

**Virtuelles und NMR basiertes Screening zur Ermittlung
neuer Liganden für das H-Ras-Protein sowie
Charakterisierung der Ligand-Protein-Wechselwirkungen
mittels (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQC-Spektroskopie**



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Sandra Kreitner

aus Peissenberg

September 2011

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 26.09.2011

Das Promotionskolloquium fand statt am: 11.11.2011

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. Karl Kunzelmann
	1. Gutachter:	Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer
	2. Gutachter:	apl. Prof. Dr. Werner Kremer
	3. Prüfer:	apl. Prof. Dr. Stefan Dove

In liebevoller Erinnerung an meine Großeltern

Nikolaus und Anna Kreiher

Josef und Franziska Habersetzer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Der Weg vom Zielprotein zum Medikament	1
1.1.1	Vom Zielmolekül über Screening zur chemischen Optimierung	2
1.1.2	Die Bedeutung der Automatisierung	3
1.1.3	Die Klinischen Phasen und Zulassung	3
1.2	Guaninnukleotid-bindende Proteine	4
1.2.1	Die Funktion in der Signalweiterleitung	4
1.2.2	Die Superfamilie der Ras-verwandten Proteine	5
1.3	Das Ras-Protein	7
1.3.1	Die Struktur des Ras-Proteins	7
1.3.2	Der molekulare Schalter und seine Funktionen	9
1.3.3	Die Ras-Effektor-Wechselwirkung	10
1.3.4	Die <i>partial loss-of-function</i> Mutanten	10
1.3.5	Die bekannten Liganden Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA	12
1.3.6	Ras als Zielprotein in der Krebstherapie	13
1.4	Virtuelles Ligandenscreening	15
1.4.1	Die Bedeutung in der Arzneimittelforschung	15
1.4.2	Das LUDI Programm	17
1.5	Die Maybridge Library	18
1.6	STD-NMR-Spektroskopie zur Identifizierung und Charakterisierung von Liganden	19
1.7	Zielsetzung	21
2	Materialien und Geräte	23
2.1	Chemikalien	23
2.2	Häufig verwendete Puffer-Lösungen	23
2.3	Plasmide und Bakterienstämme	24
2.4	Nährmedien und Antibiotika	24
2.5	Enzyme	25

2.6	Standard.....	25
2.7	Verbrauchsmaterialien und Zubehör.....	25
2.8	Säulenmaterialien.....	26
2.9	Geräte.....	26
2.10	Virtuelle Bibliotheken.....	26
2.11	Software	27
3	Methoden	28
3.1	Expression und Reinigung von Proteinen	28
3.1.1	Expression und Reinigung von unmarkiertem Ras	28
3.1.2	Expression und Reinigung von ¹⁵ N-markiertem Ras	29
3.2	Proteinbiochemische Methoden	29
3.2.1	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmiden.....	29
3.2.2	Einführung einer Punktmutation in c'Ras an Stelle 166	30
3.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels HPLC	31
3.2.4	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	31
3.2.5	Nukleotidaustausch zu GppNHp.....	32
3.3	Vorbereitung der Substanz Bibliotheken	32
3.3.1	Vorbereitung der virtuellen Datenbanken	32
3.3.1.1	Filterung auf <i>drug-likeness</i> und Eliminierung reaktiver Gruppen	32
3.3.1.2	Konvertierung in 3D	34
3.3.1.3	Generierung von LUDI Bibliotheken	34
3.3.2	Vorbereitung der Substanzen für STD-NMR-Messungen.....	34
3.3.2.1	Substanzen aus virtuellem Screening	34
3.3.2.2	ZINC-Substanzen und Substanzen der Maybridge Library	35
3.3.2.3	Derivate der Zn ²⁺ -Cyclene.....	36
3.4	Automatisierung.....	36
3.4.1	Der Pipettierroboter	36
3.4.2	Der Probenwechsler am 600 MHz Spektrometer.....	37
3.5	Virtuelles Screening mit LUDI	37
3.5.1	Vorbereitung der Struktur von c'Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GppNHp.....	37
3.5.2	LUDI Parameter und Einstellungen	37

3.5.3	<i>De-novo</i> Screening im aktiven Zentrum.....	38
3.5.4	<i>Fragment-based</i> Screening um das aktive Zentrum	39
3.5.5	Verarbeitung und Auswertung der LUDI Daten	39
3.6	NMR Messmethoden	40
3.6.1	Sättigungs-Transfer-Differenz-NMR-Spektroskopie.....	40
3.6.1.1	Probenvorbereitung und Messung	40
3.6.1.2	Bestimmung von Bindungskonstanten	41
3.6.1.3	Bestimmung von Epitopen der Liganden	41
3.6.2	(¹ H- ¹⁵ N)- <i>sofast</i> -HMQC-Spektroskopie	42
3.6.2.1	Probenvorbereitung und Messung	42
3.6.2.2	Bestimmung der Bindungsstellen im Protein.....	42
3.6.2.3	Bestimmung von Bindungskonstanten	43
3.6.3	³¹ P-NMR-Spektroskopie	43
4	Ergebnisse	45
4.1	Virtuelles Screening an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mittels LUDI	45
4.1.1	Bestimmung der Screening Positionen im und nahe dem aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GppNHp.....	45
4.1.2	<i>De-novo</i> Screening im aktiven Zentrum.....	47
4.1.2.1	Ambinter-, ChemStar-, und InterBioScreen Datenbank	47
4.1.2.2	ZINC Datenbank	51
4.1.3	<i>Fragment-based</i> Screening an definierten Stellen nahe dem aktiven Zentrum.....	55
4.1.3.1	Ambinter-, ChemStar- und InterBioScreen Datenbank	55
4.1.3.2	ZINC Datenbank	60
4.2	Überprüfung von virtuellen Liganden auf reale Bindung an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mittels STD-NMR-Spektroskopie.....	64
4.2.1	Bestimmung der optimalen Parameter	64
4.2.2	STD-NMR von Substanzen der Ambinter Datenbank.....	66
4.2.2.1	Überprüfung der realen Bindung	66
4.2.2.2	Bestimmung der Bindungskonstanten der Liganden B1 und B4.....	69
4.2.3	STD-NMR von Substanzen der ZINC Datenbank.....	69

4.3	Bindungsstudien der Liganden aus dem virtuellen Screening an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bzw. Ras(wt)•Mg²⁺•GppNHp	71
4.3.1	<i>Molecular Docking</i> der Substanzen N und L im aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GppNHp mittels LUDI	71
4.3.2	(¹ H- ¹⁵ N)- <i>sofast</i> -HMQC-Titrationsen von c'Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GppNHp mit den Substanzen N und L.....	72
4.3.2.1	Bestimmung der Bindungsstellen.....	73
4.3.2.2	Berechnung der Bindungskonstanten	74
4.3.3	³¹ P-NMR-Titration von Ras(wt)•Mg ²⁺ •GppNHp mit Substanz N.....	75
4.4	Screening der Maybridge Library an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp.....	77
4.4.1	STD-NMR-Screening der Maybridge Library	77
4.4.2	Bestimmung der Epitope der Maybridge Liganden	83
4.4.3	<i>Molecular Docking</i> der Maybridge Liganden im aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GppNHp mittels LUDI	87
4.4.4	(¹ H- ¹⁵ N)- <i>sofast</i> -HMQC-Titrationsen von c'Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GppNHp mit den Maybridge Liganden.....	92
4.4.4.1	Bestimmung der Bindungsstellen.....	92
4.4.4.2	Berechnung der Bindungskonstanten	101
4.5	STD-NMR von Derivaten des Zn²⁺-Cyclens an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp.....	105
4.6	Charakterisierung der Doppelmutante c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp.....	108
4.6.1	Vergleich der (¹ H- ¹⁵ N)- <i>sofast</i> -HMQC-Spektren von c'Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GppNHp mit der Doppelmutante c'Ras(T35A, H166A)•Mg ²⁺ •GppNHp.....	108
4.6.2	STD-NMR von Zn ²⁺ -Cyclen und Zn ²⁺ -BPA an c'Ras(T35A, H166A)•Mg ²⁺ •GppNHp.....	110
4.6.3	(¹ H- ¹⁵ N)- <i>sofast</i> -HMQC-Titrationsen von c'Ras(T35A, H166A)•Mg ²⁺ •GppNHp mit Zn ²⁺ -Cyclen und Zn ²⁺ -BPA	112
4.6.3.1	Bestimmung der Bindungsstellen.....	112
4.6.3.2	Berechnung der Bindungskonstanten	114

5	Diskussion	115
5.1	Virtuelles Screening an c'Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GppNHp mit LUDI	115
5.2	Überprüfung der virtuellen Liganden auf reale Bindung an c'Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GppNHp mittels STD-NMR-Spektroskopie	118
5.3	Bindungsstudien der Liganden aus dem virtuellen Screening an c'Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GppNHp bzw. Ras(wt)•Mg ²⁺ •GppNHp	121
5.4	Screening der Maybridge Library an c'Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GppNHp...	123
5.5	STD-NMR von Derivaten des Zn ²⁺ -Cyclens an c'Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GppNHp.....	126
5.6	Vergleich von c'Ras(T35A)•Mg ²⁺ •GppNHp mit c'Ras(T35A, H166A)•Mg ²⁺ •GppNHp.....	127
5.7	Ausblick	130
6	Zusammenfassung	131
7	Literaturverzeichnis	134
8	Abkürzungsverzeichnis	146
9	Anhang	148

1 Einleitung

1.1 Der Weg vom Zielprotein zum Medikament

Der Weg von einem Zielprotein (Target) bis zum neuen Medikament auf dem Markt dauert im Durchschnitt 10 bis 12 Jahre und verschlingt, je nach Therapie und Pharmafirma, Gesamtkosten im Bereich zwischen 500 Millionen bis 2 Milliarden Dollar (Adams (2006)). Dabei erreicht von durchschnittlich 2 Millionen getesteten Substanzen nur eines letztendlich das Ziel und wird zum innovativen Arzneimittel. Die Pharmafirma Roche gibt auf ihrer Internetseite (www.roche.com) an, dass 7 000 874 Stunden Arbeitszeit, 6 587 Experimente und 423 Wissenschaftler benötigt werden, um einen einzigen neuen Wirkstoff zu entwickeln und zur Zulassung zu bringen. Daran erkennt man, dass der Weg vom Zielmolekül bis zum zugelassenen Medikament kein einfacher und schneller Prozess ist, sondern sehr viel Geld, Zeit und Arbeit kostet. Dieser Weg lässt sich in einzelne Schritte unterteilen (siehe Abbildung 1.1), angefangen bei dem *Targeting* über die vorklinische Entwicklung bis hin zu klinischen Studien und letztendlich der Zulassung. In den folgenden Kapiteln werden einige dieser Schritte der Arzneimittelentwicklung sowie die Rolle der Automatisierung genauer betrachtet.

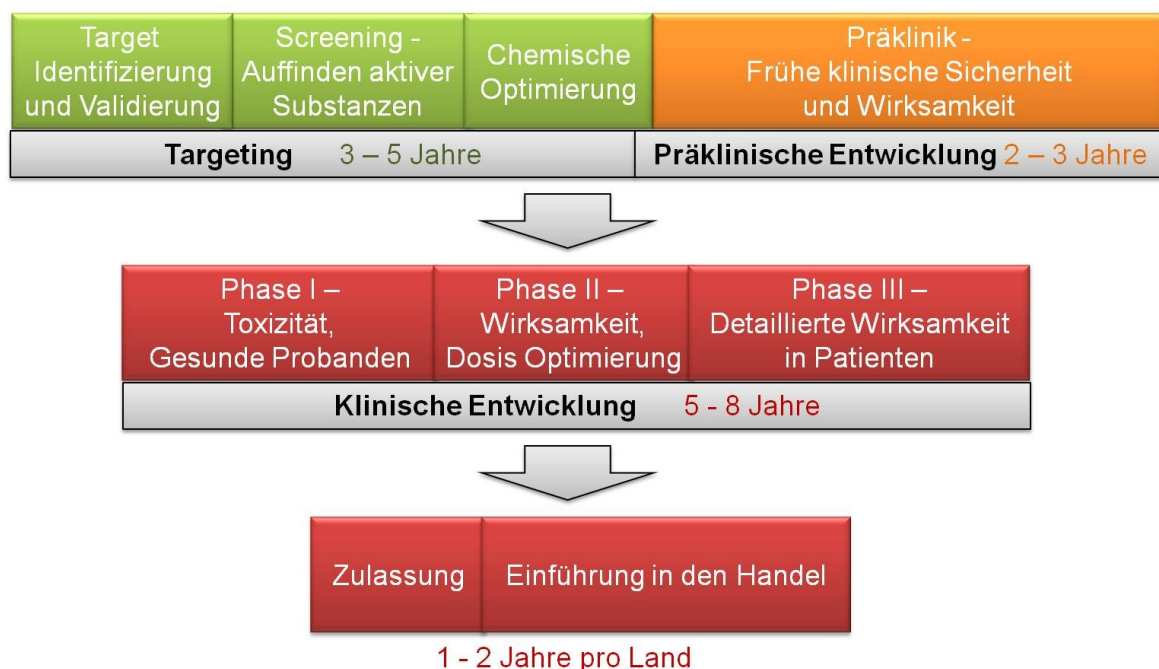


Abbildung 1.1: Überblick über die einzelnen Schritte der Medikamentenentwicklung

1.1.1 Vom Zielmolekül über Screening zur chemischen Optimierung

Bevor mit der Entwicklung eines neuen Arzneimittels begonnen werden kann, stellt sich zunächst die Frage, für welche Krankheit dieses Medikament entwickelt werden soll. Dabei stehen vor allem Krankheiten im Fokus, für die es noch keine oder unzureichende Behandlungsmöglichkeiten gibt. Im nächsten Schritt wird nach einem geeigneten Zielmolekül gesucht, dem Target, von welchem die Rolle im Krankheitsverlauf bestenfalls bereits bekannt ist. Meist stellt dieses Target ein Protein wie zum Beispiel ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (Felder (2009)) dar. Des Weiteren können Targets auch Ionenkanäle (Pexton (2011)), DNA (Nain (2010)) und andere Rezeptoren sein. Sobald ein Target identifiziert wurde, folgt die Validierung. Das heißt es muss zunächst überprüft werden, ob eine Veränderung der Aktivität des Zielmoleküls überhaupt zu dem erwünschten therapeutischen Effekt führen kann.

Der zweite Schritt nach der Ermittlung und Validierung eines geeigneten Zielmoleküls ist dann das *High-Throughput* Screening (Fox (1999)). Hierbei werden pro Tag zwischen 10 000 und 100 000 kleiner organischer Substanzen auf Aktivität am Target überprüft und mögliche Hits herausgefiltert, welche später optimiert und als Wirkstoffkandidaten ausgewählt werden. Die Ansprüche, die solch ein Screening im Allgemeinen erfüllen muss, sind Schnelligkeit, Effektivität, Robustheit und Sensitivität. Um in relativ kurzer Zeit Millionen genetischer, biochemischer oder pharmakologischer Experimente durchführen zu können, werden beim *High-Throughput* Screening Roboter, sensitive Detektoren, Kontrollsoftware und Flüssigkeitssysteme verwendet. Die gängigsten Assays wurden von Inglese (2007) zusammengefasst. Dabei spielen vor allem optische Methoden wie Fluoreszenz, Absorbanz- und Lumineszenz-basierte Assays eine wichtige Rolle.

Den letzten Schritt vor der präklinischen Phase stellt die Optimierung der Leitstrukturen dar. Hierbei ist die chemische Struktur eines Hits aus dem *High-Throughput* Screening der Ausgangspunkt für weitergehende Modifizierungen um die Bindung der Substanz am Zielmolekül zu verbessern. Gleichzeitig wird bereits jetzt auf die Wirksamkeit, die Selektivität und die Pharmakokinetik des Wirkstoffes geachtet. Die Optimierung einer Leitstruktur findet neben chemischen und biochemischen Experimenten mittlerweile auch sehr häufig unter Verwendung von *Molecular Modeling* (McCarthy (2007)) virtuell am Computer statt.

1.1.2 Die Bedeutung der Automatisierung

Bis in die 90er Jahre hinein wurde die Identifizierung von neuen Wirkstoffen überwiegend in Handarbeit durch Wissenschaftler vorgenommen. Dies war eine langwierige und arbeitsintensive Phase um aktive Substanzen für ein Zielmolekül zu finden. Die Automatisierung durch das *High-Throughput* Screening (Fox (1999)) und die immer größer werdenden Substanzbibliotheken revolutionierten die Wirkstofffindung. Sie führte dazu, dass pro Tag etwa 10 000 chemische Substanzen vollautomatisch auf Aktivität am Target geprüft werden können. Hierbei werden die entsprechenden Proben in der Regel per Roboter sortiert, portioniert und gemischt und anschließend Mikrotiterplatten mit 384 oder 1536 Probelöchern bestückt. Auch die Messungen mittels optischer Lesegeräte erfolgen automatisch und da bei dieser hohen Anzahl an Experimenten große Datenmengen anfallen, werden auch entsprechend komplexe Computerprogramme zur Auswertung benötigt. In den USA werden jährlich über 2.5 Milliarden US-Dollar für *High-Throughput* Screening-Produkte ausgegeben (www.bio-pro.de/magazin/thema/00138/). In dem Bestreben den Probendurchsatz weiter zu erhöhen, ist momentan kein Ende in Sicht. Mittlerweile werden sogar sogenannte *Ultra-High-Throughput* Screenings verwendet, bei denen 100 000 bis 200 000 Substanzen täglich vermessen werden können.

1.1.3 Die Klinischen Phasen und Zulassung

Nach der Ermittlung eines geeigneten Targets, dem Wirkstoffscreening und der chemischen Optimierung einer Leadstruktur folgt als nächstes die präklinische Phase. Dabei wird, bevor eine Testung der Substanzen im Menschen erfolgt, der Wirkstoff auf seine pharmakokinetischen, pharmakodynamischen und ADME Parameter und die Toxizität in Tiermodellen überprüft. ADME steht für *adsorption*, *distribution*, *metabolism* sowie *excretion* und beschreibt damit die Aufnahme, die Verteilung, den Metabolismus und die Ausscheidung der Substanz in einem lebenden Organismus (Eddershaw (2000)). Wenn der Wirkstoff die präklinische Phase besteht, wird am Ende dieser vorklinischen Entwicklung bereits eine sichere Dosis für die Verwendung in den ersten klinischen Studien am Menschen abgeschätzt.

Diese geringe Dosis der Substanz wird dann in den klinischen Studien der Phase 1 an einer kleinen Gruppe von 20 bis 80 gesunden Menschen eingesetzt. Wiederum erfolgen Untersuchungen auf Sicherheit, Verträglichkeit und die

pharmakokinetischen und -dynamischen Parameter. Wenn hierbei keine größeren Nebenwirkungen beobachtet werden, folgt die klinische Studie der Phase 2. Hierbei wird der Wirkstoff einer größeren Gruppe von 100 bis 300 Freiwilligen und Patienten verabreicht, wobei in Phase 2A die Festlegung der Dosis erfolgt und in Phase 2B die Effektivität des Wirkstoffes in gegebener Dosis ermittelt wird. Die schließlich letzte klinische Phase 3 ist die aufwändigste und kostenintensivste. Hier wird der Wirkstoff in randomisierten, multizentrischen Studien an einer großen Menge von 300 bis 3000 oder mehr Patienten auf seine Wirksamkeit hin getestet. Wenn alle klinischen Studien erfolgreich abgeschlossen sind, erfolgt die Zulassung zum Medikament was ca. zwei Jahre pro Land dauert. In Deutschland ist hierbei das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizin (BfArM), europaweit die EMA (*European Medicines Agency*) und in den USA die FDA (*Food and Drug Administration*) zuständig. Eine Marktzulassung durch die Behörden erfolgt dann, wenn die übermittelten Daten der Pharmafirma die Qualität, Wirksamkeit und Sicherheit des Arzneimittels beweisen.

1.2 Guaninnukleotid-bindende Proteine

1.2.1 Die Funktion in der Signalweiterleitung

Guaninnukleotid-bindende Proteine, wie das in dieser Arbeit behandelte Ras-Protein, spielen eine wichtige Rolle in der Signalweiterleitung innerhalb von Zellen. Dabei fungieren sie als regulierbare, kleine Schalter, welche in ihrer inaktiven Form im Ruhezustand vorliegen, wohingegen ihre aktive Form an Effektorproteine binden kann und somit Signale in der Zelle weiterleitet. Diese Signalübertragung von den Rezeptoren der Zelle bis ins Zellinnere kann zum Zellwachstum, zur Zellteilung, zur Proliferation bis hin zum Tod von Zellen (Apoptose) führen.

Am Beispiel des Ras-Proteins (siehe Abbildung 1.2) wird deutlich, dass dieser Prozess der intrazellulären Signaltransduktion sehr komplex sein kann und oftmals viele verschiedene Proteine in Signalweiterleitungskaskaden beteiligt sind. In der Abbildung ist zu sehen, dass Ras eine Vielzahl unterschiedlicher Effektormoleküle wie Raf, RalGDS, P13K und p120GAP aktivieren kann. Dabei werden Signalwege mit verschiedenen Endfunktionen initiiert, wie zum Beispiel die MAPK-Kaskade (*mitogen activated protein kinase*) durch die Bindung an Raf. Diese führt schließlich im Kern zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und damit zur Einleitung der Proliferation der Zelle.

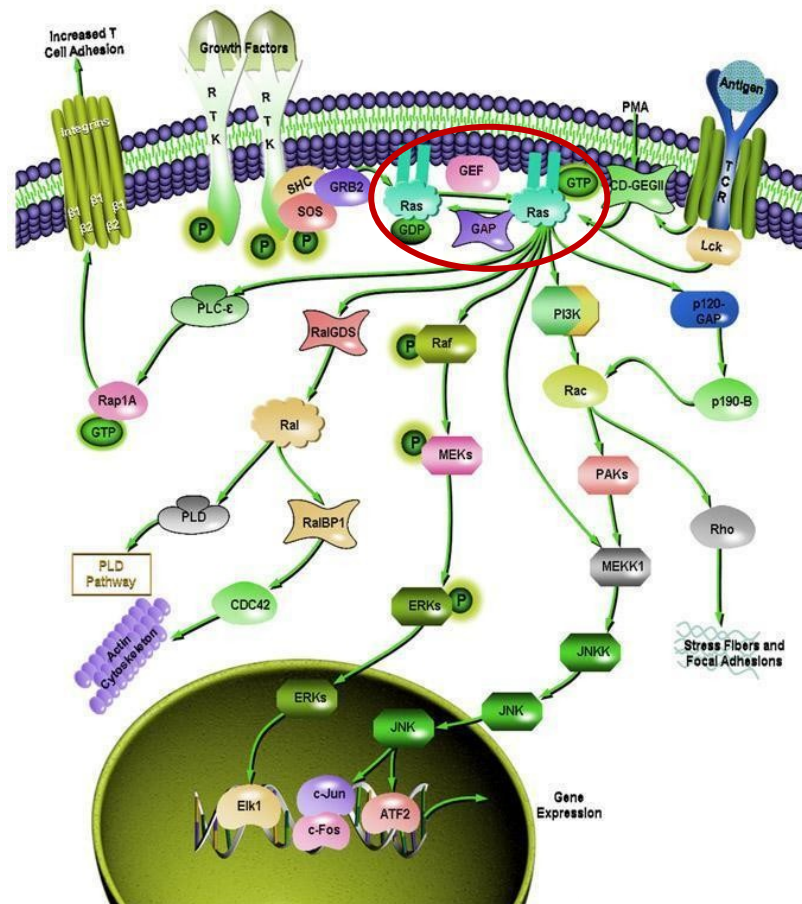


Abbildung 1.2: Die Rolle des Ras-Proteins in der intrazellulären Signaltransduktion (SABiosciences, www.SABiosciences.com)

Zu den Guaninnukleotid-bindenden Proteinen gehört nicht nur die Superfamilie der Ras-verwandten Proteine, sondern auch die α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine ($G_s\alpha$, $G_i\alpha$, $G_t\alpha$, $G_o\alpha$ und $G_q\alpha$), die Translationsfaktoren der Proteinbiosynthese (IF-2, EF-Tu, EF-G, RF-3), das Signalerkennungspartikel (SRP) und dessen Rezeptor (SRP-R) sowie die großen Guaninnukleotid-bindenden Proteine (Dynamamin, GBP, Mx). Die Unterteilung in diese fünf Gruppen erfolgt aufgrund ihrer Funktionen und Homologien in den Sequenzen (Bourne (1990; 1991)).

1.2.2 Die Superfamilie der Ras-verwandten Proteine

Die Superfamilie der Ras-verwandten Proteine besteht aus bisher 100 bekannten Proteinen, welche alle eine molekulare Masse von 20 bis 25 kDa aufweisen und dazu fähig sind, Guaninnukleotide wie GDP und GTP zu binden und als molekulare Schalter zu fungieren. Die Bindestelle im Protein, an der diese

Guaninnukleotide gebunden werden, ist in der ganzen Superfamilie gleich und wird als Nukleotid-Bindedomäne bezeichnet. In ihrer GTP gebundenen Form liegen diese Proteine in ihrem aktiven Zustand vor und sind in der Lage, Effektoren zu aktivieren und Signale weiterzuleiten. Allen diesen Proteinen ist gemein, dass das GTP hydrolysiert und in GDP und freies Phosphat gespalten werden kann. Deshalb werden die Proteine auch kleine GTPasen genannt. Im GDP gebundenen Zustand sind die Proteine inaktiv und weisen nur noch eine sehr geringe Affinität gegenüber Effektoren auf. Dies liegt daran, dass sie eine andere Konformation als ihre aktive, GTP gebundene Form besitzen. Die Proteine der Ras-Superfamilie sind an unterschiedlichen zellulären Funktionen beteiligt und werden, wie in Tabelle 1.1 dargestellt, in fünf Gruppen unterteilt (Wennerberg (2005)). Dazu gehören Ras, Rho, Rab, Arf und Ran.

Im Rahmen dieser Arbeit wird ein Protein dieser Ras-Superfamilie, das H-Ras, genauer untersucht.

Untergruppen	Ras	Rho	Rab	Arf	Ran
	<i>Rat sarcoma</i>	<i>Ras homologous</i>	<i>Ras-like proteins in brain</i>	<i>ADP-ribosylation factor</i>	<i>Ras-like nuclear protein</i>
Mitglieder	Ras, Rap, Rit, Rem, TC21, Rad, Gem, Rheb, Ral, Rerg	Rho, Rnd, Rif, Rac, Cdc42, TC10, TCL, Wrch	Rab	Arf, Sar, Arl, Ard	Ran
zelluläre Funktionen	Proliferation, Apoptose und Differenzierung eukaryotischer Zellen	Reorganisation des Zytoskeletts, Kontrolle des Zellwachstums und Regulation der Genexpression	gerichteter Vesikelverkehr und Exozytose	Steuerung der Bildung von Vesikeln und deren Transport zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat	Regulation des Kerntransports
	Vojteck (1998)	Mackay (1998) Sander (1999)	Schimmoller (1998)	Jackson (2000) Moss (1998)	Moore (1998)

Tabelle 1.1: Untergruppen der Ras-Superfamilie mit Mitgliedern und ihren zellulären Funktionen

1.3 Das Ras-Protein

Das H-Ras-Protein besitzt ursprünglich, wie auch N- und K-Ras, 189 Aminosäuren und eine molekulare Masse von 21 kDa. In der vorliegenden Arbeit wurde hauptsächlich mit der am C-Terminus verkürzten Version, dem c'Ras gearbeitet. Dieses besteht aus nur 166 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 18 kDa. Da die 23 gekürzten Aminosäuren des C-Terminus nicht notwendig für die biologische Funktion sind (John (1989)), wird oft zur Vereinfachung dieses verkürzte Ras verwendet. Wie im Kapitel 1.2 erklärt, spielt das Ras-Protein eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signalweiterleitung und ist an der Proliferation, Apoptose und Differenzierung eukaryotischer Zellen beteiligt.

In der Zelle wird Ras als biologisch inaktives Protein exprimiert. Zur biologischen Aktivierung wird das Cystein in der CAAX-Sequenz des C-terminalen Endes S-farnesyliert. Zusätzlich dazu werden andere Cysteine im Bereich des C-Terminus durch hydrophobe Palmitoylsäurethioester modifiziert. Dies dient zur Verankerung des Proteins in der Plasmamembran (Wittinghofer(2000)).

In den folgenden Kapiteln wird das Protein mit seiner Struktur, den Funktionen und Effektor-Wechselwirkungen sowie wichtigen Mutanten und bereits bekannten Liganden vorgestellt. Da Ras ein Target in der Krebstherapie darstellt, wird auch darauf genauer eingegangen.

1.3.1 Die Struktur des Ras-Proteins

Die Struktur des Ras-Proteins besteht aus 5 α -Helices und 6 β -Faltblättern. Die entsprechende Faltung wird im Allgemeinen als G-Domäne bezeichnet und ist in allen Proteinen der Ras-Superfamilie als Grundstruktur enthalten (Wittinghofer (1991)). Die Tertiärstruktur von Ras in der aktiven, GppNHp gebundenen Form ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Hierbei sind zwei Schalterregionen zu sehen welche als Switch 1 (AS 30-38) und Switch 2 (AS 60-72) bezeichnet sind. Diese beiden Regionen sind an den Strukturänderungen zwischen dem aktiven, GTP-gebundenen und dem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand beteiligt und somit entscheidend für die Eigenschaft als molekularer Schalter (Milburn (1990)). Ebenso spielen sie eine wichtige Rolle in der Ras-Effektor-Wechselwirkung (siehe Kapitel 1.3.3).

An der Bindung des Ras-Proteins zu den Nukleotiden GDP und GTP bzw. den GTP-Analoga sind sechs konservierte Bereiche (PM1-3 und G1-3) beteiligt. Das dargestellte PM1-Motiv besteht aus den Aminosäuren 10-18 und ist vor allem an

der Bindung zum Mg^{2+} und zu den Phosphatgruppen des Nukleotids beteiligt (siehe auch Abbildung 1.4), weshalb es häufig als *P-loop* bezeichnet wird (Saraste (1990)). Als PM2-Motiv wird das hochkonservierte Threonin 35 bezeichnet, da es mit seiner Hydroxylgruppe das Magnesium bindet und mit der NH-Gruppe der Hauptkette eine Wasserstoffbrückenbindung zum γ -Phosphat des Nukleotids ausbildet. Das PM3-Motiv besteht aus den Aminosäuren 57-61, wobei vor allem das Glycin 60 (siehe Abbildung 1.4) eine wichtige Rolle bei der Bindung zum Nukleotid einnimmt (Vetter (2001)).

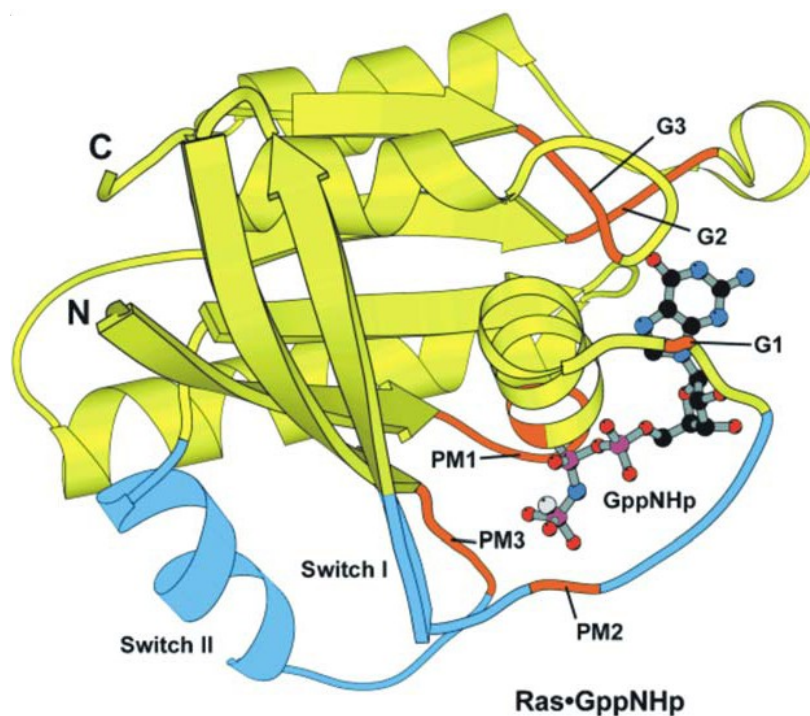


Abbildung 1.3: Struktur und konservierte Regionen von Ras. Bändermodell der Tertiärstruktur von c-Ras-Mg²⁺-GppNHp. Die konservierten Bereiche der G-Domäne (PM1-3) sind orange und die beiden Schalterregionen (Switch I und Switch II) blau dargestellt. (Wittinghofer (2000))

Doch nicht nur die Phosphatgruppen des Nukleotids erfahren durch die PM1-3 Motive eine starke Wechselwirkung mit dem Protein, auch das Nukleosid wird durch die G1-3 Motive stabilisiert. Hierbei bilden das Phenylalanin 28 (G1-Motiv) sowie die zwei Lysine 117 und 147 starke hydrophobe Wechselwirkungen zum Guanin aus. Des Weiteren führen Wasserstoffbrückenbindungen der Aminosäuren des G2-Motivs ebenfalls zu einer Stabilisierung des Nukleosids. Eine Auswahl an Wechselwirkungen zwischen Ras(wt) und dem GTP-Analogon GppNHp, analog zur Kristallstruktur des Ras-Nukleotidkomplex von Pai (1990), ist in Abbildung 1.4

dargestellt. Die Bindungsstärke, mit der die Nukleotide GDP und GTP an Ras(wt) gebunden werden, liegt bei etwa 10 pM (John (1990), Schmidt (1996)). Jedoch hängt diese Affinität stark von der in Lösung vorliegenden Magnesiumionenkonzentration ab (John (1988)).

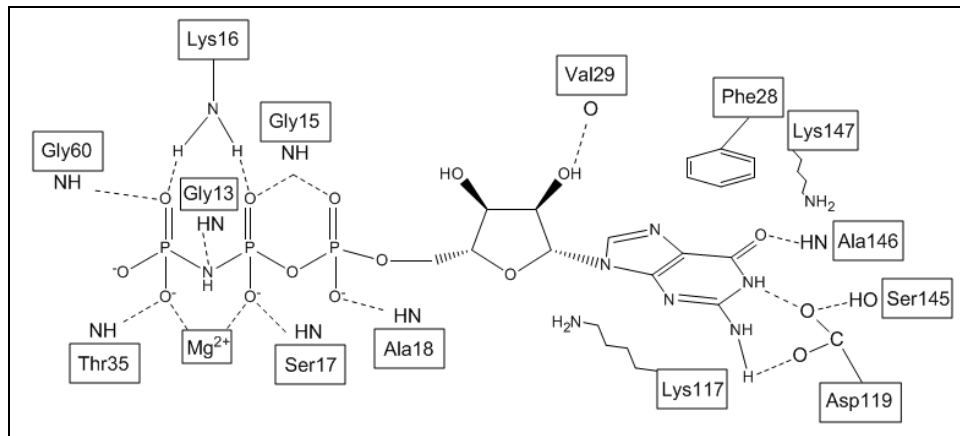


Abbildung 1.4: Wechselwirkungen zwischen Ras(wt) und GppNHp. Darstellung des Nukleotids und der Wechselwirkungen zu ausgewählten konservierten Aminosäuren analog der Röntgenkristallstrukturen von Pai (1990).

1.3.2 Der molekulare Schalter und seine Funktionen

Wie bereits in den vorigen Kapiteln erwähnt, fungiert das Ras-Protein als ein molekularer Schalter (dargestellt in Abbildung 1.5), der zwischen seiner inaktiven, GDP gebundenen Form und seiner aktiven, GTP gebundenen Form wechselt. In der aktiven Form ist das Protein in der Lage, Effektoren zu aktivieren und dadurch Signale innerhalb der Zelle weiterzuleiten.

Sowohl die Dissoziation des GDP als auch die Hydrolyse von GTP verläuft intrinsisch sehr langsam (Hydrolyserate: 0.028 min^{-1} bei 37°C nach Bourne (1990)). Deshalb werden diese beiden Reaktionen regulatorisch beschleunigt. Hierbei sind Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) wie z.B. SOS und Cdc25 für den Austausch von GDP zu GTP und damit für die Aktivierung des Proteins zuständig. Die GTPase aktivierenden Proteine (GAPs) wie NF1 oder p120GAP hingegen beschleunigen die Hydrolyse von GTP in GDP und freies Phosphat und damit die Inaktivierung von Ras um einen Faktor von 10^5 (Ahmadian (1997)).

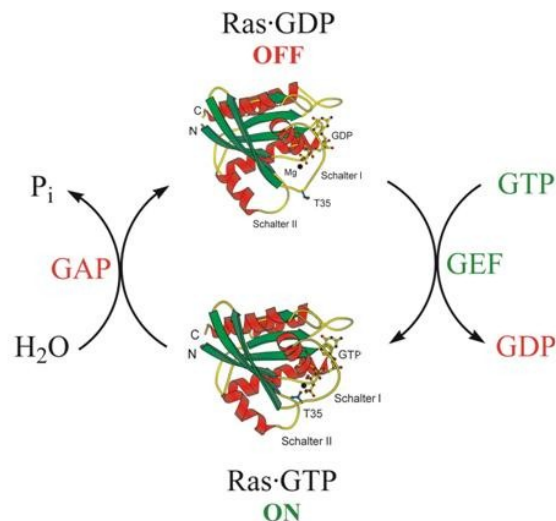


Abbildung 1.5: Molekularer Schalter von Ras. Schematische Darstellung der Ras Aktivierung mittels Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) und der Deaktivierung mittels GTPase aktivierenden Proteinen (GAPs). Dargestellt sind die Röntgenstrukturen von H-Ras(wt)•GDP (oben, Tong (1991)) und H-Ras(wt)•GppNHp (unten, Pai (1990)).

1.3.3 Die Ras-Effektor-Wechselwirkung

In seiner aktiven, GTP gebundenen Form ist das Ras-Protein in der Lage, an Effektoren wie Raf, RalGDS, Byr2, Nore1, P13K und p120GAP zu binden und diese damit zu aktivieren. Dem Großteil dieser Effektoren von Ras ist eine Ras-Bindedomäne (RBD) gemein, welche als Strukturmerkmal eine Ubiquitinfaltung ($\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$) aufweist. Die Wechselwirkung zwischen Ras und den Effektoren erfolgt über die geladenen Seitenketten der beiden Schalterregionen, Switch1 und 2 (siehe Abbildung 1.3) von Ras, wobei die hier beteiligten Aminosäuren je nach Effektor variieren. Raf, RalGDS und Byr2 interagieren beispielsweise durch ein Inter-Protein- β -Faltblatt mit dem Schalter 1 von Ras. Die Bindungsaffinitäten zwischen Effektoren und Ras liegen im Bereich zwischen $2\ \mu\text{M}$ und $20\ \text{nM}$ (Wohlgemuth (2005)).

1.3.4 Die *partial loss-of-function* Mutanten

Zusätzlich zu dem oben erwähnten konformationellen Gleichgewicht in Ras zwischen inaktivem und aktivem Zustand, konnte mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie von Geyer (1996) nachgewiesen werden, dass ein weiteres dynamisches Gleichgewicht in Ras(wt) existiert. Dieses besteht aus zwei Zuständen im aktiven

Ras. Zustand 1 wird im Allgemeinen aufgrund der reduzierten Affinität gegenüber Effektoren (Spoerner (2001; 2004; 2007)) als *weak-binding-state* bezeichnet. Des Weiteren konnte mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie nachgewiesen werden, dass Guaninnukleotid-Austauschfaktoren wie SOS selektiv an diesen Zustand 1 binden (Kalbitzer (2009)). Zustand 2 dagegen wird durch die Bindung der Ras-Bindedomänen von Effektoren stabilisiert (Geyer (1996; 1997), Gronwald (2001), Linnemann (1999), Spoerner (2001; 2004; 2005)).

Mutationen im Ras an der hochkonservierten Aminosäure Threonin 35 zu Alanin (T35A) oder Serin (T35S) führen zu einer Verschiebung dieses Gleichgewichtes hin zu Zustand 1 (Spoerner (2001)). Diese Mutationen verhindern die Wechselwirkung mit einer Untergruppe von Effektoren, während sie die Bindung von anderen Effektoren nicht beeinträchtigen (White (1995), Akasaka (1996)). Damit führen sie, durch die selektive Unterbrechung bestimmter Signalwege, zu einem partiellen Verlust ihrer Funktion und werden als *partial loss-of-function* Mutanten bezeichnet. Der Unterschied zwischen den beiden Mutanten Ras(T35A) und Ras(T35S) besteht darin, dass von Ras(T35A) bisher mittels ^{31}P -NMR nur Zustand 1 beobachtet wurde, wohingegen bei Ras(T35S) durch Zugabe des Effektors Raf-RBD sich das Gleichgewicht zu Zustand 2 verschiebt, wie in Abbildung 1.6 beobachtet werden kann.

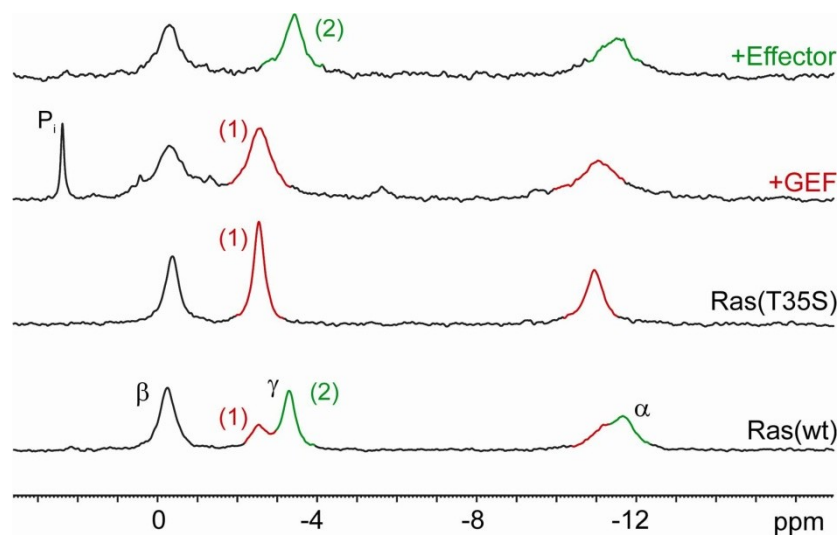


Abbildung 1.6: ^{31}P -NMR-Spektren der konformationellen Zustände von $\text{Ras}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$. ^{31}P -NMR-Spektren von Ras(wt), der *partial loss-of-function* Mutante Ras(T35S) $\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ sowie Ras(T35S) $\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ im Komplex mit SOS(W729E) bzw. Raf-RBD (Kalbitzer (2009)).

1.3.5 Die bekannten Liganden Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA

Wie in Kapitel 1.3.4 genauer erklärt wurde, existiert in aktivem Ras ein konformationelles Gleichgewicht zwischen dem Effektor-bindenden Zustand 2 und Zustand 1, der für seine reduzierte Affinität gegenüber Effektoren bekannt ist. Die Stabilisierung von Ras in Zustand 1 stellt einen interessanten Ansatz dar, die Ras-Effektor-Wechselwirkung zu hemmen. Bisher sind zwei kleine Moleküle identifiziert worden, Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA, welche das Gleichgewicht in aktivem Ras in Zustand 1 überführen und damit selektiv Zustand 1 binden können (Spoerner (2005), Rosnizeck (2010) und Dissertation, Universität Regensburg). Diese Substanzen sind außerdem in der Lage, die Wechselwirkung zwischen Ras und dem Effektor Raf-RBD zu inhibieren (Rosnizeck, Dissertation Universität Regensburg), wie am Beispiel von Zn^{2+} -Cyclen in Abbildung 1.7 dargestellt ist.

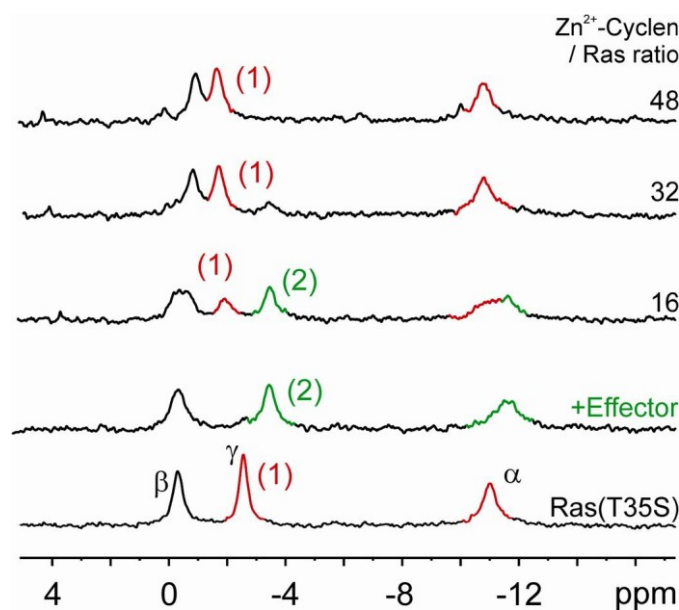


Abbildung 1.7: ^{31}P -NMR-Spektren der Verdrängung des Effektors Raf-RBD von Ras(T35S)• Mg^{2+} •GppNHp mit Zn^{2+} -Cyclen. ^{31}P -NMR-Spektren von reinem Ras(T35S)• Mg^{2+} •GppNHp, Ras(T35S)• Mg^{2+} •GppNHp mit 1.5fachem Überschuss Effektor (Raf-RBD) und Zugabe von 16, 32 und 48fachem Überschuss von Zn^{2+} -Cyclen. (Rosnizeck, Dissertation Universität Regensburg)

Wie von I. Rosnizeck (Dissertation, Universität Regensburg) mittels (^1H - ^{15}N)-HSQC-NMR festgestellt wurde, zeigen Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA je zwei Bindungsstellen im Protein c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNH. Die Metall-Cyclene binden demnach nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids GppNHp direkt im aktiven Zentrum

(Position A) wohingegen Bindungsstelle 2 zwischen dem negativ geladenen L7-Loop und dem C-terminalen Ende des Proteins lokalisiert ist (Position C). M^{2+} -BPA bindet ebenfalls an der Rückseite des Proteins, analog der Cyclene an Position C. Die Bindungsstelle 1 dagegen unterscheidet sich, da das BPA nicht wie Zn^{2+} -Cyclen direkt im aktiven Zentrum bindet, sondern die Bindeposition im PM3-Motiv (an Aminosäuren 39, 40 und 53-58) lokalisiert ist (Position B). Die Bindungskonstanten der beiden Liganden an $c'Ras(T35A) \cdot Mg^{2+} \cdot GppNH$ liegen bei 2.07 ± 0.25 mM für Zn^{2+} -BPA und 9.65 ± 1 mM für Zn^{2+} -Cyclen (Rosnizeck, Dissertation Universität Regensburg). Die 2D Strukturen der beiden Substanzen Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA sind in Abbildung 1.8 dargestellt.

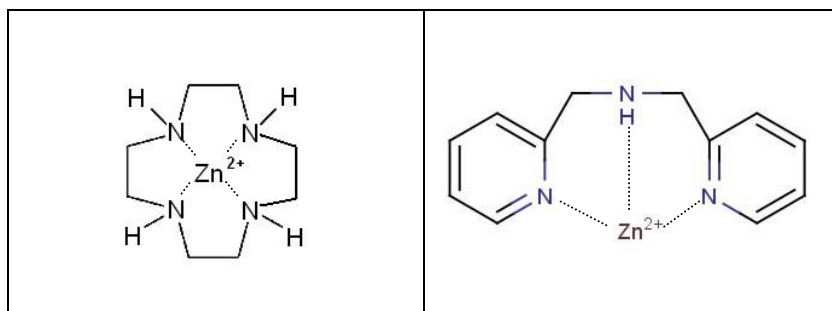


Abbildung 1.8: 2D Strukturen der bekannten Liganden Zn^{2+} -Cyclen (links) und Zn^{2+} -BPA (rechts).

1.3.6 Ras als Zielprotein in der Krebstherapie

Wie das statistische Bundesamt Deutschland in einer Pressemitteilung (Nr. 371 vom 18.10.2010) mitteilt, ist Krebs die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen in Deutschland. 2009 erlagen 116 711 Männer und 99 417 Frauen einem Krebsleiden. Die häufigste Krebsart mit Todesfolge war dabei Lungen- und Bronchialkrebs. Ein Viertel aller an Krebs verstorbenen Personen war jünger als 65 Jahre. Mit einem Anteil von 41% an allen Sterbefällen war Krebs in der Altersgruppe der 45- bis 65-Jährigen die bedeutendste Todesursache (Pressemitteilung Nr. 048 vom 03.02.2011).

Diese Zahlen verdeutlichen wie wichtig es ist, neue Medikamente gegen Krebs zu entwickeln. Das Ras-Protein kann hierbei eine entscheidende Rolle spielen, da es in einer Vielzahl menschlicher Tumore mutiert vorliegt (Bos (1989)). Gründe dafür sind Punktmutationen im Ras an den Positionen 12, 13 sowie 61 (Seeburg (1984), Karnoub (2008)). Eine Mutation an diesen Stellen hat zur Folge, dass das Ras-Protein seine intrinsische und durch GAPs regulierte Hydrolyseaktivität verliert und somit dauerhaft in seiner aktiven, GTP gebundenen Form vorliegt. Dies führt zu

unkontrolliertem Zellwachstum und letztendlich zur Entstehung von Tumoren (Bos (1989)). Die am meisten betroffene Tumorart ist das Pankreaskarzinom, bei dem Ras zu 95% mutiert vorliegt (Almoguera (1988)). Dann folgen Lungenkrebs zu 65% (Burmer (1989)), Endometriumkarzinom zu 46% (Enomoto (1990)) und Blasenkrebs zu 16% (Visvanathan (1988)).

Von Wittinghofer und Waldmann (2000) wurden vier Ansatzpunkte beschrieben, um onkogenes Ras zu inhibieren und somit neue Antitumormedikamente zu entwickeln. Diese Ansatzmöglichkeiten werden im Folgenden näher beschrieben und sind in Abbildung 1.9 dargestellt.

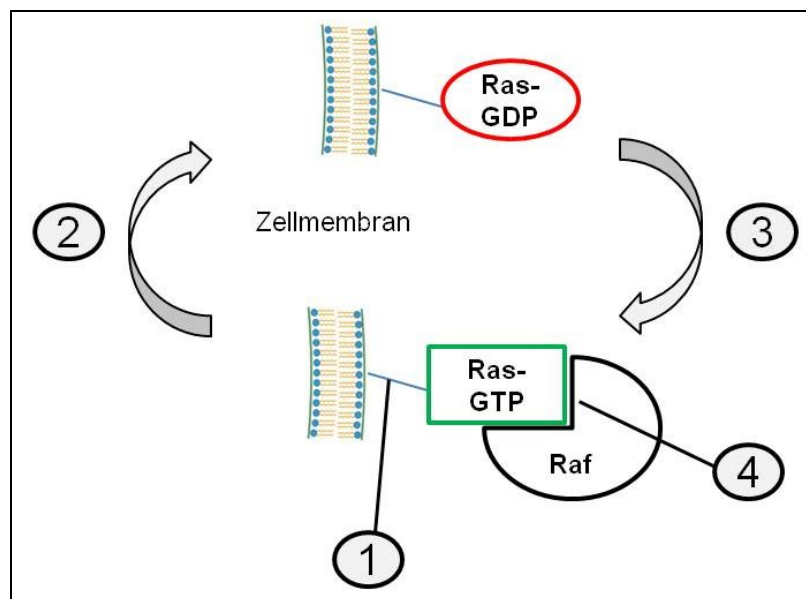


Abbildung 1.9: Ansatzpunkte 1-4 zur Inhibition des Ras-Proteins nach Wittinghofer (2000). Ansatzpunkt 1: Inhibition der Membranverankerung, 2: Beschleunigung der GTP-Hydrolyse, 3: Inhibition des Nukleotidaustauschs und 4: Inhibition der Ras-Effektor-Wechselwirkung

Der erste Ansatzpunkt ist die Inhibition der Membranverankerung des Proteins. Wie bereits in diesem Kapitel erwähnt, ist die posttranslationale Modifikation am C-Terminus und damit die Verankerung von Ras in der Zellmembran entscheidend für seine biologische Aktivität. Die Inhibition dieser Modifikation hat zur Folge, dass Ras nicht in der Plasmamembran verankert wird und somit inaktiv bleibt (Gelb (2006)). Das Hauptziel dieses Ansatzes stellt die Inhibition des Enzyms Farnesyl-Transferase dar (Basso (2006)).

Die zweite Möglichkeit zur Inhibition von Ras (Ansatzpunkt 2) ist die Beschleunigung der Hydrolyse von GTP. Es wurde bereits erwähnt, dass in onkogenem Ras die intrinsische und durch GAPs regulierte Hydrolyseaktivität nicht mehr vorhanden ist. Wie von Ahmadian (1999) gezeigt werden konnte, sorgt das GTP-Analogon DABP-GTP in den onkogenen Rasmutanten G12V und Q61N

für eine 220 - 720fach schnellere Hydrolyse des Nukleotids und damit für eine Inaktivierung des onkogenen Ras.

Ansatzmöglichkeit 3 ist die Inhibierung des Nukleotidaustauschs von GDP zu GTP. Dabei ist das Ziel, die Bindung von Ras an GEFs wie z.B. SOS zu inhibieren. Neueste Ansätze dabei sind Liganden, welche Zuckergruppen enthalten (Gaponenko (2011)) oder eine synthetisch hergestellte α -Helix (basierend auf den Guaninnukleotid-Austauschfaktor SOS) welche die Ras-SOS-Wechselwirkung inhibiert und somit die Signalweiterleitung durch Ras unterbricht (Patgiri (2011)) sowie Inhibitoren, welche aromatische Hydroxylamine und eine Sulfonamidgruppe in einem Molekül enthalten (Colombo (2010)). Eine weitere Substanz, welche den Nukleotidaustausch inhibiert, ist das Molekül SCH-54292, welches 0.7 μ M an Ras•GDP bindet (Ganguly (1998)).

Die vierte Methode (Ansatzpunkt 4) stellt die Inhibierung der Ras-Effektor-Wechselwirkung dar. Die bisher bekanntesten Inhibitoren der Ras-Raf-Wechselwirkung basieren auf Sulindac (Herrmann (1998), Karaguni (2002), Waldmann (2004)). Wie in Kapitel 1.3.5 näher erläutert, inhibieren auch Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA die Wechselwirkung zwischen Ras und Raf (Rosnizeck (2010) und Dissertation Universität Regensburg). Dies geschieht bei beiden Liganden durch eine Stabilisierung des aktiven Zustandes 1, welcher eine geringe Affinität gegenüber Effektoren aufweist (Spoerner (2005)). Die selektive Bindung und Stabilisierung des aktiven Zustandes 1 durch kleine Moleküle ist gleichzeitig der Ansatzpunkt, welcher in dieser Arbeit verfolgt wurde, um neue Inhibitoren für die Ras-Effektor-Wechselwirkung zu finden und somit die Signalweiterleitung zu unterbinden.

1.4 Virtuelles Ligandenscreening

1.4.1 Die Bedeutung in der Arzneimittelforschung

Der Prozess der Arzneimittelentwicklung vor allem im Screening- und Optimierungsprozess hat sich innerhalb der letzten 15 Jahre rapide weiterentwickelt. Dazu beigetragen haben von allem neue Technologien wie die funktionelle Genomik (Dean (2001)), die kombinatorische Chemie (Otto (2002)) sowie das *High-Throughput* Screening (Fox (1999)). Aber vor allem die Fortschritte in der Computertechnologie haben dazu geführt, dass immer häufiger in der Medikamentenentwicklung auch PC-gestützte Verfahren wie das virtuelle Screening oder das *Molecular Modeling* verwendet werden. Die Vorteile dieser „in

silico“ Methoden liegen in der mittlerweile hohen Effizienz, der Schnelligkeit und vor allem der Kostenersparnis. Seit dem Beginn der computergestützten Arzneimittelentwicklung 1994 (Greer (1994)) konnte eine Vielzahl neuer Medikamente durch die Unterstützung von virtuellem Screening und dem *Molecular Modeling* entwickelt werden. Darunter befinden sich zum Beispiel der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Deininger (2003)) oder Dorzolamid als Inhibitor für die Carboanhydrase (Grover (2006)). Auch in den Indikationsgebieten Krebs (Barril (2005), Li (2004) und Huang (2000)), Alzheimer (Becker (2004), Mizutani (2004) und Zhao (2005)) und vielen weiteren wie Asthma, Depressionen und Entzündungskrankheiten haben diese computergestützten Verfahren zur Entwicklung neuer Arzneimittel erfolgreich beigetragen.

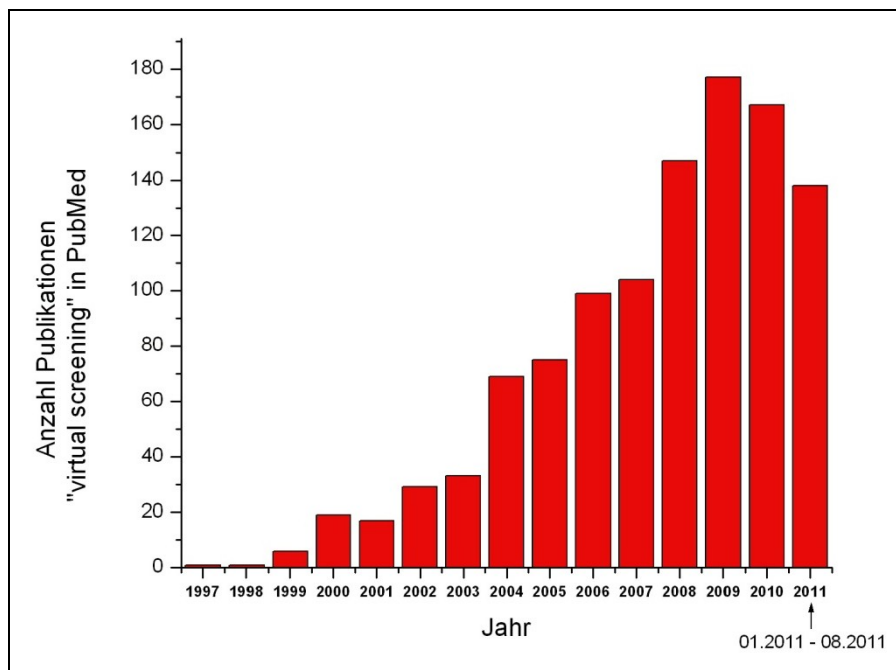


Abbildung 1.10: Anstieg der Publikationen zum Thema Virtuelles Screening seit 1997. Die Anzahl der Publikationen in PubMed zum Stichwort „*virtual screening*“ ist im Balkendiagramm gegen die Jahreszahlen von 1997 bis zum Stand 08.2011 aufgetragen.

Daher ist es nicht verwunderlich, dass in der Forschung und Entwicklung neuer Medikamente die „*in silico*“ Methoden immer wichtiger werden und häufiger Verwendung finden. Das virtuelle Screening ist hierbei eine schnelle und kostengünstige Alternative bzw. Ergänzung zum *High-Throughput* Screening. Hier werden große virtuelle 3D Strukturdatenbanken am PC auf Bindung an ein Zielmolekül mit bekannter Struktur überprüft. Dass es über die Jahre immer öfter verwendet wurde, ist auch aus dem Anstieg der in PubMed gelisteten Publikationen zum Stichwort „*virtual screening*“ in Abbildung 1.10 ersichtlich. Das

LUDI wurde ab 1989 von H.-J. Böhm in der Firma BASF entwickelt, um automatisiert und schnell neue Liganden für Proteine zu finden. Hierbei fittet LUDI kleine Moleküle so in das aktive Zentrum oder einer anderen vorgegebenen Position im Protein, dass Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Molekül und Protein ausgebildet und hydrophobe Bereiche entsprechend ausgefüllt werden können. Dabei basiert die Positionierung der Liganden rein auf geometrischen Faktoren und nicht auf Kraftfeld Berechnungen. Die Bindungsenergien zwischen Ligand und Protein werden nach dem *Docking*-Vorgang mittels einer einfachen empirischen Funktion ermittelt, welche die Enthalpie und Entropie einkalkuliert (Bohm (1993)).

Die Software LUDI arbeitet in drei Schritten: erstens, der Generierung von Wechselwirkungsstellen im Protein, zweitens, dem Fitten der molekularen Fragmente und drittens, der Verlinkung zweier oder mehrerer Fragmente miteinander. Eine Schematische Darstellung als Flussdiagramm ist in Abbildung 1.11 zu sehen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Verlinkungsmodus nicht verwendet, da das virtuelle Screening zur Ermittlung neuer Liganden im Vordergrund stand und nicht die Modifizierung bereits bekannter Fragmente.

1.5 Die Maybridge Library

Die *Maybridge RO3 Fragment Library* ist eine kommerziell erhältliche Datenbank der Firma Maybridge. Sie enthält 500, 1000 oder 1500 organische Fragmente, welche zum Liganden-Screening mit Möglichkeit zum *fragment-based Drug Design* entsprechend Hajduk (2007) verwendet werden. Alle Fragmente erfüllen die *Rule-of-Three* Parameter (Carr (2005)), wie in Tabelle 1.2 dargestellt ist. Des Weiteren sind die Moleküle 1 mM in wässriger Lösung und 200 mM in DMSO löslich. Reaktive Gruppen wurden von der Firma aussortiert, wohingegen funktionelle Gruppen welche leicht verlinkt werden können (z.B. Amine, Alkohole und Carbonsäuren) erhalten blieben. McGregor (1997) wies nach, dass eine quantifizierbare Vielfalt der Fragmente gewährleistet ist. Die Firma Maybridge garantiert eine 95%ige Reinheit der Substanzen und man erhält auf Nachfrage analytische Daten aller Moleküle, wie z.B. ^1H -NMR-Spektren. Ein weiterer Vorteil der *Maybridge RO3 Fragment Library* besteht in der Möglichkeit, interessante Substanzen und deren vorhandene Analoga einzeln nachzubestellen.

	Rule of Three Kriterien	Maybridge RO3 Fragmente
molekulare Masse [g/mol]	≤ 300	93.1 - 298.4
cLogP	≤ 3.0	-2.5 bis 3
H-Brücken Akzeptoren	≤ 3	0 bis 3
H-Brücken Donoren	≤ 3	0 bis 2
rotierbare Bindungen	≤ 3	0 bis 3

Tabelle 1.2: Vergleich der *Rule-of-Three* Parameter (Carr (2005)) mit den Daten der Maybridge RO3 Fragmente (www.maybridge.com).

Bekannte Arzneimittel, welche auf Molekülen der Maybridge Library beruhen (www.ryansci.com/downloads/mayhitdisc.pdf), sind zum Beispiel Nevaxar von Bayer gegen das Nierenzellkarzinom (Leadstruktur: GK00687) und Sutent von Pfizer gegen gastrointestinale Tumoren (auf Basis des Moleküls KM03422).

1.6 STD-NMR-Spektroskopie zur Identifizierung und Charakterisierung von Liganden

Die Identifizierung neuer Liganden als Leitstrukturen für Zielproteine stellt einen bedeutenden Schritt in der Arzneimittelentwicklung dar. Um Substanzen auf Bindung oder Aktivität an einem Target zu überprüfen werden vor allem Methoden wie ELISA, RIA, Immunplot, Oberflächenplasmonenresonanz und Fluoreszenzbasierte Techniken verwendet. Doch auch die NMR spielt, durch die Entwicklung neuer Hochfeldmagnete, die Einführung des Cryo-Probenkopfes sowie immer neuerer Pulsprogramme, eine immer größere Rolle bei der Ermittlung von Liganden. Gängige NMR-Methoden sind zum Beispiel WaterLOGSY (Dalvit (2001)), *reverse NOE pumping* (Chen (1998; 2000)) sowie Transfer-NOE (Meyer (1997)) und SAR (Shuker (1996)). Besonders gut geeignet zum Screenen einer größeren Bibliothek ist die Sättigungs-Transfer-Differenz (STD) NMR-Spektroskopie nach Mayer (1999), welche auf dem Transfer-NOE Effekt beruht. Da die STD-NMR für das Screening der Maybridge Bibliothek in dieser Arbeit verwendet wurde, wird diese Methode im Folgenden genauer beschrieben.

Voraussetzung für die STD-NMR ist ein Protein, welches sich mit einer molekularen Masse von über 10 kDa am Spin-Diffusions-Limit befinden muss. Dieses wird zunächst selektiv gesättigt. Die Einstrahlung der selektiven

Sättigungspulse erfolgt normalerweise bei -2 oder 8-10 ppm. Innerhalb weniger Millisekunden breitet sich die Magnetisierung durch den intramolekularen Sättigungstransfer (Spin Diffusion) über das ganze Protein aus (Kalk (1976)). Wenn nun ein Ligand an das Protein bindet, so wird auch dieser durch intermolekularen Transfer der Magnetisierung gesättigt. Dabei erfahren die Protonen, welche sich näher am Protein befinden, eine größere Sättigung. Über den chemischen Austausch gelangen die gesättigten Liganden wieder in Lösung. Weil die Liganden nur wenige Millisekunden am Protein verbleiben, die Sättigungsdauer jedoch im Rahmen von Sekunden liegt, kann eine Vielzahl an Liganden gesättigt werden. Der Verlust der Sättigung der Liganden in Lösung geht nur langsam mit der normalen T_1 -Relaxation vonstatten. Es ist somit möglich, die Sättigung der Moleküle zu detektieren, da die Liganden eine reduzierte Signalintensität im Sättigungsspektrum aufweisen. Um den STD-Effekt sichtbar zu machen wird neben dem Sättigungs- bzw. *on*-Resonanzspektrum ein zweites Spektrum, das Referenz- oder *off*-Resonanzspektrum benötigt.

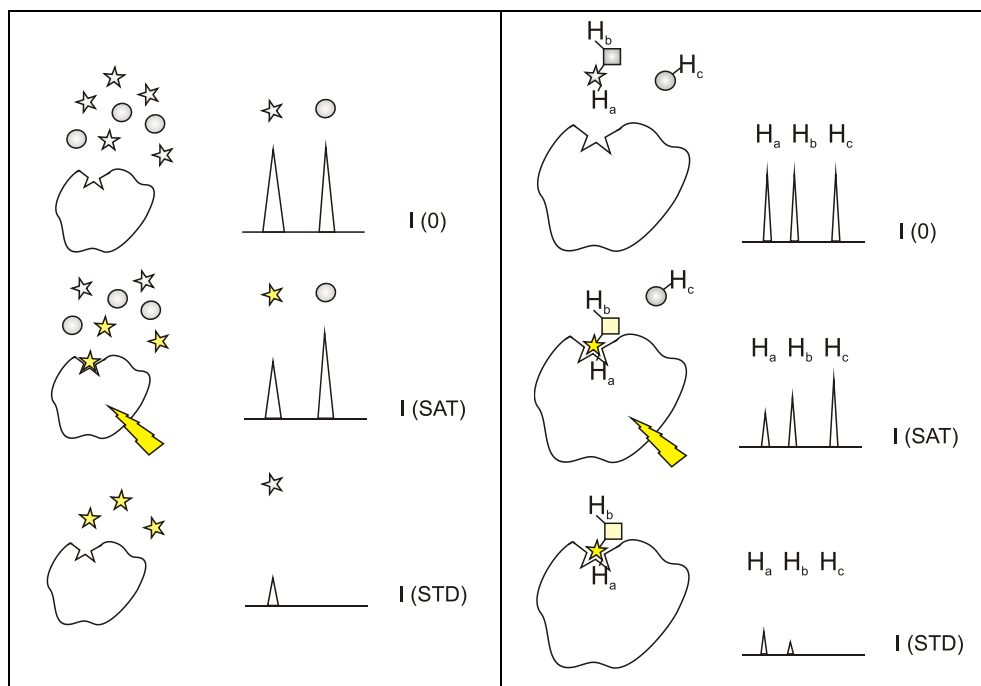


Abbildung 1.12: Schematische Darstellung des STD-Effekts analog Peng (2004). Kugeln und Sterne stellen nichtbindende bzw. bindende Substanzen dar. $I(0)$ ist die Intensität der Signale im Referenzspektrum (*off*-Resonanz), $I(SAT)$ die Intensität der Signale im Sättigungsspektrum (*on*-Resonanz) und $I(STD)$ ist die Intensität der Signale im Differenzspektrum. Die Farbe Gelb stellt die Sättigung von Protein bzw. Liganden dar. In der Grafik rechts ist zu erkennen, dass Protonen in näherer Distanz zum Protein eine stärkere Sättigung erfahren, was die Bestimmung von Epitopen ermöglicht (Mayer(2001)).

Beim Referenzspektrum wird ein selektiver Vorsättigungspuls außerhalb des spektralen Fensters bei z.B. 40 ppm eingestrahlt. Hier erfährt das Protein keine Sättigung weshalb Protein und Liganden ihre normale Intensität behalten. Wenn nun die Differenz zwischen Referenz- und Sättigungsspektrum gebildet wird, erhält man das STD-Spektrum. In diesem sind nur Signale von Liganden erkennbar, die an das Protein binden, wie in Abbildung 1.12 dargestellt ist. Die Intensität dieser STD-Signale ist z.B. von dem gewählten Ligandenüberschuss oder der Sättigungsdauer abhängig und gibt keinerlei Auskunft über die Bindungskonstante.

Die Vorteile der STD-NMR-Spektroskopie liegen in der Möglichkeit Liganden aus Mischungen zu identifizieren, Bindungs epitope zu bestimmen (Mayer (2001)) und Bindungskonstanten durch Titrations zu berechnen. Des Weiteren sind nur geringe Mengen an Protein nötig und weder Rezeptor noch Liganden müssen gelabelt oder immobilisiert werden. Für ein Screening ist die STD-NMR vor allem geeignet, weil sie als 1D Experiment schnell ist und keine langen Zeiten zur Auswertung nötig sind. Der größte Nachteil der Methode besteht darin, dass nicht ermittelt werden kann, wo genau im Protein die Liganden binden. Dazu sind weitere NMR-Experimente, wie die in der Arbeit verwendete (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-Spektroskopie, nötig. Der detektierbare Bereich der STD-Methode liegt bei Bindungskonstanten zwischen 10^{-8} und 10^{-3} M.

1.7 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, durch virtuelle und STD-NMR basierte Screenings neue Liganden für aktives Ras in Zustand 1 zu identifizieren. Dazu soll sowohl das virtuelle als auch das in Teilen automatisierte STD-NMR-Screening zunächst am Lehrstuhl für Biophysik etabliert werden.

Für den ersten Schritt, das virtuelle Screening mit dem Programm LUDI, ist zunächst die Erstellung geeigneter, virtueller 3D Strukturdatenbanken und die Modifizierung der 3D Proteinstruktur von c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp nötig. Bei dem virtuellen Screening sind zwei Ansätze interessant. Zum einen das Screening direkt im aktiven Zentrum, an gleicher Position neben dem P_γ des Nukleotids wo auch Zn^{2+} -Cyclen bindet, und zum andern an definierten Positionen nahe des aktiven Zentrums um eine spätere Verlinkung zu ermöglichen. Nach Ermittlung virtueller Liganden sollen diese auf reale Bindung am Ras-Protein mittels STD-NMR überprüft werden.

Ein reales Screening von 500 Substanzen der Maybridge RO3 Fragment Library an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mittels STD-NMR soll weitere neue Liganden für aktives Ras in Zustand 1 identifizieren.

Die entsprechenden Bindungspositionen und Bindungskonstanten von den neuen Liganden werden dann durch *Molecular Modeling* mit LUDI und (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Titrationsen ermittelt. Ob diese Liganden in der Lage sind, das konformationelle Gleichgewicht in Ras(wt) hinzu Zustand 1 zu verschieben, kann daraufhin mittels ³¹P-NMR überprüft werden.

Eine weitere Aufgabe wird die Expression, Aufreinigung und Charakterisierung einer neuen Mutante von Ras, c'Ras(T35A, H166A), darstellen. Diese Mutante soll mit c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp hinsichtlich ihrer 2D Spektren und der Bindung von Zn²⁺-Cyclen und Zn²⁺-BPA verglichen werden.

2 Materialien und Geräte

2.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden in der jeweils höchsten Reinheitsstufe (Analysequalität) von den Firmen Amersham Life Science (Little Chalfont, England), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Serva (Heidelberg), Roth (Karlsruhe), Euriso-Top (Saarbrücken) und Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

Die Substanzen 2-Aminoanilin, 3-Aminoanilin, Zn^{2+} -Cyclen, Zn^{2+} -BPA sowie die Derivate des Zn^{2+} -Cyclens wurden am Lehrstuhl für Organische Chemie (Prof. König) der Universität Regensburg synthetisiert.

Substanzen A3, B1, B2, B4, C4, D2 und E3 aus dem virtuellen Screening wurden von der Firma Ambinter (Paris, Frankreich) bezogen.

Die Maybridge RO3 500 Fragment Library wurde von der Firma Fisher Scientific (Loughborough, England) erworben.

2.2 Häufig verwendete Puffer-Lösungen

Aufschlusspuffer:	32 mM Tris/HCl pH=7.4; 5 mM EDTA; 2 mM DTE; 1 mM PMSF
C/2-Puffer:	32 mM Tris/HCl pH=7.4; 10 mM MgCl_2 ; 1 mM DTE
Puffer D:	64 mM Tris/HCl pH=7.4; 400 mM NaCl; 10 mM MgCl_2 ; 2 mM DTE; 0.1 mM GDP
Austauschpuffer:	50 mM Tris/HCl pH=7.4; 2 mM DTE
STD-Messpuffer:	40 mM Tris/HCl pH=7.4; 10 mM MgCl_2

2.3 Plasmide und Bakterienstämme

Für die Expression der H-Ras-Proteine c'Ras(T35A) sowie c'Ras(T35A, H166A) wurden ptac Vektoren verwendet. Die Vektoren befanden sich in dem *Escherichia coli* Stamm CK600K (supE, hsdM⁺, hsdR⁻, kanR) der Firma Hoffmann-Berling (Heidelberg, Deutschland).

Das Plasmid von c'Ras(T35A, H166A) wurde nach einer *site-directed* Mutagenese an Position 166 von der Firma Entelechon (Regensburg, Deutschland) erhalten.

2.4 Nährmedien und Antibiotika

Nährmedien:

LB (Lysogeny Broth)-Medium:	10 g/L Bacto-Trypton; 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl; 0.5 mM NaOH
New Minimal Medium (NMM):	900 mL Minimal Medium 10 mL SL-mix 4 g Glucose 1 g Thiamin 1 g ¹⁵ NH ₄ Cl <i>wurden auf 1 L mit Millipore H₂O aufgefüllt</i>
Minimal Medium:	7.5 g NaHPO ₄ ; 3 g KH ₂ PO ₄ ; 0.5 g NaCl 0.25 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O; 0.014 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O <i>wurden auf 900 mL mit Millipore H₂O aufgefüllt und steril filtriert</i>
SL-Mix:	1 mL SL-6 Lösung; 0.9 mL SL-4 Lösung <i>wurden auf 10 mL mit Millipore H₂O aufgefüllt und steril filtriert</i>
SL-6 Lösung (haltbar bei 4 °C):	100 mg/L ZnSO ₄ x 7 H ₂ O; 30 mg/L MnCl ₂ ; 300 mg/L HBO ₃ ; 200 mg/L CoCl ₂ x 6 H ₂ O; 10 mg/L CuCl ₂ x 2 H ₂ O; 20 mg/L NiCl x 6 H ₂ O; 30 mg/L Na ₂ MoO ₄

SL-4 Lösung (nicht haltbar): 500 mg/L EDTA; 200 mg/L $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
wurden auf 90 mL mit Millipore H_2O aufgefüllt

Antibiotika:

Carbenicillin: Stammlösung: 50 mg/mL in H_2O

Kanamycin: Stammlösung: 30 mg/mL in H_2O

Die Antibiotika wurden von der Firma GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg, Deutschland) bezogen.

2.5 Enzyme

Alkaline Phosphatase: Roche (Mannheim, Deutschland)

DNase I: Roche (Mannheim, Deutschland)

Lysozyme: Sigma (Deisenhofen, Deutschland)

2.6 Standard

Dalton Mark VII – L Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
L7 (66 /45 /36 /29 /24 /20.1 /14.2 kDa)

2.7 Verbrauchsmaterialien und Zubehör

Bradford-Reagenz Biorad (München, Deutschland)

Einmalküvetten

Eppendorf Cups

Latexhandschuhe



Roth (Karlsruhe, Deutschland)

NMR-Probenröhrchen:

4.25 mm NMR Tube

Bruker (Karlsruhe, Deutschland)

8 mm NMR Tube

Shigemi Co. LTD (Tokyo, Japan)

Quarzglasküvetten

Perkin Elmer (Waltham, USA)

Sterifilter

Millipore (Schwalbach, Deutschland)

Vivaspin 6, 20

Vivascience (Hannover, Deutschland)

2.8 Säulenmaterialien

Nucleosil 100 C-18 Vorfilter	Bischoff (Leonberg, Deutschland)
ODS Hypersil C18	Beckmann Coulter (Fullerton, USA)
Superdex G-75 prep grade	} Amersham (Freiburg, Deutschland)
Sephadex G25 in PD10	
Q-Sepharose Fast Flow	

2.9 Geräte

FPLC-Anlage (GradiFrac)	Amersham (Freiburg, Deutschland)
HPLC-Anlage (Gold 166)	Beckmann (Unterschleißheim, Deutschland)
Milliporeanlage Milli-Q	Millipore (Hamburg, Deutschland)
NMR-Spektrometer:	
AVANCE 500	} Bruker (Karlsruhe, Deutschland)
AVANCE 600	
Probenwechsler B-ACS 120	
Pipettierroboter:	
RoboSeq 4204 SE-L	MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland)

2.10 Virtuelle Bibliotheken

Ambinter Databases	www.ambinter.com
Chemstar: CStar2007	www.chemstar.ru
InterBioScreen	www.ibscreen.com
ZINC	www.zinc.docking.org (University of California)

2.11 Software

Auremol 2.4.0	www.auremol.de
CorelDraw 12	Corel Corporation (Ottawa, Kanada)
CORINA	Molecular Networks (Erlangen, Deutschland)
IconNMR	Bruker (Karlsruhe, Deutschland)
InsightII, LUDI	Accelrys (San Diengo, USA)
Instant JChem	ChemAxon (Budapest, Ungarn)
Marvin Space	ChemAxon (Budapest, Ungarn)
MS Office	Microsoft (Redmond, USA)
Origin 6.0	Microcal Software Inc. (Northampton, USA)
RoboManager NT	MWG Biotech AG (Ebersberg, Deutschland)
SSH Secure File Transfer	Internet Engineering Task Force (IETF)
Topspin 2.0	Bruker (Karlsruhe, Germany)
ViewerLite 4.2	Accelrys Inc. (San Diego, USA)

3 Methoden

3.1 Expression und Reinigung von Proteinen

3.1.1 Expression und Reinigung von unmarkiertem Ras

Die Mutante des verkürzten humanen H-Ras, c'Ras(T35A), wurde durch Überexpression basierend auf der Methode von Tucker (1986) mit Hilfe eines *ptac*-Vektors im *E. coli* Stamm CK600K erhalten. Nach Herstellung von 200 mL einer Übernachtskultur wurden damit 10 L LB-Medium (siehe Kapitel 2.4) mit den Antibiotika Carbenicillin (50 mg/L) und Kanamycin (25 mg/L) verteilt auf 5 Erlenmeyerkolben beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und einer Schüttlergeschwindigkeit von 180 rpm. Durch Zugabe von 1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0.8 wurde die Proteinexpression induziert. Nach Inkubation über Nacht (15-18 Stunden) wurde die Kultur bei 4 °C zentrifugiert, der Niederschlag eingefroren und bei -20 °C gelagert.

Der aufgetaute Bakterienniederschlag wurde in 150 mL Aufschlusspuffer (32 mM Tris/HCl pH=7.4; 5 mM EDTA; 2 mM DTE; 1 mM PMSF) resuspendiert. Durch Zugabe von Lysozym (1 mg/mL Zellsuspension) wurde der Zellaufschluss eingeleitet. Nach Inkubation bei 4 °C über 30 min wurden zur Zellsuspension 6 mL einer 6%igen Natrium-Desoxycholat-Lösung gegeben. 30 min später erfolgte die Zugabe von 10 mM MgCl₂ und 20 mg DNase1. Der Ansatz wurde weitere 30 min bei 4 °C inkubiert.

Zur Sedimentation der Zellfragmente wurde 60 min bei 18000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde auf eine mit C/2-Puffer (32 mM Tris/HCl pH=7.4; 10 mM MgCl₂; 1 mM DTE) äquilibrierte Q-Sepharose Säule (Säulenvolumen 500 mL) aufgetragen. Daraufhin wurde diese mit 1.5 Säulenvolumen C/2-Puffer gewaschen und ein linearer Salzgradient von 0 bis 800 mM NaCl in C/2-Puffer über ein Volumen von 4 L angelegt. Die Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (siehe Kapitel 3.2.4) analysiert und die Ras-Protein enthaltenden Fraktionen vereinigt, aufkonzentriert und über eine mit Puffer D (64 mM Tris/HCl pH=7.4; 400 mM NaCl; 10 mM MgCl₂; 2 mM DTE; 0.1 mM GDP) äquilibrierte Sephadex G75-Säule durch Gelfiltration gereinigt. Mittels SDS-PAGE wurden die Fraktionen mit reinem Ras-Protein identifiziert, vereinigt und bis zu einer Konzentration von 20-50 mg/mL eingeeengt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte via HPLC (siehe Kapitel 3.2.3). Die Lösung wurde anschließend aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.1.2 Expression und Reinigung von ¹⁵N-markiertem Ras

Die Überexpression der beiden H-Ras-Proteine c'Ras(T35A) und c'Ras(T35A, H166A) wurde basierend auf der Methode nach Tucker (1986) mit Hilfe von *ptac*-Vektoren im *E. coli* Stamm CK600K durchgeführt. 10 L LB-Medium (siehe Kapitel 2.4) mit den Antibiotika Carbenicillin (50 mg/L) und Kanamycin (25 mg/L) verteilt auf 5 Erlenmeyerkolben wurden mit 200 mL einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C und einer Schüttlergeschwindigkeit von 180 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0.8 wurde die Kultur bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Bakterienniederschlag zweimal mit je 100 mL New Minimal Medium (NMM, inklusive 1 g/L ¹⁵NH₄Cl siehe Kapitel 2.4) gewaschen. Nachdem die Pellets in je 200 mL NMM resuspendiert wurden, erfolgte die Überführung in 4 L NMM, verteilt auf zwei Erlenmeyerkolben. Die Proteinexpression wurde nach 15 minütiger Inkubation bei 37 °C und 180 rpm mit 1 mM IPTG induziert. Bei 30 °C und 180 rpm wurde die Kultur über Nacht inkubiert und am darauf folgenden Tag zentrifugiert. Der Niederschlag wurde eingefroren und bei -20 °C gelagert. Die folgenden Reinigungsschritte wurden analog der Reinigung von unmarkiertem Ras (siehe Kapitel 3.1.1) durchgeführt.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmiden

Die Transformation kompetenter *E. coli* CK600K mit dem Plasmid von c'Ras(T35A, H166A) (siehe Kapitel 2.3) wurde nach der Methode von Hanahan (1983) durchgeführt. Dazu wurden 200 µL der kompetenten CK600K Zellen angetaut und mit 10 µL des Plasmids durch Anschnippen vermischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein 45 sek Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C. Es folgte ein Kälteschock für 5 min auf Eis. Der Zellsuspension wurde 1 mL LB-Medium (siehe Kapitel 2.4) zugegeben und bei 37 °C im Schüttler für 45 min inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz 30 sek bei 4000 rpm zentrifugiert und 1 mL des Überstandes abgesaugt. Der Niederschlag wurde mit dem restlichen Überstand resuspendiert und einmal 20 µL sowie einmal 180 µL davon auf Selektivagarplatten (LB-Medium, 10% Bacto-Agar, 50 mg/mL Carbenicillin, 25 mg/mL Kanamycin) ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht. Die Einzelkolonien wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze in je 30 mL LB-Medium (inklusive 50 mg/mL Carbenicillin und 25 mg/mL Kanamycin) überführt.

Nach Inkubation bei 37 °C und einer Schüttlergeschwindigkeit von 180 rpm über Nacht wurden die Kulturen in 10 mL Ansätze aliquotiert, bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand bis auf 0.7 mL verworfen. Die Pellets wurden im verbliebenen Überstand resuspendiert und in Cryo-Gefäße überführt. Nach Vermischen mit je 0.3 mL 50% Glycerin wurden die Glycerinkulturen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Einführung einer Punktmutation in c'Ras an Stelle 166

Um eine Bindungsstelle am C-Terminus des Ras-Proteins auszuschließen (siehe Kapitel 4.6.2), wurde im c'Ras(T35A) an Position 166 das natürliche Histidin gegen ein Alanin ausgetauscht. Dazu wurde zunächst das Plasmid (siehe Kapitel 2.3) von der Firma Entelechon sequenziert. Die erhaltene Aminosäuresequenz sowie der entsprechende Triplet-Code ist in Abbildung 3.1 dargestellt.

5'3' Frame 3

L **Stop** A D T I S H R K Q N S **Met** T E Y K L V V V G A G G V G K S A L T I Q L I Q N H F V D E
Y D P A I E D S Y R K Q V V I D G E T C L L D I L D T A G Q E E Y S A **Met** R D Q Y **Met** R T G E
G F L C V F A I N N T K S F E D I H Q Y R E Q I K R V K D S D D V P **Met** V L V G N K C D L A A
R T V E S R Q A Q D L A R S Y G I P Y I E T S P K T R Q G V E D A F Y T L V R E I R Q **H** **Stop**
L R K L N P P D E S G P G C **Met** S C K C V L S **Stop** R S T S S G H G G A G C R K E V Q T E R
R R K E G R K Q G X X E G L L E P S H P G T V X E **Stop** L Q S V **Met** S F V P V X

A A T T G T G A G C G G A T A C A A T T C A C A C A G G A A A C A G A A T T C T A T G A C A G A A T A C A A
G C T T G T T G T T G T T G G C G C C G G C G G T G T G G G C A A G A G T G C G C T G A C C A T C C A G C T G
A T C C A G A A C C A T T T T G T G G A C G A A T A C G A C C C C G C C A T A G A G G A T T C C T A C C G G A
A G C A G G T G G T C A T T G A T G G G G A G A C G T G C C T G T T G G A C A T C C C T G G A T A C C G C C G G
C C A G G A G G A G T A C A G C G C C A T G C G G G A C C A G T A C A T G C G C A C C G G G G A G G G C T T C
C T G T G T G T G T T T G C C A T C A A C A C C A A G T C T T T T G A G G A C A T C C A C C A G T A C A
G G G A G C A G A T C A A A C G G G T G A A G G A C T C G G A T G A C G T G C C C A T G G T G C T G G T G G
G A A C A A G T G T G A C C T G G C T G C A C G C A C T G T G G A A T C T C G G C A G G C T C A G G A C C T C
G C C C G A A G C T A C G G C A T C C C T A C A T C G A G A C C T C G G C A A G A C C C G G C A G G A G
T G G A G G A T G C C T T C T A C A C G T T G G T G C G T G A G A T C C G G C A G C A G T A G C T G C G G A
G C T G A A C C C T C C T G A T G A G A G T G G C C C C G G C T G C A T G A G C T G C A A G T G T G T G C T C
T C C T G A C G C A G C A C A G A G C T C A G G A C A T G G A G G T G C C G G A T G C A G G A A G G A G G T G C
A G A C G G A A G G A G A G A G G A A G A G A C G G A A G C A A G G A N N N N G A A G G G C T G C T
G G A G C C A G T C A C C C C G G G A C C G T G G N C G A G T G A C T G C A G T C A G T C A T G T C C T T T
G T G C C C G T C C N N N

Abbildung 3.1: Aminosäuresequenz und Triplet-Code des Plasmids c'Ras(T35A). Grün geschrieben ist die Sequenz des Proteins, gelb hinterlegt das Histidin 166 bzw. der entsprechende Triplet-Code.

Die Sequenz des Sequenzierprimers 511 war hierbei GAG CTG TTG ACA ATT AAT CAT CGG CTC.

Um das Histidin in ein Alanin zu mutieren, wurde die Sequenz CAC (Histidin) in GCC (Alanin) umgewandelt. Diese Mutation wurde von der Firma Entelechon (Regensburg, Deutschland) mittels einer *site-directed* Mutagenese (Kunkel (1985), Taylor (1985)) durchgeführt.

3.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels HPLC

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (Beckmann, System Gold 166) mittels einer ODS-Hypersil C18 Umkehrphasensäule. Da äquimolare Mengen an Protein und gebundenem Nukleotid vorliegen, ist es (nach Abtrennung von freiem Nukleotid) möglich, die Konzentration von reinem Protein über die Bestimmung der Nukleotidkonzentration zu ermitteln. Die Absorption des Nukleotids wurde bei $\lambda=254$ nm bestimmt. Als Laufpuffer dienten 100 mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 6.4 mit 10 mM Tetrabutylammoniumbromid sowie 5-7.5% Acetonitril. Zur Eichung des HPLC Systems wurden mehrere GDP Lösungen verwendet, deren genaue Konzentrationen durch Messung der Absorption bei $\lambda=254$ nm und dem Extinktionskoeffizienten $\epsilon_{GDP} = 13700 \text{ L cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ bestimmt wurden.

3.2.4 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Um Proteingemischen nach ihrer molaren Masse aufzutrennen, wurde die denaturierende SDS-PAGE nach Laemmli (1970) angewandt. Dabei kann nicht nur das gewünschte Protein aus einer Mischung identifiziert, sondern auch dessen Reinheit überprüft werden. 18 μL der Proteinproben wurden mit 6 μL eines 4x SDS haltigen Probenpuffers (150 mM Tris/HCl pH=6,8; 2% (w/v) SDS; 20% (v/v) Glycerin; 0.01% (w/v) Bromphenolblau; 10 mM DTE) vermischt und vor dem Auftragen auf das Gel durch Hitze denaturiert (5 min bei 95 °C). Die Acrylamidkonzentration im Trenngel betrug dabei 15% und im Sammelgel 4%. Der Laufpuffer bestand aus 25 mM Tris-Base, 200 mM Glycin und 0.1% (w/v) SDS. Die Gele wurden bei einer konstanten Stromstärke von 36 mA über eine Dauer von ca. 50 min gefahren. Daraufhin wurden sie in einer Färbelösung (0,1% Coomassie Brilliantblau G250; 0,1% Coomassie Brilliantblau R250; 40% (v/v) Methanol; 10% (v/v) Essigsäure), nach Aufkochen in der Mikrowelle, 30 min

gefärbt. Die Entfärbung fand in einer Entfärbelösung (20% (v/v) Essigsäure; 10% (v/v) Ethanol) bis zum deutlichen Sichtbarwerden der Proteinbanden statt. Als Größenstandard wurde der Proteinstandard L7 (siehe Kapitel 2.6) verwendet.

3.2.5 Nukleotidaustausch zu GppNHp

Da an das jeweilige Ras-Protein nach der Reinigung GDP gebunden ist, muss dieses gegen GppNHp ausgetauscht werden. Zunächst wurde das Protein vom Elutionspuffer in einen Austauschpuffer (50 mM Tris/HCl pH=7.4; 2 mM DTE) ohne Mg^{2+} umgepuffert, da dies die Bindung zu GDP schwächt. Nach Zugabe von 200 mM $(NH_4)_2SO_4$, einem dreifachen Überschuss an GppNHp sowie alkalische Phosphatase (2 U/mg Protein) wurde über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken inkubiert. Durch Gelfiltration (PD10 Sephadex G25, siehe Kapitel 2.8) wurde das Protein am nächsten Tag von alkalischer Phosphatase, freiem Nukleotid und Salzen gereinigt.

3.3 Vorbereitung der Substanz Bibliotheken

3.3.1 Vorbereitung der virtuellen Datenbanken

3.3.1.1 Filterung auf *drug-likeness* und Eliminierung reaktiver Gruppen

Für die Dateien der virtuellen Datenbanken (siehe Kapitel 2.10) wurden zunächst Projekte im Programm Instant JChem (siehe Kapitel 2.11) erstellt und die Datenbanken importiert. Um diese dann auf *drug-likeness* nach Oprea (2000) basierend auf Lipinskis *Rule-of-Five* (1997) zu filtern, mussten davor die Anzahl der Ringe (rings), der rotierbaren Bindungen (RTB), der Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren (HAc) sowie -donoren (HDo) und der logP (Oktanol/Wasser Koeffizient) berechnet werden. Die Daten zur molekularen Masse (MW) waren bereits in allen Datensätzen vorhanden. Die einzelnen Datenbanken wurden entsprechend Tabelle 3.1 gefiltert und die erhaltenen Dateien separat gespeichert. Die Anzahl der 2D Strukturen belief sich nach diesem Schritt auf insgesamt ca. 2.3 Millionen, zuvor enthielt die Gesamtdatenbank ca. 3.6 Millionen Strukturen. Da die ZINC Bibliothek separat nach dem *fragment-based Drug Design* entsprechend Hajduk (2007) gescreent wurde und hierbei eine molekulare Masse von 250 g/mol nicht überschritten werden und auch Strukturen ohne Ringe beinhalten sollte, wurde der Filter bei dieser Datenbank entsprechend angepasst.

$0 \leq$	MW	≤ 500
$2 \leq$	RTB	≤ 15
$-3.5 \leq$	logP	≤ 4.5
$2 \leq$	HAc	≤ 9
$0 \leq$	HDo	≤ 5
$1 \leq$	rings	≤ 4

Tabelle 3.1: Bedingungen des *drug-likeness* Filters

Im nächsten Schritt wurden die 2D Strukturbibliotheken entsprechend Rishton (1982) nach reaktiven Gruppen (siehe Tabelle 3.2) gefiltert und diese eliminiert, da sie generell leicht in wässriger Lösung hydrolysieren und sich als reaktiv gegenüber Proteinen und biologischen Nukleophilen erwiesen haben.

Tabelle 3.2: Eliminierte reaktive Gruppen

Nach der Eliminierung der reaktiven Gruppen enthielten die Ambinter-, Chemstar- und InterBioScreen Datenbanken noch ca. 1.6 Millionen einzelne Strukturen. Die ZINC Datenbank wurde von ursprünglich 8.2 Millionen Strukturen auf 135 119 Strukturen reduziert.

3.3.1.2 Konvertierung in 3D

Zum Screenen der Datenbanken wurden die Strukturen in 3 dimensionaler Form benötigt. Da die 165 ZINC Bibliotheken bereits im gewünschten Format vorlagen, war eine Konvertierung bei ihnen nicht nötig. Die anderen Bibliotheken mussten zunächst von 2D in 3D Strukturen umgewandelt werden. Dazu wurde das Programm CORINA (siehe Kapitel 2.11) verwendet. Neben der Konvertierung wurden gleichzeitig auch, wenn möglich, entsprechende Stereoisomere und unterschiedliche Ringkonformere erzeugt und die Bibliotheken im gewünschten .sdf Format abgespeichert. Nach diesem Verfahren standen insgesamt 9.6 Millionen Strukturen organischer Moleküle für das virtuelle Screening zur Verfügung. Diese wurden, aufgrund der sonst zu hohen Dateigröße, für das Screening in 21 kleinen Teilbibliotheken auf den entsprechenden Computer in der Pharmazie mittels SSH Secure File Transfer (siehe Kapitel 2.11) transferiert.

3.3.1.3 Generierung von LUDI Bibliotheken

Da im Programm LUDI (siehe Kapitel 2.11) keine .sdf Files verwendet werden, wurden die Bibliotheken mittels des LUDI internen Programmes genfra in entsprechende genfra-Datensätze umgewandelt. Dabei wurden pro Datensatz jeweils zwei Files erzeugt, zum einen das Strukturfile im .pdb Format und zum andern das Targetfile im .inp Format.

3.3.2 Vorbereitung der Substanzen für STD-NMR-Messungen

3.3.2.1 Substanzen aus virtuellem Screening

Die bei der Firma Ambinter bestellten Substanzen (Kapitel 2.1) wurden in fester Form geliefert und mussten zunächst in Lösung gebracht werden. Dazu wurden die leicht löslichen Substanzen B1, B4, C4 und E3 in STD-Messpuffer (40 mM

Tris/HCl pH=7.4; 10 mM MgCl₂) gelöst, den schwerer löslichen Substanzen A3, B2 und D2 wurde DMSO beigefügt, bis auch diese vollständig gelöst waren. Ein Überblick über die so erhaltenen Konzentrationen der Stammlösungen ist in Tabelle 3.3 abgebildet. Alle Lösungen wurden bei -20 °C eingefroren und gelagert.

Ambinter ID-Nr.	Substanz	c [mol/L]
SBB006315	A3	0.010
PB-80799194	B1	0.035
T0507-7808	B2	0.026
STK104944	B4	0.046
STOCK1S-61355	C4	0.060
T0506-6760	D2	0.034
A2937/0123658	E3	0.054

Tabelle 3.3: Konzentrationen der gelösten Ambinter Substanzen

3.3.2.2 ZINC-Substanzen und Substanzen der Maybridge Library

Um einheitliche Stammkonzentrationen zu erhalten, die eine bessere Handhabung vor allem im Hinblick auf die Automatisierung mittels des Pipettierroboters (siehe Kapitel 3.4.1) ermöglichten, wurden zunächst die vorhandenen Stoffmengen aller Substanzen der Maybridge Library (siehe Kapitel 2.1) berechnet. Die Substanzen 1-100 wurden dann in entsprechenden Volumina STD-Messpuffer (40 mM Tris/HCl pH=7.4; 10 mM MgCl₂) gelöst, um eine Stammkonzentration von 50 mM zu erhalten. Dabei konnten 35 Substanzen, zum Teil nach Erwärmen der Lösungen auf 60 °C und Behandlung im Ultraschallbad, gelöst werden. Weitere 48 Substanzen wurden nach entsprechender Zugabe von d⁶-DMSO mit einer Stammkonzentration von 25 mM in Lösung gebracht. Alle weiteren Substanzen (Maybridge 101-500 sowie die ZINC Substanzen (siehe Kapitel 2.1)) wurden daraufhin mit einer Stammkonzentration von 300 mM in reinem d⁶-DMSO gelöst. Aus diesen Stammlösungen wurden dann Verdünnungen (Verdünnungspuffer bestehend aus 1/3 d⁶-DMSO sowie 2/3 STD-Messpuffer) mit Konzentrationen von 20 mM hergestellt. Alle Substanzen wurden zum Schluss mit STD-Messpuffer

weiter auf 5 mM verdünnt. Diese Lösungen enthielten somit 9.4% d⁶-DMSO. Der pH-Wert der verdünnten Substanzen wurde per pH-Papier überprüft und, falls nicht im neutralen Bereich, auf 7.4 eingestellt. Die Lösungen wurden bis zum Vermessen bei -20 °C eingefroren und gelagert.

3.3.2.3 Derivate der Zn²⁺-Cyclene

Die Derivate der Zn²⁺-Cyclene (siehe Kapitel 2.1) wurden einheitlich mit einer Stammkonzentration von 100 mM in den entsprechenden Volumina von reinem d⁶-DMSO gelöst. Des Weiteren wurden Verdünnungen mittels Verdünnungspuffer (1/3 d⁶-DMSO; 2/3 STD-Messpuffer) der Konzentration 5 mM hergestellt. Die Lösungen wurden auf einen neutralen pH-Wert überprüft. Die Lagerung der gelösten Verbindungen erfolgte bei -20 °C.

3.4 Automatisierung

3.4.1 Der Pipettierroboter

Zur Automatisierung der Probenvorbereitung der Maybridge und ZINC Substanzen für die STD-NMR spektroskopische Untersuchung wurde der Pipettierroboter MWG RoboSeq 4204 SE-L (siehe Kapitel 2.9) verwendet. Der Vorteil dieser Automatisierung lag in der Standardisierung der zu vermessenden Proben. Der Roboter wurde über die Software RoboManagerNT (siehe Kapitel 2.11) gesteuert. Vor jeder Anwendung wurden die Schläuche des Pumpsystems mit Millipore Wasser gespült bis keine Luftbläschen mehr in dem System vorhanden waren. Des Weiteren wurden zur Desinfektion und Reinigung vor und nach jedem Gebrauch die Nadeln des Roboters mit 20% Ethanol gespült. Zwei Standardprogramme wurden erstellt, eines für die Probenherstellung mit Protein und eines für die Blindtests. Die zu vermessenden Proben mit Protein enthielten fünf Komponenten (5 µM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp; 250 µM Substanz; 10% (v/v) D₂O; 0.2 mM DSS und STD-Messpuffer) in einem Probenvolumen von insgesamt 360 µL. Die Blindproben wurden analog dazu ohne Protein pipettiert.

3.4.2 Der Probenwechsler am 600 MHz Spektrometer

Das STD-NMR-Screening (siehe Kapitel 4.3) der Maybridge Library wurde an einem Bruker Avance 600 MHz Spektrometer mit Hilfe eines Probenwechslers durchgeführt. Zur Steuerung dieses Probenwechslers wurde das Programm ICON-NMR von Bruker (siehe Kapitel 2.11) verwendet. Das Programm wurde so eingestellt, dass bei allen Proben zunächst automatisch geshimmt, eingelockt und nach einer ^1H -NMR-Messung mit der STD-NMR-Messung begonnen wurde. Durch die Automatisierung konnten pro Tag bis zu 25 Proben vermessen werden.

3.5 Virtuelles Screening mit LUDI

3.5.1 Vorbereitung der Struktur von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp

Für das virtuelle Screening wurde die von Rosnizeck (2010) veröffentlichte und mittels HADDOCK berechnete 3D Struktur von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp im Komplex mit Zn²⁺-Cyclen verwendet. In dieser Struktur wurde das Zn²⁺-Cyclen entfernt und die reine Proteinstruktur mit Mg²⁺ und dem Nukleotid GppNHp auf den Rechner in der Pharmazie transferiert. Nach dem Öffnen der Struktur im Programm LUDI (siehe Kapitel 2.11) musste diese noch auf das Screening vorbereitet werden. Zum einen wurden C- und N-Terminus modifiziert, da im Programm nicht die richtigen Anfangs- und Endgruppen (-COO⁻ und -NH₃⁺) erkannt wurden. Außerdem fehlten im Nukleotid alle Doppelbindungen (nur Einfachbindungen wurden dargestellt) und im Magnesium fehlte die Ladung (2+), diese wurden nachgetragen. Die modifizierte Struktur wurde als .psv File abgespeichert und konnte so für das virtuelle Screening verwendet werden.

3.5.2 LUDI Parameter und Einstellungen

Vor jedem Screening wurde im Programm LUDI zunächst die Proteinstruktur geladen und die entsprechende Library ausgewählt. Daraufhin wurden die *Runtime* Parameter festgelegt (siehe Tabelle 3.4), welche bei jedem Screening identisch waren. Bei den Einstellungen für den jeweiligen Screening Lauf wurde bis auf den Radius (*Search Sphere Radius*) und die Suchkoordinaten (*Search Sphere Center Coordinates*) ebenfalls alles gleich gehalten. Als Rezeptor wurde dabei immer die Proteinstruktur von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp (siehe Kapitel

3.5.1) verwendet. Da das Screening auf dem *Receptor based Design* beruht, wurde in der Eingabemaske für den Run das *Active Analog* auf „off“ gesetzt. Des Weiteren sollte bei den Screenings kein automatisches Verlinken erfolgen, weshalb *Linkage* auf „none“ festgelegt wurde. Es wurde ein Maximum RMS (*Maximum Root Mean Square*) von 0.3 verwendet. Zur Vereinfachung sollte das Programm keine Bindungen rotieren lassen, darum wurden *Rotatable Bonds* auf „none“ gesetzt. Nach Eingabe aller Parameter und Einstellungen konnte das Screening direkt gestartet werden.

Preselect	2.00	Lipo Weight	1	Minimum Distance	2.5
Minimum Separation	3.00	HBond Weight	1	Minimum Score	0
Density of Lipophilic Sites	25	Aliphatic_Aromatic	off	Maximum Fits	5000
Density of Polar Sites	25	Reject_Bifurcated	off	Maximum Hits	All
Minimum Surface	0	No Unpaired Polar	on	Maximum Unfilled Cavity	0
Link Weight	1	Electrostatic Check	off	Scoring Funct.: Energy_Estimate	on

Tabelle 3.4: LUDI Runtime Parameter für das virtuelle Screening an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp

3.5.3 *De-novo* Screening im aktiven Zentrum

Für das *De-novo* Screening direkt im aktiven Zentrum des Ras-Proteins (siehe Kapitel 4.1.1) an Position 1 wurden die Koordinaten für das O-P_γ des an c'Ras(T35A)•Mg²⁺ gebundenen Nukleotids GppNHp verwendet, welche bei X=-0.155, Y=7.814 und Z=9.662 lagen. Hierbei wurde ein Radius von 6 Å festgelegt.

3.5.4 *Fragment-based* Screening um das aktive Zentrum

Das *Fragment-based* Screening fand an insgesamt drei ermittelten Positionen (siehe Kapitel 4.1.1) um das aktive Zentrum des c’Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp statt. Die genauen im Screening verwendeten Suchkoordinaten (*Search Sphere Center Coordinates*: X, Y und Z) und Radien (*Search Sphere Radius*) der Positionen sind Tabelle 3.5 zu entnehmen.

Position	Zentralatom	Radius	X	Y	Z
2	Ile36-N	4.5 Å	-5.652	9.416	12.675
3	GNP-O2'	5 Å	3.884	15.054	2.646
4	GNP-N7	7 Å	4.507	10.728	0.708

Tabelle 3.5: Suchkoordinaten und Radien der drei ermittelten Positionen für das *fragment based* Screening nahe dem aktiven Zentrum von c’Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp

3.5.5 Verarbeitung und Auswertung der LUDI Daten

Nach erfolgreichem Screening einer Bibliothek wurden die Fragmente, die laut LUDI an die ausgewählte Position eines Proteins binden, zunächst geladen und in einer Textdatei (.txt) gespeichert. Durch Öffnen dieser Dateien in Excel wurden dann die Moleküle mittels ihrer ID-Nummern ihren Strukturen zugeordnet.

Um Hitlisten zu erstellen, wurden die besten Fragmente einzeln aus ihren *Run-Files* in InstantJChem (siehe Kapitel 2.11) geladen und nach ihren von LUDI erstellten *Scores* sortiert. Diese *Scores* ermöglichten eine Berechnung des K_i-Wertes der einzelnen Moleküle ($-Score = 100 \log K_i$). Die erhaltenen Hitlisten für jedes Screening wurden zum Schluss nach den insgesamt höchsten LUDI-Scores abgesucht und die besten Hits in neuen Listen vereint.

Zum Speichern einer Proteinstruktur inklusive gebundener Substanz wurde der Hit aus dem *Assembly* (Assy_LUDI) entfernt und dafür dem Protein als neue Gruppe hinzugefügt. Dieses neue *Assembly* konnte dann unter *Molecule* → *Put* als .pdb File abgespeichert werden.

3.6 NMR Messmethoden

3.6.1 Sättigungs-Transfer-Differenz-NMR-Spektroskopie

3.6.1.1 Probenvorbereitung und Messung

Die Proben für die STD-NMR-Spektroskopie an den Substanzen (Firma Ambinter) aus dem virtuellen Screening enthielten jeweils 20 μM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp in STD-Messpuffer (40 mM Tris/HCl pH=7.4; 10 mM MgCl₂), 2 mM Substanz, 10% D₂O sowie 0.2 mM DSS als Standard. Die Proben für das Screening der Maybridge Library, der ZINC Substanzen und der Zn²⁺-Cyclen Derivate enthielten 5 μM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp in STD-Messpuffer (40 mM Tris/HCl pH=7.4; 10 mM MgCl₂), 250 μM Substanz, 10% D₂O sowie 0.2 mM DSS als Standard. Für die Blindtests wurden entsprechende Lösungen ohne das Protein c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp verwendet. Zur Bestimmung der Bindungskonstanten erfolgte eine Titration der entsprechenden Liganden zu der Proteinlösung. Für die STD-NMR-Spektroskopie an c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp enthielten die Proben 5 μM c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp in STD-Messpuffer (40 mM Tris/HCl pH=7.4; 10 mM MgCl₂), 500 μM Zn²⁺-Cyclen bzw. Zn²⁺-BPA, 10% D₂O sowie 0.2 mM DSS als Standard.

Die Einstrahlfrequenz zur Proteinsättigung (*on*-Resonanz) lag bei einer chemischen Verschiebung von -2 ppm, die Einstrahlfrequenz der selektiven Vorsättigung für das Referenzspektrum (*off*-Resonanz) bei +40 ppm. *On*- und *off*-Resonanz Spektren wurden immer abwechselnd aufgenommen. Es wurde das Pulsprogram `stdiffgpw5.pr` verwendet. Die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung wurde über *sp1* auf 40 dB eingestellt. Die Dauer der Vorsättigung wird über die Anzahl der selektiven Pulse bestimmt (Einstellung über den Loop *l7*). Die Vorsättigung erfolgt über den zweiten Kanal, der auf Protonen gestellt werden muss. Hier wurde ein sinusförmiger Puls mit einer Länge von 50 ms verwendet, daher entspricht eine Loopzahl von 40 einer Sättigungsdauer von 2 s. Zur Wasserunterdrückung wurde eine *WATERGATE-W5*-Sequenz nach Liu (1998) verwendet. Die STD-NMR-Spektroskopie wurden an einem Bruker Avance 600 MHz Spektrometer mit 5 mm TXI-Cryoprobekopf bei 278 K (Ambinter Substanzen) bzw. 294 K (Maybridge Screening) durchgeführt. Die ¹H-Resonanzfrequenz betrug dabei 600.03 MHz. Die Spektren wurden als komplexe Datenmatrix von 2 x 32768 Punkten mit 16 Scans pro *Increment* aufgenommen. Zur Auswertung wurden die Datensätze in *on*- und *off*-Resonanz-Spektren getrennt und identisch mit dem Programm Topspin2.0 prozessiert und

gephast. Das STD-Spektrum wurde durch Differenzbildung aus *on*- und *off*-Resonanz-Spektren erhalten.

3.6.1.2 Bestimmung von Bindungskonstanten

Um die Bindungskonstanten mittels STD-NMR-Spektroskopie zu bestimmen, wurde der von Mayer (1999) eingeführte Amplifikationsfaktor A_{STD} verwendet. Dieser ist definiert als das Produkt aus relativem STD-Effekt und Ligandenüberschuss (siehe Formel 3.1). Hierbei ist I_0 die relative Intensität des Signals im Referenzspektrum (*off*-Resonanz) und I die relative Signalintensität im Sättigungsspektrum (*on*-Resonanz). Die Intensitäten wurden den Spektren mittels Topspin2.0 entnommen.

$$A_{STD} = \frac{I_0 - I}{I_0} \times \text{Ligandenüberschuss}$$

Formel 3.1

Dieser Amplifikationsfaktor wurde dann im Programm Origin (siehe 2.11) gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen und der K_D -Wert durch Formel 3.2 bestimmt. Hierbei ist α_{STD} der maximale A_{STD} und $[L]$ die Ligandenkonzentration.

$$A_{STD} = \frac{\alpha_{STD} \times [L]}{[L] + K_D}$$

Formel 3.2

3.6.1.3 Bestimmung von Epitopen der Liganden

Die Identifizierung der an der Bindung beteiligten Epitope in Liganden erfolgte nach der Methode von Mayer (2001). Da die Protonen mit dem engsten Kontakt zum Protein auch den größten Effekt im STD-Spektrum zeigen, kann somit das Epitop im Liganden bestimmt werden. Dabei wurde für die jeweiligen Ligandenprotonen der höchste relative STD-Effekt als 100% festgelegt und alle anderen relativen STD-Effekte der weiteren Protonen darauf bezogen.

3.6.2 (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-Spektroskopie

3.6.2.1 Probenvorbereitung und Messung

Für die (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-NMR-Spektroskopie an den Maybridge und ZINC Substanzen enthielten die Proben jeweils 0.1 mM ^{15}N c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4 und 10 mM MgCl_2 sowie 10% D_2O und 0.2 mM DSS als Standard. Diese Lösung wurde als Stammlösung hergestellt, der pH-Wert auf 7.4 eingestellt, aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Messung eingefroren. Für die (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-Messungen wurden die Lösungen dann aufgetaut und schrittweise die entsprechenden Substanzen titriert. Zur Vermessung der Doppelmutante c'Ras(T35A, H166A)• Mg^{2+} •GppNHp enthielten die Proben 0.1 mM ^{15}N c'Ras(T35A, H166A)• Mg^{2+} •GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4 und 10 mM MgCl_2 sowie 10% D_2O und 0.2 mM DSS als Standard. Die (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-NMR-Spektren wurden analog zu Schanda (2005) an einem Bruker Avance 600 MHz Spektrometer mit 5 mm TXI-Cryoprobekopf bei 294 K durchgeführt. Hierbei wurde das Pulsprogram *sofast.pr* verwendet. Die ^1H -Resonanzfrequenz betrug dabei 600.03 MHz, die ^{15}N -Resonanzfrequenz 60.80 MHz. Alle Spektren wurden als komplexe Datenmatrix von 256 x 2048 Punkten mit 8 Scans pro *Increment* aufgenommen. Die Spektrenweiten betrugen 8389 Hz in der ^1H -Dimension und 2250 Hz in der ^{15}N -Dimension. Die Relaxationszeit betrug 1.5 s. Die chemischen Verschiebungen von ^1H wurden direkt, die von ^{15}N indirekt nach der Methode von Wishart (1995) auf DSS referenziert. Alle Spektren wurden unter Verwendung von Topspin2.0 prozessiert.

3.6.2.2 Bestimmung der Bindungsstellen im Protein

Zur Bestimmung der Bindungsstellen im Protein wurden zunächst alle Peaks in den Spektren mit der höchsten Ligandenkonzentration den Peaks im ursprünglichen Spektrum des reinen Proteins per Hand im Programm Auremol (siehe Kapitel 2.11) zugeordnet. Diese Zuordnung wurde als ASCII-Peaklist exportiert und in Excel geöffnet. Daraufhin wurden die kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta_{\text{combined}}$ berechnet (siehe Formel 3.3) und gegen die Positionen der Aminosäuren aufgetragen. Hierbei ist w als Wichtungsfaktor definiert ($w = \text{Standardabweichung } ^{15}\text{N} / \text{Standardabweichung } ^1\text{H}$), $\Delta\delta_{\text{H}}$ und $\Delta\delta_{\text{N}}$ als die Änderungen der chemischen Verschiebungen von ^1H bzw. ^{15}N .

$$\Delta\delta_{combined} = \sqrt{(w \times \Delta\delta_H)^2 + \Delta\delta_N^2}$$

Formel 3.3

Nach Schumann (2007) wurden nur die Aminosäuren als relevant betrachtet, deren $\Delta\delta_{combined}$ größer waren als die korrigierte Standardabweichung zu Null (σ_0^{corr}).

3.6.2.3 Bestimmung von Bindungskonstanten

Die Bindungskonstanten (K_D) wurden durch Auftragung der ^{15}N bzw. ^1H chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta$) einer bestimmten Aminosäure gegen die Ligandenkonzentration ($[L]$) mittels einer *one-site binding* Isotherme (siehe Formel 3.4) bestimmt. Hierbei wurde das Programm Origin (siehe 2.12) verwendet.

$$\Delta\delta = \frac{\Delta\delta_{max} \times [L]}{[L] + K_D}$$

Formel 3.4

3.6.3 ^{31}P -NMR-Spektroskopie

Für die ^{31}P -NMR-Spektren wurde eine Probe vorbereitet, die 1.5 mM Ras(wt) in 40 mM Tris/HCl pH=7.4 mit 10 mM MgCl_2 , 10% D_2O sowie 0.2 mM DSS als Standard enthielt. Das Volumen betrug 0.5 mL, der pH Wert wurde auf 7.4 eingestellt. Dieser Lösung wurde dann die Substanz N schrittweise bis zu einem 64fachen Überschuss zutitriert.

Alle Spektren wurden an einem Bruker DMX-500 NMR-Spektrometer in einem 10 mm Probenkopf im 8 mm Shigemi-Probenröhrchen bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen. Um die reale Temperatur der NMR-Probe zu bestimmen, wurde extern mit Hilfe einer Ethylenglykol-Probe nach der Methode von Raiford (1979) kalibriert. Die ^{31}P -Resonanzfrequenz betrug 202 MHz. Die chemischen Verschiebungen von ^1H wurden direkt, die von ^{31}P indirekt nach der Methode von Maurer (1996) auf DSS referenziert. Dafür wurde vor jeder ^{31}P -NMR-Messung ein ^1H -Spektrum aufgenommen und ein Ξ - Wert von 0.4048073561 eingesetzt,

entsprechend externer 85%iger Phosphorsäure in Glaskügelchen. Die Protonen wurden durch eine GARP-Sequenz nach Shaka (1985) mit einer B_1 -Feldstärke von 830 Hz entkoppelt.

4 Ergebnisse

4.1 Virtuelles Screening an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mittels LUDI

Das protoonkogene Ras-Protein spielt, wie von Wittinghofer (2000) beschrieben, eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung. Somit ist es als Target in der Arzneimittelforschung von großem Interesse. Wie aus Kapitel 1.1.1 bekannt, ist der zweite Schritt im Prozess der Arzneimittelentwicklung das Screening kleiner organischer Moleküle, um geeignete Leitstrukturen als Inhibitoren zu finden. Da das reale Screening von Millionen Substanzen nicht nur sehr teuer sondern auch zeitaufwändig ist, stellt das virtuelle Screening (siehe Kapitel 1.4.1) eine vielversprechende Alternative dar. Benötigt wird dazu eine 3D Struktur des Zielproteins sowie eine 3D Strukturbibliothek und eine geeignete Software zum Screenen.

Ein Ansatzpunkt für die Inhibierung des Ras-Proteins liegt in der Stabilisierung des aktiven Zustandes 1 (siehe Kapitel 1.3.6). Es lag somit nahe, für das Screening eine Struktur zu benutzen, die in diesem Zustand vorliegt. Deshalb wurde die von Rosnizeck (2010) veröffentlichte und mittels HADDOCK von T. Graf (Dissertation, Universität Regensburg) nach Dominguez (2003) berechnete Struktur von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp verwendet. Ein weiterer Vorteil lag in der bereits vorhandenen (¹H-¹⁵N)-HSQC Zuordnung dieser Struktur, da später Bindungsstudien einfacher durchgeführt werden konnten (siehe Kapitel 4.3.2). Als 3D Strukturbibliotheken wurden die Ambinter-, Chemstar- InterBioScreen- und ZINC Datenbanken genutzt, da diese kostenfrei zur Verfügung stehen (siehe Kapitel 2.10). Sie wurden für das virtuelle Screening wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben vorbereitet und dann mit der Software LUDI (siehe Kapitel 1.4.2) gescreent.

4.1.1 Bestimmung der Screening Positionen im und nahe dem aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp

Vor dem eigentlichen Screening wurden die Positionen im und nahe des aktiven Zentrums von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp über die durch LUDI generierten Wechselwirkungsstellen im Protein ermittelt. Die Wechselwirkungen zwischen

Protein und einem Liganden werden vor allem durch nichtkovalente Bindungen wie Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophobe Wechselwirkungen oder Salzbrücken ausgebildet (siehe Kapitel 1.4.2). Die von LUDI berechneten Wechselwirkungsstellen im und um das aktive Zentrum der Struktur von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp sind in Abbildung 4.1 zu sehen.

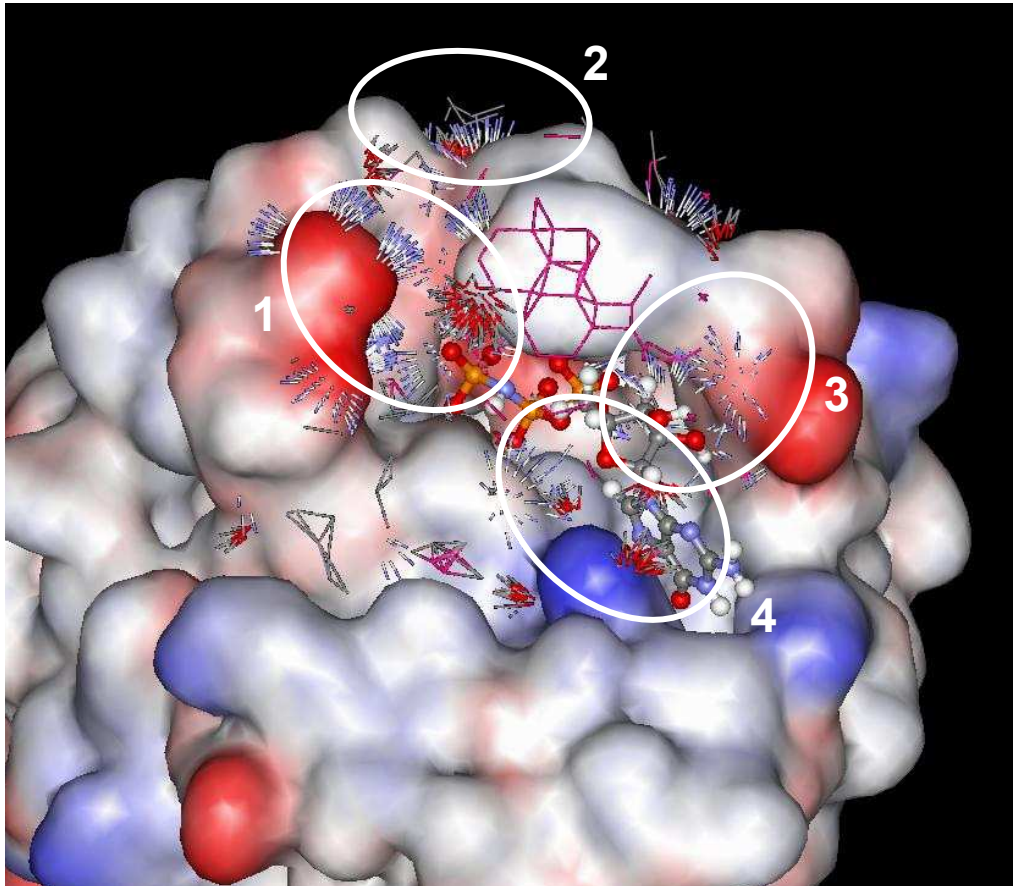


Abbildung 4.1: Durch LUDI generierte Wechselwirkungsstellen im und nahe dem aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Oberflächendarstellung der berechneten Struktur von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Das Nukleotid GppNHp ist als „Ball and Stick“ Modell abgebildet. Die Oberflächenfarben werden durch das elektrostatische Potential angezeigt (rot=negative, blau=positive Oberflächenladung). Vektoren in rot/grau stellen die Wasserstoffbrückenakzeptoren, die in weiß/blau die Wasserstoffbrückendonoren dar. In grau bzw. pink abgebildet sind die hydrophoben Wechselwirkungsstellen. Die weißen Kreise mit Nummerierung zeigen die insgesamt vier Positionen, welche für das Screening ausgewählt wurden.

Entsprechend der generierten Wechselwirkungsstellen wurde eine Screening-Position direkt im aktiven Zentrum des Proteins bestimmt (Abbildung 4.1: Position 1), an welcher auch die Zn²⁺-Cyclene binden. Von diesen ist bereits bekannt, dass sie durch ihre Bindung an dieser Position in der Lage sind, Effektoren des Ras-

Proteins zu verdrängen (Rosnizeck (2010)). Als zentrales Atom wurde das O-P γ des Nukleotids ausgemacht, das mit einem Radius von 6 Å gescreent wurde.

Die zweite Position (Abbildung 4.1: Position 2) liegt in direkter räumlicher Nähe zur Position 1, was eine Verlinkung zweier Liganden dieser Positionen vereinfachen würde. Hierbei ist das Zentralatom der Stickstoff des Isoleucin 36 (Ile36-N), welcher mit einem Radius von 4.5 Å gescreent wurde. Des Weiteren wurden zwei Positionen ausgewählt, die am anderen Ende des Nukleotids viele Wechselwirkungsstellen zeigten (Abbildung 4.1: Position 3 und 4). Position 3 beinhaltet als zentrales Atom das GNP-O2' und wurde mit einem Radius von 5 Å gescreent. Das Zentralatom von Position 4 war GNP-N7 mit einem Screening-Radius von 7 Å. Die genauen Koordinaten aller Screening-Positionen sind Kapitel 3.5.3 und Kapitel 3.5.4 zu entnehmen.

4.1.2 *De-novo* Screening im aktiven Zentrum

4.1.2.1 Ambinter-, ChemStar-, und InterBioScreen Datenbank

Um neue Liganden zu finden, die analog zum Zn²⁺-Cyclen direkt im aktiven Zentrum des c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp binden, wurden 9.6 Millionen organischer Strukturen an Position 1 (siehe Kapitel 4.1.1) einem virtuellen *de-novo* Screening mit dem Programm LUDI unterzogen. Die verwendeten Datenbanken waren hierbei die Ambinter-, ChemStar- und InterBioScreen Bibliotheken nachdem diese, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, vorbereitet wurden.

Diese Datenbanken wurden an Position 1 (Zentralatom: O-P γ des GppNHp) im c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit einem Radius von 6 Å und den in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Parametern mit LUDI gescreent. Dabei wurden 1 960 Moleküle gefunden, die unter diesen Bedingungen an das aktive Zentrum des Proteins binden. Die besten 55 Treffer aus diesem Screening (P1-1 bis P1-55; LUDI-Score ≥ 350) sind als 2D Struktur mit Nummern in Abbildung 4.2 und Abbildung 4.3 dargestellt. Wichtige zugehörige Parameter dieser Substanzen wie der LUDI-Score, entsprechende Bindungskonstanten (K_i), molekulare Massen (M) und ID-Nummern sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Die berechneten Bindungskonstanten dieser 55 Substanzen an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bewegen sich in einem Bereich zwischen 15 $\mu\text{mol/L}$ und 316 $\mu\text{mol/L}$ was den LUDI-Scores von 483 bis 350 entspricht. Die molekularen Massen dieser besten Binder reichen von 108.2 g/mol bis 293.4 g/mol.

Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur
P1-1		P1-9		P1-17		P1-25	
P1-2		P1-10		P1-18		P1-26	
P1-3		P1-11		P1-19		P1-27	
P1-4		P1-12		P1-20		P1-28	
P1-5		P1-13		P1-21		P1-29	
P1-6		P1-14		P1-22		P1-30	
P1-7		P1-15		P1-23		P1-31	
P1-8		P1-16		P1-24		P1-32	

Abbildung 4.2: Virtuelles Screening der Ambinter-, ChemStar- und InterBioScreen Bibliotheken an Position 1 (P1). 2D Strukturen der LUDI *de-novo* Screening Hits 1-32 im aktiven Zentrum (Zentralatom: O-P γ , Radius: 6 Å) von cRas(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau und Schwefel in grün dargestellt.

Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur
P1-33		P1-41		P1-49	
P1-34		P1-42		P1-50	
P1-35		P1-43		P1-51	
P1-36		P1-44		P1-52	
P1-37		P1-45		P1-53	
P1-38		P1-46		P1-54	
P1-39		P1-47		P1-55	
P1-40		P1-48			

Abbildung 4.3: Virtuelles Screening der Ambinter-, ChemStar- und InterBioScreen Bibliotheken an Position 1 (P1). 2D Strukturen der LUDI *de-novo* Screening Hits 33-55 im aktiven Zentrum (Zentralatom: O-P_γ, Radius: 6 Å) von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau, Schwefel in grün und Chlor in hellgrün dargestellt.

Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer	Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer
P1-1	483	15 µM	217.27	STOCK3S-64645	P1-28	369	204 µM	155.24	CAM018488
P1-2	453	30 µM	166.24	STOCK1S-61355	P1-29	369	204 µM	202.26	A4352/0185657
P1-3	432	48 µM	253.30	STOCK4S-22633	P1-30	366	219 µM	173.28	CHS 0669337
P1-4	429	51 µM	184.32	BBV-023994	P1-31	364	229 µM	143.23	CAM018464
P1-5	419	65 µM	259.39	BBV-025226	P1-32	363	234 µM	198.26	CAM005135
P1-6	414	72 µM	185.31	A2937/0123658	P1-33	363	234 µM	184.24	CAM005099
P1-7	414	72 µM	185.31	A2937/0123658	P1-34	363	234 µM	157.25	CAM018466
P1-8	405	89 µM	273.37	CHS 0464351	P1-35	363	234 µM	232.36	BBV-026472
P1-9	405	89 µM	256.39	ZERO/009520	P1-36	362	240 µM	165.23	STOCK1N-42675
P1-10	401	98 µM	205.30	AA1202	P1-37	360	251 µM	143.23	CAM018464
P1-11	401	98 µM	246.39	BBV-034393	P1-38	360	251 µM	205.30	AA1202
P1-12	394	115 µM	240.34	BBV-019792	P1-39	360	251 µM	156.27	BBV-024421
P1-13	386	138 µM	206.28	STOCK1S-00242	P1-40	359	257 µM	134.18	STOCK4S-84781
P1-14	386	138 µM	265.42	CHS 3215608	P1-41	359	257 µM	157.25	AA1218
P1-15	386	138 µM	284.40	BBV-034406	P1-42	359	257 µM	205.30	AA1202
P1-16	386	138 µM	185.31	A2937/0123658	P1-43	359	257 µM	239.40	BBV-033509
P1-17	384	145 µM	157.25	CAM018466	P1-44	358	263 µM	258.40	BBV-025096
P1-18	382	151 µM	190.28	BBV-021985	P1-45	357	269 µM	207.30	STOCK3S-62157
P1-19	381	155 µM	281.39	STOCK3S-02819	P1-46	357	269 µM	157.25	CAM018466
P1-20	380	158 µM	206.28	STOCK1S-00242	P1-47	357	269 µM	209.72	BP1082
P1-21	379	162 µM	108.16		P1-48	357	269 µM	196.33	BBV-024544
P1-22	378	166 µM	204.27	STOCK5S-55719	P1-49	356	275 µM	142.24	BBV-026315
P1-23	375	178 µM	267.37	STOCK3S-04990	P1-50	355	282 µM	156.27	BBV-036285
P1-24	372	191 µM	143.23	AA1220	P1-51	354	288 µM	224.73	AmbAcC5P-0011
P1-25	371	195 µM	218.28	F3111-2826	P1-52	353	295 µM	268.35	BBV-026230
P1-26	371	195 µM	159.25	STOCK3S-74576	P1-53	353	295 µM	156.27	BBV-032596
P1-27	370	200 µM	185.31	A2937/0123658	P1-54	351	309 µM	274.38	BBV-036559
					P1-55	350	316 µM	293.40	STOCK1S-08168

Tabelle 4.1: Virtuelles Screening der Ambinter-, ChemStar- und InterBioScreen Bibliotheken an Position 1 (P1). LUDI-Scores, Bindungskonstanten, molekulare Massen und ID-Nummern der 55 besten Hits des Screenings im aktiven Zentrum (Zentralatom: O-P γ , Radius: 6 Å) von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp.

Alle 55 Strukturen beinhalten mindestens ein Stickstoffatom, in 50 Fällen in der funktionellen Gruppe eines primären oder sekundären Amines. Besonders häufig (in 29 von 55 Strukturen) ist dabei die Sequenz -N-C-C-N- bzw. -N-C-C-OH zu beobachten, wobei in 17 Fällen diese -C-C- Gruppe Teil einer Ringstruktur ist.

Aromatische Reste sind in 30 Strukturen der 55 Treffer vorhanden, hierbei machen Phenylgruppen den größten Teil aus, da sie in 26 Molekülen zu finden sind.

Acht der Moleküle (Strukturen 1, 3, 14, 22, 25, 26, 30 und 45) weisen die funktionelle Gruppe der Guanidine bzw. deren Schwefel-Derivate auf.

Strukturen 6 und 7 sind Diastereomere einer Substanz (ID-Nr. A2937/0123658) welche zwei Chiralitätszentren besitzt, wobei diese Strukturen identische Bindungskonstanten von 72 μM zeigen. Substanz 16 ist das Enantiomer zu Struktur 7 und bindet laut LUDI 138 μM . Ein Ringkonformer dieser Substanz, Struktur 27, zeigt einen K_i -Wert von 200 μM .

Drei unterschiedliche Ringkonformere der Substanz CAM018466 (Strukturen 17, 34 und 46) zeigen verschiedene LUDI-Scores, wobei Molekül 17 davon den höchsten besitzt ($K_i=145 \mu\text{M}$), Struktur 34 bzw. 46 dagegen nur 234 μM bzw. 269 μM im aktiven Zentrum an Position 1 (siehe Kapitel 4.1.1) von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp binden.

4.1.2.2 ZINC Datenbank

Ein weiteres virtuelles Screening im aktiven Zentrum von Ras in Zustand 1 mit Substanzen von durchschnittlich kleineren molekularen Massen (<250 g/mol) wurde mit der ZINC Datenbank durchgeführt. Diese Bibliothek enthielt nach der Vorbereitung (siehe Kapitel 3.3.1) 135 119 Strukturen. Diese kleineren Substanzen haben den Vorteil, dass sie einfacher z.B. mit Molekülen aus dem ersten Screening verlinkt oder modifiziert werden können. Somit besteht die Möglichkeit, sie auch nach dem *fragment-based Drug Design* entsprechend Hajduk (2007) zu verwenden.

Nach dem Screening der ZINC-Substanzen an Position 1 (Zentralatom: O-P γ des GppNHp) im c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit einem Radius von 6 Å und den in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Parametern wurden 475 Moleküle gefunden, die laut LUDI an das Protein in Zustand 1 im aktiven Zentrum binden.

Die besten 55 Treffer (P1Z-1 bis P1Z-55; LUDI-Score ≥ 350) aus diesem Screening sind als 2D Struktur mit Nummern in Abbildung 4.4 und Abbildung 4.5 dargestellt.

Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur
P1Z-1		P1Z-9		P1Z-17		P1Z-25	
P1Z-2		P1Z-10		P1Z-18		P1Z-26	
P1Z-3		P1Z-11		P1Z-19		P1Z-27	
P1Z-4		P1Z-12		P1Z-20		P1Z-28	
P1Z-5		P1Z-13		P1Z-21		P1Z-29	
P1Z-6		P1Z-14		P1Z-22		P1Z-30	
P1Z-7		P1Z-15		P1Z-23		P1Z-31	
P1Z-8		P1Z-16		P1Z-24		P1Z-32	

Abbildung 4.4: Virtuelles Screening der ZINC Bibliothek an Position 1 (P1Z). 2D Strukturen der LUDI *de-novo* Screening Hits 1-32 im aktiven Zentrum (Zentralatom: O-P_γ, Radius: 6 Å) von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau und Schwefel in grün dargestellt.

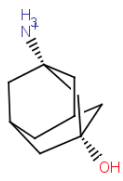
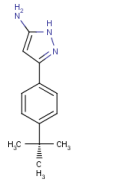
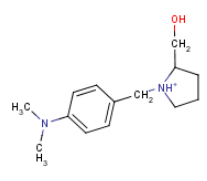
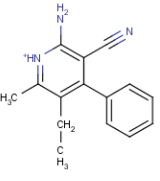
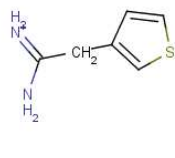
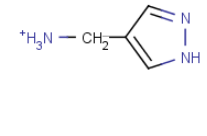
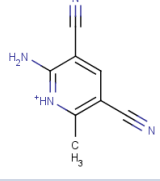
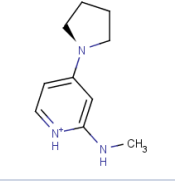
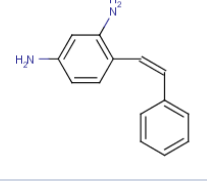
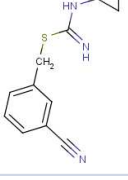
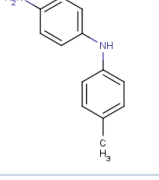
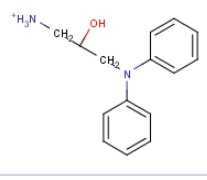
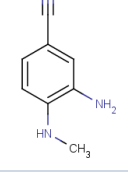
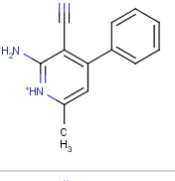
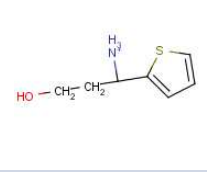
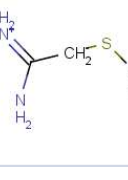
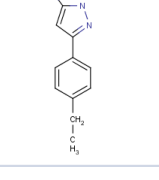

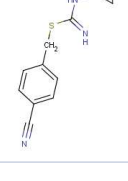
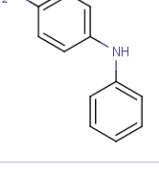
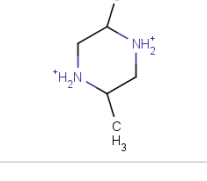
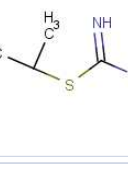
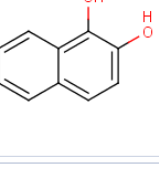
Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur
P1Z-33		P1Z-41		P1Z-49	
P1Z-34		P1Z-42		P1Z-50	
P1Z-35		P1Z-43		P1Z-51	
P1Z-36		P1Z-44		P1Z-52	
P1Z-37		P1Z-45		P1Z-53	
P1Z-38		P1Z-46		P1Z-54	
P1Z-39		P1Z-47		P1Z-55	
P1Z-40		P1Z-48			

Abbildung 4.5: Virtuelles Screening der ZINC Bibliothek an Position 1 (P1Z). 2D Strukturen der LUDI *de-novo* Screening Hits 33-55 im aktiven Zentrum (Zentralatom: O-P γ , Radius: 6 Å) von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau und Schwefel in grün dargestellt.

Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer	Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer
P1Z-1	558	2.6 µM	116.20	12359034	P1Z-28	377	169.8 µM	162.23	6732198
P1Z-2	518	6.6 µM	184.32	12357047	P1Z-29	376	173.8 µM	134.16	8730004
P1Z-3	516	6.9 µM	116.20	12357131	P1Z-30	375	177.8 µM	166.24	3874922
P1Z-4	509	8.1 µM	104.13	1652056	P1Z-31	375	177.8 µM	102.14	1420626
P1Z-5	481	15.5 µM	249.07	12359468	P1Z-32	374	182 µM	136.19	2022785
P1Z-6	461	24.5 µM	128.22	12363075	P1Z-33	374	182 µM	168.26	12343408
P1Z-7	453	29.5 µM	246.35	11728387	P1Z-34	372	190.5 µM	238.31	4838268
P1Z-8	451	30.9 µM	104.13	1652056	P1Z-35	368	208.9 µM	159.17	66378
P1Z-9	445	35.5 µM	246.33	8628545	P1Z-36	368	208.9 µM	231.32	11255797
P1Z-10	439	40.7 µM	144.26	12382565	P1Z-37	365	223.9 µM	147.18	161891
P1Z-11	435	44.7 µM	116.20	12357131	P1Z-38	365	223.9 µM	105.18	1439401
P1Z-12	430	50.1 µM	188.31	1653126	P1Z-39	365	223.9 µM	231.32	11254701
P1Z-13	427	53.7 µM	249.07	12359371	P1Z-40	365	223.9 µM	118.20	3806248
P1Z-14	423	58.9 µM	172.29	12382175	P1Z-41	363	234.4 µM	215.29	165513
P1Z-15	421	61.7 µM	124.20	12362999	P1Z-42	362	240 µM	141.21	1442839
P1Z-16	416	69.2 µM	235.05	12359487	P1Z-43	362	240 µM	178.25	1703096
P1Z-17	415	70.8 µM	178.27	6744923	P1Z-44	360	251.2 µM	198.26	8412100
P1Z-18	406	87.1 µM	178.27	6744917	P1Z-45	360	251.2 µM	210.25	28063
P1Z-19	397	107.1 µM	181.28	1442736	P1Z-46	360	251.2 µM	187.24	4234668
P1Z-20	395	112.2 µM	214.32	3846012	P1Z-47	360	251.2 µM	184.24	136186
P1Z-21	393	117.5 µM	172.19	4707980	P1Z-48	360	251.2 µM	160.17	407059
P1Z-22	390	125.9 µM	156.25	12363290	P1Z-49	359	257 µM	235.35	11727392
P1Z-23	385	141.2 µM	235.28	313208	P1Z-50	358	263 µM	98.13	12351305
P1Z-24	381	154.9 µM	99.15	12363336	P1Z-51	355	281.8 µM	210.27	4701130
P1Z-25	379	162.2 µM	224.28	291830	P1Z-52	355	281.8 µM	243.32	4733397
P1Z-26	378	166 µM	164.23	1652060	P1Z-53	352	302 µM	158.24	4037278
P1Z-27	378	166 µM	128.20	12372008	P1Z-54	350	316.2 µM	205.28	3866088
					P1Z-55	350	316.2 µM	116.20	12370138

Tabelle 4.2: Virtuelles Screening der ZINC Bibliothek an Position 1 (P1Z). LUDI-Scores, Bindungskonstanten, molekulare Massen und ID-Nummern der 55 besten Hits des Screenings im aktiven Zentrum (Zentralatom: O-P_γ, Radius: 6 Å) von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp.

Wichtige zugehörige Parameter dieser Substanzen wie der LUDI-Score, entsprechende Bindungskonstanten (K_i), molekularen Massen (M) und ID-Nummern sind Tabelle 4.2 zu entnehmen. Die LUDI-Scores dieser 55 Substanzen bewegen sich in einem Bereich zwischen 558 und 350 was Bindungskonstanten von 2.6 $\mu\text{mol/L}$ bis 316.2 $\mu\text{mol/L}$ entspricht. Die molekularen Massen dieser Binder reichen von 98.13 g/mol bis 249.07 g/mol. Bis auf eine Substanz (Struktur 48) enthalten alle anderen Moleküle mindestens ein Stickstoffatom, 34 Strukturen in der funktionellen Gruppe eines Amins, bei 13 davon ist dabei die Sequenz -N-C-C-N- bzw. -N-C-C-OH zu beobachten. 12 Strukturen weisen eine Guanidin-Gruppe bzw. deren Schwefel-Derivate auf und 17 der Strukturen besitzen ein weiteres Derivat der Guanidin-Gruppe, in denen ein Stickstoff durch einen Kohlenstoff ersetzt ist. Davon besitzen Strukturen mit den Nummern 5, 13, 16, 25, 29, 34, 35, 43 und 45 als Grundstruktur ein *ortho*-Aminopyridin. In 52 der Strukturen ist mindestens ein Ring vorhanden, 35 Strukturen davon enthalten einen bzw. mehrere aromatische Reste.

Strukturen 4 und 8 sind die gleiche Substanz. Diese bindet an zwei unterschiedlichen Positionen im aktiven Zentrum mit Bindungskonstanten von 8.1 μM und 30.9 μM .

Strukturen 3 und 11 sind auch identisch und binden ebenfalls an zwei verschiedenen Positionen im aktiven Zentrum mit Bindungskonstanten von 6.9 μM und 44.7 μM .

Die Strukturen 17 und 18 zeigen zwei Ringkonformere einer Substanz, welche sehr ähnliche Bindungskonstanten besitzen (70.8 μM und 87.1 μM).

4.1.3 *Fragment-based* Screening an definierten Stellen nahe dem aktiven Zentrum

4.1.3.1 Ambinter-, ChemStar- und InterBioScreen Datenbank

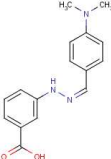
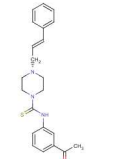
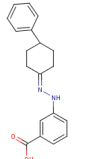
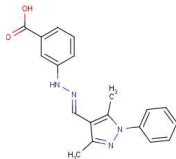
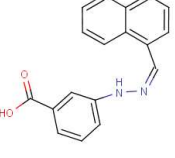
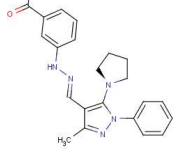
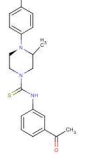
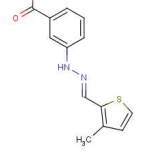
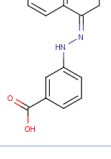
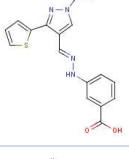
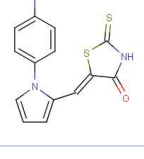
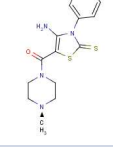
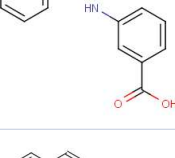
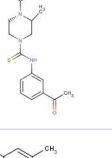
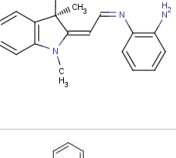
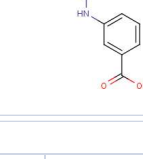
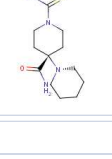
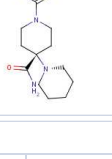
In einem weiteren Ansatz wurden die Ambinter-, ChemStar- und InterBioScreen-Datenbanken an den definierten Positionen 2, 3 und 4 (siehe Kapitel 4.1.1) um das aktive Zentrum von $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ mit LUDI gescreent. Basierend auf der *fragment-based* Methode von Hajduk (2007) war die Intension kleine Moleküle zu finden, die durch eine Verlinkung mit den Substanzen aus dem ersten Screening an Position 1 (siehe Kapitel 4.1.2) oder mit den M^{2+} -Cyclenen (siehe Kapitel 1.3.5) zu deutlich niedrigeren Bindungskonstanten und damit einer besseren Inhibierung der Wechselwirkung von Ras mit Effektoren führen können.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, Moleküle, die an den einander sehr nahestehenden Positionen 3 und 4 als Binder identifiziert werden, ebenfalls miteinander zu verlinken.

Die Bibliotheken wurden analog Kapitel 3.3.1 vorbereitet und alle 9.6 Millionen Strukturen an den drei Positionen nahe des aktiven Zentrums (siehe Kapitel 3.5.4) im c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit LUDI gescreent. Die verwendeten Screening-Einstellungen und Parameter sind Kapitel 3.5.2 zu entnehmen. Die Auswertung fand analog Kapitel 3.5.5 statt. Hierbei wurden 16 431 Strukturen von LUDI gefunden, die an Position 2 (Zentralatom: Ile36-N, Radius: 4.5 Å) binden, 10 977 Strukturen an Position 3 (Zentralatom: GNP-O2', Radius: 5 Å) und 2 611 Strukturen an Position 4 (Zentralatom: GNP-N7, Radius: 7 Å).

Die besten 18 Hits aus dem Screening an Position 2 (P2-1 bis P2-18; LUDI-Score ≥ 350) im c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit einem Screening-Radius von 4.5 Å sind als 2D Strukturen mit Nummerierung in Abbildung 4.6 zu sehen. Ebenfalls in Abbildung 4.6 sind entsprechende Parameter dieser Substanzen wie der LUDI-Score, Bindungskonstante (K_i), molekulare Massen (M) und ID-Nummer zu finden. Die Bindungskonstanten dieser 18 Moleküle an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bewegen sich in einem Bereich zwischen 13 $\mu\text{mol/L}$ und 302 $\mu\text{mol/L}$ was den LUDI-Scores von 487 bis 352 entspricht. Die molekularen Massen dieser Substanzen reichen von 240.26 g/mol bis 389.45 g/mol. Alle Strukturen dieser besten 18 Hits sind aromatisch. Die Moleküle enthalten zwei bis vier Ringe, wobei 12 der 18 Strukturen drei Ringe beinhalten. Die häufigste funktionelle Gruppe (Strukturen 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 16 und 17) ist das Hydrazone (=N-NH-) welches jeweils eine Brücke zwischen zwei Aromaten bildet. In jedem dieser Moleküle befindet sich an einem dieser beiden Aromaten in *meta*-Position eine Carbonsäuregruppe. Sechs weitere Moleküle (Strukturen 6, 10, 12, 13, 15, 18) zeigen funktionelle Gruppen der Schwefel-Derivate des Guanidins.

Die 2D Strukturen der besten 17 Hits aus dem Screening an Position 3 (P3-1 bis P3-17; LUDI-Score ≥ 330) sowie die dazugehörigen Parameter (LUDI-Score, Bindungskonstante (K_i), molekulare Massen (M) und ID-Nummer) sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Die LUDI-Scores dieser 17 Substanzen bewegen sich in einem Bereich zwischen 380 und 331, dies entspricht Bindungskonstanten von 158 $\mu\text{mol/L}$ bis 490 $\mu\text{mol/L}$. Die molekularen Massen dieser Binder reichen von 253.32 g/mol bis 391.53 g/mol. Alle dieser Moleküle enthalten aromatische Gruppen und zwei bis vier Ringe. In 16 der 17 Strukturen sind Derivate des Thioharnstoffs zu finden, welche in 15 Fällen eine Brücke zwischen zwei Ringen ausbilden. In zehn Fällen enthalten diese Ringe ein oder mehrere Methylgruppen als Substituenten.

Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur
P2-1		P2-6		P2-11		P2-16	
P2-2		P2-7		P2-12		P2-17	
P2-3		P2-8		P2-13		P2-18	
P2-4		P2-9		P2-14			
P2-5		P2-10		P2-15			

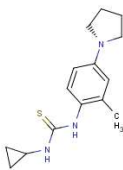
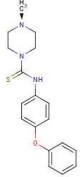
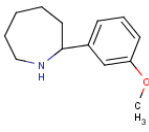
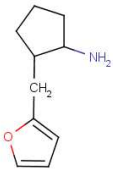
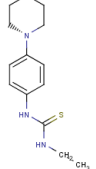
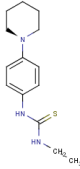
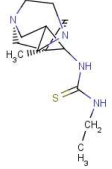
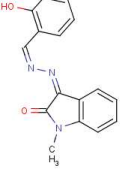
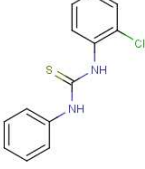
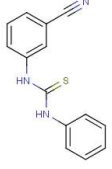
Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer	Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer
P2-1	487	13 µM	283.33	CHS 0062355	P2-10	370	200 µM	374.54	STOCK4S-02833
P2-2	457	27 µM	290.32	T0506-6760	P2-11	370	200 µM	308.37	PB-00218173
P2-3	448	33 µM	280.32	T0507-7808	P2-12	367	214 µM	367.51	M-369556
P2-4	431	49 µM	240.26	PB-00218035	P2-13	366	219 µM	329.44	STK111257
P2-5	416	69 µM	266.29	PB-05646384	P2-14	361	245 µM	291.39	T0500-7948
P2-6	401	98 µM	379.52	M-560269	P2-15	359	257 µM	346.49	STOCK3S-67604
P2-7	395	112 µM	389.45	PB-00218230	P2-16	357	269 µM	334.37	T5415067
P2-8	392	120 µM	388.44	T0506-9068	P2-17	357	269 µM	260.31	PB-00218134
P2-9	375	178 µM	367.51	M-369556	P2-18	352	302 µM	348.49	T0516-7887

Abbildung 4.6: Virtuelles Screening der Ambinter-, ChemStar- und InterBioScreen Bibliotheken an Position 2 (P2). 2D Strukturen sowie LUDI-Scores, Bindungskonstanten, molekulare Massen und ID-Nummern der LUDI *fragment-based* Screening Hits 1-18 nahe des aktiven Zentrums von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp (Zentralatom: Ile36-N, Radius: 4.5 Å). Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau und Schwefel in grün dargestellt.

Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur
P3-1		P3-6		P3-11		P3-16	
P3-2		P3-7		P3-12		P3-17	
P3-3		P3-8		P3-13			
P3-4		P3-9		P3-14			
P3-5		P3-10		P3-15			

Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer	Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer
P3-1	380	158 µM	359.49	STOCK1S-26059	P3-10	342	380 µM	391.53	T5314758
P3-2	371	195 µM	342.44	F3305-0037	P3-11	341	389 µM	311.44	DAH1198174
P3-3	360	251 µM	274.39	M-856092	P3-12	340	398 µM	345.55	T5329021
P3-4	356	275 µM	259.37	CAM018907	P3-13	337	427 µM	330.49	CHS 0547264
P3-5	349	324 µM	263.40	M-369372	P3-14	337	427 µM	353.52	T0520-4254
P3-6	347	339 µM	377.51	T5435498	P3-15	337	427 µM	253.32	PB57120946
P3-7	344	363 µM	327.45	T0501-9006	P3-16	333	468 µM	353.52	M-884152
P3-8	344	363 µM	292.78	M-860516	P3-17	331	490 µM	316.46	STOCK1S-88702
P3-9	342	380 µM	314.41	T5302198					

Abbildung 4.7: Virtuelles Screening der Ambinter-, ChemStar- und InterBioScreen Bibliotheken an Position 3 (P3). 2D Strukturen sowie LUDI-Scores, Bindungskonstanten, molekulare Massen und ID-Nummern der LUDI *fragment-based* Screening Hits 1-17 nahe des aktiven Zentrums von c’Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp (Zentralatom: GNP-O2', Radius: 5 Å). Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau, Schwefel in grün und Chlor in hellgrün dargestellt.

Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur
P4-1		P4-4		P4-7		P4-10	
P4-2		P4-5		P4-8			
P4-3		P4-6		P4-9			

Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer	Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer
P4-1	362	240 µM	275.41	T5329048	P4-6	321	617 µM	262.76	STK034959
P4-2	347	339 µM	263.40	T0513-0809	P4-7	319	646 µM	205.30	C7A-0045
P4-3	342	380 µM	279.29	T5383847	P4-8	319	646 µM	268.42	STK034748
P4-4	334	457 µM	327.44	STK089951	P4-9	316	692 µM	253.32	STK050103
P4-5	329	513 µM	263.40	T0513-0809	P4-10	315	708 µM	165.23	STOCK3S-19959

Abbildung 4.8: Virtuelles Screening der Ambinter-, ChemStar- und InterBioScreen Bibliotheken an Position 4 (P4). 2D Strukturen sowie LUDI-Scores, Bindungskonstanten, molekulare Massen und ID-Nummern der LUDI *fragment-based* Screening Hits 1-10 nahe des aktiven Zentrums von c’Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp (Zentralatom: GNP-N7, Radius: 7 Å). Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau, Schwefel in grün und Chlor in hellgrün dargestellt.

Die 2D Strukturen der besten zehn Hits aus dem Screening an Position 4 (P4-1 bis P4-10; LUDI-Score ≥ 315) sowie die dazugehörigen Parameter (LUDI-Score, Bindungskonstante (K_i), molekulare Masse (M) und ID-Nummer) sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Die Bindungskonstanten dieser Moleküle an c’Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp reichen von 240 µmol/L bis 708 µmol/L was den LUDI-Scores von 362 bis 315 entspricht. Die molekularen Massen dieser Substanzen bewegen sich in einem Bereich zwischen 205.30 g/mol und 327.44 g/mol. Jede der Substanzen bis auf Struktur 8 enthält zwei oder drei Ringe und ein aromatisches System. Sieben der zehn Strukturen (1+2, 4-6 und 8+9) weisen die funktionelle Gruppe eines Thioharnstoffs auf.

4.1.3.2 ZINC Datenbank

Die im *fragment-based* Screening an den Positionen 2, 3 und 4 nahe des aktiven Zentrums von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp (siehe Kapitel 4.1.3.1) gefundenen Substanzen sind relativ große Moleküle mit einer molekularen Masse von 205.30 g/mol bis 391.53 g/mol. Da kleinere Substanzen leichter zu verlinken sind, und eine zum Teil schwierige und langwierige organische Synthesen ersparen können, wurden in einem zweiten Ansatz die Strukturen der ZINC Datenbank gescreent. Diese 135 119 Strukturen wiesen nach der Vorbereitung (siehe Kapitel 3.3.1) eine molekulare Masse von unter 250 g/mol auf und waren daher gut für ein weiteres *fragment-based* Screening an den drei Positionen nahe dem aktiven Zentrum von Ras (siehe Kapitel 3.5.4) geeignet.

Die genauen verwendeten Einstellungen und Parameter beim Screening mit LUDI sind in Kapitel 3.5.2 beschrieben, die genauen Koordinaten der Screeningzentren befinden sich in Kapitel 3.5.4. Die Auswertung fand analog Kapitel 3.5.5 statt.

Bei diesem Screening mit LUDI wurden 1 482 Strukturen gefunden, die an Position 2 (Zentralatom: Ile36-N, Radius: 4.5 Å) binden, 1 507 Strukturen an Position 3 (Zentralatom: GNP-O2', Radius: 5 Å) und 342 Strukturen an Position 4 (Zentralatom: GNP-N7, Radius: 7 Å). Da die Bindungskonstanten bei diesem Screening insgesamt unterschiedlicher und größer ausfallen, werden jeweils die besten 12 Hits genauer betrachtet.

Die 2D Strukturen der besten Hits aus dem Screening an Position 2 (P2Z-1 bis P2Z-12; LUDI-Score \geq 300) sowie die entsprechenden Parameter (LUDI-Score, Bindungskonstante (K_i), molekulare Masse (M) und ID-Nummer) sind in Abbildung 4.9 dargestellt. Die Bindungskonstanten dieser Moleküle an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bewegen sich in einem Bereich zwischen 155 μ mol/L und 955 μ mol/L entsprechend den LUDI-Scores von 345 bis 302. Die molekularen Massen dieser Substanzen reichen von 178.25 g/mol bis 244.31 g/mol. Alle Substanzen enthalten zwei bis drei Ringe und ein aromatisches System. Strukturen 6, 8, 9, 10 sind Derivate der Struktur 11, die die funktionelle Gruppe eines sekundären Thioamids beinhaltet. Dieses verknüpft einen Phenylrest mit einem Pyridin. Substanzen mit den Strukturen 1 und 2 sind Derivate der Struktur 4 welche ebenfalls ein Pyridin als funktionelle Gruppe besitzt, das über einen sekundären Kohlenstoff mit dem Stickstoff eines Anilins verknüpft ist.

Die besten Hits aus dem Screening an Position 3 (P3Z-1 bis P3Z-12; LUDI-Score \geq 315) sind als 2D Struktur und zugehörigen Parametern in Abbildung 4.10 zu finden. Ihre LUDI-Scores umfassen einen Bereich von 389-315, entsprechende Bindungskonstanten

Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur
P2Z-1		P2Z-4		P2Z-7		P2Z-10	
P2Z-2		P2Z-5		P2Z-8		P2Z-11	
P2Z-3		P2Z-6		P2Z-9		P2Z-12	

Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer	Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer
P2Z-1	345	355 µM	212.29	263310	P2Z-7	326	549 µM	236.27	445294
P2Z-2	341	389 µM	212.29	183521	P2Z-8	316	692 µM	242.34	309775
P2Z-3	336	436 µM	215.29	550535	P2Z-9	316	692 µM	228.31	298811
P2Z-4	333	468 µM	184.24	798244	P2Z-10	304	912 µM	228.31	50968
P2Z-5	329	513 µM	244.31	469354	P2Z-11	304	912 µM	214.29	225658
P2Z-6	327	537 µM	242.34	310797	P2Z-12	302	955 µM	178.25	1703096

Abbildung 4.9: Virtuelles Screening der ZINC Bibliothek an Position 2 (P2Z). 2D Strukturen sowie LUDI-Scores, Bindungskonstanten, molekulare Massen und ID-Nummern der LUDI *fragment-based* Screening Hits 1-12 nahe des aktiven Zentrums von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp (Zentralatom: Ile36-N, Radius: 4.5 Å). Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau und Schwefel in grün dargestellt.

gehen von 129 µmol/L bis 708 µmol/L und ihre molekularen Massen reichen von 197.26 g/mol bis 249.34 g/mol. Bis auf Strukturen 1 und 7 (welche nur einen Ring besitzen) enthalten alle Strukturen zwei Ringe. Alle Hits aus dem Screening an Position 3 sind Aromaten. Die am häufigsten zu findende funktionelle Gruppe bei diesen Substanzen ist Thioharnstoff. Dieser ist Bestandteil in sieben der 12 Moleküle (Strukturen 1, 4 und 6-10). Pyrazole sind als funktionelle Gruppen in sechs Strukturen (4 und 6-10) vorhanden und die ebenfalls heterocyclischen 1,2,4-Triazole sind in Strukturen 3 und 12 zu finden. Diese besitzen zusätzlich eine Hydrazongruppe.

Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur
P3Z-1		P3Z-4		P3Z-7		P3Z-10	
P3Z-2		P3Z-5		P3Z-8		P3Z-11	
P3Z-3		P3Z-6		P3Z-9		P3Z-12	

Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer	Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer
P3Z-1	389	129 µM	237.32	386322	P3Z-7	322	603 µM	226.34	10631846
P3Z-2	389	129 µM	226.27	307582	P3Z-8	321	616 µM	249.34	7326689
P3Z-3	338	417 µM	236.25	7012962	P3Z-9	321	616 µM	246.33	10847084
P3Z-4	330	501 µM	238.35	10180792	P3Z-10	317	676 µM	246.33	10185599
P3Z-5	326	549 µM	199.25	11757344	P3Z-11	315	708 µM	242.34	4168098
P3Z-6	324	575 µM	238.35	10634269	P3Z-12	315	708 µM	197.26	5896934

Abbildung 4.10: Virtuelles Screening der ZINC Bibliothek an Position 3 (P3Z). 2D Strukturen sowie LUDI-Scores, Bindungskonstanten, molekulare Massen und ID-Nummern der LUDI *fragment-based* Screening Hits 1-12 nahe des aktiven Zentrums von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp (Zentralatom: GNP-O2', Radius: 5 Å). Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau und Schwefel in grün dargestellt.

Die 2D Strukturen der besten Hits aus dem Screening an Position 4 (P4Z-1 bis P4Z-12; LUDI-Score ≥ 255) sowie die entsprechenden Parameter (LUDI-Score, Bindungskonstante (K_i), molekulare Masse (M) und ID-Nummer) sind in Abbildung 4.11 dargestellt. Die Bindungskonstanten der Moleküle reichen von 468 µmol/L bis 2.8 mmol/L was den LUDI Scores von 333 bis 255 entspricht. Die molekularen Massen dieser Substanzen bewegen sich in einem Bereich zwischen 132.23 g/mol und 239.30 g/mol. Bis auf Struktur 3 besitzen alle Moleküle aromatische Systeme und einen bis drei Ringe.

Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur	Nr.	Struktur
P4Z-1		P4Z-4		P4Z-7		P4Z-10	
P4Z-2		P4Z-5		P4Z-8		P4Z-11	
P4Z-3		P4Z-6		P4Z-9		P4Z-12	

Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer	Nr.	Score	K _i	M [g/mol]	ID-Nummer
P4Z-1	333	468 µM	232.32	6760207	P4Z-7	268	2.1 mM	211.26	65623
P4Z-2	314	724 µM	226.32	232086	P4Z-8	268	2.1 mM	197.23	153228
P4Z-3	278	1.6 mM	132.23	7466066	P4Z-9	266	2.2 mM	226.36	6318859
P4Z-4	277	1.7 mM	239.30	12504979	P4Z-10	262	2.4 mM	226.73	450495
P4Z-5	277	1.7 mM	204.27	334968	P4Z-11	258	2.6 mM	213.26	5927969
P4Z-6	274	1.8 mM	237.26	7809978	P4Z-12	255	2.8 mM	203.67	157480

Abbildung 4.11: Virtuelles Screening der ZINC Bibliothek an Position 4 (P4Z). 2D Strukturen sowie LUDI-Scores, Bindungskonstanten, molekulare Massen und ID-Nummern der LUDI *fragment-based* Screening Hits 1-12 nahe des aktiven Zentrums von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp (Zentralatom: GNP-N7, Radius: 7 Å). Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau, Schwefel in grün und Chlor in hellgrün dargestellt.

Jede Substanz enthält mindestens ein Stickstoffatom wobei die funktionellen Gruppen sehr unterschiedlich sind und von sekundären Aminen (Strukturen 1, 2, 5 und 12) über Imine (Strukturen 7+8) bis hin zu Thioharnstoffen (Strukturen 9+10), Hydrazon (Struktur 6) und einer Azogruppe (Struktur 11) reichen.

4.2 Überprüfung von virtuellen Liganden auf reale Bindung an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mittels STD-NMR-Spektroskopie

Die Identifizierung von Liganden sowie die Charakterisierung der Ligand-Protein-Bindung spielt vor allem in der Medikamentenentwicklung eine bedeutende Rolle. Zur Inhibierung des Ras-Proteins wurden Liganden analog der bereits bekannten M²⁺-Cyclene gesucht, die den aktiven Zustand 1 binden und damit die Wechselwirkung von Ras mit Effektoren blockieren können (siehe Kapitel 1.3.5). Hierbei wurde die Sättigungs-Transfer-Differenz-NMR-Spektroskopie verwendet, eine Methode nach Mayer (1999) zur Identifizierung der Bindung von Liganden an Proteine. Der Vorteil der STD-NMR-Spektroskopie besteht in den geringen benötigten Ligand- und Proteinkonzentrationen, den kurzen Messzeiten und der Möglichkeit, Bindungs epitope (Mayer (2001)) und Bindungskonstanten der Liganden zu bestimmen. Hier wurde die STD-NMR genutzt, um einige Liganden aus dem virtuellen Screening auf reale Bindung an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp zu überprüfen.

4.2.1 Bestimmung der optimalen Parameter

Das Prinzip der STD-NMR-Spektroskopie beruht auf einer selektiven Sättigung des Rezeptorproteins („*on*-Resonanz“) bei -1 bis -2 ppm oder 8 bis 10 ppm (Mayer (1999)). Diese Sättigung wird bei vorhandener Bindung eines Liganden innerhalb einer Zeitskala von 10-20 ms vom Rezeptor auf diesen übertragen. Dabei werden vor allem die Ligandprotonen gesättigt, welche in engerem Kontakt zum Protein stehen. Da die Verweildauer der Liganden nur einige Millisekunden, die Sättigungszeit üblicherweise jedoch ein paar Sekunden beträgt, wird eine Vielzahl an Liganden gesättigt. Nach der Dissoziation eines Liganden erscheinen seine Signale im ¹H-Spektrum scharf, aber mit reduzierter Signalintensität. Parallel abwechselnd zu den *on*-Resonanz-Spektren werden sogenannte *off*-Resonanz-Spektren oder Referenzspektren aufgenommen, bei denen keine Sättigung des Proteins stattfindet, da ein selektiver Vorsättigungspuls bei z.B. 40 ppm eingestrahlt wird. Durch Differenzbildung aus Sättigungs- und Referenzspektren wird das STD-NMR-Spektrum erhalten. Wenn ein Ligand bindet, sind in diesem Differenzspektrum Signale des Liganden zu sehen. In sogenannten Blindtests ohne Protein wird überprüft, ob die Sättigung des Liganden allein durch die

Bindung an das Protein zustande kommt oder der Ligand bereits ohne Protein gesättigt wird, z.B. aufgrund von Aggregatbildung oder weil die Einstrahlfrequenz zu nah an Signalen der Substanz ist. Wie von I. Rosnizeck (Dissertation, Universität Regensburg) beschrieben, wurde zunächst die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung auf 30 dB eingestellt. Dabei stellte sich heraus (siehe Abbildung 4.12), dass auch im Blindtest der Substanz E3 (siehe Kapitel 4.2.2.1) die Substanz gesättigt wurde. Eine eindeutige Identifizierung von Liganden mit dieser Einstellung war somit nicht möglich, da diese auch ohne die Anwesenheit von Protein gesättigt und falsch positive Ergebnisse herbeigeführt würden. Deshalb mussten die Parameter neu definiert werden.

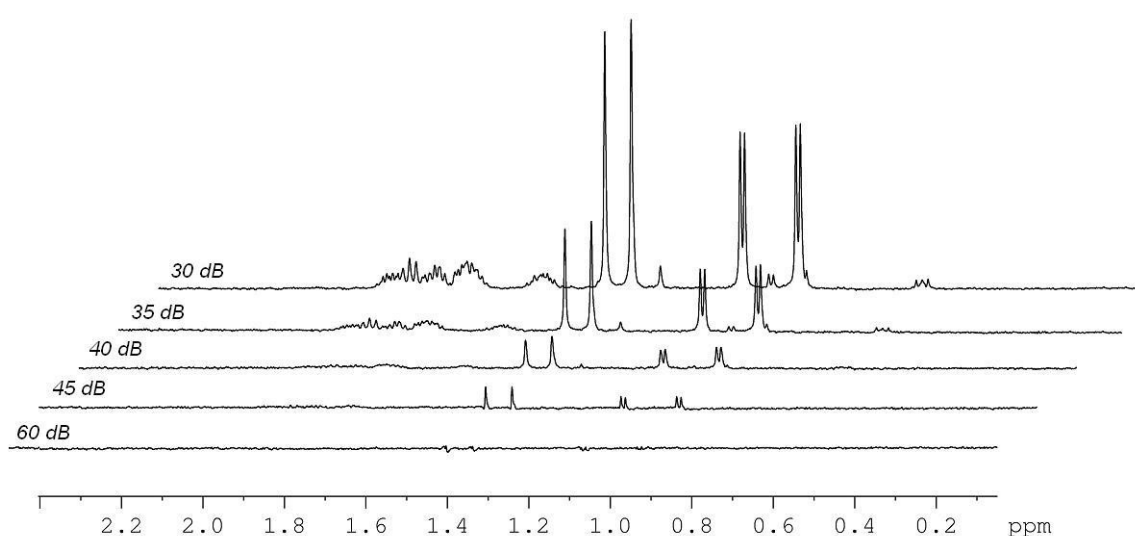


Abbildung 4.12: STD-NMR-Spektren der Substanz E3 mit unterschiedlich starken Sättigungspulsen. Ausschnitte aus den Differenzspektren aus STD-NMR-Experimenten mit einer *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlfrequenz von -2 ppm bzw. +40 ppm und Sättigungspulsen von 60, 45, 40, 35 und 30 dB. Die Probe enthielt 2 mM Substanz E3 in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS und 10% D₂O. Alle Spektren wurden bei 278 K aufgenommen.

Wie in Abbildung 4.12 zu erkennen ist, zeigen sich im Differenzspektrum der Substanz E3 bei einer Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung von 30 dB deutliche Signale, was eine Sättigung der Substanz auch ohne Protein bedeutet. Erst ab einer Abschwächung von 40 dB zeigen die Signale eine viel geringere Intensität und bei 60 dB ist kein Signal mehr zu sehen. Allerdings ist eine Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung von 60 dB nicht akzeptabel, da hierbei auch das Protein keine Sättigung mehr erfährt (siehe Abbildung 4.13).

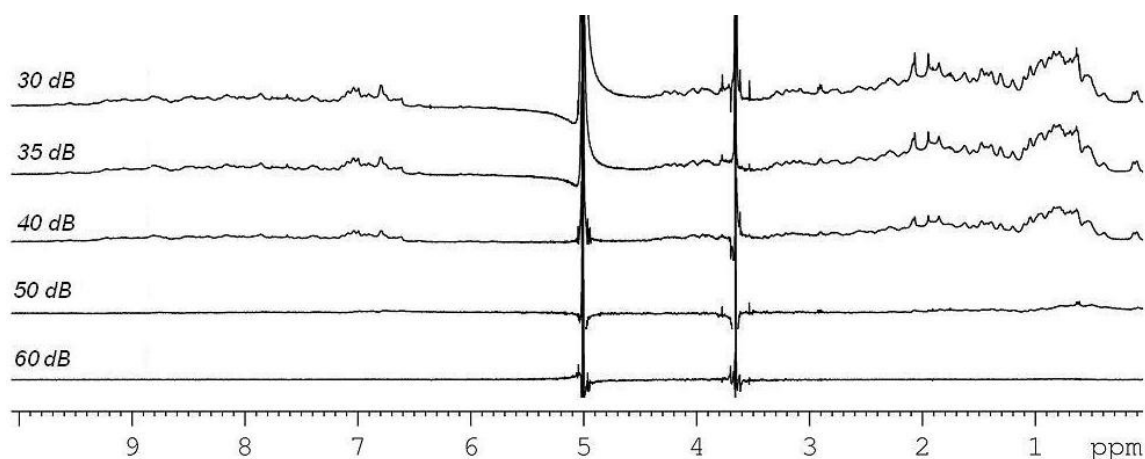


Abbildung 4.13: STD-NMR-Spektren von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit unterschiedlich starken Sättigungspulsen. Differenzspektren aus STD-NMR-Experimenten mit einer *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlungsfrequenz von -2 ppm bzw. +40 ppm und Sättigungspulsen von 60, 50, 40, 35 und 30 dB. Die Probe enthielt 1.14 mM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS und 10% D₂O. Alle Spektren wurden bei 278 K aufgenommen.

Eine akzeptable Sättigung des Proteins erfolgt ab einer Abschwächung von 40 dB, wie in Abbildung 4.13. zu erkennen ist. Da bei 40 dB auch die Intensitäten der Signale im STD-Blind-Spektrum von Testsubstanz E3 sehr gering waren, wurde in allen folgenden STD-NMR-Experimenten die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung auf 40 dB festgelegt. Zum Ausschluss von falsch positiven Ergebnissen wurde in allen folgenden Messungen bei einem positiven Ergebnis im STD-Experiment immer ein Blindtest der entsprechenden Substanz durchgeführt. Des Weiteren wurden vor allem im STD-Screening der Maybridge Library (siehe Kapitel 4.4.1) geringere Konzentrationen der Substanzen verwendet (250 µM) sowie statt eines 100fachen Überschusses nur ein 50facher Überschuss zugegeben.

4.2.2 STD-NMR von Substanzen der Ambinter Datenbank

4.2.2.1 Überprüfung der realen Bindung

Um zu testen, ob einige der virtuell gefundenen Liganden auch real an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp binden, wurden sieben bei Ambinter bestellte Substanzen wie in Kapitel 3.3.2.1 beschrieben vorbereitet und mittels STD-NMR-Spektroskopie (siehe Kapitel 3.6.1) vermessen.

Substanzen B1, B4, C4 und E3 stammen dabei aus dem virtuellen Screening direkt im aktiven Zentrum von Ras an Position 1 (siehe Kapitel 4.1.2.1) und

entsprechen den Strukturen P1-22, P1-1, P1-2 und P1-6/7/16 (siehe Abbildung 4.2). Moleküle B2 und D2 sind Liganden welche im virtuellen Screening mit LUDI an Position 2 (siehe Kapitel 4.1.2.1) nahe des aktiven Zentrums von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp gefunden wurden und entsprechen den Strukturen P2-3 und P2-2 (siehe Abbildung 4.6). Substanz A3 stammt aus dem virtuellen Screening an Position 4 (siehe Kapitel 4.1.2.1) und entspricht Struktur P4-6 (siehe Abbildung 4.8).

Beispiele für die STD-NMR-Spektren von auch real bindenden Substanzen, wie B4 und B1 und Substanzen welche im STD-Experiment nicht als Liganden erkannt wurden, sind in Abbildung 4.14 zu finden. Substanzen E3, C4, D2 und A3 zeigten in den STD-NMR-Spektren keine Signale und binden somit nicht in dem STD-NMR relevanten Bereich von 1 nM bis etwa 10 mM (Mayer (2003)). Positive STD-NMR-Ergebnisse lieferten dagegen Substanzen B1, B2 und B4, welche deutliche Signale in den STD-Spektren zeigten (welche in den Blindtests ohne Protein nicht zu sehen waren, vgl. Abbildung 4.15) und damit an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp binden.

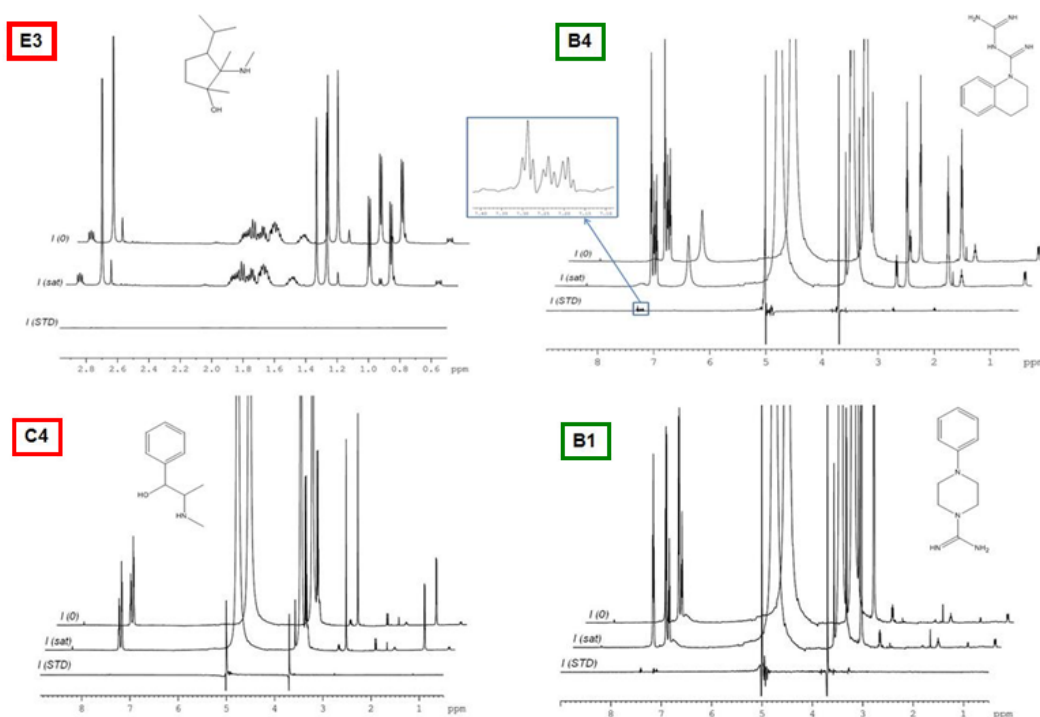


Abbildung 4.14: STD-NMR-Experimente an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit den Substanzen E3, B4, C4 und B1. Die Proben enthielten je 0.02 mM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS, 10% D₂O und 2 mM Substanz. Die on- bzw. off-Resonanz Einstrahlfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen.

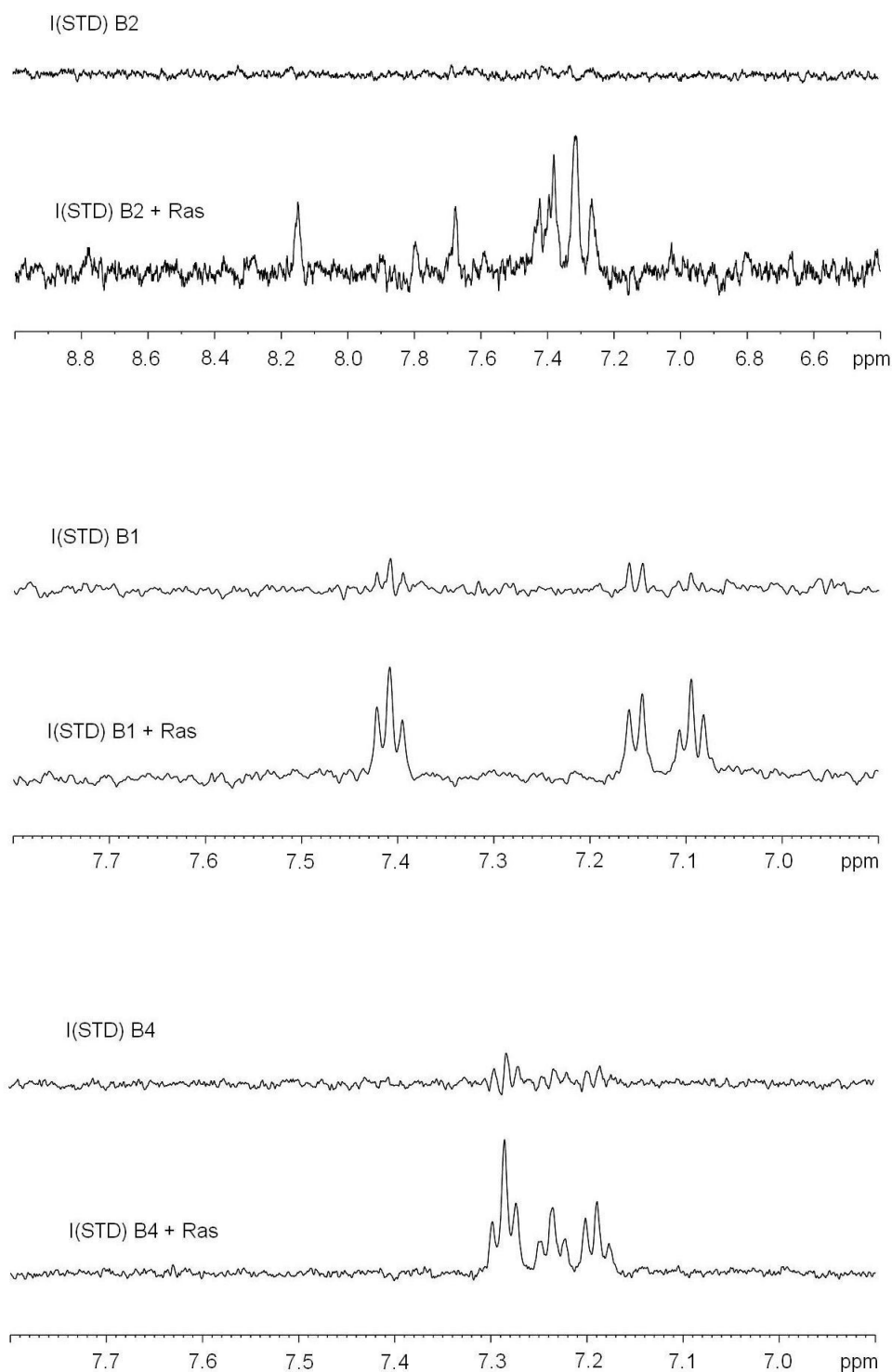


Abbildung 4.15: Ausschnitte aus den Differenz-STD-NMR-Spektren der Liganden B4, B1 und B2 mit c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bzw. ohne Ras als Blindtest. Die Proben enthielten je 2 mM Substanz B4, B1 oder B2 in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS, 10% D₂O mit bzw. ohne 0.02 mM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen.

4.2.2.2 Bestimmung der Bindungskonstanten der Liganden B1 und B4

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten der Liganden B1 und B4 wurden STD-NMR-Titrationsen durchgeführt, bei denen schrittweise die entsprechende Substanz zu c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp titriert wurde. Der Amplifikationsfaktor wurde jedes Mal entsprechend Formel 3.1 berechnet und die so erhaltenen A_{STD} gegen die Konzentrationen der Substanzen aufgetragen. Gefittet wurden die Daten mit Formel 3.2, dabei wurden Bindungskonstanten von 1.20 ± 0.18 mM für Substanz B1 und 5.55 ± 0.69 mM für Substanz B4 erhalten.

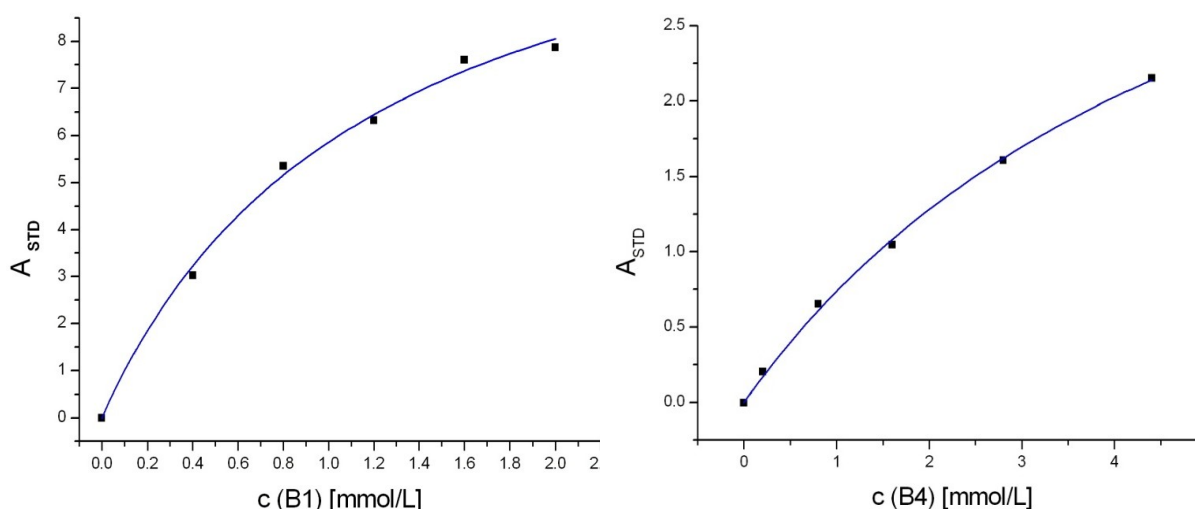


Abbildung 4.16: Plot der Amplifikationsfaktoren gegen die Konzentrationen der Substanzen B1 bzw. B4. Berechnung der Amplifikationsfaktoren aus STD-NMR-Titrationsen von 0.02 mM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS und 10% D₂O. Die *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen. Die Daten wurden mit Formel 3.2 gefittet, der Fit ist als blaue Linie dargestellt. Die K_D -Werte entsprechen 1.2 ± 0.18 mM für Substanz B1 und 5.55 ± 0.69 mM für Substanz B4.

4.2.3 STD-NMR von Substanzen der ZINC Datenbank

In dem virtuellen *de-novo* Screening der ZINC Datenbank mit LUDI an Position 1 im aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp wurde eine Substanz gefunden (Struktur 1, siehe Abbildung 4.4), welche als bester Treffer nicht nur eine sehr niedrige Bindungskonstante von 2.6 µM aufweist, sondern auch als kleines Molekül mit einer molekularen Masse von 116.2 g/mol sehr gut für eine Modifizierung oder Verlinkung geeignet ist.

Dieses nicht aromatische Molekül, (1S, 2S)-(+)-1,2-Diaminocyclohexan, wird im weiteren Verlauf Substanz N genannt. Die entsprechende aromatische Substanz dazu ist das *ortho*- oder 2-Aminoanilin (Substanz L), welches freundlicherweise vom Lehrstuhl König (Organische Chemie, Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt wurde. Das *meta*-substituierte Molekül (3-Aminoanilin, Substanz M) wurde ebenfalls vom Lehrstuhl für Organische Chemie erhalten. Um zu testen, ob diese drei Substanzen real an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp binden, wurden STD-NMR-Experimente (siehe Kapitel 3.6.1.1) durchgeführt.

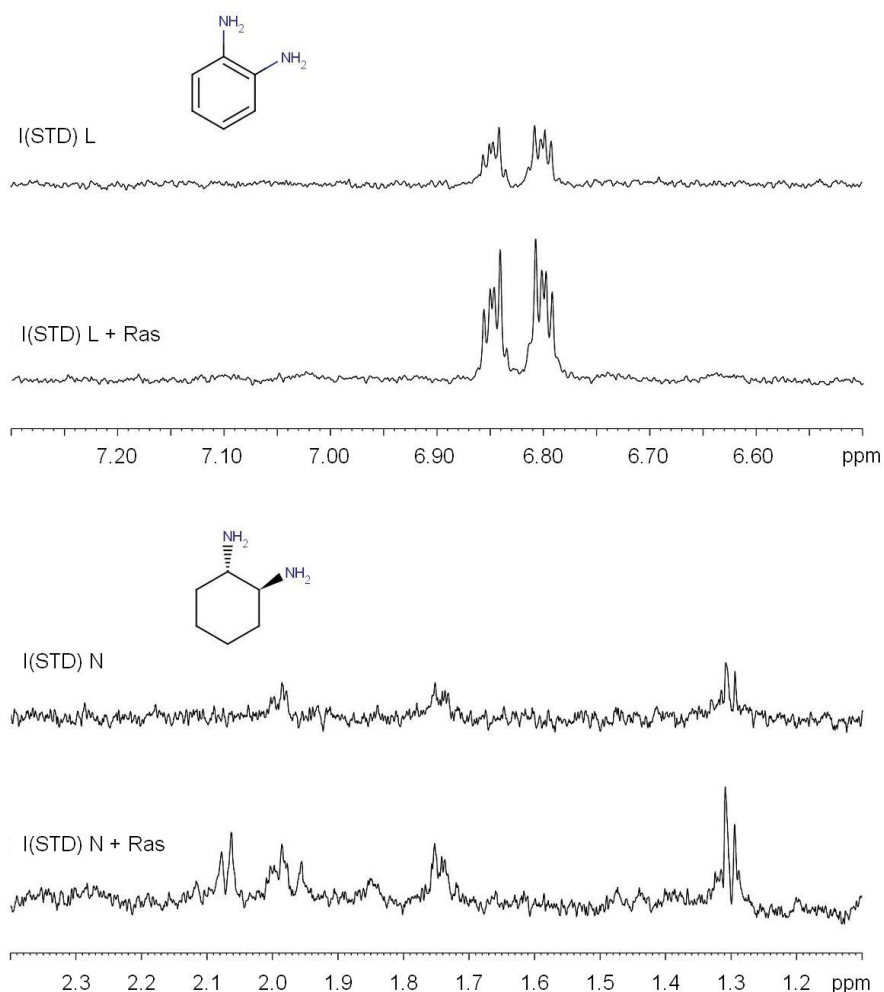


Abbildung 4.17: Ausschnitte aus den Differenz-STD-NMR-Spektren der Liganden L und N mit c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bzw. ohne Ras als Blindtest. Die Proben enthielten je 2 mM Substanz L bzw. N in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS, 10% D₂O mit bzw. ohne 0.02 mM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlungsfrequenzen betrugen 8 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen.

Die Substanzen wurden analog Kapitel 3.3.2.2 vorbereitet und dann vermessen. In allen STD-NMR-Spektren war bei der normalerweise verwendeten *on*-Resonanz Einstrahlfrequenz von -2 ppm eine deutliche Sättigung der Substanzen auch ohne Protein zu beobachten, weshalb hier eine *on*-Resonanz Einstrahlfrequenz von 8 ppm verwendet wurde. Trotz dieser Maßnahme sind noch leichte Signale im Differenz-Spektrum auch ohne Protein zu beobachten.

Bei den STD-NMR-Experimenten zeigte sich, dass die aus dem virtuellen Screening stammende Substanz N sowie ihr aromatisches Analogon Substanz L an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp binden, da sie deutlich höhere Signale im Differenz-Spektrum mit Protein als in den Blindtests zeigen (siehe Abbildung 4.17). Dem 3-Aminoanilin (Substanz M), welches sich von dem *ortho*-Aminoanilin nur in der Stellung einer Aminogruppe unterscheidet, konnte dagegen mittels STD-NMR keine Bindung an Ras nachgewiesen werden.

4.3 Bindungsstudien der Liganden aus dem virtuellen Screening an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bzw. Ras(wt)•Mg²⁺•GppNHp

4.3.1 *Molecular Docking* der Substanzen N und L im aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mittels LUDI

In der Arzneimittelentwicklung spielt die Modifizierung bzw. Verlinkung von Liganden eine wichtige Rolle, um hochaffine Inhibitoren für Proteine zu erhalten. Dazu ist es wichtig zu wissen, wie diese Liganden an das Protein binden um herauszufinden, an welchen Positionen im Molekül eine Modifizierung möglich ist. Eine Methode dazu ist das *Molecular Docking* (Kitchen (2004)), bei dem virtuell vorhergesagt wird, wie und mit welchen Energien ein Ligand an vorgegebenen Stellen im Protein bindet. Benötigt wird für diese Methode die 3D Struktur des Zielproteins (hier: c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp, siehe Kapitel 3.5.1), die 3D Strukturen der Liganden sowie eine Software (hier: LUDI, siehe Kapitel 1.4.2).

Um eine Vorstellung zu bekommen, wie und wo die Substanzen der ZINC Bibliothek, welche im STD-NMR-Experiment als Liganden identifiziert wurden (siehe Kapitel 4.2.3), an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp binden könnten, wurden die zwei Moleküle, Substanz L und N, einem *Molecular Docking* mittels des Programmes LUDI unterzogen. Hierbei wurden als Positionen im Protein erneut

Position 1 - 4 im und nahe dem aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp verwendet (siehe Kapitel 4.1.1). Die Einstellungen und Parameter der Software wurden aus dem virtuellen Screening (siehe Kapitel 3.5.2) übernommen, die Auswertung erfolgte analog Kapitel 3.5.5.

Wie in Abbildung 4.18 zu erkennen ist, binden beide Substanzen im aktiven Zentrum von Ras nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids GppNHp. Dabei bildet Substanz L zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein aus. An diesen Bindungen beteiligt sind die beiden Aminosäuren Glu63 und Tyr32 des Ras-Proteins als Akzeptoren. Substanz N bildet laut LUDI drei Wasserstoffbrücken zu den Aminosäuren Glu63, Ala59 und zum O-P γ des Nukleotids GppNHp aus.

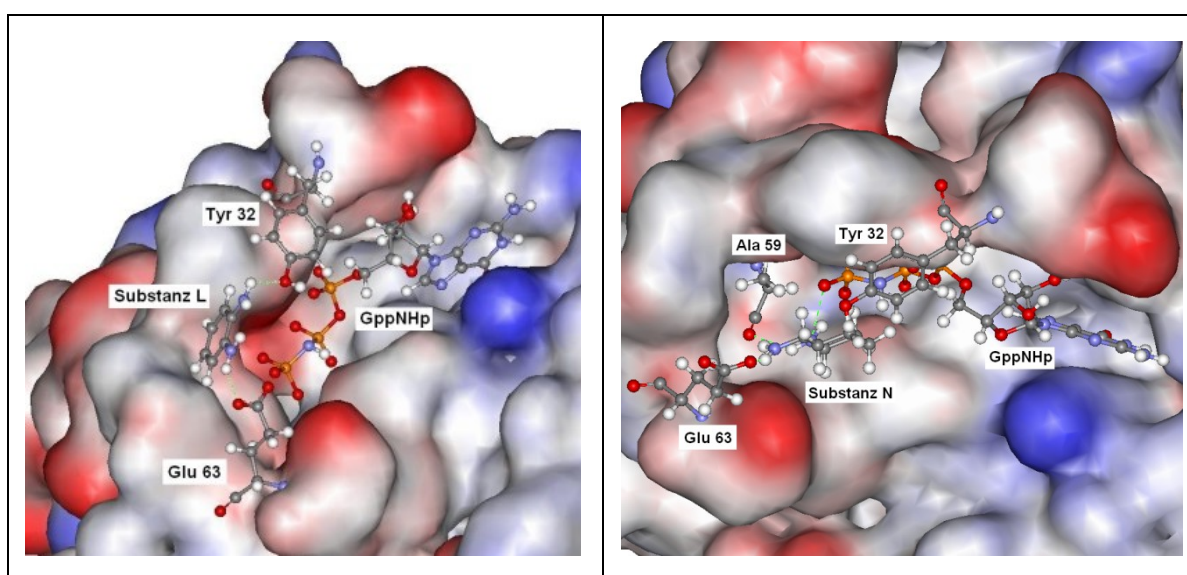


Abbildung 4.18: 3D Proteinoberfläche von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp inklusive der mittels LUDI gedockten Substanzen L bzw. N. Oberflächendarstellung der berechneten Struktur von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die Substanzen L und N, das Nukleotid GppNHp sowie die an der Bindung beteiligten Aminosäuren sind als „Ball and Stick“ Modell abgebildet. Die Oberflächenfarben werden durch das elektrostatische Potential angezeigt (rot=negative, blau=positive Oberflächenladung). Die berechneten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Liganden und Aminosäuren sind grün gestrichelt dargestellt.

4.3.2 (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Titrationsen von

c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit den Substanzen N und L

Die sofast-HMQC-Spektroskopie nach Schanda (2005) ist eine schnelle Alternative zu den sonst gebräuchlichen multidimensionalen heteronuklearen NMR Methoden. Sie wird deshalb bevorzugt für *High-Throughput* Screenings oder *real-time* Studien verwendet. Zur Feststellung, an welchen Positionen im Protein

Liganden binden und zur Berechnung entsprechender Bindungskonstanten, sind Titrations mit zweidimensionalen heteronuklearen NMR Experimenten nötig. Um die Dauer der einzelnen Experimente zu verkürzen und mit geringen Mengen sowohl an Protein ($c=0.1\text{mM}$) als auch Liganden arbeiten zu können wurde hierbei die $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -*sofast*-HMQC-Spektroskopie verwendet. Dadurch konnten in nur einem Drittel der sonst üblichen Zeit insgesamt 23 Titrations von Liganden am Ras-Protein durchgeführt werden (siehe auch Kapitel 4.4.4 und 4.6.3).

Das virtuelle Screening der ZINC Bibliothek an $\text{c'Ras(T35A)}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ ergab einen aussichtsreichen Kandidaten, Substanz N (siehe Kapitel 4.1.2.2). Die Bindung des Moleküls an aktives Ras in Zustand 1 wurde daraufhin mittels STD-NMR-Spektroskopie bestätigt, wie in Kapitel 4.2.3 nachzulesen ist. Des Weiteren konnte dies auch für das aromatische Analogon dazu, Substanz L, nachgewiesen werden. Das *Molecular Docking* mit LUDI ergab als Bindungsstelle für diese beiden Substanzen eine Position direkt im aktiven Zentrum von $\text{c'Ras(T35A)}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids (Kapitel 4.3.1). Um zu Überprüfen, ob diese beiden Liganden auch real im aktiven Zentrum an beschriebener Stelle binden und um die Bindungskonstanten zu berechnen, wurden $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -*sofast*-HMQC-Titrations durchgeführt.

4.3.2.1 Bestimmung der Bindungsstellen

Die Bestimmung der Bindungsstellen der Substanzen N und L an $\text{c'Ras(T35A)}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ erfolgte analog Kapitel 3.6.2.2. Hierbei wurde jeweils 0.1 mM $\text{c'Ras(T35A)}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ bei Raumtemperatur mit dem betreffenden Liganden titriert. Die berechneten kombinierten chemischen Verschiebungen (siehe Formel 3.3) wurden dann gegen die Positionen der Aminosäuren aufgetragen. Dargestellt sind die zwei entsprechenden Balkendiagramme in Abbildung 4.19.

Die Substanzen wurden bis zu einem 64fachen Überschuss zu Ras titriert. Gut zu erkennen ist, dass beide Liganden direkt im aktiven Zentrum von $\text{c'Ras(T35A)}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ binden (Position A), da vor allem die Aminosäuren Phe28, Ala35 und Thr58 Änderungen in ihren chemischen Verschiebungen zeigen. Des Weiteren ist ersichtlich, dass ebenfalls die Aminosäuren am C-Terminus, His166, Arg164 sowie Asp108 und Met111 (Position C) von der Bindung der Liganden betroffen sind. Das Ergebnis ist in Tabelle 4.3 veranschaulicht.

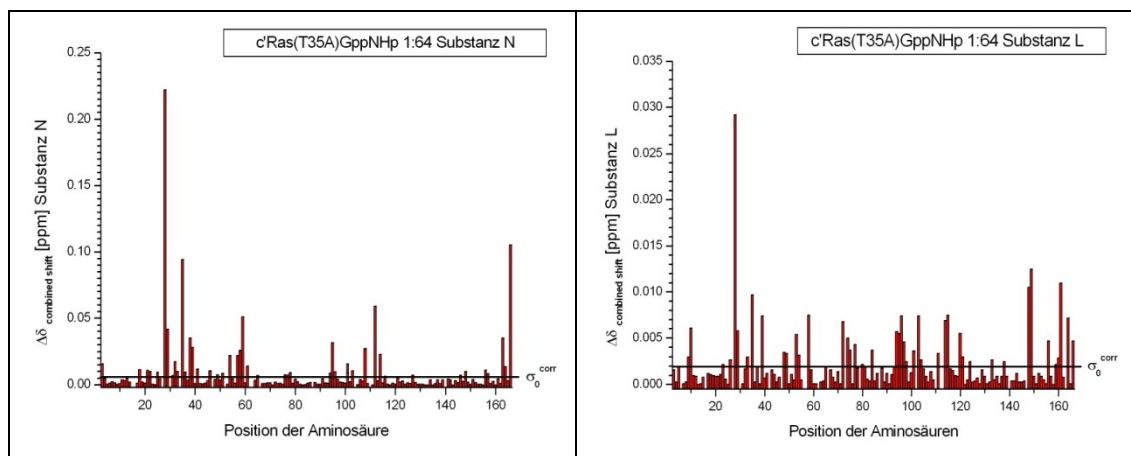


Abbildung 4.19: Balkendiagramm der kombinierten chemischen Verschiebungen gegen die Positionen der Aminosäuren von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp durch Titration der Liganden N und L. Die kombinierten chemischen Verschiebungen ($\delta\Delta_{\text{combined shift}}$) wurden mit Formel 3.3 aus (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Titrationsen von 0.1 mM ¹⁵N-gelabeltem c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit den Liganden N und L berechnet. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen. Die Berechnung der korrigierten Standardabweichung zu Null (σ_0^{corr}) erfolgte nach Schumann (2007).

		Position A	Position C
N	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	29, 38, 59	108, 163
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	35	112
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	-	166
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	28	-
L	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	29, 39	114, 120, 156, 120, 164, 166
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	35, 58	103, 115, 148, 149, 161
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	-	-
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	28	-

Tabelle 4.3: Relative kombinierte chemische Verschiebungen in c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp durch Liganden N und L. Die kombinierten chemischen Verschiebungen wurden auf den höchsten Effekt normiert und in Untergruppen eingeteilt.

4.3.2.2 Berechnung der Bindungskonstanten

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten der beiden Liganden N und L wurden (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Experimente durchgeführt, bei denen Schrittweise die entsprechende Substanz zu ¹⁵N c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp titriert wurde. Die

Berechnung der Bindungskonstanten der Liganden fand analog Kapitel 3.6.2.3 statt. Die chemische Verschiebung der entsprechenden Aminosäuren wurde gegen die Konzentrationen der Substanzen aufgetragen. Gefittet wurden die Daten mit Formel 3.2. Entsprechende Plots sind Abbildung 4.20 zu entnehmen. Hierbei ist ersichtlich, dass Substanz N 0.58 ± 0.16 mM und Substanz L 1.50 ± 0.54 mM an aktives Ras im Zustand 1 binden. Für Substanz N konnten zusätzlich K_D -Werte für Phe28 (1.59 ± 0.32 mM) und His166 (3.02 ± 0.31 mM) berechnet werden. Der Plot der chemischen Verschiebung von Phe28 gegen die Konzentration von Substanz L ergab außerdem eine Bindungskonstante von 1.97 ± 0.62 mM.

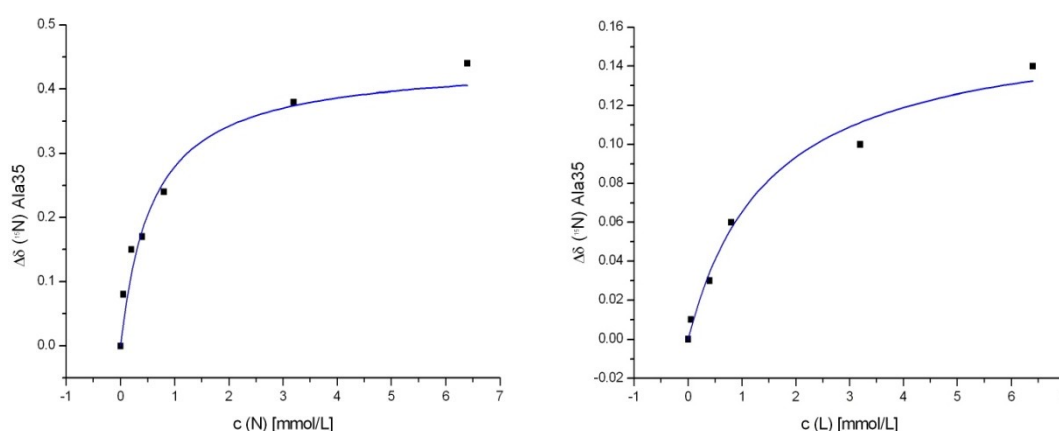


Abbildung 4.20: Plot der chemischen Verschiebungen gegen Konzentrationen der Substanzen N und L. Berechnung der chemischen Verschiebungen aus $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -sofast-HMQC-Titrationsen von 0.1 mM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS und 10% D₂O. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen. Die Daten wurden mit Formel 3.2 gefittet, der Fit ist als blaue Linie dargestellt. Die K_D -Werte entsprechen 0.58 ± 0.16 mM für Substanz N und 1.50 ± 0.54 mM für Substanz L.

4.3.3 ³¹P-NMR-Titration von Ras(wt)•Mg²⁺•GppNHp mit Substanz N

Im virtuellen Screening der ZINC Library an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp in Position 1 (im aktiven Zentrum nahe des γ -Phosphates des Nukleotids) konnte Substanz N als Ligand für aktives Ras in Zustand 1 identifiziert werden. Durch STD-NMR-Experimente wurde bestätigt, dass diese Substanz auch real bindet. Mittels *Molecular Docking* mit LUDI und $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -sofast-HMQC-Titrationsen konnte ermittelt werden, dass Ligand N tatsächlich direkt im aktiven Zentrum an beschriebener Position nahe des γ -Phosphates von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit einer Bindungskonstante von 0.58 ± 0.16 mM bindet.

Sowohl von den M^{2+} -Cyclenen als auch den M^{2+} -BPAs ist bekannt, dass sie das konformationelle Gleichgewicht in aktivem Ras zugunsten des Zustandes 1 positiv beeinflussen (Rosnizeck (2010)). Die Bindung beider Liganden an Ras führt des Weiteren zu einer Verdrängung des Effektors Raf-RBD (Rosnizeck, Dissertation Universität Regensburg).

Alle bisher durchgeführten Experimente dieser Arbeit fanden stets mit aktivem Ras in Zustand 1 statt. Somit weiß man nun, dass und wie die ermittelten Liganden an $c'Ras(T35A) \cdot Mg^{2+} \cdot GppNHp$ binden, allerdings ist noch unbekannt, ob sie nicht auch an Zustand 2 binden. Deswegen ist es interessant herauszufinden, ob diese Substanzen analog zu M^{2+} -Cyclen und M^{2+} -BPA in der Lage sind, das dynamische Gleichgewicht von aktivem Ras zugunsten Zustandes 1 zu beeinflussen.

Dazu wurde eine ^{31}P -NMR-Titration von $Ras(wt) \cdot Mg^{2+} \cdot GppNHp$ mit Substanz N bis zu einem 64fachen Überschuss durchgeführt. Die erhaltenen Spektren sind in Abbildung 4.21 zu sehen.

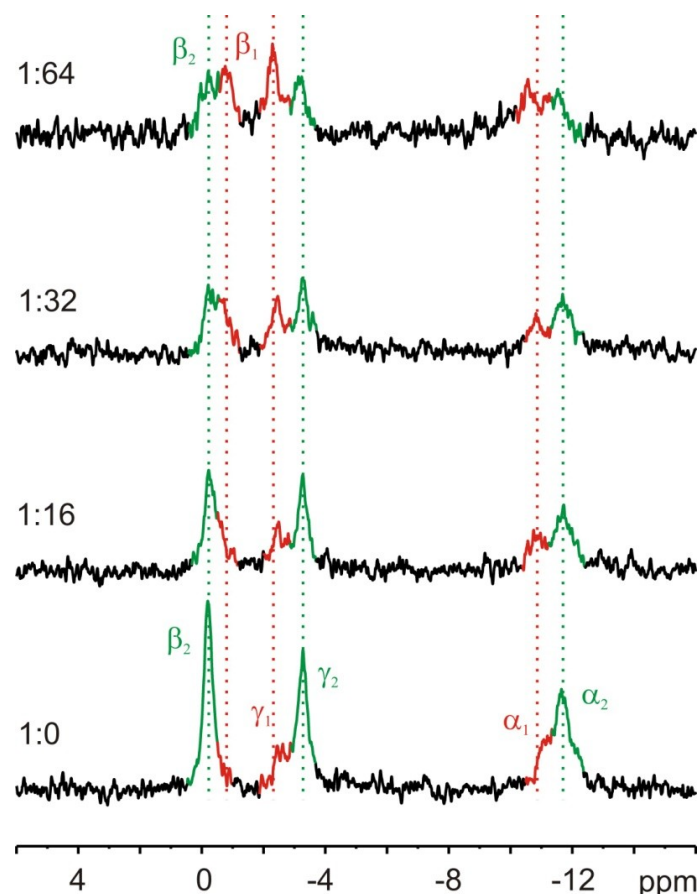


Abbildung 4.21: Einfluss des Liganden N auf das dynamische Gleichgewicht von $Ras(wt) \cdot Mg^{2+} \cdot GppNHp$. ^{31}P -NMR-Spektren von 1.5 mM $Ras(wt) \cdot Mg^{2+} \cdot GppNHp$ in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM $MgCl_2$, 0.2 mM DSS und 10% D_2O sowie ohne bzw. mit Substanz N. Das molare Verhältnis von Ras:Substanz N ist ersichtlich. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen.

Sehr deutlich ist an allen drei Phosphor-Signalen zu erkennen, dass Substanz N mit höherer Affinität an Zustand 1 von Ras bindet und eine Verschiebung des Gleichgewichtes zum schwach Effektor bindenden Zustand 1 bewirkt. Die Signale des konformationellen Zustandes 1 steigen in Intensitäten und Integralen an, wohingegen die Signale des Zustandes 2 an Intensitäten und Integralen verlieren. Entsprechende Ergebnisse sind in Tabelle 4.4 zusammengefasst. Im Gegensatz zu M^{2+} -Cyclen und M^{2+} -BPA wurde keine Ausfällung an Protein beobachtet.

P:L	α -Phosphat		β -Phosphat		γ -Phosphat		K_{12}
	δ_1 [ppm]	δ_2 [ppm]	δ_1 [ppm]	δ_2 [ppm]	δ_1 [ppm]	δ_2 [ppm]	
1:0	-11.14	-11.65		-0.21	-2.53	-3.28	2.89
1:64	-10.68	-11.59	-0.78	-0.22	-2.31	-3.20	0.73

Tabelle 4.4: Chemische Verschiebungen der Phosphate des Nukleotids von Ras(wt)• Mg^{2+} •GppNHp in Ab- und Anwesenheit des Liganden N. Berechnung von K_{12} aus den relativen Peakflächen der γ -Phosphate: $K_{12}=A(\gamma_2)/A(\gamma_1)$.

4.4 Screening der Maybridge Library an c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp

4.4.1 STD-NMR-Screening der Maybridge Library

Die Maybridge Library ist eine Bibliothek bestehend aus 500 kleinen organischen Molekülen und bestens für ein STD-NMR-Screening im aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp geeignet (siehe Kapitel 1.5). Nach Vorbereitung der Substanzen analog Kapitel 3.3.2.2 wurden sie wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben mittels STD-NMR-Experimenten auf Bindung an aktivem Ras in Zustand 1 überprüft. Zuerst wurden alle Substanzen in 50fachem Überschuss mit c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp vermessen, anschließend wurden die Moleküle welche Signale im Differenz-STD-NMR-Spektrum zeigten (insgesamt 166 Maybridge-Substanzen) zusätzlich einem Blind-Screening ohne Protein unterzogen. Nach dem Vergleich der Blindtests mit den Messungen mit Protein zeigten 30 Substanzen eindeutig eine Sättigung, welche nur durch die Bindung an Ras resultierte. Diese 30 Liganden mit ihren Strukturen und Ausschnitten aus den Differenz-Spektren mit und ohne c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp sind in Abbildung 4.22 bis Abbildung 4.26 dargestellt.

Alle Moleküle enthalten Ringsysteme, 28 der Strukturen sind Aromaten. 23 Moleküle beinhalten Heterozyklen.

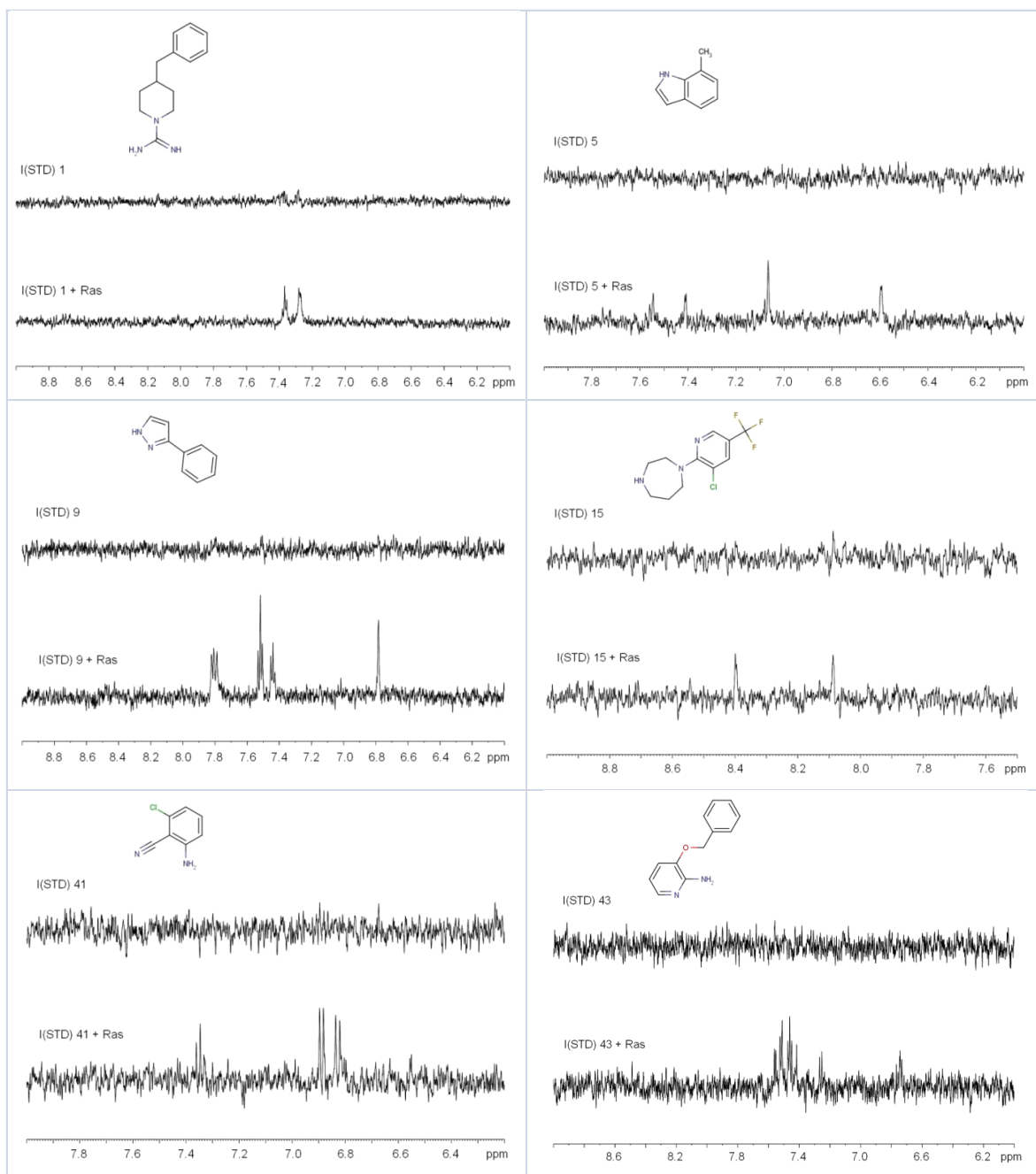


Abbildung 4.22: Ausschnitte aus den Differenz-STD-NMR-Spektren der Liganden 1, 5, 9, 15, 41 und 43 mit c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bzw. ohne Ras als Blindtest. Die Proben enthielten je 250 µM Substanz in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS, 10% D₂O mit bzw. ohne 5 µM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen.

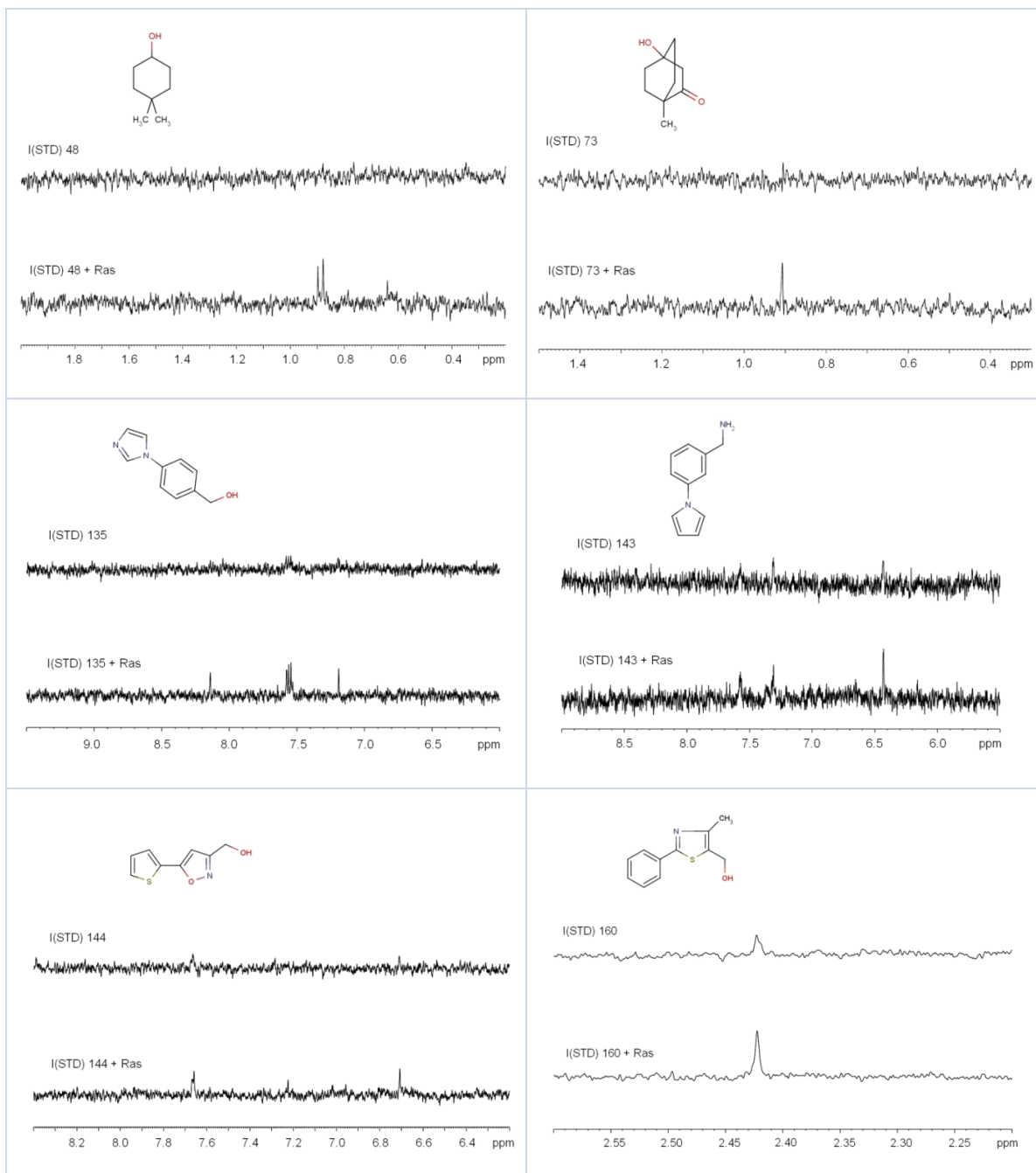


Abbildung 4.23: Ausschnitte aus den Differenz-STD-NMR-Spektren der Liganden 48, 73, 135, 143, 144 und 160 mit c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bzw. ohne Ras als Blindtest. Die Proben enthielten je 250 µM Substanz in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS, 10% D₂O mit bzw. ohne 5 µM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlungsfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen.

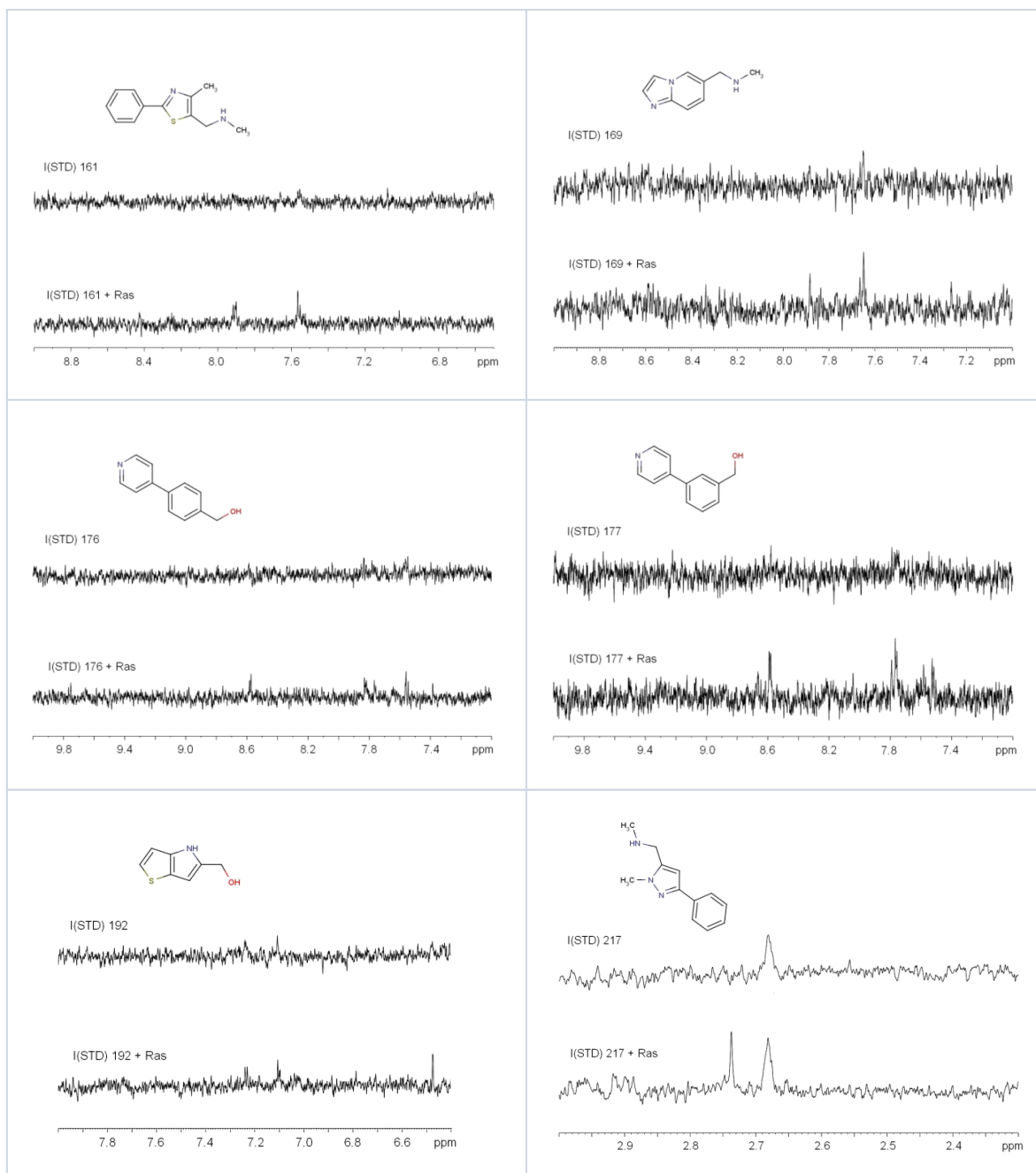


Abbildung 4.24: Ausschnitte aus den Differenz-STD-NMR-Spektren der Liganden 161, 169, 176, 177, 192 und 217 mit c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bzw. ohne Ras als Blindtest. Die Proben enthielten je 250 µM Substanz in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS, 10% D₂O mit bzw. ohne 5 µM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen.

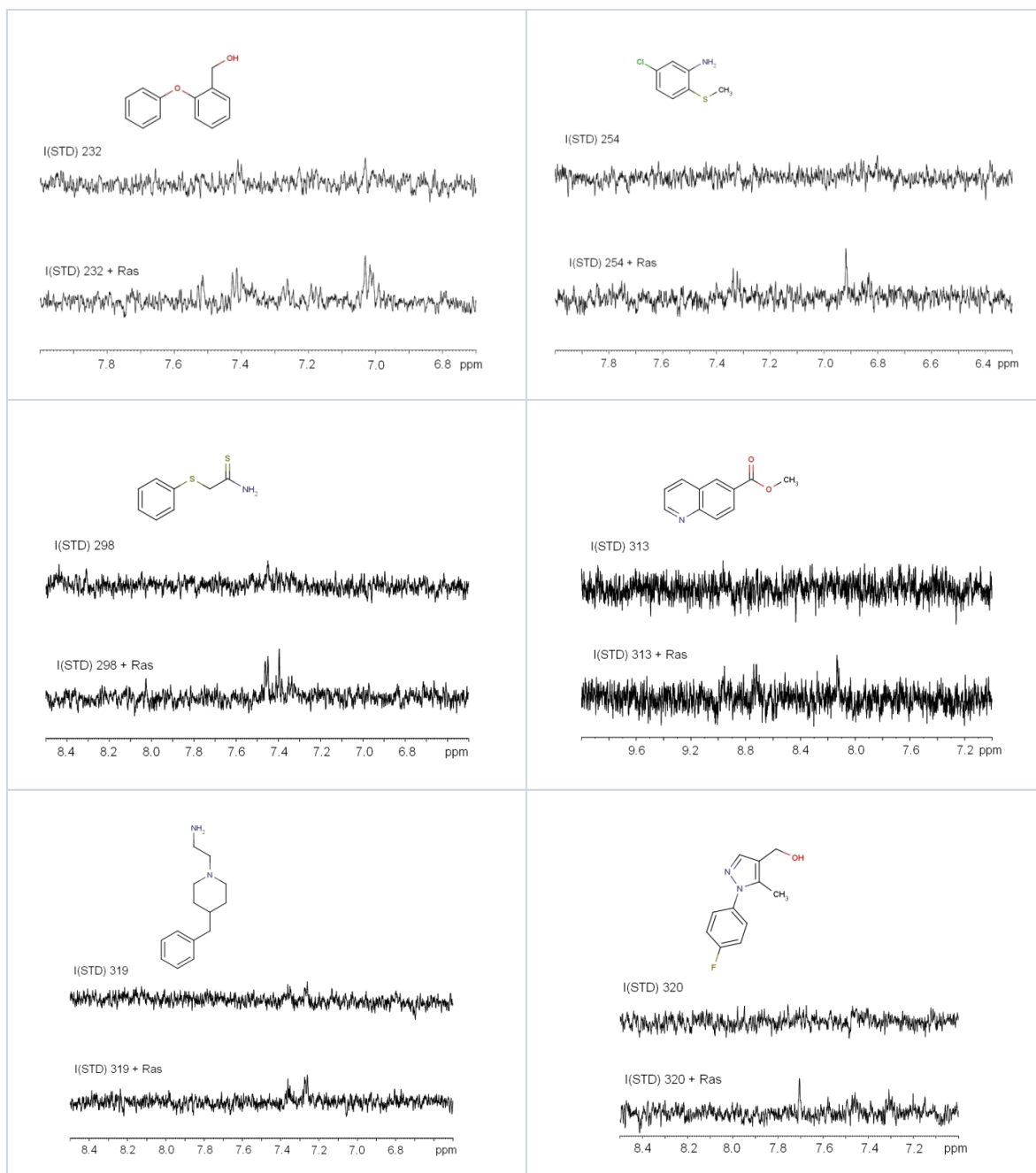


Abbildung 4.25: Ausschnitte aus den Differenz-STD-NMR-Spektren der Liganden 232, 254, 298, 313, 319 und 320 mit c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bzw. ohne Ras als Blindtest. Die Proben enthielten je 250 µM Substanz in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS, 10% D₂O mit bzw. ohne 5 µM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen.

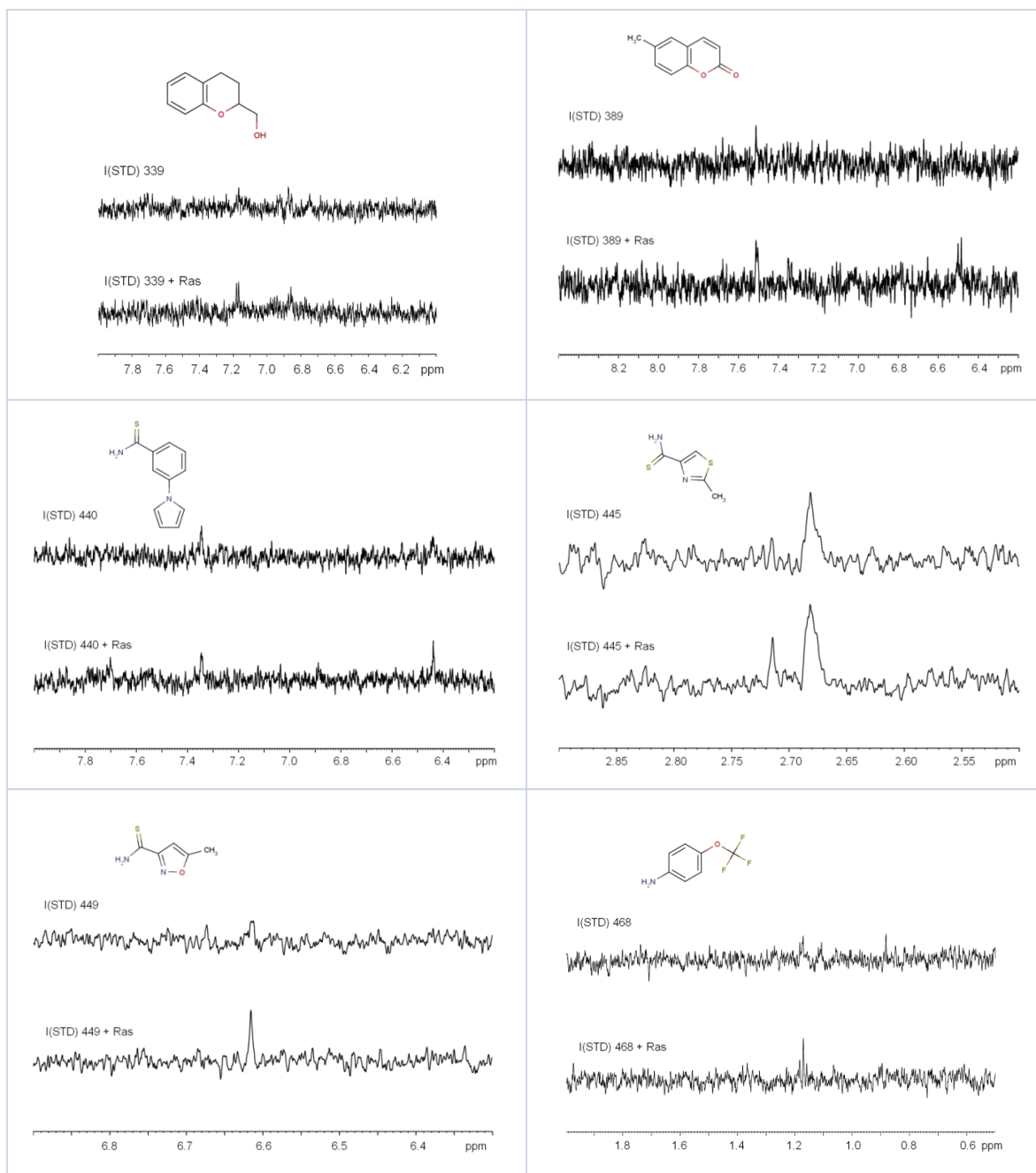


Abbildung 4.26: Ausschnitte aus den Differenz-STD-NMR-Spektren der Liganden 339, 389, 440, 445, 449 und 468 mit c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bzw. ohne Ras als Blindtest. Die Proben enthielten je 250 µM Substanz in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS, 10% D₂O mit bzw. ohne 5 µM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen.

Die Signale bei 2.68 ppm in den Spektren der Substanzen 217 und 445 rühren vom organischen Lösungsmittel DMSO her, welches selbst geringe STD-Effekte auch ohne Anwesenheit von Protein zeigt.

In Tabelle 4.5 sind alle 30 gefundenen Liganden mit Nummern und entsprechenden Maybridge-Codes zusammengefasst.

Nr.	Maybridge-Code	Nr.	Maybridge-Code	Nr.	Maybridge-Code
1	MO07692	144	CC23109	298	KM04192
5	AC12704	160	CC29209	313	KM10245
9	AC29603	161	CC29246	319	MO00719
15	AW00189	169	CC33146	320	MO00765
41	BTB07422	176	CC35409	339	MO07319
43	BTB08555	177	CC35609	389	SB00764
48	BTBG00026	192	CC40909	440	SPB01074
73	BTB14472	217	CC46646	445	SPB02802
135	CC18509	232	CC49909	449	SPB04532
143	CC21913	254	CD05201	468	TL00398

Tabelle 4.5: Nummern und Maybridge-Codes der mittels STD-NMR ermittelten Liganden für c’Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp aus der Maybridge RO3 Library

4.4.2 Bestimmung der Epitope der Maybridge Liganden

Um die Bindung von Liganden an Proteine genauer zu charakterisieren ist es möglich, mittels STD-NMR-Spektroskopie die Epitope der Substanzen nach Mayer (2001) zu ermitteln. Der Teil eines Liganden mit dem engsten Kontakt zum Protein zeigt die intensivsten STD-Effekte, wodurch sehr einfach und schnell die Epitope von Substanzen ausgemacht werden können.

Die Bestimmung der Epitope der 30 ermittelten Liganden aus der Maybridge Library (siehe Kapitel 4.4.1) fand analog Kapitel 3.6.1.3 statt.

In Tabelle 4.6 bis Tabelle 4.9 sind die 2D Strukturen der Liganden sowie deren Epitope durch Prozentzahlen abgebildet.

1	5	9
15	41	43
48	73	135

Tabelle 4.6: 2D Strukturen und Epitope der Liganden 1, 5, 9, 15, 41, 43, 48, 73 und 135 in Prozentangaben. Berechnung der Epitope analog Kapitel 3.6.1.3 aus STD-NMR-Spektren von 250 μM Ligand und 5 μM c' Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS, 10% D₂O. Die *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen. Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau, Fluor in gelb und Chlor in hellgrün dargestellt.

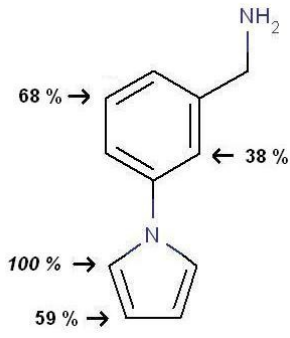
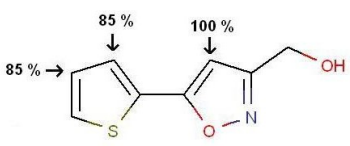
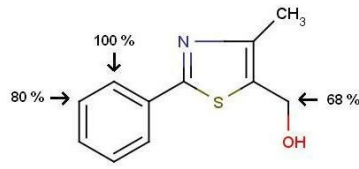
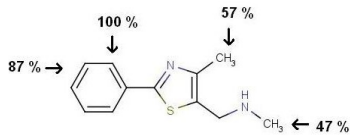
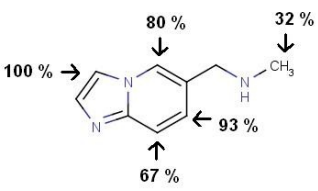
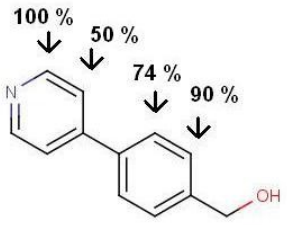
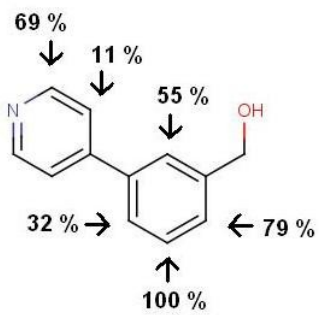
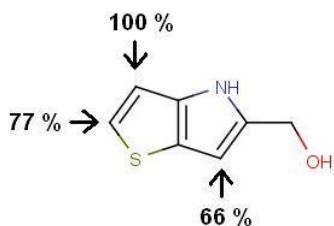
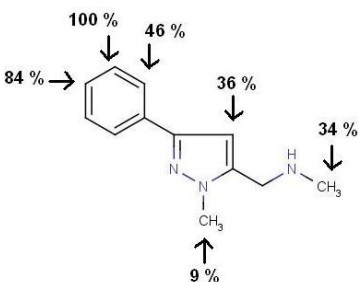
143	144	160
		
161	169	176
		
177	192	217
		

Tabelle 4.7: 2D Strukturen und Epitope der Liganden 143, 144, 160, 161, 169, 176, 177, 192 und 217 in Prozentangaben. Berechnung der Epitope analog Kapitel 3.6.1.3 aus STD-NMR-Spektren von 250 μ M Ligand und 5 μ M c’Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS, 10% D₂O. Die *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen. Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau und Schwefel in grün dargestellt.

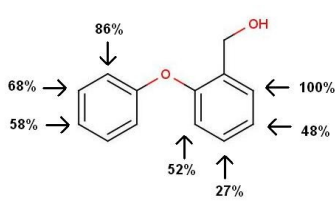
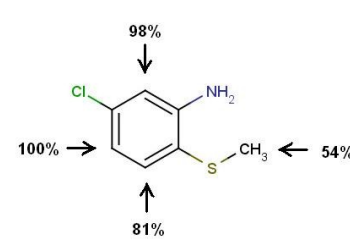
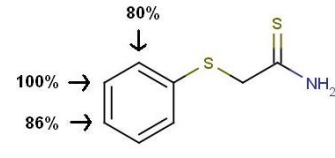
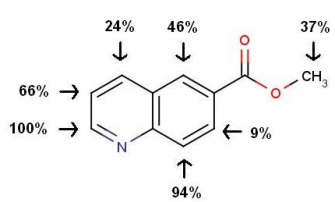
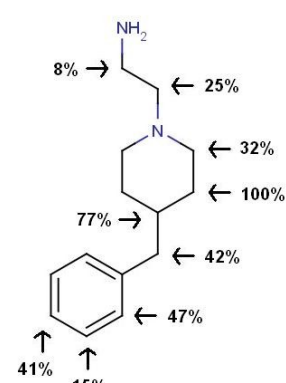
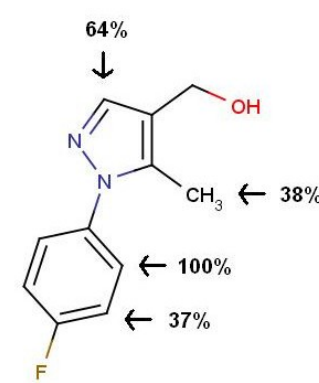
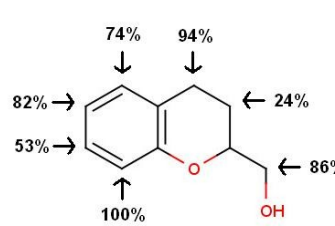
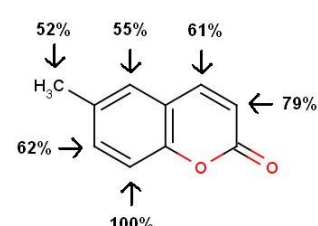
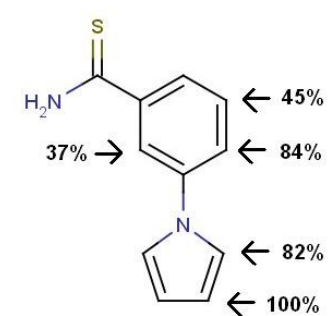
232	254	298
		
313	319	320
		
339	389	440
		

Tabelle 4.8: 2D Strukturen und Epitope der Liganden 232, 254, 298, 313, 319, 320, 339, 389 und 440 in Prozentangaben. Berechnung der Epitope analog Kapitel 3.6.1.3 aus STD-NMR-Spektren von 250 μ M Ligand und 5 μ M c’Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS, 10% D₂O. Die *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen. Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau, Schwefel in grün, Fluor in gelb und Chlor in hellgrün dargestellt.

445	449	468

Tabelle 4.9: 2D Strukturen und Epitope der Liganden 445, 449 und 468 in Prozentangaben.

Berechnung der Epitope analog Kapitel 3.6.1.3 aus STD-NMR-Spektren von 250 μM Ligand und 5 μM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS, 10% D₂O. Die *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen. Funktionelle Gruppen von Sauerstoff sind in rot, Stickstoff in blau, Fluor in gelb und Schwefel in grün dargestellt.

Die Protonen mit den höchsten Prozentangaben weisen dabei jeweils die kürzeste Distanz zum Protein c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp auf, da sie die höchsten relativen STD-Effekte in den Differenz-Spektren zeigen.

4.4.3 *Molecular Docking* der Maybridge Liganden im aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mittels LUDI

Das STD-NMR-Screening der Maybridge Library ergab 30 Liganden, die an aktives Ras in Zustand 1 binden (siehe Kapitel 4.4.1). Um nun festzustellen, wie und ob diese Substanzen im aktiven Zentrum oder an Positionen nahe dessen binden, wurden diese 30 Moleküle einem *Molecular Docking* mit der Software LUDI unterzogen. Relevante Positionen im c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp wurden analog Kapitel 4.1.1 verwendet. Die Einstellungen und Parameter der Software wurden aus dem virtuellen Screening (siehe Kapitel 3.5.2) übernommen, die Auswertungen erfolgten analog Kapitel 3.5.5.

Abgebildet sind jeweils die 3D Strukturen des Ras-Proteins mit Liganden und ihre Positionen sowie die von LUDI berechneten Wasserstoffbrückenbindungen (Abbildung 4.27 bis Abbildung 4.30).

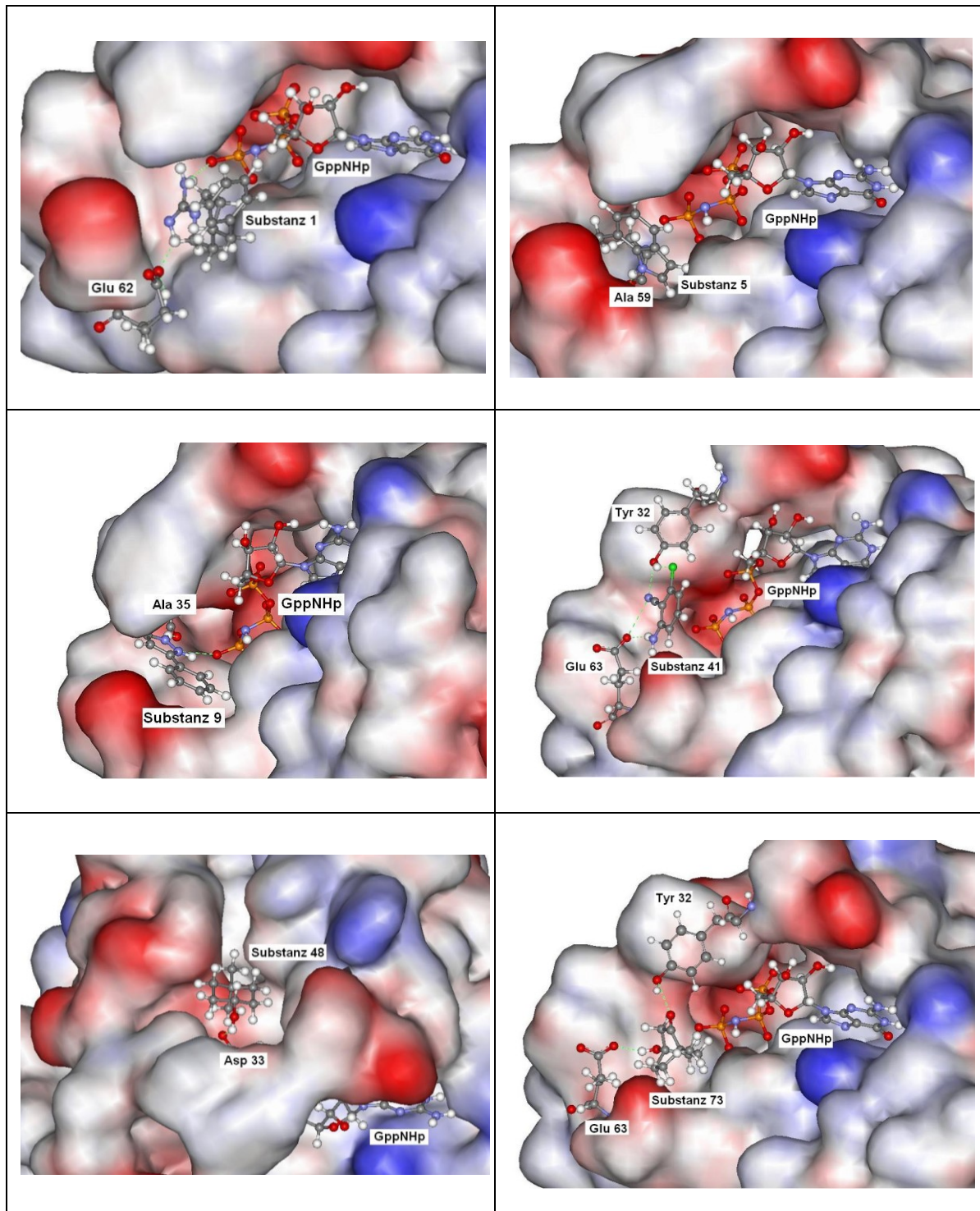


Abbildung 4.27: 3D Proteinoberfläche von c’Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp inklusive der mittels LUDI gedockten Substanzen 1, 5, 9, 41, 48 und 73. Oberflächendarstellung der berechneten Struktur von c’Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die Substanzen, das Nukleotid GppNHp sowie die an der Bindung beteiligten Aminosäuren sind als „Ball and Stick“ Modell abgebildet. Die Oberflächenfarben werden durch das elektrostatische Potential angezeigt (rot=negative, blau=positive Oberflächenladung). Die berechneten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Liganden und Aminosäuren sind grün gestrichelt dargestellt.

Substanzen 15, 43, 144, 313, 320, 339, 389, 440, 445, 449 und 468 konnten unter gegebenen Einstellungen und Bedingungen nicht mittels LUDI als Liganden an den Positionen 1-4 in c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp ermittelt werden.

Von den ersten sechs gedockten Liganden binden fünf (Substanz 1, 5, 9, 41 und 73) laut LUDI direkt im aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids GppNHp. Die Aminosäuren des Proteins, welche an den Wasserstoffbrückenbindungen zu diesen Liganden am häufigsten beteiligt sind, sind Alanin 59, Alanin 35, Tyrosin 32 sowie Glutaminsäure 63. Liganden 1 und 9 bilden außerdem je eine Wasserstoffbrücke direkt zum O-P γ des Nukleotids aus. Die Substanz mit der Nummer 48 bindet laut LUDI nicht direkt im aktiven Zentrum von Ras, sondern an das Aspartat 33 (siehe Abbildung 4.27 links unten). Die an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp gedockten Liganden 135, 143, 160, 161, 169 und 176 sind in Abbildung 4.28 zu sehen. Alle diese Substanzen binden direkt im aktiven Zentrum des Proteins. Dabei befinden sich laut LUDI die Liganden 135, 143, 160 und 161 nahe dem γ -Phosphat von GppNHp, wohingegen Substanzen 169 und 176 eher parallel neben das Nukleotid binden. Die Substanzen 135, 160 und 161 bilden Wasserstoffbrücken zum Tyrosin 32 aus, Liganden 143, 160 und 161 binden an Glutamat 63 und Substanzen 135 und 169 weisen H-Brücken zur Aminosäure Glycin 13 auf. Die beiden Substanzen 169 und 176 binden laut LUDI außerdem an Lysin 117 sowie Asparagin 85.

Die Positionen der Liganden 177, 192, 217, 232, 254 und 298 nach dem Docking an das Ras-Protein sind in Abbildung 4.29 zu erkennen. Deutlich ersichtlich ist, dass Substanzen 177, 192 sowie 232 direkt im aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids binden. An diesen Bindungen beteiligte Aminosäuren sind Glutamat 63 (Substanz 192 und 232), Tyrosin 32 (Substanz 232), Glutamat 62 und Aspartat 33 (Substanz 177), sowie Alanin 35 (Substanz 192). Ligand 217 bindet laut LUDI nicht im aktiven Zentrum sondern an das Glutamat 37 (siehe Abbildung 4.29 Mitte links). Substanzen 254 und 298 wurden von LUDI nahe dem Zuckerring an Position 3 (GNP-O2') von GppNHp mit Wasserstoffbrücken zur Aminosäure Aspartat 30 gedockt.

Substanz 319 (siehe Abbildung 4.30) bindet im aktiven Zentrum von Ras ebenfalls nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids an die Aminosäure Alanin 59.

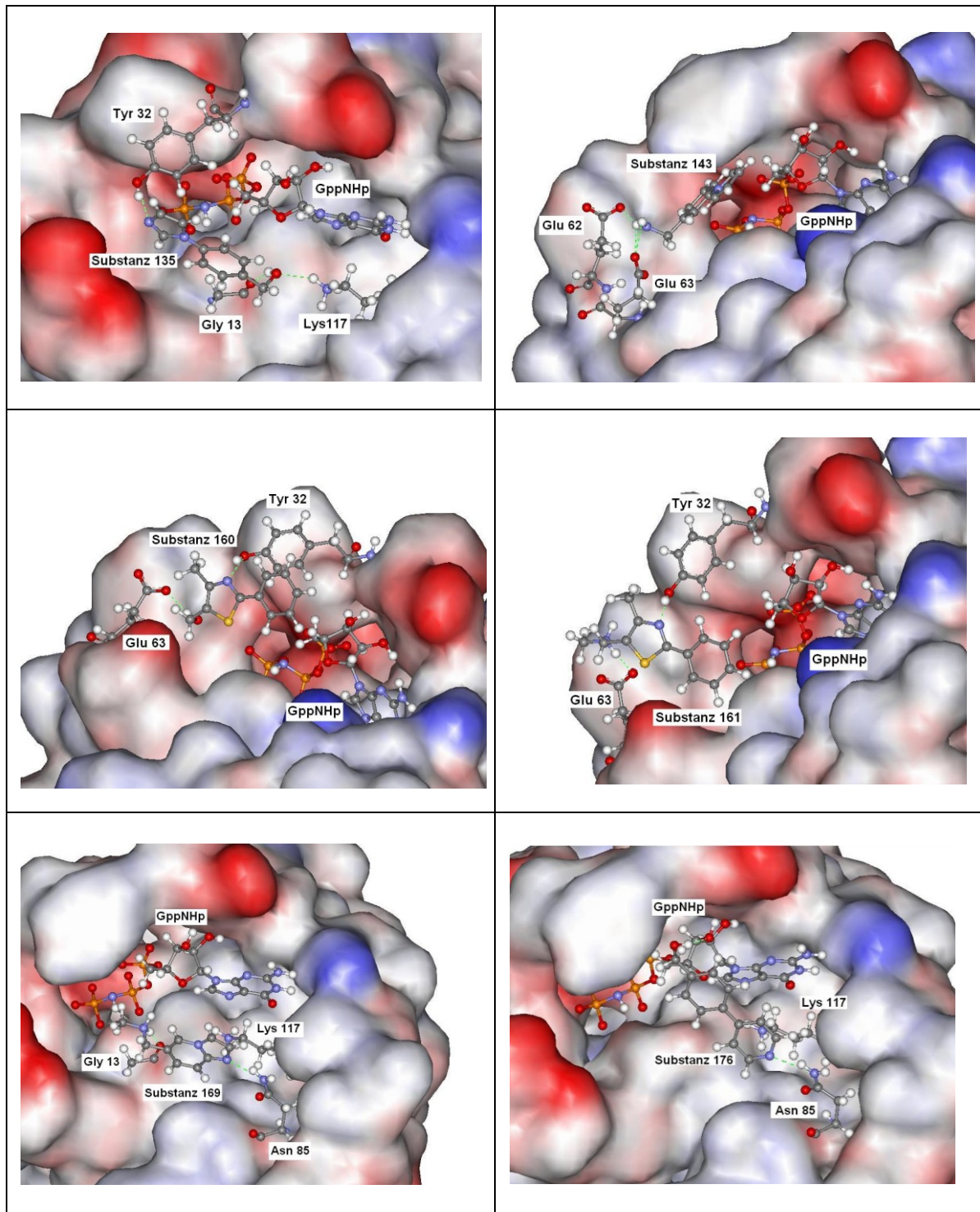


Abbildung 4.28: 3D Proteinoberfläche von c' Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp inklusive der mittels LUDI gedockten Substanzen 135, 143, 160, 161, 169 und 176. Oberflächendarstellung der berechneten Struktur von c' Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die Substanzen, das Nukleotid GppNHp sowie die an der Bindung beteiligten Aminosäuren sind als „Ball and Stick“ Modell abgebildet. Die Oberflächenfarben werden durch das elektrostatische Potential angezeigt (rot=negative, blau=positive Oberflächenladung). Die berechneten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Liganden und Aminosäuren sind grün gestrichelt dargestellt.

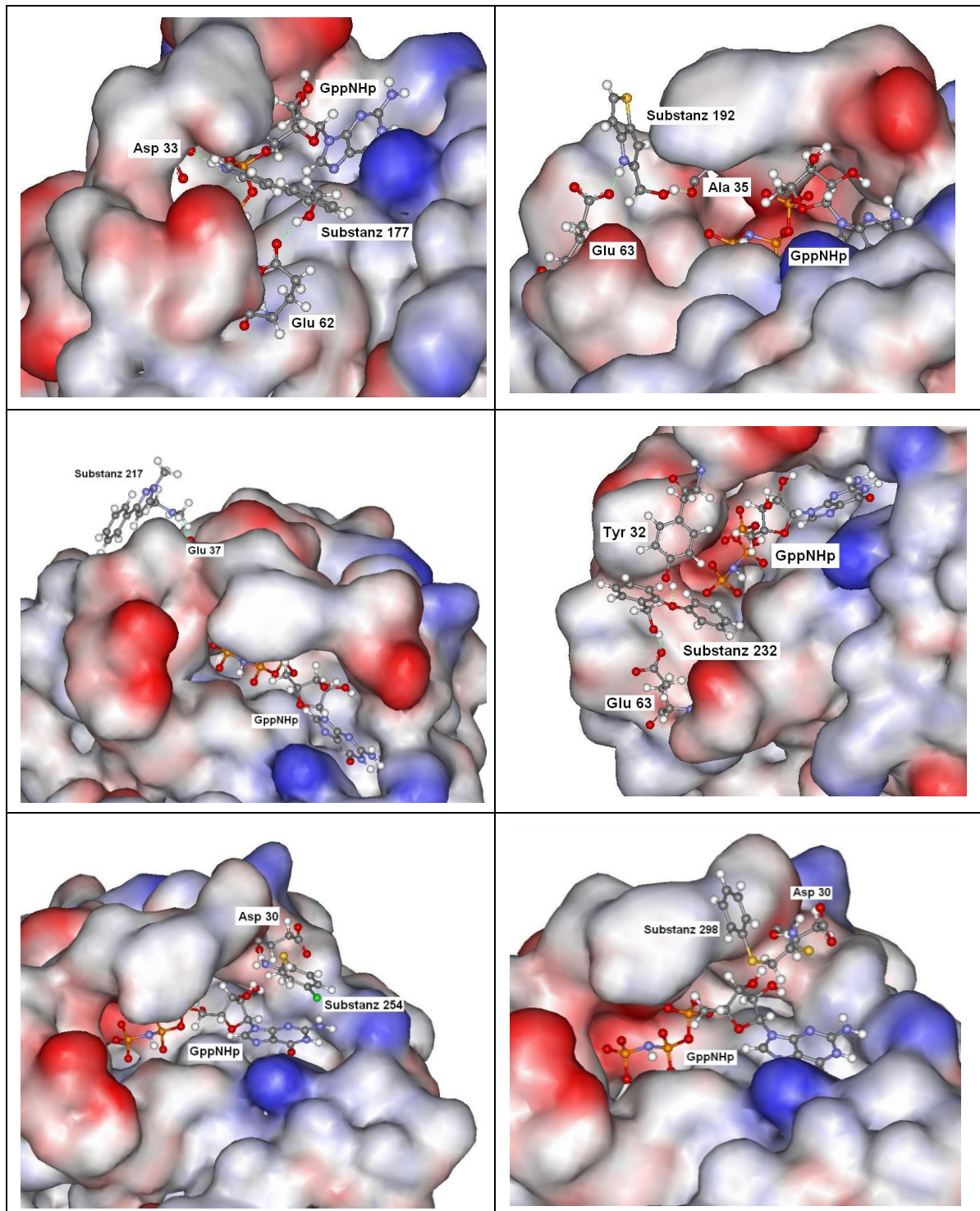


Abbildung 4.29: 3D Proteinoberfläche von c'ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp inklusive der mittels LUDI gedockten Substanzen 177, 192, 217, 232, 254 und 298. Oberflächendarstellung der berechneten Struktur von c'ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die Substanzen, das Nukleotid GppNHp sowie die an der Bindung beteiligten Aminosäuren sind als „Ball and Stick“ Modell abgebildet. Die Oberflächenfarben werden durch das elektrostatische Potential angezeigt (rot=negative, blau=positive Oberflächenladung). Die berechneten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Liganden und Aminosäuren sind grün gestrichelt dargestellt.

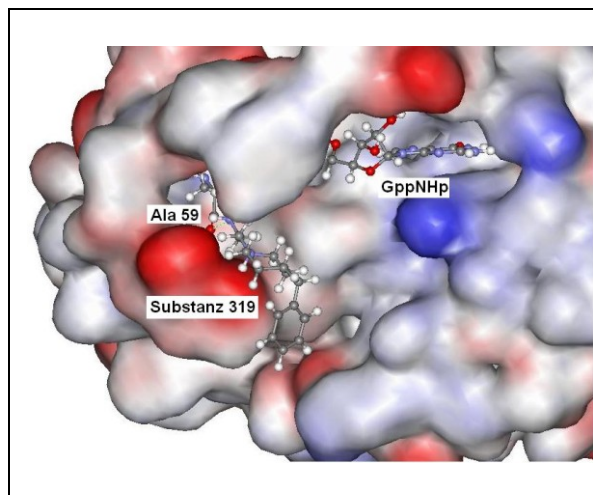


Abbildung 4.30: 3D Proteinoberfläche von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp inklusive der mittels LUDI gedockten Substanz 319. Oberflächendarstellung der berechneten Struktur von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die Substanz, das Nukleotid GppNHp sowie die an der Bindung beteiligte Aminosäure sind als „Ball and Stick“ Modell abgebildet. Die Oberflächenfarben werden durch das elektrostatische Potential angezeigt (rot=negative, blau=positive Oberflächenladung). Die berechnete Wasserstoffbrückenbindung zwischen Ligand und Aminosäure ist grün gestrichelt dargestellt.

4.4.4 (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Titrations von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit den Maybridge Liganden

Mittels STD-NMR wurden 30 neue Liganden aus der Maybridge Library (siehe Kapitel 4.4.1) für aktives Ras im Zustand 1 ermittelt, von denen 19 durch das *Molecular Docking* mit LUDI als Binder im und nahe des aktiven Zentrums von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp identifiziert werden konnten (siehe Kapitel 4.4.3). Um nun die Bindungskonstanten zu berechnen und festzustellen, ob diese 19 Liganden auch real im und um das aktive Zentrum von Ras binden, wurden (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Titrations von ¹⁵N-markiertem c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit diesen Substanzen durchgeführt.

4.4.4.1 Bestimmung der Bindungsstellen

Die Bestimmung der Bindungsstellen von den Maybridge Liganden an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp erfolgte analog Kapitel 3.6.2.2. Hierbei wurde jeweils 0.1 mM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bei Raumtemperatur mit der betreffenden Substanz aus der Maybridge Library titriert. Die berechneten kombinierten chemischen Verschiebungen (siehe Formel 3.3) wurden dann gegen die

Positionen der Aminosäuren aufgetragen. Dargestellt sind die entsprechenden Balkendiagramme in Abbildung 4.32 bis Abbildung 4.35.

Substanzen 1, 5, 9 und 135 wurden bis zu einem 64fachen Überschuss titriert, alle weiteren Liganden bis zu einem 32fachen Überschuss. Für die Aminosäuren mit den größten kombinierten chemischen Verschiebungen im Protein konnten insgesamt drei übergeordnete Positionen ausgemacht werden. Position A ist dabei eine Bindungsstelle direkt im aktiven Zentrum nahe GppNHp, Position B ist die Stelle, an der auch M^{2+} -BPA bindet (Rosnizeck, Dissertation Universität Regensburg) und Position C befindet sich auf der Rückseite des Proteins nahe des C-Terminus.

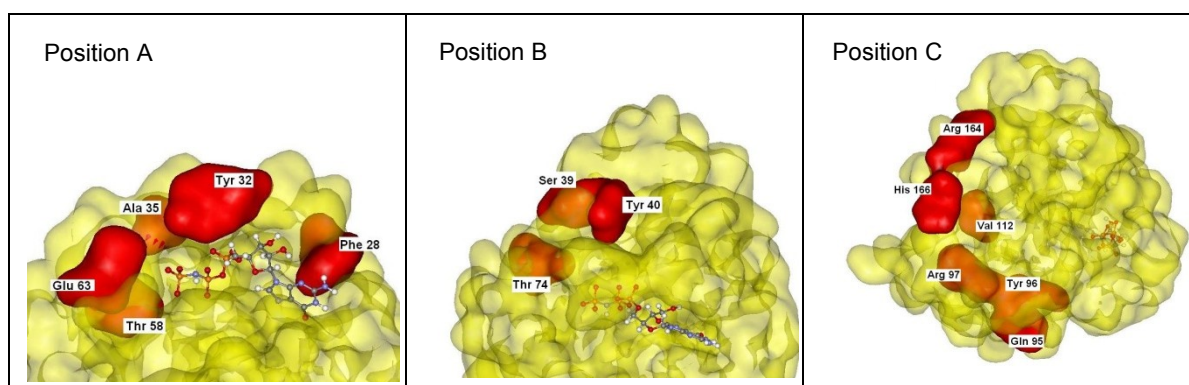


Abbildung 4.31: Oberflächendarstellung der Bindungspositionen der Maybridge Liganden an c'ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. In rot dargestellt sind die durch Ligandenbindung betroffenen Aminosäuren an den jeweiligen Positionen. Das Nukleotid GppNHp ist als „Ball and Stick“ Modell abgebildet.

Liganden, welche an Position A und somit direkt im aktiven Zentrum von c'ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp binden, führen am häufigsten an den Aminosäuren Ala35, Phe28, Tyr32, Glu63 und Thr58 zu Änderungen in ihren chemischen Verschiebungen. In Position B dagegen sind vor allem die Aminosäuren Ser39, Tyr40 und Thr74 betroffen wohingegen in Position C auf der Rückseite des Proteins durch Ligandenbindung die Aminosäuren Gln95, Tyr96, Arg97, Val112, Arg164 und His166 einen Effekt in ihren chemischen Verschiebungen zeigen. Entsprechende Positionen mit Aminosäuren sind in Abbildung 4.31 dargestellt.

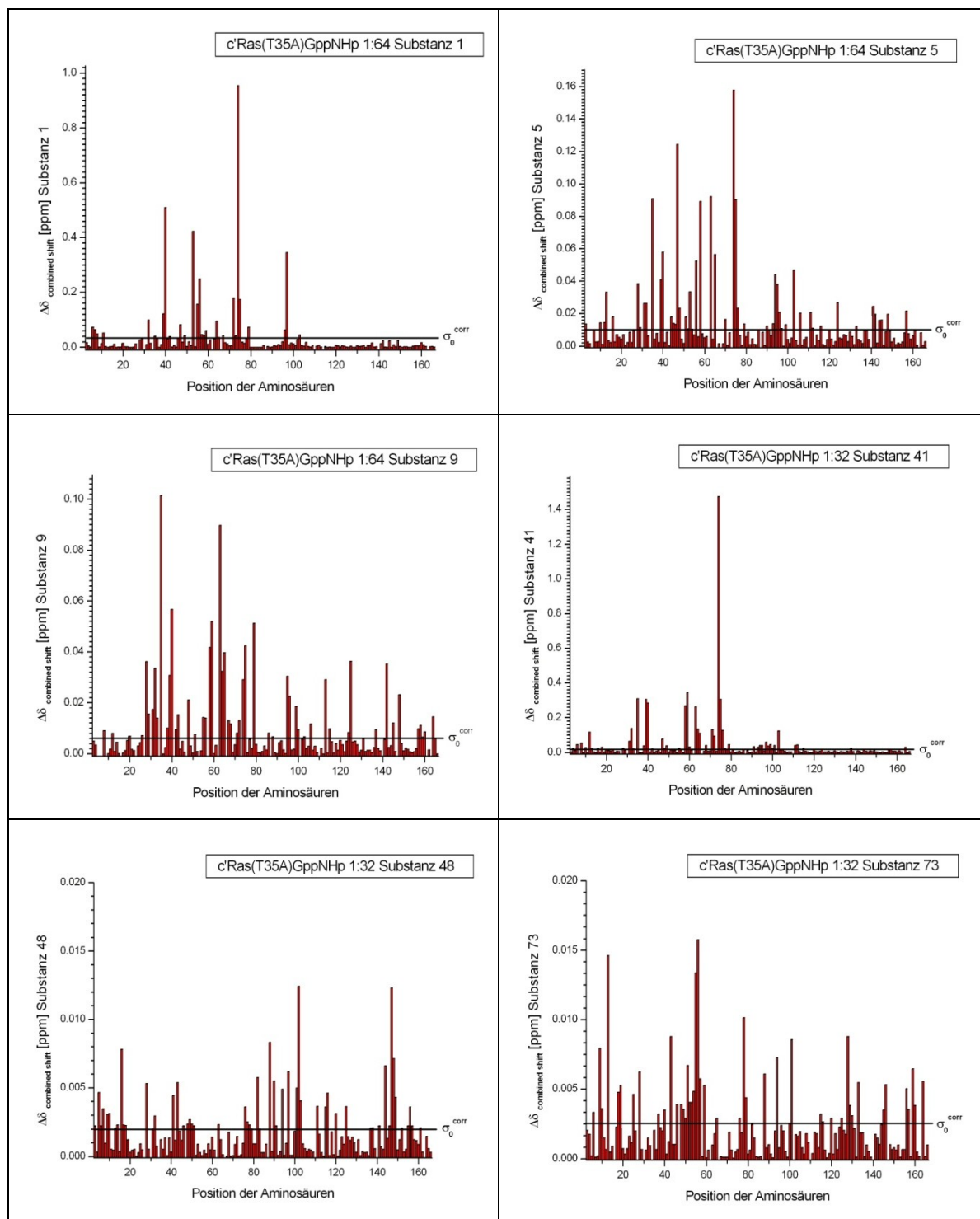


Abbildung 4.32: Balkendiagramm der kombinierten chemischen Verschiebungen gegen die Positionen der Aminosäuren von c' Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp durch Titration der Liganden 1, 5, 9, 41, 48 und 73. Die kombinierten chemischen Verschiebungen ($\delta\Delta_{\text{combined shift}}$) wurden mit Formel 3.3 aus (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Titrationsen von 0.1 mM ¹⁵N-gelabeltem c' Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit den Liganden 1, 5, 9, 41, 48 und 73 berechnet. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen. Die Berechnung der korrigierten Standardabweichung zu Null (σ_0^{corr}) erfolgte nach Schumann (2007).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Liganden 1, 5, 9 und 41 ist in Tabelle 4.10 dargestellt. Substanz 48 zeigt vor allem bei den Aminosäuren 16, 88, 102 und 147-149 große Änderungen der chemischen Verschiebungen. Diese Aminosäuren sind vor allem Lysine und Arginine. Die Positionen können nicht den oben genannten Bindungsstellen im Protein zugeordnet werden. Ebenso verhält es sich bei Ligand 73, welcher vor allem bei den Aminosäuren 48-57 Auffälligkeiten zeigt. Beide Liganden sind nicht aromatisch. Alle weiteren Ergebnisse sind in Abbildung 4.33 bis Abbildung 4.35 sowie Tabelle 4.11 und Tabelle 4.12 veranschaulicht.

		Position A	Position B	Position C
1	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	-	55, 72, 75	96
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	-	53, 56	97
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	-	40	-
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	-	74	-
5	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	13, 28, 31, 32	53	95, 124
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	65	56, 39, 40	94, 103
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	35, 58, 63	75	-
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	-	47, 74	-
9	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	29, 31, 32	43, 48	96, 99
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	28, 58, 64, 65	39, 74, 75	95, 113, 125, 142
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	59	40, 79	-
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	35, 63	-	-
41	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	35, 58, 59, 63	39, 40, 75	-
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	-	-	-
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	-	-	-
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	-	74	-

Tabelle 4.10: Relative kombinierte chemische Verschiebungen in c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp durch Liganden 1, 5, 9 und 41. Die kombinierten chemischen Verschiebungen wurden auf den höchsten Effekt normiert und in Untergruppen eingeteilt.

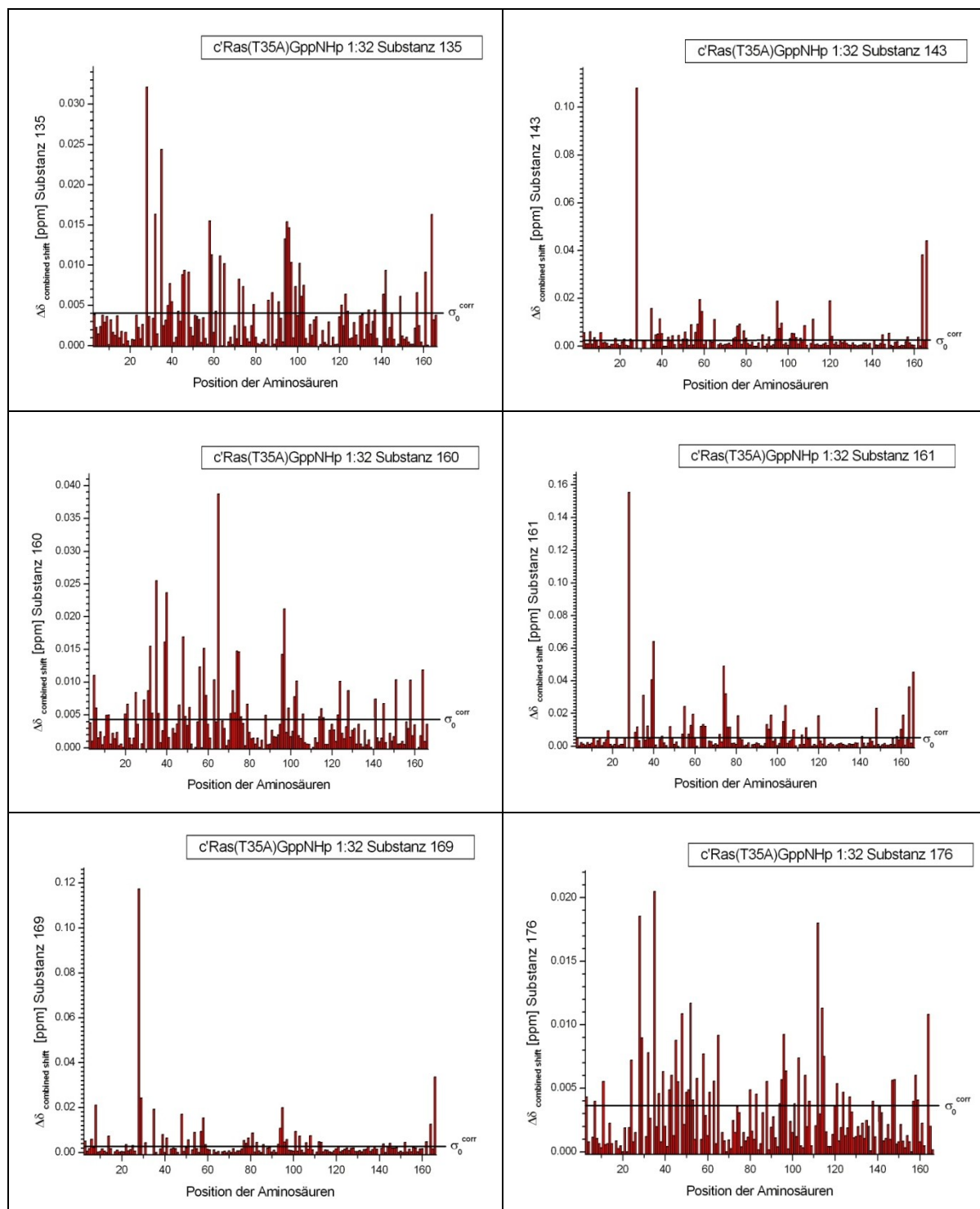


Abbildung 4.33: Balkendiagramm der kombinierten chemischen Verschiebungen gegen die Positionen der Aminosäuren von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp durch Titration der Liganden 135, 143, 160, 161, 169 und 176. Die kombinierten chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{\text{combined shift}}$) wurden mit Formel 3.3 aus (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Titrationsen von 0.1 mM ¹⁵N-gelabeltem c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit den Liganden 135, 143, 160, 161, 169 und 176 berechnet. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen. Die Berechnung der korrigierten Standardabweichung zu Null (σ_0^{corr}) erfolgte nach Schumann (2007).

		Position A	Position B	Position C
135	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	-	38, 39, 40, 74, 79	86, 88, 91, 99, 102, 103, 121, 123, 149, 157, 161
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	59, 63, 65	45, 46, 48, 72	94, 97, 101, 142
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	32, 58	-	95, 96, 164
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	28, 35	47	-
143	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	58	-	95, 120
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	-	-	164, 166
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	-	-	-
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	28	-	-
160	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	6, 21, 25, 29, 31, 59	46, 51, 72, 79	99, 102, 115, 128, 141, 145
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	5, 32, 58, 63	39, 48, 56, 74, 75	96, 103, 124, 151, 158, 164
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	2, 35	40	97
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	65	-	-
161	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	35	55, 75	104, 164
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	-	39, 40, 74	166
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	-	-	-
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	28	-	-
169	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	8, 29, 35	-	95, 164
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	-	-	166
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	-	-	-
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	28	-	-
176	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	11, 24, 29, 32, 39, 55, 58, 63, 65	43, 45, 46	88, 95, 97, 103, 106, 115, 121, 147, 148, 158
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	52	48	96, 114, 164
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	28, 35	-	112

Tabelle 4.11: Relative kombinierte chemische Verschiebungen in c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp durch Liganden 135, 143, 160, 161, 169 und 176. Die kombinierten chemischen Verschiebungen wurden auf den höchsten Effekt normiert und in Untergruppen eingeteilt.

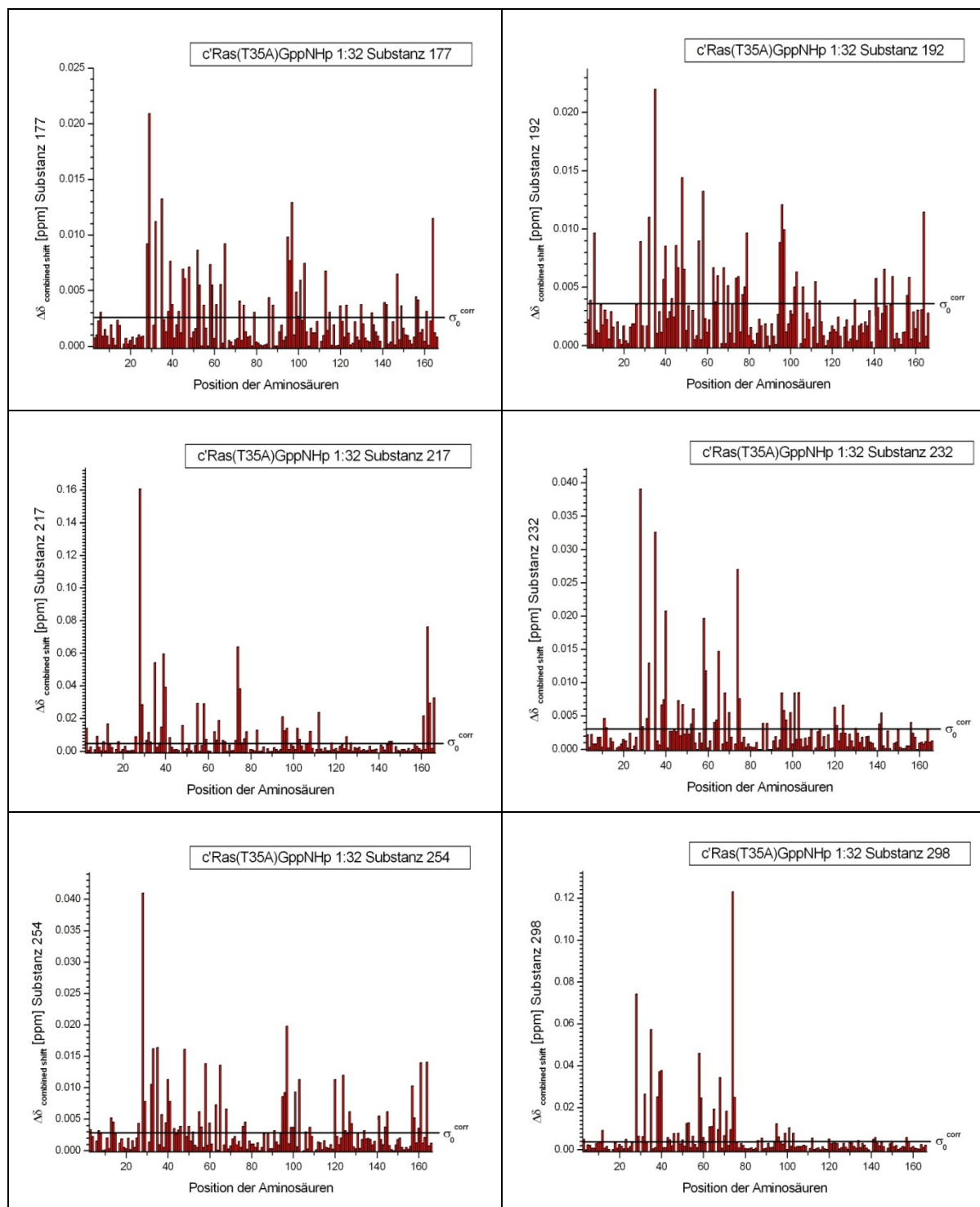


Abbildung 4.34: Balkendiagramm der kombinierten chemischen Verschiebungen gegen die Positionen der Aminosäuren von c'ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp durch Titration der Liganden 177, 192, 217, 232, 254 und 298. Die kombinierten chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{\text{combined shift}}$) wurden mit Formel 3.3 aus (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Titrationsen von 0.1 mM ¹⁵N-gelabeltem c'ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit den Liganden 177, 192, 217, 232, 254 und 298 berechnet. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen. Die Berechnung der korrigierten Standardabweichung zu Null (σ_0^{corr}) erfolgte nach Schumann (2007).

		Position A	Position B	Position C
177	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	-	40, 55, 72, 74	86, 88, 99, 120, 123, 130, 141, 142, 149, 156, 157
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	28, 58, 59, 63, 65	39, 45, 46, 48, 52, 53	95, 96, 101, 103, 113, 147
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	32, 35	-	97, 102, 164
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	29	-	-
192	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	4, 9, 26, 64	43, 51, 70, 72, 77, 78	102, 106, 112, 114, 131, 156
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	6, 28, 63, 65, 68	39, 40, 45, 46, 49, 56, 74, 75, 79	95, 103, 141, 145, 149, 157
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	32, 58	48	96, 97, 164
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	35	-	-
217	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	29	40, 55, 58, 75	164, 166
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	35	39, 74	-
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	-	-	163
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	28	-	-
232	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	-	38, 39, 46, 48, 53, 68, 75	95, 101, 103, 120, 124
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	32, 59, 65	-	-
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	58	40, 74	-
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	28, 35	-	-
254	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	29, 63	41, 55, 68	95, 96, 101, 127, 145
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	32, 33, 35, 58, 65	40, 48	103, 120, 124, 157, 161, 164
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	-	-	97
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	28	-	-
298	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	32, 59, 65	38, 75	-
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	58	39, 40, 68	-
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	35, 28	-	-
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	-	74	-
319	$0.15 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	63	38, 75	-
	$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	35	40	-
	$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	-	-	-
	$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	-	39, 74	-

Tabelle 4.12: Relative kombinierte chemische Verschiebungen in c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp durch Liganden 177, 192, 217, 232, 254, 298 und 319. Die kombinierten chemischen Verschiebungen wurden auf den höchsten Effekt normiert und in Untergruppen eingeteilt.

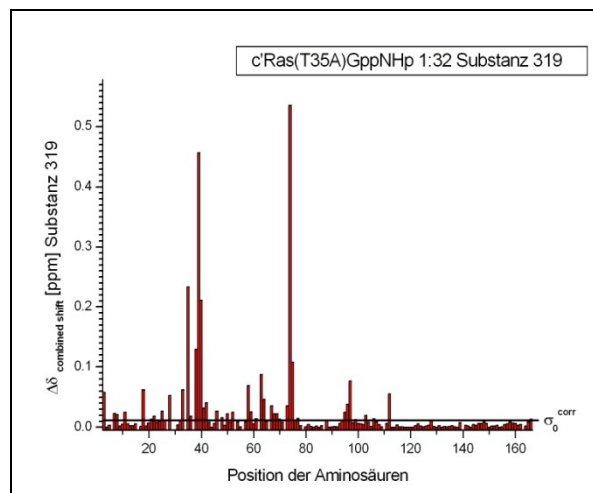


Abbildung 4.35: Balkendiagramm der kombinierten chemischen Verschiebungen gegen die Positionen der Aminosäuren von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp durch Titration des Liganden 319. Die kombinierten chemischen Verschiebungen ($\delta\Delta_{\text{combined shift}}$) wurden mit Formel 3.3 aus (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Titrationsen von 0.1 mM ¹⁵N-gelabeltem c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit dem Liganden 319 berechnet. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen. Die Berechnung der korrigierten Standardabweichung zu Null (σ_0^{corr}) erfolgte nach Schumann (2007).

Bis auf Substanz 1 binden alle anderen Substanzen direkt im aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp an Position A. Des Weiteren ist ersichtlich, dass die Bindung der Substanzen, außer Liganden 143 und 169, auch Aminosäuren an Position B beeinflusst. Die Bindung der Substanzen 41, 298 und 319 führt, im Gegensatz zu allen anderen Liganden, zu keinen chemischen Verschiebungen von Aminosäuren an Position C auf der Rückseite des Proteins. Insbesondere die Bindung der Liganden 135, 143, 160, 161, 169, 176, 177, 192, 217 und 254 führt zu Auffälligkeiten bei Aminosäuren direkt am C-Terminus, His166 und Arg164. Bei all diesen Liganden ist außerdem zu beobachten, dass die Aminosäure Phe28 hohe kombinierte chemische Verschiebungen aufweist.

Die höchsten kombinierten chemischen Verschiebungen von Aminosäuren an Position A, direkt im aktiven Zentrum, zeigen Substanzen 9, 135, 143, 160, 161, 169, 176, 177, 192, 217, 232 und 254. Die größten kombinierten chemischen Verschiebungen der Aminosäuren an Position B werden dagegen durch Bindung der Liganden 1, 5, 41, 298 und 319 hervorgerufen. In keinem Fall ist die höchste kombinierte chemische Verschiebung an einer Aminosäure an Position C, auf der Rückseite des Proteins, zu beobachten.

4.4.4.2 Berechnung der Bindungskonstanten

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten der 19 Maybridge Liganden wurden (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-Titrations durchgeführt, bei denen Schrittweise die entsprechende Substanz zu ^{15}N c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp titriert wurde. Die Berechnung der Bindungskonstanten der Liganden fand analog Kapitel 3.6.2.3 statt. Die chemische Verschiebung der entsprechenden Aminosäuren wurde gegen die Konzentrationen der Substanzen aufgetragen. Gefittet wurden die Daten mit Formel 3.2.

In Abbildung 4.36 bis Abbildung 4.39 sind jeweils die Plots dargestellt, für die der niedrigste K_D -Wert je Ligand ermittelt wurde. Alle berechneten Bindungskonstanten sind zusätzlich in Tabelle 4.13 zusammengefasst.

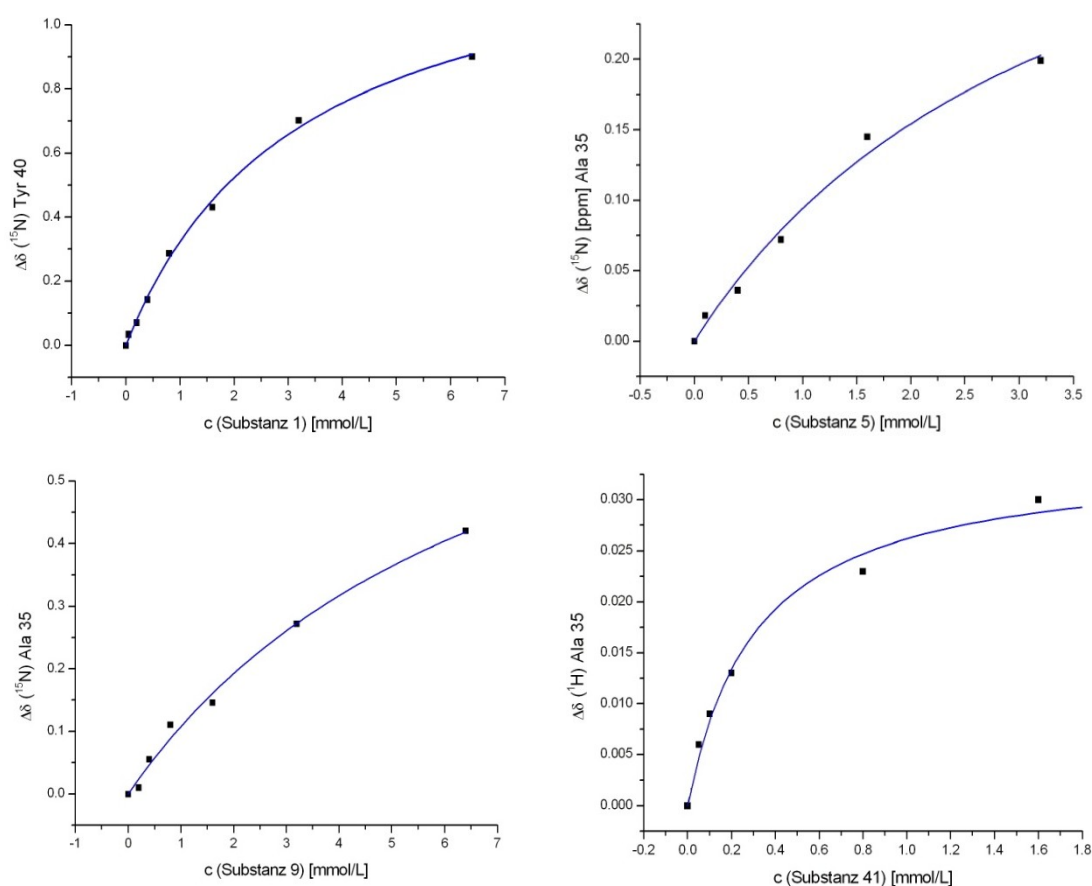


Abbildung 4.36: Plot der chemischen Verschiebungen gegen Konzentrationen der Substanzen 1, 5, 9 und 41. Berechnung der chemischen Verschiebungen aus (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-Titrations von 0.1 mM c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl_2 , 0.2 mM DSS und 10% D_2O . Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen. Die Daten wurden mit Formel 3.2 gefittet, der Fit ist als blaue Linie dargestellt. Die K_D -Werte entsprechen 3.21 ± 0.27 mM für Substanz 1, 3.53 ± 0.99 mM für Substanz 5, 7.36 ± 1.56 mM für Substanz 9 und 0.31 ± 0.05 mM für Substanz 41.

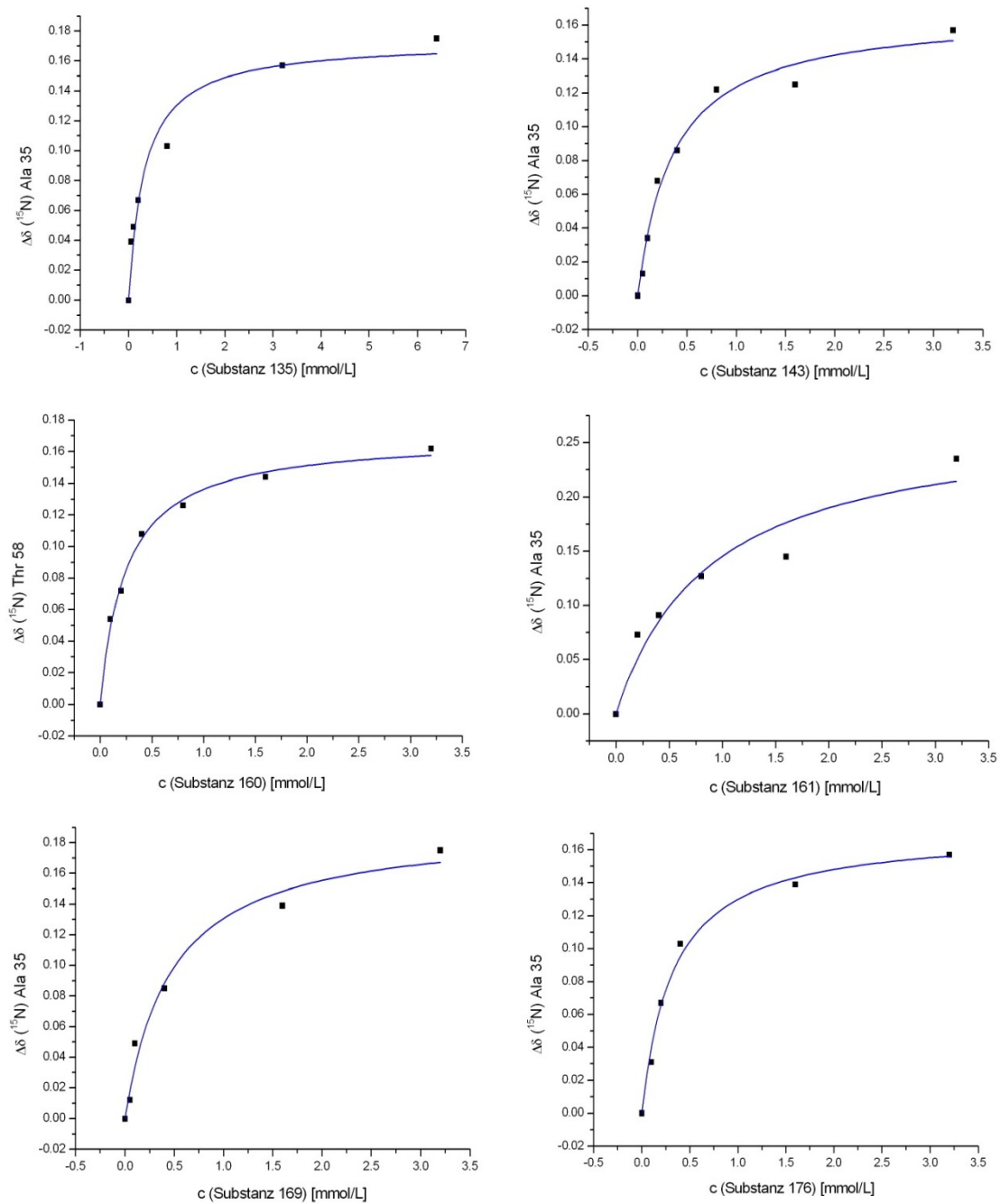


Abbildung 4.37: Plot der chemischen Verschiebungen gegen Konzentrationen der Substanzen 135, 143, 160, 161, 169 und 176. Berechnung der chemischen Verschiebungen aus (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQC-Titrationsen von 0.1 mM c'ras(T35A)•Mg $^{2+}$ •GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl $_2$, 0.2 mM DSS und 10% D $_2$ O. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen. Die Daten wurden mit Formel 3.2 gefittet, der Fit ist als blaue Linie dargestellt. Die K_D -Werte entsprechen 0.33 ± 0.08 mM für Substanz 135, 0.36 ± 0.06 mM für Substanz 143, 0.25 ± 0.02 mM für Substanz 160, 0.88 ± 0.37 mM für Substanz 161, 0.47 ± 0.12 mM für Substanz 169 und 0.32 ± 0.05 mM für Substanz 176.

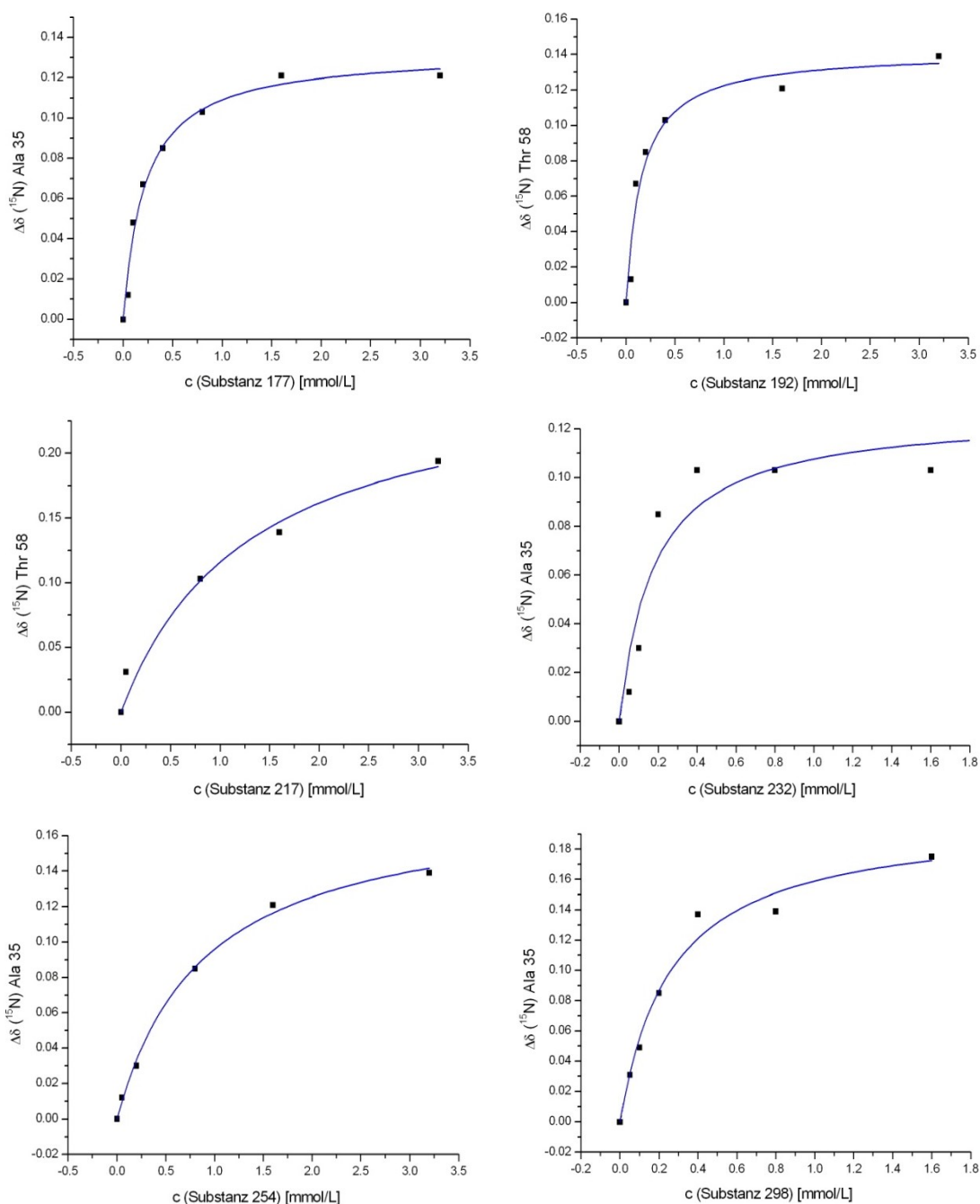


Abbildung 4.38: Plot der chemischen Verschiebungen gegen Konzentrationen der Substanzen 177, 192, 217, 232, 254 und 298. Berechnung der chemischen Verschiebungen aus (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-Titrationsen von 0.1 mM c’Ras(T35A)•Mg $^{2+}$ •GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl $_2$, 0.2 mM DSS und 10% D $_2$ O. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen. Die Daten wurden mit Formel 3.2 gefittet, der Fit ist als blaue Linie dargestellt. Die K_D -Werte entsprechen 0.22 ± 0.03 mM für Substanz 177, 0.16 ± 0.04 mM für Substanz 192, 1.30 ± 0.54 mM für Substanz 217, 0.17 ± 0.08 mM für Substanz 232, 0.88 ± 0.10 mM für Substanz 254 und 0.26 ± 0.05 mM für Substanz 298.

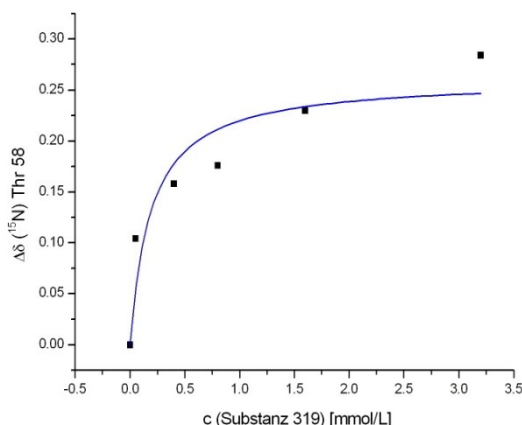


Abbildung 4.39: Plot der chemischen Verschiebungen gegen Konzentrationen der Substanz 319. Berechnung der chemischen Verschiebungen aus (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-Titration von 0.1 mM c'Ras(T35A)•Mg $^{2+}$ •GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl $_2$, 0.2 mM DSS und 10% D $_2$ O. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen. Die Daten wurden mit Formel 3.2 gefittet, der Fit ist als blaue Linie dargestellt. Der K_D -Wert entspricht 0.19 ± 0.13 mM für Substanz 319.

Substanz	K_D [mol/L]						
	Ala 35	Thr 58	Ala 59	Phe 28	Tyr 40	Thr 74	His 166
1	-	-	-	-	3.21 ± 0.27	4.19 ± 0.40	-
5	3.53 ± 0.99	-	-	3.15 ± 1.15	-	-	-
9	7.36 ± 1.56	-	-	-	-	-	-
41	0.31 ± 0.05	-	0.58 ± 0.04	-	2.96 ± 1.04	4.14 ± 0.96	-
135	0.33 ± 0.08	0.40 ± 0.13	-	0.56 ± 0.23	-	-	-
143	0.36 ± 0.06	0.42 ± 0.15	-	1.93 ± 0.50	-	-	↑ mM
160	0.49 ± 0.20	0.25 ± 0.02	-	-	-	-	-
161	0.88 ± 0.37	-	-	1.65 ± 0.35	0.77 ± 0.05	-	8.6 ± 2
169	0.47 ± 0.12	-	-	1.96 ± 0.26	-	-	13.9 ± 7.3
176	0.32 ± 0.05	-	-	0.77 ± 0.15	-	-	-
177	0.22 ± 0.03	0.11 ± 0.07	-	-	-	-	-
192	0.23 ± 0.10	0.16 ± 0.04	-	-	-	-	-
217	0.87 ± 0.36	1.30 ± 0.54	-	↑ mM	-	-	↑ mM
232	0.17 ± 0.08	0.28 ± 0.09	-	0.45 ± 0.13	0.81 ± 0.22	-	-
254	0.88 ± 0.10	1.29 ± 1.05	-	0.45 ± 0.15	-	-	-
298	0.26 ± 0.05	-	-	1.25 ± 0.64	-	↑ mM	-
319	0.64 ± 0.37	0.19 ± 0.13	-	-	-	↑ mM	-

Tabelle 4.13: Bindungskonstanten der Liganden der Maybridge Library an unterschiedliche Aminosäuren von c'Ras(T35A)•Mg $^{2+}$ •GppNHp. Berechnung der chemischen Verschiebungen aus (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-Titrationen von 0.1 mM c'Ras(T35A)•Mg $^{2+}$ •GppNHp in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl $_2$, 0.2 mM DSS und 10% D $_2$ O. Die Daten wurden mit Formel 3.2 gefittet. Blau hinterlegt sind die Werte zu den Plots dargestellt in Abbildung 4.36 bis Abbildung 4.39.

Bis auf Substanz 1, die 3.21 ± 0.27 mM an Position B bindet, weisen alle Liganden ihre höchsten Bindungskonstanten an Position A direkt im aktiven Zentrum von $c'Ras(T35A) \cdot Mg^{2+} \cdot GppNHp$ auf. Dabei binden Substanzen 5 und 9 im millimolaren Bereich, alle weiteren zeigen K_D -Werte im Bereich zwischen 110 und 880 μM . Die Bindungskonstanten für die Position am C-Terminus (His166) sind alle im höheren millimolaren Bereich ≥ 8.6 mM angesiedelt.

4.5 STD-NMR von Derivaten des Zn^{2+} -Cyclens an $c'Ras(T35A) \cdot Mg^{2+} \cdot GppNHp$

Die hier verwendeten Zn^{2+} -Cyclen-Derivate TG-ZC-023, -025, -132, -331, -332, -333, -334, -431 und -432 (Strukturen siehe Tabelle 4.14) wurden von T. Graf (Dissertation, Universität Regensburg) synthetisiert und mittels *WaterLOGSY*-NMR-Messungen nach Dalvit (2001) auf Bindung an $Ras(T35A) \cdot Mg^{2+} \cdot GppNHp$ überprüft. Dabei wurde festgestellt, dass Substanzen TG-ZC-331 sowie TG-ZC-333 gut an aktiviertem Ras in Zustand 1 binden, die restlichen Moleküle werden als schwach bindend angegeben.

Zur Überprüfung mittels einer weiteren Methode und Bestätigung dieser Ergebnisse wurden die Derivate des Zn^{2+} -Cyclens nach ihrer Vorbereitung (siehe Kapitel 3.3.2.3) durch STD-NMR-Spektroskopie auf Bindung an $c'Ras(T35A) \cdot Mg^{2+} \cdot GppNHp$ untersucht. Bei jeder Substanz wurde anschließend ein STD-NMR Blindtest ohne Protein durchgeführt, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen.

Hierbei zeigten die Substanzen TG-ZC-132, TG-ZC-333 und TG-ZC-334 die höchsten relativen STD-Effekte in den Differenz-Spektren der Messungen mit Protein, wohingegen in den Blindtests keine Signale in den Differenz-Spektren zu erkennen waren (siehe Abbildung 4.40). Diese Moleküle beinhalten alle die aromatische Aminosäure Phenylalanin, welche mit dem Cyclen über eine Amid-Bindung verknüpft ist. Die restlichen Derivate zeigen nur sehr geringe bis gar keine Unterschiede in den Signalintensitäten der Differenz-Spektren der Lösungen mit Ras verglichen mit den Blindtests, weshalb ihnen mittels STD-NMR unter gegebenen Bedingungen keine eindeutige Bindung an das Ras-Protein $c'Ras(T35A) \cdot Mg^{2+} \cdot GppNHp$ nachgewiesen werden konnte.

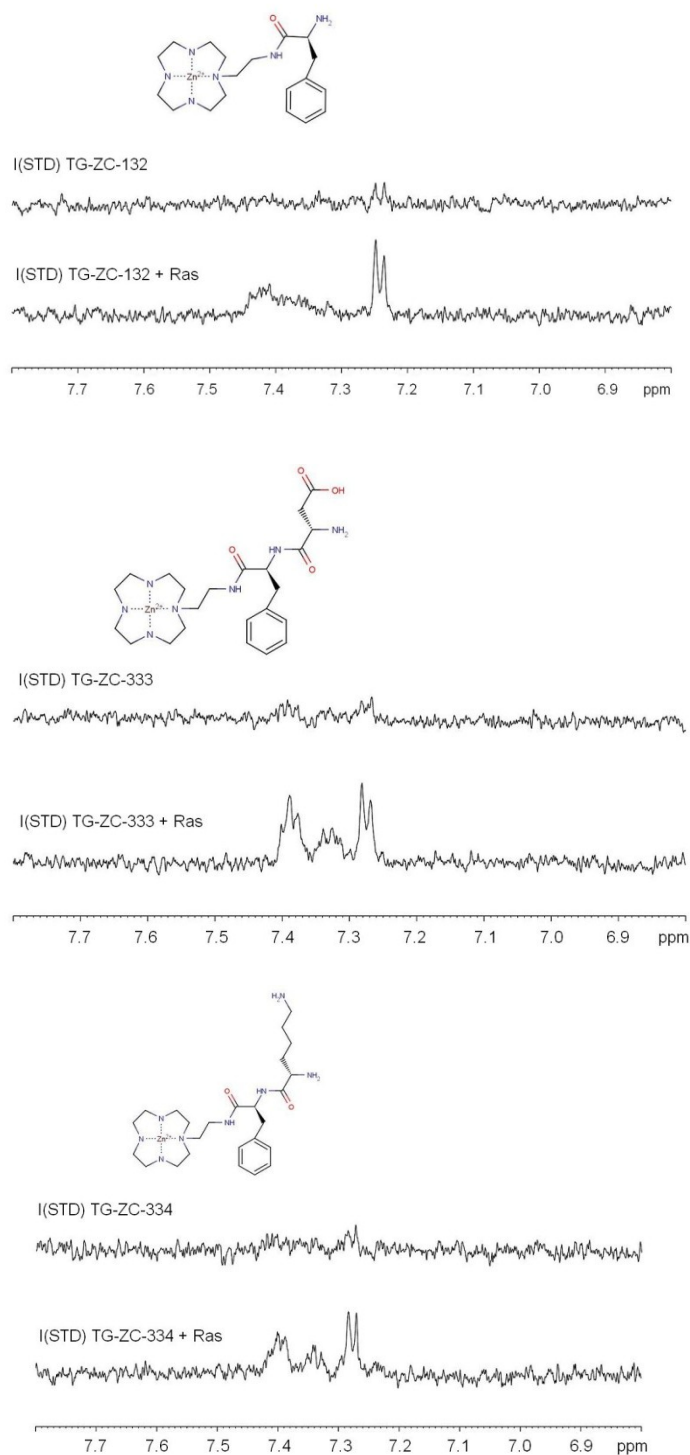


Abbildung 4.40: Ausschnitte aus den Differenz-STD-NMR-Spektren der Liganden TG-ZC-132, -333 und -334 mit c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bzw. ohne Ras als Blindtest. Die Proben enthielten je 1 mM Substanz in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM DSS, 10% D₂O mit bzw. ohne 20 µM c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die *on*- bzw. *off*-Resonanz Einstrahlfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen.


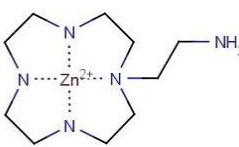
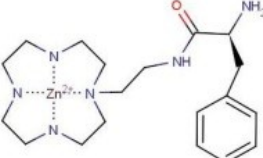
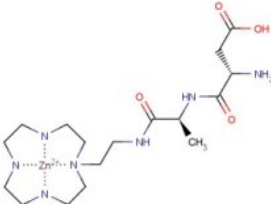
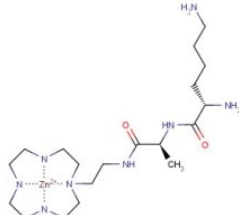
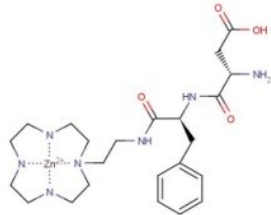
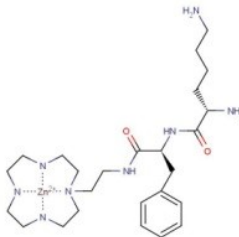
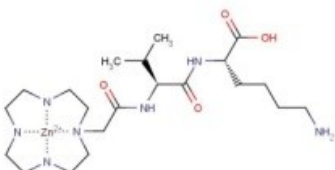
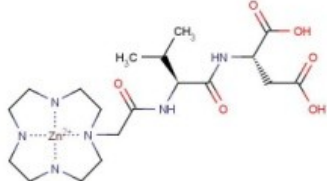
		
TG-ZC-023	TG-ZC-025	TG-ZC-132
		
TG-ZC-331	TG-ZC-332	TG-ZC-333
		
TG-ZC-334	TG-ZC-431	TG-ZC-432

Tabelle 4.14: 2D Strukturen der Zn^{2+} -Cyclen Derivate TG-ZC-023, -025, -132, -331, -332, -333, -334, -431 und -432

4.6 Charakterisierung der Doppelmutante

c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp

Wie bereits in Kapitel 1.3.5 beschrieben, binden sowohl Zn²⁺-Cyclen als auch Zn²⁺-BPA bevorzugt an aktives Ras in Zustand 1. Hierbei wurden von I. Rosnizeck (Dissertation, Universität Regensburg) mittels (¹H-¹⁵N)-HSQC-NMR für jedes Molekül zwei Bindungsstellen im Protein c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp ermittelt. Die Aminosäuren welche durch Bindung der Metall-Cyclenen am meisten beeinflusst werden, sind an Bindungsstelle 1 (Position A) nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids Gly13, Tyr32, Ala59, Gly60 und Gln61. Die zweite Bindungsstelle ist im negativ geladenen L7-Loop auf der Rückseite lokalisiert (Position C) wobei vor allem die Aminosäuren nahe dem C-Terminus, Glu162, Gln165 und His166 betroffen sind. Zn²⁺-BPA bindet ebenfalls an der Rückseite des Proteins, analog der M²⁺-Cyclene an Position C. Die andere Bindungsstelle unterscheidet sich jedoch, da das BPA nicht direkt im aktiven Zentrum bindet, sondern vor allem die Aminosäuren 39, 40 und 53-58 Änderungen in ihren chemischen Verschiebungen zeigen (Position B). Beiden unterschiedlichen Liganden ist also eine Bindungsstelle weit entfernt des aktiven Zentrums am C-Terminus, bei der vor allem das Histidin 166 betroffen ist, gemein. Das Protein c'Ras(T35A) wurde daraufhin in Auftrag an Position 166 zu einem Alanin mutiert (siehe Kapitel 2.3) um diese zweite Bindungsstelle möglicherweise ausschließen zu können.

4.6.1 Vergleich der (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Spektren von

c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit der Doppelmutante

c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp

Wie bereits in Kapitel 4.6 beschrieben, ist die Mutante Ras(T35A, H166A) von großem Interesse. Nicht nur die Bindung der M²⁺-Cyclene und M²⁺-BPA (Rosnizeck, Dissertation 2010) sondern auch einige der Substanzen der Maybridge Library (siehe Kapitel 4.4.4.1) sowie die Liganden der ZINC Bibliothek (siehe Kapitel 4.3.2.1) führen zu Änderungen in den chemischen Verschiebungen der Aminosäuren am C-Terminus.

Um genauer zu untersuchen, wie sich nun die neue Mutante c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp im Vergleich zu c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp verhält, wurden (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Spektren aufgenommen und analog Kapitel 3.6.2.2 ausgewertet. Die kombinierten chemischen Verschiebungen sind in

einem Balkendiagramm (siehe Abbildung 4.41) gegen die Positionen der Aminosäuren aufgetragen.

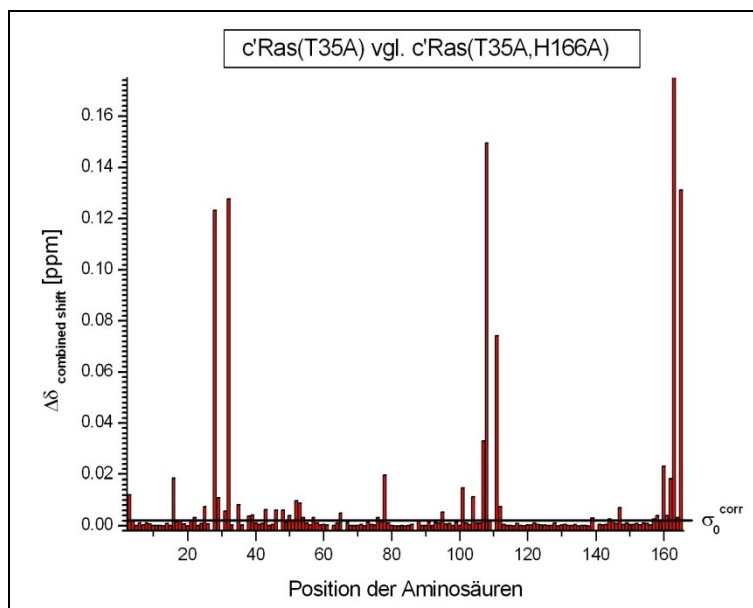


Abbildung 4.41: Balkendiagramm der kombinierten chemischen Verschiebungen gegen die Positionen der Aminosäuren von c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp im Vergleich mit c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die kombinierten chemischen Verschiebungen ($\delta\Delta_{\text{combined shift}}$) wurden mit Formel 3.3 aus (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Experimenten von 0.1 mM ¹⁵N-gelabeltem c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp und 0.1 mM ¹⁵N-gelabeltem c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp berechnet. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen. Die Berechnung der korrigierten Standardabweichung zu Null (σ_0^{corr}) erfolgte nach Schumann (2007).

Die größte chemische Verschiebung zeigte wie erwartet das Ala166. Im c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp befindet sich das His166 an Position 125.291 ppm (¹⁵N) / 7.704 ppm (¹H), dagegen das Ala166 der neuen Mutante c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp an Position 130.049 ppm (¹⁵N) / 7.570 ppm (¹H). Da die kombinierte chemische Verschiebung dementsprechend einen sehr hohen Wert von 15.4 ppm aufweist, ist diese Aminosäure aus dem Balkendiagramm Abbildung 4.41 und den Ergebnissen in Tabelle 4.15 ausgeschlossen.

Wie deutlich zu erkennen ist, zeigen vor allem die Aminosäuren nahe des Ala166, von Val160 bis Gln165 sowie Asp107, Asp108 und Met111 große kombinierte chemische Verschiebungen. Außerdem fallen die Aminosäuren Phe28 und Tyr32 durch hohe $\Delta\delta_{\text{combined}}$ auf. Diese Aminosäuren befinden sich nicht in der Nähe des C-Terminus, sondern auf der anderen Seite des Proteins, im aktiven Zentrum.

	Position A	Position C
$0.10 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.25$	3, 16, 29	78, 101, 107, 160, 162
$0.25 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.50$	-	111
$0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$	28, 32	108, 165
$0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1.00$	-	163

Tabelle 4.15: Relative kombinierte chemische Verschiebungen in c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp im Vergleich zu c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Die kombinierten chemischen Verschiebungen wurden auf den höchsten Effekt normiert und in Untergruppen eingeteilt.

4.6.2 STD-NMR von Zn²⁺-Cyclen und Zn²⁺-BPA an c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp

Wie in Kapitel 4.6.1 mittels (¹H-¹⁵N)-*sofast*-HMQC ermittelt, führte die Mutation an Aminosäureposition 166 von einem Histidin zum Alanin wie erwartet zu einer Änderung der chemischen Verschiebungen der Aminosäuren Glu162, Gln165 und His166 nahe dem C-Terminus sowie der dazu benachbarten Positionen Asp108 und Met111. Des Weiteren zeigten Aminosäuren Phe28 und Tyr32 im aktiven Zentrum eine Veränderung in den chemischen Verschiebungen.

Um festzustellen, ob die Liganden Zn²⁺-Cyclen und Zn²⁺-BPA an dieses doppelt mutierte c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp binden, wurden STD-NMR-Experimente durchgeführt. Ebenso wurden beide Liganden zum Vergleich unter identischen Bedingungen mit c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp vermessen. Zusätzlich fanden Blindtests ohne Protein zur Vermeidung falsch positiver Ergebnisse statt.

Wie in Abbildung 4.42 eindeutig zu erkennen ist, sind die Signale beider Liganden in den Differenz-Spektren der Lösungen mit c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp sowie c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp deutlich zu erkennen und nahezu identisch. Damit binden sowohl Zn²⁺-Cyclen als auch Zn²⁺-BPA ebenfalls an die neue Mutante c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp.

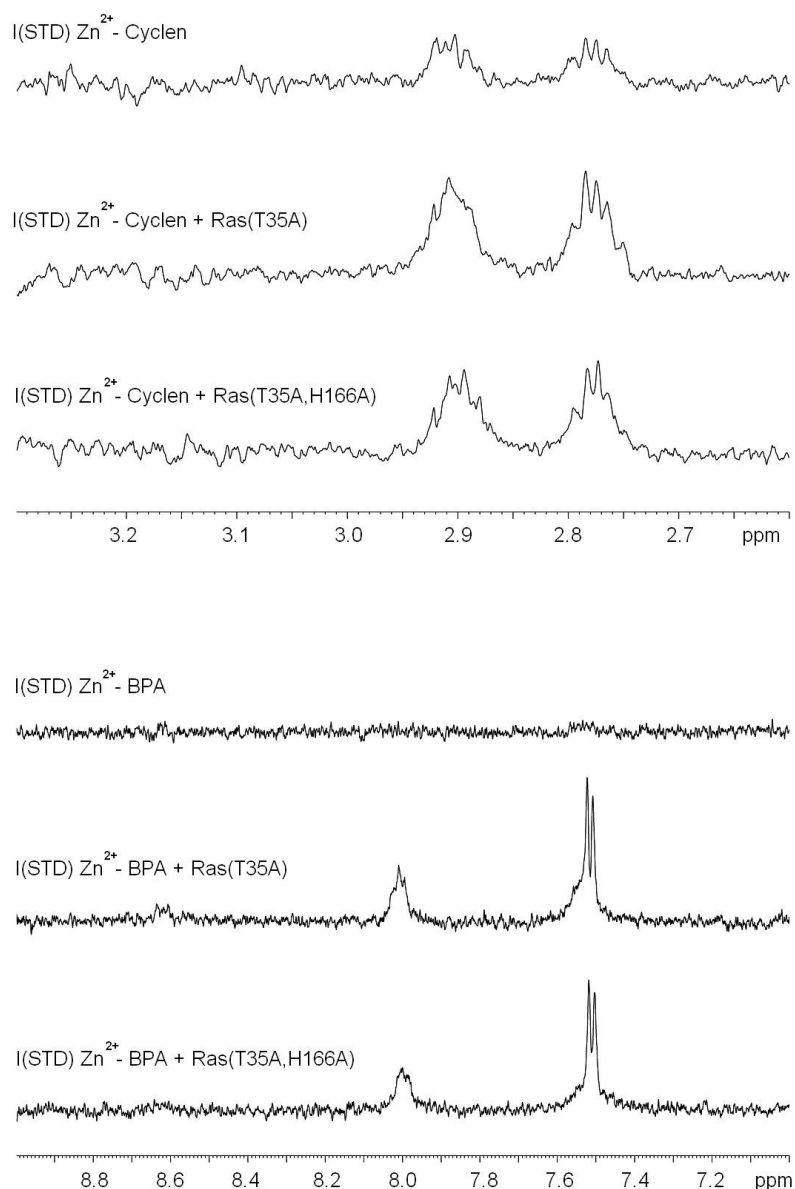


Abbildung 4.42: Ausschnitte aus den Differenz-STD-NMR-Spektren der Liganden Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA mit c'Ras(T35A, H166A)• Mg^{2+} •GppNHp bzw. mit c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp bzw. ohne Ras als Blindtest. Die Proben enthielten je 500 μM Ligand in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl_2 , 0.2 mM DSS, 10% D_2O mit 5 μM c'Ras(T35A, H166A)• Mg^{2+} •GppNHp bzw. 5 μM c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp bzw. ohne Ras. Die on- bzw. off-Resonanz Einstrahlfrequenzen betrugen -2 ppm bzw. +40 ppm und die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung 40 dB. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 294 K aufgenommen.

4.6.3 (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-Titrations von $\text{c'Ras(T35A, H166A)}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ mit Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA

Durch STD-NMR-Experimente wurde in Kapitel 4.6.2 gezeigt, dass die bereits bekannten Liganden Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA an die neue Mutante $\text{c'Ras(T35A, H166A)}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ binden. Um diese Bindung nun genauer zu charakterisieren, wurden (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-Titrations durchgeführt. Dabei sollten sowohl die Bindungsstellen im Protein als auch die Bindungskonstanten ausfindig gemacht werden.

Wie durch Rosnizeck (Dissertation, Universität Regensburg) ermittelt wurde, binden sowohl Zn^{2+} -Cyclen als auch Zn^{2+} -BPA an $\text{c'Ras(T35A)}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ nicht nur im (Position A, Cyclen) und nahe (Position B, BPA) des aktiven Zentrums sondern auch an Position C auf der Rückseite des Proteins an His166. Nun sollte festgestellt werden, ob diese Bindungsstelle auch in der Mutante $\text{c'Ras(T35A, H166A)}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ noch vorhanden ist oder ausgeschlossen werden kann.

4.6.3.1 Bestimmung der Bindungsstellen

Die Bestimmung der Bindungsstellen von Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA an $\text{c'Ras(T35A, H166A)}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ erfolgte analog Kapitel 3.6.2.2. Hierbei wurde jeweils 0.1 mM $\text{c'Ras(T35A, H166A)}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ bei 278 K mit dem betreffenden Liganden titriert. Die berechneten kombinierten chemischen Verschiebungen (siehe Formel 3.3) wurden dann gegen die Positionen der Aminosäuren aufgetragen. Dargestellt sind die zwei entsprechenden Balkendiagramme in Abbildung 4.43.

Hierbei ist zu erkennen, dass die Bindung von Zn^{2+} -Cyclen an $\text{c'Ras(T35A, H166A)}\cdot\text{Mg}^{2+}\cdot\text{GppNHp}$ vor allem Aminosäuren im aktiven Zentrum an Position A betrifft. Auch an Position C zeigen die Aminosäuren Ala166 und Ile163 relative $\Delta\delta_{\text{comb}}$ von 0.25 bis 0.50.

Die Bindung von Zn^{2+} -BPA dagegen zeigt nur noch deutliche kombinierte chemische Verschiebungen bei Aminosäuren in Position B. Keine der Aminosäuren an Position C zeigt eine relative $\Delta\delta_{\text{comb}}$ von mehr als 0.15.

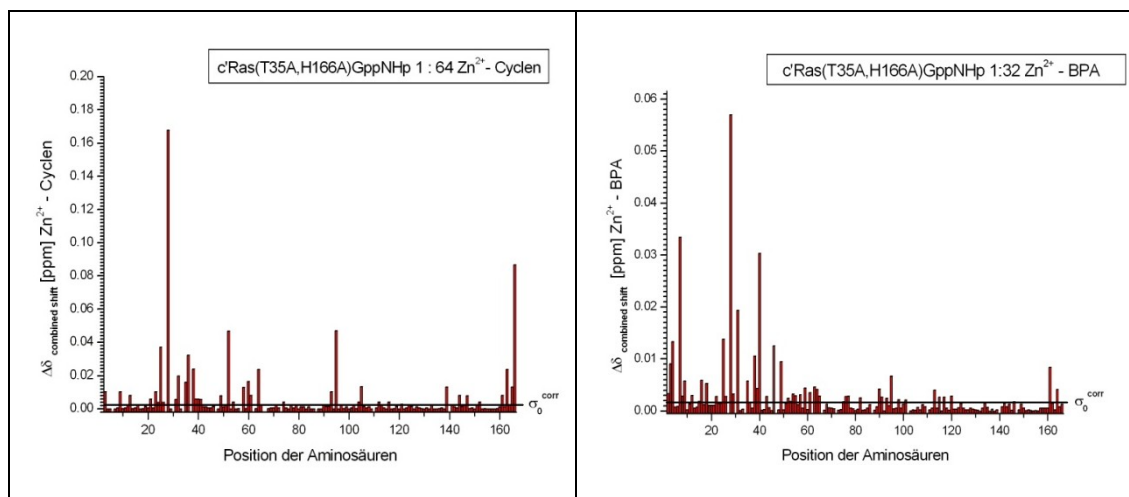


Abbildung 4.43: Balkendiagramm der kombinierten chemischen Verschiebungen gegen die Positionen der Aminosäuren von c' Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp durch Titration der Liganden Zn²⁺-Cyclen und Zn²⁺-BPA. Die kombinierten chemischen Verschiebungen ($\delta\Delta_{\text{combined shift}}$) wurden mit Formel 3.3 aus (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Titrationsen von 0.1 mM ¹⁵N-gelabeltem c' Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp mit den Liganden Zn²⁺-Cyclen und Zn²⁺-BPA berechnet. Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen. Die Berechnung der korrigierten Standardabweichung zu Null (σ_0^{corr}) erfolgte nach Schumann (2007).

		Position A	Position B	Position C
Zn²⁺-Cyclen	0.15 < $\Delta\delta_{\text{comb}}$ < 0.25	25, 63, 64	-	-
	0.25 < $\Delta\delta_{\text{comb}}$ < 0.50	36, 38, 39, 52	-	95, 163, 166
	0.50 < $\Delta\delta_{\text{comb}}$ < 0.75		-	-
	0.75 < $\Delta\delta_{\text{comb}}$ < 1.00	28	-	-
Zn²⁺-BPA	0.15 < $\Delta\delta_{\text{comb}}$ < 0.25	-	3, 4, 38, 46, 49, 25	-
	0.25 < $\Delta\delta_{\text{comb}}$ < 0.50	-	31	-
	0.50 < $\Delta\delta_{\text{comb}}$ < 0.75	-	7, 40	-
	0.75 < $\Delta\delta_{\text{comb}}$ < 1.00	-	28	-

Tabelle 4.16: Relative kombinierte chemische Verschiebungen in c' Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp durch Liganden Zn²⁺-Cyclen und Zn²⁺-BPA. Die kombinierten chemischen Verschiebungen wurden auf den höchsten Effekt normiert und in Untergruppen eingeteilt.

4.6.3.2 Berechnung der Bindungskonstanten

Zur Bestimmung der Bindungskonstanten von Zn^{2+} -Cyclen bzw. Zn^{2+} -BPA an $\text{c'Ras(T35A, H166A)•Mg}^{2+}\text{•GppNHp}$ wurden $(^1\text{H-}^{15}\text{N})$ -*sofast*-HMQC-Experimente durchgeführt, bei denen Schrittweise die entsprechende Substanz zu ^{15}N $\text{c'Ras(T35A, H166A)•Mg}^{2+}\text{•GppNHp}$ titriert wurde.

Die Berechnung der Bindungskonstanten fand analog Kapitel 3.6.2.3 statt. Die chemische Verschiebung der entsprechenden Aminosäuren wurde gegen die Konzentrationen der Substanzen aufgetragen. Die Daten wurden mit Formel 3.2 gefittet.

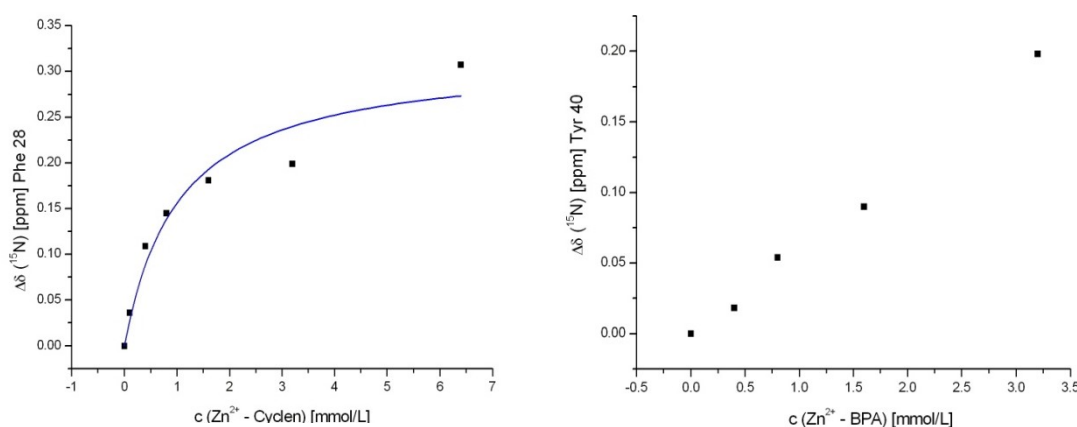


Tabelle 4.17: Plot der chemischen Verschiebungen gegen Konzentrationen von Zn^{2+} -Cyclen bzw. Zn^{2+} -BPA. Berechnung der chemischen Verschiebungen aus $(^1\text{H-}^{15}\text{N})$ -*sofast*-HMQC-Titrationsen von 0.1 mM $\text{c'Ras(T35A, H166A)•Mg}^{2+}\text{•GppNHp}$ in 40 mM Tris/HCl pH=7.4, 10 mM MgCl_2 , 0.2 mM DSS und 10% D_2O . Alle Spektren wurden bei einer Temperatur von 278 K aufgenommen. Die Daten wurden mit Formel 3.2 gefittet, der Fit ist als blaue Linie dargestellt. Der K_D -Wert von Zn^{2+} -Cyclen entspricht 1.04 ± 0.37 mM.

Zn^{2+} -Cyclen wurde bis zu einem 64fachen Überschuss titriert und bindet mit einer Bindungskonstante von 1.04 ± 0.37 mM an $\text{c'Ras(T35A, H166A)•Mg}^{2+}\text{•GppNHp}$. Zn^{2+} -BPA konnte nur bis zu einem 32fachen Überschuss titriert werden, da es bei höheren Zugaben zu einer Ausfällung des Proteins kam. Die Plots der Aminosäuren Phe28 und Tyr40 des Liganden Zn^{2+} -BPA ergaben einen linearen Verlauf. Der K_D -Wert liegt demnach über dem gemessenen Bereich von 3.2 mM.

5 Diskussion

5.1 Virtuelles Screening an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit LUDI

Das virtuelle Screening ist mittlerweile ein wichtiger Bestandteil im Prozess der Arzneimittelentwicklung geworden und wird neben dem *High-Throughput* Screening (Fox (1999)) als Methode zur Leadstruktur Entwicklung verwendet. Zwei Ansätze werden dabei verfolgt: der *fragment-based* Ansatz (Bajorath (2002)), welcher auf der Struktur bereits bekannter Liganden basiert, und der *receptor-based* Ansatz (Gohlke (2002)), bei dem von der bekannten 3D Struktur eines beliebigen Targets ausgegangen wird. Die heutzutage am häufigsten verwendete Software zum virtuellen Screening wurde von McInnes (2007) beschrieben. Es sind *Docking* Programme wie Gold (Jones (1997)), Dock (Ewing (2001)), Glide (Halgren (2004) Friesner (2004)), FlexX (Kramer (1999)), Fred (McGann (2003)) und LigandFit (Venkatachalam (2003)). Diese Methoden haben bereits sehr erfolgreich zur Entwicklung für Medikamente in den Bereichen Krebs (Barril (2005), Li (2004) und Huang (2000)), Alzheimer (Becker (2004), Mizutani (2004) und Zhao (2005)) und vielen weiteren wie Asthma, Depressionen und Entzündungskrankheiten beigetragen. Ein weiteres *Docking* Programm, welches für das virtuelle Screening bei dieser Arbeit verwendet wurde, ist LUDI (Bohm (1992)).

Da das Ras-Protein eine Schlüsselrolle in der Signalweiterleitung der Zelle übernimmt und für 30% aller Tumorentstehungen mitverantwortlich ist (Barbacid (1987)), wird es als Target in der Krebsforschung verwendet. Dabei werden unterschiedliche Wege zur Inhibierung der Signalweiterleitung verfolgt (Wittinghofer (2000)). Im aktiven Protein liegt ein dynamisches Gleichgewicht zweier konformationeller Zustände vor (Geyer (1996)), wobei Zustand 1 bekannter Weise eine reduzierte Affinität gegenüber Effektoren aufweist (Spoerner (2001)). Daher ist eine Möglichkeit der Inhibierung von Ras die Stabilisierung des aktiven Zustandes 1. Beispiele dafür sind die bereits bekannten Liganden Zn²⁺-Cyclen (Spoerner (2005)) und Zn²⁺-BPA (Rosnizeck, Dissertation Universität Regensburg).

Um neue Liganden zur Inhibierung der Ras-Effektor-Wechselwirkung zu ermitteln, wurde ein virtuelles Screening an aktivem Ras in Zustand 1 durchgeführt (siehe Kapitel 3.5). Hierbei wurden vier unterschiedliche Struktur-Bibliotheken für

organische Moleküle verwendet: Ambinter-, Chemstar-, InterBioScreen- und die ZINC Library. Die für das Screening erforderliche 3D Struktur des Proteins c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp wurde von T. Graf (Dissertation, Universität Regensburg) berechnet.

Insgesamt wurden 9.74 Millionen 3D Strukturen kleiner organischer Moleküle an vier definierten Positionen im (Position 1) und um (Positionen 2-4) das aktive Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp gescreent. Hierbei wurden 2 435 Moleküle ermittelt, welche direkt im aktiven Zentrum von aktivem Ras in Zustand 1 an gleicher Stelle wie die M²⁺-Cyclene binden. 17 913 der Strukturen wurden von LUDI an Position 2 (Ile36-N) gedockt, 12 484 an Position 3 (GNP-O2') und 2 953 an Position 4 (GNP-N7). Wenn man die ermittelten Positionen in Abbildung 4.1 genauer betrachtet, ist zu erkennen, dass Position 1 sterisch am meisten gehindert ist, wohingegen Positionen 2, 3 und 4 direkt an der Oberfläche des Proteins keine sterische Hinderung erfahren. Dies erklärt, warum für Position 1 am wenigsten Moleküle von LUDI gefunden wurden und die molekularen Massen dieser Liganden mit weniger als 294 g/mol die Kleinsten an den 4 Positionen sind. Obwohl Position 4 durch keine hervorstehende Aminosäure gehindert ist, wurden auch hier im Gegensatz zu den Positionen 2 und 3 wenig Liganden ermittelt. Dies ist jedoch auch die Position mit den wenigsten Wechselwirkungsstellen, was den Befund erklärt.

Die höchsten Scores und damit besten Bindungskonstanten im Bereich von 10⁻⁶ M wurden von Liganden erreicht, welche an Position 1 im aktiven Zentrum nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids binden. Dies ist nicht verwunderlich wenn man die hohe Anzahl der Wechselwirkungsmöglichkeiten an dieser Stelle betrachtet (siehe Abbildung 4.1). Hier können in verschiedene Richtungen Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet werden. Des Weiteren befindet sich diese Position nahe an den negativ geladenen Phosphaten des Nukleotids, welche zusätzlich für Wasserstoffbrücken bzw. Salzbrücken zur Verfügung stehen. Die kleinsten Scores dagegen wurden für die Liganden an Position 4 berechnet. Das liegt an der geringen Anzahl möglicher Wechselwirkungsstellen dieser Position, Liganden können hier weniger Wasserstoffbrücken bzw. hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden.

Für die Position 1 im aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp wurden Liganden ermittelt, welche als Hauptmerkmale Stickstoffe in Form von primären bzw. sekundären Aminen sowie Guanidine und deren Schwefelderivate beinhalten. Viele der Liganden zeigen die Sequenz -N-C-C-N- und besitzen aromatische

Systeme. An Position 1 im Protein stehen vor allem die zum Teil negativ geladenen Sauerstoffe der Aminosäuren Glu63, Tyr32, Ala35, Ala59 und die des Nukleotids GppNHp als Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren bereit (siehe Abbildung 5.1). Dies erklärt, warum auffällig viele funktionelle Gruppen H-Brücken-Donoren wie Amine als Strukturmerkmale der Liganden an dieser Position gefunden wurden. Außerdem ist zu beachten, dass primäre und sekundäre Amine sowie die Guanidine bei physiologischem pH-Wert positiv geladen vorliegen und somit Salzbrücken mit den negativ geladenen Sauerstoffen des GppNHps und der Aminosäure Glu63 ausbilden können.

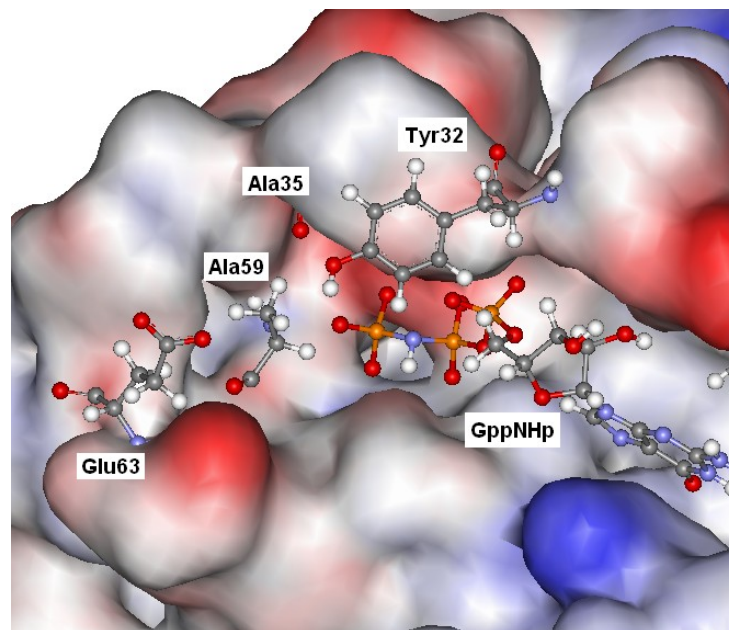


Abbildung 5.1: Wasserstoffbrückenbindungsakzeptoren im aktiven Zentrum von c' Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Oberflächendarstellung der von T. Graf (Universität Regensburg) berechneten Struktur von c' Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp. Das Nukleotid GppNHp und die Aminosäuren Glu63, Ala59, Ala35 und Tyr32 sind als „Ball and Stick“ Modell abgebildet. Die Oberflächenfarben werden durch das elektrostatische Potential angezeigt (rot=negative, blau=positive Oberflächenladung).

Die Liganden für c' Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp, welche von LUDI für die Position 2 (Ile36-N) ermittelt wurden, sind alle aromatisch und besitzen im Durchschnitt drei Ringe. Da die Screening-Position an der Oberfläche des Proteins liegt, wurden auch größere Liganden mit molekularen Massen bis zu 389.45 g/mol gefunden. Die häufigste funktionelle Gruppe ist das Hydrazon (=N-NH-) welches jeweils eine Brücke zwischen zwei Aromaten bildet. Dies kann durch genauere Betrachtung der Position 2 in Abbildung 4.1 erklärt werden, da hier Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor bzw. -donorstellen sehr nahe beieinander liegen. Die

funktionelle Gruppe des Hydrazons weist zwei direkt benachbarte Stickstoffe auf, von denen eines (=N-) als Akzeptor und das andere (-NH-) als Donor agieren kann. Das Screening an Position 3 (GNP-O2') als auch an Position 4 (GNP-N7) ergab Liganden, die alle aromatische Gruppen und zwei bis vier Ringe enthalten. In den meisten Strukturen sind Derivate des Thioharnstoffs zu finden, die zum Teil eine Brücke zwischen zwei Ringen ausbilden. Die aromatischen Gruppen können an diesen beiden Positionen zur Base des Nukleotids hydrophobe Wechselwirkungen ausbilden und der Schwefel des Thioharnstoffs als Wasserstoffbrückenbindungsakzeptor für z.B. die Hydroxylgruppen im Zuckerteil des GppNHps fungieren.

Die Ergebnisse dieses Screenings mit LUDI ergaben eine Vielzahl von neuen Liganden, die virtuell an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp binden. Die Liganden der unterschiedlichen Positionen könnten, wenn diese auch real an diesen Stellen binden, nach der *fragment-based* Methode von Hajduk (2007) miteinander oder mit Zn²⁺-Cyclen verlinkt werden. Dies oder eine entsprechende Modifizierung würde in Liganden mit deutlich erhöhter Bindungsstärke resultieren. Liganden des Screenings an Position 1 sollten analog zu Zn²⁺-Cyclen bzw. Zn²⁺-BPA in der Lage sein, das dynamische Gleichgewicht von aktivem Ras hin zum Zustand 1 zu verschieben und Effektoren zu verdrängen. In diesem Screening wurde nicht ermittelt, ob die Liganden auch an aktives Ras im Zustand 2 binden. In diesem Fall wäre eine Verschiebung des Gleichgewichtes abhängig von den Bindungsstärken eventuell nicht möglich.

5.2 Überprüfung der virtuellen Liganden auf reale Bindung an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mittels STD-NMR-Spektroskopie

Ein erster Schritt im Prozess der Identifizierung einer geeigneten Leadstruktur ist das *High-Throughput* Screening, bei dem eine Vielzahl an Substanzen innerhalb kurzer Zeit biochemischen, genetischen oder pharmakologischen Experimenten unterzogen wird. Um Festzustellen, ob eine Substanz an das Target bindet, werden Methoden wie ELISA, RIA, Immunplot, Oberflächenplasmonenresonanz, NMR und Fluoreszenz-basierte Techniken verwendet. Doch insbesondere die NMR-Methoden bieten gewisse Vorteile. Es ist keine Immobilisierung des Zielproteins notwendig und es besteht die Möglichkeit Liganden aus

Substanzmischungen heraus zu detektieren. Verschiedenste NMR-Arrays wurden bereits für den Nachweis einer Bindung von Liganden an Zielproteine entwickelt (Peng (2004), Pellechia (2008)). Doch eine der mittlerweile gebräuchlichsten Methoden, die für ein NMR-Screening geeignet ist, ist die STD-NMR nach Mayer (1999). Hierbei können Substanzen detektiert werden, die Bindungskonstanten im Bereich zwischen 10^{-8} und 10^{-3} M aufweisen. Die Vorteile dieser Methode liegen in den geringen benötigten (ungelabelten) Protein- und Substanzmengen und der Möglichkeit Epitope zu bestimmen (Mayer (2001)). Des Weiteren sind nur kurze Messzeiten nötig, was diese Methode vor allem im Hinblick auf das Screening vieler Komponenten attraktiv macht. Aufgrund dieser Vorteile wurde innerhalb dieser Arbeit die STD-NMR-Spektroskopie zur Ermittlung von Liganden für das Ras-Protein gewählt. Als Einstrahlfrequenz der Sättigungspulse wurde -2 ppm gewählt um zu gewährleisten, dass keine Liganden direkt gesättigt werden. Des Weiteren wurde die Abschwächung der selektiven Sättigungspulsleistung von 30 dB auf 40 dB erhöht, um ebenfalls falsch positive Ergebnisse zu reduzieren. Bei allen Substanzen die positive Ergebnisse, d.h. eindeutige Signale in den STD- bzw. Differenzspektren lieferten, wurden Blindtests ohne Protein durchgeführt. Dies ist nötig, da es vorkommen kann, dass die Liganden durch Aggregation direkt gesättigt werden und somit zu falsch positiven Resultaten führen.

Im virtuellen Screening mit LUDI (siehe Kapitel 4.1) wurde eine Vielzahl an möglichen neuen Liganden für aktives Ras im Zustand 1 ermittelt. Zur Überprüfung, ob einige dieser Moleküle auch real an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp binden, wurden an sieben der Substanzen (A3, B1, B2, B4, C4, D2 und E3) STD-NMR-Messungen durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.2). Zusätzlich wurde eine Substanz, das *trans*-1,2-Diaminocyclohexan (Substanz N), aus dem virtuellen Screening der ZINC Bibliothek sowie zwei ähnliche aromatische Substanzen, das *ortho*- bzw. *meta*-Aminoanilin, mittels STD-NMR getestet.

Es wurde festgestellt, dass drei der sieben Substanzen aus dem ersten virtuellen Screening, B1, B2 und B4 auch tatsächlich unter den gegebenen STD-NMR Messbedingungen Signale in den Differenzspektren zeigen und somit an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp binden. Zwei dieser Liganden, B1 und B4, stammen aus dem virtuellen Screening an Position 1, d.h. direkt im aktiven Zentrum nahe des γ -Phosphates von GppNHp. Substanz B2 stammt aus dem Screening an Position 2 (Ile36-N) nahe dem aktiven Zentrum. Alle drei Liganden sind aromatisch und besitzen mindestens zwei Stickstoffe. Mittels STD-NMR-Titrationen konnten für Liganden B1 und B4 Bindungskonstanten von 1.20 ± 0.18 mM und

5.55 ± 0.69 mM ermittelt werden. Diese Werte unterscheiden sich stark von denen, die von LUDI im virtuellen Screening berechnet wurden. Demnach sollte Ligand B4 mit 15 µM besser binden als Ligand B1 mit 166 µM.

Bei der Substanz N aus dem virtuellen Screening der ZINC Bibliothek konnte mittels STD-NMR die Bindung an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bestätigt werden. Des Weiteren bindet auch das aromatische Analogon, *ortho*-Aminoanilin (Substanz L), an aktives Ras im Zustand 1 wohingegen das *meta*-Aminoanilin (Substanz M) keine Signale im Differenzspektrum zeigt. Dies stimmt überein mit den virtuellen Ergebnissen, da hier an Position 1 viele Liganden mit dem Motiv -N-C-C-N- gefunden wurden, welches auch bei Substanzen N und L vorhanden ist. In Substanz M dagegen sitzen die beiden Stickstoffe durch einen zusätzlichen Kohlenstoff weiter voneinander getrennt. Es ist davon auszugehen, dass das Motiv -N-C-C-N- somit selektiv direkt im aktiven Zentrum bindet und die Abstände der beiden Stickstoffe genau zu zwei Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungsstellen im Protein passen. Dies sind wahrscheinlich zwei der Aminosäuren in Abbildung 5.1. Da die STD-NMR-Spektroskopie keine Hinweise auf die Bindungsstelle im Protein gibt, ist die genaue Bindungsposition bisher unbekannt. In den Kapiteln 4.3.1 und 4.3.2.1 konnte diese jedoch sowohl virtuell mit LUDI als auch mittels (¹H-¹⁵N)-*sofast*-HMQC-Spektroskopie ermittelt werden (siehe Kapitel 5.3).

Laut Wang (2003) besitzt LUDI eine *Scoring* Erfolgsrate von 67% und als Schwachstelle die *Scoringfunktion* für Hydrophobe Wechselwirkungen mit nur 54% Erfolgsrate. Dies erklärt, dass von den insgesamt acht getesteten Substanzen aus dem virtuellen Screening nur vier auch real an Ras binden. LUDI arbeitet mit einer fixen 3D Proteinstruktur und geht damit von einem unbeweglichen Protein aus. Da dies jedoch nicht der Realität entspricht, sind die vom Programm berechneten Bindungskonstanten eher kritisch zu betrachten.

5.3 Bindungsstudien der Liganden aus dem virtuellen Screening an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bzw. Ras(wt)•Mg²⁺•GppNHp

Insgesamt wurden mittels STD-NMR-Spektroskopie aus den Maybridge Substanzen und der ZINC-Library 32 neue Liganden für aktives Ras im Zustand 1 ermittelt (siehe Kapitel 4.3 und 4.2.3). Um die Bindung dieser Substanzen an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp genauer zu charakterisieren wurden zwei Ansätze verfolgt. Zum einen die virtuelle Methode des *Molecular Docking* (Kitchen (2004)), bei welcher vorhergesagt wird, ob und wie ein Ligand an vorgegebene Positionen im Protein bindet. Zum anderen die Methode der (¹H-¹⁵N)-*sofast*-HMQC-Spektroskopie nach Schanda (2005). Ihr Vorteil im Vergleich zu der gängigen (¹H-¹⁵N)-HSQC-Spektroskopie oder der (¹H-¹⁵N)-TROSY-HSQC-Spektroskopie liegt in ihrer Schnelligkeit. Dies ist vor allem nützlich, wenn, wie in diesem Fall, viele Titrations zur Ermittlung der Bindungskonstanten und der Bindungsstellen im Protein benötigt werden.

Zunächst wurden die zwei Liganden, Substanz N und L, aus dem virtuellen Screening der ZINC-Library einem *Molecular Docking* mit dem Programm LUDI unterzogen (siehe Kapitel 4.3.1). Als Screening-Positionen wurden die bereits im virtuellen Screening verwendeten Positionen im (Position 1) und nahe des (Positionen 2-4) aktiven Zentrums von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp verwendet. Das *Molecular Docking* der Substanzen N und L ergab, dass beide Liganden laut LUDI direkt im aktiven Zentrum nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids binden. Substanz N bildet drei Wasserstoffbrücken zum Protein aus, zu den Aminosäuren Glu63, Ala59 und dem O-P γ des GppNHp wohingegen Substanz L nur zwei Wasserstoffbrücken, zu Glu63 und Tyr32, aufweist. Dementsprechend sollte Substanz N, welche keinen Aromaten aufweist, besser an Ras binden als Substanz L.

Wenn diese Ergebnisse nun mit den Resultaten aus den (¹H-¹⁵N)-*sofast*-HMQC-Titrations verglichen werden ist deutlich, dass beide sehr gut übereinstimmen. Die (¹H-¹⁵N)-*sofast*-HMQC-Titrations zeigen, dass beide Substanzen auch tatsächlich im aktiven Zentrum von Ras binden, da vor allem die Aminosäuren Phe28, Ala35 und Thr58 Änderungen in ihren chemischen Verschiebungen aufweisen (vgl. Kapitel 4.3.2). Des Weiteren ist zu beobachten, dass auch Aminosäuren nahe dem C-Terminus, His166, Arg164 sowie Asp108 und Met111

Auffälligkeiten zeigen. Demnach ist von einer zweiten Bindungsstelle dort auszugehen, wie auch bereits bei der Bindung von Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA an aktives Ras im Zustand 1 beobachtet werden konnte (Roznizeck, Dissertation Universität Regensburg). Die Berechnung der Bindungskonstanten von Substanzen N und L ergab, dass Substanz N mit 0.58 ± 0.16 mM besser an $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ bindet als Substanz L mit 1.50 ± 0.54 mM. Dies stimmt erneut mit den Ergebnissen aus dem virtuellen *Docking* mit LUDI überein. Für die Bindung von Ligand N am His166 konnte eine Bindungskonstante von 3.02 ± 0.31 mM berechnet werden, was eine schwächere Bindung der Substanz an der zweiten Bindungsstelle nahe dem C-Terminus bedeutet.

Wie bereits durch ^{31}P -NMR nachgewiesen, existieren im Ras Wildtyp (wt) zwei konformationelle Zustände die sich im dynamischen Gleichgewicht befinden (Geyer (1996), Spoerner (2001)). Dabei sind die Gleichgewichtskonstanten von mehreren Faktoren, wie der Art des gebundenen Nukleotids oder Mutationen im Protein, abhängig (Spoerner (2004; 2005)). Zustand 1 weist eine drastisch reduzierte Affinität gegenüber Effektoren auf, wohingegen Zustand 2 als der Effektor-bindende Zustand beschrieben wird. Darum stellt die Stabilisierung des Zustandes 1 einen vielversprechenden Ansatz zur Inhibierung der Ras-Effektor-Wechselwirkung dar. Es ist bereits bekannt, dass die Liganden Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA vorzugsweise den Zustand 1 binden und in der Lage sind, das Gleichgewicht in Ras(wt) zugunsten des Zustandes 1 zu verschieben (Spoerner (2005), Rosnizeck, Dissertation Universität Regensburg). Des Weiteren konnte durch ^{31}P -NMR nachgewiesen werden, dass die Bindung beider Liganden zu einer Verdrängung des Effektors Raf-RBD führt (Roznizeck (2010)).

Durch virtuelles und STD-NMR basiertes Screening konnten in dieser Arbeit weitere 35 Substanzen ermittelt werden, die an aktives Ras in Zustand 1 binden. Einer dieser Liganden, Substanz N (*trans*-1,2-Diaminocyclohexan), stammt aus dem virtuellen Screening und bindet mit einer Bindungskonstante von 0.58 ± 0.16 mM an $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ im aktiven Zentrum (siehe Kapitel 4.3.2). Um festzustellen, ob dieser Ligand analog zu Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA in der Lage ist, das dynamische Gleichgewicht in Ras(wt) in Richtung Zustand 1 zu verschieben, wurde eine ^{31}P -NMR-Titration von $\text{Ras(wt)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ mit der Substanz N durchgeführt.

Diese zeigt deutlich, dass die Substanz N analog zu Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA selektiv Zustand 1 erkennt und das dynamische Gleichgewicht dahingehend verschieben kann. Es ist an alle drei Phosphaten des Nukleotids GppNHp zu erkennen, dass Zustand 2 in den Zustand 1 übergeht wobei leichte chemische

Verschiebungen der α - und γ -Phosphorresonanzen von bis zu 0.46 ppm beobachtet werden können. Dies lässt sich analog zu Zn^{2+} -Cyclen, dessen Bindung an Ras(wt) höhere chemische Verschiebungen von über 1 ppm verursacht (Spoerner (2005)), leicht anhand der Bindungsstelle erklären, da beide Liganden direkt im aktiven Zentrum nahe des γ -Phosphates binden. Diese chemischen Verschiebungen waren dagegen beim Liganden Zn^{2+} -BPA, der außerhalb des aktiven Zentrums bindet, nicht beobachtet worden (Roznizeck, Dissertation Universität Regensburg).

Das Gleichgewicht liegt ab einem molaren Überschuss von Ras zu Substanz N von 1:64 auf Seiten von Zustand 1 mit einem K_{12} -Wert von 0.73, wohingegen Zn^{2+} -Cyclen bereits bei 20fachem Überschuss das Gleichgewicht in Ras(wt) komplett zu Zustand 1 verschiebt (Spoerner (2005)) und Zn^{2+} -BPA bei 28fachem Überschuss einen K_{12} -Wert von 0.58 aufweist (Roznizeck, Dissertation Universität Regensburg). Eine Begründung dafür könnte darin liegen, dass Substanz N eventuell auch an Zustand 2 bindet und deshalb das Gleichgewicht erst bei höheren Konzentrationen der Substanz verschoben wird.

5.4 Screening der Maybridge Library an $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$

Ziel des Screening der Maybridge Library an $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ war es, neue Inhibitoren zu ermitteln, die spezifisch an aktives Ras im Zustand 1 binden. Diese sollten analog zu Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA in der Lage sein, das dynamische Gleichgewicht in aktivem Ras positiv zu beeinflussen und die Ras-Effektor-Wechselwirkung zu hemmen (Roznizeck, Dissertation Universität Regensburg).

Um eine größere Vielzahl an Substanzen neben dem virtuellen Ansatz auch real zu screenen und somit neue Liganden für das Ras-Protein zu finden, wurde ein in Teilen automatisiertes STD-NMR-Screening für die 500 Moleküle der Maybridge Library entwickelt (siehe Kapitel 4.4.1). Die STD-NMR-Experimente wurden für das Screening so angepasst, dass geringere Proteinmengen ($c=5 \mu\text{M}$, $V=360 \mu\text{L}$) verwendet und nicht ein 100facher sondern nur ein 50facher Überschuss an Substanzen benötigt wurde. Dies gewährleistete weniger falsch positive Ergebnisse und sparte die Menge an verwendeten Substanzen, wie in Kapitel 4.2.1 nachzulesen ist. Die Messungen für das Screening fanden aus praktischen Gründen der Automatisierung bei Raumtemperatur (294 K) statt.

Nach erfolgreichem STD-NMR-Screening der Maybridge Library an $c'Ras(T35A) \cdot Mg^{2+} \cdot GppNHp$ zeigten 166 der Substanzen Signale in den Differenzspektren. Daraufhin wurden diese Substanzen einem zweiten Screening ohne Protein (Blindtests) unterzogen und die Differenzspektren der Moleküle mit und ohne Ras verglichen. Es stellte sich heraus, dass 136 der Moleküle auch ohne Zugabe von Protein Signale in den Differenzspektren zeigten und deshalb eine Sättigung nicht durch Proteinbindung erfolgte. Allerdings konnten 30 der 166 Substanzen eindeutig als Liganden für $c'Ras(T35A) \cdot Mg^{2+} \cdot GppNHp$ identifiziert werden, da sie ohne Protein keine Signale in den Differenzspektren aufwiesen. Alle diese 30 Moleküle enthalten Ringsysteme und 28 davon sind aromatische Verbindungen. 23 Strukturen zeigten die funktionellen Gruppen von Heterozyklen (siehe Abbildung 4.22 bis Abbildung 4.26). Substanz 1 weist eine große strukturelle Ähnlichkeit zu der virtuell gefundenen Substanz B1 auf, welche auch real als Binder für aktives Ras im Zustand 1 bestätigt wurde.

Für alle 30 Liganden wurden ihre Epitope nach Mayer (2001) bestimmt. Diese Ergebnisse können später, in Kombination mit den Resultaten der Bindungsstellen im Protein aus den $(^1H-^{15}N)$ -*sofast*-HMQC-Spektren (siehe Kapitel 4.4.4.1) und den *Molecular Docking* Studien mit LUDI (siehe Kapitel 4.4.3) zur Verlinkung und Modifizierung der Liganden nützlich sein. So kann festgestellt werden, an welchen Positionen Verlinkungen und Modifizierungen geeignet wären. Dafür kommen vor allem die Stellen im Liganden in Betracht, welche nicht den engsten Kontakt zum Protein haben (100% im Epitop erreichen), da hier eine sterische Hinderung eventuell zu einer schlechteren Bindung führen könnte. Deshalb sollte darauf geachtet werden, Positionen zur Modifikation zu wählen, welche zum einen genügend Platz bieten und zum anderen geeignete nahestehende Wechselwirkungsstellen im Protein aufweisen.

Um Festzustellen, ob und wie die durch STD-NMR identifizierten 30 Liganden aus der Maybridge-Library im aktiven Zentrum von $c'Ras(T35A) \cdot Mg^{2+} \cdot GppNHp$ binden, wurden diese zunächst einem *Molecular Docking* mit dem Programm LUDI unterzogen (siehe Kapitel 4.4.3). Von den 30 Liganden konnte mittels LUDI 19 der Substanzen eine Bindung im und nahe des aktiven Zentrums (an Positionen 1-4) nachgewiesen werden. Von diesen 19 Liganden wiederum binden laut *Molecular Docking* 13 direkt im aktiven Zentrum von aktivem Ras im Zustand 1 nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids. Als Aminosäuren im Protein, welche an diesen Bindungen mittels Wasserstoffbrücken am häufigsten betroffen sind, konnten Ala59, Tyr32, Glu63 und Ala35 identifiziert werden. Substanzen 48 und 217

binden laut LUDI an Position 2 (Ile36-N) nahe dem aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp, Substanzen 169 und 176 eher parallel dem GppNHp und Moleküle 254 und 298 nahe dem Zuckerring des GppNHp (Position 3, GNP-O2') an das Asp30.

Die 19 Liganden, welche durch *Molecular Docking* mit LUDI als Binder im und nahe dem aktiven Zentrum von Ras ermittelt werden konnten, wurden daraufhin mittels (¹H-¹⁵N)-*sofast*-HMQC-Titrations an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp (siehe Kapitel 4.4.4) genauer überprüft. Die beiden einzigen nicht-aromatischen Substanzen 48 und 73 führten zu Änderungen in chemischen Verschiebungen von vielen entfernt voneinander gelegenen Aminosäuren (Lys und Arg) von Ras was auf eine eher unspezifische Bindung hinweist. Allen anderen Liganden konnten insgesamt drei übergeordnete Bindungspositionen zugeteilt werden. Position A, die direkt im aktiven Zentrum nahe dem γ -Phosphat des GppNHp liegt und bei der vor allem die Aminosäuren Glu63, Ala59, Thr58, Ala35, Phe28 und Tyr32 Änderungen ihrer chemischen Verschiebungen zeigen. Position B, die insbesondere die Aminosäuren Ser39, Tyr40 und Thr74 betrifft und an welcher auch Zn²⁺-BPA bindet (Rosnizeck, Dissertation Universität Regensburg) und Position C, die ebenfalls durch Bindung von Zn²⁺-Cyclen und Zn²⁺-BPA bereits bekannt ist. Hier sind Aminosäuren nahe dem C-Terminus betroffen, wie zum Beispiel His166, Arg164, Gln95 und Val112. Die meisten Liganden, Substanzen 9, 135, 143, 160, 161, 169, 176, 177, 192, 217, 232 und 254, zeigten die größten Änderungen der kombinierten chemischen Verschiebungen von Aminosäuren an Position A. Dies stimmt außer für Substanzen 169, 176, 217 und 254 sehr gut mit den Ergebnissen aus dem *Molecular Docking* mit LUDI überein. Die größten kombinierten chemischen Verschiebungen der Aminosäuren an Position B werden durch die Bindung der Liganden 1, 5, 41, 298 und 319 hervorgerufen. Bis auf Substanz 1 binden diese Substanzen zusätzlich an Position A. Somit stimmt die Bindungsstelle des virtuellen Dockings von Ligand 1 nicht mit der Realität aus dem (¹H-¹⁵N)-*sofast*-HMQC-Titrations überein. Liganden 41, 298 und 319 zeigen als einzige Substanzen keine Auffälligkeiten der Aminosäuren in Position C. Da Positionen B und C nicht Gegenstand des virtuellen Screenings waren, weil diese Positionen in weiterer Entfernung zum aktiven Zentrum von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp liegen, kann hier kein direkter Vergleich zum *Molecular Docking* angestellt werden. Aufgrund der (¹H-¹⁵N)-*sofast*-HMQC-Titrations war eindeutig zu erkennen, dass in keinem Fall die höchste kombinierte chemische Verschiebung an einer Aminosäure der Position C zu beobachten war. Dass die Liganden, welche dort Auffälligkeiten zeigen, an dieser

Bindungsstelle schlechter binden, belegen nicht nur die Bindungsstudien mit dem Liganden N (siehe Kapitel 4.3.2.2) sondern auch die Berechnung der Bindungskonstanten der Maybridge Liganden. Alle diese K_D -Werte lagen im Bereich ab 8.6 ± 2 mM aufwärts oder zeigten einen linearen Verlauf, was darauf hinweist, dass die Bindungskonstanten über dem gemessenen Konzentrationsbereich liegen. Die Bindungskonstanten der Liganden an ihren besten Bindungspositionen lagen im Bereich zwischen 0.11 und 7.36 mM. Es wurden 13 neue Liganden ermittelt, welche im μM Bereich im aktiven Zentrum an $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ binden.

5.5 STD-NMR von Derivaten des Zn^{2+} -Cyclens an $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$

Von T. Graf (Dissertation, Universität Regensburg) wurden Derivate des Zn^{2+} -Cyclens am Lehrstuhl für Organische Chemie (Prof. König) synthetisiert und mittels *WaterLOGSY*-NMR-Experimenten nach Dalvit (2001) auf Bindung an $\text{Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ überprüft. Neun der Derivate, TG-ZC-023, -025, -132, -331, -332, -333, -334, -431 und -432, wurden im Rahmen dieser Arbeit zur Überprüfung und Bestätigung mittels STD-NMR erneut vermessen.

Hierbei wurde festgestellt, dass die drei Derivate, welche einen hydrophoben Benzylrest in Form der verknüpften Aminosäure Phenylalanin beinhalten, eindeutige Signale in den Differenzspektren zeigten. Diese wurden in den STD-NMR-Spektren ihrer Blindtests nicht beobachtet. Somit binden die Substanzen TG-ZC-132, TG-ZC-333 und TG-ZC-334 eindeutig an $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$, wohingegen die anderen Derivate nur sehr geringe bis gar keine Unterschiede in den Signalintensitäten der STD-Spektren der Lösungen mit Ras verglichen mit den Blindtests zeigten.

Es ist davon auszugehen, dass eine hydrophobe Gruppe in Liganden, welche im aktiven Zentrum von Ras binden, durchaus vorteilhaft ist. Dies wird durch die Ergebnisse des virtuellen Screenings mit LUDI (siehe Kapitel 4.1) und durch das STD-NMR-Screening der Maybridge Library in Kombination mit den Ergebnissen der *Molecular Dockings* und den $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -*sofast*-HMQC-Spektren bestätigt. Hier wurden insbesondere aromatische Liganden ermittelt, die direkt im aktiven Zentrum nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids GppNHp binden.

5.6 Vergleich von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp mit c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp

Wie bereits in Kapitel 1.3.4 beschrieben, existiert die Ras-Mutante Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp im aktiven Zustand 1, welcher eine reduzierte Affinität gegenüber Effektoren aufweist (Spoerner (2001; 2007)). Die Stabilisierung dieses Zustandes durch die Bindung von kleinen organischen Liganden, wie zum Beispiel Zn²⁺-Cyclen und Zn²⁺-BPA, kann damit zur Inhibierung der Ras-Effektor-Wechselwirkung führen (Rosnizeck (2010)). Im Screening nach neuen geeigneten Liganden wurde mittels der (¹H-¹⁵N)-*sofast*-HMQC-Spektroskopie nach Schanda (2005) festgestellt, dass einige der neuen Liganden nicht nur im und nahe des aktiven Zentrums von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp binden, sondern eine weitere Bindungsstelle im negativ geladenen L7-Loop auf der Rückseite aufweisen. Dies wurde auch bei den bereits bekannten Liganden Zn²⁺-Cyclen und Zn²⁺-BPA beobachtet (Rosnizeck, Dissertation Universität Regensburg). Hierbei sind vor allem die Aminosäuren nahe dem C-Terminus, Glu162, Gln165 und His166 sowie Aminosäuren in benachbarten Positionen Asp108 und Met111 betroffen. Um nun festzustellen, ob insbesondere die basische und aromatische Aminosäure Histidin 166 in dieser Bindung eine wichtige Rolle spielt, wurde sie von der Firma Entelechon (Regensburg, Deutschland) mittels einer *site-directed* Mutagenese (Kunkel (1985), Taylor (1985)) durch ein Alanin ersetzt (siehe Kapitel 3.2.2).

Zur Charakterisierung dieser neuen Mutante wurde zunächst ein (¹H-¹⁵N)-*sofast*-HMQC-Spektrum von c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp aufgenommen und das Spektrum mit dem von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp verglichen (siehe Kapitel 4.6.1). Dabei stellte sich heraus, dass nicht nur wie erwartet die Aminosäuren nahe dem Ala166 (Val160 bis Ala166 sowie Asp108 und Met111) sondern auch Aminosäuren im weit entfernten aktiven Zentrum des Proteins (Phe28 und Tyr32) hohe kombinierte chemische Verschiebungen zeigen. Dies weist darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen Bindungsstellen im aktiven Zentrum und der auf der Rückseite des Proteins am C-Terminus bestehen könnte. Unterstützt wird diese Aussage durch die Ergebnisse der Bindungsstellen der Maybridge Liganden (siehe Kapitel 4.4.4.1). Hierbei ist ersichtlich, dass alle Substanzen, welche die höchsten kombinierten chemischen Verschiebungen an Position A direkt im aktiven Zentrum von Ras zeigen, auch kleinere kombinierte chemische Verschiebungen an Position C nahe dem C-Terminus im negativ geladenen L7-Loop aufweisen.

Um festzustellen, ob die bekannten Liganden Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA auch an die neue Mutante $\text{c'Ras(T35A, H166A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ binden, wurden STD-NMR-Messungen durchgeführt (siehe Kapitel 4.6.2). Hierbei ist zu sehen, dass beide Liganden identische Signale in ihren Differenzspektren sowohl in der Lösung mit $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ als auch in der Lösung mit der neuen Doppelmutante $\text{c'Ras(T35A, H166A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ zeigen. Obwohl die T35A, H166A Mutante nicht nur am C-Terminus sondern auch im aktiven Zentrum Unterschiede zu $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ aufweist, sind sowohl Zn^{2+} -Cyclen als auch Zn^{2+} -BPA in der Lage an das Protein zu binden. Dies ist für Zn^{2+} -BPA nicht verwunderlich, da es eine Bindungsstelle an Position B (Aminosäuren 39, 40 und 53 bis 58) aufweist, welche keine kombinierten chemischen Verschiebungen durch die Punktmutation an Stelle 166 zeigt. Zn^{2+} -Cyclen hingegen bindet im aktiven Zentrum nahe des γ -Phosphates und im negativ geladenen L7-Loop nahe des C-Terminus (Roznizeck, Dissertation Universität Regensburg), also den beiden Positionen, die sich zum Teil durch die Mutation H166A verändert haben. Da Zn^{2+} -Cyclen offensichtlich noch an $\text{c'Ras(T35A, H166A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ bindet, kann die Mutation nicht zu besonders großen Strukturänderungen an beiden Positionen geführt haben.

Es ist interessant zu prüfen, ob und wenn ja inwiefern sich die Bindungsstellen und -Konstanten von Zn^{2+} -Cyclen und Zn^{2+} -BPA an $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ von denen der neuen Doppelmutante von Ras unterscheiden. Daher wurden (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-Titrations (siehe Kapitel 4.6.3) beider Liganden an $\text{c'Ras(T35A, H166A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass Zn^{2+} -Cyclen zwei Bindestellen an $\text{c'Ras(T35A, H166A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ aufweist welche identisch zu den Ergebnissen von I. Rosnizeck (Dissertation, Universität Regensburg) sind, also zum einen direkt im aktiven Zentrum nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids an Position A und nahe dem C-Terminus an Position C. Somit zeigt Zn^{2+} -Cyclen keinen Unterschied in den Bindungspositionen. Zn^{2+} -BPA dagegen weist nur noch deutliche kombinierte chemische Verschiebungen bei Aminosäuren in Position B auf. Keine der Aminosäuren an Position C nahe dem C-Terminus zeigt relative kombinierte chemische Verschiebungen von mehr als 0.15. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Titrations von Zn^{2+} -BPA an $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ von I. Rosnizeck (Dissertation, Universität Regensburg). Hier betrifft die Bindung von Zn^{2+} -BPA nicht nur Aminosäuren der Position B sondern führt auch zu hohen relativen kombinierten chemischen Verschiebungen der Aminosäuren 96, 139, 162, 166 ($0.50 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 0.75$) sowie

108 ($0.75 < \Delta\delta_{\text{comb}} < 1$) an Position C. Die Unterschiede in den Bindungspositionen sind in Abbildung 5.2 veranschaulicht.

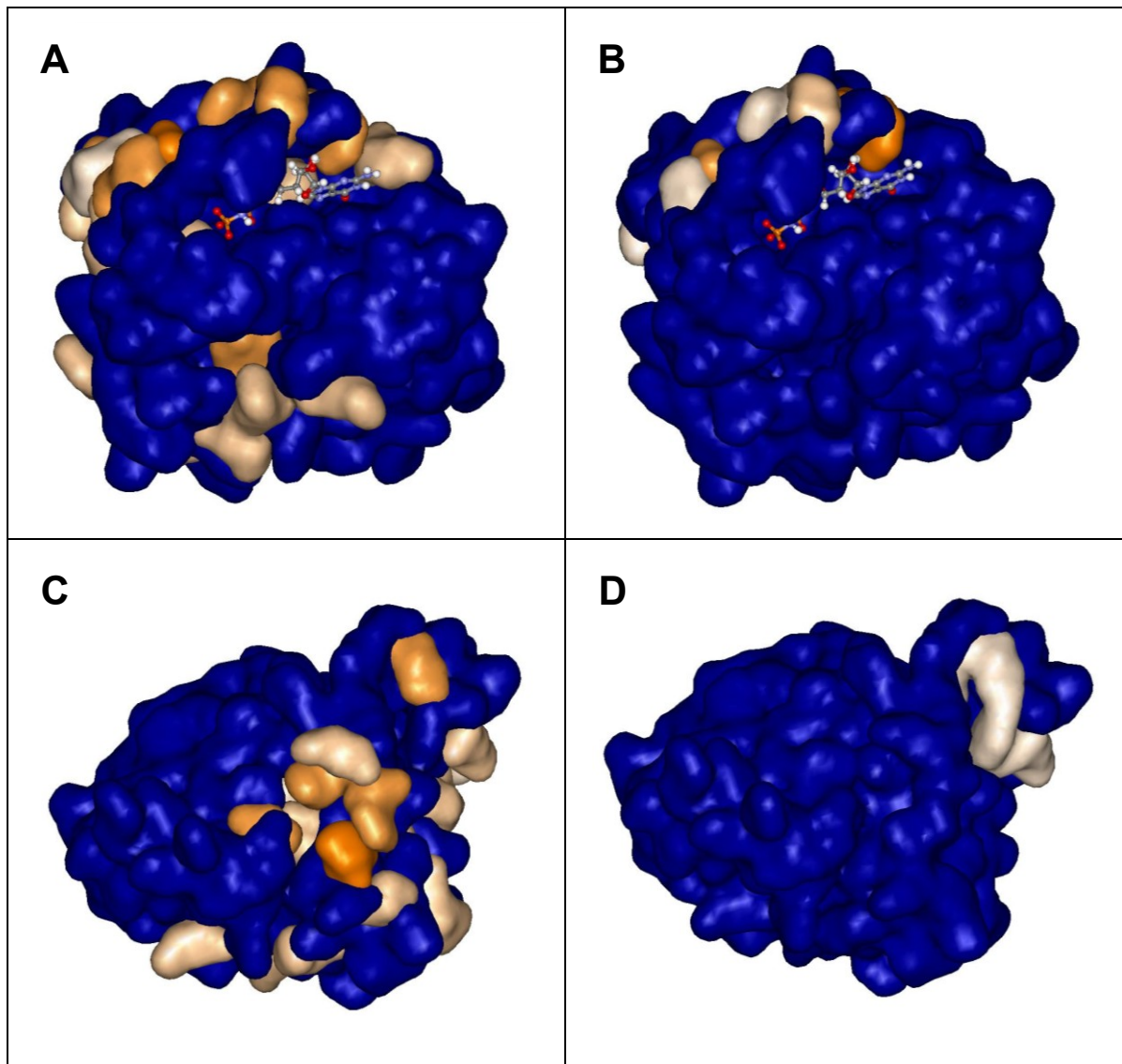


Abbildung 5.2: Änderungen der chemischen Verschiebungen beobachtet in c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp bzw. c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp bei Zugabe von Zn²⁺-BPA. (A), (B): Bindestelle an Position B. (C), (D): Bindestelle an Position C. In (A) und (C) ist der Effekt des Zn²⁺-BPA an c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp dargestellt, in (B) und (D) der Effekt von Zn²⁺-BPA an c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp. Die Farben sind den Untergruppen in Tabelle 4.16 zugeteilt. Je stärker der beobachtete Effekt, desto dunkler sind die Farben. Die entsprechenden Werte für (A) und (C) sind der Dissertation von I. Rosnizeck (Universität Regensburg) entnommen. Gezeigt wird die von T. Graf (Dissertation, Universität Regensburg) berechnete Struktur von c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp.

Die Berechnung der Bindungskonstanten ergab einen Wert von 1.04 ± 0.37 mM für Zn²⁺-Cyclen an c'Ras(T35A, H166A)•Mg²⁺•GppNHp welcher deutlich unter dem

durch STD-NMR-Titration von I. Rosnizeck ermittelten K_D -Wert von 9.65 ± 1 mM für Zn^{2+} -Cyclen an c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp liegt. Somit bindet Zn^{2+} -Cyclen besser an c'Ras(T35A, H166A)• Mg^{2+} •GppNHp als an c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp. Wenn man dagegen den berechneten K_D -Wert von Zn^{2+} -BPA an beide Mutanten vergleicht, wird deutlich, dass dieser Ligand mit 2.07 ± 0.25 mM (I. Rosnizeck, Dissertation Universität Regensburg) besser an c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp bindet als an c'Ras(T35A, H166A)• Mg^{2+} •GppNHp. Denn hier ergab die Titration eine Gerade, die auf eine Bindungskonstante über dem gemessenen Bereich von 3.2 mM hinweist.

5.7 Ausblick

Während dieser Arbeit wurden 35 neue Liganden für das aktive Ras-Protein in Zustand 1 ermittelt. Diese können als Ausgangspunkt für weitergehende Projekte dienen. Zum einen sollte zunächst ermittelt werden, welche dieser Liganden selektiv Zustand 1 und welche davon ebenfalls Zustand 2 binden. Dies kann zum Beispiel durch ein STD-NMR-Screening der Moleküle an Ras in Zustand 2 erfolgen. Substanzen welche nicht Zustand 2 binden, sollten das dynamische Gleichgewicht von aktivem Ras schneller zu Gunsten des Zustandes 1 verschieben können und damit zu einer besseren Inhibierung der Ras-Effektor-Wechselwirkung führen. Dies kann z.B. mittels ^{31}P -NMR-Titrations nachgewiesen werden.

Ein weiterer Schritt kann die Modifizierung einzelner Liganden sein, um die Bindungsstärke an aktives Ras in Zustand 1 zu erhöhen. Diese Modifizierungen können zunächst virtuell mittels LUDI im Verlinkungsmodus erfolgen, bevor tatsächlich durch kombinatorische Chemie verschiedene aussichtsreiche Derivate einer Substanz synthetisiert und getestet werden. Eine andere Methode stellt die Verlinkung verschiedener Liganden miteinander dar. Dies sollte zu Liganden mit einer deutlich erhöhten Bindungsstärke und damit zu einer verbesserten Inhibierung der Ras-Effektor-Wechselwirkung führen.

6 Zusammenfassung

Ras ist ein Guaninnukleotid-bindendes Protein, welches eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion einnimmt. Dabei agiert es als molekularer, regulierbarer Schalter, welcher zwischen einer GDP gebundenen, inaktiven und einer GTP gebundenen, aktiven Form wechselt. In seiner aktiven Form ist Ras dazu in der Lage, Effektoren zu aktivieren und damit Signale ins Zellinnere weiterzuleiten. Ras ist als Target in der Krebstherapie von großem Interesse, da es in 30% aller Tumore an den Aminosäurepositionen 12, 13 oder 61 mutiert vorliegt. Diese Mutationen führen dazu, dass das Protein dauerhaft in seiner aktiven Form verbleibt und zu vermehrtem Zellwachstum und letztendlich zu Tumorbildung führt. Durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie konnte nachgewiesen werden, dass im aktiven Zustand von Ras ein weiteres konformationelles Gleichgewicht vorliegt wobei einem der Zustände, Zustand 1, eine reduzierte Affinität gegenüber Effektoren nachgewiesen wurde. Dieses Gleichgewicht konnte bereits durch kleine Moleküle, M^{2+} -Cyclen und M^{2+} -BPA, in Richtung Zustand 1 verschoben und dieser durch die Bindung stabilisiert werden. Des Weiteren wurde ermittelt, dass diese Substanzen dazu in der Lage sind, den Effektor Raf zu verdrängen und somit das Ras-Protein zu inhibieren.

Durch virtuelles Screening mittels LUDI von 9.74 Millionen Substanzen an definierten Positionen im und um das aktive Zentrum von $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ konnten insgesamt 35 785 Liganden für Ras in Zustand 1 ermittelt werden. Die besten Bindungskonstanten erreichten dabei Moleküle, welche direkt im aktiven Zentrum nahe dem γ -Phosphat des GppNHp binden. Diese Substanzen enthielten als Hauptmerkmale Stickstoffe in Form von primären und sekundären Aminen sowie Guanidine und deren Schwefelderivate. Viele Liganden zeigen die Sequenz -N-C-C-N und sind aromatisch.

Von 10 dieser Liganden aus dem virtuellen Screening konnten mittels STD-NMR-Spektroskopie 5 Substanzen (B1, B2, B4, Substanz N und L) als Binder an $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ bestätigt werden. Alle fünf Liganden besitzen Ringsysteme sowie mindestens zwei Stickstoffe und vier davon sind Aromaten.

Zur Ermittlung der Bindungsstellen und -konstanten wurde *Molecular Modeling* mit LUDI und $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -*sofast*-HMQC-Titrations an $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ durchgeführt. Beide Methoden ergaben übereinstimmend die Bindungsstelle von Substanz N und L im aktiven Zentrum von Ras mit Beteiligung der Aminosäuren Ala35, Thr58 und Phe28. Als zweite Bindungsstelle wurden Aminosäuren nahe

dem C-Terminus (His166, Arg164, sowie Asp108 und Met111) analog zu M^{2+} -Cyclen und M^{2+} -BPA identifiziert. Die Berechnung der Bindungskonstanten ergab 0.58 ± 0.16 mM für Substanz N und 1.50 ± 0.54 mM für Substanz L.

Die ^{31}P -NMR-Titration von Substanz N an $\text{Ras(wt)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ zeigte, dass dieser Ligand das konformationelle Gleichgewicht im aktiven Zustand von Ras in Richtung Zustand 1, welcher eine reduzierte Affinität gegenüber Effektoren aufweist, verschieben kann.

Das STD-NMR-Screening der 500 Maybridge Fragmente ergab 30 weitere Liganden für $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$. Alle 30 Liganden enthalten Ringsysteme, 28 davon sind Aromaten und 23 zeigen die funktionelle Gruppe von Heterozyklen. Für jede dieser Substanzen wurde eine Epitopsbestimmung durchgeführt.

Von den 30 Liganden der Maybridge Library konnte mittels LUDI 19 der Substanzen eine Bindung im und nahe des aktiven Zentrums von Ras nachgewiesen werden. 13 der Liganden binden laut *Molecular Modeling* direkt im aktiven Zentrum nahe dem γ -Phosphat des Nukleotids wobei häufig Aminosäuren Ala59, Tyr32, Glu63 und Ala35 an den Wasserstoffbrücken zu den Liganden beteiligt sind. Die 19 Substanzen, welche durch *Molecular Docking* mit LUDI als Binder im und um das aktive Zentrum ermittelt werden konnten, wurden mittels $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -*sofast*-HMQC-Titrationsen genauer überprüft. Dabei konnten 17 der Liganden insgesamt drei übergeordnete Bindungspositionen zugeteilt werden: Position A im aktiven Zentrum, bei der vor allem Aminosäuren Glu63, Ala59, Thr58, Ala35, Phe28 und Tyr32 Änderungen ihrer chemischen Verschiebungen zeigen, Position B, die Aminosäuren Ser39, Tyr40 und Thr74 betrifft und Position C nahe dem C-Terminus (His166, Arg164, Gln95 und Val112). Die Bindungskonstanten der Liganden lagen im Bereich zwischen 0.11 und 7.36 mM. Es wurden 13 neue Liganden ermittelt, welche μmolar direkt im aktiven Zentrum an $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ binden.

Die STD-NMR-Tests an neun Zn^{2+} -Cyclen Derivaten ergab, dass drei davon (TG-ZC-132, -333 und -334) eindeutig an $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ binden. Alle drei Derivate beinhalten einen aromatischen Rest in Form eines Phenylalanins.

Die Vergleich der $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -*sofast*-HMQC-Spektren der neuen Mutante $\text{c'Ras(T35A, H166A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ mit $\text{c'Ras(T35A)} \cdot \text{Mg}^{2+} \cdot \text{GppNHp}$ ergab Änderungen der chemischen Verschiebungen der Aminosäuren Val160 bis Ala166 und Asp108 sowie Met111. Überraschender Weise waren aber auch Aminosäuren im räumlich entfernten aktiven Zentrum (Phe28 und Tyr32) betroffen. Mittels STD-

NMR-Spektroskopie wurde gezeigt, dass sowohl Zn^{2+} -Cyclen als auch Zn^{2+} -BPA in der Lage sind, c'Ras(T35A, H166A)• Mg^{2+} •GppNHp zu binden. Die Ermittlung der Bindungsstellen ergab, dass Zn^{2+} -Cyclen zwei Bindestellen aufweist, die identisch zu der Bindung an c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp sind. Zn^{2+} -BPA dagegen weist nur noch deutliche kombinierte chemische Verschiebungsänderungen in Position B auf und bindet nicht mehr nahe des C-Terminus. Die Berechnung der Bindungskonstanten ergab Werte von $1.04 \pm 0.37 \text{ mM}$ für Zn^{2+} -Cyclen an c'Ras(T35A, H166A)• Mg^{2+} •GppNHp, für Zn^{2+} -BPA liegt der K_D -Wert deutlich über dem gemessenen Bereich von 3.2 mM.

7 Literaturverzeichnis

Adams, C. P. and V. V. Brantner (2006). "Estimating the cost of new drug development: Is it really \$802 million?" Health Affairs **25**(2): 420-428.

Ahmadian, M. R., U. Hoffmann, et al. (1997). "Individual rate constants for the interaction of Ras proteins with GTPase-activating proteins determined by fluorescence spectroscopy." Biochemistry **36**(15): 4535-4541.

Ahmadian, M. R., T. Zor, et al. (1999). "Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 7065-7070.

Akasaka, K., M. Tamada, et al. (1996). "Differential structural requirements for interaction of Ras protein with its distinct downstream effectors." J Biol Chem **271**(10): 5353-5360.

Almoguera, C., D. Shibata, et al. (1988). "Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes." Cell **53**(4): 549-554.

Bajorath, J. (2002). "Integration of virtual and high-throughput screening." Nature Reviews Drug Discovery **1**(11): 882-894.

Barbacid, M. (1987). "ras genes." Annu Rev Biochem **56**: 779-827.

Barril, X., P. Brough, et al. (2005). "Structure-based discovery of a new class of Hsp90 inhibitors." Bioorg Med Chem Lett **15**(23): 5187-5191.

Basso, A. D., P. Kirschmeier, et al. (2006). "Lipid posttranslational modifications. Farnesyl transferase inhibitors." J Lipid Res **47**(1): 15-31.

Becker, O. M., Y. Marantz, et al. (2004). "G protein-coupled receptors: In silico drug discovery in 3D." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(31): 11304-11309.

Bohm, H. J. (1992). "The computer program LUDI: a new method for the de novo design of enzyme inhibitors." J Comput Aided Mol Des **6**(1): 61-78.

Bohm, H. J. (1992). "LUDI: rule-based automatic design of new substituents for enzyme inhibitor leads." J Comput Aided Mol Des **6**(6): 593-606.

Bohm, H. J. (1993). "A novel computational tool for automated structure-based drug design." J Mol Recognit **6**(3): 131-137.

Bohm, H. J. (1994). "On the use of LUDI to search the Fine Chemicals Directory for ligands of proteins of known three-dimensional structure." J Comput Aided Mol Des **8**(5): 623-632.

Bos, J. L. (1989). "ras oncogenes in human cancer: a review." Cancer Res **49**(17): 4682-4689.

Bourne, H. R., D. A. Sanders, et al. (1990). "The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions." Nature **348**(6297): 125-132.

Bourne, H. R., D. A. Sanders, et al. (1991). "The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism." Nature **349**(6305): 117-127.

Burner, G. C. and L. A. Loeb (1989). "Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2403-2407.

Carr, R. A., M. Congreve, et al. (2005). "Fragment-based lead discovery: leads by design." Drug Discov Today **10**(14): 987-992.

Chen, A. and M. J. Shapiro (1998). "NOE pumping: A novel NMR technique for identification of compounds with binding affinity to macromolecules." Journal of the American Chemical Society **120**(39): 10258-10259.

Chen, A. D. and M. J. Shapiro (2000). "NOE pumping. 2. A high-throughput method to determine compounds with binding affinity to macromolecules by NMR." Journal of the American Chemical Society **122**(2): 414-415.

Colombo, S., A. Palmioli, et al. (2010). "Structure-activity studies on arylamides and arylsulfonamides Ras inhibitors." Curr Cancer Drug Targets **10**(2): 192-199.

Dalvit, C., G. Fogliatto, et al. (2001). "WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability." J Biomol NMR **21**(4): 349-359.

Dean, N. M. (2001). "Functional genomics and target validation approaches using antisense oligonucleotide technology." Curr Opin Biotechnol **12**(6): 622-625.

Deininger, M. W. and B. J. Druker (2003). "Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib." Pharmacol Rev **55**(3): 401-423.

Dominguez, C., R. Boelens, et al. (2003). "HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information." J Am Chem Soc **125**(7): 1731-1737.

Eddershaw, P. J., A. P. Beresford, et al. (2000). "ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery." Drug Discov Today **5**(9): 409-414.

Enomoto, T., M. Inoue, et al. (1990). "K-ras activation in neoplasms of the human female reproductive tract." Cancer Res **50**(19): 6139-6145.

Ewing, T. J., S. Makino, et al. (2001). "DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases." J Comput Aided Mol Des **15**(5): 411-428.

Felder, C. (2009). "Potential advantages of allosteric vs. orthosteric site GPCR modulators: Targeting M1 and M4 receptors for the treatment of schizophrenia." Abstracts of Papers of the American Chemical Society **238**.

Fox, S., S. Farr-Jones, et al. (1999). "High Throughput Screening for Drug Discovery: Continually Transitioning into New Technology." J Biomol Screen **4**(4): 183-186.

Friesner, R. A., J. L. Banks, et al. (2004). "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy." J Med Chem **47**(7): 1739-1749.

Ganguly, A. K., Y. S. Wang, et al. (1998). "Interaction of a novel GDP exchange inhibitor with the Ras protein." Biochemistry **37**(45): 15631-15637.

Gaponenko, V., E. Sacco, et al. (2011). "Binding properties and biological characterization of new sugar-derived Ras ligands." Medchemcomm **2**(5): 396-401.

Gelb, M. H., L. Brunsveld, et al. (2006). "Therapeutic intervention based on protein prenylation and associated modifications." Nat Chem Biol **2**(10): 518-528.

Geyer, M., C. Herrmann, et al. (1997). "Structure of the Ras-binding domain of RalGEF and implications for Ras binding and signalling." Nature Structural Biology **4**(9): 694-699.

Geyer, M., T. Schweins, et al. (1996). "Conformational transitions in p21(ras) and in its complexes with the effector protein Raf-RBD and the GTPase activating protein GAP." Biochemistry **35**(32): 10308-10320.

Gohlke, H. and G. Klebe (2002). "Approaches to the description and prediction of the binding affinity of small-molecule ligands to macromolecular receptors." Angew Chem Int Ed Engl **41**(15): 2644-2676.

Greer, J., J. W. Erickson, et al. (1994). "Application of the three-dimensional structures of protein target molecules in structure-based drug design." J Med Chem **37**(8): 1035-1054.

Gronwald, W., F. Huber, et al. (2001). "Solution structure of the Ras binding domain of the protein kinase Byr2 from *Schizosaccharomyces pombe*." Structure **9**(11): 1029-1041.

Grover, S., M. A. Apushkin, et al. (2006). "Topical dorzolamide for the treatment of cystoid macular edema in patients with retinitis pigmentosa." American Journal of Ophthalmology **141**(5): 850-858.

Hajduk, P. J. and J. Greer (2007). "A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned." Nature Reviews Drug Discovery **6**(3): 211-219.

Halgren, T. A., R. B. Murphy, et al. (2004). "Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 2. Enrichment factors in database screening." J Med Chem **47**(7): 1750-1759.

Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.

Herrmann, C., C. Block, et al. (1998). "Sulindac sulfide inhibits Ras signaling." Oncogene **17**(14): 1769-1776.

Huang, Z. W., J. L. Wang, et al. (2000). "Structure-based discovery of an organic compound that binds Bcl-2 protein and induces apoptosis of tumor cells." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(13): 7124-7129.

Inglese, J., R. L. Johnson, et al. (2007). "High-throughput screening assays for the identification of chemical probes." Nat Chem Biol **3**(8): 466-479.

Jackson, C. L. and J. E. Casanova (2000). "Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors." Trends in Cell Biology **10**(2): 60-67.

John, J., I. Schlichting, et al. (1989). "C-terminal truncation of p21H preserves crucial kinetic and structural properties." J Biol Chem **264**(22): 13086-13092.

Jones, G., P. Willett, et al. (1997). "Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking." J Mol Biol **267**(3): 727-748.

Joseph-McCarthy, D., J. C. Baber, et al. (2007). "Lead optimization via high-throughput molecular docking." Curr Opin Drug Discov Devel **10**(3): 264-274.

Kalbitzer, H. R., M. Spoerner, et al. (2009). "Fundamental link between folding states and functional states of proteins." J Am Chem Soc **131**(46): 16714-16719.

Kalk, A. and H. J. C. Berendsen (1976). "Proton Magnetic-Relaxation and Spin Diffusion in Proteins." Journal of Magnetic Resonance **24**(3): 343-366.

Karaguni, I. M., P. Herter, et al. (2002). "The new Sulindac derivative IND 12 reverses Ras-induced cell transformation." Cancer Research **62**(6): 1718-1723.

Karnoub, A. E. and R. A. Weinberg (2008). "Ras oncogenes: split personalities." Nature Reviews Molecular Cell Biology **9**(7): 517-531.

Kitchen, D. B., H. Decornez, et al. (2004). "Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications." Nature Reviews Drug Discovery **3**(11): 935-949.

Kramer, B., M. Rarey, et al. (1999). "Evaluation of the FLEXX incremental construction algorithm for protein-ligand docking." Proteins **37**(2): 228-241.

Kunkel, T. A. (1985). "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(2): 488-492.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Li, C., L. Xu, et al. (2004). "Virtual screening of human 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide transformylase against the NCI diversity set by use of AutoDock to identify novel nonfolate inhibitors." J Med Chem **47**(27): 6681-6690.

Linnemann, T., M. Geyer, et al. (1999). "Thermodynamic and kinetic characterization of the interaction between the Ras binding domain of AF6 and members of the Ras subfamily." J Biol Chem **274**(19): 13556-13562.

Lipinski, C. A., F. Lombardo, et al. (1997). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." Advanced Drug Delivery Reviews **23**(1-3): 3-25.

Liu, M. L., X. A. Mao, et al. (1998). "Improved WATERGATE pulse sequences for solvent suppression in NMR spectroscopy." Journal of Magnetic Resonance **132**(1): 125-129.

Mackay, D. J. and A. Hall (1998). "Rho GTPases." J Biol Chem **273**(33): 20685-20688.

Maurer, T. and H. R. Kalbitzer (1996). "Indirect Referencing of ³¹P and ¹⁹F NMR Spectra." J Magn Reson B **113**(2): 177-178.

Mayer, M. and B. Meyer (1999). "Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy." Angewandte Chemie-International Edition **38**(12): 1784-1788.

Mayer, M. and B. Meyer (2001). "Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor." Journal of the American Chemical Society **123**(25): 6108-6117.

McGann, M. R., H. R. Almond, et al. (2003). "Gaussian docking functions." Biopolymers **68**(1): 76-90.

McGregor, M. J. and P. V. Pallai (1997). "Clustering of large databases of compounds: Using the MDL "keys" as structural descriptors." Journal of Chemical Information and Computer Sciences **37**(3): 443-448.

McInnes, C. (2007). "Virtual screening strategies in drug discovery." Curr Opin Chem Biol **11**(5): 494-502.

Meyer, B. and T. Peters (2003). "NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors." Angew Chem Int Ed Engl **42**(8): 864-890.

Meyer, B., T. Weimar, et al. (1997). "Screening mixtures for biological activity by NMR." Eur J Biochem **246**(3): 705-709.

Milburn, M. V., L. Tong, et al. (1990). "Molecular Switch for Signal Transduction - Structural Differences between Active and Inactive Forms of Protooncogenic Ras Proteins." Science **247**(4945): 939-945.

Mizutani, M. Y. and A. Itai (2004). "Efficient method for high-throughput virtual screening based on flexible docking: discovery of novel acetylcholinesterase inhibitors." J Med Chem **47**(20): 4818-4828.

Moore, M. S. (1998). "Ran and nuclear transport." J Biol Chem **273**(36): 22857-22860.

Moss, J. and M. Vaughan (1998). "Molecules in the ARF orbit." J Biol Chem **273**(34): 21431-21434.

Nain, V., S. Sahi, et al. (2010). "CPP-ZFN: a potential DNA-targeting anti-malarial drug." Malar J **9**: 258.

Oprea, T. I. (2000). "Property distribution of drug-related chemical databases." Journal of Computer-Aided Molecular Design **14**(3): 251-264.

Otto, S., R. L. Furlan, et al. (2002). "Dynamic combinatorial chemistry." Drug Discov Today **7**(2): 117-125.

Pai, E. F., U. Krengel, et al. (1990). "Refined Crystal-Structure of the Triphosphate Conformation of H-Ras P21 at 1.35 Å Resolution - Implications for the Mechanism of Gtp Hydrolysis." Embo Journal **9**(8): 2351-2359.

Patgiri, A., K. K. Yadav, et al. (2011). "An orthosteric inhibitor of the Ras-Sos interaction." Nat Chem Biol **7**(9): 585-587.

Pellecchia, M., I. Bertini, et al. (2008). "Perspectives on NMR in drug discovery: a technique comes of age." Nature Reviews Drug Discovery **7**(9): 738-745.

Peng, J. W., J. Moore, et al. (2004). "NMR experiments for lead generation in drug discovery." Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy **44**(3-4): 225-256.

Pexton, T., T. Moeller-Bertram, et al. (2011). "Targeting voltage-gated calcium channels for the treatment of neuropathic pain: a review of drug development." Expert Opin Investig Drugs **20**(9): 1277-1284.

Raiford, D. S., C. L. Fisk, et al. (1979). "Calibration of Methanol and Ethylene-Glycol Nuclear Magnetic-Resonance Thermometers." Analytical Chemistry **51**(12): 2050-2051.

Rishton, S. A., S. P. Beaumont, et al. (1982). "Exposure Range of Low-Energy Electrons in Pmma." Journal of the Electrochemical Society **129**(6): C234-C234.

Rosnizeck, I. C., T. Graf, et al. (2010). "Stabilizing a weak binding state for effectors in the human ras protein by cyclen complexes." Angew Chem Int Ed Engl **49**(22): 3830-3833.

Sander, E. E. and J. G. Collard (1999). "Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion." Eur J Cancer **35**(14): 1905-1911.

Saraste, M., P. R. Sibbald, et al. (1990). "The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins." Trends Biochem Sci **15**(11): 430-434.

Schanda, P. and B. Brutscher (2005). "Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds." J Am Chem Soc **127**(22): 8014-8015.

Schanda, P., E. Kupce, et al. (2005). "SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds." J Biomol NMR **33**(4): 199-211.

Schimmoller, F., I. Simon, et al. (1998). "Rab GTPases, directors of vesicle docking." J Biol Chem **273**(35): 22161-22164.

Schumann, F. H., H. Riepl, et al. (2007). "Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions." J Biomol NMR **39**(4): 275-289.

Seeburg, P. H., W. W. Colby, et al. (1984). "Biological properties of human c-Ha-ras1 genes mutated at codon 12." Nature **312**(5989): 71-75.

Shaka, A. J., P. B. Barker, et al. (1985). "Computer-Optimized Decoupling Scheme for Wideband Applications and Low-Level Operation." Journal of Magnetic Resonance **64**(3): 547-552.

Shuker, S. B., P. J. Hajduk, et al. (1996). "Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR." Science **274**(5292): 1531-1534.

Spoerner, M., T. Graf, et al. (2005). "A novel mechanism for the modulation of the Ras-effector interaction by small molecules." Biochem Biophys Res Commun **334**(2): 709-713.

Spoerner, M., C. Herrmann, et al. (2001). "Dynamic properties of the Ras switch I region and its importance for binding to effectors." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(9): 4944-4949.

Spoerner, M., A. Nuehs, et al. (2005). "Conformational states of Ras complexed with the GTP analogue GppNHp or GppCH2p: implications for the interaction with effector proteins." Biochemistry **44**(6): 2225-2236.

Spoerner, M., A. Nuehs, et al. (2007). "Slow conformational dynamics of the guanine nucleotide-binding protein Ras complexed with the GTP analogue GTPgammaS." FEBS J **274**(6): 1419-1433.

Spoerner, M., T. F. Prisner, et al. (2005). "Conformational states of human H-Ras detected by high-field EPR, ENDOR, and 31P NMR spectroscopy." Magn Reson Chem **43 Spec no.**: S74-83.

Spoerner, M., A. Wittinghofer, et al. (2004). "Perturbation of the conformational equilibria in Ras by selective mutations as studied by 31P NMR spectroscopy." FEBS Lett **578**(3): 305-310.

Taylor, J. W., J. Ott, et al. (1985). "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA." Nucleic Acids Res **13**(24): 8765-8785.

Tong, L. A., A. M. de Vos, et al. (1991). "Crystal structures at 2.2 Å resolution of the catalytic domains of normal ras protein and an oncogenic mutant complexed with GDP." J Mol Biol **217**(3): 503-516.



Tucker, J., G. Sczakiel, et al. (1986). "Expression of p21 proteins in Escherichia coli and stereochemistry of the nucleotide-binding site." EMBO J **5**(6): 1351-1358.

- Venkatachalam, C. M., X. Jiang, et al. (2003). "LigandFit: a novel method for the shape-directed rapid docking of ligands to protein active sites." J Mol Graph Model **21**(4): 289-307.
- Vetter, I. R. and A. Wittinghofer (2001). "Signal transduction - The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions." Science **294**(5545): 1299-1304.
- Visvanathan, K. V., R. D. Pockock, et al. (1988). "Preferential and novel activation of H-ras in human bladder carcinomas." Oncogene Res **3**(1): 77-86.
- Vojtek, A. B. and C. J. Der (1998). "Increasing complexity of the Ras signaling pathway." J Biol Chem **273**(32): 19925-19928.
- Waldmann, H., I. M. Karaguni, et al. (2004). "Sulindac-derived Ras pathway inhibitors target the Ras-Raf interaction and downstream effectors in the Ras pathway." Angew Chem Int Ed Engl **43**(4): 454-458.
- Wang, R., Y. Lu, et al. (2003). "Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking." J Med Chem **46**(12): 2287-2303.
- Wennerberg, K., K. L. Rossman, et al. (2005). "The Ras superfamily at a glance." Journal of Cell Science **118**(5): 843-846.
- White, M. A., C. Nicolette, et al. (1995). "Multiple Ras Functions Can Contribute to Mammalian-Cell Transformation." Cell **80**(4): 533-541.
- Wishart, D. S., C. G. Bigam, et al. (1995). "¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR." J Biomol NMR **6**(2): 135-140.
- Wittinghofer, A. and E. F. Pai (1991). "The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch." Trends Biochem Sci **16**(10): 382-387.
- Wittinghofer, A. and H. Waldmann (2000). "Ras - A molecular switch involved in tumor formation." Angewandte Chemie-International Edition **39**(23): 4193-4214.
- Wohlgemuth, S., C. Kiel, et al. (2005). "Recognizing and defining true Ras binding domains I: biochemical analysis." J Mol Biol **348**(3): 741-758.

Zhao, L. and R. D. Brinton (2005). "Structure-based virtual screening for plant-based ERbeta-selective ligands as potential preventative therapy against age-related neurodegenerative diseases." J Med Chem **48**(10): 3463-3466.

8 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Aminosäuren:	A (Ala) Alanin, I (Ile) Isoleucin, R (Arg) Arginin, C (Cys) Cystein, K (Lys) Lysin, S (Ser) Serin, D (Asp) Asparaginsäure, L (Leu) Leucin, T (Thr) Threonin, E (Glu) Glutaminsäure, M (Met) Methionin, V (Val) Valin, F (Phe) Phenylalanin, N (Asn) Asparagin, W (Trp) Tryptophan, G (Gly) Glycin, P (Pro) Prolin, Y (Tyr) Tyrosin, H (His) Histidin, Q (Gln) Glutamin
A _{STD}	STD-Amplifikationsfaktor
BPA	<i>Bis(2-picolyl)amine</i>
c'	Verkürzter C-Terminus
C-Terminus	Carboxyende einer Polypeptidkette
DABP-GTP	diaminobenzophenonephosphoramidate-GTP
DNase	Desoxyribonuklease
DMSO	Dimethylsulfoxid
DSS	2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonat
DTE	1,4-Dithioerythritol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Erdbeschleunigung
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid Austauschfaktor
GppNHp	Guanosin-5'-(β , γ -imido)-triphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H166A	Mutation der Aminosäure 166 von Histidin zu Alanin
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalaktosid
K	Kelvin
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton

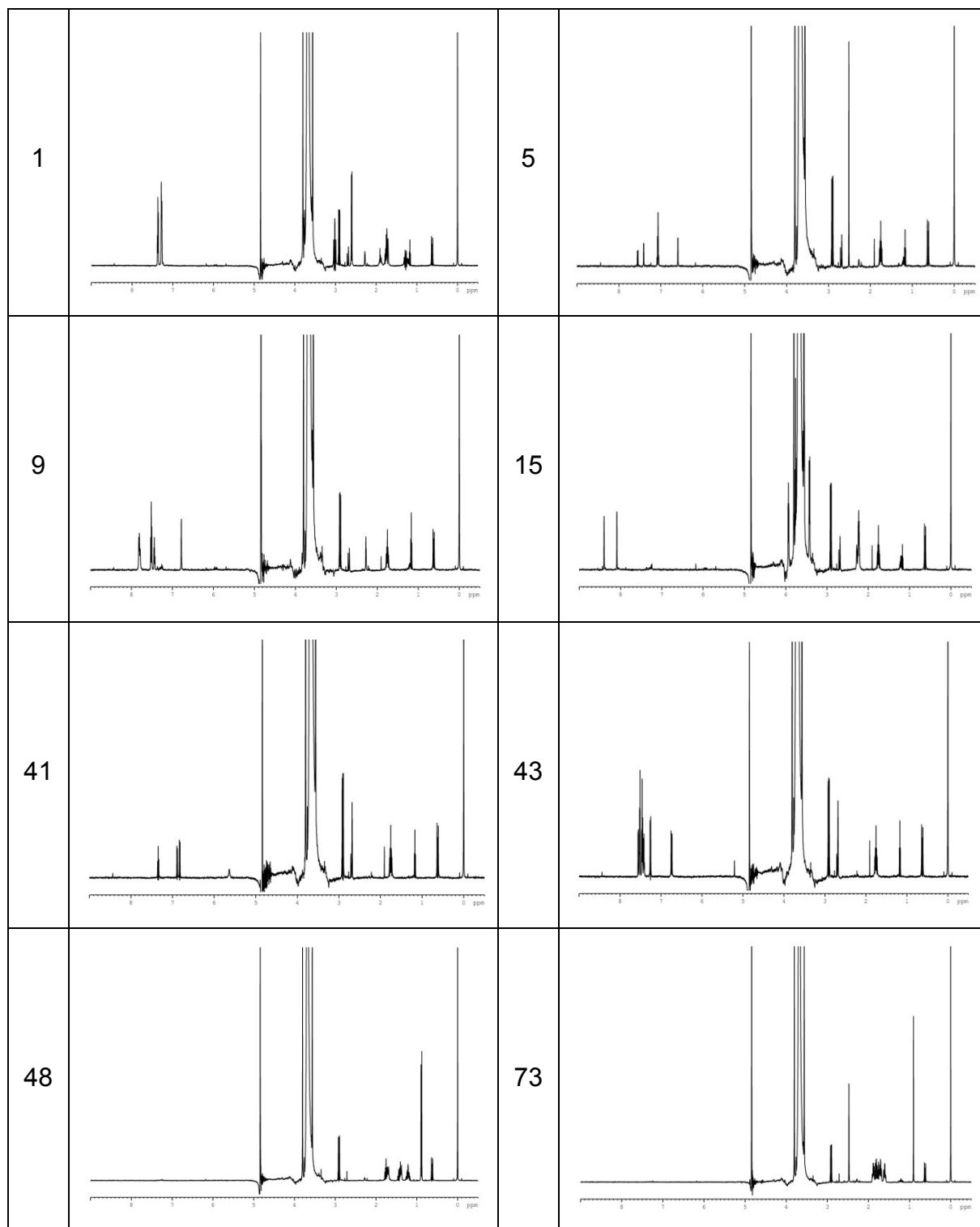
M	mol/l
nm	Nanometer
NMR	Kernspinresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
P1, P2 P3, P4	 Positionen 1, 2, 3 und 4 im virtuellen Screening der Ambinter-, ChemStar- und InterBioScreen Bibliotheken mit LUDI
P1Z, P2Z P3Z, P4Z	 Positionen 1, 2, 3 und 4 im virtuellen Screening der ZINC Bibliothek mit LUDI
³¹ P	Phosphor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P _i	Orthophosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
ppm	10 ⁻⁶ (<i>parts per million</i>)
Ras	Ratten-Sarkom Protein
RBD	Ras-Bindedomäne
RIA	Radioimmunoassay
RO3	Rule-Of-Three
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
sofast HMQC	<i>Selective Optimized Flip-Angle Short-Transient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
STD	Sättigungs-Transfer-Differenz
T	Temperatur in Kelvin
T35A	Mutation der Aminosäure 35 von Threonin zu Alanin
T35S	Mutation der Aminosäure 35 von Threonin zu Serin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TROSY	<i>Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy</i>
U	Enzymatische Aktivität in $\mu\text{mol/min}$ (<i>unit</i>)
wt	Wildtyp
δ	Chemische Verschiebung
λ	Wellenlänge

9 Anhang

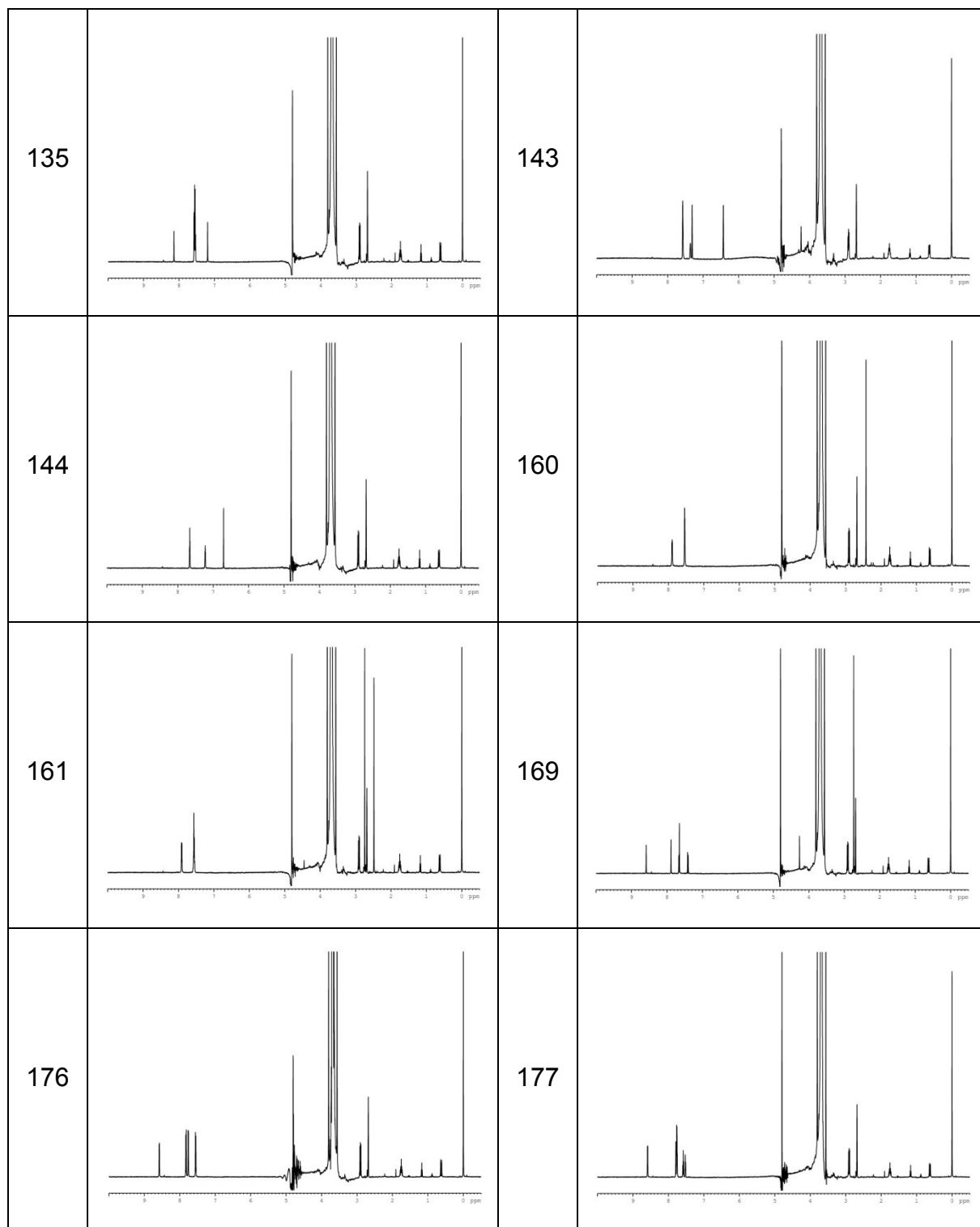
Chemische Verschiebungen der Aminosäuren von 0.1 mM ^{15}N -gelabeltem c'Ras(T35A, H166A)•Mg $^{2+}$ •GppNHp im (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQC bei 278 K.

Aminosäure	$\delta (^{15}\text{N})$ [ppm]	$\delta (^1\text{H})$ [ppm]	Aminosäure	$\delta (^{15}\text{N})$ [ppm]	$\delta (^1\text{H})$ [ppm]	Aminosäure	$\delta (^{15}\text{N})$ [ppm]	$\delta (^1\text{H})$ [ppm]
ALA11	121.88	9.04	GLU126	127.19	8.74	LYS5	123.58	9.04
ALA121	122.75	8.15	GLU143	124.81	7.83	LYS88	124.20	8.45
ALA122	121.81	7.70	GLU153	116.90	8.28	MET111	123.00	8.18
ALA130	123.58	7.01	GLU162	118.18	8.14	MET67+ARG73	116.77	8.00
ALA134	121.88	8.43	GLU3	126.67	8.35	MET72	119.08	8.36
ALA146	132.38	9.12	GLU31	118.29	7.95	PHE156	112.67	7.20
ALA155	124.12	8.61	GLU37	122.17	8.07	PHE28	122.41	8.21
ALA166	130.05	7.57	GLU49	122.35	7.65	PHE78	121.47	8.27
ALA18	125.32	9.11	GLU63	120.82	8.50	PHE82	123.98	9.31
ALA35	118.79	7.88	GLU76	121.41	8.90	PHE90	124.68	7.41
ALA59	122.66	8.43	GLU91	121.77	8.43	SER106	109.20	7.54
ALA83	121.16	8.69	GLU98	117.22	8.02	SER127	121.79	9.43
ARG102	118.07	7.74	GLY10	108.02	7.41	SER136	117.87	7.94
ARG123	120.29	8.00	GLY115	114.60	8.03	SER145	112.54	8.80
ARG128	117.96	8.68	GLY12	106.34	8.76	SER17	119.91	9.54
ARG135	118.40	8.45	GLY13	113.37	8.89	SER39	113.44	7.81
ARG149	118.18	7.80	GLY138	111.01	8.32	SER65	119.17	7.85
ARG161	119.08	8.03	GLY15	108.20	8.38	SER89	114.29	7.95
ARG164	118.90	8.41	GLY151	115.18	8.94	THR124	114.38	9.15
ARG41	120.76	8.30	GLY48	103.04	8.33	THR144	112.63	8.81
ARG68	120.29	7.68	GLY60	111.24	9.38	THR148	106.22	7.71
ARG97	118.99	8.35	GLY75	108.22	7.85	THR158	117.02	8.53
ASN116	121.20	8.76	GLY77	101.30	7.21	THR20	116.99	7.51
ASN26	116.64	7.99	HIS94	117.37	7.81	THR50	126.15	8.93
ASN85	117.08	7.89	ILE100	120.20	7.61	THR58	113.50	7.36
ASN86	119.17	7.93	ILE139	113.43	8.08	THR74	108.73	7.73
ASP105	120.92	7.95	ILE142	130.23	8.49	TYR137	120.09	7.61
ASP107	122.41	8.40	ILE163	122.71	8.25	TYR141	119.99	8.27
ASP108	120.73	8.34	ILE21	120.85	8.91	TYR157	119.32	9.56
ASP119	117.46	8.60	ILE24	114.22	8.14	TYR32	121.43	8.04
ASP132	120.18	8.21	ILE36	123.98	8.26	TYR4	121.97	8.73
ASP154	116.52	8.16	ILE46	126.07	8.16	TYR40	122.82	9.01
ASP33	125.86	8.12	ILE55	124.03	9.19	TYR64	121.18	8.31
ASP38	120.78	8.07	ILE84	113.26	8.47	TYR71	118.58	8.13
ASP54+57	125.77	8.75	ILE93	120.74	7.57	TYR96	119.39	7.62
ASP69	118.65	8.10	LEU113	128.80	8.92	VAL103	118.41	8.28
ASP92	117.44	8.50	LEU120	120.98	7.80	VAL109	122.48	7.71
CYS118	114.20	8.77	LEU133	123.67	7.49	VAL112	117.89	8.13
CYS51	124.09	9.46	LEU159	121.67	7.24	VAL114	128.21	9.17
CYS80	124.45	8.72	LEU19	120.60	8.83	VAL125	124.54	7.62
GLN129	116.90	6.80	LEU23	120.20	7.74	VAL14	112.50	7.40
GLN131	118.09	8.60	LEU52	121.99	8.77	VAL152	120.73	7.10
GLN150	124.30	7.82	LEU53	124.09	9.18	VAL160	118.92	7.50
GLN165	116.19	7.62	LEU56	130.00	9.00	VAL29	125.64	7.66
GLN22	120.92	8.11	LEU79+6	126.11	9.19	VAL44	121.03	9.10
GLN25	116.26	8.91	LYS101	117.40	7.76	VAL45	121.18	8.10
GLN43	128.98	8.90	LYS104	116.35	8.12	VAL7	121.92	8.11
GLN61	119.77	8.26	LYS117	112.61	7.25	VAL8	128.80	8.72
GLN70	118.03	7.79	LYS147	115.83	6.97	VAL81	126.13	9.03
GLN95	116.25	7.49	LYS16	123.83	9.10	VAL9	120.51	9.11
GLN99	120.15	7.89	LYS42	122.86	8.72			

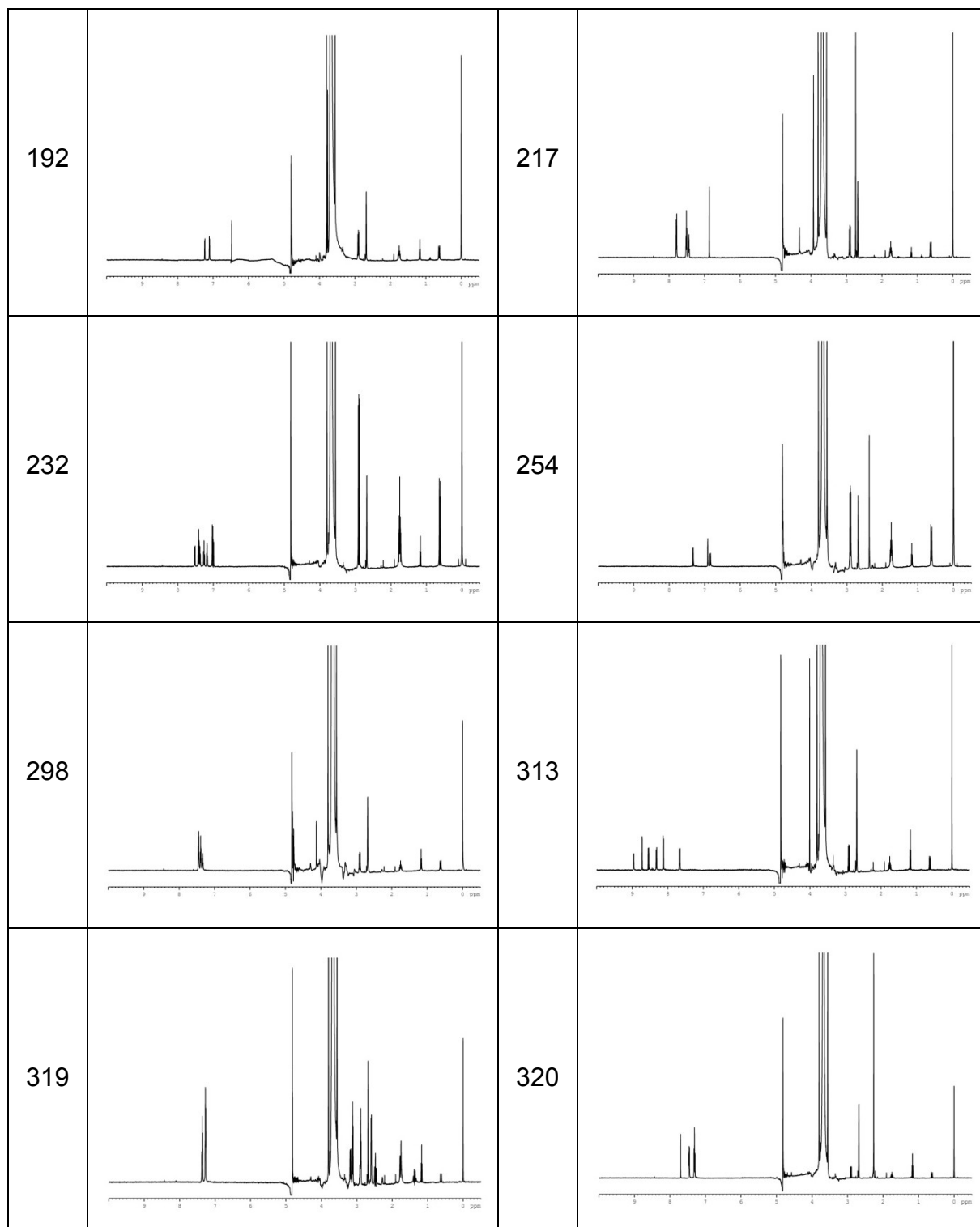
^1H -NMR-Spektren der Liganden 1, 5, 9, 15, 41, 43, 48 und 73 bei Konzentrationen von 250 μM und einer Temperatur von 294K.



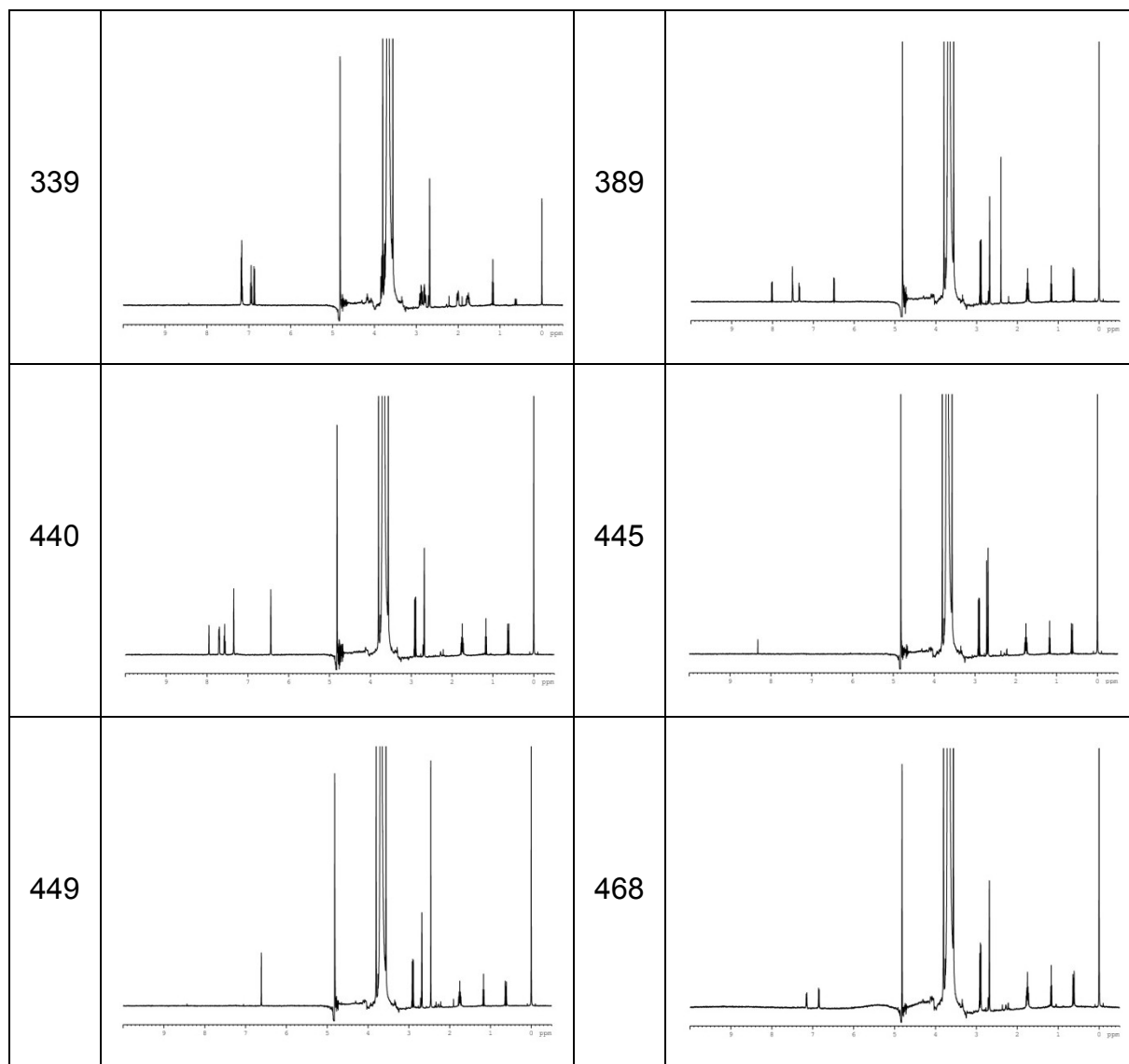
^1H -NMR-Spektren der Liganden 135, 143, 144, 160, 161, 169, 176 und 177 bei Konzentrationen von 250 μM und einer Temperatur von 294K.



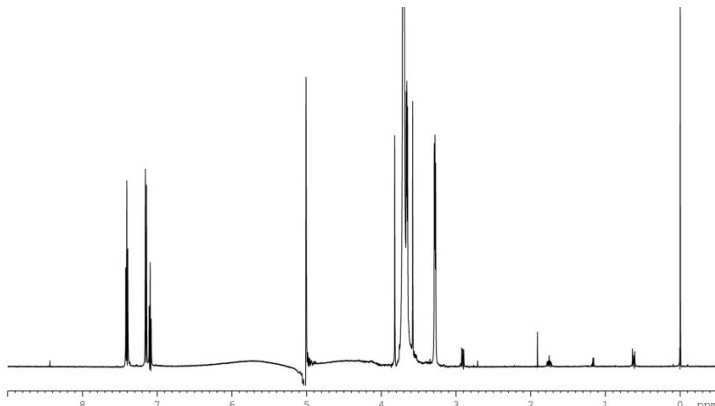
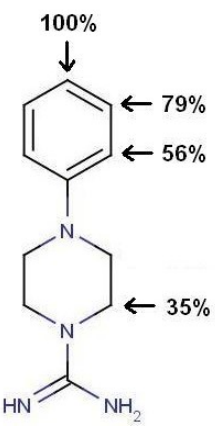
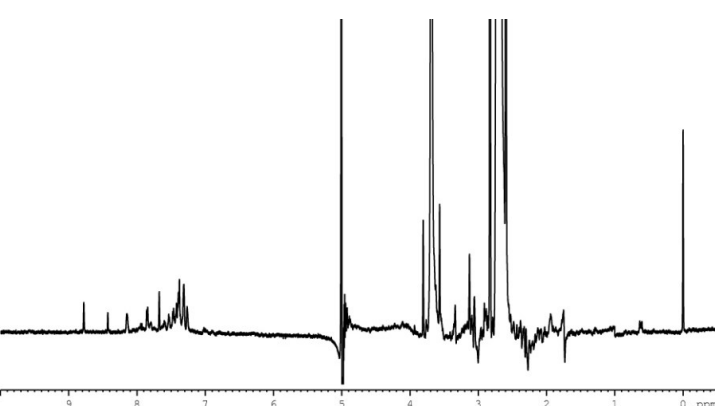
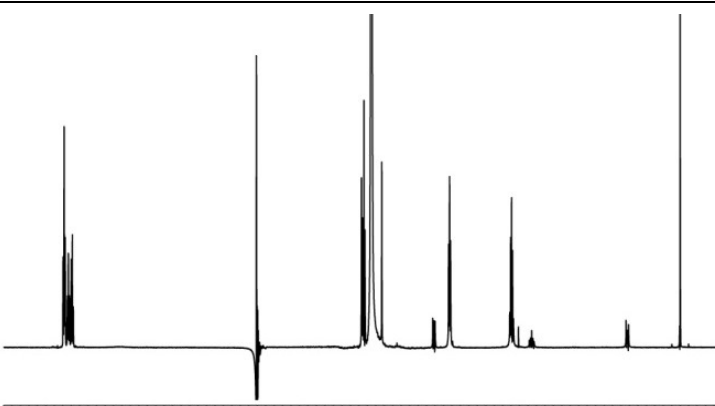
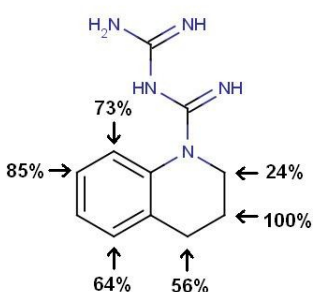
^1H -NMR-Spektren der Liganden 192, 217, 232, 254, 298, 313, 319 und 320 bei Konzentrationen von 250 μM und einer Temperatur von 294K.



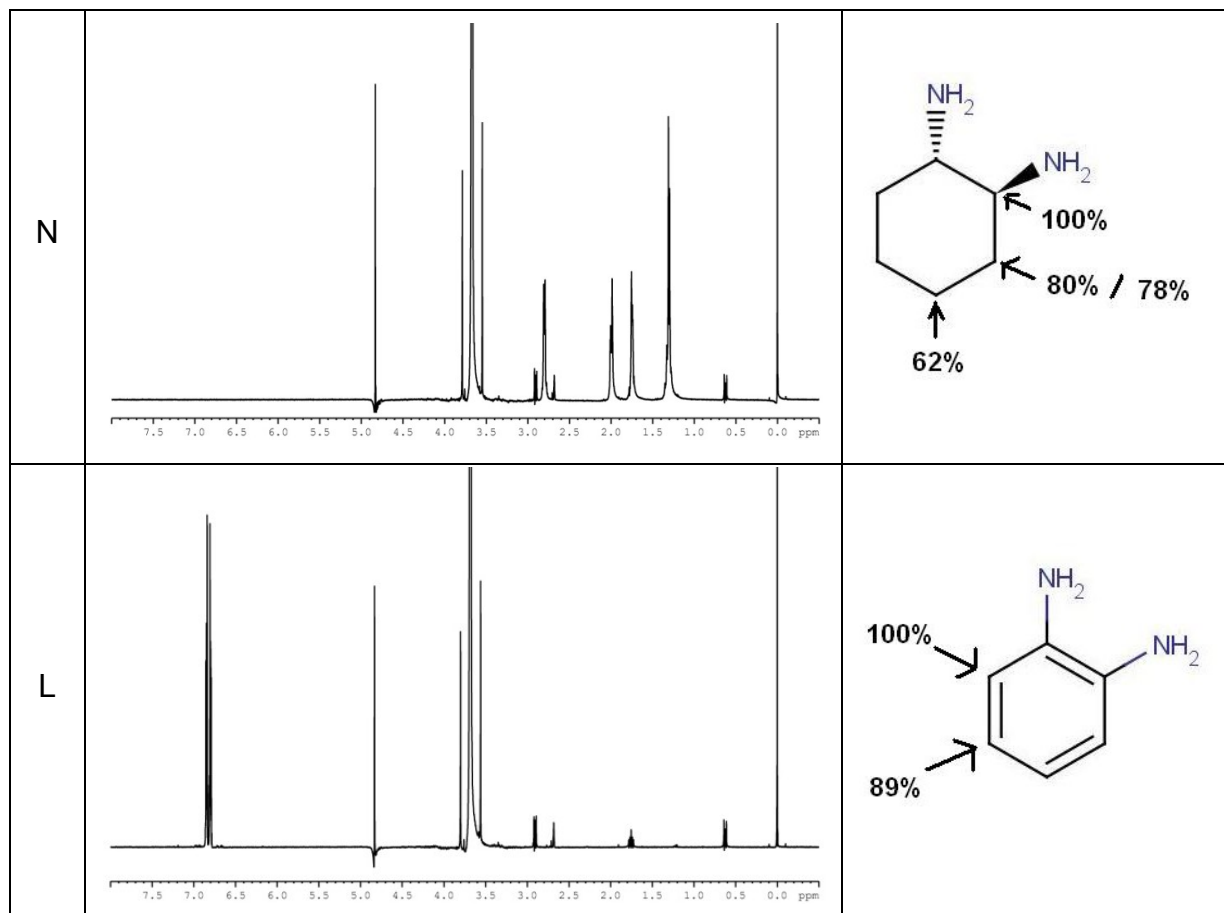
^1H -NMR-Spektren der Liganden 339, 389, 440, 445, 449 und 468 bei Konzentrationen von 250 μM und einer Temperatur von 294K.



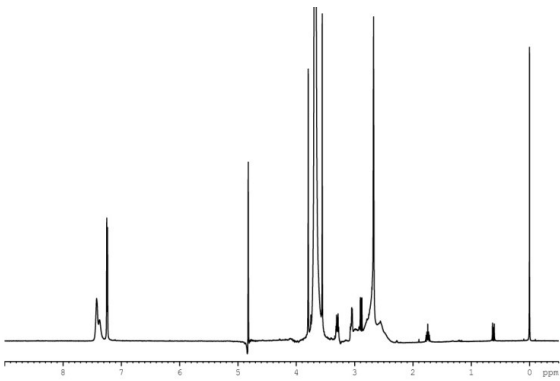
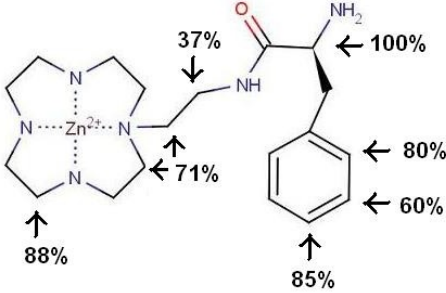
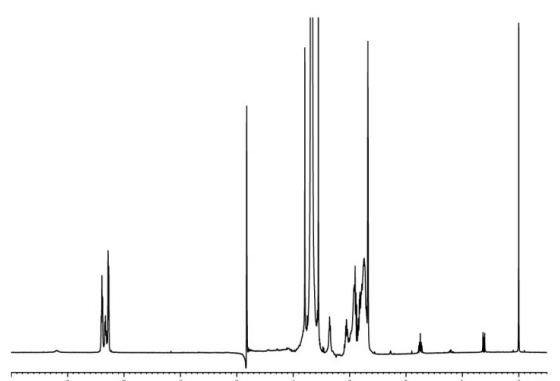
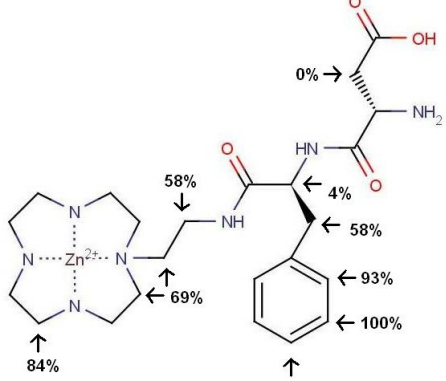
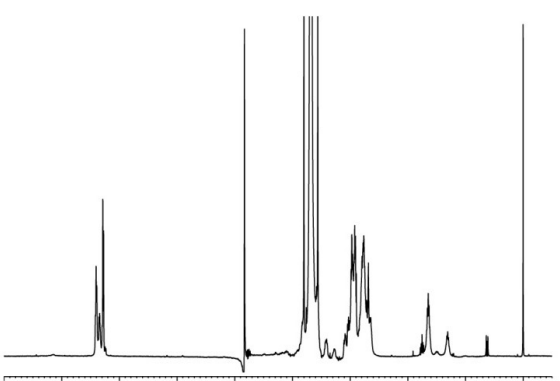
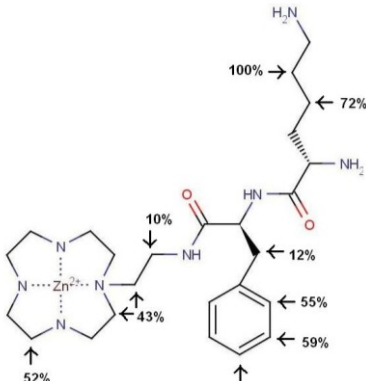
^1H -NMR-Spektren der Liganden B1, B2 und B4 bei Konzentrationen von 2 mM und einer Temperatur von 278K sowie Epitope aus den STD-NMR-Spektren mit 20 μM c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp.

B1		
B2		Epitopsbestimmung nicht möglich
B4		

^1H -NMR-Spektren der Substanzen N und L bei Konzentrationen von 2 mM und einer Temperatur von 278K sowie Epitope aus den STD-NMR-Spektren mit 20 μM c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp.



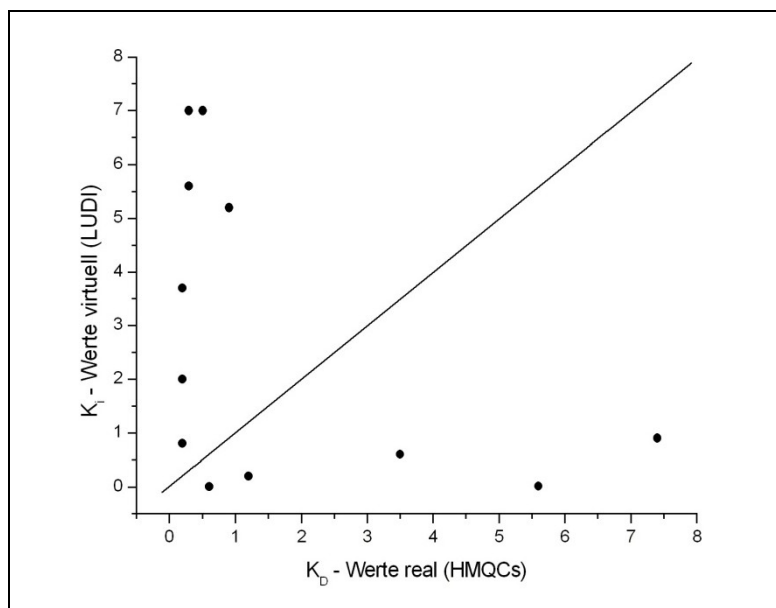
^1H -NMR-Spektren der Zn^{2+} -Cyclen-Derivate TG-ZC-132, TG-ZC-333 und TG-ZC-334 bei Konzentrationen von 1 mM und einer Temperatur von 294K sowie Epitope aus den STD-NMR-Spektren mit c'Ras(T35A)• Mg^{2+} •GppNHp (c=20 μM).

TG-ZC-132		
TG-ZC-333		
TG-ZC-334		

Überblick über alle 35 neuen Liganden für c'Ras(T35A)•Mg²⁺•GppNHp, welche durch STD-NMR bestätigt wurden, mit Bindungspositionen nach LUDI sowie (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQCs.

		Virtuelles Screening mit LUDI				(¹ H- ¹⁵ N)-sofast-HMQC			Übereinstimmung?	
		Position 1	Position 2	Position 3	Position 4	Position A	Position B	Position C		
Liganden der Maybridge Library aus STD-NMR-Screening	1	o					xxx	x	nein	
	5	o				xx	xxx	x	ja	
	9	o				xxx	xx	x	ja	
	15	Substanz konnte nicht mit LUDI an Positionen 1-4 gedockt werden								
	41	o				x	xxx		ja	
	43	Substanz konnte nicht mit LUDI an Positionen 1-4 gedockt werden								
	48		o			unspezifische Bindung				
	73	o				unspezifische Bindung				
	135	o				xxx	xxx	xx	ja	
	143	o				xxx		x	ja	
	144	Substanz konnte nicht mit LUDI an Positionen 1-4 gedockt werden								
	160	o				xxx	xx	xx	ja	
	161	o				xxx	x	x	ja	
	169				o	xxx		x	nein	
	176				o	xxx	xx	xxx	nein	
	177	o				xxx	x	xx	ja	
	192	o				xxx	xx	xx	ja	
	217		o			xxx	x	xx	nein	
	232	o				xxx	xx	x	ja	
	254			o		xxx	x	x	nein	
	298			o		xx	xxx		nein	
	313	Substanz konnte nicht mit LUDI an Positionen 1-4 gedockt werden								
	319	o				x	xxx		ja	
	320	Substanz konnte nicht mit LUDI an Positionen 1-4 gedockt werden								
	339	Substanz konnte nicht mit LUDI an Positionen 1-4 gedockt werden								
	389	Substanz konnte nicht mit LUDI an Positionen 1-4 gedockt werden								
	440	Substanz konnte nicht mit LUDI an Positionen 1-4 gedockt werden								
445	Substanz konnte nicht mit LUDI an Positionen 1-4 gedockt werden									
449	Substanz konnte nicht mit LUDI an Positionen 1-4 gedockt werden									
468	Substanz konnte nicht mit LUDI an Positionen 1-4 gedockt werden									
ZINC	Substanz N	o				xxx		xx	ja	
	Substanz L	o				xxx		x	ja	
Ambinter	Substanz B1	o				zu wenig Substanz vorhanden				
	Substanz B2	o								
	Substanz B4		o							
	höchste Bindungskonstante		Position 1 des virtuellen Screenings entspricht Position A in den HMQCs							
	xxx = 0.75 < Δδ _{comb} < 1		Positionen B und C waren nicht Gegenstand des virtuellen Screenings							
	xx = 0.50 < Δδ _{comb} < 0.75									
	x = 0.25 < Δδ _{comb} < 0.50									

Vergleich der virtuell berechneten K_i -Werte durch das Programm LUDI und der realen K_D -Werte aus (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQC-Titrationsen.



Liganden	K_i (LUDI) [mM]	K_D (HMQC / STD) [mM]
5	0.6	3.5
9	0.9	7.4
41	7	0.3
135	5.6	0.3
143	13	0.4
160	7	0.5
161	5.2	0.9
176	9	0.3
177	2	0.2
192	3.7	0.2
319	0.8	0.2
N	0.003	0.6
B1	0.2	1.2
B4	0.015	5.6

Danksagung

- 📌 Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für das interessante und motivierende Thema meiner Dissertation. Dankeschön, dass ich im Rahmen einer interdisziplinären Arbeitsgruppe und gut ausgestatteten Laboren arbeiten durfte.
- 📌 Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Stefan Dove für die Möglichkeit, durch das von Ihm bereitgestellte Programm LUDI ein virtuelles Screening durchführen zu können und für die stets ermutigenden Worte.
- 📌 Bei Herrn Prof. Dr. Werner Kremer bedanke ich mich für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung meiner Dissertation.
- 📌 Der DFG und dem Graduiertenkolleg GRK 760 möchte ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit danken.
- 📌 Herrn Prof. Dr. Burkhard König sowie Florian Schmidt vom Lehrstuhl für Organische Chemie danke ich für die Bereitstellung der Substanzen Zn^{2+} -Cyclen sowie *ortho*- und *meta*-Aminoanilin.
- 📌 Meinem Betreuer PD Dr. Michael Spörner danke ich für die Möglichkeit selbstbestimmt zu arbeiten. Dadurch habe ich mich sehr weiterentwickelt.
- 📌 Bei Paul Ramm bedanke ich mich für die Unterstützung in NMR-Fragestellungen, du warst immer sehr hilfsbereit und *sofast* 😊
- 📌 Für die nette, offene Arbeitsatmosphäre und die Hilfsbereitschaft am Lehrstuhl bedanke ich mich bei Tanja, Daniela, Maren, Paul, Raphael, Hannes, Malte, Markus, Jörg, Christoph, Groggy, Dörte, Werner und Sabine (Ost und West). Es hat mir immer Spaß gemacht, in einer so bunt gemischten Truppe zu arbeiten, zu diskutieren und auch mit euch zu feiern.
- 📌 Ein herzliches Dankeschön geht an meine beste Freundin und Trauzeugin Maren. Du bist einfach in jeder Situation ganz selbstverständlich für mich da. Ich bin so froh, dass ich dich hab 😊
- 📌 Meiner Familie möchte ich von ganzem Herzen Danke sagen. Mama und Papa, Ihr habt stets das Beste aus mir herausgeholt, mich gefordert und gefördert und dabei immer meinen eigenen Weg gehen lassen. Danke für all eure Unterstützung und Begleitung. Lena und Anna, danke dass Ihr immer für mich da seid, ich hab euch sehr lieb.
- 📌 Von ganzem Herzen danke ich meinem Mann Raphael für seine Liebe zu mir und den tiefen Glauben an mich. Du bist seit sieben Jahren mein Fels in der Brandung und machst mich sehr glücklich. Ich liebe dich.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Regensburg, September 2011



Sandra Kreitner