



A Journal of the Gesellschaft Deutscher Chemiker

Angewandte Chemie

GDCh

International Edition

www.angewandte.org

Accepted Article

Title: Functional disruption of the cancer-relevant interaction between Survivin and Histone H3 with a guanidiniocarbonyl pyrrole ligand

Authors: Cecilia Vallet, Dennis Aschmann, Christine Beuck, Matthias Killa, Annika Meiners, Marcel Mertel, Martin Ehlers, Peter Bayer, Carsten Schmuck, Michael Giese, and Shirley Karin Knauer

This manuscript has been accepted after peer review and appears as an Accepted Article online prior to editing, proofing, and formal publication of the final Version of Record (VoR). This work is currently citable by using the Digital Object Identifier (DOI) given below. The VoR will be published online in Early View as soon as possible and may be different to this Accepted Article as a result of editing. Readers should obtain the VoR from the journal website shown below when it is published to ensure accuracy of information. The authors are responsible for the content of this Accepted Article.

To be cited as: *Angew. Chem. Int. Ed.* 10.1002/anie.201915400
Angew. Chem. 10.1002/ange.201915400

Link to VoR: <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201915400>
<http://dx.doi.org/10.1002/ange.201915400>

COMMUNICATION

Functional disruption of the cancer-relevant interaction between Survivin and Histone H3 with a guanidiniocarbonyl pyrrole ligand

Cecilia Vallet^[a], Dennis Aschmann^[b], Christine Beuck^[c], Matthias Killa^[b], Annika Meiners^[a], Marcel Mertel^[b], Martin Ehlers^[b], Peter Bayer^[c], Carsten Schmuck^{†[b]}, Michael Giese^{*[b]} and Shirley K. Knauer^{*[a]}

[†]In Memory of Prof. Dr. Carsten Schmuck (20.02.1968 – 01.08.2019)

Abstract: The protein Survivin is highly upregulated in most cancers and considered to be a key player of carcinogenesis. We explored a supramolecular approach to address Survivin as a drug target by inhibiting the protein-protein interaction of Survivin and its functionally relevant binding partner Histone H3. Ligand **L1** is based on the guanidiniocarbonyl pyrrole cation and serves as a highly specific anion binder in order to target the interaction between Survivin and Histone H3. NMR titration confirmed binding of **L1** to Survivin's Histone H3 binding site. The inhibition of the Survivin-Histone H3 interaction and consequently a reduction of cancer cell proliferation were demonstrated by microscopic and cellular assays.

Survivin is overexpressed in almost all malignant tumors and is considered an early diagnostic and prognostic biomarker.^[1] The protein has been associated with a resistance against chemo- and radiotherapy and a poor clinical outcome.^[2] Survivin is involved in two key processes of carcinogenesis: As a member of the inhibitor of apoptosis protein (IAP) family, it counteracts cell death, and as part of the chromosomal passenger complex (CPC) it promotes cell proliferation.^[3] As Survivin is mainly expressed during embryonic development but mostly absent in terminally differentiated adult tissues, it is considered to be one of the most cancer-specific proteins identified so far.^[4] However, Survivin possesses no enzymatic activity, which makes it challenging to address the protein as a drug target. Current therapeutic strategies include antisense oligonucleotides, siRNAs, small molecule inhibitors, gene therapy and immunotherapy but none of these approaches has yet reached the clinic.^[5] We aimed to identify a ligand that specifically interferes with the protein-protein-interaction (PPI) between Survivin and its functionally relevant binding partner Histone H3. Twenty years ago, PPIs were still thought to be "intractable" as PPI interfaces are, in contrast to the deep cavities that typically bind small molecules, flat and large.^[6] Recently, the modulation of PPIs has shown more and more promising results since supramolecular chemistry has emerged as a novel tool to target protein interfaces.^[7,8] However, the design of ligands, which specifically address a well-defined hot spot on the protein surface, remains challenging.^[9]

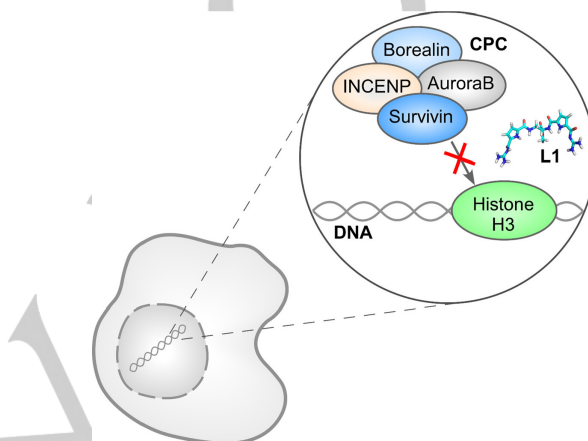


Fig. 1: The interaction between Survivin (blue) and Histone H3 (green) is essential for Survivin to fulfil its role in mitosis as a member of the Chromosomal Passenger Complex (CPC), which consists of Survivin, Borealin (light blue), AuroraB (grey), INCENP (yellow). The supramolecular guanidiniocarbonyl pyrrole cation (GCP) ligand **L1** (turquoise) was designed to inhibit the interaction between Survivin and Histone H3 and thereby decrease cancer cell proliferation.

The most successful approaches so far have used compounds that display specific, well-characterized recognition properties for amino acids and peptides in order to functionally modulate PPIs.^[7] Some well-known examples are Calixerenes that were linked to peptide loops to mimic the structure of antibodies and inhibit the interaction between cytochrome c and the cytochrome c peroxidase, Cucurbiturils that have been used to induce and reversibly control the dimerization of proteins or lysine- and arginine-specific molecular tweezers that are able to disrupt the PPI between 14-3-3 and its partner proteins C-Raf and ExoS.^[10] We show a proof-of-concept using supramolecular chemistry to design a ligand based on the guanidiniocarbonyl pyrrole cation (GCP) in order to target the interaction between Survivin and Histone H3. The guanidinium moiety in the form of arginine is not only present in the active sites of many enzymes as binder for anionic substrates but has in addition proven to be an excellent binding motif in supramolecular chemistry. Guanidinium scaffolds have been used to develop artificial receptors that are able to bind oxoanions through hydrogen bonding as well as hydrophobic and charge pairing interactions.^[11] The cationic guanidiniocarbonyl pyrrole (GCP) is a rigid planar analogue with superior binding properties in aqueous solvents containing competing anions and salts, which makes it suitable for applications in a cellular environment. It has already successfully been used by us for the design of artificial receptors for amino acids, oligopeptides or oligonucleotides and in artificial transfection vectors for gene delivery.^[12]

- [a] Dr. C. Vallet, A. Meiners, Prof. Dr. S.K. Knauer
Department of Molecular Biology II, University of Duisburg-Essen
Universitätsstraße 5, 45141 Essen, Germany
E-mail: cecilia.vallet@uni-due.de; shirley.knauer@uni-due.de
- [b] D. Aschmann, M. Killa, M. Mertel, Dr. M. Ehlers, Prof. Dr. C. Schmuck, Prof. Dr. M. Giese
Institute for Organic Chemistry, University of Duisburg-Essen
E-mail: michael.giese@uni-due.de
- [c] Dr. C. Beuck, Prof. Dr. P. Bayer
Department of Structural and Medicinal Biochemistry, University of Duisburg-Essen

COMMUNICATION

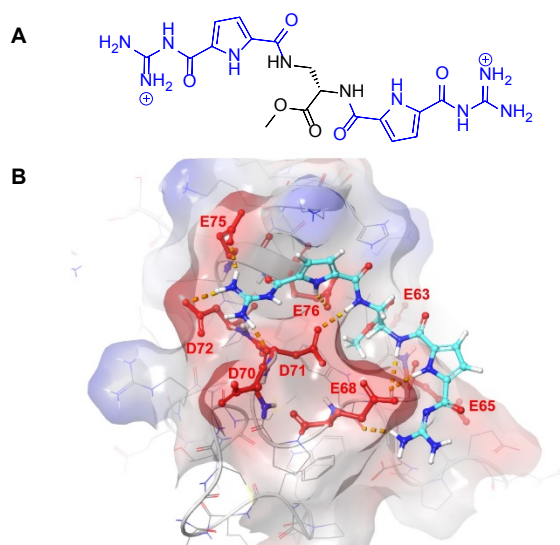
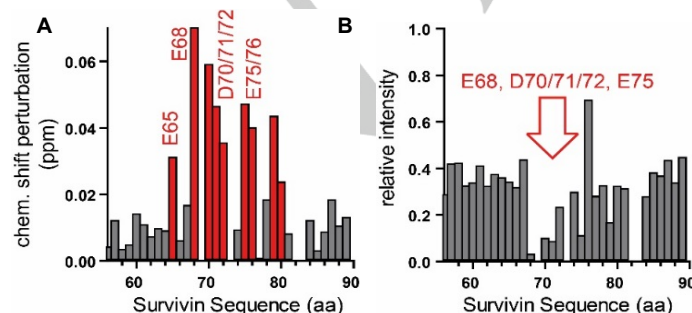


Fig. 2: (A) Chemical structure of the supramolecular GCP ligand 1 (**L1**) with two guanidiniocarbonyl pyrrole (GCP) groups (blue). (B) Docking of **L1** (turquoise) to Survivin's Histone H3 binding site. The dotted lines (orange) indicate interactions between ligand and protein interaction sites of the ligand are highlighted in red.

To identify ligands suitable to target the surface-exposed anionic Histone H3 binding site of Survivin we performed docking studies with a focused library of ligands containing one or two GCP units to address the negatively charged amino acids on the protein surface. We tested different linkers to vary the distance between the GCP units in order to achieve the best binding orientation between ligands and target amino acids and identified ligand 1 (**L1**) as the ligand with the best docking score (Fig. 2A and B).

To map the binding of **L1** to distinct residues on the protein surface, we performed NMR titration experiments (Sup. Fig. 1A). The titration resulted in chemical shift perturbations at glutamic acids (E) 65 and 68, aspartic acids (D) 70, 71 and 72 and glutamic acids (E) 75 and 76 (Fig. 3A). Those amino acids correspond to the known Histone H3 binding site of Survivin, which comprises amino acids 51 to 80 [13]. Furthermore, a decrease in NMR signal intensities indicates a binding equilibrium with kinetics in the intermediate time regime (ms), which corresponds to a dissociation constant in the μM range. Indeed, also the relative intensities I/I_0 showed a significant decrease within Survivin's Histone H3 binding site, thereby indicating ligand binding within this region. The intensities strongly decreased for glutamic acid (E) 68, aspartic acid (D) 70, 71 and 72 and glutamic acid (E) 75 (Fig. 3B).



These results clearly show that **L1** interacts with Survivin's Histone H3 binding site. Whether **L1** is taken up by cells and able to inhibit the interaction between the two proteins in a cellular environment was verified with two different approaches. First, we performed a co-immunoprecipitation. For this assay, HeLa cells, which are derived from cervical cancer, were transfected with HA-tagged Survivin and treated with different ligand concentrations or the respective amount of DMSO as a control. After 24 h of incubation, cell lysates were generated and incubated with magnetic HA-antibody-coupled beads, which allowed the elution of Survivin-HA together with all other proteins bound to Survivin including Histone H3. The amount of Histone H3 bound to Survivin was then quantified via Western Blot analysis. We were able to show that **L1** indeed reduced the interaction between Survivin and Histone H3 in a concentration-dependent manner. A ligand concentration of 10 μM already led to a 50 % decrease in Survivin-Histone H3 interaction, while a concentration of 50 μM caused a decrease of 65 % (Fig. 4A and B).

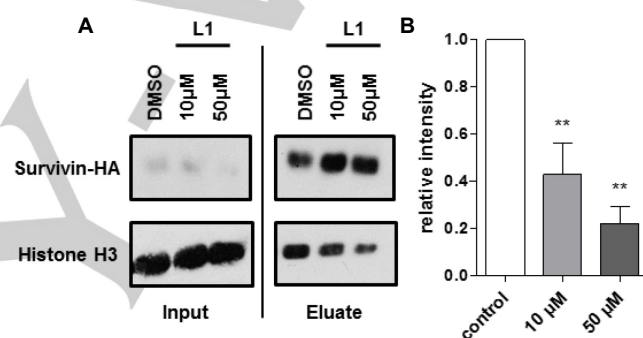


Fig. 4: **L1** is able to inhibit the interaction between Survivin and Histone H3 in HeLa cells. (A) Immunoprecipitation experiments reveal a concentration-dependent inhibition of the Survivin-Histone H3 interaction by **L1**. (B) Quantitative analysis of the Western Blot shows the intensity of the Histone H3 signal in the eluate normalized to the respective Survivin-HA signal of HeLa cells treated with either 10 μM **L1**, 50 μM **L1** or DMSO (control). Experiments were performed in triplicates. The error bars show the standard error of the mean. Data was analyzed by t test. Two asterisks (**) indicate a p value smaller than 0.01.

Since Western Blot analysis is considered to be only semi-quantitative and co-immunoprecipitation was performed with overexpressed and HA-tagged Survivin, which does not fully correspond to the natural conditions inside the cell, we verified the results with an *in situ* Proximity Ligation Assay (PLA). The PLA allows the visualization of protein-protein interactions within cells on an endogenous level. At first, two primary antibodies bind to the target proteins Survivin and Histone H3.

Fig. 3: NMR titration experiments confirmed binding of **L1** to Survivin's Histone H3 binding site. (A) Chemical Shift Perturbation (CSP, $\Delta\delta$) of ^{15}N -labeled Survivin 1-120 (300 μM) with **L1** (300 μM), compared to protein without **L1**, plotted against the Survivin sequence. **L1**-binding residues with prominent shift perturbations are colored in red, featuring aspartic and glutamic acid residues within the Histone H3 binding site of Survivin. (B) The relative signal intensities show a significant decrease within Survivin's Histone H3 binding site indicating ligand binding within this region (red arrow). The histograms in (A) and (B) only show the region around the H3 binding site, for the full plots see Figure S1.

COMMUNICATION

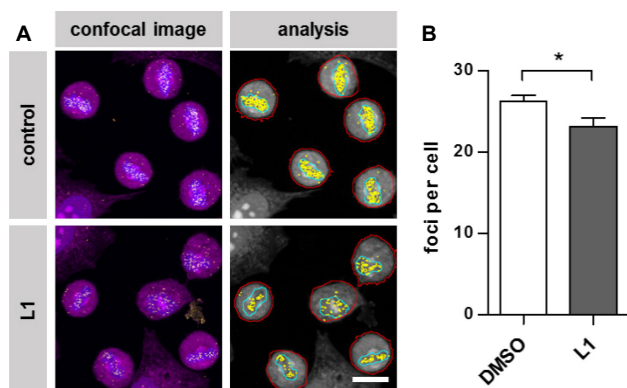


Fig. 5: The inhibiting effect of **L1** could be confirmed via PLA. (A) PLA performed in HeLa cells treated with 50 μ M **L1** or the respective amount of DMSO (control). Entire cells are depicted in magenta, DNA in blue and PLA foci in yellow. Scale bar: 20 μ m. (B) Quantification of the PLA. The error bars show the standard error of the mean. $N > 55$. Data was analyzed by t test. One asterisk (*) indicates a p value smaller than 0.05

Secondary antibodies that are conjugated to a matched pair of short single-stranded oligonucleotides then recognize these antibodies. If the two targets are in close proximity (<40 nm), the oligonucleotides hybridize and ligate with two additional connector oligonucleotides to form a continuous circular DNA structure. DNA polymerase then amplifies these circular structures through rolling-circle amplification with fluorescent nucleotides that can be detected as PLA signals with fluorescence microscopy.

The PLA indeed revealed a significant decrease of the Survivin-Histone H3 interaction inside the cell upon **L1** treatment and thereby confirmed the results of the co-immunoprecipitation (Fig. 5A and B).

As **L1** could be shown to inhibit the interaction between Survivin and Histone H3 inside the cell, we wanted to investigate whether the inhibitor would consequently also interfere with Survivin's role in cell proliferation. Therefore, HeLa cells were treated with 50 μ M of **L1** and synchronized before they were fixed during mitosis. The cells were then immunostained to allow the microscopic identification of mitotic defects. Cells that displayed mitotic defects were assigned to one of the five following categories: Multipolar Pro-/Metaphase, Multipolar Ana-/Telophase, Lagging Chromosomes, Acentric Fragments and Chromatin Bridges (Fig. S23).^[14] The experiments revealed that ligand treatment drastically increased the number of mitotic defects in HeLa cells. While only 6 % of control cells had mitotic defects, the amount increased to 32 % in ligand-treated cells (Fig. 6A). Furthermore, **L1**-treated cells showed a larger variety of mitotic defects in comparison to the control. In addition to acentric fragments and lagging chromosomes, also chromatin bridges and multipolar spindles could be observed (Fig. 6B). This confirms that **L1** is able to interfere with Survivin's mitotic functions. We quantified the inhibiting effect of the ligand on cell proliferation by performing cell proliferation assays in different types of cancer cells: HeLa cells that are derived from cervical cancer, A549 cells as a model for lung cancer, MDA-MB-231 cells originating from breast cancer and HCT 116 cells that serve as a model for colon cancer.

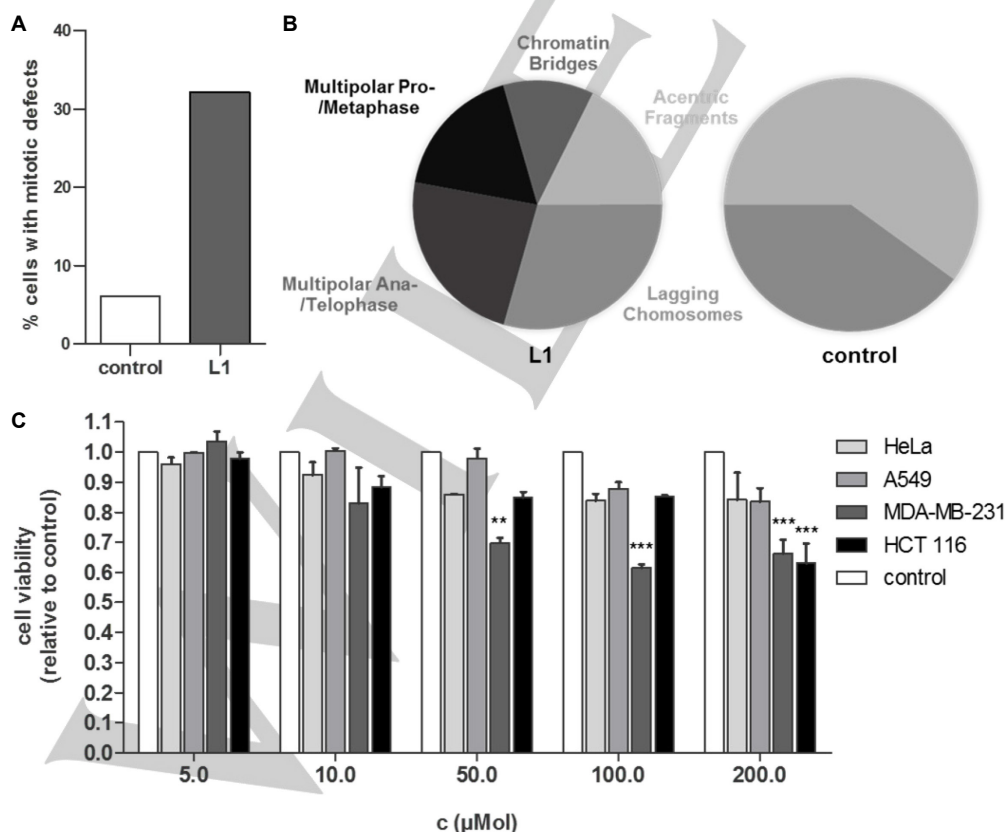


Fig. 6: **L1** induces mitotic defects in HeLa cells and inhibits cell proliferation. (A) Percentage of HeLa cells with mitotic defects in cells treated with 50 μ M **L1** for 48 h in comparison to the DMSO control. (C) Pie charts show proportions of the different mitotic defects found in **L1**-treated cells in comparison to DMSO-treated cells (control). $N > 100$. (C) HeLa, A549, MDA-MB-231 and HCT 116 cells were treated with different ligand concentrations or the respective amounts of DMSO and incubated for 72 h before cell proliferation was measured via an MTS assay. The measured absorbance at 490 nm in **L1**-treated cells was normalized to the absorbance in DMSO-treated cells of the respective cell type (control). Experiments were performed in triplicates. The error bars show the standard error of the mean. Data was analyzed by a 1way ANOVA test followed by a Tukey's Multiple Comparison test. Two asterisks (**) indicate a p value smaller than 0.01. Three asterisks (***) indicate a p value smaller than 0.001.

COMMUNICATION

The tetrazolium compound [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS)] used for this assay is added to the cells and bioreduced into a colored formazan product. The quantity of formazan product measured at 490nm absorbance is directly proportional to the number of living cells in culture. The assay revealed that **L1** was able to successfully inhibit cell proliferation in all cancer cell lines tested (Fig. 6C). In three of the four cell lines, proliferation could be decreased by more than 30 %, which is comparable to the decrease in proliferation observed in Survivin-depleted cells [15]. The inhibition of cell proliferation occurred in a concentration-dependent manner and the largest effects could be observed in the breast cancer cell line MDA-MB-231 and the colon cancer cell line HCT 116.

To confirm that the observed effects of **L1** on cancer cell proliferation are Survivin-specific, we performed a rescue experiment in which we transiently transfected HCT 116 cells with Survivin-HA (Rescue) or with GFP (Control). After treating the cells with **L1** for 72 h we measured cell proliferation via an MTS assay. We were able to observe that an overexpression of Survivin-HA nearly completely rescued the antiproliferative effect of **L1** in all tested concentrations. While cell proliferation was reduced to 72 % (50 μ M), 67 % (100 μ M) and 55 % (200 μ M) in control cells, cell viability could be restored to 97 % (50 μ M), 89 % (100 μ M) and 91 % (200 μ M) in cells overexpressing Survivin-HA (Fig. 7). These results suggest that the effects of **L1** are indeed caused by a specific inhibition of Survivin inside the cells.

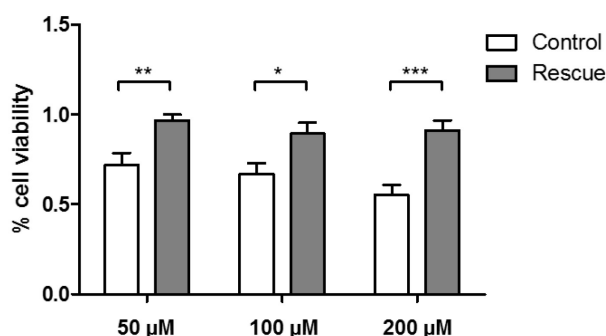


Fig. 7: Overexpression of Survivin-HA rescues the antiproliferative effect of **L1** in HCT 116 cells and thereby confirms that the observed effects of the ligand are Survivin-specific. HCT 116 were transiently transfected with Survivin-HA (Rescue) or GFP (Control) and treated with different concentrations of **L1** for 72 h. Cell proliferation was measured via an MTS assay. Experiments were performed in triplicates. The error bars show the standard error of the mean. Data was analyzed by a 1way ANOVA test followed by a Tukey's Multiple Comparison test. One asterisk (*) indicates a p value smaller than 0.05. Two asterisks (**) indicate a p value smaller than 0.01. Three asterisks (***) indicate a p value smaller than 0.001.

Based on a focused library we were able to identify **L1** as potent ligand to target the cancer-relevant protein Survivin by disrupting the protein-protein interaction with Histone H3. We verified binding of the ligand to Survivin's Histone H3 binding site, which mediates the interaction with Histone H3 in the early stages of mitosis and is crucial for cell proliferation. In addition, it was shown that the interaction between the two proteins was successfully decreased in a cellular environment. This resulted in

an increasing number of mitotic defects and consequently in a reduction of cancer cell proliferation that was confirmed to be caused by a specific inhibition of Survivin inside the cells. Further studies now focus on the development of additional ligands in order to target other functionally relevant protein-protein interactions of Survivin. In addition, multivalency is explored as an approach to further improve and optimize **L1** regarding specificity and affinity.

Experimental Section

All experimental details can be found in *Supporting Information*.

Acknowledgements

This work was supported by the collaborative research center 1093 (CRC 1093) funded by the German Research Foundation (DFG). Microscopic analyses were performed in collaboration with the Imaging Centre Campus Essen (ICCE).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords: Supramolecular chemistry • Molecular recognition • Survivin • PPI inhibitor • Cancer • Guanidiniocarbonyl pyrrole • NMR • Confocal microscopy • Apoptosis • Drug discovery • Inhibitors

References

- [1] a) V. Vaira, C. W. Lee, H. L. Goel, S. Bosari, L. R. Languino, D. C. Altieri, *Oncogene* **2007**, *26*, 2678; b) Y. Xu, F. Fang, G. Ludewig, G. Jones, D. Jones, *DNA and cell biology* **2004**, *23*, 527; c) L. Tracey, A. Pérez-Rosado, M. J. Artiga, F. I. Camacho, A. Rodríguez, N. Martínez, E. Ruiz-Ballesteros, M. Mollejo, B. Martinez, M. Cuadros et al., *The Journal of pathology* **2005**, *206*, 123; d) W. H. Hoffman, S. Biade, J. T. Zilfou, J. Chen, M. Murphy, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3247; e) Y. Jiang, H. I. Saavedra, M. P. Holloway, G. Leone, R. A. Altura, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 40511.
- [2] a) C. Adida, D. Berrebi, M. Peuchmaur, M. Reyes-Mugica, D. C. Altieri, *Lancet (London, England)* **1998**, *351*, 882; b) G. Capalbo, C. Rödel, R. H. Stauber, S. K. Knauer, M. Bache, M. Kappler, F. Rödel, *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* **2007**, *183*, 593; c) K. Engels, S. K. Knauer, D. Metzler, C. Simf, O. Struschka, C. Bier, W. Mann, A. F. Kovács, R. H. Stauber, *The Journal of pathology* **2007**, *211*, 532; d) C. Xu, M. Yamamoto-Ibusuki, Y. Yamamoto, S. Yamamoto, S. Fujiwara, K. Murakami, Y. Okumura, L. Yamaguchi, Y. Fujiki, H. Iwase, *Breast cancer (Tokyo, Japan)* **2014**, *21*, 482; e) P. Chen, J. Zhu, D.-Y. Liu, H.-Y. Li, N. Xu, M. Hou, *Medical oncology (Northwood, London, England)* **2014**, *31*, 775.

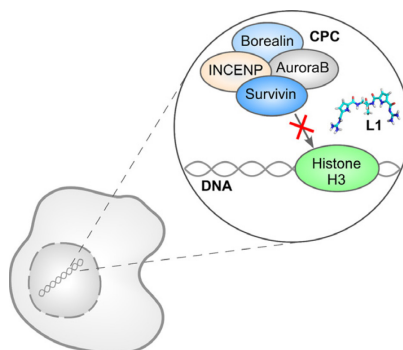
COMMUNICATION

- [3] F. Li, G. Ambrosini, E. Y. Chu, J. Plescia, S. Tognin, P. C. Marchisio, D. C. Altieri, *Nature* **1998**, 396, 580.
- [4] F. Shojaei, F. Yazdani-Nafchi, M. Banitalebi-Dehkordi, M. Chehelgerdi, M. Khorramian-Ghahfarokhi, *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* **2018**.
- [5] M. Mobahat, A. Narendran, K. Riabowol, *International journal of molecular sciences* **2014**, 15, 2494.
- [6] a) H. Hwang, T. Vreven, J. Janin, Z. Weng, *Proteins* **2010**, 78, 3111; b) J. C. Fuller, N. J. Burgoyne, R. M. Jackson, *Drug discovery today* **2009**, 14, 155; c) M. R. Arkin, Y. Tang, J. A. Wells, *Chemistry & biology* **2014**, 21, 1102.
- [7] L.-G. Milroy, T. N. Grossmann, S. Hennig, L. Brunsveld, C. Ottmann, *Chemical reviews* **2014**, 114, 4695.
- [8] M. W. Peczu, A. D. Hamilton, *Chemical reviews* **2000**, 100, 2479.
- [9] R. Kubota, I. Hamachi, *Chemical Society reviews* **2015**, 44, 4454.
- [10] a) D. Bier, R. Rose, K. Bravo-Rodriguez, M. Bartel, J. M. Ramirez-Anguila, S. Dutt, C. Wilch, F.-G. Klärner, E. Sanchez-Garcia, T. Schrader et al., *Nature chemistry* **2013**, 5, 234; b) P. J. de Vink, J. M. Briels, T. Schrader, L.-G. Milroy, L. Brunsveld, C. Ottmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, 56, 8998; c) H. D. Nguyen, D. T. Dang, J. L. J. van Dongen, L. Brunsveld, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, 49, 895; d) Y. Wei, G. L. McLendon, A. D. Hamilton, M. A. Case, C. B. Purring, Q. Lin, H. S. Park, C. S. Lee, T. Yu, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2001**, 1580; e) Y. Hamuro, M. C. Calama, H. S. Park, A. D. Hamilton, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, 36, 2680.
- [11] a) K. A. Schug, W. Lindner, *Chemical reviews* **2005**, 105, 67; b) P. Blondeau, M. Segura, R. Pérez-Fernández, J. de Mendoza, *Chemical Society reviews* **2007**, 36, 198.
- [12] a) M. Ehlers, J.-N. Grad, S. Mittal, D. Bier, M. Mertel, L. Ohl, M. Bartel, J. Briels, M. Heimann, C. Ottmann et al., *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2018**, 19, 591; b) J. Matić, F. Šupljika, T. Tandarić, M. Dukšić, P. Piotrowski, R. Vianello, A. Brozovic, I. Piantanida, C. Schmuck, M. R. Stojković, *International journal of biological macromolecules* **2019**, 134, 422; c) H. Jiang, X.-Y. Hu, S. Mosel, S. K. Knauer, C. Hirschhäuser, C. Schmuck, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2019**, 20, 1410; d) L. Bartsch, M. Bartel, J. IglesiasFernandez, Y. Ruiz Blanco, C. Beuk, J. Briels, A. Gigante, N. Toetsch, P. Bayer, E. Sanchez-Garcia et al., *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2019**; e) C. Schmuck, M. Heil, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2006**, 12, 1339; f) J. Hatai, C. Schmuck, *Accounts of chemical research* **2019**, 52, 1709.
- [13] E. Niedzialkowska, F. Wang, P. J. Porebski, W. Minor, J. M. G. Higgins, P. T. Stukenberg, *Molecular biology of the cell* **2012**, 23, 1457.
- [14] N. C. Baudoin, D. Cimini, *Chromosoma* **2018**, 127, 215.
- [15] a) Y. Li, D. Liu, Y. Zhou, Y. Li, J. Xie, R. J. Lee, Y. Cai, L. Teng, *Journal of Cancer* **2015**, 6, 1187; b) G.-Y. Miao, *WJG* **2007**, 13, 1170; c) X.-Q. CHEN, S. YANG, Z.-Y. LI, H.-S. LU, M.-Q. KANG, T.-Y. LIN, *Molecular Medicine Reports* **2012**, 5, 917.

COMMUNICATION

COMMUNICATION

The supramolecular guanidiniocarbonyl pyrrole ligand **L1** targets the Histone H3 binding site of the protein Survivin, which is highly upregulated in cancer. Inhibiting the interaction between the two proteins successfully reduced cancer cell proliferation.



Cecilia Vallet, Dennis Aschmann, Matthias Killa, Annika Meiners, Christine Beuck, Marcel Mertel, Martin Ehlers, Peter Bayer, Carsten Schmuck, Michael Giese and Shirley K. Knauer

Page No. – Page No.

Functional disruption of the cancer-relevant interaction between Survivin and Histone H3 with a guanidiniocarbonyl pyrrole ligand

Funktionelle Inhibition der krebsrelevanten Interaktion von Survivin und Histon H3 mit einem Guanidiniumcarbonylpyrrol-Liganden

Cecilia Vallet^[a], Dennis Aschmann^[b], Christine Beuck^[c], Matthias Killa^[b], Annika Meiners^[a], Marcel Mertel^[b], Martin Ehlers^[b], Peter Bayer^[c], Carsten Schmuck^{†[b]}, Michael Giese^{*[b]} and Shirley K. Knauer^{*[a]}

[†]In Gedenken an Prof. Dr. Carsten Schmuck (20.02.1968 – 01.08.2019)

Zusammenfassung: Das Protein Survivin ist bei den meisten Krebsarten überexprimiert und gilt als einer der Hauptakteure der Krebsentstehung. Wir haben einen supramolekularen Ansatz genutzt, um Survivin als Wirkstoff-Ziel zu adressieren, indem wir die Protein-Protein-Interaktion von Survivin und seinem funktionell relevanten Bindungspartner Histon H3 inhibieren. Ligand **L1** basiert auf dem Guanidiniumcarbonylpyrrol-Kation und dient als hochspezifischer Anionenbinder. Durch NMR-Titrations konnte die Bindung von **L1** an die Histon H3-Bindungsstelle von Survivin bestätigt werden. Die Hemmung der Survivin-Histon-H3-Interaktion und folglich eine Verringerung der Proliferation von Krebszellen wurde durch mikroskopische und zelluläre Assays nachgewiesen.

Survivin wird in fast allen malignen Tumoren überexprimiert und gilt als früher diagnostischer sowie prognostischer Biomarker.^[1] Das Protein wurde mit einer Resistenz gegenüber Chemo- und Bestrahlungstherapien sowie einem schlechteren Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht.^[2] Survivin ist an zwei Schlüsselprozessen der Karzinogenese beteiligt: Als Mitglied der Familie der *Inhibitor of Apoptosis Proteins* (IAPs) wirkt es dem Zelltod entgegen und fördert als Teil des *Chromosomal Passenger Complex* (CPC) die Zellproliferation.^[3] Da Survivin hauptsächlich während der Embryonalentwicklung exprimiert wird, jedoch kaum in ausdifferenzierten adulten Geweben, gilt es als eines der krebsspezifischsten Proteine, die bisher bekannt sind.^[4] Survivin besitzt keine enzymatische Aktivität und stellt daher ein schwierig anzugreifendes Wirkstoffziel dar. Bisherige Strategien zur Inhibition des Proteins basieren auf Antisense-Oligonukleotiden, siRNAs, *small molecule*-Inhibitoren, Gen- und Immuntherapien. Allerdings findet bislang keiner dieser Ansätze klinische Anwendung.^[5] Unser Ziel war es einen Liganden zu identifizieren, der spezifisch die Protein-Protein-Interaktion (PPI) zwischen Survivin und seinem funktionell relevanten Bindungspartner Histon H3 inhibiert. Vor zwanzig Jahren galten PPIs noch als schwer zu adressieren, da PPI-Grenzflächen, im Gegensatz zu tiefen Bindetaschen, an die typischerweise kleine Moleküle binden, flach und großflächig sind.^[6]

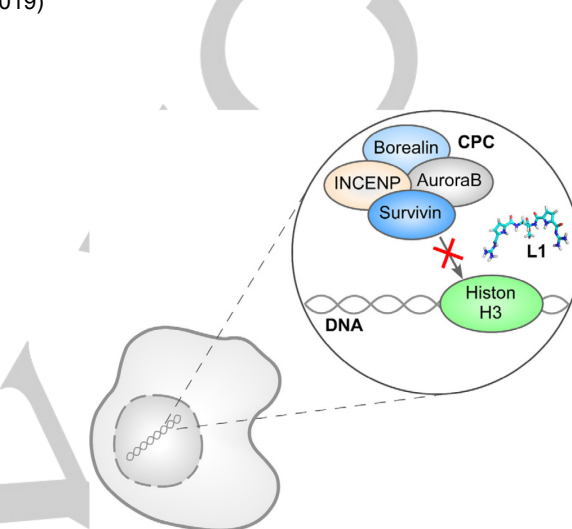


Abb. 1: Die Interaktion von Survivin (blau) und Histon H3 (grün) ist für Survivin essentiell, um seine Rolle als Mitglied des *Chromosomal Passenger Complex* (CPC) in der Mitose zu erfüllen, der aus Survivin, Borealin (hellblau) und INCENP (gelb) besteht. Der supramolekulare Guanidiniumcarbonylpyrrol-Ligand **L1** (türkis) wurde entwickelt, um die Interaktion von Survivin und Histon H3 zu inhibieren und dadurch die Proliferation von Krebszellen zu verringern.

Seit Kurzem hat die Modulation von PPIs immer vielversprechendere Ergebnisse gezeigt, da supramolekulare Chemie sich als geeignete Methode zur Adressierung von Proteingrenzflächen bewährt hat.^[7,8] Das Design von Liganden, die an einen genau definierten *hotspot* auf der Proteinoberfläche binden, bleibt jedoch eine Herausforderung.^[9]

Die bisher erfolgreichsten Ansätze verwendeten Verbindungen mit spezifischen, gut charakterisierten Bindungsmotiven für Aminosäuren und Peptide, um PPIs funktionell zu modulieren.^[7] Einige bekannte Beispiele sind Calixarene, die an Peptidschleifen gebunden die Struktur von Antikörpern imitieren und so die Interaktion von Cytochrom c und der Cytochrom c-Peroxidase hemmen, Cucurbiturile, die verwendet wurden, um die Dimerisierung von Proteinen zu induzieren und zu kontrollieren, oder Lysin und Arginin-spezifische molekulare Pinzetten, die in der Lage sind, die PPI zwischen 14-3-3 und seinen Partnerproteinen C-Raf und ExoS zu inhibieren.^[10] Bei unserem *Proof of Concept*-Ansatz, wurde ein supramolekularer Ligand auf der Basis des Guanidiniumcarbonylpyrrol-Kations (GCP) entworfen, um die Interaktion zwischen Survivin und Histon H3 zu modulieren. Die Guanidinium-Einheit in Form von Arginin liegt nicht nur in den aktiven Zentren vieler Enzyme als Bindestelle für anionische Substrate vor, sondern hat sich auch als ausgezeichnetes Bindungsmotiv in der supramolekularen Chemie erwiesen.

[a] Dr. C. Vallet, A. Meiners, Prof. Dr. S.K. Knauer
Lehrstuhl für Molekularbiologie II, Universität Duisburg-Essen
Universitätsstraße 5, 45141 Essen, Deutschland
E-Mail: cecilia.vallet@uni-due.de; shirley.knauer@uni-due.de

[b] D. Aschmann, M. Killa, M. Mertel, Dr. M. Ehlers, Prof. Dr. C. Schmuck, Prof. Dr. M. Giese
Institut für organische Chemie, Universität Duisburg-Essen
E-Mail: michael.giese@uni-due.de

[c] Dr. C. Beuck, Prof. Dr. P. Bayer
Lehrstuhl für strukturelle und medizinische Biochemie, Universität Duisburg-Essen

COMMUNICATION

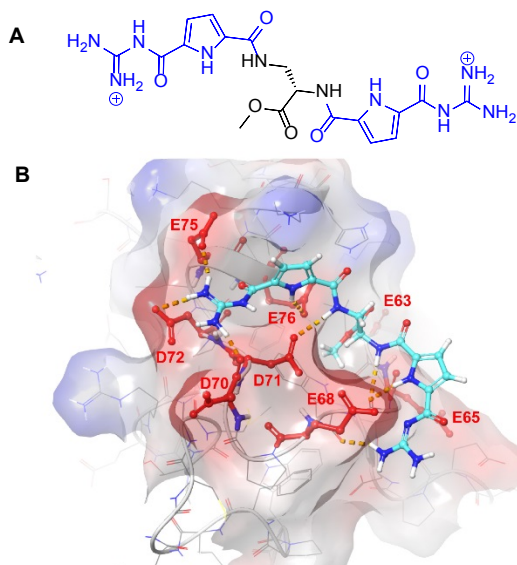
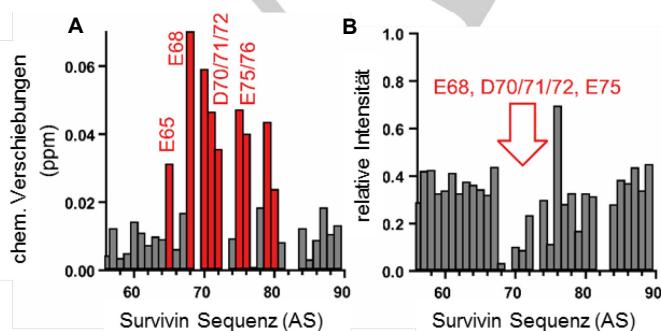


Abb. 2: (A) Chemische Struktur des supramolekularen GCP-Liganden 1 (**L1**) mit zwei Guanidiniumcarbonylpyrrol -Gruppen (blau). (B) Docking von **L1** (türkis) an die Histone H3-Bindestelle von Survivin. Die gepunkteten Linien (orange) zeigen Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein. Interaktionsstellen des Liganden sind rot hervorgehoben.

Guanidinium-Gerüste wurden bereits verwendet, um künstliche Rezeptoren zu entwickeln, die Oxoanionen über Wasserstoffbrücken sowie Ionenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen binden können.^[11] Das kationische Guanidiniumcarbonylpyrrol (GCP) ist ein starres planares Analogon mit überlegenen Bindungseigenschaften in wässrigen Lösungsmitteln, die konkurrierende Anionen und Salze enthalten, weshalb es sich für Anwendungen in einer zellulären Umgebung eignet. Es wurde von uns bereits erfolgreich für das Design künstlicher Rezeptoren für Aminosäuren, Oligopeptide oder Oligonukleotide sowie für die Transfektion von DNA eingesetzt.^[12]

Um Liganden zu identifizieren, die für die oberflächenexponierte anionische Histone H3-Bindestelle von Survivin geeignet sind, führten wir Docking-Studien mit einer fokussierten Bibliothek von Liganden durch, die eine oder zwei GCP-Einheiten enthalten, um die negativ geladenen Aminosäuren auf der Proteinoberfläche zu adressieren. Wir haben verschiedene Linker getestet, um den Abstand zwischen den GCP-Einheiten zu variieren und die beste Bindungsorientierung zwischen Liganden und Zielamino-säuren zu erzielen. Ligand 1 (**L1**) wurde hierbei als der Ligand mit dem besten Docking-Score identifiziert (**Abb. 2A und B**).



Um die Bindung von **L1** bestimmten Aminosäuren auf der Proteinoberfläche zuzuordnen, führten wir NMR-Titrationsexperimente durch (**Abb. 1A**). Diese zeigten chemische Verschiebungen bei Glutaminsäuren (E) 65 und 68, Asparaginsäuren (D) 70, 71 und 72 und Glutaminsäuren (E) 75 und 76 (**Abb. 3A**). Diese Aminosäuren entsprechen der bereits bekannten Histone H3-Bindestelle von Survivin, die die Aminosäuren 51 bis 80 umfasst.^[13] Darüber hinaus deutet die Abnahme der NMR-Signalintensitäten auf ein Bindungsgleichgewicht mit einer Kinetik im mittleren Zeitbereich (ms) hin, was einer Dissoziationskonstante im μM -Bereich entspricht. Auch die relativen Intensitäten I/I_0 zeigten eine signifikante Abnahme im Bereich der Histone H3-Bindestelle von Survivin, was ebenfalls auf eine Ligandenbindung innerhalb dieser Region hinweist. Die Intensitäten nahmen für Glutaminsäure (E) 68, Asparaginsäuren (D) 70, 71 und 72 und Glutaminsäure (E) 75 stark ab (**Abb. 3B**).

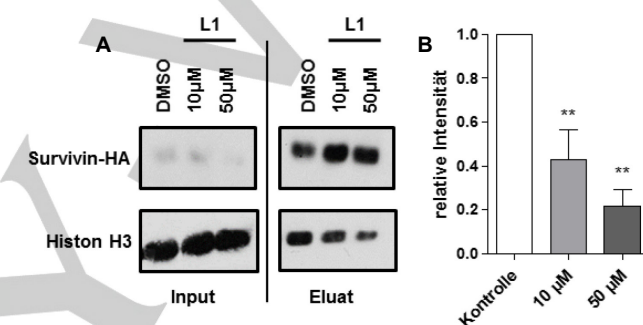


Abb. 4: **L1** reduziert die Interaktion von Survivin und Histone H3 in HeLa-Zellen. (A) Die Immunpräzipitation zeigt eine konzentrationsabhängige Reduktion der Survivin-Histone H3-Interaktion durch **L1**. (B) Die quantitative Analyse des Western Blots zeigt die Intensität des Histone H3-Signals im Eluat, normalisiert auf das jeweilige Survivin-HA-Signal in HeLa-Zellen, die entweder mit 10 μM **L1**, 50 μM **L1** oder DMSO behandelt wurden (Kontrolle). Bei den Experimenten handelt es sich um Triplicate. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts. Die Daten wurden mittels t-Test analysiert. Zwei Sternen (**) entsprechen einem p-Wert von weniger als 0,01.

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass **L1** mit der Histone H3-Bindestelle von Survivin interagiert. Ob **L1** von Zellen aufgenommen wird und die Interaktion zwischen den beiden Proteinen in einer zellulären Umgebung inhibieren kann, wurde mit zwei verschiedenen Ansätzen überprüft. Zunächst führten wir eine Co-Immunpräzipitation durch. Für diesen Assay wurden HeLa-Zellen, bei denen es sich um Gebärmutterhalskrebs-Zellen handelt, mit HA-markiertem Survivin transfiziert und mit unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen oder der jeweiligen Menge an DMSO als Kontrolle behandelt.

Abb. 3: NMR-Titrationsexperimente bestätigten die Bindung von **L1** an die Histone H3-Bindestelle von Survivin. (A) Chemische Verschiebungen (CSP, $\Delta\delta$) von ^{15}N -markiertem Survivin 1-120 (300 μM) mit **L1** (300 μM) im Vergleich zu Protein ohne **L1**, aufgetragen gegen die Survivin-Sequenz. **L1**-bindende Aminosäuren (AS) mit deutlichen Verschiebungen sind rot markiert. (B) Die relativen Signalintensitäten zeigen eine signifikante Abnahme im Bereich der Histone H3-Bindestelle von Survivin, was auf eine Ligandenbindung innerhalb dieser Region hinweist (roter Pfeil). Die Histogramme in (A) und (B) zeigen nur die Region um die H3-Bindestelle, für die vollständigen Diagramme siehe Abbildung S1.

COMMUNICATION

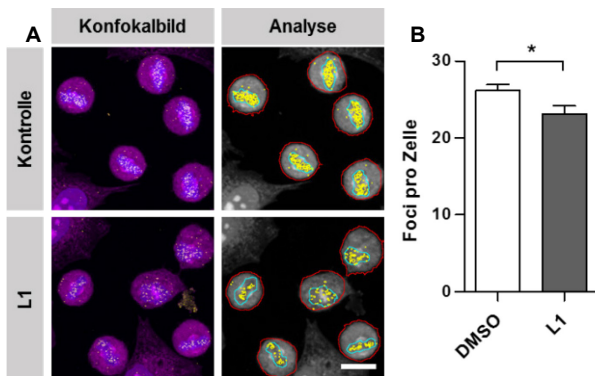


Abb. 5: Die inhibierende Wirkung von **L1** konnte mittels PLA bestätigt werden. (A) Der PLA wurde in HeLa-Zellen durchgeführt, die mit 50 μM **L1** oder der jeweiligen Menge an DMSO (Kontrolle) behandelt wurden. Ganze Zellen sind in Magenta, DNA in Blau und PLA-Foci in Gelb dargestellt. Maßstabsbalken: 20 μm . (B) Quantifizierung des PLAs. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts. $N > 55$. Die Daten wurden mittels t-Test analysiert. Ein Stern (*) entspricht einem p-Wert kleiner als 0,05.

Nach 24-stündiger Inkubation wurden Zelllysate hergestellt und mit magnetischen HA-Antikörper-gekoppelten *Beads* inkubiert, was die Elution von Survivin-HA zusammen mit allen an Survivin gebundenen Proteinen, einschließlich Histon H3, ermöglichte. Die Menge an an Survivin gebundenem Histon H3 wurde dann mittels Western-Blot-Analyse quantifiziert. So konnte gezeigt werden, dass **L1** tatsächlich die Interaktion zwischen Survivin und Histon H3 konzentrationsabhängig reduziert. Eine Ligandenkonzentration von 10 μM führte bereits zu einer Abnahme der Survivin-Histon-H3-Interaktion um 50%, während eine Konzentration von 50 μM eine Abnahme von 65% bewirkte. (Abb. 4A und B).

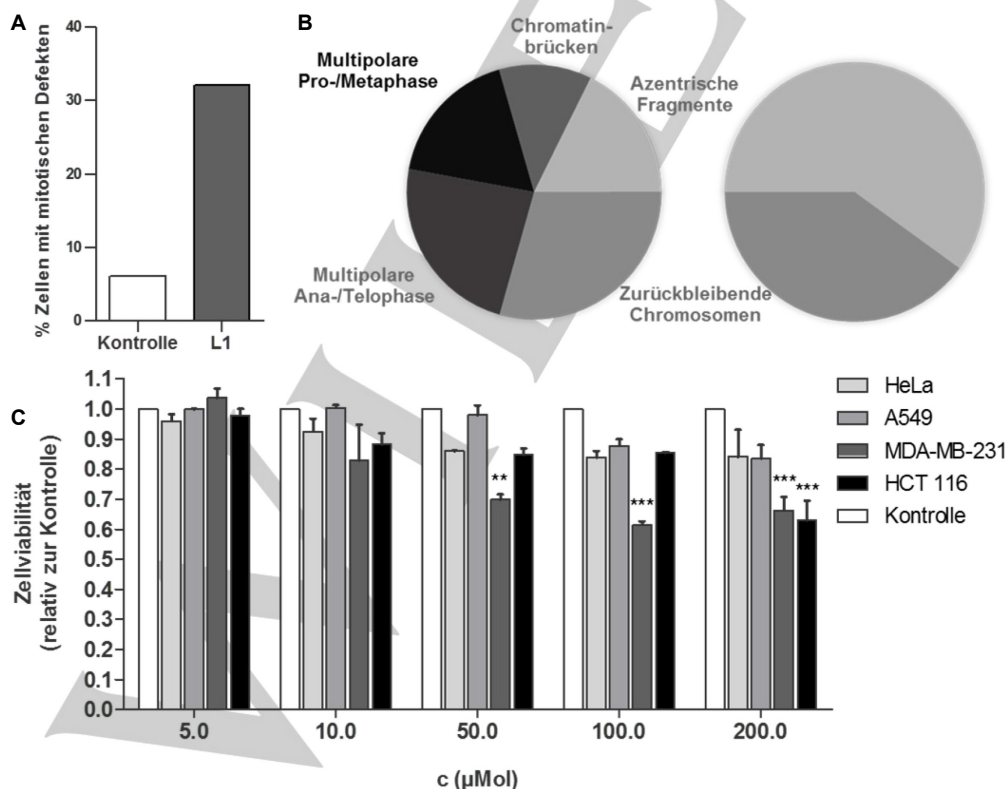


Abb. 6: **L1** induziert mitotische Defekte in HeLa-Zellen und hemmt die Zellproliferation. (A) Anteil von HeLa-Zellen mit mitotischen Defekten, die 48 h mit 50 μM **L1** behandelt wurden, im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. (C) Tortendiagramme zeigen die Anteile der verschiedenen mitotischen Defekte, die in **L1**-behandelten Zellen im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen gefunden wurden (Kontrolle). $N > 100$. (C) HeLa-, A549-, MDA-MB-231- und HCT-116-Zellen wurden mit unterschiedlichen Liganden-Konzentrationen oder DMSO behandelt und für 72 h inkubiert, bevor die Zellproliferation mittels MTS-Assay gemessen wurde. Die Absorption bei 490 nm in **L1**-behandelten Zellen wurde auf die Absorption in DMSO-behandelten Zellen des jeweiligen Zelltyps (Kontrolle) normiert. Die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts. Die Daten wurden mittels 1way ANOVA analysiert, gefolgt von einem Tukey's Multiple Comparison-Test. Zwei Sterne (**) entsprechen einem p-Wert kleiner als 0,01. Drei Sterne (***) einem p-Wert kleiner als 0,001.

COMMUNICATION

zugeordnet: Multipolare Pro- / Metaphase, multipolare Ana- / Telophase, zurückbleibende Chromosomen, azentrische Fragmente und Chromatinbrücken (Abb. S23).^[14] Die Experimente zeigten, dass **L1** die Anzahl der mitotischen Defekte in HeLa-Zellen drastisch erhöhte. Während nur 6% der Kontrollzellen mitotische Defekte aufwiesen, erhöhte sich der Anteil in mit Liganden behandelten Zellen auf 32% (Abb. 6A). Darüber hinaus zeigten **L1**-behandelte Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine größere Vielfalt an mitotischen Defekten. Neben azentrischen Fragmenten und zurückbleibenden Chromosomen konnten auch Chromatinbrücken und multipolare Spindeln beobachtet werden (Abb. 6B). Dies bestätigt, dass **L1** mit den mitotischen Funktionen von Survivin interferiert. Wir haben die antiproliferativen Eigenschaften des Liganden quantifiziert, indem wir Zellproliferationsassays in verschiedenen Arten von Krebszellen durchgeführt haben: HeLa-Zellen, bei denen es sich um Gebärmutterhalskrebs-Zellen handelt, A549-Zellen als Modell für Lungenkrebs, MDA-MB-231-Zellen, bei denen es sich um eine Brustkrebs-Zelllinie handelt und HCT-116-Zellen, die als Modell für Darmkrebs dienen. Die für den Assay verwendete Tetrazoliumverbindung [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) wird von lebenden Zellen zu einem farbigen Formazan-Produkt bioreduziert. Die bei 490 nm gemessene Absorption des Formazan-Produkts ist direkt proportional zur Anzahl der lebenden Zellen. Der Assay ergab, dass **L1** die Zellproliferation in allen getesteten Krebszelllinien erfolgreich reduzieren konnte (Abb. 6C). In drei der vier Zelllinien konnte die Proliferation um mehr als 30% verringert werden, was in etwa der gleichen Größenordnung wie bei Survivin-depletierten Zellen entspricht.^[15] Die Hemmung der Zellproliferation erfolgte konzentrationsabhängig wobei die größten Effekte in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 sowie der Darmkrebszelllinie HCT 116 beobachtet werden konnten.

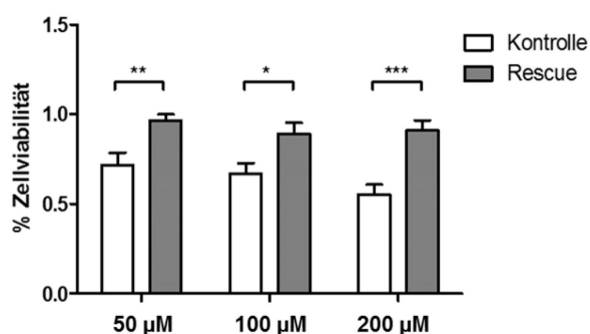


Abb. 7: Die Überexpression von Survivin-HA hebt die antiproliferative Wirkung von **L1** in HCT 116-Zellen auf und bestätigt damit, dass die beobachteten Effekte des Liganden Survivin-spezifisch sind. HCT 116-Zellen wurden transient mit Survivin-HA (*Rescue*) oder GFP (Kontrolle) transfiziert und 72 h mit unterschiedlichen **L1**-Konzentrationen behandelt. Die Zellproliferation wurde mittels MTS-Assay gemessen. Die Experimente wurden als Triplikate durchgeführt. Die Fehlerbalken zeigen den Standardfehler des Mittelwerts. Die Daten wurden mit einem 1way ANOVA analysiert, gefolgt von einem Tukey's Multiple Comparison-Test. Ein Stern (*) entspricht einem p-Wert kleiner als 0,05. Zwei Sterne (**) entsprechen einem p-Wert kleiner als 0,01 und drei Sterne (***) einem p-Wert kleiner als 0,001.

Um zu bestätigen, dass die beobachteten Auswirkungen der **L1**-Behandlung auf die Proliferation von Krebszellen Survivin-spezifisch sind, wurde ein *Rescue*-Experiment durchgeführt, bei dem HCT 116-Zellen transient mit Survivin-HA (*Rescue*) oder mit GFP (Kontrolle) transfiziert wurden. Nach 72-stündiger Behandlung der Zellen mit **L1** wurde die Zellproliferation mittels MTS-Assay gemessen. Wir konnten beobachten, dass eine Überexpression von Survivin-HA die antiproliferative Wirkung von **L1** in allen getesteten Konzentrationen nahezu vollständig aufhob. Während die Zellproliferation in Kontrollzellen auf 72% (50 μM), 67% (100 μM) und 55% (200 μM) verringert wurde, konnte die Zellviabilität in Zellen, die Survivin-HA überexprimierten, auf 97% (50 μM), 89% (100 μM) und 91% (200 μM) wiederhergestellt werden (Abb. 7). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Wirkung von **L1** tatsächlich durch eine spezifische Inhibition von Survivin verursacht wird.

Basierend auf einer fokussierten Bibliothek konnten wir **L1** als vielversprechenden Liganden identifizieren, um die Protein-Protein-Interaktion von Survivin und Histon H3 zu inhibieren. Die Bindung des Liganden an die Histone H3-Bindungsstelle von Survivin, die die Wechselwirkung mit Histone H3 in den frühen Stadien der Mitose vermittelt und für die Zellproliferation von entscheidender Bedeutung ist, konnte mittels NMR-Titration verifiziert werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen den beiden Proteinen in einer zellulären Umgebung erfolgreich verringert wurde. Dies führte zu einer zunehmenden Anzahl von mitotischen Defekten und folglich zu einer Survivin-spezifischen Hemmung der Krebszellproliferation. Weitere Studien konzentrieren sich nun auf die Entwicklung zusätzlicher Liganden, um andere funktionell relevante Protein-Protein-Interaktionen von Survivin zu inhibieren. Darüber hinaus wollen wir Multivalenz nutzen, um **L1** in Bezug auf Spezifität und Affinität weiter zu verbessern und zu optimieren.

Experimenteller Abschnitt

Alle experimentellen Details finden Sie in der *Supporting Information*.

Danksagungen

Diese Arbeit wurde vom Sonderforschungsbereich 1093 (SFB 1093) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert. Mikroskopische Analysen wurden in Zusammenarbeit mit dem Imaging Center Campus Essen (ICCE) durchgeführt.

Interessenskonflikt

Die Autoren deklarieren keinen Interessenkonflikt.

Schlüsselwörter: Supramolekulare Chemie • Molekulare Erkennung • Survivin • PPI-Inhibitor • Krebs • Guanidiniumcarbonylpyrrol • NMR • Konfokale Mikroskopie • Apoptose • Wirkstoffentwicklung • Inhibitoren

COMMUNICATION

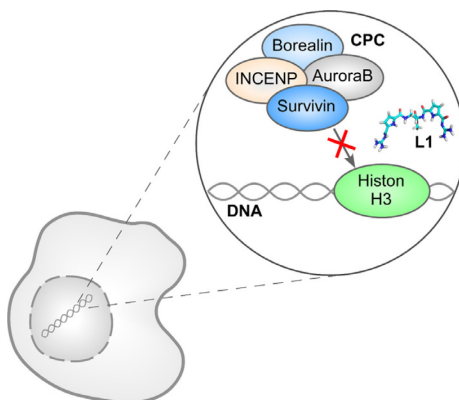
Referenzen

- [1] a) V. Vaira, C. W. Lee, H. L. Goel, S. Bosari, L. R. Languino, D. C. Altieri, *Oncogene* **2007**, *26*, 2678; b) Y. Xu, F. Fang, G. Ludewig, G. Jones, D. Jones, *DNA and cell biology* **2004**, *23*, 527; c) L. Tracey, A. Pérez-Rosado, M. J. Artiga, F. I. Camacho, A. Rodríguez, N. Martínez, E. Ruiz-Ballesteros, M. Mollejo, B. Martínez, M. Cuadros et al., *The Journal of pathology* **2005**, *206*, 123; d) W. H. Hoffman, S. Biade, J. T. Zilfou, J. Chen, M. Murphy, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 3247; e) Y. Jiang, H. I. Saavedra, M. P. Holloway, G. Leone, R. A. Altura, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 40511.
- [2] a) C. Adida, D. Berrebi, M. Peuchmaur, M. Reyes-Mugica, D. C. Altieri, *Lancet (London, England)* **1998**, *351*, 882; b) G. Capalbo, C. Rödel, R. H. Stauber, S. K. Knauer, M. Bache, M. Kappler, F. Rödel, *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Röntgengesellschaft ... [et al]* **2007**, *183*, 593; c) K. Engels, S. K. Knauer, D. Metzler, C. Simf, O. Struschka, C. Bier, W. Mann, A. F. Kovács, R. H. Stauber, *The Journal of pathology* **2007**, *211*, 532; d) C. Xu, M. Yamamoto-Ibusuki, Y. Yamamoto, S. Yamamoto, S. Fujiwara, K. Murakami, Y. Okumura, L. Yamaguchi, Y. Fujiki, H. Iwase, *Breast cancer (Tokyo, Japan)* **2014**, *21*, 482; e) P. Chen, J. Zhu, D.-Y. Liu, H.-Y. Li, N. Xu, M. Hou, *Medical oncology (Northwood, London, England)* **2014**, *31*, 775.
- [3] F. Li, G. Ambrosini, E. Y. Chu, J. Plescia, S. Tognin, P. C. Marchisio, D. C. Altieri, *Nature* **1998**, *396*, 580.
- [4] F. Shojaei, F. Yazdani-Nafchi, M. Banitalebi-Dehkordi, M. Chehelgerdi, M. Khorramian-Ghahfarokhi, *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)* **2018**.
- [5] M. Mobahat, A. Narendran, K. Riabowol, *International journal of molecular sciences* **2014**, *15*, 2494.
- [6] a) H. Hwang, T. Vreven, J. Janin, Z. Weng, *Proteins* **2010**, *78*, 3111; b) J. C. Fuller, N. J. Burgoyne, R. M. Jackson, *Drug discovery today* **2009**, *14*, 155; c) M. R. Arkin, Y. Tang, J. A. Wells, *Chemistry & biology* **2014**, *21*, 1102.
- [7] L.-G. Milroy, T. N. Grossmann, S. Hennig, L. Brunsveld, C. Ottmann, *Chemical reviews* **2014**, *114*, 4695.
- [8] M. W. Peczu, A. D. Hamilton, *Chemical reviews* **2000**, *100*, 2479.
- [9] R. Kubota, I. Hamachi, *Chemical Society reviews* **2015**, *44*, 4454.
- [10] a) D. Bier, R. Rose, K. Bravo-Rodriguez, M. Bartel, J. M. Ramirez-Anguila, S. Dutt, C. Wilch, F.-G. Klärner, E. Sanchez-Garcia, T. Schrader et al., *Nature chemistry* **2013**, *5*, 234; b) P. J. de Vink, J. M. Briels, T. Schrader, L.-G. Milroy, L. Brunsveld, C. Ottmann, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2017**, *56*, 8998; c) H. D. Nguyen, D. T. Dang, J. L. J. van Dongen, L. Brunsveld, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 895; d) Y. Wei, G. L. McLendon, A. D. Hamilton, M. A. Case, C. B. Purring, Q. Lin, H. S. Park, C. S. Lee, T. Yu, *Chemical communications (Cambridge, England)* **2001**, 1580; e) Y. Hamuro, M. C. Calama, H. S. Park, A. D. Hamilton, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1997**, *36*, 2680.
- [11] a) K. A. Schug, W. Lindner, *Chemical reviews* **2005**, *105*, 67; b) P. Blondeau, M. Segura, R. Pérez-Fernández, J. de Mendoza, *Chemical Society reviews* **2007**, *36*, 198.
- [12] a) M. Ehlers, J.-N. Grad, S. Mittal, D. Bier, M. Mertel, L. Ohl, M. Bartel, J. Briels, M. Heimann, C. Ottmann et al., *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2018**, *19*, 591; b) J. Matić, F. Šupljika, T. Tandarić, M. Dukši, P. Piotrowski, R. Vianello, A. Brozovic, I. Piantanida, C. Schmuck, M. R. Stojković, *International journal of biological macromolecules* **2019**, *134*, 422; c) H. Jiang, X.-
- Y. Hu, S. Mosel, S. K. Knauer, C. Hirschhäuser, C. Schmuck, *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2019**, *20*, 1410; d) L. Bartsch, M. Bartel, J. IglesiasFernandez, Y. Ruiz Blanco, C. Beuk, J. Briels, A. Gigante, N. Toetsch, P. Bayer, E. Sanchez-Garcia et al., *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **2019**; e) C. Schmuck, M. Heil, *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **2006**, *12*, 1339; f) J. Hatai, C. Schmuck, *Accounts of chemical research* **2019**, *52*, 1709.
- [13] E. Niedzialkowska, F. Wang, P. J. Porebski, W. Minor, J. M. G. Higgins, P. T. Stukenberg, *Molecular biology of the cell* **2012**, *23*, 1457.
- [14] N. C. Baudoin, D. Cimini, *Chromosoma* **2018**, *127*, 215.
- [15] a) Y. Li, D. Liu, Y. Zhou, Y. Li, J. Xie, R. J. Lee, Y. Cai, L. Teng, *Journal of Cancer* **2015**, *6*, 1187; b) G.-Y. Miao, *WJG* **2007**, *13*, 1170; c) X.-Q. CHEN, S. YANG, Z.-Y. LI, H.-S. LU, M.-Q. KANG, T.-Y. LIN, *Molecular Medicine Reports* **2012**, *5*, 917.

COMMUNICATION

COMMUNICATION

Der supramolekulare Guanidiniumcarbonylpyrroligand **L1** bindet die Histon H3-Bindungsstelle des Proteins Survivin, das in Krebszellen überexprimiert wird. Die Inhibition der Interaktion von Survivin und Histon H3 reduzierte erfolgreich die Proliferation von Krebszellen.



Cecilia Vallet, Dennis Aschmann, Matthias Killa, Annika Meiners, Christine Beuck, Marcel Mertel, Martin Ehlers, Peter Bayer, Carsten Schmuck, Michael Giese and Shirley K. Knauer

Page No. – Page No.

Funktionelle Inhibition der krebisrelevanten Interaktion von Survivin und Histon H3 mit einem Guanidiniumcarbonylpyrrol-Liganden