

Zeitaufgelöst und markerfrei gemessene ligandeninduzierte Konformationsänderungen von HSP90 – hin zu einem Konformationsaktivitätsscreening für die Wirkstoffentwicklung

Jörn Güldenhaupt, Marta Amaral, Carsten Kötting, Jonas Schartner, Djordje Musil, Matthias Frech und Klaus Gerwert*

Abstract: Während der frühen Medikamentenentwicklung ist die Untersuchung der Protein-Liganden-Wechselwirkungen von entscheidender Bedeutung. Die ATR-FTIR-Spektroskopie kann Protein-Liganden-Wechselwirkungen markerfrei mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung detektieren. Wir haben das Hitzeschockprotein HSP90, einen wichtigen molekularen Angriffspunkt für Medikamente, auf einem ATR-Kristall immobilisiert und mit unserem neuartigen Ansatz eine ligandeninduzierte Sekundärstrukturänderung untersucht. Zwei spezifische Bindungsmodi von 19 Inhibitoren wurden analysiert. Unterschiedliche Bindungsmodi können zu unterschiedlicher Wirksamkeit und Spezifität verschiedener Medikamente führen. Darüber hinaus wurden die k_{obs} -Werte der Dissoziation der Liganden ermittelt. Die Ergebnisse werden durch Röntgenkristallographie für die Strukturänderung und SPR-Experimente für die Dissoziationskinetik validiert, wobei unsere Methode sämtliche Daten in einem einzigen und einfachen Experiment liefert.

Das tiefgehende Verständnis ligandeninduzierter Konformationsänderungen in Proteinen mit gleichzeitig hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ist von fundamentalem Interesse.^[1,2] Die etablierten biophysikalischen Methoden, die derartige Informationen liefern (Röntgenkristallographie, NMR-Spektroskopie), sind aber sehr zeit- und materialaufwendig. Daher besteht momentan ein großes Interesse daran, alternative biophysikalische Verfahren zu entwickeln, die die gewünschten Informationen über Konformationsänderungen in Proteinen schneller liefern.^[3] Jedoch liefern alle diese Techniken entweder indirekte Informationen über die Konformationsänderungen, z. B. die Änderung des hydrodynamischen

Durchmessers (akustische Oberflächenwellen,^[4] elektroschaltbarer DNA-Chip^[5]), oder sie erfordern eine Markierung des Proteins an der richtigen Position ("Second Harmonic Generation"^[6]). Die Infrarot(IR)-Spektroskopie wiederum liefert spezifische zeitaufgelöste Informationen über Konformationsänderungen, ohne dass ein Marker nötig ist, indem sie die Sekundärstrukturempfindlichkeit der Absorptionsfrequenz der Amid-I-Banden von Proteinen nutzt.^[7] Diese Beziehung zwischen IR-Spektrum und Proteinstruktur ermöglicht eine direkte molekulare Interpretation der Spektren und erlaubt so die Unterscheidung verschiedener Arten von ligandeninduzierten Konformationsänderungen. Da die FTIR-Spektroskopie mit abgeschwächter Totalreflexion (ATR) auf einem oberflächenbasierten Detektionsprinzip beruht, kann sie in Durchfluss-Systemen eingesetzt werden. Dadurch bietet sie die Möglichkeit, reversible Liganden-Protein-Wechselwirkungen zu untersuchen.^[8]

Insbesondere Mehrfachreflexions-ATR-Messungen an Proteinmonolagen, die auf Germanium-IREs immobilisiert sind, ermöglichen einen breiten Spektralbereich (4000 bis 900 cm^{-1}) und ein ausreichend hohes Signal-Rausch-Verhältnis, um reversible Liganden-Wechselwirkungen zu detektieren. Vor kurzem haben wir Methoden zur spezifischen Proteinimmobilisierung auf Germanium-IREs entwickelt,^[9,10] bei denen His-markierte oder lipidierte Proteine an Lipiddoppelschichten anbinden. Alternativ etablierten wir die Immobilisierung über NTA-Gruppen, die in einer planaren Schicht oder in Dextran-Matrizes gebunden sind. Als Grundlage dieser Immobilisierungstechniken dienen jeweils selbstorganisierende Monolagen (SAMs) von Silanen oder Thiole.^[11–14] Dieser jüngste Durchbruch ermöglichte es uns, die ATR-FTIR-Spektroskopie als durchflussbasierten Sensor für die Detektion von Konformationsänderungen einzusetzen, um den Effekt der Bindung von Resorcinen auf die Konformation des molekularen Chaperons Hitzeschockprotein 90 (HSP90) zu untersuchen. HSP90 besteht aus drei Domänen und fördert als Dimer die korrekte Faltung anderer Proteine.^[15] Die N-terminale Domäne (HSP90 NTD, 25 kDa), die in dieser Studie analysiert wurde und im Folgenden als HSP90 bezeichnet wird, umfasst eine ATP-Bindetasche zwischen α -Helix 2, α -Helix 3 und dem zentralen β -Faltblatt (Abbildung 1 A). Da HSP90 ein Zielprotein in der Krebstherapie ist, werden derzeit mehrere HSP90-Inhibitoren, die diese Bindetasche angreifen, in klinischen Studien untersucht.^[16] Im Verlauf dieser Wirkstoff-Forschung wurden Inhibitoren gefunden, die die Bildung einer transienten Subbindetasche stabilisieren, was zu einem Loop-zu-Helix-Übergang in α -

[*] Dr. J. Güldenhaupt, Dr. C. Kötting, Dr. J. Schartner, Prof. Dr. K. Gerwert

Lehrstuhl für Biophysik, Ruhr-Universität Bochum
44780 Bochum (Deutschland)
E-Mail: gerwert@bph.rub.de

Dr. M. Amaral, Dr. D. Musil, Dr. M. Frech
Molecular Interactions and Biophysics, Merck KGaA
Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (Deutschland)

Dr. M. Amaral
Derzeitige Adresse:
Sanofi-Aventis (Deutschland) GmbH
Biologics Research/ Protein Therapeutics
Frankfurt am Main (Deutschland)

 Hintergrundinformationen und die Identifikationsnummer (ORCID) eines Autors sind unter:
<https://doi.org/10.1002/ange.201802603> zu finden.

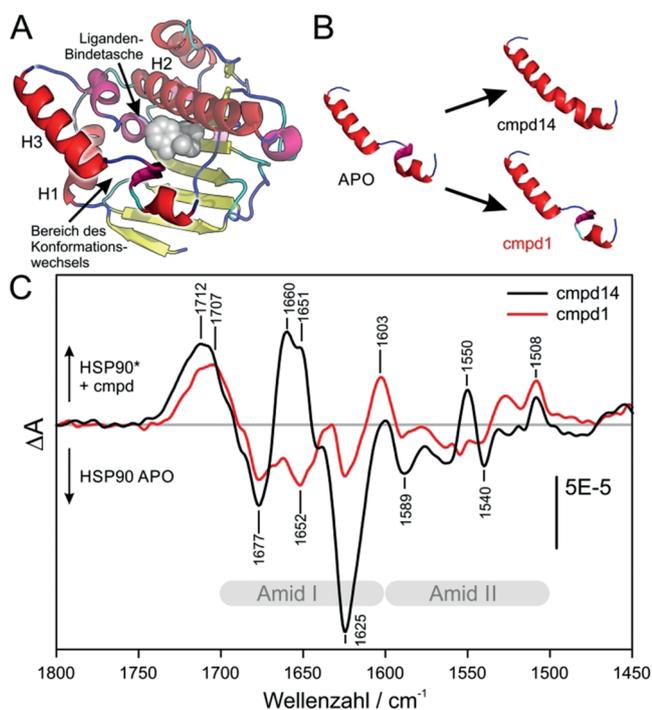


Abbildung 1. Konformationsänderung in der ATP-Bindetasche von HSP90 NTD durch verschiedene Arten von Inhibitoren. A) Die NTD des HSP90 APO (1YER) wird in „Cartoon“-Darstellung gezeigt. Die Sekundärstrukturzuweisung erfolgte durch den STRIDE-Algorithmus^[22] und die verschiedenen Strukturen wurden nach folgendem Schema eingefärbt: β -Faltblatt (gelb), „Random coil“ (blau), α -Helices (rot), 3_{10} -Helix (magenta) und „Turn“ (cyan). Die Position der Ligandenbindetasche wird durch das Hinzufügen des Loopbinders cmpd1 (graue Kugeln) veranschaulicht. B) Nur Helix 3 der HSP90 APO-Struktur (1YER) und die Co-Kristallstrukturen von HSP90 im Komplex mit cmpd 14 (PDB ID 5J27) und cmpd 1 (PDB ID 5J64) werden gezeigt. Die Bindung von cmpd 14 führt zu einer Änderung der Sekundärstruktur in Helix 3, die das Helix-Loop-Helix-Motiv in eine kontinuierliche Helix-Konformation umwandelt. Im Gegensatz dazu verändert die Bindung von cmpd 1 die Sekundärstruktur nicht wesentlich. C) Liganden-Interaktionsspektren von cmpd 14 und 1 stellen die Absorptionsspektren des immobilisierten HSP90 mit und ohne die entsprechenden Liganden dar und entsprechen somit der Summe der Konformationsänderungsspektren von HSP90 und der Liganden-Absorptionsspektren. Die Frequenz der positiven Bande bei $1660\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ im Liganden-Interaktionsspektrum von cmpd 14 ist charakteristisch für Helix-Sekundärstrukturen und kann somit der vollständigen Helix 3 zugeordnet werden.

Helix 3 führt.^[17,18] Diese ligandeninduzierte Konformationsänderung kann als typischer Effekt angesehen werden, der im Verlauf der Erforschung zusätzlicher Wechselwirkungen im Bereich von etablierten Ligandenbindetaschen auftreten kann: Oft erhöht sich durch eine dann höhere Selektivität die Spezifität der Arzneimittelwirkung.^[19] Um diese inhibitorinduzierte Konformationsänderung zu untersuchen, führten wir ATR-FTIR-Messungen an insgesamt 19 Resorcine-Inhibitoren durch, wobei zwei verschiedene Typen (Triazolone bzw. Pyrazole), die verschiedene Substituenten R^1 und R^2 tragen, eingesetzt wurden (Tabelle 1). Für sechs der dreizehn Triazolone und für zwei der sechs Pyrazole existieren Röntgen-Cokristallstrukturen, die einen stabilisierenden Effekt

Tabelle 1: Die Resorcine in dieser Studie haben zwei Arten von Gerüsten, Triazolone (A) und Pyrazole (B) und variieren in den Substituenten R^1 und R^2 . Die Liganden (cmpd) sind zuerst nach ihrem bekanntesten und erwarteten Effekt auf die Konformation von HSP90 und dann nach zunehmender Verweilzeit sortiert (siehe Tabelle S3).

cmpd	Typ	R^1	R^2	cmpd	Typ	R^1	R^2
1	T	H	F	11	T		F
2	T	H	Me	12	T		Me
3	T	H	Cl	13	P		Me
4	P	H	Cl	14	T		F
5	P	H	Et	15	T		F
6	T	Br	F	16	T		H
7	P		Cl	17	T		Me
8	P		Me	18	P		Me
9	T		Cl	19	T		F
10	T		F				

der Liganden auf die HSP90-Bindetasche zeigen. Basierend auf diesen Daten lassen sich die Verbindungen in Loopbinder und Helixbinder unterteilen (Abbildung 1B). Kinetische Daten aus Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)-Messungen wurden zusammen mit Strukturdaten zur Validierung unseres FTIR-basierten Konformationsänderungssensors verwendet.

Nach der schrittweise erfolgten Modifikation der Germanium-IRE-Oberfläche zur Bildung der proteinbindenden NTA-Schicht und der anschließenden Immobilisierung von HSP90 auf dieser Schicht (wie zuvor beschrieben,^[12] siehe Abbildung S1 und experimentelle Verfahren für Details) wurden die Liganden-interaktionsexperimente durchgeführt. Die Zeitreihen der erhaltenen Differenzspektren wurden mit der multivariaten Methode MCR-ALS (‘‘multivariate curve resolution alternating least square’’^[20]) ausgewertet, um die durch die Ligandenbindung induzierten Konformationsänderungsspektren und ihre jeweilige Kinetik zu extrahieren (siehe Abbildung S5 und experimentelle Verfahren für Details). Diese Art von Differenzspektrum ist die Summe aus dem Sekundärstruktur-Änderungsspektrum des Proteins und der intrinsischen Absorption des Liganden und wird im Folgenden auch als Liganden-Interaktionsspektrum bezeichnet.

Wir haben zunächst die Effekte der Bindung von Verbindung (cmpd) 1 und 14 auf HSP90 untersucht. Dieser Vergleich bot sich an, weil cmpd 1 und 14 zwar ein gemeinsames Triazolone-Gerüst mit nur einer einzigen Variation in R^1 aufweisen, aber verschiedene Bindungsmodi haben. Letzteres

ist durch Cokristallstrukturen von HSP90 im Komplex mit cmpd 1 und 14 bekannt, sie werden deshalb als Loop- bzw. Helixbinder klassifiziert.

Abbildung 1 C zeigt die Liganden-Interaktionsspektren von cmpd 1 und 14, die Differenzen der Absorptionsspektren vom HSP90 im ligandengebundenen und im Apo-Zustand entsprechen (HSP90 cmpd – HSP90 APO). Beide Liganden-Interaktionsspektren zeigen positive und negative Banden im konformationsrelevanten Amid-I- ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) und Amid-II-Bereich ($1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$) sowie eine positive Bande bei ca. 1710 cm^{-1} . Das Liganden-Interaktionsspektrum des Helixbinders cmpd 14 zeigt deutliche positive Banden bei 1660 und 1651 cm^{-1} , die im Liganden-Interaktionsspektrum von cmpd 1 nicht vorhanden sind. Der Spektralbereich von $1665\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ ist charakteristisch für die Amid I Absorption von helikalen Sekundärstrukturen, wie α -Helices und 3_{10} -Helices.^[21] Zudem ist die positive Bande bei 1550 cm^{-1} , die der Amid-II-Absorption von α -Helices^[21] entspricht, nur im Liganden-Interaktionsspektrum von cmpd 14 und nicht in dem von cmpd 1 vorhanden. Das bedeutet, dass cmpd 14 die Bildung einer α -Helix induziert, was durch die Strukturdaten bestätigt wird (Abbildungen 1 B, S1). Interessanterweise besteht die im Spektrum von cmpd 14 vorhandene Helixbande aus zwei Teilbanden bei 1660 und 1651 cm^{-1} , was die Bildung von zwei unterschiedlichen helikalen Strukturen nahelegt. Ein Grund dafür könnte eine Biegung im neu gebildeten helikalen Teil (Abbildung 1B) oder eine dynamische Umwandlung zwischen mehreren Helixkonformationen sein (siehe Abbildung S7 für Details).

Die Liganden-Interaktionsspektren von cmpd 1 und 14 haben negative Banden ähnlicher Intensität bei 1677 cm^{-1} , der charakteristischen Absorptionsfrequenz für "Turns". Negative Absorptionsbanden bedeuten einen Verlust der absorbierenden Spezies im Vergleich zum vorherigen Zustand (= APO). Das bedeutet, dass der Anteil der Sekundärstruktur "Turn" durch Bindung des Liganden gesenkt wird. Für cmpd 14 lässt sich folgern, dass die Zunahme des Anteils der Sekundärstruktur α -Helix mit einer Abnahme der Sekundärstruktur "Turn" einhergeht. Diese Konformationsänderung von "Turn" zu α -Helix wird durch den Vergleich röntgenkristallographischer Daten von HSP90 APO und Protein-Ligand-Komplexen von HSP90 mit cmpd 14 bestätigt (Abbildung S4).

Die Position der Bande bei 1710 cm^{-1} ist bei cmpd 14 (1712 cm^{-1}) und cmpd 1 (1707 cm^{-1}) leicht unterschiedlich. Der Ursprung dieser Bande ist die Carbonylschwingung der Triazolongruppe, wie der Vergleich der Liganden-Interaktionsspektren aller untersuchten Pyrazole und Triazolone deutlich zeigt (Abbildung S7).

Das Liganden-Interaktionsspektrum von cmpd 14 zeigt eine negative Bande bei 1625 cm^{-1} , was einen Verlust von β -Faltblatt-Sekundärstruktur anzeigt (Abbildung 1 C). Während dieser Befund nicht durch Röntgendaten gestützt wird (siehe Abbildung S4), vermutlich aufgrund fehlender dynamischer Informationen, wurde in MD-Simulationen festgestellt, dass die Bindung von cmpd 14 vermutlich zu einer Destabilisierung des ersten Strangs des zentralen β -Faltblatts führt (Reste 17–21).^[23] Eine zweite Erklärung könnte eine ligandeninduzierte Störung des Proteintrückgrats von D93 in

der Mitte des β -Faltblatts sein, wie sie in NMR-Experimenten beobachtet wurde.^[24] Diese negative β -Faltblatt-Bande existiert auch im Liganden-Interaktionsspektrum von cmpd 1, ist aber mit etwa einem Drittel der Absorption wesentlich weniger intensiv.

Diese spektralen Beobachtungen passen gut zu den aus den Röntgendaten erhaltenen Sekundärstruktur-Zuordnungen und zeigen deutlich, dass die durchflussbasierte ATR-FTIR Spektroskopie zur Detektion von Konformationsänderungen eingesetzt werden kann.

Um die Vorhersagekraft von ATR-FTIR für die Erkennung von Konformationsänderungen weiter zu validieren, führten wir Liganden-Interaktionsmessungen von drei Loopbindern (cmpd 1, 4 und 6) und fünf Helixbindern (cmpd 7, 10, 14, 15 und 19) (Tabelle 1) durch. Die Zuordnung als Loop- oder Helixbinder wurde hierbei durch Röntgenstrukturanalysen gemacht (siehe Lit. [23] und diese Arbeit). Die Interaktionsspektren aller 8 Liganden sind in Abbildung S6 (schwarze Spektren) dargestellt.

Die Liganden-Interaktionsspektren aller 8 Liganden sind in Abbildung S6 (schwarze Spektren) dargestellt. Die Liganden-Interaktionsspektren der Helixbinder zeigen mit einer positiven Bande im Helixbereich der Amid-I-Bande bei $1662\text{--}1652\text{ cm}^{-1}$ und einer kleineren, aber signifikanten positiven Bande im Helixbereich des Amid-II-Bereiches bei 1550 cm^{-1} ein ähnliches Muster (Abbildungen 1 C, S6). Diese Helixbanden sind in den Liganden-Interaktionsspektren der Loopbinder nicht vorhanden. Die zuvor diskutierte negative β -Faltblatt-Bande bei 1624 cm^{-1} und die negative "Turn"-Bande bei 1677 cm^{-1} sind ebenfalls in allen Liganden-Interaktionsspektren der Helixbinder vorhanden, ihre Intensitäten sind jedoch variabel. Eine zusätzliche positive Bande bei 1637 cm^{-1} und eine negative Bande bei 1642 cm^{-1} können weiteren kleinen Veränderungen in Sekundärstrukturen wie "Random Coil" und β -Faltblatt zugeordnet werden.

Die Intensität der Banden im Amid I-Bereich ist für die verschiedenen Helixbinder unterschiedlich. Dies wird hauptsächlich durch Veränderungen der Biegeschwingung von Wasser verursacht, die zu breiten Signalüberlagerungen führen (vgl. Abbildung S10). Die Form der α -Helix-Doppelbande variiert zwischen den Liganden-Interaktionsspektren der verschiedenen Helixbinder. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die unterschiedlichen Liganden die α -Helix unterschiedlich stark stabilisieren (siehe Abbildung S7 für Details). Um einen bestimmten Liganden der Helixbinder- oder Loopbinder-Gruppe zuzuordnen, wurde zur Quantifizierung des Helix-Signals das Integral des Spektralbereichs von $1677\text{--}1642\text{ cm}^{-1}$ als Marker verwendet (Abbildung S6).

Diese Grenzen wurden gewählt, weil sie die nächstgelegenen Minima neben den Helixbanden im Bereich von $1660\text{--}1650\text{ cm}^{-1}$ markieren und somit die vollständige Erfassung einer potenziellen Amid-I-Helixbande gewährleisten. Abbildung 2 zeigt ein Balkendiagramm der erhaltenen Flächenintegrale der Helix-Banden. Für alle Helixbinder, die durch Röntgenstrukturanalyse validiert wurden (cmpd 7, 10, 14, 15 und 19) führt diese Integration zu großen Helix-Signalen zwischen 0.04 und 0.084, während die durch Röntgenstrukturanalyse validierten Loopbinder (cmpd 1, 4 und 6) mindestens achtmal kleinere Helix-Signale von unter 0.005 aufwei-

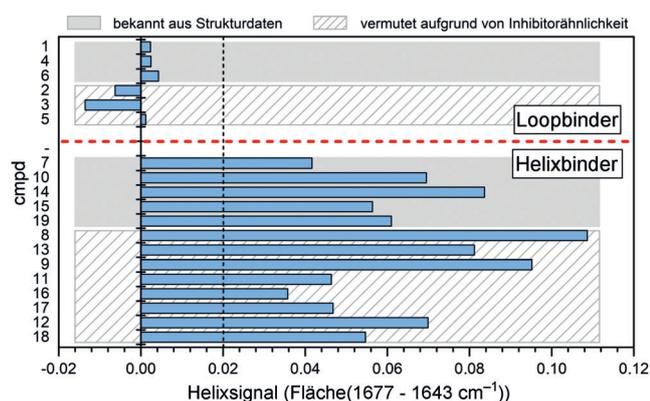


Abbildung 2. Bestimmung der Konformationsaktivität von Inhibitoren durch Analyse von Amid-I-Differenzbanden. Helix-Signale wurden aus den Liganden-Interaktionsspektren der Helixbinder durch Integration des Helix-Signalsbereichs, wie in Abbildung S6 dargestellt, extrahiert. Die Liganden werden nach Sekundärstrukturinformationen, die aus Röntgendaten von Co-Kristallen von HSP90-Inhibitor-Komplexen stammen, gruppiert (graue Kästen, Abbildung S4). Die Übereinstimmung der Flächenintegrale der Helix-Banden mit den Sekundärstrukturinformationen der HSP90-Inhibitor-Komplexe validieren die Methode eindeutig. Mit einem Grenzwert von 0.02 kann eine Vorhersage des Inhibitor-Typs (Helix- oder Loopbinder) für Inhibitoren mit unbekanntem Bindungsmodus (gestreifte Kästen) ohne Vorkenntnisse gemacht werden. Die Strukturähnlichkeiten zwischen den Verbindungen (Tabelle 1) bestätigen die Richtigkeit der Vorhersagen.

sen (Abbildung 2). Durch die Verwendung eines Grenzwertes von 0.02, der ungefähr der Mitte des maximalen Loopbinder- und des minimalen Helixbinder-Signals entspricht, konnten wir alle acht durch Röntgenstrukturanalyse validierten Liganden ihren jeweiligen Gruppen korrekt zuordnen.

Im nächsten Schritt wurden 11 weitere Liganden basierend auf der Intensität ihres Helix-Signals zugeordnet. Für diese Liganden lagen keine Strukturdaten vor. Die entsprechenden Spektren sind grau dargestellt (Abbildung S6). Basierend auf dem gewählten Grenzwert sind cmpd 2, 3 und 5 Loopbinder, während cmpd 8, 9, 11, 12, 13, 16, 17 und 18 Helixbinder sind (Abbildung 2). Tatsächlich haben cmpd 2, 3 und 5 nur ein einziges Atom als R^1 , so wie es auch für alle anderen durch Röntgenstrukturanalyse validierten Loopbinder gefunden wurde. Andererseits haben alle neu zugeordneten Helixbinder einen relativ großen Substituenten R^1 , wiederum im Einklang mit den durch Röntgenstrukturanalyse validierten Helixbindern. Dies zeigt weiter, dass unser ATR-FTIR-Ansatz den Bindungsmodus anhand kleiner, aber eindeutiger Konformationsunterschiede leicht bestimmen kann.

Neben Signalen, die auf Konformationsänderungen beruhen, enthalten die Liganden-Interaktionsspektren auch intrinsische Absorptionsbanden des Liganden. Diese Banden geben Hinweise auf lokale Bedingungen in der Bindetasche, z. B. auf die Beteiligung von strukturierten Wassermolekülen,^[25] und können so zur Charakterisierung des Bindungsmodus beitragen. Aus dem Vergleich aller Interaktionsspektren ergab sich, dass die Bande nahe 1710 cm^{-1} eindeutig auf die Triazolone-Carbonyl-Vibration zurückzuführen ist (siehe Abbildung S7). Unterstützt wird dies durch zusätzliche DFT-Berechnungen und durch Normalmodenanalysen, die zur

Berechnung der Absorptionsfrequenzen der Liganden in Wasser verwendet wurden. Die Position der Triazolone-Bande variiert zwischen 1715 und 1695 cm^{-1} , ist aber unabhängig von der Einteilung in Helix- oder Loopbinder. Die variable Position zusammen mit der bemerkenswerten Breite der Triazolone-C=O-Bande (FWHH von ca. 30 cm^{-1}) weist auf eine breite Variation der H-Brücken-Geometrien zum Carbonyl-Sauerstoffatom hin. Die bindungsabhängige Verschiebung der Absorption von 1702 nach 1710 cm^{-1} von cmpd 1 (vgl. Abbildung 1C und S2B) weist auf eine geringe Wasserstoffbrückenbindung von proteingebundenem cmpd 1 im Vergleich zu cmpd 1 in wässriger Lösung hin.

Tatsächlich zeigt die Triazolone-Carbonylgruppe aus der Bindetasche heraus und ist über eine H-Brücke an K58 sowie an Wassermoleküle gebunden, die zu einem Wassernetzwerk gehören, das zwischen der vermutlich dynamischen Helix 3 und Helix 2 über der Bindetasche lokalisiert ist (Abbildung S3). Für cmpd 9 und 10 wurde eine detailliertere Analyse mit DFT-Berechnungen des Liganden durchgeführt und weitere Banden zugeordnet (Abbildung S8). Die große Übereinstimmung der theoretischen und experimentellen Frequenzunterschiede der Chlorphenyl- und Fluorphenyl-Substitution in R^2 zeigt, wie tiefgehend die in den Liganden-Interaktionsspektren enthaltenen Informationen sind.

Da wir die Messungen in einem oberflächenbasierten Durchfluss-System durchgeführt haben, konnten wir die durch Ligandenbindung induzierten Effekte auf die Proteinkonformation zeitaufgelöst darstellen. Die MCR-ALS-Analyse von Zeitreihen der Infrarot-Differenzspektren ergab sowohl Liganden-Interaktionsspektren, die Informationen über die Konformationsänderung beinhalten, als auch Konzentrationsprofile, die kinetische Informationen über die Wechselwirkung zwischen Ligand und Protein beinhalten (siehe Abbildung S5). Für die Konzentrationsprofile aller Helixbinder-Experimente wurden eine segmentierte Anpassung verwendet, welche die drei Versuchsphasen Waschen mit Puffer, Ligandenzugabe und Waschen beschreibt (siehe die Hintergrundinformationen). Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} wurde aus einer monoexponentiellen Anpassung der Waschphase gewonnen. k_{obs} ist an die Geschwindigkeitskonstante k_{off} gekoppelt, kann aber bei Massentransfereffekten unterschiedlich sein. Abbildung 3 A zeigt Konzentrationsprofile von drei Helixbindern (cmpd 8, 14 und 18) mit schnellem, mittlerem und langsamem Signalabfall (relativ zur zeitlichen Auflösung der Experimente) und den entsprechenden Anpassungen. Die beobachtete Geschwindigkeitskonstante des Signalabfalls (k_{obs}) für diese Liganden war $(1.7 \pm 0.4) \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$ für cmpd 8, $(8.1 \pm 1.1) \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ für cmpd 14 und $(7.9 \pm 2.0) \times 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ für cmpd 18. Um zu evaluieren, ob unser Infrarot-basierter Durchfluss-Sensor systematischen Zugang zu diesen kinetischen Informationen geben kann, haben wir die Daten aller Helixbinder wie oben beschrieben analysiert. Die erhaltenen k_{obs} -Werte wurden mit k_{off} -Referenzwerten aus SPR-Messungen verglichen (siehe die Hintergrundinformationen und Lit. [23]). Abbildung 3 B zeigt ein Streudiagramm der reziproken Werte von k_{obs} (ATR) und der reziproken Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten k_{off} (SPR) mit ihrer jeweiligen Unsicherheit und einer linearen Anpassung der Daten. Bei einem Korrelati-

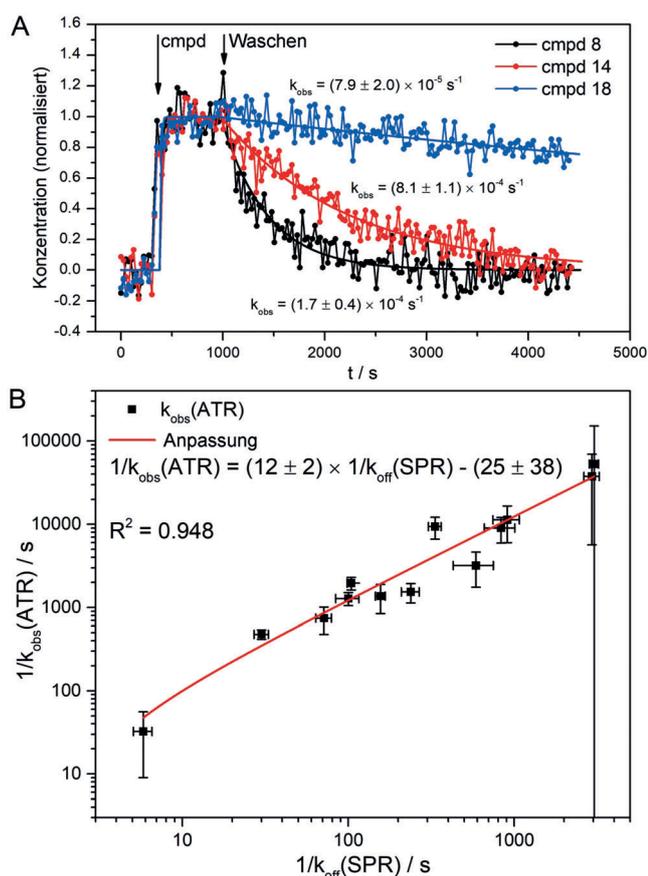


Abbildung 3. Kinetik der Ensemble-Konformationsänderung. A) Beispielhafte Konzentrationsprofile der Liganden-Interaktionsspektren der Wechselwirkung zwischen HSP90 und drei verschiedenen Helixbindern (compd 8, 14 und 18). Die Konzentrationsprofile wurden aus der MCR-ALS-Analyse der jeweiligen Zeitreihe von Infrarot-Differenzspektren gewonnen. Nach 5 Minuten Waschen mit Puffer wurden die Verbindungen 10 Minuten lang mit einer Konzentration von $5 \mu\text{M}$ über die Oberfläche gespült, gefolgt von einem Waschschrift von 60 Minuten. Die glatten Linien repräsentieren die Drei-Segment Anpassung der Konzentrationsprofile (siehe experimentelle Verfahren). Die beobachteten Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten $k_{\text{obs}}(\text{ATR})$ wurden aus monoexponentiellen Anpassungen der Waschsegmente erhalten. B) Konzentrationsprofile von 13 Helixbindern wurden wie oben beschrieben analysiert und die erhaltenen durchschnittlichen $k_{\text{obs}}(\text{ATR})$ gegen die k_{off} -Referenzwerte aus SPR-Experimenten in reziproken Werten aufgetragen. Mit einem Korrelationskoeffizienten R^2 von 0.948 korrelieren die von der ATR abgeleiteten Verweilzeiten stark mit den SPR-Referenzwerten. Die $1/k_{\text{obs}}(\text{ATR})$ -Werte sind 12-mal niedriger als die $1/k_{\text{off}}(\text{SPR})$ -Werte, was höchstwahrscheinlich auf die durch die große Oberfläche und die hohe Proteinbeladung im ATR-Experiment verursachten Massentransporteffekte zurückzuführen ist.

onskoeffizienten R^2 von 0.948 korrelieren die $1/k_{\text{obs}}(\text{ATR})$ -Werte stark mit den $1/k_{\text{off}}(\text{SPR})$ -Referenzwerten.

Wir haben festgestellt, dass die Unsicherheiten der $k_{\text{obs}}(\text{ATR})$ -Werte für Helixbinder im mittleren Bereich der analysierten Kinetik gering sind. Bei schnelleren Liganden werden die höheren Unsicherheitswerte durch die geringe zeitliche Auflösung (20 s pro Spektrum) verursacht, die gewählt wurde, um Spektren mit ausreichendem Signal-

Rausch-Verhältnis zu erhalten. Höhere Unsicherheitswerte für langsame Liganden ergeben sich aus der begrenzten Waschzeit von 1 h, die zu einem unvollständigen Signalabfall und damit zu nicht optimalen exponentiellen Anpassungen führt. Es wurde festgestellt, dass die reziproken beobachteten Geschwindigkeitskonstanten $1/k_{\text{obs}}(\text{ATR})$, die die Kinetik der Dissoziation repräsentieren, 12-mal niedriger sind als die Referenzwerte, die sich aus SPR-Messungen ergeben. Die Ursache hierfür sind Massentransporteffekte, die durch die große Sensorfläche^[26] von ca. 300 mm^2 sowie die hohe Beladung der Oberfläche mit Protein verursacht werden. Beides ist notwendig, um das erforderliche Signal-Rausch-Verhältnis im ATR-Aufbau zu erreichen. Die sehr starke lineare Korrelation der k_{obs} -Werte, die durch die ATR-Messungen erhalten wurden, mit den k_{off} -Werten von SPR-Experimenten zeigt, dass unser Ansatz für die systematische Untersuchung der Liganden Dissoziationskinetik gut geeignet ist.

Wir haben die ATR-FTIR-Spektroskopie eingesetzt, um die konformationsverändernden Effekte von 19 Resorcinen mit zwei unterschiedlichen Bindungstypen (Helix- und Loopbinder) auf HSP90 zu analysieren. Ein bemerkenswert umfangreicher Satz von Referenzdaten, bestehend aus acht Röntgenstrukturen und einem vollständigen Satz von kinetischen SPR-Daten (beide teilweise aus Lit. [23] und teilweise für diese Studie erhoben), wurde für den Vergleich verwendet, um eine robuste Validierung dieses neuartigen methodischen Ansatzes zu ermöglichen. Die Konformationseffekte der analysierten Inhibitoren wurden für alle Liganden mit bekannten Strukturdaten korrekt bestimmt. Weiterhin wurden erstmals die Bindungsmodi von 11 weiteren Inhibitoren bestimmt. Die Geschwindigkeitskonstanten k_{obs} zeigten eine starke Korrelation mit den k_{off} -Werten aus SPR-Experimenten. Darüber hinaus ermöglicht diese Methode ein tieferes Verständnis der Eigenschaften von Bindetaschen, indem sie eine detaillierte Analyse der Eigenschaften von Liganden-Absorptionsbanden ermöglicht. Unsere Arbeit zeigt den ersten systematischen Einsatz eines Infrarot-Spektroskopie-basierten Durchflusssensors zur markierungsfreien und zeitaufgelösten Detektion von ligandeninduzierten Konformationsänderungen.

Die Informationen über Proteindynamik und -konformation sowie zu chemischen Eigenschaften, die diese Methode liefert, werden dazu beitragen, die Mechanismen der Protein-Ligand-Wechselwirkungen besser zu verstehen, insbesondere die Parameter, die die k_{off} -Werte bestimmen. Vor allem in einer automatisierten Screening-Plattform kann unsere Methode im frühen Entwicklungsprozess zur Identifizierung neuer Wirkstoffkandidaten eingesetzt werden.

Experimentelles

Die Röntgen-Cokristallstrukturen von compd 4 und 7 wurden erhalten wie zuvor für die anderen Liganden (compd 1, 6, 10, 14, 15 und 19) beschrieben,^[23] und SPR-Experimente an compd 4, 5, 7 und 8 wurden durchgeführt wie zuvor für die anderen Liganden (compd 1–3, 6 und 9–19) beschrieben.^[23] Siehe die Hintergrundinformationen für Details und weitere experimentellen Informationen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde unterstützt vom EU/EFPIA Innovative Medicines Initiative (IMI) Joint Undertaking, K4DD (grant no. 115366). Diese Publikation gibt nur die Meinung der Autoren wieder, und weder das IMI noch die Europäische Kommission haften für die Verwendung der hierin enthaltenen Informationen. Wir danken Steffen Wolf für die Hilfe bei den DFT-Berechnungen, Jutta Güldenhaupt für Hilfe mit dem Manuskript und Daria Kokh und Jörg Bomke für hilfreiche Gespräche.

Interessenkonflikt

Die Autoren erklären, dass keine Interessenkonflikte vorliegen.

-
- [1] S. J. Teague, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2003**, *2*, 527–541.
- [2] R. A. Copeland, *Future Med. Chem.* **2011**, *3*, 1491–1501.
- [3] J.-P. Renaud, C.-W. Chung, U. H. Danielson, U. Egner, M. Hennig, R. E. Hubbard, H. Nar, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2016**, *15*, 679–698.
- [4] R. G. Heym, W. B. Hornberger, V. Lakics, G. C. Terstappen, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics* **2015**, *1854*, 979–986.
- [5] A. Langer, P. A. Hampel, W. Kaiser, J. Knezevic, T. Welte, V. Villa, M. Maruyama, M. Svejda, S. Jähner, F. Fischer, et al., *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2099; <https://doi.org/10.1038/ncomms3099>.
- [6] B. Moree, K. Connell, R. B. Mortensen, C. T. Liu, S. J. Benkovic, J. Salafsky, *Biophys. J.* **2015**, *109*, 806–815.
- [7] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J. M. Ruyschaert, *Subcell. Biochem.* **1994**, *23*, 405–450.
- [8] N. Hassler, D. Baurecht, G. Reiter, U. P. Fringeli, *J. Phys. Chem. C* **2011**, *115*, 1064–1072.
- [9] J. Güldenhaupt, T. Rudack, P. Bachler, D. Mann, G. Triola, H. Waldmann, C. Kötting, K. Gerwert, *Biophys. J.* **2012**, *103*, 1585–1593.
- [10] P. Pinkerneil, J. Güldenhaupt, K. Gerwert, C. Kötting, *ChemPhysChem* **2012**, *13*, 2649–2653.
- [11] J. Schartner, J. Güldenhaupt, B. Mei, M. Rögner, M. Muhler, K. Gerwert, C. Kötting, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4079–4087.
- [12] J. Schartner, K. Gavriljuk, A. Nabers, P. Weide, M. Muhler, K. Gerwert, C. Kötting, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2529–2534.
- [13] J. Schartner, N. Hoeck, J. Güldenhaupt, L. Mavarani, A. Nabers, K. Gerwert, C. Kötting, *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 7467–7475.
- [14] A. Nabers, J. Ollesch, J. Schartner, C. Kötting, J. Genius, H. Hafermann, H. Klafki, K. Gerwert, J. Wiltfang, *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 2755–2762.
- [15] M. Taipale, D. F. Jarosz, S. Lindquist, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 515–528.
- [16] M. Tatokoro, F. Koga, S. Yoshida, K. Kihara, **2015**, DOI: <https://doi.org/10.17179/excli2014-586>.
- [17] L. Wright, X. Barril, B. Dymock, L. Sheridan, A. Surgenor, M. Beswick, M. Drysdale, A. Collier, A. Massey, N. Davies, et al., *Chem. Biol.* **2004**, *11*, 775–785.
- [18] R. M. Immormino, Y. Kang, G. Chiosis, D. T. Gewirth, *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 4953–4960.
- [19] A. Stank, D. B. Kokh, J. C. Fuller, R. C. Wade, *Acc. Chem. Res.* **2016**, *49*, 809–815.
- [20] R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **1995**, *30*, 133–146.
- [21] E. Goormaghtigh, V. Cabiaux, J. M. Ruyschaert, *Subcell. Biochem.* **1994**, *23*, 329–362.
- [22] H. Zhu, DSSP and Stride Plugin for PyMOL, 2011, BIOTEC, TU Dresden, **2011_04_11**.
- [23] M. Amaral, D. B. Kokh, J. Bomke, A. Wegener, H. P. Buchstaller, H. M. Eggenweiler, P. Matias, C. Sirrenberg, R. C. Wade, M. Frech, *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 2276.
- [24] A. Dehner, J. Furrer, K. Richter, I. Schuster, J. Buchner, H. Kessler, *ChemBioChem* **2003**, *4*, 870–877.
- [25] N. M. Levinson, S. G. Boxer, *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 127–132.
- [26] R. W. Glaser, *Anal. Biochem.* **1993**, *213*, 152–161.

Manuscript received: March 1, 2018

Accepted manuscript online: May 17, 2018

Version of record online: ■■■■■, ■■■■■

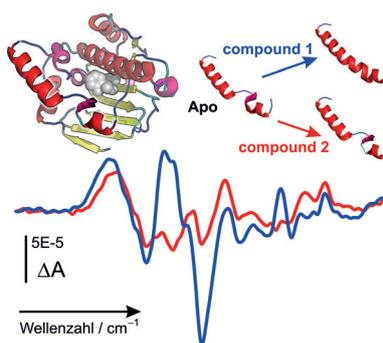
Zuschriften



Bioanalytik

J. Güldenhaupt, M. Amaral, C. Kötting,
J. Schartner, D. Musil, M. Frech,
K. Gerwert*     

Zeitaufgelöst und markerfrei gemessene
ligandeninduzierte
Konformationsänderungen von HSP90 –
hin zu einem
Konformationsaktivitätsscreening für die
Wirkstoffentwicklung



IR-Sensor für Protein-Konformationsänderungen: Mit einem neuartigen Ansatz wurde eine ligandeninduzierte Sekundärstrukturänderung in HSP90 untersucht. Zwei spezifische Bindungsmodi von 19 Inhibitoren wurden analysiert. Die Methode liefert strukturelle und kinetische Daten in einem einzigen, simplen markerfreien Experiment.