

## Inhibitoren

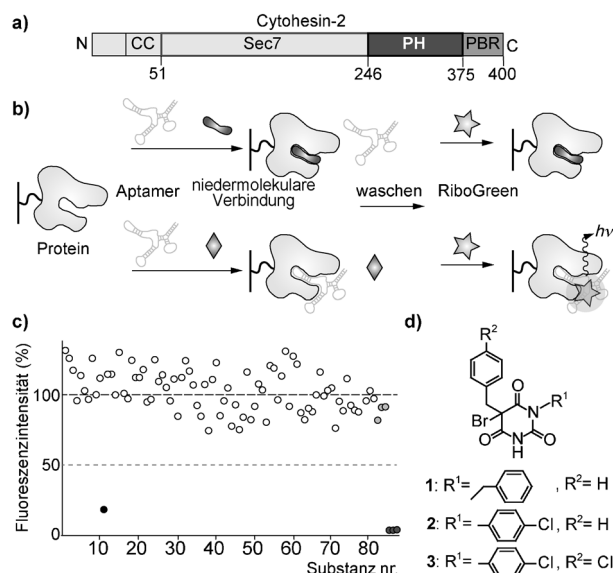
## Kovalente Inhibition der Pleckstrin-Homologiedomäne von Cytohesinen durch Cyplecksine\*\*

Mohamed Hussein, Martina Bettio, Anton Schmitz, Jeffrey S. Hannam, Julian Theis, Günter Mayer, Stefan Dosa, Michael Gütschow und Michael Famulok\*

Der Firma Bayer zum 150. Jubiläum gewidmet

Cytohesine sind cytoplasmatische Multidomänenproteine, die als Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) an Ras-ähnlichen GTPasen der Klasse der Adenosin-5'-diphosphat-(ADP)-Ribosylierungsfaktoren (Arfs) agieren.<sup>[1]</sup> Ihre Sec7-Domäne katalysiert den Austausch von Guanidin-5'-diphosphat (GDP) gegen Guanidin-5'-triphosphat (GTP), was zur Aktivierung von Arf-Proteinen wie Arf1 oder Arf6 führt. Säugerzellen enthalten vier stark homologe Cytohesine (Cytohesin-1–4), die an zellulären Prozessen (wie der  $\beta$ 2-Integrin-vermittelten Zelladhäsion oder Aktindynamik) sowie an Arf-abhängigen Funktionen (wie Membran- und Vesikeltransport, Endozytose und dergleichen) beteiligt sind.<sup>[2]</sup> Cytohesin-2 (ARNO) fungiert außerdem als cytoplasmatischer Aktivator der Signalübertragung durch Rezeptor-Tyrosinkinasen wie den Insulin-<sup>[3]</sup> oder den EGF-Rezeptor (EGF = epidermaler Wachstumsfaktor).<sup>[4]</sup> ARNO und Arf6 tragen auch zur Herabsetzung der endothelialen Stabilität durch Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) bei, indem sie an das Adapterprotein MYD88 binden.<sup>[5]</sup> Bei diesen Entdeckungen hat sich SecinH3, ein Inhibitor der Cytohesin-Sec7-Domänen, als äußerst hilfreich erwiesen.<sup>[3b,6]</sup>

Cytohesine enthalten eine weitere funktionale Domäne C-terminal zur Sec7-Domäne, die Pleckstrin-Homologie(PH)-Domäne (Abbildung 1a). Über ihre PH-Domänen werden Cytohesine an die Innenseite der Plasmamembran rekrutiert, indem sie entweder an Phosphatidylinositolphosphate wie PIP<sub>2</sub> oder PIP<sub>3</sub> oder an aktiviertes Arf6-GTP binden.<sup>[2]</sup> Die Cytohesin-Sec7-abhängige Aktivierung von Integrinen bei der Zelladhäsion benötigt die PH-Domäne, wobei diese die Sec7-Domäne zu einem gewissen Grad inhibiert, was während der Membranrekrutierung und Wechselwirkung mit PIPs wieder aufgehoben wird.<sup>[7]</sup> Diese Befunde



**Abbildung 1.** Aptamer-Verdrängungsassay durch RiboGreen-Fluoreszenzmessung. a) Domänenstruktur von Cytohesin-2; CC: Coiled coil; PBR: polybasische Region. b) Immobilisiertes Cytohesin wird mit Aptamer und niedermolekularen organischen Molekülen inkubiert. Nichtbindende Substanzen werden durch Pufferspülung entfernt. Verbleibendes gebundenes Aptamer wird durch RiboGreen-Fluoreszenz detektiert (unten rechts); Fluoreszenzreduktion erhält man nach Verdrängung des Aptamers durch die niedermolekulare Verbindung (oben rechts). c) Repräsentativer Primärscreen mit einer Treffersubstanz (schwarzer Punkt; Nr. 11). Positivkontrolle (dunkelgraue Punkte; Nr. 87–90) ohne Cytohesin-1; Negativkontrollen (hellgraue Punkte; Nr. 84–86) enthielten keine niedermolekularen Verbindungen. d) Chemische Strukturen der aktivsten Treffersubstanzen (5-Brompyrimidin-2,4,6-trion-Derivate).

[\*] Dipl.-Chem. M. Hussein, M. Sc. M. Bettio, Dr. A. Schmitz, Dr. J. S. Hannam, Dr. J. Theis, Prof. G. Mayer, Prof. M. Famulok Life and Medical Sciences (LIMES) Institute, Universität Bonn Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland) E-Mail: m.famulok@uni-bonn.de Homepage: <http://www.famuloklab.de>

Dr. S. Dosa, Prof. M. Gütschow Pharmazeutisches Institut – Pharmazeutische Chemie I, Universität Bonn (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 645, SFB 704) unterstützt. Wir danken M. Lemmon für Plasmide, V. Fieberg und P. A. Ottersbach für technische Unterstützung sowie T. Quast für Hilfe bei der Mikroskopie.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201302207> zu finden.

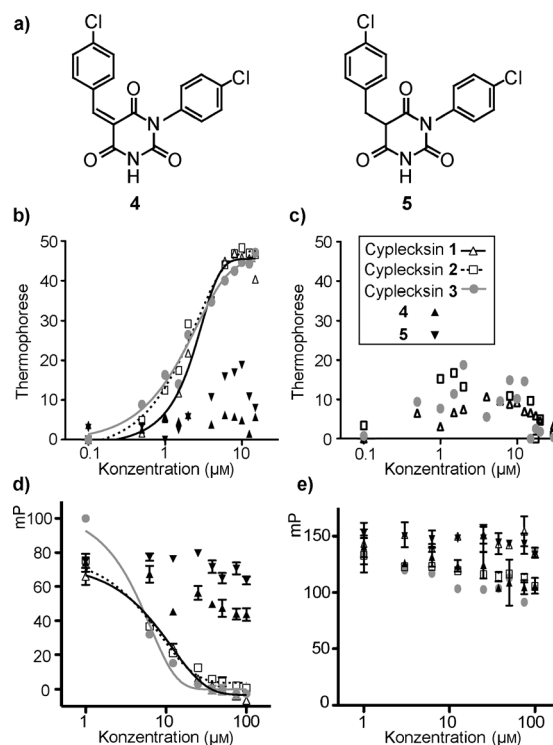
lassen auf eine enge Kopplung der Funktionen der Cytohesin-Sec7- und Cytohesin-PH-Domänen schließen. Der erfolgreiche Einsatz von SecinH3 in der chemischen Biologie zur Aufklärung neuartiger Funktionen der Cytohesin-Sec7-Domäne hat uns motiviert, nun auch niedermolekulare Inhibitoren für die PH-Domäne zu identifizieren. Hier beschreiben wir die Entdeckung einer Klasse von Inhibitoren der Cytohesin-PH-Domäne, der Cyplecksine (Cytohesin-Pleckstrin-Homologiedomänen-Inhibitoren), die einen kovalenten Wirkmechanismus aufweisen.

Zur Entwicklung eines Aptamer-Verdrängungsassays für das Hochdurchsatzscreening (HTS) selektierten wir zunächst ein RNA-Aptamer mit Spezifität für die PH-Domäne von Cytohesin-1. Nach sieben Selektionsrunden wurde die ange-

reicherte RNA-Bibliothek kloniert und sequenziert und Klon 6.10 als Cytohesin-PH-Domänenbinder identifiziert (Hintergrundinformationen (SI) Abbildung S1a). 6.10 zeigte  $K_d$ -Werte zwischen 0.3 und 0.7  $\mu\text{M}$  für die Bindung an die PH-Domänen der Cytohesine-1, -2 und -3. Eine Bindung an die Sec7-Domäne oder verwandte PH-Domänen konnte nicht detektiert werden (Abbildung S1b,c (SI)). Das Aptamer zeige eine konzentrationsabhängige Inhibition der Bindung von Cytohesinen an  $\text{PIP}_3$ -dotierte Liposomen (Abbildung S1d (SI)). Bindung und Inhibition benötigten die Triphosphatgruppe am 5'-Ende des Aptamers.

Abbildung 1b illustriert die Entwicklung des Aptamer-Verdrängungsassays. 96-Loch-Screeningplatten wurden mit Cytohesin-1-PH beschichtet und mit Aptamer 6.10 in Gegenwart der Substanzen inkubiert. Niedermolekulare Verbindungen, die mit 6.10 um die Bindung konkurrieren, führen zu einer Verringerung der Aptamerbindung an das immobilisierte Protein, was bei nicht konkurrierenden Substanzen ausbleibt (Abbildung 1b, Mitte). Die Platten werden zur Entfernung von ungebundenem Aptamer mit Pufferlösung gewaschen und anschließend mit RiboGreen inkubiert, einem Farbstoff der entsprechend der Menge an verbliebener Nukleinsäure ein Fluoreszenzsignal liefert. Niedrige Fluoreszenz weist auf Substanzen hin, die das Aptamer vom Zielprotein verdrängt haben (für mögliche falsch-positive Szenarien siehe Abbildung S2 (SI)). Wir durchsuchten eine chemische Bibliothek aus etwa 12000 diversitätsbasierten, Wirkstoff-ähnlichen Substanzen nach möglichen Inhibitoren der Cytohesin-PH-Domäne. Der Assay zeigte einen Qualitätsparameter  $Z'$  von 0.69, was mit HTS-Bedingungen vereinbar ist (Abbildung 1c und Abbildung S3 (SI)). Die Suche ergab eine Serie substituierter 5-Brompyrimidin-2,4,6-trione **1–3**, die mit 6.10 um Bindung an die PH-Domäne konkurrierten (Abbildung 1d).

Zur Quantifizierung der Bindung der Cyplecksine **1–3** und der verwandten Derivate **4** und **5** (Abbildung 2a), denen der Br-Substituent an Position 5 fehlt, an die Alexa647-markierte Cytohesin-1 PH-Domäne führten wir Thermophoresemessungen durch (Abbildung 2b). Steigende Konzentrationen von **1–3** ergaben sigmoidale Bindungskurven, aus denen sich  $K_d$ -Werte um 2  $\mu\text{M}$  ableiten. Dagegen zeigten weder **4** noch **5** Bindung an die PH-Domäne von Cytohesin-1. Zur Ermittlung der Spezifität von **1–3** gegenüber anderen PH-Domänen wurden entsprechende Bindungstests an der Alexa647-markierten DH-PH-Domäne von „T-lymphoma invasive and metastasis inducing protein 1“ (Tiam1) durchgeführt. Wir konnten keine konzentrationsabhängige Änderung der Thermophorese feststellen, woraus wir schließen, dass die PH-Domäne des Tiam1-Fragments von **1–3** nicht erkannt wird (Abbildung 2c). Danach untersuchten wir, ob die Cyplecksine **1–3** mit  $\text{PIP}_2$  um die Bindung an die Cytohesin-1-PH-Domäne in vitro konkurrieren (Abbildung 2d). Dazu verwendeten wir Tetramethylrhodamin (TMR)-markiertes  $\text{PIP}_2$  und bestimmten die Fluoreszenzpolarisation (FP) bei steigenden Konzentrationen von **1–5**. Der Komplex aus TMR- $\text{PIP}_2$  und der Cytohesin-1-PH-Domäne ergibt höhere FP-Werte als freies TMR- $\text{PIP}_2$ . Tatsächlich ergaben steigende Cyplecksinkonzentrationen eine Inhibition der TMR- $\text{PIP}_2$ -Bindung an die Cytohesin-1-PH-Domäne mit



**Abbildung 2.** Bindungsverhalten der Cyplecksine **1–3** und ihrer Analoga **4** und **5**. a) Chemische Strukturen der nicht bindenden Cyplecksinanaloga **4** und **5**. b), c) Cyplecksine **1–3** binden spezifisch an Cytohesin-1-PH, aber nicht an Tiam1-DH-PH. 100 nM Alexa647-markierte Cyth1-PH- (b) oder Tiam1-DH-PH-Domäne (c) wurde mit Substanzen inkubiert (0.1–20  $\mu\text{M}$ ), und die Bindung wurde mittels Mikroskalen-Thermophorese (MST) analysiert. Legende der Symbole: siehe Kasten in (c). d), e) Spezifische Inhibition der Bindung von Cytohesin an  $\text{PIP}_2$  durch Cyplecksine. 250 nM Cyth1-PH (d) oder 500 nM GEP100-PH (e) wurden mit Substanzen (1–100  $\mu\text{M}$ ) und 30 nM Tetramethylrhodamin (TMR)-konjugiertem  $\text{PIP}_2$  inkubiert. Die  $\text{PIP}_2$ -Bindung wurde durch Fluoreszenzpolarisation quantifiziert. mP = Millipolarisation.

$\text{IC}_{50}$ -Werten unterhalb von 10  $\mu\text{M}$ . In diesem Assay waren **4** und **5** wiederum inaktiv.

Das gleiche Experiment führten wir mit den PH-Domänen des Arf6-GEF GEP100 (Abbildung 2e) sowie denen von DAGK, ARHGAP25, IRS1, Pleckstrin und Vollängen-Akt2 durch (Abbildung S4 (SI)). Die Cyplecksine **1** und **2** verhinderten die Bindung von TMR- $\text{PIP}_2$  oder TMR- $\text{PIP}_3$  an diese Proteine entweder gar nicht oder zeigten nur schwache Inhibition mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten oberhalb von wenigstens 100  $\mu\text{M}$ . In den letztgenannten Fällen konnte kein genauer  $\text{IC}_{50}$ -Wert bestimmt werden, weil dazu Substanzkonzentrationen jenseits der Löslichkeitsgrenze nötig gewesen wären. Lediglich Cyplecksin **3** zeigte ein etwas weniger spezifisches Inhibitionsprofil. Die Cyplecksine **1–3**, nicht jedoch **4** und **5**, inhibierten auch die Bindung von  $\text{PIP}_3$  an Cytohesin-1-PH oder an das fast komplette Cytohesin-1 und -2, denen nur die kurze polybasische Region fehlte (Abbildung S5 (SI)). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Cyplecksine **1** und **2** ein hohes Maß an Spezifität für die Cytohesin-PH-Domäne aufweisen.

Die fehlende inhibitorische Aktivität der Cyplecksinanaloga **4** und **5** weist auf die Bedeutung des Bromsubstituenten

für die Bindung und Inhibition hin. In wässriger Lösung findet eine langsame Hydrolyse der Cyplecksine im Laufe einiger Stunden statt, wobei Gemische von Derivaten resultieren, einschließlich solcher, die durch Ringöffnung entstehen (Daten nicht gezeigt). Bei verwandten 5-Methyl- oder 5-Phenyl-substituierten Pyrimidin-2,4,6-trionen erfolgt in Gegenwart von Aminen jedoch eine Substitution des Bromrestes.<sup>[8]</sup> Dies lässt vermuten, dass bei der Bindung der Cyplecksine an ihre Bindungsstelle in der Cytohesin-PH-Domäne eine Substitutionsreaktion erfolgt, in der entweder das C5 in **1–3** durch ein Nukleophil (Lysin oder Cystein) unter Austritt des Br-Atoms angegriffen wird oder eines der Carbonyl-C-Atome im Heterocyclus unter Ringöffnung attackiert wird.<sup>[9]</sup> Beide Mechanismen würden zu einer kovalenten Verknüpfung der Cyplecksine mit der Cytohesin-PH-Domäne führen.

Um diese Hypothese zu prüfen, synthetisierten wir die Sonde **6**, ein biotinyliertes Analogon von Cyplecksin **1** (Abbildung 3a). Die nichtbromierte Variante **7** wurde als Negativkontrolle verwendet. Danach inkubierten wir die Cytohesin-1-PH-Domäne, Volllängen-Cytohesin-1 und die Sec7-Domäne von Cytohesin-2, an die **6** nicht binden sollte, mit steigenden Konzentrationen an **6** oder **7**. Nach denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) und Western blot wurden kovalent verknüpfte Biotingruppen in den Proteinen mit Neutravidin detektiert. Die Cytohesin-1-PH-

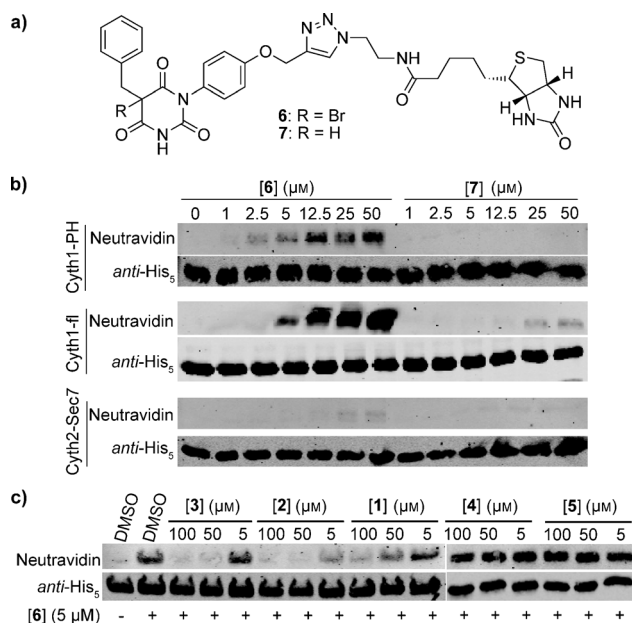
Domäne und das Volllängenprotein zeigten eine konzentrationsabhängige Biotinylierung durch **6**, während die Cytohesin-2-Sec7-Domäne unmodifiziert blieb – ein klarer Hinweis für kovalente Adduktbildung (Abbildung 3b).

Um diesen Befund zu bekräftigen, untersuchten wir, ob die Biotinylierung der Cytohesin-1-PH-Domäne mit **6** durch die nicht biotinylierten Cyplecksine **1–3** kompetiert werden kann. Ab Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  führten die Cyplecksine **1–3** zu einer deutlichen Reduktion der Biotinylierung durch **6**, und auch bei 5  $\mu\text{M}$  konnte eine Verringerung bereits detektiert werden. Weder **4** noch **5** konnten mit **6** um die Bindung an die Cytohesin-1-PH-Domäne konkurrieren, auch nicht bei Konzentrationen von 100  $\mu\text{M}$  (Abbildung 3c). Diese Befunde können nur mit einer spezifischen kovalenten Modifikation der Cytohesin-1-PH-Domäne mit der biotinylierten Variante **6** von Cyplecksin **1** erklärt werden.

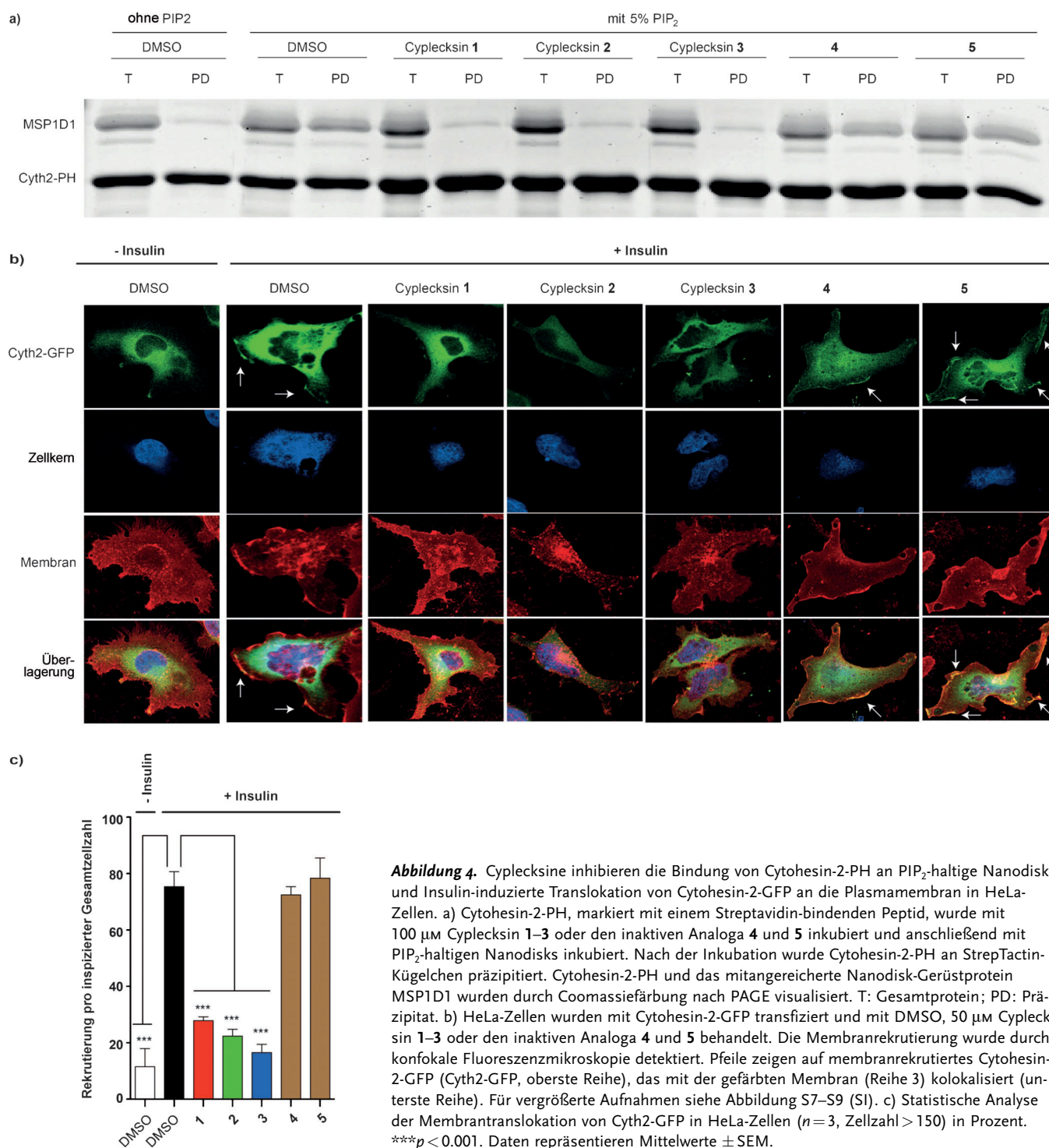
Als ersten Schritt zur Identifizierung des Cyplecksin-reaktiven Nukleophils im Protein alkylierten wir die Cysteinreste in der Cytohesin-1-PH-Domäne mit Iodacetamid. Weder die Bindung von TMR-PIP<sub>2</sub> noch die Inhibition durch die Cyplecksine **1–3** wurden dadurch beeinflusst, was gegen die Cysteinreste als kovalente Anknüpfungspunkte der Cyplecksine spricht (Abbildung S6 (SI)). Um den Bindungsmodus und die Bindestelle der Cyplecksine zweifelsfrei zu bestimmen, wären massenspektrometrische und kristallographische Studien nötig, was den Rahmen dieser Arbeit übersteigt.

Um zu untersuchen, ob Cyplecksine die Membranrekrutierung von Cytohesin-2-PH-Domänen inhibieren, verwendeten wir Nanodisks<sup>[10]</sup> als Membranersatz. Die Bindung von Cytohesin-2-PH erfolgte nur an PIP<sub>2</sub>-dotierte Nanodisks. Dies zeigt, dass Nanodisks für eine zuverlässige Detektion der PIP<sub>2</sub>-abhängigen Membranrekrutierung von Cytohesinen geeignet sind (Abbildung 4a). Die Cyplecksine **1–3**, nicht aber die Kontrollsubstanzen **4** und **5** inhibierten die Bindung.

Nachdem wir gezeigt hatten, dass Cyplecksine in vitro die Bindung von Cytohesin-PH-Domänen an PIP<sub>2</sub>/PIP<sub>3</sub>-Phospholipide nach einem kovalenten Mechanismus inhibieren, interessierte uns die Aktivität dieser Substanzen in lebenden Zellen. Stimuliert man HeLa-Zellen mit Insulin, wird die PIP<sub>3</sub>-Produktion durch Insulinrezeptor(IR)-abhängige Signalkaskaden angeregt, was wiederum die Translokation von Cytohesinen über ihre PH-Domänen an die Innenseite der Plasmamembran bewirkt. Um den Effekt der Cyplecksine auf diesen Prozess zu untersuchen, transfizierten wir HeLa-Zellen mit einem Cytohesin-2-Konstrukt, das an grün fluoreszierendes Protein (GFP) fusioniert war (Abbildung 4b, oberste Reihe, Cyth2-GFP). Anschließend wurde die Membranrekrutierung von Cytohesin-2-GFP in den Zellen durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Ohne Insulinstimulation kann praktisch kein Cyth2-GFP an der Membran detektiert werden (Abbildung 4b, Spalte 1). Nach Insulinstimulation transloziert Cyth2-GFP an die Membran (weiße Pfeile, Spalte 2) und kolokalisiert mit durch Weizenkeim-Agglutinin gefärbten Membranproteinen (weiße Pfeile, Überlagerung, Spalte 2). In Gegenwart von 50  $\mu\text{M}$  Cyplecksin **1**, **2** oder **3** findet jedoch keine insulinabhängige Translokation von Cyth2-GFP an die Plasmamembran statt (Spalten 3–5). Dagegen haben die inaktiven Cyplecksinanaloge **4** und **5**



**Abbildung 3.** Cyplecksine binden kovalent an Cytohesine. a) Chemische Struktur der biotinylierten Cyplecksin-2-Analoga **6** und **7**. b) Steigende Konzentrationen von **6** und seinem inaktiven Analogon **7** in Gegenwart der Cytohesin-1-PH-Domäne (oberes Feld), Volllängen-Cytohesin-1 (Cyth1-fl; mittleres Feld) oder Cytohesin-2-Sec7-Domäne (unteres Feld), analysiert mit denaturierender PAGE. Kovalent gebundenes Biotin wird mit Neutravidin und Gesamtprotein mit einem anti-His<sub>5</sub>-Antikörper detektiert. Cytohesin-1-PH-Domäne und Volllängen-Cytohesin-1, nicht jedoch die Cytohesin-2-Sec7-Domäne, wurden biotinyliert. **7** war in allen Experimenten inaktiv. c) Konkurrenz der Bildung biotinylierter Addukte durch **6** mittels Cyplecksin **1–5**. Die Cyplecksine **1–3**, aber nicht **4** und **5** konkurrierten mit **6** um die Bindung an die Cytohesin-1-PH-Domäne (Analyse wie in (b)).



**Abbildung 4.** Cyplecksine inhibieren die Bindung von Cytohesin-2-PH an PIP<sub>2</sub>-haltige Nanodisks und Insulin-induzierte Translokation von Cytohesin-2-GFP an die Plasmamembran in HeLa-Zellen. a) Cytohesin-2-PH, markiert mit einem Streptavidin-bindenden Peptid, wurde mit 100  $\mu$ M Cyplecksin 1–3 oder den inaktiven Analoga 4 und 5 inkubiert und anschließend mit PIP<sub>2</sub>-haltigen Nanodisks inkubiert. Nach der Inkubation wurde Cytohesin-2-PH an StrepTactin-Kügelchen präzipitiert. Cytohesin-2-PH und das mitangereicherte Nanodisk-Gerüstprotein MSP1D1 wurden durch Coomassiefärbung nach PAGE visualisiert. T: Gesamtprotein; PD: Präzipitat. b) HeLa-Zellen wurden mit Cytohesin-2-GFP transfiziert und mit DMSO, 50  $\mu$ M Cyplecksin 1–3 oder den inaktiven Analoga 4 und 5 behandelt. Die Membranrekrutierung wurde durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Pfeile zeigen auf membranrekrutiertes Cytohesin-2-GFP (Cyth2-GFP, oberste Reihe), das mit der gefärbten Membran (Reihe 3) kolokalisiert (unterste Reihe). Für vergrößerte Aufnahmen siehe Abbildung S7–S9 (SI). c) Statistische Analyse der Membrantranslokation von Cyth2-GFP in HeLa-Zellen ( $n=3$ , Zellzahl > 150) in Prozent. \*\*\* $p < 0.001$ . Daten repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  SEM.

bei gleichen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Membranrekrutierung von Cyth2-GFP (Spalten 6 und 7). Die Analyse der Membranrekrutierung von Cyth2-GFP in einer großen Zahl von Zellen ergab eine statistisch hochsignifikante Inhibition durch die Cyplecksine 1–3 (Abbildung 4c). Diese Befunde zeigen eindeutig, dass die Cyplecksine 1–3 die Bindung von PIP<sub>3</sub> an Cytohesin-PH-Domänen auch in lebenden Zellen sehr effektiv inhibieren.

Zusammengenommen zeigt unsere Studie, dass Aptamer-Verdrängungsassays eine geeignete Methode zur Identifizierung niedermolekularer Inhibitoren für Cytohesin-PH-Domänen sind. Aptamer-basierte Screeningassays haben bereits zu nützlichen Wirkstoff-ähnlichen Inhibitoren geführt.<sup>[3b,6,11]</sup> Unser auf RiboGreen-Detektion aufgebauter Screeningassay ergab eine Serie substituierter 5-Brompyrimidin-2,4,6-trione 1–3, die Cyplecksine, welche die Bindung von Phospholipiden



an die Cytohesin-PH-Domäne inhibieren. Innerhalb der hier getesteten PH-Domänen anderer Proteine zeigten die Cyplecksine eine hohe Selektivität für die Cytohesin-PH-Domänen, konnten jedoch nicht innerhalb der Cytohesin-Familie diskriminieren. In dieser Hinsicht verhalten sich Cyplecksine ähnlich wie SecinH3, ein Inhibitor, der sich spezifisch gegen die Sec7-Domänen von Cytohesin-1, -2 und -3 richtet, nicht jedoch gegen andere Sec7-Domänen. Ob die Cyplecksine diese Cytohesin-Spezifität über das gesamte Proteom mit über 250 PH-Domänen enthaltenden Proteinen<sup>[12]</sup> beibehalten, muss noch untersucht werden.

PH-Domänen sind in den Proteomen höherer Organismen weit verbreitet.<sup>[13]</sup> Ihnen ist eine hochkonservierte dreidimensionale Architektur gemeinsam, wobei ihre Primärsequenzen wenig Ähnlichkeiten aufweisen. Außer den gemeinsamen Strukturelementen enthalten PH-Domänen variable Schleifenregionen, die antiparallele  $\beta$ -Faltblätter innerhalb eines  $\beta$ -Sandwich-Motivs miteinander verbinden und oft einen gewissen Beitrag zur Ligandenspezifität leisten.<sup>[14]</sup> Kürzlich wurde gezeigt, dass bestimmte PH-Domänen genügend Spezifität aufweisen, um zwischen verschiedenen Inosit-Pentakisphosphat-Isomeren unterscheiden zu können, während andere dazu nicht in der Lage waren.<sup>[15]</sup> Diese Strukturunterschiede könnten trotz der allgemeinen Ähnlichkeit dieser Domäne durchaus die Erkennung spezifischer PH-Domänen durch einen bestimmten Inhibitor ermöglichen. Eine andere Studie berichtete über die Identifizierung einer Klasse von (Thio-)Harnstoffderivaten, den PITeninen, aus ca. 50000 Substanzen, welche die Bindung von PIP<sub>2</sub> an die Akt-PH-Domäne inhibierten.<sup>[16]</sup> PITenine zeigten  $K_d$ -Werte von 20–40  $\mu$ M gegenüber einer Teilmenge von PIP<sub>3</sub>-spezifischen PH-Domänen und wirkten auf die PIP<sub>3</sub>-Bindung von Cytohesin-PH-Domänen mit noch geringeren Affinitäten.

Eine besonderes Merkmal der hier beschriebenen Cyplecksine ist, dass sie kovalente Inhibitoren sind. Unseres Wissens repräsentieren sie das erste Beispiel kovalenter Inhibitoren von PH-Domänen und sogar für GEF-Proteine allgemein. Im Hinblick auf die Aussichten künftiger Wirkstoff-Entwicklung dieser Substanzklasse hat diese Eigenschaft nicht nur mögliche Vorteile bezüglich verbesserter Pharmakodynamik, Selektivität oder Wirksamkeit.<sup>[17]</sup> Ihr kovalenter Inhibitionsmechanismus wird auch die Verwendung von Cyplecksinen als Forschungswerkzeuge zur weiteren Aufklärung der biologischen Funktion der Cytohesine beflügeln, besonders hinsichtlich des Zusammenspiels ihrer Sec7- und PH-Domänen, einschließlich Struktur-/Funktionsanalysen, Bestimmung der Bindestelle und rationalem Design.<sup>[18]</sup> Darüber hinaus könnte es nun möglich werden, die Cyplecksine chemisch an die Inhibitoren der Secin-Klasse zu koppeln, die spezifisch für die Cytohesin-Sec7-Domäne sind.<sup>[6,19]</sup> Dies könnte ein gleichzeitiges Targeting zweier unterschiedlicher Domänen der Cytohesin-Familie ermöglichen, was für die Validierung dieser interessanten Proteinklasse als Wirkstoff-Targets von Bedeutung wäre.

Eingegangen am 15. März 2013,  
veränderte Fassung am 23. Mai 2013  
Online veröffentlicht am 10. Juli 2013

**Stichwörter:** Aptamere · Cyplecksine · Cytohesine · Inhibitoren · Wirkstoff-Forschung

- [1] a) W. Kolanus, *Immunol. Rev.* **2007**, *218*, 102–113; b) J. L. Bos, H. Rehmann, A. Wittinghofer, *Cell* **2007**, *129*, 865–877.
- [2] J. G. Donaldson, C. L. Jackson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 362–375.
- [3] a) B. Fuss, T. Becker, I. Zinke, M. Hoch, *Nature* **2006**, *444*, 945–948; b) M. Hafner, A. Schmitz, I. Grüne, S. G. Srivatsan, B. Paul, W. Kolanus, T. Quast, E. Kremmer, I. Bauer, M. Famulok, *Nature* **2006**, *444*, 941–944; c) J. Lim, M. Zhou, T. D. Veenstra, D. K. Morrison, *Genes Dev.* **2010**, *24*, 1496–1506.
- [4] a) A. Bill, A. Schmitz, B. Albertoni, J. N. Song, L. C. Heukamp, D. Walrafen, F. Thorwirth, P. J. Verveer, S. Zimmer, L. Meffert, A. Schreiber, S. Chatterjee, R. K. Thomas, R. T. Ullrich, T. Lang, M. Famulok, *Cell* **2010**, *143*, 201–211; b) A. Bill, A. Schmitz, K. König, L. C. Heukamp, J. S. Hannam, M. Famulok, *PLoS One* **2012**, *7*, e41179.
- [5] W. Zhu, N. R. London, C. C. Gibson, C. T. Davis, Z. Tong, L. K. Sorensen, D. S. Shi, J. Guo, M. C. Smith, A. H. Grossmann, K. R. Thomas, D. Y. Li, *Nature* **2012**, *492*, 252–255.
- [6] M. Hafner, E. Vianini, B. Albertoni, L. Marchetti, I. Grüne, C. Gloeckner, M. Famulok, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 579–587.
- [7] J. P. DiNitto, A. Delprato, M. T. Gabe Lee, T. C. Cronin, S. Huang, A. Guilherme, M. P. Czech, D. G. Lambright, *Mol. Cell* **2007**, *28*, 569–583.
- [8] M. Meusel, A. Ambrozak, T. K. Hecker, M. Gütschow, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 4684–4692.
- [9] Eine dritte Option ist die Eliminierung des Substituenten an Position 5. Dies würde zu **4** führen, in dem das elektrophile Kohlenstoffatom im Michael System von einem Nukleophil in der PH-Domäne angegriffen wird. Diesen Mechanismus können wir jedoch ausschließen, weil **4** in allen unseren Assays inaktiv war.
- [10] T. H. Bayburt, Y. V. Grinkova, S. G. Sligar, *Nano Lett.* **2002**, *2*, 853–856.
- [11] a) S. Yamazaki, L. Tan, G. Mayer, J. S. Hartig, J. N. Song, S. Reuter, T. Restle, S. D. Laufer, D. Grohmann, H. G. Kräusslich, J. Bajorath, M. Famulok, *Chem. Biol.* **2007**, *14*, 804–812; b) G. Mayer, D. Faulhammer, M. Grattinger, S. Feselle, M. Blind, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1993–1996; c) D. M. Thal, K. T. Homan, J. Chen, E. K. Wu, P. M. Hinkle, Z. M. Huang, J. K. Chuprun, J. Song, E. Gao, J. Y. Cheung, L. A. Sklar, W. J. Koch, J. J. Tesmer, *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1830–1839.
- [12] I. Letunic, R. R. Copley, B. Pils, S. Pinkert, J. Schultz, P. Bork, *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, D257–260.
- [13] a) G. E. Cozier, J. Carlton, D. Bouyoucef, P. J. Cullen, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2004**, *282*, 49–88; b) M. A. Lemmon, K. M. Ferguson, *Biochem. J.* **2000**, *350*, 1–18.
- [14] a) K. M. Ferguson, J. M. Kavan, V. G. Sankaran, E. Fournier, S. J. Isakoff, E. Y. Skolnik, M. A. Lemmon, *Mol. Cell* **2000**, *6*, 373–384; b) S. E. Lietzke, S. Bose, T. Cronin, J. Klarlund, A. Chawla, M. P. Czech, D. G. Lambright, *Mol. Cell* **2000**, *6*, 385–394; c) T. C. Cronin, J. P. DiNitto, M. P. Czech, D. G. Lambright, *EMBO J.* **2004**, *23*, 3711–3720.
- [15] S. G. Jackson, S. Al-Saigh, C. Schultz, M. S. Junop, *BMC Struct. Biol.* **2011**, *11*, 11.
- [16] a) B. Miao, I. Skidan, J. Yang, A. Lugovskoy, M. Reibarkh, K. Long, T. Brazell, K. A. Durugkar, J. Maki, C. V. Ramana, B. Schaffhausen, G. Wagner, V. Torchilin, J. Yuan, A. Degterev, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 20126–20131; b) B. Miao, I. Skidan, J. Yang, Z. You, X. Fu, M. Famulok, B. Schaffhausen, V. Torchilin, J. Yuan, A. Degterev, *Oncogene* **2012**, *31*, 4317–4332.
- [17] a) J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 307–317; b) C. U. Lee, T. N. Grossmann,

- Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 8699–8700; c) Q. Liu, Y. Sabnis, Z. Zhao, T. Zhang, S. J. Buhrlage, L. H. Jones, N. S. Gray, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 146–159.
- [18] a) B. Albertoni, J. S. Hannam, D. Ackermann, A. Schmitz, M. Famulok, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 1272–1274; b) X. Bi, A. Schmitz, A. M. Hayallah, J. N. Song, M. Famulok, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 9707–9710; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 9565–9568.
- [19] a) D. Stumpfe, A. Bill, N. Novak, G. Loch, H. Blockus, H. Geppert, T. Becker, A. Schmitz, M. Hoch, W. Kolanus, M. Famulok, J. Bajorath, *ACS Chem. Biol.* **2010**, *5*, 839–849; b) A. Bill, H. Blockus, D. Stumpfe, J. Bajorath, A. Schmitz, M. Famulok, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 8372–8379.
-