

# Stabilisierung eines niederaffinen Zustands für Effektoren im menschlichen Ras-Protein durch Cyclenkomplexe\*\*

Ina C. Rosnizeck, Thorsten Graf, Michael Spoerner, Jens Tränkle, Daniel Filchtinski, Christian Herrmann, Lothar Gremer, Ingrid R. Vetter, Alfred Wittinghofer, Burkhard König und Hans Robert Kalbitzer\*

Das Guaninnukleotid-bindende Protein Ras ist an zellulären Signaltransduktionswegen beteiligt, die die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen kontrollieren. Es funktioniert als molekularer Schalter, der zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand und einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand wechselt. Nur im Komplex mit GTP kann das Ras-Protein verschiedene Effektoren wie die Raf-Kinase oder RalGDS mit hoher Affinität binden (siehe z. B. Lit. [1]). Mittels  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie konnte gezeigt werden, dass Ras-Wildtyp im Komplex mit den GTP-Analoga GppNHp oder GppCH<sub>2</sub>p in mindestens zwei verschiedenen Konformationen vorliegt, die sich im dynamischen Gleichgewicht befinden.<sup>[2,3]</sup> Zustand 1 wird durch Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs)<sup>[4]</sup> erkannt, Zustand 2 durch Effektor-Proteine.<sup>[2,3,5–9]</sup> Die Affinität von Ras im Zustand 1 gegenüber Effektoren ist um einen Faktor von etwa 20 kleiner.<sup>[7]</sup> Zustand 1 stellt somit einen schwach Effektor-bindenden Zustand dar. In mehr als 30 % aller menschlichen Tu-

moren weist Ras Mutationen an den Aminosäurepositionen 12, 13 oder 61 auf.<sup>[10]</sup> Diese Mutanten verbleiben in der Zelle in ihrem aktiven GTP-gebundenen Zustand, da sie weder intrinsisch noch durch GAP (GTPase aktivierendes Protein) beschleunigt das gebundene GTP hydrolysieren. Es sollte möglich sein, die Wechselwirkung von aktiviertem, onkogenem Ras mit Effektoren durch die selektive Stabilisierung von Zustand 1 durch geeignete niedermolekulare Verbindungen zu inhibieren. Wie  $^{31}\text{P}$ -NMR-spektroskopisch gezeigt werden konnte, bindet der 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-Zn<sup>2+</sup>-Komplex (Zn<sup>2+</sup>-Cyclen; Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen) selektiv an Zustand 1 von aktiviertem Ras und verschiebt somit das dynamische Gleichgewicht auf die Seite des schwach an Effektoren bindenden Zustands.<sup>[11,12]</sup> Voraussetzung für die Nutzung von Zn<sup>2+</sup>-Cyclen als Leitsubstanz im Rahmen der strukturbasierten Entwicklung von Inhibitoren der Ras-Effektor-Wechselwirkung ist eine dreidimensionale Struktur des Komplexes, die hier vorgestellt wird.

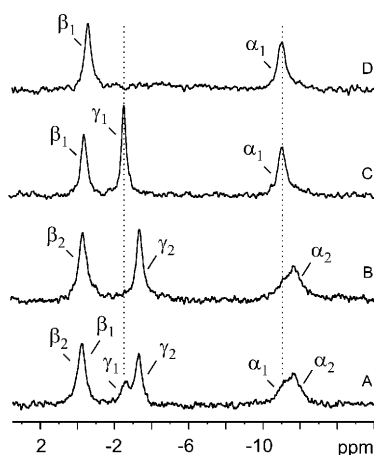
Cu<sup>2+</sup>-Cyclen kann als paramagnetisches Analogon von Zn<sup>2+</sup>-Cyclen eingesetzt werden, um eine Relaxation benachbarter Kerne im Protein in Abhängigkeit vom Abstand zu induzieren. Abbildung 1, Spektrum A zeigt das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von Ras(wt)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp, das charakteristisch für das gleichzeitige Vorliegen der beiden Konformationen 1 und 2 ist ( $K_{12} = [2]/[1] = 0.9$ ), da zwei Sätze von Resonanzlinien für das gebundene Nukleotid beobachtet werden. In Anwesenheit von Cu<sup>2+</sup>-Cyclen werden die  $^{31}\text{P}$ -Resonanzlinien des  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphats hochfeldverschoben, die Zustand 1 zugeordnet sind. Der stärkste Effekt wird für die  $\gamma$ -Phosphatgruppe beobachtet. Das Signal des  $\alpha$ -Phosphats hingegen ist leicht tieffeldverschoben. Mit steigender Konzentration an Cu<sup>2+</sup>-Cyclen werden die Resonanzlinien breiter. Bei einem Ligand/Protein-Verhältnis von mehr als 2:1 ist das  $\gamma$ -Phosphat-Signal bereits soweit verbreitert, dass es nicht mehr detektiert werden kann, während das  $\beta$ -Phosphat-Signal nur leicht verbreitert ist (Abbildung 1, Spektren A und B). Die dem Zustand 2 zugehörigen Signale werden durch die Zugabe von Cu<sup>2+</sup>-Cyclen nicht beeinflusst, d. h., sie sind bei der gleichen Konzentration weder verschoben noch verbreitert. Als unabhängige Kontrolle wurden die gleichen Experimente mit Ras(T35A)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp durchgeführt, das ausschließlich in Zustand 1 vorliegt ( $K_{12} < 0.1$ ). Hier können die Effekte des Cu<sup>2+</sup>-Cyclens wesentlich leichter beobachtet werden, da die Signale des Zustands 2 scheinbar abwesend sind. Wiederum wird das Signal des  $\gamma$ -Phosphats verbreitert und ist bei einem Verhältnis Cu<sup>2+</sup>-Cyclen/Ras = 2:1 (Abbildung 1, Spektren C

[\*] I. C. Rosnizeck, T. Graf, M. Spoerner, Prof. H. R. Kalbitzer  
Universität Regensburg  
Institut für Biophysik und Physikalische Biochemie  
Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg (Deutschland)  
E-Mail: hans-robert.kalbitzer@biologie.uni-regensburg.de  
J. Tränkle, D. Filchtinski, C. Herrmann  
Ruhr-Universität Bochum, Institut für Physikalische Chemie I  
Universitätsstraße 150, 44780 Bochum (Deutschland)  
L. Gremer,<sup>[†]</sup> I. R. Vetter, A. Wittinghofer  
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie  
Abteilung Strukturelle Biologie  
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)  
B. König  
Universität Regensburg, Institut für Organische Chemie  
Universitätsstraße 31, 93053 Regensburg (Deutschland)

[†] Derzeitige Adresse:  
Klinikum der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Institut für Biochemie und Molekularbiologie II  
Universitätsstraße 1, 40225 Düsseldorf (Deutschland)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, dem Fonds der Chemischen Industrie und der Volkswagenstiftung unterstützt. Wir danken dem Personal des X10SA am Swiss Light Source Paul Scherrer Institut, Villigen (Schweiz), für die Unterstützung und unseren Kollegen vom MPI Dortmund (Michael Weyand, Katja Gotthardt und Antje Schulte) für die Hilfe bei der Datenaufnahme. Spezieller Dank geht an Michael Kruppa und Florian Schmidt für die Synthese der Übergangsmetall-Cyclen-Komplexe.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200907002> zu finden.



**Abbildung 1.**  $\text{Cu}^{2+}$ -Cyclen und sein Einfluss auf das  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von Ras-GppNHp-Komplexen.  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von Ras- $\text{Mg}^{2+}$ . GppNHp in 40 mM Tris/HCl, pH 7.5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM Dithioerythrol (DTE), 0.2 mM 4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonsäure (DSS) und 5 %  $\text{D}_2\text{O}$ . A) 1.3 mM Ras(wt)- $\text{Mg}^{2+}$ -GppNHp, B) 1.3 mM Ras(wt)- $\text{Mg}^{2+}$ -GppNHp in Anwesenheit von 2.6 mM  $\text{Cu}^{2+}$ -Cyclen, C) 1.3 mM Ras-(T35A)- $\text{Mg}^{2+}$ -GppNHp und D) 1.3 mM Ras-(T35A)- $\text{Mg}^{2+}$ -GppNHp in Anwesenheit von 6.5 mM  $\text{Cu}^{2+}$ -Cyclen.  $\alpha_1$ ,  $\beta_1$ ,  $\gamma_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma_2$ : Resonanzen der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Phosphatgruppen im Zustand 1 bzw. Zustand 2. Die chemische Verschiebung der Resonanzen des Zustands 1 sind mit gestrichelten Linien gekennzeichnet. Alle Spektren wurden bei 278 K und 202 MHz aufgenommen.

und D) nicht mehr erkennbar. Diese Daten weisen darauf hin, dass  $\text{Cu}^{2+}$ -Cyclen in der Nähe der  $\gamma$ -Phosphatgruppe von GppNHp bindet, wenn Ras im Zustand 1 vorliegt. Das aktive Zentrum im Zustand 2 wird hingegen nicht erkannt. Da Ras-(T35A) vorwiegend im Zustand 1 vorliegt, wurden die weiteren Strukturuntersuchungen zur Komplexbildung zwischen Metallocyclen und Ras im Zustand 1 mit dieser Mutante durchgeführt.

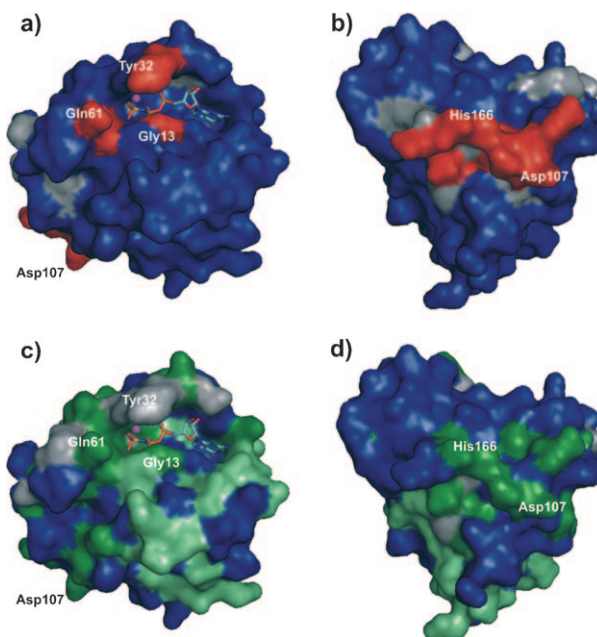
Die Abstände des  $\text{Cu}^{2+}$ -Ions zu den Phosphorkernen des gebundenen GppNHp von  $0.30 \pm 0.05$ ,  $0.48 \pm 0.05$  und  $0.54 \pm 0.05$  nm für die  $\gamma$ -,  $\beta$ -, bzw.  $\alpha$ -Phosphatgruppe können aus der paramagnetischen Verstärkung der Relaxation (PRE) abgeschätzt werden (Tabelle S1 in den Hintergrundinformationen).

Sehr wahrscheinlich ist das positiv geladene  $\text{Cu}^{2+}$ -Cyclen, das sich annähernd im Van-der-Waals-Abstand zur negativ geladenen  $\gamma$ -Phosphatgruppe befindet, direkt an ein Sauerstoffatom der  $\gamma$ -Phosphatgruppe koordiniert. In den entsprechenden Kristallstrukturen von  $\text{Zn}^{2+}$ -Cyclenderivaten in 1:1-Komplexen mit Phenylphosphat<sup>[13]</sup> ist das  $\text{Zn}^{2+}$ -Ion 0.294 nm vom Phosphorkern entfernt.

Die Zugabe von paramagnetischem  $\text{Cu}^{2+}$ -Cyclen führt sowohl zu einer Abnahme der Kreuzsignalintensität im  $[\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC-NMR-Spektrum als auch zu Änderungen der chemischen Verschiebungen (Tabelle S2, Abbildung S2). Die Signalintensitäten der Resonanzen von Gly13, das sich im P-Loop in der Nähe der  $\gamma$ -Phosphatgruppe des gebundenen Nukleotids befindet, und von Gly60, das im Switch II zu finden ist, sind wesentlich verringert und bei höheren Konzentrationen an  $\text{Cu}^{2+}$ -Cyclen vollständig verschwunden. Andere Resonanzen, z.B. die von Ser118 oder Thr148, werden durch die Zugabe von  $\text{Cu}^{2+}$ -Cyclen nicht beeinflusst.

Durch die Zugabe von diamagnetischem  $\text{Zn}^{2+}$ -Cyclen werden die meisten Resonanzen nicht beeinflusst. Einige verschieben sich jedoch und/oder werden verbreitert. Interessanterweise spalten einige der Resonanzen in zwei Linien auf, z.B. die Signale von Ile124 und Gly115 (Tabelle S2, Abbildung S2).

Bildet man die Aminosäuren bezüglich der Änderung ihrer kombinierten chemischen Verschiebung ( $\Delta\delta^{\text{comb}} \geq \sigma_0^{\text{corr}}$ ) auf die Oberfläche der Kristallstruktur von Ras(wt) ab, so werden zwei Bindungsstellen erkennbar (Abbildung 2).



**Abbildung 2.** Nachweis der Bindungsstellen von  $\text{Zn}^{2+}$ - und  $\text{Cu}^{2+}$ -Cyclen in Ras- $\text{Mg}^{2+}$ -GppNHp durch  $[\text{H},^{15}\text{N}]$ -HSQC-NMR-Spektroskopie.

a, b) Aminosäuren, die eindeutig vom paramagnetischen, abstandsabhängigen  $\text{Cu}^{2+}$ -Effekt beeinflusst werden, sind auf der Oberfläche von Ras(wt)- $\text{Mg}^{2+}$ -GppNHp<sup>[16]</sup> abgebildet. Reste mit einem signifikanten relativen Signalverlust  $I(j)/I_0(j) < 1 - \sigma_0$  sind rot eingefärbt, nicht eindeutig zugeordnete Reste sind grau. c, d) Aminosäuren, die in Anwesenheit von  $\text{Zn}^{2+}$ -Cyclen signifikante Verschiebungsänderungen aufweisen, sind auf die Oberfläche von Ras(wt)- $\text{Mg}^{2+}$ -GppNHp abgebildet: dunkelgrün: Aminosäuren mit einer signifikanten Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebung ( $\Delta\delta^{\text{comb}} > \sigma_0^{\text{corr}}$ ); hellgrün: Aminosäuren, deren Signale durch die Bindung von  $\text{Zn}^{2+}$ -Cyclen aufspalten (typisch für langsame Austauschprozesse); grau: nicht eindeutig zugeordnete Aminosäuren.

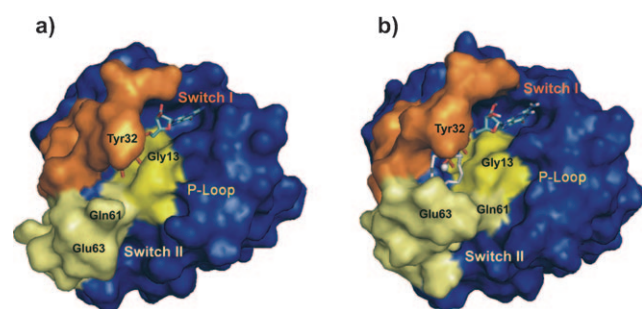
Die Analyse der Konzentrationsabhängigkeit von  $\Delta\delta^{\text{comb}}$  bestätigt das Vorliegen von zwei Bindungsstellen. Die halbmaximalen Sättigungen der Bindungsstellen sind bei einer Ligandenkonzentration von etwa 2 mM bzw. 6 mM erreicht. Da zudem Daten mit dem paramagnetischen Analogon  $\text{Cu}^{2+}$ -Cyclen vorliegen, können die durch die Ligandenbindung hervorgerufenen, weitreichenden Strukturänderungen erkannt werden, da die paramagnetische Verstärkung der Relaxation stark abstandsabhängig ist.

In guter Übereinstimmung mit den  $^{31}\text{P}$ -NMR-Daten befindet sich die Bindungsstelle 1 (Abbildung 2 a,c) nahe am  $\gamma$ -Phosphat des gebundenen Nukleotids. Am meisten betroffen

sind dabei die Reste Gly13, Tyr32, Ala59 und Gln61, die sich im P-Loop (Aminosäuren 10–18), dem PM3-Motiv (AS 57–61) bzw. im Switch II (AS 60–72) befinden. Die zweite Bindungsstelle (Abbildung 2b,c) liegt nahe den Resten Asp105, Ser106, Asp107, Asp108, Val109 und Met111 der negativ geladenen Schleife L7 und den C-terminalen Resten Glu162, Gln165 und His166.

Aus den Daten, die aus den Änderungen der chemischen Verschiebung erhalten wurden, und den aus der PRE erhaltenen Abstandsinformationen wurde die Struktur des Proteins im Komplex mit dem Cyclenliganden an der Bindungsstelle 1 mit dem Programm HADDOCK berechnet.<sup>[14,15]</sup> Wegen des Fehlens einer Kristallstruktur von Ras-(T35A)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp wurde für die Berechnung die Kristallstruktur von Ras(wt)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp<sup>[16]</sup> verwendet, wobei das Threonin in Position 35 durch Alanin ersetzt wurde. Es wird dabei angenommen, dass die Kristallstruktur des Wildtyps den Zustand 2 repräsentiert, während Ras(T35A) und Ras(T35S) im Komplex mit Mg<sup>2+</sup>·GppNHp vorzugsweise in Zustand 1 vorliegen. Die verfügbare Kristallstruktur von Ras(T35S)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp<sup>[7]</sup> wurde deshalb herangezogen, um Abstandsinformationen für das gebundene Nukleotid zu erhalten. Diese Abstandsinformationen wurden verwendet, um das Nukleotid zusammen mit dem Mg<sup>2+</sup>-Ion während der Strukturrechnung zu fixieren (für Details der Berechnung siehe Tabelle S3).

In Abbildung 3 ist eine Oberflächendarstellung der Ras(wt)-Struktur sowie die Struktur mit der niedrigsten Energie aus der HADDOCK-Berechnung gezeigt. Der Cu<sup>2+</sup>-



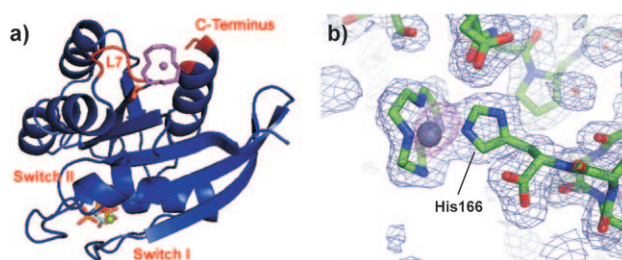
**Abbildung 3.** Vergleich der berechneten Struktur von Ras(T35A)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp im Komplex mit Cu<sup>2+</sup>-Cyclen und der Kristallstruktur von Wildtyp-Ras. a) Oberflächendarstellung der Kristallstruktur von Ras(wt)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp<sup>[16]</sup> (pdb 5p21). b) Oberflächendarstellung der HADDOCK-Struktur von Ras(T35A)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp im Komplex mit Cu<sup>2+</sup>-Cyclen (weiß). Die Switch-Regionen und die Phosphatbindeschleife sind orange, hellgelb bzw. gelb.

Cyclen-Komplex ist über sein Metallzentrum an das γ-Phosphat des GppNHp koordiniert; die vier Aminprotonen des Cyclengerüsts bilden Wasserstoffbrücken zu den Carbonylsauerstoffatomen von Gly12, Asp33, Ala35 und Ala59. Dieses Wasserstoffbrückenmuster könnte auch die starken Änderungen der chemischen Verschiebung der Signale von den benachbarten Aminosäuren Gly13, Ile36 und Gly60 in Anwesenheit von Zn<sup>2+</sup>-Cyclen erklären. Die erhaltenen Wechselwirkungsenergien von Cu<sup>2+</sup>-Cyclen mit dem Protein sind in

einem sinnvollen Bereich (Tabelle S4). Die allgemeine Topologie des Ras-Proteins ist wie erwartet unverändert.

Die mittlere quadratische Abweichung (RMSD) zwischen der berechneten Rückgrat-Struktur von Ras(T35A)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp im Komplex mit Cu<sup>2+</sup>-Cyclen und der Kristallstruktur von Ras(wt)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp<sup>[16]</sup> beträgt 0.12 nm (Abbildung S3). Die beiden Strukturen zeigen eine gute Übereinstimmung in denjenigen Regionen, die sich in Zustand 1 und Zustand 2 ähnlich sein sollten. Signifikante Änderungen werden jedoch beobachtet: Während Switch I und der P-Loop eine offenere Konformation einnehmen, bewegt sich Switch II in Richtung der Nukleotidbindestelle. Ein ähnliches strukturelles Muster liegt in der Kristallstruktur zwischen Ras und seinem Austauschfaktor SOS vor.<sup>[17]</sup> In der hier berechneten Struktur ist Tyr32 gedreht und hat sich vom gebundenen Nukleotid entfernt. Eine Änderung der Position dieser Aminosäure wurde bereits von Geyer et al.<sup>[2]</sup> als Erklärung für die Unterschiede in den chemischen Verschiebungen zwischen den <sup>31</sup>P-Resonanzlinien des Ras-Proteins im Zustand 1 und Zustand 2 postuliert. Hall et al.<sup>[18]</sup> konnten ebenfalls zeigen, dass sich Tyr32 in der Ras(A59G)-Mutante nicht mehr in seiner Position von Zustand 2 befindet. Außerdem rückt Glu63 näher zum Nukleotid, und auch His27 scheint seine Position zu ändern. Grundsätzlich ist die Tasche, die das Nukleotid enthält, in Zustand 1 offener als in Zustand 2. Das stimmt gut mit der beobachteten Bevorzugung von SOS für Zustand 1 überein.<sup>[4]</sup> Dadurch wird auch die berechnete Abnahme des partiellen molaren Volumens nach Übergang von Zustand 2 zu Zustand 1<sup>[4]</sup> erklärt, was normalerweise mit einer Zunahme der dem Wasser exponierten Oberfläche einher geht.

Zusätzlich wurde die Kristallstruktur von Ras(wt)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp im Komplex mit Zn<sup>2+</sup>-Cyclen mit einer Auflösung von 2.1 Å gelöst (Tabelle S5). Die erhaltene Struktur ist in Abbildung 4a gezeigt. Zn<sup>2+</sup>-Cyclen kann nur an der Bindungsstelle 2 detektiert werden, die bereits in den NMR-Untersuchungen identifiziert wurde und sich in der Nähe des C-Terminus und der Schleife L7 befindet. Das Zn<sup>2+</sup>-Ion ist an ein Imidazol-Stickstoffatom der Seitenkette des C-terminalen Histidins 166 koordiniert (Abbildung 4b). Es können darüber hinaus keine weiteren signifikanten Elektronendichten des Liganden detektiert werden, auch nicht im Bereich der Bin-



**Abbildung 4.** Kristallstruktur von Ras(wt)·GppNHp im Komplex mit Zn<sup>2+</sup>-Cyclen. a) Darstellung der Sekundärstrukturelemente von Ras·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp im Komplex mit Zn<sup>2+</sup>-Cyclen (magenta). Die Aminosäuren, die in den PRE-Studien mit Cu<sup>2+</sup>-Cyclen als zugehörig zur Bindungsstelle 2 identifiziert wurden, sind rot dargestellt. b) Elektrorendichtekarte für die Koordination von Zn<sup>2+</sup>-Cyclen an Ras(wt)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp.



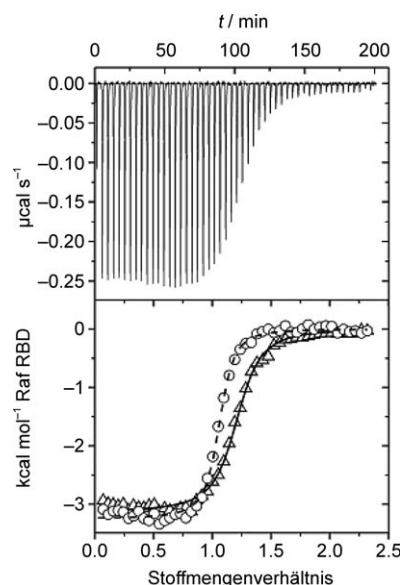
ungsstelle 1 in der Nähe der Switch-Regionen. Die Proteinstruktur selbst liegt weitgehend unverändert vor, Ausnahmen sind die Region um Switch II von Aminosäure 62 bis 75 mit einem RMSD-Wert von 0.241 nm für diese 14 Reste (hier ist die Elektronendichte in Ras-Strukturen für gewöhnlich nicht sehr gut definiert) und die Schleife um den Rest 106, die im Vergleich zur Apo-Struktur ihre Position leicht verändert hat (RMSD 0.024 nm für die Reste 96 bis 109). Die Kristallstruktur des nicht-komplexierten Ras(wt)-Mg<sup>2+</sup>-GppNHp, die hier vor der Inkubation der Kristalle mit Zn<sup>2+</sup>-Cyclen bestimmt wurde, und die des komplexierten Ras nach der Inkubation mit Zn<sup>2+</sup>-Cyclen zeigen Switch I in sehr ähnlichen Konformationen. In diesen Strukturen liegt Switch I jedoch in einer etwas geschlosseneren Konformation vor als in der Struktur von Pai et al.,<sup>[16]</sup> bei der das Protein in einer anderen Raumgruppe kristallisierte. In den Kristallen, die in dieser Arbeit analysiert wurden, packen die Moleküle über die sich gegenüber liegenden Effektorschleifen (in der Konformation 2). Die Affinität des Zn<sup>2+</sup>-Cyclens war bei der für die Zn<sup>2+</sup>-Cyclen-Wechselwirkung verwendeten Konzentration (25 mM) offensichtlich zu gering, um die Kräfte, die die Effektorschleife geschlossen beim  $\gamma$ -Phosphat halten, zusammen mit den Kristallpackungskräften zu überwinden. Andernfalls wären die Kristalle wohl gebrochen. Folglich wurde nicht erwartet, den Zn<sup>2+</sup>-Cyclen-Komplex an Bindungsstelle 1 in der Kristallstruktur zu detektieren.

Beide Cyclenkomplexe bevorzugen den Zustand 1 von Ras. Da angenommen wird, dass Zustand 1 einen schwach Effektor-bindenden Zustand darstellt, ist zu erwarten, dass die Cyclen-Übergangsmetall-Komplexe die Bindung von Effektoren an aktives Ras durch die Stabilisierung von Zustand 1 abschwächen. Um diese Annahme zu bestätigen, wurde die Bindung von Ras/Raf in Anwesenheit von Cyclenen durch isotherme Titrationskalorimetrie vermessen (Abbildung 5). Wie angenommen, wird die Bindung der Ras-Bindedomäne der Raf-Kinase (RafRBD) an Ras(wt)-GppNHp durch die Gegenwart von Zn<sup>2+</sup>-Cyclen bzw. Cu<sup>2+</sup>-Cyclen gestört, was zu einer verminderten Affinität zwischen Ras und Raf führt.

Zusammenfassend binden Zn<sup>2+</sup>- und Cu<sup>2+</sup>-Cyclen-Komplexe mit millimolarer Affinität an zwei räumlich separierten Orten in Ras-Mg<sup>2+</sup>-GppNHp. Die Bindungsstelle, die für die Stabilisierung der Konformation 1 mit verminderter Affinität gegenüber Effektoren zuständig ist, befindet sich in der Nähe der  $\gamma$ -Phosphatgruppe des gebundenen Nukleotids in aktivem Ras. <sup>31</sup>P-NMR-Experimente zeigen, dass eine entsprechende Bindungsstelle in der Nähe der Phosphate in Ras-Mg<sup>2+</sup>-GDP nicht gefunden werden kann (Daten nicht gezeigt). Durch die Bindung von Zn<sup>2+</sup>-Cyclen öffnet sich die Nukleotidbindetasche, und gleichzeitig wird die Affinität für Effektoren geschwächt, wie die isotherme Titrationskalorimetrie mit dem Komplex mit RafRBD zeigt. Folglich kann Zn<sup>2+</sup>-Cyclen als Leitsubstanz innerhalb eines neuen Ansatzes zur Inhibierung der Ras-Effektor-Wechselwirkung dienen.

### Experimentelles

Details der Proteinreinigung, der NMR-Spektroskopie, der Kristallographie, der Auswertung der durch die Bindung des Liganden hervorgerufenen Änderungen der chemischen Verschiebungen und



**Abbildung 5.** Störung der Ras/Raf-Wechselwirkung durch Zn<sup>2+</sup>-Cyclen. ITC-Messungen wurden bei 298 K mit 40  $\mu$ M H-Ras(wt)-Mg<sup>2+</sup>-GppNHp in 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 2 mM DTE durchgeführt. Die Probe wurde mit einer 400 mM Lösung von RafRBD (Ras-bindende Domäne von Raf) im gleichen Puffer in Abwesenheit (○) und Anwesenheit von Zn<sup>2+</sup>-Cyclen (1–10 mM) (Δ) titriert (gezeigt sind die Daten für 4 mM Zn<sup>2+</sup>-Cyclen). Die Heizleistung letzterer Titration ist als Funktion der Zeit gezeigt (oben). Die Änderung der Enthalpie ist als Funktion des Stoffmengenverhältnisses von Raf zu Ras aufgetragen. Die Daten wurden mit einem 1:1-Bindungsmodell angeglichen.

der paramagnetischen Beschleunigung der Relaxation, der NMR-Strukturrechnung sowie der Kalorimetrie sind in den Hintergrundinformationen hinterlegt.

Eingegangen am 12. Dezember 2009  
Online veröffentlicht am 16. April 2010

**Stichwörter:** Cyclen · NMR-Spektroskopie · Ras-Protein · Signaltransduktion · Wirkstoff-Forschung

- [1] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4360; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4192.
- [2] M. Geyer, T. Schweins, C. Herrmann, T. Prisner, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Biochemistry* **1996**, *35*, 10308.
- [3] M. Spoerner, A. Nuehs, P. Ganser, C. Herrmann, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Biochemistry* **2005**, *44*, 2225.
- [4] H. R. Kalbitzer, M. Spoerner, P. Ganser, C. Hosza, W. Kremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16714.
- [5] M. Geyer, C. Herrmann, S. Wohlgemuth, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 694.
- [6] T. Linnemann, M. Geyer, B. K. Jaitner, C. Block, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, C. Herrmann, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 13556.
- [7] M. Spoerner, C. Herrmann, I. R. Vetter, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4944.
- [8] M. Spoerner, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *FEBS Lett.* **2004**, *578*, 305.
- [9] W. Gronwald, F. Huber, P. Grünwald, M. Spörner, S. Wohlgemuth, C. Herrmann, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Structure* **2001**, *9*, 1029.

- [10] J. Bos, *Cancer Res.* **1989**, 49, 4682.
  - [11] H. R. Kalbitzer, B. Koenig, WO 2004006934, **2004**, A2 20040122, CAN 140:122769, AN 2004:60322.
  - [12] M. Spoerner, T. Graf, B. König, H. R. Kalbitzer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 334, 709.
  - [13] S. Aoki, K. Iwaida, N. Hanamoto, M. Shiro, E. Kinura, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 5256–5257.
  - [14] C. Dominguez, R. Boelens, A. M. J. J. Bonvin, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 1731.
  - [15] A. D. J. van Dijk, R. Boelens, A. M. J. J. Bonvin, *FEBS J.* **2005**, 272, 293.
  - [16] E. F. Pai, U. Krengel, G. A. Petsko, R. S. Goody, W. Kabsch, A. Wittinghofer, *EMBO J.* **1990**, 9, 2351.
  - [17] P. A. Boriack-Sjodin, S. M. Margarit, D. Bar-Sagi, J. Kuriyan, *Nature* **1998**, 394, 337.
  - [18] B. E. Hall, D. Bar-Sagi, N. Nassar, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, 99, 12138.
-