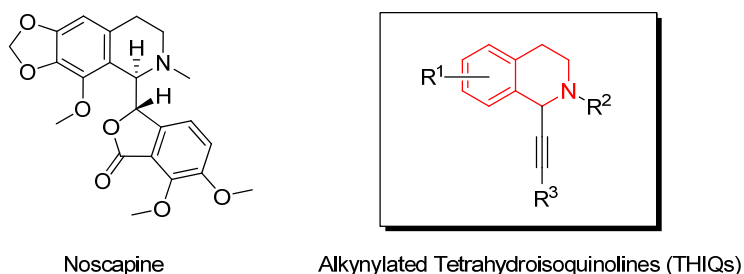


## Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei Grundpfeilern der chemischen Biologie: Mit der Synthese- und Methodenentwicklung zur Synthese einer Substanzkollektion auf Basis des Tetrahydroisochinolin-Grundgerüsts sowie mit der Anwendung von Mikroarrays mit immobilisierten niedermolekularen Sonden als Werkzeug zum Auffinden von hoch-affinen Ligand-Protein-Wechselwirkungen.

### **BIOS einer Substanzkollektion auf Basis des Tetrahydroisochinolin-Grundgerüsts**

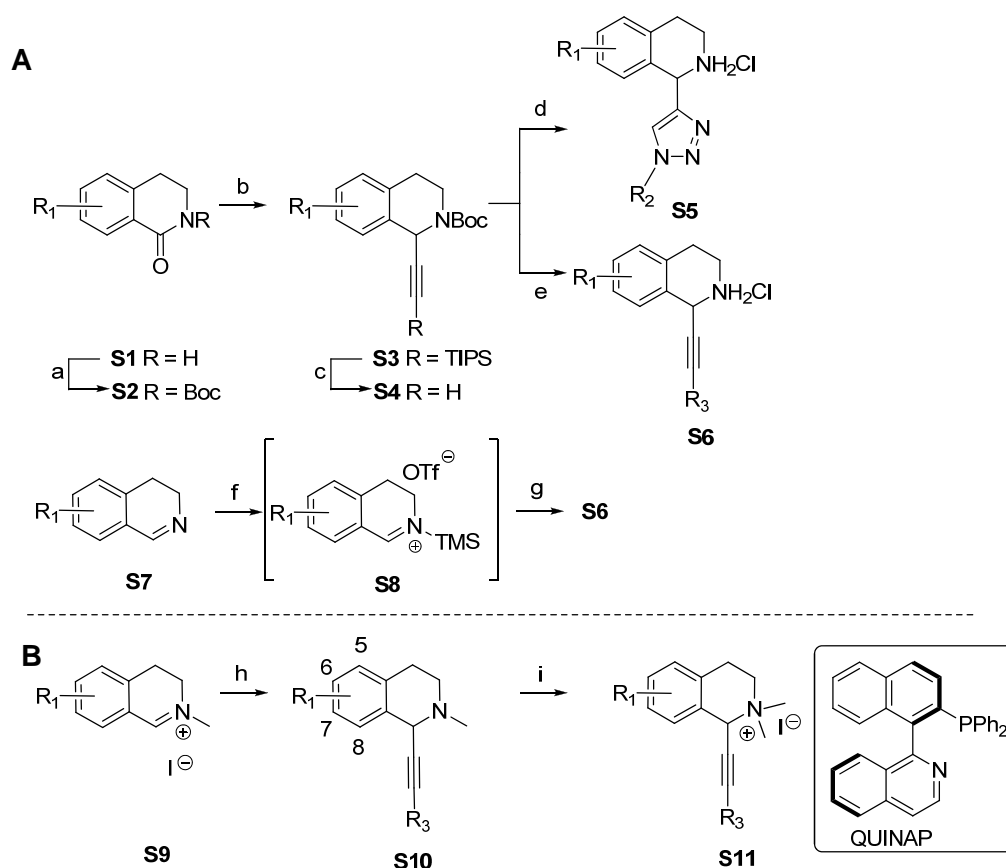
Unter Anwendung der Prinzipien der Biologie-orientierten Synthese wurde eine Substanzbibliothek von alkinilierten Tetrahydroisochinolinen (THIQs) dargestellt. Diese Substanz-Kollektion basiert auf dem biologisch prävalidierten Grundgerüst der Tetrahydroisochinoline, das ein häufig in Naturstoffen anzutreffendes Motiv ist. Inspiriert durch das natürlich vorkommende Tetrahydroisochinolin Noscaphin, das besonders durch seine niedrige Toxizität kombiniert mit seiner Fähigkeit Krebszellen durch die Störung der Mikrotubulidynamik in den Zelltod zu führen attraktiv erscheint, wurde eine Substanzkollektion unter Beibehaltung des Noscaphin-THIQ-Grundgerüsts und Variation der Substituenten in  $\alpha$ -Position des Stickstoffs erstellt (**Abbildung 1**).



**Abbildung 1:** Naturstoff Noscaphin und synthetisierte Substanzkollektion alkinilierter Tetrahydroisochinoline (THIQs). Das THIQ-Grundgerüst ist in rot hervorgehoben.

Die Synthese der sekundären Tetrahydroisochinoline **S5** und **S6** (A, **Schema 1**) erfolgte ausgehend von verschiedenen Phenylethylaminen, die mittels Bischler-Napieralski-Cyclisierung zu den entsprechenden Lactamen (**2**) umgesetzt wurden. Nach Boc-Schützung (**S2**) wurde eine Eintopf-Lactam-Alkinilierung unter Verwendung von Bor-Acetyliden und anschließender Reduktion durchgeführt. Auf Basis des geschützten Tetrahydroisochinolin-Grundgerüsts **S4** waren zahlreiche Modifikationen möglich. Zur Diversifizierung der Substanzkollektion wurden zum einen Triazole mittels Click-Chemie (**S5**) synthetisiert und zum anderen diverse alkinilierte Tetrahydroisochinoline unter Verwendung der Sonogashira-Kupplung (**S6**) hergestellt. Da die Eintopf-Alkinilierung für elektronenreiche

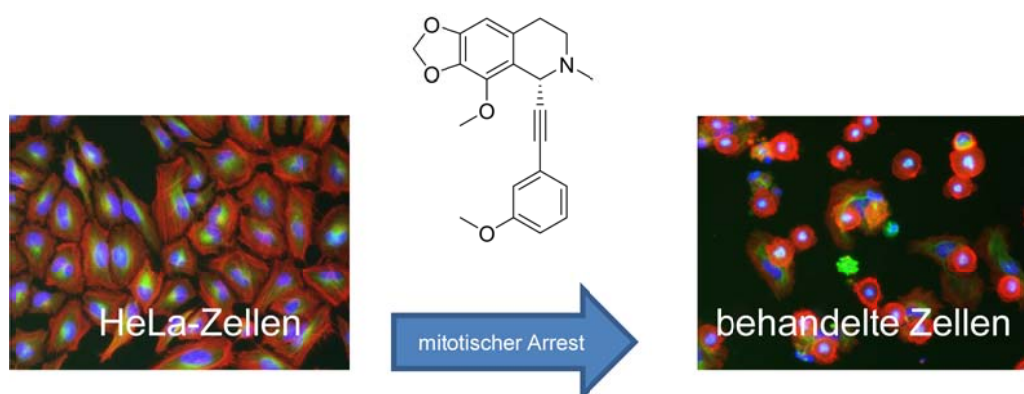
Dimethoxylactame nur in niedrigen Ausbeuten funktionierte, wurde ein zweiter Zugang durch die Alkinilierung von mit TMS-Triflat ausgefällten Iminen (**S8**) entwickelt. In den meisten Fällen konnten über diese Route höhere Ausbeuten bei der Synthese elektronenreicher Tetrahydroisochinoline erzielt werden. Zusammen mit der Lactam-Alkinilierung konnte so ein effizienter Zugang zu zahlreichen sekundären Tetrahydroisochinolen geschaffen werden. Eine weitere Kollektion tertiärer und quaternärer Tetrahydroisochinoline (B, **Schema 1**) wurde mittels Derivatisierung substituierter 2-Methyl-3,4-dihydroisochinoliniumiodid (**S9**) synthetisiert. Neben synthetischen Iminiumsalze wurde auch das Naturstoffderivat Cotarnin ( $R^1 = 6,7\text{-OCH}_2\text{O}$ ,  $8\text{-OMe}$ ) verwendet. Um *N*-methylierte Analoga **S10** zu erhalten, wurden diverse Alkine nach Deprotonierung mit *i*PrMgCl zu dem entsprechenden Iminiumsalz gegeben. Eine Quaternisierung erfolgte anschließend über die Reaktion mit Methyljodid (**S11**).



**Schema 1: Synthese einer Substanzkollektion alkinilierter Tetrahydroisochinoline.** A) Synthese sekundärer Tetrahydroisochinoline. a) 1. NaH oder DMAP/Et<sub>3</sub>N; 2. Boc<sub>2</sub>O, 57-89%; b) 1. TIPS-Acetylen, *n*-BuLi, BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O, -78 °C, 2. DIBAL-H, 17-73%; c) TBAF, THF, 0 °C, 86-88%; d) Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, CuI, Et<sub>3</sub>N, THF, RT, R<sub>2</sub>I, dann HCl/MeOH, 15-95%; e) CuSO<sub>4</sub>, Na-Ascorbat, EtOH/H<sub>2</sub>O, R<sup>2</sup>N<sub>3</sub>, dann HCl/MeOH, 54-75%. f) TMS-OTf, THF, 0 °C, 2h. g) *i*PrMgCl, R<sup>3</sup>-Alkin, THF, 0 °C, 31-90%. B) Synthese tertiärer und quaternärer Tetrahydroisochinoline. h) *i*PrMgCl, R<sup>3</sup>-Alkin, THF, 0 °C, 13-99% oder CuBr/QUINAP, R<sup>3</sup>-Alkin, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -55 °C, i) MeI, Acetonitril, 99%. DMAP = 4-Dimethylaminopyridin, Boc<sub>2</sub>O = di-*tert*-Butyldicarbonat, TIPS = Triisopropylsilyl, *n*-BuLi = *n*-Butyllithium, DIBAL-H = Diisobutylaluminiumhydrid, TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid, TMS = Trimethylsilyl, OTf = Triflat.

Um enantiomerenreine Tetrahydroisochinoline zu erhalten, wurde eine kupferkatalysierte enantioselektive Alkinilierungsreaktion von Iminiumsalzen (**S9**) untersucht. Nach intensivem Liganden-Screening konnte mit CuBr/QUINAP eine sehr gute Alkinilierungsmethode gefunden werden, die mit hohen Ausbeuten und ee's funktioniert. Die absolute Konfiguration der alkinilierten Tetrahydroisochinoline konnte in Analogie zu den Publikationen von Taylor und Schreiber bestimmt werden (Org. Lett. **2006**, 8, 143-146).

Die Substanzkollektion von 103 Tetrahydroisochinolin-Derivaten wurde auf phänotypische Änderungen in BSC-1 und HeLa-Zelllinien getestet. Alkinilierte Tetrahydroisochinoline zeigten eine sehr effektive Hemmung der Tubulinpolymerisation und verursachten Apoptose in HeLa-Zellen (**Abbildung 2**). Interessanterweise konnten ausschließlich mit Noscadin verwandte Strukturen als Hits identifiziert werden. Während Noscadin über zwei Stereozentren verfügt, wiesen die aktiven Substanzen lediglich ein Stereozentrum mit gleicher (*R*)-Konfiguration wie im Naturstoff in der  $\alpha$ -Position zum Stickstoff auf. Letztlich konnte ein Tetrahydroisochinolinderivat (**Abbildung 2**) identifiziert werden, das sowohl *in vitro* als auch *in vivo* stärker die Tubulin-Polymerisation inhibiert als der zugrunde liegende Naturstoff.

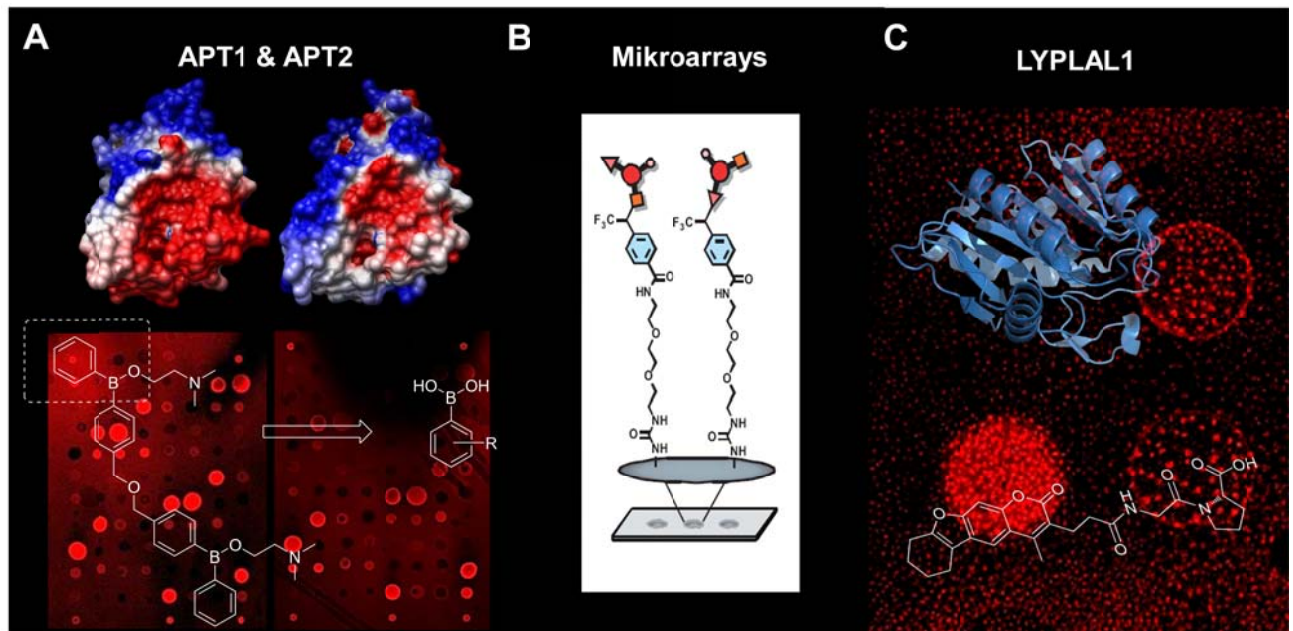


**Abbildung 2:** Schematische Darstellung des phänotypischen Screenings. Humane Krebszellen (HeLa) wurden mit alkinilierten Tetrahydroisochinolinen inkubiert und auf phänotypische Änderungen hin untersucht.

## **Mikroarrays mit immobilisierten niedermolekularen Sonden als Werkzeuge in der chemischen Biologie**

In der chemischen Biologie werden Screeningverfahren angewendet, um die Beeinflussung von ganzen Zellen, Zellverbänden oder isolierten biochemischen Testsystemen durch niedermolekulare Sonden synthetischen oder natürlichen Ursprungs zu untersuchen. Letztlich werden so die Wechselwirkungen einer bestimmten niedermolekularen Sonde mit einem Protein untersucht. Osada (RIKEN Advanced Science Institute, Japan) entwickelte über die Jahre verschiedene Techniken für die direkte Untersuchung dieser Ligand-Protein-Wechselwirkungen durch die Immobilisierung niedermolekularer Moleküle. Nach Inkubation von Proteinen mit immobilisierten Sonden und folgenden Waschvorgängen bleiben komplementäre Proteine mit hoher Bindungsaffinität an den entsprechenden Sonden „kleben“. Die Detektion von gebundenem Protein erfolgt bei Immobilisierung auf Glasoberflächen mit Antikörpern oder Fluoreszenzmarkern oder im Fall von Oberflächenplasmonenresonanz durch die Änderung des Totalreflexionswinkels von polarisiertem Licht an einer Goldoberfläche. Nicht zwangsläufig führen jedoch Protein-Binder auch zu Protein-Inhibitoren, da in dieser Methode keine Aussage über eine das Enzym hemmende Sonden-Protein-Wechselwirkung getroffen wird.

Zur Herstellung dieser Mikroarrays werden Hochpräzisions-Spotter eingesetzt, um Substanzen als Spots mit Durchmesser von ca. 100  $\mu\text{m}$  auf Glasplatten aufzubringen. Hauptmerkmal dieser Mikroarraytechnologie ist die hocheffiziente und schnelle Datenanalyse. Einzigartig wird diese Methode durch die verwendete Immobilisierungstechnik. Klassischerweise müssen für das Anbringen funktioneller Gruppen, die eine chemische Immobilisierung ermöglichen ohne die Sonde-Protein Wechselwirkung zu beeinflussen, aufwändige Struktur-Aktivitätsbeziehungen durchgeführt werden. Die von Osada entwickelte Immobilisierungsmethode ist von funktionellen Gruppen unabhängig. Die Verwendung von beschichteten Glasplatten mit photoaktivierbaren Carbenen ermöglicht eine statistische Immobilisierung und macht folglich eine vorherige chemische Modifikation der Sonden unnötig. So können selbst komplexe Naturstoffe auf Glas- oder Goldoberflächen immobilisiert werden (B, **Abbildung 3**).



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Mikroarray Screenings. A) Kristallstrukturen von humanem APT1 und 2. Hintergrund: Bindeprofil für beide Proteine. Proteine die an immobilisierte Sonden binden wurden mittels fluoreszenzmarkierten Antikörpern sichtbar gemacht. Vordergrund: Borinatester- und abgeleitete Boronsäure-Mikroarraybinder. B) Darstellung eines Mikroarrays mit immobilisierten niedermolekularen Sonden. C) Kristallstruktur von humanem LYPLAL1. Hintergrund: Bindeprofil. Vordergrund: Identifizierter LYPLAL1-Inhibitor.

Als Zielproteine für die Evaluierung des Mikroarrayscreenings wurden drei Proteine mit hoher Sequenz- und Strukturübereinstimmung gewählt. Acyl protein thioesterase 1 (APT1), APT2 und Lysophospholipase-like 1 (LYPLAL1) Protein sind Teil der  $\alpha/\beta$ -Hydrolase Familie. APT1 wurde als wesentliches Protein bei der Steuerung des Ras-Zyklus identifiziert, eines dynamischen De- und Repalmitoylierungskreislaufes, der für die korrekte Lokalisierung und Funktion dieses Onkogens verantwortlich ist. Die Inhibition von APT1 wird als neue Strategie zur Behandlung von durch Ras-Mutationen verursachten Krebsarten angesehen. Erst kürzlich wurde durch Pulldown-Experimente mit als APT1 bekannten kovalenten  $\beta$ -Laktoninhibitoren APT2 als Isoenzym identifiziert. Dessen biologische Funktion ist jedoch noch weitgehend unklar. Über LYPLAL1 ist trotz großer Verwandtschaft zu APT1 außer zahlreichen Hinweisen über eine Beteiligung an Fettleibigkeit ebenfalls nichts bekannt. Durch Mikroarray-Screeningexperimente mit der Substanzbibliothek des RIKEN Instituts (NPDepo) konnte ein „chemischer Fingerabdruck“ mit charakteristischen Bindeprofilen für die drei verwandten Proteine erzeugt werden (A und C, **Abbildung 3**). Wie bereits Sequenz- und Strukturhomologie von APT1 und APT2 nahelegten, wurde auch ein nahezu identisches Bindeprofil festgestellt. Deutlich davon unterschied sich jedoch das Profil von LYPLAL1.

Für APT1 und APT2 konnten Borinsäuren bzw. Borinatester im Mikroarray als hochaffine Proteinbinder und in einem funktionalen enzymatischen Assay als potente Inhibitoren identifiziert werden (A, **Abbildung 3**). Mittels Lineweaver-Burk Analyse konnte eine

kompetitive Inhibition der beiden Enzyme gezeigt werden, die eine Koordination des Boratoms an das Serin der aktiven Tasche nahelegt. Inspiriert durch die Aktivität der borhaltigen Substanzen, wurden einfache Phenylboronsäuren auf ihre Inhibitionseigenschaft hin überprüft. Tatsächlich konnten insbesondere für APT2 Inhibitoren im nanomolaren Bereich gefunden werden, die sowohl nicht toxisch als auch zellgängig waren. Kokristallisationen mit APT1 oder APT2 Inhibitoren waren nicht erfolgreich, da beide Proteine als Dimer kristallisierten. Die Suche nach einem kristallographischen Modellsystem führte schließlich zum als Monomer kristallisierenden APT1 aus Hefe, das hohe Sequenzhomologie mit humanem APT1 aufweist und ebenso in der Lage ist N-Ras zu depalmitoylieren. Einige Boronsäuren konnten kristallisiert werden und zeigten die erwartete Bindung an das Serin der katalytischen Triade.

Für LYPLAL1 musste zuerst ein funktioneller Assay entwickelt werden, um die identifizierten Mikroarray-Binder zu validieren. Basierend auf einer genauen Analyse der Kristallstruktur wurden zahlreiche Substrate getestet. Im Gegensatz zu APT1 und APT2 setzt LYPLAL1 keine langen, hydrophoben Substrate um und entgegen den in der Literatur geäußerten Vermutungen ist LYPLAL1 auch keine Phospholipase. Eine Studie mit 4-Nitrophenylestern unterschiedlicher Kettenlänge zeigte die Bevorzugung kurzer Substrate. Im funktionalen Enzymassay konnten Mikroarray-Binder als Inhibitoren von LYPLAL1 identifiziert werden (C, **Abbildung 3**).