

Von Enzymen, Moleküldesign und Inhibitorsynthese

Von der Proteinstruktur zum spezifischen Inhibitor

Many successful drugs affect the function of proteins. To be able to interfere with a disease, the relevant key proteins need to be defined and characterized. Inhibiting or activating such key proteins may be of therapeutic benefit, and thus they are potential drug targets. The development of a medically applicable drug is a very lengthy process requiring substantial screening power and enormous resources. This is typically not compatible with the possibilities that are available at universities and with how academic institutions function. Therefore, an important question is how university-based research can contribute to drug development. Certainly, potential drug targets can be identified and their biological relevance specified and verified. As an alternative for small molecule screening, computer-based analyses are becoming ever more powerful. In silico screening processes combined with docking studies, molecular dynamics simulations and chemo-informatics can be used to define small molecules or 'hits'. Further evolving these into 'lead' substances and finally drugs will require industrial partners. Together, academic research can provide important information early in the drug developing process and thus function as an attractive partner for industry.

Viele wirksame Medikamente beeinflussen die Funktion von Proteinen. Ein Beispiel ist Olaparib, erhältlich unter dem Handelsnamen Lynparza. Dieser Wirkstoff wurde von der amerikanischen Food and Drug Administration und der Europäischen Kommission im Jahre 2014 zugelassen, um Patientinnen mit bestimmten Formen von Eierstock- und Brustkrebs zu behandeln. Dabei werden diejenigen Tumore therapiert, die eine bestimmte genetische Veränderung aufweisen, nämlich eine inaktivierende Mutation in einem der beiden Brustkrebsgene BRCA1 oder BRCA2. Olaparib wirkt als Inhibitor hemmend auf das PARP1-Enzym. Dieses führt eine biochemische Reaktion durch, die als ADP-Ribosylierung von Substratproteinen bezeichnet wird und für die Reparatur der Erbsubstanz (der DNA) wichtig ist. Befunde aus der Grundlagenforschung haben gezeigt, dass diese Aktivität nicht in direktem Zusammenhang mit der Funktion der von den BRCA1- und BRCA2-Genen abgelesenen Proteine steht, sondern eher eine indirekte Wechselwirkung ist. Die Unterdrückung von PARP1 und das Fehlen von BRCA1 oder BRCA2 wirken kooperativ in Tumorzellen und führen zum Zelltod. Diese Form der Wechselwirkung wird als synthetische Letalität bezeichnet, ein wichtiges Wirkprinzip in der Tumorthherapie [1].

Bei der Entwicklung von Olaparib als spezifisches Krebsmedikament war die Identifizierung und Charakterisierung grundlegender molekularer Prozesse essenziell. Dazu wurden umfangreiche Daten zur Funktion von PARP1 mithilfe von biochemischen, zellbiologischen und genetischen Experimenten erhoben, die sowohl mit gereinigten Proteinen und in Zellkulturexperimenten und in der Maus durchgeführt wurden. Diese Untersuchungen brachten den Nachweis, dass PARP1 an der Reparatur der DNA, unserer Erbsubstanz, beteiligt ist und damit einen Beitrag zur genetischen Stabilität von Zellen leistet. Genetische Stabilität, also der Erhalt der Integrität unserer Erbsubstanz, ist eine wesentliche Voraussetzung, um die bösartige Entartung von Zellen zu verhindern und damit der Tumorentstehung entgegenzuwirken. Der Nachweis, dass PARP1 ein wichtiges Enzym in einem DNA-Reparaturprozess ist, unterstützt die Vermutung, dass Inhibitoren von PARP1 genutzt werden könnten, um das Überleben von Zellen zu manipulieren. Im Fall von Tumoren mit BRCA1- oder BRCA2-Mutationen, wie zum Beispiel bei bestimmten Formen von Eierstock- und Brustkrebs, zeigt sich eine deutlich höhere Sensitivität bezüglich der Inhibition von PARP1 im Vergleich zu Tumoren ohne BRCA1- oder



Bild 1: Diskussion relevanter Aminosäuren, die für die katalytische Aktivität der Macrodome-Hydrolase des Chikungunya-Virus wichtig sind, anhand eines Strukturmodells.
Foto: Peter Winandy

BRCA2-Mutationen und zu Normalgewebe. Diese Erkenntnis war ein weiterer zentraler Baustein auf dem Weg, Olaparib klinisch nutzen zu können.

Die Identifizierung von geeigneten Inhibitoren wurde mithilfe von großen Substanzbibliotheken – die Zahl der untersuchten Moleküle kann dabei in die Millionen gehen – und entsprechenden biochemischen Assays, standardisierten Nachweisverfahren, durchgeführt. Ein solches Vorgehen erlaubt es, sogenannte Hits zu identifizieren, die dann nach weiteren Evaluationsschritten zu einer Lead-Substanz etabliert werden können. Es sind dann die Leads, die aufgrund von pharmakokinetischen Überlegungen weiter verändert werden, um so die inhibitorische Aktivität, die Löslichkeit, die Verfügbarkeit im Organismus, die Stabilität und Zellgängigkeit zu optimieren. Das kann dazu führen, dass Tausende von Substanzen (Varianten der Lead-Substanz) synthetisiert und in vielfältigen Untersuchungen miteinander verglichen und analysiert werden müssen.

Von der Identifizierung eines Proteins in einem zellulären Prozess, das eine mögliche Zielstruktur für eine therapeutische Intervention darstellt, über die Identifizierung und Charakterisierung von entsprechenden Inhibitoren und deren klinischen Überprüfung bis zur

Anwendung im Patienten vergehen typischerweise viele Jahre. Unterschiedliche Disziplinen von der Chemie, der Biochemie, der Strukturbiologie, der Zellbiologie bis hin zur Medizin müssen zusammengebracht und koordiniert werden, um eine Chance auf Erfolg zu haben. Die Kosten bewegen sich im Bereich von Hunderten Millionen Euro. Diese Art der Entwicklung neuer Medikamente ist nur im industriellen Umfeld möglich und kann an einer Universität nicht geleistet werden.

Doch in welchen Bereichen kann die universitäre Forschung zu diesem Prozess beitragen? Ganz sicher kann sie potenzielle molekulare Zielstrukturen identifizieren. Die universitäre Grundlagenforschung untersucht unter anderem Fragestellungen zur Funktionsweise von Zellen und Geweben und zur Wechselwirkung mit Pathogenen und deren krankheitsassoziierten Veränderungen. Aus dem Verständnis solcher Prozesse können die Schlüsselproteine definiert und eine Abschätzung ihrer Bedeutung für bestimmte Krankheitszustände vorgenommen werden. Schon der nächste Schritt, das Screening von großen Substanzbibliotheken, ist nicht mehr möglich. Die erforderliche Logistik, also die entsprechenden Substanzbibliotheken und die Roboterstraßen für die Hochdurchsatzanalytik der Substanzen, fehlt und kann auf-

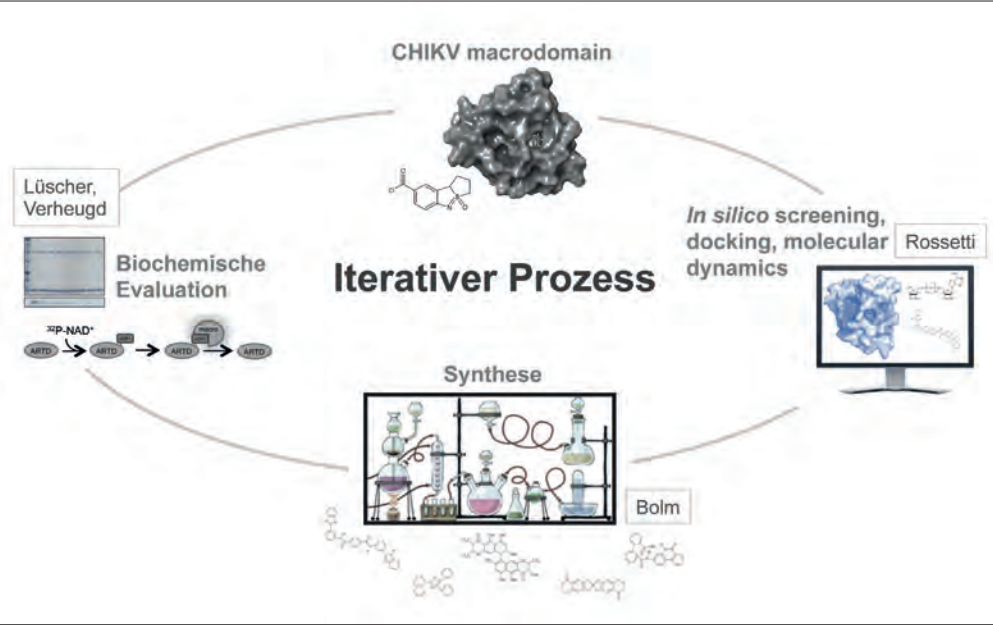


Bild 2: Kooperation zwischen Biochemie, Organischer Chemie und Molecular Modeling auf dem Weg zum spezifischen Inhibitor.

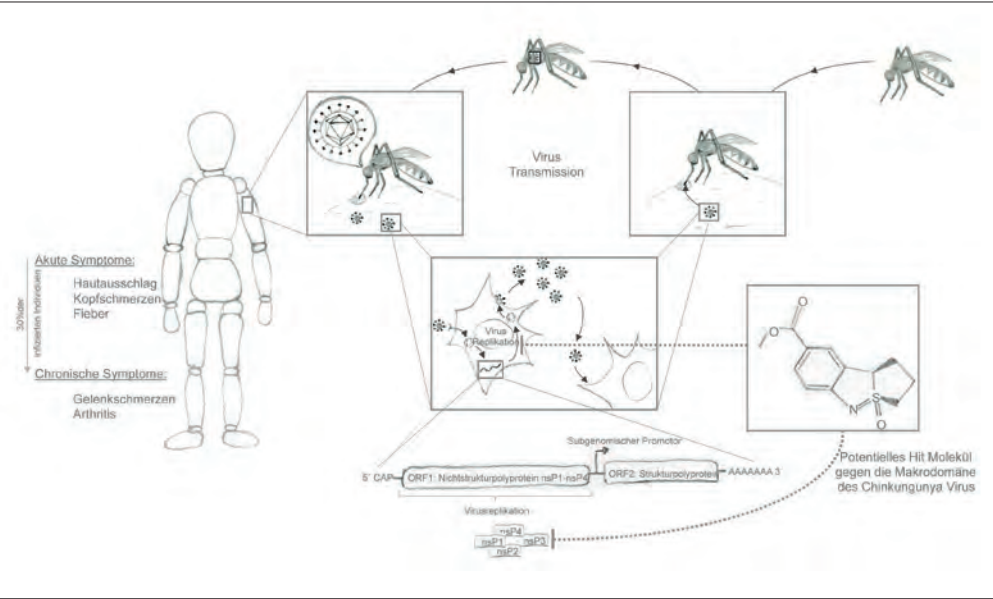


Bild 3: Lebenszyklus des Chikungunya Virus – Von der Mücke zum Menschen und zurück.

grund der hohen Kosten auch nicht vorgehalten werden. Alternativ bieten sich zunehmend computergestützte Analyseverfahren (In-silico-Screenings) an, die es einerseits erlauben, die Struktur eines möglichen Inhibitors zu modulieren und andererseits das aktive Zentrum von Enzymen darzustellen. Anschließend können damit Substanzbibliotheken daraufhin untersucht werden, ob aus ihnen einzelne Moleküle als mögliche Inhibitoren, die an das Zielprotein binden, infrage kommen. Vorhersagen über die Affinität lassen sich mit der Nutzung von Docking-Modulierung und Molecular-Dynamics-Simulationen machen.

Diese Verfahren sind von großer Rechnerkapazität abhängig, wie dem Supercomputer JURECA am Forschungszentrum Jülich. Der Vorteil dieser Vorgehensweise ist, dass in vergleichsweise kurzer Zeit beliebig große Substanzbibliotheken analysiert werden können. Die Limitierung ist dabei lediglich durch die Rechenkapazität gegeben. Ein weiterer Vorteil ist, dass zusätzlich zu den Verbindungsklassen, die in typischen industriellen Substanzbibliotheken vorhanden sind, neue chemische Molekültypen untersucht werden können. Also auch solche, die nur virtuell vorhanden und noch gar nicht synthetisiert worden sind.

Hier kommt die universitäre organische Chemie ins Spiel. Eine ihrer wesentlichen Aufgabenstellungen ist es, neue Syntheseverfahren für Moleküle mit verschiedensten Strukturen zu entwickeln. Dabei werden vor allem solche Verbindungen von Interesse sein, die in dem oben beschriebenen In-silico-Verfahren identifiziert wurden, neue molekulare Grundstrukturen darstellen, aber nicht in bekannten Substanzbibliotheken vorhanden sind. Das kann auch zur Konsequenz haben, dass gänzlich neue Synthesewege entwickelt werden müssen. Zudem erlauben solche neuen Substanzen den Schutz des entsprechenden geistigen Eigentums. Das hat auch in den Universitäten einen hohen Stellenwert. Dort können wenige solcher Substanzen initial getestet werden. Die weitere Entwicklung bis zu einer entsprechenden Lead-Substanz ist möglich, wenn eine Vielzahl von Arbeitsschritten in silico durchgeführt werden kann. Es lässt sich dann ein Verfahren mit wiederholten Rechengängen (iterativ) entwickeln, in dem die jeweils auf computerbasierten Modeling-Verfahren besten Substanzen synthetisiert und biochemisch sowie zellbiologisch getestet werden. Dann jedoch kommt der universitäre Ansatz an seine Grenzen. Eine

Lead-Optimierung sowie das Testen daraus resultierender multipler Substanzen kann nur noch im industriellen Maßstab erfolgen. Das Chikungunya-Virus, kurz CHIKV, beispielsweise ist endemisch in Zentralafrika und hat sich in den letzten Jahren auf große Teile von Südafrika, Südostasien sowie Süd- und Zentralamerika ausgebreitet. Auch über erste Fälle in Norditalien und Südfrankreich wurde bereits berichtet. CHIKV wird durch Mücken wie *Aedes aegypti* (Ägyptische Tigermücke) und *Aedes albopictus* (Asiatische Tigermücke) übertragen, deren Ausbreitungsgebiete durch den Klimawandel zunehmen. Es ist deshalb zu erwarten, dass die von diesen Mücken übertragenen viralen Krankheiten sich künftig auch in Europa und in Nordamerika verbreiten werden. Zu den viralen Erkrankungen zählen unter anderem auch das Denguefieber und das Gelbfieber. CHIKV ist ein sogenanntes RNA-Virus, seine Erbsubstanz (Genom) besteht aus einer RNA und nicht wie beim Menschen aus einer DNA. Nach einer Infektion durch CHIKV reagiert die infizierte Zelle mit der Produktion von Interferonen, also Signalmolekülen, die eine vielfältige anti-virale Antwort koordinieren. Einer der Effekte ist die Aktivierung von ADP-ribosylierenden Proteinen, die zelluläre Proteine in ihren Funktionen verändern und dadurch zur antiviralen Immunabwehr beitragen, so dass die Vermehrung der Viren gehemmt wird. Neueste Daten weisen darauf hin, dass CHIKV einen Antagonisten der ADP-Ribosylierung herstellt, eine sogenannte Makrodomänen-Hydrolase [2]. Die Aktivität dieses Enzyms ist für die Vermehrung von CHIKV essenziell. Diese Befunde legen den Schluss nahe, dass das virale Genom ein Protein nutzt, um den durch Interferon induzierten ADP-Ribosyltransferasen entgegenzuwirken. Mit anderen Worten: Die ADP-Ribosylierung in den Wirtszellen scheint für CHIKV und andere RNA-Viren ein zentraler, inhibierender Mechanismus zu sein, der durch ein Virusprotein gezielt antagonisiert wird. Mithilfe eines Strukturmodells der CHIKV-Makrodomänen-Hydrolase können nun In-silico-Methoden etabliert und weiterentwickelt werden, um potenzielle Inhibitoren dieses Enzyms zu finden. Über das oben beschriebene Verfahren der Hit-Identifizierung und der Optimierung in einem iterativen Prozess zwischen der Modeling-Gruppe, der Organischen Chemie, der Biochemie und Zellbiologie sollen damit Lead-Substanzen generiert und getestet werden. Erwartet wird, dass solche Inhibitoren die Virus-Vermehrung

hemmen oder eindämmen. Eine Weiterentwicklung solcher Inhibitoren müsste dann mit industriellen Partnern erfolgen, da ihre Kapazitäten typischerweise deutlich größer sind als die, über die universitäre Einheiten verfügen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass insbesondere die Hit-Identifizierung und -Validierung sowie eine initiale Entwicklung und Abschätzung der Aktivität von Inhibitoren durch kooperative Ansätze im universitären Umfeld möglich sind. Die Innovation ist motiviert durch die biologische Fragestellung, durch die Entwicklung neuer oder modifizierter Verfahren der computerbasierten Analyse der Wechselwirkung kleiner organischer Moleküle mit Schlüssel-Enzymen und die Darstellung neuer Synthesewege für die entsprechenden Substanzen.

Literatur

- [1] Lüscher, B., M. Bütepage, L. Eckei, S. Krieg, P. Verheugd and B. H. Shilton, Adp-Ribosylation, a Multifaceted Posttranslational Modification Involved in the Control of Cell Physiology in Health and Disease. *Chem Rev* 118 (2018): 1092-1136. DOI: 10.1021/acs.chemrev.7b00122.
- [2] Eckei, L., S. Krieg, M. Bütepage, A. Lehmann, A. Gross, B. Lippok, A. R. Grimm, B. M. Kummerer, G. Rossetti, B. Lüscher and P. Verheugd, The Conserved Macrod domains of the Non-Structural Proteins of Chikungunya Virus and Other Pathogenic Positive Strand Rna Viruses Function as Mono-Adp-Ribosylhydrolases. *Sci Rep* 7 (2017): 41746. DOI: 10.1038/srep41746.

Autoren

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Carsten Bolm ist Inhaber des Lehrstuhls für Organische Chemie II. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Bernhard Lüscher ist Inhaber des Lehrstuhls für Biochemie und Molekularbiologie und leitet das Institut für Biochemie und Molekularbiologie. Dr. Giulia Rossetti, Ph. D., ist Juniorprofessorin für Computerbasierte Molekulare Wissenschaft und leitet eine Arbeitsgruppe am Supercomputer-Zentrum des Forschungszentrums Jülich. Dr. rer. nat. Patricia Verheugd ist Arbeitsgruppenleiterin am Institut für Biochemie und Molekularbiologie.
