

# „Vollständig funktionalisierte“ Verbindungsbibliotheken zur effizienteren Targetidentifizierung nach phänotypischen Screens

Julian Oeljeklaus, Farnusch Kaschani und Markus Kaiser\*

Chemische Biologie · Phänotypen · Photoaffinitätsmarkierung · Targetidentifizierung · Verbindungsbibliotheken

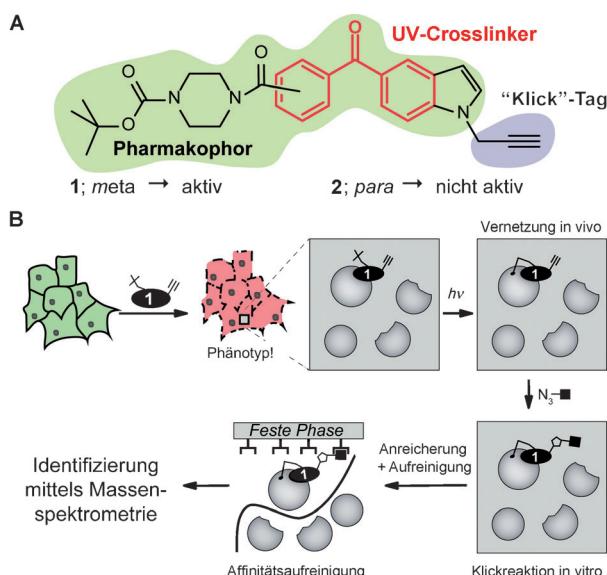
Bioaktive niedermolekulare Verbindungen stellen heutzutage wichtige chemische Werkzeuge zum Studium biologischer Prozesse dar.<sup>[1]</sup> Somit ist die Auffindung chemischer Sonden mit neuartigen Wirkmechanismen von großer Bedeutung und kann zum Beispiel durch ein systematisches Durchmustern von Substanzbibliotheken nach Phänotyp-induzierenden bioaktiven Verbindungen erreicht werden.<sup>[2]</sup> Solche phänotypischen Screens liefern oftmals biologisch relevantere Treffer als Target-gerichtete Screens, da sie unter physiologischen Bedingungen ganze Signalwege und nicht nur isolierte Proteine berücksichtigen. Demgegenüber steht der Nachteil, dass in einem zweiten Schritt die entsprechenden Zielproteine der aufgefundenen Verbindungen identifiziert werden müssen.<sup>[3]</sup> Obwohl in den letzten Jahren unbestreitbar signifikante methodische Fortschritte bei der Targetidentifizierung gemacht wurden, bleibt dieser Schritt eine Herausforderung und verringert die Effizienz phänotypischer Screening-Kampagnen.<sup>[4]</sup> Dies wird bedingt durch die oft geringen Bindungsaffinitäten der im Screening identifizierten Verbindungen bzw. durch die bei den meisten Targetidentifizierungsmethoden bestehende Notwendigkeit der Anreicherung potentiell bindender Proteine über eine Affinitätschromatographie. So lassen sich z. B. schwach bindende oder von der nativen Umgebung abhängige Targetproteine nur äußerst schwer auffinden. Im Gegensatz dazu ist die Targetidentifizierung von bioreaktiven Molekülen, die eine kovalente Bindung mit dem Protein bilden, eine viel leichtere Aufgabe. Zwar basiert auch diese Methode auf einer Proteinanreicherung über eine Affinitätsaufréinigung; durch die irreversible kovalente Wechselwirkung mit dem Targetprotein können jedoch harschere Aufreinigungsmethoden verwendet werden, wodurch reinere Proteinproben und somit leichtere und eindeutigere Proteinanalysen möglich werden.<sup>[5]</sup>

Die Arbeitsgruppe Cravatt hat in den letzten Jahren bahnbrechende Arbeit auf dem Gebiet der chemischen Pro-

teomik geleistet und dabei effiziente und zuverlässige Methoden zur Targetidentifizierung reaktiver Verbindungen etabliert.<sup>[6]</sup> In einer neueren Arbeit wurde nun ein neuartiger, eleganter Ansatz zur Effizienzsteigerung bei phänotypischen Screens vorgestellt.<sup>[7]</sup> Die geniale, dennoch simple Idee hinter ihrem Konzept besteht darin, phänotypische Screens mit bioreaktiven Verbindungen durchzuführen. Interessanterweise ist dieses Konzept nicht neu, und die Machbarkeit eines solchen Ansatzes wurde bereits in vorherigen Studien aufgezeigt.<sup>[8]</sup> Jedoch basierte bei diesen Studien die Ausbildung der kovalenten Bindung auf einer komplementären Reaktivität zwischen der bioreaktiven Verbindung und einer Aminosäure in der interagierenden Proteinbindungstasche und ist somit nicht allgemein anwendbar. Demgegenüber erlaubt das Integrieren einer photoreaktiven Gruppe, welche unter UV-Bestrahlung mit fast allen in räumlicher Nähe vorhandenen Proteinbestandteilen reagiert, eine Bindungsstellen-unabhängige Ausbildung einer kovalenten Bindung. Deshalb schlagen Cisar und Cravatt vor, „vollständig funktionalisierte“ Verbindungsbibliotheken herzustellen und in phänotypischen Screens zu verwenden.<sup>[7]</sup> Solche „vollständig funktionalisierten“ Verbindungen bestehen aus 1) einer photoreaktiven Gruppe (z. B. Benzophenon), welche in das eigentliche pharmakologische Strukturelement integriert wird und 2) einer Alkin-Modifizierung, welche nach der Photoaffinitätsmarkierung der entsprechenden Zielproteine eine anschließende Proteinanreicherung mittels Klick-Chemie möglich macht (Abbildung 1A). Somit verfügen diese „vollständig funktionalisierten“ Verbindungen über alle chemischen Funktionalitäten, um phänotypische Screens und anschließende Proteomik-basierte Identifikationen der photoaffinitätsmarkierten Proteine durchzuführen (Abbildung 1B). Dementsprechend sollte ein solcher Ansatz neuartige niedermolekulare Sonden in einer besonders effizienten Art und Weise generieren.

Um einen Machbarkeitsbeweis für diesen Ansatz zu liefern, synthetisierten Cisar und Cravatt exemplarisch zwei Verbindungsbibliotheken, welche entweder auf dem Strukturmotiv 5-Benzoylindol (BzIndol, Abbildung 1A) oder 7-Benzoylbenzo-1,4-diazepin-2,5-dion (BzBD) basierten und somit eine photoreaktive Benzophenon-Gruppe enthielten.<sup>[7]</sup> Anschließende Markierungsexperimente, die mithilfe von

[\*] J. Oeljeklaus, Dr. F. Kaschani, Prof. Dr. M. Kaiser  
Zentrum für Medizinische Biotechnologie  
Fakultät für Biologie, Universität Duisburg-Essen  
Universitätsstr. 2, 45117 Essen (Deutschland)  
E-Mail: markus.kaiser@uni-due.de



**Abbildung 1.** A) Strukturformeln der „vollständig funktionalisierten“ Verbindungen **1** (aktiv) und **2** (inaktiv), die mittels phänotypischem Screening entdeckt wurden.<sup>[7]</sup> B) Arbeitsablauf eines phänotypischen Screens mit „vollständig funktionalisierten“ Verbindungsbibliotheken.

Gelelektrophorese ausgewertet wurden, mit MDA-MB-231-Krebszellen lieferten dann den Hinweis, dass die hergestellten Verbindungen trotz der Fokussierung der Bibliotheken beachtlich verschiedene Bioreaktivitäten aufwiesen. In einem anschließenden phänotypischen Screen wurde dann eine Substanz (**1**, Abbildung 1 A) aufgefunden, welche bei niedrigen, nicht jedoch hohen Glucosekonzentrationen eine antiproliferative Aktivität in MDA-MB-231 Krebszellen zeigte. Die strukturell verwandte Verbindung **2** (Abbildung 1 A), welche sich von **1** nur durch eine Verschiebung der *tert*-Butyloxycarbamoylpirazincarbonyl-Gruppe von der *meta*- zur *para*-Position unterscheidet, war hingegen inaktiv. Um die zellulären Zielproteine, die den phänotypischen Effekt hervorrufen, zu identifizieren, führten Cesar und Cravatt dann SILAC-Experimente durch (SILAC: stable isotope labeling with amino acids in cell culture). Dazu ließen sie Zellen in Gegenwart isotopenmarkierter Aminosäuren wachsen, inkubierten sie dann mit der aktiven (**1**) oder inaktiven Verbindung (**2**), bestrahlten sie mit UV-Licht und reicherten dann entsprechend gebundene Proteine mittels einer Sequenz aus Klick-Chemie und Affinitätschromatographie an. Nachfolgende massenspektrometrische Analysen führten zur Identifizierung der Proteine Epoxid-Hydrolase-1 (EPHX1) und der mitochondrial codierten Dehydrogenase-1 (MT-ND1), einer Untereinheit des mitochondrialen Komplexes I. Parallel dazu durchgeführte Markierungsexperimente, die mithilfe von Gelelektrophorese ausgewertet wurden, untermauerten diese Ergebnisse. Daher wurde in einem letzten Schritt der Effekt der Verbindungen auf den mitochondrialen Komplex I, welcher eine wichtige Rolle bei der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung spielt und MT-ND1 enthält, untersucht. Verbindung **1** hemmte den Komplex I im nanomolaren Konzentrationsbereich, während die inaktive Verbindung **2** eine zehnfach geringere Hemmung zeigte.

Obwohl die Autoren nicht weiter untersuchten, ob nicht auch EPHX1 eine Rolle beim Wachstum der Krebszellen spielt, zeigten ihre Ergebnisse deutlich, dass der antiproliferative Effekt mit der Hemmung von MT-ND1 zusammenhängt. Insgesamt haben die Autoren somit eindrucksvoll demonstriert, dass die Anwendung von „vollständig funktionalisierten“ Verbindungskollektionen zu einer maßgeblichen Effizienzsteigerung der Targetprotein-Identifizierung nach im Hochdurchsatzverfahren durchgeföhrten phänotypischen Screens beitragen kann.

Trotz der Vorteile ist das vorgestellte Konzept natürlich auch mit einigen Handicaps belastet. So werden in Zukunft viel größere Bibliotheken von „vollständig funktionalisierten“ Verbindungen für Hochdurchsatzanalysen benötigt. Da dieser neue Ansatz jedoch nicht auf bereits bestehende „klassische“ Verbindungsbibliotheken angewendet werden kann, muss zur Generierung der Kollektionen ein großer (und teurer) synthetischer Aufwand betrieben werden. Die geringe Anzahl unterschiedlicher photoreaktiver Gruppen, die meist auf Benzophenon- oder Trifluormethyliazirin-Motiven basieren, ist ein zweiter schwerwiegender Nachteil. Da diese Komponenten jedoch ein integraler Teil der zu testenden Verbindungen sind, hat dies direkte Auswirkungen auf die chemisch-strukturelle Diversität der Verbindungsbibliotheken. Des Weiteren haben photoreaktive Gruppen nur eine begrenzte chemische Stabilität gegenüber etlichen Reaktionsbedingungen, welche häufig bei der Synthese von Verbindungskollektionen angewendet werden. Diese Einschränkungen machen somit eine Weiterentwicklung von neuen, strukturell verschiedenen und chemisch stabileren photoreaktiven Gruppen notwendig, um so den Anwendungsbereich von „vollständig funktionalisierten“ Verbindungsbibliotheken zu erweitern. Zuletzt sollte noch vermerkt werden, dass die Effizienz der Photomarkierung von Zielproteinen natürlich auch von der Bindungsaffinität bzw. dem Bindungsmodus abhängt, sodass – ungeachtet der Verwendung von „vollständig funktionalisierten“ Verbindungen – die Targetprotein-Identifizierung in manchen Fällen auch weiterhin sehr anspruchsvoll bleiben wird. Somit verbleiben weitere Herausforderungen für das Design und die Synthese von Verbindungskollektionen, für welche die Arbeit von Cesar und Cravatt als Leitfaden dienen könnte. In einem nächsten Schritt wird es nun notwendig sein, durch die Synthese weiterer „vollständig funktionalisierter“ Verbindungscolektionen eine allgemeinere Anwendbarkeit des Konzeptes zu belegen.

Eingegangen am 10. September 2012,  
veränderte Fassung am 22. November 2012  
Online veröffentlicht am 20. Dezember 2012

- [1] B. R. Stockwell, *Nature* **2004**, *432*, 846–854.
- [2] a) P. Lang, K. Yeow, A. Nichols, A. Scheer, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 343–356; b) D. C. Swinney, J. Anthony, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 507–519.
- [3] F. Cong, A. K. Cheung, S. M. Huang, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, *52*, 57–78.
- [4] U. Rix, G. Superti-Furga, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 616–624.

- [5] T. Böttcher, M. Pitscheider, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 2740–2759; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 2680–2698.  
[6] M. J. Evans, A. Saghatelian, E. J. Sorensen, B. F. Cravatt, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1303–1307.  
[7] J. S. Cisar, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10385–10388.  
[8] C. I. Hall, M. L. Reese, E. Weerapana, M. A. Child, P. W. Bowyer, V. E. Albrow, J. D. Haraldsen, M. R. Phillips, E. D. Sandoval, G. E. Ward, B. F. Cravatt, J. C. Boothroyd, M. Bogyo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 10568–10573.

**Ideal für Studenten der Astronomie, Chemie, Biochemie und Biologie**

**Verdammt clever!**

**Auf der Suche nach Leben im Universum**

**KEVIN W. PLAXCO und MICHAEL GROß**  
**Astrobiologie für Einsteiger**  
ISBN: 978-3-527-41145-0  
2012 336 S. mit ca. 80 Abb.  
Broschur € 24,90

**Kompakt**

**Preiswert**

**Prüfungsrelevant**

**Klare und kompakte Übersicht!**  
Vom Entstehen des Lebens auf der Erde, seiner Ausbreitung und seinen drei Milliarden Jahren Bestehens – im Kontext mit der Suche nach anderen Lebensformen im Sonnensystem und dem Rest des Universums.

**Einführung mit Format!**  
Viele Studienrichtungen wie Astronomie, Biologie und Chemie erwarten Grundkenntnisse auch in diesem Spezialgebiet.

**Aktuelles interdisziplinäres Forschungsgebiet!**  
Erheblicher Kommunikations- und Vermittlungsbedarf zwischen Forschungsbereichen und der Öffentlichkeit muss bewältigt werden.

**WILEY-VCH**

Irrtum und Preisänderungen vorbehalten. Stand der Daten Oktober 2012.

PSB-12453661210.bu