

Phänotyp-Assays im Screening

Die chemische Genetik entdeckt das (Zebra-)Fischen

Rolf Breinbauer*

Stichwörter:

Assays · Bioorganische Chemie · Hochdurchsatz-Screening · Kombinatorische Chemie

Während der letzten zwanzig Jahre ist es Biochemikern, Molekularbiologen und Genetikern gelungen, eine große Zahl neuer biologischer Targets zu identifizieren, die für die Heilung von Krankheiten nützlich sein könnten. Anfangs schien es, dass nur die Identifizierung chemischer Substanzen, die an diese Targets binden, fehlte, um diese Vielzahl therapeutischer Möglichkeiten zu nutzen. Mit der Kombinatorischen Chemie bekam die organische Synthese jenen Rückenwind, der die Herstellung der Zahl an Verbindungen ermöglichte, die ein Hochdurchsatz-Screeningsystem gegen ein spezifisches Zielprotein verarbeiten kann. Dieser Ansatz hat eine Reihe aufregender Erfolgsgeschichten geschrieben, die jüngst in der Einführung von Glivec, einem Inhibitor der Bcr-Abl-Tyrosin-Kinase, zur Behandlung von chronischer myeloischer Leukämie einen Höhepunkt fanden.^[1] Nicht selten aber war dieser Vorgehensweise, die sich auf vorselektierte Mechanismen oder Zielproteine konzentriert, der Erfolg versagt geblieben; auch wenn Verbindungen identifiziert worden waren, die exzellente Bindungseigenschaften zu den entsprechenden Zielproteinen aufweisen. Probleme tauchten vor allem dann auf, wenn die Untersuchungen auf die komplexeren Organisationsstruktu-

ren einer Zelle oder des gesamten Organismus ausgedehnt wurden. Unspezifische Bindung, geringe Bioverfügbarkeit und ungenügende Target-Validierung zählen zu den Gründen, warum diese Verbindungen in der therapeutischen Entwicklung aufgegeben werden mussten. Eine wachsende Gruppe von Wissenschaftlern hat daher angeregt, dass sich die chemische Biologie ihrer Wurzeln besinnen möge und zu phänotypischen Screenings zurückkehren soll, anstatt sich ausschließlich auf vorselektierte und isolierte biologische Targets zu beschränken. Das phänotypische Screening hatte sich über Jahrzehnte vor allem in jenen Bereichen der Naturwissenschaften bewährt, die wegen ihrer intrinsischen Komplexität wenig verstanden sind (wie die Entwicklungsbiologie oder die heterogene Katalyse). Oftmals stieß eine phänotypische Beobachtung vertiefende Untersuchungen an, die zur Aufklärung überraschender und unvorhergesehener Mechanismen führten. Bei der Umsetzung dieses Ansatzes in der chemischen Biologie werden Bibliotheken von chemischen Substanzen eine wichtige Rolle spielen.

Schreiber und Mitchison waren die ersten, die jene Elemente eines Programms skizzierten, das als „chemische Genetik“ bezeichnet wird^[2] und das sich kleiner Moleküle als modulierende Liganden bedient, um zellbiologische Untersuchungen und das Verständnis von Signalwegen bestimmter Genprodukte zu ermöglichen.^[3] Chemische Genetik unterscheidet sich in einigen fundamentalen Gesichtspunkten von herkömmlichen genetischen Methoden wie Mutationsgenetik und dem Einsatz von Knockout-Organismen und bietet folgende Vorteile:

- Die Wirkung kleiner Moleküle erfolgt sehr rasch.

- In den meisten Fällen ist der biologische Effekt reversibel (aufgrund von Metabolismus und Ausscheidung), wodurch eine zeitabhängige Untersuchung der Proteinfunktion möglich ist.
- Der Effekt ist regulierbar; durch Änderung der Konzentrationen lassen sich unterschiedlich starke Ausprägungen des Phänotyps einstellen.
- Die Wirkung ist konditional, denn sie kann in der Entwicklung des Organismus zu jedem beliebigen Zeitpunkt ausgelöst werden. Ein für die embryonale Entwicklung letaler Gen-Knockout kann hingegen nicht in einem erwachsenen Organismus untersucht werden.
- Knockout-Studien können nicht unterscheiden zwischen verschiedenen Proteinformen, die vom selben Gen abstammen. Kleine Moleküle sind im Prinzip in der Lage, die verschiedenen Funktionen zu unterscheiden.

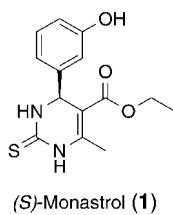
Der Erfolg der Chemischen Genetik hängt entscheidend von der Identifizierung von Liganden ab, die mit hoher Affinität spezifisch an nur eines von etwa 100000 verschiedenen Proteinen binden.^[3] In diesem Highlight soll an zwei Beispielen die Strategie des phänotypischen Screenings von Verbindlungsbibliotheken als eine Methode zur Auffindung solcher Liganden vorgestellt werden.

Die Arbeitsgruppen von Schreiber und Mitchison verwendeten zwei phänotypische Assays beim Screening einer Bibliothek von 16320 Molekülen auf ihren Einfluss auf den Zellzyklus.^[4] In einem ersten Durchlauf verwendeten sie einen Ganzzellen-Immunodetektions-Assay (Cytoblot). Nachdem die Zellen zunächst mit den kleinen Molekülen inkubiert worden waren, wurden Anti-

[*] Dr. R. Breinbauer

Abteilung für Chemische Biologie
Max-Planck-Institut für molekulare
Physiologie, Otto-Hahn-Straße 11
44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-133-2499
und
Fachbereich 3, Organische Chemie
Universität Dortmund
44221 Dortmund (Deutschland)
E-mail: rolf-peter.breinbauer@mpi-dortmund.mpg.de

körper zugesetzt, die spezifisch an das Protein Phosphonuclein binden. Der Phänotyp eines erhöhten Phosphonucleingehalts kann mit Zellen im mitotischen Arrest korreliert werden. Von der ursprünglichen Bibliothek zeigten nur 139 Verbindungen diesen Effekt. Daraus wurden jene Verbindungen ausgesortiert, die an das Protein Tubulin binden, das auch an diesem Prozess beteiligt ist. Die verbliebenen 86 Verbindungen wurden einem zweiten Phänotyp-Assay unterzogen, bei dem die In-vivo-Markierung von Chromosomen und Tubulin fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurde. Eine Verbindung zeigte dabei den bis dahin unbekannten Phänotyp von monastralen Spindeln in mitotischen Zellen, bei dem die Chromosomen an der äußeren Korona eines sternförmigen Spindelapparats erscheinen. Diese Verbindung, Monastrol (**1**), lieferte die gewünschte molekulare Sonde für weiterführende Untersuchungen.

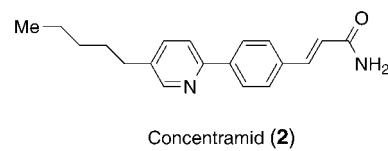


Das Kinesin-Protein Eg5 wurde als das molekulare Zielprotein identifiziert. (*S*)-Monastrol (**1**) bindet an eine neuartige allosterische Bindungsstelle innerhalb der Motor-Domäne von Eg5, was die Inhibition von dessen ATPase-Aktivität zur Folge hat. Damit wurde auch ein neues Target für das Hochdurchsatz-Screening von Verbindungsbibliotheken identifiziert.^[5]

Eine neue Qualität des Phänotyp-Screenings wurde erreicht, indem ganze Organismen für das Screening von Bibliotheken herangezogen wurden.^[6,7] Der Zebrafisch (*Danio rerio*) hat sich dabei als ein besonders nützliches Testobjekt erwiesen, das auch schon Gegenstand der groß angelegten Mutationsanalysen war, die von der Gruppe von Nüsslein-Volhard und den Labors von Fishman und Driever durchgeführt wurden waren.^[8] Der Zebrafisch hat einige Eigenschaften, die ihn als Modellorganismus auszeichnen: Zum einen ist sein

Generationszyklus sehr kurz, zum anderen wird bei jeder Paarung eine große Zahl von Eiern produziert. Da die Befruchtung extern erfolgt, können auch alle embryonalen Entwicklungsperioden untersucht werden. Für das Screening von kleinen Molekülen unabdingbar ist die gute Permeabilität des Zebrafisches für Wirkstoffmoleküle. Ungefähr 48 h nach der Befruchtung schlüpft der Zebrafischembryo und wird eine frei schwimmende Larve, die ein breites Verhaltensspektrum wie Schwimmen oder Berührungssensitivität zeigt. Da der Zebrafisch recht transparent ist, kann seine Entwicklung in den ersten fünf Tagen mit optischen Methoden studiert werden. Schließlich besteht zwischen Säugetiergenen und denen des Zebrafisches eine beträchtliche Homologie.

Peterson und Schreiber et al. haben ein Screening einer Bibliothek aus 1100 Verbindungen gegen Zebrafisch-Eier durchgeführt, die in 96er-Titerplatten angeordnet waren.^[6] Durch visuelle Untersuchung mit einem Präparations-Mikroskop konnte man Veränderungen des zentralen Nervensystems, des Herzkreislaufsystems, der Pigmentierung und des Ohres erkennen. Ungefähr 1% der Moleküle bewirkte eine spezifische Veränderung innerhalb der genannten Systeme und wurde näher untersucht. Eine dieser Verbindungen, Concentramid (**2**), verändert die globale



Organisation des Zebrafischherzens mit einer effektiven Dosis (ED_{50}) von ca. 2 nm. Nach Exposition mit Concentramid (**2**) werden sowohl atriale als auch ventrikuläre Zellen generiert und die beiden Herzkammern ausgebildet. Dabei wird aber das Ventrikulum (Herz-Kammer) innerhalb des Atriums (Vorhof) generiert. Die Gruppe um Fishman analysierte diesen morphologischen Effekt und verglich ihn mit der Heart-and-Soul(*has*)-Mutation.^[9] Diese in einem früheren genetischen Screening gefundene Mutation zeigt einen mit dem oben

beschriebenen nahezu identischen Phänotyp. Die *has*-Mutation bewirkt eine Punktmutation in der Kinase PKC λ , was zusätzlich noch Defekte in vielen anderen Geweben wie der Retina, der Niere, dem Darm und dem Gehirn zur Folge hat. Demgegenüber scheinen Concentramid-behandelte Embryos weniger Entwicklungsdefekte andernorts aufzuweisen. Den unterschiedlichen und komplementären Informationsgehalt von genetischen und chemischen Untersuchungsmethoden nutzend, konnten Fishman et al. zeigen, dass die Polarität der Zusammensetzung der kardischen Röhre von mindestens zwei unterschiedlichen molekularen Wegen kontrolliert wird. Obwohl das molekulare Target von Concentramid (**2**) noch nicht gefunden wurde, gibt es starke Hinweise darauf, dass es die Anterior-posterior-Ausprägung im Herz unterbindet.

Die hier gezeigten Beispiele lassen vermuten, dass ein Phänotyp-orientiertes Screening von kombinatorischen Bibliotheken gegen Zellen oder Organismen eine reiche Quelle interessanter und manchmal gänzlich unvorhergesehener biologischer Phänomene sein wird. Gleichzeitig lehren diese Beispiele eine weitere Lektion: Das Entdecken neuer Schätze mag zwar einfacher geworden sein, doch sie zu heben (d.h. die Identifizierung des biologischen Targets der kleinen Moleküle) scheint noch immer schwierig zu sein.^[10]

-
- [1] R. Capdeville, E. Buchdunger, J. Zimmermann, A. Matter, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2002**, *1*, 493–502.
 - [2] a) T. J. Mitchison, *Chem. Biol.* **1994**, *1*, 3–6; b) S. L. Schreiber, *Bioorg. Med. Chem.* **1998**, *6*, 1127–1152; c) C. M. Crews, U. Splittergerber, *Trends Biochem. Sci.* **1999**, *24*, 317–320; d) B. R. Stockwell, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 449–455; e) B. R. Stockwell, *Nat. Rev. Genet.* **2000**, *1*, 116–125.
 - [3] Ausgezeichnete Übersichtsartikel über chemische Methoden für das Studium von biologischen Systemen: a) P. J. Alaimo, M. A. Shogren-Knaak, K. M. Shokat, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 360–367; b) M. A. Shogren-Knaak, P. J. Alaimo, K. M. Shokat, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2001**, *17*, 405–433; c) K. M. Shokat, M. Vellaca, *Drug Discovery Today* **2002**, *7*, 872–879; d) G. E. Ward, K. L. Carey, N. J. Westwood, *Cell. Microbiol.* **2002**, *4*, 471–482.

- [4] T. U. Mayer, T. M. Kapoor, S. J. Haggerty, R. W. King, S. L. Schreiber, T. J. Mitchison, *Science* **1999**, *286*, 971–974.
- [5] Z. Maliga, T. M. Kapoor, T. J. Mitchison, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 989–996.
- [6] R. T. Peterson, B. A. Link, J. E. Dowling, S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 12965–12969.
- [7] H.-S. Moon, E. M. Jacobson, S. M. Kheronsky, M. R. Luzung, D. P. Walsh, W. Xiong, J. W. Lee, P. B. Parikh, J. C. Lam, T.-W. Kang, G. R. Rosania, A. F. Schier, Y.-T. Chang, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 11608–11609.
- [8] a) J. P. Briggs, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **2002**, *282*, R3–R9; b) R. S. Hauptschein, B. K. Eustace, D. G. Jay, *Exp. Hematol.* **2002**, *30*, 381–387; c) E. E. Patton, L. I. Zon, *Nat. Genet.* **2001**, *2*, 956–966; d) C. Nüsslein-Volhard, *Angew. Chem.* **1996**, *108*, 2316–2328; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35*, 2176–2187.
- [9] R. T. Peterson, J. D. Mably, J.-N. Chen, M. C. Fishman, *Chem. Biol.* **2001**, *11*, 1481–1491.
- [10] Übersichtsartikel über neuere Methoden zum Identifizieren der Zielproteine, an die kleine Moleküle binden: R. W. King, *Chem. Biol.* **1999**, *6*, R327–R333.

40 Jahre Chemiegeschichte



★ Grundlage für eine **Entdeckungsreise** durch alle wichtigen Entwicklungen der Chemie und ihrer Nachbardisziplinen

★ **Autoren** und **Stichwörter** aller in der **Angewandten Chemie** erschienenen Aufsätze der letzten vier Jahrzehnte

★ **jetzt zum Sonderpreis von € 19.80**
(incl. Versandkosten)

Richten Sie Ihre Bestellung nur an:
Redaktion *Angewandte Chemie*
Postfach 10 11 61
69451 Weinheim
Telefon: (+49) 6201-606-265
Telefax: (+49) 6201-606-331
E-mail: angewandte@wiley-vch.de