

Zusammenfassung

PDZ-Domänen kommen im menschlichen Genom häufig vor und sind bei der Bildung komplexer Signaltransduktionsnetzwerke involviert. Es wird angenommen, dass PDZ-Domänen eine wichtige Rolle in Krankheitsprozessen spielen. Dies macht sie zu interessanten Zielen für das Design von Protein-Protein-Interaktionsinhibitoren.

Diese aus ~90 Aminosäureresten bestehenden Domänen erkennen meist die vier bis sieben C-terminalen Reste von Membranrezeptoren und Ionenkanälen. Aufgrund ihrer zwar flachen aber gut definierten flachen Bindungsfurche gelten sie als gute Ziel-Proteine für die Entwicklung von Protein-Protein-Interaktionsinhibitoren.

Bis zu dieser Studie waren keine reversibel-bindenden kleinen Moleküle als Inhibitoren für PDZ-Domänen bekannt. Daher war das hauptsächliche Ziel dieser Studie das Auffinden neuer, nicht-kovalenter kompetitiver kleiner Inhibitormoleküle.

Als Modellsystem wurde die AF6-PDZ-Domäne als Zielprotein für Ligandenscreens und Entwicklungszwecke eingesetzt. Das humane AF6-Protein (ALL-1 fusion partner on chromosome 6), auch als L-afadin bekannt, ist in zahlreichen Signaltransduktionswegen einschließlich dem Ras-Signaling involviert. Dieses Protein enthält zwei N-terminale „Ras-Association-Domains“, eine „Fork-Head-Association-Domain“ (FHA), einen „Class-V-Myosin-Homology-Repeat“, der auch als „Dilute-Domain“ bezeichnet, eine Klasse-II-PDZ-Domäne sowie eine prolinreiche Sequenz.

Bei unserer Suche nach kleinen Inhibitormolekülen für die AF6-PDZ-Domäne, wurde eine Bibliothek von ~5000 kleinen Molekülen gescreent. Hierfür wurde NMR eingesetzt, 2D-¹H-¹⁵N-HSQC-screening-Experimente mit ¹⁵N-markiertem Protein durchgeführt. Dabei 2-thioxo-4-thazolidinon als ein

Substanzgerüst identifiziert, das an das Protein bindet. Dieses wurde für weitergehende Optimierung durch einfache chemische Verfahren ausgewählt. Systematische Modifizierung des Gerüstmoleküls führte zur Entwicklung von (2R, 5R)-2-sulfanyl-5-[4-(trifluoromethyl)benzyl]-1, 3-thiazol-4-on (**7i**), einer chiralen 291-Da-Verbindung mit einer Affinität von 100 μM für das racemische Gemisch. ^{15}N -Filter-NMR Experimente zeigten, dass die Verbindung kompetitiv interagiert. Unter der Annahme, dass nur eines der Enantiomere bevorzugt bindet, kann die Affinität der Interaktion auf 50 μM geschätzt werden, was im Affinitätsbereich von natürlichen Peptidliganden liegt.

Um die Interaktion zwischen der AF6-PDZ-Domäne und der Substanz **7i** zu verstehen, und das künftige Struktur-basierte Liganden-Design zu erleichtern, wurden die Lösungs-NMR-Strukturen der PDZ-Domäne mit und ohne Ligand bestimmt. Die Strukturanalyse in Anwesenheit von **7i** deutet auf die Bildung einer hydrophoben Subtasche in der Domäne hin, die in den veröffentlichten Strukturen von apo- und Peptid-gebundener PDZ-Domäne nicht vorhanden ist. Diese unerwartete Bindungstasche, die durch Induced-Fit entsteht, definiert ein neues pharmakologisches Potential dieser Domäne und offenbart 5-aryl-2-thioxo-4-thiazolidinone und strukturell verwandte Verbindungen als vielversprechende Kandidaten für die Entwicklung von hochaffinen und spezifischen kleinen Modulator-Molekülen für einzelne Domänen der großen PDZ-Familie.