

Identifizierung und Struktur von niedermolekularen Substanzen als Stabilisatoren von 14-3-3-Protein-Protein-Wechselwirkungen**

Rolf Rose, Silke Erdmann, Stefanie Bovens, Alexander Wolf, Micheline Rose, Sven Hennig, Herbert Waldmann und Christian Ottmann*

Die Inhibierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen (PPIs) mit niedermolekularen Verbindungen gewinnt in der pharmazeutischen Forschung zunehmend an Interesse und bietet neue Therapiemöglichkeiten für Krankheiten.^[1–5] Dennoch konnten bisher nur einige wenige niedermolekulare Stabilisatoren von Protein-Protein-Wechselwirkungen entwickelt werden;^[6,7] dabei handelt es sich typischerweise um chemisch komplexe Naturstoffe, die durch Fermentierung und Isolierung aus natürlichen Quellen gewonnen werden.^[8–11] Einige dieser Substanzen werden in der Forschung intensiv genutzt und befinden sich teilweise auch im klinischen Gebrauch, was den Wert dieses Ansatzes demonstriert. Deshalb sind die Identifizierung und Entwicklung von niedermolekularen PPI-Stabilisatoren, die durch organische Synthese hergestellt und in ihrer Potenz und Spezifität optimiert werden können, von größtem Interesse.

Eine besonders interessante Anwendung stellen 14-3-3-Proteine und ihre Wechselwirkungen mit verschiedenen Zielproteinen dar. 14-3-3-Proteine sind eine hochkonservierte Klasse von Adapterproteinen, die an der Regulation von mehreren hundert Proteinen beteiligt sind. Darunter befinden sich wichtige pharmazeutische Zielproteine, z.B. Raf, p53, Cdc25, Cdk2 und Histon-Desacetylasen (HDACs).^[12] Die Bindung von 14-3-3-Proteinen kann sich sowohl inhi-

bierend als auch stimulierend auf das Zielprotein auswirken. Ersteres zeigt das Beispiel der Cdc25-Phosphatasen,^[13] letzteres das Tumorsuppressor-Protein p53.^[14] Abhängig vom physiologischen Kontext, beispielsweise in verschiedenen Krebsarten, kann die Stabilisierung eines regulatorischen Protein-Protein-Komplexes von therapeutischem Nutzen sein. Synthetische niedermolekulare Stabilisatoren für diese therapeutisch interessanten Wechselwirkungen sind bisher nicht bekannt. Ein Beispiel aus der Natur ist die spezifische Stabilisierung der PPI von 14-3-3 mit der pflanzlichen Protonenpumpe PMA2 durch das Pilztoxin Fusicoccin.^[15] Dieser Naturstoff bindet an eine Wechselwirkungsfläche, die durch beide Proteine gebildet wird, und wirkt durch den gleichzeitigen Kontakt mit beiden Partnerproteinen stabilisierend.^[16,17]

Wir berichten hier über die Identifizierung von zwei niedermolekularen Substanzen, die durch selektive Bindung an zwei verschiedenen Positionen an der PPI-Grenzfläche die Wechselwirkung von 14-3-3 und PMA2 *in vitro* stabilisieren und darüber hinaus auch *in vivo* aktiv sind. Um potenziell stabilisierende Moleküle zu identifizieren, haben wir im Hochdurchsatzverfahren eine Substanzbibliothek von 37 000 Verbindungen *in vitro* getestet. Hierbei wurde die Bindung von 14-3-3, markiert mit grün fluoreszierendem Protein (GFP), an oberflächenimmobilisiertes PMA2-CT52, fusioniert mit Gluthation-S-Transferase (GST), gemessen (siehe die Hintergrundinformationen zur C-terminalen PMA2-Sequenz). Beim ersten Screening wurden zwei strukturell nicht verwandte Substanzen mit der gewünschten Aktivität identifiziert (Abbildung 1a). Für diese Substanzen wurde die Kinetik der stabilisierenden Aktivität mithilfe von Oberflächenplasmonenresonanz (surface plasmon resonance, SPR) bestimmt (Abbildung 1b). Hierfür wurde die 14-3-3-Wechselwirkungsdomäne von PMA2, genauer die 52 C-terminalen Aminosäurereste, CT52, auf der Dextranmatrix eines Biacore-Chips immobilisiert, und die Bindung des 14-3-3-Proteins wurde in Gegenwart der zuvor identifizierten niedermolekularen Stabilisatoren gemessen. Das dreifach substituierte Pyrrolidonmolekül (Pyrrolidon1) zeigt eine ähnliche Assoziationskinetik wie Fusicoccin (Abbildung 1b), aber mit einer schnelleren Dissoziation und einem K_D -Wert von 80 μM . Das Dipeptid Epibestatin unterscheidet sich in seinem kinetischen Verhalten bei der Stabilisierung des 14-3-3/PMA2-Komplexes von Fusicoccin und Pyrrolidon1 durch eine langsamere Assoziation (Abbildung 2b), zeigt aber eine mit Fusicoccin vergleichbare, langsame Dissoziation und somit eine stabilere Komplexbildung. Für Epibestatin wurde ein K_D -Wert von 1.8 μM errechnet. In Abwesenheit stabilisierender Substanzen konnte keine Bindung von 14-3-3 an immobili-

[*] Dr. R. Rose, Dr. S. Erdmann, Dr. S. Bovens, Dr. A. Wolf, M. Rose, Dr. S. Hennig, Dr. C. Ottmann
Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft
Otto-Hahn-Straße 15, 44227 Dortmund (Deutschland)
Fax: (+49) 231-231-2499
E-Mail: christian.ottmann@cgc.mpg.de
Homepage: <http://www.cgc.mpg.de>
Prof. Dr. H. Waldmann
Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie
Abteilung Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 11, 44227 Dortmund (Deutschland)
und
Technische Universität Dortmund, Fakultät Chemie
Lehrbereich Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)

[**] Diese Arbeit wurde durch die Max-Planck-Gesellschaft und das BMBF (GO-Bio 0313873 für R.R., S.B., S.E., A.W., M.R. und S.H.) unterstützt. Wir danken Alfred Wittinghofer für hilfreiche Diskussion sowie den Mitarbeitern der Swiss Light Source, Beamline X10SA, für Unterstützung während der röntgenkristallographischen Datensammlung. Die Atomkoordinaten und Strukturfaktoren des T14-3e/CT30/Pyrrolidon1- und des T14-3e/CT30/Epibestatin-Komplexes wurden bei der Protein Data Bank unter den ID-Nummern 3M51 und 3M50 abgelegt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.200907203> zu finden.

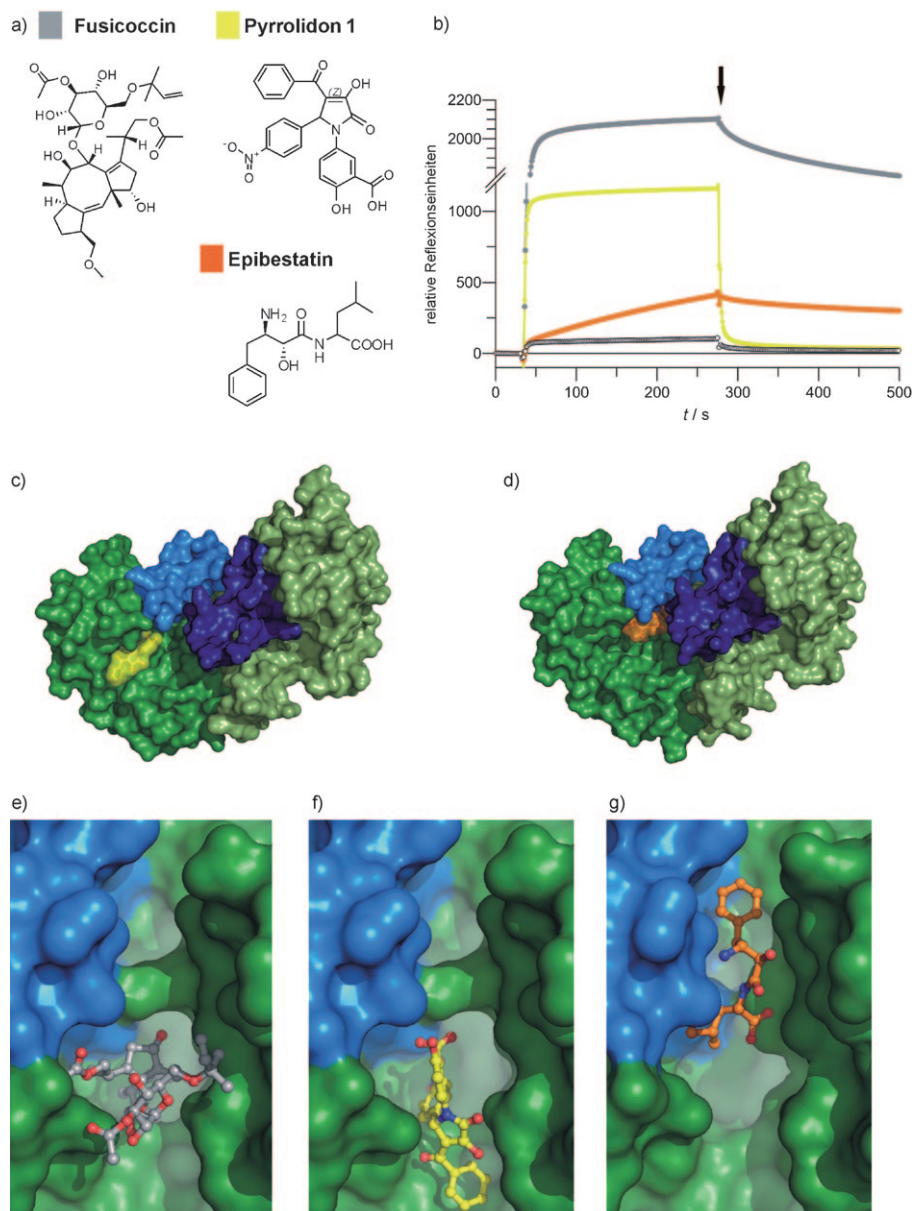


Abbildung 1. Pyrrolidon1 und Epibestatin stabilisieren den 14-3-3/PMA2-Komplex in unterschiedlicher Weise verglichen mit Fusicoccin. a) Strukturen von Fusicoccin, Pyrrolidon1 und Epibestatin. b) Die Assoziation und Dissoziation von 14-3-3 an die Binde domäne der PMA2 (CT52) wurde mithilfe von Oberflächenplasmonenresonanz (BiaCore) in Gegenwart von Fusicoccin (5 μM , grau), Pyrrolidon1 (50 μM , gelb), Epibestatin (50 μM , orange) oder DMSO (als Kontrolle, offene Kreise) bestimmt. Der Wechsel von der Assoziations- zur Dissoziationsphase im Experiment ist markiert. c) Kristallstruktur von Pyrrolidon1 (gelb), gebunden an den binären Komplex von 14-3-3 (grün) und PMA2-CT30 (blau). d) Epibestatin (orange), gebunden an den 14-3-3/PMA2-CT30-Komplex. e) Überlagerung von Fusicoccin (grau), gebunden an den 14-3-3/PMA2-CT30-Komplex (Oberflächendarstellung, Farben wie in (c)) wie in der von uns bereits publizierten Struktur des 14-3-3/PMA2-CT52-Komplexes (PDB: 2O98).^[17] f) Bindestelle von Pyrrolidon1 (gelb) im 14-3-3/PMA2-CT30-Komplex. g) Bindestelle von Epibestatin (orange) im 14-3-3/PMA2-CT30-Komplex.

siertes PMA2 bestimmt werden (Abbildung 1b, DMSO-Kontrolle).

Zur Aufklärung des Mechanismus für die offensichtlich unterschiedlichen Bindemodi von Pyrrolidon1 und Epibestatin wurden die Kristallstrukturen der ternären Komplexe

dieser Moleküle mit 14-3-3 und den 30 C-terminalen Aminosäureresten von PMA2 (PMA2-CT30) gelöst. Durch Cokristallisation von 14-3-3 und PMA2-CT30 im Verhältnis von 1:1.5, jeweils in Gegenwart von 2 mm Stabilisator, konnten für Röntgenbeugungsexperimente geeignete Proteinkristalle mit derselben Raumgruppe erzeugt werden. Der Epibestatin-Kristall zeigte eine reproduzierbare Diffraction bis 2.6 Å, wohingegen der Kristall mit Pyrrolidon1 keine Diffraction besser als 3.2 Å zeigte. Dennoch konnten wir für beide Substanzen die Bindung und Orientierung an der Grenzfläche der Proteinpartner bestimmen (Abbildungen 2e,f und Abbildungen S1, S2).

Die unterschiedlichen Assoziations- und Dissoziationskinetiken von Pyrrolidon1 und Epibestatin spiegeln sich im jeweiligen Bindemodus wider. Pyrrolidon1 hat mehr Kontakt mit der Oberfläche von 14-3-3 (288.2 Å² von 349.7 Å², 83 %) und bindet an einer solvensexponierten Stelle, was zu seiner hohen Assoziationsgeschwindigkeit beitragen könnte (Abbildungen 1b,c). Die Kontakte zu PMA2 sind gering (Abbildung 1f, Abbildung 2a), was zusammen mit dem exponierten Charakter der Bindetasche zur hohen Dissoziationsgeschwindigkeit des Komplexes beiträgt. Epibestatin liegt tiefer im Proteinkomplex als Pyrrolidon1 und ist zwischen 14-3-3 und PMA2 quasi eingeklemmt (Abbildung 1d). Der Kontakt zu den Proteinoberflächen von 14-3-3 (164.4 Å², 55 %) und PMA2 (135.5 Å², 45 %) ist vergleichbar groß (Abbildung 1g). Diese Charakteristika stimmen mit den beobachteten Assoziations- und Dissoziationskinetiken überein.

Die Bindestelle von Pyrrolidon1 überlappt teilweise mit der von Fusicoccin (Abbildung 2a), weist aber einen deutlich unterschiedlichen Bindemodus auf. Fusicoccin füllt beinahe die komplette Bindetasche

aus, wohingegen Pyrrolidon1 nur einen Teil der Region besetzt (Abbildung 2a–c). Dieser Bindemechanismus legt die Vermutung nahe, dass entsprechende Derivatisierungen dieses Inhibitorstyps Substanzen liefern könnte, welche die Grube an der Grenzfläche zwischen den beiden Proteinen

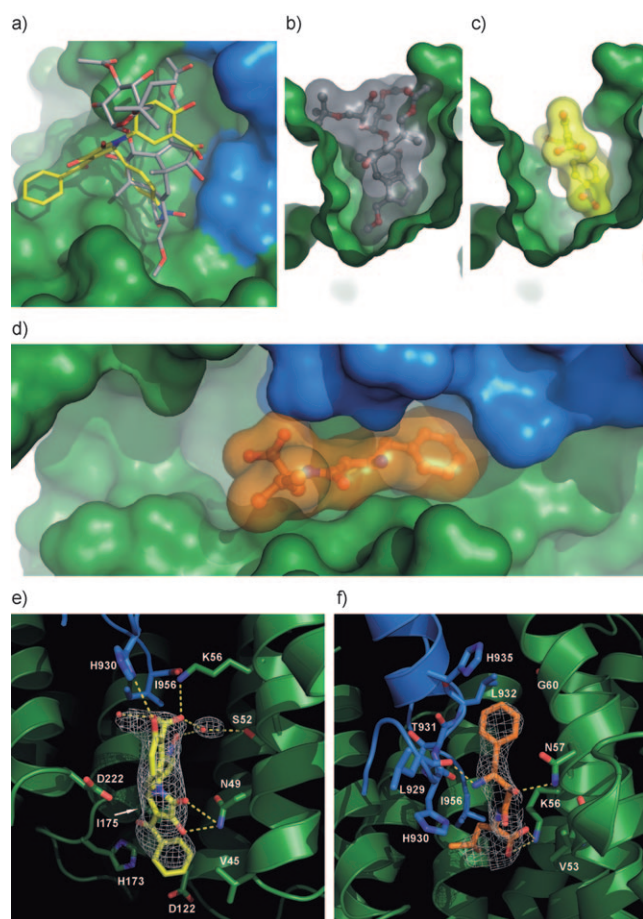


Abbildung 2. Vergleich der Bindemodi von Fusicoccin, Pyrrolidon1 und Epibestatin. a) Überlagerung von Fusicoccin (grau) und Pyrrolidon1 (gelb), gebunden an den 14-3-3/PMA2-CT30-Komplex (grüne bzw. blaue Oberfläche). b) Fusicoccin (grau) füllt die 14-3-3-Bindegrube (grün) nahezu komplett, c) Pyrrolidon1 (gelb) besetzt dagegen nur ca. ein Drittel dieser 14-3-3-Bindegrube. d) Bindung von Epibestatin (gelb) in einer tunnelförmigen Grube zwischen 14-3-3 (grün) und PMA2-CT30 (blau). e) Aminosaurereste von 14-3-3 (grün) und PMA2 (blau), die an der Koordinierung von Pyrrolidon1 (gelb) beteiligt sind, sind als Stabmodelle dargestellt. Polare Kontakte sind als gelbe Linien eingezeichnet, die $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calcd}}$ -Elektronendichte von Pyrrolidon1 (konturiert auf 1σ) und zwei Wassermolekülen (rote Kugeln) in Weiß. f) Aminosaurereste des 14-3-3/PMA2-Komplexes (Farben wie in e)), die an der Bindung von Epibestatin (orange) beteiligt sind, sind mit der $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calcd}}$ -Elektronendichte von Epibestatin (konturiert auf 1σ) in Weiß dargestellt.

komplett ausfüllen. Wie auch Fusicoccin füllt Epibestatin seine Bindestelle, einen Spalt zwischen beiden Proteinen, zu einem deutlich höheren Anteil als Pyrrolidon1 aus (Abbildung 2d). Dies lässt den Schluss zu, dass der Bindemodus von Epibestatin, ähnlich wie der von Fusicoccin, auf einer stark formorientierten Komponente beruht. Der engere Kontakt zu beiden Proteinpartnern spiegelt wahrscheinlich das höhere Stabilisierungspotenzial für den 14-3-3/PMA2-Komplex wider. Die detaillierten Proteinkontakte beider Substanzen sind in den Abbildungen 2e und f im Detail dargestellt.

Die Stabilisierung des 14-3-3/PMA2-Komplexes durch Fusicoccin führt zu einer Aktivierung der Protonenpumpe und damit zur Öffnung von Stomata, den Gasaustauschporen

auf den Blättern einer Pflanze, sodass die Pflanzen schließlich welken.^[18,19] Zur Bestimmung der In-vivo-Aktivität von Pyrrolidon1 und Epibestatin haben wir einen Stomata-Öffnungstest genutzt, bei dem isolierte Blattepidermis der Gemeinen Tagblume (*Commelina communis*) mit den Substanzen inkubiert wurde. Nach drei Stunden wurde die Öffnungsweite der Stomata lichtmikroskopisch bestimmt (Abbildung 3a). In Gegenwart von $50\mu\text{M}$ Pyrrolidon1 oder Epibestatin öffneten sich die Stomata im Durchschnitt $3\mu\text{m}$ bzw. $3.2\mu\text{m}$. Diese Daten zeigen ein In-vivo-Potenzial für Pyrrolidon1 und Epibestatin als Aktivatoren der pflanzlichen Protonenpumpe.

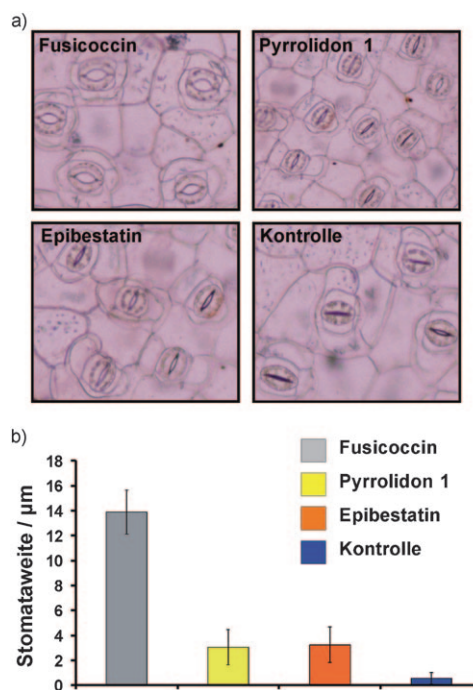


Abbildung 3. Pyrrolidon1 und Epibestatin zeigen Fusicoccin-ähnliche Aktivität in Pflanzenzellen. a) Öffnungsweite der Stomata in Gegenwart von Fusicoccin ($5\mu\text{M}$), Pyrrolidon1 ($50\mu\text{M}$) und Epibestatin ($50\mu\text{M}$). Die Blattepidermis der Gemeinen Tagblume (*Commelina communis*) wurde drei Stunden in einer gepufferten Lösung mit Fusicoccin, Pyrrolidon1, Epibestatin oder DMSO (Kontrolle) inkubiert, und die Öffnungsweite wurde lichtmikroskopisch bestimmt. b) Gemittelte Öffnungsweite der Stomata nach der dreistündigen Behandlung der Epidermis von *Commelina communis*.

Die Tatsache, dass Pyrrolidon1 und Epibestatin chemisch nicht verwandt sind und des Weiteren keine strukturellen Gemeinsamkeiten mit Fusicoccin zeigen, ist von besonderer Bedeutung für die Strategie zur Entwicklung von niedermolekularen 14-3-3-PPI-Stabilisatoren. Die Identifizierung unterschiedlicher Chemotypen aus einem begrenzten Screening für eine bestimmte 14-3-3-PPI weist darauf hin, dass noch weitere Substanzklassen gefunden werden könnten. Da die Bindestelle des Protein-Protein-Stabilisators durch beide Proteinpartner gebildet wird, ist zu vermuten, dass die intrinsische Bindungsspezifität dieser Moleküle sehr hoch ist. Um dies zu klären, haben wir Pyrrolidon1 und Epibestatin auf ihre Fähigkeit getestet, andere 14-3-3-PPIs zu stabilisieren,

darunter Raf1, p53, Cdc25c, RNF11, Mif1, AICD, Cby und YAP (Abbildung S3 und S4). Beide Substanzen stabilisierten keinen dieser Komplexe. Obwohl unsere Untersuchung in dieser Hinsicht nicht erschöpfend ist, zeigen die Daten, dass es möglich sein könnte, niedermolekulare Verbindungen zu finden, die in der Lage sind, bestimmte 14-3-3-PPIs spezifisch zu stabilisieren. Solche spezifischen Substanzen wären wertvolle Hilfsmittel, um 14-3-3-PPIs mit einer Vielzahl von Zielproteinen zu untersuchen und könnten ein vielversprechender Startpunkt für die Entwicklung medizinisch aktiver Substanzen sein.

Eingegangen am 21. Dezember 2009,
veränderte Fassung am 1. März 2010
Online veröffentlicht am 30. April 2010

Stichwörter: 14-3-3-Proteine · Kristallstrukturen ·
Oberflächenplasmonenresonanz ·
Protein-Protein-Wechselwirkungen · Wirkstoffentwicklung

- [1] J. A. Wells, C. L. McClendon, *Nature* **2007**, 450, 1001–1009.
- [2] L. T. Vassilev, B. T. Vu, B. Graves, D. Carvajal, F. Podlaski, Z. Filipovic, N. Kong, U. Kammlott, C. Lukacs, C. Klein, N. Fotouhi, E. A. Liu, *Science* **2004**, 303, 844–848.
- [3] T. Oltersdorf, S. W. Elmore, A. R. Shoemaker, R. C. Armstrong, D. J. Augeri, B. A. Belli, M. Bruncko, T. L. Deckwerth, J. Dinges, P. J. Hajduk, M. K. Joseph, S. Kitada, S. J. Korsmeyer, A. R. Kunzer, A. Letai, C. Li, M. J. Mitten, D. G. Nettesheim, S.-C. Ng, P. M. Nimmer, J. M. O'Connor, A. Oleksijew, A. M. Petros, J. C. Reed, W. Shen, S. K. Tahir, C. B. Thompson, K. J. Tomaselli, B. Wang, M. D. Wendt, H. Zhang, S. W. Fesik, S. H. Rosenberg, *Nature* **2005**, 435, 677–681.
- [4] M. M. He, A. S. Smith, J. D. Oslob, W. M. Flanagan, A. C. Braisted, A. Whitty, M. T. Cancilla, J. Wang, A. A. Lugovskoy, J. C. Yoburn, A. D. Fung, G. Farrington, J. K. Eldredge, E. S. Day, L. A. Cruz, T. G. Cachero, S. K. Miller, J. E. Friedman, I. C. Choong, B. C. Cunningham, *Science* **2005**, 310, 1022–1025.
- [5] T. M. Bonacci, J. L. Mathews, C. Yuan, D. M. Lehmann, S. Malik, D. Wu, J. L. Font, J. M. Bidlack, A. V. Smrcka, *Science* **2006**, 312, 443–446.
- [6] S. S. Ray, R. J. Nowak, R. H. Brown, Jr., P. T. Lansbury, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, 102, 3639–3644.
- [7] P. Hammarström, R. L. Wiseman, E. T. Powers, J. W. Kelly, *Science* **2003**, 299, 713–716.
- [8] J. Choi, J. Chen, S. L. Schreiber, J. Clardy, *Science* **1996**, 273, 239–242.
- [9] J. P. Griffith, J. L. Kim, E. E. Kim, M. D. Sintchak, J. A. Thomson, M. J. Fitzgibbon, M. A. Fleming, P. R. Caron, K. Hsiao, M. A. Navia, *Cell* **1995**, 82, 507–522.
- [10] L. Renault, B. Guibert, J. Cherfils, *Nature* **2003**, 426, 525–530.
- [11] J. J. G. Tesmer, R. K. Sunahara, A. G. Gilman, S. R. Sprang, *Science* **1997**, 278, 1907–1916.
- [12] H. Hermeking, *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 931–943.
- [13] C. Y. Peng, P. R. Graves, R. S. Thoma, Z. W. Wu, A. S. Shaw, H. Piwnicka-Worms, *Science* **1997**, 277, 1501–1505.
- [14] M. J. Waterman, E. S. Stavridi, J. L. Waterman, T. D. Halazonetis, *Nat. Genet.* **1998**, 19, 175–178.
- [15] C. Oecking, C. Eckerskorn, E. W. Weiler, *FEBS Lett.* **1994**, 352, 163–166.
- [16] M. Würtele, C. Jelich-Ottmann, A. Wittinghofer, C. Oecking, *EMBO J.* **2003**, 22, 987–994.
- [17] C. Ottmann, S. Marco, N. Jaspert, C. Marcon, N. Schauer, M. Weyand, C. Vandermeeren, G. Duby, M. Boutry, A. Wittinghofer, J.-L. Rigaud, C. Oecking, *Mol. Cell* **2007**, 25, 427–440.
- [18] C. Oecking, M. Piotrowski, J. Hagemeyer, K. Hagemann, *Plant J.* **1997**, 12, 441–453.
- [19] N. C. Turner, A. Graniti, *Nature* **1969**, 223, 1070–1071.