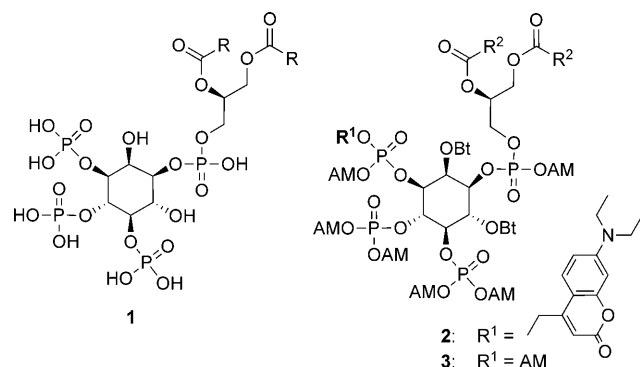


# Photoaktivierbares und zellmembranpermeables Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat\*\*

Matthias Mentel, Vibor Laketa, Devaraj Subramanian, Hartmut Gillandt und Carsten Schultz\*

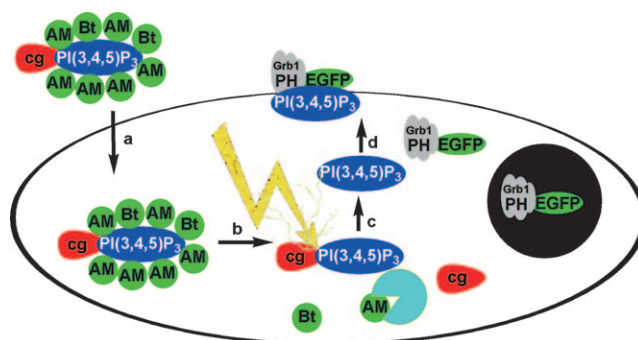
Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat [PI(3,4,5)P<sub>3</sub>; **1**, Schema 1]<sup>[1]</sup> ist ein sekundärer Botenstoff, der viele intrazelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Zellmigration, Zellüberleben usw. reguliert.<sup>[2,3]</sup> Das Lipid befindet sich haupt-



**Schema 1.** Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (**1**) und seine membranpermeablen 3-*P*-, „caged“- (**2**) und 3-*P*-, „non-caged“-Derivate (**3**). R = Lipidrest, R<sup>2</sup> = C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>, AM = Acetoxymethyl, Bt = Butanoyl.

sächlich in der Plasmamembran, wo es aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat [PI(4,5)P<sub>2</sub>] durch mehrere Isoformen der PI-3-Kinase gebildet wird.<sup>[4]</sup> Die spezifische Lipidphosphatase PTEN ist für die Rückreaktion zuständig.<sup>[5]</sup> Darüber hinaus entfernt die PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Phosphatase SHIP die 5-*O*-Phosphatgruppe und produziert den Metaboliten Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat [PI(3,4)P<sub>2</sub>].<sup>[6]</sup> Aufgrund des komplizierten Signalnetzwerks auf Phospholipidebene ist es von großer Bedeutung, spezifisch und schnell die Lipidzusammensetzung manipulieren zu können. Die Hemmung der Gentranslation in Proteine (Genstummenschaltung) mittels RNA-Interferenzexperimenten oder die Überexpression

eines relevanten Enzyms ist ein relativ langsamer Prozess. Eine alternative und schnellere Methode ist die Translokation eines aktiven Enzyms zur Zielmembran des Phospholipids durch Zugabe eines Protein-dimerisierenden organischen Moleküls.<sup>[7]</sup> Eine weitere Option ist die direkte Zugabe des Phospholipids, vorausgesetzt, dass das Lipid die Plasmamembran überwinden kann. Für Phospholipide erfordert dies den Einsatz von bioaktivierbaren Schutzgruppen<sup>[8]</sup> oder Polyaminen.<sup>[9]</sup> Letzterer Ansatz macht die Zugabe eines potentiell bioaktiven Moleküls erforderlich. Im Falle der bioaktivierbaren Schutzgruppen ist dagegen die intrazelluläre enzymatische Hydrolyse von Acetoxymethyl(AM)-Ethern und Butyraten, welche zumindest teilweise an Membrangrenzflächen stattfindet, recht langsam.<sup>[8a,d]</sup> Dies führt zu unphysiologisch langsamer Lipidfreisetzung. Eine Lösung ist der Einsatz von photoaktivierbaren Schutzgruppen („cages“).<sup>[8c]</sup> Da die photolabile Schutzgruppe biologische Aktivität und idealerweise einen schnellen Metabolismus verhindert, wird den Verbindungen Zeit gegeben, in Zellen zu diffundieren und von den bioaktivierbaren Schutzgruppen befreit zu werden. Nach Freisetzung der photosensitiven Schutzgruppe sollte umgehend Aktivität verfügbar sein (Abbildung 1). Wenn die Entschützung durch die Linse eines Objekts ausgeführt wird, sollte eine exzellente räumliche Begrenzung der Molekülfreisetzung möglich sein.



**Abbildung 1.** Wirkungsmechanismus von **2**: a) Zelleintritt; b) enzymatische Spaltung von Bt(Butanoyl)- und AM(Acetoxymethyl)-Schutzgruppen liefert cgPI(3,4,5)P<sub>3</sub>; c) lichtinduzierte Abspaltung der Cumarinschutzgruppe; d) PI(3,4,5)P<sub>3</sub> induziert Translokation der EGFP-Grp1-PH-Domäne zur Plasmamembran.

Bislang wurden nur einige wenige photoaktivierbare Lipide synthetisiert,<sup>[8c,10]</sup> unter denen sich nur ein einziges Phosphoinositid befand. Im Falle des membranpermeablen „caged“-Phosphatidylinositol-3-phosphats [cgPI(3)P] wurde gezeigt, dass es nach „uncaging“ sofort die Fusion früher Endosomen herbeiführte.<sup>[8c]</sup> Hier präsentieren wir die Syn-

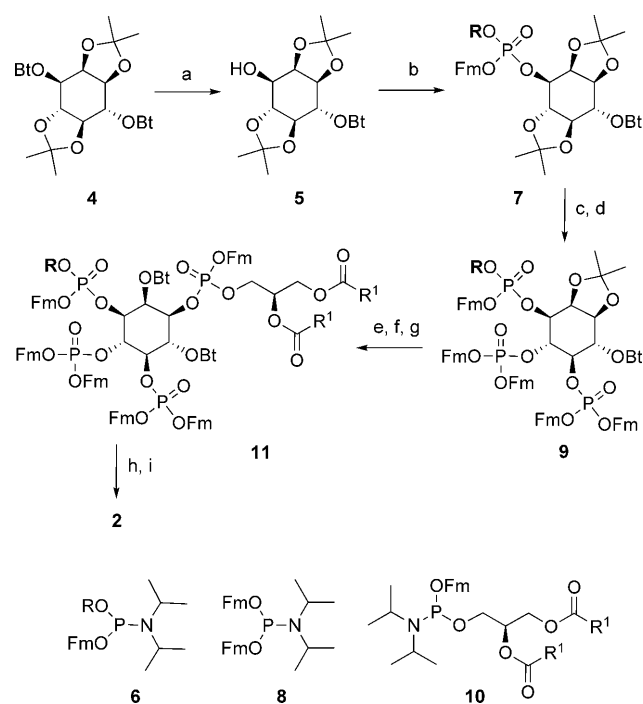
[\*] Dr. M. Mentel, Dr. V. Laketa, Dr. D. Subramanian, Dr. C. Schultz  
Cell Biology & Biophysics Unit  
European Molecular Biology Laboratory  
Meyerhofstraße 1, 69117 Heidelberg (Deutschland)  
Fax: (+49) 6221-387-206  
E-Mail: schultz@embl.de  
Dr. H. Gillandt  
Sirius Fine Chemicals (SiChem) GmbH  
Fahrenheitstraße 1, 28359 Bremen (Deutschland)

[\*\*] Die Autoren danken der Advanced Light Microscopy Facility des EMBL und Heike Stichnoth für die Bereitstellung von Zellen. Diese Arbeit wurde unterstützt durch SBCancer, die ESF und die DFG (Schu843/8-1). M.M. ist Stipendiat des EMBL Interdisciplinary Postdoc Program (EIPOD).

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201007796> zu finden.

these eines membranpermeablen, photoaktivierbaren Derivats von PI(3,4,5)P<sub>3</sub> [cgPI(3,4,5)P<sub>3</sub>/AM (**2**), Schema 1] mit der photoaktivierbaren 7-Diethylamino-4-methylenhydroxycumarin-Gruppe,<sup>[11]</sup> die sich bereits im Falle des cgPI(3)P gut eignete. Wir zeigen Anwendungen in lebenden Zellen zur Induzierung von Zellmembrankräuseln und PH-Domänen-Translokation – als typischen Merkmalen der PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Signaltransduktion – in Gegenwart des PI-3-Kinase-Inhibitors Wortmannin.

Da *myo*-Inositol eine *meso*-Verbindung mit sechs chemisch nahezu identischen Hydroxygruppen ist, stellt die Einführung von zwei Butyraten und drei unterschiedlich substituierten Phosphaten eine Herausforderung dar. Typischerweise ist es besonders schwer, einzelne selektiv geschützte oder ungeschützte Hydroxygruppen zu generieren. Ausnahmen sind Reaktionen, bei denen elektronische oder sterische Unterschiede in der Reaktivität der *cis*-vicinalen Hydroxygruppen ausgenutzt werden. Unsere Reaktionssequenz (Schema 2) startete vom Dibutyrat des enantiomerenreinen Diketals **4**. Selektive Spaltung des sterisch mehr zugänglichen 3-*O*-Butyrats mit der sterisch gehinderten Base Ethyldiisopropylamin unter strikter thermischer Kontrolle lieferte die 3-Hydroxyverbindung **5** in exzellenter Ausbeute. Phosphorylierung mit dem Phosphoramiditreagens **6**, das

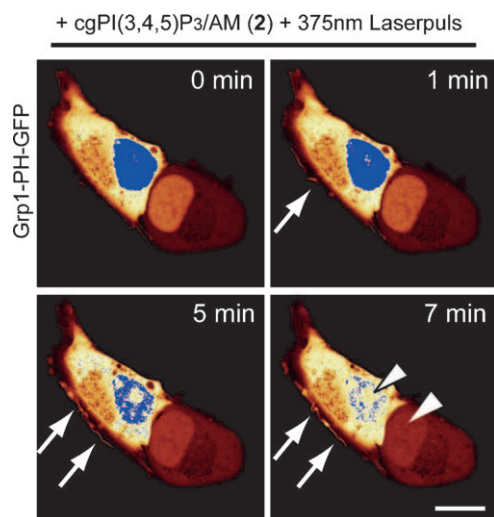


**Schema 2.** Synthese von cgPI(3,4,5)P<sub>3</sub>/AM (**2**): a) MeOH/Et<sub>2</sub>Pr<sub>2</sub>N 4:1, 36 °C, 11 h, 91%; b) **6**, 4,5-Dicyanimidazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C bis RT, 20 min, dann AcOOH, –18 °C bis RT, 1 h, 70%; c) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/HCOOH 7:3, RT, 3.5 h; d) **8**, 4,5-Dicyanimidazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN 4:1, RT, 1 h, dann AcOOH, –18 °C bis RT, 1.5 h, 48% (2 Stufen); e) HCOOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 95:5, 4.5 h; f) Bt(OMe)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Jandajel-Pyridiniumtrifluoracetat, RT, 23 h, dann DOWEX 50WX8 H<sup>+</sup>, 1 h; g) **10**, 4,5-Dicyanimidazol, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeCN, RT, 30 min, dann AcOOH, –18 °C bis RT, 30 min, 46% (3 Stufen); h) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Piperidin, RT, 1 h; i) Brommethylylacetat, Et<sub>2</sub>Pr<sub>2</sub>N, MeCN, RT, 10 h, 16% (2 Stufen). Bt = Butanoyl, Fm = 9H-Fluoren-9-ylmethyl, R = 7-(Diethylamino)-2-oxo-2H-chromen-4-ylmethyl, R<sup>1</sup> = C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>.

sowohl das photoaktivierbare Cumarin als auch eine Fluorenymethyl(Fm)-Gruppe enthält, ergab das vollständig geschützte 3-*O*-Phosphatderivat **7** als Diastereomergemisch. In den folgenden Schritten wurde das labilere *trans*-Ketal selektiv durch vorsichtige Hydrolyse in Dichlormethan/Ameisensäure entfernt und das resultierende Diol zügig mit dem di-Fm-Phosphoramiditreagens **8** phosphoryliert.<sup>[12]</sup> Es stellte sich heraus, dass die Cumarinringgruppe selbst unter milden Reaktionsbedingungen eine exzellente Abgangsgruppe war, besonders in Gegenwart einer vicinalen Hydroxygruppe. Deshalb mussten die folgenden Schritte zügig mit geringstem Reinigungsaufwand erfolgen. Nach der Spaltung des verbleibenden Ketals wurde das Diol einer Monobutyrylierung mit einem cyclischen Orthoesterintermediat unterzogen. Nach vorsichtiger Hydrolyse wurde das 2,6-Di-*O*-butyrat gewonnen. Die freie 1-*O*-Hydroxygruppe wurde dann mit dem eine Dioctanoylglycerin-Gruppe enthaltenden P<sup>III</sup>-Reagens **10** umgesetzt. Im Basischen wurden die Fm-Gruppen des vollständig geschützten PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Derivats **11** entfernt. Die Alkylierung der resultierenden Phosphatgruppen mit AM-Bromid lieferte 25 mg des Hexakis(AM)-Esters des „caged“-PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (**2**). Die Zielverbindung war ausreichend stabil für die analytische Charakterisierung. Die Gesamtausbeute der Synthese betrug 2.5 %, wobei die größten Verluste von der Cumarinspaltung während der finalen Acetoxymethyl-Alkylierungsreaktion herrührten.

Zu den wichtigsten von PI(3,4,5)P<sub>3</sub> regulierten zellulären Vorgängen zählt die PH-Domänen-Translokation und die Umgestaltung der Plasmamembran, oft als Membrankräuseln bezeichnet.<sup>[13]</sup> Beide Effekte sind durch den Gebrauch einer GFP-fusionierten PH-Domäne unter dem Mikroskop zu verfolgen. Wir haben lebende Zellen mit Verbindung **2** für mindestens eine Stunde behandelt, um die enzymatische Spaltung der Acetoxymethylester und Butyrate herbeizuführen (Abbildung 1). Blitzlichtphotolyse durch das Objektiv des Mikroskops setzte anschließend das aktive Phospholipid frei.

Wegen der Fluoreszenzeigenschaften der Cumarin-Gruppe ( $\lambda_{\text{max}} = 380 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$ ) waren wir in der Lage, die Verteilung von **2** in U2OS- und HeLa-Kyoto-Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie und Anregung bei 405 nm zu zeigen. Wir beobachteten eine Färbung der meisten zellulären Membranen (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen). Als nächstes wurde eine EGFP-Fusion der Grp-1-PH-Domäne, eines bekannten Reporters von PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Spiegeln in der Plasmamembran,<sup>[14]</sup> in U2OS-Zellen exprimiert. Die photoinduzierte Freisetzung von cgPI(3,4,5)P<sub>3</sub> (5 oder 10  $\mu\text{M}$  extrazellulär, 1  $\mu\text{M}$  war ineffektiv; Abbildung S2) durch einen kurzen 375-nm-Laserpuls durch das Objektiv des Mikroskops resultierte in der Translokation der cytosolischen PH-Domäne zur Plasmamembran innerhalb einer Minute (Abbildung 2), was ungefähr dieselbe Zeit ist, die der Wachstumsfaktor PDGF („platelet-derived growth factor“) benötigt, um Membrankräuseln und PH-Domänen-Translokation zu induzieren (Abbildung S3). Im Vergleich mit der nichtinaktivierten Verbindung **3** oder mit Histone-PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Konjugaten war nur der Einsatz von cgPI(3,4,5)P<sub>3</sub> (**2**) erfolgreich (Abbildung S4). Interessanterweise beobachteten wir, dass die erhöhten PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Spiegel in diesem und den

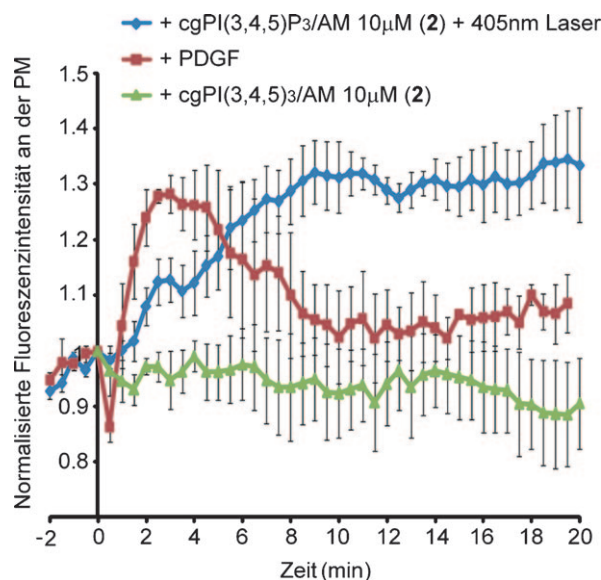


**Abbildung 2.** Fluoreszenzmikroskopische Bilder von lebenden U2OS-Zellen, die mit Wortmannin behandelt wurden. Behandlung mit **2** (10  $\mu$ M, 1 h) zeigte keinen Effekt. Beleuchtung für 5 s mittels Laser führt zu Membrankräuseln und PH-Domänen-Translokation zu den Membranfalten (Pfeile) innerhalb 1 min. Zusätzlich translozierten PH-Domänen aus dem Kern in das Cytoplasma (Dreieck). Die blaue Farbe zeigt Sättigung der Fluoreszenzintensität. Maßstabsbalken 10  $\mu$ m.

folgenden Experimenten von einer starken Translokation der markierten PH-Domäne vom Zellkern in das Cytosol begleitet wurden (Abbildung 2 sowie Abbildungen S3, S5 und S7).

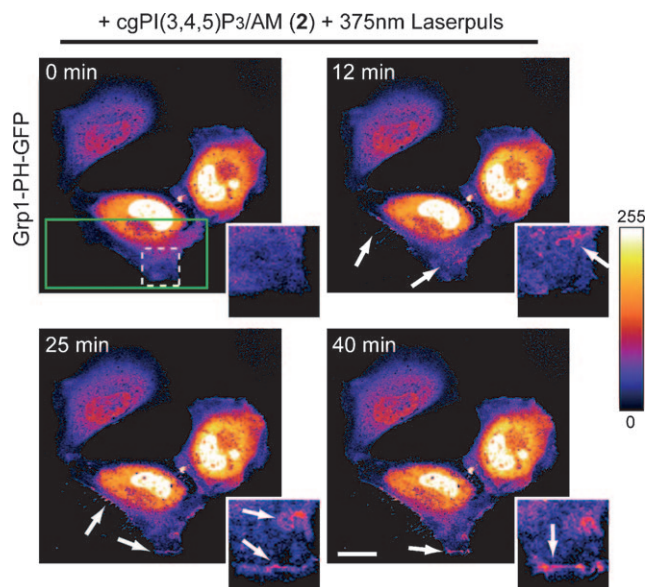
Alternativ zur gepulsten Aktivierung und mit weniger Photostress beleuchteten wir HeLa-Zellen alle 15 s mit 405 nm Laserlicht geringer Intensität (2 %) durch das Objektiv. Wieder translozierte die Grp1-PH-GFP innerhalb weniger Minuten zur Plasmamembran (Abbildung S5). Zur Quantifizierung und zum Vergleich mit der PDGF-Stimulation nutzten wir interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRF). TIRF ermöglicht die ausschließliche Visualisierung der Plasmamembran aufgrund der starken Fokalität des abklingenden Feldes (100 nm Tiefe) und erlaubt die quantitative Darstellung der PH-Domänen-Translokation und des Membrankräuselns (Abbildung 3, Abbildung S6). Blitzlichtphotolyse von cgPI(3,4,5)P<sub>3</sub> und PDGF-Stimulation leiteten einen vergleichbaren Beginn der PH-Domänen-Translokation ein (Abbildung 3) und zeigten so, dass die Freisetzung von PI(3,4,5)P<sub>3</sub> in Teilen der Wachstumsfaktorsignalwirkung ähnelt, wie zuvor für das nicht-inaktivierte PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Derivat **3** gezeigt.<sup>[8b]</sup> Präinkubation mit cgPI(3,4,5)P<sub>3</sub> hatte keinen Effekt auf die PH-Domänen-Lokalisierung in Abwesenheit der Photolyse (Abbildung 3, grüne Kurve). Zelluläre Effekte waren sogar nach mehreren Stunden der Präinkubation gefolgt von Photolyse sichtbar, was auf einen sehr langsamen Metabolismus der photoaktivierbaren Verbindung **2** hinweist (Abbildung S7).

Einer der Vorteile von photoaktivierbaren Verbindungen ist eine räumlich aufgelöste Freisetzung. Zellen zeigten einen signifikanten Anstieg an Membrankräuseln, wenn sie global beleuchtet wurden. Wenn ein Teil einer einzelnen Zelle innerhalb des Sichtfeldes beleuchtet wurde, zeigte die beleuchtete Region mehr Membrankräuseln als die anderen



**Abbildung 3.** Zeitverlauf der PH-Domänen-Translokation in HeLa-Zellen ohne Blitzlichtphotolyse von **2** (grün), nach Blitzlichtphotolyse von **2** (blau) und nach Zugabe von PDGF (rot). Intensitätswerte sind normalisiert auf den Zeitpunkt null vor der Blitzlichtphotolyse. Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung, die aus Messungen an drei verschiedenen Zellen erhalten wurde.

Regionen der Zelle, wodurch die Möglichkeit einer lokalen Erhöhung von Signallipiden demonstriert wird (Abbildung 4). Die zur erfolgreichen Photolyse benötigte Laserintensität war überraschend gering. Höhere Lichtintensitäten oder Beleuchtung nach höheren Dosierungen an **2** (100  $\mu$ M) führten gewöhnlich zum Zelltod.



**Abbildung 4.** Lokale Blitzlichtphotolyse von **2** (10  $\mu$ M extrazellulär) generiert eine räumlich begrenzte Antwort in U2OS-Zellen. Ein räumlich limitierter (Rechteck) 5 s langer Laserpuls leitet Membrankräuseln ein, das durch Grp1-GFP-PH-Domänen-Translokation vorzugsweise in der beleuchteten Region angezeigt wird. Andere Zellen bleiben unverändert. Maßstabsbalken 10  $\mu$ m.

Zusammenfassend zeigen wir hier die erste erfolgreiche Synthese eines photoaktivierbaren membrandurchdringenden PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Derivats. Die Wahl der photochemisch favorisierten Cumaringruppe erforderte besonders milde und optimierte Reaktionsbedingungen für die Schutzgruppen- und Phosphorylierungschemie. Nichtsdestotrotz war die Gesamtausbeute respektabel. Die Unmittelbarkeit und Stärke der biologischen Antwort ist derjenigen des membranpermeablen, aber nicht inaktivierten Derivats klar überlegen.<sup>[8b]</sup> In Zukunft müssen mehr photoaktivierbare Derivate anderer Lipide inklusive der Sphingosine und des Cholesterols entwickelt werden, um zum Verständnis des ausgeprägten Zusammenspiels von Lipid-induzierten Aktivitäten beizutragen. Zusätzlich werden dringend photolabile Gruppen mit längerer Anregungswellenlänge benötigt, um innerhalb eines Experiments den Einsatz mehrerer photoaktivierbarer Verbindungen zu ermöglichen und die potentielle Photoschädigung in Langzeitexperimenten verringern zu können. Wir erwarten eine Vielzahl biologischer Experimente, in denen cgPI-(3,4,5)P<sub>3</sub>/AM (**2**) benutzt wird, um intrazelluläre PI(3,4,5)P<sub>3</sub>-Spiegel zeitlich und in räumlich aufgelöster Weise manipulieren zu können.

Eingegangen am 10. Dezember 2010  
Online veröffentlicht am 14. März 2011

**Stichwörter:** Kinasen · Phospholipide · Photoaktivierbare Verbindungen · Signaltransduktion

- [1] a) A. E. Traynor-Kaplan, A. L. Harris, B. L. Thompson, P. Taylor, L. A. Sklar, *Nature* **1988**, 334, 353–356; b) A. E. Traynor-Kaplan, B. L. Thompson, A. L. Harris, P. Taylor, G. M. Omann, L. A. Sklar, *J. Biol. Chem.* **1989**, 264, 15668–15673.  
[2] D. A. Cantrell, *J. Cell Sci.* **2001**, 114, 1439–1445.

- [3] L. C. Cantley, *Science* **2002**, 296, 1655–1657.  
[4] K. R. Auger, L. A. Serunian, S. P. Soltoff, P. Libby, L. C. Cantley, *Cell* **1989**, 57, 167–175.  
[5] P. A. Steck, M. A. Pershouse, S. A. Jasser, W. K. A. Yung, H. Lin, A. H. Ligon, L. A. Langford, M. L. Baumgard, T. Hattier, T. Davis, C. Frye, R. Hu, B. Swedlund, D. H. F. Teng, S. V. Tavtigian, *Nat. Genet.* **1997**, 15, 356–362.  
[6] J. E. Damen, L. Liu, P. Rosten, R. K. Humphries, A. Jefferson, P. W. Majerus, G. Krystal, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 1689–1693.  
[7] a) D. J. Austin, G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Curr. Biol.* **1994**, 1, 131–136; b) G. R. Crabtree, S. L. Schreiber, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, 21, 418–422; c) J. D. Klemm, S. L. Schreiber, G. R. Crabtree, *Annu. Rev. Immunol.* **1998**, 16, 569–592; d) T. Inoue, W. D. Heo, J. S. Grimley, T. J. Wandless, T. Meyer, *Nat. Methods* **2005**, 2, 415–418; e) P. Várnai, B. Thyagarajan, T. Rohacs, T. Balla, *J. Cell Biol.* **2006**, 175, 377–382.  
[8] a) C. Schultz, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 885–898; b) V. Laketa, S. Zorbakhsh, E. Morbier, D. Subramanian, C. Dinkel, J. Brumbaugh, P. Zimmermann, R. Pepperkok, C. Schultz, *Chem. Biol.* **2009**, 16, 1190–1196; c) D. Subramanian, V. Laketa, R. Müller, C. Tischer, S. Zorbakhsh, R. Pepperkok, C. Schultz, *Nat. Chem. Biol.* **2010**, 6, 324–326; d) M. Bartsch, M. Zorn-Kruppa, N. Kuhl, H.-G. Genieser, F. Schwede, B. Jastorff, *Biol. Chem.* **2003**, 384, 1321–1326.  
[9] S. Ozaki, D. B. DeWald, J. C. Shope, J. Chen, G. D. Prestwich, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 11286–11291.  
[10] C. Dinkel, O. Wichmann, C. Schultz, *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 1153–1155.  
[11] V. Hagen, J. Bendig, S. Frings, T. Eckardt, S. Helm, D. Reuter, U. B. Kaupp, *Angew. Chem.* **2001**, 113, 1077–1080; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, 40, 1045–1048.  
[12] a) Y. Watanabe, T. Nakamura, H. Mitsumoto, *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 7407–7410; b) L. Bialy, H. Waldmann, *Chem. Eur. J.* **2004**, 10, 2759–2780.  
[13] G. Di Paolo, P. De Camilli, *Nature* **2006**, 443, 651–657.  
[14] T. Balla, T. Bondeva, P. Várnai, *Trends Pharmacol. Sci.* **2000**, 21, 238–241.