

Redox-Modulation der PTEN-Phosphataseaktivität durch Wasserstoffperoxid und Bisperoxidovanadium-Komplexe

Chang-Uk Lee, Gernot Hahne, Jonas Hanske, Tanja Bange, David Bier, Christoph Rademacher, Sven Hennig und Tom N. Grossmann*

Abstract: PTEN ist eine dualspezifische Protein-Tyrosin-Phosphatase. Sie ist einer der zentralen Tumorsuppressoren, weshalb eine genaue Regulierung ihrer Aktivität essenziell für die richtige zelluläre Homöostase ist. Die genauen Auswirkungen der Inhibition von PTEN durch reaktive Sauerstoffspezies (z. B. H_2O_2) und deren strukturelle Folgen sind bisher wenig verstanden. Wichtige Instrumente für das Studium der Wirkung von PTEN-Inhibition sind Bisperoxidovanadium-(bpV)-Komplexe, mit dem Potenzial für die Behandlung von Nervenverletzungen oder kardialer Ischämie. Allerdings ist ihr Wirkmechanismus unbekannt, was weitere Optimierungen und therapeutische Anwendungen erschwert. Mithilfe der Proteinkristallographie, Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie untersuchen wir hier die molekularen Grundlagen der PTEN-Inhibition durch H_2O_2 und bpV-Komplexe. Dabei zeigen wir, dass PTEN in beiden Fällen oxidativ inhibiert wird und sich die gleiche intramolekulare Disulfidbrücke bildet. Dies ermöglicht die Reaktivierung von PTEN unter reduzierenden Bedingungen.

PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) ist ein Mitglied der Superfamilie der Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTPs) und einer der wichtigsten Tumorsuppressoren.^[1] Zudem ist sie ein entscheidender Faktor

bei regenerativen Prozessen.^[2] Diese Eigenschaften hängen hauptsächlich mit der hemmenden Wirkung auf den AKT-Signalweg zusammen, der durch die Lipid-Phosphataseaktivität vermittelt wird.^[1] PTEN wird durch posttranslationale Modifikationen, z. B. Phosphorylierung, Ubiquitinierung und Oxidation, reguliert.^[1,3] PTEN und viele andere PTPs haben ein aktives Zentrum mit einer charakteristischen Phosphatbindeschleife (P-Loop: [I/V]HCXXGXXR[S/T]). In diesem P-Loop befindet sich ein deprotoniertes katalytisches Cysteine,^[4,5] das besonders oxidationsanfällig ist.^[6] Im zellulären Kontext können reaktive Sauerstoffspezies (z. B. H_2O_2)^[7] zunächst die Oxidation von Thiolen zu Sulfensäure auslösen, die anschließend entweder irreversibel zu Sulfin- und Sulfonsäure^[6] weiter oxidiert werden oder durch Reaktion mit Nucleophilen (z. B. Thiolen und aktivierten Amidinen) zu reversiblen Modifikationen wie Disulfiden oder Sulfenamiden führen (Abbildung 1 a).^[6] Die reversible Modifikation ist ein

[*] C.-U. Lee, Dr. G. Hahne, D. Bier, Dr. S. Hennig, Dr. T. N. Grossmann
Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft
Otto-Hahn-Straße 15, 44227 Dortmund (Deutschland)
E-Mail: tom.grossmann@cgc.mpg.de

J. Hanske, Dr. C. Rademacher
Max-Planck-Institut für Kolloid- und Grenzflächenforschung
Am Mühlenberg 1, 14424 Potsdam (Deutschland)

Dr. T. Bange, Dr. T. N. Grossmann
Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie
Otto-Hahn-Straße 11, Dortmund (Deutschland)

C.-U. Lee, Dr. G. Hahne, Dr. T. N. Grossmann
Technische Universität Dortmund
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
Otto-Hahn-Straße 6, 44227 Dortmund (Deutschland)

Dr. T. N. Grossmann
VU University Amsterdam
Department of Chemistry & Pharmaceutical Sciences
De Boelelaan 1083, 1081 HV, Amsterdam (Niederlande)

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201506338> zu finden.

© 2015 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial License, die eine Nutzung, Verbreitung und Vervielfältigung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird.

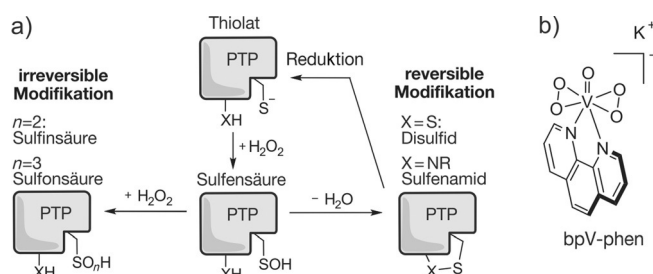


Abbildung 1. a) H_2O_2 vermittelt die Oxidation von Thiolen zu Sulfensäure, die mit Nucleophilen unter Bildung reversibler Modifikationen reagieren kann. Alternativ ist auch eine irreversible Bildung von Sulfin- oder Sulfonsäure möglich. b) Chemische Struktur von bpV-phen (Kaliumoxidobis(η^2 -peroxido)phenanthrolinvanadat).

zellulärer Schutzmechanismus, der die irreversible Schädigung der Phosphataseaktivität verhindert.^[6] H_2O_2 inhibiert die Phosphataseaktivität von PTEN durch Disulfidbildung zwischen dem katalytischen Cystein C124 und dem räumlich benachbarten Cystein C71.^[8–10] Bisher waren die strukturellen Folgen dieser Oxidation unbekannt.

Die Inhibition von PTEN und die nachfolgende Aktivierung von zellulären Überlebenssignalen können die Zellregeneration stimulieren, wodurch das Wachstum von Axonen und das Überleben von Nervenzellen begünstigt werden.^[11] Daher wird die Inhibition von PTEN als therapeutischer Ansatz für Nervenverletzungen und kardiale Ischämie in Erwägung gezogen. Bisperoxidovanadium-Komplexe (bpV-Komplexe, auch: Bisperoxovanadium-Komplexe) inhibieren die PTEN-Aktivität und fungieren als Modellverbindungen,

um diese Auswirkungen zu studieren.^[12–16] Die genaue Wirkungsweise von bpV-Inhibitoren ist noch umstritten,^[13,16] ihre Aufklärung kann allerdings die weitere Entwicklung von PTEN-Inhibitoren unterstützen. Um strukturelle Einblicke in die Inhibition von PTEN durch H₂O₂ und bpV-Komplexe zu erhalten, verwendeten wir Proteinkristallographie, Massenspektrometrie (MS) und ⁵¹V-NMR-Spektroskopie. Bemerkenswert ist, dass beide Moleküle PTEN durch oxidative Mechanismen inhibieren, die zur Bildung der gleichen intramolekularen Disulfidbrücke führen. In beiden Fällen ist die Disulfidbildung unter reduktiven Bedingungen reversibel.

Die Phosphataseaktivität von Vollängen-PTEN wurde zunächst mithilfe eines Malachitgrün-Assays untersucht, wobei Phosphatidylinositoltrisphosphat [PI(3,4,5)P₃] als Substrat verwendet wurde. Die halbmaximalen Inhibitions-konzentrationen (IC₅₀) von H₂O₂ und bpV-phen (Abbildung 1b) wurden bestimmt und liegen in den vorher berichteten Bereichen [H₂O₂: IC₅₀ = (60 ± 23) μM, bpV-phen: IC₅₀ = (0.18 ± 0.02) μM, Abbildung S2 der Hintergrundinformationen].^[8,12] Um die Reversibilität der PTEN-Inhibition unter reduzierenden Bedingungen zu überprüfen, wurde PTEN mit H₂O₂ (3.5 mM) vorbehandelt. Anschließend wurden die Proben mit einem entsprechenden Puffer verdünnt, der entweder kein Reduktionsmittel (mock) oder Dithiothreitol (DTT, 4 mM) oder Glutathion (GSH, 4 mM) enthielt (Abbil-

dung 2a). In Abwesenheit von Reduktionsmittel wurde effiziente PTEN-Inhibition beobachtet [verbleibende Phosphataseaktivität: (8 ± 4) %], während die Zugabe von DTT oder GSH die Reaktivierung zur Folge hatte [Phosphataseaktivitäten: (99 ± 3) % bzw. (73 ± 4) %]. In Anbetracht der vorhandenen Peroxidoliganden in bpV-phen und des bisher unbekannten Inhibitionsmechanismus überprüften wir, ob die PTEN-Inhibition durch bpV-phen ebenfalls unter reduzierenden Bedingungen aufgehoben wird. Analog zur Behandlung mit H₂O₂ wurde die Inhibition von PTEN [verbleibende Phosphataseaktivität: (4 ± 4) %] nach Inkubation mit DTT oder GSH aufgehoben [Phosphataseaktivitäten: (95 ± 7) % bzw. (69 ± 5) %], was auf eine oxidative Inhibition durch bpV-phen schließen lässt (Abbildung 2a).

H₂O₂ löst im aktiven Zentrum von PTEN die Disulfidbildung zwischen den Cysteinen C124 und C71 aus.^[8] Ob die Behandlung mit bpV-phen zur gleichen Disulfidbrücke führt, untersuchten wir mit HPLC-gekoppelter hochauflösender MS. Nach Inkubation von PTEN mit H₂O₂ oder bpV-phen wurden die Proben mit Iodacetamid behandelt, um freie Thiole zu schützen. Dem folgte ein tryptischer Verdau in Abwesenheit von Reduktionsmittel, um die vorhandenen Disulfidbrücken zu bewahren. Die dadurch erhaltenen Peptide wurden mit MS analysiert. Behandlung mit H₂O₂ und bpV-phen führte zur Bildung eines tryptischen Fragments mit einer monoisotopischen Masse von 930.918 Th (MH⁴⁺), die in der unbehandelten Probe fehlte. MS/MS-Sequenzierung dieses Peaks (Abbildung S7) identifizierte ein Fragment, das aus zwei Peptiden bestand, verknüpft durch eine Disulfidbindung zwischen C124 und C71 (Abbildung 2b). Anschließend Behandlung der tryptischen Mischung mit DTT führte zum vollständigen Verschwinden des entsprechenden Isotopenmusters (Abbildung 2c). Dies bestätigt die oxidative Inhibition von PTEN durch bpV-phen.

Proteinkristallographie wurde verwendet, um die strukturellen Auswirkungen der Disulfidbildung zu untersuchen. Die einzige bisher verfügbare Kristallstruktur von PTEN (PDB: 1D5R) enthält das aktive Zentrum im reduzierten Zustand. Diese Struktur wurde mit einem verkürzten Proteinkonstrukt von PTEN generiert, das aus der zentralen Phosphatase und der C2-Domäne besteht (tPTEN, 7–353 AS, mit einem fehlenden Sequenzbereich von 286 bis 309).^[17] Die Verwendbarkeit von tPTEN für unsere Studien wurde dadurch bestätigt, dass die Behandlung mit H₂O₂ sowie bpV-phen das gleiche disulfidverbrückte tryptische Fragment ergibt, das bei PTEN voller Länge beobachtet wurde (Abbildungen S8 und S9). Wir nutzten eine Kristallisationsbedingung analog zur PTEN-Struktur.^[17] Die entstandenen Proteinkristalle wurden bis zu einer Auflösung von 2.2 Å vermessen. tPTEN kristallisiert in einer anderen Raumgruppe als die ursprüngliche Struktur (C222₁ gegenüber I4), die sich durch eine deutlich größere Elementarzelle auszeichnet und vier tPTEN-Moleküle pro asymmetrische Einheit beherbergt (Abbildung S10). Bei der Überlagerung zeigen die vier Protomere sowohl untereinander (maximaler RMSD = 1.46 Å für 314 C_α-Atome) als auch mit der vorherigen tPTEN-Struktur (maximaler RMSD = 1.29 Å; Abbildungen S11 und S12) eine hohe Übereinstimmung. Wie bereits bei der früheren tPTEN-Struktur berichtet, bindet das aktive

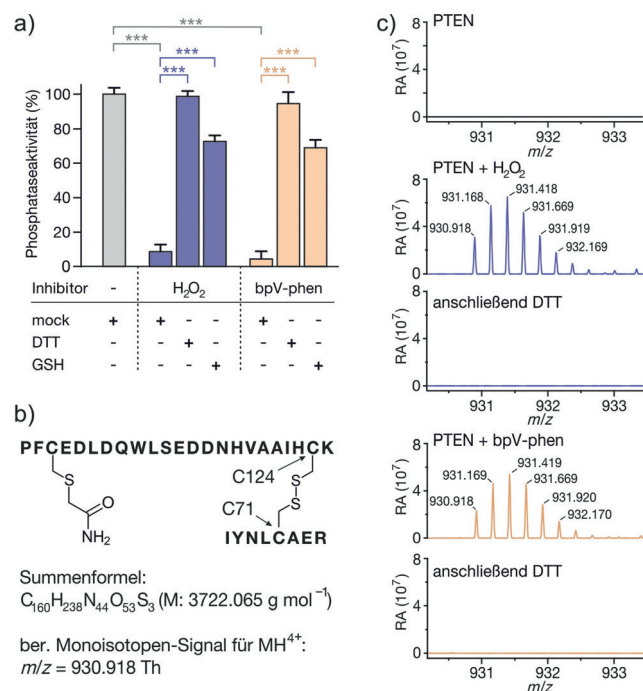


Abbildung 2. a) Die Inhibition von PTEN (100 μM) durch H₂O₂ (3.5 mM, blau) oder bpV-phen (400 μM, orange) wird in Gegenwart von Thiolen aufgehoben (T = 25 °C, 4 mM DTT bzw. GSH, dreifache Messungen, Fehler 1σ; *** P < 0.001). b) Tryptisches Peptidfragment mit Disulfidbrücke zwischen C71 und C124 (Th: Thomson = Da/e). c) Hochaufgelöste MS-Spektren des tryptischen Fragments (Abbildung 2b) nach Behandlung mit H₂O₂ (1 mM, blau) oder bpV-phen (1 mM, orange). T = 25 °C, 100 μM PTEN, t = 10 min; jeweils im oberen Diagramm. Das Fragment fehlt in der unbehandelten Kontrolle (schwarz) und nach Inkubation mit 10 mM DTT (jeweils im unteren Diagramm; Details finden sich in Abbildung S6).

Zentrum ein Tartratmolekül, das dem Kristallisationspuffer entstammt (Abbildung S13).

Mit *t*PTEN-Kristallen wurden Soaking-Experimente durchgeführt, um die Strukturveränderungen infolge der H_2O_2 -Behandlung zu untersuchen. Die mit H_2O_2 inkubierten Kristalle (1 mm, 1 h) erreichten Auflösungen bis zu 2.4 Å. Die gelöste Kristallstruktur ist der reduzierten Form von *t*PTEN sehr ähnlich (maximale RMSD = 1.57 Å für 314 C_α -Atome; Abbildungen 3a und S14). Während die Elektronendichte

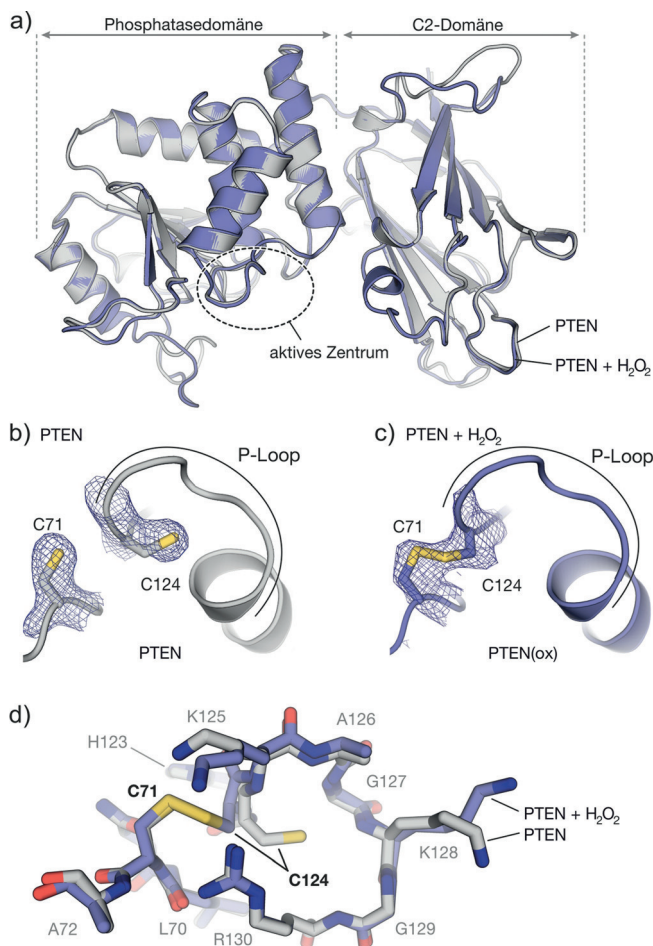


Abbildung 3. a) Strukturüberlagerung von PTEN vor (grau, PDB: 5BZZ, Kette A) und nach der Oxidation mit H_2O_2 (blau, PDB: 5BUG, Kette A). b, c) Struktur des aktiven Zentrums jeweils in der reduzierten und mit H_2O_2 behandelten Form (beide Kette A). Seitenketten von C71 und C124 sind detailliert dargestellt ($2F_o - F_c$ -Elektronendichte um C71 und C124, konturiert bei 1σ). d) Strukturüberlagerung der Aminosäuren im aktiven Zentrum von PTEN im reduzierten (grau) und mit H_2O_2 behandelten Zustand (blau).

zwischen dem katalytischen Cystein C124 und dem benachbarten C71 vor der H_2O_2 -Behandlung eindeutig getrennt ist (Abbildung 3b), ist sie nach dem Kontakt mit H_2O_2 offensichtlich verbunden (*t*PTEN(ox); Abbildung 3c). Das oxidierte aktive Zentrum beherbergt nach wie vor Tartrat.^[18] Die Disulfidbildung fördert die Drehung des katalytischen Cysteins C124 in Richtung C71, ohne eine signifikante Änderung der Positionen der C_α -Atome auszulösen (C_α - C_α -Abstand

reduziert: 5.2 Å gegenüber oxidiert: 5.0 Å). Außerdem zeigte das gesamte aktive Zentrum, einschließlich des P-Loops (IHCKAGKGRT), nur minimale Konformationsänderungen (RMSD = 0.37 Å für 10 C_α -Atome; Abbildung 3d). Dies ist analog zur humanen lymphoiden Tyrosin-Phosphatase (LYP), die ebenfalls nur kleine Konformationsänderungen im P-Loop bei Disulfidbildung aufweist (RMSD = 0.39 Å; Abbildung S15).^[19] Die reversibel oxidierten humanen PTPs CDC25B (Disulfid; RMSD = 2.48 Å)^[20] und PTP1B (Sulfenamid; RMSD = 2.38 Å)^[21] zeigen hingegen nach Oxidation erhebliche Strukturänderungen (Abbildung S15). Insbesondere erfahren diese PTPs bei langen Inkubationszeiten mit H_2O_2 ($t > 20$ min) eine irreversible Oxidation des katalytischen Cysteins (Sulfin- oder Sulfonsäure).^[20,21] Um die Reversibilität der PTEN-Oxidation zu untersuchen, führten wir zeitabhängige Aktivitätsmessungen mit erhöhten H_2O_2 -Konzentrationen durch (Abbildung S4). Bemerkenswert ist, dass eine Reaktivierung durch DTT-Behandlung nach bis zu 20 mM H_2O_2 und 80 min Inkubationszeit erfolgte. Dies bestätigt, dass keine irreversiblen Modifikationen im aktiven Zentrum auftreten und lässt auf einen sehr effizienten Schutz von PTEN vor dauerhafter Inaktivierung durch Oxidationsmittel schließen.

Als nächstes verwendeten wir ^{51}V -NMR-Spektroskopie, um die Reaktion von bpV-phen mit PTEN zu untersuchen. bpV-Phen lieferte ein Signal mit der erwarteten chemischen Verschiebung [$\delta(^{51}\text{V}) = -744$ ppm]^[22] und wurde gegen Voll-längen-PTEN (100 μM) titriert (50–200 μM). Bei niedriger Inhibitor-konzentration (50 μM) wurde das bpV-phen-Signal schnell vermindert (vollständiger Umsatz: < 15 min). Dies geht einher mit dem Auftreten des Produktpeaks [$\delta(^{51}\text{V}) = -553$ ppm], der Dihydrogenorthovanadat (H_2VO_4^- ; Abbildung 4a) zugeordnet wurde. Bei erhöhten Inhibitor-konzentrationen (100 und 200 μM) wurde ein Restsignal von bpV-phen beobachtet, was auf quantitative Oxidation von PTEN schließen lässt. Um die strukturellen Auswirkungen der PTEN-Oxidation durch bpV-phen zu erforschen, wurden *t*PTEN-Kristalle 4 h mit 1 mM bpV-phen inkubiert. Da wir an der Lokalisierung potenzieller Vanadiumspezies interessiert waren, wurden kristallographische Datensätze bei einer längeren Wellenlänge ($\lambda = 1.77$ Å) gesammelt. Dies ermöglicht sowohl die Detektion der Röntgenbeugung als auch jene der anomalen Streuung, die nur von schweren Atomen wie Vanadium und Schwefel ausgeht. Wir erhielten eine Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2.5 Å, die sehr ähnlich zu derjenigen nach H_2O_2 -Behandlung ist (maximaler RMSD = 1.37 Å für 314 C_α -Atome; Abbildung S16). Die $2F_o - F_c$ -Elektronendichte verifiziert die Disulfidbildung mit verknüpften Dichten zwischen C124 und C71 in allen vier Protomeren (Abbildung S17). Basierend auf dem anomalen Streuungssignal wurde eine zusätzliche Elektronendichtekarte unter Anwendung der Bijvoet-Differenz-Fourier-Methode erzeugt.^[23] Unter unseren Bedingungen weist die resultierende Dichte auf Vanadium- und Schwefelatome hin. Diese Dichte bestätigt Disulfidbildung in allen Protomeren und zeigt zusätzliche anomale Dichte im aktiven Zentrum von Protomer A (Abbildung 4b). Dies lässt auf die Gegenwart einer Vanadiumspezies schließen, die zusammen mit der $2F_o - F_c$ -Elektronendichte das Vorhandensein von Orthova-

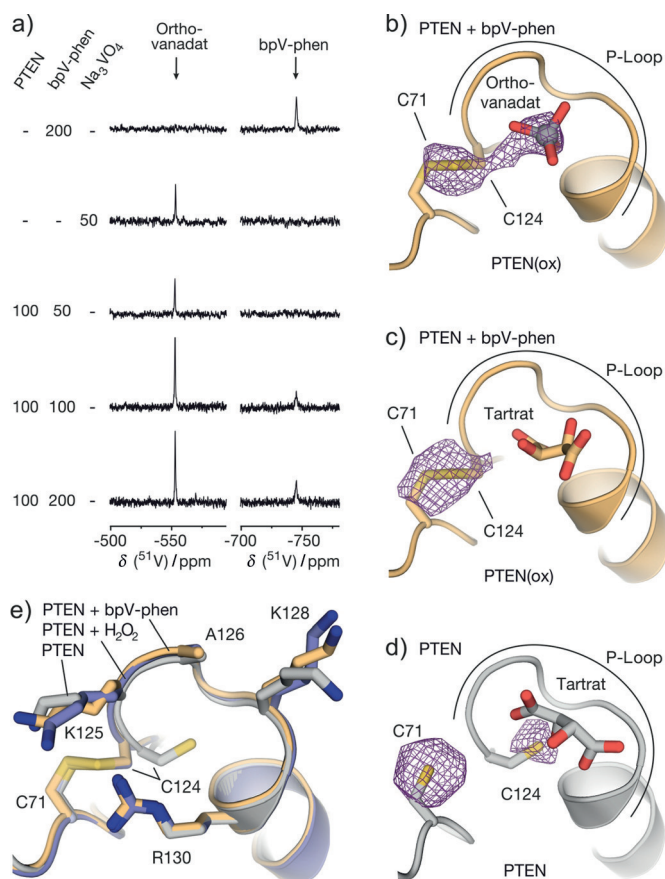


Abbildung 4. a) ^{51}V -NMR-Titrationsmessungen mit bpV-phen (50–200 μM) in Gegenwart von Vollängen-PTEN (100 μM). Vollständige Spektren siehe Abbildung S19. b)–d) Kristallstrukturen des aktiven Zentrums in der mit bpV-phen behandelten [orange, PDB: 5BZX, b) Kette A, c) Kette B] und reduzierten PTEN-Variante [grau, PDB: 5BZZ, d) Kette A]. Orthovanadat und Seitenketten von C71 und C124 sind detailliert dargestellt. Die Dichte der anomalen Streuung (konturiert bei 3.4 σ) wurde mithilfe des Bijvoet-Differenz-Fourier-Verfahrens bei einer Auflösung von 5.0 Å generiert (Vanadium und Schwefel tragen zur Elektronendichte bei). e) Strukturüberlagerung des aktiven Zentrums von PTEN (Kette A) in reduzierter (grau) und mit H_2O_2 (blau) oder bpV-phen behandelter Form (orange).

natat bestätigt (Abbildung S18). Interessanterweise enthalten die aktiven Zentren der Ketten B und D jeweils ein Tartratmolekül, analog zu den H_2O_2 -behandelten Kristallen, was sich zusätzlich im Fehlen der zugehörigen anomalen Signale widerspiegelt. Kette C zeigt einen Mischzustand, teils mit Orthovanadat und teils mit Tartrat (etwa 30:70). Trotz der unterschiedlichen Besetzung durch die Liganden stimmen die Strukturen aller vier aktiven Zentren stark überein (Abbildung S16). Die Überlagerung des reduzierten PTEN (grau) mit der durch H_2O_2 (blau) sowie der durch bpV-phen oxidierten Form (orange) lässt nur minimale Strukturveränderungen im aktiven Zentrum erkennen, wodurch eine geringe Abhängigkeit der P-Loop-Konformation vom Oxidationszustand sowie vom gebundenen Liganden deutlich wird (Abbildungen 4e und S17).

Orthovanadat bindet an aktive Zentren zahlreicher Enzyme, wie Phosphatasen und Kinasen.^[24] Um die Affinität

von Orthovanadat zu PTEN(ox) abzuschätzen, führten wir ^{51}V -NMR-Experimente mit oxidiertem PTEN durch. Bei diesen Messungen zeigt das Orthovanadatsignal weder Linienverbreiterung noch Änderungen der chemischen Verschiebung, was auf eine sehr niedrige Affinität hindeutet ($K_d > 1 \text{ mM}$; Abbildung S20). Zusammen mit der geringen Affinität von PTEN zu Tartrat erklärt dies das Auftreten von Orthovanadat, Tartrat oder Mischzuständen im aktiven Zentrum bei der röntgenkristallographischen Analyse. Orthovanadat inhibiert bestimmte humane Phosphatasen in submikromolaren Konzentrationen [z. B. PTP1B ($K_i = 0.38 \mu\text{M}$)^[25] und alkalische Phosphatase ($K_i = 0.6 \mu\text{M}$)^[26]]. Daher waren wir interessiert, ob Orthovanadat auch zur Inhibition von PTEN durch bpV-phen beiträgt. Bei Aktivitätstests mit Vollängen-PTEN und Na_3VO_4 konnten wir jedoch bis zu einer Konzentration von 0.1 mM Orthovanadat keine Phosphataseinhibition feststellen (Abbildung S5), und selbst bei 1 mM Na_3VO_4 waren nur 20 % Inhibition zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die Inhibition von PTEN durch bpV-phen hauptsächlich durch Disulfidbildung bewirkt wird.

Hier zeigen wir, dass H_2O_2 und bpV-phen PTEN über eine reversible Disulfidbildung zwischen den Cysteinen C124 und C71 inhibieren. In beiden Fällen hat die Oxidation von PTEN nur geringe Strukturveränderungen zur Folge, was minimale Auswirkungen auf Phosphatase-unabhängige Funktionen von PTEN nahelegt. Die reversible Oxidation von katalytischen Cysteinen trägt entscheidend zur Regulation vieler Phosphatasen bei (z. B. LYP,^[19] PTP1B,^[27] VHR,^[27] CDC25,^[28] SHP-1/2,^[29,30] LMW-PTP^[31] und PTEN^[32]). Bei der reversiblen Oxidation mittels Disulfidbildung werden basierend auf dem relativen Abstand der beiden Cysteine in der Primärsequenz zwei verschiedene Cysteinanordnungen diskutiert:^[19,32] A) Zwei Cysteine sind durch wenige Aminosäuren voneinander getrennt (z. B. $i, i + 5$ für LMW-PTP), und B) es erfolgt eine Disulfidbildung zwischen zwei Resten, die zwar in der Primärsequenz weit auseinander liegen, sich jedoch in räumlicher Nähe befinden. Hinsichtlich des zweiten Falls sind CDC25B, LYP und jetzt PTEN strukturell charakterisiert worden.^[19,20] Anders als PTEN erfährt CDC25B starke Strukturveränderungen infolge einer reversiblen Oxidation mit H_2O_2 , während Disulfidbildung in LYP ebenfalls nur zu geringfügigen Strukturänderungen führt. Es bleibt offen, ob diese Konformationsunterschiede des oxidierten Zustands bestimmte biologische Eigenschaften vermitteln. Eine Besonderheit an PTEN ist, dass die oxidative Inhibition der Phosphataseaktivität auch nach stringenter H_2O_2 -Behandlung komplett reversibel zu sein scheint. Dies unterscheidet PTEN von anderen untersuchten Phosphatasen und könnte auf einen effizienteren Schutz vor irreversibler Inaktivierung durch reaktive Sauerstoffspezies hinweisen.

Die PTEN-Inhibition durch bpV-phen und H_2O_2 führt zu oxidierten Proteinspezies mit der gleichen Modifikation. Allerdings unterscheiden sich die zugrunde liegenden Mechanismen darin, dass bpV-Komplexe die Oxidation, anstatt durch intermediäre Bildung von Sulfensäure, über einen Elektronentransferschritt induzieren.^[33] Die Tatsache, dass die Inhibition von PTEN durch bpV-phen Orthovanadat erzeugt, ist eine wichtige Erkenntnis. Daraus ergibt sich die Frage, ob Orthovanadat unter Umständen zu den positiven

neuronalen und kardialen Wirkungen von bpV-Komplexen beiträgt. Außerdem bleibt offen, ob die oxidative Inhibition von PTEN durch bpV-Komplexe auch auf andere Phosphatasen übertragbar ist und damit die inhibierende Wirkung auf andere PTPs erklärt.^[13,16] Abschließend bleibt zu erwähnen, dass die reversible Inhibition von PTEN durch bpV-phen einen vielversprechenden Ansatz für therapeutische Anwendungen bietet, da irreversible Inhibition dieses zentralen Tumorsuppressors systemische Störungen herbeiführen könnte.

Danksagung

Wir bedanken uns bei Dr. Stefan Heinrichs für die Bereitstellung des PTEN-Genkonstrukts und bei Dr. Ingrid Vetter für die Unterstützung bei der Strukturaufklärung. Wir danken Georg Holtermann und Franziska Müller für technische Unterstützung bei der Proteinkristallographie bzw. Massenspektrometrie. Wir bedanken uns bei Prof. Dr. Dieter Lenz für die Einführung in ⁵¹V-NMR-Spektroskopie und Inke Siewert für wertvolle Diskussionen. Wir danken den Beamline Mitarbeitern an der Swiss Light Source PXII-X10SA. J.H. dankt dem FCI für das Doktorandenstipendium. Diese Arbeit wurde finanziell unterstützt durch die DFG (Emmy Noether-Programm RA1944/2-1 und GR3592/2-1), AstraZeneca, Bayer CropScience, Bayer HealthCare, Boehringer Ingelheim, Merck KGaA und die Max-Planck-Gesellschaft.

Stichwörter: Disulfide · Inhibitoren ·

Protein-Tyrosin-Phosphatase · Tumorsuppressoren · bpV-phen

Zitierweise: *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 13796–13800
Angew. Chem. **2015**, *127*, 14001–14005

- [1] M. S. Song, L. Salmena, P. P. Pandolfi, *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *13*, 283–296.
- [2] F. Sun et al., *Nature* **2011**, *480*, 372–375.
- [3] C. A. Worby, J. E. Dixon, *Annu. Rev. Biochem.* **2014**, *83*, 641–669.
- [4] Z. Y. Zhang, J. E. Dixon, *Biochemistry* **1993**, *32*, 9340–9345.
- [5] G. H. Peters, T. M. Frimurer, O. H. Olsen, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5383–5393.
- [6] N. K. Tonks, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2006**, *7*, 833–846.
- [7] C. C. Winterbourn, *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 278–286.
- [8] S. R. Lee, K. S. Yang, J. Kwon, C. Lee, W. Jeong, S. G. Rhee, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 20336–20342.
- [9] N. R. Leslie, D. Bennett, Y. E. Lindsay, H. Stewart, A. Gray, C. P. Downes, *EMBO J.* **2003**, *22*, 5501–5510.
- [10] U. Schwertassek, A. Haque, N. Krishnan, R. Greiner, L. Weingarten, T. P. Dick, N. K. Tonks, *FEBS J.* **2014**, *281*, 3545–3558.
- [11] A. Brunet, S. R. Datta, M. E. Greenberg, *Curr. Opin. Neurobiol.* **2001**, *11*, 297–305.
- [12] A. C. Schmid, R. D. Byrne, R. Vilar, R. Woscholski, *FEBS Lett.* **2004**, *566*, 35–38.
- [13] E. Rosivatz, J. G. Matthews, N. Q. McDonald, X. Mulet, K. K. Ho, N. Lossi, A. C. Schmid, M. Mirabelli, K. M. Pomeranz, C. Erneux, et al., *ACS Chem. Biol.* **2006**, *1*, 780–790.
- [14] K. J. Christie, C. A. Webber, J. A. Martinez, B. Singh, D. W. Zochodne, *J. Neurosci.* **2010**, *30*, 9306–9315.
- [15] C. L. Walker, M. J. Walker, N.-K. Liu, E. C. Risberg, X. Gao, J. Chen, X.-M. Xu, *PLoS ONE* **2012**, *7*, e30012.
- [16] L. Spinelli, Y. E. Lindsay, N. R. Leslie, *Adv. Biol. Regul.* **2015**, *57*, 102–111.
- [17] J. O. Lee, H. Yang, M. M. Georgescu, A. Di Cristofano, T. Maehama, Y. Shi, J. E. Dixon, P. Pandolfi, N. P. Pavletich, *Cell* **1999**, *99*, 323–334.
- [18] Da das aktive Zentrum ein Molekül Tartrat beherbergt (Abbildung S13), verifizierten wir, dass Tartrat unter unseren Assay-Bedingungen die PTEN-Oxidation und -Reaktivierung nicht beeinflusst (Details siehe Abbildung S3).
- [19] S. J. Tsai, U. Sen, L. Zhao, W. B. Greenleaf, J. Dasgupta, E. Fiorillo, V. Orrú, N. Bottini, X. S. Chen, *Biochemistry* **2009**, *48*, 4838–4845.
- [20] G. Buhrman, B. Parker, J. Sohn, J. Rudolph, C. Mattos, *Biochemistry* **2005**, *44*, 5307–5316.
- [21] A. Salmeen, J. N. Andersen, M. P. Myers, T.-C. Meng, J. A. Hinks, N. K. Tonks, D. Barford, *Nature* **2003**, *423*, 769–773.
- [22] Z. Cerovac, J. Ban, A. Morinville, K. Yaccato, A. Shaver, D. Maysinger, *Neurochem. Int.* **1999**, *34*, 337–344.
- [23] G. Strahs, J. Kraut, *Annu. Rev. Biochem.* **1968**, *35*, 503–512.
- [24] J. Costa Pessoa, E. Garribba, M. F. A. Santos, T. Santos-Silva, *Coord. Chem. Rev.* **2015**, *301*–302, 49–86.
- [25] G. Huyer, S. Liu, J. Kelly, J. Moffat, P. Payette, B. Kennedy, G. Tsaprailis, M. J. Gresser, C. Ramachandran, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 843–851.
- [26] L. E. Seargeant, R. A. Stinson, *Biochem. J.* **1979**, *181*, 247–250.
- [27] J. M. Denu, K. G. Tanner, *Biochemistry* **1998**, *37*, 5633–5642.
- [28] J. Sohn, J. Rudolph, *Biochemistry* **2003**, *42*, 10060–10070.
- [29] J. M. Cunnick, J. F. Dorsey, L. Mei, J. Wu, *Biochem. Mol. Biol. Int.* **1998**, *45*, 887–894.
- [30] T.-C. Meng, T. Fukada, N. K. Tonks, *Mol. Cell* **2002**, *9*, 387–399.
- [31] A. Caselli, R. Marzocchini, G. Camici, G. Manao, G. Moneti, G. Pieraccini, G. Ramponi, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 32554–32560.
- [32] S. H. Cho, C. H. Lee, Y. Ahn, H. Kim, H. Kim, C. Y. Ahn, K. S. Yang, S. R. Lee, *FEBS Lett.* **2004**, *560*, 7–13.
- [33] F. P. Ballistreri, E. G. Barbuzzi, G. A. Tomaselli, R. M. Toscano, *J. Inorg. Biochem.* **2000**, *80*, 173–176.

Eingegangen am 9. Juli 2015,
veränderte Fassung am 22. August 2015
Online veröffentlicht am 29. September 2015