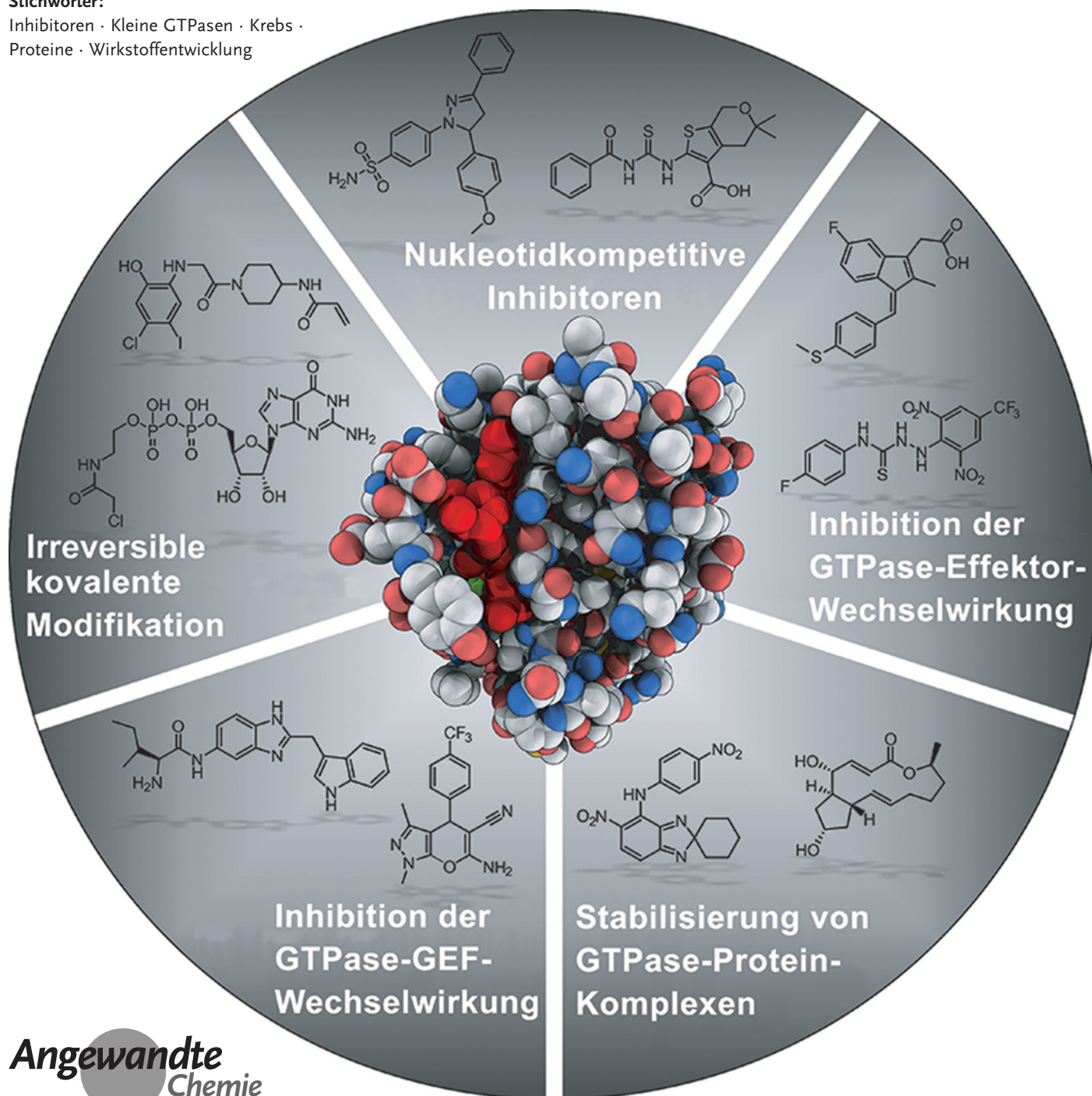


Direkte Modulation von Aktivität und Funktion kleiner GTPasen

Philipp M. Cromm, Jochen Spiegel, Tom N. Grossmann* und Herbert Waldmann*

Stichwörter:

Inhibitoren · Kleine GTPasen · Krebs · Proteine · Wirkstoffentwicklung



Kleine GTPasen bilden eine Familie von GDP-/GTP-bindenden Proteinen, die als biomolekulare Schalter innerhalb von Zellen wirken. Fehlfunktionen oder Fehlregulierungen kleiner GTPasen stehen in Verbindung mit zahlreichen menschlichen Erkrankungen, was diese Proteine zu einem vielversprechenden Ziel der pharmazeutischen Forschung macht. Allerdings werden kleine GTPasen oftmals als pharmakologisch nicht adressierbar klassifiziert, da jahrzehntelange Bemühungen keinerlei klinisch relevante Verbindungen liefern konnten, die die Aktivität kleiner GTPasen direkt modulieren. Die Entdeckung neuer, transients Bindetaschen an den Proteinoberflächen und die Anwendung neuartiger Techniken haben dem Feld jedoch kürzlich neuen Schwung verliehen. Neben Ras-Proteinen rücken zudem vermehrt andere kleine GTPasen in den Fokus der Forschung. Dieser Artikel bietet einen Überblick über die relevanten Aspekte der Superfamilie kleiner GTPasen und fasst die jüngsten Fortschritte und Perspektiven für die direkte Modulierung dieser herausfordernden Proteinklasse zusammen.

1. Einleitung

GTPasen repräsentieren eine große Familie von Enzymen, die GTP zu GDP hydrolysieren. Proteine dieser Klasse kontrollieren eine Vielzahl von essenziellen zellulären Prozessen. Darunter fallen einige der interessantesten und am schwierigsten zu beeinflussenden Prozesse in der Wirkstoffentwicklung. Bei GTPasen führt die Hydrolyse von GTP zu einer Konformationsänderung der G-Domäne und macht sie somit zu molekularen Schaltern.^[1] Durch diese Schalterfunktion können GTPasen essenzielle zelluläre Prozesse kontrollieren und gezielt an- oder ausschalten. GTPasen können grundsätzlich in zwei große Klassen unterteilt werden: TRAFAC („translation factor-related“) und SIMIBI („signal recognition particle, MinD and BioD“).^[1,2] Die TRAFAC-Klasse umfasst Translationsfaktoren, heterotrimere G-Proteine,^[3] Septine, die Dynamin-Superfamilie sowie die Ras-Superfamilie („rat sarcoma“) kleiner GTPasen. Die GTPasen der SIMIBI-Klasse umfassen hingegen das Signalerkennungspartikel („signal recognition particle“, SRP), dessen Rezeptor (SR) sowie einige weitere Familien.^[1] Obwohl GTPasen eine Vielzahl vielversprechender Ansatzpunkte für die Wirkstoffentwicklung bieten, ist bisher jedoch kein einziger Wirkstoffkandidat als Medikament zugelassen.^[4]

Die Mitglieder der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen wechseln zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand und einen inaktiven, GDP-gebundenen Zustand, die sich durch Konformationsänderungen in den Switch-I- und Switch-II-Regionen unterscheiden.^[1,5] Der Aktivierungs-/Deaktivierungszyklus der kleinen GTPasen wird von Nukleotidaustauschfaktoren („guanine nucleotide exchange factors“, GEFs), GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) und Dissoziationsinhibitoren („guanine nucleotide dissociation inhibitors“, GDIs) reguliert (Abbildung 1a).^[6,7] GEFs katalysieren den Austausch von GDP zu GTP und aktivieren auf diesem Weg die GTPase. Durch die Bindung von GAPs wird

eine essenzielle katalytische Gruppe, welche die langsame intrinsische Hydrolyse der kleinen GTPasen stark beschleunigt, bereitgestellt und die GTPase inaktiviert. In ihrer aktiven, GTP-gebundenen Form wechselwirken die kleinen GTPasen mit einer Vielzahl von Effektorproteinen und leiten auf diese Weise Signale weiter oder lösen nachgeschaltete Signalwege aus. Die Mehrheit der kleinen GTPasen trägt an ihrem C-Terminus eine hypervariable Region (HVR), die zumeist posttranslational modifiziert ist. Durch gezielte Lipidierung (Farnesyl- oder Geranylgeranylethioether) der HVR erhalten kleine GTPasen einen Membrananker, der ihre subzelluläre Lokalisation und ihre Verteilung innerhalb der Plasmamembran reguliert.^[8] Zur Kontrolle des zellulären Transports und der selektiven Verteilung in der Membran bilden kleine GTPasen lösliche Komplexe mit GDIs, was den Transport zwischen verschiedenen Membranen ermöglicht.^[6,7]

Die humane Ras-Superfamilie besteht aus mehr als 150 Proteinen und lässt sich in die fünf wichtigen Unterfamilien Ras, Rho, Rab, Arf und Ran unterteilen.^[9,10] Die Ras-Unterfamilie in Säugetieren umfasst 36 kleine GTPasen die als

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	13719
2. Nukleotidkompetitive Inhibitoren	13722
3. Inaktivierung kleiner GTPasen durch irreversible kovalente Modifikation	13723
4. Inhibition der GTPase-GEF-Wechselwirkung	13724
5. Inhibition von GTPase-Effektor-Wechselwirkungen	13729
6. Stabilisierung von GTPase-Protein-Komplexen	13732
7. Zusammenfassung	13734

[*] P. M. Cromm,^[+] J. Spiegel,^[+] Dr. T. N. Grossmann, Prof. Dr. H. Waldmann
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
E-Mail: herbert.waldmann@mpi-dortmund.mpg.de
P. M. Cromm,^[+] J. Spiegel,^[+] Dr. T. N. Grossmann, Prof. Dr. H. Waldmann
Technische Universität Dortmund
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)
Dr. T. N. Grossmann
Chemical Genomics Center der Max-Planck-Gesellschaft
Otto-Hahn-Straße 15, 44227 Dortmund (Deutschland)
E-Mail: tom.grossmann@cgc.mpg.de

[+] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit beigetragen.

Schlüsselregulatoren die Zelldifferenzierung, Zellproliferation und das Zellüberleben steuern.^[11] Die bekanntesten Mitglieder der Ras-Unterfamilie sind die Ras-, Ral- und Rap-Proteine. Die Rho-Unterfamilie („Ras homologous“) kleiner GTPasen kontrolliert die Aktinorganisation, Zellform und Zellpolarität, Zellbewegung, sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix-Wechselwirkungen.^[12–14] Bisher sind 22 Rho-GTPasen in Säugetieren bekannt, von denen Rho, Rac und Cdc42 die am besten untersuchten Proteine sind. Die Rab- („Ras-related in brain“) und Arf-Unterfamilien (ADP-Ribosylierungsfaktor) sind hingegen die Hauptregulatoren des intrazellulären Transports.^[15,16] Rab-GTPasen repräsentieren dabei die größte Untergruppe der kleinen GTPasen mit mehr als 60 identifizierten Proteinen im menschlichen Organismus und regeln den intrazellulären Vesikeltransport.^[17,18] Zudem vermitteln sie die Vesikelbildung an der Donormembran sowie die Vesikelverschmelzung mit der Akzeptormembran. Die 27 GTPasen der Arf-Unterfamilie, von denen Arf1 das am besten untersuchte Protein ist, sind ebenfalls am Vesikeltransport sowie an der Regulation der Endozytose und der Sekretionswege beteiligt. Unter den kleinen GTPasen der Ras-Superfamilie sticht die Ran-GTPase („Ras-related nuclear protein“) hervor. Sie ist das einzige Protein der Ran-Unterfamilie und liegt zudem nicht membrangebunden, sondern frei im Zytosol vor.^[19,20] Ran ist ein essenzieller Regulator des Zellkerntransports durch den Kernporenkomplex und der Bildung der mitotischen Spindel. Ran wird dabei

durch einen räumlichen Gradienten zwischen im Zellkern lokalisierten GEFs und zytosolischen GAPs reguliert.

Da kleine GTPasen in einer Vielzahl von Signalwegen aktiv sind und zahlreiche essenzielle zelluläre Funktionen kontrollieren, ist die Fehlregulation kleiner GTPasen mit einer Fülle humaner Krankheiten assoziiert. Darunter sind sich verschiedene Formen von Krebs, neurodegenerative Krankheiten, Entzündungen und Erbkrankheiten. Übermäßige und permanente Aktivierung kleiner GTPasen wurde in diesem Zusammenhang als Hauptursache vieler Krankheiten identifiziert und führt zu verstärkter und unkontrollierter Signalweiterleitung. Insbesondere drei unterschiedliche Ursachen können in diesem Zusammenhang zu einer unerwünschten Aktivierung kleiner GTPasen führen: 1) Die verstärkte Aktivierung der Wildtyp-GTPase aufgrund von vorgeschalteten Signalwegen führt zu erhöhter GEF-Aktivität, 2) eine Mutation im Genom der kleinen GTPase erzeugt ein Protein mit stark beeinträchtigter Hydrolysefunktion, und 3) ein Verlust der GAP-Funktion verhindert die GAP-vermittelte Hydrolyse von GTP in der Wildtyp-GTPase.^[21] Jedoch unterscheidet sich das Aktivierungsmuster zwischen den verschiedenen Unterfamilien der kleinen GTPasen. Die kleinen GTPasen der Rho-Familie sind nur in seltenen Fällen mutiert, sodass ihre Überaktivierung bei Krebserkrankungen primär das Resultat einer Überexpression oder Mutation von Wachstumsfaktorrezeptoren oder vorangeschalteten Signalwegen ist.^[22] Dagegen ist eine verstärkte Ras-Signalweiter-



Philipp M. Cromm studierte Chemie an der Technischen Universität München (TUM), wo er im Jahr 2009 den B.Sc. erhielt. 2011 folgte der M.Sc. unter Anleitung von Horst Kessler und David J. Craik nach einem sechsmonatigen Aufenthalt am Institute for Molecular Bioscience (IMB) in Brisbane, wo er N-methylierte disulfidreiche cyclische Peptide untersuchte. Zurzeit erforscht er in der Gruppe von Herbert Waldmann am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie im Rahmen seiner Doktorarbeit die Adressierung kleiner GTPasen mithilfe stabilisierter α -Helices sowie neue Verbrückungstechniken.



Tom N. Grossmann studierte Chemie an der Humboldt-Universität zu Berlin. Nach studentischen Forschungsvorhaben in der Gruppe von K. P. C. Vollhardt an der University of California, Berkeley, promovierte er im Jahr 2008 unter der Anleitung von Prof. O. Seitz an der Humboldt-Universität. Es folgte ein Postdoktorat in Cambridge (USA) bei Prof. G. L. Verdine an der Harvard University. Anschließend wurde er Gruppenleiter an der Technischen Universität und dem Chemical Genomics Centre in Dortmund. Seine Forschungsinteressen umfassen die Stabilisierung von Peptid-Sekundärstrukturen und die Entwicklung biokompatibler Reaktionen.



Jochen Spiegel studierte Chemie an der Technischen Universität München (TUM). Nach studentischen Projekten bei Horst Kessler an der TUM und bei W. D. Lubell an der University of Montreal (Kanada) zur Synthese cyclischer Azapeptide als Integrinliganden und ihre biologische Aktivität, erhielt er im Jahr 2011 seinen M.Sc. Für die Doktorarbeit wechselte er in die Gruppe von Herbert Waldmann am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund; dort beschäftigt er sich aktuell mit der direkten Adressierung kleiner GTPasen mithilfe stabilisierter Peptid-Sekundärstrukturen.



Herbert Waldmann studierte Chemie an der Universität Mainz und promovierte dort im Jahr 1985 unter der Anleitung von Horst Kunz in organischer Chemie. Nach einem Postdoktorat bei George Whitesides an der Harvard University habilitierte er sich 1991 an der Universität Mainz. 1999 wurde er zum Direktor am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie in Dortmund und zum Professor für Organische Chemie an der Universität Dortmund berufen. Seine Forschungsinteressen liegen auf der Synthese von Modulatoren der Signaltransduktion sowie auf Synthese und biologischer Evaluierung Naturstoff-inspirierter Verbindungsbibliotheken. Er ist Mitglied der „Deutsche Akademie der Naturforscher Leopoldina“.

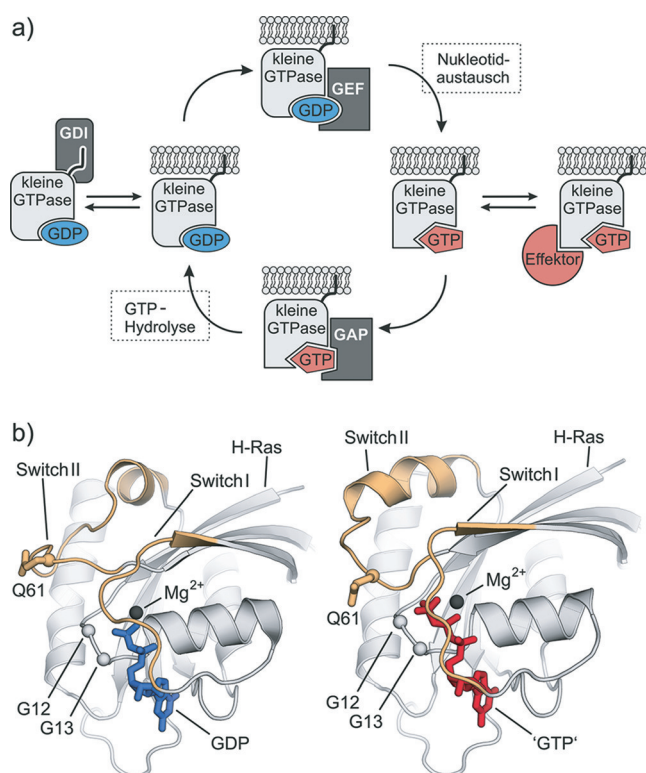


Abbildung 1. Aktivierungs-/Inaktivierungszyklus kleiner GTPasen: a) GDP-gebundene kleine GTPasen werden durch einen GEF-vermittelten Nukleotidaustausch aktiviert. In ihrer GTP-gebundenen Form wechselwirken sie mit Effektorproteinen und lösen nachgeschaltete Signalwege aus. GTP-Hydrolyse erfolgt durch die Bindung von GAPs und deaktiviert die kleinen GTPasen. GDIs vermitteln den Transport der kleinen GTPasen zwischen den Membranen durch die Bildung löslicher Komplexe. b) Kristallstrukturen von inaktivem (GDP-gebundenem) H-Ras (links) und aktiviertem (GTP-gebundenem) H-Ras (rechts); PDB: 1Q21 bzw. 5P21. Die flexiblen Switch-I- und Switch-II-Regionen sind orange dargestellt, das koordinierte Magnesium dunkelgrau und die Nukleotide blau (GDP) bzw. rot (GTP). Die Positionen der am häufigsten gefundenen Mutationen in kontinuierlich aktiviertem Ras (G12, G13 und Q61) sind explizit hervorgehoben.

leitung hauptsächlich auf direkte Mutationen der Ras-Gene zurückzuführen.

Die bekanntesten Vertreter und Begründer der Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen sind die Ras-Proteine K-Ras (Kirsten-Ras), H-Ras (Harvey-Ras) und N-Ras (Neuroblastom-Ras). Sie repräsentieren Protoonkogene und gehören zu den häufigsten Auslösern von Krebs.^[23–25] Ras-Mutationen kommen in 20–30% aller menschlichen Tumore vor und werden zudem mit schlechten Überlebensprognosen assoziiert.^[26–28] Die Mutationen kommen hauptsächlich an den Positionen Gly12, Gly13 und Gln61 vor (Abbildung 1b) und verhindern die intrinsische und GAP-vermittelte Hydrolyse von GTP.^[23] Dies resultiert in einer Anhäufung von aktivem, GTP-gebundenem Ras, das im Zusammenhang mit vielen Krebserkrankungen steht, da es die zellulären Überlebenssignale und Proliferationssignale uneingeschränkt aufrecht erhält. Zudem hat sich das direkte Adressieren von Ras und anderen kleinen GTPasen als ausgesprochen schwierig erwiesen. Trotz intensivsten Bemühungen in akademischer und

industrieller Forschung konnte bisher kein Medikament gegen kleine GTPasen auf den Markt gebracht werden.^[27–31] Gemäß des aktuellen Forschungsstands weisen kleine GTPasen außerhalb ihrer Nukleotidbindetasche keinerlei weitere Taschen auf, die für eine Bindung von kleinen Molekülen geeignet sind. Zusätzlich wird die Signalweiterleitung kleiner GTPasen durch Protein-Protein-Wechselwirkungen (PPIs) über ausgedehnte und flache Bindungsstellen vermittelt. Daher führten die klassischen Strategien der Wirkstoffentwicklung bisher nicht zur Entwicklung von selektiven Inhibitoren, sodass kleine GTPasen heutzutage generell als pharmakologisch nicht adressierbar („undruggable“) bezeichnet werden.

Obwohl Ras eines der bekanntesten Protoonkogene ist und bereits im Jahr 1982 mit Krebs in Verbindung gebracht wurde,^[32] konnten bisher keine klinisch relevanten Verbindungen gefunden werden, die Ras direkt inhibieren. Aus diesem Grund wurden große Anstrengungen unternommen, sowohl vor- als auch nachgeschaltete Signalkaskaden zu inhibieren oder die räumliche und zeitliche Organisation von Ras zu beeinträchtigen. Dabei waren in erster Linie Inhibitoren der Ras-Farnesylierung von Interesse, da sie sich in vor-klinischen Studien als äußerst effektiv erwiesen und die Membranbindung von Ras unterdrückten.^[33] Jedoch scheiterte diese Klasse von Ras-Inhibitoren, da sich die vielversprechenden anfänglichen Ergebnisse nicht in klinischen Studien bestätigen ließen. Geranylgeranyltransferasen springen für die Farnesyltransferase ein und lipidieren Ras, um die fehlende Farnesylierung auszugleichen und eine Membranverankerung von Ras zu gewährleisten.^[34] Daher wird zurzeit vor allem die Inhibition von Proteinen nachgeschalteter Signalwege, wie der Raf-MEK-ERK-Kinasen, verfolgt. Einige Verbindungen wie Sorafenib oder Vemurafenib sind bereits auf dem Markt oder befinden sich in klinischen Studien.^[35] Diese Anstrengungen werden jedoch durch die Bildung von Resistenzen und das Auftreten bisher nur teilweise verstandener, komplexer Rückkopplungsmechanismen erschwert.^[27,36] Trotz dieser ernüchternden Bilanz nach mehr als 30 Jahren gezielter Forschung haben jüngste Entdeckungen auf dem Gebiet der kleinen GTPasen und der Ras-orientierten Forschung das Feld erneut belebt. In diesem Zusammenhang beginnt sich die klassische „An/Aus“-Vorstellung der kleinen GTPasen zugunsten eines deutlich dynamischeren Bilds zu wandeln, da weitere Konformationszustände von Ras-Proteinen entdeckt wurden.^[37,38] Insbesondere computergestützte Simulationen und neue Kristallstrukturen kleiner GTPasen in zuvor unbekannten Konformationen ermöglichten die Entdeckung kleiner, kurzlebiger Taschen, die durch niedermolekulare Wirkstoffe adressiert werden können.^[39]

Dieser Aufsatz beschreibt jüngste Fortschritte beim Adressieren und Modulieren kleiner GTPasen. Aufgrund der umfangreichen Literatur in diesem Gebiet kann die Übersicht nicht allumfassend sein. Der interessierte Leser findet zusätzliche Informationen in weiterführenden und ausführlicheren Übersichtsartikeln über die einzelnen Ras-Unterfamilien,^[12–18,20,22,27,40,41] ihre GEF-, GAP- und GDI-Regulation^[6,7,10,42] sowie ihren Zusammenhang mit diversen Krankheiten.^[21,25,29,43–45] Unser Aufsatz befasst sich mit der direkten Modulation kleiner GTPasen. Zunächst wird das Potenzial

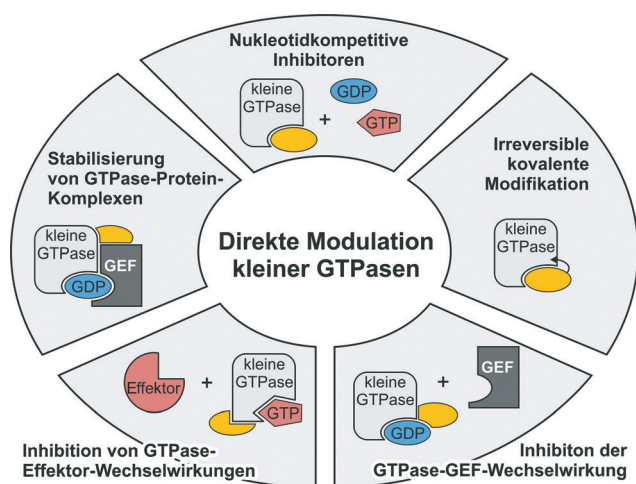


Abbildung 2. Strategien zum direkten Adressieren kleiner GTPasen: Dieser Aufsatz beschreibt fünf unterschiedliche Strategien zum direkten Adressieren und Modulieren kleiner GTPasen: Stören der Nukleotid-Bindung; GTPase-Inaktivierung durch irreversible, kovalente Modifikation; Inhibition der GTPase-GEF-Wechselwirkung; Inhibition der GTPase-Effektor-Wechselwirkung; und Stabilisierung von GTPase-Protein-Komplexen.

von Verbindungen evaluiert, die direkt die Bindung des Nukleotids stören (Abbildung 2). Anschließend werden kovalente Inhibitoren, die irreversibel an kleine GTPasen binden, besprochen. Weiterführend befassen wir uns mit Inhibitoren der Wechselwirkungen zwischen kleinen GTPasen und ihren GEFs sowie zwischen kleinen GTPasen und ihren Effektoren, bevor wir Stabilisatoren dieser Wechselwirkungen diskutieren. Wir schließen mit einer Zusammenfassung der neuesten Fortschritte und liefern Ideen für zukünftige Strategien und Denkansätze.

2. Nukleotidkompetitive Inhibitoren

Ein erhöhtes Niveau an aktivierten, GTP-gebundenen kleinen GTPasen fördert die permanente Signalweiterleitung nachgeschalteter Signalkaskaden und wurde daher als Ursache vieler humaner Krankheiten identifiziert. Da die aktivierte Form kleiner GTPasen an die Bindung zu GTP gekoppelt ist, wurde zu Beginn der GTPase-Forschung versucht, mit der Bindung von GTP zu konkurrieren. So wurden für Ras modifizierte Nukleotide synthetisiert, die eine erhöhte Affinität im Vergleich zu GDP aufweisen, jedoch nur über ein sehr geringes Inhibitions Potenzial verfügen.^[46] Die Verwendung von nukleotidbasierten kompetitiven Inhibitoren ist eine bewährte Strategie für die Inhibition von Kinasen, die normalerweise eine mikromolare Affinität zu ATP aufweisen.^[47] Im Unterschied zu Kinasen haben GTPasen jedoch eine pikomolare Affinität gegenüber ihren Nukleotiden,^[48] was die direkte Konkurrenz mit einem Nukleotid in Gegenwart von millimolaren zellulären Nukleotidkonzentrationen deutlich erschwert. Einige Hochdurchsatzanalysen (HTSS) identifizierten jedoch Verbindungen, die in der Lage sind, die Nukleotidbindung an kleine GTPasen in vitro zu behindern.^[49–51]

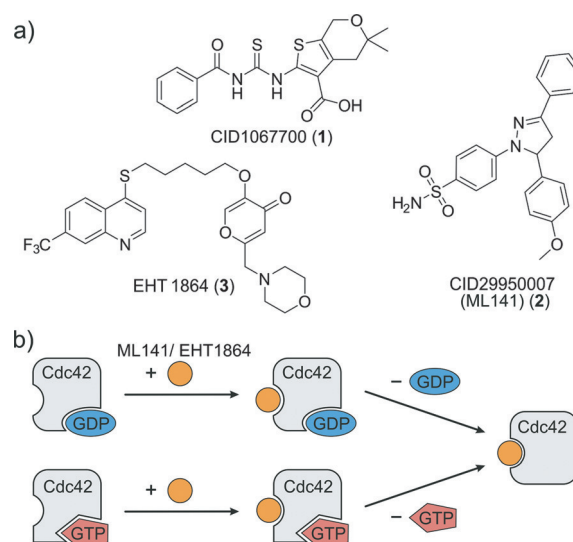


Abbildung 3. Kleine Moleküle, die die Nukleotidbindung stören: a) Strukturformeln repräsentativer Inhibitoren der Nukleotidbindung. b) Vorgeschlagener Wirkmechanismus der Verbindungen **2** und **3**.

Eine harzkügelchenbasierte zytometrische Analyse^[52] von 300 000 Verbindungen identifizierte CID1067700 (**1**) als einen direkten Konkurrent der Nukleotidbindung (Abbildung 3a).^[49] Diese Verbindung verhindert in vitro die Nukleotidbindung von verschiedenen kleinen GTPasen mit nanomolaren Inhibitionskonstanten ($K_i = 12.9\text{--}19.7\text{ nm}$). In einem identischen Versuchsaufbau wurde CID29950007 (ML141, **2**) als selektiver nichtkompetitiver allosterischer Cdc42-Inhibitor entdeckt (Abbildung 3a).^[50] In diesem Fall ist **2** in der Lage, Cdc42 in einer inaktiven Konformation einzufrieren und gleichzeitig die Freisetzung des gebundenen Nukleotids zu bewirken (Abbildung 3b). Verbindung **2** inhibiert die von Cdc42 kontrollierte Bildung von Filopodien und die Zellmigration. Zudem ist **2** in Kombination mit dem Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF) in der Lage, die Mobilisierung vom blutbildenden Stamm- und Vorläuferzellen zu unterstützen.^[53] Eine weitere Studie identifizierte EHT1864 (**3**) als einen Inhibitor von Rac1, der in vitro effektiv das Niveau von A β -Peptiden in Alzheimer-Modellen senken kann (Abbildung 3a).^[54] Weitere Untersuchungen der genauen Wirkweise lassen annehmen, dass **3** mit niedriger nanomolarer Affinität an Rac1 bindet (Dissoziationskonstante $K_D = 40\text{ nm}$). Dabei bedient sich **3** desselben nichtkompetitiven Wirkmechanismus, der bereits für **2** beobachtet wurde, und bewirkt eine Freisetzung des Nukleotids infolge seiner Bindung an Rac1 (Abbildung 3b).^[55]

Da jedoch die allgemeine Effektivität von nukleotidkompetitiven Inhibitoren durch die hohe Affinität kleiner GTPasen für ihre Nukleotide und die intrazellulären Nukleotidkonzentrationen stark eingeschränkt ist, wurden verschiedene andere Strategien untersucht, um die unkontrollierte Signalweiterleitung von fehlregulierten kleinen GTPasen zu unterdrücken.

3. Inaktivierung kleiner GTPasen durch irreversible kovalente Modifikation

Etliche Bakterien verändern die Signalwirkung kleiner GTPasen, indem sie diese posttranslational durch enzymkatalysiertes Einbringen verschiedener organischer Gruppen modifizieren. Sie stören dadurch die Signalweiterleitung des Wirtsorganismus, um die Immunantwort zu unterdrücken und in der für sie feindlichen Umgebung zu überleben.^[56] Dieser Mechanismus zeigt, dass es prinzipiell möglich ist, die Signalwirkung kleiner GTPasen mittels kovalenter Modifikation zu beeinflussen. Obwohl es in der Geschichte der Wirkstoffentwicklung zahlreiche erfolgreiche Beispiele für den Einsatz kovalenter Inhibitoren gibt, erregte diese Substanzklasse klassischerweise Bedenken aufgrund möglicher Toxizität und Nebenwirkungen, und erst kürzlich sind derartige Moleküle wieder verstärkt ins Zentrum des wissenschaftlichen Interesses gerückt.^[57,58] Zwei aktuelle Beispiele zeigen, dass dieses Konzept auch erfolgreich im Bereich kleiner GTPasen angewendet werden kann und dabei sogar die spezifische Adressierung onkogener Mutanten ermöglicht.^[59,60]

3.1. Posttranslationale Modifikation durch bakterielle Pathogene

Viele bakterielle Pathogene inaktivieren kleine GTPasen durch kovalente Modifikation über den Einsatz ADP-ribosylierender Toxine.^[56] Das C3-Exoenzym aus *Clostridium botulinum* ist eine bakterielle ADP-Ribosyltransferase, die eine ADP-Ribose-Einheit kovalent an Asn41 der Rho-Isoformen RhoA, RhoB und RhoC anbringt, um deren zelluläre Funktionen zu stören.^[61,62] Die ADP-Ribosylierung an Asn41 in der Switch-I-Region inhibiert nicht die Bildung von Rho-Effektor-Komplexen, verhindert jedoch den GEF-katalysierten Nukleotidaustausch sowie die Auflösung des Rho-GDI-Komplexes.^[63] Im Unterschied zu klassischen Neurotoxinen umfasst das C3-Exoenzym jedoch keine Transportdomäne, und es erreicht das Zytoplasma der Wirtszellen nur durch unspezifische Aufnahme.^[64] Daher wurden Proteinchimären konstruiert, die die Transportdomänen anderer Toxine enthalten.^[65] Aufgrund ihrer hohen Substratspezifität finden diese Chimären Anwendung in zellbiologischen Studien, um gleichzeitig alle drei Rho-Isoformen zu inaktivieren und eine vermehrte Aktivierung einzelner Rho-Isoformen durch Rückkopplungsschleifen zu verhindern.^[66] Rho-GTPasen spielen eine wichtige Rolle beim Axonwachstum und der Reparatur verletzter Neuronen. So stellt die Inhibierung von Rho-Proteinen eine mögliche Strategie zur Anregung des Axonalwachstums dar. Die Unterdrückung Rho-nachgeschalteter Signalwege mithilfe von C3-Proteinen bewirkt die Reparatur und das Neuwachstum von Axonen in Tiermodellen.^[67] Das chimäre C3-Exoenzym BA-210 (Cethrin) wird lokal verabreicht, um Rückenmarksverletzungen zu behandeln. Es hat vielversprechende Ergebnisse in klinischen Phase-I/IIa-Studien gezeigt^[68] und soll Ende 2015 unter dem Namen VX-210 in Phase IIb eintreten. Allerdings wurde infrage gestellt, ob die ADP-Ribosyltransferase-Aktivität von C3 die entscheidende Ursache der neurotrophen Wirkung ist,

da ein Peptidfragment, das keine enzymatische Aktivität aufweist, ebenfalls neurotroph wirkt.^[69] Neben ADP-Ribosylierung existieren noch eine Reihe weiterer posttranslationaler Modifikationen (Glykosylierung, Adenylierung, Deaminierung usw.), die von Pathogenen dazu genutzt werden, um die Funktion von GTPasen verschiedener Unterfamilien dauerhaft zu aktivieren oder deaktivieren.^[56] Beispielsweise unterdrückt das „Letale Toxin“ aus *Clostridium sordellii* die Signalwirkungen von Mitgliedern der Ras-Familie in intakten Zellen.^[70] Allerdings muss der Einsatz derartiger Toxine in biologischen Studien und medizinischen Anwendungen noch erforscht werden.

3.2. Mutanten-selektive Adressierung durch niedermolekulare Substanzen

Um die Einschränkungen zu überwinden, die mit dem Einsatz nukleotidkompetitiver Binder einhergehen, wurden kovalente Inhibitoren für die konstitutiv aktive G12C-Mutante von K-Ras entwickelt, die kovalent und irreversibel an das Protein binden. Die G12C-Mutation ist am häufigsten auftretende K-Ras-Mutation in Lungenkrebs mit einer Prävalenz von 7%.^[26]

Ausgehend vom Nukleotid-Grundgerüst, wurden kovalente Inhibitoren entwickelt, die direkt in die Nukleotidbindetasche von K-Ras^{G12C} binden.^[59] Unterstützt von molekularen Docking-Experimenten wurde eine Reihe verschiedener Elektrophile an das β -Phosphat von GDP ligiert, um an den Cysteinrest der G12C-Mutante in direkter Nähe zur Nukleotidbindetasche zu binden. Massenspektrometrische Experimente zeigten, dass das Chloracetyl-Derivat SML-8-73-1 (**4**) selbst in Gegenwart von millimolaren Nukleotidkonzentrationen kovalent an K-Ras^{G12C} bindet (Abbildung 4a). Affinitätsstudien mit der fluoreszenzmarkierten Ras-Bindungsdomäne (RBD) von Raf deuten darauf hin, dass K-Ras in einer Konformation stabilisiert wird, die dem GDP-gebundenen, inaktivierten Zustand gleicht.^[59] Dies wurde ebenfalls durch kristallographische Daten von **4** gebunden an K-Ras^{G12C} bestätigt.^[71] Der Inhibitor besetzt die Nukleotidbindetasche in einer Orientierung ähnlich zu GDP und bindet kovalent an Cys12, wobei Switch I und Switch II eine offene, inaktive Konformation einnehmen, die unfähig zur Effektorbindung ist. In einem massenspektrometrischen Kontrollexperiment in Lysat aus K-Ras^{G12C}-mutierten Zellen wurden lediglich zwei weitere GTP-bindende Proteine, darunter eine kleine GTPase (Arf-Familie Arl3) markiert, was die Selektivität des Moleküls unter Beweis stellt. Da das Experiment einen Gelfiltrationsschritt zur Entfernung von Nukleotiden enthält, bleibt allerdings offen, ob der Inhibitor mit zellulären Nukleotidkonzentrationen konkurrieren kann.^[71]

Um Zellgängigkeit zu erzielen, wurde das von **4** abgeleitete Phosphoramidat-Derivat SML-10-70-1 (**5**) synthetisiert, welches die Akt- und ERK-Phosphorylierung in H358-Zellen bei einer Konzentration von 100 μ M beeinträchtigt und die Proliferation von H358 und H23 mit K-Ras^{G12C}-Mutation mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 27 μ M bzw. 48 μ M hemmt. Bemerkenswerterweise wirkt **5** aber

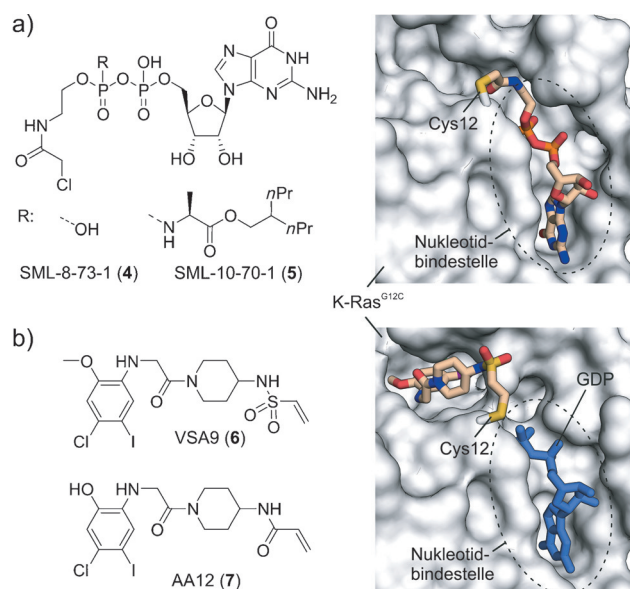


Abbildung 4. Mutantenselektive kovalente Inhibitoren, die an Cys 12 von K-Ras^{G12C} binden: a) Der nukleotidkompetitive Inhibitor **4** und sein zellgängiges Derivat **5**. Verbindung **4** bindet an Cys 12 und besetzt die Nukleotidbindestasche (PDB: 4NMM). b) Der Vinylsulfonamid-basierte Inhibitor **6** und der Acrylamid-basierte Inhibitor **7**. Aus der Kristallstruktur (PDB: 4LYJ) ist zu erkennen, dass die Bindung von **6** an K-Ras^{G12C} eine deutliche Konformationsänderung der Switch-II-Region bewirkt, wodurch eine neue Tasche in direkter Nähe zur Nukleotidbindestasche gebildet wird.

auch antiproliferativ auf A549-Zellen, die eine G12S-Mutation aufweisen, was auf einen zusätzlichen, unselektiven Wirkmechanismus schließen lässt.^[59]

Unter Verwendung der Verankerungsstrategie („tethering“) wurden weitere kovalente Inhibitoren entwickelt, welche die Ras-G12C-Mutation als Ankerpunkt verwenden.^[60] In einer systematischen Untersuchung von 480 Fragmenten, die in der Lage sind, Disulfidbrücken zu bilden, wurden mehrere Moleküle identifiziert, die spezifisch an K-Ras^{G12C}, aber nicht an die Wildtyp-Variante binden. Kristallstrukturen der kovalent gebundenen Moleküle mit K-Ras^{G12C}-GDP zeigen, dass diese nicht in die Nukleotidbindestasche binden, sondern vielmehr in eine neu gebildete Tasche (genannt S-IIP), die von Cys 12 ausgehend entgegen der Nukleotidbindestelle liegt und hauptsächlich durch die Reste der Switch-II-Region gebildet wird. Darauf aufbauend wurden verschiedene Derivate mit Acrylamid- und Sulfonamid-Funktionen als elektrophile Gruppen synthetisiert und sukzessive optimiert. Diese Verbindungen reagieren mit mutiertem K-Ras^{G12C}, jedoch nicht mit der Wildtyp-Variante und verringern die Konzentration an aktiviertem K-Ras-GTP. Das Vinylsulfonamid VSA9 (**6**) und das Acrylamid AA12 (**7**) beeinflussen allosterisch die Nukleotidaffinität von K-Ras und reduzieren die relative GTP-Affinität im Vergleich zu GDP (um etwa Vierfache). Darüber hinaus unterdrücken diese Verbindungen vollständig den SOS-katalysierten Nukleotidaustausch und verhindern damit die Beladung von K-Ras mit GTP. Immunpräzipitationsexperimente zeigen zudem, dass eine Behandlung von K-Ras^{G12C}-mutierten

Zellen eine verringerte Ras-Effektor-Bindung bewirkt. Bemerkenswerterweise reduzieren die Inhibitoren die Lebensfähigkeit der Zellen und fördern Apoptose in verschiedenen K-Ras^{G12C}-mutierten Zelllinien mit unterschiedlicher Wirkstärke. Zellen, denen diese Mutation fehlt, sind hingegen unempfindlich gegenüber den Inhibitoren. In Übereinstimmung mit der Markierungseffizienz *in vitro* zeigt **7** eine mittlere effektive Konzentration $EC_{50} = 0.32 \mu\text{M}$ in K-Ras^{G12C}-mutierten H1792-Zellen.

4. Inhibition der GTPase-GEF-Wechselwirkung

Da kleine GTPasen eine sehr hohe Affinität für ihre Nukleotide aufweisen, werden GEF-Proteine benötigt, um den Nukleotidaustausch zu beschleunigen und so die Aktivierung kleiner GTPasen in Zellen zu ermöglichen.^[6,7] Bei der Nukleotidaustauschreaktion handelt es sich um einen komplexen, mehrstufigen Mechanismus, während dem das GEF die Nukleotidbindestelle der kleinen GTPase umstrukturiert und so die Freisetzung des Nukleotids bewirkt. In einem ersten Schritt bilden die inaktivierte, GDP-gebundene kleine GTPase und das GEF zunächst einen Komplex mit geringer Affinität. Nach dem Freisetzen des Nukleotids bildet sich ein hochaffiner GTPase-GEF-Komplex, der erst durch die Bindung eines neuen Nukleotids wieder aufgelöst werden kann. Da die Bindungsaffinitäten kleiner GTPasen gegenüber GDP und GTP ähnlich groß sind, ist die Aktivierung auf die ca. 10-fach höhere intrazelluläre Konzentration an GTP im Vergleich zu GDP zurückzuführen. Obwohl die Nukleotidaustauschreaktion nicht bei allen GTPasen der Ras-Superfamilie identisch abläuft, lassen sich doch grundsätzliche Gemeinsamkeiten feststellen. Zuerst deformiert das GEF die Phosphatbindestelle (Switch I und P-Loop) der kleinen GTPase, was die Affinität für das Nukleotid reduziert. Anschließend wechselwirkt das GEF mit der Switch-II-Region um den nukleotidfreien Zustand der kleinen GTPase zu stabilisieren (für genauere Informationen und eine bildliche Darstellung des Austauschmechanismus siehe Lit. [6,7]). Die kleinen GTPasen der Ras-Familie werden von GEFs aktiviert, die eine CDC25-Homologiedomäne, sowie ein Ras-Austauschmotiv („Ras exchanger motif“, REM) enthalten. Das RasGEF „Son of Sevenless“ (SOS) nutzt z. B. eine α -Helix, um die Nukleotidbindestelle von Ras aufzubrechen und die Freisetzung des Nukleotids zu ermöglichen.^[42] Im Unterschied zum RasGEF RasGRF1 („Ras guanine nucleotide-release factor 1“) benötigt SOS jedoch die allosterische Bindung von Ras-GTP zur Aktivierung.^[72] GTPasen der Rho-Unterfamilie werden, anders als kleine GTPasen der Ras-Unterfamilie, von einer Vielzahl an GEFs (mehr als 75 GEFs) und GAPs (über 60 GAPs) kontrolliert.^[22] Jedoch wurden trotz der großen Zahl an GEFs bisher lediglich zwei unterschiedliche Aktivierungsdomänen der RhoGEFs identifiziert. Die meisten RhoGEFs, z. B. TrioN, Tiam1 oder LARG, enthalten eine Ddl-Homologiedomäne (über 69 GEFs),^[73] während nur wenige RhoGEFs die kleinen GTPasen der Rho-Unterfamilie mithilfe einer Dock-Homologiedomäne aktivieren (11 Mitglieder).^[74] Die GTPasen der Arf-Familie werden durch ArfGEFs aktiviert, die eine Sec7-Domäne

aufweisen. RCC1 ist das einzige bisher identifizierte RanGEF und katalysiert die GTP-Beladung von Ran. RabGEFs verfügen entweder über eine Vsp9-Domäne oder eine DENN-Domäne, oder sie binden an MSS4, das nach aktuellem Stand der Forschung vermutlich sowohl Chaperon- als auch GEF-Aktivität aufweist.^[75] Da die Aktivierung kleiner GTPasen auf den GEF-vermittelten Nukleotidaustausch angewiesen ist, stellt die GTPase-GEF-Wechselwirkung ein interessantes und wirksames Ziel in der Wirkstoffentwicklung kleiner GTPasen dar.

4.1. Ras-GTPasen

Die ersten Verbindungen, die in der Lage waren, den Nukleotidaustausch von Ras zu stören, waren ursprünglich dafür gedacht, das Nukleotid zu verdrängen (z. B. SCH53239 (**8**), Abbildung 5a). Massenspektrometrische Untersuchungen identifizierten diese Verbindungen jedoch in einem ternären Komplex mit Ras und GDP, und weiterführende NMR-Untersuchungen lokalisierten die Verbindungen in der Nähe der Nukleotidbindetasche.^[76] Um ihre Wasserlöslichkeit und Affinität zu erhöhen wurden weitere Derivate synthetisiert, die in der Lage sind, den RasGRF1 katalysierten Nukleotidaustausch *in vitro* ($IC_{50} = 35\text{--}80\text{ }\mu\text{M}$) zu hemmen.^[77] In Ras-abhängigen Zelllinien konnten bei hohen mikromolaren Konzentrationen ein vermindertes Wachstum und eine reduzierte Signalweiterleitung beobachtet werden, allerdings ist der exakte Wirkmechanismus bis heute ungeklärt, sodass unbeabsichtigte Nebeneffekte nicht auszuschließen sind. Für eine andere Verbindung der SCH-Familie (SCH51344 (**9**), Abbildung 5a), die ursprünglich als Modulator des Ras-Signalweges entdeckt wurde,^[78] wurde kürzlich das humane mutT-Homolog hMTH1 als tatsächliches Zielprotein identifiziert.^[79]

Ausgehend von den Ras-bindenden Epitopen seiner GEFs, wurden gezielt orthosterische Peptide entwickelt, die den Nukleotidaustausch von Ras stören.^[80–82] Das RasGEF SOS bildet einen hochaffinen Komplex mit nukleotidfreiem Ras, nachdem es durch Insertion eines helikalen Haarnadel-Motivs zwischen die Switch-I- und Switch-II-Region die Nukleotidbindetasche aufgebrochen und das Nukleotid freigesetzt hat (Abbildung 6a).^[6,7] Diese α -Helix α H dient als Ausgangspunkt für das Design von peptidbasierten Inhibitoren der Ras-Aktivierung.^[80,81] Stabilisierte α -Helices werden seit einiger Zeit sehr erfolgreich dazu verwendet, Protein-Protein-Wechselwirkungen (PPIs) zu inhibieren. Dabei sind der Wasserstoffbrücken-Ersatz („hydrogen bond surrogates“, HBS) und die hydrophobe Verbrückung („hydrocarbon peptide stapling“) die am weitesten fortgeschrittenen Techniken.^[83,84] HSB3 (**10**) ist ein auf Löslichkeit optimiertes Derivat der Helix α H und wurde als Inhibitor der Ras-SOS-Wechselwirkung entwickelt (Abbildung 6b). Es hat eine mittlere Affinität für die GDP-gebundene ($K_D = 158\text{ }\mu\text{M}$) und die nukleotidfreie (nf) Form von H-Ras ($K_D = 28\text{ }\mu\text{M}$).^[80] Obwohl die Affinität von **10** für Ras-GDP um das ca. 10-fache niedriger ist als die Affinität des Ursprungspoteins SOS, ist die Verbindung in der Lage, den SOS-vermittelten Nukleotidaustausch *in vitro* zu stören. Zudem reduziert **10** die ERK-Aktivierung in serumfreien HeLa-Zellen. Die kürzlich beschriebene hydrophobe Verbrückung derselben Helix α H scheint jedoch einen deutlich größeren Effekt zu haben als der Wasserstoffbrücken-Ersatz. So bindet das hydrophob verbrückte Peptid SAH-SOS1_a (**11**) mit niedriger nanomolarer Affinität an die nukleotidgebundenen Formen von Wildtyp- und mutierten K-Ras-Proteinen ($EC_{50} = 60\text{--}140\text{ nM}$; Abbildung 6b).^[81] Zur großen Überraschung führt der Einbau einer hydrophoben Verbrückung in die α H-Helix zu einer drastisch erhöhten Affinität, selbst im Vergleich zur gesamten katalytischen Domäne von SOS ($K_D(\text{H-Ras-GDP-}$

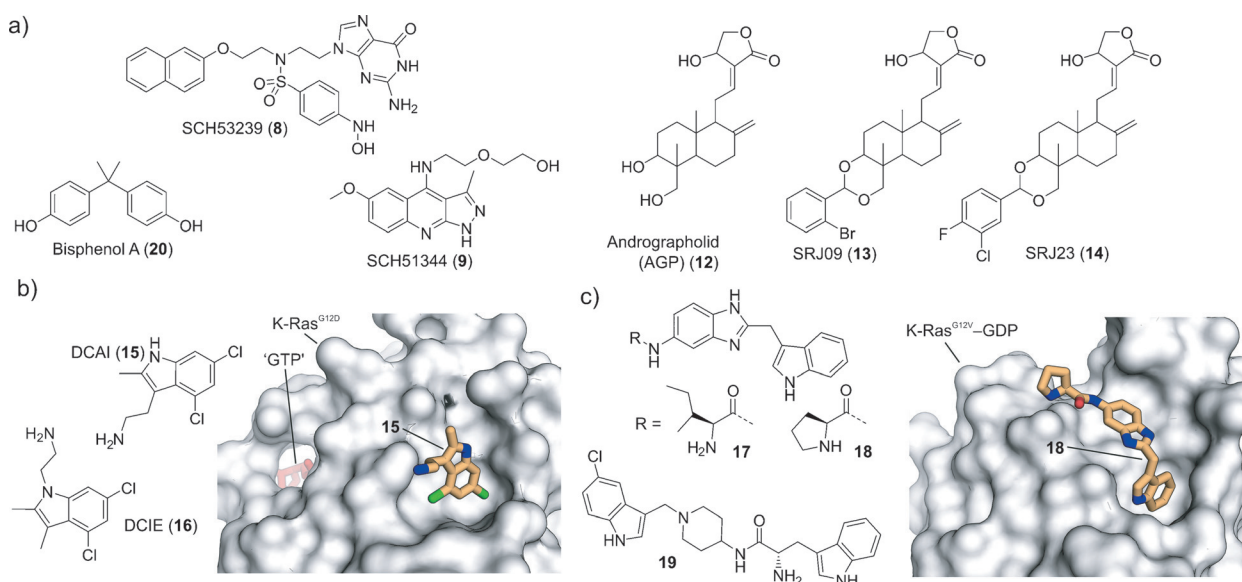


Abbildung 5. Niedermolekulare Inhibitoren der Ras-GEF-Wechselwirkung: a) Strukturformeln der Ras-GEF-Inhibitoren. b) Kristallstruktur von **15** mit K-Ras^{G12D}-GTP (PDB: 4DST). c) Strukturformeln der Fragmente **17–19** und die Kristallstruktur von **18** im Komplex mit K-Ras^{G12V}-GDP (PDB: 4EPY).

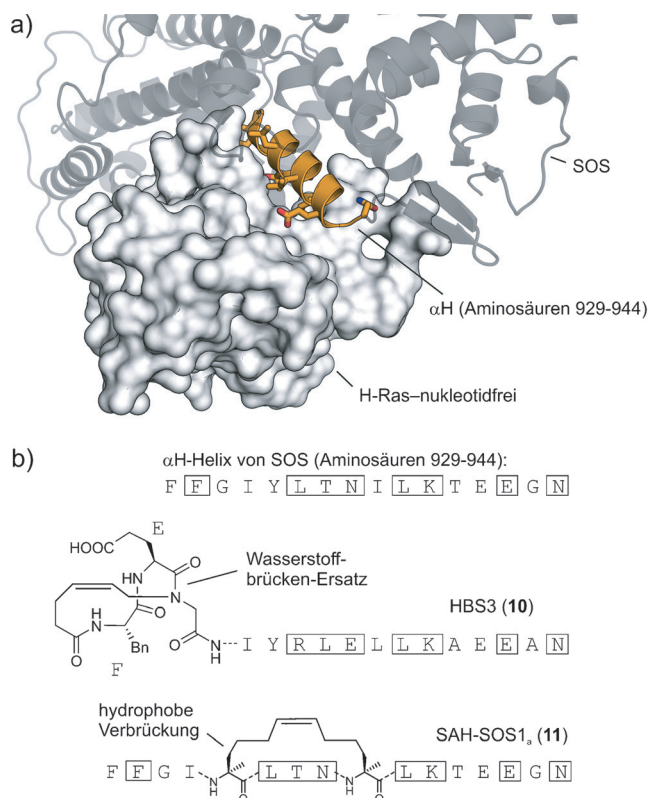


Abbildung 6. Strukturelle Grundlagen für die Inhibition der Ras-SOS-Wechselwirkung: a) Kristallstruktur von nukleotidfreiem Ras (grau) im Komplex mit seinem GEF-SOS (dunkelgrau; PDB: 1NVW). Die Helix α H ist orange hervorgehoben, und die wechselwirkenden Aminosäuren sind explizit gezeigt. b) Schematische Präsentation der α -helikal stabilisierten Peptide **10** und **11** sowie die dazugehörige Ursprungssequenz. Beide Peptide sind von α H abgeleitet. Die wechselwirkenden Aminosäuren sind mit Kästchen gekennzeichnet.

$\text{SOS}_{\text{cat.}} \approx 14.5 \mu\text{M}$).^[85] Obwohl sich die Konformation der Switch-Regionen von K-Ras je nach Nukleotidbindestand ändert, bindet **11** überraschenderweise mit nahezu identischer Affinität an die GDP- und GTP-Form von K-Ras. Obgleich der Einfluss auf den GEF-vermittelten Nukleotidaustausch für **11** nie untersucht wurde, reduziert es die Lebensfähigkeit von K-Ras-abhängigen Zelllinien und stört die Signalweiterleitung in Panc-10.05-Zellen.

Computergestützten Rechnungen und Moleküldynamik-Simulationen zufolge ist die Ras-Oberfläche nicht so starr wie bisher vermutet, sondern sie kann verschiedene kurzlebige Taschen bilden, die eventuell kleine Moleküle binden können.^[39,86,87] Docking-Experimente identifizierten zwei kleine Moleküle, die die Phosphorylierung von ERK und die Ras-GTP-Konzentration in U251-Glioblastomzellen ($\text{IC}_{50} = 10\text{--}30 \mu\text{M}$) reduzieren.^[86] Allerdings müssen weitere Experimente den vorgeschlagenen Wirkmechanismus erst noch bestätigen. Als Bindestelle für den Antitumorwirkstoff Andrographolid (AGP, **12**) und einige seiner Benzyliden-Derivate (Abbildung 5a) wurden bereits zuvor gefundene kurzlebige Taschen auf der Oberfläche von GDP-gebundenem K-Ras vorgeschlagen.^[88] Molekulares Docking platziert **12** in der Ras-GEF-Schnittstelle, wo es die GEF-katalysierte Ras-Aktivierung verhindert. Ebenso wie **12** reduzieren auch die

Derivate SRJ09 (**13**) und SRJ23 (**14**) die Konzentration an Wildtyp-Ras-GTP und die ERK-Phosphorylierung in Zellen. Nach einer Langzeitbehandlung (3 Tage) mit **13** und **14** konnten zudem verminderte Konzentrationen an mutiertem K-Ras^{G12V}-GTP beobachtet werden. Die geringe intrinsische GTPase-Aktivität von mutiertem Ras^{G12V} in Kombination mit der blockierten GEF-Aktivität wird als Ursache für diesen Effekt angenommen. Allerdings kann ein alternativer Mechanismus nicht ausgeschlossen werden.^[88]

Neben den computerchemischen Methoden hat auch die fragmentbasierte Wirkstoffforschung^[89] bisher unbekannte Oberflächentaschen und neue Ligandengerüste hervorgebracht.^[90–92] So wurde eine Fragmentbibliothek mit 3300 Molekülen in einer 1:1-Mischung von K-Ras-GDP und einem nichthydrolysierbaren GTP-Analogon (ab hier 'GTP') mithilfe von NMR-Spektroskopie auf Bindung untersucht.^[90] Die 240 initialen Treffer wurden weiterführend mit 2D-NMR-Spektroskopie getestet, was 25 bestätigte Treffer lieferte, die einer bestimmten Stelle auf der Ras-GTP-Oberfläche zugeordnet werden konnten. Hochaufgelöste Kristallstrukturen mit K-Ras-'GTP' zeigten alle Verbindungen in einer zuvor unbekannten hydrophoben Tasche zwischen Switch I und Switch II. Diese neue Tasche vergrößert sich durch die Bindung der Fragmente und überlappt mit der SOS-Bindestelle. Zwei der gefundenen Verbindungen – DCAI (**15**) und DCIE (**16**) – sind in der Lage, den SOS-vermittelten Nukleotidaustausch sowie die Freisetzung des Nukleotids in vitro zu behindern (Abbildung 5b). Die Bindung von **15** führt zu einer Neuausrichtung zweier Seitenketten, wodurch die Tasche vergrößert wird, und verhindert gleichzeitig die Bildung von zwei essenziellen Salzbrücken, die den Ras-SOS-Komplex stabilisieren. Trotz der geringen Affinität zu K-Ras ($K_D = 1.1 \text{ mM}$) inhibiert **12** sowohl den Nukleotidaustausch als auch die Nukleotidfreisetzung mit moderater Wirksamkeit ($\text{IC}_{50} = 342 \mu\text{M}$ bzw. $155 \mu\text{M}$). Darüber hinaus verhindert **15** in Experimenten an lebenden Zellen die Membranlokalisierung einer fluoreszenzmarkierten Ras-Bindedomäne (RBD) der c-Raf-Kinase (Raf-RBD) mit einem überraschend geringen EC_{50} von $15.8 \mu\text{M}$. Diese Beobachtungen lassen auf einen zusätzlichen Mechanismus, neben der orthosterischen Inhibition der SOS-vermittelten Ras-Aktivierung, in Zellen schließen.

In einer weiteren Studie, in der mittels NMR-Spektroskopie 11 000 Fragmente untersucht wurden, wurden 140 Moleküle identifiziert, die mit millimolarer Affinität direkt an GDP-gebundenes K-Ras^{G12D} binden ($K_D = 1.3\text{--}2.0 \text{ mM}$).^[91] Da diese Verbindungen mit ähnlicher Affinität an Wildtyp-K-Ras und -H-Ras binden, besetzen sie höchst wahrscheinlich eine konservierte Bindestelle, die in allen Ras-Proteinen zu finden ist. Hochaufgelöste Kristallstrukturen mit K-Ras-GDP zeigten die Bindung dieser Verbindungen in dieselbe hydrophobe Tasche, die bereits für **15** identifiziert wurde.^[90] Eine kleine Substanzbibliothek ausgehend von dem initialen Indolgerüst lieferte **17** und **18** als effektive Inhibitoren des SOS-vermittelten Nukleotidaustauschs mit Affinität gegenüber K-Ras-GDP in hohen mikromolaren Konzentrationen ($K_D = 190 \mu\text{M}$ bzw. $340 \mu\text{M}$; Abbildung 5c). Dennoch scheint das Potenzial dieses Indolgerüsts als Startpunkt für eine Vergrößerung des Fragments begrenzt zu sein, da **19** als Aktivator des SOS-katalysierten Nukleotidaustauschs beschrieben

wurde ($EC_{50} = 14 \mu\text{M}$).^[93] Verbindung **19** bindet in eine hydrophobe Tasche der CDC25-Domäne von SOS und erhöht konzentrationsabhängig die zelluläre Ras-GTP-Konzentration. Ein Effekt auf das Ras-spezifische GEF RasGRF1 wurde hingegen nicht beobachtet. Weitere Untersuchungen von **19** sind nötig, da diese Verbindung eine zweiphasige Wirkung zeigt und zudem die AKT- und ERK-Aktivierung weiter unten in der Signalkaskade von Ras in unbekannter Art und Weise reduziert.^[93] Dies betont unter anderem die hohe Komplexität des Ras-Signalnetzwerks. Eine andere fragmentbasierte Untersuchung einer Substanzbibliothek von weniger als 100 Fragmenten identifizierte Bisphenol A (**20**) als Binder von K-Ras und Rheb („Ras homolog enriched in brain“) mit niedriger bis mittlerer Affinität ($K_D = 600 \mu\text{M}$ (K-Ras) bzw. $1830 \mu\text{M}$ (Rheb); Abbildung 5a).^[92] Verbindung **20** stört ebenfalls den SOS-vermittelten Nukleotidaustausch, und molekulares Docking platziert sie in der gleichen Bindetasche wie **15** und **17**. Der stark ausgeprägte hydrophobe Charakter und die vergleichsweise niedrige Bindungsaffinitäten weisen jedoch auf einen möglicherweise unspezifischen Wirkmechanismus von **20** hin.

4.2. Ral-GTPasen

Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurden die Ras-ähnlichen GTPasen RalA und RalB als wichtige Faktoren für verschiedene humane Krebsformen identifiziert.^[41,94,95] Trotz ihrer hohen Sequenzidentität von 82 % übernehmen RalA und RalB unterschiedliche Funktionen beim Tumorwachstum und bei der Bildung von Metastasen.^[96] Während RalA ein wichtiger Faktor bei der Entstehung von Tumoren ist, ist die RalB-Aktivität vor allem wichtig für die Bildung von Metastasen. Da die RalGEFs RalGDS, Rgl und Rgf direkte Effektoren von aktiviertem Ras-GTP sind,^[97] sind sowohl RalA als auch RalB in Ras-abhängigen Tumoren kontinuierlich aktiviert. Ebenso wie für andere kleine GTPasen wurden auch für Ral bisher keine klinisch relevanten Inhibitoren gefunden. Trotzdem zählen Ral-GTPasen zu den interessanten Zielproteinen in der Wirkstoffentwicklung. Mit der Idee, die Ral-Aktivierung durch das Blockieren der Ral-GEF-Wechselwirkung zu verhindern, wurde die RalA-GDP-Kristallstruktur als Ausgangspunkt für die Suche nach Inhibitoren verwendet. Eine strukturbasierte virtuelle Analyse lieferte 88 initiale Treffer, nachdem 500 000 Verbindungen individuell in eine Bindestelle nahe der Switch-II-Region gedockt wurden.^[98] Eine Messung der verbleibenden RalA-GTP-Mengen nach Behandlung mit den jeweiligen Verbindungen identifizierte RBC6 (**21**) und RBC8 (**22**) als wirksame Modulatoren des RalA-GTP-Niveaus in Zellen (Abbildung 7a). Da beide Verbindungen auf demselben chemischen Grundgerüst aufbauen, wurden weitere Derivate synthetisiert und getestet. Dies lieferte BQU57 (**23**), den bisher potentesten Binder von Ral-GTPasen (Abbildung 7a). Mithilfe einer NMR-Analyse von RalB-GDP und **23** konnte die zuvor berechnete Bindestelle bestätigt werden. Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) und Oberflächenplasmonenresonanz-(SPR)-Spektroskopie offenbarten eine niedrige mikromolare Bindungsaffinität ($K_D = 7.7 \mu\text{M}$ bzw. $4.7 \mu\text{M}$). Zudem konnte

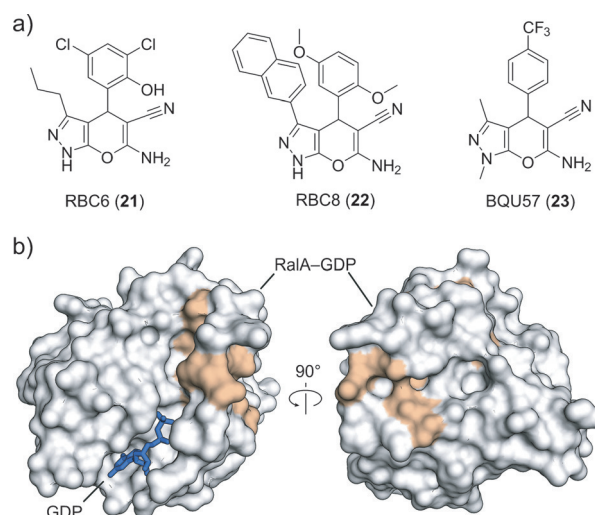


Abbildung 7. Ral-GTPase-Inhibitoren: a) Strukturformeln der Ral-GEF-Inhibitoren **21**, **22** und **23**. b) Kristallstruktur von RalA-GDP (PDB 1U90). Orange eingefärbte Aminosäuren zeigen einen Unterschied der chemischen Verschiebung > +2 s.d. nach Inkubation mit **23** (100 mM). Das Experiment wurde mit RalB-GDP durchgeführt, die betreffenden Aminosäuren wurden auf RalA-GDP übertragen.

keine Bindung an RalB-GTP nachgewiesen werden. Verbindung **23** inhibiert die Koloniebildung von menschlichen Lungenkrebszellen mit $IC_{50} = 1.3\text{--}2.0 \mu\text{M}$ und ist ebenfalls in Xenograft-Mausmodellen von menschlichem Lungenkrebs effektiv. Tumor-Immunblots zeigen eine signifikante Abnahme der aktiven RalA- und RalB-Konzentrationen ohne einen Effekt auf aktives Ras oder RhoA auszuüben.

4.3. Rho-GTPasen

Die kleinen GTPasen der Rho-Unterfamilie, insbesondere Rho, Rac und CDC42, sind Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts sowie von einigen anderen Signalwegen.^[12,13] Rac und Cdc42 haben eine vergleichsweise hohe Sequenzidentität (ca. 70 %) und ein gemeinsames Bindemotiv von ungefähr 15 Aminosäuren, das CRIB-Motiv („Cdc42/Rac-interaktive Bindung“).^[99] Dagegen beträgt die Sequenzidentität von RhoA mit Rac oder Cdc42 lediglich ca. 45 %. Dennoch ist die selektive Modulation von allen drei kleinen GTPasen der Rho-Unterfamilie mithilfe von zahlreichen regulatorischen Proteinen möglich. Die GTPasen der Rho-Familie sind ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort und spielen eine Rolle bei Entzündungen sowie in zahlreichen Schritten der Krebsentstehung.^[22,44] All diese Eigenschaften machen Rho-GTPasen und ihre Signalwege zu interessanten Zielen der Wirkstoffforschung. Jedoch hat sich die Entwicklung von effektiven Inhibitoren für kleine GTPasen der Rho-Familie als äußerst kompliziert erwiesen, sodass sich bisher noch keine Verbindung in klinischen Studien befindet.^[44] Die Untersuchung einer Bibliothek von 570 pharmakologisch aktiven Verbindungen mithilfe der AlphaScreen-Technik lieferte den Topoisomerase-II-Inhibitor Mitoxantron (MTX, **24**) als Breitbandinhibitor aller drei Rho-GTPasen (Abbildung 8a).^[100] Verbindung **24** verhindert die GTP-Beladung

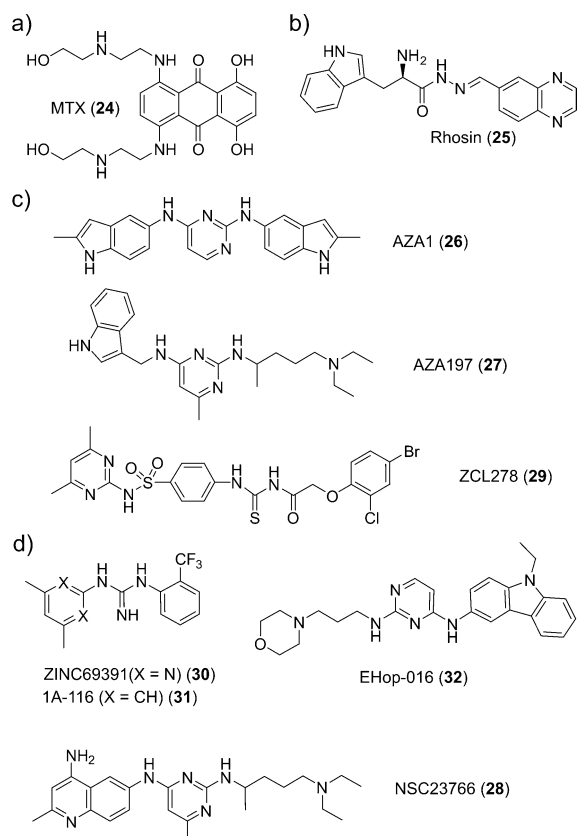


Abbildung 8. Inhibitoren der Rho-Unterfamilie: a) Breitbandinhibitor für RhoA, Cdc42 und Rac1. b) Der Rho-spezifische Inhibitor Rhosin blockiert die Rho-GEF-Wechselwirkung. c) Inhibitoren der Cdc42-GEF-Wechselwirkung. d) Rac-selektive Inhibitoren der Rac-GEF-Wechselwirkung.

von RhoA/Rac1/Cdc42 *in vitro*, und stört die F-Aktin-Reorganisation und die Zellwanderung im Wundheilungsexperiment. Da jedoch jedes Mitglied der Familie der Rho-GTPasen eine bestimmte Funktion bei der Regulierung verschiedener Signalwege hat, sind selektive Inhibitoren anstelle von Breitbandinhibitoren wünschenswert.

4.3.1. RhoA

Um einen RhoA-selektiven Inhibitor zu entwerfen, wurden verschiedene computergestützte Docking-Ansätze angewendet.^[101–104] Eine strukturbasierte virtuelle Selektion identifizierte verschiedene niedermolekulare Verbindungen als potenzielle RhoA-Inhibitoren.^[101] Nachdem die Bindung mithilfe von SPR-Messungen verifiziert wurde, wurden 41 Analoga synthetisiert und auf ihre biologische Aktivität getestet. Zwei Verbindungen verminderten bei niedriger mikromolarer Konzentration ($IC_{50} = 1.2\text{--}1.7\text{ }\mu\text{M}$) die RhoA-Aktivität und verringerten die Phenylephrin(PE)-induzierte Arterienkontraktion. Die weitere Optimierung der Verbindung erhöhte die Löslichkeit und die Fähigkeit, PE-induzierte arterielle Ringkontraktion zu reduzieren.^[102] Allerdings ist der genaue Wirkmechanismus bisher unbekannt, sodass eine weiterführende Untersuchung unerlässlich ist. Ein weiterer virtueller Ansatz identifizierte den Rho-spezifischen

Inhibitor Rhosin (**25**, Abbildung 8b).^[103,104] Die virtuelle Analyse war dabei darauf ausgelegt, niedermolekulare Verbindungen zu identifizieren, die RhoA in der Nähe von Trp58 binden. Eine Analyse der Kristallstruktur von RhoA mit seinem GEF LARG, identifizierte die Bindestelle um Trp58 herum als geeignet, um die GEF-Bindung zu inhibieren.^[105] Trp58 zeichnet dabei einen Grat zwischen zwei flachen Taschen inmitten der GEF-Bindestelle von RhoA. Verbindung **25** besteht strukturell gesehen aus zwei aromatischen Fragmenten, die über einen passenden Linker miteinander verbunden sind. Die Verbindung bindet mit submikromolarer Affinität an RhoA ($K_D = 350\text{ nM}$) und stört die RhoA-GEF-Wechselwirkung.^[103] Dabei hat **25** keinerlei Effekt auf die Rac1- und Cdc42-Aktivierung durch ihre jeweiligen GEFs. Zudem reagiert die Bindung zu RhoA sehr empfindlich auf Punktmutationen im Bereich der erwarteten Bindestelle. Als nahe verwandte Isoformen verfügen RhoB und RhoC über dasselbe Erkennungsmotiv in der Nähe von Trp58 und werden gleichermaßen von **25** inaktiviert. In einer zellbasierten Analyse blockiert **25** die RhoA-spezifische Signalweiterleitung sowie die Bildung von Aktin-Stressfasern, ohne die Signalweiterleitung von Cdc42 oder Rac1 zu beeinflussen. Darüber hinaus ist **25** in der Lage, konzentrationsabhängig das Wachstum von MCF7-Zellen zu inhibieren und die Invasion dieser Brustkrebszellen zu verhindern. Zusätzlich fördert **25** das Neuritenwachstum in neuronalen Zellen.

4.3.2. Cdc42

Wie auch die anderen kleine GTPasen der Rho-Familie, Rho und Rac, kontrolliert auch Cdc42 die Organisation von Aktin und die Zellform. Allerdings sind die Aktivität und Funktion von Cdc42 noch nicht vollständig verstanden, sodass auch nur wenige Modulatoren von Cdc42 bekannt sind.^[106–108] AZA1 (**26**) inhibiert sowohl die Aktivierung von Cdc42 durch seine GEFs als auch die Aktivität von Rac1 (Abbildung 8c).^[106] Der genaue Wirkmechanismus von **26** ist zwar noch unklar, die Verbindung reduziert aber die Bildung von Lamellipodien und Filopodien und die Ausbreitung von Prostatakrebszellen. Zudem verringert **26** die Signalweiterleitung durch p21-aktivierte Kinase (PAK1), AKT und ERK und zeigt positive Effekte in Mausmodellen von humanem Prostatakrebs. Ein Analogon, das auf demselben Grundgerüst wie **26** und der Rac1-Inhibitor NSC23766 (**28**) aufbaut, AZA197 (**27**), zeigt hingegen selektive Inhibition von Cdc42 (Abbildung 8c).^[107] Verbindung **27** blockiert den Nukleotidaustausch von Cdc42 in Dickdarmkrebszellen, ohne einen Effekt auf RhoA oder Rac1 auszuüben. Verbindung **27** reduziert die Wanderung und das Eindringen von Dickdarmkrebszellen, vermindert die PAK1-vermittelte Signalweiterleitung, stört das Tumorstadium und verlängert den Überlebenszeitraum der Tiere in Mausmodellen von humanem Dickdarmkrebs.

Eine virtuelle Analyse von 197 000 Verbindungen identifizierte ZCL278 (**29**) als selektiven niedrig mikromolaren Inhibitor von Cdc42 ($K_D = 11.4\text{ }\mu\text{M}$; Abbildung 8c). Verbindung **29** bindet in eine Furche nahe Phe 56, das essenziell für die GEF-Bindung an Cdc42 ist.^[108] Im Zellexperiment inhibiert **29** die Bildung von Filopodien und reduziert die zellu-

läre Konzentration von aktiviertem Cdc42-GTP. Verbindung **29** verhindert die Wundheilung von humanen Prostatakrebszellen, ohne ihre Lebensfähigkeit zu beeinflussen. Da die Deaktivierung von Cdc42 eine deutlich verringerte Zahl an Neuriten zu Folge hat und die Bildung von Filopodien reduziert,^[109] verhindert eine Behandlung mit **29** die Verzweigung von primären Kortexneuronen. Des Weiteren werden es die Cdc42-selektiven Inhibitoren **29** und **27** ermöglichen, die Cdc42-bedingten Zusammenhänge in Krebs und neurologischen Krankheiten besser zu verstehen.

4.3.3. Rac

Eine strukturelle Analyse der Wechselwirkung zwischen Rac1 und seinen GEFs identifizierte die Region im Umfeld von Trp56 als essenziell für die Bindung von GEFs.^[110] Diese Studie beschreibt Trp56 als wichtigen Faktor der GEF-Bindung (wie Trp58 für RhoA und Phe56 in Cdc42), da unter anderem die Rac1^{W56F}-Mutante nicht mit einigen RacGEFs wechselwirken kann. Im Gegenzug wird die Cdc42^{F56W}-Mutante für RacGEFs zugänglich. Dies unterstreicht die hohe strukturelle Ähnlichkeit zwischen Rac1 und Cdc42. Eine virtuelle Analyse von mehr als 140 000 niedermolekularen Verbindungen identifizierte **28** als Inhibitor der Rac-GEF-Wechselwirkung, der in die flache Tasche um Trp56 herum bindet (Abbildung 8d).^[111] Verbindung **28** inhibiert in vitro selektiv die Wechselwirkung von Rac1 mit seinen GEFs Tiam1 und TrioN mit mittlerer mikromolarer Affinität ($IC_{50} \approx 50 \mu M$). In zellbasierten Analysen hat es zudem keinen Effekt auf die Wechselwirkung zwischen RhoA und Cdc42 mit ihren GEFs. Die Anwendung von **28** auf Prostatakrebszellen reduziert die Bildung von Lamellipodien, die Zellausbreitung und das Eindringen der Tumorzellen in Abhängigkeit seiner Konzentration. Kürzlich erschienene Studien berichten über einen therapeutischen Effekt auf Arthrose in Mäusen, nachdem ihr Rac1-GTP-Niveau mithilfe von **28** gesenkt wurde.^[112] Um eine konstante Freisetzung von **28** zu erreichen, wurden mit **28** ummantelte Hyaluronsäure-Chitosan-Mikrokügelchen wöchentlich in die arthritischen Gelenke injiziert.

Nach den ersten Erfolgen mit **28** wurde versucht, die Affinität und Effektivität der Verbindung weiter zu erhöhen.^[113–115] Aufbauend auf einer weiteren virtuellen Analyse auf der Grundlage der Kristallstruktur von **28** mit Rac1,^[116] wurden weitere Verbindungen mit verschiedenen Grundgerüsten identifiziert, deren IC_{50} -Werte zwischen 12 und 58 μM liegen.^[113] Nahe Analoga von **28**, wie Verbindung **26** und **27**, zeigen jedoch abweichende Selektivität. Sie binden entweder Rac1 und Cdc42 (**26**) oder sind Cdc42-selektiv (**27**).^[106,107] Eine Studie zur Struktur-Affinitäts-Beziehung von **28** führte lediglich zu einer marginalen Verbesserung von Affinität und Effektivität.^[114] Eine andere Docking-Studie war hingegen deutlich erfolgreicher und lieferte ZINC69391 (**30**) und dessen optimiertes Analogon 1A-116 (**31**), das die zelluläre Rac1-GTP-Konzentration mit niedriger mikromolarer Affinität senkt ($IC_{50} = 4.0 \mu M$; Abbildung 8d).^[115] Verbindung **31** inhibiert die Rac-vermittelte Ausbreitung von Tumorzellen in zellbasierten Analysen sowie deren metastatische Aktivität in vivo durch eine Reduktion von 60 % der metastatischen

Lungenkrebskolonien in Mäusen. Der aktuell potenteste Rac-Inhibitor ist EHOp-016 (**32**), das bei niedriger mikromolarer Konzentration eine Inhibition der Rac-Aktivität in Zellen bewirkt ($IC_{50} = 1.1 \mu M$; Abbildung 8d).^[117] Die niedermolekulare Verbindung **32** hat dabei keinen Effekt auf RhoA, reduziert jedoch ebenfalls die Cdc42-Aktivierung bei Konzentrationen über 10 μM . Bei niedrigen Konzentrationen (2 μM) reduziert **32** die Bildung von Lamellipodien und die Zellwanderung signifikant, ohne dabei die Cdc42-vermittelte Bildung der Filopodien zu beeinflussen. In Mausmodellen von Brustkrebs verringert **32** deutlich das Tumorstadium und die Metastasenbildung sowie die Angiogenese.^[118] Im Vergleich zu **28**, kann die Rac1-Inhibition mit **32** mit einer ca. 10–50-fach geringeren Konzentration erreicht werden.^[117]

5. Inhibition von GTPase-Effektor-Wechselwirkungen

Sobald kleine GTPasen mit GTP beladen sind, können sie mit einer Vielzahl an Effektoren wechselwirken, um nachgeschaltete Signalkaskaden zu aktivieren. Die Inhibierung derartiger PPIs ist ein vielversprechender Ansatz, um die Signalübertragung von GTPasen zu beeinflussen, insbesondere in Fällen, in denen Mutationen die Proteine dauerhaft aktivieren. Ein Paradebeispiel ist konstitutiv aktiviertes Ras, bei dem verschiedene Mutationen die GTP-Hydrolyse unterbinden und dadurch zu einer Anreicherung der aktivierten Spezies und anhaltender Signalweiterleitung führen. Sobald sich die kleine GTPase im aktivierten Zustand befindet, ist eine Rückkehr zur inaktivierten Form relativ langsam. Inhibitoren, welche die Beladung mit GTP unterbinden, müssen daher hoch effizient funktionieren, um spürbare Auswirkungen auf nachgeschaltete Signalkaskaden zu haben. Wegen der Bedeutung von konstitutiv aktiviertem Ras für die Entstehung menschlicher Krebserkrankungen wurden zahlreiche Anstrengungen unternommen, Moleküle zu entwickeln, die die Bildung von GTPase-Effektor-Komplexen verhindern. Die therapeutische Wirksamkeit eines solchen Ansatzes wird durch Studien mit Antikörperfragmenten gestützt, die direkt gegen die Effektor-bindende Switch-I-Region von Ras-GTP wirken.^[119] Zellen, die derartige Fragmente exprimieren, zeigen eine eingeschränkte Signalwirkung unterhalb von Ras, was ausreichend ist, um K-Ras-vermittelte Tumorbildung und -wachstum in transgenen Mausmodellen von menschlichem Lungenkrebs zu hemmen.^[120]

5.1. Orthosterische Inhibitoren

5.1.1. Niedermolekulare Ras-Inhibitoren

Das Fehlen geeigneter Bindetaschen auf der Proteinoberfläche und der hochdynamische Charakter der Effektor-Binderegionen stellen gewaltige Hürden für den Einsatz niedermolekularer Inhibitoren dar. Eine Verbindung, die dazu in der Lage ist, die Bildung des Ras-Raf-Komplexes zu hemmen, ist Sulindac-Sulfid (**33**, Abbildung 9a), ein Metabolit des nichtsteroidalen Entzündungshemmers Sulindac.^[121] Eine durch Sulindac inspirierte Molekülbibliothek lieferte Inhibitoren mit 20-fach höherer Wirksamkeit als **33** ($IC_{50} =$

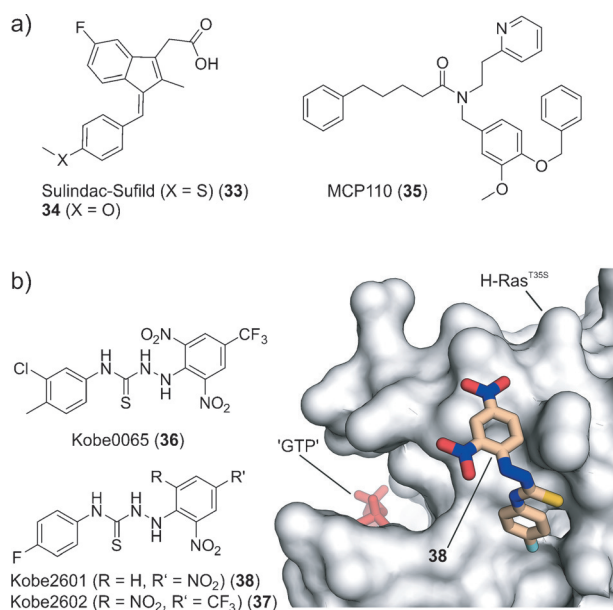


Abbildung 9. Niedermolekulare orthosterische Inhibitoren von Ras-Effektor-Wechselwirkungen: a) Strukturformeln repräsentativer orthosterischer Ras-Inhibitoren. b) Strukturelle Basis für die orthosterische Inhibition durch die Kobe-Verbindungen: Die NMR-spektroskopisch bestimmte Struktur von H-Ras^{T35S}-'GTP' zeigt, dass die Bindestelle von **38** mit der Bindestelle von Effektoren überlappt und zu sterischer Hinderung führen sollte (PDB: 2LWI).

10 μM für die beste Verbindung **34**). ¹⁵N-HSQC-NMR-Verschiebungsexperimente zeigen eine direkte Wechselwirkung zu Ras in direkter Nähe zur Switch-I-Region im Bereich der Effektor-Bindestellen.^[122] Eine andere Klasse von Inhibitoren wurde mit einem Hefe-Zwei-Hybrid-System identifiziert^[123] und im Anschluss weiter optimiert.^[124] Die MCP-Verbindungen stören die Ras-Raf-Wechselwirkung in vitro und in Zellen, reduzieren die ERK-Phosphorylierung und zeigen antiproliferative Wirkung in Zellen, die konstitutiv aktiviertes Ras exprimieren.^[125] Nach intraperitonealer und intravenöser Verabreichung macht MCP110 (**35**) Tumorzellen in Xenograft-Mausmodellen menschlicher Krebserkrankungen empfindlicher für anderen Antikrebswirkstoffe, und es zeigt synergistische Effekte (Abbildung 9a).^[126] Leider fehlt bei diesen älteren Beispielen von GTPase-Effektor-Inhibitoren eine detaillierte biophysikalische Charakterisierung, was eine weitergehende strukturgestützte Optimierung erschwert. Zudem stellt sich die Frage, ob die Aktivität dieser Substanzen zumindest teilweise auf weitere Wechselwirkungen abseits von Ras zurückzuführen ist, da Moleküle wie Sulindac bekanntermaßen mit einer Reihe verschiedener Zielproteine wechselwirken.^[127]

Eine Studie zur Entwicklung orthosterischer Inhibitoren der Ras-Effektor-Wechselwirkungen startete kürzlich mit einer computergestützten Suche nach potenziellen Bindern von M-Ras^{P40D}-'GTP',^[128] einem nahen Verwandten von K-Ras.^[129] Aus einer Bibliothek mit 41 000 niedermolekularen Verbindungen wurden 97 Kandidaten identifiziert und in vitro charakterisiert.^[129] Eines der Moleküle, Kobe0065 (**36**), hemmt dabei die Wechselwirkung von M-Ras^{P40D}-GTP und H-Ras-GTP mit der RBD von c-Raf mit $K_i = 46 \mu\text{M}$ (Abbil-

dung 9b). Eine strukturgestützte Ähnlichkeitssuche in 160 000 Molekülen lieferte 273 weitere Treffer, von denen Kobe2602 (**37**) in vitro bestätigt werden konnte ($K_i = 149 \mu\text{M}$). Da die an der Bindung beteiligten Reste unter Mitgliedern der Ras-Familie stark konserviert sind, wurden die Verbindungen auf ihre Affinität zu anderen kleinen GTPasen untersucht (Abbildung 9b). Laut NMR-Experimenten binden beide Moleküle an M-Ras, Rap2A und RalA aus der Ras-Unterfamilie, jedoch nicht an RhoA oder Cdc42 aus der Rho-Familie. Sowohl **36** als auch **37** interferieren mit verschiedenen Ras-Effektor-Wechselwirkungen in Zellen und stören dosisabhängig die entsprechenden nachgeschalteten Signalwege. Sie verringern den Gehalt an Ras-gebundenem c-Raf-1 und reduzieren die Phosphorylierung von MEK und ERK unterhalb von Raf sowie die RalA-Aktivierung und Akt-Phosphorylierung unterhalb von RalGDS bzw. PI3K.

Während die Verbindungen nicht die Bindung an das aktive Zentrum von SOS blockieren, beeinträchtigen sie die Wechselwirkung von Ras-GTP mit der allosterischen Bindestelle von SOS und dadurch die Beschleunigung der GEF-Aktivität. Diese Ergebnisse decken sich mit NMR-Bindungsexperimenten von Kobe2601 (**38**), einem wasserlöslichen, weniger affinen Analogon, mit H-Ras^{T35S}-'GTP' (Abbildung 9b). Die NOE-Signale deuten auf eine Bindung von **38** in hydrophobe Bindetaschen in direkter Nähe von Switch I und II hin, überlappend mit den Ras-Effektor-Bindestellen. Die Moleküle inhibieren die Koloniebildung und die adhäsionsabhängige Proliferation verschiedener Zelllinien mit konstitutiv aktiviertem Ras und sind zudem aktiv in Xenograft-Mausmodellen menschlicher Tumore.

5.1.2. Peptid-basierte Ras-Inhibitoren

Um dem Fehlen ausgeprägter Bindetaschen und den ausgedehnten unprofilieren Wechselwirkungsflächen Rechnung zu tragen, wurden etliche peptidbasierte Inhibitoren gegen GTPase-Effektor-Komplexe entwickelt. Kurze lineare Peptidsequenzen, die von Raf abgeleitet wurden, dienen als orthosterische Inhibitoren, zeigen jedoch nur moderate Aktivität.^[130] Konformativ stabilisierte Peptide wurden verwendet, um die hochflexiblen Effektor-Binderegionen besser zu adressieren und den Peptiden bessere pharmakologische Eigenschaften zu verleihen. Zwei kombinatorische Bibliotheken cyclisierter Peptide wurden auf die Bindung an K-Ras sowie die Hemmung der K-Ras-c-Raf-Wechselwirkung getestet.^[131,132] Eine 1.5 Millionen Moleküle umfassende Bibliothek bicyclischer Peptide (3–5 variable Reste pro Ring) lieferte vier Moleküle, die an K-Ras-GTP mit Affinitäten im mikromolaren Bereich binden ($K_d = 0.5\text{--}6.8 \mu\text{M}$). Die Peptide zeigen eine Präferenz für den GTP-gebundenen Zustand und inhibieren die Ras-Raf-Wechselwirkung in vitro (beste IC₅₀: 1.4 μM), weisen jedoch kaum antiproliferative Aktivität auf. Dies ist wahrscheinlich auf eine zu geringer Zellgängigkeit zurückzuführen.^[132] Eine andere kombinatorische Bibliothek wurde mit sechs Millionen cyclischen Peptiden bestehend aus einem variable Anteil mit 4–6 Resten und einer FK506-Bindeprotein-12(FKBP)-bindenden Einheit synthetisiert.^[131] In Analogie zu Rapamycin wurde die FKBP-bindende Einheit

eingebaut, um die Bildung eines binären Peptid-FKBP-Komplexes mit potenziell vergrößerter Wechselwirkungsfläche zum Zielprotein zu bewirken.^[133] Etliche Peptid-FKBP-Komplexe sind dazu in der Lage, an Ras zu binden, wobei **39** die Wechselwirkung von K-Ras^{G12V} und Raf-RBD in vitro selbst in Abwesenheit von FKBP mit $IC_{50} = 0.7 \mu M$ unterbindet. Fluoreszenzpolarisations (FP)- und Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Messungen zeigen, dass **39** an K-Ras mit $K_D = 0.83 \mu M$ bindet. Das Peptid hat jedoch keine Auswirkung auf die MEK- oder ERK-Phosphorylierung in Zellen, wahrscheinlich wegen zu geringer Zellgängigkeit (Abbildung 10a). Für eine zweite Generation der kugelumgebundenen Bibliothek wurden monocyclische Peptide aus einem potenziell zellgängigen Motiv in **39** und einer kombinatorischen Peptidsequenz von bis zu fünf Aminosäuren erzeugt.^[134] Unter den 1.6 Millionen Verbindungen der Bibliothek wurden zwei Peptide identifiziert, die K-Ras^{G12V} mit submikromolarer Affinität binden und die Ras-Raf-Wechselwirkung in vitro inhibieren. Eine weitergehende sukzessive Optimierung der Sequenz lieferte hochwirksame Ras-Inhibitoren (beste $IC_{50} = 14 \text{ nM}$) mit variierender zellulärer Aufnahme. Das zellgängige Peptid Cyclorasin 9A5 (**40**) bindet bevorzugt an die GTP-gebundene Form von Ras^{G12V} und inhibiert die Ras-Raf-Wechselwirkung ($IC_{50} = 0.12 \mu M$), laut ¹⁵N-HSQC-NMR-Experimenten durch Wechselwirkung mit den Effektor-Binderegionen von Ras. Die Behandlung verschiedener Krebszelllinien mit **40** unterbindet dosisabhängig die EGF-stimulierte Phosphorylierung von Akt, MEK

und Erk, was darauf hindeutet, dass gleichzeitig verschiedene Signalwege unterhalb von Ras blockiert werden. Eine dreistündige Behandlung von N-Ras^{Q61K}-mutierten H1299-Zellen mit **40** ($10 \mu M$) induziert einen 2.3-fachen Anstieg der Caspase-3-Aktivität sowie gesteigerte Apoptose in Durchflusszytometrie-Experimenten, bewirkt die Abrundung von Zellen und verringert die Zellgröße.

5.1.3. Peptid-basierte Rab-Inhibitoren

Auf der Suche nach Inhibitoren von Rab-PPIs wurden hydrophob verbrückte Peptide („hydrocarbon stapled peptides“)^[135] auf Basis von α -helikalen Bindungsmotiven natürlicher Rab-Wechselwirkungspartner entwickelt.^[136] Beim Einbau hydrophober Seitenkettenverbrückungen („peptide stapling“) werden zwei Windungen einer Helix mittels eines hydrophoben Makrocyclus verbunden, um dadurch die α -helikale Konformation zu stabilisieren.^[84] Um geeignete α -helikale Bindungsdomänen für diesen Ansatz zu identifizieren, wurden in einem ersten Schritt die Kristallstrukturen von Rab-Proteinen mit verschiedenen Partnern auf ihre jeweilige Wechselwirkungsfläche untersucht. Die am besten bewerteten Peptidfragmente wurden auf Bindung zu einer repräsentativen Auswahl von sechs verschiedenen Rab-Proteinen in allen Nukleotid-Bindungszuständen getestet. Vier der Peptide binden nukleotidfreie Rab-Proteine im niedrigen mikromolaren Bereich. Der Einbau von hydrophoben Seitenkettenverbrückungen in diese Peptidsequenzen lieferte eine

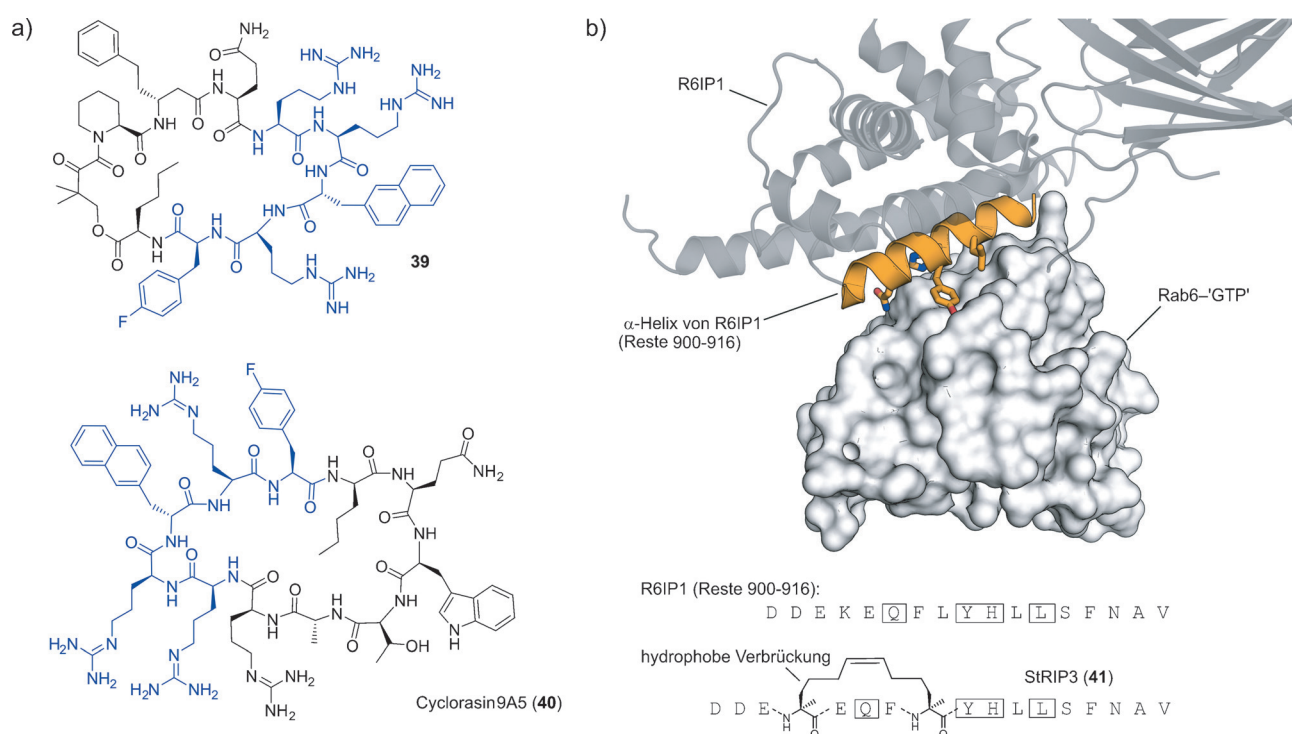


Abbildung 10. Peptidbasierte orthosterische Inhibitoren von GTPase-Effektor-Wechselwirkungen: a) Strukturformeln makrocyclischer orthosterischer Ras-Inhibitoren. Das potenziell zellgängige Motiv ist blau hervorgehoben. b) Kristallstruktur von Rab6-GTP (grau) und seinem Effektor R6IP1 („Rab6-interacting protein 1“, dunkelgrau; PDB: 3CWZ). Die α -Helix, die als Ausgangspunkt für die Synthese hydrophob verbrückter Peptide („hydrocarbon stapled peptides“) dient, ist orange gezeigt (oben). Die Sequenz des hydrophob verbrückten Peptids **41** und die Wildtyp-Sequenz. Wechselwirkende Reste sind hervorgehoben (unten).

Bibliothek stabilisierter Peptide, die eine Auswahl repräsentativer Rab-Proteine im nukleotidfreien Zustand mit variierenden Selektivitäten und Affinitäten bis in den submikromolaren Bereich binden. Bemerkenswerterweise bindet ein Peptid StRIP3 (**41**) selektiv mit $K_D = 22 \mu\text{M}$ an Rab8a in seinem aktivierten, GTP-gebundenen Zustand und inhibiert die Wechselwirkung von Rab8a mit seinem Effektor OCRL1 in vitro (Abbildung 10b). Trotz der moderaten Wirksamkeit unterstreichen diese Ergebnisse das Potenzial, GTP-gebundene, aktivierte kleine GTPasen mit hydrophob verbrückten Peptiden zu adressieren. Das wirft die Frage auf, ob sich das Konzept stabilisierter Wechselwirkungsdomänen, wie stabilisierte Helices oder β -Faltblätter, auch auf die Modulierung von Ras^[137] und anderen konstitutiv aktivierten GTPasen anwenden lässt.

5.2. Allosterische Inhibitoren

Ein anderer Ansatz, die Bildung von Ras-Effektor-Komplexen zu hemmen, macht sich die dynamische Struktur GTP-gebundener Ras-Proteine zunutze. In ³¹P-NMR-Experimenten wurde gezeigt, dass GTP-gebundenes Ras in einem dynamischen Gleichgewicht zweier Konformationszustände existiert, die im Wildtyp von Ras nahezu gleich stark besetzt sind und binnen Millisekunden ineinander übergehen.^[138] Der Zustand 2 ähnelt stark der Konformation, die in Ras-Effektor-Komplexen gefunden wird, und zeigt eine hohe Tendenz zur Effektorbindung. Bei Zustand 1 handelt es sich hingegen um eine Konformation mit um ein bis zwei Größenordnungen reduzierter Affinität für Effektoren.^[38,139] Zustand 1 wird direkt bei der GTP-Bindung während des Nukleotidaustausches gebildet, muss aber in Zustand 2 übergehen, damit Ras funktional wird.^[140] Im Konformationszustand 1 weist Ras einige einzigartige Oberflächenvertiefungen auf, die genutzt werden können, um diesen Zustand allosterisch zu stabilisieren und damit das Gleichgewicht in Richtung der niederraffinen Konformation zu verschieben und die Signalweiterleitung von Ras zu beeinträchtigen. Sowohl Zn²⁺- als auch Cu²⁺-Cyclen-Komplexe binden an H-Ras-‘GTP’ in dessen Zustand 1 mit millimolarer Affinität (Abbildung 11).^[141,142] Die Ergebnisse von ³¹P-NMR-Verschiebungsexperimenten deuten auf zwei Bindestellen hin. Bei der einen koordiniert das Metallion an das γ -Phosphat des Nukleotids. Die andere befindet sich nahe dem C-Terminus und Loop 7, wobei letztere nur geringe Auswirkungen auf die Stabilisierung des Konformationszustands 1 zu haben scheint. Ein- und zweikernige Zn²⁺-Cyclen-Peptidkonjugate wurden synthetisiert, um die Affinität der Komplexe zu erhöhen, führten aber zur Aggregation von Ras.^[143] In einer ähnlichen Studie binden Bis(2-picolyl)amin(BPA)-Komplexe von Zn²⁺ und Cu²⁺ an Ras bei millimolaren Konzentrationen, ebenfalls an zwei unterschiedlichen Bindestellen (Abbildung 11).^[144] Position 2 befindet sich erneut nahe des C-Terminus und hat keinen Einfluss auf die Stabilisierung des Konformationszustands 1. Dagegen befindet sich Bindestelle 1 am aktiven Zentrum, jedoch nicht mehr in direkter Nähe der Nukleotidbindetasche und weist eine mindestens fünffach stärkere Wirksamkeit auf mutiertes Ras^{G12V} auf als die Cyclen-Komplexe. Aufgrund der

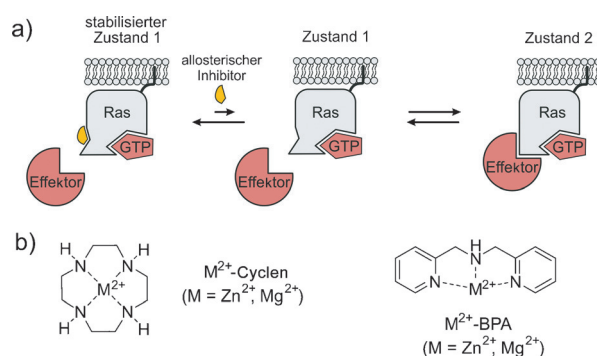


Abbildung 11. Allosterische Inhibitoren von Ras-Effektor-Wechselwirkungen. a) Die Switch-I-Region von GTP-gebundenem Ras nimmt zwei unterschiedliche Konformationen ein, von denen lediglich Zustand 2 die Bindung an Effektoren zulässt. Zustand 1 kann durch Bindung von Molekülen an allosterische Positionen stabilisiert werden, sodass sich das Gleichgewicht in seine Richtung verschiebt und die Signalweiterleitung von Ras unterdrückt wird. b) Strukturformeln von Inhibitoren der Ras-Effektor-Wechselwirkungen.

geringen Affinitäten und schlechten pharmakologischen Eigenschaften zeigen derartige Organometallkomplexe bisher lediglich die prinzipielle Machbarkeit allosterischer Ras-Inhibitoren. Allerdings könnte das Konzept der allosterischen Konformationsstabilisierung möglicherweise auch auf andere kleine GTPasen ausgedehnt werden, da Konformationszustände mit variierender Effektoraffinität auch bei anderen GTPasen in unterschiedlichen Besetzungsverhältnissen existieren.^[140]

6. Stabilisierung von GTPase-Protein-Komplexen

Ein alternativer Ansatz zur Aktivitätsmodulierung kleiner GTPasen basiert auf der Stabilisierung von Komplexen aus kleinen GTPasen und ihren Wechselwirkungspartnern. Moleküle, die an die Oberfläche derartiger Proteinkomplexe binden, können potenziell bestimmte funktionale oder funktionsunfähige Konformationen stabilisieren. Bisher sind Stabilisatoren von PPIs unterrepräsentiert in chemischer Biologie und pharmazeutischer Forschung, obwohl mehrere beeindruckende Beispiele wie Cyclosporin A, FK506 oder Rapamycin das Potenzial dieser Strategie unter Beweis stellen.^[145,146] Der Naturstoff Brefeldin A (BFA, **42**) ist ein wohlbekannter Stabilisator einer GTPase-PPI (Abbildung 12a), und der Einsatz derartiger Substanzen wurde erst kürzlich für andere Familien kleiner GTPasen in Betracht gezogen. Prinzipiell kann ein derartiger Stabilisator dabei helfen, einige der gewaltigen Herausforderungen zu umgehen, die im Feld kleiner GTPasen bestehen. So müssen bei der Stabilisierung eines Protein-Protein-Komplexes nicht große, makromolekulare Wechselwirkungspartner durch niedermolekulare Substanzen verdrängt werden. Auch kann der gebildete Komplex aus kleiner GTPase und Partnerprotein zusätzlich spezifische Bindetaschen aufweisen, die in der Oberflächenstruktur der GTPase alleine gar nicht vorhanden sind.

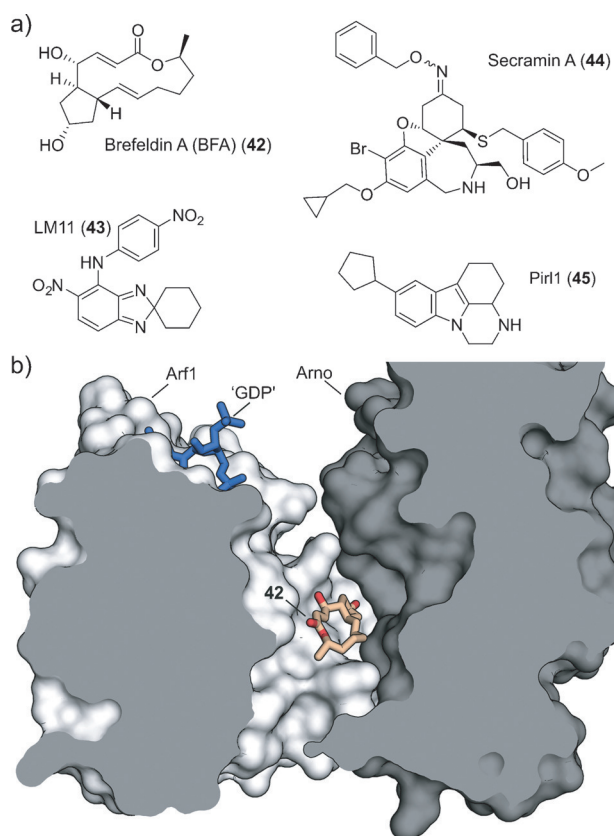


Abbildung 12. Stabilisierung von GTPase-Protein-Wechselwirkungen: a) Strukturformeln verschiedener Stabilisatoren von GTPase-Protein-Wechselwirkungen. b) Schnittbild der Kristallstruktur (PDB: 1R8Q) von **42** (orange) gebunden an die Wechselwirkungsflächen eines Komplexes von Arf1-GDP (grau) und der katalytischen Sec7-Domäne von ARNO (dunkelgrau). Verbindung **42** besetzt eine gemeinsam gebildete Bindetasche in der Kontaktfläche der wechselwirkenden Proteine und stabilisiert einen frühen Übergangszustand der Nukleotidaustauschreaktion.

6.1. Arf-ARNO

Das Paradebeispiel für die Stabilisierung einer GTPase-Protein-Wechselwirkung ist der Pilzmetabolit **42**, der die durch Arf regulierten zellulären Transportprozesse und die Membrantransformation hemmt.^[147] Verbindung **42** ist ein 13-gliedriger Lactonring, der in eine hydrophobe Tasche der Kontaktflächen von Arf-GDP und der katalytischen Sec7-Domäne zugehöriger GEFs, wie ARNO, bindet (Abbildung 12b).^[148] Dabei bindet **42** ausschließlich den ternären Komplex, jedoch weder isoliertes Arf noch die Sec7-Domäne oder den nukleotidfreien Komplex beider Proteine.^[149] Indem ein früher Übergangszustand der Nukleotidaustauschreaktion stabilisiert wird, wirkt **42** als ein nichtkompetitiver Inhibitor. Es blockiert Arf in einem funktionslosen Komplex, der nicht mit dem nächsten Schritt, der Nukleotiddissoziation, fortfahren kann und hemmt dadurch die Arf-Aktivierung und Signalweiterleitung.^[150] Inspiriert durch **42** wurde die Chembridge Datenbank virtuell nach vergleichbaren Stabilisatoren des Arf1-GDP-ARNO^{E156K}-Komplexes durchsucht; dies lieferte Treffer für eine flexible Tasche, die nahe der Kontakt-

flächen der drei Bindungspartner jedoch abseits der Bindestelle von **42** liegt.^[151] Es wurden 17 Moleküle auf die Inhibition von Arf1 und einer speziellen Sec7-Domäne von ARNO getestet, die vier BFA-sensibilisierende Mutationen trägt (ARNO^{4M}). Die wirksamste Verbindung, LM11 (**43**), verringert die apparente Geschwindigkeitskonstante des Nukleotidaustauschs um den Faktor 3.6 (Abbildung 12 a). Im Unterschied zu **42** wirkt **43** über einen nichtkompetitiven Mechanismus. Es bindet sowohl an den Arf1-1- als auch den Arf1-GDP-ARNO-Komplex und hemmt den spontanen ebenso wie den ARNO-katalysierten Nukleotidaustausch. Dabei bewirkt **43** die Bildung eines nicht funktionsfähigen Komplexes, dessen Konformation sich deutlich von der durch **42** stabilisierten unterscheidet. Trotz seiner relativ geringen Inhibitionswirkung zeigt **43** zelluläre Aktivität und blockiert dosisabhängig die durch ARNO vermittelte Migration von MDCK-Zellen.^[151]

6.2. Cdc42-RhoGDI

Die niedermolekulare Verbindung Secramin A (**44**) wirkt vermutlich ebenfalls als PPI-Stabilisator (Abbildung 12 a). Das Molekül wurde durch phänotypisches Screening einer ca. 2500 Verbindungen umfassenden Substanzbibliothek Galanthamin-inspirierter Moleküle^[152] als starker Hemmstoff des Transports vom Golgi-Apparat zur Plasmamembran und der Aktinpolymerisation identifiziert.^[153] Verbindung **44** ist ein Cdc42-spezifischer Hemmstoff, der Cdc42-Effektor-Wechselwirkungen blockiert, aber keinen Einfluss auf den Nukleotidaustausch oder die Nukleotidbindung hat. Sie beeinträchtigt den Transport und die Membranbindung von Cdc42 über einen Mechanismus, der mit dem zugehörigen Guanin-nukleotid-Dissoziationsinhibitor RhoGDI zusammenhängt. Obwohl noch eindeutige strukturelle Belege fehlen, wird davon ausgegangen, dass **44** die Cdc42-RhoGDI-Wechselwirkung stabilisiert und dadurch die kleine GTPase in einem nicht weiter funktionsfähigen Komplex gefangen hält, sodass sie nicht mehr zur Signalweiterleitung zur Verfügung steht.^[153] Verbindung **44** zeigt verschiedene zelluläre Aktivitäten, beispielsweise eine gestörte Polarisation des Golgi-Apparats bei der Zellmigration im Anschluss an Verletzungen,^[153] das Hemmen von Zellausbreitung^[154] oder die blockierte Sekretion von Kollagen I durch glatte Gefäßmuskelzellen.^[155] Die strukturell nicht verwandte niedermolekulare Verbindung Pirl1 (**45**) und einige ihrer Derivate blockieren möglicherweise auch die Cdc42-vermittelte Signalweiterleitung, indem sie einen inaktiven Cdc42-RhoGDI-Komplex stabilisieren (Abbildung 12 a).^[156] Obwohl einige experimentelle Daten darauf hindeuten, dass der Wirkmechanismus vom Stabilisieren der Cdc42-RhoGDI-Wechselwirkung abhängt, werden noch weitere stichhaltige Daten benötigt, die diese Theorie stützen.

6.3. Ras-SOS

Vor kurzem wurden niedermolekulare Verbindungen beschrieben, die an den Ras-SOS-Komplex binden und da-

durch den SOS-katalysierten Nukleotidaustausch beschleunigen können.^[93] Dabei wurden Bindetaschen entdeckt, die sich an den Wechselwirkungsflächen beider Proteine befinden. Obwohl ein derartiger Wirkmechanismus nicht zwingend vorteilhaft im Sinne einer onkologischen Therapie ist, zeigen diese Moleküle dennoch die Möglichkeit auf, den Ras-SOS-Komplex direkt zu adressieren. Somit könnten sie einen Startpunkt für die Entwicklung von PPI-Stabilisatoren darstellen.

Auf der Suche nach niedermolekularen Stabilisatoren des Ras-SOS-Komplexes wurde mithilfe von Röntgenkristallstrukturanalyse eine Bibliothek von 1160 Fragmenten auf Bindung untersucht, indem Proteinkristalle von H-Ras im Komplex mit der katalytischen Domäne von SOS (SOS_{cat.}) mit den Substanzen getränkt wurden.^[157] Die Bindung von Fragmenten wurde zusätzlich durch TROSY-HSQC-NMR-Titrations mit einem stabil isotoptenmarkierten H-Ras-SOS-Komplex bestätigt, wobei Dissoziationskonstanten im niedrigen millimolaren Bereich ermittelt wurden. Eine auf SOS identifizierte Bindetasche stimmt mit der Bindestelle überein, die bereits für **19** beschrieben wurde und manche der Fragmente, z. B. **46**, zeigen einen entsprechenden Bindungsmodus (Abbildung 13 a,b).^[93] Die Bindung von ein oder zwei Fragmenten in diese relativ flexible Tasche geht mit geringer Umorientierung von Proteinseitenketten im Vergleich zur nativen H-Ras-SOS_{cat.}-Struktur einher. Im Unterschied zur früheren Studie beschleunigen die Moleküle aber nicht den SOS-katalysierten Nukleotidaustausch.^[157] Eine weitere Fragmentbindestelle befindet sich in einer für das Lösungsmittel weitestgehend unzugänglichen Tasche nahe dem Rand der Protein-Protein-Wechselwirkungsfläche des H-Ras-SOS-Komplex und entspricht einer Bindestelle, die bereits in Studien mit nichtkomplexierten Ras-Proteinen gefunden wurde.^[90,91] Obwohl die Bindung kleiner Moleküle in früheren Untersuchungen die Bindung von SOS sowie den SOS-katalysierten Nukleotidaustausch blockieren konnte, führt die Bindung des vergleichsweise kleineren Fragments **47** an die H-Ras-SOS_{cat.}-Wechselwirkungsfläche zu keiner sterischen Abstoßung oder Beeinträchtigung des Nukleotidaustauschs (Abbildung 13 a,b). Ausgehend von **47** wurden weitere PPI-Stabilisatoren synthetisiert, und die Variation der Sulfonamid-Gruppe lieferte das Fragment **48**. Bemerkenswerterweise bewirkt die Bindung von **48** eine Erweiterung der Bindetasche an der H-Ras-SOS_{cat.}-Wechselwirkungsfläche. Allerdings brachten mehrere Runden Strukturoptimierung keine Moleküle hervor, die den Proteinkomplex deutlich besser stabilisieren können oder funktionale Aktivität aufweisen.^[157] Deshalb wurde eine Reihe kovalenter Inhibitoren synthetisiert, um an das Cys118 von H-Ras in direkter Nähe der Nukleotidbindestasche zu binden. Dieser Rest wird erst im Ras-SOS-Komplex zugänglich, da sich die Bindestasche durch die Bindung von SOS umstrukturiert. Eine Bibliothek von 400 Fragmenten mit potenziell Cystein-reaktiven funktionellen Gruppen wurde mithilfe von Massenspektrometrie auf kovalente Bindung untersucht. Von den identifizierten Treffern zeigte ein *N*-Ethylmaleimid-Fragment günstige Reaktivität und Selektivität für Cys118 gegenüber anderen Cystein- und Histidin-Seitenketten. Eine weitere Ausdehnung des Fragments in eine benachbarte lipophile Tasche sowie der

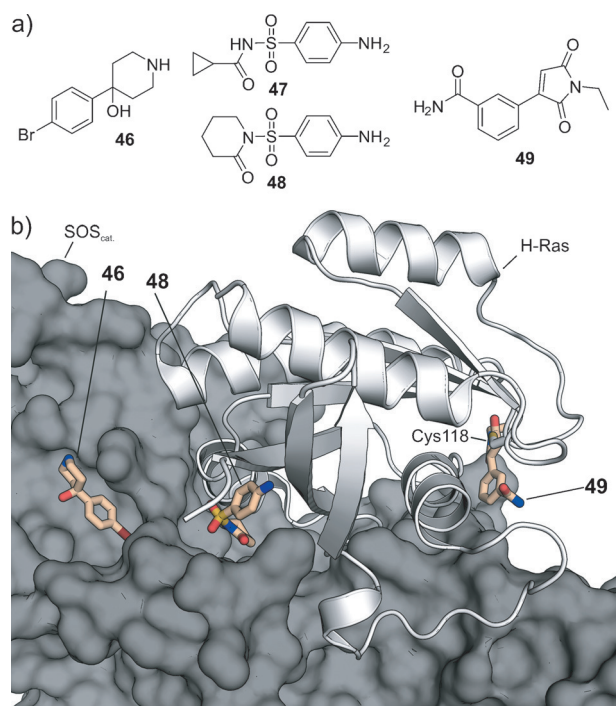


Abbildung 13. Niedermolekulare Binder des Ras-SOS-Komplexes. a) Strukturformeln niedermolekularer Fragmente. b) Überlagerung der Kristallstrukturen von Fragmenten (orange), die an verschiedene Bindestellen des H-Ras-SOS-Komplexes anlagern. **46** bindet an eine abgelegene Tasche (Position A) auf SOS (dunkelgrau; PDB: 4URV), wohingegen die **47** und **48** eine hydrophobe Tasche (Position B) an der Wechselwirkungsfläche des H-Ras-SOS-Komplexes besetzen (PDB: 4URZ). Die Bindung von SOS bewirkt eine Umorientierung der Nukleotidbindestasche von Ras (grau) und macht dadurch die Seitenkette von Cys118 zugänglich für die kovalente Bindung durch **49** (Position C; PDB: 4US2).

Aufbau von Wechselwirkungen mit Glu942 von SOS mündeten in **49**, dessen kovalente Bindung an Cys118 mittels Röntgenstrukturanalyse bestätigt werden konnte (Abbildung 13 a,b).^[157] Wird ein K-Ras-GDP-SOS-Komplex mit den Molekülen vorinkubiert, hemmen sie die Aktivierung von K-Ras in vitro, wohingegen eine Vorinkubation mit K-Ras-GDP oder SOS alleine nur einen moderaten Effekt bewirkt. Zudem wirkt **49** sowohl auf die Wildtyp-Variante von K-Ras als auch auf die onkologisch relevanten Mutanten K-Ras^{G12V} und K-Ras^{G12C}. Allerdings wird die inhibitorische Aktivität der Fragmente bereits durch die Anwesenheit von 1 mM DDT aufgehoben, was darauf hindeutet, dass die Moleküle eine höhere Affinität, aber eine geringere elektrophile Reaktivität erfordern.

7. Zusammenfassung

Kleine GTPasen sind wichtige Regulatoren vieler lebenswichtiger zellulärer Funktionen und Prozesse. Eine Fehlregulation dieser zellulären Schalter aufgrund von direkter Mutation, übermäßiger Aktivierung oder Funktionsverlust steht in Verbindung mit einer Vielzahl humaner Krankheiten. In vielen dieser Erkrankungen wurde die An-

häufung von aktivierten, GTP-gebundenen GTPasen als Auslöser identifiziert. Jedoch war es trotz großer Anstrengungen bisher nicht möglich, Medikamente für kleine GTPasen zu entwickeln. Die Modulation von Ras wurde bisher ausschließlich mithilfe von Farnesyltransferaseinhibitoren (FTIs) erreicht, die äußerst vielversprechende Resultate in vorklinischen Studien sowie im Tiermodell zeigten. Die FTIs scheiterten jedoch in klinischen Studien aufgrund fehlender Effektivität im Menschen. Die hohen Erwartungen an die FTIs führten zu einer Stagnation der Ras-fokussierten Forschung, da der mögliche Erfolg der FTIs weitere Ras-Inhibitoren überflüssig erscheinen ließ. Erst nach dem Scheitern der FTIs in klinischen Studien wurde die Forschung zur Entwicklung von Ras-Medikamenten wiederbelebt. Diese Anstrengungen haben zu zahlreichen neuen Ansätzen geführt, z. B. zur Inhibition des GDI-ähnlichen Löslichkeitsfaktors PDE δ , der den Intermembrantransport von Ras aufrecht erhält.^[158] Dieser Ansatz könnte eine selektivere Modulation der räumlichen und zeitlichen Lokalisierung von Ras ermöglichen. In der Zwischenzeit führte ein stark verbessertes Verständnis der Ras-Superfamilie von kleinen GTPasen zur Identifizierung weiterer kleiner GTPasen als interessante Zielproteine in der Wirkstoffentwicklung. In Kombination mit neuen Techniken wurden auf diese Weise zahlreiche neue Modulatoren kleiner GTPasen entwickelt, die in diesem Aufsatz zusammengefasst und diskutiert werden. Die meisten vorgestellten Arbeiten wurden innerhalb des letzten Jahrzehntes durchgeführt, und die steigende Zahl an Veröffentlichungen über kleinen GTPasen in den letzten Jahren bestätigt das neu erwachte Interesse auf diesem Gebiet. Die aktuellen Entwicklungen auf dem Feld der direkten Modulatoren kleiner GTPasen lassen sich in fünf Kategorien zusammenfassen (Abschnitt 7.1–7.5; siehe auch Abbildung 2).

7.1. Nukleotidkompetitive Inhibitoren

Die Nukleotidbindetasche ist bisher die einzige Vertiefung auf der Oberfläche kleiner GTPasen, die für die hochaffine Bindung klassischer niedermolekularer Verbindungen geeignet ist. Im Vergleich zu vielen Kinaseinhibitoren, die die ATP-Bindetasche nutzen,^[47,159] ist die Konkurrenz mit GDP und GTP bei kleinen GTPasen viel anspruchsvoller. Kinasen haben üblicherweise mikromolare Affinitäten gegenüber ATP,^[47] und ihr Nukleotidumsatz liegt mehrere Größenordnungen über dem kleiner GTPasen. Dagegen haben kleine GTPasen eine pikomolare Bindungsaffinität zu GDP und GTP sowie sehr langsame Dissoziationsgeschwindigkeiten („off-rates“). Dies macht die Entwicklung nukleotidkompetitiver Inhibitoren nahezu unmöglich.^[45] Viele der beschriebenen nukleotidkompetitiven Inhibitoren wurden in Hochdurchsatzanalysen bei nichtphysiologischen Nukleotidkonzentrationen identifiziert. Dies begrenzt die Aussagekraft und Verwendungsmöglichkeit dieser Verbindungen für die Entwicklung von GTPase-Inhibitoren. Zwei Inhibitoren der Rho-Unterfamilie, **2** und **3**, wirken nach einem alternativen Wirkmechanismus (Abbildung 3b) und induzieren die Freisetzung des Nukleotids, indem sie einen inaktiven Inhibitor-GTPase-Komplex bilden, nachdem sie an die nukleotidge-

bundene GTPase binden. Dieser Ansatz muss noch weiter untersucht werden, allerdings ist davon auszugehen, dass hohe Nukleotidkonzentrationen den Wirkmechanismus ebenfalls beeinflussen werden und das Gleichgewicht zugunsten des nukleotidgebundenen Zustands verschieben werden. Der Einsatz einer elektrophilen reaktiven Gruppe, die kovalent an die kleine GTPase bindet, könnte in diesem Zusammenhang von großem Nutzen sein. Kovalente Bindung, wie bereits für **4** beobachtet, könnte die Nachteile der nukleotidkompetitiven Verbindungen ausgleichen.

7.2. Inaktivierung kleiner GTPasen durch irreversible kovalente Modifikation

Bakterielle Toxine wie das C3-Exoenzym modulieren die Aktivität kleiner GTPasen der Ras-Superfamilie durch kovalente, posttranslationale Modifikationen, z. B. ADP-Ribosylierung.^[61,62] Das effektive Blockieren bestimmter Signalwege kleiner GTPasen ermöglicht es den Bakterien, dem Immunsystem des Wirts zu entkommen. Die ausgeprägten Effekte unterstreichen, dass kleine GTPasen interessante Ziele für die pharmazeutische Forschung sind, und weitere Arbeiten werden zeigen, ob zellgängige Chimären dieser Exoenzyme für die Humanmedizin geeignet sind.

Bemerkenswerterweise gelang vor kurzem erstmals eine selektive Adressierung der onkogenen Mutante Ras^{G12C} mithilfe niedermolekularer kovalenter Inhibitoren.^[59,60] Die Hemmstoffe nutzen das nur in der Mutante vorhandene nukleophile Thiol von Cys12 zur irreversiblen Bindung. Da onkogene Mutationen der Ras-Unterfamilie meist nur eine Aminosäure betreffen, ist eine Unterscheidung zwischen mutiertem und Wildtyp-Ras sehr schwer zu erreichen. Die kovalente Modifikation des mutierten Restes ist daher ein sehr eleganter Ansatz, die onkogene Ras^{G12C}-Variante gleichzeitig zu inaktivieren und selektiv zu adressieren. Allerdings zeigen die bisher bekannten Substanzen nur die Machbarkeit des Ansatzes, und eine weitergehende Entwicklung ist erforderlich. So weisen insbesondere die nukleotidkompetitiven SML-Verbindungen keine guten pharmakologischen Eigenschaften auf und konkurrieren direkt mit der Nukleotidbindung, was die Frage aufwirft, ob die Nukleotidaustauschraten ausreichend sind, um eine substanzielle inhibitorische Aktivität zu erzielen. Die Verbindungen **6** und **7** sind hier von besonderem Interesse, da sie nicht mit der Nukleotidbindung konkurrieren und die bisher unbekannte Bindetasche S-IIP besetzen.^[60] Die Ergebnisse könnten daher die Entwicklung weiterer kovalenter Inhibitoren für kleine GTPasen inspirieren. Allerdings stellen die geringe Verfügbarkeit oder das vollständige Fehlen geeigneter nukleophiler Reste an der Proteinoberfläche, die als Ankerpunkte für elektrophile Gruppen dienen können, eine große Hürde für die breite Anwendung dieser Strategie dar. Darüber hinaus stellen sich bei der Anwendung kovalenter Wirkstoffe stets die Fragen nach Toxizität und möglichen Nebenwirkungen. Jedoch erlebt das Forschungsfeld kovalenter Inhibitoren ebenso wie das der kleinen GTPasen eine Renaissance, da unerwünschte Effekte besser verstanden werden.^[57,58] So können durch eine sorgfältige Optimierung der Reaktivität

und Selektivität kovalenter Wirkstoffe immer bessere pharmakokinetische Profile erreicht und Nebenwirkungen zunehmend minimiert werden.

7.3. Inhibition der GTPase-GEF-Wechselwirkung

Die Inhibition der GTPase-GEF-Wechselwirkung ist der am meisten untersuchte Ansatz um die Konzentration von aktivierten GTPasen der Ras-Superfamilie zu reduzieren. Zahlreiche verschiedene Inhibitoren für unterschiedliche Unterfamilien wurden in diesem Zusammenhang bereits identifiziert. Allerdings wird über die Frage, ob die GTPase-GEF-Wechselwirkung ein geeignetes Ziel in der Krebstherapie ist, kontrovers diskutiert.^[27,29,31,45] Da die meisten direkten Mutationen von GTPasen ihre Hydrolysefähigkeit beeinträchtigen, könnte der nicht durch GEF vermittelte intrinsische Nukleotidaustausch alleine ausreichend für eine Aktivierung sein. Allerdings ist davon auszugehen, dass das Blockieren der GTP-Beladung durch Inhibition der GTPase-GEF-Wechselwirkung ein wirkungsvoller Ansatz sein kann, falls die Überaktivierung der GTPase durch erhöhte GEF-Aktivität aufgrund von Mutationen in vorgeschalteten Signalkaskaden oder Mutationen der GEFs selbst hervorgerufen wird – vorausgesetzt die GTPase hat noch immer ihre intrinsische und GAP-vermittelte GTP-Hydrolyseaktivität. Dies betrifft vor allem die kleinen GTPasen der Rho- und Ral-Unterfamilie, da diese nur in seltenen Fällen direkt mutiert sind.^[22,95] Dagegen sind Ras-GTPasen in 20–30 % aller humanen Tumoren direkt mutiert und daher weniger zugänglich für die Inhibition der Ras-GEF-Wechselwirkung. Insbesondere für kleine GTPasen der Rho-Unterfamilie könnte die Inhibition der GTPase-GEF-Wechselwirkung eine sinnvolle Strategie sein, um Inhibitoren für klinische Studien zu entwickeln. Die in diesem Zusammenhang identifizierten Bereiche um die essenziellen GEF-Bindestellen, Trp 58, Trp 56 und Phe 56 für Rho, Rac bzw. Cdc42, bieten für diese Ansätze sinnvolle Startpunkte. Weiterführende Arbeiten müssen allerdings zeigen, ob diese Vertiefungen für das Binden hochaffiner und selektiver Verbindungen geeignet sind. Da die GTPasen der Rho-Unterfamilie von mehr als 75 verschiedenen GEFs aktiviert werden, muss ein potenzieller Inhibitor in der Lage sein, mit einer Vielzahl an natürlichen Bindepartnern zu konkurrieren. Der Ral-Inhibitor **23** ist ein erster Startpunkt und weckt die Hoffnung auf verbesserte Möglichkeiten, diesen nachgeschalteten Ras-Signalweg zu modulieren.

7.4. Inhibition von GTPase-Effektor-Wechselwirkungen

Die Entwicklung hochaffiner Binder aktivierter (GTP-gebundener) kleiner GTPasen, die die Wechselwirkung mit Effektorproteinen blockieren, wäre der universellste Ansatz zur Adressierung der Mitglieder der Ras-Superfamilie. Unabhängig von der Ursache für die Überaktivierung der GTPase (Mutation der GTPase, vorgeschaltete Mutationen oder Ausfall der GAPs), unterbricht eine Inhibition der GTPase-Effektor-Wechselwirkungen die Signalweiterleitung.

Allerdings stellen die Konkurrenz zu Effektorproteinen, die Affinitäten im mittleren bis niedrigen nanomolaren Bereich aufweisen, wie auch das Fehlen definierter Bindetaschen große Herausforderungen dar. Die Adressierung von GTPase-Effektor-Wechselwirkungen mittels niedermolekularer Verbindungen war bisher nur mäßig erfolgreich. Die identifizierten Moleküle der Kobe-Familie sind zwar gute Startpunkte, weitere Studien müssen jedoch zeigen, ob sich die gefundenen Bindetaschen auf der Ras-Oberfläche weiter ausdehnen lassen.^[129] In dieser Hinsicht wurden bereits Erfolge mit Bibliotheken von mono- und bicyclischen Peptiden erzielt, die Affinitäten im submikromolaren Bereich erreichen und die Ras-Raf-Wechselwirkung *in vitro* hemmen (Abbildung 10).^[131,132,134] Die Peptide der ersten Generation dieser Inhibitoren waren noch nicht ausreichend zellgängig. Die zweite Generation der so genannten Cyclorazine ist jedoch deutlich verbessert.^[134] Allerdings muss als nächster Schritt die Wirksamkeit der Peptide *in vivo* untersucht werden, um das volle Potenzial dieser vielversprechenden Inhibitoren von Ras-Effektor-Wechselwirkungen abschätzen zu können. Aufgrund ihrer größeren Wechselwirkungsfläche stellen Makrocyclen und konformativ stabilisierte Peptide hochinteressante Verbindungsklassen für die Adressierung von PPIs kleiner GTPasen dar, da sie ausreichende Affinitäten und Selektivitäten zeigen könnten.^[160] Die Entwicklung des hydrophob verbrückten Peptids („stapled peptide“) StRIP3 (**41**) als Inhibitor der Rab8-Effektor-Wechselwirkung^[136] deutet ebenso darauf hin, dass derart modifizierte Makromoleküle als effektive Modulatoren aktivierter kleiner GTPasen wirken können.^[136] Es gilt aber zu zeigen, ob derartige Moleküle nur Ausnahmen darstellen oder ob sich diese Verbindungsklassen generell zur Modulierung kleiner GTPasen einsetzen lassen. Eine weitere interessante Strategie beruht auf allosterischen Hemmstoffen, die kleine GTPasen in GTP-gebundener Form in einer Konformation mit deutlich geringerer Affinität für die Effektorbindung stabilisieren. In seinem inaktiven Zustand 1 zeigt Ras zusätzliche kurzlebige Bindetaschen, die eine spezifische Stabilisierung dieser Konformation ermöglichen. Allerdings weisen die bisher beschriebenen Metallkomplexe zu geringe Affinitäten und ein wahrscheinlich unzureichendes pharmakologisches Profil auf.^[142,144] Alternative Grundgerüste müssen daher zunächst noch das volle Potenzial dieses Ansatzes unter Beweis stellen.

7.5. Stabilisierung von GTPase-Protein-Komplexen

Anstelle der Inhibition der PPIs kleiner GTPasen bietet der entgegengesetzte Ansatz, d. h. die Stabilisierung dieser PPIs, eine weitere vielversprechende Möglichkeit, die Aktivität kleiner GTPasen zu beeinflussen. Kleine GTPasen können in einem funktionsunfähigen Proteinkomplex stabilisiert werden, um ihre Aktivität oder die Signalweiterleitung zu beeinträchtigen. Ein wesentlicher Vorteil dieser Strategie besteht darin, dass die Moleküle nicht mit den hochaffinen Wechselwirkungspartnern kleiner GTPasen in Konkurrenz treten müssen.^[146,161] Zudem bieten die Proteinkomplexe potenziell zusätzliche Bindetaschen, die durch Konforma-

tionsänderungen der Proteine oder an den Wechselwirkungsflächen gebildet werden. Obwohl einige hochwirksame PPI-Stabilisatoren wie Cyclosporin A oder Rapamycin bekannt sind, ist das Feld der PPI-Stabilisierung noch in einer sehr frühen Entwicklungsphase.^[146,161] Dennoch wird das Potenzial dieses Ansatzes im Bereich kleiner GTPasen eindrucksvoll durch den Naturstoff Brefeldin A (**42**) unter Beweis gestellt. Diese Verbindung verhindert die Aktivierung von Arf durch Stabilisierung der Wechselwirkung mit seiner GEF-Domäne Sec7.^[148] Bei einer eigentlich moderaten In-vitro-Affinität verfügt **42** über eine beachtliche zelluläre Aktivität, da es über einen nichtkompetitiven Mechanismus wirkt und Arf in einem inaktiven Komplex mit seinem GEF einfängt. Jüngste Studien von AstraZeneca im Bereich der Ras-SOS-Wechselwirkung bestätigen zudem,^[157] dass die PPI-Stabilisierung einen vielversprechenden generellen Ansatz für die Modulation der Aktivität kleiner GTPasen darstellen könnte.

7.6. Abschließende Anmerkungen

Die direkte Modulation kleiner GTPasen im Allgemeinen und die Modulation von Ras im Speziellen sind äußerst anspruchsvolle Probleme. Zum Teil ist dies darauf zurückzuführen, dass diese Proteine komplexen Rückkopplungsmechanismen und Regulationen unterliegen, die noch nicht komplett verstanden sind.^[27] Ein verbessertes Verständnis dieser regulatorischen Prozesse ist für Ras und andere kleine GTPasen unabdingbar, um gezielt Verbindungen für die klinische Anwendung zu entwickeln. Dazu ist zusätzlich eine bessere Unterscheidung zwischen den verschiedenen Mechanismen der Ras-Überaktivierung in Tumoren nötig, um selektive Verbindungen entwickeln zu können. Die Inhibition der GTPase-GEF-Wechselwirkung ist zwar die am weitesten genutzte Strategie für die Modulation kleiner GTPasen, diese Methode ist jedoch sehr wahrscheinlich nur für eine kleine Gruppe von Tumoren geeignet, falls diese keine Mutation der kleinen GTPase selbst aufweisen. Kovalent inhibierende niedermolekulare Verbindungen haben das Potenzial, effektiv zwischen Wildtyp und mutierten GTPasen zu unterscheiden. Auf diese Weise ist es erstmals möglich, mutiertes Ras (Ras^{G12C}) selektiv zu inhibieren, ohne einen Effekt auf die Wildtyp-Form auszuüben. Berücksichtigt man, dass kovalente Inhibitoren für unterschiedliche EGFR-Mutanten bereits in klinischen Studien sind, ist eine Anwendung kovalenter Ras-Inhibitoren denkbar.^[162]

Das Adressieren und Modulieren von Ras und anderen kleinen GTPasen ist höchstwahrscheinlich ein langwieriger Prozess, bei dem mit keinem schnellen Durchbruch zu rechnen ist. Daher sind neuartige und unorthodoxe Strategien, auch wenn sie nicht direkt zum Ziel führen, von großer Bedeutung. In diese Kategorie gehört die Suche nach Ras-De-stabilisatoren, die das Niveau an funktionellem Ras in Zellen senken,^[163] oder das Design einer E3-Ubiquitin-Ligase, die selektiv K-Ras ubiquitiniert und auf diese Weise abbaut.^[164]

Nach den Rückschlägen für Strategien wie die Lipidierung und posttranslationale Modifikationen durch Verbindungen wie FTIs erlebt das Gebiet der kleinen GTPasen

zurzeit eine Renaissance durch neue Strategien zur PPI-Inhibition. Dazu gehören unter anderem fragmentbasierte Ansätze, stabilisierte Sekundärstrukturen und Makrocyclen. In diesem Zusammenhang mag es sinnvoll sein, manche Ansätze, die bereits in den 1990er Jahren angefangen und im Zuge der FTI-Studien abgebrochen wurden, zu reaktivieren. Die heutigen Molekülbibliotheken der Industrie unterscheiden sich sehr von den Bibliotheken der 1990er Jahre, sodass eine erneute Untersuchung auf Inhibitoren oder Stabilisatoren von PPIs kleiner GTPasen durchaus erfolgsversprechend sein könnte. Vor allem die Stabilisierung von PPIs könnte eine sinnvolle Strategie sein, um als pharmakologisch nicht adressierbar („undruggable“) geltende Proteine wie die kleinen GTPasen zu modulieren. So können die Proteinkomplexe neue Taschen zur Bindung von Molekülen bilden. Zudem erfolgt die Inaktivierung der Zielproteine nichtkompetitiv, sodass der Inhibitor nicht mit hochaffinen und optimierten Bindungspartnern konkurrieren muss. Die Suche nach PPI-Stabilisatoren ist aktuell eine unterrepräsentierte Technik für die Modulation von PPIs. Angesichts des Erfolgs der bereits identifizierten PPI-Stabilisatoren kann es sinnvoll sein, diese Strategie noch einmal zu überdenken.

Grundsätzlich wurde das Gebiet der kleinen GTPasen, und insbesondere die Ras-Forschung, im Laufe des letzten Jahrzehnts stark belebt. Dabei wurden zahlreiche neue Erkenntnisse gewonnen, die neue Ansätze ermöglichen. Da sich diese Proteinklasse bisher hartnäckig gegen die Modulation durch niedermolekulare Verbindungen wehrt, ist es äußerst unwahrscheinlich, dass eine einzige Verbindung die bestehenden Probleme lösen wird. Ermutigt durch jüngste Erfolge bei der Modulation kleiner GTPasen der Ras-Superfamilie, erscheint es jedoch als nicht ausgeschlossen, dass Krankheiten, die auf Fehlfunktionen kleiner GTPasen beruhen, schließlich mithilfe einer Kombination verschiedener Strategien heilbar werden. Dieses äußerst diverse und komplexe Feld präsentiert zahlreiche Herausforderungen unterschiedlicher Schwierigkeitsgrade, und auch wenn nicht alle davon zu bewältigen sein werden, sind wir doch optimistisch, dass sich mit den aktuellen Strategien vielversprechende Erfolge erzielen lassen.

Danksagung

P.M.C. bedankt dich bei der Studienstiftung des Deutschen Volkes für seine Förderung. J.S. dankt den Fonds der Chemischen Industrie für finanzielle Unterstützung. T.N.G. dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG, Emmy Noether-Programm GR3592/2-1) sowie AstraZeneca, Bayer CropScience, Bayer HealthCare, Boehringer Ingelheim, Merck KGaA und der Max-Planck-Gesellschaft für ihre Unterstützung. Unsere Forschung wurde zudem von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 642) gefördert.

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13516–13537
Angew. Chem. **2015**, *127*, 13718–13741

[1] A. Wittinghofer, I. R. Vetter, *Annu. Rev. Biochem.* **2011**, *80*, 943–971.

- [2] a) D. D. Leipe, Y. I. Wolf, E. V. Koonin, L. Aravind, *J. Mol. Biol.* **2002**, *317*, 41–72; b) G. Bange, I. Sinning, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2013**, *20*, 776–780.
- [3] W. M. Oldham, H. E. Hamm, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 60–71.
- [4] J. P. Overington, B. Al-Lazikani, A. L. Hopkins, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 993–996.
- [5] I. R. Vetter, A. Wittinghofer, *Science* **2001**, *294*, 1299–1304.
- [6] J. L. Bos, H. Rehmann, A. Wittinghofer, *Cell* **2007**, *129*, 865–877.
- [7] J. Cherfils, M. Zeghouf, *Physiol. Rev.* **2013**, *93*, 269–309.
- [8] a) I. M. Ahearn, K. Haigis, D. Bar-Sagi, M. R. Philips, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, *13*, 39–51; b) A. Gorfe, *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 1–9.
- [9] K. Wennerberg, K. L. Rossman, C. J. Der, *J. Cell Sci.* **2005**, *118*, 843–846.
- [10] D. Vigil, J. Cherfils, K. L. Rossman, C. J. Der, *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 842–857.
- [11] G. W. Reuther, C. J. Der, *Curr. Opin. Cell Biol.* **2000**, *12*, 157–165.
- [12] A. Hall, *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 1378–1382.
- [13] S. Etienne-Manneville, A. Hall, *Nature* **2002**, *420*, 629–635.
- [14] A. J. Ridley, *Trends Cell Biol.* **2006**, *16*, 522–529.
- [15] T. Bhuin, J. K. Roy, *Exp. Cell Res.* **2014**, *328*, 1–19.
- [16] J. G. Donaldson, C. L. Jackson, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2011**, *12*, 362–375.
- [17] A. H. Hutagalung, P. J. Novick, *Physiol. Rev.* **2011**, *91*, 119–149.
- [18] M. Zerial, H. McBride, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2001**, *2*, 107–117.
- [19] M. Stewart, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 195–208.
- [20] P. R. Clarke, C. Zhang, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 464–477.
- [21] R. R. Mattingly, *ISRN Oncology* **2013**, *2013*, 1–14.
- [22] F. M. Vega, A. J. Ridley, *FEBS Lett.* **2008**, *582*, 2093–2101.
- [23] I. A. Prior, P. D. Lewis, C. Mattos, *Cancer Res.* **2012**, *72*, 2457–2467.
- [24] a) M. Malumbres, M. Barbacid, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 459–465; b) Y. Pylayeva-Gupta, E. Grabocka, D. Bar-Sagi, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 761–774; c) M. P. Quinlan, J. Settleman, *Future Oncol.* **2009**, *5*, 105–116.
- [25] S. Schubbert, K. Shannon, G. Bollag, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 295–308.
- [26] S. A. Forbes, N. Bindal, S. Bamford, C. Cole, C. Y. Kok, D. Beare, M. Jia, R. Shepherd, K. Leung, A. Menzies, et al., *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39*, D945–D950.
- [27] A. G. Stephen, D. Esposito, R. K. Bagni, F. McCormick, *Cancer Cell* **2014**, *25*, 272–281.
- [28] A. D. Cox, S. W. Fesik, A. C. Kimmelman, J. Luo, C. J. Der, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2014**, *13*, 828–851.
- [29] J. Spiegel, P. M. Croom, G. Zimmermann, T. N. Grossmann, H. Waldmann, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 613–622.
- [30] a) A. T. Baines, D. Xu, C. J. Der, *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 1787–1808; b) R. Nussinov, C.-J. Tsai, C. Mattos, *Trends Mol. Med.* **2013**, *19*, 695–704; c) H. Ledford, *Nature* **2015**, *520*, 278–280.
- [31] W. Wang, G. Fang, J. Rudolph, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 5766–5776.
- [32] G. Cooper, *Science* **1982**, *217*, 801–806.
- [33] S. M. Sebti, A. D. Hamilton, *Oncogene* **2000**, *19*, 6584–6593.
- [34] N. Berndt, A. D. Hamilton, S. M. Sebti, *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 775–791.
- [35] W. H. Chappell, L. S. Steelman, J. M. Long, R. C. Kempf, S. L. Abrams, R. A. Franklin, J. Bäsecke, F. Stivala, M. Donia, P. Fagone, et al., *Oncotarget* **2011**, *2*, 135–164.
- [36] a) P. Lito, N. Rosen, D. B. Solit, *Nat. Med.* **2013**, *19*, 1401–1409; b) P. J. Roberts, C. J. Der, *Oncogene* **2007**, *26*, 3291–3310.
- [37] a) B. Ford, V. Hornak, H. Kleinman, N. Nassar, *Structure* **2006**, *14*, 427–436; b) B. Ford, K. Skowronek, S. Boykevich, D. Bar-Sagi, N. Nassar, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 25697–25705; c) B. E. Hall, D. Bar-Sagi, N. Nassar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 12138–12142; d) H. R. Kalbitzer, M. Spoerner, P. Ganser, C. Hozsa, W. Kremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16714–16719; e) M. Spoerner, A. Nuehs, P. Ganser, C. Herrmann, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Biochemistry* **2005**, *44*, 2225–2236.
- [38] M. Spoerner, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *FEBS Lett.* **2004**, *578*, 305–310.
- [39] P. Prakash, A. A. Gorfe, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **2013**, *1830*, 5211–5218.
- [40] a) A. D. Cox, C. J. Der, *Small GTPases* **2010**, *1*, 2–27; b) L. Goitre, E. Trapani, L. Trabalzini, S. F. Retta, *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1120*, 1–18; c) K. Marcus, C. Mattos, *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 1810–1818; d) A. D. Cox, C. J. Der, M. R. Philips, *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 1819–1827.
- [41] L. R. Gentry, T. D. Martin, D. J. Reiner, C. J. Der, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2014**, *1843*, 2976–2988.
- [42] P. A. Boriack-Sjodin, S. M. Margarit, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, *Nature* **1998**, *394*, 337–343.
- [43] a) L. E. Arias-Romero, J. Chernoff, *Expert Opin. Ther. Targets* **2013**, *17*, 1263–1273; b) J. Downward, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 11–22; c) M. A. Collins, M. P. di Magliano, *Front. Physiol.* **2014**, *4*, 407; d) S. Mitra, K. W. Cheng, G. B. Mills, *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, *22*, 57–68; e) J. Downward, *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 1802–1809; f) A. C. Kimmelman, *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 1828–1834.
- [44] M. Biro, M. A. Munoz, W. Weninger, *Br. J. Pharmacol.* **2014**, *171*, 5491–5506.
- [45] F. McCormick, *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 1797–1801.
- [46] a) T. Noonan, N. Brown, L. Dudycz, G. Wright, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1302–1307; b) R. Wolin, D. Wang, J. Kelly, A. Afonso, L. James, P. Kirschmeier, A. T. McPhail, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1996**, *6*, 195–200.
- [47] I. Becher, M. M. Savitski, M. F. Savitski, C. Hopf, M. Bantscheff, G. Drewes, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 599–607.
- [48] J. John, H. Rensland, I. Schlichting, I. Vetter, G. D. Borasio, R. S. Goody, A. Wittinghofer, *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 923–929.
- [49] J. O. Agola, L. Hong, Z. Surviladze, O. Ursu, A. Waller, J. J. Strouse, D. S. Simpson, C. E. Schroeder, T. I. Oprea, J. E. Golden, et al., *ACS Chem. Biol.* **2012**, *7*, 1095–1108.
- [50] L. Hong, S. R. Kenney, G. K. Phillips, D. Simpson, C. E. Schroeder, J. Noth, E. Romero, S. Swanson, A. Waller, J. J. Strouse, et al., *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 8531–8543.
- [51] Z. Surviladze, A. Waller, Y. Wu, E. Romero, B. S. Edwards, A. Wandinger-Ness, L. A. Sklar, *J. Biomol. Screening* **2010**, *15*, 10–20.
- [52] S. L. Schwartz, M. Tessema, T. Buranda, O. Pylypenko, A. Rak, P. C. Simons, Z. Surviladze, L. A. Sklar, A. Wandinger-Ness, *Anal. Biochem.* **2008**, *381*, 258–266.
- [53] C. Chen, X. Song, S. Ma, X. Wang, J. Xu, H. Zhang, Q. Wu, K. Zhao, J. Cao, J. Qiao, et al., *Int. J. Hematol.* **2015**, *101*, 5–12.
- [54] L. Desire, J. Bourdin, N. Loiseau, H. Peillon, V. Picard, C. de Oliveira, F. Bachelot, B. Leblond, T. Taverne, E. Beausoleil, et al., *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 37516–37525.
- [55] A. Shutes, C. Onesto, V. Picard, B. Leblond, F. Schweighoffer, C. J. Der, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 35666–35678.
- [56] K. Aktories, *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 487–498.
- [57] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 307–317.
- [58] R. Mah, J. R. Thomas, C. M. Shafer, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 33–39.
- [59] S. M. Lim, K. D. Westover, S. B. Ficarro, R. A. Harrison, H. G. Choi, M. E. Pacold, M. Carrasco, J. Hunter, N. D. Kim, T. Xie,

- et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 199–204; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 203–208.
- [60] J. M. Ostrem, U. Peters, M. L. Sos, J. A. Wells, K. M. Shokat, *Nature* **2013**, *503*, 548–551.
- [61] A. Sekine, M. Fujiwara, S. Narumiya, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 8602–8605.
- [62] I. Just, S. C. Huelsenbeck, H. Genth, *Open Toxinol. J.* **2010**, *3*, 19–23.
- [63] H. Genth, R. Gerhard, A. Maeda, M. Amano, K. Kaibuchi, K. Aktories, I. Just, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 28523–28527.
- [64] N. Morii, S. Narumiya, *Methods Enzymol.* **1995**, *256*, 196–206.
- [65] a) P. Aullo, M. Giry, S. Olsnes, M. R. Popoff, C. Kocks, P. Bogquet, *EMBO J.* **1993**, *12*, 921–931; b) H. Barth, R. Roebeling, M. Fritz, K. Aktories, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 5074–5081.
- [66] T. T. G. Ho, S. D. Merajver, C. M. Lapière, B. V. Nusgens, C. F. Deroanne, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 21588–21598.
- [67] a) L. McKerracher, H. Higuchi, *J. Neurotrauma* **2006**, *23*, 309–317; b) E. S. Drummond, J. Rodger, M. Penrose, D. Robertson, Y. Hu, A. R. Harvey, *Restor. Neurol. Neurosci.* **2014**, *32*, 391–402.
- [68] a) L. McKerracher, K. D. Anderson, *J. Neurotrauma* **2013**, *30*, 1795–1804; b) M. G. Fehlings, N. Theodore, J. Harrop, G. Maurais, C. Kuntz, C. I. Shaffrey, B. K. Kwon, J. Chapman, A. Yee, A. Tighe, et al., *J. Neurotrauma* **2011**, *28*, 787–796.
- [69] M. Höltje, S. Djalali, F. Hofmann, A. Münster-Wandowski, S. Hendrix, F. Boato, S. C. Dreger, G. Grosse, C. Henneberger, R. Grantyn, et al., *FASEB J.* **2009**, *23*, 1115–1126.
- [70] a) I. Just, J. Selzer, F. Hofmann, G. A. Green, K. Aktories, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 10149–10153; b) H. Genth, I. Just, *Eur. J. Cell Biol.* **2011**, *90*, 959–965.
- [71] J. C. Hunter, D. Gurbani, S. B. Ficarro, M. A. Carrasco, S. M. Lim, H. G. Choi, T. Xie, J. A. Marto, Z. Chen, N. S. Gray, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 8895–8900.
- [72] T. S. Freedman, H. Sondermann, G. D. Friedland, T. Korteme, D. Bar-Sagi, S. Marqusee, J. Kuriyan, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16692–16697.
- [73] K. L. Rossman, C. J. Der, J. Sondek, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 167–180.
- [74] J.-F. Côté, K. Vuori, *Trends Cell Biol.* **2007**, *17*, 383–393.
- [75] A. Itzen, O. Pylypenko, R. S. Goody, K. Alexandrov, A. Rak, *EMBO J.* **2006**, *25*, 1445–1455.
- [76] a) A. Ganguly, B. N. Pramanik, E. C. Huang, S. Liberles, L. Heimark, Y. H. Liu, A. Tsarbobopoulos, R. J. Doll, A. G. Taveras, S. Remiszewski, et al., *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 817–820; b) A. G. Taveras, S. Remiszewski, R. J. Doll, D. Cesarz, E. C. Huang, P. Kirschmeier, B. N. Pramanik, M. E. Snow, Y. S. Wang, J. del Rosario, et al., *Bioorg. Med. Chem.* **1997**, *5*, 125–133; c) A. K. Ganguly, Y. S. Wang, B. N. Pramanik, R. J. Doll, M. E. Snow, A. G. Taveras, S. Remiszewski, D. Cesarz, J. del Rosario, B. Vibulbhan, et al., *Biochemistry* **1998**, *37*, 15631–15637.
- [77] a) F. Peri, C. Airoidi, S. Colombo, E. Martegani, A. S. van Neuren, M. Stein, C. Marini, F. Nicotra, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1839–1848; b) E. Sacco, S. J. Abraham, A. Palmioli, G. Damore, A. Bargna, E. Mazzoleni, V. Gaponenko, M. Vanoni, F. Peri, *MedChemComm* **2011**, *2*, 396; c) A. Palmioli, E. Sacco, S. Abraham, C. J. Thomas, A. Di Domizio, L. D. Gioia, V. Gaponenko, M. Vanoni, F. Peri, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 4217–4222; d) A. Palmioli, E. Sacco, C. Airoidi, F. Di Nicolantonio, A. D'Urzo, S. Shirasawa, T. Sasazuki, A. Di Domizio, L. D. Gioia, E. Martegani, et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, *386*, 593–597.
- [78] A. B. Walsh, M. Dhanasekaran, D. Bar-Sagi, C. C. Kumar, *Oncogene* **1997**, *15*, 2553–2560.
- [79] K. V. M. Huber, E. Salah, B. Radic, M. Gridling, J. M. Elkins, A. Stukalov, A.-S. Jemth, C. Göktürk, K. Sanjiv, K. Strömberg, et al., *Nature* **2014**, *508*, 222–227.
- [80] A. Patgiri, K. K. Yadav, P. S. Arora, D. Bar-Sagi, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 585–587.
- [81] E. S. Leshchiner, A. Parkhitko, G. H. Bird, J. Luccarelli, J. A. Bellairs, S. Escudero, K. Opoku-Nsiah, M. Godes, N. Perrimon, L. D. Walensky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 1761–1766.
- [82] E. Sacco, D. Metallì, M. Spinelli, R. Manzoni, M. Samalikova, R. Grandori, A. Morrión, S. Traversa, L. Alberghina, M. Vanoni, *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 233–243.
- [83] a) A. L. Jochim, P. S. Arora, *Mol. Biosyst.* **2009**, *5*, 924–926; b) L.-G. Milroy, L. Brunsveld, *Future Med. Chem.* **2013**, *5*, 2175–2183; c) V. Azzarito, K. Long, N. S. Murphy, A. J. Wilson, *Nat. Chem.* **2013**, *5*, 161–173.
- [84] P. M. Cromm, J. Spiegel, T. N. Grossmann, *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1362–1375.
- [85] H. Sondermann, S. M. Soisson, S. Boykevich, S.-S. Yang, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, *Cell* **2004**, *119*, 393–405.
- [86] B. J. Grant, S. Lukman, H. J. Hocker, J. Sayyah, J. H. Brown, J. A. McCammon, A. A. Gorfe, R. K. Srivastava, *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25711.
- [87] A. A. Gorfe, B. J. Grant, J. A. McCammon, *Structure* **2008**, *16*, 885–896.
- [88] H. J. Hocker, K.-J. Cho, C.-Y. K. Chen, N. Rambahal, S. R. Saginiedu, K. Shaari, J. Stanslas, J. F. Hancock, A. A. Gorfe, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 10201–10206.
- [89] P. J. Hajduk, J. Greer, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 211–219.
- [90] T. Maurer, L. S. Garrenton, A. Oh, K. Pitts, D. J. Anderson, N. J. Skelton, B. P. Fauber, B. Pan, S. Malek, D. Stokoe, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 5299–5304.
- [91] Q. Sun, J. P. Burke, J. Phan, M. C. Burns, E. T. Olejniczak, A. G. Waterson, T. Lee, O. W. Rossanese, S. W. Fesik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6140–6143; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6244–6247.
- [92] M. Schöpel, K. F. G. Jockers, P. M. Düppe, J. Autzen, V. N. Potheraveedu, S. Ince, K. T. Yip, R. Heumann, C. Herrmann, J. Scherckenbeck, et al., *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 9664–9672.
- [93] M. C. Burns, Q. Sun, R. N. Daniels, D. Camper, J. P. Kennedy, J. Phan, E. T. Olejniczak, T. Lee, A. G. Waterson, O. W. Rossanese, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 3401–3406.
- [94] N. F. Neel, T. D. Martin, J. K. Stratford, T. P. Zand, D. J. Reiner, C. J. Der, *Genes Cancer* **2011**, *2*, 275–287.
- [95] B. O. Bodemann, M. A. White, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 133–140.
- [96] K.-H. Lim, K. O'Hayer, S. J. Adam, S. D. Kendall, P. M. Campbell, C. J. Der, C. M. Counter, *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 2385–2394.
- [97] a) R. M. F. Wolthuis, J. L. Bos, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1999**, *9*, 112–117; b) L. A. Feig, T. Urano, S. Cantor, *Trends Biochem. Sci.* **1996**, *21*, 438–441.
- [98] C. Yan, D. Liu, L. Li, M. F. Wempe, S. Guin, M. Khanna, J. Meier, B. Hoffman, C. Owens, C. L. Wysoczynski, et al., *Nature* **2014**, *515*, 443–447.
- [99] T. Hakoshima, T. Shimizu, R. Maesaki, *J. Biochem.* **2003**, *134*, 327–331.
- [100] A. Bidaud-Meynard, D. Arma, S. Taouji, M. Laguerre, J. Des-solin, J. Rosenbaum, E. Chevet, V. Moreau, *Biochem. J.* **2013**, *450*, 55–62.
- [101] J. Deng, E. Feng, S. Ma, Y. Zhang, X. Liu, H. Li, H. Huang, J. Zhu, W. Zhu, X. Shen, et al., *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4508–4522.
- [102] S. Ma, J. Deng, B. Li, X. Li, Z. Yan, J. Zhu, G. Chen, Z. Wang, H. Jiang, L. Miao, et al., *ChemMedChem* **2015**, *10*, 193–206.
- [103] X. Shang, F. Marchioni, N. Sipes, C. R. Evelyn, M. Jerabek-Willemsen, S. Duhr, W. Seibel, M. Wortman, Y. Zheng, *Chem. Biol.* **2012**, *19*, 699–710.

- [104] *Methods in Molecular Biology*, Bd. 928 (Hrsg.: Y. Zheng), Humana Press, New York, **2012**.
- [105] R. Kristelly, G. Gao, J. J. G. Tesmer, *J. Biol. Chem.* **2004**, 279, 47352–47362.
- [106] K. Zins, T. Lucas, P. Reichl, D. Abraham, S. Aharinejad, *PLoS ONE* **2013**, 8, e74924.
- [107] K. Zins, S. Gunawardhana, T. Lucas, D. Abraham, S. Aharinejad, *J. Transl. Med.* **2013**, 11, 295.
- [108] A. Friesland, Y. Zhao, Y.-H. Chen, L. Wang, H. Zhou, Q. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 1261–1266.
- [109] E.-E. Govek, S. E. Newey, L. van Aelst, *Genes Dev.* **2005**, 19, 1–49.
- [110] Y. Gao, J. Xing, M. Streuli, T. L. Leto, Y. Zheng, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 47530–47541.
- [111] a) Y. Gao, J. B. Dickerson, F. Guo, J. Zheng, Y. Zheng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, 101, 7618–7623; b) N. Nassar, J. Cancelas, J. Zheng, D. A. Williams, Y. Zheng, *Curr. Top. Med. Chem.* **2006**, 6, 1109–1116.
- [112] S. Zhu, P. Lu, H. Liu, P. Chen, Y. Wu, Y. Wang, H. Sun, X. Zhang, Q. Xia, B. C. Heng, et al., *Ann. Rheum. Dis.* **2015**, 74, 285–293.
- [113] N. Ferri, A. Corsini, P. Bottino, F. Clerici, A. Contini, *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 4087–4090.
- [114] E. Hernández, A. De La Mota-Peynado, S. Dharmawardhane, C. P. Vlaar, *P. R. Health Sci. J.* **2010**, 348–356.
- [115] G. Cardama, M. Comin, L. Hornos, N. Gonzalez, L. Defelipe, A. Turjanski, D. Alonso, D. Gomez, P. Menna, *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2014**, 14, 840–851.
- [116] Y. Zheng, N. Nassar, K. R. Skowronek, *GTPase Inhibitors and Methods of Use and Crystal Structure of Rac-1 GTPase*, **2007**; siehe WO2007/016539.
- [117] B. L. Montalvo-Ortiz, L. Castillo-Pichardo, E. Hernández, T. Humphries-Bickley, A. De La Mota-Peynado, L. A. Cubano, C. P. Vlaar, S. Dharmawardhane, *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 13228–13238.
- [118] L. Castillo-Pichardo, T. Humphries-Bickley, C. De La Parra, I. Forestier-Roman, M. Martinez-Ferrer, E. Hernandez, C. Vlaar, Y. Ferrer-Acosta, A. V. Washington, L. A. Cubano, et al., *Transl. Oncol.* **2014**, 7, 546–555.
- [119] T. Tanaka, R. L. Williams, T. H. Rabbitts, *EMBO J.* **2007**, 26, 3250–3259.
- [120] T. Tanaka, T. H. Rabbitts, *Oncogene* **2010**, 29, 6064–6070.
- [121] a) P. J. Pasricha, A. Bedi, K. O'Connor, A. Rashid, A. J. Akhtar, M. L. Zahurak, S. Piantadosi, S. R. Hamilton, F. M. Giardiello, *Gastroenterology* **1995**, 109, 994–998; b) C. Herrmann, C. Block, C. Geisen, K. Haas, C. Weber, G. Winde, T. Mörry, O. Müller, *Oncogene* **1998**, 17, 1769–1776.
- [122] a) O. Müller, E. Gourzoulidou, M. Carpintero, I.-M. Karaguni, A. Langerak, C. Herrmann, T. Mörry, L. Klein-Hitpaß, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 450–454; *Angew. Chem.* **2004**, 116, 456–460; b) H. Waldmann, I.-M. Karaguni, M. Carpintero, E. Gourzoulidou, C. Herrmann, C. Brockmann, H. Oschkinat, O. Müller, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 454–458; *Angew. Chem.* **2004**, 116, 460–464; c) I.-M. Karaguni, K.-H. Glüsenkamp, A. Langerak, C. Geisen, V. Ullrich, G. Winde, T. Mörry, O. Müller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, 12, 709–713.
- [123] J. Kato-Stankiewicz, I. Hakimi, G. Zhi, J. Zhang, I. Serebriiskii, L. Guo, H. Edamatsu, H. Koide, S. Menon, R. Eckl, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 14398–14403.
- [124] Y. Lu, S. Sakamuri, Q.-Z. Chen, Y.-F. Keng, V. Khazak, K. Illgen, S. Schabbert, L. Weber, S. R. Menon, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 3957–3962.
- [125] V. González-Pérez, D. J. Reiner, J. K. Alan, C. Mitchell, L. J. Edwards, V. Khazak, C. J. Der, A. D. Cox, *J. Mol. Signaling* **2010**, 5, 2.
- [126] N. Skobeleva, S. Menon, L. Weber, E. A. Golemis, V. Khazak, *Mol. Cancer Ther.* **2007**, 6, 898–906.
- [127] H. Zhou, W. Liu, Y. Su, Z. Wei, J. Liu, S. K. Kolluri, H. Wu, Y. Cao, J. Chen, Y. Wu, et al., *Cancer Cell* **2010**, 17, 560–573.
- [128] F. Shima, Y. Ijiri, S. Muraoka, J. Liao, M. Ye, M. Araki, K. Matsumoto, N. Yamamoto, T. Sugimoto, Y. Yoshikawa, et al., *J. Biol. Chem.* **2010**, 285, 22696–22705.
- [129] F. Shima, Y. Yoshikawa, M. Ye, M. Araki, S. Matsumoto, J. Liao, L. Hu, T. Sugimoto, Y. Ijiri, A. Takeda, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, 110, 8182–8187.
- [130] a) D. Barnard, H. Sun, L. Baker, M. S. Marshall, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 247, 176–180; b) G. J. Clark, J. K. Drugan, R. S. Terrell, C. Bradham, C. J. Der, R. M. Bell, S. Campbell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 1577–1581; c) T. R. Brtva, J. K. Drugan, S. Ghosh, R. S. Terrell, S. Campbell-Burk, R. M. Bell, C. J. Der, *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 9809–9812.
- [131] X. Wu, P. Upadhyaya, M. A. Villalona-Calero, R. Briesewitz, D. Pei, *MedChemComm* **2013**, 4, 378.
- [132] P. Upadhyaya, Z. Q. Qian, N. A. A. Habir, D. H. Pei, *Tetrahedron* **2014**, 70, 7714–7720.
- [133] X. Wu, L. Wang, Y. Han, N. Regan, P.-K. Li, M. A. Villalona, X. Hu, R. Briesewitz, D. Pei, *ACS Comb. Sci.* **2011**, 13, 486–495.
- [134] P. Upadhyaya, Z. Qian, N. G. Selner, S. R. Clippinger, Z. Wu, R. Briesewitz, D. Pei, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, DOI: 10.1002/anie.201502763; *Angew. Chem.* **2015**, DOI: 10.1002/ange.201502763.
- [135] Y.-W. Kim, T. N. Grossmann, G. L. Verdine, *Nat. Protoc.* **2011**, 6, 761–771.
- [136] J. Spiegel, P. M. Cromm, A. Itzen, R. S. Goody, T. N. Grossmann, H. Waldmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 2498–2503; *Angew. Chem.* **2014**, 126, 2531–2536.
- [137] A. M. Watkins, P. S. Arora, *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 94, 480–488.
- [138] M. Geyer, T. Schweins, C. Herrmann, T. Prisner, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Biochemistry* **1996**, 35, 10308–10320.
- [139] M. Spoerner, C. Herrmann, I. R. Vetter, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 4944–4949.
- [140] J. Liao, F. Shima, M. Araki, M. Ye, S. Muraoka, T. Sugimoto, M. Kawamura, N. Yamamoto, A. Tamura, T. Kataoka, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, 369, 327–332.
- [141] M. Spoerner, T. Graf, B. König, H. R. Kalbitzer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 334, 709–713.
- [142] I. C. Rosnizeck, T. Graf, M. Spoerner, J. Tränkle, D. Filchtinski, C. Herrmann, L. Gremer, I. R. Vetter, A. Wittinghofer, B. König, et al., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 3830–3833; *Angew. Chem.* **2010**, 122, 3918–3922.
- [143] F. Schmidt, I. C. Rosnizeck, M. Spoerner, H. R. Kalbitzer, B. König, *Inorg. Chim. Acta* **2011**, 365, 38–48.
- [144] I. C. Rosnizeck, M. Spoerner, T. Harsch, S. Kreitner, D. Filchtinski, C. Herrmann, D. Engel, B. König, H. R. Kalbitzer, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 10647–10651; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 10799–10804.
- [145] L.-G. Milroy, T. N. Grossmann, S. Hennig, L. Brunsveld, C. Ottmann, *Chem. Rev.* **2014**, 114, 4695–4748.
- [146] P. Thiel, M. Kaiser, C. Ottmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 2012–2018; *Angew. Chem.* **2012**, 124, 2052–2059.
- [147] J. B. Helms, J. E. Rothman, *Nature* **1992**, 360, 352–354.
- [148] J.-C. Zeeh, M. Zeghouf, C. Grauffel, B. Guibert, E. Martin, A. Dejaegere, J. Cherfils, *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 11805–11814.
- [149] S. Robineau, M. Chabre, B. Antonny, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, 97, 9913–9918.
- [150] a) L. Renault, B. Guibert, J. Cherfils, *Nature* **2003**, 426, 525–530; b) E. Mossessova, R. A. Corpina, J. Goldberg, *Mol. Cell* **2003**, 12, 1403–1411.

- [151] J. Viaud, M. Zeghouf, H. Barelli, J.-C. Zeeh, A. Padilla, B. Guibert, P. Chardin, C. A. Royer, J. Cherfils, A. Chavanieu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10370–10375.
- [152] H. E. Pelish, N. J. Westwood, Y. Feng, T. Kirchhausen, M. D. Shair, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 6740–6741.
- [153] H. E. Pelish, J. R. Peterson, S. B. Salvarezza, E. Rodriguez-Boulan, J.-L. Chen, M. Stamnes, E. Macia, Y. Feng, M. D. Shair, T. Kirchhausen, *Nat. Chem. Biol.* **2006**, *2*, 39–46.
- [154] B. Xu, H. Pelish, T. Kirchhausen, G. B. Hammond, *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 4149.
- [155] J. Lengfeld, Q. Wang, A. Zohlman, S. Salvarezza, S. Morgan, J. Ren, K. Kato, E. Rodriguez-Boulan, B. Liu, *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 1955–1963.
- [156] J. R. Peterson, A. M. Lebensohn, H. E. Pelish, M. W. Kirschner, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 443–452.
- [157] J. Winter, M. Anderson, K. Blades, C. Chresta, K. J. Embrey, G. Fairley, P. Faulder, R. M. V. Finlay, J. G. Kettle, T. Nowak, et al., *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 2265–2274.
- [158] G. Zimmermann, B. Papke, S. Ismail, N. Vartak, A. Chandra, M. Hoffmann, S. A. Hahn, G. Triola, A. Wittinghofer, P. I. H. Bastiaens, et al., *Nature* **2013**, *497*, 638–642.
- [159] J. Zhang, P. L. Yang, N. S. Gray, *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 28–39.
- [160] a) T. A. Hill, N. E. Shepherd, F. Diness, D. P. Fairlie, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 13020–13041; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 13234–13257; b) M. Pelay-Gimeno, A. Glas, O. Koch, T. N. Grossmann, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, DOI: 10.1002/anie.201412070; *Angew. Chem.* **2015**, DOI: 10.1002/ange.201412070.
- [161] L.-G. Milroy, L. Brunsveld, C. Ottmann, *ACS Chem. Biol.* **2013**, *8*, 27–35.
- [162] A. O. Walter, R. T. T. Sjin, H. J. Haringsma, K. Ohashi, J. Sun, K. Lee, A. Dubrovskiy, M. Labenski, Z. Zhu, Z. Wang, et al., *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 1404–1415.
- [163] J. Carver, T. S. Dexheimer, D. Hsu, M.-T. Weng, J. L. Smith, R. Guha, A. Jadhav, A. Simeonov, J. Luo, *PLoS ONE* **2014**, *9*, e103836.
- [164] Y. Ma, Y. Gu, Q. Zhang, Y. Han, S. Yu, Z. Lu, J. Chen, *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 286–294.

Eingegangen am 13. Mai 2015

Online veröffentlicht am 16. Oktober 2015