

Fluoreszente Mimetika von CMP-Neu5Ac sind hochaffine, zellgängige Polarisationssonden eukaryotischer und bakterieller Sialyltransferasen und inhibieren die zelluläre Sialylierung**

Johannes J. Preidl, Vinayaga S. Gnanapragassam, Michael Lisurek, Jörn Saupe, Rüdiger Horstkorte und Jörg Rademann*

Abstract: Oligosaccharide der Glycolipide und Glycoproteine auf der äußeren Membran humaner Zellen tragen terminale Neuraminsäuren, die für die Zell-Zell-Erkennung und die Adhäsion von Zellen, Bakterien und Viruspartikeln verantwortlich sind. Die Synthese der Neuraminsäure-tragenden Glycoside wird von intrazellulären Sialyltransferasen vollzogen. Daher könnte die chemische Manipulation der zellulären Sialylierung ein Weg zur Hemmung der Krebsentwicklung sowie von Entzündungen und Infektionen sein. Hier wird die Entwicklung und Anwendung der ersten nanomolaren fluoreszenten Inhibitoren von Sialyltransferasen beschrieben. Die erhaltenen Mimetika von Kohlenhydratnukleotiden erwiesen sich als Liganden der vier kommerziell erhältlichen und in Fluoreszenzpolarisations-Assays getesteten eukaryotischen wie bakteriellen Sialyltransferasen. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass die anionischen Mimetika schnell und effizient in Vesikeln in Zellen eindringen und zu den kernnahen Organellen von CHO-Zellen wanderten. Die neuen Verbindungen inhibieren die zelluläre Sialylierung in zwei Zelllinien und eröffnen neue Perspektiven zur Untersuchung zellulärer Sialylierung.

Sialinsäuren wie die 5-*N*-Acetylneuraminsäure (Neu5Ac) sind an Glykokonjugate wie Glycoproteine und Glycolipide der äußeren Zelloberfläche eukaryotischer Zellen gebunden und agieren unter anderem als multivalente Liganden in Zelladhäsionsprozessen. Die Regulierung der Sialylierung ist dabei von allgemeiner Bedeutung bei der Wartung gesunder Zellen und Organismen.^[1] Hypersialylierung von Zellen wird bei Entzündungsprozessen beobachtet und ermöglicht Im-

munkzellen in infiziertes Gewebe einzudringen.^[2] Überdies sind hypersialylierte Krebszellen befähigt, sich aus ihrer Primärgewebeumgebung zu lösen, zu migrieren und in entfernten Geweben Metastasen zu bilden.^[3] Hypersialylierung weist daher oftmals auf eine schlechte Prognose von Neoplasien hin, und die Inhibition derselben könnte eine mögliche therapeutische Strategie gegen Krebs darstellen.^[4]

Die Sialylierung von Glykokonjugaten erfolgt im Golgi-Apparat durch mindestens 20 unterschiedliche Sialyltransferasen, die sowohl im menschlichen wie auch im Mäusegenom gefunden wurden.^[5] Der Sialylierungsgrad von Zellen ist eng mit dem Expressionsspiegel der Sialyltransferasen verknüpft, was letztere als mögliches Ziel für pharmakologische Eingriffe empfiehlt.^[6] Für ein weiterreichendes Verständnis der Funktionen und der Bedeutung der Proteinsialylierung sind proteinbindende Sonden für diese Enzymklasse überaus erstrebenswert. Darüber hinaus wären spezifische und generische Inhibitoren dieser Enzyme für die Validierung der Sialyltransferasen als potentielle Ziele für die Behandlung metastasierender Neoplasien wertvoll.^[7]

Inhibitoren für Sialyltransferasen zu entwickeln, ist aus einer Reihe von Gründen aufwändig und anspruchsvoll. Erstens sind bislang wenige der genetisch codierten Enzyme als stabile, lösliche bioaktive Proteine für homogene Assays exprimiert und isoliert worden. Zweitens ist die Entwicklung funktioneller Assays erschwert, da viele der Enzyme spezifische Oligosaccharidsubstrate benötigen, die aufwändig hergestellt oder isoliert werden müssen. Drittens erfordert die Verfolgung der Enzymreaktion typischerweise die Analyse der Produkte mittels Chromatographie, wodurch die Assays bei niedrigem Durchsatz zeitraubend und teuer werden,^[8] obgleich jüngste Fortschritte im Bereich von Glycan-Arrays zukünftig eine Alternative für die Lösungsassays hervorbringen könnten.^[9]

Aus diesen Überlegungen schlossen wir, dass ein genereller Assay für Sialyltransferasen nur realisierbar wäre, wenn nicht die enzymespezifische Umsetzung von Akzeptorsubstraten, sondern die Bindung an die Erkennungstasche des Donorsubstrats dieser Enzyme, 5-*N*-Acetylneuraminsäurecytidinmonophosphat (CMP-Neu5Ac, Abbildung 1), detektiert würde. Für die Realisierung eines solchen Bindungsassays für Sialyltransferasen bedurfte es der Entwicklung generischer Sonden für diese Enzymklasse.

Bereits vor zwei Jahrzehnten etablierten Reutter et al., dass die Enzyme des Sialinsäuremetabolismus, so auch die Sialyltransferasen, beim Donorsubstrat verschiedene Substituenten in der C5-Position tolerieren.^[10] Neben der nativen *N*-

[*] Dr. J. J. Preidl, Dr. J. Saupe, Prof. Dr. J. Rademann
Medizinische Chemie, Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Straße 2 + 4, 14195 Berlin (Deutschland)
E-Mail: j.rademann@fu-berlin.de
Homepage: <http://www.bcp.fu-berlin.de/ag-rademann>
Dr. J. J. Preidl, Dr. M. Lisurek, Prof. Dr. J. Rademann
Abteilung für Medizinische Chemie
Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP)
Robert-Rössle-Straße 10, 13125 Berlin (Deutschland)
Dr. V. S. Gnanapragassam, Prof. Dr. R. Horstkorte
Institut für Physiologische Chemie
Martin-Luther-Universität
Hollystraße 1, 06114 Halle (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG (FOR 806, SFB 765 und TRR 67) und der Berlin School of Integrated Oncology unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201400394> zu finden.

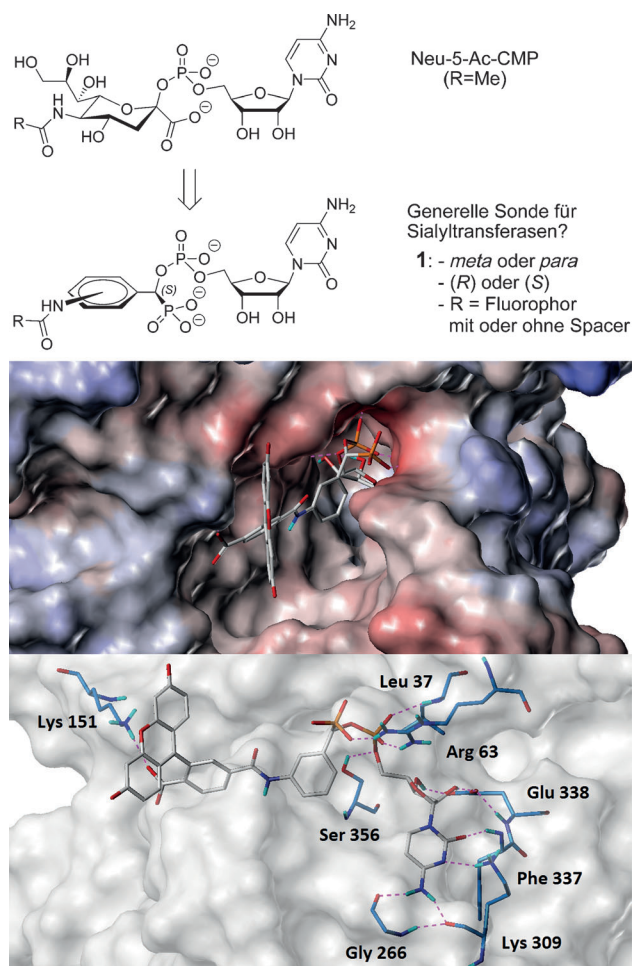


Abbildung 1. Design von potentiellen Sondenmolekülen für Sialyltransferasen: Das native Substrat der Sialyltransferasen, CMP-Neu5Ac (oben), kann an der 5-Position der Neuraminsäure variiert werden. Docking-Studien einer daraus abgeleiteten Struktur (R)-1-m an die bakterielle Sialyltransferase PmST1 (PDB: 2IHZ)^[13] und später (siehe Hintergrundinformationen) an die Säugetiertransferase pST3Gal I (PDB: 2WNB^[14]).

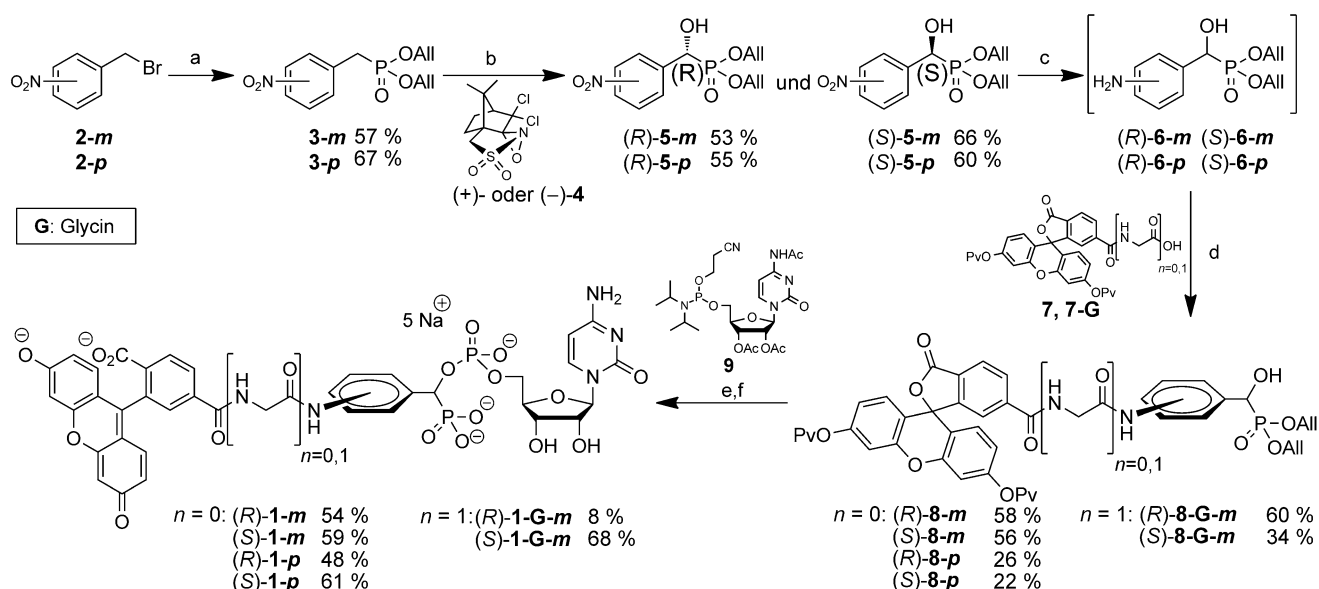
Acetyl-Gruppe werden größere Amidreste und Azide akzeptiert, eine Erkenntnis, die nachfolgend für die Derivatisierung von 5-Azidosialinsäuren auf lebenden Zellen genutzt wurde.^[11] Potente Inhibitoren von Sialyltransferasen, auf Phosphatester von α -Hydroxybenzylphosphonsäurederivaten basierend, wurden von der Gruppe von R. R. Schmidt identifiziert.^[12] Die Kombination dieser unterschiedlichen Erkenntnisse veranlasste uns die Hypothese aufzustellen, Arylamid **1** könne eine allgemeine Struktur genereller Sonden für Sialyltransferasen darstellen (Abbildung 1): Die Grundstruktur von **1** sollte den Bindungsmodus des Substrates bewahren, und die Substrattoleranz der Enzyme gegenüber der C5-Position von CMP-Neu5Ac könnte, auf die Inhibitoren übertragen, verschiedene Substituenten in *meta*- wie *para*-Position ermöglichen. So wäre die Integration größerer Gruppen wie Fluorophore, Funktionalitäten für Pull-Down-Experimente oder photoreaktive Crosslinking-Gruppen denkbar. Wir fokussierten uns zunächst auf die Ent-

wicklung fluoreszenter Sialyltransferasesonden, da diese Moleküle direkt in Bindungsassays eingesetzt werden können. Dabei werden die durch kompetitive Verdrängung solcher Sonden hervorgerufenen Veränderungen in der Fluoreszenzpolarisation gemessen.

Docking-Simulationen der entworfenen Moleküle mit den Kristallstrukturen der Sialyltransferase PmST1 (PDB: 2IHZ)^[13] und später der nicht homologen Säugetiertransferase pST3Gal I (PDB: 2WNB^[14]) ermutigten uns, dieser Hypothese nachzugehen (Abbildung 1 und S2 in den Hintergrundinformationen). Verschiedene Kombinationen aus Spacer und Fluorescein als Fluorophor passten gut in die Bindungstasche und interferierten nicht mit der Erkennung des mutmaßlichen CMP-Neu5Ac-Mimetikums. Entsprechend wurde eine Reihe potentieller Fluoreszenzsonden **1** für Sialyltransferasen entworfen (Abbildung 1, Schema 1). Variiert wurden die Substitution am Phenylring des Inhibitors (*meta* oder *para*), die Einfuhr eines Glycin-Linkers zwischen Fluorescein und dem Inhibitor sowie die Konfiguration des α -Hydroxymethylphosphonats (*R* oder *S*).

Die Synthese der Sonden begann mit der Alkylierung von Triallylphosphit mit den elektrophilen 3- oder 4-Nitrobenzylbromiden **2-m** und **2-p**. Die erhaltenen Phosphonate **3-m** und **3-p** wurden mit Natrium-bis(trimethylsilyl)amid (NaHMDS) deprotoniert und die intermediären Phosphoryl-stabilisierten Benzylianionen durch die Anwendung von entweder (–)- oder (+)-[(8,8-Dichlorcamphoryl)sulfonyl]oxaziridin^[15] **4** stereoselektiv zu den entsprechenden (*R*)- und (*S*)- α -Hydroxymethylphosphonaten (*R*)-**5-m** oder (*R*)-**5-p** und (*S*)-**5-m** oder (*S*)-**5-p** oxidiert. Der Enantiomerenüberschuss (*ee*) wurde durch die NMR-Analyse der abgeleiteten Mosher-Ester mit Werten zwischen 83–87 % bestimmt (für Details siehe Hintergrundinformationen).

Die vier Nitro-substituierten (*R*)- und (*S*)- α -Hydroxymethylphosphonate **5** wurden mit Zinn(II)-chlorid zu den entsprechenden vier aromatischen Amidinen (*R*)-**6-m** oder (*R*)-**6-p** sowie (*S*)-**6-m** oder (*S*)-**6-p** reduziert. Die Aniline **6** waren nach Isolation und längerer Lagerung nicht stabil und wurden daher nach wässriger Aufarbeitung unverzüglich an Pivaloylgeschütztes 6-Carboxyfluorescein^[16] **7** oder das Glycinspacerderivat **7-G** gekuppelt. Sechs stabile Benzylalkohole der allgemeinen Struktur **8** wurden isoliert, (*R*)- und (*S*)-**8-m**, (*R*)- und (*S*)-**8-p** sowie (*R*)- und (*S*)-**8-G-m**, die letzten beiden mit dem Glycinspacer. Alle sechs Alkohole **8** wurden an das geschützte Cytidinphosphoramidit **9** gekuppelt, mit *tert*-Butylhydroperoxid oxidiert und anschließend mit [Pd(PPh₃)₄] sowie K₂CO₃ in MeOH in einer Prozedur entschützt, die eine simultane Abspaltung der Allyl-, Acetyl-, Pivaloyl- und Cyanoethylschutzgruppen in einem Schritt ermöglicht.^[18] Die sechs erhaltenen Fluorescein-markierten Inhibitoren (*R*)- und (*S*)-**1-m**, (*R*)- und (*S*)-**1-p** sowie (*R*)- und (*S*)-**1-G-m** wurden mittels HPLC-Chromatographie aufgereinigt und mit einem Kationenaustauscherharz in die entsprechenden Natriumsalze überführt. Der finale Diastereomerenüberschuss (*de*) der sechs potentiellen FP-Sonden **1** wurde durch die Integration der Protonensignale des Cytidin H-5 oder H-1' in den ¹H-NMR-Spektren bestimmt und lag zwischen 71 und 84 %. Entsprechend war keine signifikante Epimerisierung im Laufe des mehrstufigen Protokolls von **6** zu **1** zu verzeichnen.



Scheme 1. Reaktionsbedingungen für die Synthese der Sonde **1**: a) $\text{P}(\text{OAll})_3$, Toluol, Mikrowellen, 105°C , 15 h; b) 1. NaHMDS, THF, -95°C → -45°C , 1–3 h, 2. (–)– oder (+)–**4**, THF, -95°C → -78°C , 3.5 h; ee 84–87 %; c) SnCl_2 , EtOH, 20 – 40°C , 1–3 d; d) **7** or **7-G**, DCM, 2–18 h; e) 1. **9**, 1*H*-Tetrazol, DCM, 2.5–18 h; 2. $t\text{BuOOH}$, 1–21 h; f) 1. $[\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4]$, K_2CO_3 , MeOH, 4–24 h, 2. HPLC, 3. Na^+ , de 71–84 %.

Zur Evaluierung der Bindung der Sonden an die CMP-Neu5Ac-Bindungstasche wurden zwei kommerziell erhältliche Säugetiersialyltransferasen ausgewählt, die rST3Gal II^[19] aus der Ratte für die Sialylierung von Galaktose in Position 3 und die humane hST6Gal I^[20] für die Sialylierung von Galaktose in Position 6, beide in löslicher Form und rekombinant in Insektenzellen exprimiert erhältlich. Zusätzlich wurden die beiden prokaryotischen Sialyltransferasen PmST1 aus *Pasteurella multocida*^[21] und Pd2,6ST(N) aus *Photobacterium damsela*^[22] für die Sialylierung von Galaktose in Position 3 bzw. in Position 6 eingesetzt. Die potentiellen Enzymsonden **1** wurden in Puffer gelöst (10 nM) und mit seriellen Verdünnungen der vier Sialyltransferasen titriert. Die Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D der Liganden-Protein-Komplexe erfolgte durch die Messung der Anisotropieänderungen der Fluoreszenzpolarisation als Funktion der Enzymkonzentration. Dabei erwiesen sich alle Sonden als Liganden der vier untersuchten STs. Die Bindungsaffinitäten gegenüber den Säugetier-STs waren sehr hoch und lagen im zweistelligen nanomolaren Bereich mit überraschend geringen Affinitätsdifferenzen zwischen den verschiedenen Sonden. Die besten Affinitäten gegenüber den bakteriellen STs waren ebenfalls im niedrigen nanomolaren Bereich, jedoch mit stärkeren Variationen zwischen den Sonden.

Die Konfiguration der α -Hydroxymethylphosphonate hatte nur einen geringen Einfluss auf die Bindungseigenschaften der Sonden gegenüber den Säugetier-STs, während die *R*-konfigurierten Sonden bei den bakteriellen STs wesentlich besser als die *S*-konfigurierten banden. Die Position der aromatischen Substitution hatte nur geringen Einfluss auf die Affinitäten der Sonden zu den Säugetier-STs, aber die *para*-substituierten Sonden waren sehr viel stärkere Liganden der bakteriellen STs als die *meta*-substituierten. Beides, sowohl die Konfiguration des benzylichen Stereozentrums als auch die aromatische Substitution, beeinflussten die

anisotropischen Eigenschaften der Sonden bezüglich der maximalen Anisotropie und der Quantenausbeute der Fluoreszenz. Der Glycin-Linker schien für die Bindung der Sonden an die STs bedeutungslos, steigerte allerdings den Dynamikbereich der Anisotropie für die rST3Gal II signifikant. Unterschiede im Dynamikbereich der Anisotropie zwischen den Sonden könnte durch die Flexibilität des Fluorophor-Tags, unterschiedliche Rotationsrelaxationszeiten der Sonden-Protein-Komplexe oder den Einfluss der Proteinumgebung auf die Fluoreszenzlebensdauer entstehen.^[23] Die Selektivität der ST-Sonden wurde für ein ausgewähltes Beispiel eingehender untersucht. (*S*)-**1-G-m** wurde mit steigenden Konzentrationen der kommerziell erhältlichen β -1,4-Galactosyltransferase aus der Kuhmilch inkubiert und die Fluoreszenzpolarisation gemessen. Selbst bei der maximalen Proteinkonzentration von $250\ \mu\text{M}$ war nur eine geringfügige Retention der FP zu verzeichnen, woraus auf einen $K_D > 250\ \mu\text{M}$ für diese Sonde und eine Selektivität für die beiden eukaryotischen Sialyltransferasen von mehr als 10000 geschlossen werden kann.

Als nächstes wurde ein FP-basierter Verdrängungsassay für jede der Sialyltransferasen etabliert (Abbildung 2). Dazu wurde für jede ST eine Sonde ausgewählt, die eine optimale Kombination aus hoher Affinität, hohem Anisotropie-Dynamikfenster und konstanter Fluoreszenzquantenausbeute aufwies. Dies waren (*S*)-**1-G-m** für das Rattenenzym rST3Gal II, (*S*)-**1-p** für das humane Protein hST6Gal I, (*R*)-**1-p** für Pd2,6ST(N) und (*S*)-**1-p** für PmST1. Die initiale Anisotropie wurde für jeden Bindungsassay hinsichtlich der Sensitivität durch Justieren der Proteinkonzentration optimiert.^[24]

Anschließend wurden die gebundenen Sonden durch die Zugabe von Cytidindiphosphat (CDP) und dem vereinfachten nicht-fluoreszenten CMP-Neu5Ac-Biomimetikum **1-Ac** (Abbildung 1, $\text{R} = \text{Me}$) kompetitiv verdrängt. Die Experimente bestätigten eindeutig den reversiblen Bindungsmodus

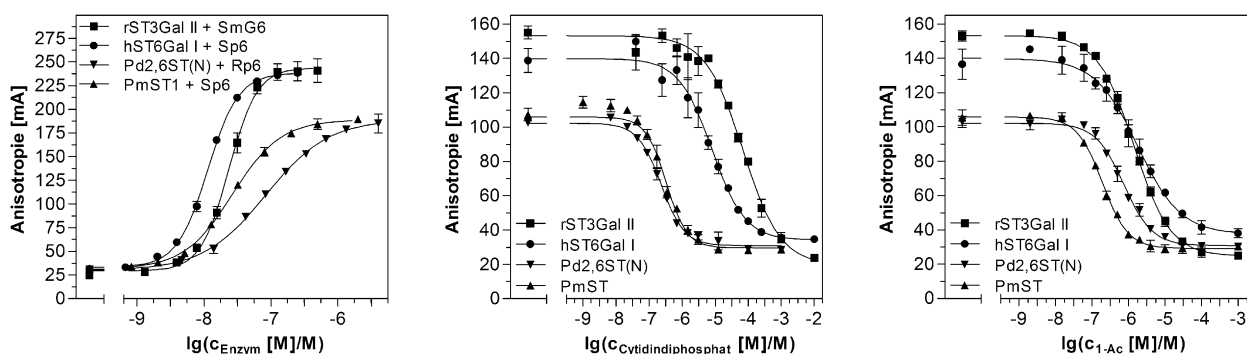


Abbildung 2. Fluoreszenzpolarisations-Bindungskurven der potentesten Sonden (links), Verdrängung mit Cytidindiphosphat (CDP) (Mitte) und 1-Ac (rechts). Graphen aller Sonden und ein DMSO-Test für 1-Ac finden sich in den Hintergrundinformationen.

Tabelle 1: Bindungsaffinitäten (K_D -Werte) und Anisotropieänderungen (ΔA) der fluoreszenten NeuAc5-CMP-Mimetika **1** sowie Verdrängungseigenschaften (K_i -Werte) und Assaysignalfenster (ΔA) der Inhibitoren Cytidindiphosphat (CDP) und 1-Ac hinsichtlich der vier eukaryotischen und bakteriellen Sialyltransferasen.

Sonde	rST3Gal II		hST6Gal I		Pd2,6ST(N)		PmST1	
	K_D [nM] ^[a]	ΔA [mA] ^[a]	K_D/K_i [nM] ^[a]	ΔA [mA] ^[a]	K_D/K_i [nM] ^[a]	ΔA [mA] ^[a]	K_D/K_i [nM] ^[a]	ΔA [mA] ^[a]
(R)-1-m	41.0 ± 1.9	181.5 ± 6.1	22.2 ± 0.4	213.2 ± 2.5	924.6 ± 157.5	193.3 ± 15.5	33.6 ± 1.8	160.7 ± 6.2
(S)-1-m	44.8 ± 0.8	144.1 ± 1.6	9.0 ± 0.3	184.8 ± 2.8	> 1000	180.1 ± 28.5	183.8 ± 7.9	140.3 ± 2.7
(R)-1-p	24.5 ± 0.7	131.5 ± 2.7	21.5 ± 0.6	152.2 ± 2.7	83.9 ± 5.1	159.2 ± 4.5	11.5 ± 0.6	133.7 ± 4.2
(S)-1-p	78.9 ± 4.5	180.3 ± 6.7	11.3 ± 0.2	205.0 ± 2.7	590.7 ± 48.5	163.2 ± 4.7	26.5 ± 1.0	157.7 ± 2.8
(R)-1-G-m	23.9 ± 0.6	194.3 ± 2.9	17.9 ± 0.3	205.0 ± 2.0	53.2 ± 13.9	75.1 ± 11.6	12.7 ± 1.0	139.0 ± 4.1
(S)-1-G-m	23.5 ± 0.9	214.5 ± 5.4	12.8 ± 0.2	208.9 ± 2.3	> 1000	182.1 ± 9.4	184.6 ± 21.0	104.3 ± 5.2

Inhibitor	rST3Gal II		hST6Gal I		Pd2,6ST(N)		PmST1	
	K_i [μM] ^[a]	ΔA [mA] ^[a]	K_i [μM] ^[a]	ΔA [mA] ^[a]	K_i [μM] ^[a]	ΔA [mA] ^[a]	K_i [μM] ^[a]	ΔA [mA] ^[a]
CDP	32.83 ± 4.31	129.5 ± 4.1	3.50 ± 0.41	104.6 ± 8.0	0.09 ± 0.00	74.2 ± 2.5	0.15 ± 0.01	77.4 ± 5.6
1-Ac 0% DMSO	0.66 ± 0.03	128.4 ± 4.0	0.78 ± 0.09	101.9 ± 9.5	0.36 ± 0.02	72.5 ± 2.5	0.08 ± 0.01	75.8 ± 5.6
1-Ac 1% DMSO	0.69 ± 0.03	115.5 ± 0.7	0.88 ± 0.13	96.8 ± 11.2	0.39 ± 0.01	70.0 ± 4.8	0.09 ± 0.01	80.0 ± 7.0

[a] ± Standardfehler; fett gedruckte FP-Sonden wurden für die Verdrängungsstudien verwendet.

aller selektierten Sonden. Die Inhibitionskonstanten K_i wurden nach einer Methode von Nikolovska-Coleska et al.^[25] berechnet, und CDP zeigte Inhibition der Säugetier-STs im μM-Bereich, während 1-Ac im sub-μM Bereich aktiv war (siehe Tabelle 1). Bemerkenswerterweise wies CDP gegenüber beiden bakteriellen Sialyltransferasen ähnliche Inhibitionswirkungen auf wie das nicht-fluoreszente Mimetikum 1-Ac. Der Verdrängungsassay erwies sich als robust gegenüber 1% Dimethylsulfoxid (DMSO), eine wichtige Eigenschaft für den Einsatz dieses Assays im Screening chemischer Bibliotheken.

Abschließend wurde die selektierte Sonde (S)-1-G-m in lebenden Chinese Hamster Ovary (CHO)-Zellen untersucht. Gewöhnlich wird die äußere Zellmembran als impermeabel gegenüber polyanionischen Molekülen, wie die Verbindungen **1** es ist, betrachtet, ein allgemeines Problem für die zelluläre Verfügbarkeit organischer Phosphate, Phosphatmimetika, Nukleinsäuren usw. Daher erwarteten wir den Bedarf von Transfektionsmitteln, um die Sonde (S)-1-G-m in die Zellen zu transportieren. Zu unserer großen Überraschung führte die Behandlung der CHO-Zellen mit der Fluoreszenzsonde (S)-1-G-m zu einer raschen und anhaltenden intrazellulären Färbung der Zellen (Abbildung 3). Intensität wie Homogenität der zellulären Aufnahme wurde mittels

Durchflusszytometrie untersucht (Abbildung 3E,F). Nach 24 h Inkubation mit (S)-1-G-m zeigten alle CHO-Zellen starke Fluoreszenz (dunkelgrau), während die Kontrollzellen, behandelt mit 6-Carboxyfluorescein bei identischer Konzentration, weniger als 5% Fluoreszenz (hellgrau) zeigten.

Die Färbung der Zellen mit (S)-1-G-m wurde ausschließlich in subzellulären Kompartimenten beobachtet, während das Cytoplasma überhaupt nicht beeinflusst wurde. Dies weist auf einen vesikulären Aufnahmemechanismus hin. Die fluoreszenten Vesikel verlagerten sich schnell in die Umgebung des Nukleus, welcher selbst nicht angefärbt wurde. Um die subzelluläre Lokalisation von (S)-1-G-m exakter zu bestimmen, wurde der Farbstoff Bodipy tr C₅ ceramide^[26] eingesetzt. Bodipy tr C₅ ceramide wurde als spezifischer Farbstoff für extranukleäre Kompartimente von Zellen, insbesondere des endoplasmatischen Retikulums (ER) und des Golgi-Apparats, beschrieben. Die Coanfärbung von CHO-Zellen mit (S)-1-G-m (grün), dem Nukleusfärbereagens Hoechst 33342 (blau) und dem ER/Golgi-Tracker (rot) bestätigte die Translokation des Neu5Ac-Biomimetikums in die den Zellkern umgebenden Kompartimente. Die direkt an den Nukleus gebundenen Kompartimente, das ER und das nähere cis-Golgi-Netzwerk, welche durch den Tracker am stärksten gefärbt wurden, enthielten keine Sialyltransferase-

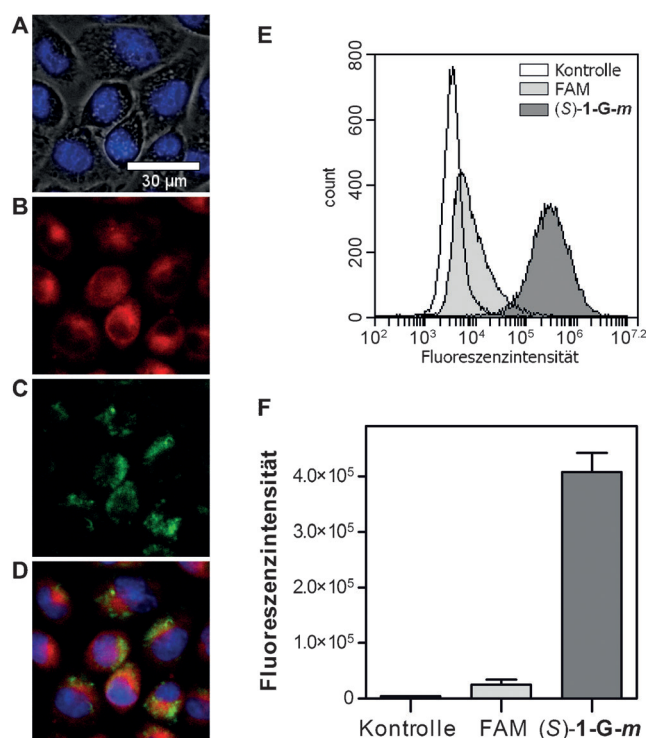


Abbildung 3. Zelluläre Aufnahme von (S)-1-G-m durch CHO-Zellen: A) Nukleusanfärbung mit Hoechst 33342 und Überlagerung mit Phasenkontrastbild; B) mit BODIPY TR C₅-ceramide (5 μM) für Markierung des ER und des Golgi; C) vesikuläre Verteilung der Sonde; D) Cofärbung mit drei Farbstoffen (für Bilder der Kontrolle und Behandlung mit Carboxyfluorescein, siehe Hintergrundinformationen). Durchflusszytometrieanalyse der Aufnahme von (S)-1-G-m (50 μM) durch CHO-Zellen verglichen mit Carboxyfluorescein (FAM) und Kontrolle nach 24 h Inkubation. E) Logarithmisches Diagramm, das eine signifikante Fluoreszenz aller mit der Sonde inkubierten Zellen zeigt. F) Balkendiagramm der absoluten Werte (Mittelwert ± SEM, n = 2).

sonde. Allerdings zeigten die direkt an die am stärksten rot angefärbten Organellen gebundenen Kompartimente die stärkste Fluoreszenzintensität. Diese Kompartimente könnten Teil des trans-Golgi-Netzwerks sein, welches die beschriebene Lage der Sialyltransferasen ist. Daher wurde der funktionelle Einfluss der Sonde auf die Sialylierung lebender Zellen untersucht. Zwei Zelllinien, CHO- und B35-Zellen, wurden mit einer einzelnen Dosis der Sonde (S)-1-G-m (50 μM, 24 h) inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, lysiert und identische Mengen des Zelllysats einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zugeführt. Das Gel wurde auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und die sialylierten Glycoproteine durch Inkubation mit biotinyliertem Sialolektin Limax Flavus Agglutinin (LFA) und anschließende Behandlung mit Streptavidin-markierter Meerrettichperoxidase detektiert (Abbildung 4). In beiden Zelllinien wurde bei Inkubation mit der Sonde (S)-1-G-m ein Rückgang der Chemilumineszenzintensität der LFA-Färbung beobachtet, ein Hinweis auf die reduzierte Sialylierung der mit SDS-Page separierten Glycoproteine.

Zusammengefasst haben wir die Verbindungen der allgemeinen Struktur **1** als generelle und potente Fluoreszenzsonden für Sialyltransferasen etabliert. Die entwickelten

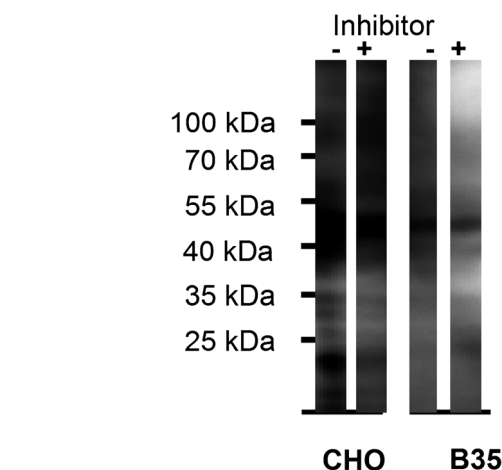


Abbildung 4. Lektin-Blot: CHO- oder B35-Zellen wurden in Abwesenheit (–) oder Gegenwart (+) von 1-G-m (50 μM) für 24 h gezüchtet. Die Zellen wurden geerntet und in RIPA-Puffer homogenisiert. Identische Mengen (50 μg) der Zelllysate wurden auf jede Tasche aufgetragen, und eine SDS-Page wurde durchgeführt. Die Proteine wurden geblottet und sialylierte Proteine mit biotinyliertem Limax Flavus Agglutinin (LFA) (1:5000) sowie Streptavidin-markierter Meerrettichperoxidase (1:20000) detektiert.

Sonden erwiesen sich als hochaktiv gegenüber den vier getesteten rekombinanten Sialyltransferasen, die von Säugtieren stammen oder bakterieller Herkunft sind und im Zeitraum dieser Untersuchungen die einzigen vier kommerziell verfügbaren Enzyme waren. Die Bindung der Sonden an die STs wurde in Fluoreszenzpolarisationsexperimenten untersucht, wobei Anisotropiemessungen für die Etablierung eines robusten kompetitiven Bindungsassays für jede der in dieser Studie verwendeten STs eingesetzt wurde. Die ausgewählte Sonde (S)-1-G-m war hoch zellgängig und fand sich in den Zellkern umgebenden Kompartimenten, möglicherweise dem trans-Golgi-Netzwerk. Ferner inhibierte (S)-1-G-m die Proteinsialylierung in zwei Zelllinien. Dieser Befund generiert neue wissenschaftliche Möglichkeiten sowie Forschungsrichtungen und wirft zugleich zusätzliche Fragen auf. Als nächstes werden die zellgängigen Sonden in weiteren funktionellen biologischen Studien untersucht, um ihr Potential als Inhibitoren der Membransialylierung in lebenden Zellen genau zu überprüfen und den Effekt der veränderten zellulären Dekoration mit Sialinsäureresten zu studieren. Weiter gilt es den mutmaßlichen Membranrezeptor zu identifizieren, der für die vesikuläre Aufnahme der Sonden verantwortlich ist. Abschließend sind die Sonden derzeit im Screening chemischer Bibliotheken zur Suche kleiner Molekül-inhibitoren von Sialyltransferasen im Einsatz, die in Zukunft als innovativer therapeutische Ansatz gegen Krebszellen getestet werden könnten.^[27]

Eingegangen am 14. Januar 2014
Online veröffentlicht am 15. April 2014

Stichwörter: Fluoreszenzpolarisation · Metastasierung · Neuraminsäure · Proteinbindende Sonden · Sialyltransferasen

- [1] a) N. M. Varki, A. Varki, *Lab. Invest.* **2007**, *87*, 851–857; b) A. Varki, *Glycoconjugate J.* **2009**, *26*, 231–245; c) P. R. Crocker, J. C. Paulson, A. Varki, *Nat. Rev. Immunol.* **2007**, *7*, 255–266; d) J. N. Arnold, M. R. Wormald, R. B. Sim, P. M. Rudd, R. A. Dwek, *Annu. Rev. Immunol.* **2007**, *25*, 21–50.
- [2] a) K. Ley, *Trends Mol. Med.* **2003**, *9*, 263–268; b) R. Schauer, *Glycoconjugate J.* **2001**, *17*, 485–499.
- [3] a) T. Meyer, I. R. Hart, *Eur. J. Cancer* **1998**, *34*, 214–221; b) R. Kannagi, M. Izawa, T. Koike, K. Miyazaki, N. Kimura, *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 377–384.
- [4] a) H. C. Carcinomas, F. Schneider, W. Kemmner, W. Haensch, G. Franke, S. Gretscher, U. Karsten, P. M. Schlag, *Cancer Res.* **2001**, *61*, 4605–4611; b) M. J. Vierbuchen, W. Fruechtlich, S. Brackrock, K. T. Krause, T. J. Zienkiewicz, *Cancer* **1995**, *76*, 727–735; c) S. Ogata, I. Ho, A. Chen, H. C. Mucosa, D. Dubois, J. Maklansky, A. Singhal, S. Hakomori, S. H. Itzkowitz, *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1869–1874; d) M. A. Liebert, M. Lise, C. Belluco, S. P. Perera, R. Patel, P. Thomas, L. E. T. Al, *Hybridoma* **2000**, *19*, 281–286.
- [5] A. Harduin-Leapers, V. Vallejo-Ruiz, M.-A. Krzewinski-Recchi, B. Samyn-Petit, S. Julien, P. Delannoy, *Biochimie* **2001**, *83*, 727–737.
- [6] a) M. M. Fuster, J. D. Esko, *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 526–542; b) F. Dall'Olio, M. Chiricolo, *Glycoconjugate J.* **2001**, *18*, 841–850; c) A. Cazet, S. Julien, M. Bobowski, M.-A. Krzewinski-Recchi, A. Harduin-Leapers, S. Groux-Degroote, P. Delannoy, *Carbohydr. Res.* **2010**, *345*, 1377–1383.
- [7] Einige Steroidderivate wurden als Inhibitoren einer 2,3-ST mit promiscuen Eigenschaften beschrieben: a) C.-Y. Wu, C.-C. Hsu, S.-T. Chen, Y.-C. Tsai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *284*, 466–473; b) W.-W. Chang, C.-Y. Yu, T.-W. Lin, P.-H. Wang, Y.-C. Tsai, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *341*, 614–619; c) C.-H. Chiang, C.-H. Wang, H.-C. Chang, S. V. More, W.-S. Li, W.-C. Hung, *J. Cell. Physiol.* **2010**, *792*–799.
- [8] Für einen aktuellen Bericht über das Substratumsatz-basierte Screening nach Sialyltransferaseinhibitoren siehe: C. D. Rillahan, S. J. Brown, A. C. Register, H. Rosen, J. C. Paulson, *Angew. Chem.* **2011**, *123*, 12742–12745; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 12534–12537.
- [9] a) A. Belouqui, J. Calvo, S. Serna, S. Yan, I. B. Wilson, M. Martin-Lomas, N. C. Reichardt, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 7625–7629; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7477–7481; b) L. Ban, N. Pettit, L. Li, A. D. Stuparu, L. Cai, W. Chen, W. Guan, W. Han, P. G. Wang, M. Mrksich, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 769–773.
- [10] a) H. Kayser, R. Zeitler, C. Kannicht, D. Grunow, R. Nuck, W. Reutter, *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16934–16938; b) O. T. Keppler, R. Horstkorte, M. Pawlita, C. Schmidt, W. Reutter, *Glycobiology* **2001**, *11*, 11R–18R; c) C. Oetke, R. Brossmer, L. R. Mantey, S. Hinderlich, R. Isecke, W. Reutter, O. T. Keppler, M. Pawlita, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6688–6695.
- [11] E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* **2000**, *287*, 2007–2010.
- [12] a) B. Müller, C. Schaub, R. R. Schmidt, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 3021–3024; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 2893–2897; b) K. H. Jung, R. Schwörer, R. R. Schmidt, *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **2003**, *15*, 275–289.
- [13] L. Ni, H. A. Chokhawala, H. Cao, R. Henning, L. Ng, S. Huang, H. Yu, X. Chen, A. J. Fisher, *Biochemistry* **2007**, *46*, 6288–6298.
- [14] F. V. Rao, J. R. Rich, B. Rakić, S. Buddai, M. F. Schwartz, K. Johnson, C. Bowe, W. W. Wakarchuk, S. DeFrees, S. G. Withers, N. C. J. Strynadka, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2009**, *16*, 1186–1188.
- [15] D. Pogatchnik, D. Wiemer, *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 3495–3498.
- [16] F. M. Rossi, J. P. Y. Kao, *Bioconjugate Chem.* **1997**, *8*, 495–497.
- [17] a) D. M. Whitfield, S. P. Douglas, T.-H. Tang, I. G. Csizmadia, H. Y. S. Pang, F. L. Moolten, J. J. Krepinsky, *Can. J. Chem.* **1994**, *72*, 2225–2238; b) Y. Kajihara, T. Ebata, K. Koseki, H. Kodama, H. Matsushita, H. Hironobu, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5732–5735.
- [18] D. R. Vutukuri, P. Bharathi, Z. Yu, K. Rajasekaran, M.-H. Tran, S. Thayumanavan, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 1146–1149.
- [19] Y. Lee, Y. Kim, K.-Y. Lee, K.-S. Kim, B. Kim, H.-N. Kim, C.-H. Kim, S.-O. Do, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *360*, 41–46.
- [20] M. A. Williams, H. Kitagawa, A. K. Datta, J. C. Paulson, J. C. Jamieson, *Glycoconjugate J.* **1995**, *12*, 755–761.
- [21] H. Yu, H. Chokhawala, R. Karpel, H. Yu, B. Wu, J. Zhang, Y. Zhang, Q. Jia, X. Chen, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17618–17619.
- [22] M. Sun, Y. Li, H. A. Chokhawala, R. Henning, X. Chen, *Bio-technol. Lett.* **2008**, *30*, 671–676.
- [23] A. Song, J. Zhang, M. Zhang, T. Shen, J. Tang, *Colloids Surf. A* **2000**, *167*, 253–262.
- [24] X. Huang, A. Aulabaugh, *Methods Mol. Biol.* **2009**, *565*, 127–143.
- [25] Z. Nikolovska-Coleska, R. Wang, X. Fang, H. Pan, Y. Tomita, P. Li, P. P. Roller, K. Krajewski, N. G. Saito, J. A. Stuckey, et al., *Anal. Biochem.* **2004**, *332*, 261–273.
- [26] R. E. Pagano, O. C. Martin, H. C. Kang, R. P. Haugland, *J. Cell Biol.* **1991**, *113*, 1267–1279.
- [27] Für die Entwicklung und Applikation metabolischer Inhibitoren der zellulären Sialylierung siehe: a) C. D. Rillahan, A. Antonopoulos, C. T. Lefort, R. Sonon, P. Azadi, K. Ley, A. Dell, S. M. Haslam, J. C. Paulson, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 661–668; b) C. Büll, T. J. Boltje, M. Wassink, A. M. A. de Graaf, F. L. van Delft, M. H. den Brok, G. J. Adema, *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 1935–1946.