

Protein/Protein-Interaktionen nachgeahmt

Strukturbasierte Identifizierung niedermolekularer Inhibitoren

A. Metz, E. Ciglia, T. Kröger und H. Gohlke

Protein/Protein-Interaktionen (PPIs), von denen es schätzungsweise mehr als 100.000 allein im Menschen gibt, sind als zentrale Schalt- und Kontrollelemente bedeutend für alle biologischen Prozesse. Umgekehrt führt die Fehlfunktion von PPIs zu Krebs und anderen Erkrankungen. Daher ist die Identifizierung neuer, für die pharmakologische Therapie oder als Werkzeuge in der chemischen Biologie geeigneter niedermolekularer Inhibitoren von PPIs (PPIIs) erstrebenswert [1,2].

Bislang wurden mehr als 1650 PPIIs und 50 Protein/PPII-Kristallstrukturen beschrieben. Es ist also durchaus möglich, PPIs zu inhibieren. Jedoch wurden nur wenige dieser PPIIs durch systematische, struk-

turbasierte Überlegungen entdeckt. Dies erscheint zunächst überraschend, da sich der Einsatz computergestützter Methoden in der (strukturbasierten) Wirkstofffindung für konventionelle pharmakologische Zielmoleküle (etwa Enzyme oder Rezeptoren; Abb. 1a)) bewährt hat. Jedoch ist die direkte Übertragung solcher Methoden auf an PPIs beteiligte Proteine schwierig, da in den hier vergleichsweise großen Interaktionsflächen häufig ausgeprägte, von potentiellen PPIIs adressierbare Taschen fehlen (Abb. 1b). Außerdem gibt es nur selten natürliche niedermolekulare Liganden, so dass eine auf Liganden-Ähnlichkeit basierende Suche nach PPIIs nicht möglich ist. Aufwendige Hochdurchsatzexperimente können zwar prinzipiell bei der Identifizie-

rung von PPIIs helfen. Jedoch haben die Liganden konventioneller pharmakologischer Zielmoleküle und PPIIs unterschiedliche physikochemische Eigenschaften. Deshalb eignen sich die gebräuchlichen Substanzbibliotheken nur bedingt für Hochdurchsatzexperimente an PPIs [1].

Ein vielversprechender Ansatz zur strukturbasierten Identifizierung von PPIIs beruht dagegen auf der gezielten Adressierung oder Nachahmung der essentiellen Interaktionen einer PPI (Abb. 1d). Diese sind oft auf wenige Aminosäuren in der Interaktionsfläche begrenzt, sogenannte Hot Spots. Der Ansatz beruht auf der Annahme, dass entscheidende Faktoren von PPIs bzw. der Bindung von PPIIs an Interaktionsflächen übereinstimmen. Folglich sollten PPIIs

durch rationale Überlegungen, ausschließlich auf Basis einer PPI-Komplexstruktur, identifiziert werden können. Wir erläutern diesen Ansatz am Beispiel von drei ausgewählten PPIs: zwischen Interleukin-2 und der α -Untereinheit des zugehörigen Rezeptors (IL-2/IL-2R α ; Abb. 1b-c), zwischen zwei Dimeren der Nerve Homology Region 2 Domäne (NHR2; Abb. 2) und zwischen den Dimerisierungsdomänen des Heat Shock Protein 90 (Hsp90).

IL-2/IL-2R α -Komplex

Zunächst validierten wir den vorgeschlagenen Ansatz in einer retrospektiven Studie anhand der IL-2/IL-2R α -Interaktion [3]. Zusätzlich zur IL-2/IL-2R α -Komplexstruktur sind auch experimentelle Strukturen und Affinitäten für fünf IL-2/PPII-Komplexe bekannt. Zur computer-gestützten Identifizierung der Hot Spots der IL-2/IL-2R α - und IL-2/PPII-Komplexe führten wir eine Aminosäure-weise Zerlegung der Bindungsenergie mit der „Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area“ (MM-PBSA)-Methode durch [4]. Diese Analysen zeigten, dass drei der fünf Hot Spots der IL-2/IL-2R α -Interaktion ebenfalls essentiell für die Bindung der PPIIs sind. Alanin-Mutanten dieser Hot Spots bestätigten diese Vorhersage. Damit lag nahe, dass auf Basis einer PPI-Komplexstruktur vorhergesagte Hot Spots die zielgerichtete Identifizierung und Optimierung von PPIIs lenken können [3].

Allerdings binden die PPIIs bei IL-2 in eine Tasche der Interaktionsfläche (Abb. 1c), die sowohl im ungebundenen IL-2 als auch im IL-2/IL-2R α -Komplex fehlt (Abb. 1b). Die Ausbildung dieser Taschen in den PPII-gebundenen Strukturen weist auf eine erhöhte Mobilität in der Interaktionsfläche hin [5]. Im Einklang mit dem Konformations-Selektions-Modell [6] gelang es uns mit Hilfe molekularer Simulationen das Öffnen transientscher Taschen in der ungebundenen IL-2-Struktur vorherzusagen. Molekulares Docking in diese Taschen und dessen Auswertung unter Zuhilfenahme der vorhergesagten Hot Spots lieferte die nativen Bindeposen der PPIIs. Außerdem konnten im Rahmen eines Docking-basierten virtuellen Screenings bekannte PPIIs unter einer großen Anzahl physikochemisch ähnlicher, jedoch inaktiver Substanzen identifiziert werden. Für diese Vorhersagen wurde ausschließlich die IL-2/IL-2R α -Komplexstruktur benötigt. Daher überprüften wir als nächstes, ob der grundlegende Ansatz auch auf andere PPIs mit bekannter Komplexstruktur übertragbar ist [3].

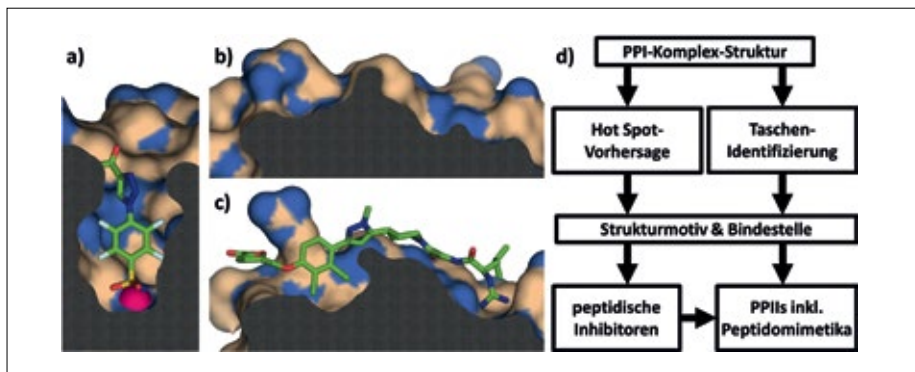


Abb.1: a) Querschnitt durch die tiefe Bindetasche der Carboanhydrase, einem konventionellen pharmakologischen Zielmolekül, und b) die im Vergleich flache Interaktionsfläche des ungebundenen Interleukin-2 (IL-2), das mit der α -Untereinheit des IL-2 Rezeptors eine PPII eingeht. c) PPIIs können die Ausbildung transientscher Taschen in verformbaren Interaktionsflächen bedingen, wie hier für IL-2 im Vergleich zu b) gezeigt. d) Schematische Vorgehensweise zur Identifizierung von PPIIs, ausgehend von einer PPI-Komplexstruktur.

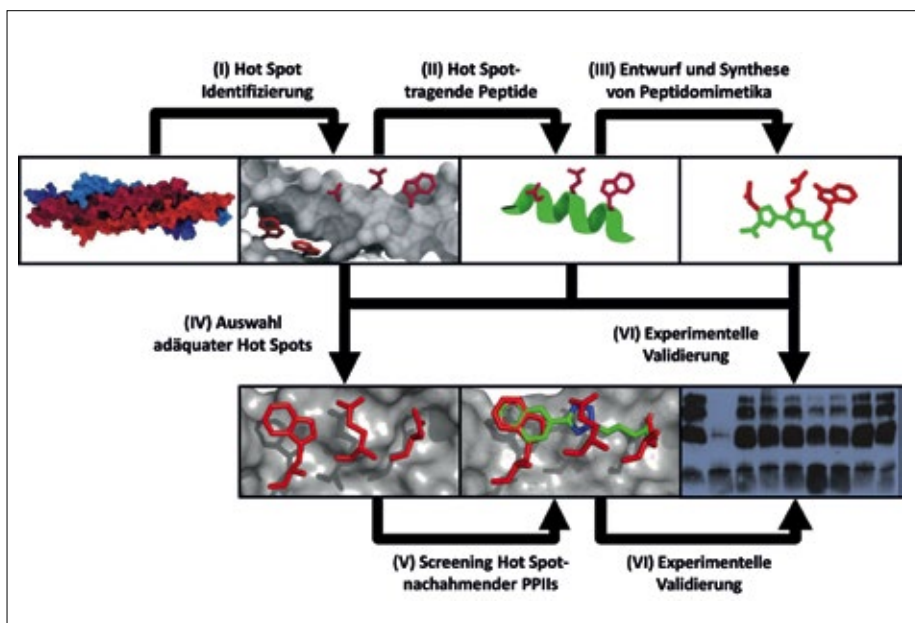


Abb. 2: Identifizierung von PPIIs auf Basis der PPI-Komplexstruktur (hier gezeigt am Beispiel der tetrameren NHR2 Domäne): (I) Identifizierung von Hot Spots in den Interaktionsflächen; (II) Entwicklung Hot Spot-tragender, inhibitorischer Peptide; (III) Entwurf und Synthese von peptidomimetischen PPIIs mit funktionellen Gruppen, die Hot Spots entsprechen; (IV, V) Auswahl adäquater, benachbarter Hot Spots, die als Templat in einem virtuellen Screening nach PPIIs dienen; (VI) experimentelle Validierung durch biochemische und zellbiologische Experimente.

NHR2-Tetramer

Zu diesem Zweck untersuchten wir in einer prospektiven Studie die Interaktion zwischen zwei Dimeren der NHR2-Oligomerisierungsdomäne [7] des aus der Translokation t-(8;21) resultierenden onkogenen Fusionsproteins AML1-ETO. Die Homotetramerisierung dieser NHR2-Domäne ist eine wesentliche Voraussetzung für die Entstehung und Aufrechterhaltung der AML1-ETO-abhängigen akuten myeloischen Leukämie (AML). Unserem Ansatz folgend (Abb. 2) identifizierten wir zu-

nächst fünf für die Tetramerisierung essentielle Hot Spots (Abb. 2, Schritt I). Experimente bestätigten, dass die Mutation dieser Hot Spots zu Alanin die NHR2-Tetramerisierung verhindert ohne die α -helikale Struktur der Dimere zu beeinträchtigen. Mit diesen Mutanten konnten wir außerdem erstmals in Zellkultur und Mausmodell zeigen, dass dissoziierte AML1-ETO-Dimere nicht über den onkogenen Charakter des Tetramers verfügen [8].

Da die NHR2-Hot Spots räumlich benachbart in einem Spalt der Dimer/Dimer-Interaktionsfläche liegen, folgerten wir, dass

die Adressierung dieses für die Tetramerisierung essenziellen Strukturmotivs durch PPIIs eine gezielte Bekämpfung AML1-ETO-abhängiger Leukämien ermöglicht. In einer proof-of-principle-Studie zeigten wir, dass bereits ein relativ kleines Molekül, hier ein aus der NHR2-Sequenz um die drei wichtigsten Hot Spots abgeleitetes 18mer-Peptid, die NHR2-Tetramerisierung inhibiert (Abb. 2, Schritt (II)). Der nachfolgende Entwurf Hot Spot-tragender, peptidomimetischer PPIIs führte zur Synthese einer neuen Klasse von auf Teroxazol basierenden α -Helixmimetika (Abb. 2, Schritt (III)) [9]. Gleichzeitig lieferte ein auf den drei wichtigsten Hot Spots beruhendes (Abb. 2, Schritt (IV)), pharmakophorbasiertes virtuelles Screening der ZINC-Datenbank [10 und Crossmedialbalken] nach niedermolekularen Hot Spot-Mimetika (Abb. 2, Schritt (V)) die ersten wirkstoffartigen PPIIs der NHR2-Tetramerisierung, welche die Proliferation AML1-ETO-abhängiger Zellen inhibieren (Abb. 2, Schritt (VI)) [11].

Hsp90-Dimer

In einer dritten Studie untersuchten wir die über die C-terminale Domäne vermittelte Dimerisierung von Hsp90. Als Chaperon ist Hsp90 an einer Reihe von zellulären Prozessen beteiligt, wie etwa der (Rück-)Faltung, Stabilisierung und Qualitätskontrolle von Proteinen. Vereinfacht gesagt schützt Hsp90 die Zelle vor Stress. Allerdings begünstigt Hsp90 auch die maligne Transformationen von Zellen. Folglich haben vielen Studien die Inhibierung von Hsp90 als eine Möglichkeit zur Bekämpfung von Krebserkrankungen aufgezeigt. Die meisten der bisher entdeckten Hsp90 Inhibitoren adressieren die ATP-Bindetasche der N-terminalen Domäne. Jedoch ist ATP in Zellen weit verbreitet, so dass gegen ATP-Bindetaschen gerichtete Inhibitoren häufig un-

erwünschte Nebenwirkungen haben. Hingegen sollten Inhibitoren der für die Aktivität notwendigen und durch die C-terminale Domäne vermittelten Dimerisierung von Hsp90 diesen Nachteil nicht aufweisen.

Unserem Ansatz folgend konnten wir vier Hot Spots in der Interaktionsfläche zwischen den C-terminalen Domänen vorhersagen. Hierzu verwendeten wir, zusätzlich zur MM-PBSA-Methode, die aus PPI-Komplexstrukturen abgeleitete wissensbasierte Bewertungsfunktion DrugScore^{PPI} [12]. Ein Webservice zur Hot Spot-Vorhersage mittels DrugScore^{PPI} wurde von uns eingerichtet (Crossmedialbalken). Die verminderte Stabilität des Hsp90-Komplexes nach Alanin-Mutationen bestätigte die Bedeutung dieser Hot Spots [13]. Hingegen zeigten Alanin-Mutanten vorhergesagter Cold Spots keinen solchen Effekt, was für die hohe Spezifität der Hot Spot-Vorhersagen spricht. Vorläufige Ergebnisse weisen außerdem darauf hin, dass aus der Interaktionsfläche der C-terminalen Domäne abgeleitete Hot Spot-tragende Peptide die Komplexbildung von Hsp90 inhibieren. Analog zu unserem Vorgehen bei IL-2 und NHR2 nutzen wir die Kenntnis der Hot Spots für die pharmakophorbasierte Suche und das rationale Design von PPIIs der Hsp90-Dimerisierung [14].

Fazit

Zusammengefasst haben wir drei Anwendungsbeispiele zur strukturbasierten Identifizierung von PPII vorgestellt (Abb. 1d). Vorhergesagte Hot Spots und transiente Bindetaschen kennzeichnen essentielle Interaktionen und potentielle Bindestellen für PPIIs in einer Protein-Protein-Interaktionsfläche. Dieses Wissen kann zur zielgerichteten Lenkung von molekularem Docking oder pharmakophorbasiertem virtuellem Screening eingesetzt werden. Da hierfür lediglich die PPI-Komplexstruktur bekannt sein muss, eignet sich diese Vorgehensweise als

Startpunkt für eine Vielzahl vergleichbarer Vorhaben zur Identifizierung von PPIIs.

Literatur

- [1] Metz A. *et al.*: *Curr. Pharm. Des.* 18, 4630–4647 (2012)
- [2] Wells J.A. und McClendon C.L.: *Nature* 450, 1001–1009 (2007)
- [3] Metz A. *et al.*: *J. Chem. Inf. Model.* 52, 120–133 (2012)
- [4] Homeyer N. und Gohlke H.: *Mol. Inf.* 31, 114–122 (2012)
- [5] Ulucan O. *et al.*: *Curr. Pharm. Des.* 18, 4599–4606 (2012)
- [6] Boehr D.D. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.* 5, 789–796 (2009)
- [7] Liu Y. *et al.*: *Cancer Cell* 9, 249–260 (2006)
- [8] Wichmann C. *et al.*: *Blood* 116, 603–613 (2010)
- [9] Gomes C.P. *et al.*: *Eur. J. Org. Chem.* 2012, 3270–3277 (2012)

- [10] Irwin J.J.: *J. Chem. Inf. Model.* 45, 177–182 (2005)
- [11] Metz A. *et al.*: *J. Chem. Inf. Model.* 53, 2197–2202 (2013)
- [12] Krüger D.M. und Gohlke H.: *Nucleic Acids Res.* 38, W480–W486 (2010)
- [13] Ciglia E. *et al.*: *PLoS ONE* doi:10.1371/journal.pone.0096031 (2014)
- [14] Spanier L. *et al.*: *J. Org. Chem.* 79, 1582–1593 (2014)

KONTAKT |

Prof. Dr. Holger Gohlke
 Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie
 Heinrich-Heine-Universität
 Düsseldorf
 Tel.: 0211/81-13662
 Fax: 0211/81-13847
 gohlke@uni-duesseldorf.de

Weitere Beiträge zum Thema: <http://bit.ly/Wirkstoff>

Hot Spot-Vorhersage: <http://cpclab.uni-duesseldorf.de/dsppi>
 Zinc-Datenbank: <https://docking.org>

SPECTROSCOUT

Das RFA-Labor vor Ort

Das neue portable SPECTROSCOUT bietet viel von der analytischen Leistung erstklassiger RFA Geräte im Labor, ist aber für den Einsatz vor Ort konzipiert.

- Elementanalyse in der Exploration und bei Umweltscreenings
- Analyse der relevanten Elemente im Bereich Na-U innerhalb 10-15 Minuten mit hoher Empfindlichkeit möglich
- Komplette Datenspeicherung inklusive der GPS-Position
- Leicht zu transportieren, leicht zu bedienen

SPECTRO Analytical Instruments GmbH
 Boschstraße 10, 47533 Kleve, Germany
 Tel.: +49.2821.892.2100, Fax: +49.2821.892.2200
 E-Mail: spectro.info@ametek.com

www.spectro.de/scout