

# Screening fluoreszenter RNA-Methyltransferase-Sonden im Nanomolmaßstab ermöglicht die Entdeckung von METTL1-Inhibitoren

J. Laurenz Meidner<sup>+</sup>, Ariane F. Frey<sup>+</sup>, Robert A. Zimmermann<sup>+</sup>, Mark O. Sabin, Zarina Nidoieva, Annabelle C. Weldert, Sabrina N. Hoba, Mackenzie W. Krone, und Fabian Barthels\*

**Abstract:** Die Methylierung von RNA ist ein Stoffwechselprozess, der für seine Verbindung zu verschiedenen Krankheiten bekannt geworden ist. Darum gewinnen RNA-Methyltransferasen (MTasen) in der Arzneistoffentwicklung zunehmend an Bedeutung. Die gängigsten RNA-MTase-Assays sind jedoch in ihrem Durchsatz begrenzt, was die Entwicklung im dynamischen Forschungsfeld der medizinischen Chemie verlangsamt. In dieser Studie präsentieren wir ein modulares Synthesystem im Nanomolmaßstab, das die Identifizierung maßgeschneiderter, fluoreszenter MTase-Sonden ermöglicht, um eine breite Auswahl von MTasen für fluoreszenzbasierte Bindungsassays zu erschließen. Die Sondenkandidaten wurden zunächst im 4-Nanomolmaßstab synthetisiert und konnten direkt aus der unbehandelten Reaktionsmischung getestet werden, um eine schnelle Identifizierung von optimierten Sonden zu ermöglichen. Mithilfe einer Alkin-Azid-Click-Funktionalisierungsstrategie und einer *in silico* *protein databank* (PDB) Suche haben wir eine Auswahl fluoreszenter Sonden entwickelt, die für krankheitsassoziierte MTasen aus den METTL- und NSUN-Familien sowie für weitere bakterielle und virale MTasen Eignung zeigen. Basierend auf diesem Konzept wurden bei einem Hochdurchsatz-Screening des bisher unerforschten Wirkstoffziels METTL1 drei Trefferverbindungen mit mikromolarer Wirkpotenz entdeckt, die einen vielversprechenden Ausgangspunkt für die Erforschung von künftigen METTL1-Wirkstoffen darstellen.

RNA hat in der modernen Arzneistoffforschung stark an Bedeutung gewonnen – sei es als Wirkstoff, als Ziel von Arzneistoffen oder als zentrale Komponente in zellulären Stoffwechselwegen, die mit Erkrankungen und Infektionen in Verbindung stehen.<sup>[3,4]</sup> In diesem Zusammenhang spielt die Methylierung von RNA eine wichtige Rolle, da sie ein wesentlicher Stoffwechselprozess in vielen Organismen ist und mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht wird.<sup>[5]</sup> Im Jahr 2023 wurde mit STC-15 der erste RNA-Methyltransferase (MTase)-Inhibitor seiner Klasse, der gezielt METTL3/14 adressiert, in die klinische Erprobung gebracht.<sup>[6]</sup> Während der Präparation dieses Manuskripts wurde eine Serie von METTL1 Inhibitoren durch Nai et al. berichtet.<sup>[7]</sup>

Derzeit stellen enzymatische Szintillationsassays unter Verwendung von <sup>3</sup>H-markiertem *S*-Adenosylmethionin (SAM) und der LC/MS-basierte Nachweis des MTase-Koprodukts *S*-Adenosylhomocystein (SAH) die wichtigsten Techniken für das Screening von Wirkstoffkandidaten gegen RNA-MTasen wie z. B. METTL3/14,<sup>[8]</sup> DNMT2,<sup>[1]</sup> NSUN2,<sup>[9]</sup> und antiinfektiöse Ziele wie *H. influenzae* TrmD oder SARS-CoV2 nsp10/16 dar.<sup>[10,11]</sup> Obwohl diese auf Enzymaktivität basierenden Assayformate wertvoll für die Bestimmung der Hemmkonstanten (IC<sub>50</sub>, K<sub>1</sub>) von fortgeschrittenen Wirkstoff- und Leitstruktur-Kandidaten sind, haben sie im Vergleich zu biophysikalischen Liganden-Bindungsassays Nachteile, wie eine erhöhte Anfälligkeit für Interferenzen und eine unzureichende Reproduzierbarkeit bei sehr hohen Ligandenkonzentrationen.<sup>[12]</sup> Zusätzlich zu diesen Einschränkungen sind der Zeitaufwand, die Reagenzien- und Instrumentenaufwendungen aller bisher etablierten MTase-Assays von Natur aus hoch, was ihre Verwendung für mittlere bis hochdurchsatzbasierte Anwendungen limitiert und Fortschritte in diesem sich gerade disruptiv entwickelnden Bereich der medizinischen Chemie bremst.<sup>[13]</sup>

Um diese methodische Lücke zu schließen, haben wir kürzlich eine fluoreszente Sonde für das Screening von DNMT2-Inhibitoren mit Hilfe von *microscale thermophoresis* (MST) und der Fluoreszenzpolarisation (FP) Assays entwickelt.<sup>[14]</sup> Die 5-FAM-Triazolyl-Adenosyl-Diaminobuttersäure (FTAD)-Sonde bindet an das aktive Zentrum von DNMT2, wo sie durch Liganden, wie Wirkstoffkandidaten,

[\*] J. L. Meidner,<sup>+</sup> A. F. Frey,<sup>+</sup> Dr. R. A. Zimmermann,<sup>+</sup> M. O. Sabin, Dr. Z. Nidoieva, A. C. Weldert, S. N. Hoba, Dr. F. Barthels  
Institut für Pharmazeutische und Biomedizinische Wissenschaften  
Johannes Gutenberg-Universität, 55128 Mainz.  
E-mail: barthels@uni-mainz.de

Dr. M. W. Krone, Dr. F. Barthels  
Department of Molecular, Cellular, and Developmental Biology  
Yale-University, New Haven, CT 06511, USA.

[†] Diese Autoren haben gleichermaßen beigetragen.

© 2024 Die Autoren. Angewandte Chemie veröffentlicht von Wiley-VCH GmbH. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License, die jede Nutzung des Beitrages in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert wird.

verdrängt werden kann und bietet so einen praktischen primären Assay für initiale Wirkstoffscreenings.

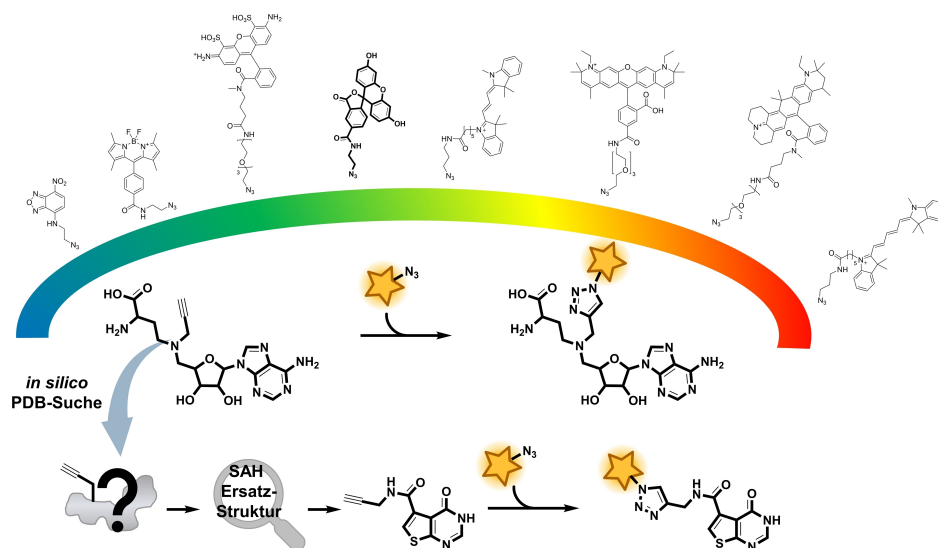
Im Vergleich zu markierungsfreien Screeningmethoden wie der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) oder der isothermalen Titrationskalorimetrie (ITC) bietet die orthosterisch bindende **FTAD**-Sonde einen Vorteil für Wirkstoffscreening-Anwendungen. Nicht-hemmende Binder werden durch diesen Assay nicht erfasst, da sie die katalytische Funktion der MTase nicht beeinflussen und in Bezug auf die Entwicklung von Hemmstoffen häufig falsch-positive Treffer darstellen. Das Konzept der **FTAD**-Sonde zeigt jedoch seine Limitation bei der Anwendung anderer RNA-MTasen, wie beispielsweise aus den NSUN- und METTL-Familien, sowie bei nicht Rossmann-gefalteten MTasen wie der bakteriellen TrmD, da **FTAD** nur eine schwache Bindungsaffinität ( $K_D > 20 \mu\text{M}$ ) zu vielen dieser krankheitsassoziierten Wirkstoffziele aufweist (Abb. S1A).

In dieser Studie stellen wir ein modulares Baukastensystem unter Verwendung kombinatorischer Chemie vor, dass es ermöglicht, maßgeschneiderte fluoreszente Sonden zu identifizieren. Diese Sonden bestehen aus zwei rekombinierbaren Segmenten (einem Fluorophor und einem MTase-Rekrutierer) und erschließen eine breite Auswahl an MTase-Targets für die Wirkstoffentwicklung – einschließlich bisher nicht adressierter MTasen aus den NSUN- und METTL-Familien (Abb. 1). Im Anschluss demonstrierten wir die generelle Nutzbarkeit dieses Systems für ein Wirkstoffscreening der zuvor nicht adressierten MTase METTL1 (Abb. 5).

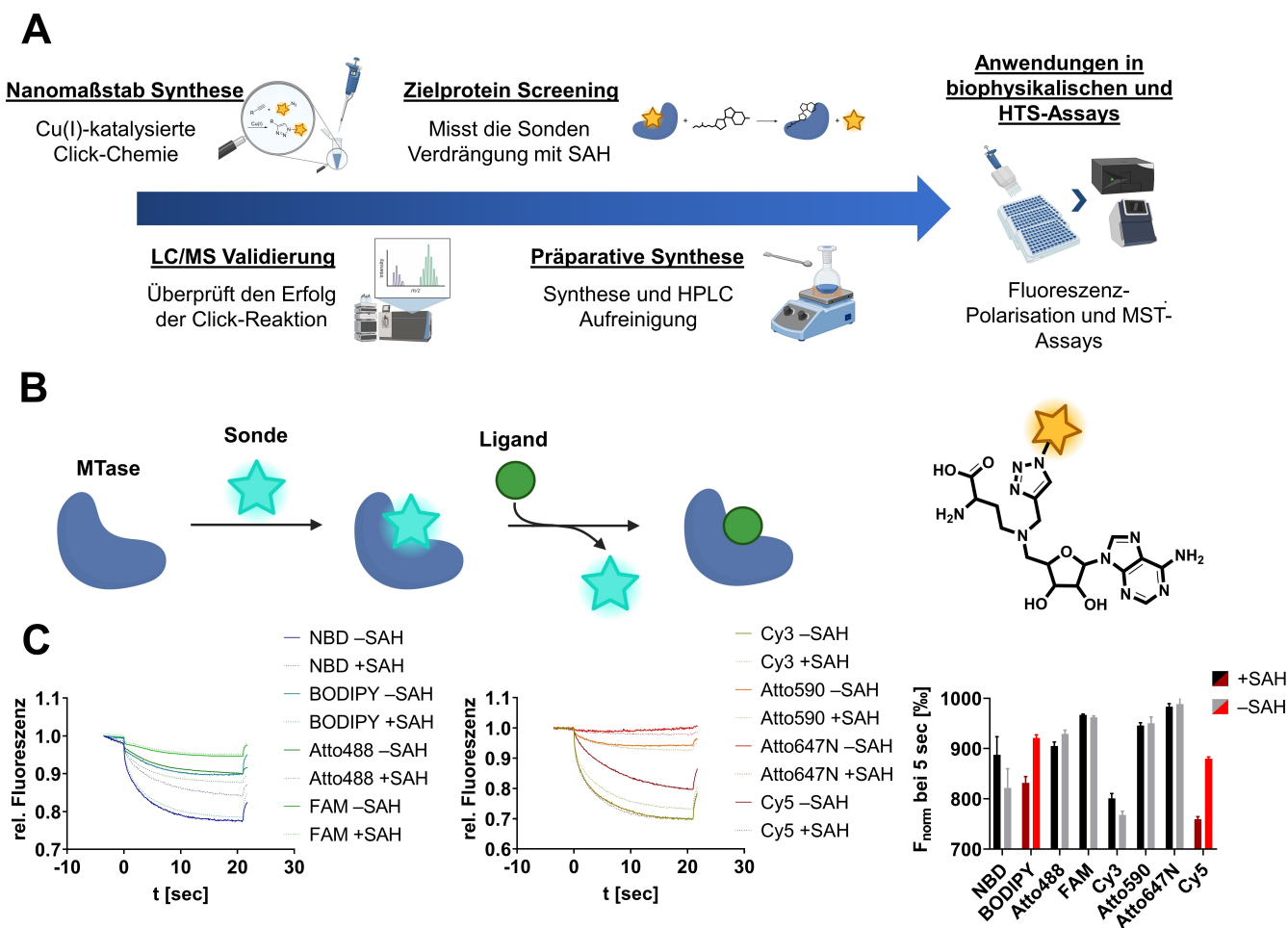
Im ersten Schritt unserer Entwicklungskampagne haben wir SAH-Triazol-abgeleitete Chemotypen als Sondenkandidaten ausgewählt. Dies basierte auf zwei Gründen: Erstens

ist das SAH-Triazol-Motiv unter MTase-Inhibitoren gut etabliert<sup>[1–15–17]</sup> und zweitens konnten wir schnell eine Auswahl verschiedener Fluorophor-Azide einsetzen, die durch eine kupferkatalysierte Azid-Alkin-Clickreaktion (CuAAC) an den bestehenden SAH-Alkin-Baustein gekoppelt wurden. Um ein breites Spektrum an Fluorophoreigenschaften abzudecken, haben wir Fluorophorazide verwendet, die in drei Gruppen eingeteilt werden können: globuläre Farbstoffe wie 5-FAM, Atto488, Atto590 und Atto647N; kleine organische Fluorophore wie NBD oder BODIPY; und längliche Fluorophore vom Cyanin-Typ wie Cy3 und Cy5. Aus physikochemischer Sicht lässt sich diese Auswahl von Fluorophoren auch durch ihre Molekülladung (Atto488:  $X^{-1}$  bis Atto590:  $X^{+1}$ ) oder die Hydrophobizität (NBD: am polarsten, Cy5: am wenigsten polar) charakterisieren. Alle ausgewählten Fluorophor-Azide zeigten Biokompatibilität und eigneten sich gut für MST- bzw. FP-basierte Assays. Bei der Auswahl eigener Fluorophore ist zu berücksichtigen, dass für die Entwicklung von FP-Assays besonders solche Fluorophore vorteilhaft sind, die keinen zu flexiblen Linker aufweisen („Propeller-Effekt“) und eine kurze Fluoreszenzlebensdauer ( $< 10 \text{ ns}$ ) besitzen.<sup>[18]</sup> Für das initiale Sondenscreening wurde die Synthese im 4-Nanomolmaßstab ( $416 \mu\text{M}$  in  $12 \mu\text{L}$ ) nach konventionellen CuAAC-Bedingungen mit Cu(II), Ascorbat und Tris[(1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amin in 1:1 DMSO/Wasser durchgeführt (Abb. 2A).<sup>[2]</sup>

Der Erfolg der Reaktion wurde anschließend mittels LC/MS überprüft. Eine Reaktion wurde als erfolgreich betrachtet, wenn ein Produktumsatz von  $> 85 \%$  erreicht wurde (Abb. S5). In diesem Fall konnten die Sonden direkt aus dem Reaktionsgemisch durch ein MST-Verdrängungsex-



**Abbildung 1.** Überblick über die Strategie zur Entwicklung von MTase-Sonden im Nanomolmaßstab. Acht verschiedene Fluorophorazide (als Sterne dargestellt) wurden durch CuAAC-Funktionalisierung an einen SAH-Alkin-Baustein gekoppelt.<sup>[1,2]</sup> Auf diese Weise wurden Sondenkandidaten im 4-Nanomolmaßstab synthetisiert und direkt aus den Reaktionsmischungen auf ihre MTase-Ziellaffinität getestet. Zudem ermöglichte die Variation der SAH-Kernstruktur durch eine *protein databank* (PDB)-Suche die Identifizierung von elf SAH-Ersatzstrukturen, die ebenfalls mit Fluorophoren funktionalisiert wurden, um den chemischen Raum der möglichen MTase-Sonden zu erweitern. Diese Strategie führte zur Entdeckung einer Thienopyrimidin-basierten Sonde, die für bakterielle MTasen mit SPOUT-Faltung Eignung zeigte, für welche der SAH-Alkin-Baustein keine geeigneten Sonden generierte.



**Abbildung 2.** Strategie zur Entwicklung von MTase-Sonden. (A) Die Entwicklung der fluoreszenten Sonden erfolgte in fünf sequenziellen Schritten. (B) Schematische Darstellung des Verdrängungsassays: Funktionelle Sonden bilden einen Komplex mit MTasen, was zu einer Veränderung der Thermophoresis (MST-Assay) oder der Polarisation (FP-Assay) im Vergleich zur ungebundenen Sonde führt. Die Titration mit einem kompetitiven Liganden (wie SAH) führt zur Verdrängung der Sonde und stellt die ursprünglichen Fluoreszenzeigenschaften der ungebundenen Sonde wieder her. (C) Screening-Ergebnisse von TAD-basierten Sondenkandidaten (100 nM) auf METTL1 (2  $\mu$ M) durch MST-Assays. Die MST-Diagramme (links) in Anwesenheit von SAH (100  $\mu$ M) oder ohne SAH ergaben MST-Verschiebungen, wobei **Cy5-TAD** (rechts) die größte SAH-induzierte Verschiebung aufwies ( $\Delta F_{norm}$  bei 5 sek.), was diese Sonde zu einem vielversprechenden Kandidaten als METTL1 Sonde macht (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

periment mit dem natürlichen Liganden SAH getestet werden (Abb. 2B).<sup>[14]</sup> Es wurde dabei sichergestellt, dass die CuAAC-Reagenzien den MST-Assay nicht beeinträchtigen. Daher wurden die MST-Bindungsseigenschaften des in situ synthetisierten **FTAD** mit denen HPLC-aufgereinigten **FTADs** verglichen und als ununterscheidbar validiert (Abb. S1B,C). Anschließend wurden diese initial synthetisierten Sondenkandidaten an zwei ausgewählten Modell-MTasen, METTL1 und NSUN6, untersucht. Für diese Enzyme, deren Überexpression mit Onkogenese in Verbindung gebracht wird, sind derzeit keine selektiven Inhibitoren bekannt, was sie zu attraktiven Zielenzymen für die Arzneistoffentwicklung macht.<sup>[19,20]</sup> Das primäre Sondenscreening wurde mit einer MTase-Lösung (2  $\mu$ M), die mit dem jeweiligen Sondenkandidaten (100 nM) behandelt wurde, durchgeführt. Hierfür wurde das Thermophoreseprofil sowohl mit als auch ohne Zugabe des orthosterisch bindenden Liganden SAH (100  $\mu$ M) aufgenommen. Die Sonde, die die größte Verschiebung im MST-Profil zwischen der Anwesenheit und

Abwesenheit von SAH zeigte, wurde als vielversprechender Sondenkandidat ausgewählt. Bei diesem Screening wurden die beiden BODIPY- bzw. Cy5-basierten Sonden für METTL1 (Abb. 2C) und NSUN6 (Abb. S2A) identifiziert. Die beiden Sonden wurden daraufhin im präparativen Maßstab resynthetisiert, aufgereinigt und validiert. Dabei zeigte sich, dass **Cy5TAD** gut für die Untersuchung von METTL1 (Abb. 4A) und NSUN6 (Abb. S3A) geeignet ist, während sich BODIPY-TAD aufgrund spontaner Deborylierung als zu instabil erwies.

Wir setzten die neu entdeckten TAD-Sonden auch zur Untersuchung der homologen Enzyme NSUN2 und METTL3/14 ein, zwei Krebszielproteine, für die bisher nur einzelne, wenige Inhibitoren entwickelt wurden und für die bisher keine fluoreszenten Sonden oder biophysikalischen Screening-Tests bekannt sind.<sup>[8,9,21]</sup> Auch hier erwiesen sich **Cy5TAD** (NSUN2) und **FTAD** (METTL3/14) als effektive Sonden (Abb. S3).

Im nächsten Schritt haben wir die neu entdeckten Sonden an MTasen außerhalb der NSUN- und METTL-Familien getestet. Zur Entwicklung einer geeigneten Sonde für eine pharmazeutisch relevante bakterielle MTase führten wir analoge MST-Screenings an der MTase *H. inf.* TrmD durch, die für ihren unverwechselbaren SPOUT-gefalteten Bindungsmodus des SAM-Cofaktors bekannt ist.<sup>[10]</sup> Zunächst konnte kein TAD-Sonden kandidat mit einer signifikanten MST-Verschiebung identifiziert werden (Abb. S2B). Wir vermuteten, dass der SAH-Triazol (TAD)-Chemotyp nur für Rossmann-gefaltete MTasen geeignet ist. Zur Lösung dieses Problems entwickelten wir eine Strategie zur Variation der MTase-Rekrutierer, um SAH-Ersatzstrukturen zu erhalten, die für ein weites Feld von MTasen Eignung zeigt (Abb. 1). Zur Identifizierung geeigneter SAH-Ersatzstrukturen setzten wir eine *protein databank* (PDB) Suchstrategie ein (Details und Code in der SI). Im Wesentlichen entwickelten wir eine cheminformatische Pipeline, welche die PDB nach SAH-Bindungstaschen durchsucht, in denen chemisch unverwandte, nicht-SAH-typische Liganden gebunden sind (Abb. 3A).

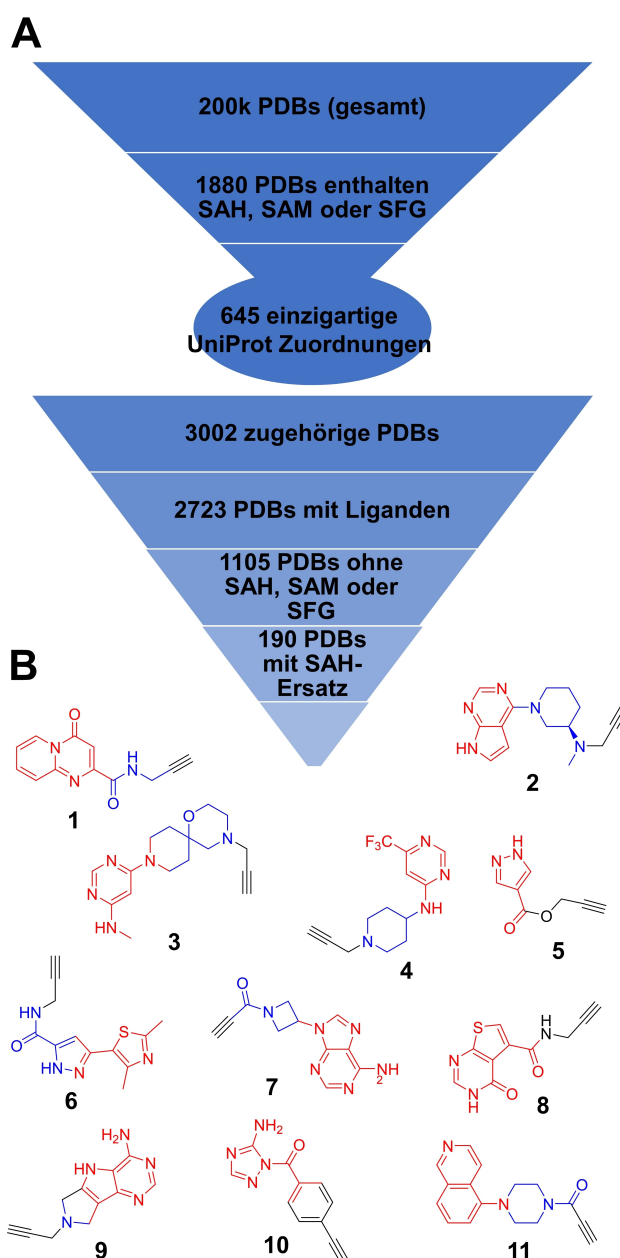
Das Clustering der Ergebnisse führte zur Identifizierung von elf SAH-Ersatzstrukturen **1–11**, die sich für die CuAAC-Funktionalisierung und das Sondenscreening eignen (Abb. 3B). Mit diesem erweiterten Satz von Alkinen wurden analoge Kupplungsreaktionen im Nanomolmaßstab an 5-FAM-N<sub>3</sub> bzw. Cy5-N<sub>3</sub>, gefolgt von MST-Assays, durchgeführt. Diese führten zur Entdeckung einer Thienopyrimidin-basierten Sonde (**Cy5TPD**), die sich sowohl in MST- als auch in FP-Assays geeignet für die Untersuchung von TrmD erwies (Abb. 4C).

Die Validierung im präparativen Maßstab wurde anschließend für alle drei Sonden (**FTAD**, **Cy5TAD** und **Cy5TPD**) durchgeführt, welche für MTase-Targets im Screening effektiv waren (Abb. 4A–C). Zur weiteren biophysikalischen Charakterisierung bestimmten wir die Bindungsaffinitäten zwischen den Sonden und ihren MTasen mittels MST/FP-Assays sowie die jeweiligen SAH-Affinitäten durch präparative Verdrängungsassays, welche mit den durch ITC bestimmten SAH-Bindungsaffinitäten Übereinstimmung zeigten (Tabelle 1, Abb. S6). Wir konnten zudem bestätigen, dass die Proteinbindung dieser drei Sonden nur zu einer minimalen Änderung der Quantenausbeute führt.

**Tabelle 1:** Charakterisierung der fluoreszenten MTase Sonden mittels MST/FP-Assays (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

MTase	Sonde	Sonde $K_D$		SAH $K_D$	
		FP [ $\mu$ M]	MST [ $\mu$ M]	FP/MST [ $\mu$ M]	ITC [ $\mu$ M]
<b>DNMT2</b>	FTAD	6.4 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 0.1	13.6 $\pm$ 2.3	13.6 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>
<b>NSUN2</b>	Cy5TAD	2.4 $\pm$ 0.5	6.9 $\pm$ 0.3	7.9 $\pm$ 0.6	4.7 $\pm$ 0.8
<b>NSUN6</b>	Cy5TAD	6.4 $\pm$ 0.6	6.5 $\pm$ 1.0	4.5 $\pm$ 1.1	4.2 $\pm$ 0.2
<b>METTL1</b>	Cy5TAD	1.6 $\pm$ 0.3	3.2 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.1
<b>METTL3/14</b>	FTAD	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.7	3.7 $\pm$ 0.1 <sup>a</sup>
<b><i>H. inf.</i> TrmD</b>	Cy5TPD	2.0 $\pm$ 0.7	1.3 $\pm$ 0.3	13.9 $\pm$ 1.7	9.2 $\pm$ 0.4
<b>SARS-CoV2 nsp10/16</b>	FTAD	n.d.	1.2 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.9	5.7 $\pm$ 1.9 <sup>a</sup>

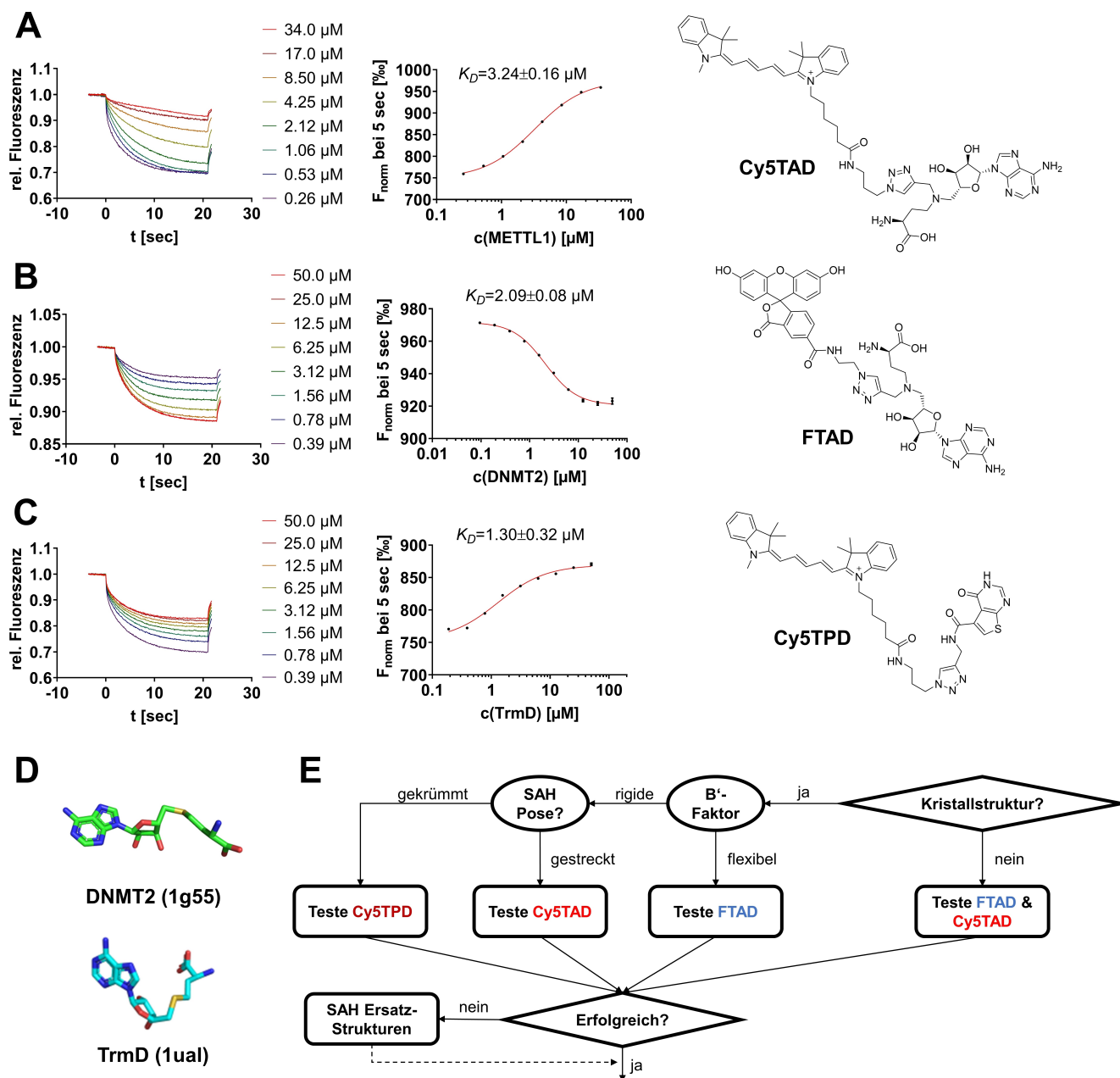
[a] Vergleichende Literaturwerte.<sup>[1],25,26]</sup>



**Abbildung 3.** Beschreibung der Strategie zur PDB Suche von SAH-Ersatzstrukturen. (A) Cheminformatische Pipeline für die Suche nach SAH-Ersatzstrukturen, die in kristallographischer SAH-Bindetaschen. (B) Clustering von 190 Liganden ergab elf SAH-Ersatzalkyne **1–11**, die für eine CuAAC-Funktionalisierung geeignet sind. Rot: Adenin-Ersatz; blau: Ribose-Ersatz; schwarz: Alkin-Gruppe (siehe Abb. S4 für kristallografische Ligandenposen).

Dadurch ist sichergestellt, dass lokale Schwankungen der Fluoreszenzintensität die gemessene Fluoreszenzpolarisation nicht verfälscht (Abb. S7).

Letztlich bemühten wir uns um die Entwicklung eines strukturbasierten Modells, um die Eignung einer Sonde für eine bestimmte MTase vorherzusagen. Zwei Faktoren erwiesen sich unserem Modell nach als entscheidend: Die Konformation des SAH-Moleküls in der Kristallstruktur und die intrinsische Flexibilität der MTase-Bindungstasche,



**Abbildung 4.** Validierung der fluoreszenten MTase-Sonden. (A) Validierung der HPLC-aufgereinigten **Cy5TAD**-Sonde (10 nM) mit METTL1 durch MST-Assays (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). (B) **FTAD**-Sonde (100 nM) mit DNMT2 (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). (C) **Cy5TPD**-Sonde (10 nM) mit TrmD (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). (D) Zwei unterschiedliche Bindungsmodi von SAH in MTasen: DNMT2 bindet SAH in einer gestreckten Form, während TrmD einen charakteristisch gekrümmten SAH-Liganden aufweist. PDB-IDs in Klammern. (E) Entscheidungsbaum für die Auswahl einer Sonde auf der Grundlage der SAH-Konformation und der MTase-Flexibilität. Die Flexibilität des aktiven Zentrums (B'-Faktoren) wurde mit Hilfe des BANΔIT-Toolkits bestimmt.<sup>[22]</sup> Details siehe in Tabelle S1.

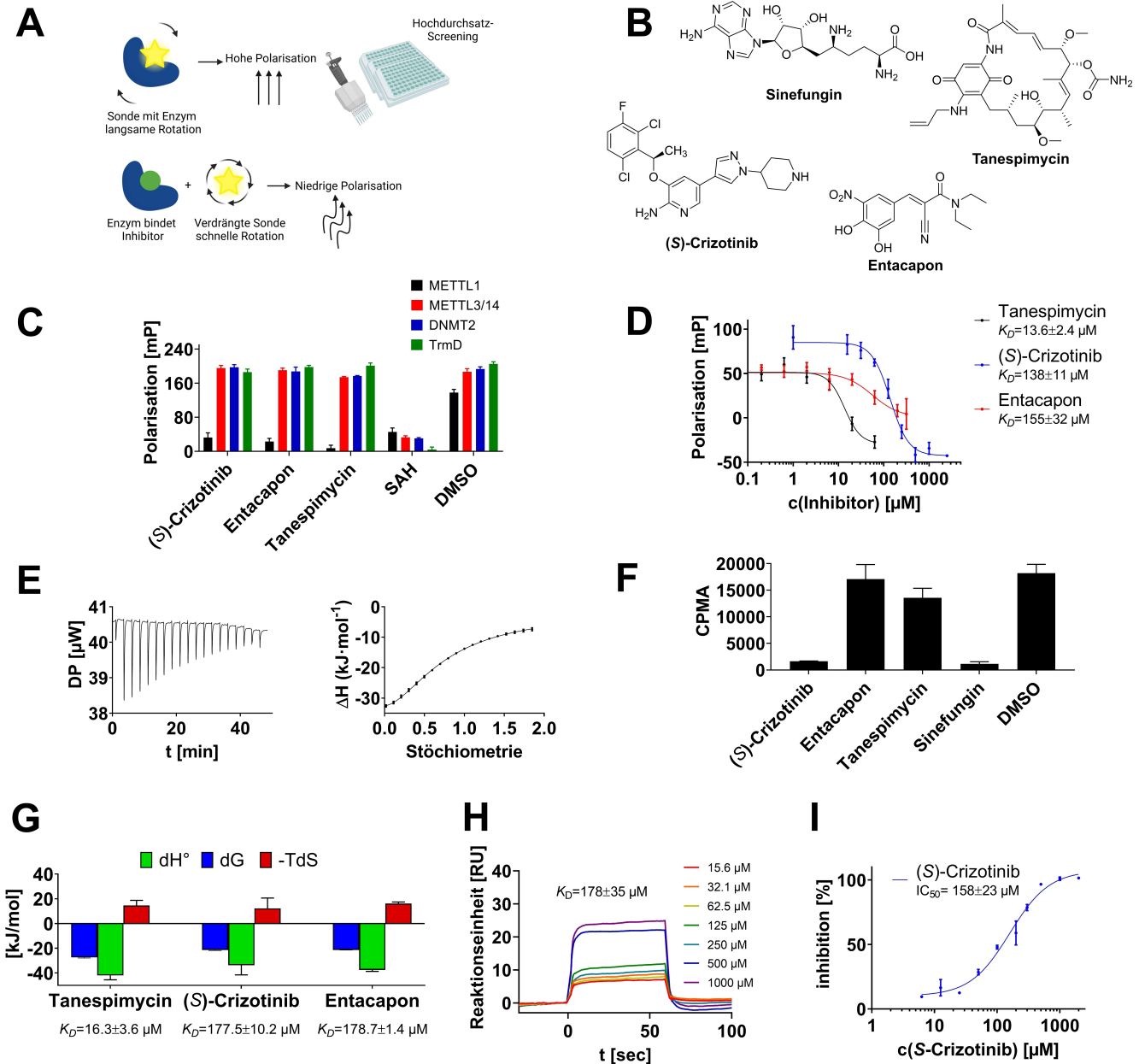
die durch kristallographische B'-Faktoren bestimmt werden kann (Tabelle S1).<sup>[22]</sup> Wenn eine Kristallstruktur einer MTase verfügbar ist, kann mithilfe des unten postulierten Entscheidungsbaums eine passende Sonde ausgewählt werden. (Abb. 4E). MTasen, die einen SAH-Liganden in gekrümmten Modus binden ( $< 100^\circ$ ), sind meist nicht für die beiden TAD-Sonden geeignet, sodass in diesem Fall die **Cy5-TPD** Sonde verwendet werden sollte (Abb. 4D). MTasen mit einer relativ flexiblen Bindungstasche ( $B' > 0$ ) er-

möglichen die Verwendung von **FTAD**, während MTasen mit starrerem Bindungstaschenelementen **Cy5TAD** bevorzugen (Tabelle S1).

Zur Demonstration der Nützlichkeit unseres Konzepts verwendeten wir die neu identifizierte **Cy5TAD**-Sonde für ein Hochdurchsatz-Wirkstoffscreening der weitgehend unerforschten, METTL1-Methyltransferase, welche m7G-Modifikationen in verschiedene tRNAs einführt.<sup>[20]</sup> Mit Hilfe eines FP-Assay Screenings haben wir eine haus eigene Sub-

stanzbibliothek von 2230 Arzneistoffen getestet, um initiale METTL1-bindende Strukturen zu identifizieren, die sich für eine anschließende Leitstrukturoptimierung eignen (Abb. 5). Die Substanzbibliothek wurde zu einem Mastermix aus rekombinant exprimiertem METTL1-Protein (1  $\mu\text{M}$ ), der Cy5TAD-Sonde (20 nM) bei einer finalen Wirk-

stoffkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  hinzugefügt (Abb. 5A). Verbindungen, die die Cy5TAD-Sonde um mindestens 50 % (< 20 mP) verdrängen konnten und die Fluoreszenzeigenschaften der Sonde nicht beeinträchtigten, wurden als Screening-Treffer definiert (siehe Einzelheiten zum Screening-Setup und zur Trefferauswahl in der SI). Auf diese Weise identifi-



**Abbildung 5.** Verwendung von Cy5TAD für ein Hochdurchsatz-Wirkstoffscreening gegen METTL1. (A) Schematische Darstellung des METTL1-FP-Screenings. (B) Chemische Strukturen der identifizierten METTL1 Treffer und der Positivkontrolle Sinefungin. (C) FP-Selektivitätsassays gegen verschiedene rekombinant exprimierte MTasen und 200  $\mu\text{M}$  der jeweiligen Trefferverbindung (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). (D) Dosis-Wirkungs-Kurven und  $K_D$ -Bestimmung mittels METTL1-FP-Assays (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). (E) ITC-Thermogramme und Stöchiometrieplots von Tanespimycin (250  $\mu\text{M}$ ), titriert gegen METTL1 (25  $\mu\text{M}$ ). (F) METTL1/WDR4 Inhibitionsassays der Trefferverbindungen (500  $\mu\text{M}$ ) mittels  $^3\text{H}$ -Szintillometrie (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). Nur (S)-Crizotinib und der Pan-MTase-Inhibitor Sinefungin hemmten die METTL1/WDR4 MTase-Aktivität (CPMA). (G) Signaturdiagramme, welche die ITC-Bindungsthermodynamik aller HTS-Treffer zusammenfassen (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ ). (S)-Crizotinib und Entacapon wurden durch ITC-Verdrängungstitrationen bestimmt (Details in der SI).<sup>[22]</sup> Zusätzliche Thermogramme und Stöchiometrieplots befinden sich in Abb. S6. (H) Bestimmung der Bindungsaffinität von (S)-Crizotinib gegenüber METTL1 mittels SPR. Die Sensorgramme der Triplikate und Dosis-Wirkungs-Kurven sind in Abb. S9 zu finden. (I) Dosis-Wirkungs-Kurve zur Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Werts von (S)-Crizotinib gegen den METTL1/WDR4-Komplex gemessen durch  $^3\text{H}$ -Szintillationsassays (Mittelwert  $\pm$  SD,  $n = 3$ ).

zierten wir drei Trefferverbindungen mit mikromolarer Potenz, die auch durch orthogonale biophysikalische (ITC, FP, SPR) und enzymatische Assays als reale METTL1 Binder validiert werden konnten (Abb. 5D–I).

Unter diesen Trefferverbindungen erwies sich (*S*)-Crizotinib als der vielversprechendste Ausgangspunkt für die Wirkstoffentwicklung gegen METTL1, da es in allen biophysikalischen und enzymatischen Experimenten eine Bindung mittels FP ( $K_D = 138 \mu\text{M}$ ), ITC ( $K_D = 177 \mu\text{M}$ ), SPR ( $K_D = 178 \mu\text{M}$ ) und Inhibition ( $\text{IC}_{50} = 158 \mu\text{M}$ ) zeigte. Bemerkenswert ist, dass (*S*)-Crizotinib bei Ligandkonzentrationen von bis zu 1 mM keine der anderen RNA-MTasen dieser Studie hemmte (Abb. 5C), was diese Verbindung zu einem selektiven METTL1-Treffer macht. Interessanterweise bindet das entsprechende Kinase-hemmende Eutomer (*R*)-Crizotinib (vermarktet als Xalkori) nicht an METTL1, was eine vorteilhafte intrinsische strukturelle Selektivität hervorhebt. Obwohl Tanespimycin und Entacapon in den FP- und ITC-Experimenten als METTL1-Binder identifiziert werden konnten, zeigten diese Verbindungen nur eine schwache Hemmung des heterodimeren METTL1/WDR4-Komplexes unter Verwendung von  $^3\text{H}$ -SAM und eines tRNA-Substrats (Abb. 5F). Dies deutet darauf hin, dass ihre Eignung als potenzielle Ansatzpunkte für die Wirkstoffforschung einschränkt ist. Vermutlich binden diese Trefferverbindungen entweder an die entsprechende Protein-Protein-Interaktionstelle oder an die tRNA-Bindungsstelle, die in Anwesenheit von WDR4 besetzt ist.<sup>[24]</sup> Die vollständigen METTL1-HTS-Assay-Daten sowie weitere identifizierte Treffer sind in der Hintergrundinformationen diskutiert.

Abschließend möchten wir die Grenzen der hier beschriebenen Methodik beleuchten. Eine allgemeine Einschränkung von Assays mit kompetitiven Sonden im Vergleich zu markierungsfreien Methoden (wie SPR oder ITC) ist, dass Inhibitoren mit  $K_D$ -Werten, die um mehr als eine Größenordnung affiner als die Sonde sind, aufgrund des *tight binding* Verhaltens des Enzyminhibitors nur extrapoliert werden können.<sup>[25]</sup> Um diese Einschränkung zu veranschaulichen und gleichzeitig eine Lösung des Problems zu entwickeln, haben wir den hochaffinen METTL3/14-Inhibitor STM2457 ( $\text{IC}_{50} = 5 \text{ nM}$ )<sup>[8]</sup> unter Nutzung der **FTAD**-Sonde charakterisiert. Dies führte zu dem eben beschriebenen *tight binding* Verhalten ( $[\text{E}] = 1 \mu\text{M}$ ) und somit zu einem scheinbar gemessenen  $K_D$  bei halber Enzymkonzentration von 500 nM (Abb. S3G). Diese Limitation konnten wir letztendlich durch die Synthese einer neuen hochaffinen FAM-markierten STM2457-Sonde (**STM-FL**,  $K_D = 19 \text{ nM}$ ) überwinden, welche die Bestimmung einer Bindungsaffinität für STM2457 mit einem  $K_D$  von 9.9 nM ermöglichte (Abb. S8). Dieses Verfahren könnte als allgemeiner Leitfaden für die zukünftige Entwicklung von RNA MTase-Sonden verwendet werden: Während der Entscheidungsbaum in Abb. 4E für die Entwicklung von Sonden ohne bekannte Liganden geeignet ist, ermöglichen bekannte hochaffine MTase-Liganden eine direkte Dekoration mit Fluorophoren. Forscher sollten mit 2–3 Wochen von der Synthese im Nanomaßstab bis zur präparativen Validierung eines Sondenkandidaten rechnen. Um die Ergebnisse und den Nutzen dieser Studie einer breiten Öffentlichkeit zugänglich zu

machen, sind die Sonden auf Anfrage erhältlich: <https://akbarthels.pharmazie.uni-mainz.de/probes-request>.

### Danksagung

Wir bedanken uns für die finanzielle Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Transregio-Sonderforschungsbereichs RMAP (TRR319 RMaP). Unser Dank gilt auch Prof. Craig Crews, der uns großzügig Zugang zu seinem SPR-Instrument ermöglichte. Die Abbildungen wurden unter <https://www.biorender.com/> mit Unterstützung von Dr. Klein erstellt. Open Access Veröffentlichung ermöglicht und organisiert durch Projekt DEAL.

### Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

### Erklärung zur Datenverfügbarkeit

Die Daten, die die Ergebnisse dieser Studie unterstützen, sind in den Hintergrundinformationen zu diesem Artikel verfügbar.

**Stichwörter:** Wirkstoffforschung · Fluoreszente Sonden · RNA

- [1] M. Schwickert, T. R. Fischer, R. A. Zimmermann, S. N. Hoba, J. L. Meidner, M. Weber, M. Weber, M. M. Stark, J. Koch, N. Jung, C. Kersten, M. Windbergs, F. Lyko, M. Helm, T. Schirmeister, *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 9750–9788.
- [2] P. Gehrtz, S. Marom, M. Bührmann, J. Hardick, S. Kleinbölling, A. Shraga, C. Dubiella, R. Gabizon, J. N. Wiese, M. P. Müller, G. Cohen, I. Babaev, K. Shurrush, L. Avram, E. Resnick, H. Barr, D. Rauh, N. London, *J. Med. Chem.* **2022**, *65*, 10341–10356.
- [3] P. A. Boriack-Sjodin, S. Ribich, R. A. Copeland, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2018**, *17*, 435–453.
- [4] N. Jonkhout, J. Tran, M. A. Smith, N. Schonrock, J. S. Mattick, E. M. Novoa, *RNA* **2017**, *23*, 1754–1769.
- [5] A. Cayir, *WIREs RNA* **2022**, *13*, e1702.
- [6] Y. Ofir-Rosenfeld, L. Vasiliaskaitė, C. Saunders, A. Sapetschnig, G. Tsagkogeorga, M. Albertella, M. Carkill, J. Self-Fordham, J. B. Holz, O. Rausch, *Eur. J. Cancer* **2022**, *174*, S123.
- [7] F. Nai, M. P. Flores Espinoza, A. Invernizzi, P. A. Vargas-Rosales, O. Bobileva, M. Herok, A. Caffisch, *ACS Bio and Med Chem Au* **2024**, *4*, 100–110.
- [8] E. Yankova, W. Blackaby, M. Albertella, J. Rak, E. De Braekeleer, G. Tsagkogeorga, E. S. Pilka, D. Aspris, D. Leggate, A. G. Hendrick, N. A. Webster, B. Andrews, R. Fosbeary, P. Guest, N. Irigoyen, M. Eleftheriou, M. Gozdecka, J. M. L. Dias, A. J. Bannister, B. Vick, I. Jeremias, G. S. Vassiliou, O. Rausch, K. Tzelepis, T. Kouzarides, *Nature* **2021**, *593*, 597–601.
- [9] Y. Tao, J. G. Felber, Z. Zou, E. Njomen, J. R. Remsberg, D. Ogasawara, C. Ye, B. Melillo, S. L. Schreiber, C. He, D.

- Remillard, B. F. Cravatt, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2023**, *62*, e202311924.
- [10] P. J. Hill, A. Abibi, R. Albert, B. Andrews, M. M. Gagnon, N. Gao, T. Grebe, L. I. Hajec, J. Huang, S. Livchak, S. D. Lahiri, D. C. McKinney, J. Thresher, H. Wang, N. Olivier, E. T. Buurman, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7278–7288.
- [11] N. L. Inniss, J. Kozic, F. Li, M. Rosas-Lemus, G. Minasov, J. Rybáček, Y. Zhu, R. Pohl, L. Shuvalova, L. Rulíšek, J. S. Brunzelle, L. Bednárová, M. Štefek, J. M. Kormaník, E. Andris, J. Šebestík, A. S. M. Li, P. J. Brown, U. Schmitz, K. Saikatendu, E. Chang, R. Nencka, M. Vedadi, K. J. F. Satchell, *ACS Infect. Dis.* **2023**, *9*, 1918–1931.
- [12] J.-P. Renaud, C. Chung, U. H. Danielson, U. Egner, M. Hennig, R. E. Hubbard, H. Nar, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2016**, *15*, 679–698.
- [13] T. R. Fischer, L. Meidner, M. Schwickert, M. Weber, R. A. Zimmermann, C. Kersten, T. Schirmeister, M. Helm, *Nucleic Acids Res.* **2022**, gkac224.
- [14] R. A. Zimmermann, M. Schwickert, J. L. Meidner, Z. Nid-oieva, M. Helm, T. Schirmeister, *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* **2022**, *5*, 1079–1085.
- [15] T.-R. Chern, L. Liu, E. Petrunak, J. A. Stuckey, M. Wang, D. Bernard, H. Zhou, S. Lee, Y. Dou, S. Wang, *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 1348–1352.
- [16] J. Dowden, W. Hong, R. V. Parry, R. A. Pike, S. G. Ward, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20*, 2103–2105.
- [17] G. Zhang, S. L. Richardson, Y. Mao, R. Huang, *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 4149–4154.
- [18] A. M. Rossi, C. W. Taylor, *Nat. Protoc.* **2011**, *6*, 365–387.
- [19] M. Li, Z. Tao, Y. Zhao, L. Li, J. Zheng, Z. Li, X. Chen, *J. Transl. Med.* **2022**, *20*, 214.
- [20] W. Cheng, A. Gao, H. Lin, W. Zhang, *Mol. Ther. Oncolytics* **2022**, *26*, 27–34.
- [21] A. Dolbois, R. K. Bedi, E. Bochenkova, A. Müller, E. V. Moroz-Omori, D. Huang, A. Cafilisch, *J. Med. Chem.* **2021**, *64*, 12738–12760.
- [22] F. Barthels, T. Schirmeister, C. Kersten, *Mol. Inf.* **2020**, *40*, 202000144.
- [23] S. J. Hammerschmidt, F. Barthels, A. C. Weldert, C. Kersten, *J. Chem. Educ.* **2024**, DOI 10.1021/acs.jchemed.3c01133.
- [24] V. M. Ruiz-Arroyo, R. Raj, K. Babu, O. Onolbaatar, P. H. Roberts, Y. Nam, *Nature* **2023**, *613*, 383–390.
- [25] P. J. Tonge, *ACS Infect. Dis.* **2019**, *5*, 796–808.
- [26] S. Perveen, A. Khalili Yazdi, K. Devkota, F. Li, P. Ghiabi, T. Hajian, P. Loppnau, A. Bolotokova, M. Vedadi, *SLAS Discovery* **2021**, *26*, 620–627.
- [27] X. Wang, J. Huang, T. Zou, P. Yin, *RNA Biol.* **2017**, *14*, 300–304.

Manuskript erhalten: 23. Februar 2024

Akzeptierte Fassung online: 15. August 2024

Endgültige Fassung online: 24. Oktober 2024