

Metall-Bis(2-picollyl)amin-Komplexe als Zustand-1(T)-Inhibitoren für aktiviertes Ras-Protein**

Ina C. Rosnizeck, Michael Spoerner, Tobias Harsch, Sandra Kreitner, Daniel Filchtinski, Christian Herrmann, Daniel Engel, Burkhard König und Hans Robert Kalbitzer*

Das Guaninnukleotid-bindende (GNB-)Protein Ras kontrolliert als eine zentrale Komponente im zellulären Signalleitungsnetzwerk Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen. Es wechselt zwischen einer inaktiven GDP gebundenen und einer aktiven GTP gebundenen Form und agiert damit als molekularer Schalter, der durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) reguliert wird (siehe z. B. Lit. [1]). Im Komplex mit GTP wechselwirkt Ras mit hoher Affinität mit Effektoren wie Raf-Kinase, RalGDS oder PI3-Kinase, die das ankommende, aktivierende Signal an nachgeschaltete Zielmoleküle weiterleiten.^[2] Mit ³¹P-NMR-Spektroskopie können zwei Konformationszustände in Ras identifiziert werden, wenn es Nukleosidtriphosphate (T) gebunden hat. Diese wurden als Zustand 1(T) und 2(T) bezeichnet.^[3] Die beiden Zustände wurden zunächst über spektroskopische Eigenschaften definiert: Im Zustand 1(T) sind die ³¹P-NMR-Resonanzlinien der α - und γ -Phosphatgruppe relativ zu den Resonanzlinien für den Zustand 2(T) tieffeldverschoben.^[4] Die beiden Zustände befinden im dynamischen Gleichgewicht miteinander, mit Austauschraten von 10^3 s^{-1} bei Raumtemperatur. Ras im Zustand 1(T) weist eine um mehr als zwei Größenordnungen geringere Affinität für Effektorproteine auf als Ras im Zustand 2(T).^[4,5] Bei 283 K betragen die Dissoziationskonstanten K_D für Raf-RBD von Ras im Zustand 1(T) und 2(T) 7 bzw. 0.012 μM .^[4b] Im Unterschied zu

den Effektoren bindet der Guaninnukleotid-Austauschfaktor Sos mit seiner katalytischen Bindungsstelle vorzugsweise an Ras im Zustand 1(T).^[6] Der Zustand 2(T) wird dagegen stabilisiert, wenn Ras im Komplex mit den Ras-Bindedomänen (RBD) von seinen Effektoren wie der Raf-Kinase, RalGDS, AF-6 oder Byr2 vorliegt,^[3,7] und wird deshalb als Effektorbindender Zustand bezeichnet. Der Wildtyp (wt) von H-Ras(1–166) im Komplex mit dem natürlichen Liganden GTP weist eine Gleichgewichtskonstante K_{12} zwischen den beiden Zuständen 1(T) und 2(T) von 11.3 auf.^[8] So genannte Partial-Loss-of-Function-Mutanten wie Ras(T35A) oder Ras(T35S) können im Komplex mit Triphosphatnukleosiden unter physiologischen Konzentrationen nur einen Teil der bekannten Effektoren binden. Sie liegen überwiegend im schwach Effektor-bindenden Konformationszustand 1(T) vor.^[4b] In der Krebsforschung ist das Ras-Protein ein wichtiges Zielmolekül, da es in rund 30 % aller menschlichen Tumorerkrankungen in entscheidender Weise involviert ist.^[9] Onkogenes Ras kann weder durch seine intrinsische GTPase-Aktivität noch durch GAP ausgeschaltet werden und trägt dadurch zur unkontrollierten Zellproliferation und damit zur Tumorentwicklung bei.

Derzeit werden große Anstrengungen unternommen, die Ras-vermittelte Signalleitung durch niedermolekulare Verbindungen zu unterbrechen, die direkt mit Ras wechselwirken sollen. Hierzu werden unterschiedliche Strategien verfolgt: 1) die Verhinderung der Ras-Aktivierung durch die Inhibierung des Nuklotidaustauschs^[10] oder 2) die Wiederherstellung der GTPase-Aktivität bei onkogenen Ras-Mutanten, was die Inaktivierung von Ras zur Folge hätte.^[11] Für letzteren Ansatz konnten bisher jedoch keine derart wirksamen Moleküle gefunden werden. 3) Eine weitere Strategie ist die Inhibierung der Wechselwirkung zwischen Ras und den Effektoren durch niedermolekulare Verbindungen^[12] oder Peptide.^[13] Für diesen Ansatz bietet die selektive Stabilisierung des nur schwach Effektor-bindenden Zustands 1(T) durch niedermolekulare Verbindungen eine vielversprechende neuartige Strategie zur Inhibierung der Signalleitung von onkogenem Ras.^[14] In der Tat erkennen M^{2+} -Cyclene und deren Peptidkonjugate selektiv den Konformationszustand 1(T).^[15] Dieser kleine Ligand wechselwirkt dabei direkt mit dem γ -Phosphat des gebundenen Nukleotids.^[16]

Liganden, die an das γ -Phosphat des Nukleotids in der Nukleotid-Bindetasche binden, sind von Natur aus Kandidaten zur Stabilisierung des Zustands 1(T). Da der allgemeine Wirkmechanismus grundsätzlich jedoch auf einem allosterischen Mechanismus beruht, muss sich die Liganden-Wechselwirkungsstelle nicht notwendigerweise in der Bin-

[*] Dr. I. C. Rosnizeck,^[+] Priv.-Doz. Dr. M. Spoerner,^[+] T. Harsch, Dr. S. Kreitner, Prof. Dr. Dr. H. R. Kalbitzer
Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie
Universität Regensburg
Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg (Deutschland)
E-Mail: hans-robert.kalbitzer@biologie.uni-regensburg.de
Dr. D. Filchtinski, Prof. Dr. C. Herrmann
Institut für Physikalische Chemie
Ruhr-Universität Bochum (Deutschland)
Dr. D. Engel, Prof. Dr. B. König
Institut für Organische Chemie
Universität Regensburg (Deutschland)

[+] I. C. Rosnizeck und M. Spoerner trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

[**] Diese Arbeit wurde von der DFG, dem FCI und der Volkswagenstiftung finanziell unterstützt. Ein besonderer Dank gilt Dr. Georg Discherl und Dr. Florian Schmidt für die Herstellung der M^{2+} -BPA-Komplexe.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Proteinreinigung, NMR- und fluoreszenzspektroskopische Experimente, Auswertung, durch die Ligandenbindung induzierte Änderungen der chemischen Verschiebungen und paramagnetische Relaxationsbeschleunigung, Strukturrechnung) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201204148> zu finden.

dungsstelle des Nukleotids oder innerhalb der Effektor-Wechselwirkungsfläche befinden. Wir beschreiben hier eine alternative Klasse von Zustand-1(T)-stabilisierenden Molekülen, die mit Ras·Mg²⁺·GTP außerhalb der Nukleotid-Bindungsstelle wechselwirken. Die Ausgangsverbindungen sind Metall(II)-bis(2-picoly)amine (M²⁺-BPA;^[17] Abbildung 1a), die das Gleichgewicht zwischen Zustand 1(T) und 2(T) in gewünschter Weise beeinflussen.^[18]

Zustand-1(T)-Inhibitoren können auf einfache Weise detektiert werden, indem die ³¹P-NMR-Signale analysiert werden, die Ras·Mg²⁺·GppNHp (GppNHp = Guanosin-5'-(β,γ -imino)triphosphat) im Zustand 1(T) oder 2(T) repräsentieren. Die Integrale der Signale sind dabei proportional zur Population von Ras im entsprechenden Zustand. Bei Ras(wt) werden je zwei Sätze von Resonanzlinien für das α - und γ -Phosphat detektiert, wenn das Protein mit dem GTP-Analogon GppNHp komplexiert ist.^[3,5a] In Gegenwart von Zn²⁺-BPA nehmen die Integrale der Resonanzlinien des α - und γ -Phosphats des Ras(wt) zu, die charakteristisch für den Konformationszustand 1(T) sind, während diejenigen abnehmen, die dem Zustand 2(T) entsprechen (Abbildung 1b). Die ³¹P-chemischen Verschiebungen des Protein-gebundenen Nukleotids ändern sich nur leicht, wenn Zn²⁺-BPA gebunden wird. Dagegen führt die Wechselwirkung von Zn²⁺-BPA mit freiem Mg²⁺·GppNHp zu großen Änderungen der chemischen Verschiebungen. Bei der gleichen Ligandenkonzentration zeigen die Resonanzlinien des α - und β -Phosphats eine Verschiebungänderung zu höherem Feld von mehr als einem ppm, und die Resonanzlinie des γ -Phosphats erfährt eine Änderung der chemischen Verschiebung von $\delta = 0.8$ ppm zu tieferem Feld (Tabelle S1 der Hintergrundinformationen (SI)). Diese Verschiebungänderungen beruhen in erster Linie auf der direkten Wechselwirkung zwischen dem Zn²⁺-Ion und den Phosphatgruppen. Da Effekte ähnlicher Größenordnung auch zu erwarten wären, wenn das Protein-gebundene Nukleotid direkt mit Zn²⁺-BPA wechselwirken würde, ist das Metall-Ion im Proteinkomplex aller Wahrscheinlichkeit nach nicht direkt an eines der Phosphate gebunden. Eine zusätzliche Auswirkung der Zn²⁺-BPA-Bindung ist, dass bei einer Zn²⁺-BPA-Konzentration von 6 mM Signale von freiem Mg²⁺·GppNHp im Komplex mit Zn²⁺-BPA (Tabelle S1 (SI)) im Spektrum sichtbar werden (Abbildung 1b) und gleichzeitig Nukleotid-freies Ras ausfällt (analysiert durch SDS-PAGE). Bei der höchsten Zn²⁺-BPA-Konzentration, die hier zugegeben wurde (10 mM), waren etwa 50% des gesamten Nukleotids in der Probe freigesetzt.

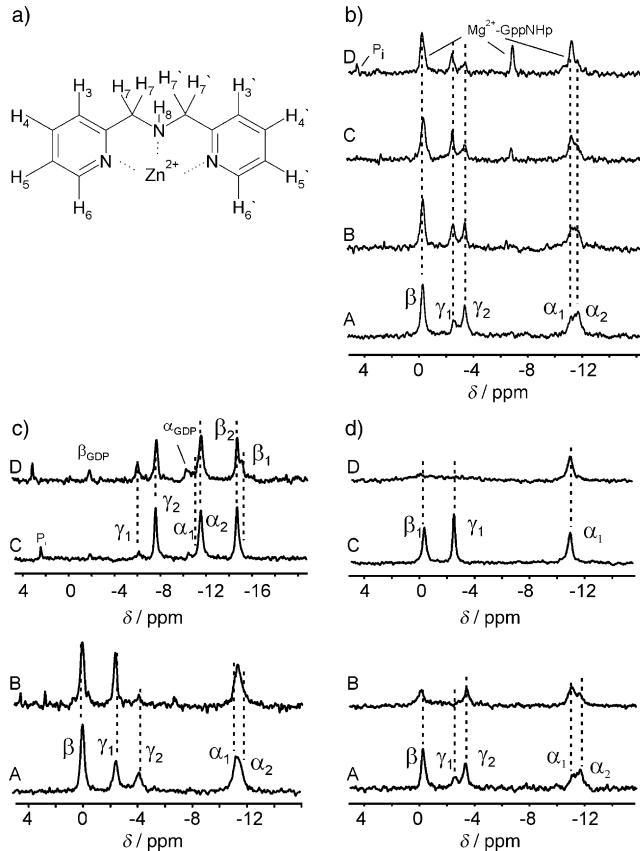


Abbildung 1. Einfluss von M²⁺-BPA auf das dynamische Gleichgewicht aktiver Ras-Komplexe. a) Molekülstruktur von Zink(II)-bis(2-picoly)amin. b) ³¹P-NMR-Spektren von 0.4 mM Ras(wt)·Mg²⁺·GppNHp in Abwesenheit (A) und in Anwesenheit von Zn²⁺-BPA in Konzentrationen von 3 mM (B), 5.6 mM (C) und 9 mM (D). P_i = anorganisches Phosphat. c) Einfluss von Zn²⁺-BPA auf Ras(G12V). ³¹P-NMR-Spektren von 0.6 mM Ras(G12V)·Mg²⁺·GppNHp (A, B) und 0.6 mM Ras(G12V)·Mg²⁺·GTP (C, D) in Abwesenheit (A, C) und in Anwesenheit von 5.3 mM (B) bzw. 11 mM Zn²⁺-BPA (D). d) Einfluss von Cu²⁺-BPA auf Ras·Mg²⁺·GppNHp. ³¹P-NMR-Spektren von 0.6 mM Ras(wt)·Mg²⁺·GppNHp in Abwesenheit (A) und in Anwesenheit von 4.3 mM Cu²⁺-BPA (B). 0.7 mM Ras(T35A)·Mg²⁺·GppNHp in Abwesenheit (C) und in Anwesenheit von 5 mM Cu²⁺-BPA (D). Alle Experimente wurden bei 278 K durchgeführt. Der Puffer enthielt 40 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 2 mM DTE, 0.2 mM DSS und 5% D₂O. α_1 , β_1 , γ_1 , α_2 , β_2 , γ_2 : Resonanzlinien der α , β , und γ -Phosphatgruppe in Zustand 1(T) bzw. Zustand 2(T). DTE = Dithioerythritol, DSS = 2,2-Dimethyl-2-silapentan-5-sulfonsäure, Tris = Tris(hydroxymethyl)aminomethan.

Mithilfe von Sättigungstransferrendifferenz(STD)-NMR-Spektroskopie^[19] konnten wir die Affinität von Zn²⁺-BPA (Abbildung S1 a (SI)) zu aktiviertem Ras bestimmen. Für die Mutante Ras(T35A)·Mg²⁺·GppNHp, die weitgehend im Zustand 1(T) vorliegt, der den Effektor nur schwach bindet,^[4b] erhalten wir eine gemessene Dissoziationskonstante von (2.1 ± 0.3) mM (Abbildung S1 c (SI)).

Die Verschiebung des Gleichgewichts zum niederaffinen Zustand für Effektoren durch Zn²⁺-BPA findet man auch im Komplex der onkogenen Mutante Ras(G12V) mit dem GTP-Analogon GppNHp (Abbildung 1c, unten). Da Ras(G12V)·Mg²⁺·GTP eine sehr langsame Hydrolyse für GTP von 0.002 min^{-1} bei 37°C aufweist,^[8] können mit dieser Mutante auch Untersuchungen im Komplex mit dem natürlichen Substrat GTP bei tiefer Temperatur durchgeführt werden. Der Satz von Phosphorresonanzlinien des gebundenen Nukleotids, der im ³¹P-NMR-Spektrum von Ras(G12V)·Mg²⁺·GTP überwiegt (Abbildung 1c, oben), wurde bereits dem Konformationszustand 2(T) zugeordnet.^[8] In Gegenwart von Zn²⁺-BPA wird ein zweiter Satz von Resonanzlinien für das γ - und β -Phosphat detektiert (Abbildung 1c). Die Werte der chemischen Verschiebungen entsprechen denen, die typisch für den Zustand 1(T) sind und auch in den Spektren von Ras(wt)·Mg²⁺·GTP beobachtet werden (Tabelle S1 (SI)).

Um quantitativer Strukturinformationen zu erhalten, verwendeten wir das paramagnetische Cu^{2+} -Derivat von BPA. Im Unterschied zum diamagnetischen Zn^{2+} -Ion induziert das Cu^{2+} -Ion durch das starke magnetische Dipolmoment des ungepaarten Elektrons eine Distanz-abhängige T_2 -Relaxation (Linienverbreiterung) bei den räumlich benachbarten Kernen. Im Wildtyp-Ras-Mg²⁺-GppNHp sind die Resonanzlinien, die den Phosphatgruppen dem Zustand 1(T) zugehören, stark verbreitert (Abbildung 1d), während diejenigen, die dem Zustand 2(T) zuzuordnen sind, anscheinend nicht beeinflusst werden. Diese Beobachtung zeigt, dass Cu^{2+} -BPA ausschließlich an den Zustand 1(T) bindet. Die Resonanzlinie des α -Phosphats im Zustand 1(T) ist selbst bei einem molaren Verhältnis Cu^{2+} -BPA/Ras von 8:1 (d.h. 4.3 mM) detektierbar, und sein Integral nimmt relativ zu dem Zustand 2(T) zugehörigen Signal zu. Dies bedeutet, dass die Bindung von Cu^{2+} -BPA das Gleichgewicht hin zum schwach Effektor-bindenden Zustand 1(T) bei Ras(wt) verschiebt. Bei der Zustand-1(T)-Mutante Ras(T35A)-Mg²⁺-GppNHp (Abbildung 1d) kann dieser Effekt der Linienverbreiterung besonders deutlich beobachtet werden. Wie bei Ras(wt) werden die Signale des β - und γ -Phosphats viel stärker verbreitert als die des α -Phosphats. Bei einem molaren Verhältnis von Cu^{2+} -BPA zu Ras von 4:1 nimmt die Linienbreite der γ -Phosphatresonanzlinie, die dem Zustand 1(T) zugeordnet ist, auf 563 Hz zu, während sie in Abwesenheit des Liganden 71 Hz beträgt. Bei einer Konzentration von 5 mM Cu^{2+} -BPA ist das Signal nicht mehr über dem Rauschniveau detektierbar (Abbildung 1d).

Die ^{31}P -NMR-spektroskopischen Daten weisen darauf hin, dass M^{2+} -BPA nicht direkt an die Phosphate des Nukleotids bindet, da keine Änderungen in den chemischen Verschiebungen beobachtet werden, die bei einer direkten Wechselwirkung auftreten. Zusätzliche Informationen über die Bindungsstelle konnten über die paramagnetische Relaxationsverstärkung durch Cu^{2+} -BPA im $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Spektrum von Ras(T35A)-Mg²⁺-GppNHp erhalten werden. Der diamagnetische Ligand Zn^{2+} -BPA bewirkt analoge Änderungen der chemischen Verschiebungen $\Delta\delta_{\text{combined}} > \sigma_0^{\text{corr}}$ bei den Titrationsexperimenten (Abbildung S2 a (SI)). Die stärksten Verschiebungsänderungen werden für die Aminosäurereste Asp38, Ser39 und Tyr40 sowie für die C-terminalen Aminosäuren Ile163, Gln165 und His166 detektiert. Weitere große Änderungen finden sich bei Ile139, das nahe dem C-Terminus liegt, und bei Lys147, das sich nahe dem Nukleotid-Bindemotiv G1 befindet. Phe28, das Teil des G1-Motivs ist und starke hydrophobe Wechselwirkungen mit der Guanin-Base eingeht, ist ebenso wie die Reste seiner direkten Umgebung betroffen. In Tabelle S2 (SI) sind die Ergebnisse der $[^1\text{H}, ^{15}\text{N}]$ -HSQC-Titrationsexperimente an Ras mit M^{2+} -BPA zusammengefasst. Eine farbliche Hervorhebung dieser Daten auf der Oberfläche der NMR-Struktur von Ras-(T35S)-Mg²⁺-GppNHp^[20] zeigt zwei verschiedene Bindungsstellen: Eine Bindungsstelle (Abbildung S2 b, C und D (SI)) befindet sich direkt am C-terminalen Ende von Ras und der Schleife L7. Eine ähnliche Stelle an Ras wurde auch für die Bindung von M^{2+} -Cyclen durch NMR-Spektroskopie und Röntgenkristallographie gefunden.^[16] Die zweite Bindungsstelle (Abbildung S2 b, A und B (SI)) befindet sich nahe dem

aktiven Zentrum von Ras und scheint verantwortlich für die Stabilisierung des Zustands 1(T) zu sein. Die Effekte sowohl in der Änderung der chemischen Verschiebungen als auch in der paramagnetischen Relaxationsverstärkung zeigen deutliche Unterschiede zur Bindung von M^{2+} -Cyclen. M^{2+} -BPA ist höchstwahrscheinlich außerhalb der Nukleotid-Bindetasche nahe den Aminosäuren Asp38, Ser39 und Tyr40 lokalisiert.

An der Bindungsstelle am C-Terminus von Ras bewirkt M^{2+} -BPA die stärksten paramagnetischen Relaxations- und diamagnetischen Verschiebungseffekte bei den Aminosäuren Gln165 und His166. Das Metall-Ion von Zn^{2+} -Cyclen ist in der Röntgenstruktur direkt an den Imidazolring des His166 gebunden. Deshalb wird eine Koordination des Metall-Ions von M^{2+} -BPA an den Imidazolring des His166 wahrscheinlich auch die Liganden-Bindungsstelle 2 definieren. Bei der Mutante Ras(T35A/H166A) sollte die zweite Bindungsstelle für M^{2+} -BPA und M^{2+} -Cyclen somit zerstört sein. STD-NMR-Experimente zeigen, dass diese Mutante trotzdem die Liganden binden kann. In den sofast [$^1\text{H}, ^{15}\text{N}$]-HMQC-Spektren werden deutliche Änderungen in den chemischen Verschiebungen an der Bindungsstelle 1 beobachtet. An der Bindestellung 2 am C-Terminus sind dagegen beinahe keine Effekte mehr zu detektieren (Abbildungen S3 und S4 (SI)). Die erhaltenen Änderungen der chemischen Verschiebungen in der Bindungsstelle 1 unterscheiden sich in ihren Mustern deutlich zwischen der Bindung von Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA (Abbildung S3 (SI)). Die Zugabe von Cu^{2+} -BPA führt im ^{31}P -NMR-Spektrum von Ras(T35A/H166A)-Mg²⁺-GppNHp (Abbildung 2 a) zur gleichen Linienverbreiterung wie bei Ras(T35A)-Mg²⁺-GppNHp (Abbildung S2 c (SI)). Diese Befunde zeigen, dass die Wechselwirkung des Liganden mit der C-terminalen Bindungsstelle nicht für die Stabilisierung des Zustands 1(T) verantwortlich ist. Wenn Cu^{2+} -BPA an der gleichen Stelle binden würde wie das diamagnetische

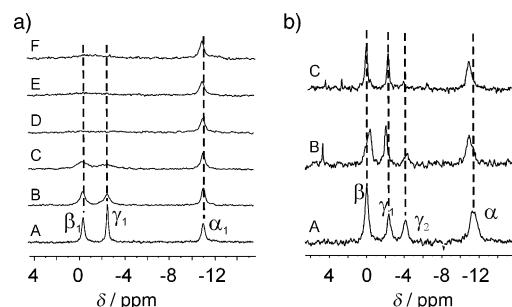


Abbildung 2. Titration von Ras(T35A/H166A) mit Cu^{2+} -BPA und Zn^{2+} -Cyclen und Titration von Ras(G12V) mit Zn^{2+} -Cyclen oder Zn^{2+} -BPA. a) Die Probe enthielt zu Beginn 2.1 mM Ras(T35A/H166A)-Mg²⁺-GppNHp. A) ^{31}P -NMR-Spektrum der Probe ohne Ligand, B) in Anwesenheit von 1.6 mM Cu^{2+} -BPA, C) 3.6 mM Cu^{2+} -BPA bzw. D) 14.8 mM Cu^{2+} -BPA. E) Spektren der Probe mit 14.6 mM Cu^{2+} -BPA und 10 mM Zn^{2+} -Cyclen und (F) mit 14.4 mM Cu^{2+} -BPA und 22.5 mM Zn^{2+} -Cyclen. b) Stabilisierung des Zustands 1(T) in der onkogenen Mutante Ras(G12V) durch Zn^{2+} -BPA oder Zn^{2+} -Cyclen. A) ^{31}P -NMR-Spektrum von 0.6 mM Ras(G12V)-Mg²⁺-GppNHp, B) Probe von (A) in Anwesenheit von 24 mM Zn^{2+} -Cyclen oder C) in Anwesenheit von 5.3 mM Zn^{2+} -BPA. Alle Spektren wurden bei 278 K aufgenommen. Der Puffer enthielt 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 10% D₂O und 0.1 mM DSS.

Zn^{2+} -Cyclen, sollte es vom Komplex dissoziieren, wenn Zn^{2+} -Cyclen in höheren Konzentrationen zugegeben wird. Dies ist klar sichtbar nicht der Fall (Abbildung 2). Dies stützt die Annahme, dass die Bindungsstelle von M^{2+} -BPA außerhalb der Nukleotid-Bindespalte lokalisiert ist.

Das Ziel des Wirkstoffdesigns ist letztlich die Inhibition onkogener, aktiver Ras-Mutanten. Eine prominente Gruppe von onkogenen Ras-Mutanten weist eine Mutation an der Aminosäureposition 12 auf. Deshalb untersuchten wir die Wechselwirkung von Zn^{2+} -BPA und Zn^{2+} -Cyclen mit der Mutante Ras(G12V). In Abbildung 2b sind die Ergebnisse gezeigt: Beide Moleküle vermögen den Zustand 1(T) zu stabilisieren, wobei aber das hier beschriebene Zn^{2+} -BPA deutlich wirkungsvoller als das Cyclen-Derivat ist. Während Zn^{2+} -BPA in der Lage ist, das Konformationsgleichgewicht bei einer Konzentration von 5 mM vollständig zum Zustand 1(T) zu verschieben, wird dies durch Zn^{2+} -Cyclen selbst bei einer 5-mal höheren Konzentration noch nicht erreicht. Dieser Befund gründet wahrscheinlich auf einer sterischen Hinderung der Val12-Seitenkette, die nahe am γ -Phosphat liegt. Für die Bindung von Zn^{2+} -BPA spielt diese Seitenkette dagegen keine Rolle, da dieser Ligand außerhalb des aktiven Zentrums bindet.

Die experimentellen Daten (Tabelle S2 (SI)) wurden dazu verwendet, eine Struktur des Komplexes von Zn^{2+} -BPA mit Ras- Mg^{2+} -GppNHp zu berechnen. Da wir zeigen konnten, dass die Zn^{2+} -BPA-Wechselwirkung an der Bindungsstelle 1, nicht jedoch an Bindungsstelle 2, das Gleichgewicht zum Zustand 1(T) verschiebt, ist für die Berechnung des Komplexes nur die Bindungsstelle 1 von Zn^{2+} -BPA an Ras- Mg^{2+} -GppNHp im Zustand 1(T) von pharmazeutischem Interesse. Wir haben gezeigt, dass Zn^{2+} -BPA auch an Ras im Komplex mit Zn^{2+} -Cyclen binden kann und verwenden deshalb als Startstruktur für das Ligandendocken die bereits bestimmte Komplexstruktur von Ras und Zn^{2+} -Cyclen.^[16] Das Programm HADDOCK^[21] wurde für die Berechnungen der Komplexstrukturen verwendet. Die Basis bildeten dabei Änderungen der chemischen Verschiebungen (mehrdeutige Beschränkungen) aus den Titrationsexperimenten mit Zn^{2+} -BPA und die Befunde der paramagnetischen Relaxationsverstärkung (eindeutige Beschränkungen) aus den Titrationsexperimenten mit Cu^{2+} -BPA (Tabelle S2 (SI)). Die erhaltenen Komplexstrukturen mit hohen HADDOCK-Bewertungen sind alle sehr ähnlich. Die Struktur mit der höchsten Bewertung ist in Abbildung 3 dargestellt. In dieser Struktur ist Zn^{2+} -BPA in einer negativ geladenen Tasche in der Zustand-1(T)-Struktur lokalisiert. Das Zn^{2+} -Ion ist dabei an das Carboxylatanion der Seitenkette von Asp38 gebunden. Die Methylengruppen und ein aromatischer Ring sind im engen Kontakt zur Oberfläche des Proteins, wie es auch durch die STD-NMR-Experimente vorhergesagt wurde (Abbildung S1 (SI)). Es soll hier darauf hingewiesen werden, dass diese Bindungsstelle auch einem kürzlich vorhergesagten Hotspot für Ras-Liganden entspricht.^[12c,d]

Wie oben gezeigt, stabilisiert Zn^{2+} -BPA den schwach Effektor-bindenden Zustand 1(T). Deshalb kann es als Ausgangsstruktur für die allosterische Inhibition der Ras-Signalleitung über die Effektorbindung herangezogen werden. Wie durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie^[4b] gezeigt, kann

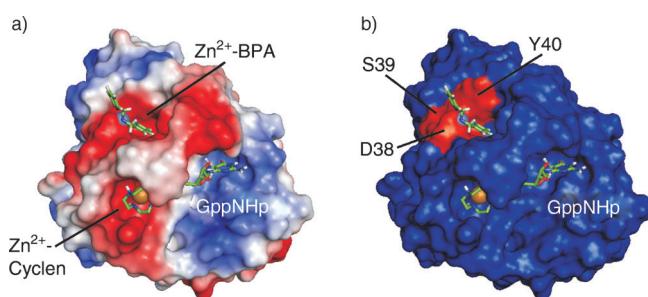


Abbildung 3. Bindungsstelle von M^{2+} -BPA an Ras-GppNHp. Berechnete Struktur des Komplexes Ras(T35A)- Mg^{2+} -GppNHp- Zn^{2+} -Cyclen mit Zn^{2+} -BPA, erhalten durch die Moleküldynamikrechnung mit HADDOCK.^[21] Hierfür wurden die Beschränkungen, die durch die experimentellen Daten aus den Änderungen der chemischen Verschiebungen und aus der paramagnetischen Relaxationsverstärkung verwendet, die aus den ^{31}P -NMR- und [1H , ^{15}N]-HSQC-Titrationsexperimenten (Abbildung S2, Tabelle S2 (SI)) erhalten wurden; a) mit Ras in der elektrostatischen Oberflächendarstellung und b) mit der Hervorhebung der Aminosäurereste, die die stärksten Effekte aufweisen und einen Teil der Oberfläche ausmachen, dies sind die Reste 38–40 (Tabelle S2 (SI)).

bei der Zustand-1(T)-Mutante Ras(T35S)- Mg^{2+} -GppNHp das dynamische Gleichgewicht in Gegenwart von Raf-RBD hin zum stark Effektor-bindenden Zustand 2(T) verschoben werden (Abbildung 4a). Wie erwartet, wird es jedoch durch Zugabe von Zn^{2+} -BPA wieder zum schwach Effektor-bindenden Zustand 1(T) zurückverlagert: Die Integrale der Signale, die den Zustand 1(T) repräsentieren, wachsen bei Zugabe von Zn^{2+} -BPA (Abbildung 4a).

Zusätzlich wurden Stopped-Flow-Fluoreszenzexperimente mit Ras(wt) durchgeführt, das ein GTP-Analogon mit einer N' -Methylanthraniloyl-Fluoreszenzmarkierung (mant-GppNHp) gebunden hatte. Die Assoziationskinetik von Ras und Raf-RBD wurde in An- und Abwesenheit von Zn^{2+} -BPA untersucht. In Abbildung 4b ist deutlich zu erkennen, dass die beobachteten Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation von Raf-RBD an Ras in Gegenwart von Zn^{2+} -BPA drastisch abnehmen. In Abwesenheit von Zn^{2+} -BPA erhält man eine nichtlineare Abhängigkeit der effektiven Assoziationskonstanten k_{obs} für die Raf-RBD-Bindung (Abbildung 4b), die durch einen zweistufigen Bindungsmechanismus erklärt werden kann.^[4b] In Gegenwart von Zn^{2+} -BPA sind die beobachteten k_{on} -Werte substanzell kleiner und zeigen einen typischen linearen, konzentrationsabhängigen Verlauf, wie er früher für die Zustand-1(T)-Mutante Ras(T35A) gezeigt werden konnte. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass das Gleichgewicht durch die Zugabe von Raf-RBD im hier untersuchten Konzentrationsbereich nicht mehr zum stark Effektor-bindenden Zustand 2(T) verschoben werden kann.

Die inhibitorisch wirkende Bindungsstelle für Zn^{2+} -Cyclen ist eindeutig durch die Koordination des Metall-Ions durch das γ -Phosphat des gebundenen Triphosphat-Nukleotids bestimmt. Der Koordination des Zn^{2+} -Cyclens durch das γ -Phosphat entsprechend, beobachtet man keine Wechselwirkung mit Ras-gebundenem GDP, das keine γ -Phosphatgruppe trägt.^[16] Allerdings sprechen sämtliche Anhaltspunkte dafür, dass die Bindungsstelle von Zn^{2+} -BPA außerhalb der Nukleotid-Bindungspalte lokalisiert ist, und zwar nahe einem

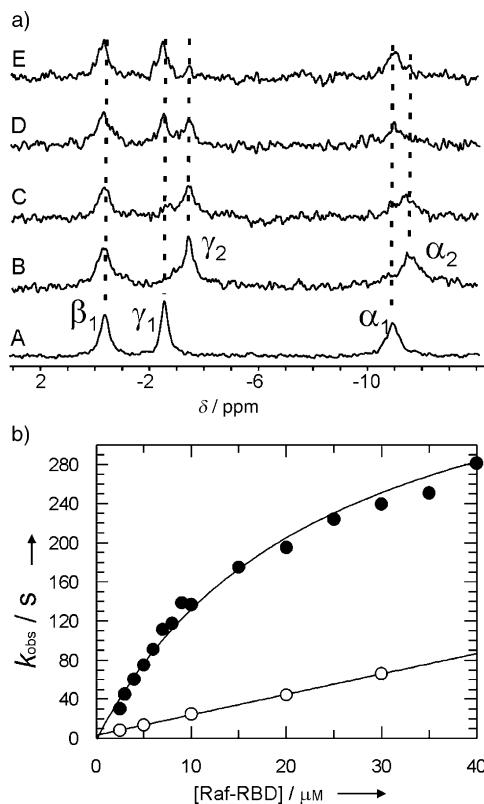


Abbildung 4. Einfluss von Zn^{2+} -BPA auf die Ras-Effektor-Wechselwirkung. a) Störung der Wechselwirkung zwischen Raf-RBD und Ras-(T35S)-Mg $^{2+}$.GppNHp durch Zn^{2+} -BPA. Die Probe enthielt zu Beginn 0.8 mm Ras(T35S)-Mg $^{2+}$.GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH 7.4, 10 mM MgCl $_2$, 2 mM DTE, 0.2 mM DSS und 5% D $_2$ O. Die ^{31}P -NMR-Spektren wurden wie folgt aufgenommen: Ras(T35S)-Mg $^{2+}$.GppNHp in Abwesenheit von Raf-RBD (A) und 0.6 mm Ras(T35S)-Mg $^{2+}$.GppNHp in Anwesenheit von 0.9 mm Raf-RBD (B). Anschließend wurde Zn^{2+} -BPA zugegeben zu Endkonzentrationen in der Probe von 2.4 mM (C), 4.5 mM (D) und 6.4 mM (E). Alle Spektren wurden bei 278 K aufgenommen. b) Kinetik der Assoziation zwischen Ras(wt)-Mg $^{2+}$.mantGppNHp und Raf-RBD in Ab- und Anwesenheit von Zn^{2+} -BPA. Die beobachteten effektiven Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} sind gegen Konzentration von Raf-RBD in Abwesenheit (●) und Anwesenheit (○) von 10 mM Zn^{2+} -BPA aufgetragen. Die Messungen wurden bei 283 K durchgeführt. Der Puffer enthielt 15 mM Hepes/NaOH pH 7.5, 125 mM NaCl, 5 mM MgCl $_2$. Hepes = 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure.

Bereich, der von den Aminosäuren an den Positionen 38–40 und 53–58 gebildet wird. Im Einklang mit diesem Modell lassen unsere ^{31}P -NMR-spektroskopischen Daten darauf schließen, dass M $^{2+}$ -BPA im Unterschied zu M $^{2+}$ -Cyclen auch mit der GDP-gebundenen, ausgeschalteten Form von Ras wechselwirken kann (Abbildung S5, Tabelle S3 (SI)).

Das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen, örtlich getrennten inhibitorischen Bindungsstellen für die beiden Leitstrukturen hat praktische Konsequenzen. Wie wir experimentell gezeigt haben, können Zn $^{2+}$ -Cyclen und Zn $^{2+}$ -BPA gleichzeitig an Ras binden und wahrscheinlich wechselseitig ihre Effekte steigern. Die gleichzeitige Bindung der beiden Liganden stimmt auch mit dem erhaltenen Strukturmodell überein (Abbildung 3). Prinzipiell könnten die beiden Liganden chemisch verknüpft werden, um eine Steigerung der Affinität zu erreichen, eine typische Vorgehensweise bei der

Fragment-basierten Wirkstoffentwicklung. Der Vorteil von Molekülen, die die Zn $^{2+}$ -Cyclen-Bindungsstelle erkennen, ist die Möglichkeit, dass sie potenziell auch die onkogenen Mutationen erkennen, die in unmittelbarer Nähe an den Aminosäurepositionen 12, 13 und 61 liegen. Dies könnte durch die direkte Wechselwirkung mit den Seitenketten der mutierten Aminosäuren erfolgen. Andererseits könnte auch ein sterischer Konflikt oder eine Konformationsänderung durch die Aminosäuren in den onkogenen Mutanten die Affinität der Liganden reduzieren. Dies trifft für Ras(G12V) zu, das eine geringere Affinität für Zn $^{2+}$ -Cyclen aufweist als das Wildtyp-Protein. Die Bindungsstelle von Zn $^{2+}$ -BPA ist dagegen nicht von dieser Mutation betroffen, sodass dieses Moleköl auch an die onkogene Mutante binden könnte (Abbildung 3). Tatsächlich bindet Zn $^{2+}$ -BPA deutlich stärker an Ras(G12V) als Zn $^{2+}$ -Cyclen.

Zn $^{2+}$ -BPA sowie auch Zn $^{2+}$ -Cyclen stabilisieren den Sos-bindenden Zustand 1(T).^[6] Ihre hauptsächliche Wirkung ist, dass sie die Wechselwirkung mit Effektoren schwächen, da diese den Zustand 2(T) bevorzugen. Dadurch setzen sie auch die intrinsische (und möglicherweise auch Gap-beschleunigte) GTPase-Aktivität herab, die den Zustand 2(T) für die strukturelle Anordnung um das γ -Phosphat benötigt.^[8] Dies spielt jedoch bei permanent aktivierten, onkogenen Ras-Mutanten keine Rolle, solange die Wechselwirkung mit Effektoren gestört wird. Eine Verschiebung des Gleichgewichts zum Zustand 1(T) sollte auch die Nukleotid-Austauschreaktion in Abwesenheit von Sos beeinflussen. Dies wird in der Tat experimentell für Zn $^{2+}$ -BPA (diese Arbeit) beobachtet und gilt auch für Zn $^{2+}$ -Cyclen (unveröffentlicht). Das Gleichgewicht wird zur Nukleotid-freien Form verschoben, und gebundenes GTP wird freigesetzt. Als Folge der Bindung von Zustand-1(T)-Inhibitoren würde man eine stärkere Wechselwirkung mit dem Austauschfaktor Sos^[20] erwarten, einen Effekt, der noch genauer untersucht werden sollte. Zn $^{2+}$ -BPA bindet auch an Ras·Mg $^{2+}$.GDP. Diese Eigenschaft könnte bedeuten, dass die Bindung von Zn $^{2+}$ -BPA an Ras·Mg $^{2+}$.GDP den zugehörigen Zustand 1(D) stabilisieren könnte. Diese pharmakologisch wichtige Eigenschaft von Zn $^{2+}$ -BPA muss noch experimentell nachgewiesen werden.

Wir halten fest, dass beide Zustand-1(T)-Inhibitoren in der Lage sind, die Ras-Effektor-Wechselwirkung *in vitro* zu unterdrücken, obwohl sie völlig getrennte Bindungsstellen aufweisen. Die Kontrolle der Konformationsgleichgewichte von Subzuständen von Ras durch kleine organische Liganden wie Zn $^{2+}$ -Cyclen oder Zn $^{2+}$ -BPA basiert in ihrer Wirkweise auf einem anderen Mechanismus als die klassische kompetitive Inhibition und eröffnet damit neue Möglichkeiten zum Eingriff in die Ras-vermittelte Signalleitung. Natürlich können die hier diskutierten Zustand-1(T)-Inhibitoren nur als Leitstrukturen für die Entwicklung von Liganden mit höherer Affinität dienen, die für medizinische Anwendungen notwendig ist, sie bieten jedoch eine vielversprechende Grundlage.

Eingegangen am 28. Mai 2012
Online veröffentlicht am 20. September 2012

Stichwörter: Inhibitoren · Konformationsdynamik · Ras-Protein · Signaltransduktion · Wirkstoff-Forschung

- [1] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4360–4383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4192–4214.
- [2] C. Herrmann, *Curr. Opin. Struc. Biol.* **2003**, *13*, 122–129.
- [3] M. Geyer, T. Scheweins, C. Herrmann, T. Prisner, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Biochemistry* **1996**, *35*, 10308–10320.
- [4] a) M. Spoerner, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *FEBS Lett.* **2004**, *578*, 305–310; b) M. Spoerner, C. Herrmann, I. R. Vetter, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4944–4949.
- [5] a) M. Spoerner, A. Nuehs, P. Ganser, C. Herrmann, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Biochemistry* **2005**, *44*, 2225–2236; b) M. Spoerner, A. Nuehs, C. Herrmann, G. Steiner, H. R. Kalbitzer, *FEBS J.* **2007**, *274*, 1419–1433.
- [6] H. R. Kalbitzer, M. Spoerner, P. Ganser, C. Hosza, W. Kremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16714–16719.
- [7] a) M. Geyer, C. Herrmann, S. Wohlgemuth, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 694–699; b) T. Linemann, M. Geyer, B. K. Jaitner, C. Block, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, C. Herrmann, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 13556–13562; c) W. Gronwald, F. Huber, P. Grünwald, M. Spörner, S. Wohlgemuth, C. Herrmann, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Structure* **2001**, *9*, 1029–1041.
- [8] M. Spoerner, C. Hozsa, J. A. Poetzel, K. Reiss, P. Ganser, M. Geyer, H. R. Kalbitzer, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 39768–39778.
- [9] a) J. L. Bos, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4682–4689; b) A. T. Baines, D. Xu, C. J. Der, *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 1787–808; c) B. B. Friday, A. A. Adjei, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* **2005**, *1756*, 127–144.
- [10] a) A. Palmioli, E. Sacco, S. Abraham, C. J. Thomas, A. Di Domizio, L. De Gioia, V. Gaponenko, M. Vanoni, F. Peri, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4217–4222; b) S. Colombo, A. Palmioli, C. Airolidi, R. Tisi, S. Fantinato, S. Olivieri, L. De Gioia, E. Martegani, F. Peri, *Curr. Cancer Drug Targets* **2010**, *10*, 192–199; c) E. Sacco, et al., *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 233–243; d) C. Müller, et al., *ChemMedChem* **2009**, *4*, 524–528; e) T. Maurer, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 5299–5304; f) Q. Sun, J. P. Burke, J. Phan, M. C. J. Burns, E. T. Olejniczak, A. G. Waterson, T. Lee, O. W. Rossanese, S. W. Fesik, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6244–6247; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6140–6143.
- [11] a) T. Zor, M. Bar-Yaacov, S. Elgavish, B. Shaanan, Z. Selinger, *Eur. J. Biochem.* **1997**, *249*, 330–336; b) M. R. Ahmadian, T. Zor, D. Vogt, W. Kabsch, Z. Selinger, A. Wittinghofer, K. Scheffzek, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 7065–7070; c) R. Gail, B. Costisella, M. R. Ahmadian, A. Wittinghofer, *ChemBioChem* **2001**, *2*, 570–575; d) L. Soulère, C. Aldrich, O. Daumke, R. Gail, L. Kissau, A. Wittinghofer, H. Waldmann, *ChemBioChem* **2004**, *5*, 1448–1453.
- [12] a) O. Müller, E. Gourzoulidou, M. Carpintero, I. M. Karaguni, A. Langerak, C. Herrmann, T. Möröy, L. Klein-Hitpass, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 456–460; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 450–454; b) H. Waldmann, I. M. Karaguni, M. Carpintero, E. Gourzoulidou, C. Herrmann, C. Brockmann, H. Oschkinat, O. Müller, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 460–464; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 454–458; c) B. J. Grant, S. Lukman, H. J. Hocker, J. Sayyah, J. H. Brown, J. A. McCammon, A. A. Gorfe, *PLoS One* **2011**, *6*, e25711; d) G. Buhrman, C. O'Connor, B. Zerbe, B. M. Kearney, R. Napoleon, E. A. Kovrigina, S. Vajda, D. Kozakov, E. L. Kovrigin, C. Mattos, *J. Mol. Biol.* **2011**, *413*, 773–789.
- [13] a) F. Barnard, H. Sun, L. Baker, M. S. Marshall, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *247*, 176–180; b) P. C. Gareiss, A. R. Schneekloth, M. J. Salcius, S. Y. Seo, C. M. Crews, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 517–522.
- [14] H. R. Kalbitzer, B. Koenig, *PCT Int. Appl.* 14 pp. WO 2004006934 A2 20040122, **2004** [CAN 140:122769; AN 2004:60322].
- [15] a) M. Spoerner, T. Graf, B. König, H. R. Kalbitzer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 709–713; b) F. Schmidt, I. C. Rosnizeck, M. Spoerner, H. R. Kalbitzer, B. König, *Inorg. Chim. Acta* **2011**, *365*, 38–48.
- [16] I. C. Rosnizeck, T. Graf, M. Spoerner, J. Tränkle, D. Filchtinski, C. Herrmann, L. Gremer, I. R. Vetter, A. Wittinghofer, B. König, H. R. Kalbitzer, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3918–3922; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3830–3833.
- [17] M. Kruppa, B. König, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3520–3560.
- [18] I. C. Rosnizeck, Dissertation, **2010**, Universität Regensburg.
- [19] M. Mayer, B. Meyer, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1902–1906; *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1784–1788.
- [20] M. Araki, F. Shima, Y. Yoshikawa, S. Muraoka, Y. Ijiri, Y. Nagahara, T. Shirono, T. Kataoka, A. Tamura, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 39644–39653.
- [21] C. Dominguez, R. Boelens, A. M. J. J. Bonvin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1731–1737.