

Kovalente Inhibition der Pleckstrin-Homologiedomäne von Cytohesinen durch Cypeleksine**

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

Der Firma Bayer zum 150. Jubiläum gewidmet

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

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 Phosphatidylinositophosphate wie PIP₂ oder PIP₃ oder an aktiviertes Arf6-GTP binden.^[2] 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.^[7] Diese Befunde

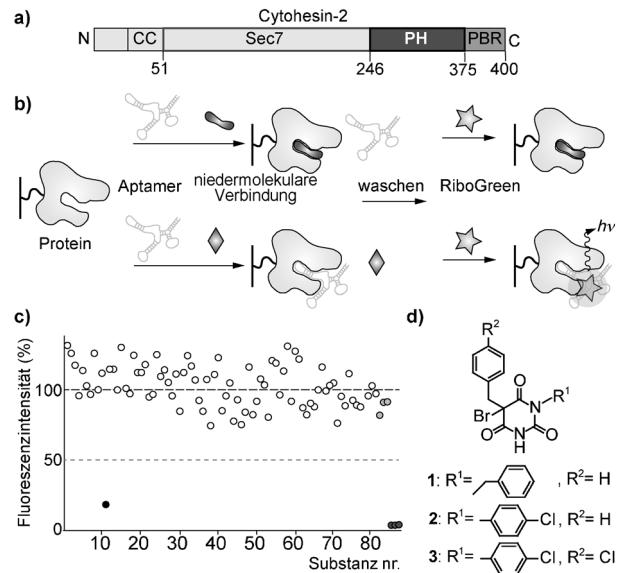


Abbildung 1. Aptamer-Verdrängungsassay durch RiboGreen-Fluoreszenzmessung. a) Domänenstruktur von Cytohesin-2; CC: Coiled coil; PBR: polybasierte Region. b) Immobilisiertes Cytohesin wird mit Aptamer und niedermolekularen organischen Molekülen inkubiert. Nicht-bindende Substanzen werden durch Pufferspülung 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).

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 Cypeleksine (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-

[*] 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. Güttschow
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.

reicherte RNA-Bibliothek kloniert und sequenziert und Klon 6.10 als Cytohesin-PH-Domänenbinder identifiziert (Hintergrundinformationen (SI) Abbildung S1 a). 6.10 zeigte K_d -Werte zwischen 0.3 und 0.7 μm 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 S1 b,c (SI)). Das Aptamer zeige eine konzentrationsabhängige Inhibition der Bindung von Cytohesinen an PIP₃-dotierte Liposomen (Abbildung S1 d (SI)). Bindung und Inhibition benötigten die Triphosphatgruppe am 5'-Ende des Aptamers.

Abbildung 1 b 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 1 b, 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 1 c 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 1 d).

Zur Quantifizierung der Bindung der Cylecksine **1–3** und der verwandten Derivate **4** und **5** (Abbildung 2 a), denen der Br-Substituent an Position 5 fehlt, an die Alexa647-markierte Cytohesin-1 PH-Domäne führten wir Thermophoresemessungen durch (Abbildung 2 b). Steigende Konzentrationen von **1–3** ergaben sigmoidale Bindungskurven, aus denen sich K_d -Werte um 2 μm 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-markiertem 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 2 c). Danach untersuchten wir, ob die Cylecksine **1–3** mit PIP₂ um die Bindung an die Cytohesin-1-PH-Domäne in vitro konkurrierten (Abbildung 2 d). Dazu verwendeten wir Tetramethylrhodamin(TMR)-markiertes PIP₂ und bestimmten die Fluoreszenzpolarisation (FP) bei steigenden Konzentrationen von **1–5**. Der Komplex aus TMR-PIP₂ und der Cytohesin-1-PH-Domäne ergibt höhere FP-Werte als freies TMR-PIP₂. Tatsächlich ergaben steigende Cylecksinkonzentrationen eine Inhibition der TMR-PIP₂-Bindung an die Cytohesin-1-PH-Domäne mit

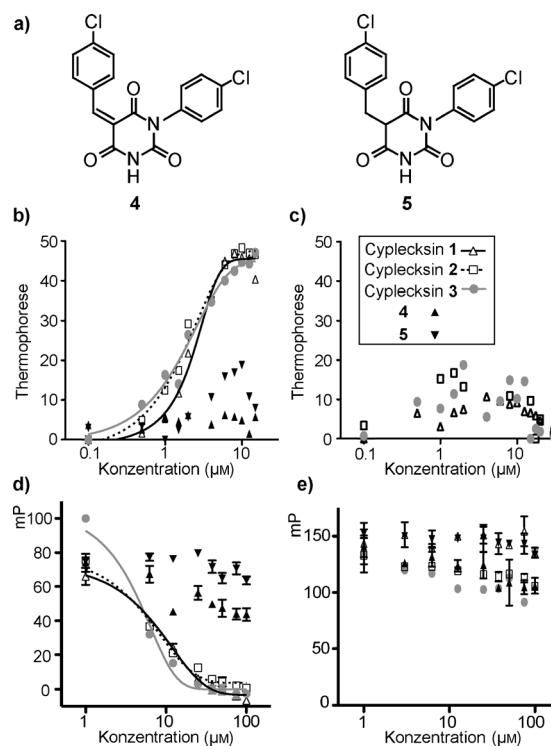


Abbildung 2. Bindungsverhalten der Cylecksine **1–3** und ihrer Analoga **4** und **5**. a) Chemische Strukturen der nicht bindenden Cylecksinanaloge **4** und **5**. b),c) Cylecksine **1–3** binden spezifisch an Cytohesin-1-PH, aber nicht an Tiam1-DH-PH. 100 nm Alexa647-markierte Cyth1-PH- (b) oder Tiam1-DH-PH-Domäne (c) wurde mit Substanzen inkubiert (0.1–20 μM), 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 PIP₂ durch Cylecksine. 250 nm Cyth1-PH (d) oder 500 nm GEP100-PH (e) wurden mit Substanzen (1–100 μM) und 30 nm Tetramethylrhodamin-TMR-konjugiertem PIP₂ inkubiert. Die PIP₂-Bindung wurde durch Fluoreszenzpolarisation quantifiziert. mP = Millipolarisation.

IC₅₀-Werten unterhalb von 10 μM . In diesem Assay waren **4** und **5** wiederum inaktiv.

Das gleiche Experiment führten wir mit den PH-Domänen des Arf6-GEF GEP100 (Abbildung 2 e) sowie denen von DAGK, ARHGAP25, IRS1, Pleckstrin und Volllängen-Akt2 durch (Abbildung S4 (SI)). Die Cylecksine **1** und **2** verhinderten die Bindung von TMR-PIP₂ oder TMR-PIP₃ an diese Proteine entweder gar nicht oder zeigten nur schwache Inhibition mit IC₅₀-Werten oberhalb von wenigstens 100 μM . In den letztgenannten Fällen konnte kein genauer IC₅₀-Wert bestimmt werden, weil dazu Substanzkonzentrationen jenseits der Löslichkeitsgrenze nötig gewesen wären. Lediglich Cylecksin **3** zeigte ein etwas weniger spezifisches Inhibitionsprofil. Die Cylecksine **1–3**, nicht jedoch **4** und **5**, inhibierten auch die Bindung von PIP₃ an Cytohesin-1-PH oder an das fast komplettete Cytohesin-1 und -2, denen nur die kurze polybasische Region fehlt (Abbildung S5 (SI)). Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass die Cylecksine **1** und **2** ein hohes Maß an Spezifität für die Cytohesin-PH-Domäne aufweisen.

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

für die Bindung und Inhibition hin. In wässriger Lösung findet eine langsame Hydrolyse der Cylecksine 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.^[8] Dies lässt vermuten, dass bei der Bindung der Cylecksine 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.^[9] Beide Mechanismen würden zu einer kovalenten Verknüpfung der Cylecksine mit der Cytohesin-PH-Domäne führen.

Um diese Hypothese zu prüfen, synthetisierten wir die Sonde **6**, ein biotinyliertes Analogon von Cyleksin **1** (Abbildung 3a). Die nichtbromierte Variante **7** wurde als Negativkontrolle verwendet. Danach inkubierten wir die Cytohesin-1-PH-Domäne, Vollängen-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 Vollängenprotein 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 Cyleeksine **1–3** kompetiert werden kann. Ab Konzentrationen von 50 µM führten die Cyleeksine **1–3** zu einer deutlichen Reduktion der Biotinylierung durch **6**, und auch bei 5 µM 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 µM (Abbildung 3c). Diese Befunde können nur mit einer spezifischen kovalenten Modifikation der Cytohesin-1-PH-Domäne mit der biotinylierten Variante **6** von Cyleeksin **1** erklärt werden.

Als ersten Schritt zur Identifizierung des Cyleeksin-aktiven Nukleophils im Protein alkylierten wir die Cysteinreste in der Cytohesin-1-PH-Domäne mit Iodacetamid. Weder die Bindung von TMR-PIP₂ noch die Inhibition durch die Cyleeksine **1–3** wurden dadurch beeinflusst, was gegen die Cysteinreste als kovalente Anknüpfungspunkte der Cyleeksine spricht (Abbildung S6 (SI)). Um den Bindungsmodus und die Bindestelle der Cyleeksine zweifelsfrei zu bestimmen, wären massenspektrometrische und kristallographische Studien nötig, was den Rahmen dieser Arbeit übersteigt.

Um zu untersuchen, ob Cyleeksine die Membranrekrutierung von Cytohesin-2-PH-Domänen inhibieren, verwendeten wir Nanodisks^[10] als Membranersatz. Die Bindung von Cytohesin-2-PH erfolgte nur an PIP₂-dotierte Nanodisks. Dies zeigt, dass Nanodisks für eine zuverlässige Detektion der PIP₂-abhängigen Membranrekrutierung von Cytohesinen geeignet sind (Abbildung 4a). Die Cyleeksine **1–3**, nicht aber die Kontrollsubstanzen **4** und **5** inhibierten die Bindung.

Nachdem wir gezeigt hatten, dass Cyleeksine *in vitro* die Bindung von Cytohesin-PH-Domänen an PIP₂/PIP₃-Phospholipide nach einem kovalenten Mechanismus inhibieren, interessierte uns die Aktivität dieser Substanzen in lebenden Zellen. Stimuliert man HeLa-Zellen mit Insulin, wird die PIP₃-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 Cyleeksine 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 kolokaliert mit durch Weizenkeim-Agglutinin gefärbten Membranproteinen (weiße Pfeile, Überlagerung, Spalte 2). In Gegenwart von 50 µM Cyleeksin **1**, **2** oder **3** findet jedoch keine insulinabhängige Translokation von Cyth2-GFP an die Plasmamembran statt (Spalten 3–5). Dagegen haben die inaktiven Cyleeksinanaloga **4** und **5**

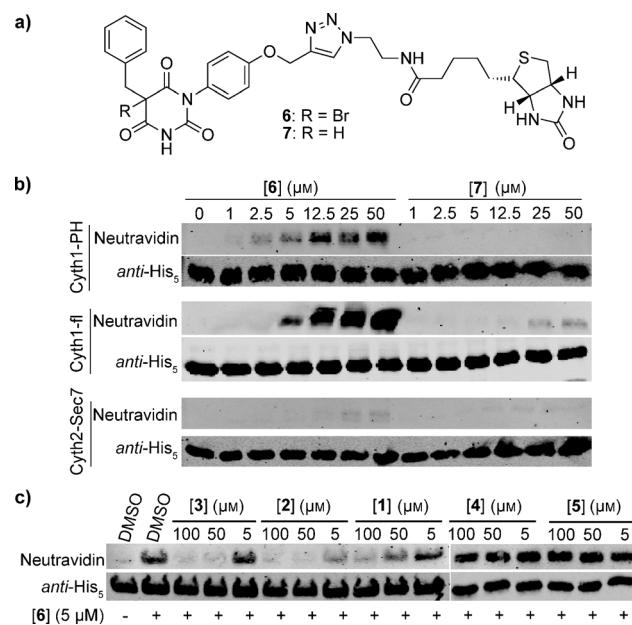


Abbildung 3. Cyleeksine binden kovalent an Cytohesine. a) Chemische Struktur der biotinylierten Cyleeksin-2-Analoga **6** und **7**. b) Steigende Konzentrationen von **6** und seinem inaktiven Analogon **7** in Gegenwart der Cytohesin-1-PH-Domäne (oberes Feld), Vollängen-Cytohesin-1 (mittleres Feld) oder Cytohesin-2-Sec7-Domäne (unteres Feld), analysiert mit denaturierender PAGE. Kovalent gebundenes Biotin wird mit Neutravidin und Gesamtprotein mit einem anti-His₆-Antikörper detektiert. Cytohesin-1-PH-Domäne und Vollängen-Cytohesin-1, nicht jedoch die Cytohesin-2-Sec7-Domäne, wurden biotinyliert. **7** war in allen Experimenten inaktiv. c) Kompetition der Bildung biotinylierter Addukte durch **6** mittels Cyleeksin **1–5**. Die Cyleeksine **1–3**, aber nicht **4** und **5** konkurrierten mit **6** um die Bindung an die Cytohesin-1-PH-Domäne (Analyse wie in (b)).

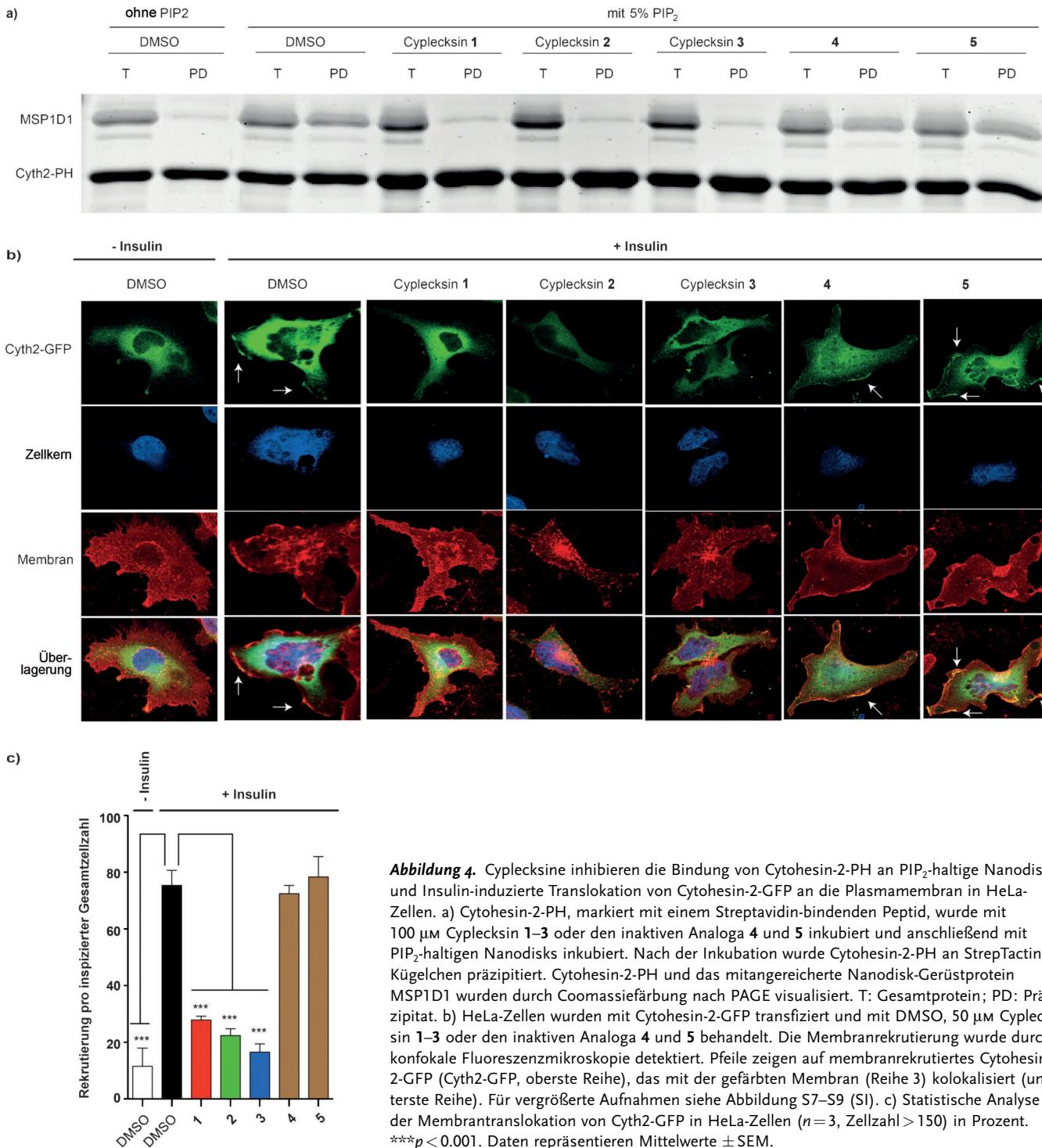


Abbildung 4. Cycleksine inhibieren die Bindung von Cytohesin-2-PH an PIP₂-haltige Nanodisks und Insulin-induzierte Translokation von Cytohesin-2-GFP an die Plasmamembran in HeLa-Zellen. a) Cytohesin-2-PH, markiert mit einem Streptavidin-bindenden Peptid, wurde mit 100 μ M Cycleksin 1–3 oder den inaktiven Analoga 4 und 5 inkubiert und anschließend mit PIP₂-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 μ M Cycleksin 1–3 oder den inaktiven Analoga 4 und 5 behandelt. Die Membranrekruierung wurde durch konfokale Fluoreszenzmikroskopie detektiert. Pfeile zeigen auf membranrekruitiertes 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 Membranrekruierung von Cyth2-GFP (Spalten 6 und 7). Die Analyse der Membranrekruierung von Cyth2-GFP in einer großen Zahl von Zellen ergab eine statistisch hochsignifikante Inhibition durch die Cycleksine 1–3 (Abbildung 4c). Diese Befunde zeigen eindeutig, dass die Cycleksine 1–3 die Bindung von PIP₂ 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.^[3b, 6, 11] Unser auf RiboGreen-Detektion aufgebauter Screeningassay ergab eine Serie substituierter 5-Bromypyrimidin-2,4,6-trione 1–3, die Cycleksine, welche die Bindung von Phospholipiden

an die Cytohesin-PH-Domäne inhibieren. Innerhalb der hier getesteten PH-Domänen anderer Proteine zeigten die Cypleckins eine hohe Selektivität für die Cytohesin-PH-Domänen, konnten jedoch nicht innerhalb der Cytohesin-Familie diskriminieren. In dieser Hinsicht verhalten sich Cypleckins 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 Cypleckins diese Cytohesin-Spezifität über das gesamte Proteom mit über 250 PH-Domänen enthaltenden Proteinen^[12] beibehalten, muss noch untersucht werden.

PH-Domänen sind in den Proteomen höherer Organismen weit verbreitet.^[13] Ihnen ist eine hochkonservierte dreidimensionale Architektur gemeinsam, wobei ihre Primärsequenzen wenig Ähnlichkeiten aufweisen. Außer den gemeinsamen Strukturelementen enthalten PH-Domänen variable Schleifenregionen, die antiparallele β -Faltblätter innerhalb eines β -Sandwich-Motivs miteinander verbinden und oft einen gewissen Beitrag zur Ligandspezifität leisten.^[14] Kürzlich wurde gezeigt, dass bestimmte PH-Domänen genügend Spezifität aufweisen, um zwischen verschiedenen Inositol-Pentakisphosphat-Isomeren unterscheiden zu können, während andere dazu nicht in der Lage waren.^[15] 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 PIP₂ an die Akt-PH-Domäne inhibierten.^[16] PITenine zeigten K_d -Werte von 20–40 μM gegenüber einer Teilmenge von PIP₃-spezifischen PH-Domänen und wirkten auf die PIP₃-Bindung von Cytohesin-PH-Domänen mit noch geringeren Affinitäten.

Eine besonderes Merkmal der hier beschriebenen Cypleckins 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.^[17] Ihr kovalenter Inhibitionsmechanismus wird auch die Verwendung von Cypleckins als Forschungswerzeuge zur weiteren Aufklärung der biologischen Funktion der Cytohesine befähigen, besonders hinsichtlich des Zusammenspiels ihrer Sec7- und PH-Domänen, einschließlich Struktur-/Funktionsanalysen, Bestimmung der Bindestelle und rationalem Design.^[18] Darüber hinaus könnte es nun möglich werden, die Cypleckins chemisch an die Inhibitoren der Secin-Klasse zu kuppeln, die spezifisch für die Cytohesin-Sec7-Domäne sind.^[6,19] Dies könnte ein gleichzeitiges Targeting zweier unterschiedlicher Domänen der Cytohesin-Familie ermöglichen, was für die Validierung dieser interessanten Protein-Klasse 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 · Cypleckins · 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. Fessele, 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. Kavran, 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.
-