



Chemoproteomik-vermittelte Entdeckung eines potenten und selektiven Inhibitors des DNA-Reparaturproteins MGMT

Chao Wang⁺, Daniel Abegg⁺, Dominic G. Hoch und Alexander Adibekian*

Abstract: Wir präsentieren ein neues chemisches Gerüst für Cystein-reaktive Inhibitoren. Die Chlormethyltriazole (CMTs) werden in nur zwei chemischen Schritten erhalten, was eine schnelle Optimierung der pharmakologischen Eigenschaften dieser Inhibitoren möglich macht. Wir demonstrieren die Optimierung der CMTs für ein biologisches Target durch die Synthese von AA-CW236 als ersten, potenten Nicht-Pseudo-substrat-Inhibitor der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), ein Protein von hoher klinischer Bedeutung für die Behandlung mehrerer Krebsarten. Durch die Nutzung quantitativer Proteomiktechniken zeigen wir, dass AA-CW236 eine hohe Selektivität für MGMT aufweist. Schlussendlich validieren wir die Effektivität unseres MGMT-Inhibitors in Kombination mit der DNA-alkylierenden Substanz Temozolomid in Brust- und Dickdarmkrebszelllinien mithilfe von konfokaler Fluoreszenzmikroskopie und Zellviabilitätsassays. Unsere Ergebnisse könnten zur Entwicklung eines klinisch zugelassenen MGMT-Inhibitors beitragen.

DNA ist ein chemisch angreifbares Molekül und unsere Zellen haben ausgeklügelte Reparaturmechanismen entwickelt, um die Integrität und Stabilität von DNA zu erhalten.^[1] Das DNA-Reparaturprotein O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) überführt die natürlich vorkommende DNA-Modifikation O⁶-Methylguanin zurück in das Guanin.^[2] Während dieses Vorgangs wird die O⁶-Methylgruppe auf den Cysteinrest im aktiven Zentrum von MGMT übertragen, was zu dessen irreversiblen Inaktivierung führt. Diese Eigenschaft von MGMT wurde für die Entwicklung eines Proteintags ausgenutzt.^[3] Unglücklicherweise repariert MGMT auch Schäden, die durch DNA-Alkylanzien in Krebszellen verursacht werden.^[4] Zum Beispiel kann die Aktivität von MGMT in Hirntumoren bis zu 300-fach variieren und es gibt einen klaren Zusammenhang zwischen den hohen MGMT-Werten in Patienten und Fällen, in denen eine Chemotherapie mit Alkylanzien fehlschlug.^[5] Pseudosubstrat-Inhibitoren wie O⁶-Benzylguanin und O⁶-(4-Bromthienyl)guanin (Lomeguatrib) alkylieren irreversibel den Cysteinrest im aktiven Zentrum von MGMT und wurden deshalb

in Kombination mit DNA-Alkylanzien in klinischen Studien getestet.^[6] Phase-I-Studien, in welchen Kombinationen des DNA-alkylierenden Temozolomid und Lomeguatrib eingesetzt wurden, waren erfolgreich und zeigten einen effektiven Rückgang der MGMT-Aktivität und ein häufigeres Vorkommen des gewünschten O⁶-MeG-Addukts in Patienten mit verschiedenen Krebsarten.^[7] Leider verursachen DNA-Alkylanzien wie Temozolomid in Patienten auch eine schwere Myelosuppression, die bei zusätzlicher Administration von MGMT-Pseudosubstraten sogar verstärkt wird.^[8] Interessanterweise variiert der Grad der Myelosuppression deutlich zwischen den verschiedenen Pseudosubstraten, was hoffen lässt, dass sich diese schwere Nebenwirkung durch neue MGMT-Inhibitoren zumindest abmildern lässt.^[9] Paradoxerweise bildet die Reaktion zwischen den hochdosierten MGMT-Pseudosubstraten und dem eigentlichen Protein freie Guaninbasen als Nebenprodukt, die von Krebszellen zur Synthese neuer DNA genutzt werden können, was genau den gegenteiligen Effekt hervorruft, den viele Antikrebsmittel zu erzielen versuchen.^[10] Daher glauben wir, dass es neuer MGMT-Inhibitoren bedarf, die nicht auf O⁶-Alkylguanin basieren. Wir präsentieren hier Chlormethyltriazole (CMT), die auf einem leicht modifizierbaren chemischen Grundgerüst beruhen, das in nur zwei Syntheseschritten erhalten werden kann. Dies ermöglicht die schnelle Herstellung großer Serien von Wirkstoffen und die Optimierung der Potenz und Selektivität der Inhibitoren. Durch Anwendung von Methoden aus der Biochemie, Zellbiologie und quantitativer Proteomik entdecken und evaluieren wir AA-CW236 als den ersten potenten und selektiven MGMT-Hemmer, der kein Pseudosubstrat darstellt.

Kovalente Inhibitoren erleben gerade eine Renaissance der Bekanntheit in der pharmazeutischen Forschung.^[11] Bei den Chlormethyltriazolen als Cystein-reaktive, kovalente Inhibitoren (Abbildung 1 A) wurden wir von der Form N-heterocyclischer Carbenliganden inspiriert. In diesen in der Katalyse genutzten Liganden sind beide Stickstoffsubstituenten auf das reaktive Metallzentrum gerichtet, um es somit sterisch zu schützen.^[12] Wir stellten die Hypothese auf, dass aufgrund der Nähe zur Chlormethylgruppe die Gruppen R¹ und R² sowohl die chemische Reaktivität als auch die Selektivität der Inhibitoren stark beeinflussen.

Um zu testen, ob die CMTs kovalent mit proteomischen Cysteinen reagieren, synthetisierten wir die klickbare Sonde AA-CW159A (**1**; Abbildung 1 B). Daraufhin behandelten wir Lysat aus der Brustkrebszelllinie MCF7 mit 10 µM der Sonde **1**, ließen es über Kupfer(I)-katalysierte Alkin-Azid-Cycloaddition (CuAAC) mit TAMRA-Alkin reagieren, trennten es mit SDS-PAGE auf und machten die markierten Proteine mithilfe eines Fluoreszenzscanners sichtbar. Mehrere Banden

[*] C. Wang,^[†] D. Abegg,^[†] D. G. Hoch, Prof. Dr. A. Adibekian
School of Chemistry and Biochemistry, NCCR Chemical Biology,
University of Geneva
30 quai Ernest-Ansermet, Geneva (Schweiz)
E-Mail: alexander.adibekian@unige.ch

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Synthese der Stoffe, Zellkultur, Bioassays, Markierung und Probenvorbereitung für Proteomik und Massenspektrometrie) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201511301> zu finden.

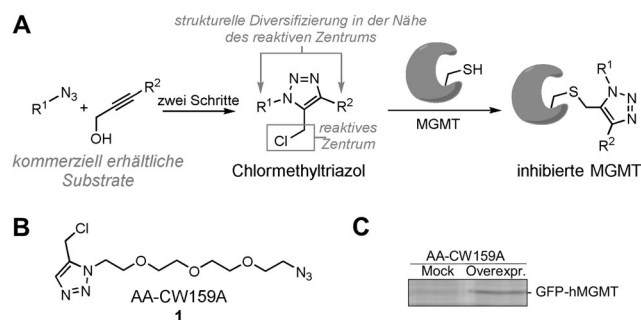


Abbildung 1. Testen der Reaktivität einer klickbaren Chlormethyltriazol-Sonde. A) Ein allgemeines Reaktionsschema, welches das Konzept der synthetischen Zugänglichkeit der CMTs und den erwarteten Mechanismus der MGMT-Inhibition zeigt. B) Chemische Struktur der klickbaren CMT-Sonde **1** (AA-CW159A). C) Gelbasierte Fluoreszenzmarkierung von Mock- oder GFP-hMGMT-transfizierten MCF-7-Lysaten (komplette Bilder sind in Abbildung S2 dargestellt).

wurden detektiert, und die Fluoreszenzmarkierung wurde durch die Vorbehandlung der Cystein-reaktiven Sonde Iodacetamid komplett aufgehoben, was zeigt, dass **1** eine hohe Präferenz für die Markierung von Cysteinen gegenüber anderen nukleophilen Aminosäuren hat (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Als Nächstes führten wir ein Proteomik-Experiment durch, um zu ermitteln, ob MGMT von der Sonde **1** markiert und angereichert werden kann. Hierfür wurden MCF7-Zelllysate mit 10 μM der Sonde **1** behandelt, an Biotin-Alkin gekuppelt, mithilfe von Streptavidin-Beads angereichert und mit LC-MS/MS analysiert. Neben mehreren angereicherten Proteinen wurde MGMT als Target der Sonde **1** identifiziert (Tabelle S1). Wir bestätigten, dass die CMT-Modellsonde **1** in der Tat in der Lage ist, kovalent an MGMT zu binden, indem wir GFP-markiertes hMGMT in MCF7-Zellen überexprimierten und eine gelbasierte Fluoreszenzmarkierung mit **1** durchführten. Eine neue Bande bei 52 kDa zeigte die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen der CMT-Sonde und MGMT auf (Abbildungen 1C und S2).

Durch diese Ergebnisse ermutigt, stellten wir eine kleine Sammlung an 1,4-substituierten CMTs **2–19** zusammen (Abbildung 2A). Beginnend mit kommerziell erhältlichen Alkylaziden und substituierten Propargylalkoholen wurden durch thermische Azid-Alkin-Cycloaddition 5-Hydroxymethyltriazole erhalten. Alternativ für temperatursensitive Substrate konnten die Triazole auch effizient mittels Ruthenium-katalysierter Azid-Alkin-Cycloaddition (RuAAC)^[13] zugänglich gemacht werden. Im Fall beider Methoden wurde meistens das 1,4-substituierte Isomer als Hauptprodukt erhalten, das durch Säulenchromatographie vom 1,5-substituierten Isomer getrennt werden konnte. Schließlich wurden die Hydroxymethyltriazole durch Mesylierung und nukleophile Substitution mit Tetrabutylammoniumchlorid in einem Schritt in die entsprechenden Chloride umgewandelt. Die 1,4-substituierte Konfiguration der CMTs wurde eindeutig mittels Röntgenstrukturanalyse (für fünf CMTs) und HMBC-NMR-Analyse der Alkohol-Vorstufen bestimmt. Darüber hinaus entwickelten wir ein gelbasiertes, kompetitives Protein-Profilingsperiment, um potente MGMT-Binder zu

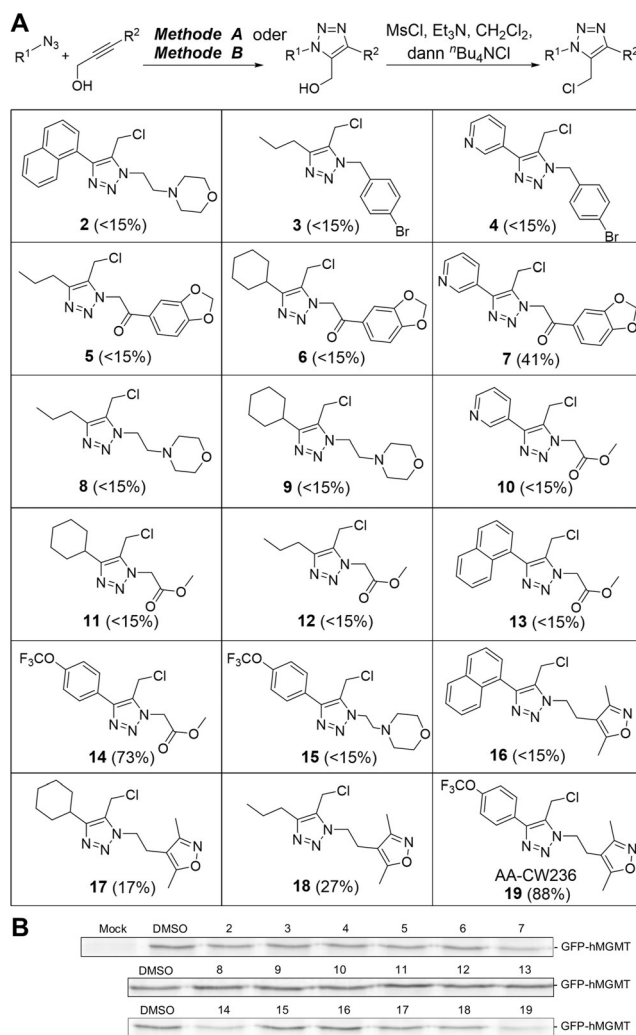


Abbildung 2. Synthese und gelbasiertes Screening der 1,4-substituierten CMTs. A) Allgemeine Synthesestrategie für 1,4-substituierte CMTs und chemische Strukturen der CMTs **2–19** (Methode A: PhMe, 125 °C; Methode B: Cp*Ru(PPh₃)₂Cl (2 Mol-%), PhMe, 80 °C). Werte in Klammern geben den Prozentsatz der Konkurrenz der GFP-hMGMT-Markierung mit der Sonde **1** (AA-CW159A) an. Alle Stoffe wurden bei einer Konzentration von 200 nM getestet. B) Bilder des gelbasierten kompetitiven Screenings der CMTs **2–19**.

identifizieren. Zelllysate mit überexprimierten hMGMT wurden erst mit den Substanzen bei 200 nM und darauffolgend mit der Sonde **1** behandelt (Abbildungen 2A,B und S3). Während die meisten CMTs die Fluoreszenzmarkierung von MGMT nicht aufhoben, wurde eine > 70 % Konkurrenz mit dem Triazol **14** beobachtet. Auch für die CMTs **17** und **18** wurde eine beachtliche Aktivität detektiert. Jedoch wurde die beste Aktivität (88 %) bei der Substanz **19** (AA-CW236) ermittelt, welche die folgenden beiden Strukturelemente aufweist: eine 3,5-Dimethylisoxazol- und eine 4-(Trifluormethoxy)phenyl-Gruppe (Abbildung 2B und S4).

Da hMGMT fünf verschiedene Cysteine aufweist, war es wichtig sicherzustellen, dass die CMTs tatsächlich mit Cys¹⁴⁵ im aktiven Zentrum reagieren. Im Gegensatz zum überexprimierten Wildtyp-Protein wurde die Mutante C145A nicht von der Sonde **1** markiert, was bedeutet, dass die CMTs ex-

wir mehrere Peptide, die zu > 66% kompetitiert wurden und von Proteinen wie der Arginin-tRNA-Ligase RARS, dem Guanin-Nukleotidbindprotein GNB2 und Dynamin-2 stammten (Abbildung S8, Tabelle S5).

Um den molekularen Hintergrund der beobachteten Potenz von AA-CW236 gegenüber hMGMT zu verstehen, führten wir mit der hochaufgelösten Röntgenstruktur von hMGMT (PDB:1EH6) und dem Protein-Ligand-Dockingprogramm GOLD^[21] ein kovalentes Docking durch (Abbildung 4A). Der vom Programm berechnete optimale Bindungsmodus weist auf eine essentielle Interaktion zwischen

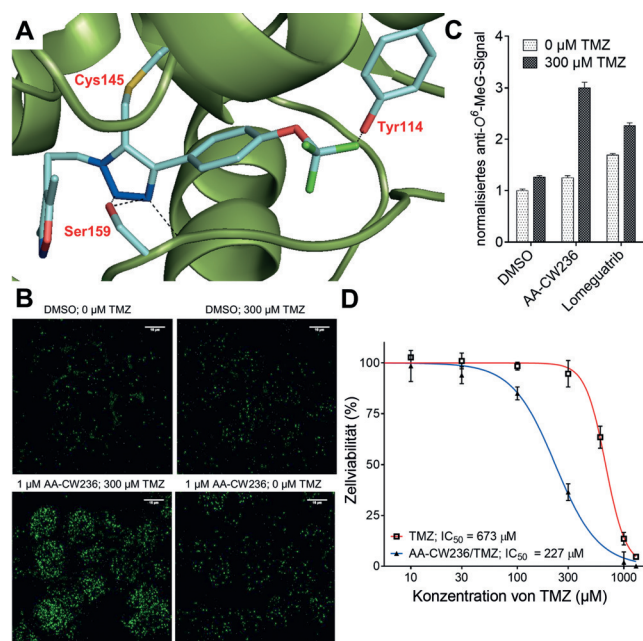


Abbildung 4. Vorgeschlagerener Bindungsmodus und der Sensibilisierungseffekt von AA-CW236. A) Erhaltenes Modell von AA-CW-235, das kovalent an das Cys¹⁴⁵ des menschlichen MGMT bindet. B) Detektion der O⁶-Alkylierung von Guanin mit Anti-O⁶-MeG-Antikörper nach 12 h Behandlung mit entweder DMSO oder AA-CW236, gefolgt Zugabe von \pm Temozolomid. (konfokale Mikroskopiebilder; weiße Skalenbalken entsprechen 10 μ m). C) Quantifizierung der Guanin-O⁶-Alkylierungsfärbung (relative Werte \pm SEM, $n=3$). Die Werte wurden gegen DAPI-Färbung normalisiert. D) Caco-2-Zellviabilitätskurve nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von TMZ mit oder ohne 3 μ M AA-CW236 ($n=3$).

der Trifluormethoxygruppe von AA-CW236 und Tyr¹¹⁴ hin und zeigt außerdem eine mögliche Interaktion zwischen der Triazolgruppe und Ser¹⁵⁹ auf. Der Bindungsmodus für AA-CW236 ergab einen GoldScore von 46.0, wohingegen deutlich niedrigere Werte (35–40) für die weniger aktiven Derivate **8**, **9** und **11** erhalten wurden, was das vorgeschlagene Modell stützt. Um die Rolle der CF₃-Gruppe in der Interaktion mit hMGMT zu untersuchen, stellten wir darüber hinaus zwei strukturell eng verwandte Derivate von AA-CW236 her, die diese Funktionalität nicht aufweisen. Nachträgliche gelbasierte Messungen der IC₅₀-Werte bestätigten, dass diese Substanzen tatsächlich deutlich weniger aktiv als AA-CW236 sind (Abbildung S9).

Zuletzt versuchten wir herauszufinden, ob die wirksame Inhibition von hMGMT durch AA-CW236 auch zu erhöhter O⁶-Methylierung führt, vor allem in Kombination mit dem Zytostatikum Temozolomid (TMZ). TMZ wird derzeit klinisch für die First-Line-Therapie des Glioblastoms und zur Nebenbehandlung des Astrozytoms genutzt.^[22] Mithilfe eines auf O⁶-Methylguanin gerichteten Antikörpers und konfokaler Mikroskopie visualisierten wir direkt im Zellkern befindliches O⁶-methyliertes Guanin in MCF7-Zellen (Abbildungen 4B und S10). Die Behandlung der Zellen mit 300 μ M TMZ für 3 h führte lediglich zu einem rund 25%igen Anstieg der O⁶-Methylguanin-Färbung. Administration von 1 μ M AA-CW236 in MCF7-Zellen führte zu einem ähnlich niedrigen Anstieg an Guanin-Methylierung. Als wir allerdings beide Stoffe simultan zu den Zellen gaben, ermittelten wir einen stabilen dreifachen Anstieg der O⁶-Methylguanin-Färbung (Abbildungen 4C und S10). Interessanterweise war die beobachtete Sensibilisierung^[15] der MCF7-Zellen deutlich stärker als die Sensibilisierung, die durch die Kombination von TMZ mit dem bestdokumentierten^[9] MGMT-Pseudosubstrat Lomeguatrib beobachtet wurde (Abbildung S10). Außerdem wurde dieser Sensibilisierungseffekt auch in Zellviabilitätsassays in Caco-2-Zellen beobachtet, die eine vergleichsweise hohe MGMT-Aktivität (Abbildung 3C) aufweisen und resistent gegenüber TMZ sind.^[23] Simultane Behandlung mit 3 μ M AA-CW236 und TMZ reduzierten deutlich die Lebensfähigkeit der Zellen, im Gegensatz zu den einzelnen Zugaben von entweder TMZ (Abbildung 4D) oder AA-CW236 (Abbildung S11).

Zusammenfassend haben wir ein neues chemisches Grundgerüst für kovalente Cystein-reaktive Inhibitoren präsentiert. Die schnelle und modulare Synthese von strukturell diversen Chlormethyltriazolen führte zur Entdeckung von AA-CW236, einem potenten, niedrig-nanomolaren Nicht-Pseudosubstrat-Inhibitor von MGMT. Durch verschiedenste gel- und MS-basierte Proteom-Profilierungstechniken demonstrierten wir, dass AA-CW236 in Zellen aktiv ist und eine hohe Selektivität für MGMT aufweist. Außerdem wurde ein starker Sensibilisierungseffekt in MCF7- und Caco-2-Zellen beobachtet, wenn AA-CW236 zusammen mit dem DNA-alkylierenden Pharmakon TMZ appliziert wurde. Auch wenn es keine Garantie gibt, dass dieser besondere Stoff in klinischen Studien erfolgreich sein wird, so glauben wir sehr, dass die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass sich der Aufwand lohnt, bessere MGMT-Inhibitoren zu finden.

Danksagung

Wir danken der University of Geneva, der Swiss National Science Foundation und dem NCCR Chemical Biology für finanzielle Unterstützung.

Stichwörter: Aktivitätsbasiertes Protein-Profilierung · Massenspektrometrie · MGMT · Proteomik · Wirkstoffentwicklung

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 2911–2915
Angew. Chem. **2016**, 128, 2964–2968

- [1] T. Lindahl, R. D. Wood, *Science* **1999**, 286, 1897–1905.
- [2] A. E. Pegg, M. E. Dolan, R. C. Moschel, *Prog. Nucleic Acid Res.* **1995**, 51, 167–223.
- [3] A. Juillerat, T. Gronemeyer, A. Keppler, S. Gendreizig, H. Pick, H. Vogel, K. Johnsson, *Chem. Biol.* **2003**, 10, 313–317.
- [4] M. Esteller, J. G. Herman, *Oncogene* **2004**, 23, 1–8.
- [5] J. R. Silber, A. Blank, M. S. Bobola, S. Ghatan, D. D. Kolstoe, M. S. Berger, *Clin. Cancer Res.* **1999**, 5, 807–814.
- [6] a) M. R. Middleton, G. P. Margison, *Lancet Oncol.* **2003**, 4, 37–44; b) A. Sabharwal, M. R. Middleton, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2006**, 6, 355–363.
- [7] a) M. Ranson, M. R. Middleton, J. Bridgewater, S. M. Lee, M. Dawson, D. Jowle, G. Halbert, S. Waller, H. McGrath, L. Gumbrell, R. S. McElhinney, D. Donnelly, T. B. H. McMurphy, G. P. Margison, *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12, 1577–1584; b) A. J. Watson, M. R. Middleton, G. McGown, M. Thorncroft, M. Ranson, P. Hersey, G. McArthur, I. D. Davis, D. Thomson, J. Beith, A. Haydon, R. Kefford, P. Lorigan, P. Mortimer, A. Sabharwal, O. Hayward, G. P. Margison, *Br. J. Cancer* **2009**, 100, 1250–1256.
- [8] H. A. Tawbi, L. Villaruz, A. Tarhini, S. Moschos, M. Sulecki, F. Viverette, J. Shipe-Spotloe, R. Radkowski, J. M. Kirkwood, *Br. J. Cancer* **2011**, 105, 773–777.
- [9] O. Khan, M. R. Middleton, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2007**, 16, 1573–1584.
- [10] W. B. Parker, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2880–2893.
- [11] a) L. Guterman, *Chem. Eng. News* **2011**, 89, 19–26; b) J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, 10, 307–317; c) D. S. Johnson, E. Weerapana, B. F. Cravatt, *Future Med. Chem.* **2010**, 2, 949–964.
- [12] S. Díez-González, N. Marion, S. P. Nolan, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 3612–3676.
- [13] L. K. Rasmussen, B. C. Boren, V. V. Fokin, *Org. Lett.* **2007**, 9, 5337–5339.
- [14] a) R. Kitz, I. B. Wilson, *J. Biol. Chem.* **1962**, 237, 3245–3249; b) P. Bey, F. N. Bolkenius, N. Seiler, P. Casara, *J. Med. Chem.* **1985**, 28, 1–2; c) T. Wirth, K. Schmuck, L. F. Tietze, S. A. Sieber, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 2874–2877; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 2928–2931.
- [15] M. Clemons, J. Kelly, A. J. Watson, A. Howell, R. S. McElhinney, T. B. H. McMurphy, G. P. Margison, *Br. J. Cancer* **2005**, 93, 1152–1156.
- [16] a) C. Robinson, J. Palomo, M. A. Vogelbaum, *Anal. Biochem.* **2010**, 405, 263–265; b) K. Ishiguro, K. Shyam, P. G. Penketh, A. C. Sartorelli, *Anal. Biochem.* **2008**, 383, 44–51.
- [17] a) M. Uttamchandani, C. H. S. Lu, S. Q. Yao, *Acc. Chem. Res.* **2009**, 42, 1183–1192; b) L. I. Willems, W. A. Van der Linden, N. Li, K. Y. Li, N. Liu, S. Hoogendoorn, G. A. Van der Marel, B. I. Florea, H. S. Overkleeft, *Acc. Chem. Res.* **2011**, 44, 718–729; c) G. C. Rudolf, W. Heydenreuter, S. A. Sieber, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2013**, 17, 110–117.
- [18] D. Abegg, R. Frei, L. Cerato, D. P. Hari, C. Wang, J. Waser, A. Adibekian, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 10852–10857; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 11002–11007.
- [19] a) E. Weerapana, C. Wang, G. M. Simon, F. Richter, S. Khare, M. B. D. Dillon, D. A. Bachovchin, K. Mowen, D. Baker, B. F. Cravatt, *Nature* **2010**, 468, 790–U779; b) C. Wang, E. Weerapana, M. M. Blewett, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2014**, 11, 79–85; c) M. Abo, E. Weerapana, *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 137, 7087–7090.
- [20] B. R. Lanning, L. R. Whitby, M. M. Dix, J. Douhan, A. M. Gilbert, E. C. Hett, T. Johnson, C. Joslyn, J. C. Kath, S. Niessen, L. R. Roberts, M. E. Schnute, C. Wang, J. J. Hulce, B. X. Wei, L. O. Whiteley, M. M. Hayward, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, 10, 760–767.
- [21] M. L. Verdonk, J. C. Cole, M. J. Hartshorn, C. W. Murray, R. D. Taylor, *Proteins Struct. Funct. Genet.* **2003**, 52, 609–623.
- [22] M. E. Hegi, A. Diserens, T. Gorlia, M. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J. M. Kros, J. A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J. E. C. Bromberg, P. Hau, R. O. Mirimanoff, J. G. Cairncross, R. C. Janzer, *N. Engl. J. Med.* **2005**, 352, 997–1003.
- [23] T. Strittmatter, A. Brockmann, M. Pott, A. Hantusch, T. Brunner, A. Marx, *ACS Chem. Biol.* **2014**, 9, 282–290.

Eingegangen am 6. Dezember 2015

Online veröffentlicht am 22. Januar 2016