J. W. Tilley, R. Sarabu, R. Wagner, K. Mulkerins, *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 906–910.
- [21] Reaktionsbedingungen modifiziert nach: J. B. Grimm, K. J. Wilson, D. J. Witter, *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 4509–4513.
- [22] Reaktionsbedingungen modifiziert nach: J. Wrobel, A. Dietrich, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 3543–3546.
- [23] M. S. Sekine, M. Satoh, H. Yamagata, T. Hata, *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4162–4167.
- [24] Reaktionsbedingungen analog zu: R. Karaman, A. Goldblum, E. Breuer, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1989**, 765–774.
- [25] S. T. Chen, W.-H. Huang, K.-T. Wang, *Chirality* **1994**, *6*, 572–576. Die Literaturprozedur musste wie beschrieben modifiziert werden.
- [26] P. M. Grimley, F. Dong, H. Rui, *Cytokine Growth Factor Rev.* **1999**, *10*, 131–157.
- [27] F. W. Quelle, D. Wang, T. Nosaka, W. E. Thierfelder, D. Stravopodris, Y. Weinstein, J. E. Ihle, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 1622–1631.
- [28] Z.-Y. Zhang, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 209–234.
- [29] a) J. Hou, U. Schindler, W. J. Henzel, S. C. Wong, S. L. McKnight, *Immunity* **1995**, *2*, 321–329; b) H. Wakao, N. Harada, T. Kitamura, A. L.-F. Mui, A. Miyajima, *EMBO J.* **1995**, *14*, 2527–2535.
- [30] a) A. Meinke, F. Barahmand-Pour, S. Wöhrl, D. Stoiber, T. Decker, *Mol. Cell. Biol.* **1996**, *16*, 6937–6944; b) N. Cella, B. Groner, N. E. Hynes, *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18*, 1783–1792.
- [31] Z. Nikolovska-Coleska, R. Wang, X. Fang, H. Pan, Y. Tomita, P. Li, P. P. Roller, K. Krajewski, N. G. Saito, J. A. Stuckey, S. Wang, *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 261–273.
- [32] J. D. Wade, J. Bedford, R. C. Sheppard, G. W. Tregear, *Pept. Res.* **1991**, *4*, 194–199.
- [33] Fmoc-Entschützung mit Piperidin/DMF 20:80 resultierte in einer partiellen Spaltung der Carbonyl-Phosphonat-Bindung und der Bildung des Piperidinamids, typischerweise im Bereich von 20% nach drei Zyklen der Fmoc-Entschützung.