



Chemoproteomik-vermittelte Entdeckung eines potenteren 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, potenteren Nicht-Pseudosubstrat-Inhibitor der O^6 -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 O^6 -Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) überführt die natürlich vorkommende DNA-Modifikation O^6 -Methylguanin zurück in das Guanin.^[2] Während dieses Vorgangs wird die O^6 -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 O^6 -Benzylguanin und O^6 -(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 O^6 -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 O^6 -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 potenteren 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 1A) 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 1B). 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.

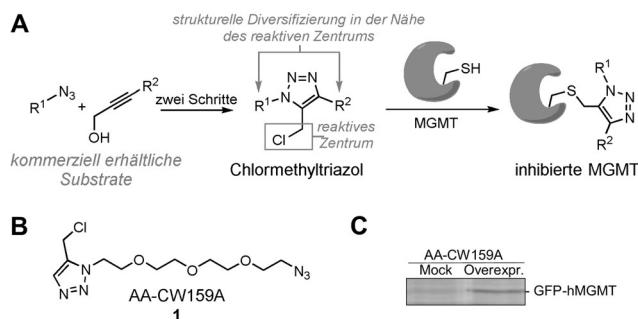


Abbildung 1. Testen der Reaktivität einer klickbaren Chlormethyltriazol-Sonde. A) Ein allgemeines Reaktionsschema, welches das Konzept der synthetischen Zugänglichkeit der CMTs und den erwarteten Mechanismus der MGMT-Inhibition zeigt. B) Chemische Struktur der klickbaren CMT-Sonde **1** (AA-CW159A). 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-Profilinexperiment, um potente MGMT-Binder zu

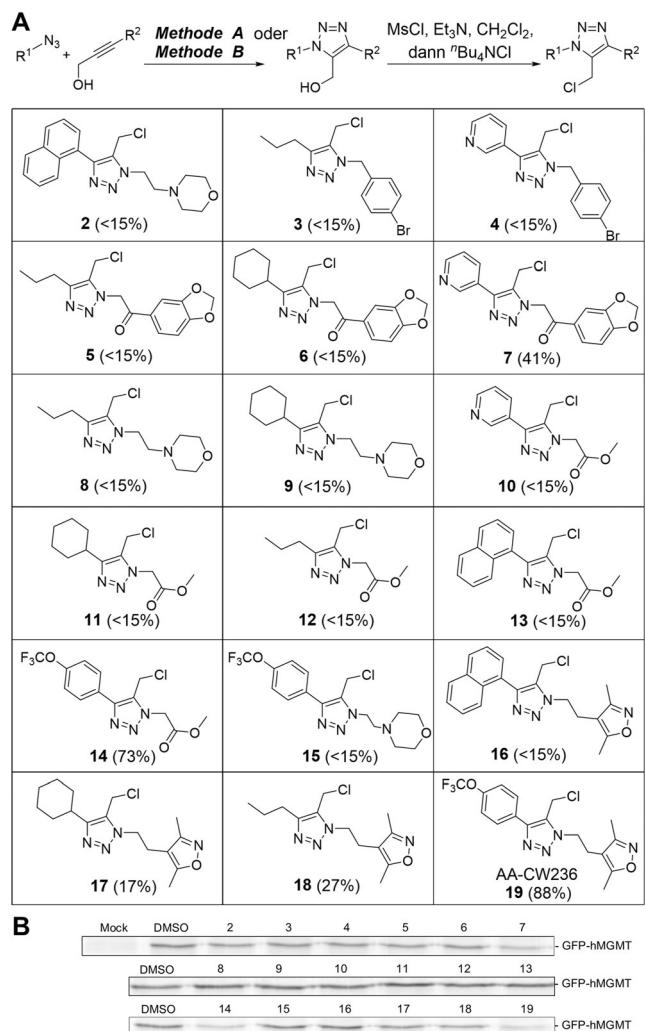


Abbildung 2. Synthese und gelbasiertes Screening der 1,4-substituierten CMTs. A) Allgemeine Synthesestrategie für 1,4-substituierte CMTs und chemische Strukturen der CMTs **2–19** (Methode A: PhMe, 125 °C; Methode B: Cp*Ru(PPh₃)₂Cl (2 Mol-%), PhMe, 80 °C). Werte in Klammern geben den Prozentsatz der Kompetition 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 % Kompetition 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-

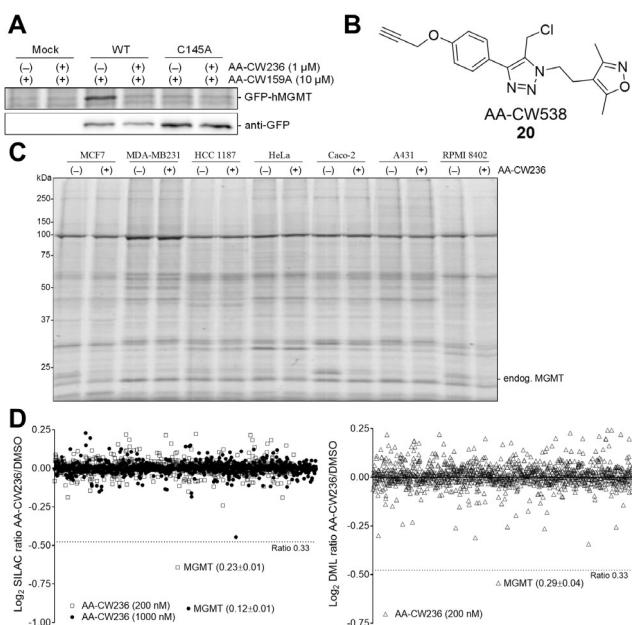


Abbildung 3. Evaluierung der proteomweiten Selektivität von AA-CW236. A) Die klickbare CMT Sonde AA-CW159A markiert das WT GFP-hMGMT, aber nicht die C145A-Mutante. B) Chemische Struktur der klickbaren CMT-Sonde **20** (AA-CW538). C) Gelbasiertes Profiling der MGMT-Aktivität und AA-CW236-Selektivität in den Proteomen verschiedener Krebszelllinien. Proteome wurden für 1 h mit DMSO oder 200 nm AA-CW236 behandelt und darauffolgend 1 h mit 30 μM AA-CW538. D) Evaluierung der AA-CW236-Selektivität durch quantitative Proteomik. Es werden Scatterblots mit den SILAC- und DML-Verhältnissen gezeigt. Links: SILAC-Verhältnisse der kompetitiven Experimente mit 200 nm ($n=3$) oder 1 μM ($n=4$) AA-CW236 gefolgt von 10 μM AA-CW159A. Rechts: DML-Verhältnisse der kompetitiven Experimente mit 200 nm AA-CW236 ($n=6$) gefolgt von 10 μM IAA-Alkin. Verhältnisse \pm SEM für MGMT sind dargestellt.

klusiv an Cys¹⁴⁵ binden (Abbildung 3 A). Weil AA-CW236 kovalent und irreversibel an MGMT bindet, nutzten wir die Methode von Kitz und Wilson, um die Konstanten K_1 und k_{inact} zu ermitteln.^[14] Unser Kinetik-Assay beruht auf Messung der Kompetition der Sonde **1** und nicht auf Substrat-Turnover und ist deshalb anwendbar für Proteine, die wie MGMT keine Enzyme sind. Ein berechneter K_1 -Wert von 24 nm demonstriert eindrucksvoll, dass AA-CW236 ein hochpotenter Inhibitor des menschlichen MGMT ist. Zum Vergleich: AA-CW236 ist genauso potent wie Lomeguatrib und etwa 10-fach potenter als *O*⁶-Benzylguanin (Abbildung S5). Jedoch glauben wir, dass Selektivität relevanter ist, um das klinische Potential von kovalenten Inhibitoren vorherzusagen.^[11] Daher evaluieren wir die Selektivität von AA-CW236 in einem gelbasierten Assay durch die Nutzung von MCF7-Lysaten mit überexprimierten hMGMT und der CMT-Sonde **1** (Abbildung S4). Wir ermittelten komplett Kompetition von MGMT nach Behandlung mit 300 nm AA-CW236, wohingegen kein anderes Target der Sonde **1** sichtbar beeinträchtigt wurde. Während sich das breite Profil der Sonde für die Experimente mit dem überexprimierten MGMT als nützlich erwies, erlaubte sie nicht, die Aktivität des nativen MGMT, wegen der vergleichsweise geringen Menge dieses Proteins, mittels der gelbasierten Methode zu

detektieren. Daher synthetisierten wir die MGMT-gerichtete Sonde **20**, ein klickbares Derivat des Inhibitors AA-CW236 (Schema S1).

Mit der neuen Sonde waren wir schließlich in der Lage, die Aktivität des nativen MGMTs in unterschiedlichen Krebszelllinien zu detektieren (Abbildung 3C und S6). Übereinstimmend mit der Literatur^[15] wurde eine hohe MGMT-Aktivität in der Brustkrebszelllinie MCF7 ermittelt. Zusätzlich fanden wir eine hohe Aktivität in der Krebszelllinie Caco-2 (Kolonkarzinom) und RPMI-8402 (Lymphoplastisches Lymphom). Der gelbasierte Assay zur Bestimmung der Aktivität von MGMT mit AA-CW538 sollte auch für klinische Proben anwendbar sein und sollte eine deutliche Verbesserung in der Einfachheit und dem Durchsatz gegenüber den gängigen Radioaktivitäts- und Northern-Blot-basierten MGMT-Aktivitätsassays darstellen.^[16] Bemerkenswerterweise wurde lediglich die MGMT-Bande selektiv nach einer Behandlung mit 200 nm AA-CW236 kompetitiert, wobei viele andere Proteine von der Sonde AA-CW538 bei einer Konzentration von 30 μM markiert wurden. Außerdem erwies sich die Sonde **20** als nützlich, um die Aktivität von AA-CW236 direkt in lebenden MCF7-Zellen zu messen (Abbildung S7). Das gelbasierte Profil zeigt, dass MGMT nach der Behandlung der Zellen für 10 h mit 100 nm AA-CW236 komplett inhibiert wurde.

MS-basierte Profilingmethoden bieten einen klaren Vorteil gegenüber gelbasierten Techniken, da eine viel größere Zahl an Proteinen in nur einem Experiment detektiert und quantifiziert werden kann.^[17] Daher führten wir ein kompetitives, aktivitätsbasiertes Protein-Profil in MCF7-Proteomen durch, das wir mit der Quantifizierung mittels stabiler Isotopenmarkierung von Aminosäuren in Zellkultur (SILAC) koppelten. Wir nutzten zwei verschiedene Konzentrationen des MGMT-Inhibitors AA-CW236, 200 nm (Tabelle S2) und 1 μM (Tabelle S3), und die CMT-Sonde **1** für die darauffolgende proteomische Anreicherung. Bemerkenswerterweise wurde unter den insgesamt 1039 quantifizierten Proteinen selbst bei einer Konzentration von 1 μM nur MGMT zu mehr als 66 % gebunden (SILAC-Verhältnis von 0.12 = 88 % Kompetition; Abbildung 3D). Außerdem führten wir ein weiteres kompetitives Proteomik-Experiment durch: Durch die Nutzung der allgemeinen Cystein-reaktiven Anreicherungsponde Iodacetamidalkin (IAA)^[18] folgten wir einer Catch-and-Release-Strategie, die wir anstatt mit SILAC mit der Dimethylmarkierung (DML) als Methode zur Quantifizierung koppelten. Diese Methode erlaubt eine selektive Anreicherung und Quantifizierung von Peptiden, die Cysteine enthalten und von IAA modifiziert wurden. Wieder beobachteten wir nach der Behandlung mit 200 nm AA-CW236 unter 1245 angereicherten und quantifizierten Peptiden nur ein Peptid, welches das Cystein im aktiven Zentrum von MGMT repräsentierte und zu mehr als 66 % kompetitiert wurde (Abbildung 3D, Tabelle S4). Das ist erstaunlich, wenn man bedenkt, dass das menschliche Proteom tausende von Cysteinen enthält, die mit elektrophilen Sonden reagieren können.^[18,19] Tatsächlich ist es so, dass selbst hochoptimierte und klinisch zugelassene Kinase-Inhibitoren zahlreiche Cysteine von Off-Targets binden.^[20] Zum Vergleich: Bei der Nutzung von 200 nm Lomeguatrib als Binder beobachteten

wir mehrere Peptide, die zu > 66 % kompetitiert wurden und von Proteinen wie der Arginin-tRNA-Ligase RARS, dem Guanin-Nukleotidbindeprotein 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 hochauflösten 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

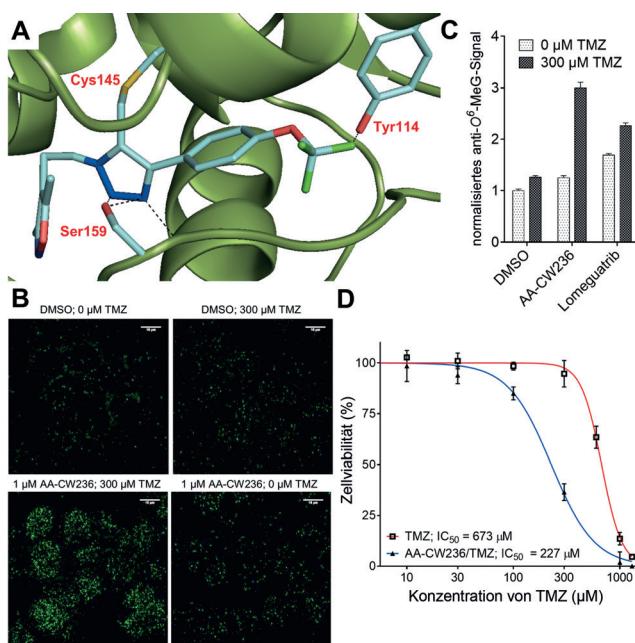


Abbildung 4. Vorgeschlagener Bindungsmodus und der Sensibilisierungseffekt von AA-CW236. A) Erhaltenes Modell von AA-CW236, das kovalent an das Cys¹⁴⁵ des menschlichen MGMT bindet. B) Detektion der O⁶-Alkylierung von Guanin mit Anti-O⁶-MeG-Antikörper nach 12 h Behandlung mit entweder DMSO oder AA-CW236, gefolgt Zugabe von ± Temozolomid. (konfokale Mikroskopiebilder; weiße Skalenbalken entsprechen 10 µm). C) Quantifizierung der Guanin-O⁶-Alkylierungs-Färbung (relative Werte ± 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 µM 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 gelbsierte 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 Inhibierung 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 µM TZ für 3 h führte lediglich zu einem rund 25 %igen Anstieg der O⁶-Methylguanin-Färbung. Administration von 1 µM 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 µM 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 potenteren, 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. McMurry, 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. McMurry, 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. Overkleef, *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, R. Stupp, *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