

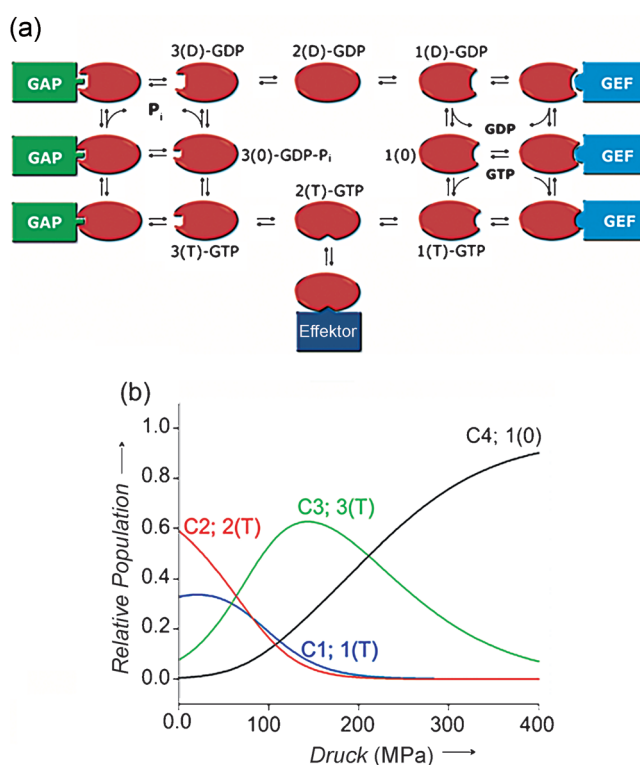
# Intrinsische allosterische Hemmung von Signalproteinen durch Stabilisierung gering besetzter, durch Hochdruck-NMR-Spektroskopie nachweisbarer Interaktionszustände\*\*

Hans Robert Kalbitzer,\* Ina C. Rosnizeck, Claudia E. Munte,  
Sunilkumar Puthenpurackal Narayanan, Veronika Kropf und Michael Spoerner

Proteine, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, liegen in mehr als einem Konformationszustand vor und erlauben somit im Allgemeinen eine neue Art der allosterischen Hemmung durch die Stabilisierung ihrer gering besetzten Interaktionszustände. Ein Beispiel ist das Ras-Protein, bei dem die Protein-Protein-Wechselwirkung zwischen Ras und Effektoren durch kleine Moleküle moduliert werden kann, die an den Konformationszustand 1(T) binden. Eine Analyse des Ras-Zyklus ergibt mindestens acht wirkstoffrelevante funktionelle Zustände des Proteins, die für eine allosterische Modulierung der Ras-Aktivität verwendet werden können. Es ist uns gelungen, die vier Zustände, die im aktivierten Ras erwartet werden, durch Hochdruck-NMR-Spektroskopie nachzuweisen. Die Untersuchungen, basierend auf dem Ras-System, führen zu einer neuen, allgemein anwendbaren Strategie zur Entwicklung allosterischer Inhibitoren für Protein-Protein-Wechselwirkungen in Mehrzustandssystemen, die typisch für signalleitende Proteine sind.

Das Ras-Protein ist in ungefähr 30 % aller menschlichen Tumoren aufgrund von spezifischen Punktmutationen permanent aktiviert.<sup>[1]</sup> Es ist das prototypische Mitglied der Ras-Superfamilie, der mehr als 100 verschiedene Guaninnukleotid-bindende Proteine (GNB-Proteine) aus verschiedenen Sub-Familien angehören (siehe z. B. Lit. [2]). Die GNB-Proteine wechseln zwischen zwei strukturellen Hauptzuständen, die durch Bindung von GDP oder GTP stabilisiert werden.

In diesem vereinfachten Schema ist die Affinität des GDP-gebundenen Zustands (Abbildung 1a) gegenüber Effektoren niedrig, und die Affinität des GTP-gebundenen



**Abbildung 1.** Konformationszustände von Ras während des Signalzyklus. a) Allgemeines Schema der funktionellen Zustände von Ras, die potentielle Zielstrukturen für Wirkstoffe sind. Es ist anzumerken, dass noch weitere für die Wirkstoffentwicklung relevante Zielstrukturen existieren; ein bekanntes Beispiel ist die Beeinflussung der kovalenten Modifizierung am C-Terminus. b) Die relativen Populationen der verschiedenen Konformationszustände von C1 bis C4 wurden mit den Parametern von Tabelle 1 als Funktion des Drucks berechnet [Gl. (9), Hintergrundinformationen]. C1 entspricht Zustand 1(T), C2 Zustand 2(T), C3 und C4 vermutlich Zustand 3(T) und Zustand 1(0).

Zustands zu den Effektor-Proteinen hoch. Das Signal wird weitergeleitet, wenn das gebundene GDP durch GTP mithilfe von Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs) ersetzt wird. Der Aktivierungszyklus wird durch die Hydrolyse von GTP zu GDP abgeschlossen, die durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs) katalysiert wird. Da aktiviertes Ras mit drei verschiedenen Proteinen mit sehr unterschiedlichen Bindungsstellen interagiert, ergeben grundlegende thermodynamische Überlegungen, dass mindestens drei Konformationszustände des aktivierten GNB-Proteins Ras·Mg<sup>2+</sup>·GTP nebeneinander in Lösung vorliegen müssen,<sup>[3]</sup> die den Kom-

[\*] Prof. Dr. H. R. Kalbitzer, Dr. I. C. Rosnizeck, Prof. Dr. C. E. Munte,<sup>[†]</sup> Dr. S. P. Narayanan, V. Kropf, Priv.-Doz. Dr. M. Spoerner  
Institut für Physik und Physikalische Biochemie, Zentrum für Magnetische Resonanz in der Chemie und Biomedizin (CMRCB), Universität Regensburg  
Universitätsstraße 31, 93047 Regensburg (Deutschland)  
E-Mail: Hans-Robert.Kalbitzer@Biologie.Uni-Regensburg.de

[†] Derzeitige Adresse: Physikalisches Institut São Carlos, Universität São Paulo (Brasilien)

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), der Bayerischen Forschungsförderung (BFS) und der Human Frontier Science Program Organisation (HFSP) unterstützt. Teile dieser Arbeit wurden auf der EUROMAR 2012 in Dublin, Irland, präsentiert.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag (Details zur Probenpräparation, NMR-Spektroskopie und der Auswertung der Hochdruck-Daten) sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201305741> zu finden.

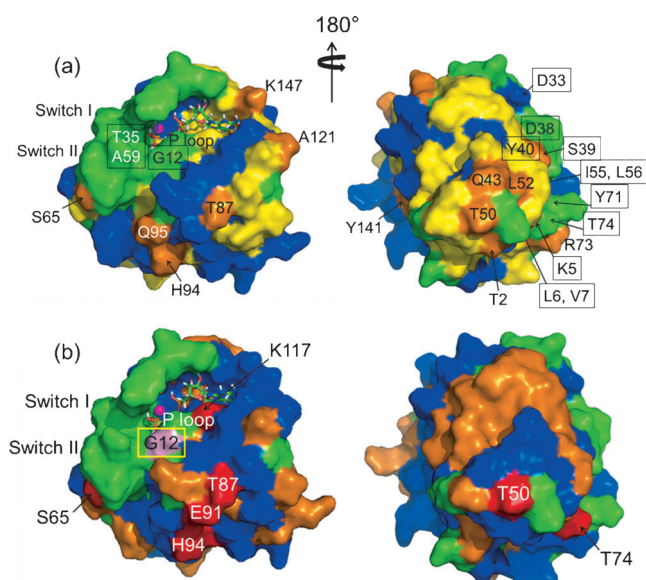
plexen mit GEFs (Zustand 1(T)), Effektoren (Zustand 2(T)) und GAPs (Zustand 3(T)) entsprechen (Abbildung 1).

Zwei der konformationellen Hauptzustände (Zustand 1(T) und Zustand 2(T)) von Ras-Mg<sup>2+</sup>·GppNHp können direkt durch <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie unterschieden und durch verschiedene Werte der chemischen Verschiebung für die Resonanzen der α- und γ-Phosphatgruppen charakterisiert werden.<sup>[4–6]</sup> Mithilfe der NMR-Spektroskopie und kinetischer Experimente konnte bereits gezeigt werden, dass Ras nur im Zustand 2(T) mit den Ras-Bindedomänen (RBD) der Effektor-Proteine wie RalGDS, cRaf-1, Af6 und Byr2 mit hoher Affinität interagiert.<sup>[4–9]</sup> Demgegenüber bindet der Nukleotidaustauschfaktor Sos bevorzugt an Zustand 1(T).<sup>[3]</sup> Für die Nukleosiddiphosphat-komplezierte Form (D) kann man annehmen, dass neben dem Hauptzustand 2(D) die mit GEF und GAP wechselwirkenden Zustände 1(D) und 3(D) in der Lösung vorkommen. Tatsächlich konnten mittels <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie auch für Ras-Mg<sup>2+</sup>·GDP bereits zwei Konformationszustände nachgewiesen werden.<sup>[10]</sup> Im allgemeinen Ras-Zyklus sind zusätzlich ein Nukleotid-freier Zustand und ein GDP·P<sub>i</sub>-gebundener Zustand erforderlich, die im Folgenden mit 1(0) und 3(0) bezeichnet werden (Abbildung 1).

Zum experimentellen Nachweis der zusätzlichen Konformationszustände im Ras-Protein führten wir weitere Hochdruck-<sup>[1</sup>H,<sup>15</sup>N]-HSQC-Experimente an Ras im Komplex mit dem nicht-hydrolysierenden GTP-Analog GppNHp durch (Abbildung S1, Hintergrundinformationen). Die Anpassung einer Taylor-Reihe zweiter Ordnung [Gl. (1), Hintergrundinformationen] an die druckinduzierten chemischen Verschiebungen wurde verwendet, um die besonders druckempfindlichen Regionen am Protein zu identifizieren. Die <sup>1</sup>H- und <sup>15</sup>N-NMR-chemischen Verschiebungen wurden für druckinduzierte Random-Coil-Effekte<sup>[11]</sup> korrigiert und zeigen daher nur strukturspezifische Druckeffekte (Abbildungen S2 und S3). Die Druckkoeffizienten können auf der Struktur von Ras-Mg<sup>2+</sup>·GppNHp abgebildet werden (Abbildung 2, für weitere Details siehe Abbildung S3). Aminosäuren, die mit bekannten Wirkstoffen interagieren, sind markiert.<sup>[12–15]</sup>

Qualitativ können hohe Druckkoeffizienten mit großen Strukturänderungen in der Nähe des betrachteten Atoms assoziiert werden, obwohl fehlende Verschiebungsänderungen nicht notwendigerweise die Abwesenheit von Strukturänderungen bedeuten.

Zusätzlich zu den Änderungen der chemischen Verschiebungen können auch Volumenänderungen der Kreuzsignale beobachtet werden (Abbildung 3 sowie Abbildung S4). Unter den Bedingungen des langsamen Austauschs wird eine Volumenänderung der Kreuzsignale erwartet, wenn sich in einem Gleichgewicht von *N* Zuständen die Populationen der beobachteten Konformationszustände mit dem Druck ändern. Die Intensität der meisten Kreuzsignale nimmt ab, da die Population des Hauptzustands 2(T) abnimmt, es erscheinen aber auch neue Kreuzsignale mit dem Druck (z. B. Gly12, Abbildung S5). Die Volumenänderungen können auf der Oberfläche der Struktur von Ras im Zustand 2(T) dargestellt werden (Abbildung 2b).



**Abbildung 2.** Druckempfindliche Aminosäuren in Ras(wt)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp und Protein-Protein-Interaktionsstellen. a) Aminosäuren, die hohe Druckkoeffizienten erster Ordnung für Amid-Protonen und Amid-Stickstoff-Atome aufweisen, sind auf der Oberfläche der Kristallstruktur von Ras(wt)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp<sup>[16]</sup> (pdb 5P21) dargestellt. Aminosäuren mit Druckkoeffizienten von  $B_{1,2}^* \leq 2\sigma_0$  und mindestens einem im Bereich  $\sigma_0 < B_{1,2}^* \leq 2\sigma_0$  sind gelb gekennzeichnet. Aminosäuren mit mindestens einem Druckkoeffizienten  $> 2\sigma_0$  sind orange gekennzeichnet. Aminosäuren, die im <sup>[1</sup>H,<sup>15</sup>N]-HSQC-Spektrum von Ras(wt)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp nicht sichtbar sind oder während der Druckreihe nicht verfolgt werden können, sind grün dargestellt. Aminosäuren mit  $B_{1,2}^* \leq \sigma_0$  sind blau gekennzeichnet. Aminosäuren, die Bindungsstellen von Ras-Inhibitoren darstellen, sind markiert: Zn<sup>2+</sup>-Cyclen, Gly12, Asp33, Thr35, Ala59,<sup>[12]</sup> Zn<sup>2+</sup>-BPA, Asp38, Ser39, Tyr40,<sup>[13]</sup> 4,6-Dichlor-2-methyl-3-aminoethylindol (DCAI), Lys5, Leu6, Val7, Ile55, Leu56, Thr74<sup>[14]</sup> und 2-((1*H*-Indol-3-yl)methyl)-3*H*-imidazo[4,5-*c*]pyridin, Lys5, Val7, Ser39, Asp54, Leu56, Tyr71, Thr74.<sup>[15]</sup> b) Die Volumenänderungen der <sup>[1</sup>H,<sup>15</sup>N]-HSQC-Kreuzsignale mit dem Druck sind auf der Oberfläche der Kristallstruktur von Ras(wt)·Mg<sup>2+</sup>·GppNHp aufgetragen. Aminosäuren mit einer Volumenverringern von  $> \sigma_0$  sind orange dargestellt, Signale, die bei 180 MPa vollständig verschwinden, sind rot markiert. Aminosäuren, die bei Umgebungsdruck aufgrund von Austauschverbreiterung nicht sichtbar sind, sind grün gekennzeichnet. Aminosäuren, die eine Volumenänderung von  $< \sigma_0$  zeigen, sind blau gekennzeichnet. Bei 278 K und Hochdruck werden die Signale von Gly12 und Gly13 sichtbar (rosa markiert).

Die druckabhängigen Regionen können mit den Interaktionsstellen von Ras im Komplex mit GEFs, Effektoren und GAPs verglichen werden (Abbildung S6). Im Modell der konformativen Selektion (Abbildung 1) wird erwartet, dass Teile dieser Regionen an den Konformationsübergängen beteiligt sind, und daher durch Druckänderungen nachgewiesen werden können. Abbildung 2 zeigt eine gute Korrelation mit diesen Daten. Dennoch können die Konformationsübergänge nicht nur auf die Interaktionsoberflächen beschränkt sein, da Strukturelemente in Proteinen stark gekoppelt sind. Tatsächlich werden auch außerhalb der Interaktionsoberflächen signifikante Druckeffekte beobachtet. Dies wird besonders an der Rückseite des Proteins deutlich (Abbildung 2), auf der z. B. Gln43 und Thr50 eine sehr große Reaktion auf den Druck zeigen.

Eine detailliertere Analyse der Daten mit einem thermodynamischen Modell (siehe Hintergrundinformationen) ermöglicht die Ermittlung der Differenz der freien Energie  $\Delta G_{ij}^0$  und die entsprechende Differenz des partiellen molaren Volumens  $\Delta V_{ij}^0$  zwischen zwei Konformationszuständen Ci und Cj bei der Referenztemperatur  $T_0$  und dem Referenzdruck  $p_0$  (Tabelle 1).

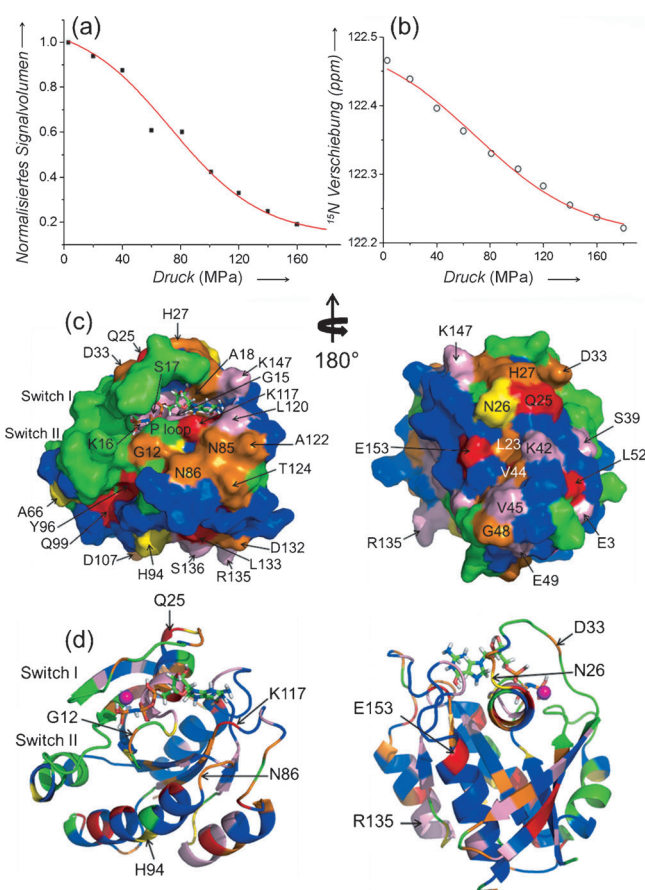
**Tabelle 1:** Konformationsübergänge und zugehörige Differenzen der molaren freien Energien  $\Delta G^0$  und partiellen molaren Volumina  $\Delta V^0$  von Ras(wt)-Mg<sup>2+</sup>-GppNHP bei 303 K.<sup>[a]</sup>

Übergang	$\Delta G^0$ [kJ mol <sup>-1</sup> ]	$\Delta V^0$ [mL mol <sup>-1</sup> ]
C2→C1	1.5 ± 0.2	-18 ± 1
C2→C3	5.2 ± 0.3	-81 ± 3
C2→C4	12.4 ± 0.4	-115 ± 2

[a] Im Rahmen der Fehlergrenzen sind die Differenzen der freien Energien  $\Delta G^0$  und partiellen molaren Volumina  $\Delta V^0$  für die Übergänge C2→C1 und C2→C3 im Bereich zwischen 278 K und 303 K unabhängig von der Temperatur.  $\Delta G^0$  und  $\Delta V^0$  wurden aus den Druckabhängigkeiten der chemischen Verschiebungen und der Volumina der Kreuzsignale bestimmt.

Es stellt sich heraus, dass mindestens vier verschiedene Konformationszustände C1 bis C4 für eine zufriedenstellende Erklärung (und Anpassung) der druckinduzierten Änderungen der chemischen Verschiebungen notwendig sind. Ein Beispiel ist in Abbildung 3 gezeigt, in der die Änderung der <sup>15</sup>N-chemischen Verschiebung des Kreuzsignals von Glu49 und die Volumenänderung des Kreuzsignals von Ala18 mit denselben Differenzen der freien Enthalpie und des partiellen molaren Volumens angepasst werden können. Einige Aminosäuren zeigen eine zweiphasige Druckabhängigkeit der chemischen Verschiebungen, die für ein Modell typisch ist (und angepasst werden kann), in dem mehr als ein Übergang den betrachteten Spin beeinflusst (siehe Abbildung S7). Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass die strukturellen Zustände, die unter atmosphärischem Druck im Wildtyp-Protein dominieren, der Effektor-bindende Zustand 2(T) und der mit dem Austauschfaktor interagierende Zustand 1(T) sind. Durch <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie konnten wir bereits  $\Delta G_{21}^0$  zu 1.48 kJ mol<sup>-1</sup><sup>[6]</sup> und  $\Delta V_{21}^0$  zu -17.2 mL mol<sup>-1</sup><sup>[3]</sup> bestimmen.

Im Rahmen der Fehlergrenzen sind diese Werte gleich der hier erhaltenen Differenzen der freien Energien und der partiellen Volumina des C2-C1-Übergangs (Tabelle 1). Die Zuordnung der Konformationen C3 und C4 zu funktionellen Zuständen ist per se nicht eindeutig, aber aus unserem vereinfachten Schema (Abbildung 1) geht hervor, dass einer dieser Zustände vermutlich den GAP-interagierenden Zustand 3(T) darstellt. Der vierte Zustand könnte der offene, nukleotidfreie Zustand mit niedriger Affinität gegenüber Nukleotiden 1(0) sein (Abbildung 1), da bei sehr hohem Druck das Nukleotid freigesetzt werden sollte. Tatsächlich konnte bereits in Denaturierungsexperimenten mit GdmCl die Freisetzung des Nukleotids mittels <sup>31</sup>P-NMR-Spektroskopie beobachtet werden, wobei für die Differenz der freien Enthalpien von Zustand 2(T) und dem nukleotidfreien Zu-



**Abbildung 3.** Druckabhängigkeit der Konformationsübergänge. Anpassung der a) normalisierten druckabhängigen Volumenänderung der Kreuzsignale von Ala18 und b) der Änderung der <sup>15</sup>N<sup>H</sup>-chemischen Verschiebung der Amid-Kreuzsignale von Glu49 im [<sup>1</sup>H,<sup>15</sup>N]-HSQC-Spektrum von Ras(wt)-Mg<sup>2+</sup>-GppNHP unter a) der Annahme des langsamen [siehe Gl. (4) und (8) in den Hintergrundinformationen] und b) des schnellen Austauschs auf der NMR-Zeitskala [siehe Gl. (2) und (3) in den Hintergrundinformationen]. Die Temperatur war 303 K. Beide Aminosäuren lassen sich in einem Zweizustandsmodell mit einem  $\Delta G_{24}^0$  von 12.4 kJ mol<sup>-1</sup> und einem  $\Delta V_{24}^0$  von -115 mL mol<sup>-1</sup> fiten.  $\chi^2$  ist jeweils 0.003. c) Aminosäuren, die an den verschiedenen Übergängen beteiligt sind, sind auf der Van-der-Waals-Oberfläche markiert, die aus der Röntgenstruktur von Ras-Mg<sup>2+</sup>-GppNHP berechnet wurde.<sup>[16]</sup> Die Aminosäuren, die nur am Übergang von C2 zu C1, C2 zu C3 oder C2 zu C4 beteiligt sind, sind jeweils gelb, orange und rosa markiert. Aminosäuren, die auf die Übergänge C2 zu C1 und C2 zu C3 reagieren, sind rot dargestellt. Aminosäuren, die keine signifikante Reaktion auf den Druck zeigen, sind blau, und Aminosäuren, die nicht detektiert werden können, sind grün dargestellt. d) Bändermodell, das die entsprechenden Sekundärstrukturelemente zeigt.

stand ein  $\Delta G^0$  von etwa 9.8 kJ mol<sup>-1</sup> erhalten wurde. Dieser Wert liegt im Bereich von 12.4 ± 0.4 kJ mol<sup>-1</sup> für den hier abgeschätzten Wert des C2-C4-Übergangs.<sup>[3]</sup> Zustand C4 stellt keinen komplett denaturierten Zustand dar, da die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren noch typische Merkmale eines hydrophoben Kerns, wie z.B. Hochfeld-verschobene Methylresonanzen, zeigen.

Zur Strukturanalyse der thermodynamischen Daten sind die Aminosäuren, die durch verschiedene Übergänge beeinflusst werden, auf der Oberfläche der Kristallstruktur von Ras

farbig dargestellt (Abbildung 3); eine detaillierte Projektion auf die Sequenz von Ras ist in Abbildung S6 gezeigt.

Gly12, His27, Asp33 und Asn86 sind am C2-C3-Übergang beteiligt (Tabelle 1) und sind Teil der GAP-Bindungsstelle (Abbildung S6). Dies weist darauf hin, dass C3 dem Zustand 3(T) entspricht, wie in Abbildung 1 dargestellt. Gly15, Lys16, Ser17, Ala18, Leu120, Ala146 und Lys147 reagieren selektiv auf den C2-C4-Übergang; es ist bekannt, dass sie wesentlich zur Nukleotidbindung beitragen, die im Zustand 1(0) nicht mehr existiert; somit entspricht C4 in unserem Modell höchstwahrscheinlich dem Zustand 1(0).

Nur eine begrenzte Anzahl der Aminosäuren in Switch I und Switch II ist im Wildtyp-Protein sichtbar, die meisten sind bei niedrigem Druck gar nicht oder nur schwach zu sehen. Der Hauptgrund hierfür ist höchstwahrscheinlich das Auftreten mehrerer Konformationen im intermediären und langsamen Austausch auf der NMR-Zeitskala ( $< 10 \text{ s}^{-1}$ ); dies wurde ursprünglich von Ito et al.<sup>[17]</sup> als regionaler Polysterismus bezeichnet. Tatsächlich befinden sich viele dieser Aminosäuren in den überlappenden Interaktionsstellen der GEFs (Zustand 1(T)), Effektoren (Zustand 2(T)) und GAPs (Zustand 3(T)) (Abbildung S6). Die meisten von ihnen werden in der Zustand 1(T)-Mutante Ras(T35S) sichtbar, die im Gegensatz zum Wildtyp-Protein bei Umgebungsdruck überwiegend im Zustand 1(T) vorliegt. Dies zeigt, dass sie am Übergang von 2(T) zu 1(T) beteiligt sind. Die Populationen der verschiedenen Zustände bei unterschiedlichem Druck können aus den entsprechenden thermodynamischen Parametern berechnet werden (Abbildung 1). Bei atmosphärischem Druck dominieren die Zustände 2(T) und 1(T), mit steigendem Druck nimmt die Population des Effektor-bindenden Zustands 2(T) ab, die von Zustand 1(T) erst leicht zu und ab einem Druck über 100 MPa ab. Zustand 3(T) nimmt stark zu, dominiert bei einem Druck von 120 MPa und nimmt bei höherem Druck wieder ab. Bei Drücken über 300 MPa liegt vor allem der Nukleotid-freie Zustand 1(0) vor.

Die klassische rationale Wirkstoffentwicklung konzentriert sich auf das aktive Zentrum von Enzymen und verwendet kleine Moleküle, die Substrate oder Produkte der enzymatischen Reaktion nachahmen. Normalerweise wird die enzymatische Reaktion gehemmt und die Wirkstoffe binden in einer kompetitiven Weise.

Ein Spezialfall ist das Vorhandensein einer regulatorischen Bindungsstelle (allosterische Regulation) in Enzymen, die ebenfalls durch kleine Moleküle besetzt werden kann, die mit den natürlichen Modulatoren konkurrieren. Das Monod-Wyman-Changeux-Modell (MCW-Modell) der allosterischen Regulation<sup>[18]</sup> kann auf zwei grundlegende Bedingungen reduziert werden, die Existenz von zwei strukturellen Zuständen eines Proteins, das 1) zwei räumlich getrennte Bindungsstellen für zwei unterschiedliche Liganden mit 2) verschiedenen Affinitäten in den beiden Zuständen besitzt.

Wie hier gezeigt, kann diese grundlegende Idee auch auf Proteine angewendet werden, die keine speziellen regulatorischen Zentren entwickelt haben. Wenn ein Protein mit verschiedenen Proteinen in einem funktionellen Zyklus interagiert, sind unterschiedliche strukturelle Zustände für die spezifische Erkennung der Partner notwendig (siehe auch Abbildung 1). Im Allgemeinen sind diese strukturellen Un-

terschiede nicht auf die Interaktionsstelle an sich beschränkt, wie unsere Hochdruck-Daten für aktiviertes Ras anschaulich zeigen. Diese strukturellen Unterschiede außerhalb der überlagernden Protein-Bindungsstellen erzeugen „intrinsische“ allosterische Bindungsstellen, die potenziell selektiv durch kleine Liganden besetzt werden können (Bedingung 1). Wenn der Ligand unterschiedliche Affinitäten für einen bestimmten Zustand aufweist (Bedingung 2), wird dessen Bindung zur Zunahme der relativen Population dieses Zustandes führen, und gleichzeitig die Populationen aller anderen Zustände beeinflussen.

Tatsächlich konnten wir bereits zeigen, dass die Stabilisierung des Zustands 1(T) von Ras durch  $\text{Zn}^{2+}$ -Zyklen<sup>[12,19,20]</sup> zu einer effektiven Hemmung der Effektor-Bindung führt.  $\text{Zn}^{2+}$ -Zyklen bindet an das  $\gamma$ -Phosphat von GTP in der Nukleotid-Bindetasche (Abbildung 2), die sich in einer lokalen Konformation befindet, die nur im Zustand 1(T) vorliegt. Es kann jedoch jede andere Bindungsstelle für kleine Moleküle außerhalb der Nukleotid-Bindetasche verwendet werden, solange sie an den strukturellen 1(T)-Übergang gekoppelt ist. In Übereinstimmung mit dieser Überlegung bindet  $\text{Zn}^{2+}$ -BPA außerhalb der Nukleotid-Bindetasche, stabilisiert aber dennoch den Zustand 1(T).<sup>[13]</sup> Es interagiert mit Ser39, einer Aminosäure, die auch auf den schwach Nukleotid-bindenden Zustand 1(0) reagiert. (Abbildung 3 sowie Abbildung S6). Tatsächlich löst  $\text{Zn}^{2+}$ -BPA bei höheren Konzentrationen die Freisetzung des gebundenen Nukleotids aus; eine Eigenschaft, die für eine Verschiebung des Gleichgewichts zum Zustand 1(0) erwartet wird.<sup>[13]</sup>

Die neue Art allosterischer Hemmung hat auch zusätzliche „Nebeneffekte“, da die Stabilisierung jedes beliebigen Zustands im Signalzyklus die gesamte Gleichgewichtsverteilung aller anderen funktionellen Zustände verschiebt. Für Ras kann aus Abbildung 1 vorhergesagt werden, dass  $\text{Zn}^{2+}$ -Zyklen die intrinsische GTPase-Aktivität verringert, die intrinsische Austrauschrate erhöht, aber voraussichtlich auch die Sos-vermittelte Austausch-Aktivität verringert. Der zuletzt genannte Effekt wurde durch eine Anzahl von Verbindungen, veröffentlicht als Sos-Inhibitoren von Maurer et al.,<sup>[14]</sup> beobachtet. Einige dieser Verbindungen sind kommerziell erhältlich, und durch  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie kann tatsächlich gezeigt werden, dass sie schwache Zustand 1(T)-Inhibitoren sind (Abbildung S8), obwohl angenommen wird, dass sich ihre Hauptfunktion auf den GDP-gebundenen Zustand konzentriert (als Zustand 1(D)-Stabilisatoren?). Offensichtlich können auch kombinierte Arten der Wechselwirkungen auftreten, wenn ein allosterischer Inhibitor an die Protein-Protein-Interaktionsstelle bindet und damit gleichzeitig die Protein-Protein-Wechselwirkung direkt hemmt. Dies trifft für  $\text{Zn}^{2+}$ -BPA zu, dessen Bindungsstelle mit der Effektor-Bindungsstelle von Ras überlagert, und für die veröffentlichten Verbindungen von Maurer et al.<sup>[14]</sup> und Sun et al.,<sup>[15]</sup> deren Bindungspositionen mit der Interaktionsstelle von Sos überlappen (Abbildung 2).

Die Struktur des Zustands 1(T) wie sie in den Ras-Mutanten Ras(T35A) oder Ras(T35S) vorliegt, wurde bereits zum experimentellen<sup>[13,21]</sup> und virtuellen<sup>[22]</sup> Wirkstoffscreening genutzt. Hochdruck-NMR-Spektroskopie stellt eine effektive Methode dar, neue Konformationszustände zu de-



tektieren, die durch kleine Moleküle stabilisiert werden können. Zusätzliche vielversprechende Regionen für die allosterische Hemmung auf der Oberfläche außerhalb der Protein-Protein-Interaktionsstelle, die zukünftig zur Wirkstoffentwicklung genutzt werden können, sind mit Hochdruck-NMR (Abbildung 2) identifizierbar.

Zusammenfassend stellt diese „nicht-klassische“ Art der allosterischen Hemmung eine allgemein anwendbare Strategie zur Modulierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen durch kleine Moleküle dar, unabhängig vom Vorhandensein der klassischen allosterischen regulativen Bindungsstellen.

Eingegangen am 3. Juli 2013,

veränderte Fassung am 20. August 2013

Online veröffentlicht am 11. November 2013

**Stichwörter:** Allosterische Hemmung · Hochdruck-NMR-Spektroskopie · Konformationszustände · Ras-Protein · Wirkstoff-Forschung

- [1] J. L. Bos, *Cancer Res.* **1989**, *49*, 4682–4689.
- [2] A. Wittinghofer, H. Waldmann, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 4360–4383; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 4192–4214.
- [3] H. R. Kalbitzer, M. Spoerner, P. Ganser, C. Hosza, W. Kremer, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 16714–16719.
- [4] M. Geyer, T. Schweins, C. Herrmann, T. Prisner, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Biochemistry* **1996**, *35*, 10308–10302.
- [5] M. Spoerner, C. Herrmann, I. Vetter, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 4944–4949.
- [6] M. Spoerner, A. Nuehs, P. Ganser, C. Herrmann, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Biochemistry* **2005**, *44*, 2225–2236.
- [7] M. Geyer, C. Herrmann, S. Wohlgemuth, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Nat. Struct. Biol.* **1997**, *4*, 694–699.
- [8] W. Gronwald, F. Huber, P. Grünwald, M. Spörner, S. Wohlgemuth, C. Herrmann, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Structure* **2001**, *9*, 1029–1041.
- [9] T. Linnemann, M. Geyer, B. K. Jaitner, C. Block, H. R. Kalbitzer, A. Wittinghofer, C. Herrmann, *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 13556–13562.
- [10] M. Rohrer, T. F. Prisner, O. Brüggemann, H. Käss, M. Spoerner, A. Wittinghofer, H. R. Kalbitzer, *Biochemistry* **2001**, *40*, 1884–1889.
- [11] J. Koehler, M. B. Erlach, E. Crusca, Jr., W. Kremer, C. E. Munte, H. R. Kalbitzer, *Materials* **2012**, *5*, 1774–1786.
- [12] I. C. Rosnizeck, T. Graf, M. Spoerner, J. Tränkle, D. Filchtinski, C. Herrmann, L. Gremer, I. R. Vetter, A. Wittinghofer, B. König, H. R. Kalbitzer, *Angew. Chem.* **2010**, *122*, 3918–3922; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 3830–3833.
- [13] I. C. Rosnizeck, M. Spoerner, T. Harsch, S. Kreitner, D. Filchtinski, C. Herrmann, D. Engel, B. König, H. R. Kalbitzer, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10799–10804; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10647–10651.
- [14] T. Maurer, L. S. Garrenton, A. Oha, K. Pitts, D. J. Anderson, N. J. Skelton, B. P. Fauber, B. Pan, S. Malek, D. Stokoe, M. J. C. Ludlam, K. K. Bowman, J. S. Wu, A. M. Giannetti, M. A. Starovasnik, I. Mellman, P. K. Jackson, J. Rudolph, W. R. Wang, G. Fang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 5299–5304.
- [15] Q. Sun, J. P. Burke, J. Phan, M. C. J. Burns, E. T. Olejniczak, A. G. Waterson, T. Lee, O. W. Rossanese, S. W. Fesik, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 6244–6247; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 6140–6143.
- [16] E. F. Pai, U. Krengel, G. A. Petsko, R. S. Goody, W. Kabsch, A. Wittinghofer, *EMBO J.* **1990**, *9*, 2351–2359.
- [17] Y. Ito, K. Yamasaki, J. Iwahara, T. Terada, A. Kamiya, M. Shirouzu, Y. Muto, G. Kawai, S. Yokoyama, E. D. Laue, M. Walchli, T. Shibata, S. Nishimura, T. Miyazawa, *Biochemistry* **1997**, *36*, 9109–9119.
- [18] J. Monod, J. Wyman, J. P. Changeux, *J. Mol. Biol.* **1965**, *12*, 88–118.
- [19] H. R. Kalbitzer, B. Koenig, PCT Int. Appl. 14 pp. WO2004006934 A2 20040122, 2004 [CAN 140:122769; AN2004:6032; DE 102 39 612 A1 2004.01.29], **2004**.
- [20] M. Spoerner, T. Graf, B. König, H. R. Kalbitzer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *334*, 709–713.
- [21] F. Schmidt, I. C. Rosnizeck, M. Spoerner, H. R. Kalbitzer, B. König, *Inorg. Chim. Acta* **2011**, *365*, 38–48.
- [22] S. Kreitner, M. Spoerner, S. Dove, B. König, H. R. Kalbitzer, Proceedings of the 32th Annual Discussion Meeting of the GDCh Magnetic Resonance Division: Magnetic Resonance in Chemistry and Biology, Münster **2010**, 87–87.