

Rationales Design und asymmetrische Synthese potenter neuritotropher Liganden für FK506-bindende Proteine (FKBPs)**

Sebastian Pomplun, Yansong Wang, Alexander Kirschner, Christian Kozany, Andreas Bracher und Felix Hausch*

Abstract: Um höchst effiziente Inhibitoren für FK506-bindende Proteine zu erzielen, wurde eine neue asymmetrische Synthese für pro-(S)-C⁵-verzweigte [4.3.1]-Aza-Amid-Bicyclen entwickelt. Der entscheidende Syntheseschritt war dabei eine HF-vermittelte N-Acyliminium-Cyclisierung. Die Funktionalisierung des C⁵-Restes führte zu neuen Proteinkontakten mit dem psychiatrischen Risikofaktor FKBP51, was eine mehr als 280-fache Steigerung der Affinität ermöglichte. Die besten Liganden verstärkten potent die Differenzierung von N2a-Neuroblastomzellen.

FK506-bindende Proteine (FKBPs) gehören zur Familie der Immunophilline, die als Komplexe mit den Naturstoffen FK506 und Rapamycin deren immunsuppressive Aktivität vermitteln.^[1] Außerhalb des Immunsystems werden FKBPs stark im zentralen Nervensystem exprimiert, und nicht immunsuppressive FKBPs haben wiederholt neuroprotektive und neuritotrophe Wirkung gezeigt.^[2] Es konnte gezeigt werden, dass die hirnspezifische Eliminierung von FKBP12 das kontextuelle Gedächtnis erhöht, während FKBP52 die Ausrichtung von neuronalen Wachstumskegeln beeinflusst.^[3] Unter den menschlichen FKBPs hat FKBP51 besonderes Interesse als Regulator der Stressbewältigung und als Risikofaktor für stressassoziierte psychiatrische Erkrankungen erlangt, was eine Hemmung von FKBP51 als neues therapeutisches Konzept für diese Indikationen nahelegt.^[4]

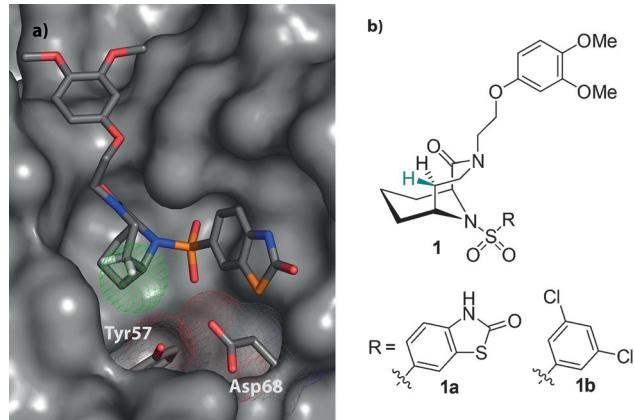


Abbildung 1. a) Kokrystallstruktur von **1a** im Komplex mit der FK506-Bindungsdomäne von FKBP51 (pdb-Code: 4JFK; von Lit. [7a]). Der freie Raum für einen pro-(S)-C⁵-Substituenten ist als grünes Drahtgeflecht angezeigt. Aminosäurereste in direkter Nähe zu einem pro-(S)-C⁵-Substituenten (Tyr57 und Asp68) sind als Stäbe und Drahtgeflecht dargestellt. b) Beispiele von C⁵-unsubstituierten [4.3.1]-bicyclischen FKB-Liganden.^[6] Die pro-(S)-C⁵-Position ist grün angezeigt.

Die Entwicklung wirksamer und Wirkstoff-ähnlicher Inhibitoren für FKBPs im Allgemeinen und für FKBP51 im Besonderen ist jedoch wegen der flachen FK506-Bindungstasche eine anspruchsvolle Aufgabe.^[5] Inspiriert durch die Arbeit von Agouron^[6c] identifizierten wir vor kurzem ein [4.3.1]-bicyclisches Gerüst als ein bevorzugtes FKB-Bindungsmotiv. Dabei ist das bicyclische Ringsystem so fixiert, dass es die aktive Konfiguration bekannter FKB-Liganden nachahmt (Abbildung 1).^[6a,b] Die Strategie der [4.3.1]-Cyclisierung erhöhte die Ligandeneffizienz gegenüber der früheren, monocyclischer Liganden, aber die Affinitäten für die großen FKBPs blieben moderat. Wir postulierten, dass das [4.3.1]-Gerüst zusätzlich auch als ein Rahmen zur konformativ definierten Einführung weiterer Substituenten dienen könnte. Basierend auf der [4.3.1]-Kernstruktur zeigen wir hier eine Synthese für C⁵-verzweigte Aza-Amid-Bicyclen, die zu nanomolaren und hochgradig ligandeneffizienten FKB-Inhibitoren mit neuritotroper Aktivität führten.

Die Analyse der Kokrystallstruktur bicyclischer [4.3.1]-Aza-Amid-Liganden^[6a] mit FKBP51 deutete an, dass Substituenten in der pro-(S)-C⁵-Position in die Bindungstasche von FKBP51 passen könnten, um so weitere Interaktionen mit dem Protein zu ermöglichen (Abbildung 1a).

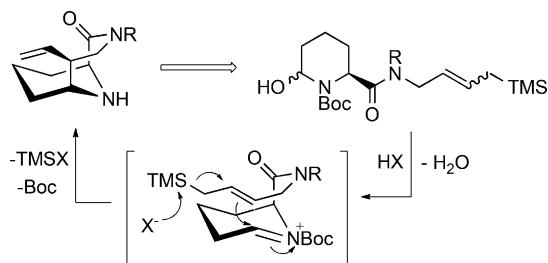
Da in der Literatur keine Beispiele für C⁵-derivatisierte 3,10-Diazabicyclo[4.3.1]decan-2-on-Systeme beschrieben waren,^[7] musste eine neue Synthese entwickelt werden, um

[*] S. Pomplun,^[+] Dr. Y. Wang,^[§]^[+] Dr. A. Kirschner, Dr. C. Kozany, Dr. F. Hausch
Max-Planck-Institut für Psychiatrie
Kraepelinstraße 2–10, 80804 München (Deutschland)
E-Mail: hausch@mpipsykl.mpg.de

Dr. A. Bracher
Max-Planck-Institut für Biochemie
82152 Martinsried (Deutschland)

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.
[**] Diese Arbeit wurde unterstützt durch den M4 Award 2011 der StMWIVT (an FH). Wir danken E. Weyher und Dr. S. Uebel (MPI für Biochemie) für die HRMS-Messung, C. Dubler und Dr. D. Stephenson (LMU München) für die NMR-spektroskopische Messung und C. Sippel für die K_i-Bestimmungen. Die Diffraktionsdaten wurden an der Strahlenquelle ID29 der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) in Grenoble (Frankreich) und der Strahlenquelle X10SA der Swiss Light Source in Villigen (Schweiz) gesammelt.

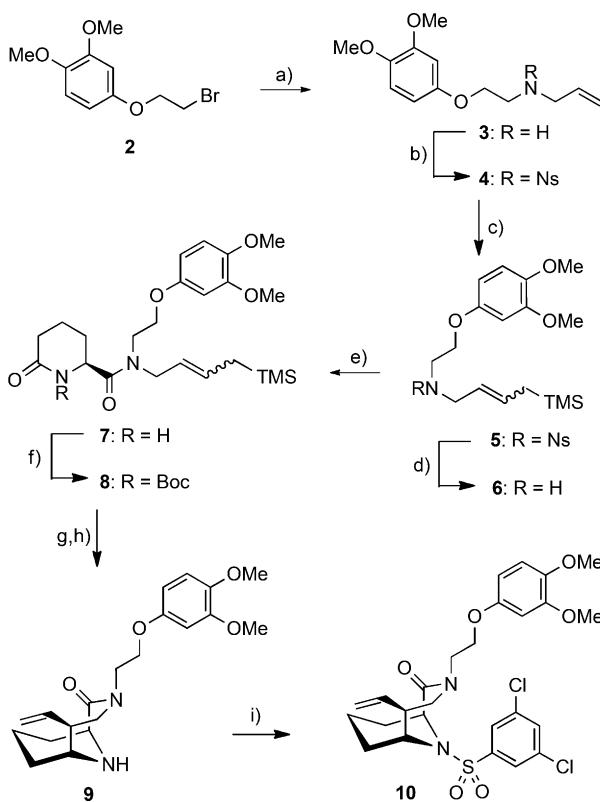
Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (experimentelle Details) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201408776> zu finden.



Schema 1. Reaktionsmechanismus der TMS-assistierten *N*-Acyliminium-Cyclisierung. Boc = *tert*-Butoxycarbonyl.

diese neuen FKBP-Liganden zu untersuchen. Inspiriert durch die Arbeiten an Aza-überbrückten bicyclischen Ringsystemen^[8] zogen wir eine Trimethylsilyl(TMS)-assistierte *N*-Acyliminium-Cyclisierung zur Konstruktion des C⁵-verbrückten bicyclischen Kernfragments in Betracht (Schema 1).

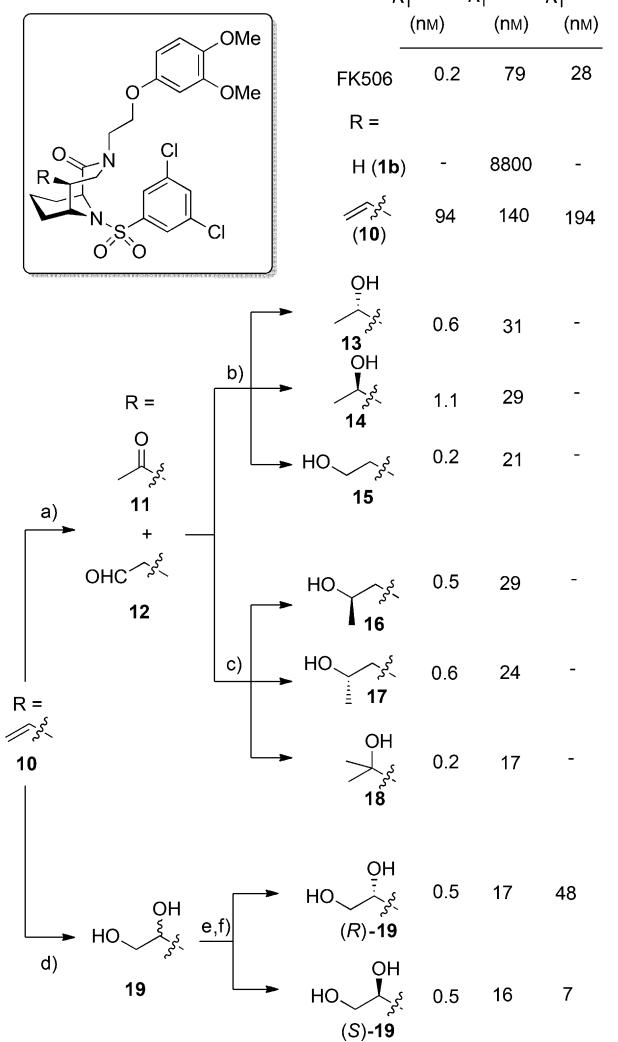
Die Synthese begann mit der Alkylierung von Allylamin mit Alkylbromid **2**,^[9] dem Ausgangsstoff für einen bevor-



Schema 2. Reagenzien und Bedingungen: a) Allylamin, CH₂Cl₂, 50°C, 24 h, 85%; b) NsCl, TEA, CH₂Cl₂, RT, 1 h, 95%; c) Allyl-TMS, *p*-Benzochinon, Grubbs-Hoveyda-Katalysator der II. Generation, CH₂Cl₂, 60°C, 2 h, 95%; d) PhSH, K₂CO₃, DMF, RT, 2 h, 65%; e) (S)-6-Oxo-2-piperidincarbonsäure, HATU, DIPEA, DMF, RT, 2 h, 72%; f) Boc₂O, TEA, DMAP, CH₂Cl₂, RT, 3 h, 86%; g) DIBAL-H, THF, -78°C; h) HF-Pyridin, CH₂Cl₂, -78–0°C, 1 h, 55% (2 Stufen); i) 3,5-Dichlorphenylsulfonylchlorid, DMAP, DIPEA, CH₂Cl₂, RT, 24 h, 55%. DIBAL-H = Diisobutylaluminiumhydrid, DIPEA = Diisopropylethylamin, DMAP = 4-(Dimethylamino)pyridin, HATU = O-(7-Azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium-hexafluorophosphat, NsCl = 2-Nitrobenzolsulfonylchlorid (Nosylchlorid), TEA = Triethylamin.

zugten N³-Substituenten von FKBP-Liganden (Schema 2).^[6a] Für die Kreuzmetathese der resultierenden Substanz **3** mit Allyltrimethylsilan war es notwendig, das sekundäre Amin temporär zu maskieren, um eine Inaktivierung des Rutheniumkatalysators zu vermeiden. Nosyl erwies sich als die Schutzgruppe der Wahl, was nach Kreuzmetathese in Gegenwart von *p*-Benzochinon^[10] **5** in ausgezeichneten Ausbeuten ergab. Anschließend wurde die Nosylgruppe entfernt und das resultierende **6** mit der kommerziell erhältlichen (S)-6-Oxo-2-piperidincarbonsäure zum Zwischenprodukt **7** umgesetzt. Die anschließende Boc-Schützung des Amides aktivierte die C⁶-Carbonylgruppe und schuf somit die Voraussetzung für die entscheidende chemoselektive Reduktions/*N*-Acyliminium-Cyclisierungssequenz. So ergab die Reduktion von **8** mit DIBAL ein instabiles Hydroxycarbamat, das nach wässriger Aufarbeitung unter verschiedenen Cyclisierungsbedingungen umgesetzt wurde. Bei Temperaturen zwischen -78 und 0°C, verschiedenen Verdünnungen und mit einer Reihe von Brønsted- oder Lewis-Säuren konnten jedoch nur Dimere, Trimere oder Abbauprodukte erhalten werden (Tabelle SI1, SI = Hintergrundinformationen). Eine Analyse der Reaktionsgemische zeigte, dass die Trimethylsilylgruppe trotz der stark sauren Bedingungen nach wie vor in den dimeren/trimeren Produkten vorhanden war. Daher untersuchten wir die gleichzeitige Aktivierung der Hydroxycarbamat- und der TMS-Abgangsgruppe. Die Umsetzung des Reduktionsprodukts von **8** mit HF-Pyridin führte reibungslos und in guten Ausbeuten zum Cyclisierungsprodukt **9** als einzigem Diastereomer (55 % über 2 Stufen). Eine Reaktion mit 3,5-Dichlorphenylsulfonylchlorid als einem exemplarischen N¹⁰-Substituenten ergab das entscheidende Zwischenprodukt **10** in einer Gesamtausbeute von 9 % ausgehend von **2**. Eine Kokristallstruktur des Gemisches **10** mit FKBP51 bestätigte die korrekte Konfiguration von **10** und zeigte, dass der postulierte Bindungsmodus von C⁵-substituierten [4.3.1]-Bicylen möglich ist (Abbildung 1 der SI). In einem Fluoreszenzpolarisationsassay^[11] band **10** an FKBP12, FKBP51 und FKBP52 mit einem K_i-Wert von 94, 140 bzw. 194 nm und lieferte somit einen ersten Beleg für die Umsetzbarkeit des Konzeptes der Affinitätssteigerung durch C⁵-Substituenten bei FKBP-Liganden.

Ein interessanter Aspekt der gewählten Syntheseroute war, dass die neu eingeführte C⁵-Vinylgruppe eine spezifische Reaktivität für nachfolgende Derivatisierungen bereitstellte. Mit dem Ziel, die Affinität weiter zu erhöhen, beschlossen wir, polare Gruppen am C⁵-Vinylsubstituenten einzuführen, um mögliche Kontakte mit den polaren Tyr57- oder Asp68-Resten zu erforschen (Abbildung 1a). Eine Wacker-Oxidation von **10** ergab in äquimolaren Mengen das Methylketon **11** und den Aldehyd **12**, die nach Reduktion mit NaBH₄ die trennbaren Alkohole **13**, **14** und **15** lieferten (Schema 3).^[12] Analog ergab die Umsetzung von **11**/**12** mit MeMgBr die sekundären und tertiären Alkohole **16**, **17** und **18**. Die Umsetzung von **10** mit AD-Mix α oder AD-Mix β führte zu einer untrennbaren äquimolaren Mischung der Diastereomere (*R*)-**19** und (*S*)-**19**. Temporäre Bis-TBDMS-Schützung des Diols ermöglichte jedoch die Trennung der beiden Diastereomere durch präparative HPLC, was nach Entschützung die beiden diastereomerenreinen Diole (*R*)-**19** und (*S*)-**19** ergab.



Schema 3. Reagentien und Bedingungen: a) $\text{PdCl}_2, \text{CuCl}, \text{O}_2, \text{DMF}/\text{H}_2\text{O}$, RT, 24 h; b) $\text{NaBH}_4, \text{EtOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, RT, 1 h; 13: 16%, 14: 9%; 15: 23% (jeweils über 2 Stufen); c) $\text{MeMgBr}, \text{THF}, -78^\circ\text{C}$, 1 h; 16: 12%; 17: 9%; 18: 34% (jeweils über 2 Stufen); d) $\text{AD-Mix}\beta, t\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}$, RT, 24 h, 75%; e) $\text{TBDMSOTf}, 2,6\text{-Lutidin}, \text{CH}_2\text{Cl}_2$, 1 h, präparative HPLC; f) TBAF, THF , RT, 30 min. TBAF = Tetrabutylammoniumfluorid, TBDMS = *tert*-Butyldimethylsilyl, Tf = Trifluormethansulfonyl. Die Bindung an FKBP12 oder die FK506-Bindungsdomäne von FKBP51 oder FKBP52 wurde durch einen kompetitiven Fluoreszenzpolarisationsassay mit 40-Fluorescein-Gly-Rapamycin als Indikator bestimmt.^[12]

Es zeigte sich, dass sowohl die Alkohole 13–18 als auch die Diole (R)-19 und (S)-19 alle mit niedrigen nanomolaren Affinitäten an FKBP51 banden (Schema 3), und zwar bis zu fünfmal stärker als der prototypische FKBP-Ligand FK506. Ähnlich wie FK506 und die meisten seiner synthetischen Derivate sind die C⁵-derivatisierten 3,10-Diazabicyclo-[4.3.1]decan-2-one pan-selektive FKBP-Liganden mit einer leichten Präferenz für das kleinere FKBP12. Substanz 18 wurde als repräsentatives Beispiel für die Homologen FKBP12.6 und FKBP13 getestet, für die es eine substanzliche Affinität von $K_i=6$ bzw. $K_i=70$ nm aufwies. Der direkte Vergleich mit 1b,^[6a] dem direkten Analogon von 13–19, das sich nur in der fehlenden C⁵-Substituentengruppe unter-

scheidet, zeigte, dass polare C⁵-Substituenten > 14 kJ mol⁻¹ zur Bindungsenergie beitrugen, was zu einer >280-fach erhöhten Affinität führte.

Um die strukturelle Grundlage für den beobachteten Affinitätsgewinn zu untersuchen, lösten wir die Kokristallstruktur von (R)-19 und (S)-19 mit FKBP51.^[13] Beide Liganden bilden eine Wasser-vermittelte Wasserstoffbrücke zwischen der sekundären Hydroxygruppe und Asp68, was zwei verschiedene Ausrichtungen der terminalen Hydroxymethylengruppe für (R)-19 und (S)-19 erzwingt (Abbildung 2a).

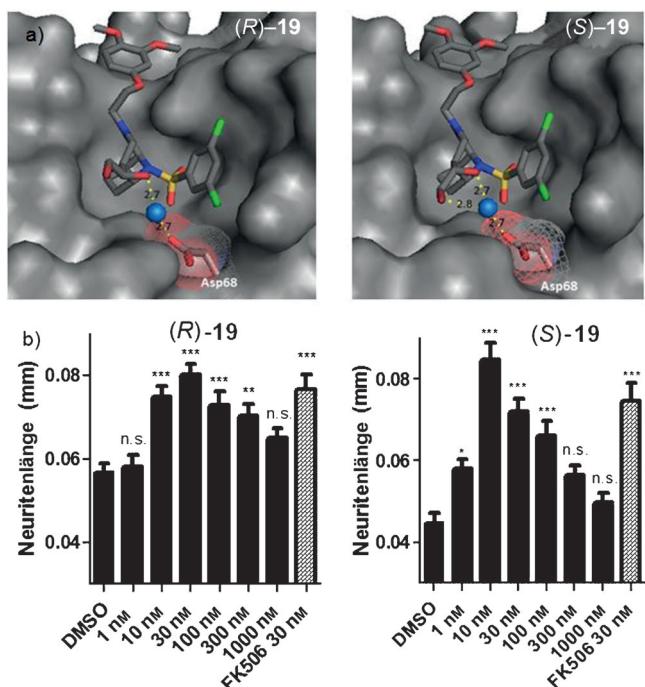


Abbildung 2. a) Kokristallstrukturen von (R)-19 (pdb-Code: 4W9O) und (S)-19 (pdb-Code: 4W9P) im Komplex mit der FK506-Bindungsdomäne von FKBP51. Wasserstoffbrücken sind als gelb gestrichelte Linien mit Abständen in Å dargestellt. Das konservierte Wasser ist als blaue Kugel und die Van-der-Waals-Oberfläche des interagierenden Asp68 als Drahtgeflecht gezeigt. b) Stimulierung des Neuritenauswuchses durch (R)-19 und (S)-19. N2a-Zellen wurden mit einem Plasmid für myristoliertes, gelb fluoreszierendes Protein transfiziert. Nach anschließendem, 24-stündigem Serumengang wurden die Zellen fixiert und durch Fluoreszenzmikroskopie morphologisch analysiert. FK506 als positive Kontrolle wurde zeitgleich bei seiner wirkungsvollsten Konzentration (30 nm) getestet. Die Daten repräsentieren Mittelwerte von >35 Zellen. Fehlerbalken zeigen ± Standardfehler, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, n.s.: nicht signifikant.

Für (S)-19 kann das C⁵-Diol auch ein alternatives Rotamer einnehmen, um eine direkte Wasserstoffbrücke zu Asp68 zu bilden (Abbildung 2 der SI).

Die Affinität der neuartigen Liganden ermöglichte Studien in komplexeren biologischen Systemen. FKBP51 hemmt den Neuritenauswuchs von N2a-Neuroblastomzellen,^[14] einem Modell für die ersten Stufen der neuronalen Differenzierung. In diesen Zellen erhöhten sowohl (R)-19 als auch (S)-19 bei niedrigen nanomolaren Konzentrationen die neuronale Aussprossung (Abbildung 2b; Abbildung 3 der SI).

Wir beobachteten jedoch auch, dass beide Stoffe bei höheren Konzentrationen ihre Fähigkeit zur Verstärkung der neuronalen Aussprossung verloren. Eine ähnliche glockenförmige Dosis-Wirkungs-Kurve war früher für FK506 und dessen Analoga in SH-SY5Y-Neuroblastoma-Zellen^[15] beobachtet worden. Der immunsuppressive FKBP-Ligand Rapamycin blockierte vollständig den Neuritenauswuchs (Abbildung 4 der SI), vermutlich durch die Hemmung von mTOR, den Haupteffekt von Rapamycin.^[16] Die Tatsache, dass **19-(R)** und **19-(S)**, die sich strukturell deutlich von FK506 unterscheiden, vollständig dessen glockenförmiges Dosis-Wirkungs-Profil bei neuronaler Aussprossung reproduzieren, gibt starken Anlass zur Annahme, dass die Hemmung eines FKBP für die initiale Stimulation des Neuritenauswuchses und für den Verlust dieses Effekts bei höheren Konzentrationen verantwortlich ist. In Anbetracht der kürzlich gefundenen anti- und pro-neuritotrophen Funktion von FKBP51 bzw. FKBP52 in N2a-Zellen^[14] postulieren wir, dass die Hemmung von FKBP51 bzw. bei höheren Konzentrationen von FKBP52 für die steigenden und fallenden Arme der glockenförmigen Dosis-Wirkungs-Kurve verantwortlich ist.

Zusammengenommen sind C⁵-verzweigte 3,10-Diazabicyclo[4.3.1]decan-2-one eine höchst effiziente Klasse von FKBP-Liganden, die für zelluläre Studien von FKBP5 geeignet sind. Polare Substituenten in der C⁵-Position erhöhen robust die Affinität, unabhängig von ihrer exakten Position und Orientierung. Die C⁵-Substitution des [4.3.1]-bicyclischen Gerüstes ist daher eine allgemeine Strategie zur Affinitätssteigerung von FKBP-Liganden, die zusätzlichen Spielraum für Modifikationen zur Feinabstimmung von Zusatzeigenschaften wie Löslichkeit, Lipophilie oder Selektivität lässt. Studien zur Struktur-Wirkungs-Beziehung hierzu sollen in Kürze vorgestellt werden.

Eingegangen am 3. September 2014
Online veröffentlicht am 24. November 2014

Stichwörter: Cyclisierungen · FKBP-Liganden · Neuritotrophe Stoffe · Rationales Design · Wirkstoff-Forschung

- [1] a) S. L. Schreiber, *Science* **1991**, *251*, 283; b) F. Edlich, G. Fischer, *Handb. Exp. Pharmacol.* **2006**, *172*, 359; c) S. Gaali, R. Gopalakrishnan, Y. Wang, C. Kozany, F. Hausch, *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 5355.
- [2] a) R. E. Babine, J. E. Villafranca, B. G. Gold, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2005**, *15*, 555; b) M. Gerard, A. Deleersnijder, J. Demeulemeester, Z. Debryser, V. Baekelandt, *Mol. Neurobiol.* **2011**, *1*; c) C. B. Kang, Y. Hong, S. Dhe-Paganon, H. S. Yoon, *Neurosignals* **2008**, *16*, 318; d) S. H. Snyder, D. M. Sabatini, M. M. Lai, J. P. Steiner, G. S. Hamilton, P. D. Suzdak, *Trends Pharmacol. Sci.* **1998**, *19*, 21; e) C. Christner, T. Herdegen, G. Fischer, *Minirev. Med. Chem.* **2001**, *1*, 377; f) J. Xu, M. H. Lacoske, E. A. Theodorakis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 956; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 972.

- [3] a) C. A. Hoeffer, W. Tang, H. Wong, A. Santillan, R. J. Patterson, L. A. Martinez, M. V. Tejada-Simon, R. Paylor, S. L. Hamilton, E. Klann, *Neuron* **2008**, *60*, 832; b) S. Shim, J. P. Yuan, J. Y. Kim, W. Zeng, G. Huang, A. Milsteyn, D. Kern, S. Muallem, G.-I. Ming, P. F. Worley, *Neuron* **2009**, *64*, 471.
- [4] a) D. L. Cioffi, T. R. Hubler, J. G. Scammell, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11*, 308; b) N. M. Galigniana, L. T. Ballmer, J. Tonetto, A. G. Erlejman, M. Lagadari, M. D. Galigniana, *J. Neurochem.* **2012**, *122*, 4; c) M. V. Schmidt, M. Paez-Pereda, F. Holsboer, F. Hausch, *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1351; d) C. L. Storer, C. A. Dickey, M. D. Galigniana, T. Rein, M. B. Cox, *Trends Endocrinol. Metab.* **2011**, *22*, 481.
- [5] a) X. J. Wang, F. A. Etzkorn, *Biopolymers* **2006**, *84*, 125; b) E. A. Blackburn, M. D. Walkinshaw, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2011**, *11*, 365.
- [6] a) Y. Wang, A. Kirschner, A. K. Fabian, R. Gopalakrishnan, C. Kress, B. Hoogeland, U. Koch, C. Kozany, A. Bracher, F. Hausch, *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 3922; b) Y. Wang, F. Hausch (Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V.), WO2014015993, **2014**; c) S. Katoh, H. Kawakami, M. Linton, V. Kalish, J. Tatlock, E. Villafranca (Agouron Pharmaceuticals), WO0004020, **2000**.
- [7] Die ähnlichsten Strukturen sind C⁵-unsubstituierte 3,10-Diazabicyclo[4.3.1]decan-2-one (beschrieben von Wang et al. und Katoh et al. (Lit. [6])) sowie 3,10-Diazabicyclo[4.3.1]decane ohne die entscheidende C²-Carbonylgruppe: a) H. Audrain, D. Bender, J. Scheel-Krüger, E. Ø. Nielsen, G. M. Olsen, D. Peters, P. Cumming, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2003**, *46*, 873; b) T. Sasaki, S. Eguchi, T. Kiriyama, *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 2061.
- [8] a) P. M. Esch, H. Hiemstra, W. J. Klaver, W. N. Speckamp, *Heterocycles* **1987**, *26*, 75; b) W. J. Klaver, H. Hiemstra, W. N. Speckamp, *Tetrahedron* **1988**, *44*, 6729; c) J. Sisko, J. R. Henry, S. M. Weinreb, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 4945; d) J. Sisko, S. M. Weinreb, *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 3210; e) P. Somfai, J. Åhman, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 3791.
- [9] a) R. Gopalakrishnan, C. Kozany, S. Gaali, C. Kress, B. Hoogeland, A. Bracher, F. Hausch, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4114; b) R. Gopalakrishnan, C. Kozany, Y. Wang, S. Schneider, B. Hoogeland, A. Bracher, F. Hausch, *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 4123.
- [10] S. H. Hong, D. P. Sanders, C. W. Lee, R. H. Grubbs, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17160.
- [11] C. Kozany, A. März, C. Kress, F. Hausch, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1402.
- [12] Es wurde nicht versucht, die Regio- oder Stereochemie zu kontrollieren. Wir entschieden vielmehr, deren Fehlen zu unserem Vorteil zu nutzen, um schnell Diversität an der C⁵-Position zu generieren.
- [13] A. Bracher, C. Kozany, A. K. Thost, F. Hausch, *Acta Crystallogr. Sect. D* **2011**, *67*, 549.
- [14] H. R. Quintá, D. Maschi, C. Gomez-Sánchez, G. Piwien-Pilipuk, M. D. Galigniana, *J. Neurochem.* **2010**, *115*, 716.
- [15] a) R. D. Price, T. Yamaji, N. Matsuoka, *Br. J. Pharmacol.* **2003**, *140*, 825; b) W. P. Revill, J. Voda, C. R. Reeves, L. Chung, A. Schirmer, G. Ashley, J. R. Carney, M. Fardis, C. W. Carreras, Y. Zhou, L. Feng, E. Tucker, D. Robinson, B. G. Gold, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, *302*, 1278.
- [16] a) J. Heitman, N. R. Movva, M. N. Hall, *Science* **1991**, *253*, 905; b) A. M. Marz, A.-K. Fabian, C. Kozany, A. Bracher, F. Hausch, *Mol. Cell. Biol.* **2013**, *33*, 1357. <