

Affinitätsbasierte Markierung von Cytohesinen mit difunktionalen SecinH3-Photoaffinitätssonden**

*Xihe Bi, Anton Schmitz, Alaa M. Hayallah, Jin-Na Song und Michael Famulok**

Professor Manfred T. Reetz zum 65. Geburtstag gewidmet

Wir haben kürzlich mithilfe eines Aptamer-Verdrängungsassays das 1,2,4-Triazolderivat SecinH3 (siehe Schema 1) als den ersten niedermolekularen Inhibitor für Cytohesine – eine Klasse cytoplasmatischer Regulationsproteine – identifiziert.^[1,2] Cytohesine sind kleine Guaninnucleotid-Austauschfaktoren (GEFs), welche die ADP-Ribosylierungsfaktoren (Arfs) stimulieren, bei denen es sich um ubiquitär exprimierte Ras-ähnliche GTPasen handelt, die verschiedene zelluläre Regulationsnetzwerke wie Vesikeltransport und Integrinaktivierung kontrollieren.^[3] In Säugern gibt es vier stark homologe Cytohesine, die alle dieselbe Domänenstruktur aufweisen: eine die GEF-Aktivität enthaltende Sec7-Domäne sowie eine Pleckstrinhomologie(PH)- und eine Coiled-Coil(CC)-Domäne. SecinH3 bindet die Sec7-Domänen der Cytohesine-1, -2 [auch bekannt als „Arf nucleotide-binding-site opener“ (ARNO)] und -3 und inhibiert ihre Guaninnucleotid-Austauschaktivität. Die Anwendung des Inhibitors in humanen Leberzellen, Fliegen und Mäusen führte in allen Fällen zu einer reduzierten Signalweiterleitung durch Insulin, was darauf hinweist, dass Insulinrezeptorkomplex-assoziierte Cytohesine essenzielle Komponenten dieses zentralen Signalwegs sind.^[1a,4]

Man kennt zwei Klassen von Arf-GEFs, die sich durch ihre Größe unterscheiden. Die Cytohesine gehören zu den kleinen (47 kDa) Arf-GEFs. Die großen Arf-GEFs, die ebenfalls eine Sec7-Domäne enthalten, haben eine Masse von etwa 200 kDa.^[5] Anders als die großen Arf-GEFs sind die kleinen SecinH3-sensitiven Cytohesine unempfindlich gegenüber dem Pilzmetaboliten Brefeldin A (BFA). Bislang ist die Spezifität von SecinH3 für Cytohesine lediglich für eine begrenzte Anzahl Proteine mithilfe isothermaler Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht worden.^[1a]

Eine leistungsfähige Methode zur Bestimmung der Spezifität kleiner Molekülmodulatoren für ihre Zielproteine ist die Photoaffinitätsmarkierung,^[6] die es ermöglicht, eine große Zahl individueller Proteine oder Proteingemische parallel zu

analysieren.^[6a,b] Die Kombination von Photoaffinitätsmarkierung mit Massenspektrometrie hat sich inzwischen als effizienter Ansatz für die Identifizierung der Bindestellen zwischen modulatorischen Substanzen und ihren Proteinliganden etabliert.^[6c,d] Außerdem können mit Reportergruppen versehene Derivate niedermolekularer Verbindungen als Reagentien für die aktivitätsbasierte Proteinprofilierung (ABPP) verwendet werden.^[7]

Wir berichten hier über das Design, die Synthese und die Anwendung von SecinH3-basierten Photoaffinitätsreagentien. Wir zeigen durch ihre Anwendung auf eine breite Palette von GEFs und ihre kleinen GTPase-Substrate, dass Secinderivate, die einen direkten Nachweis der kovalenten Verknüpfung zwischen der Photoaffinitätssonde und der Cytohesin-Sec7-Domäne ermöglichen, eine hohe Spezifität für Cytohesine aufweisen.

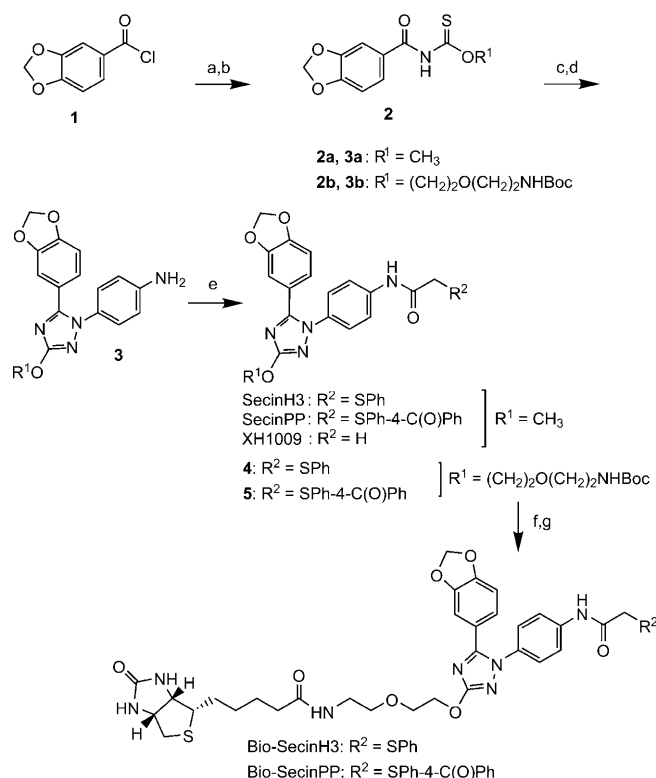
Erste Studien zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR) von SecinH3 zeigten, dass die terminale Thiophenylgruppe essenziell für die Inhibitionsaktivität ist.^[8] Die Deletion dieser Gruppe in XH1009 (Schema 1) führte zu einem deutlichen Verlust des Sec7-katalysierten Guaninnucleotid-Austauschs an [Δ 17]Arf1 (Abbildung 1). Dagegen hatte die weitere Modifikation des Phenylrestes nur einen geringfügigen Einfluss auf die Inhibitorwirkung oder war sogar vorteilhaft. Wir nutzten diesen Befund, um SecinH3 in ein Photoaffinitätsreagens zu überführen, indem wir in SecinPP (Schema 1) den terminalen Phenylrest gegen eine photolabile Benzophenon(Bp)-Gruppe austauschten. Vorteile von Bp als Photophor sind seine chemische Stabilität, die Spezifität der Insertionsstellen während der Photoaktivierung und die Möglichkeit, ohne Reaktivitätsverlust wiederholt mit UV-Licht anzuregen.^[9] Die Anbringung der Biotingruppe über den Aminoethoxyethanol-Abstandhalter in Bio-SecinPP (Schema 1) beruhte auf orientierenden SAR-Studien, denen zufolge die Methoxygruppe in Position 3 des Triazolrings ohne signifikanten Verlust der Inhibitionsaktivität verlängert werden kann.^[8] Als Kontrollsubstanz synthetisierten wir das biotinmarkierte Bio-SecinH3.

Die Synthese der Secinderivate (Schema 1) beginnt mit der Überführung des Benzodioxolcarbonsäurechlorids **1** in den Thiocarbamoylsäure-*O*-alkylester **2** mit KSCN und dem entsprechenden Alkohol. Reaktion mit 4-Nitrophenylhydrazin und anschließende Reduktion lieferten die 1,2,4-Triazolverbindungen **3**. Anknüpfung der Phenyl- oder Benzophenonsulfanylessigsäurederivate an **3a** ergab SecinH3 bzw. SecinPP, während die Anknüpfung an **3b** zu **4** bzw. **5** führte. Die Acetylierung von **3a** ergab XH1009. Die Entschützung

[*] Dr. X. Bi, Dr. A. Schmitz, Dr. A. M. Hayallah, Dr. J.-N. Song, Prof. Dr. M. Famulok
LIMES Institute Program Unit Chemical Biology & Medicinal Chemistry, Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
Fax: (+49) 228-735-388
E-Mail: m.famulok@uni-bonn.de

[**] Diese Arbeit wurde durch die SFBs 645 und 704 (M.F.) und die Alexander von Humboldt-Stiftung (X.B.) gefördert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200803962> zu finden.



Scheme 1. Synthese der verwendeten Secinderivate. a) KSCN, Aceton, 60 °C; b) $R^1\text{OH}$, Aceton, 50 °C, 83 %; c) 4-Nitrophenylhydrazin, EtOH, 80 °C, 70 %; d) Fe/HCl , NH_4Cl , $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$, 65 °C, 64 %; e) $R^2\text{CH}_2\text{COOH}$, HBTU/ NEt_3 , DMF, 22 °C, 57 %; f) TFA/ CH_2Cl_2 , 94 %; g) D(+)-Biotin, HBTU/ NEt_3 , DMF, 69 %. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl, HBTU = *O*-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, TFA = Trifluoressigsäure.

von **4** und **5**, gefolgt von der Acylierung mit D(+)-Biotin, lieferte Bio-SecinH3 und Bio-SecinPP in guten Ausbeuten.

SecinPP zeigt im ARNO-Sec7-katalysierten GDP/GTP-Austauschassay an $[\Delta 17]\text{Arf1}$ eine ähnliche Inhibitionskurve wie SecinH3, was auf vergleichbare Bindungseigenschaften beider Substanzen hinweist; XH1009 kam als Negativkontrolle zum Einsatz (Abbildung 1). Als Nächstes bestimmten wir die konzentrations- und zeitabhängige Effizienz der Markierung von ARNO-Sec7 durch Bio-SecinPP. Dafür wurden 2.5 μM ARNO-Sec7 mit 5 μM Bio-SecinPP 2–3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine UV-Bestrahlung mit steigenden Bestrahlungszeiten (0–5 min) mit einer Energie von 200 mW. Nach der Auftrennung der Proteine durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte der Nachweis der modifizierten Proteine durch ein Meerrettichperoxidase/Streptavidin-Konjugat. Weil alle hier verwendeten Proteine einen Hexahistidinanker (His6) trugen, wurde ein His6-spezifischer Antikörper zur Normalisierung der aufgetragenen Proteinmengen verwendet. Abbildung 2B zeigt, dass die Menge an markiertem ARNO-Sec7 mit steigender Bestrahlungszeit stetig ansteigt; nach 3 min lag die Modifikation 30-fach über dem

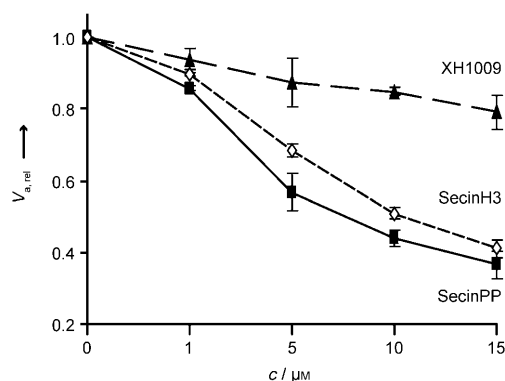


Abbildung 1. Inhibition des von der Sec7-Domäne von Cytohesin-2 (ARNO) katalysierten Guaninnucleotid-Austauschs an $[\Delta 17]\text{Arf1}$ durch SecinH3, SecinPP und XH1009 (Tryptophanfluoreszenzassay); $^{[10]}$ c = Inhibitorkonzentration, $v_{a,\text{rel}}$ = relative Anfangsgeschwindigkeit.

unbestrahlten Hintergrund. Die Photoaffinitätsmarkierung bei 2.5 μM Protein und konstanter UV-Bestrahlung für 3 min erfolgte konzentrationsabhängig bei steigenden Bio-SecinPP-Mengen von 0 bis 5 μM (Abbildung 2C). Verwendete man 2.5 μM Bio-SecinH3 unter den gleichen Bedingungen, wurde ein dem Hintergrund entsprechendes Signal erhalten (Abbildung 2C, Bahn 7), was zeigt, dass die Markierung vom Photophor abhängt. Schließlich führten wir ein Konkurrenzexperiment durch (Abbildung 2D), mit dem wir zeigen konnten, dass der Bindungsmodus von Bio-SecinPP dem von

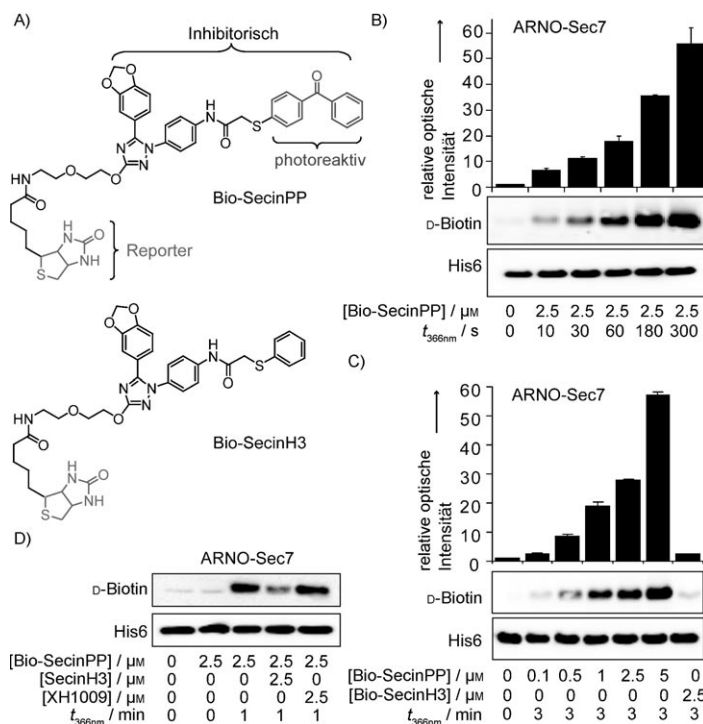


Abbildung 2. A) Strukturen von Bio-SecinPP und Bio-SecinH3. Photoaffinitätsmarkierung von ARNO-Sec7 mit Bio-SecinPP bei B) steigender Bestrahlungszeit t und C) steigender Bio-SecinPP-Konzentration. D) Konkurrenzexperiment mit gleichen Mengen SecinH3 oder XH1009.

SecinH3 entspricht. Dazu wurden 2.5 μ M SecinH3 zunächst mit ARNO-Sec7 3 min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend wurde die gleiche Menge Bio-SecinPP zugefügt, 1 min bestrahlt und durch Western Blot analysiert. In Gegenwart äquimolarer Mengen an SecinH3 ist die Menge an markiertem Protein deutlich verringert (Abbildung 2D, Bahn 4). Dagegen beeinflusst XH1009 die Effizienz der Photomarkierung von Bio-SecinPP nicht (Bahn 5), was zeigt, dass Bio-SecinPP und SecinH3 die gleiche Bindestelle im ARNO-Protein besetzen.

Nachdem wir Bio-SecinPP als difunktionales Reagens verifiziert hatten, untersuchten wir die Spezifität der Markierung anhand einer Serie anderer Arf-GEF-Sec7-Domänen, GEFs ohne Sec7-Domänen, und kleiner GTPasen (Abbildung 3). Wie ARNO-Sec7 wurden auch die Sec7-Domänen

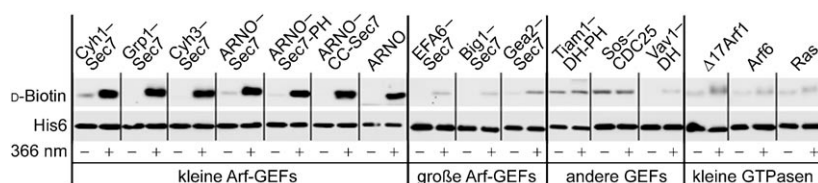


Abbildung 3. Photoaffinitätsmarkierung kleiner GTPasen und GEF-Domänen (2.5 μ M) mit Bio-SecinPP (2.5 μ M). Bestrahlung: 100 mW, 1 min.

der Cytohesine 1 und 3 sowie die Sec7-Domäne des Cytohesins Steppke aus *Drosophila melanogaster* (Grp1-Sec7) von Bio-SecinPP nach einminütiger UV-Bestrahlung mit hoher Effizienz markiert. Vollängen-ARNO sowie die trunkierten Konstrukte ARNO-Sec7-PH und ARNO-CC-Sec7 zeigten eine ebenso effiziente Markierung wie die Sec7-Domäne, was darauf hinweist, dass die anderen Cytohesindomänen die Markierung nicht beeinflussen. Die effiziente Modifizierung von Vollängen-ARNO demonstriert, dass Bio-SecinPP eine vielversprechende ABPP-Sonde für Cytohesine ist.

Die Sec7-Domänen der mittelgroßen und großen Arf-GEFs wie „exchange factor for Arf6“ (EFA6), „Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 1“ (Big1) und „Guanine nucleotide exchange factor for Arfs 2“ (Gae2) der Hefe zeigten keine Modifikation oder nur Hintergrundmodifikation. Auch GEF-Domänen, die nicht mit der Sec7-Domäne verwandt sind, wie die „Dbl homology“ (DH)-Domäne des Rho-GEF Vav1 reagierten nicht mit Bio-SecinPP. Dagegen zeigte die DH-PH-Domäne des Rac-GEF „T-lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1“ (Tiam1) und die CDC25-ähnliche GEF-Domäne des Ras-GEF „son of sevenless“ (Sos) eine geringfügig unspezifische Wechselwirkung mit dem Peroxidase/Streptavidin-Konjugat, die aber sowohl von der Bestrahlung (Abbildung 3) als auch von Bio-SecinPP (nicht gezeigt) unabhängig war. Die kleinen GTPasen Arf1, Arf6 und Ras reagierten nicht mit Bio-SecinPP. Diese Befunde zeigen, dass die Markierung durch Bio-SecinPP eine hohe Spezifität für Cytohesine aufweist.

Wir haben eine photoaktive Sonde für Cytohesine entworfen und synthetisiert, indem wir eine Benzophenongruppe so in SecinH3 integrierten, dass seine Inhibitoraktivität erhalten blieb. Die Einführung eines Biotinankers führte zu

Bio-SecinPP, einem aktivitätsbasierten Reagens für Cytohesine, dessen Anwendung auf verschiedene GEFs und GTPasen einen deutlichen Hinweis auf die spezifische Bindung des Inhibitors an die Sec7-Domänen der Mitglieder der Cytohesin-Familie ergab. Damit lassen sich nun Reaktionsbedingungen definieren, die eine proteomweite, affinitätsbasierte Profilierung von Cytohesinkomplexen in Zellen oder ganzen Organismen ermöglichen könnten.

Experimentelles

Die Photoaffinitätsmarkierung von ARNO-Sec7 mit Bio-SecinPP im zeitlichen Verlauf wird hier exemplarisch beschrieben. 2.5 μ M Bio-SecinPP wurden mit 2.5 μ M ARNO-Sec7 in 50 μ L phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS-Puffer; pH 7.4) und 1% DMSO vermischt. Nach 2–3 min Inkubation bei 23°C wurde das Gemisch in ein Glasgefäß (50 \times 10 mm; Dicke: 0.65 mm) überführt und 0–5 min bei 366 nm, 100 mW bestrahlt (Eigenbau). Danach wurden die Proteine durch Zusatz von 6 \times Ladungspuffer und 5-minütiges Erhitzen bei 96°C denaturiert. Die Proteine wurden durch 12.5% SDS-PAGE aufgetrennt und durch Blotting-Techniken auf eine Nitrocellulosemembran (Whatman) aufgetragen. Zum Nachweis der Biotinylierung wurde die Membran 1 h bei 23°C mit 10 mL TBST („Tris-buffered saline 0.1% TWEEN“, pH 7.6; Sigma) und 5% Rinderserumalbumin (Sigma) behandelt, zweimal mit 10 mL TBST gewaschen und 16 h mit Meerrettichperoxidase(HRP)-konjugiertem

Streptavidin (1:20000; Rockland Inc.) bei 4°C in 10 mL 5% Rinderserumalbumin(BSA)/TBST inkubiert. Zum Nachweis des His6-Ankers wurde die Membran 1 h mit 5% fettfreiem Milchkpulver in TBST bei 23°C blockiert und 16 h mit einem His6-spezifischen Antikörper (1:2000; SantaCruz Biotechnology) bei 4°C inkubiert. Nach sorgfältigem Waschen erfolgte die Inkubation für 1 h mit einem HRP-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG (Santa Cruz Biotech) bei 23°C. Die Visualisierung erfolgte durch verstärkte Chemilumineszenz (Millipore). Alle Daten wurden doppelt bestimmt.

Eingegangen am 11. August 2008

Online veröffentlicht am 29. Oktober 2008

Stichwörter: Benzophenon · Cytohesin · Inhibitoren · Photoaffinitätsmarkierung

- [1] a) M. Hafner, A. Schmitz, I. Grüne, S. G. Srivatsan, B. Paul, W. Kolanus, T. Quast, E. Kremmer, I. Bauer, M. Famulok, *Nature* **2006**, *444*, 941; b) M. Hafner, E. Vianini, B. Albertoni, L. Marchetti, I. Grüne, C. Gloeckner, M. Famulok, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 579.
- [2] Übersichten: a) M. Famulok, J. S. Hartig, G. Mayer, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 3715; b) S. G. Srivatsan, M. Famulok, *Comb. Chem. High Throughput Screening* **2007**, *10*, 698; c) M. Famulok, *Curr. Opin. Mol. Ther.* **2005**, *7*, 137; d) M. Famulok, G. Mayer, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 19.
- [3] a) A. K. Gillingham, S. Munro, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2007**, *23*, 579; b) W. Kolanus, *Immunol. Rev.* **2007**, *218*, 102; c) J. L. Bos, H. Rehmann, A. Wittinghofer, *Cell* **2007**, *129*, 865.
- [4] B. Fuss, T. Becker, I. Zinke, M. Hoch, *Nature* **2006**, *444*, 945.
- [5] J. G. Donaldson, C. L. Jackson, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 475.
- [6] a) G. Dormán, G. D. Prestwich, *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 64; b) F. Kotzyba-Hibert, I. Kapfer, M. Goeldner, *Angew. Chem.*

- 1995**, 107, 1391; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1995**, 34, 1296; c) L. Q. Al-Mawsawi, V. Fikkert, R. Dayam, M. Witvrouw, T. R. Burke, Jr., C. H. Borchers, N. Neamati, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, 103, 10080; d) A. Sinz, *Angew. Chem.* **2007**, 119, 670; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2007**, 46, 660; e) M. C. Hagenstein, J. H. Mussnug, K. Lotte, R. Plessow, A. Brockhinke, O. Kruse, N. Sewald, *Angew. Chem.* **2003**, 115, 5793; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 5635.
- [7] a) B. F. Cravatt, A. T. Wright, J. W. Kozarich, *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, 77, 383; b) N. Jessani, B. F. Cravatt, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2004**, 8, 54; c) K. T. Barglow, B. F. Cravatt, *Nat. Methods* **2007**, 4, 822; d) S. A. Sieber, B. F. Cravatt, *Chem. Commun.* **2006**, 2311; e) A. T. Wright, B. F. Cravatt, *Chem. Biol.* **2007**, 14, 1043; f) S. A. Sieber, S. Niessen, H. S. Hoover, B. F. Cravatt, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, 2, 274; g) T. Böttcher, S. A. Sieber, *Angew. Chem.* **2008**, 120, 4677; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, 47, 4600; h) M. C. Hagenstein, N. Sewald, *J. Biotechnol.* **2006**, 124, 56.
- [8] X. Bi, A. M. Hayallah, M. Famulok, unveröffentlichte Ergebnisse.
- [9] a) G. Dormán, G. D. Prestwich, *Biochemistry* **1994**, 33, 5661; b) P. J. A. Weber, A. G. Beck-Sickinger, *J. Pept. Res.* **1997**, 49, 375.
- [10] J. Cherfils, J. Menetrey, M. Mathieu, G. Le Bras, S. Robineau, S. Beraud-Dufour, B. Antonny, P. Chardin, *Nature* **1998**, 392, 101.
-