

### Charakterisierung der Dynamik der Kinase p38 in freiem und ligandgebundenem Zustand durch NMR-Spektroskopie<sup>\*\*</sup>

*Martin Vogtherr, Krishna Saxena, Swen Hoelder, Susanne Grimme, Marco Betz, Ulrich Schieborr, Barbara Pescatore, Michel Robin, Laure Delarbre, Thomas Langer, K. Ulrich Wendt und Harald Schwalbe\**

Das rationale Design von Wirkstoffen erfordert die Definition eines Zielproteins, eines Targets. Statt sich auf einzelne Targetproteine zu beschränken, werden heute oft ganze Familien ähnlicher Proteine parallel untersucht. Ein solcher Ansatz ist effizient, da sich bestimmte Ergebnisse auf die gesamte Proteinfamilie übertragen lassen. Insbesondere Proteinkinasen sind in dieser Hinsicht sehr attraktiv. Proteinkinasen sind an vielen zellulären Prozessen und daraus resultierenden Krankheiten beteiligt. Alle 518 bekannten Proteinkinasen<sup>[1]</sup> haben eine ähnliche Tertiärstruktur und katalysieren eine analoge Reaktion, die Phosphorylierung anderer Proteine. Dennoch weist jede einzelne Kinase spezielle charakteristische Merkmale auf, z.B. strukturelle und dynamische Details oder Protein-Protein-Wechselwirkungsdomänen. Diese Tatsache macht die Entwicklung von pharmakologisch verwendbaren, spezifischen Kinaseinhibitoren möglich.<sup>[2]</sup>

Viele Proteinkinase-Inhibitoren, z.B. Staurosporin, binden an die hochkonservierte ATP-Bindungstasche. Sie hemmen daher eine Vielzahl von Proteinkinasen und sind deshalb von sehr eingeschränktem pharmakologischem Wert. Andere Inhibitoren sind jedoch hochspezifisch, da sie auf charakteristische Eigenschaften einer Kinase abzielen. So bindet Gleevec, ein spezifischer Inhibitor der Abelson-Kinase,<sup>[3,4]</sup> an die hochkonservierte Asp-Phe-Gly-Schleife

[\*] Dr. M. Vogtherr, Dr. K. Saxena, Dr. S. Grimme, Dr. M. Betz, Dr. U. Schieborr, Dr. B. Pescatore, Dr. T. Langer, Prof. Dr. H. Schwalbe  
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt  
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie  
Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz  
Marie-Curie-Straße 11, 60439 Frankfurt am Main (Deutschland)  
Fax: (+49) 69-798-29515  
E-mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de  
Dr. S. Hoelder, Dr. K. U. Wendt  
sanofi-aventis Deutschland GmbH  
65926 Frankfurt am Main (Deutschland)  
Dr. M. Robin, Dr. L. Delarbre  
sanofi-aventis  
Centre de recherche Vitry-sur-Seine  
13, quai Jules, BP14  
94403 Vitry-sur-Seine Cedex (Frankreich)

[\*\*] Diese Arbeit wurde im Rahmen einer Kooperation zwischen sanofi-aventis und dem Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz durchgeführt. Wir danken Matthias Dreyer für kritische Anmerkungen zum Manuscript.

(DFG-Schleife). Im Komplex mit Gleevec nimmt die DFG-Schleife die DFG-out-Konformation an, die sich deutlich von der in Komplexen mit ATP-Analoga und den meisten ATP-kompetitiven Bindern gefundenen DFG-in-Konformation unterscheidet. Der mit der Bindung einhergehende Übergang von DFG-in zu DFG-out öffnet eine hydrophobe Tasche zwischen dem N- und C-terminalen Teil. Nur Kinasen, die die DFG-out-Konformation annehmen können, können Wechselwirkungen in dieser Tasche ausbilden. Die Selektivität wird somit durch eine für diesen Liganden spezifische Selektion einer der Konformationen vermittelt.

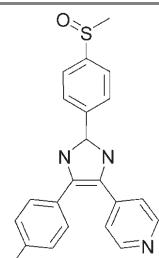
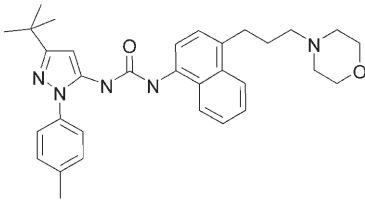
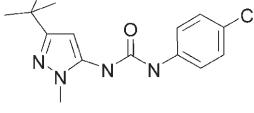
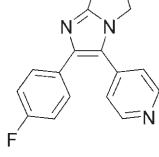
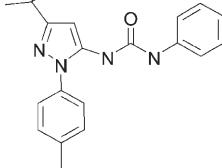
Dieser Ansatz der Untersuchung von Targetfamilien ließ sich auf andere Mitglieder der Kinasefamilie übertragen, sodass weitere Beispiele für DFG-out-Liganden bekannt sind, z. B. Raf,<sup>[5]</sup> p38<sup>[6–8]</sup> und KDR.<sup>[9]</sup> Die Klassifizierung eines Inhibitors als DFG-in oder DFG-out erfordert dabei einigen experimentellen Aufwand, meist in Form von kinetischen oder Strukturstudien. Zudem basiert das Wissen um das Gleichgewicht zwischen DFG-in und DFG-out hauptsächlich auf statischen Kristallstrukturen von freiem oder ligandge-

bundenem Protein. NMR-Messungen können dieses Bild ergänzen und ein grundlegendes Verständnis des Gleichgewichts in Lösung vermitteln.

Wir haben kürzlich die MAP-Kinase p38 NMR-spektroskopisch charakterisiert<sup>[10]</sup> und nutzen diese als Modell zur Untersuchung des DFG-in/DFG-out-Gleichgewichts. p38 ist an der Regulation entzündlicher Cytokine beteiligt,<sup>[11,12]</sup> und ihre Inhibitoren können entzündungshemmende Wirkung haben. Manche dieser Inhibitoren sind strukturell und bio-physikalisch gut charakterisiert (Tabelle 1).<sup>[13–15]</sup> Die p38-Inhibitoren **1** und **4** binden an die DFG-in-Konformation,<sup>[16]</sup> die auch für apo-p38 beobachtet wird.<sup>[17]</sup> Hingegen binden die p38-Inhibitoren **2** und **3** der Diarylharnstoff-Klasse an die DFG-out-Konformation.<sup>[6]</sup> Im Komplex p38·**2** verschiebt sich Phe169 (p38-Nummerierung) um 10 Å von der in apo-p38 gefundenen Position.

Die NMR-spektroskopische Zuordnung von p38<sup>[10]</sup> ist unvollständig. In Spektren vollständig <sup>15</sup>N-markierter p38 wurden Signale für 254 (75 %) von 337 erwarteten Amidgruppen gefunden, davon konnten 216 (85 %) zugeordnet

**Tabelle 1:** Chemische Strukturen, Wechselwirkungsweisen und biophysikalische Daten ausgewählter p38-Inhibitoren.<sup>[a]</sup>

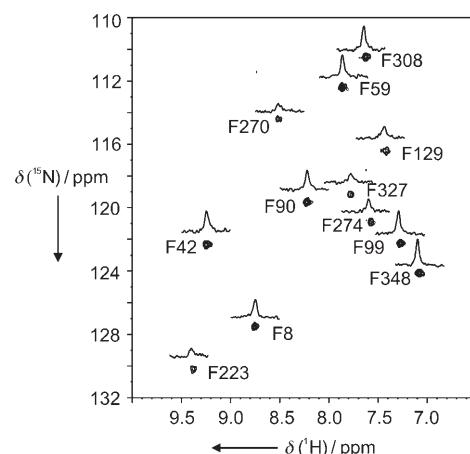
Struktur	$K_D$ [nM]	$k_{on}$ [ $M^{-1} s^{-1}$ ]	$k_{off}$ [ $s^{-1}$ ]	$\Delta H$ [ $kJ mol^{-1}$ ]	$-\Delta S$ [ $J mol^{-1} K^{-1}$ ]	PDB <sup>[b]</sup>	Modus
	11.5	$1.5 \times 10^7$	$1.8 \times 10^{-1}$	-47.3	9.2	1a9u	DFG-in
	0.1	$8.4 \times 10^4$	$8.3 \times 10^{-6}$	-52.7	-35	1kv2	DFG-out
	1160	$1.2 \times 10^5$	$1.4 \times 10^{-1}$	-23.4	-14.5	1kv2	DFG-out
	86.5	$4.3 \times 10^7$	$7.7 \times 10^{-1}$	-55.6	53.5		DFG-in
	21	$7.3 \times 10^4$	$1.6 \times 10^{-3}$	-48.5	15.9		DFG-out

[a] Werte für Verbindungen **2** und **3** und **5** bei 296 K stammen aus Lit. [7,13] ( $K_D$ ,  $k_{on}$ ,  $k_{off}$ ) und Lit. [15] ( $\Delta H$ );  $\Delta S$  wurde mit gängigen thermodynamischen Beziehungen berechnet. Alle Werte für Verbindungen **1** und **4** stammen aus Lit. [7,14]. [b] Kennziffer in der Protein Data Bank.

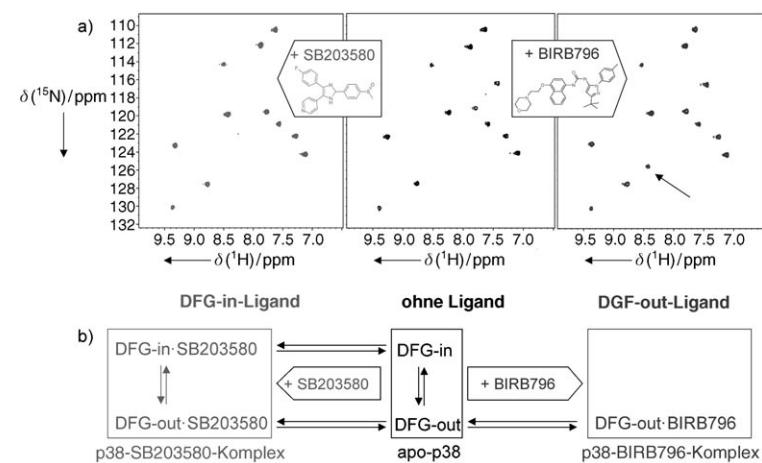
werden. Weder die Überlappung von Signalen noch unvollständige Amidprotonierung<sup>[18]</sup> können der Grund sein, da ein ähnlicher Anteil von Signalen auch in selektiv <sup>15</sup>N-markiertem Protein fehlt. Das Fehlen von 25% der erwarteten Signale hat grundlegendere Ursachen. Die Zuordnung ist fast vollständig (79%) für die N-terminale Domäne der Kinase außer der C-Helix. Im C-terminalen Teil sind das DFG-Motiv (Asp168-Phe169-Gly170), die anschließende Aktivierungsschleife (Leu171-Glu178) und große Teile der Subdomänen VIII und X nicht zugeordnet. Bezeichnenderweise fehlen die entsprechenden Sequenzen ebenfalls in unserer Zuordnung der Proteinkinase A (PKA).<sup>[19]</sup> C-Helix und Aktivierungsschleife sind an Bewegungen im Rahmen von Aktivierung und Katalyse der Kinasen beteiligt.<sup>[20]</sup> Solche Bewegungen können das Verschwinden von NMR-Signalen erklären, da sie zu Linienverbreiterungen durch Austausch führen. Austauschprozesse können durch NMR-Spektroskopie leicht nachgewiesen werden; man klassifiziert sie in schnell (ein durchschnittliches Signal), langsam (ein Signal für jede Konformation) oder intermediär (Signal ist stark verbreitert oder verschwunden). Lassen sich experimentelle Gründe ausschließen, so weist das Verschwinden eines NMR-Signals unterhalb des Detektionslimits auf einen konformativen Austauschprozess in der intermediären Zeitskala hin, der zu starker Linienverbreiterung führt.

Die NMR-Signale der DFG-Schleife (Asp168-Phe169-Gly170) wurden nicht zugeordnet. Selektiv <sup>15</sup>N-Phe markierte p38 wurde zur Untersuchung der DFG-Schleife verwendet. p38 enthält 13 Phenylalaninreste, von denen 12 im <sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N-TROSY-Spektrum gefunden und eindeutig zugeordnet wurden (Abbildung 1). Das nicht zu beobachtende Signal gehört zu Phe169 in der DFG-Schleife. Dies wurde durch das Spektrum der selektiv <sup>15</sup>N-Phe markierten Mutante Phe169Tyr bestätigt, die ein identisches TROSY-Spektrum mit 12 Signalen ergab. Andere Feldstärken (400–900 MHz Protonenresonanzfrequenz), Temperaturen innerhalb des experimentell Möglichen (5–35 °C) und empfindlichere Aufnahmebedingungen (0.5 mm Protein, 12 h Messzeit auf einem 900-MHz-Spektrometer mit Kryosondentechnik) führten zum gleichen Ergebnis. Das Fehlen des Amidsignals von Phe169 in der DFG-Schleife unter allen getesteten Bedingungen lässt auf ein Konformationsgleichgewicht in der intermediären Zeitskala für diese Region der Kinase schließen.

Es ist gezeigt worden, dass Diarylharnstoffverbindungen wie **2** an die DFG-out-Konformation von p38 binden. Die Bindung solcher Substanzen an p38 ist nicht mit der DFG-in-Konformation kompatibel<sup>[6]</sup> und muss daher konformative Austauschprozesse der DFG-Schleife beeinflussen. Bei einem hinreichend starken Effekt wird erwartet, dass die Umwandlung DFG-in $\rightleftharpoons$ DFG-out vollständig unterdrückt wird, sodass die Austauschlinienverbreiterung verschwindet und ein messbares Phe169-Signal auftritt. Dies wird bei dem in Gegenwart von **2** erhaltenen NMR-Spektrum (Abbildung 2a) tatsächlich gefunden. Alle 13 aus der Primärstruktur



**Abbildung 1.** TROSY-Spektrum von selektiv <sup>15</sup>N-Phe markierter p38. Die Signale sind wie angegeben zugeordnet, und eindimensionale Querschnitte der einzelnen Signale sind dargestellt. Das zu Phe169 gehörende Signal fehlt.



**Abbildung 2.** a) Effekt von p38-Inhibitoren auf das TROSY-Spektrum von selektiv <sup>15</sup>N-Phe markierter p38. Der DFG-out-Inhibitor BIRB796 (**2**) führt zu einem zusätzlichen, mit einem Pfeil gekennzeichneten Signal, das zu Phe169 im DFG-Motiv gehört. Der „DFG-in“-Binder SB203580 (**1**) erzeugt Änderungen der chemischen Verschiebung, jedoch kein zusätzliches Signal. b) Kinetisches Schema für den konformativen Austausch des DFG-Motivs in p38. Im Apoprotein befinden sich DFG-in und DFG-out in einem langsamen (kHz) konformativen Austausch. Ligand **2** bindet an die DFG-out-Konformation und friert das Konformationsgleichgewicht in einem definierten Zustand ein. Liganden wie **1** beeinflussen das DFG-Gleichgewicht nicht.

erwarteten Signale sind sichtbar. Da Asp168-Phe169 das einzige Asp-Phe-Paar in der p38-Sequenz ist, ließ sich die Identität des zusätzlichen Signals durch ein HNCO-Experiment an einer Probe mit doppelt selektiv <sup>13</sup>C'-markiertem Asp und <sup>15</sup>N-markiertem Phe belegen. Das Auftauchen des Phe169-Signals ist somit eine Bestätigung dafür, dass im inhibierten DFG-out-Zustand des Proteins keine Austauschprozesse und die dadurch hervorgerufenen Linienverbreiterungen mehr auftreten.

Ähnliche Ergebnisse wurden für andere Diarylharnstoffverbindungen wie **3** erhalten (Tabelle 1). Diese Befunde deuten auf ein langsames DFG-in $\rightleftharpoons$ DFG-out-Gleichgewicht

hin, das zum Verschwinden des Phe169-Signals in den Spektren von apo-p38 führt, während DFG-out-Inhibitoren wie **2** und **3** den konformativen Austausch zwischen den Konformeren offenbar unterdrücken, sodass im 2D-NMR-Spektrum das Phe169-Signal auftaucht. Unsere Ergebnisse sind konsistent mit dem in Abbildung 2b dargestellten kinetischen Schema.

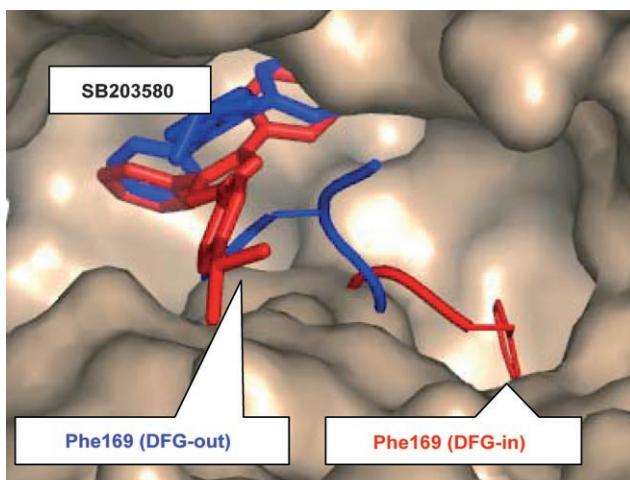
Im Unterschied zu den Diarylharnstoffverbindungen wurden die meisten anderen p38-Binder als DFG-in-Binder beschrieben. Verfügbare Kristallstrukturen solcher Substanzen im Komplex mit p38<sup>[16]</sup> zeigen das Protein in der DFG-in-Konformation, die man auch in der Kristallstruktur von apo-p38 findet.<sup>[17]</sup> SB203580 (**1**) als DFG-in-Ligand von p38 führt zu keinen zusätzlichen Signalen im TROSY-Spektrum von <sup>15</sup>N-Phe-p38 (Abbildung 2a), und dies gilt auch für andere DFG-in-Binder wie SKF86002 (**4**). Offensichtlich wird das Gleichgewicht zwischen den DFG-Zuständen, das das Verschwinden des Phe169-Signals bedingt, durch diese Liganden nicht gestört. Wir schlagen daher vor, die als „DFG-in“-Binder bekannten Verbindungen als Liganden zu betrachten, bei denen die Konformation der DFG-Schleife für die Bindung keine Rolle spielt (Abbildung 2b). Dieser Vorschlag stimmt mit Ergebnissen zum Wirkmechanismus überein, wonach DFG-in-Liganden keinen Einfluss auf die Aktivierung von p38 haben,<sup>[21]</sup> während DFG-out-Inhibitoren sowohl Aktivität als auch Aktivierung blockieren.<sup>[22]</sup>

Das dynamische Bild, das sich aus den NMR-Ergebnissen ergibt, wird durch die Kristallstruktur von **1** im Komplex mit p38 gestützt (Abbildung 3). Wir beobachten beide Konformationen des DFG-Motivs (DFG-in und DFG-out) im Protein mit relativen Anteilen von etwa 50%. Außerdem beobachten wir gut unterscheidbare Bindungspositionen des In-

hibitors **1** (50 % Besetzung) für beide DFG-Konformationen. In beiden Positionen bleiben polare Wechselwirkungen zwischen dem Inhibitor und der Hinge-Region erhalten. Die Beobachtung zweier definierter DFG-Zustände ist mit dem nicht zu beobachtenden NMR-Signal von Phe169 in Einklang. Sie zeigt auch, dass die Bindung von DFG-in-Liganden mit der DFG-out-Konformation der DFG-Schleife kompatibel ist; dies wurde bereits zur Entwicklung kombinierter DFG-in- und DFG-out-Liganden genutzt.<sup>[23]</sup>

Schon früher wurde indirekt auf ein langsames DFG-in↔DFG-out-Gleichgewicht geschlossen, da sich die Assoziationsgeschwindigkeit für DFG-in- und DFG-out-Liganden deutlich unterscheidet. Während DFG-in-Inhibitoren praktisch diffusionskontrolliert an das Protein binden (Tabelle 1), assoziieren DFG-out-Inhibitoren ähnlicher Größe zwei Größenordnungen langsamer.<sup>[6,13]</sup> Diese Daten sind als Indiz für ein langsames Gleichgewicht zwischen DFG-in- und DFG-out-Konformationen in apo-p38, bei dem sich nur ein kleiner Teil des Proteins in der DFG-out-Konformation befindet, gewertet worden.<sup>[6,7]</sup> Unsere Ergebnisse sind ein deutlicher Hinweis auf einen konformativen Austausch des DFG-Motivs in apo-p38 im intermediären Bereich der NMR-Zeitskala zwischen stark unterschiedlichen Konformationen. Diarylharnstoff-Inhibitoren unterdrücken den konformativen Austausch und frieren die Bewegung in der DFG-out-Konformation ein. Hingegen werden diese Bewegungen in weit aus geringerem Maße durch die bislang als DFG-in-Binder aufgefassten Liganden beeinflusst. Etwa vorhandene Einschränkungen der Beweglichkeit müssen vergleichsweise klein sein, da sie die dynamischen NMR-Eigenschaften des Proteins im Vergleich zum Apoprotein nicht verändern.

Da ein DFG-out-Ligand das Gleichgewicht zwischen den Konformeren unterdrückt, gehen Freiheitsgrade der inneren Bewegung verloren, was sich in einer negativen Bindungsentropie niederschlagen sollte. Thermodynamische Daten<sup>[14,15]</sup> (Tabelle 1) zeigen jedoch keinen einheitlichen Trend für DFG-in- im Vergleich zu DFG-out-Inhibitoren. Daher scheinen thermodynamische Daten nicht zur Identifizierung eines DFG-out-Bindungsmodus geeignet. Dagegen erweisen sich NMR-Messungen an selektiv markierter p38 als geeignete Methode zur schnellen und eindeutigen Klassifizierung eines Liganden als DFG-in- oder als DFG-out-Binder. Eine solche Klassifizierung würde normalerweise eine aufwändige Cokristallisation (falls möglich) oder eine detaillierte kinetische Analyse des Bindungsprozesses erfordern. Dieser Ansatz ist somit zur schnellen Charakterisierung neuer Strukturen aus dem Screening auf ihren Bindungsmodus mit p38 (DFG-in kontra DFG-out) geeignet.



**Abbildung 3.** Kristallstruktur von p38 im Komplex mit dem Inhibitor **2** (2.1 Å Auflösung,  $R_{\text{factor}} = 0.241$ ,  $R_{\text{free}} = 0.279$ ). Die Abbildung zeigt die molekulare Oberfläche von p38 mit dem Rückgrat des DFG-Motivs in Rot (DFG-in-Konformation) oder Blau (DFG-out-Konformation). Phe169 und **2** sind in Stabdarstellung dargestellt und rot (DFG-in) bzw. blau (DFG-out) eingefärbt. Bei der DFG-in-Form befindet sich die Seitenkette von Phe169 in einer hydrophoben Tasche, während sie bei der DFG-out-Form nach außen zeigt. Wir beobachten jeweils etwa 50% Besetzung für die DFG-in- und die DFG-out-Konformation in der Mitte über die Konformationszustände des Kristalls.

## Experimentelles

Proteinproduktion: Murines p38 $\alpha$  (2-349) wurde in einen modifizierten pET16b-Vektor mit N-terminalem His-Tag und einer Schnittstelle für TEV-Protease kloniert. Das resultierende Plasmid pETp38 wurde als Templat für die gerichtete Mutagenese von p38 F169Y verwendet. Rekombinantes p38 wurde in *E. coli* BL21 (DE3) mit dem Expressionsplasmid pETp38 überexprimiert und nach Lit. [19] gereinigt. Bakterienkulturen wurden bis zu  $\text{OD}_{600} = 0.6$  herangezogen und nach Zusatz von IPTG (Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalacto-

pyranosid) bei 30 °C 4 h inkubiert. <sup>15</sup>N-Markierung der Aminosäuren wie beschrieben.<sup>[19]</sup>

**NMR-Spektroskopie:** Die NMR-Spektren wurden bei 800 MHz Protonenresonanzfrequenz auf einem DRX800-Spektrometer (Bruker) aufgenommen. Bedingungen: 0.2–0.7 mM Protein, 150 mM NaCl, 50 mM HEPES-Puffer pH 6.8, 5 mM DTT (Dithiothreitol) in H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O (9:1), Messtemperatur 298 K. Die Liganden **1** und **4** (Sigma) sowie **2**, **3** und **5** (Synthese nach Lit. [7]) wurden als 50–100 mM Stammlösung in DMSO zugegeben (Endkonzentration 0.2–1 mM).

**Kristallographie:** Kristalle des p38-**1**-Komplexes wurden mit der Methode des hängenden Tropfens bei 4 °C erhalten. Die Proteinlösung (5 mg mL<sup>-1</sup> Protein, 1 mM **1**, 1 mM TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphan-hydrochlorid), 50 mM NaCl, 5 mM TRIS-Puffer pH 7.0) wurde mit dem gleichen Volumen der Fällungslösung (7% v/v MPD (2-Methyl-2,4-pentandiol) und 50 mM MES-Puffer pH 6.0) versetzt. Die Kristalle wurden in einer Lösung mit 1 mM **1**, 30% v/v MPD, 50 mM MES-Puffer (pH 6.0) getränkt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Kristallographische Daten wurden bei 100 K mit einem CCD-Detektor (ADSC Q4) an der European Synchrotron Radiation Facility (Grenoble, Frankreich) erhalten. Die Struktur wurde mit Standardsoftware gelöst (Tabelle 2).<sup>[24]</sup> Die Proteinkris-

**Tabelle 2:** Röntgenbeugungsdaten und Strukturverfeinerung des p38-**1**-Komplexes.<sup>[a]</sup>

	p38- <b>1</b>
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Auflösung [Å]	2.1
Vollständigkeit [%]	99.5 (99.3)
Redundanz	4.8 (4.9)
$\langle I \rangle / \langle I \rangle$	8.2 (2.0)
$R_{\text{merge}}$ [%]	5.3 (34.8)
B-Faktor nach Wilson [Å <sup>2</sup> ]	41.3
Verfeinerung	
Auflösungsbereich [Å]	50–2.1
Zahl der Reflexe	23123
$R_{\text{free}}/R$ [%]	27.9/24.1
RMSD (Bindungen/Winkel) [Å/°]	0.0060/1.11
durchschnittlicher B-Faktor [Å <sup>2</sup> ]	46.4

[a] Zahlen in Klammern beziehen sich auf den Bereich höchster Auflösung (highest resolution shell).

tallstrukturen sind unter der Kennziffer 2EWA in der Protein Data Bank abgelegt.

Eingegangen am 5. August 2005,  
veränderte Fassung am 15. Oktober 2005  
Online veröffentlicht am 22. Dezember 2005

**Stichwörter:** Enzyminhibitoren · NMR-Spektroskopie · Proteinkinasen · Wirkstoff-Design

- [1] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, *Science* **2002**, 298, 1912.
- [2] M. E. M. Noble, J. Endicott, L. K. Johnson, *Science* **2004**, 303, 1800.
- [3] T. Schindler, W. Bornmann, P. Pellicena, W. T. Miller, B. Clarkson, J. Kuriyan, *Science* **2000**, 289, 1938.

- [4] B. Nagar, W. G. Bornmann, P. Pellicena, T. Schindler, D. R. Veach, W. T. Miller, B. Clarkson, J. Kuriyan, *Cancer Res.* **2002**, 62, 4236.
- [5] P. T. Wan, M. J. Garnett, S. M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V. M. Good, C. M. Jones, C. J. Marshall, C. J. Springer, D. Barford, *Cell* **2004**, 116, 855.
- [6] C. Pargellis, L. Tong, L. Churchill, P. F. Cirillo, T. Gilmore, A. G. Graham, P. M. Grob, E. R. Hickey, N. Moss, S. Pav, J. Regan, *Nat. Struct. Biol.* **2002**, 9, 268.
- [7] J. Regan, S. Breitfelder, P. Cirillo, T. Gilmore, A. G. Graham, E. Hickey, B. Klaus, J. Madwed, M. Moriak, N. Moss, C. Pargellis, S. Pav, A. Proto, A. Swinamer, L. Tong, C. Torcellini, *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2994.
- [8] J. Branger, B. van den Blink, S. Weijer, J. Madwed, C. L. Bos, A. Gupta, C. L. Yong, S. H. Polmar, D. P. Olszyna, C. E. Hack, S. J. H. van Deventer, M. P. Peppelenbosch, T. van der Poll, *J. Immunol.* **2002**, 168, 4070.
- [9] P. W. Manley, G. Bold, J. Bruggen, G. Fendrich, P. Furet, J. Mestan, C. Schnell, B. Stolz, T. Meyer, B. Meyhak, W. Stark, A. Strauss, J. Wood, *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, 1697, 17.
- [10] M. Vogtherr, K. Saxena, S. Grimmel, M. Betz, U. Schieborr, B. Pescatore, T. Langer, H. Schwalbe, *J. Biomol. NMR* **2005**, 32, 175.
- [11] K. A. Gallo, G. L. Johnson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3, 663.
- [12] S. Kumar, J. Boehm, J. C. Lee, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, 2, 717.
- [13] J. Regan, C. A. Pargellis, P. F. Cirillo, T. Gilmore, E. R. Hickey, G. W. Peet, A. Proto, A. Swinamer, N. Moss, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, 13, 3101.
- [14] D. Casper, M. Bukhtiyarova, E. B. Springman, *Anal. Biochem.* **2004**, 325, 126.
- [15] R. R. Kroe, J. Regan, A. Proto, G. W. Peet, T. Roy, L. D. Landro, N. G. Fuschetto, C. A. Pargellis, R. H. Ingraham, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4669.
- [16] Z. Wang, B. J. Canagarajah, J. C. Boehm, S. Kassisa, M. H. Cobb, P. R. Young, S. Abdel-Meguid, J. L. Adams, E. J. Goldsmith, *Structure* **1998**, 6, 1117.
- [17] a) K. P. Wilson, M. J. Fitzgibbon, P. R. Caron, J. P. Griffith, W. Chen, P. G. McCaffrey, S. P. Chambers, M. S. Su, *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 27696; b) Z. Wang, P. C. Harkins, R. J. Ulevitch, J. Han, M. H. Cobb, E. J. Goldsmith, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, 94, 2327.
- [18] F. Löhr, V. Katsemi, J. Hartleib, U. Günther, H. Rüterjans, *J. Biomol. NMR* **2003**, 25, 291.
- [19] T. Langer, M. Vogtherr, B. Elshorst, M. Betz, U. Schieborr, K. Saxena, H. Schwalbe, *ChemBioChem* **2004**, 5, 1508.
- [20] D. A. Johnson, P. Akamine, E. Radzio-Andzelm, Madhusudan, S. S. Taylor, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2243.
- [21] S. Kumar, M. S. Jiang, J. L. Adams, J. C. Lee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1999**, 263, 825.
- [22] Y. Kuma, G. Sabio, J. Bain, N. Shapiro, R. Márquez, A. Cuenda, *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 19472–19479.
- [23] A. L. Gill, M. Frederickson, A. Cleasby, S. J. Woodhead, M. G. Carr, A. J. Woodhead, M. T. Walker, M. S. Congreve, L. A. Devine, D. Tisi, M. O'Reilly, L. C. A. Seavers, D. J. Davis, J. Curry, R. Anthony, A. Padova, C. W. Murray, R. A. E. Carr, H. Jhoti, *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 414.
- [24] a) Collaborative Computing Project Number 4, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1994**, 50, 760; b) A. T. Brünger, P. D. Adams, G. M. Clore, W. L. DeLano, P. Gros, R. W. Grosse-Kunstleve, J. S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N. S. Pannu, R. J. Read, L. M. Rice, T. Simonson, G. L. Warren, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1998**, 54, 905; c) A. Jones, M. Kjeldgaard, *Methods Enzymol.* **1997**, 277, 173.