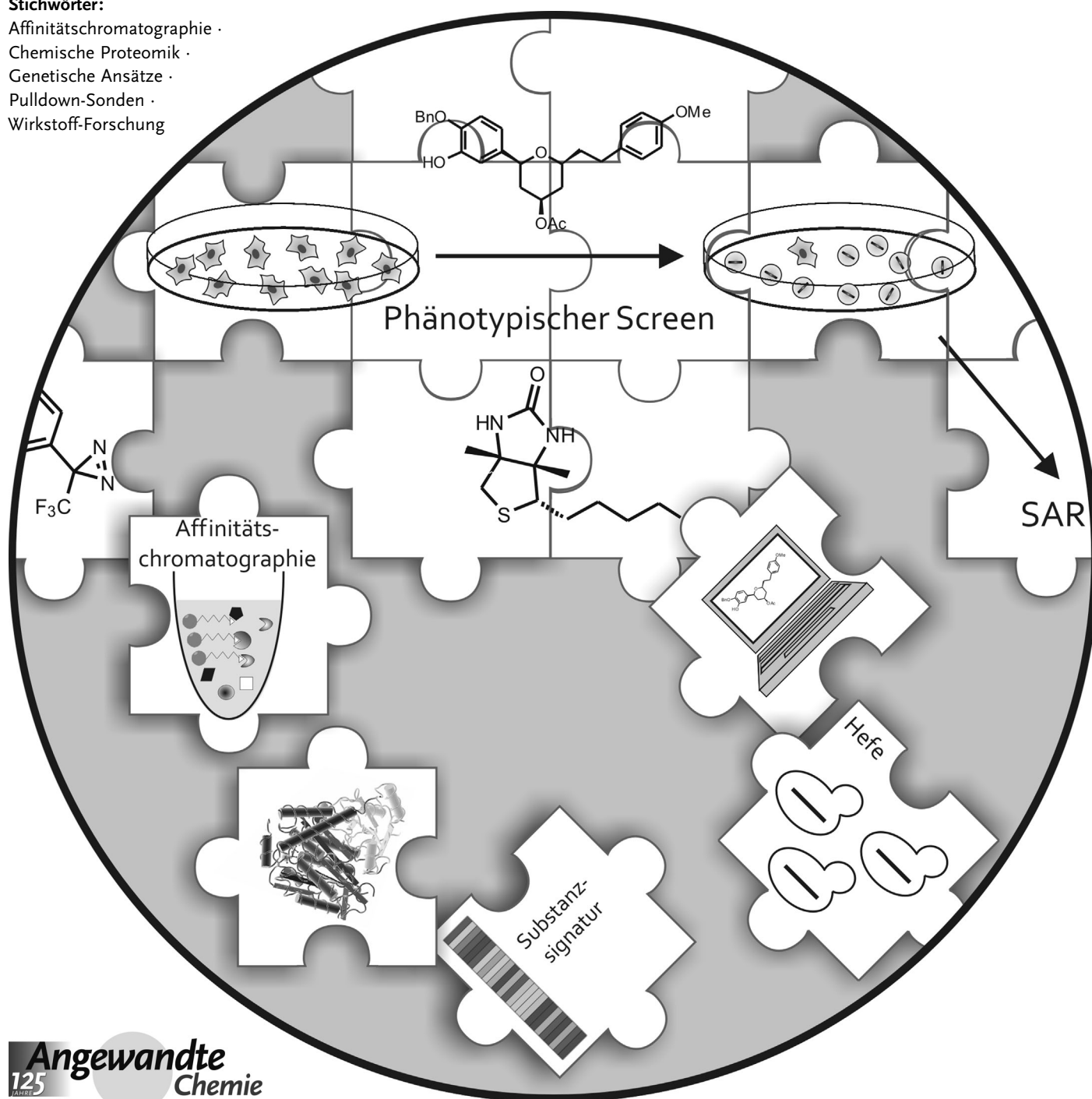


Identifizierung der Zielproteine bioaktiver Verbindungen: Die Suche nach der Nadel im Heuhaufen

Slava Ziegler,* Verena Pries, Christian Hedberg* und Herbert Waldmann*

Stichwörter:

Affinitätschromatographie ·
Chemische Proteomik ·
Genetische Ansätze ·
Pull-down-Sonden ·
Wirkstoff-Forschung



Die Identifizierung und Validierung von Zielmolekülen biologisch aktiver niedermolekularer Verbindungen ist ein äußerst wichtiger, oft maßgebender Schritt in der akademischen und pharmazeutischen Forschung. Dank der Entwicklung und der Verfügbarkeit diverser neuer experimenteller Verfahren ist die Identifizierung von Zielmolekülen prinzipiell realisierbar, und die Anzahl der erfolgreichen Beispiele wächst stetig. Allerdings ist bislang keine generische, breit anwendbare Methodik etabliert worden. Dieser Aufsatz fasst die gängigen Methoden zur Identifizierung der Zielmoleküle niedermolekularer Substanzen in erster Linie für Chemiker, aber auch für Biologen zusammen, die z. B. den molekularen Angriffspunkt (Target) einer bestimmten biologisch aktiven Substanz finden wollen. Wir beschreiben die am häufigsten eingesetzten experimentellen Ansätze zur Zielprotein-Identifizierung und geben repräsentative Beispiele, die den neuesten Stand der Forschung demonstrieren. Von den derzeit verfügbaren Methoden werden die Affinitätsisolierung von Proteinen mittels geeigneter Affinitätssonden (pull down) und die anschließende massenspektrometrische Analyse der angereicherten Proteine am häufigsten eingesetzt. Um eine Anleitung für einen schnellen Einstieg in dieses Feld zu geben, beschreiben wir basierend auf unseren eigenen Erfahrungen einen typischen Ablauf der Zielprotein-Identifizierung, der auf dem Einsatz der chemischen Proteomik als Schlüsselschritt für die Formulierung einer Hypothese für potentielle Zielproteine beruht.

1. Einleitung

Der Einsatz biologisch aktiver niedermolekularer Verbindungen für die Behandlung von Krankheiten ist fester Bestandteil der menschlichen Kultur. In der Vergangenheit wurden diese Medikamente oft als reine Substanzen oder aber als Mixturen ohne detailliertes Wissen über deren Wirkweise verabreicht. Zum Beispiel wurden die aktiven Komponenten von pflanzlichen Extrakten, die bei verschiedenen Krankheiten eingesetzt wurden, erst Jahrzehnte oder Jahrhunderte später ausfindig gemacht. Der große Fortschritt in den organisch-chemischen Methoden seit dem 19. Jh. sowie in der Substanzisolierung aus komplexen Mischungen, einschließlich von Naturstoffen, ermöglicht zunehmend Zugang zu potentiell biologisch aktiven Verbindungen. Diese Verfügbarkeit und die Möglichkeit, die Struktur der Verbindungen mittels organischer Synthese zu verändern, erlauben zunehmend ihre Anwendung als Werkzeuge für die Forschung, z. B. um biologische Phänomene aufzuklären, und zusätzlich zur Inspiration der Medizinalchemie und der Wirkstoffforschung. Die Verwendung von niedermolekularen Verbindungen bietet einige Vorteile im Vergleich zu klassisch-genetischen Methoden: Sie wirken schnell, sodass die Folgen einer Substanzbehandlung oft bereits nach einigen Minuten oder gar Sekunden verzeichnet werden können. Ihre Effekte sind regelbar, z. B. können verschiedene Konzentrationen einer Substanz oder Variation der Behandlungsdauer abgestufte Phänotypen ergeben. Ihr Einfluss ist reversibel und ermöglicht die zeitliche Kontrolle der Proteinfunktion, da sie

ren niedermolekulare Verbindungen ein biologisches System, aber verändern es nicht, während bei einem Gen-Knockout das kodierte Protein vollständig aus der Zelle oder dem Organismus entfernt und dadurch das biologische System verändert wird. Weiterhin können Substanzen nur eine oder nur bestimmte Funktionen eines Proteins modulieren. Aufgrund dieser Eigenschaften ist der Einsatz niedermolekularer Verbindungen eine Alternative zu etablierten biologischen Techniken oder bietet gänzlich verschiedene Möglichkeiten für die Gewinnung neuer Erkenntnisse. Folglich steht die Identifizierung und Synthese biologisch aktiver Verbindungen, die gezielt Proteine im Kontext der Zelle oder eines Organismus modulieren, im Kern der chemisch-biologischen Forschung.

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	2809
2. Ansätze zur Identifizierung von Zielproteinen	2811
3. Bestätigung von Zielproteinen	2832
4. Problemlösung (Troubleshooting)	2834
5. Fallbeispiele	2834
6. Zusammenfassung, Ausblick und Vorschlag eines Arbeitsablaufs	2843
7. Appendix: Tabelle 1	2845

durch Auswaschen entfernt oder auch metabolisiert werden können. Niedermolekulare Substanzen können konditional eingesetzt werden, d. h. der Zeitpunkt der Applikation ist frei wählbar. Dadurch können Proteine moduliert werden, deren Mutation, Knockout oder Knockdown letal ist. Solche Anwendungen sind von besonderer Bedeutung für die Entwicklungsbiologie. Insbesondere modulie-

[*] Dr. S. Ziegler, Dr. V. Pries, Dr. C. Hedberg, Prof. Dr. H. Waldmann
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abteilung Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
und
Technische Universität Dortmund, Fakultät Chemie
Lehrbereich Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)
E-Mail: slava.ziegler@mpi-dortmund.mpg.de
christian.hedberg@mpi-dortmund.mpg.de
herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de



Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201208749> zu finden.

Während durch gängige genetische Methoden praktisch jedes gewünschte Gen verändert werden kann, ist ihr chemisch-biologisches Gegenstück (die chemische Genetik) noch weit davon entfernt, für jedes Genprodukt und seine etwaigen diversen Funktionen einen chemischen Modulator zu finden. In Anlehnung an die klassische Genetik kommen in der chemischen Genetik eine vorwärts gerichtete (auf einem Phänotyp basierende) und eine rückwärts gerichtete (auf einem Zielmolekül basierende) Vorgehensweise zum Einsatz.^[1] Bei der rückwärts gerichteten chemischen Genetik werden zunächst Modulatoren eines bestimmten Proteins identifiziert und anschließend in der Erforschung der Proteinfunktion in *cellulo* oder in *vivo* verwendet. Dieser Ansatz wurde erfolgreich für verschiedene Proteinklassen, z.B. Enzyme und Rezeptoren und für Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt.^[2] In der vorwärts gerichteten chemischen Genetik wird zunächst die Modulation eines lebenden Systems (Zellen oder Organismen) durch eine Substanz detektiert, z.B. mithilfe von Reportergen-Aktivität, Fluoreszenzsignal oder phänotypischen Veränderungen, die mit bildgebenden Verfahren beobachtet werden können. Erst anschließend werden die Zielmoleküle identifiziert. Während die rückwärts gerichtete chemische Genetik die Identifizierung von Substanzen für ein bestimmtes Protein ermöglicht, liefert der vorwärts gerichtete Ansatz normalerweise keine direkte Information über die Zielmoleküle. Stattdessen ist die Entwicklung von effizienten Methoden für die Identifizierung von einem oder einigen zellulären Zielmolekülen aus einer komplexen Mischung der in den Zellen vorhandenen Biomoleküle notwendig. Das menschliche Proteom umfasst ca.

20000 Proteine,^[3] und außerdem können Nukleinsäuren, Kohlenhydrate oder Lipide die Zielmoleküle biologisch aktiver Verbindungen sein. Daher gleicht die Suche nach dem zellulären Ziel (target) der Suche einer Nadel in einem riesigen Heuhaufen.

In den letzten Jahrzehnten wurden große Fortschritte in der Etablierung von Methoden für die Identifizierung von Zielmolekülen biologisch aktiver Substanzen erzielt. Allerdings ist eine allgemein anwendbare Vorgehensweise noch nicht verfügbar, nach der ein generischer Ablaufplan definiert werden kann, der in der Mehrzahl der Fälle erfolgreich angewendet werden kann – ähnlich zum Arbeitsablauf bei der Trennung einzelner chemischer Substanzen (z.B. Naturstoffen) aus komplexen Mischungen. Die Ursachen könnten in der unterschiedlichen chemischen Natur biologisch aktiver Verbindungen (z.B. Heterocyclen verglichen mit Kohlenhydraten und Carbocyclen), der variierenden Affinität für ihre Zielmoleküle, der unterschiedlichen Natur der Zielmoleküle (z.B. membrangebundene im Vergleich zu zytosolischen Proteinen), ihr variierendes Vorkommen und zusätzlich in nicht ausreichend entwickelten analytischen Methoden liegen (z.B. haben neueste Entwicklungen in der Massenspektrometrie maßgeblich die Identifizierung der Zielproteine vorangetrieben). Aufgrund dieses Mangels an Methoden ist die Identifizierung der Zielmoleküle oft der herausforderndste und limitierende Schritt in einem chemisch-biologischen Forschungsprogramm. Trotz dieser Einschränkungen werden vorwärts gerichtete Ansätze zunehmend in der akademischen Forschung und in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt.^[4] Zell-basierte Screens detektieren den



Slava Ziegler studierte Biochemie und promovierte 2004 bei Dr. O. Müller am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie, Abteilung Strukturelle Biologie, im Bereich Tumorgenetik und Wnt-Signalweg. Danach absolvierte sie ein Postdoktorat am Institut für Pathologie an der Universität Düsseldorf bei Dr. R. Engers über Mechanismen der Tumordinvasion und Metastasierung. Seit Juli 2009 leitet sie eine Projektgruppe in der Abteilung von Prof. H. Waldmann am MPI für molekulare Physiologie mit Schwerpunkt zelluläre Assays und Identifizierung der Zielproteine biologisch aktiver Substanzen.



Christian Hedberg studierte Chemie an der Universität Uppsala (1995–2000) und promovierte 2005 bei Pher G. Andersson im Rahmen des SSF-Programms „SELICHEM“. Nach einem Postdoktorat bei Herbert Waldmann wurde er 2008 Nachwuchsgruppenleiter am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund. Seine Forschungen gelten der Entwicklung niedermolekularer Regulatoren biologisch wichtiger Proteine sowie der Untersuchung seltener posttranslationaler Modifikationen.



Verena Pries studierte Biologie an der Ruhr-Universität Bochum mit dem Abschluss M.Sc. 2007. 2011 promovierte sie in der Abteilung Chemische Biologie von Prof. H. Waldmann am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie. Der Fokus ihrer Doktorarbeit lag auf der Identifizierung und Validierung von Zielproteinen durch Naturstoff-inspirierte Substanzen. Derzeit ist sie als Postdoktorandin in der Abteilung Developmental & Molecular Pathways am Novartis Institut für BioMedizin-Forschung in Basel tätig.



Herbert Waldmann promovierte 1985 in organischer Chemie bei Prof. H. Kunz an der Universität Mainz. Danach folgten ein Postdoktorat bei Prof. G. Whitesides an der Harvard Universität und Berufungen auf Professuren an den Universitäten Bonn (1991), Karlsruhe (1993) und Dortmund (1999) sowie als Direktor des MPI für molekulare Physiologie (1999). Zu den Schwerpunkten seiner Forschung gehören Analyse und Verwendung von Naturstoffen für die Biologie-orientierte Synthese (BIOS), die Synthese lipidierter Peptide und Proteine und die Entwicklung niedermolekularer Modulatoren ihrer biologischen Funktionen.

Einfluss einer Substanz auf ein komplexes lebendes System als Ganzes. Chemische Verbindungen, die in solchen Screens identifiziert wurden, besitzen nachweislich die Fähigkeit, solch ein komplexes System in dem gewünschten Ausmaß zu modulieren – eine Eigenschaft, die nicht notwendigerweise die Treffersubstanzen (hits) aus rückwärts gerichteten Screens besitzen und welche zunächst in zellulären Assays validiert werden müssen.

Daher können chemisch-biologische Untersuchungen, die mit Zell-basierten Testverfahren initiiert werden, z.B. unvoreingenommene phänotypische Screens, Substanzen identifizieren, in denen gewünschte Eigenschaften wie besonders biologische Relevanz^[5] und die Fähigkeit, ein komplexes biologisches System auf gewünschte vordefinierte Weise zu modulieren, bereits kodiert sind. Der rückwärts gerichtete chemisch-genetische Ansatz fokussiert sich auf bekannte Zielmoleküle. Aus der Sequenzierung des menschlichen Genoms sind alle kodierten Proteine bekannt. Bislang können nur ca. 2 % aller theoretisch vorhergesagten Proteine mit chemischen Substanzen moduliert werden, und der Anteil der modulierbaren Proteine wird auf ca. 15 % geschätzt.^[6]

Die zellulären Targets gegenwärtiger Medikamente konzentrieren sich in wenigen Proteinfamilien, wie Kinasen, Proteasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Ionenkanäle und Rezeptoren. Der Bedarf an neuen Zielproteinen, die mit niedermolekularen Verbindungen moduliert werden können, steigt daher stetig. Der unvoreingenommene vorwärts gerichtete chemisch-genetische Ansatz hat diesbezüglich großes Potential, da dabei gleichzeitig ein gewünschter Phänotyp, biologisch aktive Verbindungen und möglicherweise neue zelluläre Angriffspunkte identifiziert werden.

Die Identifizierung der molekularen Angriffspunkte ist nicht nur für die Aufklärung der Wirkungsweise einer Substanz von Interesse, sondern sie kann auch „Off-Targets“ von bekannten Wirkstoffen und Medikamenten liefern, d.h. weiteren Zielproteinen, die Grund für unerwünschte biologische Aktivität und Toxizität sein könnten. Im Gegensatz zum Konzept, dass bei der Medikamentenentwicklung Aktivität gegenüber „Off-Targets“ vermieden werden muss, gewinnt das Konzept der „Polypharmakologie“ neuerdings zunehmend an Akzeptanz, d.h. die Vorstellung, dass für eine wirksame Krankheitsbehandlung Wirkstoffe mehrere Zielproteine gleichzeitig als Angriffspunkte haben müssen. Dies steht im Gegensatz zum Konzept, dass „ein Gen, einen Wirkstoff, eine Krankheit“ bedingt bzw. erfordert.^[7] Dieses Umdenken könnte eine neue Welle an Untersuchungen in der pharmazeutischen Industrie anstoßen, die diesem neuen Konzept folgen.^[7] Das Konzept der Polypharmakologie wird durch Beobachtungen aus der funktionellen Genomforschung in Hefen gestützt. So haben viele Gen-Knockouts keinen oder nur einen schwachen phänotypischen Effekt, z.B. sind ca. 19 % der Gene essentiell, während der Knockout von nur 15 % der Gene das Hefewachstum beeinflusst.^[8] Zudem haben Knockout-Studien in Mäusen deutlich gemacht, dass Organismen aufgrund redundanter Proteinfunktionen und alternativer Signalwege robust sind.^[8] Um diese Robustheit zu überwinden, sollte der Fokus der Wirkstofffindung eher auf der Störung von gesamten krankheitsverursachenden Netzwerken liegen als auf die Suche nach einzelnen Genen

und Proteinen, die Krankheiten verursachen. Die gleichzeitige Deletion oder Mutation von mehreren Genen oder Genprodukten könnte erforderlich sein, um die Robustheit eines biologischen Systems zu überwinden. Dieses Konzept wird weiterhin durch das Auftreten genetischer Wechselwirkungen wie z.B. bei der synthetischen Letalität gestützt.^[9] Daher wäre Polypharmakologie keine unerwünschte Eigenschaft biologisch aktiver Substanzen, sondern sie trägt zu deren Aktivität und Wirksamkeit bei geringer Toxizität bei.^[10]

In Anlehnung an die Identifizierung funktioneller Zielmoleküle verlangt die Suche nach den „Off-Targets“ ebenfalls nach Etablierung effizienter Methoden, um die Proteine zu identifizieren, die an biologisch aktive Substanzen binden und dadurch moduliert werden. Hierfür kommen zusätzlich zu den experimentellen Verfahren auch leistungsfähige In-silico-Methoden auf, die molekulare Angriffspunkte von Wirkstoffen basierend auf Strukturähnlichkeiten vorhersagen können.^[7,10]

In diesem Aufsatz geben wir einen Überblick über die aktuelle Methodik für die Identifizierung von Zielproteinen niedermolekularer Verbindungen. Wir wenden uns an erster Stelle an Chemiker, mit dem Ziel, eine Referenz oder Starthilfe zu geben, z.B. dem interessierten Chemiker, der vielleicht das Zielprotein einer bestimmten Substanz finden soll oder muss, die in einem laufenden Forschungsprojekt identifiziert (z.B. ein potenter Naturstoff) oder synthetisiert wurde. Wir beschreiben zunächst die am häufigsten angewendeten experimentellen Ansätze und geben einige repräsentative Beispiele, die den Stand der Forschung repräsentieren. Sie können als prototypische Musterbeispiele für erfolgreiche chemisch-biologische Arbeiten dienen, bei denen die Suche nach der Nadel im biologischen Heuhaufen der Zelle erfolgreich war. Diese Übersicht ist nicht umfassend. In Tabelle 1 (siehe Abschnitt 7, Appendix) sowie in den Hintergrundinformationen haben wir eine Auswahl an biologisch aktiven Substanzen, ihrer Zielmoleküle und Ansätze für ihre Identifizierung zusammengestellt. Für zusätzliche Beispiele sei der Leser auf weitere Übersichtsartikel verwiesen.^[11]

2. Ansätze zur Identifizierung von Zielproteinen

Die am häufigsten verwendeten Ansätze zur Zielmolekül-Identifizierung können in proteomische, genetische und bioinformatische sowie auf Profilierung basierende, vergleichende Verfahren unterteilt werden.^[11a,c,12] In diesem Aufsatz beschreiben und fassen wir die wichtigsten dieser Ansätze zusammen. In der Praxis werden Methoden wie die aktivitätsbasierte Proteomprofilierung (ABPP) und die Affinitätschromatographie mithilfe von quantitativer Proteomik viel häufiger angewendet als biochemische und genetische Methoden. Weiterhin diskutieren wir neue Strategien zur Bestimmung der Wirkungsweise biologisch aktiver Substanzen, für die es meist nur wenige Beispiele gibt. Auch wenn diese Methoden separat diskutiert werden, sind sie komplementär. Ihre kombinierte Anwendung könnte ein vollständigeres Bild der Wirkstoff-Protein-Wechselwirkungen in Zellen ergeben.^[13]

2.1. Affinitätschromatographie

Die Affinitäts-basierte Proteomik („Pulldown“) ist eine der am meisten verwendeten Methoden für die Identifizierung der Zielproteine biologisch aktiver Substanzen (siehe Abbildung 1 für einen Überblick der Methode). Die Affinitätssonde wird an einer festen Phase immobilisiert und zur Bindung der Zielproteine mit einem Proteinextrakt (z.B. Zelllysate) behandelt. Anschließend werden die Proteine, die unspezifisch an die Sonde oder die Matrix gebunden haben, durch stringentes Waschen entfernt, gefolgt von der Freisetzung der spezifisch gebundenen Proteine durch Elution mit der biologisch aktiven Verbindung oder durch Erhitzen. Normalerweise werden die Zielproteine nach SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese), tryptischem Verdau und der Analyse der Peptide mittels MS/MS-Analyse identifiziert.

2.1.1. Synthese der Affinitätssonde

Für ein Pulldown-Experiment muss der entsprechende Wirkstoff modifiziert werden, damit er an einer Matrix immobilisiert werden kann. Zu diesem Zweck wird ein Abstandhalter (Anker oder Linker) mit einer funktionellen Gruppe oder Affinitätsfunktionalität so angebracht, dass die Bindung an das Zielprotein nicht oder in geringem Maße

beeinflusst wird. Der Identifizierung einer Treffersubstanz (hit) in einem Screen folgen üblicherweise Untersuchungen der Aktivität strukturell ähnlicher Verbindungen zur Aufstellung einer Struktur-Wirkungs-Beziehung (structure-activity relationship, SAR). Die SAR liefert auch die Information, an welcher Stelle der Linker angebracht werden kann, d.h. die Substitutionen und/oder Veränderungen ohne einen signifikanten Aktivitätsverlust toleriert. Zum Beispiel führte das Anbringen eines Linkers an zwei verschiedenen Positionen in cGMP (Abbildung 2) zur Isolierung unterschiedlicher Proteine, was auf einen unterschiedlichen Einfluss der Kupplungspositionen hindeutet.^[14]

Oft wird die Erstellung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen durch die strukturelle Komplexität der Hits oder fehlende Synthesewege für die Modifikation (z.B. bei Naturstoffen) erschwert. In solchen Fällen können funktionelle Gruppen der Hits genutzt werden, um Modifikationen^[15] einzuführen, die Art und die Position der Modifikationen bleiben dabei aber eingeschränkt. Eine Alternative bei der Zielprotein-Identifizierung mit Substanzen, für die keine SAR aufgestellt werden kann, sind immobilisierte photoaktive Linker, die nach Bestrahlung reaktive Intermediate für eine Quervernetzung mit der festen Phase generieren (siehe auch Abschnitt 2.1.9)^[16] oder Verfahren, die ohne weitere Modifizierung auskommen (siehe Abschnitt 2.3).

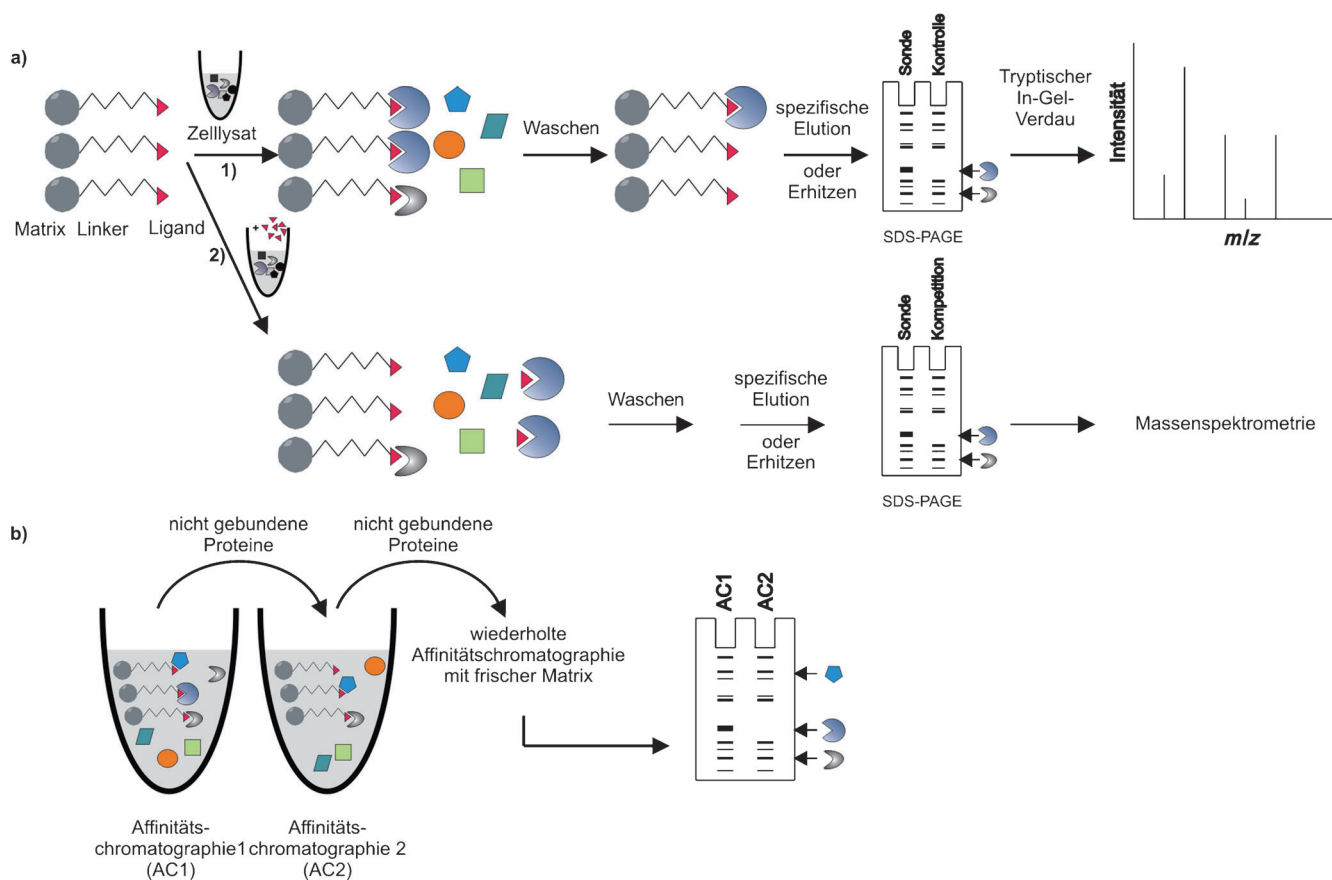


Abbildung 1. Prinzip der Affinitäts-basierten Proteomik für die Zielprotein-Identifizierung (a) unter Verwendung einer Kontrollmatrix (1) oder Veränderung mit der nicht modifizierten Substanz (2). b) Serielle Affinitätschromatographie (siehe Abschnitt 2.1.8).

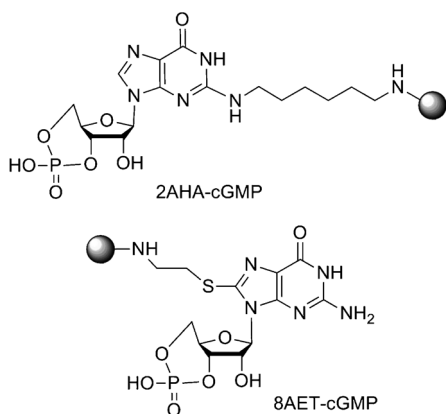


Abbildung 2. Chemische Strukturen von cGMP-Derivaten, die an verschiedenen Positionen immobilisiert wurden.

2.1.2. Linker

Das Anbringen eines Linkers an eine Verbindung, die in einem Pulldown eingesetzt werden soll, ist zwingend notwendig, um einerseits das Einführen einer funktionellen Gruppe für die Immobilisierung zu ermöglichen, und andererseits insbesondere die sterische Hinderung der Bindung der Zielproteine an die Matrix zu vermeiden. Als Linker wurden in Pulldown-Experimenten Alkylgruppen,^[17] Di- oder Triethylenglycol-Gruppen,^[18] Peptide,^[19] die Aminocaproylaminopentoxyl-Gruppe (ACAP),^[20] divalente Epoxide (Ethylenglycol-diglycidylether, EDGE)^[21] und Weinsäure^[22] genutzt (Abbildung 3a). Die hydrophoben Alkyllinker können die unspezifische Bindung von Proteinen an die immobilisierte Sonde begünstigen und so die Komplexität des zu analysierenden Proteingemischs erhöhen und dadurch die Detektion und/oder Identifizierung der Zielproteine erschweren. Meistens sind hydrophile Gruppen die Anker der Wahl, wobei Di- oder Triethylenglycolether am häufigsten eingesetzt werden. Der Polyprolin-Linker wurde konzipiert, um einige der Nachteile, die mit den Ethylenglycol-Ankern assoziiert sind (z.B. zu geringe Länge, sodass es zu sterischer Hinderung bei der Proteinbindung kommen kann), zu umgehen. Er ist starrer, länger und ermöglicht die Bindung auch von sperrigen Proteinen.^[19c] Der Weinsäure-Linker reduziert im Vergleich zu Oligoethylenglycol-Sonden die unspezifische Bindung.^[22] Bislang wurden der Polyprolin- und der Weinsäure-Anker lediglich in wenigen Fällen zur Identifizierung von Zielproteinen eingesetzt.

Im Prinzip werden Proteine, die an die immobilisierte Affinitäts-sonde binden, ent-

weder unter denaturierenden Bedingungen (Erhitzen in einem SDS-haltigen Puffer) oder durch Elution mit einem Überschuss an unmodifizierter Substanz von der festen Phase gelöst. Die Freisetzung unspezifisch bindender Proteine nach dem Erhitzen der Proben erhöht die Komplexität des Gemischs, das anschließend mittels Elektrophorese und Massenspektrometrie (MS) analysiert werden soll, und kann die Proteinidentifizierung erschweren. Daher wurden selektiv abspaltbare Anker entwickelt, die auf Diazobenzol (1) (Abspaltung unter reduzierenden Bedingungen, z.B. mit Natriumdithionit),^[23] Acylhydrazon (2) (Abspaltung durch Hydrazide),^[24] dem Levulinylester (3) (Abspaltung durch Hydrazin),^[25] Peptiden (4) (enthalten eine Protease-Erkennungssequenz),^[19b] Säure-labilen Gruppen^[26] (5) und der photolabilen 1-(2-Nitrophenyl)ethyl-Gruppe^[27] (6) basieren (Abbildung 3b). Die Abspaltung erlaubt die Freisetzung nur

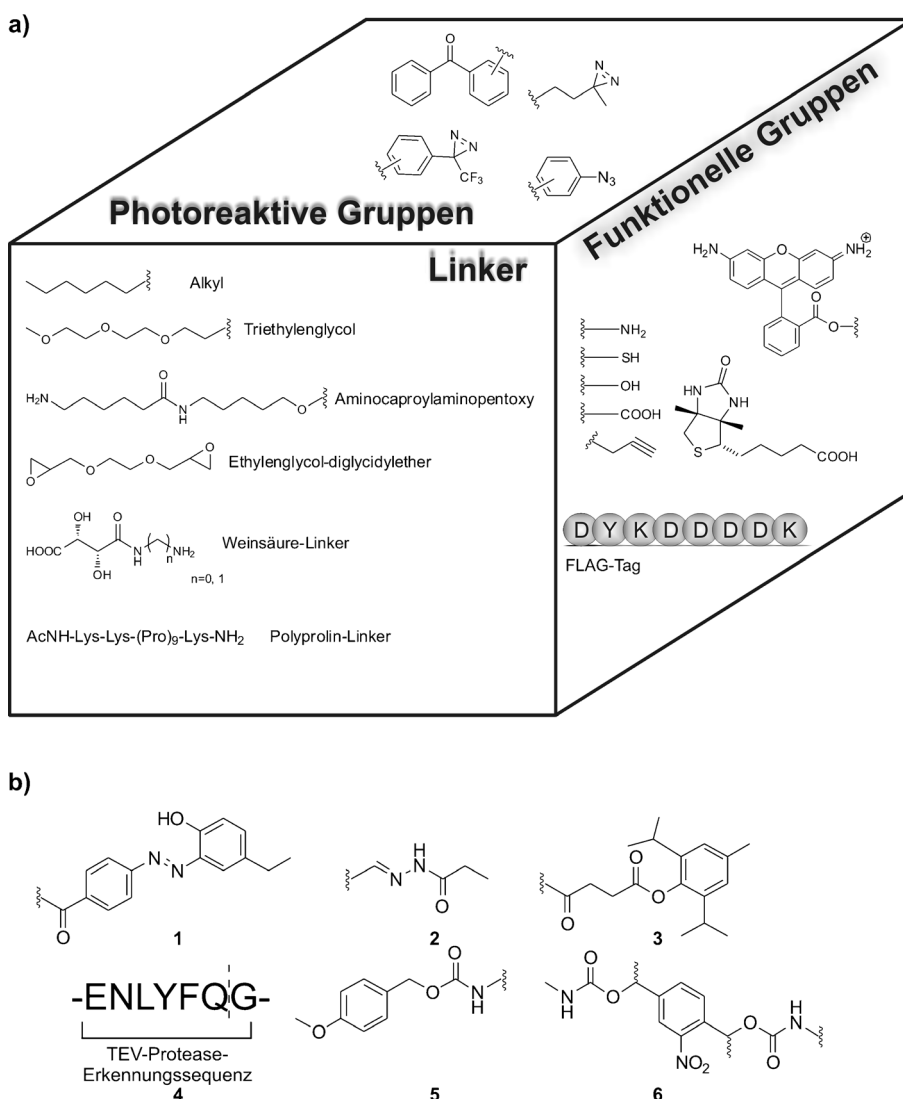


Abbildung 3. Werkzeuge für Affinitäts-basierte Zielprotein-Identifizierung. a) Für die Affinitäts-basierte Zielprotein-Identifizierung wird ein Linker an die entsprechende biologisch aktive Substanz gekuppelt. Der Linker kann zusätzlich mit einer photoreaktiven Gruppe für die kovalente Modifikation des Zielproteins sowie mit einer funktionellen Gruppe oder Affinitätsfunktionalität ausgestattet sein, um die Proteinisolierung zu erleichtern. b) Gruppen für das Design von abspaltbaren Linkern.

jener Proteine, die an die Sonde binden, während Proteine, die unspezifisch an die feste Phase binden, immobilisiert bleiben. Der Hauptnachteil von Thiol-basierten/Säure-lablen Linkern ist der Bedarf an starken Säuren (z. B. Trifluoressigsäure, TFA), die unselektiv Proteine ablösen. Außerdem muss TFA vor der massenspektrometrischen Analyse entfernt werden.^[23a] Disulfid-Linker sind mit reduzierenden Puffern (die z. B. Dithiothreitol (DTT) enthalten) nicht kompatibel. Die Verwendung von Peptid-Ankern ist durch eine potentiell ineffiziente Proteolyse und die damit einhergehende nicht vollständige Freisetzung der Proteine limitiert.

2.1.3. Funktionelle Gruppen und Affinitäts-Tags für die Immobilisierung

Für die Immobilisierung der Affinitätssonde allein oder im Komplex mit gebundenen Proteinen sollte die Sonde eine funktionelle Gruppe zur kovalenten Kupplung an eine Matrix, eine Affinitätsfunktionalität wie Biotin, das mit hoher Affinität an immobilisiertes Avidin bindet, ein Peptid-Tag oder einen Fluorophor enthalten (Abbildung 3 a).

Die Affinitätssonde kann kovalent an eine voraktivierte Matrix (z. B. als *N*-Hydroxysuccinimidester (NHS) oder als Epoxid-aktivierte Sepharose) mithilfe funktioneller Gruppen wie Amine, Alkohole, Thiole und Carboxylsäuren immobilisiert werden. Bevor die an der festen Phase immobilisierte Substanz dem Proteinextrakt ausgesetzt wird und die Zielproteine gebunden werden, müssen die nichtreagierten Gruppen inaktiviert werden (z. B. mit einem Tris-Puffer für NHS-Ester), damit die kovalente Bindung von Proteinen an die Matrix verhindert wird. Normalerweise reicht die Inkubation der Sonde mit einem Zellysats aus, um die bindenden Proteine zu isolieren, und die Verwendung von lebenden Zellen ist nicht nötig. Allerdings haben Wirth et al. gezeigt, dass, verglichen mit dem Einsatz von Zellysaten, die von dem Naturstoff Duocarmycin SA abgeleitete Affinitätssonde (Tabelle 1, Eintrag 1) ein zweites Zielprotein des Naturstoffs (Aldehyddehydrogenase, ALDH1A1), nur dann anreichern kann, wenn die Sonde mit lebenden Zellen inkubiert wurde.^[28] Dieses Beispiel demonstriert, dass die Lysisbedingungen die Bindung des Zielproteins an die Sonde beeinträchtigen können.

Aufgrund seiner hohen Affinität zu dem Vogel- und Amphibien-Protein Avidin und zu dem bakteriellen Protein Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* ist Biotin sehr gut für Affinitäts-basierte Verfahren geeignet. Zudem ist mit Neutravidin eine deglycosylierte Form des nativen Hühner-eiweiß-Avidin verfügbar. Neutravidin hat einen nahezu neutralen pI-Wert, und seine Verwendung geht mit einer reduzierten unspezifischen Bindung einher.^[29] Verglichen mit Avidin sind im Streptavidin mehrere basische Aminosäuren durch neutrale oder saure Aminosäuren ausgetauscht. Streptavidin ist nicht glycosyliert, was aber keinen Einfluss auf die Biotinbindung hat.^[30] Die drei Proteine sind Homotetramere, die vier Biotin-Moleküle binden (ein Molekül pro Monomer). Die Affinität der Proteine für Biotin ist außerordentlich hoch ($K_D \approx 10^{-14}$ – 10^{-15} M),^[31] und eine der stärksten bekannten nicht-kovalenten Wechselwirkungen. Die Biotin-(Strept/Neutr)Avidin-Bindung findet in vielen unter-

schiedlichen Protein- und Nukleinsäure-Nachweissystemen Einsatz, z. B. in der Immunohistochemie, beim Enzym-gekoppelten Immunosorbent-Assay (ELISA) und bei der Proteinreinigung. Biotin selbst beeinträchtigt kaum die Funktion der markierten Komponenten (z. B. Antikörper, niedermolekulare Substanzen, Nukleinsäuren). Weiterhin bleibt die starke Wechselwirkung zwischen Avidin und Biotin auch unter harschen Bedingungen, wie extremen pH-Werten und Temperaturen sowie bei Denaturierung bestehen, was seine Verwendung in verschiedenen biologischen Verfahren begünstigt.

Die Affinitäts-basierte Proteomik macht sich das Biotin-Streptavidin-System für die Immobilisierung der Sonden auf der festen Phase und für die Isolierung der Zielproteine zunutze. Meist werden biotinylierte Verbindungen an Streptavidin-beschichteten Partikeln immobilisiert, die dann einem Proteinextrakt ausgesetzt werden. Biotinylierte Sonden können auch zuerst mit lebenden Zellen inkubiert werden, um die Zielproteine vor der Zellyse und der Inkubation mit der Streptavidin-Matrix zu binden. Allerdings verringert der Einbau von Biotin oft die Zellpermeabilität der Sonde. Dadurch können Einschränkungen durch die Verwendung von Zellysaten umgangen werden, da die Zellyse die Bindung einer Sonde an ihre Zielproteine erschweren könnte (siehe oben). Dies könnte besonders für Membranproteine relevant sein.^[32] Nachdem die Proteine an die Sonde gebunden haben, erlaubt die hohe Affinität von Biotin zu (Strept)Avidin stringentes Waschen, um unspezifisch bindende Proteine zu entfernen. Der Biotin-Rest kann auch in trifunktionalen Sonden eingebaut werden, deren Verwendung zunächst die kovalente Bindung der Sonde an die Zielproteine (z. B. durch Licht-induzierte Quervernetzung) gefolgt von der Isolierung der Zielproteine mittels Streptavidin-Matrix ermöglicht.^[28,33]

Die hohe Affinität des Biotin-Streptavidin-Komplexes erfordert harsche Bedingungen, um die gebundenen Proteine von der festen Phase freizusetzen, was generell durch Hitze-denaturierung in einem SDS-haltigen Puffer geschieht. Eine Alternative ist die Elution des Zielproteins mit einem Überschuss an nicht modifizierter Substanz. Für kovalent bindende Proteine bietet der Einbau eines abspaltbaren Linkers (siehe Abschnitt 2.1.2) eine zusätzliche Möglichkeit, angereicherte Proteine ohne Denaturierung freizusetzen. Dabei ist zu beachten, dass der Grad der unspezifischen Bindung von Avidin über Streptavidin zu Neutravidin abnimmt.^[29] Auch können durch die Verwendung von Avidin-Matrizes endogen biotinylierte Proteine angereichert werden und einen erhöhten Hintergrund erzeugen.^[34] Die unspezifische Bindung stellt ein erhebliches Problem in der Affinitäts-basierten Proteomik dar (siehe Abschnitt 2.1.8). Beim Einsatz biotinylierter Sonden müssen die Vor- und Nachteile abgewogen werden. Biotinylierte Sonden sind wertvolle Reagentien auch für die Zielprotein-Bestätigung, z. B. für Techniken wie die Oberflächenplasmonresonanz (SPR), die homogene zeitaufgelöste Fluoreszenz (HTRF), bildgebende Verfahren und das Immunoblotting. Folglich können diese Sonden sowohl für die Zielprotein-Identifizierung als auch für die Bestätigung verwendet werden.

Anstelle des Biotin/Avidin-Paares können Antikörper eingesetzt werden, die in den Sonden eingebaute Affinitäts-

Tags erkennen. Der FLAG-Tag ist ein Octapeptid mit der Sequenz DYKDDDDK. Die geringe Größe ermöglicht die Kodierung durch einzelne Oligonukleotide. Die FLAG-Tag-Sequenz wurde entwickelt, um gute Antigen-Eigenschaften (für die Wechselwirkung mit einem anti-FLAG-Tag-Antikörper) bei maximaler Hydrophilie zu gewährleisten.^[35] Darüber hinaus enthält dieser Tag eine Protease-Erkennungssequenz für die Entfernung des Tags. Beispielsweise haben Saxena et al. eine FLAG-Tag-modifizierte Sonde von Bisindolylmaleimid III (Bis-III, Tabelle 1, Eintrag 2), einem Derivat eines bekannten Protein-Kinase-C(PKC)-Inhibitors, verwendet.^[36] Nach der Bindung der FLAG-Tag-markierten Sonde an die Zielproteine wurden die Komplexe mittels eines FLAG-Tag-Antikörpers isoliert, der zuvor an Agarose immobilisiert wurde. Die isolierten Proteine wurden mit den Zielproteinen verglichen, die nach kovalenter Bindung von Bis-III an eine Matrix identifiziert wurden. Der auf dem FLAG-Tag basierende Ansatz identifizierte mehrere der bekannten Bis-III Proteine wie PKC- α , GSK3 β , CaMKII und Adenosinkinase, aber auch einige bisher nicht identifizierte Zielproteine wie PKAC- α , Prohibitin und VDAC.^[36] Es ist bemerkenswert, dass dieser Ansatz auch mit der Freisetzung der gebundenen Proteine mittels spezifischer Elution kompatibel ist. Der in dieser Studie verwendete FLAG-Tag kann durch bekannte Tags (z.B. HA)^[37] sowie durch Fluorophore, für die Antikörper verfügbar sind (z.B. 7-Dimethylaminocumarin, Rhodamin, Fluorescein), ersetzt werden.^[38]

2.1.4. Trifunktionale Sonden

In vielen erfolgreichen Beispielen wurde die Kombination aus einer Affinitätssonde (Biotin) mit einem Fluorophor erfolgreich für die Zielprotein-Isolierung und die anschließende Detektion von fluoreszenzmarkierten Proteinen mittels SDS-PAGE angewendet. Voraussetzung hierfür ist die kovalente Bindung der Sonde an die Zielproteine, damit der Komplex den denaturierenden Bedingungen der SDS-PAGE standhält. Trifunktionale Sonden finden breite Anwendung, insbesondere in der Aktivitäts-basierten Proteom-Profilierung (ABPP).^[28,33c,d,39] Solche trifunktionalen Sonden (Abbildung 4a) enthalten in der Regel ein Alkin, das in einer Kupfer(I)-katalysierten Huisgen-[3+2]-Cycloaddition (Huisgen-Sharpless-Meldal-Klickchemie)^[40] mit Biotin- oder Fluorophor-Azid (z.B. Rhodamin-Azid) zur Anreicherung bzw. Visualisierung der gebundenen Proteine nach SDS-PAGE^[33a] gekuppelt werden kann. Die Kupplung von Biotin und Rhodamin mit dem Alkin-Derivat der entsprechenden Substanz ergibt eine trifunktionale Sonde: Der Biotin-Tag ermöglicht die Anreicherung der Zielproteine, während durch den Fluorophor die Zielproteine in einem Gel visualisiert werden können. Die im Gel fluoreszierenden Banden werden dann ausgeschnitten und massenspektrometrisch ausgewertet.^[33b] Dieses Verfahren vereinfacht deutlich die Identifizierung von Proteinen, da nur wenige Gel-Banden statt der gesamten Probenspur oder des gesamten Proteinmischs analysiert werden. Während diese Methode sehr gut für reaktive Verbindungen geeignet ist, muss für nicht-kovalent bindende Proteine in der Sonde eine photoreaktive

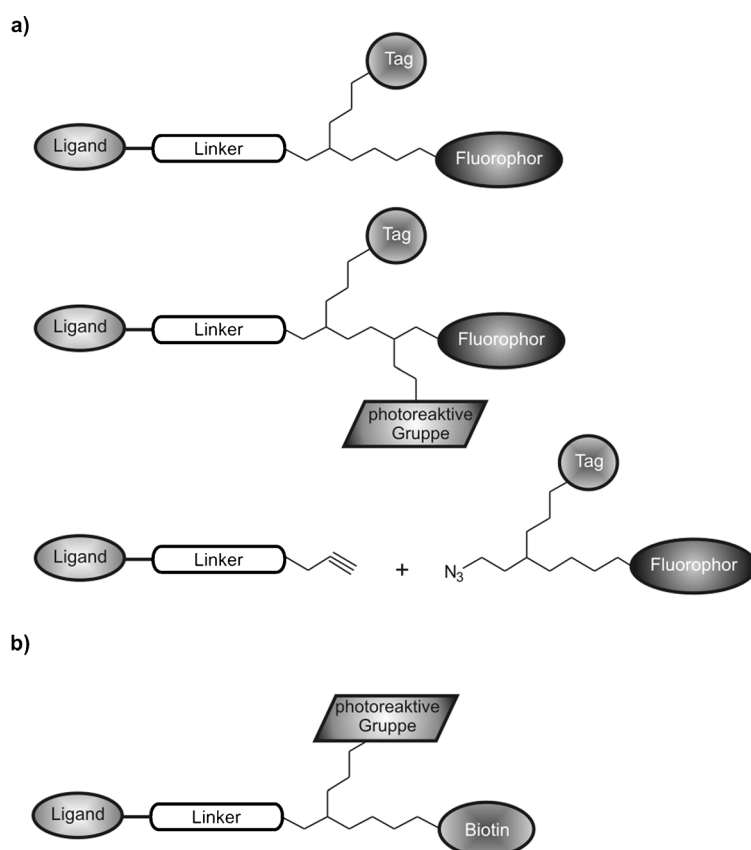


Abbildung 4. Allgemeine Struktur trifunktionaler Sonden (a) und Sonden für CCMS (b).

Gruppe (z.B. Benzophenon oder Alkyl-/Aryl-Diazirin, siehe Abbildung 3a) integriert werden.^[33c] Diese Strategie wird auch für das Design und die Synthese von Sonden für CCMS (capture compound mass spectrometry) eingesetzt.^[41] Die CCMS-Sonde ist mit einer Selektivitätsfunktionalität für die Bindung an das Zielprotein und einer photoaktivierbaren Gruppe zur kovalenten Bindung an das Zielprotein sowie mit einer Sortierfunktionalität (Biotin) für die Proteinanreicherung ausgestattet (Abbildung 4b). CCMS wurde für die Profilierung von S-Adenosyl-L-Homocystein (Tabelle 1, Eintrag 3) bindenden Proteinen wie Methyltransferasen^[42] und für die Suche nach „Off-Targets“ von Parkinson-Medikamenten eingesetzt.^[43] Tolcapon und Entacapon (Tabelle 1, Eintrag 4) haben Catechol-O-Methyltransferase (COMT) als Zielprotein, aber während Tolcapon hepatotoxisch ist, besitzt Entacapon diese Eigenschaft nicht. Unter Verwendung von CCMS wurde gezeigt, dass Tolcapon neben COMT auch Proteine, die mit der β -Oxidation und der oxidativen Phosphorylierung in Verbindung gebracht werden, als weitere molekulare Angriffspunkte hat.^[43] Für den Prodrug des gerinnungshemmenden Wirkstoffs Dabigatran konnte mithilfe von CCMS gezeigt werden, dass mehrere Proteine an eine abgeleitete CCMS-Sonde von Dabigatran binden, darunter das detoxifizierende Enzym Oxidoreduktase-Ribosyldihyronicotinamid-Dehydrogenase (NQO2).^[44]

2.1.5. Proteinextrakte

Zur Identifizierung der Zielproteine mittels chemischer Proteomik wird die Affinitätssonde normalerweise mit einem Proteinextrakt aus Gewebe oder kultivierten Zellen als Quelle des zu analysierenden Proteoms inkubiert.^[17,18] Im Allgemeinen wird die Proteinquelle nach der Aktivität des Wirkstoffs ausgewählt, z. B. eine Wirkstoff-sensitive Zelllinie, um sicherzustellen, dass die Zielproteine vorhanden sind. Die Lysisbedingungen dürfen die Integrität der Zielproteine und die Bindung der Substanz an die Proteine nicht beeinträchtigen. Da vor allem Informationen über die Zielproteine fehlen, kann dieses Problem kaum vorab angegangen werden. Wenn aber keine Zielproteine aus dem Lysat isoliert werden können, sollte der Einsatz intakter Zellen in Betracht gezogen werden.^[28,38b,45] Die Verwendung von Zelllysaten anstelle von lebenden Zellen ist zwingend notwendig, wenn die Sonde nicht membranpermeabel ist.

Um die unspezifische Bindung in Affinitäts-basierten Verfahren zu minimieren, kann eine Fraktionierung des Lysats in Betracht gezogen werden.^[46] Dabei kann die Komplexität der Proben und damit der Hintergrund reduziert werden. Zudem könnte dadurch das Zielprotein in einer subzellulären Fraktion angereichert und die Bedingungen für die Bindung der Proteine an die Sonde verbessert werden. Voraussetzung für eine Fraktionierung sind Kenntnisse über die zelluläre Lokalisation der Zielproteine, die oft durch die Verwendung eines fluoreszenzmarkierten Derivats des Wirkstoffs erhalten werden können.^[47] Beispielsweise wurde nach einer Vorfraktionierung von HeLa-Zellextrakten mittels Anionenaustauschchromatographie Ornithin- δ -Aminotransferase (OAT) als das Zielprotein von Diazonamid (Tabelle 1, Eintrag 5) identifiziert.^[46] Studien mit BODIPY-markiertem Pladienolid B (Tabelle 1, Eintrag 6) zeigten eine Lokalisation dieses Naturstoffs im Zellkern, und die folgende Zielprotein-Identifizierung wurde mit Kernextrakten durchgeführt.^[48] Da große Mengen des Proteinextrakts notwendig sind, um ausreichende Mengen an der gewünschten Fraktion zu erhalten, könnte hier die Verfügbarkeit des Primärmaterials limitierend sein. Dennoch sollten Fraktionierungen in Erwägung gezogen werden, wenn das Zielprotein z. B. an der Membran oder im Kern lokalisiert ist oder in einer bestimmten chromatographischen Fraktion vorhanden zu sein scheint. Es sollte darauf geachtet werden, dass nicht lösliche Fraktionen das gesuchte Protein (z. B. membrangebunden) enthalten könnten.

2.1.6. Bindung der Zielproteine an die Affinitäts-sonde, Waschen und Eluieren

Für die Bindung der Affinitäts-sonde an die Zielproteine muss die Substanz zunächst an einer festen Phase immobilisiert (z. B. eine mit Streptavidin-funktionalisierte oder als NHS-Ester aktivierte Matrix) und dann mit dem Lysat inkubiert werden. Für Sonden, die eine funktionelle Gruppe für die kovalente Immobilisierung an einer Matrix enthalten, ist dies die Methode der Wahl. Verbindungen mit Affinitäts-Tags (z. B. Biotin oder Peptid-Tag) können schon vor deren Immobilisierung mit lebenden Zellen oder einem Protein-Lysat

inkubiert werden. In bestimmten Fällen können immobilisierte Wirkstoffe (z. B. an Nanopolymere wie Dendrimere gekuppelt) zellpermeabel sein, was die In-situ-Inkubation mit den Zellen zur Bindung an die Zielproteine erlaubt.^[49] Bei der Verwendung trifunktionaler Sonden, die z. B. mit einem Alkin-Rest ausgestattet sind, wird die Sonde zunächst mit lebenden Zellen oder mit Zelllysaten inkubiert. In einem zweiten Schritt (ggf. nach der Zelllyse) wird ein Linker, der sowohl eine reaktive Gruppe als auch ein Fluorophor trägt, mittels Kupfer(I)-katalysierter Huisgen-[3+2]-Cycloaddition an die Sonde gekuppelt. Schließlich wird der Sonde-Protein-Komplex auf einer Matrix immobilisiert.^[28,33b]

Aufgrund der hohen Komplexität der Zelllysate, die üblicherweise eine Vielzahl von Proteinen enthalten, können in großen Mengen vorkommende Proteine unspezifisch an die Matrix, den Linker oder die Substanz binden. Um diese Proteine zu entfernen, sind ausgiebige Waschschritte mit steigender Stringenz erforderlich. Der Grad der Stringenz hängt von der Affinität der Verbindung für die Zielproteine ab. Wenn die Verbindung kovalent an das Zielprotein bindet, können viel härtere Waschbedingungen angewendet werden. Im Gegensatz dazu kann für nichtkovalent bindende Sonden die steigende Stringenz der Waschschritte, z. B. durch den Vergleich der isolierten Proteine mittels SDS-PAGE und anschließende Protein-Färbung kontrolliert werden. Um schwach bindende Proteine anzureichern, müssen milde Waschbedingungen gefunden werden.

Nach der Entfernung unspezifischer Bindungspartner werden die Proteine, die auf der festen Phase angereichert wurden, entweder mittels Denaturierung durch Erhitzen oder durch spezifische Elution freigesetzt. Denaturierende Agentien wie SDS eluieren alle Proteine, die spezifisch an die Pulldown-Sonde oder unspezifisch an den Linker oder die Matrix gebunden haben. Dieses Verfahren ergibt komplexe Gemische, könnte aber der einzige Weg sein, um die isolierten Proteine freizusetzen, wenn die Verbindung kovalent an das Zielprotein bindet und die Sonde keinen abspaltbaren Linker besitzt. Abspaltbare Linker (siehe Abschnitt 2.1.2) ermöglichen die gezielte Freisetzung von an Liganden bindenden Proteinen, während Proteine, die an die Matrix binden, gebunden bleiben. Für eine spezifische Elution werden die gebundenen Proteine mit einem Überschuss an unmodifiziertem Wirkstoff inkubiert.^[17] Dieser Schritt ermöglicht die Freisetzung von Proteinen unter milden Bedingungen und stellt gleichzeitig einen zweiten Affinitätsschritt dar. Die spezifische Elution ist nur mit nicht kovalent bindenden Liganden möglich. Sie wird durch die Löslichkeit der nicht modifizierten Verbindung in wässrigen Puffern begrenzt, weil üblicherweise hohe Konzentrationen erforderlich sind. Zum Beispiel wurde diese Vorgehensweise erfolgreich eingesetzt, um Proteine zu identifizieren, die spezifisch an ADP, cAMP, GDP und cGMP binden.^[14] Hierfür wurde cGMP über einen 2-Aminoethyl-Linker immobilisiert und mit HEK293-Zelllysate inkubiert. Anschließend erfolgte eine sequentielle Elution mit 10 mM ADP, 10 mM GDP, 5–10 mM cGMP und 10 mM cAMP, und die Proteine, die an das jeweilige Nukleotid binden, wurden isoliert. Die spezifische Elution kann durch die langsame Dissoziationskinetik des

bindenden Proteins von seinem Liganden beeinträchtigt werden.^[50]

2.1.7. Kontrollexperimente

Kontrollexperimente sind zwingend erforderlich, um zwischen spezifisch und nicht spezifisch bindenden Proteinen zu unterscheiden. Die einfachste Kontrolle ist der Einsatz von gleichem Matrixmaterial, aber ohne die immobilisierte Verbindung (Matrix-Kontrolle). Diese Probe detektiert die Proteine, die unspezifisch an die Matrix selbst binden, und wurde erfolgreich bei der Identifikation verschiedener Zielproteine verwendet.^[15b,51] Um Proteine zu isolieren, die nicht-spezifisch an den Linker oder die biologisch aktive Substanz binden, sollte entweder der Linker allein^[15b,18a,52] oder noch besser ein inaktives Derivat, das mit dem gleichen Linker ausgestattet ist,^[18a,33a,53] an der Matrix immobilisiert werden. Eine inaktive Verbindung sollte dem Wirkstoff in Struktur, Größe, hydrophoben Eigenschaften und Ladung ähneln.^[11b] Proteine, die sowohl an die Kontrollmatrix als auch an die immobilisierte Sonde binden, werden in der Regel als Hintergrund eingestuft. Obwohl diese Herangehensweise in mehreren Fällen erfolgreich war, vereinfacht sie die Bindungsereignisse während des Pulldown-Experiments meist zu stark. Mangelnde Aktivität einer Substanz in zellulären Assays könnte durch eine geringere Löslichkeit, niedrige Zellpermeabilität und niedrige Affinität für das Zielprotein hervorgerufen sein.^[11c] Diese Eigenschaften könnten die Ausbildung eines gewünschten Phänotyps in einem zellbasierten Assay verhindern und zur Einstufung der Substanz als inaktiv führen, obwohl sie möglicherweise an die Zielproteine in Zelllysaten bindet. Der Einsatz solcher Kontrollen könnte zur Identifizierung der gleichen Zielproteine für beide Sonden (die aktive und inaktive) und damit zu falsch negativen Ergebnissen führen, da diese Proteine als nicht spezifische Binder betrachtet werden. Prinzipiell ist die ideale Kontrolle für einen chiralen Wirkstoff eine inaktive Verbindung mit den gleichen physikalisch-chemischen Eigenschaften wie die aktive Sonde, aber mit unterschiedlicher Stereochemie, d.h. ein Enantiomer. Diese Strategie wurde erfolgreich zur Identifizierung von Nukleophosmin und Crm1 als Zielproteine der Centrocountine eingesetzt (Tabelle 1, Eintrag 7, siehe auch Abschnitt 5.4).^[17] Ein enantiodifferenzierender Ansatz wurde auch bei der Zielprotein-Identifizierung für das Jasmonat-Glukosid gewählt (Tabelle 1, Eintrag 8), dessen Enantiomer inaktiv ist.^[54] Eine Photoaffinitätssonde von Jasmonat-Glukosid wurde an Biotin gekuppelt und in Pulldown-Experimenten verwendet, wobei das inaktive Enantiomer als Kontrolle diente. Wir merken jedoch an, dass das als inaktiv eingestufte Enantiomer eines chiralen Wirkstoffs nicht notwendigerweise gar nicht an das gleiche Zielprotein bindet, sondern dass seine Affinität nur geringer sein könnte. Somit könnte ein Enantiomer nicht die ideale Kontrollsubstanz darstellen. Wenn die aktive Substanz achiral ist, sollte die Kontrollsonde ihr so ähnlich wie möglich sein. Ferner ist die Anknüpfung des Linkers an eine Position, die keine Modifikationen toleriert und es somit zu einem Aktivitätsverlust kommt, eine weitere Option für das Design von Kontrollsubstanzen. Diese Vorgehensweise wurde bei der

Isolierung von GSK3 β als das Zielprotein des neurotogenen Wirkstoffs TWS119 (Tabelle 1, Eintrag 9)^[55] und bei der Identifizierung von Adenosinkinase als das Zielprotein der anti-trypanosomalen Substanz 4-[5-(4-Phenoxyphenyl)-2H-pyrazol-3-yl]morpholin (Tabelle 1, Eintrag 10)^[56] verfolgt.

Eine effiziente Kontrolle ist Konkurrenz bei der Bindung des Zielproteins an den immobilisierten Liganden.^[57] Dabei wird ein Überschuss der biologisch aktiven Substanz dem Proteingemisch vor oder während des Pulldowns zugegeben. Sie bindet an das Zielprotein und verhindert so dessen Bindung an die immobilisierte Affinitätssonde. Proteine, die im Standard-Pulldown identifiziert werden, aber in der Kontrolle mit dem Kompetitor fehlen, werden als Zielproteine angesehen. Bei Konkurrenzexperimenten können hydrophobe Eigenschaften und die dadurch bedingte begrenzte Löslichkeit der Verbindungen in wässrigen Puffern Schwierigkeiten verursachen. Konkurrenzexperimente sollten mit einer Färbung der isolierten Proteine nach SDS-PAGE einhergehen, um die Abwesenheit der Zielproteine in der Probe mit dem Kompetitor zu belegen. Verschiedene Konzentrationen des nicht modifizierten Wirkstoffs sollten getestet werden, um die geeignetsten Bedingungen für die Konkurrenz zu ermitteln.

Proteine, die von der festen Phase freigesetzt werden, werden in der Regel mittels SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Nach der Elektrophorese werden Proteine im Gel gefärbt, wobei unterschiedliche Protokolle zur Verfügung stehen. Die Nachweisgrenze des weit verbreiteten Coomassie Brilliant Blau liegt bei ca. 10 ng Protein, und die Färbung ist kompatibel mit einer massenspektrometrischen Analyse.^[58] Sensitiver sind die Silberfärbung und die Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen (Nachweis von < 1 ng Protein).^[58] Während die Silberfärbung mit der Massenspektrometrie ohne zusätzliches Entfärben nicht kompatibel ist, sind es viele fluoreszierende Farbstoffe, sodass die entsprechenden Banden nach der Proteinvisualisierung aus dem Gel geschnitten und weiterverarbeitet werden können. Empfindliche Proteinfärbungen erlauben, die Zielproteine auf dem Gel sichtbar zu machen, sodass erste Informationen erhalten werden, z.B. ungefähres Molekulargewicht. Durch den Einsatz geeigneter Kontrollsonden können Unterschiede in den isolierten Proteinen (wie Menge und Vorkommen) nach einer Proteinfärbung detektiert werden. Zum Beispiel kann eine Proteinbande, welche nur mit der aktiven, aber nicht mit der inaktiven Sonde im Gel zu sehen ist, als ein potentielles Zielprotein berücksichtigt werden. In einem Konkurrenzversuch kann das Verschwinden einer Proteinbande (oder die Detektion abnehmender Mengen des Proteins) in Gegenwart des Kompetitors auf das Zielprotein hindeuten. Eine Proteinfärbung nach der SDS-PAGE und Konkurrenz kann das Auffinden der optimalen Bedingungen für den Pulldown mit einer massenspektrometrischen Analyse erleichtern. Es sollte berücksichtigt werden, dass auch in Gegenwart eines Überschusses an nicht modifiziertem Wirkstoff ungebundenes Zielprotein vorhanden sein könnte. Somit könnte das Zielprotein an die immobilisierte Sonde binden und würde massenspektrometrisch detektiert. Der simple Vergleich der detektierten Proteine in Gegenwart oder Abwesenheit eines Kompetitors wird dann falsch negative Ergebnisse liefern.

Daher ist es ratsam, quantitative Proteomik einzusetzen, um die relative Häufigkeit der isolierten Proteine detektieren zu können (siehe Abschnitt 2.1.11) sowie genügend Replikate durchzuführen, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten.

2.1.8. Unspezifische Bindung

Die Isolierung und Identifizierung der relevanten Zielproteine mittels Affinitäts-basierter Proteomik erfordert oft das Entfernen von unspezifisch an die Sonde und/oder die Matrix bindenden Proteine (Hintergrundbindung). Unspezifische Binder erhöhen die Komplexität der Gemische, die massenspektrometrisch analysiert werden, und sind oft nicht leicht zu erkennen. Hochaffine Liganden werden bevorzugt an ihre physiologischen Zielproteine im Zelllysate binden und können mit einer geringeren Affinität mit zusätzlichen Proteinen interagieren. Allerdings ist der Proteinextrakt beim Pulldown einer hohen lokalen Konzentration des immobilisierten Liganden ausgesetzt, was die niederaffine Bindung an weitere Proteine ermöglicht, insbesondere wenn das tatsächliche Zielprotein nur in geringer Konzentration vorliegt. Die Verringerung der Menge der Affinitätssonde auf der Matrix kann Abhilfe schaffen. Daher sind eine hohe Affinität der Sonde für das Zielprotein und eine ausreichend hohe Zielproteinkonzentration für eine erfolgreiche Zielprotein-Identifizierung häufig Voraussetzung. Vorzugsweise sollten Sonden mit nanomolaren oder niedrigen mikromolaren Affinitäten verwendet werden, was einen erheblichen Aufwand an Struktur-Wirkungs-Untersuchungen erfordern kann. Da der ursprüngliche Assay häufig phänotypisch ist, könnte es schwierig sein, die relative Affinität der Substanz für das Zielprotein zu beurteilen. Dennoch darf nicht vergessen werden, dass eine hohe zelluläre Aktivität von den pharmakologischen Eigenschaften der entsprechenden Verbindung verursacht werden kann und möglicherweise eher auf der Summe der niedrigen Affinitäten zu mehreren Zielproteinen anstatt der hohen Affinität für ein einziges Protein herrührt.^[11c]

In den erfolgreichen Beispielen für Zielprotein-Identifizierung wurden meist hochaffine Sonden verwendet, und/oder die Zielproteine waren in relativ hohen Konzentrationen vorhanden. Beim Einsatz niederaffiner Liganden können die Zielproteine während der stringenten Waschschriffe verlorengehen, insbesondere wenn sie nur in geringen Konzentrationen vorhanden sind, was die Isolierung der häufig vorkommenden Proteine begünstigt. Eine statistische Analyse von Pulldown-Experimenten, die mit verschiedenen Sonden durchgeführt wurden, ermöglicht es, die Häufigkeit des Auftretens identifizierter Proteine unabhängig von der Struktur der Sonde zu bestimmen („schwarze Listen“^[59]). Darüber hinaus kann die Identifizierung der Proteine, die (unspezifisch) an gängig verwendete Matrizen binden, sogenannte „Matrix-Proteome“, helfen, unspezifische Binder zu erkennen.^[60] Weiterhin kann die quantitative Abschätzung der Proteome humaner Zelllinien und der in den Zellen enthaltenen Proteinmengen^[61] hilfreich sein. Dennoch müssen unspezifisch bindende Proteine für jede Sonde im Einzelnen bewertet werden, da vermeintlich unspezifische Binder die

physiologischen Zielproteine eines entsprechenden Liganden sein können (z.B. Tubulexin, Tabelle 1, Eintrag 11, siehe Abschnitt 5.5).^[62]

Neuentwickelte massenspektrometrische Techniken ermöglichen die Identifizierung potentieller Zielproteine aus komplexen Gemischen sofort nach deren Freisetzung von der Affinitätsmatrix.^[63] Allerdings könnte es ratsam sein, in einem Vorversuch die isolierten Proteine mithilfe von Gelelektrophorese zu trennen und anzufärben. Evaluierung verschiedener Pulldown-Parameter (z.B. das Design der Sonde, die Menge der immobilisierten Sonde, die Lysatkonzentration, die Waschbedingungen, die Elution mit der unmodifizierten Substanz, die Konkurrenz) und anschließende Färbung der Proteine nach SDS-PAGE können wertvolle Informationen zur Reduzierung der unspezifischen Bindung liefern. Zum Beispiel können Linker-Variationen, die Elution mit einem Überschuss an nicht modifizierter Substanz sowie den Einbau einer photoreaktiven Gruppe stringenter Waschbedingungen ermöglichen und somit die unspezifische Bindung verringern. Darüber hinaus kann das Proteingemisch mit einer Kontroll-Matrix vorinkubiert werden, um unspezifisch bindende Proteine vor dem eigentlichen Pulldown-Experiment mit der aktiven Verbindung zu reduzieren oder zu entfernen.^[64] Eine weitere Option ist die serielle Affinitätschromatographie.^[50] Bei dieser Methode wird die immobilisierte Sonde dem Proteinextrakt ausgesetzt, und anschließend wird das Lysat abgenommen und zu einer frischen Affinitätsmatrix gegeben, wobei diese Schritte mehrmals wiederholt werden (Abbildung 1 b). Es ist zu erwarten, dass die erste Affinitätsmatrix die spezifisch bindenden Proteine anreichert, während unspezifische Binder in einem ähnlichen Ausmaß von allen folgenden Affinitätsmatrizes gebunden werden. Die serielle Affinitätschromatographie wurde erfolgreich für die FK506/FKBP12-, Methotrexat/DHFR- und Benzensulfonamide/CA2-Interaktionen eingesetzt und zur Identifizierung von Clathrin als das Zielprotein von Bolinachinon (Tabelle 1, Eintrag 12) verwendet.^[50,52]

2.1.9. Immobilisierung der Sonde durch Photoaktivierung

Naturstoffe sind eine reichhaltige Quelle biologisch aktiver Verbindungen. Jedoch sind sie oft synthetisch nicht oder limitiert zugänglich, was die Aufstellung einer SAR und dadurch die Identifizierung ihrer Zielproteine erschwert. Wenn keine Totalsynthese für einen Naturstoff verfügbar ist, kann diese Substanz an Positionen, die eine Derivatisierung zulassen, modifiziert werden, was semi-synthetische Derivate generiert. Wenn Substitutionen toleriert werden, kann ein Linker zur Immobilisierung auf einer Matrix eingebaut werden. Eine Alternative zur Immobilisierung von Verbindungen ohne vorherige Modifizierung ist deren Kupplung an eine feste Phase mittels Photoaktivierung.^[16] Bei diesem Verfahren ist die Matrix z.B. mit Aryldiazirin-Oligoethylen-glycol-Linkern derivatisiert. Nach UV-Bestrahlung werden hochreaktive Carbene generiert, welche unspezifisch mit den zu immobilisierenden Substanzen reagieren (Abbildung 5). In einer Teststudie wurden alle möglichen C-H- und C-O-Insertionsprodukte bei verhältnismäßig gleicher Verteilung erzeugt^[65] und so unterschiedlich orientierte immobilisierte

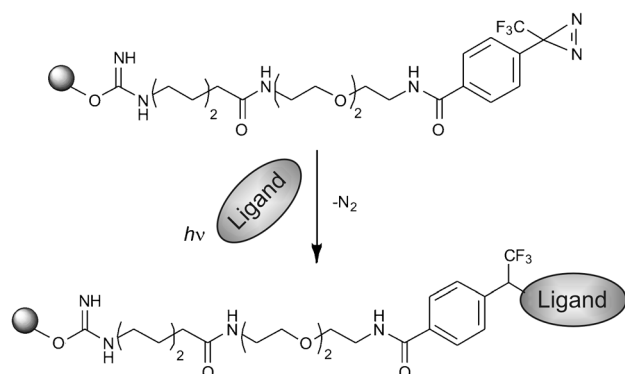


Abbildung 5. Immobilisierung von Liganden mittels Photoaktivierung.

Verbindungen generiert. Nur Insertionen an Positionen, die strukturelle Änderungen ohne einen drastischen Verlust der Aktivität tolerieren, sollten die Bindung und Isolierung der Zielproteine erlauben. Diese Methode wurde erfolgreich zur Identifizierung von Glyoxylase als Zielprotein des Osteoklastogenese-Inhibitors Methylgerfelin (Tabelle 1, Eintrag 13)^[66] und für die Erzeugung von chemischen Arrays zum Auffinden von Proteinliganden eingesetzt.^[16,67]

2.1.10. Zielprotein-Identifizierung durch ligandengesteuerte Proteinmarkierung

Eine relativ neue Strategie bei der Zielprotein-Identifizierung ist die Übertragung eines fluoreszierenden Restes von einem Liganden nach Bindung an die Zielproteine. Dafür muss die biologisch aktive Verbindung mit einer an einen Fluorophor gekuppelten reaktiven, z.B. acylierenden oder alkylierenden Gruppe (z.B. ein Phenylester oder ein Benzylsulfonat) ausgestattet sein. In einem ersten Schritt bindet die Verbindung an das Zielprotein, gefolgt von der Übertragung der reaktiven Gruppe auf eine proximale Aminosäure unter Verdrängung des als Abgangsgruppe fungierenden Liganden (Abbildung 6).^[68] Beispielsweise wurde eine Acyl-

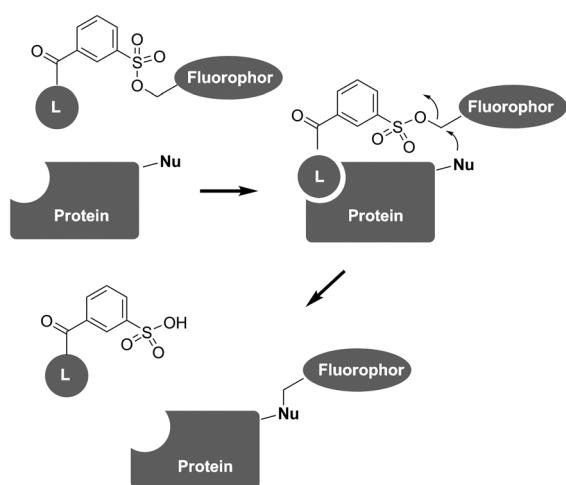


Abbildung 6. Ligandengesteuerte Proteinmarkierung mittels Tosylübertragung.^[68a]

übertragungsreaktion zur Markierung von Zielproteinen des Naturstoffs Marinopyrrol A mit Dimethylaminocumarin verwendet (Tabelle 1, Eintrag 14).^[68b] Nach Inkubation lebender Zellen mit dem Marinopyrrol-Derivat wurden in der SDS-PAGE zwei fluoreszierende Banden im Rohlysat detektiert. Die Coimmunpräzipitation unter Verwendung eines Antikörpers gegen den Fluorophor führte zum Nachweis von drei Banden, deren massenspektrometrische Analyse zwei als Aktin und die dritte als Actinin identifizierte, welches mit Aktin Komplexe bildet. Mittels Mikroskopie, Mikrokalorimetrie und In-vitro-Aktin-Polymerisationsassays konnte Aktin als Zielprotein bestätigt werden. In einem ähnlichen Versuchsaufbau wurde die Tosylübertragung zur Markierung von Proteinen, die an Fusicoccin A binden (Tabelle 1, Eintrag 15, siehe Abschnitt 5.6), verwendet.^[69]

2.1.11. Quantitative Proteomik

Der einfache Vergleich zwischen Proteinen, die mit der aktiven und der inaktiven Sonde isoliert werden, führt zu Einschränkungen, die durch eine relative Quantifizierung der Proteine aus verschiedenen Populationen überwunden werden können, d.h. mittels quantitativer Proteomik. Zu diesem Zweck werden in der Regel stabile Isotope in die Proteine eingebaut, obwohl eine markierungsfreie Quantifizierung ebenso möglich ist.^[70] Bei Einbau stabiler Isotope bleiben die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Proteine unverändert und die Bindung an den Liganden wird nicht beeinträchtigt. Die Proteine unterscheiden sich jedoch in ihrer Masse, was ihre gleichzeitige Detektion und relative Quantifizierung ermöglicht. Die Markierung mit Isotopen kann metabolisch oder chemisch erfolgen. Mann et al. haben die stabile Isotopenmarkierung von Proteinen mit Aminosäuren in der Zellkultur (stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC) etabliert.^[71] SILAC nutzt aus, dass Säugerzellen auf die Zufuhr essentieller Aminosäuren angewiesen sind (z.B. Methionin, Arginin, Leucin, Lysin). Wachsende Zellen werden entweder unter normalen Bedingungen (natürlich vorkommende oder „leichte“ Aminosäuren) oder aber mit markierten essentiellen Aminosäuren (z.B. mit ¹³C markiertem L-Arginin^[72] und mit ¹³C und ¹⁵N markiertem L-Lysin,^[73] „schwere“ Aminosäuren) kultiviert, die nach fünf Zellteilungen vollständig in das zelluläre Proteom eingebaut sind. Für den Pulldown werden verschiedene Lysate mit der aktiven und der Kontrollsonde inkubiert (z.B. „schweres“ Lysat mit der aktiven Sonde und „leichtes“ Lysat mit der Kontrollsonde).

Die aus beiden Versuchen eluierten Proteine werden vereint, aufbereitet und massenspektrometrisch analysiert (Abbildung 7a). Der Vergleich der Massenspektren von „schweren“ und „leichten“ Peptiden zeigt eine Massenverschiebung für die isotope markierten Peptide von 6 Da für ¹³C-L-Arginin-haltige Peptide und von 8 Da für ¹³C-¹⁵N-L-Lysin-markierte Peptide. SILAC-Peptidpaare haben zugewiesene Positionen bezüglich ihrer Masse und Retentionszeit. Wenn ein „leichtes“ Peptid bei einer bestimmten Masse und Retentionszeit erkannt wird, wird im Regelfall das „schwere“ Peptid ebenfalls detektiert.^[73] Die relative Menge des „schweren“ Peptids im Vergleich zum „leichten“ Peptid kann

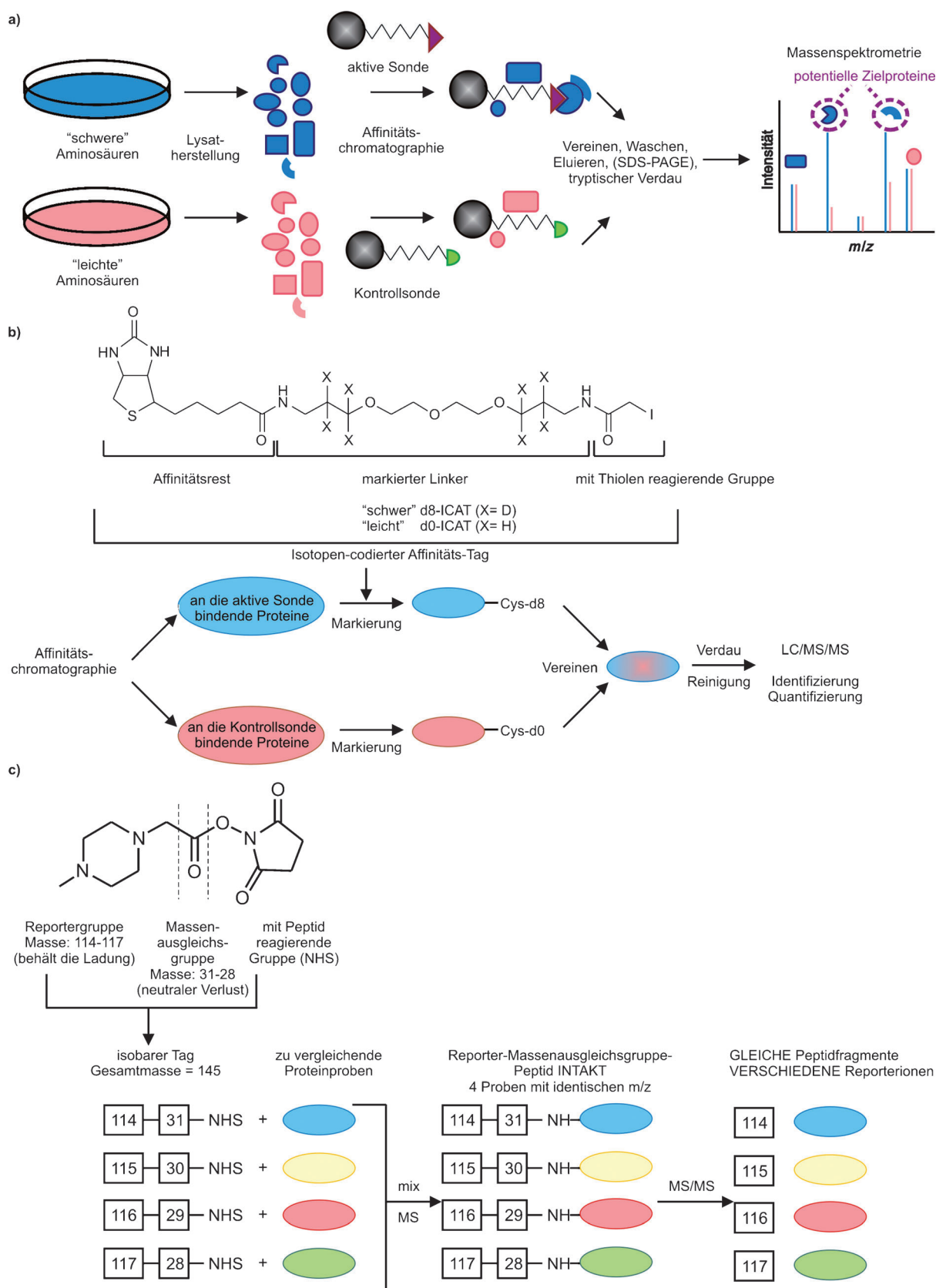


Abbildung 7. Ansätze für die quantitative Proteomik. a) Zielprotein-Identifizierung mittels SILAC.^[73] b) Isotopen-kodierte Affinitäts-Tags (ICAT).^[70] c) Quantifizierung mithilfe von isobaren Tags (iTRAQ).^[74]

aus dem Verhältnis der Ionenintensitäten der SILAC-Peptidpaare abgeleitet werden. Die Affinitätschromatographie unter Verwendung SILAC-markierter Proteinextrakte erlaubt mildere Waschbedingungen und ermöglicht die Isolierung von niederaffinen Proteinen und die Priorisierung von Zielproteinen mittels SILAC.^[73] Dieses Konzept wurde für Wirkstoffe mit bekannter Wirkungsweise (Kinase-Inhibitoren und Immunophilin-Liganden) überprüft.^[73] SILAC wurde bei der Identifizierung von Tubulin und CSE1L als Zielproteine des Tetrahydropyrans Tubulexin A (Tabelle 1, Eintrag 11),^[62] GSTP1 als das Zielprotein von Piperlongumin (Tabelle 1, Eintrag 16),^[75] Epoxidhydrolase 1 und MT-ND1 als Zielproteine eines 5-Benzoylindol-Derivats (Tabelle 1, Eintrag 17)^[76] und für die Analyse von Imatinib-Zielproteinen^[77] und des menschlichen Kinoms^[78] verwendet. SILAC wurde ebenfalls zur Markierung embryonaler Stammzellen eingesetzt.^[79] Metabolische Markierung wurde auch für ganze Organismen wie Mäuse,^[80] *C. elegans* und *D. melanogaster*^[81] beschrieben.

Obwohl sehr wirksam, ist SILAC nicht für die Markierung von Zellen geeignet, die nicht für eine ausreichend lange Zeit in Kultur gehalten werden können, um eine vollständige Markierung des Proteoms sicherzustellen, z.B. Thrombozyten, sowie zur Markierung von isoliertem Gewebe und menschlichen Körperflüssigkeiten. In solchen Fällen sollte eine chemische Markierung in Betracht gezogen werden. Mehrere Strategien stehen dafür zur Verfügung, insbesondere die Verwendung von Isotopen-kodierten Affinitäts-Tags (ICAT)^[82] oder von isobaren Tags für die relative und absolute Quantifizierung (iTRAQ).^[74] Das ICAT-Reagens enthält einen Affinitätsrest (z.B. Biotin), einen isotopenmarkierten Linker (z.B. achtfach deuteriert) und eine Gruppe (z.B. Iodacetamid), die selektiv mit Thiolen reagiert (Abbildung 7b).^[82] Die Seitenketten der Cysteinreste der zu vergleichenden Proteinpopulationen werden entweder mit der „leichten“ oder der „schweren“ Form des ICAT-Reagens derivatisiert. Nach Vereinigen der Proben und tryptischem Verdau werden die markierten Peptide mithilfe von Avidin-Affinitätschromatographie fraktioniert und quantitativ mittels Massenspektrometrie analysiert. Eine zweite Generation von ICAT-Reagentien ist mit einem spaltbaren Linker ausgestattet und wurde für die Zielprotein-Identifizierung der antitumorigenen Substanz E7070 (*N*-(3-Chlor-7-indolyl)-1,4-benzoldisulfonamid, Tabelle 1, Eintrag 18) verwendet, die Malatdehydrogenase ergab (MDH).^[83]

Die ICAT-Methode reduziert die Komplexität der zu analysierenden Gemische und deckt 96.1 % des menschlichen Proteoms ab.^[84] Eine komplette Abdeckung kann durch die N- oder C-terminale Markierung von Peptiden erreicht werden.^[84] Einen Ansatz zur Isotopenmarkierung von Aminogruppen stellt iTRAQ (isobare Tags für die relative und absolute Quantifizierung) dar.^[74] Das iTRAQ-Reagens besteht aus einer Reportergruppe (*N*-Methylpiperazin), einer Massenausgleichsgruppe (Carbonylgruppe) und einer Gruppe, die mit Peptiden reagiert (NHS-Ester) (Abbildung 7c).^[74] Dabei wird jede Peptid-Aminogruppe in einem Proteingemisch über eine Amidbindung markiert. Die Reportergruppe enthält Kombinationen von ¹³C, ¹⁵N und ¹⁸O, die in Tags mit einer Masse von 114–117 Da resultieren. Die

Massenausgleichsgruppe hat ein Molekulargewicht von 28 bis 31 Da, welches aus der Isotopenanreicherung an der Carbonyl-Komponente resultiert. Dadurch haben die verschiedenen iTRAQ-Reagentien eine identische Gesamtmasse (145 Da). Mit unterschiedlichen iTRAQ-Reagentien markierte Peptide sind isobar und erscheinen als einziger MS-Peak nach dem Vereinen der markierten Peptidgemische. Die kollisionsinduzierte Dissoziation (collision-induced dissociation, CID) führt zu der Aufspaltung der Amidbindung und einem Verlust der Massenausgleichsgruppe, während die Reportergruppen Ionensignale mit *m/z* von 114 bis 117 Da erzeugen. Die relativen Flächen der Peaks der Reportergruppen-Signale werden für die Quantifizierung der Peptide in der jeweiligen Probe herangezogen. Mithilfe von iTRAQ können bis zu vier Proben markiert und gleichzeitig analysiert werden. iTRAQ wurde in der Isolierung von Tankyrase als Zielprotein von XAV939 (Tabelle 1, Eintrag 19, siehe auch Abschnitt 5.10),^[85] des Oxysterol-bindenden Proteins OBP als Zielprotein von OSW-1 (Tabelle 1, Eintrag 20) und von ORPphilen^[15a] und für die Profilierung von ABL-Inhibitoren mittels Kinaseinhibitor-Matrizes (*Kinobeads*) (Tabelle 1, Eintrag 21) eingesetzt.^[86]

Neben den Verfahren, die eine Protein- oder Peptidmarkierung einschließen, wurden in mehreren Studien auch markierungsfreie Quantifizierungen (label-free quantification, LFQ) von Proteinen durchgeführt.^[87] Zum Beispiel kann die Integration des kompletten massenspektrometrischen Signals jedes Peptids verwendet werden, um das gleiche Peptid in verschiedenen LC-MS/MS-Läufen zu quantifizieren^[88] (für eine umfassende Übersicht über gängige markierungsfreie Quantifizierungsstrategien siehe Lit. [89]). Unter den gegenwärtigen Techniken zur massenspektrometrischen Quantifizierung ist die Genauigkeit der markierungsfreien Verfahren am niedrigsten, da sich alle experimentellen Unterschiede in den resultierenden Daten widerspiegeln.^[86,89] Allerdings ist LFQ weniger kostspielig und zeitaufwendig (es sind keine zusätzlichen Schritte zur Protein- oder Peptidmarkierung erforderlich) und deckt einen breiteren dynamischen Bereich der Quantifizierung ab als die stabile Isotopenmarkierung.^[86] Darüber hinaus gibt es keine Einschränkung für die Anzahl der Proben, die verglichen werden sollen, und die massenspektrometrische Komplexität ist nicht erhöht.^[86] Uns sind keine Beispiele für Zielprotein-Identifizierungen mithilfe von LFQ bekannt. Dennoch sollte die markierungsfreie Quantifizierung als eine Alternative bei der Planung einer Proteinquantifizierung in Erwägung gezogen werden.

2.1.12. „Getaggte“ Substanzbibliotheken

Mögliche Probleme durch nachträgliche Anknüpfung eines Linkers nach der Identifizierung einer aktiven biologisch aktiven Substanz können durch das Integrieren des Linkers bereits bei der Synthese der Substanzbibliotheken (tagging) umgangen werden.^[51c,90] Dadurch können die Schritte von der Identifizierung eines Wirkstoffs bis zur Isolierung der Zielproteine effizienter gestaltet werden. Viele Literaturbeispiele basieren auf dem Triazin-Gerüst, das diverse Modifikationen erlaubt (Abbildung 8a).^[91] Eine Tri-

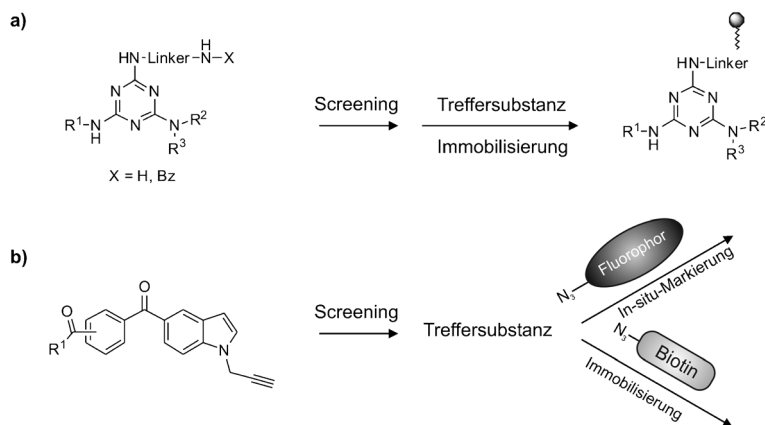


Abbildung 8. Tag-enthaltende Substanzbibliotheken für die Zielprotein-Identifizierung. a) Triazin- und b) 5-Benzoylindol-basierte Bibliotheken.

azin-basierte Bibliothek, die mit einem Triethylenglycol-Linker ausgestattet war, wurde in Zebrafisch-Embryonen hinsichtlich morphologischer Veränderungen des Gehirns und der Augen untersucht, und unter 1536 Triazinderivaten wurde eine aktive Verbindung identifiziert (Tabelle 1, Eintrag 22). Die Entfernung des Linkers (wodurch die Substanz Encephalazin generiert wurde) hatte keinen Einfluss auf die Aktivität, sodass offensichtlich weder der Linker noch die Aminogruppe wichtig für die Aktivität waren. Das den Linker enthaltende Derivat von Encephalazin wurde auf einer Affinitätsmatrix immobilisiert und mit einem Proteinextrakt inkubiert. Dadurch wurden ribosomale Proteine als Zielproteine von Encephalazin identifiziert.^[92] Ein ähnlicher Versuchsaufbau führte in einem Screen für Modulatoren der Pigmentierung zur Isolierung aktiver Verbindungen und der mitochondrialen F1F0-ATPase als deren Zielprotein.^[90,93] In einem Screen zur Modulation des Insulin-Signalwegs in *C. elegans* wurde eine Substanzbibliothek mit „Benzoyl-Capping“ und integriertem Tag eingesetzt. Für eine aktive Verbindung aus diesem Screen (GAPDS, Tabelle 1, Eintrag 23) wurde mittels Affinitätschromatographie GAPDH als Zielprotein identifiziert.^[94]

Cravatt et al. synthetisierten eine Bibliothek, die ebenfalls eine Zielprotein-Identifizierung direkt nach einem zellbasierten Screen ohne zusätzliche chemische Modifikationen der Trefferverbindungen ermöglicht.^[76] Die Bibliothek leitet sich von 5-Benzoylindol und 7-Benzoylbenzo-1,4-diazepin-2,5-dion ab, wobei jede Substanz mit einer photoreaktiven Gruppe für die UV-vermittelte Kupplung an die Zielproteine und einem Alkinrest für Klick-Chemie ausgestattet war (Abbildung 8b).^[76] Die Bibliothek wurde auf antiproliferative Aktivität in MDA-MB-231-Zellen unter normalen Bedingungen bei niedriger Glukosekonzentration untersucht. Eine Verbindung (Tabelle 1, Eintrag 17) hemmte die Proliferation unter hypoglykämischen Bedingungen. Eine SILAC-basierte Affinitätschromatographie führte zur Identifizierung der Zielproteine Epoxidhydrolase 1 und MT-ND1, die an der mitochondrialen Atmung beteiligt sind.

2.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese (2DE) ermöglicht die gleichzeitige Trennung von Tausenden von Proteinen mittels isoelektrischer Fokussierung aufgrund ihrer Ladung (1. Dimension) und entsprechend ihrer Größe (2. Dimension). Die daraus resultierenden sogenannten Proteinspots stellen in der Regel einzelne Proteine dar, die isoliert und identifiziert werden können. Diese Methode erlaubte erstmals eine Proteomanalyse^[95] und kann ebenso für die Zielprotein-Identifizierung eingesetzt werden. Eine Voraussetzung hierfür ist die kovalente Verknüpfung zwischen der Verbindung und dem Zielprotein und seine Markierung (mit einem Radioisotop oder Fluorophor) zur späteren Detektion. Jessen et al. nutzten die 2DE für die Suche nach Zielproteinen des Apoptose-induzierenden 3,5-Diaryl-[1,2,4]-oxadiazols MX-74420/MX-126374 (Tabelle 1, Eintrag 24).^[96] Ein Tritium-markiertes photoreaktives Derivat wurde durch UV-Bestrahlung an die daran bindenden Proteine gekuppelt, und eine spezifisch markierte Bande von 50 kDa und einem pI-Wert von 5.3 wurde in der SDS-PAGE beobachtet. Diese Bande wurde durch Zugabe des nicht modifizierten Wirkstoffs unterdrückt. Die Trennung der markierten Lysate mittels 2DE lieferte einen einzigen Proteinspot, welcher nach tryptischem Verdau und massenspektrometrischer Analyse als TIP47 identifiziert wurde. Park et al. haben FITGE (fluorescence difference approach in two-dimensional gel electrophoresis) als weiteres auf 2DE basiertes Verfahren entwickelt und für die Ermittlung der Zielproteine einer antiproliferativen Substanz (Tabelle 1, Eintrag 25) eingesetzt.^[45] Eine aktive und eine Kontrollsonde wurden synthetisiert, die Benzophenon als photoreaktive Gruppe und einen Acetylenrest für eine bioorthogonale Klick-Reaktion enthielten. Mithilfe dieser Sonden wurden die Proteome in Lysaten oder lebenden Zellen nach UV-Bestrahlung markiert und durch die Klick-Reaktion mit Cy5-(aktive Sonde) oder Cy3-Azid (Kontrollsonde) verknüpft. Die markierten Proteome wurden vereint und einer 2DE unterzogen. Die überlagerten Bilder der Cy5- und Cy3-Fluoreszenz zeigten nur wenige Signale, die im Cy5-Bild jedoch nicht im Cy3-Bild detektierbar waren, und darauf basierend wurde Tubulin als Zielprotein identifiziert und validiert.

Obwohl 2DE für die Zielprotein-Isolierung genutzt werden kann, ist diese Methode zeitaufwendig, arbeitsintensiv und durch die geringe Auflösung limitiert. Wegen unzureichender Sensitivität der verfügbaren Proteinfärbungen werden meistens häufig vorkommende Proteine detektiert. Weiterhin können oft hydrophobe, insbesondere Membranproteine, nicht detektiert werden, und Proteomvergleiche sind aufgrund von Gel-zu-Gel-Variationen schwierig. Neuere Optimierungen verwenden eine isoelektrische Fokussierung mit immobilisierten pH-Gradienten oder Kationenaustauschern vor der Trypsinierung und der Umkehrphasenchromatographie und sind deutlich empfindlicher.^[97]

2.3. Markierungsfreie Ansätze zur Zielprotein-Identifizierung

2.3.1. DARTS

Die DARTS-Methode (drug affinity responsive target stability) wurde als eine universell anwendbare Strategie zur Untersuchung von Ligand-Protein-Wechselwirkungen entwickelt.^[98] DARTS beruht auf der Erkenntnis, dass ein Zielprotein nach der Bindung an eine Substanz möglicherweise weniger anfällig für Proteolyse im Vergleich zum ungebundenen Zustand ist.^[99] Ein wesentlicher Vorteil von DARTS ist die Verwendung nicht modifizierter Verbindungen für die Zielprotein-Identifizierung. Die Bindung eines Liganden an ein Zielprotein könnte eine lokale oder globale Stabilisierung der Proteinkonformation und/oder eine veränderte Anfälligkeit für Proteolyse bewirken.^[98] Die Ligandenbindung könnte die Protease-Erkennungssequenz maskieren und zu Unterschieden in den Proteolysemustern zwischen dem Ligand-gebundenen und Ligand-freien Zustand führen (Abbildung 9). Beispielsweise war der FKBP12-Rapamycin/

Liganden an seine Zielproteine verändert die Stabilität der Proteine, z. B. die thermodynamische Stabilität, geringe Entfaltungsrates und die Dynamik des nativen Proteins.^[13] Die Menge der Proteine wird nach einer Pulsproteolyse mittels 2DE untersucht. Um das Konzept zu überprüfen, wählten Liu et al. nach 2DE 12 Proteinspots aus, um ATP-bindende Proteine zu isolieren. Davon waren sechs Proteine bereits als ATP-Binder bekannt. Für drei der restlichen Proteine konnte der Einfluss von ATP auf ihre energetischen Eigenschaften bestätigt werden. Da dieses Verfahren die gleichen Einschränkungen wie 2DE hat (siehe Abschnitt 2.2), setzten Chang et al. für den Nachweis von ATP-bindenden Proteinen in *E. coli* SDS-PAGE und Flüssigchromatographie statt 2DE ein.^[100] Da SDS-PAGE einfach durchführbar ist, können unterschiedliche Harnstoff-Konzentrationen untersucht werden. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit der Zielprotein-Identifizierung, da die Harnstoff-Konzentration die Proteinentfaltung in Gegenwart und Abwesenheit vom Liganden unterschiedlich moduliert.

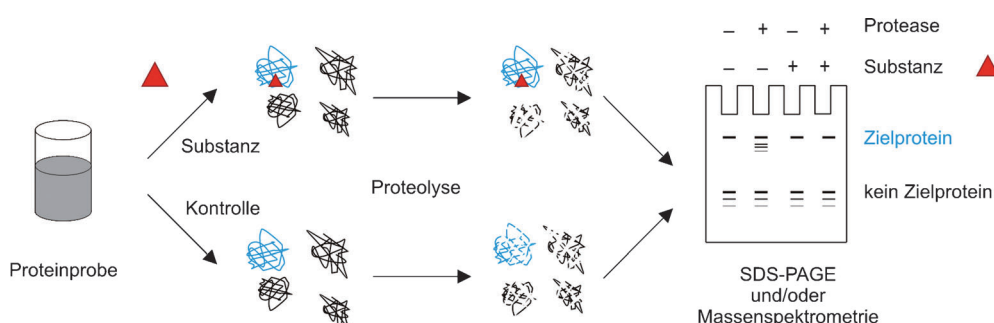


Abbildung 9. Zielprotein-Identifizierung mittels DARTS.^[98]

FK506-Komplex nach der Bindung von FKBP12 an Rapamycin und FK506 vor der proteolytischen Spaltung durch die Protease Subtilisin geschützt. Wortmannin führte nicht zur Stabilisierung, d. h. der Proteolyseschutz war selektiv. Da weder Rapamycin noch FK506 Konformationsänderungen in FKBP12 herbeiführen, reicht die Bindung allein aus, um das Protein im proteolyseresistenten Zustand zu stabilisieren.^[98] Die Eignung des DARTS-Konzepts auch für komplexe Proteingemische wurde anhand der Didemnin/B-EF1 α -, mTOR/Rapamycin-, COX-2/Celecoxib- und SCF-E3-Ubiquitin-Ligase/Inhibitor-Komplexe nachgewiesen.^[98] Darüber hinaus wurde DARTS in der Identifizierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 4A (eIF4A) als eines der Zielproteine von Resveratrol (Tabelle 1, Eintrag 26) eingesetzt. DARTS könnte durch die Affinität der Ligand-Protein-Wechselwirkung, das Vorkommen und die Detektierbarkeit der Proteine mittels Massenspektrometrie und die Anfälligkeit der Proteine für Proteolyse limitiert werden.

Eine verwandte Methode nutzt die Pulsproteolyse^[99] und wurde eingesetzt, um ATP-bindende Proteine in *E. coli* zu identifizieren.^[13] Hierfür wurden Proteinproben mit ATP inkubiert und die Harnstoff-induzierte Proteinentfaltung im Vergleich zu unbehandelten Proben nach einer kurzen Inkubation mit einer Protease analysiert. Die Bindung eines

Um die thermodynamischen Eigenschaften der Proteinfaltung/-entfaltung in Gegenwart eines Liganden zu untersuchen, machten sich West et al. die Abhängigkeit der Oxidationsrate von Methionin von chemischen Denaturierungsmitteln (genannt SPROX, stability of proteins from rates of oxidation) gekoppelt mit quantitativer Massenspektrometrie zunutze.^[101] Zu diesem Zweck wurde ein Proteingemisch

mit steigenden Konzentrationen an Guanidin-Hydrochlorid als Denaturierungsmittel in Gegenwart oder Abwesenheit einer Verbindung inkubiert. Die Proben wurden dann mit Wasserstoffperoxid versetzt, sodass die Seitenketten der Methioninreste selektiv oxidiert wurden. Die oxidierten und nicht-oxidierten Proteine wurden mittels isobarer Tags quantifiziert. Es wurden die Assaybedingungen (Übergangspunkte, transition midpoints) ermittelt, bei denen, abhängig von der Konzentration des Denaturierungsmittels, die Peptide mit nicht oxidierten Methioninresten verschwinden und Peptide mit oxidierten Methioninresten auftauchen. Als Zielproteine werden Proteine gewertet, für die sich die Übergangspunkte zwischen Ligand-gebundenem und Ligand-freiem Zustand für ein Peptid unterscheiden. Mit dieser Vorgehensweise wurden an Cyclosporin A bindende Proteine in Hefelysaten identifiziert. Acht der ermittelten Wechselwirkungen waren vorher nicht bekannt, und ein bekanntes Zielprotein (Calcineurin) wurde nicht detektiert. Diese Methode ist auf das Vorhandensein von Methioninresten in der Ligandenbindestelle und auf ausreichend hohe Protein- und Ligandenkonzentration angewiesen, damit ein Unterschied in den Übergangspunkten detektiert werden kann.

2.3.2. Chromatographische Coelution

Bei der chromatographischen Coelution werden Ligand-Protein-Komplexe aus Gemischen nahezu nativer Proteine mittels nicht denaturierender HPLC gekoppelt an LC-MS vorfraktioniert.^[102] Die Bindung eines Liganden an die Zielproteine resultiert in einer charakteristischen Verschiebung der chromatographischen Retentionszeit einer Verbindung. HPLC-MS/MS wird dann verwendet, um das bindende Protein zu identifizieren. Dieses Konzept wurde anhand der Komplexe Methotrexat/DHFR, Radiciol/Hsp90, Sordarine/elf2 und TSA/HDAC1 bestätigt. Die chromatographische Coelution wurde bei der Identifizierung von Erg6p, einer zytoplasmatischen delta-Sterol-C-Methyltransferase, als das Zielprotein des fungiziden Naturstoffs 4513-0042 (Tabelle 1, Eintrag 27) und bei der Identifizierung von „Off-Targets“ des Dopamin-Rezeptor-Agonisten A77636 eingesetzt.^[102] Diese Methode ist unter anderem auch für die Detektion von gering vorkommenden Zielproteinen sowie niederaffinen (mikromolaren) Wechselwirkungen geeignet. Eine Einschränkung ist die Notwendigkeit der Trennung von nicht gebundener und Protein-gebundener Substanz, was kovalent bindende Wirkstoffe ausschließt. Die benötigten nativen Bedingungen für TICC erfordern eine geeignete und ausreichende Solubilisierung von Membranproteinen, unter Erhaltung der Ligand-Protein-Wechselwirkung. Darüber hinaus könnten coeluierende Proteine mit ähnlichen Retentionseigenschaften die Detektion der Zielproteine erschweren. Somit ist TICC auf nicht-kovalente, in erster Linie hydrophobe Protein-Ligand-Wechselwirkungen und biologische Proben, die lösliche native Proteine enthalten, beschränkt.

2.3.3. Biochemische Suppression

In der Genetik können Phänotypen, die durch Mutationen in einem Gen hervorgerufen werden, durch die Überexpression anderer Gene kompensiert werden. Diese Methode findet in den sogenannten „High-copy suppressor“-Screens Anwendung.^[103] In Anlehnung daran wurde eine

Strategie zur biochemischen Suppression entwickelt. Dabei übernimmt ein Inhibitor die Rolle der Mutation, und die Zugabe von zum Teil gereinigten Proteinen ahmt eine Proteinüberexpression nach, welche die Hemmung durch die inhibierende Substanz in einem entsprechenden Assay aufhebt.^[103] Die biochemische Suppression ist auf lösliche und fraktionierbare Proteine angewiesen. Peterson et al. verwendeten die biochemische Suppression nach der Zugabe konzentrierter Proteinfractionen für die Suche nach dem Zielprotein des tetracyclischen Indols pirl1 (Tabelle 1, Eintrag 28).^[103] pirl1 wurde in einem Screen für PIP₂(Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat)-induzierte Aktin-Polymerisation in *Xenopus*-Extrakten identifiziert. Unbehandelte *Xenopus*-Extrakte wurden fraktioniert, konzentriert, um eine genetische Proteinüberexpression nachzuahmen, und zu den Extrakten gegeben, die mit dem Wirkstoff behandelt wurden. Die Aktivität von pirl1-unterbindenden Fraktionen verbesserte die Aktin-Polymerisationskinetik. Die weitere chromatographische Fraktionierung identifizierte einerseits den Arp2/3-Komplex als nachgeschaltete Komponente für die PIP₂-induzierte Aktin-Polymerisation. Andererseits wurde der cdc42/RhoGDI-Komplex aus einer zweiten Fraktion als Suppressor des pirl1-induzierten Phänotyps isoliert. Dieser Ansatz ist für die Identifikation von Zielproteinen nur dann geeignet, wenn eine messbare, durch den Wirkstoff modulierte Aktivität vorhanden ist. Bislang sind keine weiteren Beispiele zur Zielprotein-Isolierung nach dessen Vorgehensweise berichtet worden.

2.3.4. Vergleichende Verfahren zur Zielprotein-Identifizierung

Die zunehmend verfügbaren Daten für die Aktivität niedermolekularer Verbindungen auf Zellen (z.B. Genexpressions- und Proteomprofilierung, phänotypische Multiparameteranalyse, Zytotoxizität) ermöglicht die Erfassung von „Fingerabdrücken“ (fingerprints) oder „Signaturen“ bekannter Wirkstoffe sowie neuer biologisch aktiver Verbindungen. Diese Datenbanken können verwendet werden, um die Wirkungsweise oder gar die Zielproteine einer nicht charakterisierten Substanz vorherzusagen (Abbildung 10).

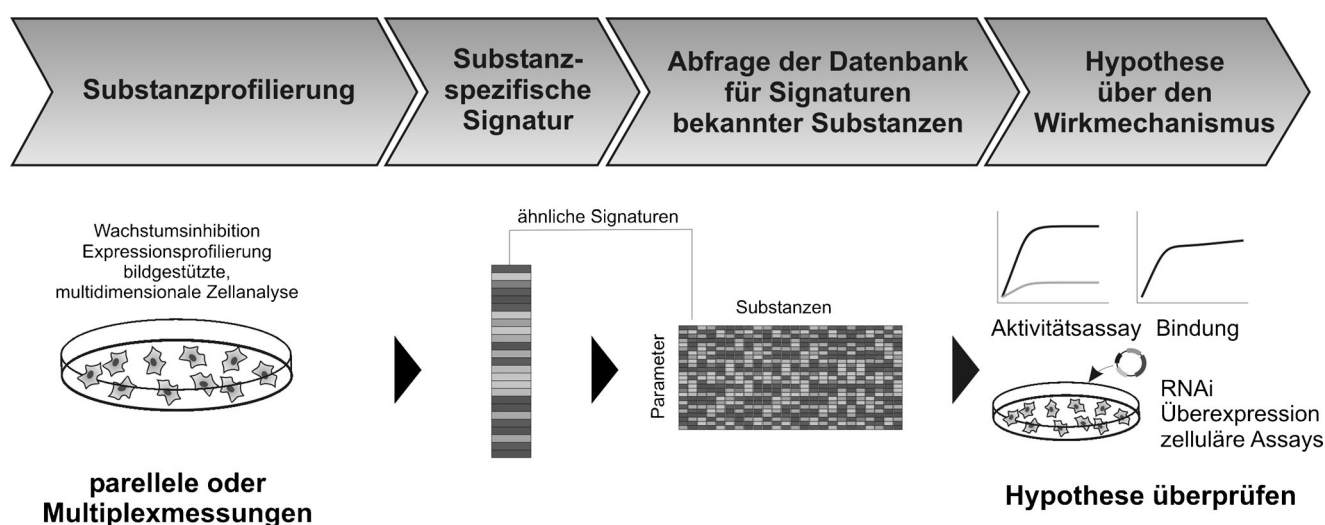


Abbildung 10. Zielprotein-Identifizierung mithilfe von Substanz-Profiling für das Erstellen einer Substanz-Signatur und Datenbankabfrage für die Aufstellung einer Hypothese über die Wirkungsweise oder das Zielprotein.

Eine Möglichkeit für die Profilierung bekannter Substanzen ist das Screening auf Zytotoxizität oder Wachstumsinhibition mit einem Satz („Panel“) an Krebszelllinien (cell line panels). Daten zur Wachstumshemmung aus diesen Studien (z. B. GI_{50} -Werte) können für das Erstellen von Aktivitätsmustern bekannter Wirkstoffe verwendet werden. Das erste Programm für ein Hochdurchsatz-Screening von Krebszelllinien waren die Untersuchungen des NCI60 (National Cancer Institute) Zelllinien-Panel.^[104] Zusätzlich zu krankheitsbasiertem Screening für die Wirkstoffentwicklung^[105] kann mithilfe des COMPARE-Algorithmus^[106] für eine Verbindung die Datenbank gescreenter Substanzen nach ähnlichen Profilen abgefragt werden. Eine Ähnlichkeit im Aktivitätsmuster ist oft mit einer ähnlichen Wirkungsweise, Resistenz oder molekularen Struktur verbunden^[105] und generiert eine Hypothese, die überprüft werden muss. Diese Art der Analyse wurde für Topoisomerase-II-Inhibitoren,^[107] Tubulin-Modulatoren^[108] und Dihydroorotatdehydrogenase^[109] durchgeführt. Die Aktivitätsmuster können mit zusätzlichen Informationen kombiniert werden, z. B. Strukturmerkmalen, möglichen Zielproteinen oder Modulatoren einer bestimmten Aktivität in Zellen.^[105] Neben der Plattform NCI60 wurden weitere Krebszelllinien-Panels zusammengestellt.^[104] Das JFCR39 (*Japanese Foundation for Cancer Research 39*)-Panel, das weniger Zelllinien als das NCI60-Panel umfasst, wurde in mehreren Studien eingesetzt, um die Wirkungsmechanismen nicht charakterisierter Substanzen vorherzusagen.^[110] Darüber hinaus sind fast 1000 Krebszelllinien in der Krebszelllinien-Enzyklopädie (Cancer Cell Line Encyclopedia, CCLE) enthalten, die durch eine Zusammenarbeit der akademischen Forschung und der Industrie initiiert wurde.^[111] CCLE enthält Informationen über den Mutationsstatus von über 1600 Genen, die DNA-Genkopien, die mRNA-Expressionsmengen und die pharmakologischen Profile von 24 Krebsmedikamenten.

Lamb et al. führten die Konnektivitätskarten (connectivity maps) als Werkzeug ein, um die Wirkung bioaktiver Substanzen mit deren genomischen Signaturen, physiologischen Prozessen oder Krankheiten zu verbinden und Wirkstoffsignaturen zu erstellen.^[112] Mithilfe von Konnektivitätskarten kann die Signatur einer gegebenen Substanz mit der Datenbank der Wirkstoffsignaturen verglichen werden, und dadurch können neue Zusammenhänge abgeleitet werden. Lamb et al. wählten als genomische Signatur die mRNA-Expressionsprofilierung von Zellen nach Substanzbehandlung. Sie wählten 164 Verbindungen aus, die ein breites Spektrum an Aktivitäten abdecken, einschließlich Substanzen mit gleichem Zielprotein sowie unterschiedliche Wirkstoffe für die gleiche klinische Indikation. Die Brustkrebs-Zelllinie MCF7 wurde für das Erstellen der genomischen Signaturen verwendet. Anschließend wurde eine Abfragesignatur mit den Expressionsprofilen in der Datenbank verglichen. Unter Verwendung der Konnektivitätskarte wurden hohe Werte für die bekannten, aber strukturell verschiedenen HDAC-Inhibitoren Vorinostat und Trichostatin A und ihre starke Konnektivität mit Valproinsäure und HC-Toxin ermittelt. Hohe Werte wurden auch für Östrogene wie E2 und Genistein erhalten. Die Konnektivitätskarte zeigte eine schwache Konnektivität mit 17- α -Estradiol auf, das eine ge-

ringere Affinität für den Östrogenrezeptor (ER) aufweist. Weiterhin wurde auch eine negative Konnektivität für die ER-Antagonisten Fulvestrant, Tamoxifen und Raloxifen ermittelt. Eine Konnektivität wurde auch für Antipsychotika festgestellt, die verschiedenen strukturellen Klassen angehören, als Dopamin-Rezeptor-Antagonisten wirken und die Genexpression nicht direkt beeinflussen. Dieses Verfahren wurde für den Naturstoff Gedunin (Tabelle 1, Eintrag 29) angewendet, für welchen kein Zielprotein bekannt war. Gedunin wurde in einem Screen zur Hemmung der Androgen-Rezeptor(AR)-Aktivierung in Prostatakrebszellen identifiziert.^[112] Es konnte eine starke Konnektivität mit dem Hsp90(heatshock protein 90)-Inhibitor Geldanamycin und zwei Geldanamycin-Derivaten ermittelt werden. Die Rolle von Hsp90 in der Regulation der AR-Stabilität wurde anschließend bestätigt. Dieses Beispiel demonstriert das Potential der Konnektivitätskarte für die Identifizierung von Signalwegen, die durch eine nicht charakterisierte Verbindung reguliert werden. Seit ihrer Einführung im Jahr 2006 wurde die Konnektivitätskartendatenbank wiederholt für die Identifizierung der Zielproteine oder der beteiligten Signalwege nicht charakterisierter Substanzen^[113] oder für die Identifizierung von neuen Verbindungen zur Regulation bestimmter physiologischer Prozesse genutzt.^[114]

Ein Fingerabdruck oder eine Signatur einer Verbindung kann auch durch Proteomprofilierung erzeugt werden, z. B. mittels zweidimensionaler differenzieller Gelelektrophorese (2D-DIGE), welche die Quantifizierung von Proteinen ermöglicht.^[115] Hierfür werden Proteinextrakte zunächst kovalent mit fluoreszierenden *N*-Hydroxysuccinimid-Derivaten (z. B. Cy3 und Cy5) verknüpft, um die ϵ -Aminogruppen von Lysinresten zu markieren. Die zu vergleichenden Proteome werden vereint und einer 2DE unterzogen. Proteinspots werden nach Anregung bei der geeigneten Wellenlänge für den jeweiligen Fluorophor detektiert. Unterschiede in den Proteinmengen werden nach der Überlagerung beider Bilder ermittelt. Diese Methode ermöglicht den Vergleich zweier Proteinproben. Der Einsatz eines internen Standards in jeder 2DE (um die Proteinspots in allen Gelen normalisieren zu können) ermöglicht den Vergleich mehrerer Proben.^[116] Muroi et al. etablierten ein Proteomprofilierungssystem, um die Wirkungsweise von Substanzen mittels 2D-DIGE aufzuklären.^[117] Die Proteommuster von 19 bekannten, gut charakterisierten Wirkstoffen wurden mittels 2D-DIGE generiert, und die Proteomdaten nicht charakterisierter Substanzen wurden mit den Daten für bekannte Verbindungen verglichen. Iejimalide (Tabelle 1, Eintrag 30) bindet an die V-ATPase und beeinflusst die Aktin-Polymerisation. Der Naturstoff wurde dem Cluster anderer V-ATPase-Hemmer wie Bafilomycin A1 und Concamycin A zugeordnet. Im Gegensatz dazu konnte keine Eingruppierung mit Aktin-Inhibitoren festgestellt werden. Somit kann ein Proteomvergleich mittels 2D-DIGE sehr sinnvoll sein, um das Zielprotein oder die Wirkungsweise einer Substanz aufzuklären.

Perlman et al. verwendeten Daten aus der automatisierten Mikroskopie, um Substanzprofile zu erstellen.^[118] Für Verbindungen mit bekannten Wirkmechanismen wurden multidimensionale phänotypische Einzelzell-Daten gesammelt. Um ein breites Spektrum zellulärer Mechanismen ab-

zudecken, wurden verschiedene Zellfärbungen (für DNA, Tubulin, Aktin, phospho-ERK, phospho-p38, phospho-CREB, c-Fos, SC35, Anillin, Calmodulin) vorgenommen. Für jede Zelle, Region und Färbung wurden verschiedene Messungen durchgeführt (z. B. Größe, Form, Intensität), um einen Satz an Deskriptoren zu erzeugen. Die Reaktion der Zellen bei zunehmenden Konzentrationen einer gegebenen Verbindung wurde für die Profilerstellung verwendet. Ähnliche Profile wurden für strukturell verschiedene Verbindungen mit gleichen Zielmolekülen erhalten. Das Konzept wurde weiterhin durch Blindversuche mit bekannten Verbindungen bestätigt – diese Substanzen wurden demselben Cluster von Verbindungen und Substanzen mit ähnlichem Wirkmechanismus zugewiesen. Zusätzlich konnte die wenig untersuchte Substanz Austocystin mit Transkriptions- und Translationsinhibitoren gruppiert werden, und die Hemmung der Transkription konnte *in vitro* bestätigt werden.^[118]

Abassi et al. wählten Impedanzmessungen zur dynamischen Überwachung des Einflusses von Substanzen auf Zellen.^[119] Diese Methode ermöglicht die zeitaufgelöste Detektion von zellulären Effekten, die durch einen Wirkstoff verursacht werden, während andere Substanz-Profilierungsstrategien auf Endpunkt-Assays basieren. Hierfür wurde ein elektrischer Sensor eingesetzt, der kontinuierlich die morphologischen Änderungen (z. B. Zellform und -bewegung) von adhären Zellen verfolgt.^[120] Wenn die Zellen in Gefäßen ausgesät werden, die eine Elektrode auf dem Boden enthalten, drosselt ihre Anheftung und Ausbreitung auf der Elektrode den Stromfluss und verursacht Veränderungen in der Impedanz, welche extrem empfindlich gegenüber äußeren Bedingungen wie Temperatur, pH und Anwesenheit von Substanzen ist.^[120] Die Untersuchung von 2000 zugelassenen Arzneimitteln, Naturstoffen und weiteren biologisch aktiven Verbindungen in der nicht-kleinzelligen Lungenkrebszelllinie A549 zeigte, dass die Änderung der Impedanz prädiktiv für den Wirkmechanismus sein kann.^[119] Darüber hinaus ermöglicht die zeitaufgelöste Aufnahme der Impedanz die Detektion der Auswirkungen einer kurzen oder langen Substanzexposition. Die Impedanz-basierten zeitabhängigen Profile der analysierten Verbindungen wurden für eine Cluster-Analyse verwendet. Gute Korrelationen wurden für GPCRs, Tubulin-Modulatoren und DNA-Synthese-Inhibitoren erhalten. Weiterhin sagte diese Methodik neue Wirkmechanismen für bekannte Wirkstoffe vorher.

Die auf Profilvergleich basierten Methoden sind für die Aufstellung von Hypothesen bezüglich der Zielproteine oder der Wirkmechanismen hilfreich und machen eine experimentelle Überprüfung nötig. Offensichtlich sind diese Strategien auf die Identifizierung bekannter Zielproteine/Zielmoleküle beschränkt. Wenn eine gegebene Substanz keinem Cluster bekannter Wirkstoffe zugewiesen werden kann, sollte ein neuer Wirkmechanismus in Betracht gezogen werden.

2.4. Protein-Mikroarrays

Proteine, die in einem Array immobilisiert wurden, können mit einem Wirkstoff inkubiert werden, um bindende Proteine zu detektieren. Protein-Mikroarrays können mit den

für die Immobilisierung von DNA entwickelten Technologien hergestellt werden. Allerdings ist ihre Herstellung wegen der möglichen Denaturierung komplexer als die Herstellung von DNA-Mikroarrays.^[121] Die größte Herausforderung bei der Entwicklung von Protein-Mikroarrays ist die Entwicklung von Strategien und Methoden zur Proteinimmobilisierung, die die Proteinstruktur und -funktion nicht beeinträchtigen (für eine umfassende Übersicht siehe Jonkheijm et al.^[121]), sowie die Expression und Reinigung von Tausenden korrekt gefalteter und aktiver Proteine. Die herkömmliche zelluläre Expression und Reinigung einer großen Anzahl rekombinanter Proteine ist zeitaufwendig und arbeitsintensiv.^[122] Zellfreie Systeme könnten hier Abhilfe leisten. Allerdings sind die Proteine, die mithilfe der derzeit verfügbaren zellfreien Verfahren hergestellt wurden, nicht posttranslational modifiziert. Diese Modifikationen können aber für die Bindung an einen Wirkstoff notwendig sein. Dennoch sollten Protein-Mikroarrays für die Zielprotein-Identifizierung berücksichtigt werden, weil damit einige der Nachteile der Affinitäts-basierten Proteomik umgangen werden, z. B. die vorzugsweise Isolierung von häufig vorkommenden Proteinen und die schwierige Isolierung selten vorkommender oder niederaffiner Proteine. Auf einem Mikroarray sind verschiedene Proteine in gleichen Mengen vorhanden.^[11a] Meist wurden sie als His- oder GST-fusionierte Proteine für die reversible Immobilisierung exprimiert. Alternativ können die Proteine kovalent an die Arrayoberfläche angeknüpft werden, z. B. durch ihre funktionellen Gruppen oder mittels einer chemischen Ligationsreaktion.^[121] Der Protein-Chip wird mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert, und die Bindungsereignisse werden detektiert. Zu diesem Zweck müssen die Verbindungen markiert sein, z. B. mit Fluorophoren. Trotz des potenziellen Nutzens von Protein-Mikroarrays gibt es bislang nur wenige Beispiele für die Identifizierung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen unter ihrer Verwendung (Tabelle 1, Eintrag 31).^[123]

2.5. In-silico-Ansätze

In-silico-Methoden stellen eine Alternative zu den experimentellen Ansätzen zur Zielmolekül-Identifizierung dar. Keiser et al. verwendeten ein auf Statistik basierendes Verfahren (similarity ensemble approach, SEA),^[124] um neue Zielmoleküle von 878 zugelassenen Medikamenten und 2787 pharmazeutischen Verbindungen vorherzusagen.^[125] SEA vergleicht Zielproteine unter Berücksichtigung von Ähnlichkeiten zwischen ihren Liganden. Auf diese Weise wurde eine Substanzbibliothek auf mehr als 1400 Proteine untersucht. Jedes Zielprotein wurde nur durch seine bekannten Liganden beschrieben. Die zweidimensionale strukturelle Ähnlichkeit jedes Wirkstoffs zu jedem Zielprotein-Liganden wurde als *E*-Wert unter Verwendung von SEA berechnet. Die Neuigkeit der vorhergesagten „Off-Targets“ mit hohen *E*-Werten wurde weiter mithilfe von orthogonalen Datenbanken und der Literatur analysiert. Einerseits konnten bekannte Zuordnungen bestätigt werden (Revanil (Lisurid) als α 2-adrenerger Antagonist; Permax (Pergolid) als 5-HT_{1D}-Rezeptor-Agonist). Andererseits waren 184 Vorhersagen ohne

Präzedenzfall getroffen. Es wurde eine Kreuzaktivität unter GPCRs festgestellt, die wohlbekannt ist.^[126] Interessanterweise wiesen für einige Wirkstoffe die vorhergesagten Zielproteine keine Sequenz- oder Strukturähnlichkeit zu den bekannten Zielproteinen auf. Die Aktivität dieser Substanzen gegenüber den vorhergesagten Proteinen wurde dann für 30 Vorhersagen experimentell untersucht, von denen sie in vier Fällen bestätigt werden konnte (Tabelle 1, Einträge 32–35).

Diese Studie wurde von Lounkine et al. ausgeweitet, die eine „Schuld-durch-Assoziation“-Metrik entwickelt haben, um ein Wirkstoff-Zielprotein-Nebenreaktionen-Netzwerk zu erzeugen.^[7] Vorhergesagte neue Wirkstoff-Zielproteine wurden mit den Nebenwirkungen jener Substanzen verknüpft, für die sie primäre oder gut bekannte „Off-Targets“ sind. Das daraus resultierende Wirkstoff-Zielprotein-Nebenreaktionen-Netzwerk zeigte, dass Wirkstoffe oft mit „Off-targets“ assoziiert wurden, die keine strukturelle oder Sequenzähnlichkeit zu ihren primären Zielproteinen hatten. Diese Methode stellt ein Werkzeug zur Bewertung von Wirkstoffkandidaten entsprechend ihres Chemotyps und der sich davon ableitenden Nebenwirkungen dar.

Weitere ähnliche Arbeiten belegen das Potential von Computer-gestützten Verfahren zur Zielprotein- und „Off-Target“-Analyse.^[127] Daher kann dieser Ansatz zur systematischen Vorhersage von Zielproteinen und „Off-Targets“ biologisch aktiver Verbindungen angewendet werden, was zum besseren Verständnis ihrer Wirkungsweise beitragen könnte. Wie bei allen vergleichenden Strategien liegen die Einschränkungen in der Abhängigkeit dieser Methode von bekannten Zielprotein-Ligand-Interaktionen.

2.6. Genetische Ansätze zur Zielmolekül-Identifizierung

Hefe wird häufig als eukaryotischer Modellorganismus für Erkrankungen und Signalwege in Säugerzellen verwendet, da mindestens 31 % der Proteine, die von Hefegenen kodiert werden, humane Homologe haben und ca. 50 % der in vererbten Krankheiten involvierten humanen Gene auch in der Hefe vorhanden sind.^[128] Weitere Vorteile der Verwendung von Hefen sind einfache Handhabung und genetische Modifizierung, der relativ kurze Lebenszyklus, die kostengünstige Kultivierung und Wachstum, die Stabilität in einem haploiden und diploiden Zustand und das seit 1996 entschlüsselte Genom der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*.^[129] Da präzise DNA-Sequenzen an spezifischen Stellen innerhalb des Hefegenoms durch homologe Rekombination eingefügt werden können,^[130] ist ein vollständiger Satz an Hefe-Deletionsmutanten verfügbar.^[131] Dadurch wurden neue genomische Screens und umfangreiche Vergleichsstudien ermöglicht,^[132] die Grundlage für erfolgreiche Strategien zur Zielmolekül-Identifizierung sind.^[126] Ein leistungsfähiger Ansatz ist die Substanz-induzierte Haploinsuffizienzprofilierung (HIP) in *S. cerevisiae*. HIP beruht auf der Tatsache, dass Reduktion eines Zielprotein-kodierenden Gens von zwei auf eine Genkopie in der diploiden Hefe zu einem heterozygoten Organismus mit erhöhter Empfindlichkeit gegenüber an das zugehörige Zielprotein bindende Substanzen führt (Abbildung 11a).^[133] Analog sind bei der homozygoten Deletions-

profilierung (HOP) beide Kopien nicht essentieller Gene deletiert. Prinzipiell wird HOP nicht für die Zielprotein-Identifizierung verwendet, kann aber eingesetzt werden, um funktionell verwandte oder verknüpfte Gene zu identifizieren, die z. B. den Target-Signalwegen entgegenwirken oder in der Substanzentgiftung eine Rolle spielen. HOP kann Gene identifizieren, die mit dem Wirkmechanismus einer Substanz in Zusammenhang stehen, selbst wenn das Zielmolekül der Verbindung kein Protein ist. Dieser Ansatz für die Identifizierung von Zielproteinen wurde durch Verwendung einzelner heterozygoter Stämme etabliert, die in Gegenwart von subletalen Konzentrationen einer Verbindung kultiviert wurden, die direkt das Genprodukt dieses Locus als Zielprotein hat.^[133] Dabei wurde jedes deletierte Gen durch eine KanMX-Deletionskassette ersetzt, die von zwei unterschiedlichen, 20 Nukleotide langen Sequenzen („TAGs“) flankiert waren. Diese Sequenzen dienen als „molekulare Barcodes“ und ermöglichen die eindeutige Identifizierung jeder Gendeletion sogar in gepoolten Populationen.^[131a] Die relativen Empfindlichkeiten der einzelnen Stämme konnte mittels Oligonukleotid-Arrays, die die komplementären Barcode-Sequenzen enthielten, quantifiziert werden.^[131]

Die Verwendung von Barcode-Stämmen ermöglichte eine erste parallele Analyse der Effekte von zehn Substanzen auf das gesamte Hefegenom. Für das Tumortherapeutikum Methotrexat (Tabelle 1, Eintrag 36) wurden nicht nur das bekannte Zielprotein Dehydrofolatreduktase (kodiert durch DFR1), sondern auch DFR1-vorgeschaltete Gene und zugehörige Transportproteine identifiziert. Demgegenüber konnte für ein weiteres Tumortherapeutikum (5-Fluorouracil, 5-FU, Tabelle 1, Eintrag 37) das bekannte Zielprotein Thymidylatsynthase nicht gefunden werden. Stattdessen wurden mehrere Gene identifiziert, die in essentiellen RNA-Prozessen eine Rolle spielen, was darauf hindeutet, dass 5-FU direkt in die RNA eingebaut werden kann. Dieser erste genomweite HIP-Assay zeigte, dass die Methodik für die Identifizierung von Zielmolekülen eingesetzt werden kann, und auch für die Aufklärung von Wirkmechanismen und für die Identifizierung von Transportproteinen, die an der Wirkstoffresistenz beteiligt sind, in Frage kommt.^[134] Mehrere andere genomweite Profilierungsstudien unter Verwendung der heterozygoten Deletionsstammsammlung wurden durchgeführt. Für tricyclische Antidepressiva (Amitriptylin, Imipramin, Desipramin, Clomipramin, Chlorpromazin und Trifluopromazin) wurde gezeigt, dass sie die P-Typ-ATPase *NEO1* beeinflussen, und als Zielproteine von Tunicamycin (Tabelle 1, Eintrag 38) wurden Proteine, die an der Stressantwort im endoplasmatischen Retikulum und an der Zellwandglykosylierung beteiligt sind, identifiziert.^[135] Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die normalen vakuolären und Golgikomplex-Funktionen für die fehlende Empfindlichkeit für das Aminoglykosid-Antibiotikum Gentamicin (Tabelle 1, Eintrag 39) in Eukaryoten verantwortlich sind^[136] und dass stickstoffhaltige Bisphosphonate (N-BPs) wie Ibandronat, Alendronat und Risedronat (Tabelle 1, Eintrag 40) über eine Schädigung der DNA und die Modulation der Zytoskelettdynamik ihre Wirkung ausüben.^[137] Anstatt der Untersuchung haploinsuffizienter Gene kann HIP alternativ für die Suche nach „haplokompetenten“ Genen verwendet werden, die zu ver-

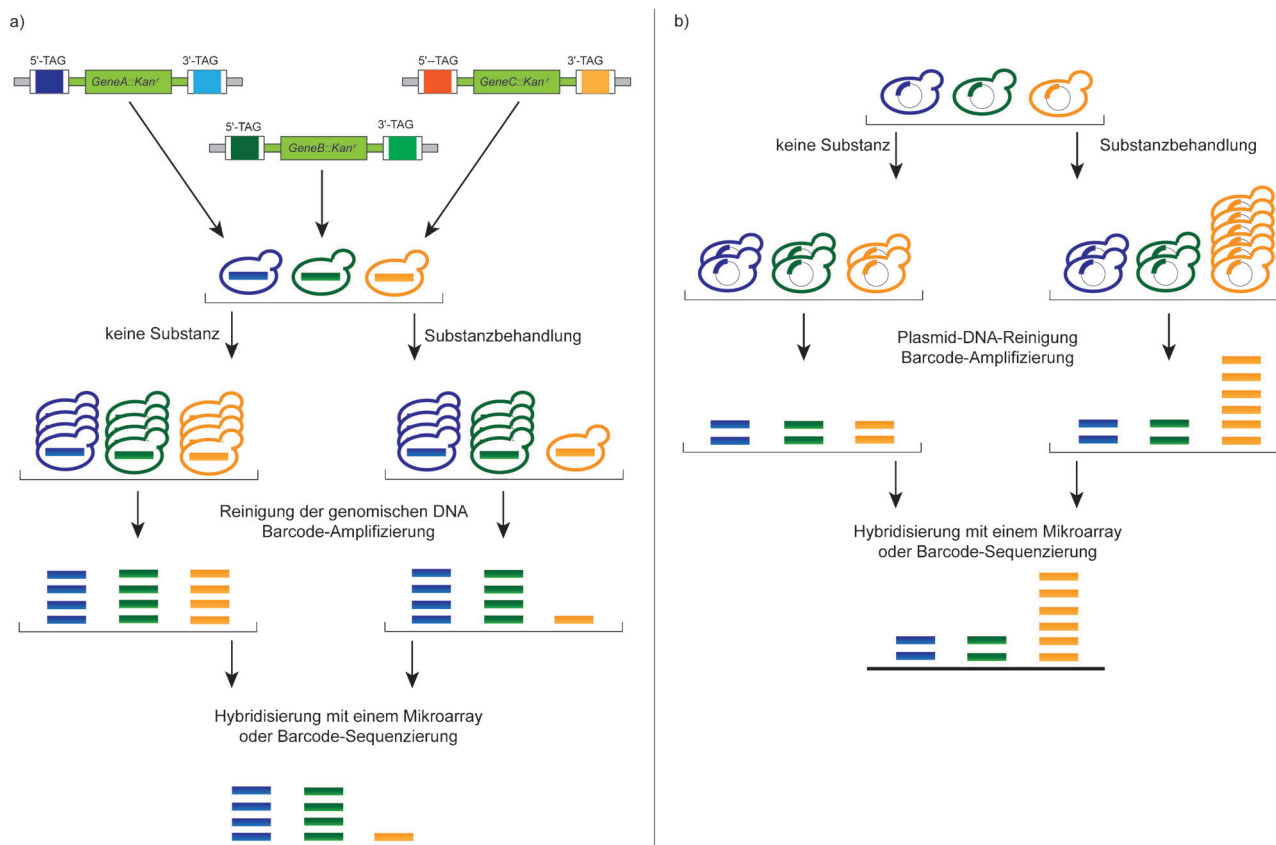


Abbildung 11. Hefe-basierte Ansätze zur Zieltmolekül-Identifizierung. a) Prinzip der Haploinsuffizienzprofilierung/Homozygoten-Deletionsprofilierung (HIP/HOP). b) Multikopien-Suppressionsprofilierung (MSP).^[12b,132]

besserer Fitness führen (haploproficient genes). Huang et al. suchten nach haplokompetenten Genen für Cisplatin (Tabelle 1, Eintrag 41)^[138] und Doxorubicin (Tabelle 1, Eintrag 42).^[139] Beide Chemotherapeutika führen häufig zur Resistenzbildung. Für Cisplatin wurden mehrere Gene mit unterschiedlichen Funktionen im Nukleotidmetabolismus, mRNA-Katabolismus, in der RNA-Polymerase-II-abhängigen Genregulation und in den vakuolären und Membrantransportsystemen ermittelt.^[138] Für Doxorubicin wurde der SUMO-Signalweg als ein wichtiger Faktor für die Resistenzbildung identifiziert.^[139] Für den Mikrotubuli-Modulator Pelorusid konnte HIP das direkte Zielprotein nicht finden. Jedoch wies eine HOP-Analyse auf Gene hin, die an der Mitose- und Zellzyklusregulation, der Proteinsynthese, dem Transport, der Sekretion, der RNA-Prozessierung und der Steroid-Biosynthese beteiligt sind.^[140] Die Fertigstellung der genomweiten Deletionssammlung von *Schizosaccharomyces pombe*^[141] erlaubte auch die Anwendung der Substanz-induzierten Haploinsuffizienz in dieser Spaltheife.^[142] Dadurch wurde ein umfangreiches Screening für medizinisch relevante Verbindungen ermöglicht, da 454 Gene in *S. pombe* nicht in *S. cerevisiae* konserviert sind, aber humane orthologe Gene haben. Eine Bibliothek von 2815 Stämmen mit deletierten Genen wurde im Hinblick auf die Mechanismen der anti-Tumor-Effekte und der Nebenwirkungen von Bortezomib (Tabelle 1, Eintrag 43) untersucht. Neunzehn Mutanten mit Gendeletionen zeigten synthetische Letalität mit Bortezomib

und konnten nach ihrer Funktion in den Ubiquitin/Proteasom-Signalweg, nukleäre bzw. Chromatinproteine, den vesikulären und Kerntransport und den Aminosäuren-, Vitamin- und RNA-Stoffwechsel eingruppiert werden. Von den neunzehn identifizierten Genen haben dreizehn humane Orthologe.

Die Etablierung von Sammlungen von Organismen mit geprüfter Gensequenz und einer Plattform-unabhängigen TagModul-Sammlung, die mit dem Gateway-Klonieren kompatibel ist und leicht für beliebige DNA-Markierungsstrategien (DNA tagging) angepasst werden kann,^[143] ließ in verschiedenen Mikroorganismen die schnelle Erzeugung von Tag-enthalten Mutanten mittels Transposon-Mutagenese zu. Daher konnte das Konzept der Substanz-induzierten Haploinsuffizienz für den Erreger *Candida albicans* angewendet und so Sec7p als Zielprotein von Brefeldin A identifiziert werden (Tabelle 1, Eintrag 44).^[143]

Die Multikopien-Suppressionsprofilierung (multicopy suppression profiling, MSP) ist ein HIP/HOP-komplementäres Gendosis-basiertes Verfahren, welches ebenfalls für die Identifizierung von Zieltmolekülen verwendet wird (Abbildung 11 b).^[144] Diese Methode basiert auf der Annahme, dass die Überexpression eines Zielproteins zu erhöhter Toleranz gegenüber dem Wirkstoff führt. Luesch et al. etablierten einen genomweiten Überexpressionsscreen in *S. cerevisiae* und zeigten, dass Stämme, die PKC1 und weitere nachgeschaltete Kinasen überexprimieren, gegenüber einem ent-

sprechenden Kinaseinhibitor (Tabelle 1, Eintrag 45) resistent sind.^[144] Darüber hinaus fanden sie Proteine aus zwei weiteren genetisch mit PKC1 interagierenden Signalwegen. Ein ähnlicher Ansatz von Butcher et al. basierte auf einer gepoolten Population von ca. 3900 Hefestämmen, von denen jeder ein anderes Protein überexprimierte. Resistente Stämme konnten mithilfe der Mikroarray-Technologie identifiziert werden. Um das Konzept zu validieren, wurde TOR1 als Zielprotein von Rapamycin sowie Gene, die an der Transkription, Translation und Regulation des Zellzyklus beteiligt sind, validiert.^[145] Vor kurzem wurde ein ähnlicher Ansatz für *S. pombe* beschrieben.^[146] Dabei wurde eine Sammlung von ca. 5000 verschiedenen ORFeom-exprimierenden (ORF: open reading frame) Spaltheftstämmen, denen die Wirkstoff-Effluxpumpen fehlen, für die Charakterisierung der Wirkungsweise von Etoposid (Tabelle 1, Eintrag 46) verwendet.

Durch Kombination von HIP und HOP mit MSP wurde ein effizienter Ansatz auf einem einzigen TAG-Mikroarray entwickelt.^[147] Die Analyse der Wirkung zunehmender und abnehmender Gendosierung verbessert die Aussagekraft der Zielprotein-Identifizierung, denn die Wahrscheinlichkeit, dass ein Genprodukt das Zielprotein eines Wirkstoffs ist, ist erhöht, wenn der Deletionsstamm empfindlich und der Überexpressionstamm resistent gegen den Wirkstoff ist. Hoepfner et al. nutzten dieses Prinzip bei der Identifizierung des Zielproteins des Naturstoffs Cladosporin (Tabelle 1, Eintrag 47).^[148] HIP wies auf Lysyl-tRNA-Synthetase als das Ziel-Protein hin, was in einem Überexpressionsexperiment validiert wurde. Darüber hinaus demonstrierte die Untersuchung von Cladosporin-resistenten *S. cerevisiae*-Mutanten nicht synonyme Mutationen in der Nähe der Bindungstasche für ATP in Lysyl-tRNA-Synthetase.

Die molekulare Barcode-Technologie wurde vor kurzem durch die Umstellung von Mikroarray-basierter Analyse^[149] auf die Sequenzierung der nächsten Generation (next generation sequencing) verbessert. Die Barcode-Analyse durch Sequenzierung („bar-seq“) übertrifft die Barcode-Mikroarray-Hybridisierung in der Empfindlichkeit, dem dynamischen Bereich und der Nachweisgrenze.^[150] Doch die meisten genetischen Ansätze identifizieren keine einzelnen Zielproteine, sondern gesamte Signalwege, da einzelne Deletionen einen gesamten Signalweg beeinflussen können und mehrere verschiedene Deletionen den gleichen Phänotyp hervorrufen können. Somit sind zusätzliche Experimente erforderlich, um den Wirkmechanismus zu validieren. Weiterhin hängen HIP und HOP vom Zellwachstum ab und sind daher besonders für die Identifizierung von Zielproteinen, die von Bedeutung für onkologische und antimykotische Anwendungen sind, geeignet. Typischerweise werden aus HIP/HOP-Studien eindeutige Ergebnisse für Enzyminhibitoren und für Substanzen, die zum Verlust der Funktion des Zielproteins führen, erhalten. HIP kann nicht das Zielprotein identifizieren, wenn das kodierende Gen dupliziert vorliegt. In solchen Fällen könnte jedoch HOP Abhilfe schaffen, indem die damit in Verbindung stehenden Gene identifiziert werden. Weitere Limitierungen sind, dass das Zielprotein nicht im Hefegenom kodiert sein kann oder redundante Signalwege die Wirkung der Substanz beeinträchtigen. Darüber hinaus ist die Hefezellwand eine

wesentliche Hürde für die Aufnahme zu analysierender Substanzen. Auch besitzen die Hefe sowie verwandte Modellorganismen mehreren Pumpen (Effluxpumpen), die effizient Substanzen aus der Zelle entfernen und dadurch deren Konzentration in der Zelle reduzieren könnten. Solche Hindernisse können durch die Deletion dieser Transporter^[151] oder die verstärkte Akkumulation von Substanzen in *S. cerevisiae* durch die Repression pleiotroper Resistenzgene^[152] umgangen werden. Giaever et al. stellten ein Struktur-basiertes Anreicherungsmodell (SAM) auf, um die allgemeine Resistenz von *Caenorhabditis elegans* gegen pharmakologische Störung zu überwinden.^[153] Dieses Computer-basierte Modell kann auf andere Organismen angewendet werden und kann zur Priorisierung verfügbarer Wirkstoffe und dadurch zur Verbesserung der Screeningeffektivität beitragen.

Die Herstellung von shRNA-Vektorbibliotheken (shRNA: short hairpin RNA) hat genomweite Screens unter Verwendung der RNA-Interferenz (RNAi) in Säugerzellen erleichtert.^[154] Brummelkamp et al. stellten eine Kollektion von 23 742 pRetro-SUPER-Vektoren zusammen, die für die Suppression von 7914 humanen Genen mittels RNAi in MCF-7-Zellen eingesetzt wurde, um den Wirkmechanismus von Nutlin-3 (Tabelle 1, Eintrag 48) zu entschlüsseln.^[154] Dieser shRNA-Barcode-Screen in großem Maßstab belegte, dass mit dieser Methode ein vollständiges Bild der Wirkstoffwirkung gewonnen werden kann. Ein ähnlicher Ansatz wurde von Burgess et al. beschrieben,^[155] die shRNAs für eine Reihe bekannter krebserrelevanter Gene („cancer 1000“) auswählten, um die Resistenz gegen Doxorubicin in einem gut charakterisierten Mauslymphommodell zu untersuchen. Carette et al. entwickelten einen haploiden genetischen Screen in humanen Zellen mithilfe von Insertionsmutagenese für die Herstellung von Null-Allelen in der chronisch myeloischen Leukämie-Zelllinie 7KBM7, die haploid für alle Chromosomen außer Chromosom 8 ist.^[156] Die Anwendung dieser globalen Gendelektionsstrategie diente zur Aufklärung des Transports von Tunicamycin^[157] und dem Ebola-Virus^[157] in Zellen. Ein ähnliches Verfahren wurde von Elling et al. entwickelt,^[158] die ausgehend von Mausblastozysten haploide embryonale Säugtierstammzellen erzeugten und die haploiden Zellen mit Retroviren mutierten, die reversible Gene Traps enthielten. Mit diesem haploiden Embryonalstammzellensystem wurde ein genomweiter Screen für Gene, die bei der Ricin-Toxizität eine Rolle spielen, durchgeführt. Demgegenüber entdeckten Luesch et al. die Bedeutung der FGFR-vermittelten Signaltransduktion in der Modulation der Apratoxin-A-Aktivität (Tabelle 1, Eintrag 49) nach transienter Transfektion einer Säugtier-cDNA-Expressionsvektorsammlung (27 000), wodurch ein genomweiter Überexpressionsscreen ermöglicht wurde.^[159]

2.7. Expressions-Klonierungsmethoden

2.7.1. Drei-Hybrid-System

Das Hefe-Zwei-Hybrid-System ist eine leistungsfähige Methode, um Protein-Protein-Wechselwirkungen zu identifizieren.^[160] In Analogie dazu wurde das Hefe-Drei-Hybrid-System entwickelt, um Ligand-Proteinrezeptor-Wechselwir-

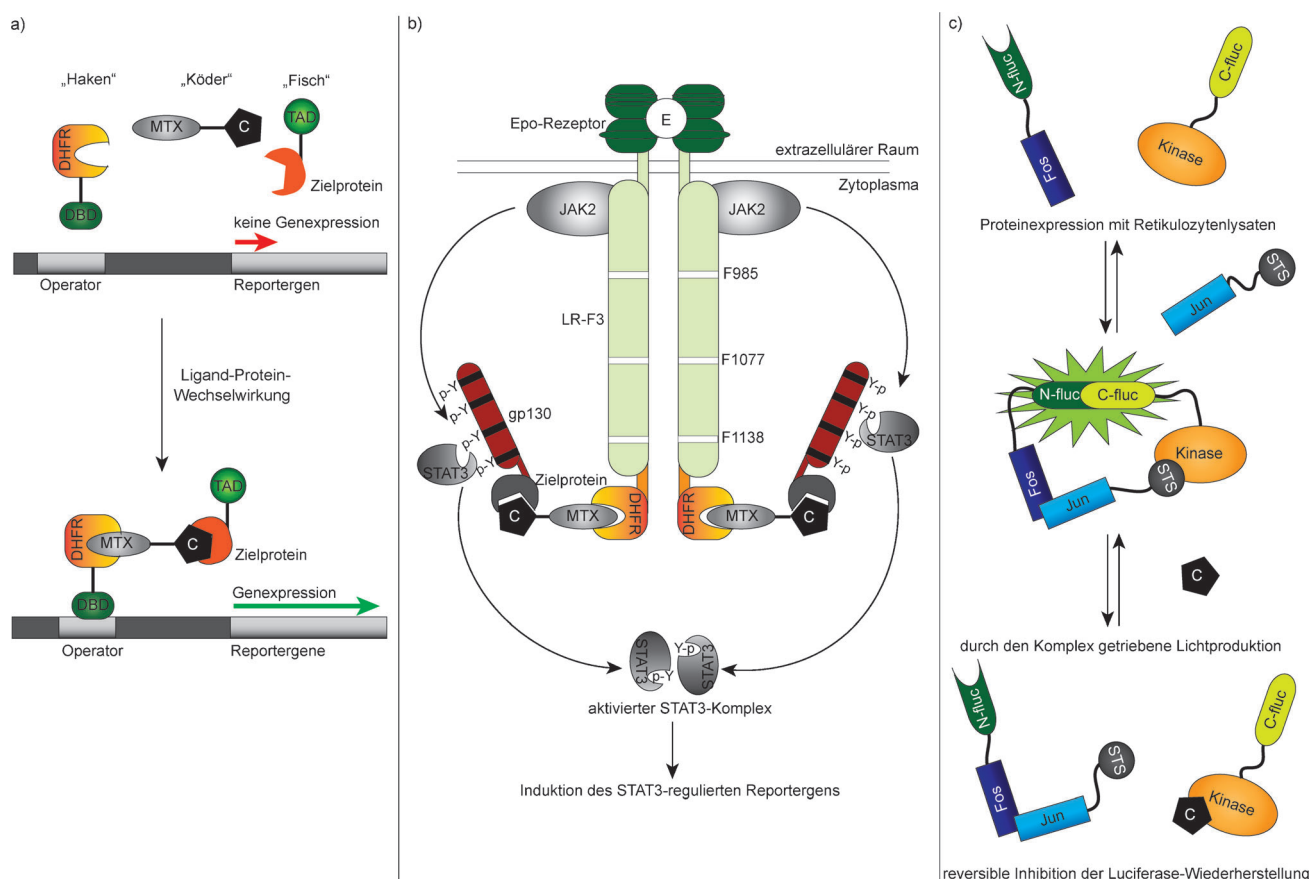


Abbildung 12. Drei-Hybrid-Systeme. a) Hefe-Drei-Hybrid-System.^[161] b) MASPIT (mammalian small molecule protein interaction trap).^[162] c) Coiled-coil-enabled Split-Luciferase-Drei-Hybrid-System.^[163] DHFR: Dihydrofolatreduktase, DBD: DNA-bindende Domäne, MTX: Methotrexat, C: Substanz, TAD: transaktivierende Domäne, fluc: *Photinus pyralis*-Luciferase, STS: Staurosporin.

kungen zu untersuchen.^[161] Dieser Ansatz benötigt drei Hybridmoleküle – einen „Fisch“, einen „Köder“ und einen „Haken“. Der „Köder“ ist ein kovalent verknüpftes Heterodimer zweier niedermolekularer Liganden. Wenn ein Ligand an seinen Rezeptor bindet, der mit einer DNA-bindenden Domäne („Haken“) fusioniert ist, und der andere Ligand an seinen Rezeptor bindet, der mit einer Transkriptionsaktivierungsdomäne („Fisch“) fusioniert ist, wird ein Reportergen exprimiert, und Hefezellen mit den entsprechenden relevanten Rezeptoren können selektiert werden (Abbildung 12 a).

Die ersten wegweisenden Experimente, die Potential und Anwendbarkeit dieses Verfahrens zeigten, verwendeten einen Hybrid-Liganden aus Dexamethason und dem Immunsuppressivum FK 506, den Glukokortikoid-Rezeptor gekoppelt an eine LexA-DNA-Bindungsdomäne und das FK506-bindende Protein gekoppelt an die Transaktivierungsdomäne des bakteriellen Proteins B42.^[161] Becker et al. untersuchten die Einschränkungen des Hefe-Drei-Hybrid-Systems mit Fokus auf die Zielproteine von ATP-kompetitiven Kinaseinhibitoren, die an das aktive Zentrum binden.^[164] Evaluierung eines Fusionats aus Purvalanol B (Tabelle 1, Eintrag 50) und Methotrexat gegen eine cDNA-Bibliothek und ein Hefezell-Array mit ausgewählten Polypeptid-ORFs führte zur Identifizierung bekannter sowie neuer Zielproteine. Weiterhin wurde gezeigt, dass das Hefe-Drei-Hybrid-

System für mikromolare und nanomolare Inhibitoren geeignet ist.^[164] Chidley et al. entwickelten ein Hefe-Drei-Hybrid-Verfahren, bei dem eine zu untersuchende Substanz an *O*⁶-Benzylguanin (BG) gekoppelt ist.^[151] In Hefezellen wird von diesem Konstrukt die zu untersuchende Verbindung auf die mit einem SNAP-Tag ausgestattete LexA-DNA-Bindungsdomäne übertragen. Das BG-Derivat kann mit vielen verschiedenen funktionellen Gruppen verknüpft werden und ermöglicht die Kupplung an eine Glutathion-Matrix über ein GST-SNAP-Fusionsprotein und so die direkte Validierung identifizierter Zielproteine durch Affinitätschromatographie. In dem Hefe-Stamm wurden drei Gene deletiert, die für wirkstoffexportierende Pumpen kodieren, wodurch die zelluläre Konzentration mehrerer Substanzen und somit die Empfindlichkeit erhöht werden konnte. Diese Methode wurde verwendet, um die ersten „Nicht-Kinase“-Zielproteine von Erlotinib zu identifizieren und auch um zu demonstrieren, dass PDE6D an Atorvastatin (Tabelle 1, Eintrag 51) bindet. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das entzündungshemmende Medikament Sulfasalazin (Tabelle 1, Eintrag 52) an das Enzym Sepiapterinreduktase (SPR) bindet. In nachfolgenden Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass die Hemmung von SPR durch Sulfasalazin die Tetrahydrobiopterin-Menge reduziert und eine verringerte NOS-Aktivität (NOS: Stickstoffmonoxid-Synthase) im Gastro-

intestinaltrakt verursacht. Dieser Befund könnte die Rolle von Sulfasalazin bei der Behandlung von entzündlichen Darmerkrankungen erklären.

Das Hefe-Drei-Hybrid-System hat den Vorteil, dass die für Zielproteine kodierenden cDNAs direkt isoliert und identifiziert werden können. Wenn jedoch das Zielprotein nicht richtig gefaltet und posttranslational modifiziert ist oder wenn es ein integrales Membranprotein oder Teil eines Proteinkomplexes ist, kann es nicht identifiziert werden. Auch müssen die Hybridliganden ihre funktionelle Aktivität beibehalten und von den Hefezellen aufgenommen werden. Einige dieser Einschränkungen können durch MASPIT (mammalian small molecule protein interaction trap) (Abbildung 12b) überwunden werden.^[162] Dieses Drei-Hybrid-System basiert auf dem Cytokinrezeptor-assoziierten JAK(Janus-activated kinase)-STAT(signal transducer and activator of transcription)-Signaltransduktionssystem. Es besteht aus DHFR aus *E. coli*, welche mit einem chimären Cytokinrezeptor fusioniert ist, welches die Ligandenbindungsdomäne des Erythropoietin(EPO)-Rezeptors und die zytoplasmatische Domäne eines mutierten Leptinrezeptors, der keine funktionellen STAT3 Rekrutierungsstellen hat, enthält. Die potentiellen Zielproteine werden als Fusionsproteine von gp130 exprimiert, welches STAT3-Bindungsstellen enthält. Das DHFR-Protein ermöglicht die Wechselwirkung mit dem Methotrexat-Substanz-Hybrid. Die Bindung der Substanz an ihr Zielprotein stellt die EPO-abhängige Aktivierung des JAK2/STAT3-Signalwegs wieder her und induziert die Expression eines STAT3-anhängigen Reportergens. Da die Wechselwirkungen im Zytoplasma auftreten, ist keine nukleäre Translokation von Fusionsproteinen oder

Substanzen notwendig. Caligiuri et al. zeigten die erfolgreiche Anwendung dieser Methode unter Verwendung des FK506-Analogons AP1867, des ABL-Kinase-Inhibitors PD173955, der CDK2-Inhibitoren RGB-285961 und RGB-286147, des CDK- und GSK3-Inhibitors RGB-285978 und des Carboanhydrase-Hemmers E7070.^[162]

Ein weiterer Ansatz zur Umgehung des Problems der Zellpermeabilität ist das „coiled-coil enabled split-luciferase“-Drei-Hybrid-System zur Profilierung von Proteinkinase-Inhibitoren von Jester et al.^[163] Dabei wird ein zellfreies Translationssystem aus dem N-terminalen Teil der *Photinus pyralis*-Luciferase gekuppelt an das Fos-Coiled-Coil-Peptid und dem C-terminalen Teil der Luciferase gekuppelt an eine Kinase verwendet. Die Zugabe eines Heterokonjugats des pan-Kinaseinhibitors Staurosporin gekuppelt an das Jun-Coiled-Coil-Peptid führt zur Wiederherstellung der aktiven Luciferase. Kinase-Inhibitoren können dann durch die Abnahme des Luciferasesignals nach Verdrängung des modifizierten Staurosporin identifiziert werden (Abbildung 12c). Zur Validierung des Konzepts wurden die Kinasen PKA, AKT1, FGFR1/FLT2 und PIM1 auf Inhibition durch 80 bekannte Kinaseinhibitoren getestet. Alle vier Kinasen zeigten selektive Inhibitionsprofile.

2.7.2. Display-Technologien

Display-Systeme verknüpfen physikalisch den Phänotyp und den entsprechenden Genotyp eines Polypeptids.^[165] Unter den verfügbaren Display-Verfahren wird das Phagen-Display am häufigsten verwendet (Abbildung 13a). Dabei werden die Protein-kodierenden Gene in Bakteriophagen

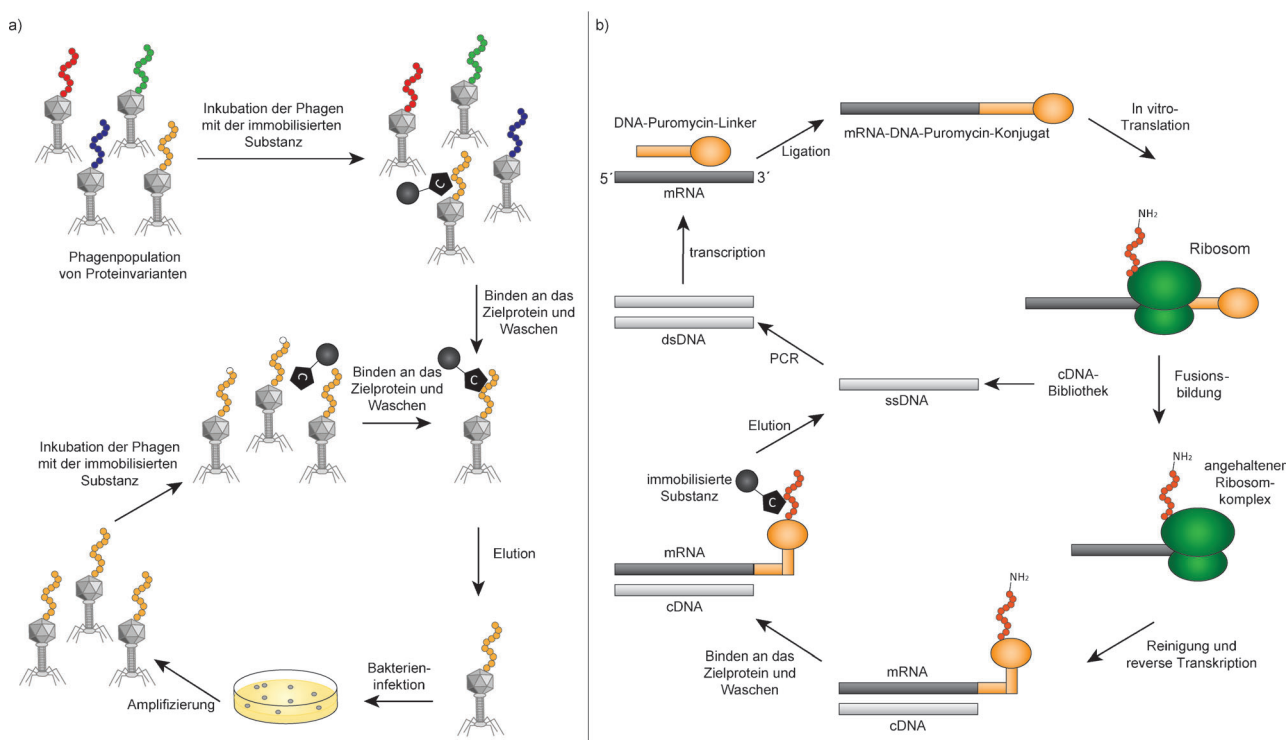


Abbildung 13. Display-Technologien zur Zielprotein-Identifizierung. a) Prinzip des Phagen-Displays. b) Prinzip des mRNA-Displays.^[11a]

kloniert, um Fusionsproteine mit dem Phagenhüllprotein zu generieren, die anschließend auf der Phagenoberfläche präsentiert werden. Zufällige Peptidsequenzen^[166] oder von cDNAs aus humanem Gewebe kodierte Peptide können auf Phagenpartikeln präsentiert werden.^[167] Wenn diese Phagen einer immobilisierten Substanz ausgesetzt werden, können die daran bindenden Phagen und somit die Zielproteine identifiziert werden. Das Zielprotein wird durch Amplifikation und Sequenzierung der Phagen-DNA ermittelt. Der Hauptvorteil dieses Ansatzes ist die Möglichkeit, ausgewählte Phagenpartikel durch Infektion von *E. coli* zu amplifizieren, wodurch weitere Runden der Zielprotein-Identifizierung mit Phagenpopulationen durchgeführt werden können. Dieses „Biopanning“ erlaubt auch die Detektion von in der Regel nur schwach exprimierten Proteinen. Sche et al. verwendeten biotinyliertes FK506, und mittels einer humanen Gehirn-cDNA-Bibliothek identifizieren sie das bekannte Zielprotein FKBP12.^[168] Weitere Untersuchungen ermittelten hNopp140 als das Zielprotein von Doxorubicin,^[169] Bcl-2, NSC-1 und NFX1 als Zielproteine von Paclitaxel (Tabelle 1, Eintrag 53),^[170] Ca²⁺/Calmodulin als das Zielprotein des Curcuminderivats HBC (Tabelle 1, Eintrag 54),^[171] UQCRB im mitochondrialen Komplex III als das Zielprotein von Terpestacin (Tabelle 1, Eintrag 55)^[172] und TACC3 als ein neues Zielprotein von Bisphenol A (Tabelle 1, Eintrag 56).^[173] Piggott und Caruso identifizierten das humane ribosomale Protein S25 als das Zielprotein des Tumortheraeutikums Kahalalid F (Tabelle 1, Eintrag 57) unter Verwendung von drei verschiedenen T7 Phagen-cDNA-Bibliotheken.^[174] Mit dem Restriktionsenzym *HinfI* können charakteristische Muster (fingerprints) ausgewählter Klone generiert und dadurch viele Klone sehr schnell untersucht werden, was die Analyse einer wesentlich größeren Anzahl von Phagen ohne Sequenzierung möglich macht. Für die Identifizierung von Zielproteinen von Paclitaxel und Cyclosporin A wurde eine photochemische Kupplung durchgeführt, bei der durch UV-Bestrahlung generierte reaktive Carbene die Substanzen unspezifisch immobilisieren.^[170b,175]

Das Phagen-Display bietet viele Vorteile. Vor allem können Probleme, die mit selten vorkommenden Proteinen in Verbindung stehen, durch die Amplifikation der Phagen und somit des Zielproteins überwunden werden. Die direkte Identifizierung der Zielproteine aus Phagen-cDNA ist möglich. Weiterhin können die Subdomänen, die für die Bindung an die entsprechende Substanz verantwortlich sind, ermittelt werden, wenn die exprimierte cDNA kürzer als die vollständige cDNA ist. Nachteile sind die fehlenden posttranslationalen Modifikationen von Proteinen und die mögliche nicht korrekte Faltung der exprimierten Polypeptide. Zudem könnte das Präsentieren von Membranproteinen problematisch sein, und die kodierende Sequenz des Zielproteins muss im gleichen Leserahmen wie die kodierende Sequenz des Phagenhüllproteins liegen.

Beim mRNA-Display ist eine neu translatierte mRNA kovalent an das von ihr kodierte Polypeptid durch Puromycin gekuppelt. Puromycin ist eine Nukleotid-Aminosäure-Chimäre und ähnelt dem 3'-Ende der Tyrosyl-tRNA, da es einerseits Adenosin und andererseits Tyrosin nachahmt.^[176] Puromycin enthält eine nicht hydrolysierbare Amidbindung,

sodass es mit der Translation interferiert, indem das Polypeptid vorzeitig freigesetzt wird. Durch In-vitro-Translation dieser Konstrukte werden Protein-mRNA-Fusionate gebildet, die gereinigt und zur weiteren Amplifikation in cDNA revers transkribiert werden.^[177] Die mRNA-Display-Protein-Bibliothek wird mit einer immobilisierten Substanz inkubiert, und gebundene Konstrukte werden eluiert und durch PCR amplifiziert. Dadurch entsteht eine Bibliothek mit angereicherten Substanz-bindenden Proteinen, die für weitere Selektionsschritte verwendet werden kann (Abbildung 13b).

Im Prinzip kann das mRNA-Display für jeden Organismus verwendet werden, aus dem man mRNA isolieren kann. Als ein In-vitro-Verfahren umgeht diese Methode weiterhin mehrere Einschränkungen wie Probleme mit der Klonierung und Expression und die Toxizität der präsentierten Peptide. Allerdings sind bisher fast ausschließlich Studien zur Validierung des Konzepts bekannt. McPherson et al. erzeugten eine mRNA-Display-Bibliothek aus humanen Leber-, Nieren- und Knochenmark-Transkripten und selektierten Konstrukte, die an biotinyliertes FK506 binden.^[178] Kürzlich wurde über eine erfolgreiche Zielprotein-Identifizierung mittels mRNA-Display und eines Mikrofluidiksystems berichtet. Dabei wurde Nucleophosmin als das Zielprotein des Phthalimid-Derivats 2-(2,6-Diisopropylphenyl)-5-amino-1*H*-isindol-1,3-dion (TC11, Tabelle 1, Eintrag 58) identifiziert.^[179]

3. Bestätigung von Zielproteinen

Die Methoden für Zielprotein-Identifizierung ermöglichen die Formulierung einer Hypothese über den möglichen Wirkmechanismus, welcher in bestätigenden Experimenten nachgewiesen werden muss. Bei der Isolierung mehrerer Zielproteinkandidaten müssen diese zunächst hinsichtlich ihrer Funktion und in Bezug auf den von der Substanz induzierten Phänotyp priorisiert werden. Das Design und die Durchführung geeigneter Kontrollexperimente sind für die Unterscheidung von spezifischer und unspezifischer Bindung essentiell und somit für die Priorisierung der Proteine. Ferner sollte berücksichtigt werden, dass unter Umständen die identifizierten Proteine keine direkten Zielproteine, sondern Teil eines Proteinkomplexes sein können, der das Zielprotein enthält, und Protein-Interaktionsdatenbanken, die Informationen über Protein-Protein-Wechselwirkungen enthalten, können dabei behilflich sein.^[180]

Normalerweise werden identifizierte Zielproteine, die an die entsprechende biologisch aktive Substanz binden, mit spezifischen Antikörpern in Immunoblotting-Experimenten nach der Affinitätsisolierung des Zielproteins bestätigt. Die Anreicherung des Zielproteins wird dann mit dem Kontrollversuch verglichen, welcher ein Pull-down-Experiment mit einem inaktiven Derivat^[17,18,53a,55,62] oder ein Kompetitions-experiment mit einem Überschuss an nicht-modifizierter Substanz sein kann.^[17,47,51a,57,64]

Ein starkes Indiz in der Bestätigung eines Zielproteins ist die Bestimmung seiner Bindungsaffinität für die entsprechende Verbindung. Verschiedene Methoden, die in erster Linie in der Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen

angewendet werden, wurden erfolgreich für die Untersuchung von Ligand-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt, vor allem Oberflächenplasmonresonanz (SPR, surface plasmon resonance)^[18b,53a,b,83] und isotherme Kalorimetrie (ITC, isothermal calorimetry).^[15b,51b,53b,56] Für SPR muss die Verbindung auf einer Chipoberfläche immobilisiert und daher modifiziert werden, wodurch die Aktivität der Substanz verringert werden kann und eine niedrigere Affinität im Vergleich zum nicht modifizierten Wirkstoff resultieren kann. Für ITC werden nicht markierte Substanzen verwendet, sodass Dissoziationskonstanten (K_D) für die nicht modifizierte Verbindung bestimmt werden können. Weitere Methoden für die Ermittlung von Bindungsaffinitäten umfassen Fluoreszenz-polarisation,^[17] Enzym-gekoppelter Immunosorbent-Assay (ELISA),^[62] homogene zeitaufgelöste Fluoreszenz (HTRF, homogeneous time-resolved fluorescence),^[181] ALPHA (amplified luminescent proximity homogeneous assay)^[182] und mikroskalige Thermophorese (MST).^[183] Alle diese Verfahren verwenden ein gereinigtes Zielprotein und meist eine Modifizierung der aktiven Verbindung (z.B. mit einem Fluorophor, Biotin oder einen Linker mit einer funktionellen Gruppe zur Immobilisierung). Dadvar et al. setzten nicht modifizierte Substanzen für UV/Vis-Absorption, Fluoreszenzemission und ^{15}N -NMR-Spektroskopie ein, um die Interaktion von PF-3717842 (Tabelle 1, Eintrag 59) mit dem Phosphatidylethanolamin-bindenden Protein 2 (PEBP2) zu untersuchen.^[184] Weiterhin kann die Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie Konformationsänderungen in der Proteinstruktur nach Ligandenbindung detektieren.^[15b] Auch die thermische Stabilität eines Proteins in Ligand-gebundenem und Ligand-freiem Zustand kann Informationen über die Ligandenbindung liefern, da der Ligand die native Proteinkonformation stabilisieren könnte. Dies würde die thermische Stabilität des Proteins erhöhen und kann mittels CD-Spektroskopie untersucht werden.^[56] Die Liganden-induzierte Stabilisierung eines Proteins kann auch mithilfe des DARTS-Verfahrens analysiert werden.^[98] Weitere Methoden, wie Ultrazentrifugation, mikroskalige Gleichgewichtsdialyse^[185] und elektrochemische Sensorik^[186] wurden zur Bestimmung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen beschrieben. Darüber hinaus kann die physikalische Wechselwirkung einer Substanz mit ihrem Zielprotein auch in Zellen unter Verwendung der auf FRET (resonanter Förster-Energietransfer) basierten FLIM-Methode (fluorescence life-time imaging microscopy) untersucht werden, welche ein fluoreszenzmarkiertes Protein und eine an einem Fluorophor gekoppelte Substanz benötigt.^[17,187]

Die Bindung einer Substanz an ein Protein muss nicht unbedingt seine Funktionen modulieren. Deshalb sind weitere funktionelle Experimente zur Target-Bestätigung erforderlich. Wenn das Zielprotein eine enzymatische Aktivität besitzt, sollte offensichtlich die Modulation dieser Aktivität in einem enzymatischen Assay untersucht werden.^[28,56,188] Obwohl ein enzymatischer Aktivitätsassay zur Substanzoptimierung in Bezug auf ein bestimmtes Zielprotein eingesetzt werden kann, kann die resultierende Struktur-Aktivitäts-Beziehung deutlich von den Daten aus dem ursprünglich verwendeten zellulären Assay abweichen. Gründe dafür können die Zellpermeabilität und Stabilität des Wirkstoffs, seine

Verteilung innerhalb der Zelle sowie seine Rolle in unterschiedlichen Signalwegen sein. Wenn für die potentiellen Zielproteine bereits chemische Modulatoren beschrieben sind, sollten die dadurch induzierten Phänotypen mit denen der untersuchten Substanz verglichen werden.^[53c,57c] In Analogie dazu sollten für die Zielproteine RNA-Interferenz (RNAi)- und/oder cDNA-Überexpressionsexperimente durchgeführt werden. Diese könnten die Substanzeffekte im untersuchten System phänotypisieren. RNAi wird heute sehr häufig für den Knockdown bestimmter Proteine verwendet. Für viele der identifizierten Zielproteine könnte der Einfluss von siRNA (small interfering RNA) oder shRNA (short hairpin RNA) bereits beschrieben sein und könnte bei der Priorisierung der Zielproteine helfen.^[17,28] Wenn für das Gen des Zielproteins keine RNAi-Studien vorliegen oder diese unterschiedliche zelluläre Auswirkungen als Hauptaugenmerk haben, sollte zur Bestätigung des Zielproteins diese Methodik auf jeden Fall eingesetzt werden, so wie für zahlreiche Zielproteine bereits beschrieben.^[47,53b,57c] Weiterhin ist für die Ausbildung eines bestimmten Phänotyps häufig eine geringere Konzentration des Wirkstoffs nach Knockdown des Zielproteins erforderlich.^[57b] Die Knockdown-Effizienz sollte mithilfe von Echtzeit-PCR oder Immunoblotting quantifiziert werden. „Off-Targets“ der siRNA sollten untersucht werden. Weiterhin sollte berücksichtigt werden, dass ein Knockdown nicht den gleichen Phänotyp wie die entsprechende Substanz hervorrufen könnte. Im Gegensatz zum Wirkstoff reduziert RNAi die Menge eines Proteins in Zellen. Die Überexpression des Zielproteins könnte weitere Erkenntnisse zur Unterstützung der Zielprotein-Hypothese liefern. Die Überexpression kann einerseits der Aktivität des Wirkstoffs entgegenwirken.^[51b,53a,189] Andererseits kann dadurch die Substanzaktivität phänotypisiert werden, z.B. wenn die Verbindung ein Aktivator ist.

Fluorophor-markierte Substanzen können eingesetzt werden, um die Lokalisation der Substanz innerhalb der Zellen sowie eine potentielle Kolo-kalisation mit dem Zielprotein zu detektieren.^[33a,47,48] Allerdings kann der Fluorophor die physikochemischen Eigenschaften der Substanz beeinflussen und eine unterschiedliche zelluläre Verteilung als die nicht markierte Substanz bewirken. Eine Mutationsanalyse oder Domänenkartierung könnte auf die Art der Ligandenbindung hinweisen.^[51b,53b] Die Kokristallisation des Ligand-Zielprotein-Komplexes würde nicht nur die Bindestelle aufzeigen, sondern könnte auch den Mechanismus der Modulation erklären sowie Modifikationen in der aktiven Substanz zur Verbesserung der Bindeeigenschaften nahelegen.^[53b,66]

Insgesamt ist die Bestätigung der Zielproteine genauso wichtig wie die Zielprotein-Identifizierung. Die Bestätigung eines Zielproteins sollte nicht nur in der Bestimmung der Bindungsaffinität für den Liganden, sondern auch im zellulären Kontext des phänotypischen Screens erfolgen. Die Kombination biophysikalischer, biochemischer, zellbiologischer und struktureller Methoden sollte ermöglichen, das Puzzle zusammenzubauen, um am Ende ein aussagekräftiges Bild der zellulären Aktivität einer Substanz zu erhalten.

4. Problemlösung (Troubleshooting)

Obwohl viele Versuche unternommen werden könnten, um die Zielproteine einer biologisch aktiven Substanz zu identifizieren, können diese Vorhaben leider aus mehreren Gründen scheitern. Für die Zielprotein-Identifizierung mithilfe von Affinitätschromatographie sind das Design und die Synthese geeigneter Sonden, falls sie benötigt werden, entscheidend. Eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung sollte auf die Position im Molekül hinweisen, die eine Derivatisierung toleriert. Wenn keine SAR verfügbar ist, sollten die Immobilisierung durch Photoaktivierung, das Anbringen des Linkers an unterschiedliche Positionen im Molekül oder markierungsfreie Methoden in Betracht gezogen werden. Um unspezifisch bindende Proteine zu unterscheiden, sollten Kontrollexperimente unter Verwendung eines inaktiven Derivats oder des Wettbewerbsverfahrens durchgeführt werden. Eine Zellfraktionierung kann selten vorkommende Proteine anreichern. Wenn der einfache Vergleich der Proteine, die mit der aktiven und der Kontrollsonde isoliert wurden, keine Zielprotein-Kandidaten identifizieren kann, sollte die quantitative Proteomanalyse in Erwägung gezogen werden.

Mehrere erfolgreiche Beispiele für Zielprotein-Identifizierung sind in der Literatur vorhanden. Jedoch liegen die identifizierten Proteine oft in hoher Konzentration vor oder weisen eine hohe Affinität für den Liganden auf. Außerdem sollten die Zielproteine in ihrer nativen Konformation sein, um an die entsprechende Substanz binden zu können. Die Isolierung insbesondere von mehrfach die Membran durchspannenden Membranproteinen ist aufgrund der hydrophoben Natur dieser Proteine und des geringen Vorkommens besonders schwierig. Darüber hinaus müssen Membranproteine in der Regel in ihrer natürlichen Umgebung sein, um ihre charakteristischen Bindeeigenschaften und ihre dreidimensionale Struktur zu erhalten.^[32] Eine trifunktionale Sonde, die neben dem Liganden ein geschütztes Hydrazin, das mit den Kohlenhydraten auf Glykoprotein-Rezeptoren reagiert und eine Biotin-Funktionalität für die Affinitätsreinigung enthält, könnte helfen, dieses Problem zu überwinden.^[32] Es ist auch zu berücksichtigen, dass die Zielmoleküle von Wirkstoffen möglicherweise keine Proteine, sondern andere Biomoleküle wie DNA oder RNA, Lipide oder Kohlenhydrate sein können.^[190] In Anbetracht dieser Tatsache ist die detaillierte Bestimmung des Wirkungsprofils der Verbindung wichtig, um die möglichen Zielproteine einzugrenzen. Verschiedene Strategien für Zielmolekül-Identifizierung sind etabliert worden. Sie sollten als komplementär angesehen werden, und ihre Anwendung muss separat in jedem Einzelfall abgewogen werden.

5. Fallbeispiele

5.1. Identifizierung der Zielproteine von Adenanthin mithilfe der chemischer Proteomik

Das aus den Blättern von *Rabdosia adenantha* isolierte Diterpenoid Adenanthin (**7**, Abbildung 14) induziert die Differenzierung akut promyelozytischer Leukämiezellen

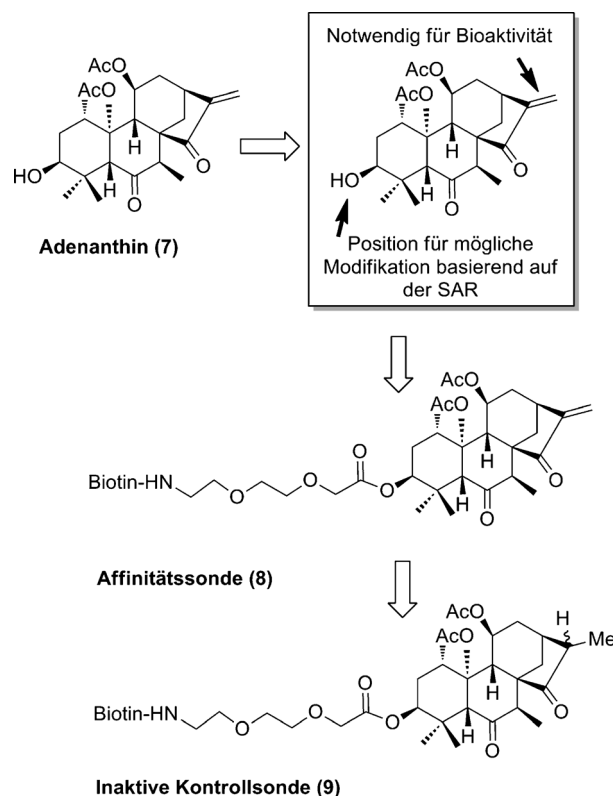


Abbildung 14. Strukturen von Adenanthin (**7**) und davon abgeleiteten Affinitätssonden.

(APL).^[191] Es verursacht APL-artige Zelldifferenzierung, unterdrückt Tumorstadium in vivo und verlängert die Lebensdauer muriner APL-Modelle, die sensitiv und resistent gegenüber Retinsäure sind. APL ist ein besonderer Subtyp der akuten myeloiden Leukämie (AML) und genetisch durch den Retinsäurerezeptor betreffende Gentranslokationen gekennzeichnet. Für die Behandlung von APL werden ATRA (*all-trans*-Retinsäure) und Arsenitrioxid eingesetzt, die vermutlich den Abbau APL-spezifischer Fusionsproteine bewirken. Im Gegensatz zu ATRA führt die Anwendung von Adenanthin nicht zur Ausbildung eines APL-spezifischen Kernkörpers oder zu Spaltung bzw. Abbau von APL-spezifischen Fusionsproteinen, sodass die Substanz zur Induktion der Differenzierung nicht an Komplexen der Fusionsproteine angreifen kann. Diese Befunde legen nahe, dass Adenanthin ein neues Zielprotein hat. Zu dessen Identifizierung mithilfe der chemischen Proteomik wurde eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung erstellt und darauf basierend die biotinylierte Adenanthin-Sonde (**8**) und ein Kontrollmolekül (**9**) synthetisiert (Abbildung 14).^[192] Dabei wurde angenommen, dass das α,β -ungesättigte Keton in Adenanthin als Michael-Akzeptor mit potentiellen Nukleophilen, wie z. B. Cysteinen, an seiner Bindungsstelle unter Ausbildung kovalenter Addukte reagiert und so eine effiziente Proteinisolierung ermöglicht. Reduktion der Doppelbindung des Michael-Akzeptors zur Einfachbindung führte zum Verlust der Differenzierung induzierenden Aktivität gegenüber NB4-Zellen und ergab eine geeignete negative Kontrollverbindung. NB4-Zelllysate wurden mit biotinyliertem Adenanthin oder Biotin selbst

inkubiert, und die gebundenen Proteine wurden unter Zuhilfenahme von mit Streptavidin belegter Agarose isoliert und durch SDS-Gelelektrophorese und Silberfärbung nachgewiesen. Nur eine Bande (Molekulargewicht von ca. 23 kDa) wurde durch Biotin-Adenanthin, aber nicht Biotin selbst erzeugt. In Gegenwart hoher Adenanthin-Konzentrationen wurde die Ausbildung der Bande verhindert, was auf eine spezifische Wechselwirkung hinweist. Massenspektrometrische Analyse ergab, dass Peroxiredoxin I und II (Prx I–II) von Adenanthin gebunden werden. Western Blotting unter Verwendung spezifischer Antikörper für Prx I–VI zeigte, dass NB4-Zellen alle sechs Prx-Isoformen exprimieren, aber Adenanthin selektiv nur Prx I und Prx II bindet. Auch *in vitro* band Biotin-Adenanthin die rekombinanten Prx I und II, und die Bindung wurde durch hohe Konzentrationen von unmarkiertem Adenanthin inhibiert.

5.2. Aktivitätsbasierte Proteom-Profilierung der Palmostatine

Die ABPP-Methode wurde kürzlich eingesetzt, um die zellulären Zielproteine von Palmostatin B (**13**)^[187] und dem verwandten Substratanalogon Palmostatin M (**10**) zu identifizieren, die beide die Ras-modulierende Acylproteinthioesterase 1 (APT1) in lebenden Zellen inhibieren.^[193] Mutierte und dadurch konstitutiv aktive H- und N-Ras-Proteine sind wichtige Onkogene und für die Tumorigenese und verstärkte zelluläre Überlebenssignale verantwortlich. Die H/N-Ras-Aktivität kann durch Interferieren mit der korrekten Lokalisierung der Proteine an der Plasmamembran über Beeinflussung ihrer Palmitoylierung reduziert werden. Als β -Lacton-Electrophil inaktiviert Palmostatin APT1 in Zellen durch reversible kovalente Modifizierung des Enzyms im aktiven Zentrum und führt so zur Delokalisierung von Ras in Zellen. Es fungiert als langsam hydrolysiertes Substrat und ist damit ein guter Ausgangspunkt für den Entwurf von ABPP-Sonden.^[33b] Palmostatin B (**13**) wurde im Lipidschwanz (**14**, Abbildung 15) mit einem Alkin versehen, und in zwei Varianten von Palmostatin M (**10**) wurde ein Alkin entweder in den Lipidschwanz (**11**) oder in die polare Kopfgruppe (**12**) eingebaut (Abbildung 15). Alle drei Sonden zeigten vergleichbare IC_{50} -Werte für die APT1-Inhibition. HeLa-Zellen wurden mit den Sonden inkubiert, gewaschen, lysiert, das Lysat wurde mit Biotin-Tetramethylrhodamin(TAMRA)-Azid durch Cu^I -katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition umgesetzt, und nachfolgend wurden gebundene Proteine an magnetischen, mit Streptavidin belegten Partikeln angereichert. Auftrennung im Gel und nachfolgende Proteomanalyse identifizierten APT1, APT2 und PPT1 als Hauptzielproteine. Quantitative Analyse von Affinitätsanreicherungs experimenten durch Western Blotting zeigte, dass die regioisomeren Alkine **11** und **12** mit deutlichem Unterschied markiert wurden. Dieser Befund legt nahe, dass die Zugänglichkeit der Alkine im gebundenen Zustand für die Cu^I -katalysierte Cycloaddition entscheidend für die Effizienz der Affinitätsisolierung ist. Das Proteomik-Experiment zeigte, dass die Palmostatine auch an das Isoenzym APT2 binden. Biochemische Untersuchung der Enzyminhibition mit rekombinanter humaner APT2 ergab für APT1 und APT2 vergleichbare

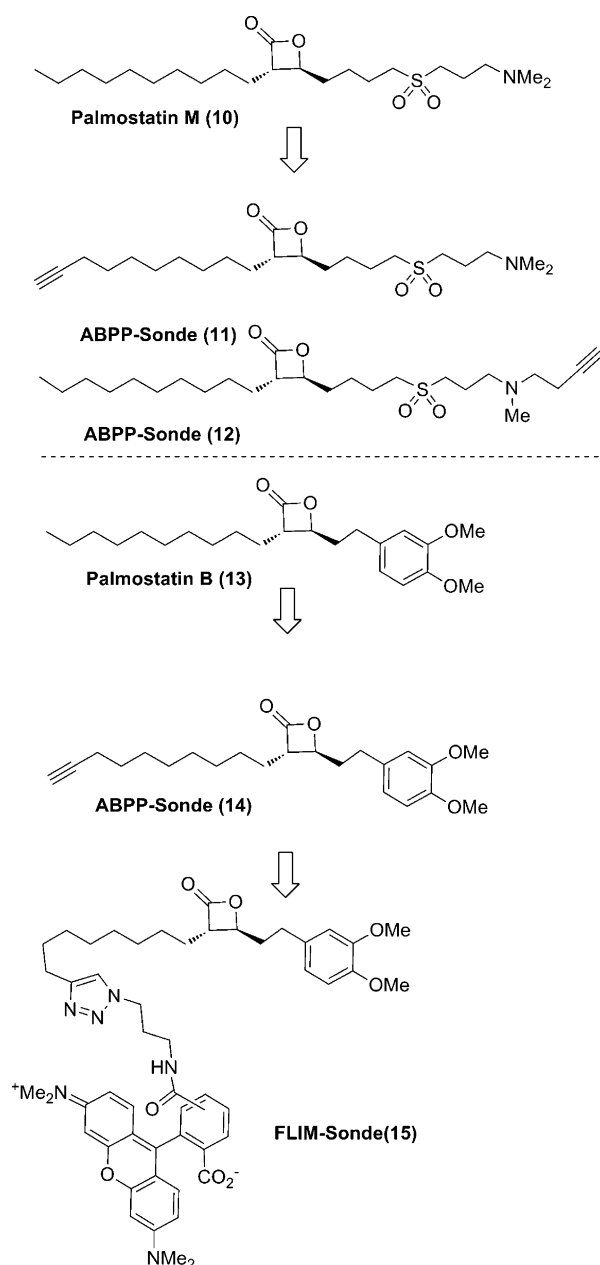


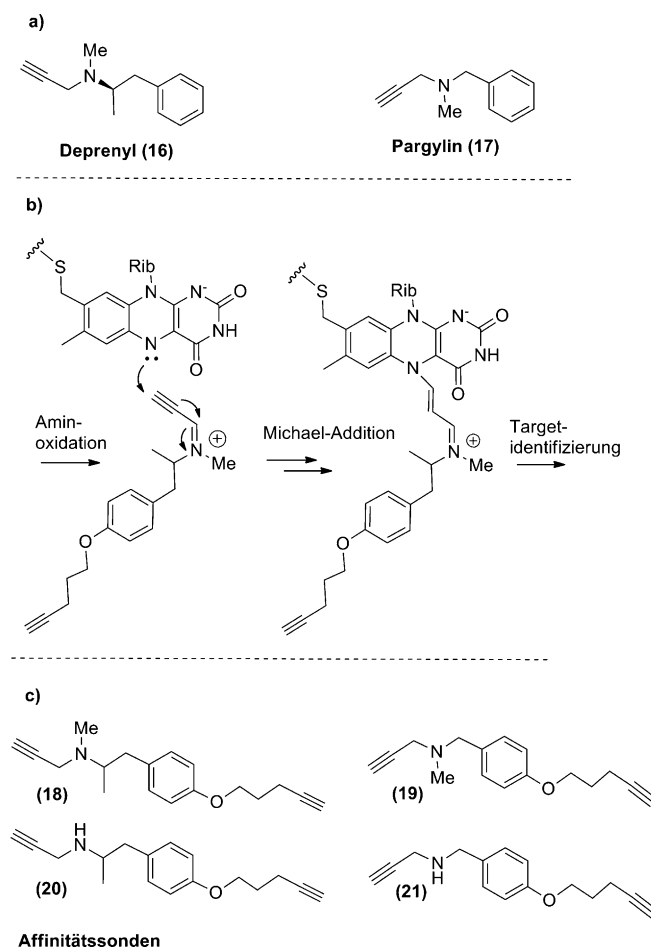
Abbildung 15. Strukturen von Palmostatin M (**10**) und B (**13**) und davon abgeleiteten Sonden.

IC_{50} -Werte. Das lysosomale depalmitoylierende Enzym PPT1 ist für die zelluläre Signaltransduktion nicht relevant, sodass APT1 und APT2 die Hauptzielproteine der Palmostatine sind. Die Selektivität der Sonden belegt der Befund, dass auch keine weiteren für die Signalvermittlung über Ras relevanten intrazellulären Esterasen (z.B. die Phospholipasen A1, A2, C und D) als Zielproteine der Palmostatine identifiziert wurden. Diese Untersuchungen belegten erstmals, dass APT2 N-Ras depalmitoyliert. Mithilfe von Messungen der Fluoreszenzlebensdauer (FLIM) wurde die direkte Wechselwirkung von Palmostatin B und APT1 in Zellen nachgewiesen. Dafür wurden die Zellen mit eGFP-markierter APT1 transfiziert und dann mit zellgängigem TAMRA-markiertem Palmostatin B (**15**, Abbildung 15) behandelt.^[187] Die Le-

bensdauer der Fluoreszenz von APT1 wurde signifikant durch Quenchen mit TAMRA selektiv reduziert und so die direkte Wechselwirkung belegt. Diese Untersuchungen zeigen beispielhaft, wie der komplementäre Einsatz von Proteomik- und Imagingmethoden direkte Korrelationen in lebenden Zellen ermöglichen kann.

5.3. Affinitätsbasierte Monoaminoxidase-Inhibitoren

Eine besondere Herausforderung beim ABPP besteht in der Erweiterung der Anwendbarkeit der verfügbaren Sonden über die klassischen α,β -Hydrolasen hinaus, um einen größeren Teil des katalytisch aktiven Proteoms untersuchen zu können. Vor kurzem wurden über ABPP von MAO-Modulatoren berichtet.^[194] Die Flavin-abhängigen Oxidasen sind eine große Proteinklasse, die diverse oxidierende Umsetzungen ausführen, wie z. B. Halogenierungen, Einführung von Mehrfachbindungen und Aminoxidationen. Monoaminoxidasen (MAOs) sind Flavinadenindinukleotid(FAD)-abhängige Enzyme, die die oxidative Deaminierung xenobiotischer Amine und wichtiger Neurotransmitter katalysieren, wie z. B. Serotonin, Norepinephrin und Dopamin. In den MAOs ist der Flavincofaktor kovalent über ein Cystein an das Protein gebunden, und tertiäre *N*-Methyl-*N*-propargylamine wie Deprenyl (**16**) und Pargylin (**17**) (Abbildung 16a) modifizieren den Cofaktor nach erfolgter Oxidation durch Michael-Addition des Isoalloxazinrings in FAD (Abbildung 16b).^[195] Deprenyl und Pargylin werden zur zellbiologischen und biochemischen Charakterisierung der MAOs verwendet und sind klinisch eingesetzte Pharmaka. Von Pargylin und Deprenyl abgeleitete Inhibitoren (**18**, **19**), in die das reaktive Propargylamin und zusätzlich ein Alkin in die aromatische Gruppe eingeführt wurden, wurden zur Visualisierung in Zelllysaten durch Alkin-Azid-Cycloaddition hergestellt (Abbildung 16c). Diese Sonden sind potente Inhibitoren von MAO A (IC_{50} 0.93 μ M für **17** und 0.04 μ M für **19**) und MAO B (IC_{50} 0.11 μ M für **16** und 1.76 μ M für **18**) in vitro. Kontrollsubstanzen (**20**, **21**) mit freier NH-Gruppe gingen keine Reaktion ein. Die Sonden wurden mit rekombinanten menschlichen MAO-Präparationen inkubiert und dann durch Cu^I -katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition mit einem TAMRA-Fluorophor verknüpft. Markierte Proteine wurden durch SDS-PAGE und Fluoreszenz-Visualisierung nachgewiesen. Orientierende Experimente zeigten, dass die Sonden (**18**, **19**) die Monoaminoxidasen A und B bis zu Konzentrationen von 100 nM effizient als Hauptzielproteine markierten. Alle in den initialen Screens identifizierten Sonden enthielten methylsubstituierte tertiäre Amine, was in Übereinstimmung mit bekannten Pharmakophoren für MAO-Inhibitoren darauf hindeutet, dass dieses Strukturelement wichtig für eine effiziente Markierung ist. Konkurrenzexperimente belegten, dass die ABPP-Sonden mit MAO-spezifischen Inhibitoren um dieselbe Bindungsstelle (den Flavincofaktor) im aktiven Zentrum des Enzyms konkurrieren, da Pargylin die Markierung von MAO durch die ABPP-Sonde blockierte. MAO-Markierung durch Deprenyl- und Pargylin-ABPP-Sonden konnte weiterhin in Gewebehomogenisaten demonstriert werden. Diese Befunde belegen, dass das entwickelte



Affinitätssonden

Abbildung 16. a) Strukturen von Deprenyl (**16**) und Pargylin (**17**).

b) Markierung von Monoaminoxidasen. c) Strukturen von Deprenyl- und Pargylin-Affinitätssonden.

ABPP-System effizient zur Profilierung der Aktivität von MAO-Isoformen in Zellkultur und in Gewebeproben eingesetzt werden kann.

5.4. Identifizierung der Zielproteine von Centrocountin mithilfe chemischer Proteomik

Centrocountin 1 (**22**) wurde bei der Untersuchung einer Indolochinolizidin-Bibliothek in einer Phänotyp-basierten Suche nach Substanzen identifiziert, die mitotischen Arrest herbeiführen. Centrocountin 1 induziert die Ausbildung multipler mitotischer Spindeln in BSC-1-Zellen und moduliert die Integrität von Centrosomen.^[17] Es bewirkt die Bildung fragmentierter und überzähliger Centrosomen, Defekte in der Chromosomenkongression, die Bildung multipolarer mitotischer Spindeln und acentrosomaler Spindelpole und löst multipolare Zellteilung aus. Diese Befunde deuten darauf hin, dass Centrocountin an der centrosomalen Maschinerie angreift. Basierend auf einer fokussierten Kollektion von Centrocountinanaloga und einer detaillierten Struktur-Aktivitäts-Analyse wurden die Affinitätssonde **24** und die negative Kontrollsonde **25** für die Identifizierung der Zielproteine

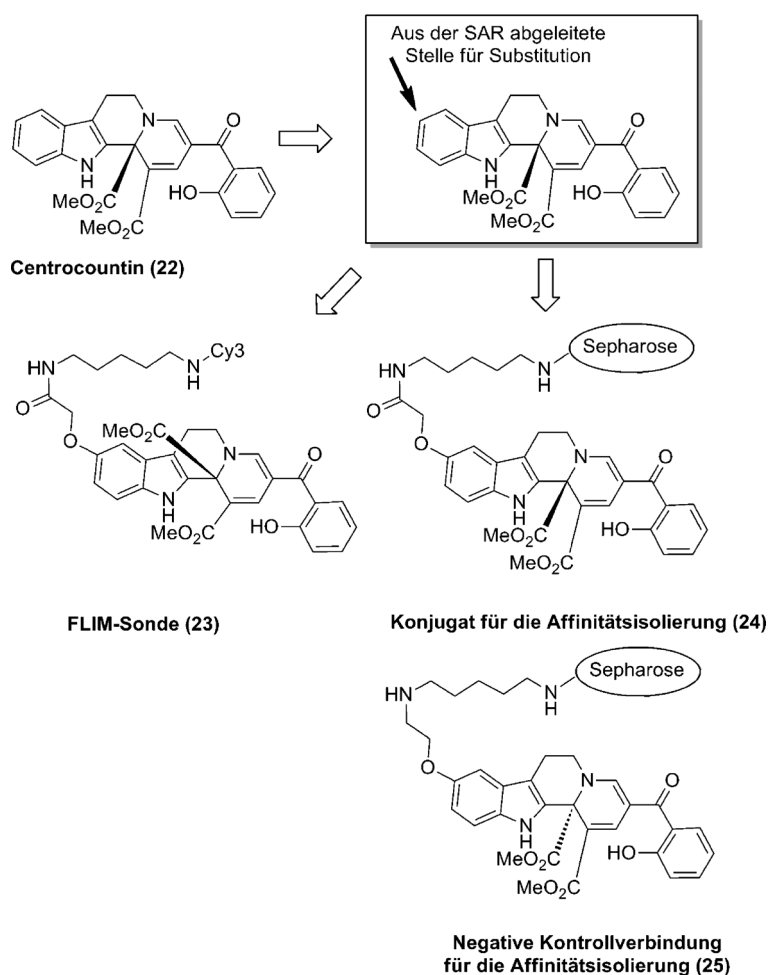


Abbildung 17. Strukturen von Centrocountin (**22**) und Sonden für FLIM-Experimente und Affinitätschromatographie.

mithilfe eines chemisch-proteomischen Ansatzes hergestellt (Abbildung 17). Substanz **24** wurde auf Sepharosepartikeln durch NHS-Kupplung immobilisiert und mit HeLa-Zelllysaten behandelt. Angereicherte Proteine wurden durch Zugabe eines zehnfachen Überschusses von Centrocountin eluiert und massenspektrometrisch identifiziert. Dabei zeigte sich, dass die Sonde **24**, nicht aber die Kontrollsonde **25** das nucleoläre und centrosomale Protein NPM und das kleine ribonukleäre U2-Protein bindet. Knockdown von NPM durch RNAi induziert Centrosomenfragmentierung und beeinflusst Chromosomenkongression und die Bildung mitotischer Spindeln in HeLa-Zellen.^[196] NPM ist an der Regulierung der Centrosomenduplikation in der Mitose beteiligt und promoviert die Biogenese der Ribosomen. Auf diesen Befunden aufbauend wurde NPM als Zielprotein validiert. Reversible Bindung von NPM an **24** wurde durch Immunoblotting mit einem NPM-spezifischen Antikörper und konzentrationsabhängige Konkurrenz zwischen immobilisiertem und nicht-immobilisiertem Centrocountin bestätigt. Bei der Regulierung der Centrosomenduplikation durch NPM spielt die Ausbildung eines Komplexes mit dem Kernexportrezeptor Crm1 eine wichtige Rolle.^[197] Knockdown von Crm1 durch RNAi und Inhibition von Crm1 durch den Naturstoff Lep-

tomycin B führen zu ähnlichen Defekten bei der Chromosomenanordnung und dem Spindelaufbau wie die Behandlung mit Centrocountin 1. Tatsächlich ergab die Auswertung der Affinitätsisolationsexperimente mit einem für Crm1 spezifischen Antikörper, dass Crm1 ebenfalls an die immobilisierte Centrocountinsonde bindet. Direkte Wechselwirkung zwischen der Sonde **23** und NPM sowie Crm1 in HeLa-Zellen wurde durch FLIM-Imaging der Donoren NPM-Citrin und EYFP-Crm1 nach Zugabe von Cy3-markiertem Centrocountin 1 als Akzeptor belegt. Diese Befunde ergaben, dass NPM und Crm1 unabhängig Centrocountin 1 binden und dass NPM und Crm1 zelluläre Zielproteine von Centrocountin sind. Durch diese Wechselwirkungen beeinflusst die Substanz die Integrität der Centrosomen und der Spindel, erzeugt Defekte in der Chromosomenanordnung, Zellzyklusarrest in der M-Phase und ultimativ Apoptose.

5.5. Identifizierung der Zielproteine der Tubulexine mithilfe von SILAC

Naturstoffe mit Tetrahydropyranstruktur sind in der Natur weit verbreitet und besitzen ausgeprägte biologische Eigenschaften. So wirken das Centrolobin und nahe verwandte Substanzen antibiotisch und antioxidativ. In einem phänotypischen Screen einer Tetrahydropyran-Kollektion auf Beeinflussung der Mitose wurden die Tubulexine als strukturell neue Modulatoren der Mitose identifiziert.^[62] Tubulexin A (**26**, Abbildung 18) ist die aktivste dieser Verbindungen und beeinflusst den Prozess der Chromosomensegregation durch

Binden an die Vincaalkaloid-Bindungsstelle an α,β -Tubulin. DNA-Visualisierung und FACS-Analyse zeigten, dass Tubulexin A BSC-1-, HeLa- und MCF-7-Zellen nahezu vollständig in der G2M-Phase arretiert. Tubulexin A arretiert HeLa-Zellen in Konzentrationen bis zu 2 μM , während Tubulexin B (**27**, Abbildung 19) und Tubulexin C (**28**, Abbildung 19) weniger potent sind, sodass mindestens 10 μM für Zellzyklusarrest in HeLa- und BSC-1-Zellen benötigt werden. Induktion der Apoptose durch Tubulexin A wurde durch Nachweis erhöhter Aktivität von Caspase-3 und Caspase-7 in HeLa- und BSC-1-Zellen. Zur weiteren Charakterisierung von Tubulexin A wurde ein aussagekräftiges SAR aus der Tetrahydropyran-Kollektion abgeleitet, und die Affinitätssonde **29** sowie die negative Kontrollsonde **30** wurden synthetisiert (Abbildung 18). Die Sonden wurden in Affinitätsisolationsexperimenten unter Verwendung des quantitativen SILAC-Ansatzes zur Identifizierung potentieller Zielproteine eingesetzt.^[71] Die Tubulexinsonde **29** zeigte in relevanten zellulären Assays vergleichbare Eigenschaften zu nicht-modifiziertem Tubulexin A. Nach Inkubieren der biotinylierten Sonden **29** und **30** auf magnetischen, mit Streptavidin belegten Partikeln wurden diese mit isotope markiertem oder unmarkiertem HeLa-Zelllysate inkubiert. Nach Freisetzen der Proteine durch

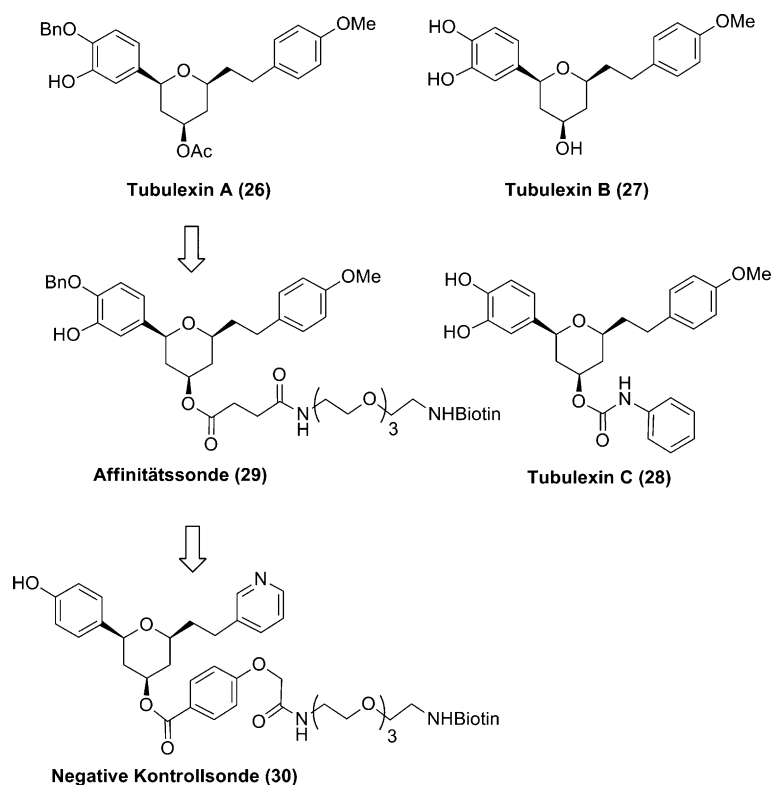


Abbildung 18. Strukturen von Tubulexin A–C und der Affinitätssonden.

Hitzenaturierung des Streptavidins wurden die markierten und unmarkierten Proben vereint, die Proteine durch SDS-PAGE getrennt und durch nano-HPCL-MS/MS-Analyse identifiziert. Ausschließlich Proteine, für die das quantifizierte Verhältnis zwischen markierten SILAC-Peptiden und nicht-markierten Peptiden in mindestens 75 % der Replikate signifikant unterschiedlich war, wurden als potentielle Zielproteine in Betracht gezogen. Auf diese Weise wurden das „chromosome segregation 1-like protein“ (CSE1L, CAS, Exportin-2) und Tubulin als für die Mitose relevante Zielproteine identifiziert. Die Bindung von Tubulexin A an CSE1L und Tubulin wurde durch Western Blotting nach Affinitätsisolierung bestätigt. Konzentrationsabhängige Kompetition zwischen ungebundenem und immobilisiertem Tubulexin A zeigte, dass die Bindung an CSE1L reversibel ist. Inhibition der In-vitro-Tubulinpolymerisation durch Tubulexin A in Abwesenheit Tubulin-assoziiierter Proteine wurde anhand von Turbiditätsmessungen nachgewiesen.

Die Mehrzahl der bekannten Inhibitoren der Tubulinpolymerisation bindet an die Colchicin- oder die Vincaalkaloid-Bindestelle an Tubulin. Obwohl Colchicin und Tubulexin alkylierte Phenolgruppen enthalten und somit Strukturähnlichkeiten aufweisen, bindet Tubulexin A nicht an die Colchicinbindestelle. Stattdessen konkurriert es konzentrationsabhängig mit einem fluoreszierenden Analogon von Vinblastin um die Vincaalkaloid-Bindestelle an Tubulin. Darüber hinaus wirkt Tubulexin A synergistisch mit CSE1L auf Tubulin. Tubulexin A ist daher ein neuer Tubulinmodulator mit dualer Wirkungsweise.

5.6. Ligandenvermittelte Proteinmarkierung von Fusicoccin-bindenden Proteinen

Kürzlich wurde eine Technik zum Liganden-dirigierten kovalenten Transfer einer Markierung (tag) auf Zielproteine entwickelt, anhand derer das Zielprotein identifiziert werden kann. Aus verschiedenen Ansätzen hat sich dafür die Verwendung von Arylsulfonaten als am erfolgreichsten erwiesen. Von Fusicoccin A abgeleitete Sonden wurden verwendet, um 14-3-3-Proteine in Krebszellen zu profilieren.^[69] 14-3-3-Proteine spielen als Vermittler von Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Einbeziehung diverser phosphorylierter Liganden wichtige Rollen in Kinase-abhängigen Signalwegen, doch das 14-3-3-Interaktom wurde bislang kaum charakterisiert. Eine ligandenabhängige Methode zur Detektion von 14-3-3-Proteinen könnte die Identifizierung von intrazellulären Signalnetzwerken ermöglichen, die 14-3-3-Proteine einschließen. Eine große Zahl intrazellulärer Proteine mit 14-3-3-Interaktionsmotiven einschließlich solcher, die an der Signalvermittlung und der Zellzykluskontrolle beteiligt sind, ist bekannt. Das Diterpen Fusicoccin^[198] (31, Abbildung 19) aktiviert durch Ausbildung eines ternären Komplexes mit einem 14-3-3-Protein die pflanzliche membrangebundene H⁺-ATPase. Diese Wechselwirkung führt zur Öffnung

der pflanzlichen Stomata und schließlich zum Verwelken der Pflanze. Anhand der Kristallstruktur des Fusicoccin/14-3-3-ζ-Komplexes^[199] wurde eine Sonde entwickelt, in der das komplexe 5-8-8-Diterpengerüst erhalten blieb und ein Linker mit Sulfonatsubstruktur an das exocyclische Kohlenhydrat angebracht wurde (Abbildung 19). Die Linkerlänge wurde so gewählt, dass die Sulfonylethylgruppe in räumliche Nähe zu einem potentiellen Nucleophil (His 164) in 14-3-3-ζ kommt. In den Terminus der transferierbaren Struktureinheit wurde ein Dansyl- oder BODIPY-Fluorophor als Reportergruppe eingeführt (32, 33). Parallel wurde eine Kontrollsubstanz ohne die Selektivität garantierendes Fusicoccin hergestellt (34, Abbildung 19).

Um zu prüfen, ob rekombinantes 14-3-3-ζ markiert wird, wurde es mit den Sonden 32 und 33 in An- und Abwesenheit des Peptids behandelt, sodass die Ausbildung des ternären Komplexes für die Reaktion entscheidend ist. Die Ausbeute der Reaktion stieg bis zur Äquimolarität von Phosphopeptid und 14-3-3-Protein, was die Ausbildung eines ternären Komplexes im Verhältnis 1:1:1 stützt.

Der Befund, dass Sonde 23 14-3-3-ζ, das ein Asn anstelle von His an Position 164 trägt, nur sehr schwach markiert, deutet darauf hin, dass His 164 bevorzugt funktionalisiert wird. Diese Ortsspezifität wurde zusätzlich durch ortsgerechte Mutagenese von 14-3-3-ζ bestätigt, denn nach Ersetzen von His durch Ala fand keine Funktionalisierung statt. Ein Kontrollexperiment mit Sonde 23 zeigte keine Funktionalisierung des Proteins. Die von Fusicoccin abgeleiteten Sonden können 14-3-3-ζ ortsspezifisch und ligandenabhängig mar-

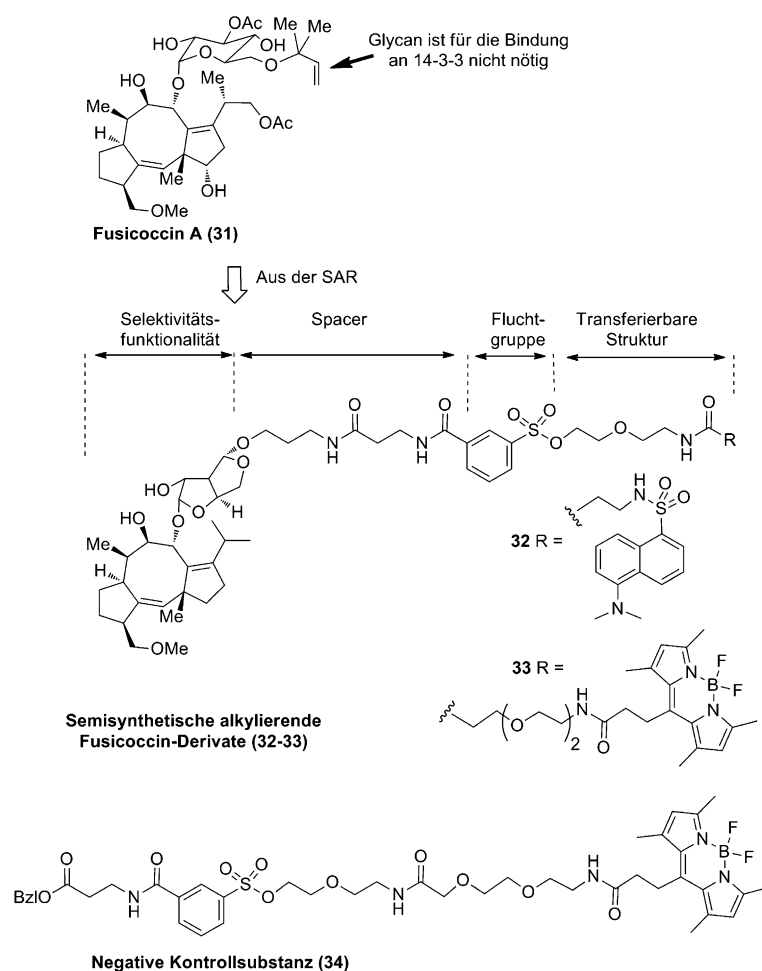


Abbildung 19. Strukturen von Fusicoccin A (31) und Sonden für ligandenvermittelte Proteinmarkierung.

kieren. Es ist zu erwarten, dass die ligandenvermittelte Proteinmarkierung zukünftig an Bedeutung gewinnen wird.

5.7. ABPP-Fluorophosphonat-Profilierung

Targetidentifizierung ist nicht nur mit spezifischen, sondern auch mit unspezifischen Reportersonden möglich. Dieser Ansatz war besonders für α,β -Hydrolasen im Allgemeinen und Serinhydrolasen im Besonderen erfolgreich.^[200] In einem typischen Experiment werden Zellen oder Lysate mit einem Inhibitor für eine bestimmte Zeit inhibiert, dann wird ein unspezifisches Reporterfluorophosphonat (FP) zugegeben, das einen Fluorophor oder eine andere Reportergruppe trägt (35, FP-Rhodamin; 36, FP-Alkin; 37, FP-Biotin; Abbildung 20), welche alle α,β -Hydrolasen kovalent im aktiven Zentrum bindet. Nachfolgende Visualisierung in Gelen und Vergleich der Experimente mit oder ohne Zugabe des Inhibitors führt bei Blockierung des aktiven Zentrums zum Fehlen bestimmter Banden. Im Gegensatz zu den reaktiveren Fluorophosphonaten können Carbamate hohe Selektivität für einzelne Serinhydrolasen zeigen. Diese Inhibitoren haben sich als wertvolle Werkzeuge für die Forschung erwiesen und treten zum Teil auch in Medikamenten auf, z. B. in Riva-

stingmin. Trotz intensiver Suche konnten potente und selektive Carbamat-Inhibitoren nur für einen Teil der Serinhydrolasen identifiziert werden, sodass ein Bedarf an alternativen Serinhydrolaseinhibitorklassen besteht. Kürzlich wurde der klassische Fluorophosphonatreporter durch modifizierbare Harnstoffe ersetzt, die durch Klick-Chemie derivatisiert werden können (38, Abbildung 20) und bei der proteomweiten Evaluierung einer kleinen Carbamatbibliothek mit Triazolharnstoffgrundstruktur eingesetzt wurden.^[201] Ersatz der FP-Sonden durch Harnstoffe dämpfte die Reaktivität, sodass Serinhydrolasen in Anwesenheit anderer Hydrolasen selektiv im Proteom adressiert werden konnten. 1,2,3-Triazolylharnstoffe (39, 40, Abbildung 20) inhibieren besonders Serinhydrolasen. Die Eigenschaften können über die Enzymklasse angepasst und so Selektivität für individuelle Mitglieder erzielt werden. In einem Zweistufenverfahren wurden substituierte Alkine mit in situ erzeugten Aziden (Azidomethanol) zu 4-substituierten Triazolen umgesetzt, die dann zu Triazolharnstoffen carbamoyliert wurden. Diese wurden typischerweise als 3:1-Gemisch von N2- und N1-carbamoylierten Regioisomeren erhalten. Mithilfe dieser Strategie wurden zwanzig 4-Aryl- und 4-Alkyltriazole erzeugt. Die Kollektion wurde bei 10 nM und 100 nM Konzentration gegen Maus-T-Zelllysate gescreent, und mehrere hochpotente und selektive Inhibitoren verschiedener Serinhydrolasen wurden identifiziert. Ausgewählte Inhibitoren wurden in Mäusen mit ausgezeichneten Resultaten geprüft, wobei sich eine gute Korrelation zwischen In-vitro- und In-vivo-Aktivität ergab. Zusammenfassend sind 1,2,3-

Triazolharnstoffe ein vielfältiger Inhibortyp für die Entwicklung selektiver und potenter Inhibitoren im Proteom weit verbreiteter und schlecht charakterisierter Serinhydrolasen.

Ein Nachteil der Verwendung von Fluorophosphonaten und verwandten Detektionsmethoden ist, dass sie besonders für die Detektion kovalenter Inhibitoren geeignet sind. Bei Verwendung reversibler Inhibitoren hängt das Resultat einer globalen Modifizierung stark von der Inkubationszeit ab, denn die apparente Desorption des nicht-kovalenten Liganden („off-rate“) bestimmt, zu welchem Teil ein gegebenes Protein mit der Reportersonde markiert wird. Dieses Problem wurde kürzlich erfolgreich durch Verwendung kovalenter Reportersonden mit adjustierbarer kinetischer Reaktivität gelöst.^[202]

5.8. Targetidentifizierung mit Capture-Compound-Massenspektrometrie (CCMS)

Targetidentifizierung ist oft nicht auf das Auffinden einzelner Zielproteine beschränkt, sondern wird auf Targetprofilierung ausgedehnt, bei der ganze Proteinfamilien mit unterschiedlichen Affinitäten (hoch bis niedrig) an Substanzen

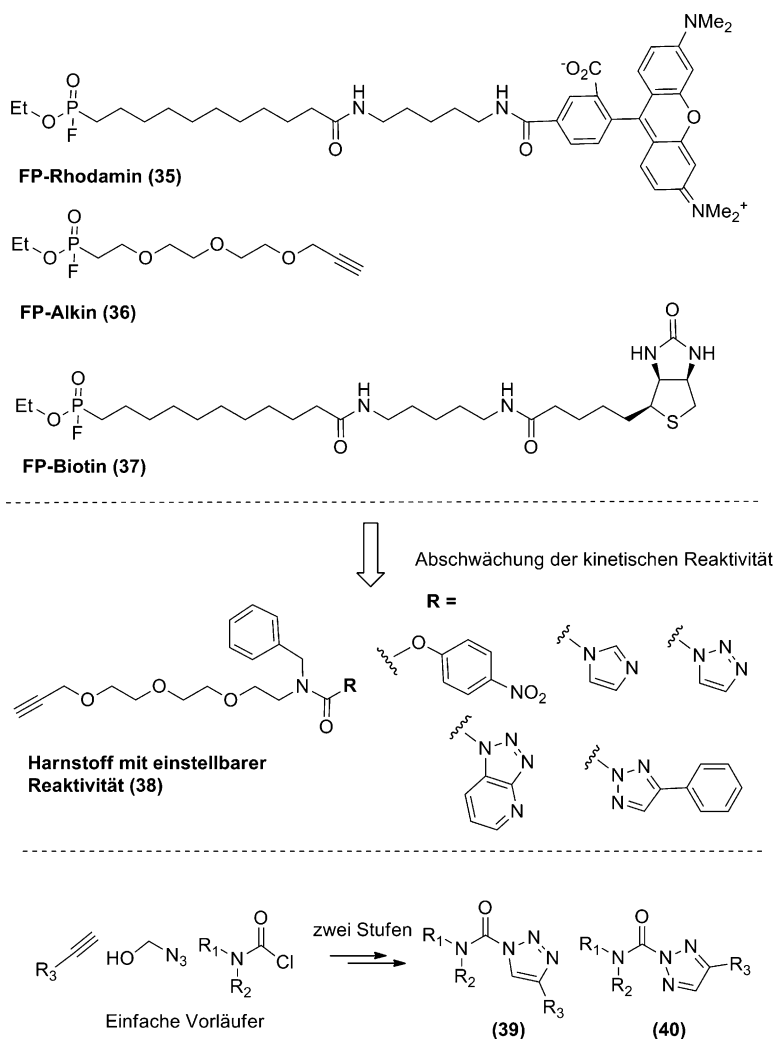


Abbildung 20. Strukturen von Reportersonden für ABPP.

binden. Beim Ausdehnen einer klassischen Affinitätsisolierung (Pulldown) auf eine Multiproteinfamilie werden viele der Bindungspartner mit niedriger oder mittlerer Affinität in den Waschschritten verloren. Ein Beispiel sind Substanzen, die spezifisch eine Kinase-Subgruppe inhibieren. Kinasen sind wichtige Zielproteine in der Krebstherapie, und verbesserte Therapien sollten auch Wechselwirkungen mit niedriger oder mittlerer Affinität in Betracht ziehen. Hierfür sind bessere Targetprofilierungsmethoden von besonderer Bedeutung. Als neue Technologie für die Isolierung von Proteinsubfamilien auf der Grundlage trifunktionaler molekularer Sonden wurde die „capture compound mass spectrometry“ (CCMS) eingeführt (Abbildung 4b).^[43] „Capture compounds“ weisen drei Funktionalitäten auf: 1) eine Selektivitätsfunktion, d.h. den Liganden, der profiliert werden soll, 2) eine photoaktivierbare Funktionalität zur Quervernetzung und 3) eine Funktionalität zum Sortieren und Trennen. In einem typischen Experiment wird ein Zelllysat mit der „capture compound“ inkubiert, sodass die Selektivitätsfunktion die Zielproteine im Gleichgewicht binden kann. Nachfolgende Photolyse führt zur Bildung eines reaktiven Intermediats, z.B. eines Nitrens oder eines Carbens, das unter

kovalenter Vernetzung zur „capture compound“ mit dem Zielprotein reagiert. Mithilfe der Sortierfunktion, z.B. Biotin und mit Streptavidin belegten magnetischen Partikeln kann der entstandene Komplex dann isoliert werden. Ein großer Vorteil bei der Verwendung dieser kovalenten Quervernetzung zwischen „capture compounds“ und Zielproteinen ist, dass auch schwach interagierende Proteine mit mikromolarer Affinität irreversibel gebunden werden. Die kovalente Bindung ermöglicht, durch stringentes Waschen den Hintergrund durch unspezifische Bindung zu reduzieren. Mithilfe der CCMS-Technik wurde das Kinasebindungsprofil von Staurosporin charakterisiert.^[203] Basierend auf einer SAR für Staurosporin (41) und der Kristallstruktur von Inhibitor-Target-Komplexen wurde ein geeigneter Anknüpfungspunkt für das trifunktionale Gerüst identifiziert, und die „capture compound“ (42) wurde synthetisiert (Abbildung 21). Zur Validierung wurde zunächst eine kovalente Bindung zwischen der gereinigten katalytischen Untereinheit rekombinanter menschlicher PKA in HepG3-Lysat erzeugt. Nach Inkubation, Photovernetzung und Anreicherung mit Streptavidinpartikeln wurden die eingefangenen Proteine tryptisch verdaut und die gebildeten Peptide mit LC-MS/MS und Suche in annotierten Datenbanken analysiert und identifiziert. Um zwischen spezifisch gebundenen Proteinen und unspezifischen Hintergrundproteinen unterscheiden zu können, wurden parallel Kompetitionskontrollexperimente ausgeführt, bei denen das Lysat mit einem großen Überschuss an Staurosporin vorinkubiert wurde. Die Capture-Experimente identifizierten in HepG2-Lysaten durchschnittlich 300 Proteine. Staurosporin ist ein ATP-kompetitiver Kinaseinhibitor, sodass promiskuitive Bindung an Proteine möglich ist, die verschiedene Nukleotide binden. Auch könnten hochaffine Bindungspartner der Kinasen, eventuell nach zusätzlicher Vernetzung wegen ihrer Bindung an die Kinase, angereichert worden sein. Insgesamt wurden nach Datenanalyse 100 Kinasen identifiziert, von denen 56 Serin/Threonin-Kinasen, 9 Tyrosinkinasen und 4 dual-spezifische Kinasen waren. Drei Kinasen zeigten subnanomolare Affinität für Staurosporin, 12 Kinasen waren im Bereich von 1–10 nM affin, 15 Kinasen zählten zum Bereich von 10–100 nM, und 7 Kinasen hatten eine Affinität von 100 nM–1 μ M. Für 2 Kinasen war die Affinität > 10 μ M. Diese Resultate belegen, dass CCMS besonders Kinasen mit Affinitäten im nanomolaren Bereich, aber auch mit mikromolarer Affinität identifizieren kann.

5.9. Identifizierung der Zielproteine von Piperlongumin mithilfe von SILAC

Bei einem Reportergen-Screen nach Apoptose-induzierenden Substanzen wurde Piperlongumin (43, Abbildung 22)

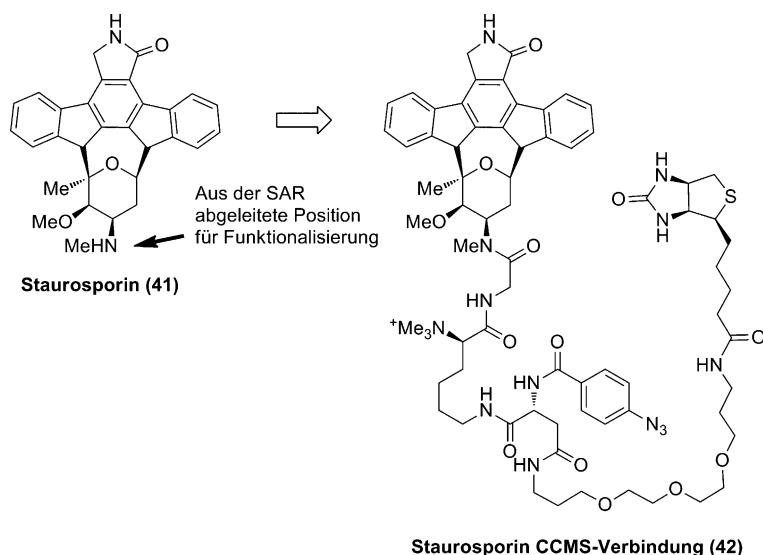


Abbildung 21. Strukturen von Staurosporin (41) und der Staurosporin-CCMS-Sonde (42).

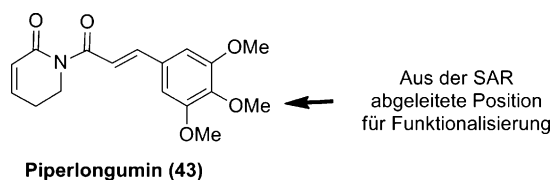


Abbildung 22. Struktur von Piperlongumin (43).

als primärer Treffer identifiziert.^[75] Piperlongumin ist ein Naturstoff aus der Pflanze *Piper longum* L., deren Extrakte zytotoxisch sind.^[204] Untersuchung der Wirkung von Piperlongumin auf Krebszellen oder normale Zellen zeigte, dass die Substanz in Krebszellen Zelltod unabhängig von Mutationsstatus von p53 induziert. Normale Zellen waren kaum oder nicht empfindlich. Daraus schloss man, dass Piperlongumin spezifisch für Krebszellen zytotoxisch ist und dass sein Zielprotein ein Produkt der malignen Transformation sein könnte. Untersuchung des Apoptose-auslösenden Effekts von Piperlongumin durch quantitatives Immunoblotting für Wildtyp-p53-Expression zeigte, dass die Expression von p53 bei der Behandlung mit Piperlongumin zunahm. Mit Piperlongumin behandelte Zellen zeigten darüber hinaus geringere Mengen überlebensfördernder Proteine, sodass die Induktion von Zelltod oder Apoptose in Krebszellen auf eine Modulation der Expression von Proteinen in den Überlebenssignalwegen zurückzuführen sein könnte. Piperlongumin hat geeignete physikochemische Eigenschaften, gute orale Verfügbarkeit und eine akzeptable Halbwertszeit im Plasma für In-vivo-Studien in Mäusen. Behandlung mit Piperlongumin führte zu einem signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der Blutgefäße in Tumor-Mausxenograften und inhibierte die Bildung sekundärer Tumore. In einem Brustdrüsenkrebs-Modell in transgenen Mäusen war Piperlongumin effizienter als Paclitaxel. Zur Aufklärung der Wirkungsweise von Piperlongumin und zur Identifizierung der Zielproteine und ihrer Komplexe kamen Affinitätsisolierung mit SILAC und

quantitative Proteomik zum Einsatz. Basierend auf einer Struktur-Aktivitäts-Beziehung für Piperlongumin wurde dafür ein geeignet funktionalisiertes Derivat synthetisiert, und zwölf Interaktionspartner wurden in zwei Zelllinien identifiziert. Für sieben dieser Proteine war bekannt, dass sie die zelluläre Reaktion auf oxidativen Stress durch reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) beeinflussen. Glutathion-S-Transferase 1 (GSTP1) wurde mit dem höchsten Wert identifiziert, gefolgt von Carbonylreduktase 1. Mehrere der identifizierten Proteine sind Teil eines größeren Komplexes, sodass die Affinitätsisolierung sowohl direkte als auch indirekte Zielproteine identifiziert haben könnte. Die Resultate legen nahe, dass Piperlongumin durch Bindung an Proteine, die oxidativen Stress regulieren, den zellulären Redoxzustand moduliert und die vermehrte Bildung von ROS induziert. Es wurde weiterhin gezeigt, dass Piperlongumin direkt mit gereinigter rekombinanter GSTP1 interagiert und sie inhibiert, was zur Reduktion des Glutathionniveaus (GSH) und

einer Erhöhung an oxidiertem Glutathion (GSSG) führt. Demgegenüber wurde in normalen Zellen die GSSG-Konzentration nicht erhöht. Bestimmung der Konzentration einzelner ROS-Verbindungen mit fluoreszierenden Sonden zeigte, dass Piperlongumin die Bildung von H_2O_2 mit NO, aber überraschend nicht von Superoxidanionen induziert. Im Gegensatz zu Krebszellen verursachte Piperlongumin in normalen Zellen keine Erhöhung des ROS-Niveaus. Durch diese Selektivität unterscheidet sich Piperlongumin von anderen Substanzen, die das ROS-Niveau beeinflussen. Diese Befunde legen nahe, dass die Beeinflussung des ROS-Stresssignalwegs eine neue Strategie zur Bekämpfung von Krebs sein könnte.

5.10. Identifizierung von Tankyraseinhibitoren mithilfe von iTRAQ

Der in der Evolution konservierte Wnt/ β -Catenin-Signalweg reguliert zahlreiche biologische Prozesse. Eine wichtige regulatorische Funktion des Signalwegs ist die Kontrolle des proteolytischen Abbaus des Effektorproteins β -Catenin durch den β -Catenin-Destruction-Komplex. Ist der Wnt-Signalweg nicht aktiviert, wird phosphoryliertes β -Catenin abgebaut. Nach Stimulierung mit Wnt dissoziiert der β -Catenin-Destruction-Komplex, β -Catenin akkumuliert im Zellkern und führt zur Transkription Wnt-abhängiger Gene. Für diverse Krebsarten wurde beobachtet, dass der Wnt-Signalweg unerwünscht aktiviert ist, sodass die Entwicklung von Modulatoren dieses Signalweges eine attraktive Option für die Medikamentenentwicklung bietet. In einem Hochdurchsatz-Screen unter Verwendung eines Wnt-abhängigen Luciferasereporter-Gen-Assays wurde der Inhibitor XAV939 (44, Abbildung 23) des Wnt-Signalwegs gefunden.^[85] XAV939 reduziert die β -Catenin-Mengen und führt zur Erhöhung der β -Catenin-Phosphorylierung. Dies legt nahe, dass XAV939 den von der Phosphorylierung abhängigen Abbau von β -

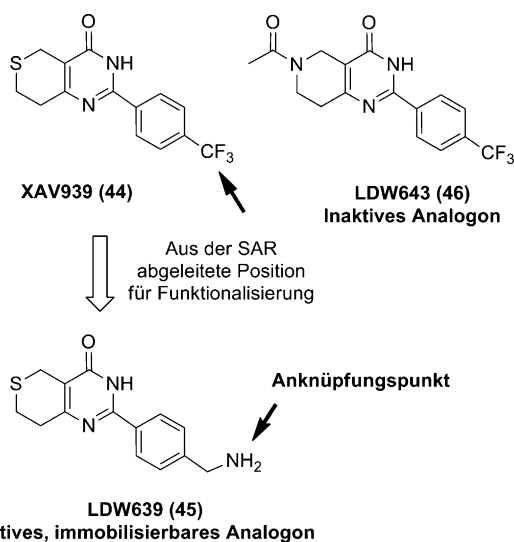


Abbildung 23. Struktur von XAV939 (44) und zugehörigen Affinitätssonden.

Catenin durch Erhöhung der Aktivität des Destruction-Komplexes begünstigt. Um aufzuklären, wie die Aktivität dieses Komplexes erhöht wird, wurde geprüft, ob die Substanz die Konzentration bekannter Mitglieder des Signalwegs beeinflusst. Nach Behandlung mit XAV939 wurden erhöhte Niveaus von Axin 1 und eine Erhöhung der Menge des Axin-GSK3 β -Komplexes beobachtet. Offenbar induziert XAV939 die Bildung des Komplexes und begünstigt somit die Phosphorylierung und den Abbau von β -Catenin.

Zur Identifizierung der zellulären Zielproteine von XAV939 wurde ein auf quantitativer chemischer Proteomik basierender Ansatz gewählt, bei dem die iTRAQ-Methode zum Einsatz kam.^[74] Auf einem SAR fußend wurde das Analogon LDW639 (45, Abbildung 23) hergestellt und zur Isolierung von Proteinen aus Zelllysaten immobilisiert. HEK293-Lysat wurde mit einem Überschuss (20 mM) an XAV939 (44), dem inaktiven Analogon LDW643 (47, Abbildung 23) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) behandelt. Mit löslichen XAV939 (44) konnten 18 Proteine spezifisch eluiert werden, einschließlich mehrerer Poly(ADP-Ribose)polymerasen (PARP1, PARP2, TNK1, TNKS2) und bekannter, wahrscheinlich copräzipitierter PARP-Substrate.

In einem komplementären Experiment wurde gezeigt, dass XAV939 (44), nicht aber LDW643 (46), bei 10 μ M Konzentration die Bindung der TNKS und bei 1 mM die Bindung von PARP1/2 blockiert. Mithilfe von siRNA wurde untersucht, ob Herabregulierung von PARP-Proteinen Funktionsverlust-Phänotypen (loss-of-function) erzeugt, die die Wirkung von XAV939 nachahmen. Codepletion von TNKS1 und TNKS2 erzeugte den gleichen phänotypischen Effekt wie XAV939 durch Erhöhung des Niveaus von Axin 1 und 2, während die gleichzeitige Herabregulierung von PARP1/2 nicht den gleichen Phänotyp induzierte.

Die Erhöhung der Axin-Proteinkonzentration durch XAV939 könnte durch Modulierung der Translation oder der Stabilität der Proteine verursacht sein. Behandlung mit

XAV939 schützte das Protein vor proteasomalem Abbau und verlängerte so die Lebensdauer von endogenem Axin 2 in Zellen. Demgegenüber führte gemeinsame Behandlung mit XAV939 und dem Proteasominhibitor MG132 zu einer signifikanten Abnahme der Polyubiquitylierung von Axin 1 und 2. Dieser Befund legt nahe, dass XAV939 Axin durch Verhinderung der Polyubiquitylierung stabilisiert. Insgesamt belegen die Resultate, dass Tankyrase für die Stabilität von Axin wichtig ist und dass Axin ein limitierender Faktor im β -Catenin-Destruction-Komplex ist. Axin kommt somit eine wichtige Rolle im Wnt-Signalweg zu.

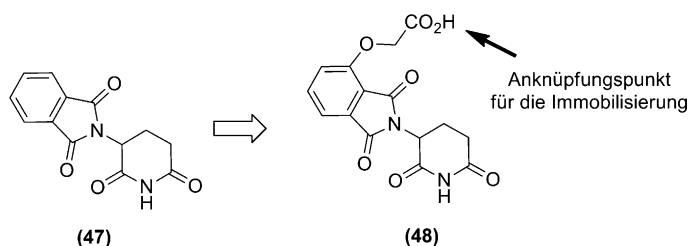


Abbildung 24. Strukturen von Thalidomid (47) und FR259625 (48).

5.11. Identifizierung der Zielproteine von Thalidomid mithilfe chemischer Proteomik

Thalidomid (47, Abbildung 24) wurde klinisch in den 60er Jahren als mildes Sedativum eingesetzt und hat als Auslöser schwerer Missbildungen traurige Berühmtheit erlangt. Es wird klinisch bis heute zur Behandlung von Lepra und des multiplen Myeloms verwendet. Die Ursachen für die von Thalidomid ausgelösten Fehlbildungen sind kaum erforscht. Frühere Arbeiten legten nahe, dass oxidativer Stress und antiangiogene Wirkung die Ursachen für die Teratogenität sein könnten. Kürzlich wurde jedoch für Thalidomid eine Targetprofilierung durchgeführt.^[205] Die von Thalidomid hervorgerufenen Missbildungen sind durch einen charakteristischen Phänotyp gekennzeichnet, der besonders deformierte und verkürzte Gliedmaßen zeigt. Carbonsäurederivat 48 (Abbildung 24) war in Zebrafischen reproduzierbar teratogen, ähnlich zum von Thalidomid ausgelösten Phänotyp. FR259625 wurde kovalent an Partikel angebunden und mit Extrakten humaner HeLa-Zellen inkubiert. Nach umfangreichem Waschen wurden gebundene Proteine mit unmodifiziertem Thalidomid eluiert und mithilfe von SDS-Gelelektrophorese und nachfolgender Silberfärbung analysiert. Zwei Proteine wurden spezifisch eluiert. Bei Zugabe von Thalidomid vor Inkubation mit den Partikeln wurde die gebundene Menge dieser Proteine reduziert, sodass die Wechselwirkung mit Thalidomid spezifisch ist. Tryptischer Verdau und massenspektrometrische Analyse zweier Banden bei 127 und 55 kDa identifizierten CRBN und DDB1 (damaged DNA binding protein 1). Die Proteine wurden weiterhin durch Immunoblotting identifiziert.

Rekombinantes FLAG-CRBN, aber nicht (His)₆-DDB1, band an mit Thalidomid beladene Partikel. Allerdings banden beide Proteine, wenn sie zusammen mit den Partikeln inkubiert wurden, sodass DDB1 durch Wechselwirkung mit

CRBN binden muss. Eine mögliche Bedeutung von CRBN für die Teratogenität von Thalidomid wurde in Tiermodellen untersucht. Thalidomid ist in Kaninchen und Hühnern teratogen, aber nicht in Mäusen und Ratten. Zebrafisch ist ein vorteilhafter Modellorganismus, da die embryonale Entwicklung schnell ist, der Embryo durchsichtig und die Deletion von Genen gut möglich ist. Um den Einfluss von Thalidomid auf die Entwicklung von Zebrafischen zu untersuchen, wurden Embryos 2 h nach Befruchtung mit unterschiedlichen Konzentrationen an Thalidomid transferiert und die Entwicklung während drei Tage verfolgt. In den mit Thalidomid behandelten Embryos war die Entwicklung von Finnen und otischen Vesikeln gestört, während im Vergleich zu einer Kontrolle die sonstige Entwicklung normal verlief. Der Phänotyp konnte durch Injektion zugehöriger zCRBN-mRNA teilweise restoriert werden (rescue-Experiment). Bei diesen Experimenten muss berücksichtigt werden, dass Thalidomid *in vitro* und *in vivo* schnell zu mehr als einem Dutzend Produkte hydrolysiert und metabolisiert wird. Diese Produkte können dieselben oder andere Zielproteine als Thalidomid haben, die Befunde legen aber nahe, dass Thalidomid seine teratogene Wirkung durch Bindung an CRBN und Inhibition seiner Ubiquitinligase-Aktivität entfaltet. Da Thalidomid für die Behandlung von Lepra und des multiplen Myeloms eingesetzt wird, kann die Identifizierung seines direkten Zielproteins das rationale Design von effizienteren Thalidomidanaloga ohne teratogene Wirkung ermöglichen.

6. Zusammenfassung, Ausblick und Vorschlag eines Arbeitsablaufs

Die Identifizierung und Validierung der Zielproteine bioaktiver Substanzen ist ein kritischer, oft entscheidender Schritt in der akademischen Forschung und der pharmazeutischen Anwendung. Zum Einsatz bioaktiver Moleküle in der chemisch-biologischen Forschung zum Stören und zur Analyse biologischer Systeme müssen ihre Zielproteine bekannt sein, um zu validen Schlussfolgerungen und Erkenntnissen zu gelangen.

Die in diesem Aufsatz vorgestellten Methoden und Beispiele belegen, dass die Identifizierung zellulärer Zielproteine im Prinzip möglich ist, und die Anzahl erfolgreicher Beispiele wächst stetig. Dieser Fortschritt wurde durch die Entwicklung und Zugänglichkeit mehrerer neuer unterschiedlich anwendbarer Techniken möglich. Zu Beginn eines Targetidentifikationsprojektes ist oft unklar, welche Technologie am besten eingesetzt werden sollte, und die Entscheidung, welche Methode schließlich verwendet wird, wird oft durch Ausprobieren oder die wissenschaftliche Expertise oder infrastrukturelle Ausstattung der jeweiligen Arbeitsgruppe bestimmt. Eine Übersicht über die in letzter Zeit berichteten erfolgreichen Beispiele zeigt, dass gegenwärtig die Anwendung der Affinitätsisolierung unter Verwendung niedermolekularer Sondenmoleküle („Pull-down“) und nachfolgende massenspektrometrische Analyse der isolierten Proteine die leistungsfähigste und meistverwendete Technologie für die Targetidentifizierung ist. Diese führende Position ist zum großen Teil auf die rasche Entwicklung besserer massen-

spektrometrischer Techniken und die Verfügbarkeit zunehmend leistungsfähigerer Massenspektrometer und Analysesoftware zurückzuführen.^[206] Analog hat eine Palette zellbiologischer und biophysikalischer Methoden neue Möglichkeiten für die Targetbestätigung eröffnet. Von besonderer Bedeutung sind dabei fortgeschrittene Mikroskopietechniken unter Verwendung von FRET-Paaren und zeitaufgelösten Messungen (Messungen der Fluoreszenzlebensdauer, FLIM), Messung der Fluoreszenzanisotropie, Fortschritte in der isothermalen Kalorimetrie, Bestimmung der Proteinschmelztemperatur sowie Oberflächenplasmonenresonanz-Techniken, die Verwendung von RNAi und Überexprimierung der Zielproteine. Es ist zu erwarten, dass weitere Fortschritte bei diesen experimentellen Methoden und natürlich die Entwicklung neuer Techniken das Methodenrepertoire für die Targetidentifizierung und -bestätigung weiter bereichern werden. Wir erwarten, dass dabei ein wichtiger Schwerpunkt auf der Entwicklung quantitativer und markierungsfreier Methoden liegen wird. Beachtenswerte neue Beispiele sind die Etablierung quantitativer massenspektrometrischer Methoden, die den Vergleich von Signalintensitäten für einzelne Peptide zur Targetidentifizierung nutzen,^[88,89] die Einführung der miniaturisierten Thermophorese (potentiell markierungsfrei)^[183b] und der DARTS-Ansatz^[98] für die Targetbestätigung.

Unabhängig von den bereits gemachten und noch zu erwartenden Fortschritten wird die Identifizierung und Bestätigung von Zielproteinen auf absehbare Zeit aber ein schwieriges, arbeitsintensives und zeitaufwendiges Unterfangen bleiben. So können die zu identifizierenden Proteine z. B. nur niedrig exprimiert, membrangebunden oder nur in der Zelle stabil sein, sodass sie unter den Bedingungen einer typischen Proteomanalyse entfallen. Zur Bewältigung dieser Herausforderungen ist momentan keine zuverlässige Methodik verfügbar. Die Affinitätsisolierung führte meist auch zur Identifizierung ganzer Proteinkomplexe, sodass nachfolgend mehrere Proteine mithilfe biophysikalischer, zellbiologischer und genetischer Methoden validiert oder devalidiert werden müssen, um die funktionalen Zielproteine zu identifizieren.

Insbesondere ist die momentan verfügbare Methodik nicht darauf ausgerichtet, andere Biomoleküle, wie DNA, regulatorische RNAs, Kohlenhydrate oder Lipide, als Targets zu identifizieren. In diesem Zusammenhang ist die Identifizierung von β -Hydroxysterolen als Target von Theonellamid F ein besonders anschauliches Beispiel.^[190b]

Zweifelloos ist die Entwicklung neuer leistungsfähiger Technologien und insbesondere zuverlässiger, breit anwendbarer generischer Vorgehensweisen von großem Interesse. Für den Chemiker, Biologen oder chemischen Biologen ohne einschlägige Erfahrung oder Kenntnis des Gebietes, der aber über eine in einem relevanten Screen aktive und potente Substanz verfügt, sind fehlende generische Vorgehensweisen und Arbeitsanweisungen für die Identifizierung und Validierung von Zielproteinen oft entscheidende Hürden.

Um einen raschen Zugang zu diesem Forschungsgebiet zu ermöglichen und Anhaltspunkte für eine erste Vorgehensweise zu liefern, skizzieren wir einen auf unserer eigenen Erfahrung beruhenden Arbeitsablauf, dem wir in unseren

eigenen entsprechenden Forschungsprojekten typischerweise folgen (Abbildung 25). Dieser Ablauf erhebt nicht den Anspruch, allgemeingültig zu sein, sondern stellt einen von mehreren möglichen experimentellen Ansätzen dar. Unsere Vorgehensweise kränzt sich um die chemische Proteomik, d.h. die Affinitätsisolierung von Zielproteinen als zentralen Schritt zur Erzeugung von Hypothesen für potentielle Targets. Alternativ haben wir die Technik des Phagen-Displays erprobt, waren damit aber weniger erfolgreich. Zurzeit erkunden wir die Anwendung der Haploinsuffizienz-Profilierung in Hefe.

Für die Identifizierung neuer bioaktiver Substanzen mit potentiell neuer Wirkungsweise und ihrer Zielproteine ist eine Substanzbibliothek für das Screening nötig. Als erster Schritt muss also eine Substanzbibliothek entworfen und zusammengestellt werden. Hierfür sind unterschiedliche Ansätze etabliert (siehe Lit. [5] und darin angegebene Literatur). Unsere in-house-Bibliothek umfasst ca. 150 000 Substanzen, die nach den Prinzipien und Kriterien der Biologie-orientierten Synthese^[5] sowie nach Diversität,^[207] Wirkstoffartigkeit,^[208] Abbildung bekannter Wirkstoffklassen und -targets und Vorkommen in der Natur (Naturstoffe) hergestellt und erworben wurden. Beim Design und der Synthese der Bibliothek ist der Beitrag der Chemie naturgemäß am größten und am wichtigsten. Biologische Argumente sind bei der Auswahl und der Etablierung zellulärer oder In-vivo-Screens am stärksten und am wichtigsten. Solche Screens sollten so aussagekräftig wie möglich sein, und die beobachteten und

erwarteten Phänotypen sollten im Idealfall eine direkte Verbindung zu Literaturbefunden und bekannten biologischen Phänomenen ermöglichen, um die Anzahl der in Frage kommenden potentiellen Zellproteine für die nachfolgende Identifizierung einzuschränken. Wir betonen, dass die Entwicklung und Umsetzung eines Mittel- oder Hochdurchsatz-Screens eine große zeitaufwendige Herausforderung sein kann, die in der biologischen Forschung sehr oft unterschätzt wird.

Aus den Strukturen identifizierter Treffer wird eine Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) für aktive Substanzklassen abgeleitet, die dann Anlass für weitere Runden aus Synthese und biologischer Evaluierung fokussierter Substanzbibliotheken geben kann. Die sich ergebende, ausgedehntere SAR liefert dann Anknüpfungspunkte für Ankergruppen in aktiven Substanzen (d.h. ohne Verlust oder mit akzeptabler Reduktion der Bioaktivität im Screen) und für das Design einer inaktiven Kontrollsonde. Wir betonen, dass eine wirklich inaktive Sonde oft für zelluläre Screens nur schwer zu finden sein kann. Zwar mag die Aktivität der ausgewählten Sonde zu gering sein, um einen gesuchten Phänotyp zu induzieren, die Sonde kann aber durchaus mit niedrigerer Affinität an das Zielprotein binden und so irreführenderweise eine unspezifische Wechselwirkung zwischen aktiver Substanz und möglichen Zielproteinen nahelegen. Dies kann z.B. für Enantiomerenpaare der Fall sein, für die angenommen, aber möglicherweise nicht separat bewiesen

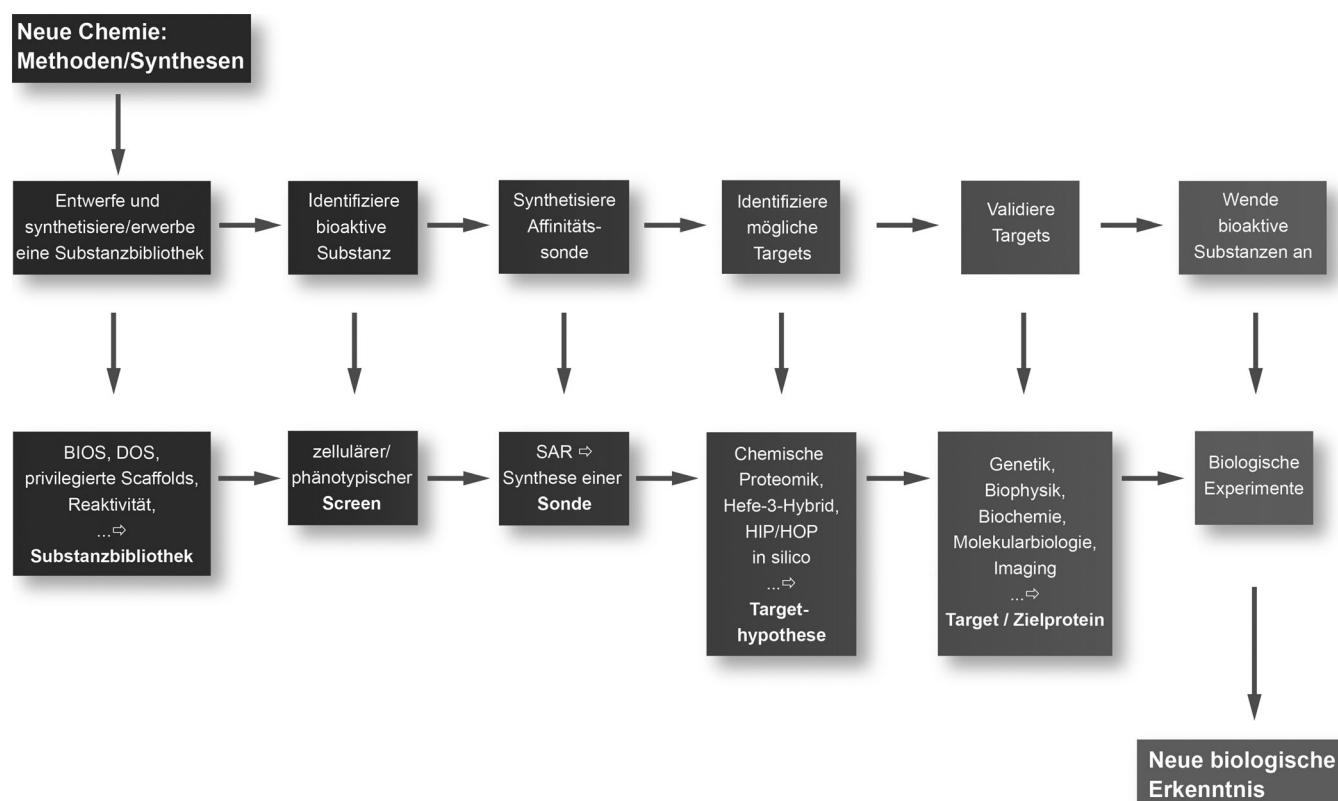


Abbildung 25. Ablauf für das Design und die Synthese von Substanzbibliotheken, Screening für biologisch aktive Substanzen und Zielmolekül-Identifizierung und -Bestätigung.

wird, dass das Enantiomer einer bioaktiven Substanz inaktiv ist.

Die aktive und die inaktive Sonde werden dann unabhängig voneinander zur Isolierung und Identifizierung möglicher Zielproteine eingesetzt. Wie oben erwähnt, setzen wir hierfür normalerweise die chemische Proteomik und damit die massenspektrometrische Identifizierung potentieller Zielproteine ein. Dafür werden die Sonden typischerweise mit einer Affinitätsgruppe versehen, insbesondere unter Verwendung des Biotin/Streptavidin-Paars, oder sie werden kovalent durch Ausbildung eines Amids an Harzpartikel angebunden. Bei Verwendung von Zelllysaten anstelle von ganzen lebenden Zellen kann der Fall eintreten, dass das Zielprotein nur schwach detektiert wird, weil es beim Zellaufschluss zerstört wird. Alternativ können Phage-Display-Techniken verwendet werden, und auch Hefe-Drei-Hybrid-Techniken^[151] und Haploinsuffizienz-Profilierung in Hefe^[133] sind sehr valide und leistungsfähige Methoden in diesem Schritt. Bei der chemischen Proteomik binden die Zielproteine im Idealfall nur an die aktive Sonde, aber nicht an das inaktive Analogon, und entweder bei der Affinitätsisolierung oder beim nachfolgenden Ablösen von der Affinitätsmatrix sollten Konkurrenzexperimente möglich sein. Potentielle Targets und erfolgreiche Konkurrenz können auch ohne massenspektrometrische Untersuchung direkt durch Vergleich von Gelen beobachtet werden, die aus den isolierten Proteingemischen erzeugt wurden. Wenn eine Bande also bei einem Experiment mit der aktiven Sonde, aber nicht mit der inaktiven Kontrollsonde identifiziert werden kann, und wenn sie bei Konkurrenz mit nicht-modifizierter Substanz nicht oder nur geringer nachgewiesen werden kann, repräsentiert sie wahrscheinlich ein valides Zielprotein.

Die Targetidentifizierung mit chemischer Proteomik liefert in der Regel eine Liste mit Proteinen, die validiert oder devalidiert werden müssen. Zur Bestätigung kommen verschiedene Methoden der Biochemie (Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern, Enzymassays), der Genetik (RNAi-Experimente, Induktion des gleichen oder eines ähnlichen Phänotyps; höhere oder niedrigere Sensitivität gegenüber der in Frage stehenden Substanz nach Supprimierung (Knockdown) oder Überexpression) sowie biophysikalische Methoden zum Einsatz, mit denen eine direkte

Wechselwirkung zwischen der aktiven (nicht aber der inaktiven) Substanz und dem Zielprotein nachgewiesen werden kann (z. B. Assays basierend auf Messungen der Fluoreszenzpolarisation, der Thermophorese und der Oberflächenplasmonresonanz, ELISA-Assays und isotherme Titrationskalorimetrie).

Die direkte Beobachtung der Wechselwirkung zwischen einer Sonde und dem Zielprotein in Zellen z. B. mithilfe von FRET-Paaren und Messung der Fluoreszenzlebensdauer (FLIM) hat besondere Aussagekraft.

Schließlich sollten funktionale Assays durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass die fragliche Substanz die biologischen Funktionen des möglichen Zielproteins moduliert. Um in solchen funktionalen Assays zuverlässige Resultate zu erhalten, kann es notwendig sein, die Selektivität der bioaktiven Substanz für das mögliche Zielprotein zu bestimmen, z. B. selektive Inhibition eines oder bestimmter Enzyme einer größeren Klasse. Nach erfolgreicher Identifizierung des Zielproteins können Wirksamkeit und Selektivität der Treffersubstanz insbesondere unter Einbeziehung der Strukturbiologie verbessert werden.

Bei der Identifizierung und Validierung möglicher Zielproteine können die geschilderten experimentellen Methoden vorteilhaft durch In-silico-Untersuchungen ergänzt werden, z. B. durch Untersuchungen der chemischen Ähnlichkeit zwischen identifizierten Trefferverbindungen und ähnlichen Substanzen, für die bereits Zielproteine bekannt sind.

Diesem Arbeitsablauf folgend haben wir erfolgreich Ligand-Protein-Paare aus verschiedenen Bereichen der Biologie identifiziert. Wie oben erwähnt, ist diese Vorgehensweise nicht generisch, sondern höchstens prototypisch. Sie kann unter Umständen von wiederholten Rückschlägen belastet sein, die zusätzliche und alternative Experimente erfordern. In jedem Fall aber liefert sie Anhaltspunkte, wenn man sich diesem Gebiet nähern will und für erste Untersuchungen. Wir hoffen, dass sie sich in vielen Fällen als gültig erweisen wird.

7. Appendix: Tabelle 1

Tabelle 1: Beispiele für bioaktive Substanzen und deren zelluläre Zielproteine.

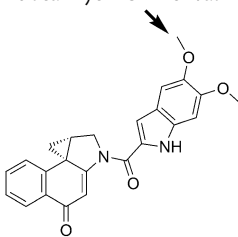
Nr.	Substanz	Ansatz zur Identifizierung der Zielproteine	Zielprotein(e)	Lit.
1	Duocarmycin SA-Derivat 	Chemische Proteomik Trifunktionale Biotin-Rhodamin-Sonde	ADH1	[28]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

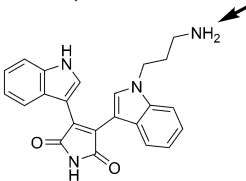
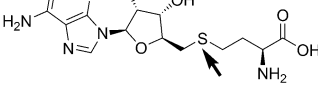
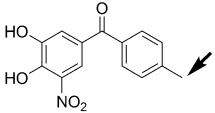
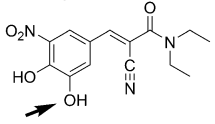
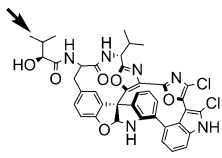
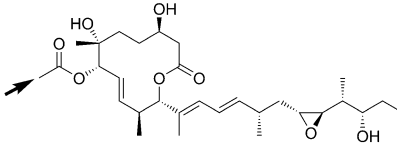
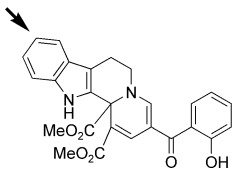
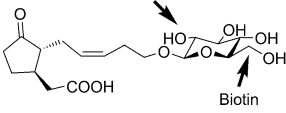
Nr.	Substanz	Ansatz zur Identifizierung der Zielproteine	Zielprotein(e)	Lit.
2	Bisindolylmaleimid III 	Chemische Proteomik FLAG-modifizierte Sonde	PKC α , GSK3 β , CaMKII Δ , γ , Adenosinkinase, CDK2, NQO2 PKAC- α , Prohibitin, VDAC	[36]
3	S-Adenosyl-L-Homocystein 	Chemische Proteomik CCMS ^[a]	Methyltransferasen	[42d,c]
4	Tolcapon  Entacapon 	Chemische Proteomik CCMS ^[a] (Caprotec) Linkerkupplung an verschiedene Positionen	COMT, Mitochondriale Proteine, die an Tolcapon binden	[43]
5	Diazonamid A 	Chemische Proteomik Vorfraktionierung	Ornithin- δ - Aminotransferase (OAT)	[46]
6	Pladienolid B 	Chemische Proteomik Vorfraktionierung	SAP130 (SfB3-Komplex)	[48]
7	Centrocountin 	Chemische Proteomik	NPM, Crm1	[17]
8	Jasmonat-Glukoside Benzophenon  Biotin	Chemische Proteomik	Membranprotein	[54]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

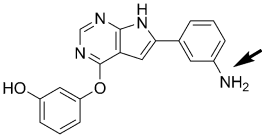
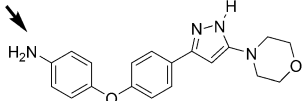
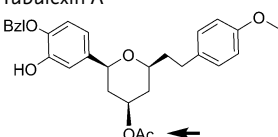
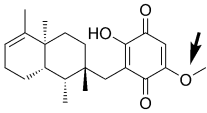
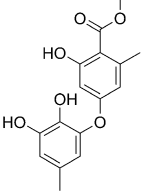
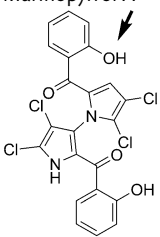
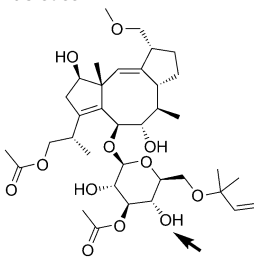
Nr.	Substanz	Ansatz zur Identifizierung der Zielproteine	Zielprotein(e)	Lit.
9	TWS119 	Chemische Proteomik	GSK3 β	[55]
10	4-[5-(4-Phenoxyphenyl)-2H-pyrazol-3-yl]-morpholin 	Chemische Proteomik	Adenosinkinase (TbrAK)	[56]
11	Tubulexin A 	Chemische Proteomik SILAC ^[b]	CSE1 L, Tubulin	[62]
12	Bolinaquinon 	Serielle Affinitätschromatographie	Clathrin	[52]
13	Methyl-Gerfelin 	Chemische Proteomik Immobilisierung durch Quervernetzung	Glyoxalase 1 (GLO1)	[66]
14	Marinopyrrol A 	Chemische Proteomik Acyl-Fluorophor-Transfer	Aktin	[68b]
15	Fusicoccin A 	Chemische Proteomik Tosylübertragung	14-3-3	[69]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

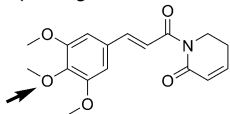
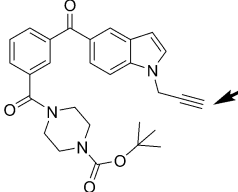
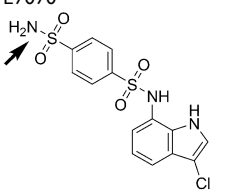
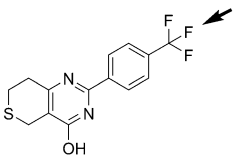
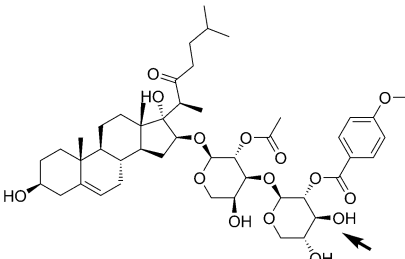
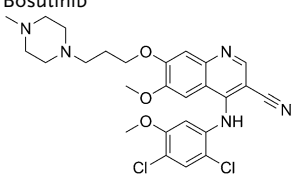
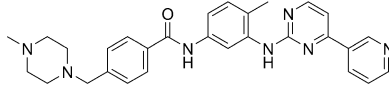
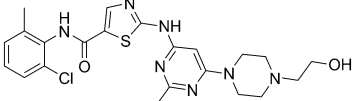
Nr.	Substanz	Ansatz zur Identifizierung der Zielproteine	Zielprotein(e)	Lit.
16	Piperlongumin 	Chemische Proteomik SILAC ^[b]	GSTP1	[75]
17		Chemische Proteomik SILAC ^[b] Funktionalisierte (tagged) Bibliothek	Epoxidhydrolase-1 MT-ND1	[76]
18	E7070 	2D-DIGE ^[c] ICAT ^[d]	MDH	[83]
19	XAV939 	Chemische Proteomik iTRAQ ^[e]	Tankyrase 1, 2	[85]
20	OSW-1 	Chemische Proteomik iTRAQ ^[e]	OSBP, ORP4L	[15a]
21	Bosutinib  Imatinib  Dasatinib 	Chemische Proteomik Kinobeads, iTRAQ ^[e]	Verschiedene Kinasen	[86]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

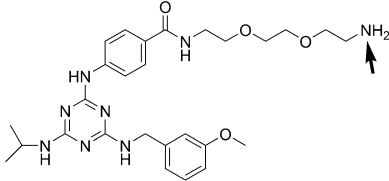
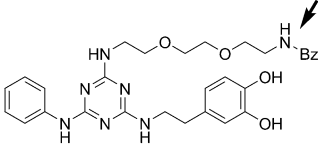
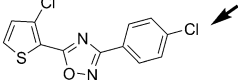
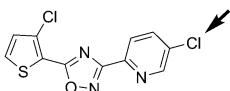
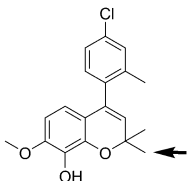
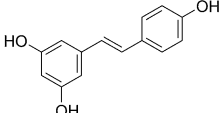
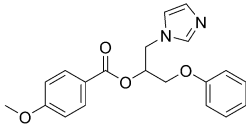
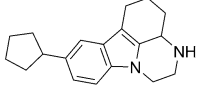
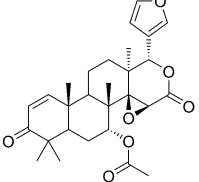
Nr.	Substanz	Ansatz zur Identifizierung der Zielproteine	Zielprotein(e)	Lit.
22		Chemische Proteomik Funktionalisierte (tagged) Bibliothek	S5-, S13- und S18-Proteine der ribosomalen 40S-Untereinheit	[51c]
23	GAPDS 	Chemische Proteomik Funktionalisierte (tagged) Bibliothek	GAPDH	[94]
24	MX-74420  MX-126374 	2DE ^[f] ³ H-Markierung	TIP47	[96]
25		FITGE ^[g] Zelllysate vs. lebende Zellen	Tubulin	[45]
26	Resveratrol 	DARTS ^[h]	eIF4A	[98]
27	4513-0042 	TICC ^[i]	Erg6p	[102]
28	Pir1 	Biochemische Suppression	Cdc42/RhoGDI	[103]
29	Gedunin 	Vergleichende Analyse Konnektivitätskarte	HSP90	[112]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

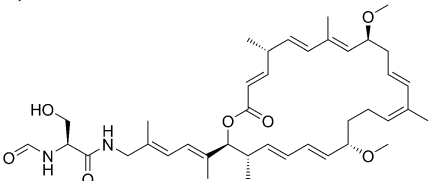
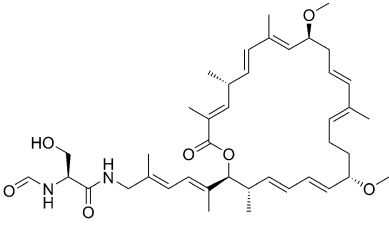
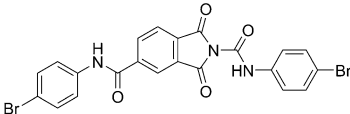
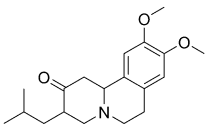
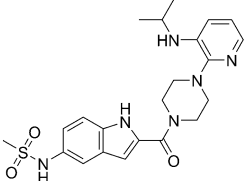
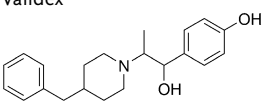
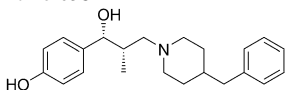
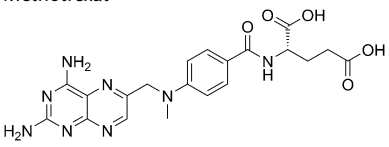
Nr.	Substanz	Ansatz zur Identifizierung der Zielproteine	Zielprotein(e)	Lit.
30	lejimalid A  lejimalid B 	Vergleichende Analyse 2D-DIGE ^[c]	V-ATPase	[117]
31	SMIR4 	Protein-Mikroarray	Ybr077cp	[123b]
32		in silico	α_2 -adrenerger Rezeptor	[125]
33	Rescriptor 	in silico	Histamin-H ₄ -Rezeptor	[125]
34	Validex 	in silico	μ -Opioidrezeptor 5-HTT; Serotonin-Transporter	[125]
35	Ro-25-6981 	in silico	5-HTT; Serotonin-Transporter NET, Noradrenalin-Transporter κ -Opioidrezeptor	[125]
36	Methotrexat 	HIP/HOP ^[j]	DFR1, FOL1, FOL2	[134]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

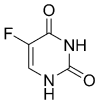
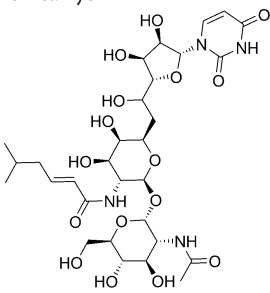
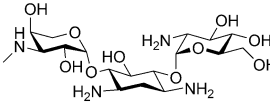
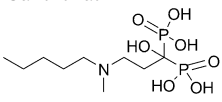

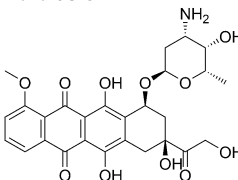
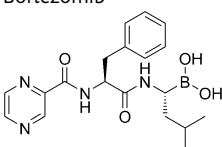
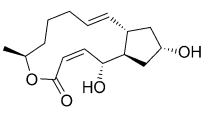
Nr.	Substanz	Ansatz zur Identifizierung der Zielproteine	Zielprotein(e)	Lit.
37	5-Fluorouracil 	HIP/HOP ^[i]	CDC21, RRP6, RRP41, RRP44, RRP46, NOP4, MAK21, SSF1, YPR143W	[135]
38	Tunicamycin 	HIP/HOP ^[i]	ALG7p, HAC1, GFA1	[135]
39	Gentamicin 	HIP/HOP ^[i]	CAX4, GCS1, MNN9, SAC1, PEP3, PEP5, VPS15, VPS16, VPS33, VPS34	[136]
40	Ibandronat 	HIP/HOP ^[i]	TBCB, ASK/BDF4	[137]
41	Cisplatin 	HIP/HOP ^[i]	FCY2, NMD2, NOT3, SKY1	[138]
42	Doxorubicin 	HIP/HOP ^[i]	SIZ1	[139]
43	Bortezomib 	HIP ^[i] <i>S. pombe</i>	POF3, CHP1, SEC28, SNZ1, REX3, PKA1/GIT6	[142]
44	Brefeldin A 	HIP ^[i] <i>C. albicans</i>	Sec7p	[143]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

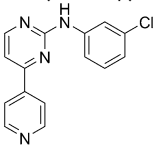
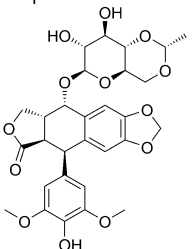
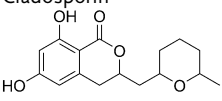
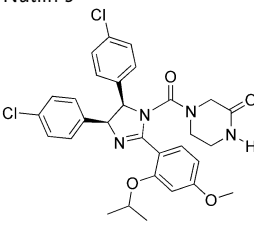
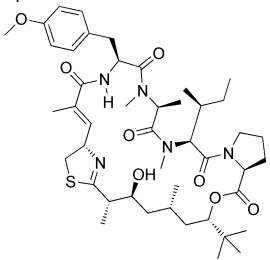
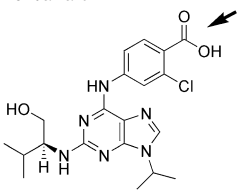
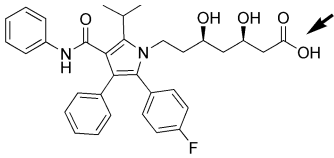
Nr.	Substanz	Ansatz zur Identifizierung der Zielproteine	Zielprotein(e)	Lit.
45	Phenylaminopyrimidin 	MSP ^[k]	PKC1, CLG1, KSS1	[144]
46	Etoposid 	MSP ^[k] <i>S. pombe</i>	RHP51, RAD22	[146]
47	Cladosporin 	HIP ^[j]	Lysyl-tRNA-Synthase	[148]
48	Nutlin-3 	shRNA-Screen	TP53, 53BP1	[154]
49	Apratoxin A 	Überexpression in Säugerzellen	FGFR1	[159]
50	Purvalanol 	Hefe-Drei-Hybrid-System	Kinasen	[164]
51	Atorvastatin 	Hefe-Drei-Hybrid-System	PDE6D	[151]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

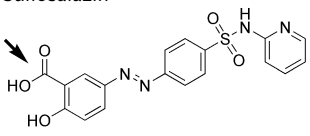
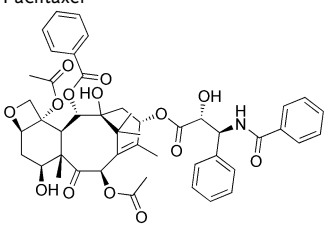
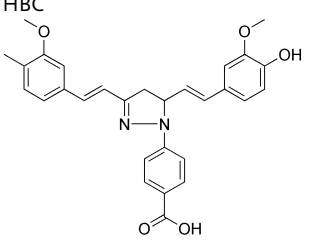
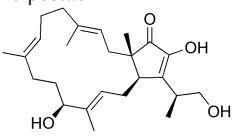
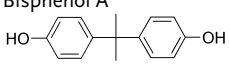
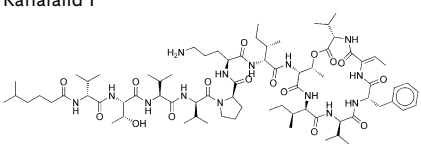
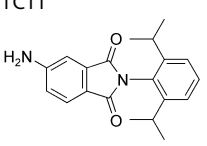
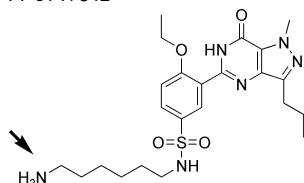
Nr.	Substanz	Ansatz zur Identifizierung der Zielproteine	Zielprotein(e)	Lit.
52	Sulfosalazin 	Hefe-Drei-Hybrid-System	SPR	[151]
53	Paclitaxel 	Phagen-Display	Bcl-2, NSC-1, NFX1	[170]
54	HBC 	Phagen-Display	Ca ²⁺ /Calmodulin	[171]
55	Terpestacin 	Phagen-Display	UQCRB	[172]
56	Bisphenol A 	Phagen-Display	TACC3	[173]
57	Kahalalid F 	Phagen-Display	RPS25	[174]
58	TC11 	mRNA-Display	NPM	[179]

Tabelle 1: (Fortsetzung)

Nr.	Substanz	Ansatz zur Identifizierung der Zielproteine	Zielprotein(e)	Lit.
59	PF-3717842	Chemische Proteomik	PDEs PEBP1	[184]



[a] CCMS: capture compound mass spectrometry. [b] SILAC: stable isotope labeling by amino acids in cell culture. [c] 2D DIGE: two-dimensional difference gel electrophoresis. [d] ICAT: isotope-coded affinity tags. [e] iTRAQ: isobaric tags for relative and absolute quantification. [f] 2DE: two-dimensional gel electrophoresis. [g] FITGE: fluorescence difference approach in two-dimensional gel electrophoresis. [h] DARTS: drug affinity responsive target stability. [i] TICC: target identification by chromatographic co-elution. [j] HIP/HOP: haploinsufficient profiling/ homozygous deletion profiling. [k] MSP: multicopy suppression profiling. Der Pfeil markiert die Modifizierungsstelle.

Danksagung

Wir danken den aktuellen und früheren Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, die an der Identifizierung und Validierung der Zielproteine bioaktiver Substanzen geforscht haben. Ihre Namen erscheinen auf den in diesem Aufsatz zitierten Veröffentlichungen unserer Gruppe. Sie haben erfolgreich die Herausforderungen dieser interdisziplinären Projekte gemeistert und die Methoden und unterschiedlichen Kulturen der Chemie und Biologie vereint. Wir danken auch unseren Kollaborationspartnern in den verschiedenen Projekten. Ihre Namen erscheinen als Autoren in unseren gemeinsamen Veröffentlichungen. Ohne ihre kontinuierliche Unterstützung und Hilfe und die vertrauensvolle Zusammenarbeit hätten viele Projekte nicht erfolgreich durchgeführt werden können. Unsere Arbeit wurde von der Max-Planck-Gesellschaft, der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Bundesministerium für Bildung und Forschung, der Alexander von Humboldt-Stiftung, der Volkswagen-Stiftung, der Europäischen Union (Förderung durch das European Research Council im Rahmen des siebten Rahmenprogramms der Europäischen Union (FP7/2007-2013/ERC Grant agreement No. 268309) und dem Land Nordrhein-Westfalen unterstützt.

Eingegangen am 31. Oktober 2012

Online veröffentlicht am 18. Februar 2013

- [1] D. R. Spring, *Chem. Soc. Rev.* **2005**, 34, 472–482.
- [2] I. Gashaw, P. Ellinghaus, A. Sommer, K. Asadullah, *Drug Discovery Today* **2011**, 16, 1037–1043.
- [3] M. Clamp, B. Fry, M. Kamal, X. Xie, J. Cuff, M. F. Lin, M. Kellis, K. Lindblad-Toh, E. S. Lander, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 19428–19433.
- [4] a) D. C. Swinney, J. Anthony, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, 10, 507–519; b) J. Kotz, *J. SciBX* **2012**, 5, 15.
- [5] a) R. S. Bon, H. Waldmann, *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43, 1103–1114; b) K. Kumar, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 3272–3290; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 3224–3242; c) S. Wetzel, R. S. Bon, K. Kumar, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2011**, 123, 10990–11018; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 10800–10826; d) M. Kaiser, S. Wetzel, K. Kumar, H. Waldmann, *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 1186–1201.
- [6] S. J. Dixon, B. R. Stockwell, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, 13, 549–555.
- [7] E. Lounkine, M. J. Keiser, S. Whitebread, D. Mikhailov, J. Hamon, J. L. Jenkins, P. Lavan, E. Weber, A. K. Doak, S. Cote, B. K. Shoichet, L. Urban, *Nature* **2012**, 486, 361–367.
- [8] A. L. Hopkins, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 682–690.
- [9] D. A. Chan, A. J. Giaccia, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, 10, 351–364.
- [10] J. Mestres, E. Gregori-Puigjane, S. Valverde, R. V. Sole, *Mol. Biosyst.* **2009**, 5, 1051–1057.
- [11] a) G. C. Terstappen, C. Schluepen, R. Raggiaschi, G. Gaviraghi, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, 6, 891–903; b) G. P. Tochtrop, R. W. King, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2004**, 7, 677–688; c) S.-i. Sato, A. Murata, T. Shirakawa, M. Uesugi, *Chem. Biol.* **2010**, 17, 616–623; d) R. K. Das, A. Samanta, K. Ghosh, D. Zhai, W. Xu, D. Su, C. Leong, C. Young-Tae, *IBC* **2011**, 3, 3; e) A. M. Piggott, P. Karuso, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2004**, 7, 607–630; f) B. J. Leslie, P. J. Hergenrother, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1347–1360.
- [12] a) B. Lomenick, R. W. Olsen, J. Huang, *ACS Chem. Biol.* **2011**, 6, 34–46; b) F. Cong, A. K. Cheung, S. M. Huang, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2012**, 52, 57–78; c) T. Roemer, J. Davies, G. Giaever, C. Nislow, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 46–56.
- [13] P. F. Liu, D. Kihara, C. Park, *J. Mol. Biol.* **2011**, 408, 147–162.
- [14] A. Scholten, M. K. Poh, T. A. B. van Veen, B. van Breukelen, M. A. Vos, A. J. R. Heck, *J. Proteome Res.* **2006**, 5, 1435–1447.
- [15] a) A. W. G. Burgett, T. B. Poulsen, K. Wangkanont, D. R. Anderson, C. Kikuchi, K. Shimada, S. Okubo, K. C. Fortner, Y. Mimaki, M. Kuroda, J. P. Murphy, D. J. Schwalb, E. C. Petrella, I. Cornella-Taracido, M. Schirle, J. A. Tallarico, M. D. Shair, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 639–647; b) N. S. Hegde, D. A. Sanders, R. Rodriguez, S. Balasubramanian, *Nat. Chem.* **2011**, 3, 829–829.
- [16] N. Kanoh, S. Kumashiro, S. Simizu, Y. Kondoh, S. Hatakeyama, H. Tashiro, H. Osada, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 5742–5745; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5584–5587.
- [17] H. Dücker, V. Pries, V. Khedkar, S. Menninger, H. Bruss, A. W. Bird, Z. Maliga, A. Brockmeyer, P. Janning, A. Hyman, S. Grimme, M. Schurmann, H. Preut, K. Hubel, S. Ziegler, K. Kumar, H. Waldmann, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 179–184.
- [18] a) S. Basu, B. Ellinger, S. Rizzo, C. Deraeve, M. Schurmann, H. Preut, H. D. Arndt, H. Waldmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 6805–6810; b) T. Knoth, K. Warburg, C. Katzka, A. Rai, A. Wolf, A. Brockmeyer, P. Janning, T. F. Reubold, S. Eschenburg, D. J. Manstein, K. Hubel, M. Kaiser, H. Wald-

- mann, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7376–7381; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7240–7245.
- [19] a) E. Weerapana, A. E. Speers, B. F. Cravatt, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1414–1425; b) A. E. Speers, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 10018–10019; c) S. Sato, Y. Kwon, S. Kamisuki, N. Srivastava, Q. Mao, Y. Kawazoe, M. Uesugi, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 873–880.
- [20] F. Gug, N. Oumata, D. Tribouillard-Tanvier, C. Voisset, N. Desban, S. Bach, M. Blondel, H. Galons, *Bioconjugate Chem.* **2010**, *21*, 279–288.
- [21] N. Shimizu, K. Sugimoto, J. Tang, T. Nishi, I. Sato, M. Hiramoto, S. Aizawa, M. Hatakeyama, R. Ohba, H. Hatori, T. Yoshikawa, F. Suzuki, A. Oomori, H. Tanaka, H. Kawaguchi, H. Watanabe, H. Handa, *Nat. Biotechnol.* **2000**, *18*, 877–881.
- [22] T. Shiyama, M. Furuya, A. Yamazaki, T. Terada, A. Tanaka, *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 2831–2841.
- [23] a) S. H. Verhelst, M. Fonovic, M. Bogoy, *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 1306–1308; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, *46*, 1284–1286; b) M. Fonovic, S. H. L. Verhelst, M. T. Sorum, M. Bogoy, *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1761–1770; c) Y. Y. Yang, M. Grammel, A. S. Raghavan, G. Charron, H. C. Hang, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 1212–1222; d) F. Landi, C. M. Johansson, D. J. Campopiano, A. N. Hulme, *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8*, 56–59.
- [24] K. D. Park, R. Liu, H. Kohn, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 763–772.
- [25] P. P. Geurink, B. I. Florea, N. Li, M. D. Witte, J. Verasdonck, C. L. Kuo, G. A. van der Marel, H. S. Overkleeft, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 6954–6957; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6802–6805.
- [26] P. van der Veken, E. H. Dirksen, E. Ruijter, R. C. Elgersma, A. J. Heck, D. T. Rijkers, M. Slijper, R. M. Liskamp, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2271–2280.
- [27] a) A. M. Piggott, P. Karuso, *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8241–8244; b) T. Koopmans, F. J. Dekker, N. I. Martin, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 2244–2246.
- [28] T. Wirth, K. Schmuck, L. F. Tietze, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 2928–2931; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 2874–2877.
- [29] A. T. Marttila, O. H. Laitinen, K. J. Aireenne, T. Kulik, E. A. Bayer, M. Wilchek, M. S. Kulomaa, *FEBS Lett.* **2000**, *467*, 31–36.
- [30] Y. Hiller, J. M. Gershoni, E. A. Bayer, M. Wilchek, *Biochem. J.* **1987**, *248*, 167–171.
- [31] N. M. Green, *Biochem. J.* **1963**, *89*, 585–591.
- [32] A. P. Frei, O. Y. Jeon, S. Kilcher, H. Moest, L. M. Henning, C. Jost, A. Pluckthun, J. Mercer, R. Aebersold, E. M. Carreira, B. Wollscheid, *Nat. Biotechnol.* **2012**, *30*, 997–1001.
- [33] a) P.-Y. Yang, K. Liu, M. H. Ngai, M. J. Lear, M. R. Wenk, S. Q. Yao, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 656–666; b) M. Rusch, T. J. Zimmermann, M. Burger, F. J. Dekker, K. Gormer, G. Triola, A. Brockmeyer, P. Janning, T. Böttcher, S. A. Sieber, I. R. Vetter, C. Hedberg, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10012–10016; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9838–9842; c) M. H. Kunzmann, I. Staub, T. Böttcher, S. A. Sieber, *Biochemistry* **2011**, *50*, 910–916; d) T. Böttcher, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 6964–6972; e) J. Eirich, R. Orth, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 12144–12153.
- [34] D. Kidd, Y. Liu, B. F. Cravatt, *Biochemistry* **2001**, *40*, 4005–4015.
- [35] A. Einhauser, A. Jungbauer, *J. Biochem. Biophys. Methods* **2001**, *49*, 455–465.
- [36] C. Saxena, E. Zhen, R. E. Higgs, J. E. Hale, *J. Proteome Res.* **2008**, *7*, 3490–3497.
- [37] J. Arnau, C. Lauritzen, G. E. Petersen, J. Pedersen, *Protein Expression Purif.* **2006**, *48*, 1–13.
- [38] a) C. C. Hughes, J. B. MacMillan, S. P. Gaudencio, W. Fenical, J. J. La Clair, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 742–746; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 728–732; b) C. Saxena, T. M. Bonacci, K. L. Huss, L. J. Bloem, R. E. Higgs, J. E. Hale, *J. Proteome Res.* **2009**, *8*, 3951–3957.
- [39] T. Böttcher, S. A. Sieber, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 14400–14401.
- [40] a) H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 2056–2075; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004–2021; b) J. E. Hein, V. V. Fokin, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1302–1315.
- [41] a) H. Köster, D. P. Little, P. Luan, R. Muller, S. M. Siddiqi, S. Marappan, P. Yip, *Assay Drug Dev. Technol.* **2007**, *5*, 381–390; b) T. Lenz, J. J. Fischer, M. Dreger, *J. Proteomics* **2011**, *75*, 100–115.
- [42] a) T. Lenz, P. Poot, E. Weinhold, M. Dreger, *Methods Mol. Biol.* **2012**, *803*, 97–125; b) T. Lenz, P. Poot, O. Grabner, M. Glinski, E. Weinhold, M. Dreger, H. Koster, *J. Visualized Exp.* **2010**, *46*, e2264; c) L. Wirsing, K. Naumann, T. Vogt, *Anal. Biochem.* **2011**, *408*, 220–225; d) C. Dalhoff, M. Hueben, T. Lenz, P. Poot, E. Nordhoff, H. Koester, E. Weinhold, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 256–265.
- [43] J. J. Fischer, S. Michaelis, A. K. Schrey, O. G. Graebner, M. Glinski, M. Dreger, F. Kroll, H. Koester, *Toxicol. Sci.* **2010**, *113*, 243–253.
- [44] S. Michaelis, A. Marais, A. K. Schrey, O. Y. Graebner, C. Schaudt, M. Sefkow, F. Kroll, M. Dreger, M. Glinski, H. Koester, R. Metternich, J. J. Fischer, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 3934–3944.
- [45] J. Park, S. Oh, S. B. Park, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 5543–5547; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 5447–5451.
- [46] G. Wang, L. Shang, A. W. Burgett, P. G. Harran, X. Wang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 2068–2073.
- [47] J. E. Wulff, R. Siegrist, A. G. Myers, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 14444–14451.
- [48] Y. Kotake, K. Sagane, T. Owa, Y. Mimori-Kiyosue, H. Shimizu, M. Uesugi, Y. Ishihama, M. Iwata, Y. Mizui, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 570–575.
- [49] L. Hu, A. Iliuk, J. Galan, M. Hans, W. A. Tao, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 4219–4222; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 4133–4136, S4133/4131–S4133/4113.
- [50] K. Yamamoto, A. Yamazaki, M. Takeuchi, A. Tanaka, *Anal. Biochem.* **2006**, *352*, 15–23.
- [51] a) D. Kaida, H. Motoyoshi, E. Tashiro, T. Nojima, M. Hagiwara, K. Ishigami, H. Watanabe, T. Kitahara, T. Yoshida, H. Nakajima, T. Tani, S. Horinouchi, M. Yoshida, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 576–583; b) W. Shi, X. Zhang, X. Jiang, H. Yuan, J. S. Lee, C. E. Barry III, H. Wang, W. Zhang, Y. Zhang, *Science* **2011**, *333*, 1630–1632; c) S. M. Khersonsky, D.-W. Jung, T.-W. Kang, D. P. Walsh, H.-S. Moon, H. Jo, E. M. Jacobson, V. Shetty, T. A. Neubert, Y.-T. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 11804–11805; d) P. Dadvar, M. O’Flaherty, A. Scholten, K. Rumpel, A. J. Heck, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 472–482.
- [52] L. Margarucci, M. C. Monti, B. Fontanella, R. Riccio, A. Casapullo, *Mol. Biosyst.* **2011**, *7*, 480–485.
- [53] a) Q. Zhang, M. B. Major, S. Takanashi, N. D. Camp, N. Nishiyama, E. C. Peters, M. H. Ginsberg, X. Jian, P. A. Randazzo, P. G. Schultz, R. T. Moon, S. Ding, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 7444–7448; b) C.-w. Chung, H. Coste, J. H. White, O. Mirguet, J. Wilde, R. L. Gosmini, C. Delves, S. M. Magny, R. Woodward, S. A. Hughes, E. V. Boursier, H. Flynn, A. M. Bouillot, P. Bamborough, J.-M. G. Brusq, F. J. Gellibert, E. J. Jones, A. M. Riou, P. Homes, S. L. Martin, I. J. Uings, J. Toun, C. A. Clement, A.-B. Boullay, R. L. Grimley, F. M. Blandel, R. K. Prinjha, K. Lee, J. Kirilovsky, E. Nicodeme, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 3827–3838; c) S. M. Wignall, N. S. Gray, Y.-T. Chang, L. Juarez, R. Jacob, A. Burlingame, P. G. Schultz, R. Heald, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 135–146; d) A. V. Statsuk, R. Bai, J. L. Baryza, V. A. Verma, E. Hamel, P. A. Wender, S. A. Kozmin, *Nat. Chem. Biol.* **2005**, *1*, 383–388; e) J. R. Snyder, A.

- Hall, L. Ni-Komatsu, S. M. Khersonsky, Y. T. Chang, S. J. Orlow, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 477–484.
- [54] Y. Nakamura, R. Miyatake, M. Ueda, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 7399–7402; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 7289–7292.
- [55] S. Ding, T. Y. H. Wu, A. Brinker, E. C. Peters, W. Hur, N. S. Gray, P. G. Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 7632–7637.
- [56] S. Kuettel, M. Mosimann, P. Maser, M. Kaiser, R. Brun, L. Scapozza, R. Perozzo, *PLoS Neglected Trop. Dis.* **2009**, *3*, e506.
- [57] a) T. Hirota, J. W. Lee, W. G. Lewis, E. E. Zhang, G. Breton, X. Z. Liu, M. Garcia, E. C. Peters, J. P. Etchegaray, D. Traver, P. G. Schultz, S. A. Kay, *Plos Biol.* **2010**, *8*, e1000559; b) T. Hirota, J. W. Lee, P. C. St John, M. Sawa, K. Iwaisako, T. Noguchi, P. Y. Pongsawakul, T. Sonntag, D. K. Welsh, D. A. Brenner, F. J. Doyle 3rd, P. G. Schultz, S. A. Kay, *Science* **2012**, *337*, 1094–1097; c) J. Lee, X. Wu, M. Pasca di Magliano, E. C. Peters, Y. Wang, J. Hong, M. Hebrok, S. Ding, C. Y. Cho, P. G. Schultz, *ChemBioChem* **2007**, *8*, 1916–1919.
- [58] I. Miller, J. Crawford, E. Gianazza, *Proteomics* **2006**, *6*, 5385–5408.
- [59] U. Rix, G. Superti-Furga, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 616–624.
- [60] L. Trinkle-Mulcahy, S. Boulon, Y. W. Lam, R. Urcia, F. M. Boisvert, F. Vandermoere, N. A. Morrice, S. Swift, U. Rothbauer, H. Leonhardt, A. Lamond, *J. Cell Biol.* **2008**, *183*, 223–239.
- [61] a) M. Beck, A. Schmidt, J. Malmstroem, M. Claassen, A. Ori, A. Szymborska, F. Herzog, O. Rinner, J. Ellenberg, R. Aebersold, *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 549; b) N. Nagaraj, J. R. Wisniewski, T. Geiger, J. Cox, M. Kircher, J. Kelso, S. Paabo, M. Mann, *Mol. Syst. Biol.* **2011**, *7*, 548.
- [62] T. Voigt, C. Gerding-Reimers, T. T. N. Tran, S. Bergmann, H. Lachance, B. Schölermann, A. Brockmeyer, P. Janning, S. Ziegler, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 428–432; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 410–414.
- [63] J. R. Wisniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, M. Mann, *Nat. Methods* **2009**, *6*, 359–362.
- [64] R. R. Falsey, M. T. Marron, G. M. Gunaherath, N. Shirahatti, D. Mahadevan, A. A. Gunatilaka, L. Whitesell, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 33–38.
- [65] N. Kanoh, T. Nakamura, K. Honda, H. Yamakoshi, Y. Iwabuchi, H. Osada, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 5692–5698.
- [66] M. Kawatani, H. Okumura, K. Honda, N. Kanoh, M. Muroi, N. Dohmae, M. Takami, M. Kitagawa, Y. Futamura, M. Imoto, H. Osada, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 11691–11696.
- [67] a) N. Watanabe, T. Sekine, M. Takagi, J. Iwasaki, N. Imamoto, H. Kawasaki, H. Osada, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 2344–2353; b) K. Hagiwara, T. Murakami, G. Xue, Y. Shimizu, E. Takeda, Y. Hashimoto, K. Honda, Y. Kondoh, H. Osada, Y. Tsunetsugu-Yokota, Y. Aida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, *403*, 40–45; c) N. Kanoh, A. Asami, M. Kawatani, K. Honda, S. Kumashiro, H. Takayama, S. Simizu, T. Amemiya, Y. Kondoh, S. Hatakeyama, K. Tsuganezawa, R. Utata, A. Tanaka, S. Yokoyama, H. Tashiro, H. Osada, *Chem. Asian J.* **2006**, *1*, 789–797.
- [68] a) S. Tsukiji, M. Miyagawa, Y. Takaoka, T. Tamura, I. Hamachi, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 341–343; b) C. C. Hughes, Y. L. Yang, W. T. Liu, P. C. Dorrestein, J. J. La Clair, W. Fenical, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 12094–12096.
- [69] M. Takahashi, A. Kawamura, N. Kato, T. Nishi, I. Hamachi, J. Ohkanda, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 524–527; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 509–512.
- [70] W. Yan, S. S. Chen, *Briefings Funct. Genomics Proteomics* **2005**, *4*, 27–38.
- [71] S. E. Ong, B. Blagoev, I. Kratchmarova, D. B. Kristensen, H. Steen, A. Pandey, M. Mann, *Mol. Cell. Proteomics* **2002**, *1*, 376–386.
- [72] S. E. Ong, I. Kratchmarova, M. Mann, *J. Proteome Res.* **2003**, *2*, 173–181.
- [73] S.-E. Ong, M. Schenone, A. A. Margolin, X. Li, K. Do, M. K. Doud, D. R. Mani, L. Kuai, X. Wang, J. L. Wood, N. J. Tolliday, A. N. Koehler, L. A. Marcaurelle, T. R. Golub, R. J. Gould, S. L. Schreiber, S. A. Carr, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 4617–4622.
- [74] P. L. Ross, Y. N. Huang, J. N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, S. Martin, M. Bartlett-Jones, F. He, A. Jacobson, D. J. Pappin, *Mol. Cell. Proteomics* **2004**, *3*, 1154–1169.
- [75] L. Raj, T. Ide, A. U. Gurkar, M. Foley, M. Schenone, X. Li, N. J. Tolliday, T. R. Golub, S. A. Carr, A. F. Shamji, A. M. Stern, A. Mandinova, S. L. Schreiber, S. W. Lee, *Nature* **2011**, *475*, 231–234.
- [76] J. S. Cisar, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10385–10388.
- [77] S. B. Breitkopf, F. S. Oppermann, G. Keri, M. Grammel, H. Daub, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 6033–6043.
- [78] a) F. S. Oppermann, F. Gnad, J. V. Olsen, R. Hornberger, Z. Greff, G. Keri, M. Mann, H. Daub, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 1751–1764; b) H. Daub, J. V. Olsen, M. Bairlein, F. Gnad, F. S. Oppermann, R. Korner, Z. Greff, G. Keri, O. Stemmann, M. Mann, *Mol. Cell* **2008**, *31*, 438–448.
- [79] T. A. Prokhorova, K. T. G. Rigbolt, P. T. Johansen, J. Henningsen, I. Kratchmarova, M. Kassem, B. Blagoev, *Mol. Cell. Proteomics* **2009**, *8*, 959–970.
- [80] M. Krüger, M. Moser, S. Ussar, I. Thievensen, C. A. Luber, F. Forner, S. Schmidt, S. Zanivan, R. Fassler, M. Mann, *Cell* **2008**, *134*, 353–364.
- [81] J. Krijgsveld, R. F. Ketting, T. Mahmoudi, J. Johansen, M. Artal-Sanz, C. P. Verrijzer, R. H. A. Plasterk, A. J. R. Heck, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 927–931.
- [82] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, *Nat. Biotechnol.* **1999**, *17*, 994–999.
- [83] Y. Oda, T. Owa, T. Sato, B. Boucher, S. Daniels, H. Yamanaka, Y. Shinohara, A. Yokoi, J. Kuromitsu, T. Nagasu, *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 2159–2165.
- [84] H. Zhang, W. Yan, R. Aebersold, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 66–75.
- [85] S. M. Huang, Y. M. Mishina, S. Liu, A. Cheung, F. Stegmeier, G. A. Michaud, O. Charlat, E. Wiellette, Y. Zhang, S. Wiessner, M. Hild, X. Shi, C. J. Wilson, C. Mickanin, V. Myer, A. Fazal, R. Tomlinson, F. Serluca, W. Shao, H. Cheng, M. Shultz, C. Rau, M. Schirle, J. Schlegl, S. Ghidelli, S. Fawell, C. Lu, D. Curtis, M. W. Kirschner, C. Lengauer, P. M. Finan, J. A. Tallarico, T. Bouwmeester, J. A. Porter, A. Bauer, F. Cong, *Nature* **2009**, *461*, 614–620.
- [86] M. Bantscheff, D. Eberhard, Y. Abraham, S. Bastuck, M. Boesche, S. Hobson, T. Mathieson, J. Perrin, M. Raida, C. Rau, V. Reader, G. Sweetman, A. Bauer, T. Bouwmeester, C. Hopf, U. Kruse, G. Neubauer, N. Ramsden, J. Rick, B. Kuster, G. Drewes, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 1035–1044.
- [87] a) N. Nagaraj, M. Mann, *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 637–645; b) C. A. Luber, J. Cox, H. Lauterbach, B. Fancke, M. Selbach, J. Tschoep, S. Akira, M. Wiegand, H. Hochrein, M. O’Keefe, M. Mann, *Immunity* **2010**, *32*, 279–289.
- [88] J. Cox, M. Mann, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 273–299.
- [89] M. Bantscheff, S. Lemeer, M. M. Savitski, B. Kuster, *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404*, 939–965.
- [90] D. Williams, D. W. Jung, S. M. Khersonsky, N. Heidary, Y. T. Chang, S. J. Orlow, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1251–1259.
- [91] M. Uttamchandani, D. P. Walsh, S. M. Khersonsky, X. Huang, S. Q. Yao, Y. T. Chang, *J. Comb. Chem.* **2004**, *6*, 862–868.
- [92] Lit. [15c].

- [93] D. W. Jung, D. Williams, S. M. Khersonsky, T. W. Kang, N. Heidary, Y. T. Chang, S. J. Orlow, *Mol. BioSyst.* **2005**, *1*, 85–92.
- [94] J. Min, Y. K. Kim, P. G. Cipriani, M. Kang, S. M. Khersonsky, D. P. Walsh, J.-Y. Lee, S. Niessen, J. R. Yates III, K. Gunsalus, F. Piano, Y.-T. Chang, *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 55–59.
- [95] T. Rabilloud, M. Chevallet, S. Luche, C. Lelong, *J. Proteomics* **2010**, *73*, 2064–2077.
- [96] K. A. Jessen, N. M. English, J. Yu Wang, S. Maliartchouk, S. P. Archer, L. Qiu, R. Brand, J. Kuemmerle, H. Z. Zhang, K. Gehlsen, J. Drewe, B. Tseng, S. X. Cai, S. Kasibhatla, *Mol. Cancer Ther.* **2005**, *4*, 761–771.
- [97] A. S. Essader, B. J. Cargile, J. L. Bundy, J. L. Stephenson, Jr., *Proteomics* **2005**, *5*, 24–34.
- [98] B. Lomenick, R. Hao, N. Jonai, R. M. Chin, M. Aghajan, S. Warburton, J. Wang, R. P. Wu, F. Gomez, J. A. Loo, J. A. Wohlschlegel, T. M. Vondriska, J. Pelletier, H. R. Herschman, J. Clardy, C. F. Clarke, J. Huang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 21984–21989.
- [99] C. Park, S. Marqusee, *Nat. Methods* **2005**, *2*, 207–212.
- [100] Y. Chang, J. P. Schlebach, R. A. Verheul, C. Park, *Protein Sci.* **2012**, *21*, 1280–1287.
- [101] G. M. West, C. L. Tucker, T. Xu, S. K. Park, X. Han, J. R. Yates 3rd, M. C. Fitzgerald, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 9078–9082.
- [102] J. N. Chan, D. Vuckovic, L. Sleno, J. B. Olsen, O. Pogoutse, P. Havugimana, J. A. Hewel, N. Bajaj, Y. Wang, M. F. Musteata, C. Nislow, A. Emili, *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11*, M111 016642.
- [103] J. R. Peterson, A. M. Lebensohn, H. E. Pelish, M. W. Kirschner, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 443–452.
- [104] S. V. Sharma, D. A. Haber, J. Settleman, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 241–253.
- [105] J. N. Weinstein, T. G. Myers, P. M. O'Connor, S. H. Friend, A. J. Fornace, Jr., K. W. Kohn, T. Fojo, S. E. Bates, L. V. Rubinstein, N. L. Anderson, J. K. Buolamwini, W. W. van Osdol, A. P. Monks, D. A. Scudiero, E. A. Sausville, D. W. Zaharevitz, B. Bunow, V. N. Viswanadhan, G. S. Johnson, R. E. Wittes, K. D. Paull, *Science* **1997**, *275*, 343–349.
- [106] K. D. Paull, R. H. Shoemaker, L. Hodes, A. Monks, D. A. Scudiero, L. Rubinstein, J. Plowman, M. R. Boyd, *J. Natl. Cancer Inst.* **1989**, *81*, 1088–1092.
- [107] F. Leteurtre, G. Kohlhaagen, K. D. Paull, Y. Pommier, *J. Natl. Cancer Inst.* **1994**, *86*, 1239–1244.
- [108] R. L. Bai, K. D. Paull, C. L. Herald, L. Malspeis, G. R. Pettit, E. Hamel, *J. Biol. Chem.* **1991**, *266*, 15882–15889.
- [109] E. S. Cleaveland, A. Monks, A. Vaigro-Wolff, D. W. Zaharevitz, K. Paull, K. Ardalan, D. A. Cooney, H. Ford, Jr., *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *49*, 947–954.
- [110] a) T. Yamori, A. Matsunaga, S. Sato, K. Yamazaki, A. Komi, K. Ishizu, I. Mita, H. Edatsugi, Y. Matsuba, K. Takezawa, O. Nakanishi, H. Kohno, Y. Nakajima, H. Komatsu, T. Andoh, T. Tsuruo, *Cancer Res.* **1999**, *59*, 4042–4049; b) S. Yaguchi, Y. Fukui, I. Koshimizu, H. Yoshimi, T. Matsuno, H. Gouda, S. Hirono, K. Yamazaki, T. Yamori, *J. Natl. Cancer Inst.* **2006**, *98*, 545–556; c) Y. Ohashi, H. Iijima, N. Yamaotsu, K. Yamazaki, S. Sato, M. Okamura, K. Sugimoto, S. Dan, S. Hirono, T. Yamori, *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 3885–3897.
- [111] J. Barretina, G. Caponigro, N. Stransky, K. Venkatesan, A. A. Margolin, S. Kim, C. J. Wilson, J. Lehar, G. V. Kryukov, D. Sonkin, A. Reddy, M. Liu, M. Murray, M. F. Berger, J. E. Monahan, P. Morais, J. Meltzer, A. Korejwa, J. Jane-Valbuena, F. A. Mapa, J. Thibault, E. Bric-Furlong, P. Raman, A. Shipway, I. H. Engels, J. Cheng, G. K. Yu, J. Yu, P. Aspesi, Jr., M. de Silva, K. Jagtap, M. D. Jones, L. Wang, C. Hatton, E. Palessandolo, S. Gupta, S. Mahan, C. Sougnez, R. C. Onofrio, T. Liefeld, L. MacConaill, W. Winckler, M. Reich, N. Li, J. P. Mesirov, S. B. Gabriel, G. Getz, K. Ardlie, V. Chan, V. E. Myer, B. L. Weber, J. Porter, M. Warmuth, P. Finan, J. L. Harris, M. Meyerson, T. R. Golub, M. P. Morrissey, W. R. Sellers, R. Schlegel, L. A. Garraway, *Nature* **2012**, *483*, 603–607.
- [112] J. Lamb, E. D. Crawford, D. Peck, J. W. Modell, I. C. Blat, M. J. Wrobel, J. Lerner, J. P. Brunet, A. Subramanian, K. N. Ross, M. Reich, H. Hieronymus, G. Wei, S. A. Armstrong, S. J. Haggarty, P. A. Clemons, R. Wei, S. A. Carr, E. S. Lander, T. R. Golub, *Science* **2006**, *313*, 1929–1935.
- [113] a) J. Gheeya, P. Johansson, Q. R. Chen, T. Dexheimer, B. Metaferia, Y. K. Song, J. S. Wei, J. He, Y. Pommier, J. Khan, *Cancer Lett.* **2010**, *293*, 124–131; b) Z. X. Zhang, T. Meng, J. X. He, M. Li, L. J. Tong, B. Xiong, L. P. Lin, J. K. Shen, Z. H. Miao, J. Ding, *Invest. New Drugs* **2010**, *28*, 715–728; c) F. M. Siu, D. L. Ma, Y. W. Cheung, C. N. Lok, K. Yan, Z. Q. Yang, M. S. Yang, S. X. Xu, B. C. B. Ko, Q. Y. He, C. M. Che, *Proteomics* **2008**, *8*, 3105–3117.
- [114] a) Y. Ishimatsu-Tsuji, T. Soma, J. Kishimoto, *FASEB J.* **2010**, *24*, 1489–1496; b) T. Sanda, X. Li, A. Gutierrez, Y. Ahn, D. S. Neuberg, J. O'Neil, P. R. Strack, C. G. Winter, S. S. Winter, R. S. Larson, H. von Boehmer, A. T. Look, *Blood* **2010**, *115*, 1735–1745.
- [115] G. Van den Bergh, L. Arckens, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2004**, *15*, 38–43.
- [116] A. Alban, S. O. David, L. Bjorkesten, C. Andersson, E. Sloge, S. Lewis, I. Currie, *Proteomics* **2003**, *3*, 36–44.
- [117] M. Muroi, S. Kazami, K. Noda, H. Kondo, H. Takayama, M. Kawatani, T. Usui, H. Osada, *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 460–470.
- [118] Z. E. Perlman, M. D. Slack, Y. Feng, T. J. Mitchison, L. F. Wu, S. J. Altschuler, *Science* **2004**, *306*, 1194–1198.
- [119] Y. A. Abassi, B. Xi, W. Zhang, P. Ye, S. L. Kirshtein, M. R. Gaylord, S. C. Feinstein, X. Wang, X. Xu, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 712–723.
- [120] I. Giaever, C. R. Keese, *Nature* **1993**, *366*, 591–592.
- [121] P. Jonkheijm, D. Weinrich, H. Schroder, C. M. Niemeyer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9762–9792; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9618–9647.
- [122] L. Berrade, A. E. Garcia, J. A. Camarero, *Pharm. Res.* **2011**, *28*, 1480–1499.
- [123] a) H. Ge, *Nucleic Acids Res.* **2000**, *28*, 3e; b) J. Huang, H. Zhu, S. J. Haggarty, D. R. Spring, H. Hwang, F. Jin, M. Snyder, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 16594–16599; c) Y. Fang, A. G. Frutos, J. Lahiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 2394–2395; d) C. Schnack, B. Hengerer, F. Gillardon, *Proteomics* **2008**, *8*, 1980–1986.
- [124] a) M. J. Keiser, B. L. Roth, B. N. Armbruster, P. Ernsberger, J. J. Irwin, B. K. Shoichet, *Nat. Biotechnol.* **2007**, *25*, 197–206; b) die SEA-Suchfunktion ist zugänglich unter <http://sea.bkslab.org/>.
- [125] M. J. Keiser, V. Setola, J. J. Irwin, C. Laggner, A. I. Abbas, S. J. Hufeisen, N. H. Jensen, M. B. Kuijer, R. C. Matos, T. B. Tran, R. Whaley, R. A. Glennon, J. Hert, K. L. H. Thomas, D. D. Edwards, B. K. Shoichet, B. L. Roth, *Nature* **2009**, *462*, 175–181.
- [126] J. U. Peters, P. Schnider, P. Mattei, M. Kansy, *ChemMedChem* **2009**, *4*, 680–686.
- [127] a) E. Gregori-Puigjané, J. Mestres, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2008**, *11*, 669–676; b) A. Lagunin, A. Stepanchikova, D. Filimonov, V. Poroikov, *Bioinformatics* **2000**, *16*, 747–748.
- [128] J. Heitman, N. Movva, M. Hall, *Science* **1991**, *253*, 905–909.
- [129] a) A. Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, S. G. Oliver, *Science* **1996**, *274*, 546–567; b) B. Suter, D. Auerbach, I. Stagljar, *Biotechniques* **2006**, *40*, 625–644.
- [130] A. Wach, A. Brachat, R. Pöhlmann, P. Philippsen, *Yeast* **1994**, *10*, 1793–1808.

- [131] a) E. A. Winzeler, D. D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J. D. Boeke, H. Bussey, A. M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S. W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S. H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J. H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, N. Liebundguth, D. J. Lockhart, A. Lucau-Danila, M. Lussier, N. M'Rabet, P. Menard, M. Mittmann, C. Pai, C. Rebischung, J. L. Revuelta, L. Riles, C. J. Roberts, P. Ross-MacDonald, B. Scherens, M. Snyder, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, S. Veronneau, M. Voet, G. Volckaert, T. R. Ward, R. Wysocki, G. S. Yen, K. Yu, K. Zimmermann, P. Philippsen, M. Johnston, R. W. Davis, *Science* **1999**, 285, 901–906; b) G. Giaever, A. M. Chu, L. Ni, C. Connelly, L. Riles, S. Veronneau, S. Dow, A. Lucau-Danila, K. Anderson, B. Andre, A. P. Arkin, A. Astromoff, M. El-Bakkoury, R. Bangham, R. Benito, S. Brachchat, S. Campanaro, M. Curtiss, K. Davis, A. Deutschbauer, K. D. Entian, P. Flaherty, F. Foury, D. J. Garfinkel, M. Gerstein, D. Gotte, U. Guldener, J. H. Hegemann, S. Hempel, Z. Herman, D. F. Jaramillo, D. E. Kelly, S. L. Kelly, P. Kotter, D. LaBonte, D. C. Lamb, N. Lan, H. Liang, H. Liao, L. Liu, C. Luo, M. Lussier, R. Mao, P. Menard, S. L. Ooi, J. L. Revuelta, C. J. Roberts, M. Rose, P. Ross-Macdonald, B. Scherens, G. Schimmack, B. Shafer, D. D. Shoemaker, S. Sookhai-Mahadeo, R. K. Storms, J. N. Strathern, G. Valle, M. Voet, G. Volckaert, C. Y. Wang, T. R. Ward, J. Wilhelmy, E. A. Winzeler, Y. Yang, G. Yen, E. Youngman, K. Yu, H. Bussey, J. D. Boeke, M. Snyder, P. Philippsen, R. W. Davis, M. Johnston, *Nature* **2002**, 418, 387–391.
- [132] D. Delneri, *FEMS Yeast Res.* **2010**, 10, 1083–1089.
- [133] G. Giaever, D. D. Shoemaker, T. W. Jones, H. Liang, E. A. Winzeler, A. Astromoff, R. W. Davis, *Nat. Genet.* **1999**, 21, 278–283.
- [134] G. Giaever, P. Flaherty, J. Kumm, M. Proctor, C. Nislow, D. F. Jaramillo, A. M. Chu, M. I. Jordan, A. P. Arkin, R. W. Davis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 793–798.
- [135] P. Y. Lum, C. D. Armour, S. B. Stepanians, G. Cavet, M. K. Wolf, J. S. Butler, J. C. Hinshaw, P. Garnier, G. D. Prestwich, A. Leonardson, P. Garrett-Engle, C. M. Rush, M. Bard, G. Schimmack, J. W. Phillips, C. J. Roberts, D. D. Shoemaker, *Cell* **2004**, 116, 121–137.
- [136] A. S. Blackburn, S. V. Avery, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 676–681.
- [137] N. Bivi, M. Romanello, R. Harrison, I. Clarke, D. Hoyle, L. Moro, F. Ortolani, A. Bonetti, F. Quadrioglio, G. Tell, D. Delneri, *Genome Biol.* **2009**, 10, R93.
- [138] R.-Y. Huang, M. Eddy, M. Vujcic, D. Kowalski, *Cancer Res.* **2005**, 65, 5890–5897.
- [139] R.-Y. Huang, D. Kowalski, H. Minderman, N. Gandhi, E. S. Johnson, *Cancer Res.* **2007**, 67, 765–772.
- [140] A. Wilmes, R. Hanna, R. W. Heathcott, P. T. Northcote, P. H. Atkinson, D. S. Bellows, J. H. Miller, *Gene* **2012**, 497, 140–146.
- [141] D.-U. Kim, J. Hayles, D. Kim, V. Wood, H.-O. Park, M. Won, H.-S. Yoo, T. Duhig, M. Nam, G. Palmer, S. Han, L. Jeffery, S.-T. Baek, H. Lee, Y. S. Shim, M. Lee, L. Kim, K.-S. Heo, E. J. Noh, A.-R. Lee, Y.-J. Jang, K.-S. Chung, S.-J. Choi, J.-Y. Park, Y. Park, H. M. Kim, S.-K. Park, H.-J. Park, E.-J. Kang, H. B. Kim, H.-S. Kang, H.-M. Park, K. Kim, K. Song, K. B. Song, P. Nurse, K.-L. Hoe, *Nat. Biotechnol.* **2010**, 28, 617–623.
- [142] K. Takeda, A. Mori, M. Yanagida, *Plos One* **2011**, 6, e22021.
- [143] J. Oh, E. Fung, M. N. Price, P. S. Dehal, R. W. Davis, G. Giaever, C. Nislow, A. P. Arkin, A. Deutschbauer, *Nucleic Acids Res.* **2010**, 38, e146.
- [144] H. Luesch, *Mol. Biosyst.* **2006**, 2, 609–620.
- [145] R. A. Butcher, B. S. Bhullar, E. O. Perlstein, G. Marsischky, J. LaBaer, S. L. Schreiber, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 103–109.
- [146] Y. Arita, S. Nishimura, A. Matsuyama, Y. Yashiroda, T. Usui, C. Boone, M. Yoshida, *Mol. Biosyst.* **2011**, 7, 1463–1472.
- [147] S. Hoon, A. M. Smith, I. M. Wallace, S. Suresh, M. Miranda, E. Fung, M. Proctor, K. M. Shokat, C. Zhang, R. W. Davis, G. Giaever, R. P. St Onge, C. Nislow, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, 4, 498–506.
- [148] D. Hoepfner, C. W. McNamara, C. S. Lim, C. Studer, R. Riedl, T. Aust, S. L. McCormack, D. M. Plouffe, S. Meister, S. Schuierer, U. Plikat, N. Hartmann, F. Staedtler, S. Cotesta, E. K. Schmitt, F. Petersen, F. Supek, R. J. Glynne, J. A. Tallarico, J. A. Porter, M. C. Fishman, C. Bodenreider, T. T. Diagana, N. R. Movva, E. A. Winzeler, *Cell Host Microbe* **2012**, 11, 654–663.
- [149] S. E. Pierce, R. W. Davis, C. Nislow, G. Giaever, *Nat. Protoc.* **2007**, 2, 2958–2974.
- [150] A. M. Smith, L. E. Heisler, J. Mellor, F. Kaper, M. J. Thompson, M. Chee, F. P. Roth, G. Giaever, C. Nislow, *Genome Res.* **2009**, 19, 1836–1842.
- [151] C. Chidley, H. Haruki, M. G. Pedersen, E. Muller, K. Johnsson, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 375–383.
- [152] A. Stepanov, K. C. Nitiss, G. Neale, J. L. Nitiss, *Mol. Pharmacol.* **2008**, 74, 423–431.
- [153] A. R. Burns, I. M. Wallace, J. Wildenhain, M. Tyers, G. Giaever, G. D. Bader, C. Nislow, S. R. Cutler, P. J. Roy, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 549–557.
- [154] R. Bernards, T. R. Brummelkamp, R. L. Beijersbergen, *Nat. Methods* **2006**, 3, 701–706.
- [155] D. J. Burgess, J. Doles, L. Zender, W. Xue, B. Ma, W. R. McCombie, G. J. Hannon, S. W. Lowe, M. T. Hemann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, 105, 9053–9058.
- [156] J. E. Carette, C. P. Guimaraes, M. Varadarajan, A. S. Park, I. Wuethrich, A. Godarova, M. Kotecki, B. H. Cochran, E. Spooner, H. L. Ploegh, T. R. Brummelkamp, *Science* **2009**, 326, 1231–1235.
- [157] J. H. Reiling, C. B. Clish, J. E. Carette, M. Varadarajan, T. R. Brummelkamp, D. M. Sabatini, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, 108, 11756–11765.
- [158] U. Elling, J. Taubenschmid, G. Wirnsberger, R. O'Malley, S.-P. Demers, Q. Vanhaelen, A. I. Shukalyuk, G. Schmauss, D. Schramek, F. Schnuetgen, H. von Melchner, J. R. Ecker, W. L. Stanford, J. Zuber, A. Stark, J. M. Penninger, *Cell Stem Cell* **2011**, 9, 563–574.
- [159] H. Luesch, S. K. Chanda, R. M. Raya, P. D. DeJesus, A. P. Orth, J. R. Walker, J. C. Izpisua Belmonte, P. G. Schultz, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 158–167.
- [160] S. Fields, O.-k. Song, *Nature* **1989**, 340, 245–246.
- [161] E. J. Licitra, J. O. Liu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 12817–12821.
- [162] M. Caligiuri, L. Molz, Q. Liu, F. Kaplan, J. P. Xu, J. Z. Majeti, R. Ramos-Kelsey, K. Murthi, S. Lievens, J. Tavernier, N. Kley, *Chem. Biol.* **2006**, 13, 711–722.
- [163] B. W. Jester, K. J. Cox, A. Gaj, C. D. Shomin, J. R. Porter, I. Ghosh, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 11727–11735.
- [164] F. Becker, K. Murthi, C. Smith, J. Come, N. Costa-Roldán, C. Kaufmann, U. Hanke, C. Degenhart, S. Baumann, W. Wallner, A. Huber, S. Dedier, S. Dill, D. Kinsman, M. Hediger, N. Bockovich, S. Meier-Ewert, A. F. Kluge, N. Kley, *Chem. Biol.* **2004**, 11, 211–223.
- [165] M. Paschke, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, 70, 2–11.
- [166] T. Clackson, J. A. Wells, *Trends Biotechnol.* **1994**, 12, 173–184.
- [167] R. Crameri, R. Jaussi, G. Menz, K. Blaser, *Eur. J. Biochem.* **1994**, 226, 53–58.
- [168] P. P. Sche, K. M. McKenzie, J. D. White, D. J. Austin, *Chem. Biol.* **1999**, 6, 707–716.
- [169] Y. Jin, J. Yu, Y. G. Yu, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 157–162.
- [170] a) D. J. Rodi, R. W. Janes, H. J. Sanganee, R. A. Holton, B. A. Wallace, L. Makowski, *J. Mol. Biol.* **1999**, 285, 197–203; b) S. Aoki, K. Morohashi, T. Sunoki, K. Kuramochi, S. Kobayashi, F. Sugawara, *Bioconjugate Chem.* **2007**, 18, 1981–1986.

- [171] J. S. Shim, J. Lee, H.-J. Park, S.-J. Park, H. J. Kwon, *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 1455–1463.
- [172] H. J. Jung, J. S. Shim, J. Lee, Y. M. Song, K. C. Park, S. H. Choi, N. D. Kim, J. H. Yoon, P. T. Mungai, P. T. Schumacker, H. J. Kwon, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 11584–11595.
- [173] B. Van Dorst, J. Mehta, E. Rouah-Martin, V. Somers, W. De Coen, R. Blust, J. Robbens, *Toxicol. in Vitro* **2010**, *24*, 1435–1440.
- [174] A. M. Piggott, P. Karuso, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 524–530.
- [175] K. Morohashi, H. Sahara, K. Watashi, K. Iwabata, T. Sunoki, K. Kuramochi, K. Takakusagi, H. Miyashita, N. Sato, A. Tanabe, K. Shimotohno, S. Kobayashi, K. Sakaguchi, F. Sugawara, *Plos One* **2011**, *6*, e18285.
- [176] A. D. Keefe, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley-VCH, Weinheim, **2001**.
- [177] P. W. Hammond, J. Alpin, C. E. Rise, M. Wright, B. L. Kreider, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 20898–20906.
- [178] M. McPherson, Y. Yang, P. W. Hammond, B. L. Kreider, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 691–698.
- [179] H. Shiheido, F. Terada, N. Tabata, I. Hayakawa, N. Matsumura, H. Takashima, Y. Ogawa, W. Du, T. Yamada, M. Shoji, T. Sugai, N. Doi, S. Iijima, Y. Hattori, H. Yanagawa, *Plos One* **2012**, *7*, e38878.
- [180] IntAct (<http://www.ebi.ac.uk/intact/>); STRING (<http://string-db.org/>); BioGRID (<http://thebiogrid.org/>); MINT (<http://mint.bio.uniroma2.it/mint/>); UniHI (<http://www.unihi.org/>); APID (<http://bioinfow.dep.usal.es/apid/>).
- [181] G. Mathis, *Clin. Chem.* **1995**, *41*, 1391–1397.
- [182] E. F. Ullman, H. Kirakossian, S. Singh, Z. P. Wu, B. R. Irvin, J. S. Pease, A. C. Switchenko, J. D. Irvine, A. Dafforn, C. N. Skold, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 5426–5430.
- [183] a) S. Duhr, D. Braun, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 19678–19682; b) S. A. Seidel, C. J. Wienken, S. Geissler, M. Jerabek-Willemsen, S. Duhr, A. Reiter, D. Trauner, D. Braun, P. Baaske, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10810–10814; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10656–10659.
- [184] P. Dadvar, D. Kovanich, G. E. Folkers, K. Rumpel, R. Rajmakers, A. J. Heck, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2654–2662.
- [185] T. Weidemann, J. M. Seifert, M. Hintersteiner, M. Auer, *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 647–654.
- [186] K. J. Cash, F. Ricci, K. W. Plaxco, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6955–6957.
- [187] F. J. Dekker, O. Rocks, N. Vartak, S. Menninger, C. Hedberg, R. Balamurugan, S. Wetzel, S. Renner, M. Gerauer, B. Scholer-mann, M. Rusch, J. W. Kramer, D. Rauh, G. W. Coates, L. Brunsveld, P. I. Bastiaens, H. Waldmann, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 449–456.
- [188] J. Yang, A. Shamji, S. Matchacheep, S. L. Schreiber, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 371–377.
- [189] B. Chen, M. E. Dodge, W. Tang, J. Lu, Z. Ma, C.-W. Fan, S. Wei, W. Hao, J. Kilgore, N. S. Williams, M. G. Roth, J. F. Amatruda, C. Chen, L. Lum, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 100–107.
- [190] a) S. Yamazoe, H. Shimogawa, S. Sato, J. D. Esko, M. Uesugi, *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 773–782; b) S. Nishimura, Y. Arita, M. Honda, K. Iwamoto, A. Matsuyama, A. Shirai, H. Kawasaki, H. Kakeya, T. Kobayashi, S. Matsunaga, M. Yoshida, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, *6*, 519–526.
- [191] a) B. Jiang, H. Yang, M. L. Li, A. J. Hou, Q. B. Han, S. J. Wang, S. H. Li, H. D. Sun, *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1111–1116; b) Y. L. Wu, C. X. Liu, G. Q. Chen, *Blood* **2008**, *112*, 568–568.
- [192] C. X. Liu, Q. Q. Yin, H. C. Zhou, Y. L. Wu, J. X. Pu, L. Xia, W. Liu, X. Huang, T. Jiang, M. X. Wu, L. C. He, Y. X. Zhao, X. L. Wang, W. L. Xiao, H. Z. Chen, Q. Zhao, A. W. Zhou, L. S. Wang, H. D. Sun, G. Q. Chen, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 486–493.
- [193] C. Hedberg, F. J. Dekker, M. Rusch, S. Renner, S. Wetzel, N. Vartak, C. Gerding-Reimers, R. S. Bon, P. I. Bastiaens, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 10006–10011; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 9832–9837.
- [194] J. M. Krysiak, J. Kreuzer, P. Macheroux, A. Hermetter, S. A. Sieber, R. Breinbauer, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 7142–7147; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 7035–7040.
- [195] B. P. Zhou, D. A. Lewis, S. W. Kwan, C. W. Abell, *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 23653–23660.
- [196] M. A. Amin, S. Matsunaga, S. Uchiyama, K. Fukui, *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 3839–3844.
- [197] W. Wang, A. Budhu, M. Forgues, X. W. Wang, *Nat. Cell Biol.* **2005**, *7*, 823–830.
- [198] A. Ballio, M. Mauri, E. B. Chain, P. Deleo, A. Tonolo, B. F. Erlanger, *Nature* **1964**, *203*, 297.
- [199] M. Würtele, C. Jelic-Ottmann, A. Wittinghofer, C. Oecking, *EMBO J.* **2003**, *22*, 987–994.
- [200] J. Z. Long, B. F. Cravatt, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 6022–6063.
- [201] A. Adibekian, B. R. Martin, C. Wang, K. L. Hsu, D. A. Bachovchin, S. Niessen, H. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 469–478.
- [202] A. Adibekian, B. R. Martin, J. W. Chang, K. L. Hsu, K. Tsuboi, D. A. Bachovchin, A. E. Speers, S. J. Brown, T. Spicer, V. Fernandez-Vega, J. Ferguson, P. S. Hodder, H. Rosen, B. F. Cravatt, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 10345–10348.
- [203] J. J. Fischer, O. Y. Graebner Baessler, C. Dalhoff, S. Michaelis, A. K. Schrey, J. Ungewiss, K. Andrich, D. Jeske, F. Kroll, M. Glinski, M. Sefkow, M. Dreger, H. Koester, *J. Proteome Res.* **2010**, *9*, 806–817.
- [204] D. P. Bezerra, G. C. G. Militao, F. O. de Castro, C. Pessoa, M. O. de Moraes, E. R. Silveira, M. A. S. Lima, F. J. M. Elmiro, L. V. Costa-Lotuf, *Toxicol. in Vitro* **2007**, *21*, 1–8.
- [205] T. Ito, H. Ando, T. Suzuki, T. Ogura, K. Hotta, Y. Imamura, Y. Yamaguchi, H. Handa, *Science* **2010**, *327*, 1345–1350.
- [206] J. Cox, M. Mann, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1367–1372.
- [207] a) M. D. Burke, S. L. Schreiber, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 48–60; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 46–58; b) G. L. Thomas, E. E. Wyatt, D. R. Spring, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.* **2006**, *9*, 700–712.
- [208] a) M. M. Hann, T. I. Oprea, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, *8*, 255–263; b) W. L. Scott, M. J. O'Donnell, *J. Comb. Chem.* **2009**, *11*, 3–13.