

Molekularer Mechanismus der Inhibition des Komplexes aus humanem Hsp90 und humanem Cdc37, einem Kinomchaperon-Cochaperon-System, durch das Triterpen Celastrol**

Sridhar Sreeramulu, Santosh Lakshmi Gande, Michael Göbel und Harald Schwalbe*

Die Inhibition der ATPase-Aktivität des Kinomchaperons Hsp90 (Kinom = alle Proteine mit Kinase-Domänen) ist ein wohlbekannter Ansatz für Krebstherapien. Cdc37, ein Co-chaperon von Hsp90 in Säugerzellen, bindet an Proteinkinasen, und seine Expressionsrate ist in einer Reihe von Krebszellen erhöht.^[1,2] Der Komplex der beiden Proteine weist einen K_D -Wert von 1.2 μM auf. Allgemein wird angenommen, dass dieser Komplex die Karzinogenese erhöht, indem er eine Reihe von onkogenen Kinasen in bösartigen Krebszellen stabilisiert. Darüber hinaus üben zumindest in Hefe Cdc37 und Hsp90 auch jeweils allein diese Funktion aus. Mehrere Liganden mit niedrigem Molekulargewicht wurden vor kurzem als Inhibitoren von Cdc37 allein oder dem Hsp90-Cdc37-Komplex und damit als neue Klasse von Tumortherapeutika vorgeschlagen.^[3,4] Aus Gen-basierten Expressionsprofilierungen wurde abgeleitet, dass das Triterpen Celastrol zu einer neuen Klasse von nicht-ATP-kompetitiven Hsp90-Inhibitoren gehört.^[5] Auf der Basis von Immunpräzipitationsexperimenten mit Zelllinien der Bauchspeicheldrüse und von Strukturen, die mittels molekularer Docking-Algorithmen ermittelt wurden, wurde vorgeschlagen, dass Celastrol seine antiproliferierende Aktivität durch Binden an die N-terminale Domäne von Hsp90 (Hsp90_N) ausübt, was das Binden von Hsp90_N an Cdc37 unterdrückt.^[6] In vivo inhibiert Celastrol das Tumorzachstum in von Prostata- oder Bauchspeicheldrüsenkrebs befallenen Nacktmäusen signifikant.^[6,7]

Wir stellen hier unsere detaillierten Studien zur Beantwortung der Frage vor, wie Celastrol den Hsp90-Cdc37-Komplex inhibiert. Dabei wurden die Sequenzen der humanen Proteine untersucht. Mit $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-NMR-Experi-

menten kann die Bindung eines Liganden an ein Zielprotein anhand von Veränderungen der chemischen Verschiebungen (CSP: chemical-shift perturbation) nachgewiesen werden.^[8–10] Zunächst untersuchten wir die Wirkung von Celastrol auf den Komplex aus $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -markiertem Hsp90_N (23 kDa) und unmarkiertem Vollängenprotein Cdc37 (45 kDa) (Abbildung 1 A). Die schnellere transversale Relaxation von Hsp90_N im Komplex (ca. 70 kDa) hat stark verbreiterte NMR-Signale im HSQC-Spektrum zur Folge, was zugleich ein Indiz für die Komplexbildung ist. Die Zugabe von Celastrol führte zur Dissoziation des Komplexes und regenerierte das HSQC-Spektrum von freiem Hsp90_N vollständig – Änderungen der chemischen Verschiebungen, die von einer Bindung von Celastrol an freies Hsp90_N herrühren würden, konnten nicht beobachtet werden (siehe die Hintergrundinformationen 1 (SI 1)) –, weshalb Celastrol den Komplex auf eine andere Art als durch Bindung an Hsp90_N dissoziieren muss.

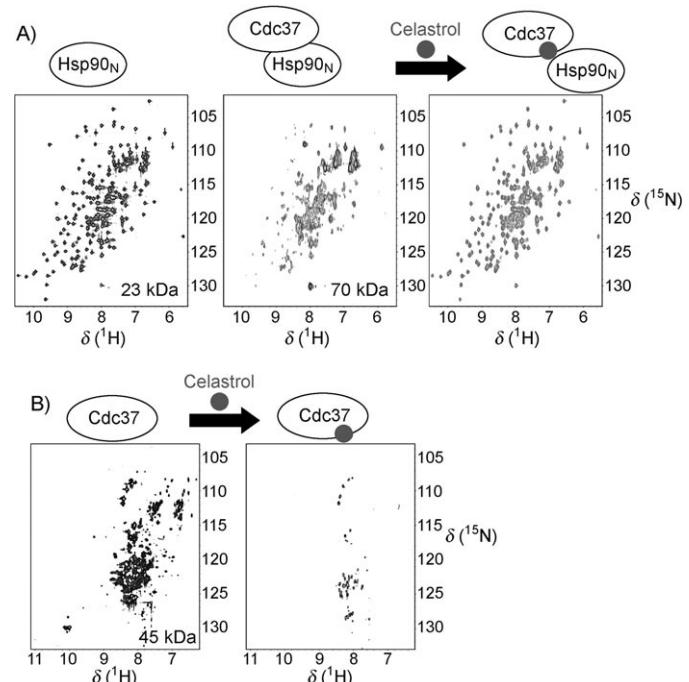


Abbildung 1. Bindung von Celastrol an Cdc37. A) $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren von Hsp90_N (links), dem Hsp90_N-Cdc37-Komplex (Mitte) sowie nach Zugabe von Celastrol zum Komplex (Konzentrationsverhältnis 1:7 Hsp90_N-Cdc37:Celastrol; rechts). B) $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektren des Vollängenkonstrukt von Cdc37 (45 kDa) vor (links) und nach der Zugabe von Celastrol (Konzentrationsverhältnis 1:7 Cdc37:Celastrol; rechts).

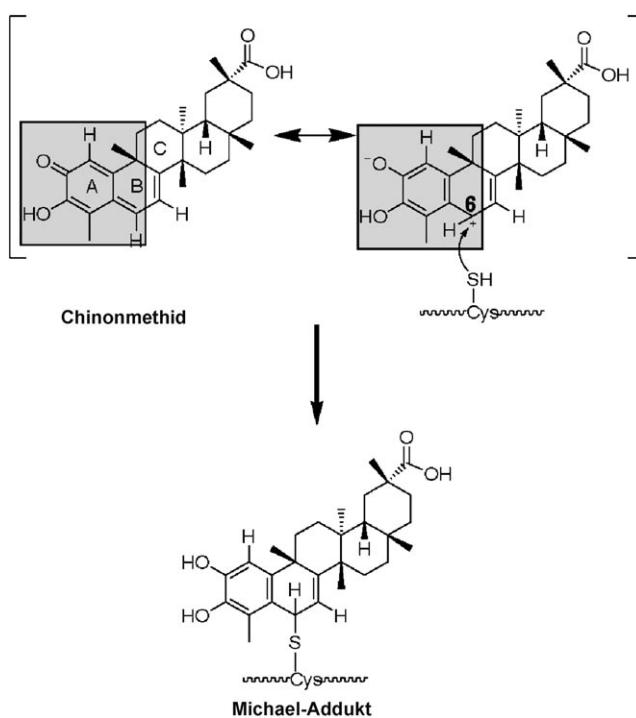
[*] S. Sreeramulu, Dr. S. L. Gande, Prof. Dr. M. Göbel, Prof. Dr. H. Schwalbe
Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main
Institut für Organische Chemie und Chemische Biologie
Zentrum für Biomolekulare Magnetische Resonanz (BMRZ)
Max-von-Laue-Straße 7, 60438 Frankfurt am Main (Deutschland)
Fax: (+49) 69-798-29515
E-Mail: schwalbe@nmr.uni-frankfurt.de
Homepage: <http://schwalbe.org.chemie.uni-frankfurt.de/>

[**] Cdc37: Cell-division-cycle protein 37, Hsp90: Heat-shock protein 90. Wir danken Frédéric Tournay am Jardin Botanique de l'Université Louis Pasteur, Frankreich, für das Bild der Pflanze *Tripterygium wilfordii*. Die Arbeiten wurden vom SPINEII-Projekt der Europäischen Kommission und vom DFG-geförderten Cluster of Excellence: Macromolecular Complex unterstützt.

Hintergrundinformationen (darunter die experimentellen Details) zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200900929> zu finden.

Als Nächstes untersuchten wir die Wechselwirkung von Cdc37 und Celastrol. Abbildung 1B zeigt links das $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum von ^{15}N -markiertem Cdc37. Nach der Zugabe von Celastrol zu Cdc37 waren die meisten NMR-Signale im HSQC-Spektrum verschwunden (Abbildung 1B rechts). Dieses Experiment zeigt an, dass Cdc37 mit dem Liganden eine Wechselwirkung eingeht. Das Verschwinden der NMR-Signale im HSQC-Spektrum könnte durch die Aggregation des Proteins nach der Zugabe von Celastrol verursacht sein. Celastrol ist orangefarben und wird nach der Zugabe von Cdc37 farblos; der Verlust seines Chromophors wurde mittels UV-Spektroskopie quantifiziert^[11] (siehe SI 2).

Celastrol weist in den Ringen A und B elektrophile Positionen auf (Schema 1), die mit nucleophilen Zentren der



Schema 1. Molekularer Mechanismus, wie Celastrol an eine Thiolgruppe des Proteins Cdc37 bindet. Die Chinonmethid-Substruktur von Celastrol ist durch den hellgrauen Kasten hervorgehoben. Eine Cdc37-Thiolgruppe reagiert mit dem Chinonmethid in einer Michael-Reaktion zu einem Addukt an C6.

Aminosäuren unter Bildung eines Michael-Addukts reagieren können.^[7,12,13] Diese Annahme wird bestätigt durch Massenspektren, die zeigen, dass der Massenpeak von Cdc37 nach Zugabe von Celastrol um 450 Da ansteigt, was dem Molekulargewicht von Celastrol entspricht (siehe SI 3).

Um zu verifizieren, dass Celastrol mit Cysteinresten von Cdc37 reagiert, haben wir alle neun Cysteinreste des Vollängenproteins Cdc37 durch Reaktion mit *N*-Ethylmaleimid (NEM) blockiert. NEM-markiertes Cdc37 reagierte nicht mit Celastrol, und beim Mischen der beiden Moleküle kam es zu keiner Änderung im UV-Spektrum, was die Reaktion von Celastrol mit Cysteinresten des Proteins stützt (siehe SI 4). Der Vergleich der Circulardichroismus(CD)-Spektren von

Wildtyp-Cdc37 und Cdc37_NEM ergab eine Abnahme des Anteils an Sekundärstrukturen in Cdc37_NEM, die kovalente Bindung von Celastrol an die Cysteinreste von Cdc37 ändert also die Konformation des Proteins (siehe SI 5). Wir beobachteten zusätzlich, dass sich das HSQC-Spektrum von Hsp90_N nicht ändert, wenn man Cdc37_NEM zugibt, was anzeigt, dass die Blockierung der Cdc37-Thiolgruppen ausreicht, um die Bildung des Hsp90_N-Cdc37-Komplexes zu inhibieren. Auch die freie Aminosäure Cystein kann an Celastrol kovalent addiert werden: Das lipophile Celastrol wird nach Zugabe von Cystein bei einem pH von 7.4 wasserlöslich, verliert seine Absorption bei 440 nm und weist Änderungen im 1D- ^1H -NMR-Spektrum auf, die in Einklang mit der Bildung eines Michael-Addukts an C6 im Ring B sind (siehe SI 6).

Die Bildung von Michael-Addukten, bei denen Cystein-Thiolgruppen als Nucleophil fungieren, ist stark pH-abhängig. Unter physiologischen Bedingungen ist die Reaktion schnell und reversibel, deshalb kann der Ligand vermutlich der hohen Glutathionkonzentration in Zellen (0.5–10 mM) ausweichen und so das Zielprotein erreichen.^[14]

Cdc37 besteht aus drei Domänen, einer N-terminalen Kinasebindedomäne (Cdc37_N, Aminosäurereste 1–126) mit drei freien Cysteinresten, einer mittleren Hsp90_N-Bindedomäne (Cdc37_M, Aminosäurerester 147–276) mit vier freien Cysteinresten und einer C-terminalen Domäne unbekannter Funktion (Cdc37_C, Aminosäurerester 282–376) mit zwei freien Cysteinresten (siehe SI 7). Um festzustellen, an welche dieser Domänen Celastrol bindet, wurden die Domänen einzeln exprimiert. Cdc37_N reduziert Celastrol zu einer inaktiven Form, wie man im $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-Spektrum nachweisen kann (Abbildung 2). Cdc37_M fällt nach der Zugabe von Celastrol

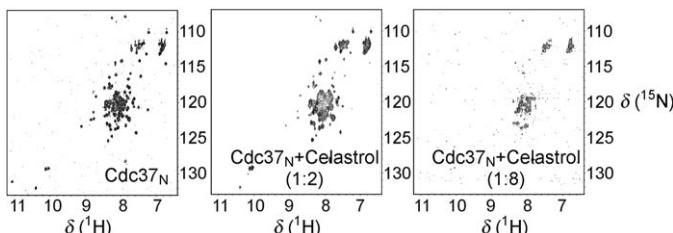


Abbildung 2. $^1\text{H}, ^{15}\text{N}$ -HSQC-spektroskopische Verfolgung der Bindung von Celastrol an Cdc37_N. Links: Spektrum von freiem Cdc37_N. Mitte: Zugabe von Celastrol zu Cdc37_N im Verhältnis 2:1. Rechts: Zugabe von Celastrol zu Cdc37_N im Verhältnis 8:1.

aus, reduziert Celastrol aber nicht, während ein Konstrukt aus der mittleren und der C-terminalen Domäne (Cdc37_{MC}) mit Celastrol reagiert, aber ebenfalls ausfällt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass insbesondere die N-terminalen Domänen für die Reduktion und Bindung von Celastrol verantwortlich ist. Wenn man die Cysteinreste von Cdc37_N mit NEM blockiert, reagiert diese Domäne nicht mehr mit Celastrol (siehe SI 8).

Um zu bestimmen, welche der drei Cysteinreste in Cdc37_N an der Wechselwirkung mit Celastrol beteiligt sind, wurden Cysteinmutanten mit nur einem Cysteinrest (Cdc37_N-C57S-C64S, Cdc37_N-C54S-C64S, Cdc37_N-C54S-C57S) hergestellt.

CD-Spektren von Wildtyp- und Mutanten-Cdc37_Ns unterscheiden sich kaum, was darauf hindeutet, dass sich die Sekundärstruktur nur unwesentlich ändert (siehe SI 5). Nach Zugabe von Celastrol zu den drei Proteinkonstrukten von Cdc37_N wurde in allen Fällen eine Abnahme der Absorption bei 440 nm beobachtet. Alle drei Mutanten reduzieren also Celastrol ähnlich wie das Wildtyp-Protein (siehe SI 4).

Wir haben hier gezeigt, dass Celastrol an Cdc37 bindet und nicht wie bisher angenommen an Hsp90_N. Dies ist ein wichtiger Befund, denn er wird die Ausrichtung in der Medizinalchemie auf die richtige Zielstruktur des Protein-Protein-Komplexes verschieben. Celastrol inaktiviert Cdc37 entweder durch die Bildung eines oder mehrerer kovalenter Addukte mit seinen Thiolgruppen oder durch die Bildung intramolekularer Disulfidbrücken oder intermolekularer Aggregate (Abbildung 3). Die Reaktivität der einzelnen Cysteinreste ist leicht verschieden (wie man aus zeitabhän-

glichen Hsp90_N-Binedomäne von Cdc37 und zerstört damit den Cdc37-Hsp90_N-Komplex, der als notwendig für die Stabilisierung von onkogenen Kinasen in mehreren Krebsarten erkannt worden ist.^[3] Unsere Daten zeigen, dass die N-terminale Kinasebindedomäne und die mittlere Hsp90_N-Binedomäne den molekularen Rezeptor für das Triterpen Celastrol bilden. Angesichts des beträchtlichen Potenzials von Cdc37 als Rezeptor für Arzneimittel und des Umstands, dass Celastrol an Cdc37 bindet, werden unsere Ergebnisse unersetzlich sein, um die molekulare Basis der Inhibierung des in Krebszellen essenziellen Cdc37-Hsp90-Komplexes zu verstehen.

Eingegangen am 17. Februar 2009
Online veröffentlicht am 7. Juli 2009

Stichwörter: Cdc37 · Chaperone · Hsp90 · Inhibitoren · NMR-Spektroskopie

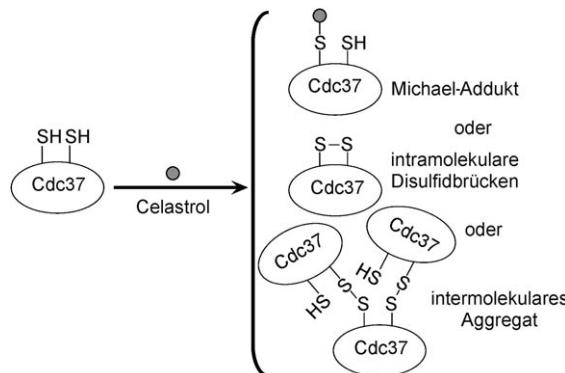


Abbildung 3. Mögliche molekulare Mechanismen der Inaktivierung von Cdc37 durch Celastrol.

gigen UV-Spektren ableiten kann). Abhängig von der Zugänglichkeit und den stabilisierenden Wechselwirkungen benachbarter Aminosäuren kann Celastrol an einen oder mehrere Cysteinreste binden. An der Cdc37-Hsp90-Wechselwirkung ist auch ein großer hydrophober Kern an der Protein-Protein-Grenzfläche beteiligt.^[15] Ihm benachbart ist C203 in Cdc37_M, das oberflächenexponiert ist. Zusätzlich zur Chinonmethid-Substruktur weist Celastrol hydrophobe Bereiche auf. Es könnte deshalb sein, dass Celastrol den hydrophoben Kern der Protein-Protein-Kontaktfläche zerstört. Die Bindung von Celastrol induziert große Konformationsänderungen in der N-terminalen Kinasebindedomäne und auch in der

- [1] P. Lee, J. Rao, A. Fliss, E. Yang, S. Garrett, A. J. Caplan, *J. Cell Biol.* **2002**, *159*, 1051.
- [2] L. H. Pearl, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2005**, *15*, 55.
- [3] P. J. Gray, Jr., T. Prince, J. Cheng, M. A. Stevenson, S. K. Calderwood, *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 491.
- [4] J. R. Smith, P. A. Clarke, E. de Billy, P. Workman, *Oncogene* **2009**, *28*, 157.
- [5] H. Hieronymus, J. Lamb, K. N. Ross, X. P. Peng, C. Clement, A. Rodina, M. Nieto, J. Du, K. Stegmaier, S. M. Raj, K. N. Maloney, J. Clardy, W. C. Hahn, G. Chiosis, T. R. Golub, *Cancer Cell* **2006**, *10*, 321.
- [6] T. Zhang, A. Hamza, X. Cao, B. Wang, S. Yu, C. G. Zhan, D. Sun, *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 162.
- [7] H. Yang, D. Chen, C. C. Qiuzhi, X. Yuan, Q. P. Dou, *Cancer Res.* **2006**, *66*, 4758.
- [8] L. D'Silva, P. Ozdowy, M. Krajewski, U. Rothweiler, M. Singh, T. A. Holak, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13220.
- [9] C. A. Lepre, J. M. Moore, J. W. Peng, *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 3641.
- [10] B. J. Stockman, C. Dalvit, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2002**, *41*, 187.
- [11] K. T. Liby, M. M. Yore, M. B. Sporn, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 357.
- [12] A. Trott, J. D. West, L. Klaic, S. D. Westerheide, R. B. Silverman, R. I. Morimoto, K. A. Morano, *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 1104.
- [13] J. H. Lee, T. H. Koo, H. Yoon, H. S. Jung, H. Z. Jin, K. Lee, Y. S. Hong, J. J. Lee, *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *72*, 1311.
- [14] T. J. Schmidt, G. Lyss, H. L. Pahl, I. Merfort, *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 2849.
- [15] S. Sreeramulu, H. R. Jonker, T. Langer, C. Richter, C. R. Lancaster, H. Schwalbe, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 3885.