

Strukturbasierte Entwicklung von Assaysystemen und Charakterisierung von orthosterischen und allosterischen Kinaseinhibitoren

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
von der Fakultät Chemie der Technischen Universität Dortmund
angenommene

DISSERTATION

von
Apothekerin

Sabine Klüter

aus Hemer/Sauerland

Dekan: Prof. Dr. H. Rehage
1. Gutachter: Prof. Dr. H. Waldmann
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Engelhard

Tag der mündlichen Prüfung: 26.8.2010

meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2006 bis Mai 2010 am Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft in Dortmund unter der Leitung von Prof. Dr. Herbert Waldmann in der Arbeitsgruppe von Dr. Daniel Rauh durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Einfluss von irreversiblen Inhibitoren auf wirkstoffresistente Kinasemutanten.....	6
2.1 Allgemeiner Teil	6
2.1.1 Aufbau und Funktion von EGFR	6
2.1.2 Die Bedeutung von EGFR für den nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC)	9
2.1.3 Tyrosinkinasehemmer zur Behandlung von NSCLC.....	12
2.2 Spezieller Teil	16
2.2.1 Aufgabenstellung	16
2.2.2.1 cSrc-Kinase als Modell für die EGFR-Kinase	17
2.2.2.2 Massenspektrometrische Validierung der kovalenten Bindung irreversibler Inhibitoren an cSrc-Kinase	19
2.2.2.3 Charakterisierung von reversiblen und irreversiblen Inhibitoren mit aktivitätsbasierten Assaysystemen.....	20
2.2.2.3.1 Etablierung eines aktivitätsbasierten Assays am Beispiel von cSrc-SM und cSrc-DM mit HTRF.....	21
2.2.2.3.2 IC ₅₀ -Bestimmung von irreversiblen und reversiblen Inhibitoren der EGFR- und der cSrc-Kinase	24
2.2.2.3.3 Profilierung irreversibler EGFR-Inhibitoren gegen 80 NSCLC-Zelllinien mit biochemischer Validierung	26
2.2.2.4 Strukturbiologische Betrachtung der Resistenzumgehung mittels irreversibler Inhibitoren	30
2.2.2.5 Katalytische Parameter der cSrc- und EGFR-Kinase	32
2.2.2.6 Zeitabhängige Inhibition von irreversiblen Inhibitoren	34
2.2.2.7 Assayentwicklung zur Charakterisierung von irreversiblen Inhibitoren	40
2.3 Zusammenfassung.....	54
3 Detektion von Stabilisatoren der inaktiven Kinasekonformation	57
3.1 Allgemeiner Teil	57
3.2 Spezieller Teil	58
3.2.1 Aufgabenstellung	58
3.2.2 Projektstudie zur Wahl eines geeigneten Assaysystems.....	59
3.2.3 Ergebnisse und Diskussion	60
3.2.3.1 Design und Aufbau des Assaysystems.....	60
3.2.3.2 Synthese der molekularen Sonde	62

3.2.3.3	Validierung des EFC-Assays	64
3.2.3.4	Übertragung des Assaysystems auf andere Kinasen.....	67
3.2.3.5	SAR-Studien mit dem EFC-Assay.....	71
3.3	Zusammenfassung.....	79
4	Assaysystem zur Detektion von allosterischen Inhibitoren der Abl-Kinase.....	81
4.1	Allgemeiner Teil	81
4.1.1	Aufbau und Funktion der Abl-Kinase.....	81
4.1.2	Die Rolle von BCR-Abl in Zusammenhang mit der chronisch myeloischen Leukämie (CML)	83
4.1.3	Abl-Inhibitoren der ersten Generation	84
4.1.4	Abl-Inhibitoren der zweiten Generation	85
4.2	Spezieller Teil	88
4.2.1	Aufgabenstellung	88
4.2.2	Ergebnisse und Diskussion	90
4.2.2.1	Expression und Aufreinigung der Abl-Kinase aus dem Zelllysat.....	90
4.2.2.2	GNF2-basierter EFC-Assay	91
4.2.2.3	Synthese eines Sondenmoleküls	93
4.2.2.4	Etablierung des Assaysystems	94
4.2.2.5	Verdrängungs-Assaysystem basierend auf zeitaufgelöster Fluoreszenzdetektion.....	99
4.3	Zusammenfassung.....	100
5	Material und Methoden	102
5.1	Materialien	102
5.1.1	Geräte	102
5.1.2	Verbrauchsmaterialien	105
5.1.3	Feinchemikalien und molekularbiologische Reagenzien.....	105
5.1.4	Reagenzien für biochemische Untersuchungen:	107
5.1.5	Enzyme.....	107
5.1.6	Gene	108
5.1.7	Bakterienstämme.....	109
5.1.8	Computerprogramme / Server.....	109
5.2	Methoden	110
5.2.1	Rekombinante Expression verschiedener Konstrukte der cSrc- und Abl-Kinase in <i>Escherichia coli</i> ⁸⁶	110
5.2.2	Proteinaufreinigung mit FPLC ⁸⁶	111
5.2.3	Proteinanalytische Verfahren	112
5.2.4	Aktivitätsbasierte Assaysysteme.....	117
5.2.5	Versuche zur Charakterisierung irreversibler Inhibitoren.....	124
5.2.6	EFC-Assaysystem	127
5.2.7	Fluoreszenzpolarisationsassay	130
5.2.8	TR-FRET Assay mit GNF2-Sonde	132
5.2.9	Chemische Synthese.....	132

5.2.10	Molekularbiologische Untersuchungen	142
5.3	Zusatzinformationen	143
5.3.1	Enzymatische Assays zur IC_{50} - und K_m -Bestimmung	143
5.3.2	IC_{50} -Bestimmung von reversiblen und irreversiblen Kinaseinhibitoren	145
5.3.3	Aktivitätsbasierte Assay-Technologien	146
6	Literaturverzeichnis.....	149
7	Anhang	160
7.1	Sequenzen	160
7.2	Lebenslauf.....	164
7.3	Danksagung.....	165

Abkürzungsverzeichnis

abs	<i>absolutum</i>
ACN	Acetonitril
AKT	Proteinkinase B
Brij-35	Polyethylenglycolether
BSA	<i>bovine serum albumine</i> , Rinderserumalbumin
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i> , Cyclin-abhängige Kinase
cSrc	<i>cellular</i> und <i>sarcoma kinase</i> , zelluläre Sarkoma-Kinase
cSrc-DM	cSrc <i>double mutant</i> , S345C/T338M
cSrc-SM	cSrc <i>single mutant</i> , S345C
DC	Dünnschichtchromatografie
DCM	Dichlormethan
DDR2	<i>discoidin domain receptor tyrosine kinase 2</i> , Discoidindomänen-Rezeptor-Tyrosinkinase 2
DIPEA	Diisopropylethylamin, auch Hünig-Base genannt
DNS	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	Escherischia coli
ED	Enzym Donor, Sonde für den EFC-Assay
EFC-Assay	<i>Enzyme Fragment Complementation</i> -Assay, Enzym-Fragment-Komplementationsassay
EGFR	<i>endothelial growth factor receptor</i> , Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors
EMEA	<i>European Medicines Agency</i>
EPHA2	Ephrin Typ A Rezeptor 2
EPHA3	Ephrin Typ A Rezeptor 3
eq	<i>equivalent</i> , Äquivalent
ErbB2	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i> , siehe HER2
ErbB3	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3</i> , siehe HER3
ErbB4	<i>erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4</i> , siehe HER4

ERK	<i>extracellular regulated kinase</i> , extrazellulär regulierte Kinase
ESI-MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FLiK	<i>fluorescence labeling in kinases</i> , Assaysystem
FP	Fluoreszenzpolarisation
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer oder Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer nach Theodor Förster
FU	<i>fluorescence unit</i> , Fluoreszenzeinheit
g	G-Kraft
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER2/neu	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2
HER3	<i>human epidermal growth factor receptor 3</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 3
HER4	<i>human epidermal growth factor receptor 4</i> , humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 4
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeits- chromatografie
HR-MS	<i>high resolution-</i> , hochaufgelöste Massenspektrometrie
HSAB Prin- zip	<i>hard and soft acids and bases</i> , Prinzip der Klassifizierung von Lewis- Säuren und -Basen
HTRF	<i>homogenous time resolved fluorescence</i> , zeitaufgelöster FRET
HTS	<i>high throughput screening</i> , Hochdurchsatzverfahren
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration</i> , mittlere inhibitorische Konzentration
IGFR	<i>insulin-like growth factor receptor</i> , Rezeptor für insulinähnliche Wachstumsfaktoren
IPASS	<i>Iressa Pan-Asia Study</i> , Iressa pan-asiatische Studie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JNK2	c-Jun N-terminale Kinase
k_{cat}	Wechselzahl
k_{obs}	Geschwindigkeitskonstante bei definierter Inhibitorkonzentration

LC-MS	Flüssigchromatografie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LM	Lösungsmittel
mAb	<i>monoconal antibody</i> , monoklonaler Antikörper
MEK	<i>mitogen activated protein kinase / extracellular regulated kinase</i> , MAPK/ERK Kinase;
MS	Massenspektrometrie
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanzspektroskopie
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i> , nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (Bronchi-alkarzinom)
OD	Optische Dichte
p38 α	mitogenaktivierte Proteinkinase
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>protein data bank</i> , Proteindatenbank
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i> , Blutplättchen-Wachstumsfaktor-Rezeptor
Pi3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
pK _s	Säurekonstante
PLC γ	Phospholipase C- γ
RAF	<i>rapidly growing fibrosarcom</i> , oder <i>rat fibrosarcoma kinase</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i> , Proto-Onkogen
RET	<i>rearranged during transfection</i> , Rezeptor-Tyrosinkinase
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-Time-PCR</i> , quantitative Echtzeit-PCR
SAR	<i>structure activity relationship</i> , Strukturaktivitätsbeziehung
SA-XL665	Konjugat aus Streptavidin (SA) und Allophycocyanin (XL665)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SOB-Medium	<i>Super Optimal Broth</i> -Medium
TB-Medium	<i>Terrific Broth</i> -Medium

TCE	Trichloressigsäure
TEV-Protease	<i>Nuclear Inclusion a</i> (NIa) Protein aus dem <i>Tobacco Etch Virus</i>
TR-FRET	<i>time resolved</i> -FRET; zeitlich versetzte FRET-Messung
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat
U	<i>unit</i> , Einheit
U/min	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
v/v	<i>volume/volume</i> , Konzentrationseinheit in Prozent
VEGFR2	<i>vascular endothelial growth factor receptor 2</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor
VEGFR3	<i>vascular endothelial growth factor receptor 3</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor
w/v	<i>weight/volume</i> , Konzentrationseinheit in Prozent
<i>wt</i>	Wildtyp
XL-665	biogener Fluorophor Allophycocyanin
YopH	Tyrosin-Phosphatase aus <i>Yersinia enterocolitica</i>

1 Einleitung

Proteinkinasen als Zielproteine in der Wirkstoffentwicklung

In einem multizellulären Organismus ist die molekulare Kommunikation die Voraussetzung für ein zusammenwirkendes Gefüge.¹ Hierbei ist die interzelluläre Verständigung, also das Empfangen und Senden von Signalen, ebenso entscheidend wie die Signaltransduktion im Zellinnern.^{2,3} Im menschlichen Organismus werden diese Aufgaben vorwiegend von Proteinkinasen übernommen, die mit 518 Vertretern eine der größten Enzymklassen darstellen und deren Gene circa 1,7 % des kodierenden humanen Genoms ausmachen.⁴ Die diffizil regulierte intrazelluläre Signaltransduktion ermöglicht die Entfaltung komplexer biologischer Vorgänge wie zum Beispiel die Zellteilung oder die Zelldifferenzierung.⁵ Proteinkinasen übertragen zur Signaltransduktion die γ -Phosphatgruppe von ATP auf Tyrosin- beziehungsweise Serin-/Threoninseitenketten anderer Proteine, wodurch diese eine Konformationsänderung ausführen, was zu deren Aktivierung oder Inaktivierung führen kann.^{6,7} Außerdem können Autophosphorylierungen wie bei den Rezeptor-Tyrosinkinasen die Rekrutierung anderer Proteine bewirken, die einen Multienzymkomplex bilden und somit ein extrazelluläres Signal dezentral über mehrere Signalkaskaden im Zellinneren weiterleiten.⁸ Disregulationen dieser komplex gesteuerten Stoffwechselwege können Krankheiten wie Krebs, Diabetes oder Autoimmunkrankheiten verursachen.⁹⁻¹¹ Nicht selten sind sie auf Punktmutationen und Deletionen der Kinase kodierenden Gene zurückzuführen. Die Sequenzierung des humanen Genoms sowie die rasch voranschreitenden Entwicklungen im Bereich der gesamtgenomischen DNA-Sequenzierung¹² ermöglichen die Korrelation von Krankheiten mit genotypischen Veränderungen.¹³⁻¹⁵ Somit können neue Zielproteine zur Wirkstoffentwicklung aufgedeckt werden.

Die Voraussetzung zur Anwendung von Kinaseinhibitoren in der Arzneimitteltherapie ist das Verständnis über das orchestrale Zusammenspiel der einzelnen Kinasen mit anderen Proteinen.¹⁶ Hierbei hat die Systembiologie in den letzten Jahren einen großen Beitrag zur Aufklärung einzelner physiologischer und pathophysiologischer Signalwege geleistet.¹⁷ Der Wunsch, jede pathophysiologische Signalkaskade mit kleinen Molekülen gezielt zu steuern, bleibt vorerst eine Zukunftsvision. Jedoch sind, trotz großer Hürden beim rationalen Wirkstoffdesign, bis jetzt in den USA elf Kinaseinhibitoren in der Krebstherapie zugelassen worden, mehr als 60 Kinaseinhibitoren befinden sich in klini-

schen Studien und mehr als 10.000 Patente wurden in den letzten zehn Jahren über Kinaseinhibitoren erstellt.¹⁸

Struktur der Kinasen

Eine wichtige Methode zur Wirkstofffindung ist das strukturbasierte Wirkstoffdesign, bei der die dreidimensionale Gestalt der Kinase im Vordergrund steht.¹⁸ Die meisten Inhibitoren binden im Bereich der katalytischen Domäne, die innerhalb der Enzymklasse der Kinasen strukturell stark konserviert ist. Die übrigen Domänen variieren zwischen den Kinasefamilien und sind von deren Substrat, der Art der Signalkaskade und deren Lokalisation in der Zelle abhängig. Die katalytische Domäne besteht aus einem N- und C-terminalen Bereich. Diese sind durch die sogenannte Scharnierregion miteinander verbunden. Diese Region bewegt sich gelenkartig und kontrolliert die Bindung von ATP und Freisetzung von ADP. Die in Abbildung 1 dargestellte glycinreiche Schleife übernimmt zusammen mit der Helix-C die Koordination von ATP.¹⁸

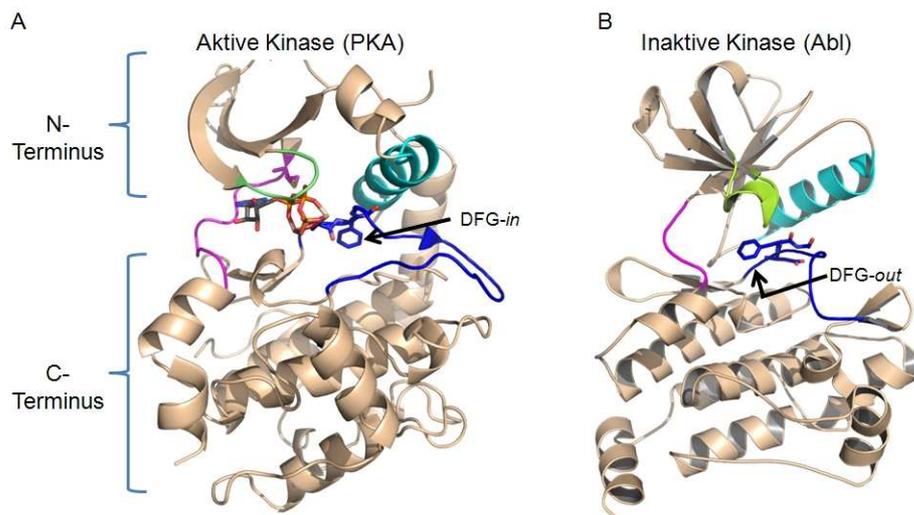


Abbildung 1: Aufbau der katalytischen Domäne einer Proteinkinase sowie Kennzeichnung der für die Katalyse wichtigen Elemente. (A) Aktive Kinasekonformation (PDB-Eintrag: 1ATP¹⁹), (B) inaktive Kinasekonformation (PDB-Eintrag: 1OPJ²⁰). Pink: Scharnierregion, blau: Aktivierungsschleife, hellblau: Helix-C, hellgrün: glycinreiche Schleife

Kinasen können im aktiven und inaktiven Zustand vorliegen, was durch Phosphorylierung in der Aktivierungsschleife, an Positionen in der Nähe der ATP-Bindungstasche sowie durch Anlagerung anderer Proteine reguliert wird. Die Aktivierungsschleife ist flexibel und im aktiven Zustand nach außen exponiert, damit der Zugang für ATP an die Scharnierregion geöffnet ist. Im inaktiven Zustand nimmt die Aktivierungsschleife eine Konformation ein, bei der die Katalyse von ATP nicht möglich ist. Die Aktivierungsschleife besitzt zwei konservierte Bereiche, welche als DFG- und HRD-Motiv bezeichnet werden. Das DFG-Motiv befindet sich am Anfang der Aktivierungsschleife und

dreht sich je nach Aktivierungsgrad nach innen (*DFG-out*) oder nach außen (*DFG-in*).⁷ Kinaseinhibitoren werden auch nach *DFG-out* und *DFG-in*-Inhibitoren klassifiziert, je nachdem ob sie an die aktive oder inaktive Kinase binden.²¹ Das HRD-Motiv dient als Base im katalytischen Prozess der Phosphatabspaltung von ATP, welches zusätzlich durch ein Metallion (Magnesium) stabilisiert wird. Die flexiblen Bereiche der ATP-Bindungstasche, flankiert durch die Aktivierungsschleife, die glycinreiche Schleife und die Helix-C, befinden sich permanent in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Kinase. Die Bewegungen dieser flexiblen Bereiche fallen bei verschiedenen Kinasen unterschiedlich aus.²²

Klassifizierung der Kinaseinhibitoren

In den letzten Jahren hat in der Arzneistoffentwicklung auf dem Gebiet der Kinasen ein Paradigmenwechsel stattgefunden, bei dem klassische ATP-kompetitive Inhibitoren (Typ-I) von allosterischen oder sogenannten Typ-II-Inhibitoren abgelöst wurden. Die klassischen Inhibitoren zielen auf die Kinasedomäne ab und interagieren vornehmlich mit der Scharnierregion im Inneren der ATP-Bindungstasche.²³ Das Pharmakophormodell von Traxler *et al.*²⁴ (Abbildung 2) beschreibt die Regionen, an die diese Inhibitoren binden.

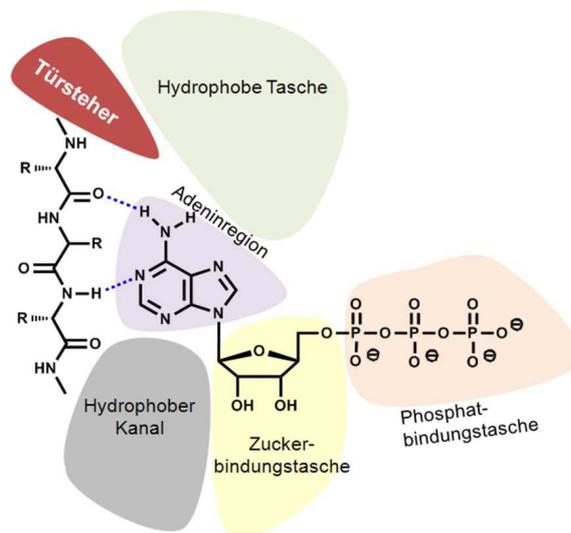


Abbildung 2: Pharmakophormodell nach Traxler *et al.*²⁴ zum Bindungsmechanismus von Typ-I-Inhibitoren.

Die wichtigsten Interaktionen werden in der Adenin bindenden Region ausgebildet. Hierfür muss das Molekül planar sein (sp^2 -Hybridisierung) sowie Wasserstoffdonor- und Wasserstoffakzeptorfunktionen tragen. Sehr viele Verbindungen gewinnen ihre Affinität und Selektivität durch Interaktionen in den beiden hydrophoben Arealen ober- und unterhalb der Adeninbindungsregion. Der Zugang zur oberen hydrophoben Tasche

ist von der Größe der Türsteher-Aminosäure abhängig, die bei unterschiedlichen Kinasen stark variiert. Die Zuckerbindungstasche besitzt sehr viele polare Areale, ebenso wie die Phosphatbindungstasche. Inhibitoren, die in dieser Region binden sind weniger bekannt. ATP-kompetitive Inhibitoren müssen sehr affin sein, damit sie mit den hohen ATP-Konzentrationen in der Zelle, die üblicherweise im millimolaren Bereich liegen, konkurrieren können.²⁵ Hinzu kommt, dass die Generierung von selektiven Kinaseinhibitoren, das heißt, eine Diskrepanz von 100-fach höherer Affinität zu anderen Kinasen, nicht trivial ist.¹⁸ Hierfür ist die starke Homologie der 518 Kinasen im Bereich der katalytischen Domäne verantwortlich. Zudem ist die Entwicklung innovativer Typ-I-Inhibitoren durch einen weiträumig patentgeschützten Strukturraum sehr erschwert. Die von der FDA und EMEA in der Klinik zugelassenen Typ-I-Inhibitoren riefen nach längerer Behandlung immer häufiger Resistenzen hervor, die auf Mutationen, unter anderem in der katalytischen Domäne, zurückzuführen sind.²⁶ Zur Umgehung dieser Resistenzen werden häufig irreversible Inhibitoren eingesetzt, die an ein Cystein am Ende der Scharnierregion binden.

Diese negativ beeinflussenden Parameter haben die Wirkstoffentwicklung dazu bewegt, nach neuen Inhibitoren zu suchen, die außerhalb der ATP-Bindungsregion liegen. DFG-*out*-Inhibitoren des Typs-II und -III binden an die inaktive Konformation der Kinase. Typ-II-Inhibitoren interagieren mit einer allosterischen hydrophoben Tasche, die sich öffnet, wenn die Kinase inaktiv ist.^{27,28} Über eine Gruppe bestehend aus einem Wasserstoffbrückenakzeptor und einem -donor treten diese mit der Helix-C und dem DFG-Motiv in Wechselwirkung. Zusätzlich wird die Affinität erhöht, indem sie wie Typ-I-Inhibitoren an die Adeninbindungstasche sowie an die hydrophobe Tasche binden.²¹

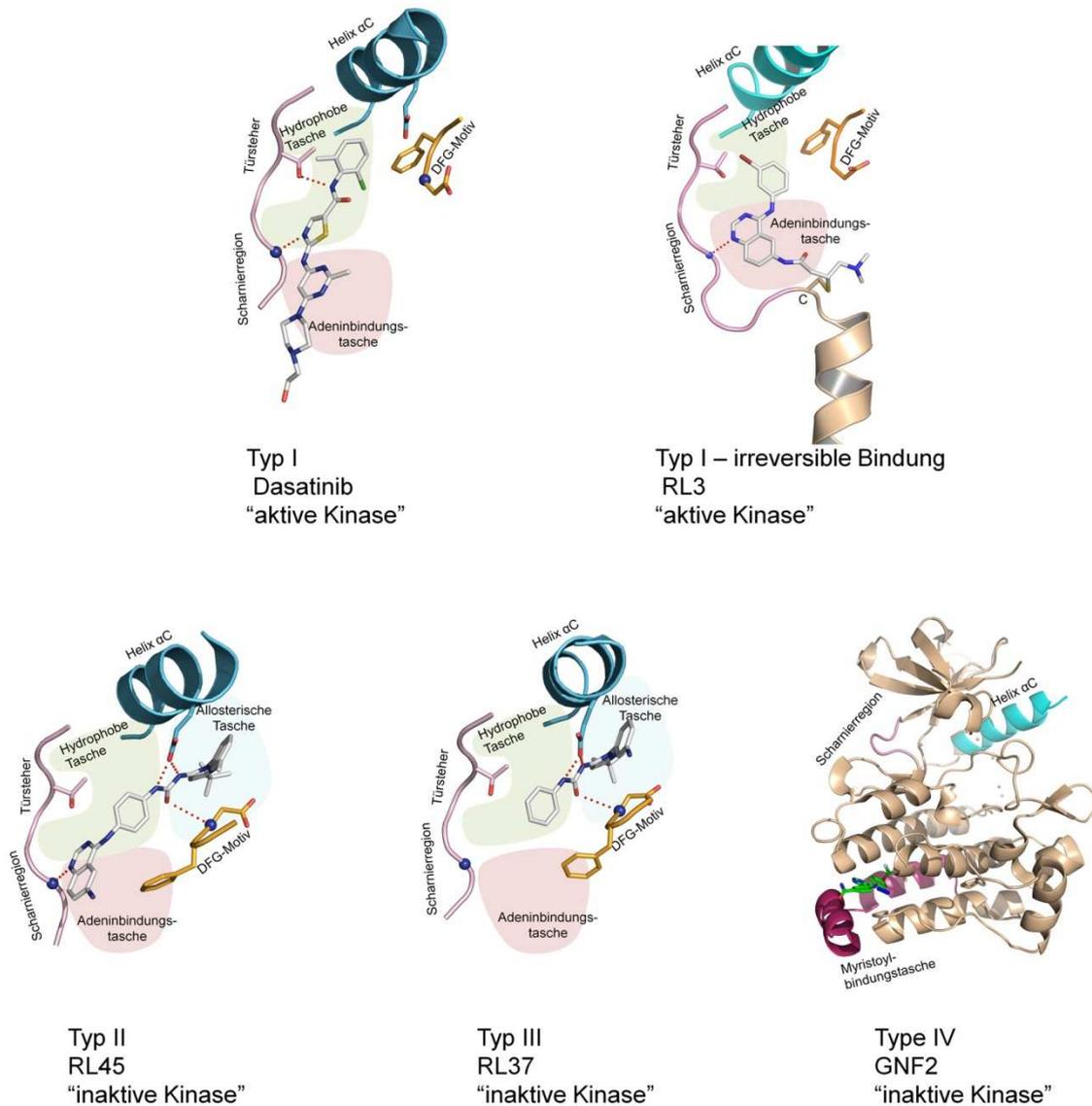


Abbildung 3: Klassifizierung von Kinaseinhibitoren nach verschiedenen Bindungsmechanismen.

Typ-III-Inhibitoren unterscheiden sich von Typ-II-Inhibitoren, indem sie nicht im Bereich der Adeninbindungstasche binden, sondern vornehmlich im allosterischen Bereich der Kinase assoziiert sind.^{7,29} Der Vorteil dieser Verbindungen ist, dass sie hauptsächlich an die weniger stark konservierte allosterische Tasche binden und somit über ein höheres Selektivitätspotenzial verfügen. Zudem sind sie pharmakokinetisch betrachtet günstiger, da sie wie die Typ-II-Inhibitoren eine längere Verweilzeit am Rezeptor besitzen.³⁰ Typ-IV-Inhibitoren wirken rein allosterisch und binden an Regionen weit außerhalb der ATP-Bindungstasche, wie zum Beispiel GNF2, welches an die Myristoylbindungstasche im C-Terminus der Kinase bindet. Des Weiteren zählen zu dieser Klasse auch Inhibitoren, die an die Substratbindungstasche binden oder Protein-Protein-Interaktionen von Kinasen unterbinden.³¹

2 Einfluss von irreversiblen Inhibitoren auf wirkstoffresistente Kinasemutanten

2.1 Allgemeiner Teil

2.1.1 Aufbau und Funktion von EGFR

Die Rezeptor-Tyrosinkinase EGFR, auch bekannt als HER1 oder ErbB1, gehört zur Familie der ErbB-Kinasen.^{*5,8} Dieser glykosylierte transmembranäre Rezeptor besteht aus drei Domänen, der extrazellulären, der transmembranären und der cytoplasmischen Domäne (Abbildung 4).

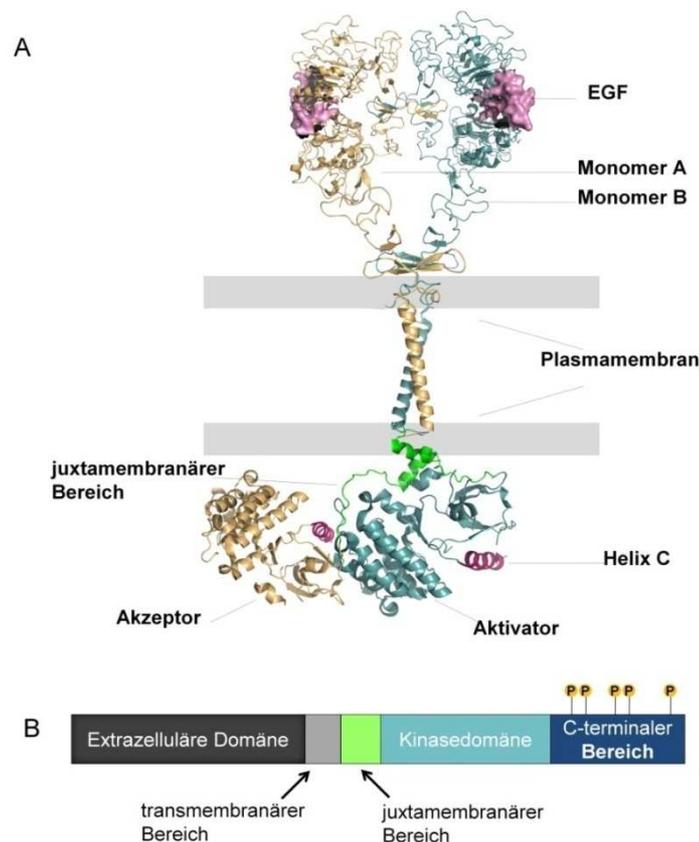


Abbildung 4: (A) Modell eines aktiven EGFR-Dimers basierend auf den PDB-Einträgen 1IVO,³² 1NQL,³³ 2JWA,³⁴ 3GOP.³⁵ Der juxtamembranäre Bereich des Akzeptors legt sich um den C-terminalen Bereich des Aktivators und stabilisiert so dessen aktive Konformation. (B) Schematische Darstellung der EGFR-Domänen. Der C-terminale Bereich wird autophosphoryliert und dient zur Signaltransduktion.

Der extrazelluläre Bereich ist in vier Subdomänen untergliedert und fungiert als Bindungsstelle für Liganden. EGFR tritt mit verschiedenen Liganden in Wechselwirkung.³⁶

* Zur Familie der ErbB-Kinasen gehören EGFR, ErbB2/HER2/neu, ErbB3/HER3 und ErbB4/HER4.

Diese sind der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), der transformierende Wachstumsfaktor- α (TGF- α), Betacellulin (BTC), Epiregulin (EPR), Amphiregulin (AR) sowie der Heparin-bindende EGF-ähnliche Wachstumsfaktor (HB-EGF) (Abbildung 4). Dockt ein Ligand an den Rezeptor an, ändert sich die Konformation des extrazellulären Bereiches und induziert eine helikale Dimerisierung des juxtamembranären Segmentes. EGFR kann sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden. Heterodimere werden mit anderen Vertretern aus der ErbB-Familie oder auch mit anderen Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie PDGFR oder IGFR, ausgebildet. Die transmembranären Bereiche der Monomere, die zusammen einen Dimer bilden, sind im aktiven Zustand über Kreuz ausgerichtet. Dadurch wird eine für die Katalyse optimale Konformation des juxtamembranären Segmentes, das sich zwischen der transmembranären und der katalytischen Region befindet, gewährleistet (Abbildung 5).^{37,38} Infolgedessen kommt es zur Anlagerung der beiden intrazellulären Kinasedomänen, wodurch die eine katalytische Domäne durch die andere aktiviert wird.

Jüngere Veröffentlichungen von Jura *et al.*³⁷ und Zhang *et al.*³⁹ geben neue Einblicke in den Aktivierungsmechanismus der katalytischen Domäne von EGFR. Danach funktioniert, ähnlich wie bei der CDK-Kinase, ein Monomer analog zu CDK als Akzeptor und ist somit katalytisch aktiv. Das zweite Monomer dient entsprechend dem Cyclin bei der CDK als Aktivator.³⁹ Anders als bisher angenommen, ist bei EGFR lediglich der Akzeptor katalytisch aktiv und phosphoryliert die C-terminalen Abschnitte der beiden Kinasedomänen.³⁷ Die Phosphorylierungen dienen als Bindungselemente für Proteine, die im Signalweg von EGFR nachgeschaltet sind. Um zu verhindern, dass die Kinasedomäne aktiv ist, wenn kein Ligand extrazellulär gebunden ist, imitiert ein sogenannter „elektrostatischer Haken“ die juxtamembranäre Schleife.³⁷ Der „elektrostatische Haken“ besteht aus einer negativ geladenen Aminosäuresequenz, die in der Nähe der Scharnierregion liegt und mit dem C-terminalen Bereich des Aktivators interagiert. Dadurch wird die Ausbildung eines aktiven Dimer-Komplexes verhindert (siehe Abbildung 5). Eine beim nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC) auftretende Mutation (V665M) sowie Exon-20-Deletionen stabilisieren diesen Komplex und induzieren somit eine konstitutive Aktivierung der Kinase.³⁸

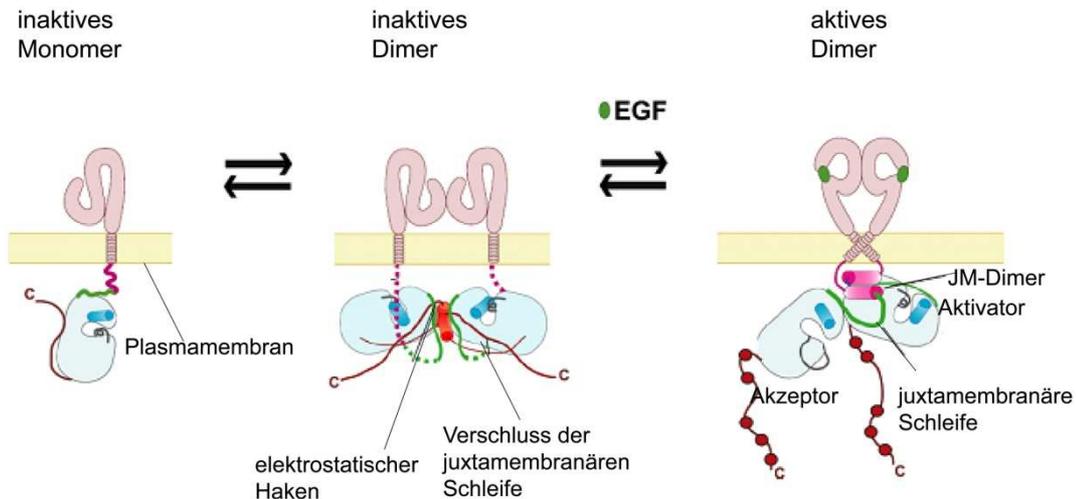


Abbildung 5: Autoinhibition und Aktivierungsmechanismus von EGFR. inaktives Monomer: Ist kein Ligand gebunden, ist die Kinase inaktiv. inaktives Dimer: Kommt es durch eine große Rezeptoranreicherung an der Membran zu einer Dimerisierung ohne Komplexbildung mit dem Liganden, bindet der C-Terminus des Aktivators an den „elektrostatischen Haken“ und verhindert, dass sich die juxtamembranäre Schleife um den Akzeptor legt und damit eine aktive Kinasekonformation stabilisiert. Somit wird gewährleistet, dass die Kinase inaktiv bleibt, auch wenn EGFR als Dimer vorliegt. aktives Dimer: Die Liganden induzieren eine Konformationsänderung. Der juxtamembranäre und der transmembranäre Bereich formieren sich so, dass der Aktivator an den Akzeptor docken kann und der Akzeptor katalytisch aktiv wird. Die juxtamembranäre Schleife stabilisiert den aktiven Komplex der beiden Monomere. Quelle: Jura *et al.*³⁷ (abgewandelt)

EGFR-abhängige Signaltransduktionswege

Durch Phosphorylierung des C-Terminus von EGFR werden Signalproteine, die zur Steuerung von Zellstoffwechselfvorgängen, wie zum Beispiel Zellwachstum, Proliferation, Apoptose, Angiogenese oder Genexpression dienen, zur Plasmamembran rekrutiert.⁴⁰ Zu den wichtigsten nachgeschalteten Signalwegen gehören der RAS-RAF-MEK-ERK-, PI3K-AKT-, PLC γ -PKC- und der STAT-Signalweg (siehe Abbildung 6).⁴¹ Die Inaktivierung von EGFR erfolgt am häufigsten über den Abbau des Rezeptors in Lysosomen oder über Dephosphorylierung durch Phosphatasen.⁴⁰

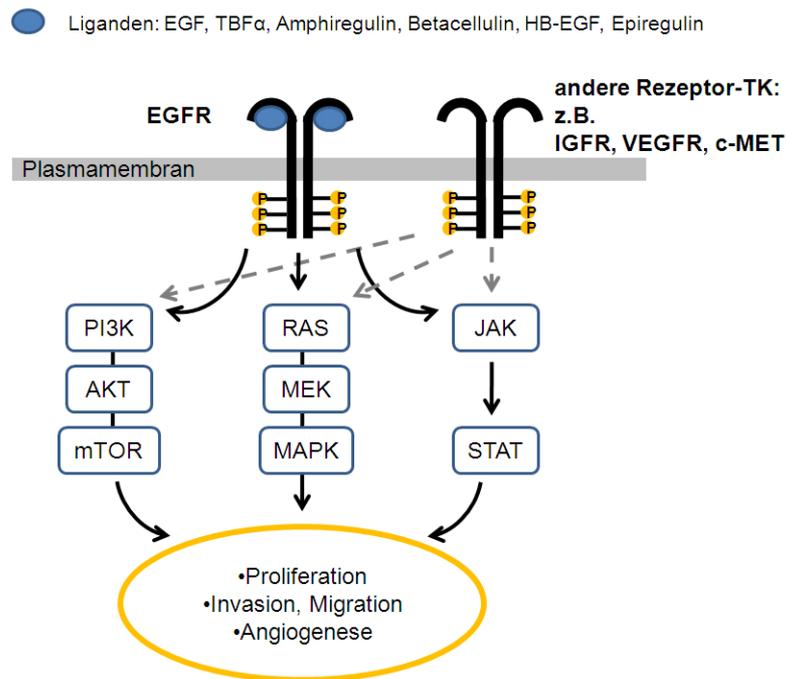


Abbildung 6: EGFR-abhängige Signaltransduktionswege. EGFR stellt einen entscheidenden Knotenpunkt in der Zellregulation dar. Die STAT-, RAS- und PI3K-Signalwege sind die wichtigsten nachgeschalteten Signaltransduktionswege für die Regulation des Zellwachstums. Ihre Enzyme sind wichtige Zielproteine in der Wirkstoffforschung.

Da EGFR die Zellproliferation steuert, können Disbalancen in der Signalkaskade zu unkontrolliertem Zellwachstum führen. Kann diesem nicht entgegengesteuert werden, kommt es zum Tumorwachstum. Anormale EGFR-Aktivitäten können folgende Ursachen haben: Erhöhte Ligandenexpression, erhöhte EGFR-Expression, EGFR-Mutationen, fehlgeschaltete Rezeptor-Disregulation oder fehlgeschaltete Signaltransduktion mit anderen membranständigen Proteinen. Eine erhöhte EGFR-Konzentration an der Plasmamembran kann, wie beim nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC), die Folge einer verstärkten Amplifikation des EGFR-Gens sein. Außerdem kann eine erhöhte EGFR-Anreicherung durch Regenerierung des abgebauten Rezeptors hervorgerufen werden.⁴⁰ In der Tumorthherapie werden EGFR-Inhibitoren vor allem gegen den nicht-kleinzelligen Lungenkrebs sowie gegen Brustkrebs eingesetzt.

2.1.2 Die Bedeutung von EGFR für den nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC)

Lungenkrebs ist die Ursache für 20 % aller krebsbedingten Todesfälle.⁴² Hierbei wird der nicht-kleinzellige Lungenkrebs (NSCLC) bei 80 % aller Lungenkrebspatienten diagnostiziert.⁴³ Dieser geht mit einem unkontrollierten Zellwachstum des Lungenepi-

thels einher und führt häufig zur Metastasierung. Die Erkrankung wird bei den meisten NSCLC-Patienten erst in einem fortgeschrittenen und inoperablen Stadium festgestellt und ist daher mit einer schlechten Prognose assoziiert.⁴⁴ Die Ein-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 16 %.⁴⁵ Die Behandlung mit den Zytostatika Cisplatin und Paclitaxel (Taxol[®]) zeigt keinen langanhaltenden Erfolg.⁴⁶ Neben der Antikörpertherapie wird seit den neunziger Jahren am gezielten Wirkstoffdesign von EGFR-Inhibitoren geforscht.^{18,47,48}

Bei 60 % aller NSCLC-Patienten kommt es zu einer EGFR-Gen-Amplifikation oder zu EGFR-Mutationen, die eine gesteigerte Kinaseaktivität induzieren.⁴⁰ Bei diesen EGFR-Abnormalitäten ist der Tumor direkt abhängig von EGFR, was Weinstein *et al.*⁴⁹ als „*oncogene addiction*“ bezeichnen. Aus diesem Grund fokussierte sich die Wirkstoffforschung zur Bekämpfung des NSCLC auf Inhibitoren der EGFR-Kinase. Im Jahr 2003 kam der erste reversible ATP-kompetitive Inhibitor Gefitinib (Iressa[®]) auf den Markt,⁵⁰ im Jahr 2005 folgte der zweite unter dem Namen Erlotinib (Tarceva[®]).⁵¹ Bei der Behandlung mit den oben genannten Medikamenten sprachen lediglich 10-18 % der behandelten Patienten auf die Therapie an.⁵¹ Es hatte sich herausgestellt, dass ein Grund für das schlechte Ansprechen auf die Kinaseinhibitoren in der durch Mutationen bedingten Diversität der EGFR-Kinase liegt.⁴⁸ So haben in den Jahren 2004/2005 Lynch,⁵² Paez⁵³ und Pao *et al.*⁵⁴ gezeigt, dass sowohl die Aktivierungsmutante L858R als auch die Deletion Leu-Arg-Glu-Ala in Exon 19 die aktive Kinasekonformation stabilisieren. Trotz einer daraus resultierenden Erhöhung der Kinaseaktivität begünstigen diese Mutationen die Bindung von ATP-kompetitiven Inhibitoren an die Kinase. Somit hatten die zur Sensitivierung von Gefitinib und Erlotinib führenden Aktivierungsmutationen einen gravierenden Effekt auf die Überlebensrate von NSCLC-Patienten, die mit EGFR-Inhibitoren behandelt wurden.⁵¹ Dieses konnte durch die kürzlich publizierte IPASS-Studie bestätigt werden, da NSCLC-Patienten, die nie geraucht hatten, weiblichen Geschlechts waren, aus Asien stammten und eine EGFR-Aktivierungsmutation aufwiesen, sehr gut auf diese Medikamente ansprachen.⁵⁵ Somit ist die personalisierte Therapie, bei der die Mutation L858R als Tumormarker eingesetzt wurde, für den Erfolg der Behandlung des NSCLC mit Erlotinib und Gefitinib ausschlaggebend.⁵⁵⁻⁵⁷

* Erlotinib hatte die Überlebensrate im Vergleich zu Placebo-Behandlungen um 2 Monate verlängert und die mit Gefitinib behandelten Patienten hatten die gleiche Überlebensrate wie das Mitosespindelgift Docetaxel.

Wirkstoffresistenzen

Die zielgerichtete Therapie mit Gefitinib und Erlotinib hat bei Patienten mit NSCLC in den ersten 6 Monaten der Behandlung das Tumorwachstum aufhalten können. Danach kam es bei 50 % der behandelten Patienten zu Resistenzen gegen diese Wirkstoffe.^{48,58} Die dafür verantwortliche Mutation wurde im Jahr 2005 gefunden:⁴⁸ Die mit nur einem Nukleotidaustausch einhergehende sekundäre Mutation T790M liegt am Eingang zur sogenannten Scharnierregion. Durch die Mutation zur sterisch anspruchsvollen Aminosäure M790 wird der Zugang des hydrophoben Bereiches oberhalb der Scharnierregion, der von vielen Kinaseinhibitoren besetzt wird, erschwert (siehe Abbildung 7).^{23,59-63} Da diese Aminosäure den Zugang von Liganden in die hydrophobe Tasche beeinflusst beziehungsweise „kontrolliert“, wird sie auch als Türsteherrest bezeichnet.⁶⁴ Die Mutationen an der Türsteherposition wurden auch bei anderen Tyrosinkinasen, wie ABL, PDGFR, KIT und cSrc, im Zusammenhang mit Wirkstoffresistenzen beschrieben.^{65,66}

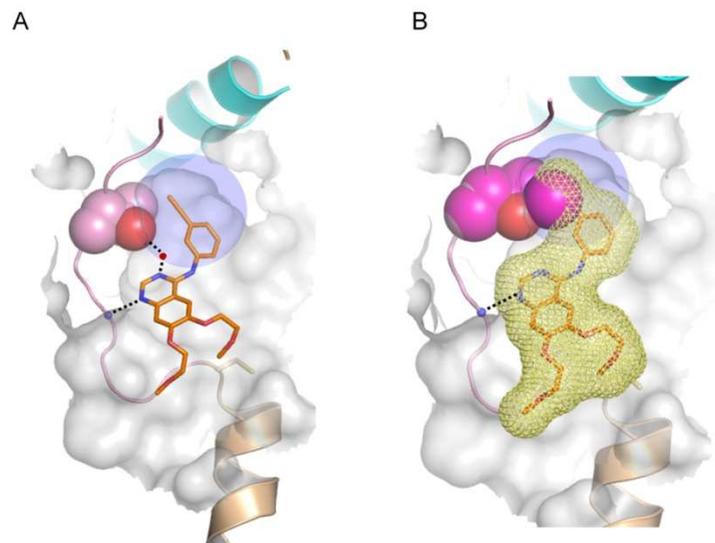


Abbildung 7: (A+B) Proteinkristallstruktur der ATP-Bindungstasche von EGFR im Komplex mit Erlotinib (orange) (PDB-Eintrag 1M17). Dargestellt sind die Scharnierregion in pink und die Helix-C in türkis. Die van-der-Waals-Radii der Türsteherseitenketten sind sphärisch dargestellt (pink). Der hydrophobe Bereich oberhalb des Türstehers ist in blau gekennzeichnet. Abbildung (A) stellt EGFR *wt* dar; Abbildung (B) ist ein Modell basierend auf dem PDB-Eintrag 1M17⁶⁷ und illustriert die sterische Hinderung von Erlotinib durch die Türstehermutante EGFR-T790M.

Neben der erworbenen Resistenzmutation T790M gibt es noch weitere Mechanismen, die durch Aktivierung nachgeschalteter EGFR-Signalkaskaden zur Resistenz von Erlotinib und Gefitinib führen: Diese sind zum Beispiel die Amplifikation des MET-Onkogens⁶⁸, KRAS-Mutationen⁶⁹ sowie der Verlust von PTEN⁷⁰, einem wichtigen Tumorsuppressor, der als Phosphatase von PI3K fungiert.^{26,41}

2.1.3 Tyrosinkinasehemmer zur Behandlung von NSCLC

Die in Forschung und Klinik angewendeten Inhibitoren der EGFR-Kinase lassen sich in zwei Gruppen, und zwar in die Inhibitoren der ersten und zweiten Generation, unterteilen.

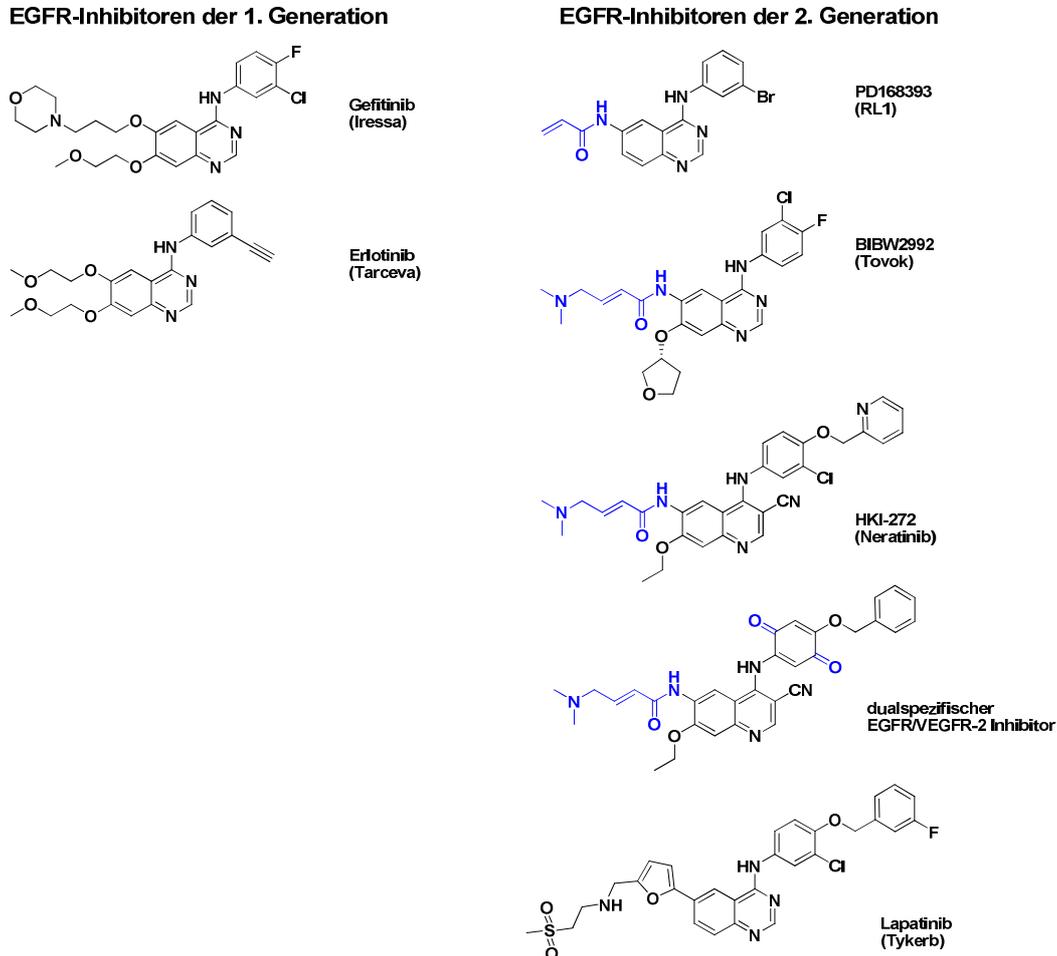


Abbildung 8: Strukturen von EGFR-Kinaseinhibitoren der ersten und zweiten Generation. Die elektrophilen Bereiche der Inhibitoren, die zur Ausbildung der kovalenten Bindung dienen, sind blau gekennzeichnet. Lapatinib stellt eine Ausnahme dar und bindet reversibel an die inaktive Kinasekonformation.

EGFR-Inhibitoren der ersten Generation

Zu den EGFR-Inhibitoren der ersten Generation gehören Erlotinib und Gefitinib.⁵¹ Bei diesen Verbindungen handelt es sich um ATP-kompetitive Inhibitoren, die an die ATP-Bindetasche der Kinase binden. Die Proteinkristallstruktur von Erlotinib im Komplex mit EGFR ist in Abbildung 7A dargestellt. Die reversible Bindung des Inhibitors an die aktive Kinasekonformation der ATP-Bindungstasche erfolgt über N-1 des Chinazolingerüsts zu M793 der Scharnierregion. Außerdem tritt N-3 des

Chinazolingrundgerüsts mit der Türsteher-Aminosäure T790 in Wechselwirkung.^{62,67} Die substituierte Phenylgruppe bindet im hydrophoben Bereich oberhalb der Scharnierregion, der nur zugänglich ist, wenn der Türsteher, wie im Fall von T790, eine kleine Seitenkette trägt. Somit können diese reversiblen Inhibitoren nicht binden, wenn die raumeinnehmende Türstehermutation T790M vorliegt (siehe Abbildung 7B). Die weiteren Substituenten in 7-Position des Chinazolingrundgerüsts sind zum äußeren Bereich der Kinase gerichtet und dienen zur Erhöhung der Löslichkeit und somit zur Verbesserung von pharmakokinetischen Eigenschaften.^{18,67}

Die katalytische Domäne bildet die aktive Konformation aus, indem die Helix-C eine Position einnimmt, mit der sie Interaktionen mit einem konservierten Glutamat und Lysin eingehen kann. Da die Aktivierungsmutante L858R eine Stabilisierung der aktiven Konformation induziert, binden Inhibitoren der ersten Generation besonders gut an diese Mutante. Deshalb werden diese Verbindungen bei der Therapie des EGFR-abhängigen NSCLC mit einer L858R-Mutation eingesetzt. Diese Inhibitoren binden spezifisch an EGFR.

EGFR-Inhibitoren der zweiten Generation

Inhibitoren der zweiten Generation zeigen biochemisch eine verbesserte Wirkung gegenüber der wirkstoffresistenten T790M-Mutante.⁷¹ Die Mehrzahl dieser Verbindungen geht eine irreversible Bindung mit der Thiolgruppe eines Cysteins (C797) am Rande der Scharnierregion ein (Abbildung 9).

Eine Ausnahme stellt der Wirkstoff Lapatinib (Tykerb[®]) dar, da dieses keine elektrophile Gruppe trägt (Abbildung 9). Das Chinazolingerüst von Lapatinib bindet reversibel, wie die Inhibitoren der ersten Generation, an die Scharnierregion. Allerdings befindet sich die Kinase in einer inaktiven Konformation, bei der die Helix-C von der Scharnierregion weggedreht ist. Dieses wird durch die zusätzliche Fluorophenylgruppe forciert, die am 3-Chloroanillin-Rest des Inhibitors konjugiert ist (Abbildung 9). Durch diese Konformationsänderung hat auch Lapatinib, wie charakteristisch für Typ-II-Inhibitoren, eine 10-fach längere Rezeptor-Verweildauer als die Typ-I-Inhibitoren der ersten Generation.⁷² Dieses hat einen günstigen Einfluss auf dessen pharmakokinetischen Eigenschaften. Im Gegensatz zu den Inhibitoren der ersten Generation bindet Lapatinib dualspezifisch an EGFR und HER2. Aus diesem Grund wird der Inhibitor zur Behandlung von HER2-positivem Brustkrebs eingesetzt.

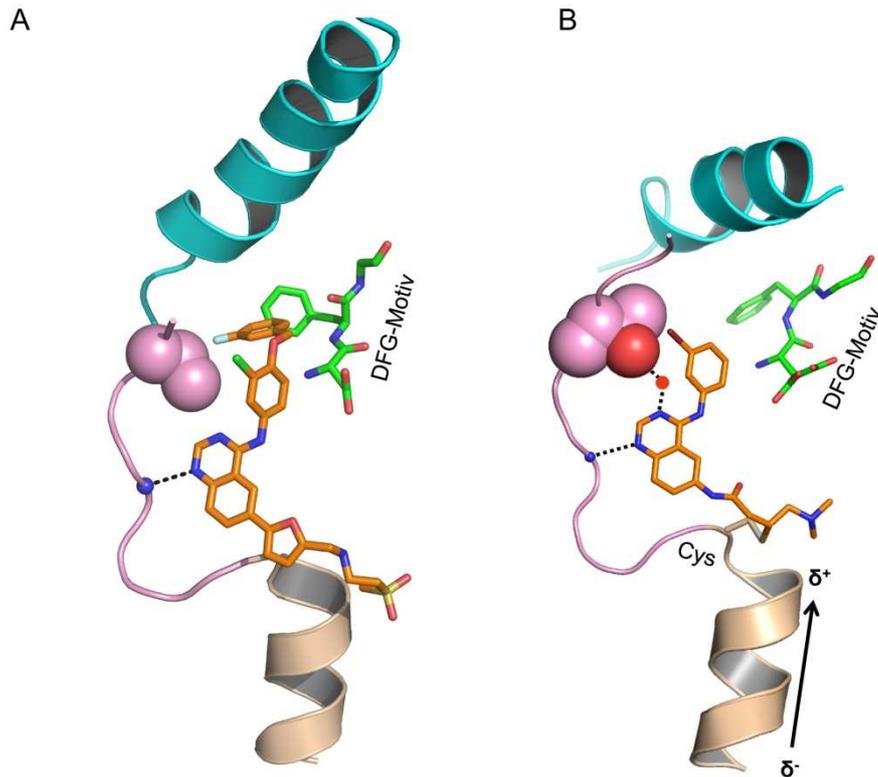


Abbildung 9: Inhibitoren der zweiten Generation. (A) Lapatinib (orange) bindet an die inaktive Kinasekonformation von EGFR (PDB-Eintrag 1XKK⁷²). Die Helix-C ist nach außen geschwungen und das DFG-Motiv (grün) ist verschoben, sodass ATP nicht mehr koordiniert werden kann. Lapatinib bindet mit N1 des Chinazolins an die Scharnierregion. Der Türsteher T790 ist leicht nach außen gedreht. (B) Der irreversible Inhibitor bindet an die aktive Kinasekonformation und bildet eine kovalente Bindung an ein Cystein in der Scharnierregion. Weiterhin werden Wasserstoffbrückenbindungen zur Scharnierregion und zum Threonin des Türstehers ausgebildet. Das DFG-Motiv (grün) und die Helix-C (türkis) nehmen eine Konformation ein, in der ATP binden könnte.

Die Entwicklung irreversibler Inhibitoren begann bereits in den neunziger Jahren mit den Arbeiten von Wyeth und Parker-Davis.⁷³ Die Forschung an diesen Verbindungen erhielt eine Renaissance, als bekannt wurde, dass irreversible Inhibitoren an die wirkstoffresistente Mutante T790M in EGFR binden können.^{74,75} In biochemischen Assaysystemen zeigen diese Verbindungen einen sehr guten Effekt.⁷⁶ Jedoch ist die Wirkung in klinisch relevanten Zelllinien noch nicht hinreichend gut, um das Tumorstadium aufhalten zu können.^{77,78} Die hierzu notwendige Wirkstoffkonzentration wäre aufgrund von auftretenden Nebenwirkungen nicht tolerabel.⁷⁹

Die meisten irreversiblen EGFR-Inhibitoren bestehen wie Erlotinib und Gefitinib aus einem Chinazolingrundgerüst und binden ebenfalls an die Scharnierregion der ATP-Bindungstasche. An das Grundgerüst ist in 6-Position ein Michael-Akzeptor substituiert, der mit dem Thiol des Cysteins (C797) in der Scharnierregion von EGFR eine kovalente Bindung ausbildet. Dieses Cystein ist negativ polarisiert, da es sich am Ende einer Helix befindet und somit besonders reaktiv gegenüber elektrophilen Gruppen ist

(Abbildung 9B).⁸⁰ Trotz kontroverser Diskussionen über den Einsatz irreversibler Verbindungen in der Arzneistoffentwicklung weisen irreversible Chinazolin-Kinaseinhibitoren einige Vorteile gegenüber ihren reversiblen Analoga auf: Die irreversiblen Inhibitoren heben das katalytische Gleichgewicht zwischen Kinase und ATP auf und blockieren, anders als reversible Inhibitoren, dauerhaft die katalytische Aktivität.⁷³ Pharmakokinetisch betrachtet, zeichnen sich irreversible Inhibitoren durch lange Halbwertszeiten aus und besitzen auch bei fallendem Plasmaspiegel eine gute Effektivität.⁷³ Aufgrund der nicht ATP-kompetitiven Inhibition können irreversible Verbindungen, trotz hoher ATP-Konzentrationen in der Zelle, EGFR gut hemmen.^{*50} Durch die bei Kinasen stark konservierte Aminosäuresequenz der ATP-Bindungstasche ist es schwierig, selektive Kinaseinhibitoren zu entwickeln. Das reaktive Cystein stellt einen Selektivitätsvorteil dar, da es nur in der ErbB-Familie sowie in einigen wenigen anderen Kinasen vorkommt.^{81,82} Eine unspezifische Bindung an Glutathion konnte bei Chinazolin-Kinaseinhibitoren unter physiologischen Bedingungen ausgeschlossen werden.⁷³ Allerdings sind bis jetzt nur wenige irreversible Inhibitoren für klinische Studien zugelassen: EKB569 (Phase II), HKI-272 (Phase III), CI1033 (Phase II eingestellt) und BIBW2992 (Phase III).⁸³

* Die ATP-Konzentration beträgt in der Zelle zwischen 1-10 mM.

2.2 Spezieller Teil

2.2.1 Aufgabenstellung

Inspiziert vom durchbrechenden Erfolg des Tyrosinkinasehemmers Imatinib (Glivec[®]) in der Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie, zielten in den vergangenen Jahren die Bemühungen der Pharmaindustrie darauf ab, selektive Wirkstoffe gegen weitere Tumorerkrankungen zu entwickeln. In der Tumorthherapie von NSCLC wurden die selektiven Rezeptor-Tyrosinkinaseinhibitoren Erlotinib (Tarceva[®]) und Gefitinib (Iressa[®]) erfolgreich bei Patienten mit EGFR-L858R-Aktivierungsmutation eingesetzt. Allerdings kam es nach kurzer Zeit zu Wirkstoffresistenzen, die durch die Mutation T790M ausgelöst wurde. Diese verhindert aufgrund der raumeinnehmenden Aminosäure Methionin die Bindung reversibler Inhibitoren in der ATP-Bindungstasche.⁵⁸ Weiterhin kam es auch zu Mutationen außerhalb der ATP-Bindungstasche und sogar zu Mutationen außerhalb des Zielproteins, die zur Wirkstoffresistenz führten.^{26,56} Dieses bedingt, dass weitere Inhibitoren gefunden werden müssen, die auch wirkstoffresistente Tumorzellen hemmen können. Zur Umgehung der wirkstoffresistenten T790M-Mutante versuchte man, bereits bekannte EGFR-Inhibitoren, meist Inhibitoren der 1. Generation, gezielt abzuwandeln. Dazu musste allerdings zunächst untersucht werden, wie irreversible Inhibitoren die zur Resistenz führende Mutation überwinden können.

Zur Klärung dieser Frage sollten in der Arbeitsgruppe Rauh zunächst strukturelle Untersuchungen durchgeführt werden. Außerdem sollte der Verlust der Inhibitionswirkung durch erhöhte katalytische Aktivität der Kinase untersucht werden.

Das Ziel dieser Arbeit war es nun, unter Verwendung und Entwicklung geeigneter Assaysysteme, dieser Fragestellung im Detail nachzugehen. Ein aktivitätsbasiertes Assaysystem sollte dabei Aufschluss über die katalytischen Parameter k_{cat} , K_m und k_{cat}/K_m verschiedener Kinasemutanten geben. Ergänzend dazu sollte ein innovatives Detektionssystem zur Charakterisierung irreversibler Inhibitoren entwickelt werden, welches für Studien zu Strukturaktivitätsbeziehungen von irreversiblen EGFR-Inhibitoren der 2. Generation genutzt werden kann. Damit sollte im Speziellen auch der Einfluss der häufig vorkommenden Methionin-Türstehermutation auf die Bindungsaffinität dieser Inhibitoren untersucht werden. Bekannte Assaysysteme sind dazu weniger geeignet, da irreversible Inhibitoren einer anderen Inhibitionskinetik als reversible Inhi-

bitoren folgen. Um einen ersten Einblick in die Inhibitionseigenschaften einzelner irreversible bindenden Inhibitoren zu bekommen, sollten zunächst unter definierten Bedingungen IC₅₀-Bestimmungen durchgeführt werden.

Zusammengefasst sollte mit diesem Projekt ein allgemeines biochemisches Verständnis über die Hintergründe der Wirkstoffresistenzentwicklung bei Mutation des Türsteherrestes erworben werden. Einen Schwerpunkt bildete dabei die Charakterisierung von irreversiblen Inhibitoren in Hinblick auf die Inhibition verschiedener Kinasemutanten.

2.2.2.1 cSrc-Kinase als Modell für die EGFR-Kinase

Ausgehend von Blair *et al.*⁸⁴ wurde für biochemische und strukturbiologische Untersuchungen die cSrc-Kinase als Modellsystem für EGFR genutzt, da EGFR nicht in *E. coli* exprimiert werden kann und die cSrc-Kinase bessere Strukturinformationen liefert als EGFR. Die Ausbeuten der cSrc-Kinase nach FPLC-Aufreinigung waren sehr hoch und betragen circa 7 mg Protein pro Liter Expressionskultur. Um cSrc an EGFR anzupassen, wurde mit zielgerichteter Mutagenese ein Cystein entsprechend zur EGFR-Kinase an das Ende der Scharnierregion eingefügt (cSrc-SM). In eine weitere Mutante, genannt Doppelmutante (cSrc-DM), wurde zusätzlich die Türstehermutation T338M eingefügt.^{84,85} Vergleicht man die Ähnlichkeit von EGFR und cSrc beträgt Strukturidentität 70 % und die Sequenzidentität 37 %. Mit diesem Modellsystem ließen sich alle erforderlichen SAR-Beziehungen ableiten und wurden in einer Publikation zur Umgehung von Wirkstoffresistenzen in EGFR veröffentlicht.⁸⁵

Expression und Aufreinigung der cSrc-Kinase

Die Expression und Aufreinigung der beiden Mutanten erfolgte nach einem einheitlichen Protokoll. Die cSrc-Kinase wurde jeweils mit der Phosphatase YopH aus *Yersinia enterocolitica* und dem Faltungsprotein GroEL aus der Chaperon-Familie überexprimiert.^{84,86} Mit der Koexpression der Phosphatase sollte die übermäßige und für *E. coli* schädliche Phosphorylierung von Tyrosinresten während der Überexpression von cSrc verhindert werden. Mit dieser Methode konnten Seeliger *et al.*⁸⁶ die aufwendige Expression in Insektenzellen umgehen.

Die Proteinexpression erfolgte ausgehend von einer Übernachtskultur bei 35 °C, die in 2 L LB-Medium verdünnt und bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,6 heran-

gezogen wurde. Dann wurde die Temperatur auf 18 °C abgesenkt und die Proteinsynthese mit IPTG gestartet. Nach einer Inkubation von 16-20 h wurden die Zellen geerntet, lysiert und das Lysat für die Aufreinigung vorbereitet (Abbildung 10). Diese bestand aus drei Schritten. Zuerst erfolgte eine Nickel-Affinitätschromatografie mit anschließender Spaltung des N-terminalen Polyhistidinanhangs durch Zugabe von TEV-Protease. Im zweiten Schritt wurde eine Anionenchromatografie durchgeführt, bevor im letzten Schritt die Kinase gelchromatografisch aufgereinigt wurde. Ein SDS-Gel, auf dem Proteinproben aus jedem Aufreinigungsschritt der cSrc-DM aufgetragen sind, ist in Abbildung 10 dargestellt.

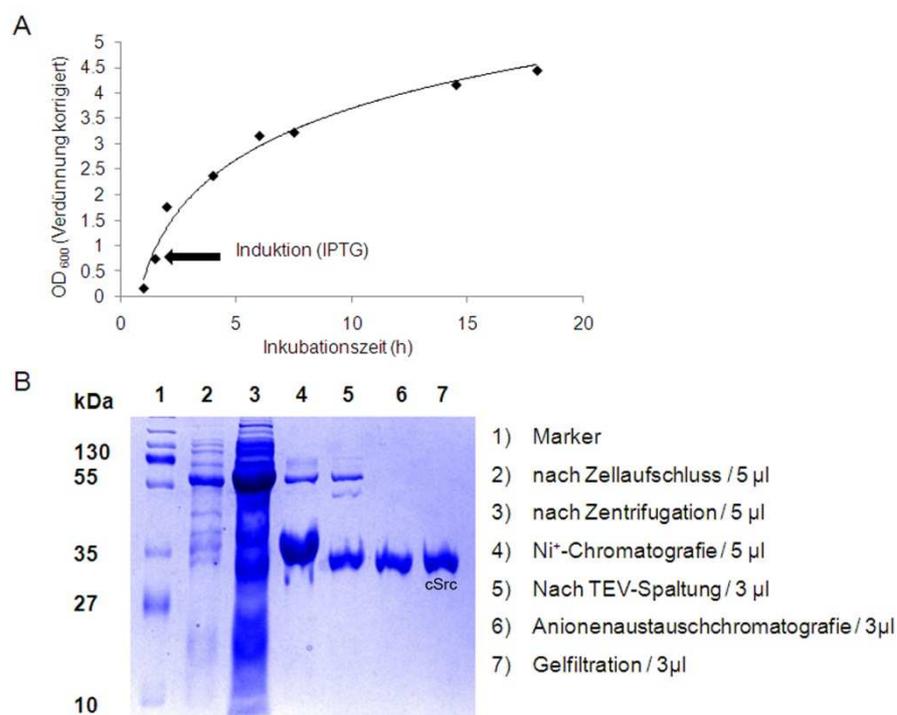


Abbildung 10: Expression und Aufreinigung der cSrc-Kinase. (A) Zeitlicher Verlauf der OD₆₀₀ einer cSrc-Expressionskultur. (B) SDS-Gel von Proteinproben aus einer dreistufigen Proteinaufreinigung mittels FPLC.

Zum Abschätzen der Reinheit der aufgereinigten cSrc-Kinase wurde ein SDS-Gel mit verschiedenen konzentrierten Proteinproben vorbereitet. Im Anschluss wurden die Proteinbanden mit der Silberfärbungs-Methode nach Nesterenko⁸⁷ angefärbt. Mit dieser Methode lassen sich Spuren von Proteinmengen (bis 0,5 ng) nachweisen. Im vorliegenden Gel (Abbildung 11) sind nur geringe Verunreinigungen durch ein Protein mit einem Molekulargewicht von 57 kDa erkennbar. Wahrscheinlich handelt es sich hier um das koexprimierte Chaperon GroEL (MW 57,2 kDa).

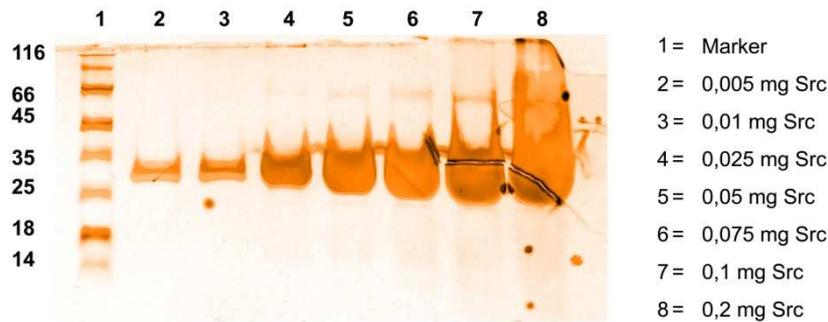


Abbildung 11: SDS-Gel mit Silberfärbung zur Überprüfung der Reinheit von cSrc. Erst bei hohen Beladungsmengen sind minimale Verunreinigungen mit einem Molekulargewicht von 57 kDa zu erkennen.

2.2.2.2 Massenspektrometrische Validierung der kovalenten Bindung irreversibler Inhibitoren an cSrc-Kinase

Zur Validierung der Identität der exprimierten Proteine und zur Überprüfung, ob die verwendeten irreversiblen EGFR-Inhibitoren eine kovalente Bindung mit der cSrc-Kinase eingehen, wurden massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Zusätzlich sollte die Spezifität der Additionsreaktion an das reaktive Cystein untersucht werden, da kovalente Inhibitoren prinzipiell auch mit anderen Cysteinen an der Proteinoberfläche reagieren könnten.

Damit die Proben massenspektrometrisch untersucht werden konnten, musste zuerst eine geeignete Aufarbeitungsmethode gefunden werden, um die Proteinlösungen zu entsalzen und um den Inhibitor nach definierten Zeiten aus dem Protein-Inhibitor-System zu eliminieren. Hierfür wurde eine Pipettenspitze mit C-18-Chromatografiematerial (Ziptip[®]), Proteinentsalzungssäulen und Dialyse Reservoire verwendet. Dabei resultierten mit den Dialyse Reservoiren, die eigentlich für die dialysevermittelte Proteinkristallisation entwickelt wurden, die sensitivsten Massendiagramme. Diese sind in Abbildung 12 dargestellt und zeigen das Apoenzym (A) und Kinase-Inhibitor-Komplexe mit verschiedenen irreversiblen Inhibitoren (B-D). Die ermittelten Massen weichen nur maximal zwei Masseneinheiten von den berechneten Werten was im Rahmen der Messungenauigkeiten liegt. Mehrfachmodifizierungen waren nicht oder nur sehr schwach zu erkennen.

Anhand dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die überexprimierten Kinasen den gewünschten Konstruktängen entsprachen. Außerdem wurde die kovalente Modifikation der cSrc-Kinase mit irreversiblen EGFR-Inhibitoren bestätigt.

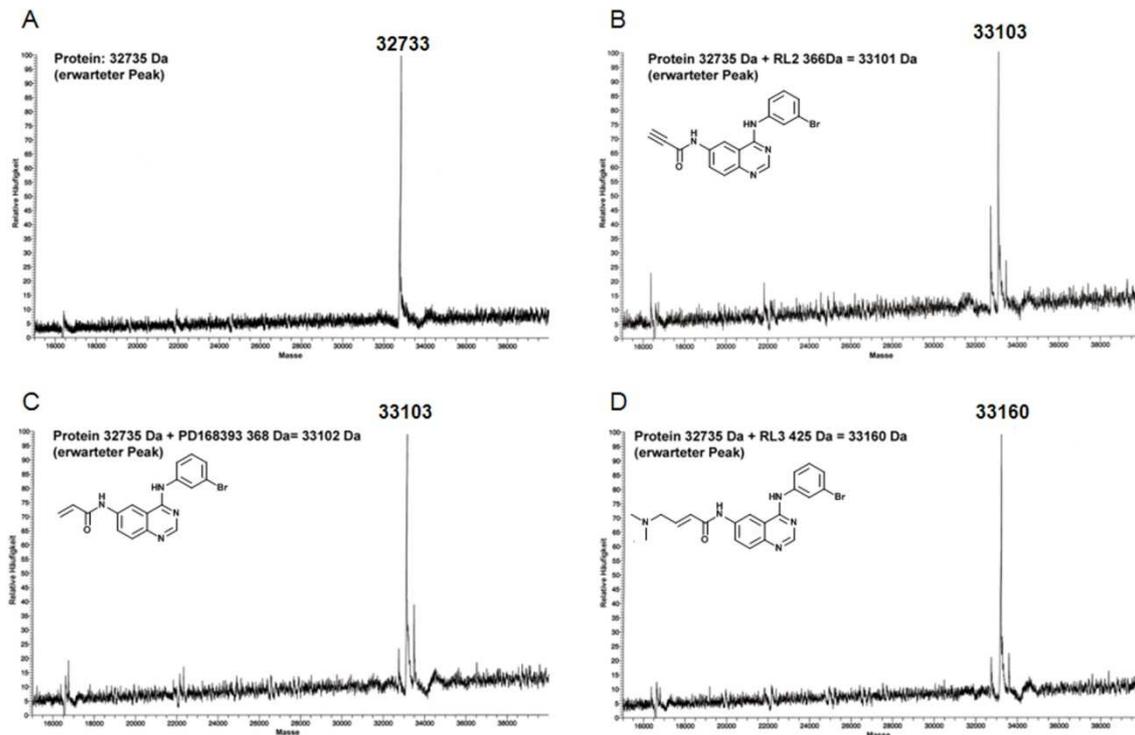


Abbildung 12: Massenspektrometrische Analyse der cSrc-Kinase mit irreversiblen Inhibitoren. (A) Masse des Apoenzym. (B-D) Masse der cSrc-Kinase mit kovalent gebundenem Inhibitor. Die spektrometrisch ermittelten Massen liegen in den erwarteten Fehlerbereichen.

2.2.2.3 Charakterisierung von reversiblen und irreversiblen Inhibitoren mit aktivitätsbasierten Assaysystemen

Bislang konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass irreversible Inhibitoren kovalent an die cSrc-Kinase binden. Quantitative Aussagen, die in der Regel mit Aktivitätsminderung der Kinase bestimmt werden,⁸⁸⁻⁹⁰ wurden hingegen noch nicht gemacht. Mittlerweile gibt es hierfür zahlreiche verschiedene kommerzielle Kinaseassays,⁸⁹ von denen eine Reihe getestet wurden und in der Arbeit vorgestellt werden. Für cSrc und EGFR wurden der Z'lyte™-Assay von Invitrogen und der HTRF®-Assay von Cisbio verwendet. Die Messung beruht auf der Detektion des Phosphorylierungsgrades eines Peptides durch die entsprechende Kinase. Um quantitative Aussagen über Inhibitoren machen zu können, bestimmt man IC₅₀-Werte, die die halbmaximale inhibitorische Konzentration darstellen und durch den Wendepunkt einer semilogarithmisch aufgetragenen sigmoidalen Dosiswirkungskurve determiniert sind.⁹¹ Die Herleitung und die genaue Beschreibung des IC₅₀-Wertes sind in Kapitel 5.3.2 dargestellt. Zur Vermessung von Inhibitoren müssen die variablen Parameter des Assaysystems wie Enzymkonzentration, ATP-Konzentration und Peptidkonzentration insofern optimiert werden, dass es

zu einer direkten Abhängigkeit zwischen katalytischer Aktivität und InhibitorKonzentration kommt (Kapitel 5.3.1). Die Etablierung des HTRF-Assays für cSrc-SM und -DM wird in diesem Kapitel im Detail beispielhaft für alle weiteren etablierten aktivitätsbasierten Assaysysteme aufgeführt. Die Beschreibung der Assayparameter für 12 weitere Kinasen und Mutanten findet sich in Kapitel 4.2.4.

2.2.2.3.1 Etablierung eines aktivitätsbasierten Assays am Beispiel von cSrc-SM und cSrc-DM mit HTRF

Die Etablierung eines aktivitätsbasierten Assaysystems zur Verwendung für IC_{50} -Bestimmungen erfolgte in fünf Schritten nach folgendem Schema (Abbildung 13):

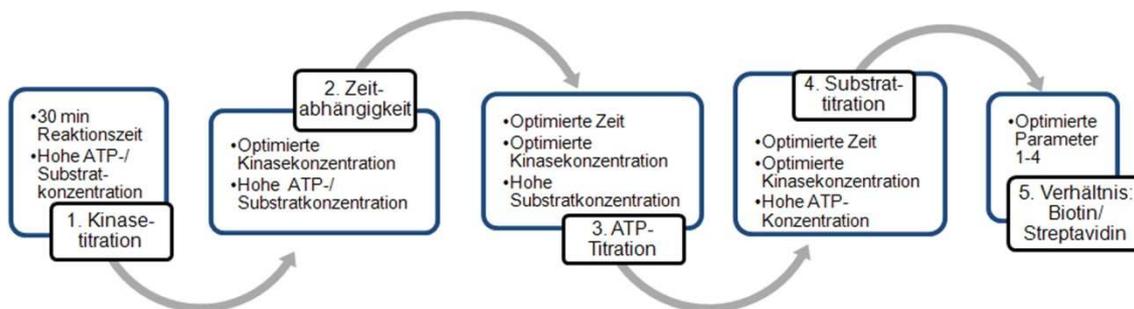


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Assayetablierung für aktivitätsbasierte Kinaseassays. Blau eingefasstes Feld: anzupassender Parameter; schwarz eingefasstes Feld: Reaktionsbedingungen, mit denen die Anpassungen durchgeführt wurden.

1. Kinasetitration

Da der IC_{50} -Wert von der Kinasekonzentration abhängig ist, müssen bei der Kinasetitration Konzentrationen gewählt werden, die im initialen Bereich der Sättigungskurve einer Kinasetitration liegen. Dadurch wird eine lineare Dosiswirkungsabhängigkeit von Inhibitoren erreicht. Zu hohe Konzentrationen führen zur Verminderung der Sensitivität von hochaffinen Inhibitoren und zu niedrige Konzentrationen erniedrigen den dynamischen Bereich des Assays und führen zu verminderter Robustheit des gesamten Systems. Da Letzteres für die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit von Bedeutung ist, wurden Kinasekonzentrationen im oberen linearen Bereich einer Kinasetitrationkurve gewählt. Diese lag für die cSrc-SM bei 0,18 ng/ μ L und für die cSrc-DM bei 0,07 ng/ μ L (Abbildung 14).

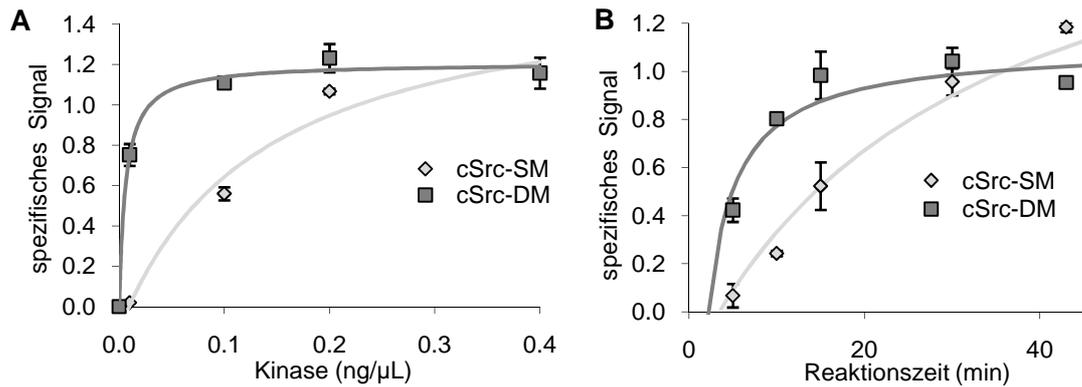


Abbildung 14: HTRF-Assay Kinasetitration (A) und Kinetikexperiment (B) mit cSrc-SM und -DM. Die cSrc-DM ist aktiver als die cSrc-SM.

2. Zeitabhängigkeit

Auch die Reaktionszeit der Peptidphosphorylierung durch die Kinase sollte bei IC_{50} -Bestimmungen im linearen Bereich einer kinetischen Sättigungskurve liegen, damit die Reaktion im Fließgleichgewicht vorliegt. Hier wurde für cSrc-SM eine Reaktionszeit von 30 min und für cSrc-DM eine Reaktionszeit von 15 min gewählt.

3. ATP- und 4. Peptidkonzentration

Nach Optimierung der Kinasekonzentration sowie der Reaktionszeit anhand des initialen Bereiches einer entsprechenden Titration wurden die ATP- und Peptidkonzentrationen angepasst. Diese entsprachen dem jeweiligen K_m -Wert, da an diesem Punkt die aktiven Zentren halbmaximal mit Substrat beziehungsweise ATP besetzt sind. Somit können ATP-kompetitive Inhibitoren erfasst werden und werden nicht durch zu hohe ATP-Konzentrationen vom aktiven Zentrum verdrängt. Um die Möglichkeit der Bindung von peptidkompetitiven Inhibitoren nicht auszuschließen, wurde auch die Peptidkonzentration dem K_m -Wert angepasst.

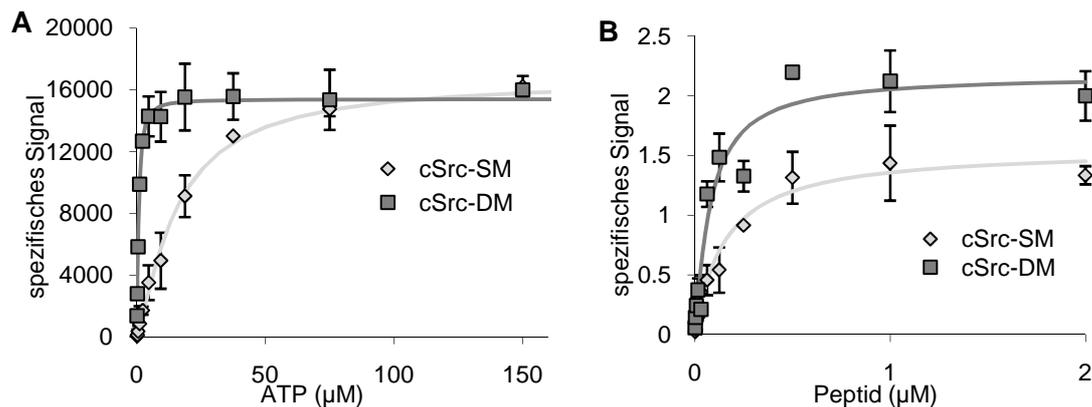


Abbildung 15: K_m-Bestimmung zur Anpassung der optimalen ATP- und Peptidkonzentration für den HTRF-Assay. (A) Der K_m-Wert der cSrc-SM für ATP lag bei 15,6 µM und für cSrc-DM bei 0,81 µM. (B) Der K_m-Wert für das Peptid betrug 0,152 µM für cSrc-SM und 0,08 µM für cSrc-DM.

5. Biotin/Streptavidin-Verhältnis

Zur Erzielung eines optimalen Signal-Rausch-Verhältnisses wurde das spezifische Signal in Bezug auf das Biotin/Streptavidin-Verhältnis untersucht. Streptavidin ist mit dem Fluorophor XL665 konjugiert und bindet an Biotin, welches an das zu phosphorylierende Peptid konjugiert ist. Der Wert des spezifischen Signals ergibt sich aus dem Quotienten der bei einer Wellenlänge von 665 nm und 620 nm gemessenen Fluoreszenzeinheiten unter Berücksichtigung der Subtraktion des Hintergrundsignals. Bei den Versuchen stellte sich heraus, dass das Biotin/Streptavidin-Verhältnis von 1/4 das beste Signal-Rausch-Verhältnis zeigte. Es wurde daraufhin für alle weiteren Vermessungen verwendet.

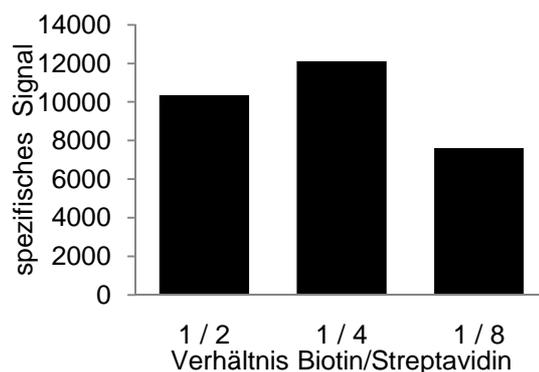


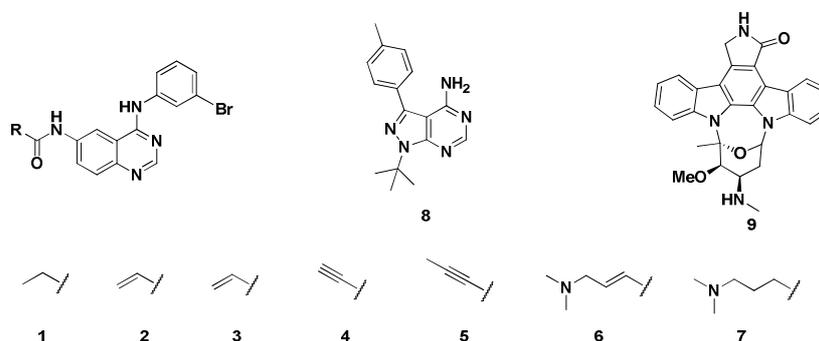
Abbildung 16: Biotin/Streptavidin-Optimierung

Anhand der optimierten Assay-Parameter konnten IC₅₀-Bestimmungen durchgeführt werden. Im Folgenden werden zwei Projekte diskutiert, für die diese von Bedeutung waren. In einem der Projekte wurde der Bindungsmechanismus von irreversiblen Inhibitoren an die arzneistoffresistente EGFR-Mutante untersucht. In einem weiteren Projekt ging es um eine Studie, in der verschiedene EGFR-Inhibitoren, vor allem irreversible

Inhibitoren, in 80 NSCLC-Zelllinien getestet wurden. Die biochemische Untersuchung dieser Inhibitoren wurde zur Ableitung von Strukturaktivitätsbeziehungen sowie zum Vergleich von biochemischen und zellbasierten Assay-Resultaten verwendet.

2.2.2.3.2 IC₅₀-Bestimmung von irreversiblen und reversiblen Inhibitoren der EGFR- und der cSrc-Kinase

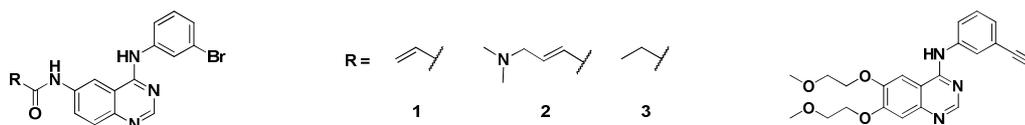
Nach Etablierung des aktivitätsbasierten Kinaseassaysystems konnte die inhibitorische Aktivität einzelner Verbindungen gemessen werden. Da irreversible Verbindungen eine zeitabhängige Inhibition zeigen, wurde in jedem Experiment die Verbindung mit der Kinase eine Stunde präinkubiert, bevor die Kinasereaktion durch Zugabe von ATP und Peptid gestartet wurde (vergleiche Kapitel 2.2.2.6). Die Experimente dienten zur Überprüfung der Robustheit und Reproduzierbarkeit des Assaysystems und wurden mit aus der Literatur bekannten sowie mit von der AG Rauh neu synthetisierten Inhibitoren durchgeführt. Ausserdem wurde die Inhibition von cSrc und EGFR durch verschiedene Inhibitoren verglichen.



Inhibitor	cSrc-SM	cSrc-DM
1	6400 ± 550	> 50000
2	340 ± 170	2800 ± 410
3	5,4 ± 1	14400 ± 2000
4	340 ± 30	8100 ± 500
5	236 ± 57	5710 ± 3000
6	8400 ± 3100	> 50000
7	71 ± 12	9000 ± 1900
8	6 ± 4	1 ± 0,02

Tabelle 1: IC₅₀-Werte bekannter cSrc-Inhibitoren und Chinazolinverbindungen.

Alle getesteten Verbindungen sind ATP-kompetitive Typ-I-Inhibitoren und binden an die Scharnierregion der ATP-Bindungstasche. Die Inhibitoren **2**, **3**, **4** und **5** enthalten einen Michael-Akzeptor in der sich in 6-Stellung befindlichen Amidseitenkette des Chinazolingerüsts (Tabelle 1). Diese Substanzen binden irreversibel an C345 in cSrc und an C797 in EGFR. Die Verbindungen **7** (PP1) und **8** (Staurosporin) sind bekannte Inhibitoren der cSrc-Kinase und werden nur für wissenschaftliche Zwecke genutzt, da diese als Arzneistoffe zu toxisch wären.⁹²⁻⁹⁴ Es wurde gezeigt, dass **7** besser an Kinasen mit kleinem Türsteher bindet als an Kinasen mit großem, sterisch anspruchsvollem Türsteher. Diese Tendenz spiegelte sich auch bei dieser Versuchsreihe wieder. Verbindung **7** hat 10-fach affiner an cSrc-DM als an cSrc-SM gebunden (Tabelle 1). Das antimikrobielle Alkaloid Staurosporin aus *Streptomyces staurosporeus* ist ein äußerst unselektiver Kinaseinhibitor.⁹⁵⁻⁹⁷ Das Alkaloid bindet an cSrc-DM besser als an die cSrc-SM (Tabelle 1). Dies ist darauf zurückzuführen, dass der größere Türsteher den Lactamring von Staurosporin, der an die Scharnierregion bindet, besser koordiniert als der kleinere Türsteher. Dies führt zu einer besseren Ausbildung der hydrophoben Interaktionen.⁹⁸ Weitere Ergebnisse zeigten, dass die irreversiblen Inhibitoren **2-5** eine nanomolare Affinität in der cSrc-SM und eine mikromolare Affinität in der cSrc-DM hatten. Der Verlust der Affinität ist durch die sterische Hinderung des großen Türsteherrestes (Kapitel 1.2) sowie der höheren ATP-Affinität (Kapitel 2.2.2.5) in der wirkstoffresistenten Variante erklärbar. Vergleicht man die Inhibition der Verbindungen **2-5**, die sich nur in den elektrophilen Substituenten unterscheiden, zeigt sich, dass Inhibitor **3** am wirksamsten ist. Dennoch besitzt auch dieser keine höhere Affinität in der cSrc-DM. Die reversiblen Chinazoline **1** und **6** sind nur sehr schwache Inhibitoren für die cSrc-Kinase.

Biochemische Validierung der cSrc-Kinase als Modellsystem für EGFR

Kinase	IC ₅₀ [nM]			
	1	2	3	Erlotinib
EGFR	0,08 ± 0,04	0,22 ± 0,13	0,43 ± 0,22	3,60 ± 2,50
EGFR-T790M	1,20 ± 0,44	3,00 ± 1,80	360 ± 260	260 ± 80,0
cSrc-SM	340 ± 170	236 ± 57,0	6400 ± 550	990 ± 7,80
cSrc-DM	2800 ± 410	5710 ± 3000	> 50000	4800 ± 660

Tabelle 2: IC₅₀-Bestimmung verschiedener Chinazolinderivate in cSrc- und EGFR-Mutanten

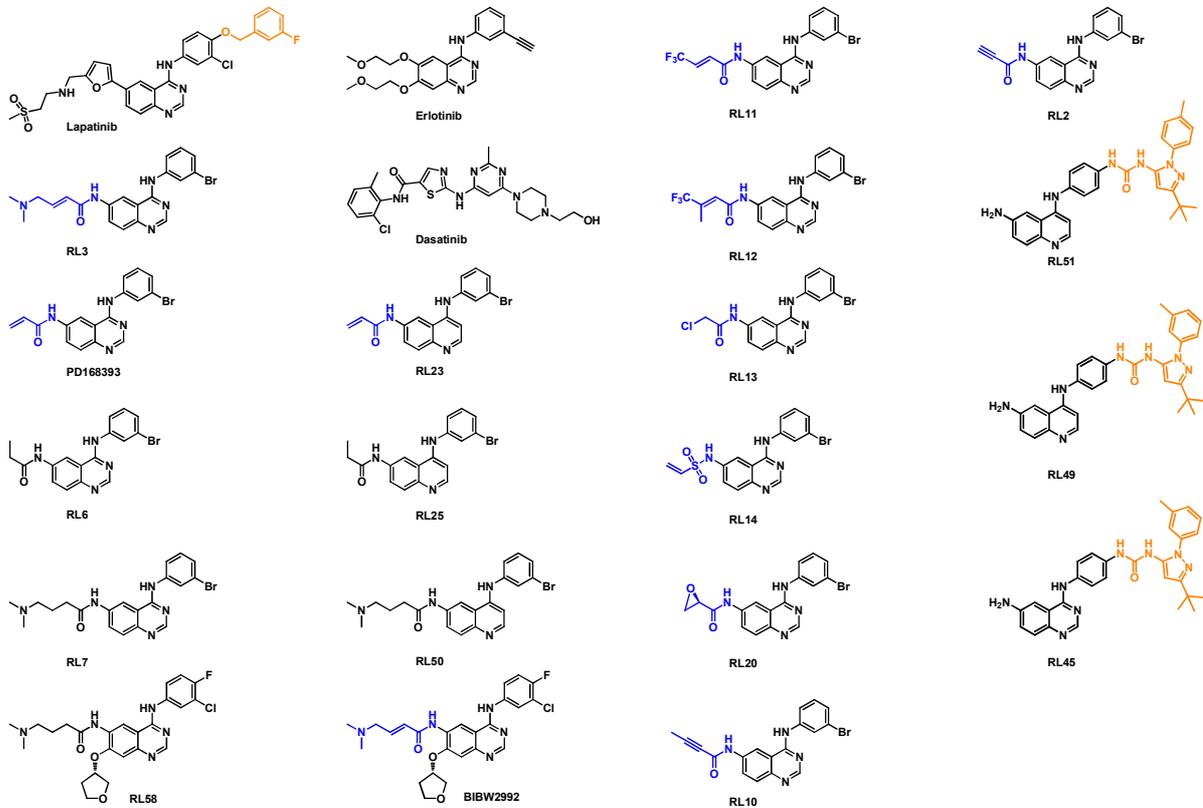
Die IC₅₀-Bestimmungen aus Tabelle 2 dienen zum Vergleich der Inhibition von EGFR und cSrc mit Chinazolinen sowie zur Validierung der cSrc-Kinase als Modellsystem für EGFR. Idealerweise sollten die IC₅₀-Werte ähnlich sein, oder zumindest sollten die Trends der Inhibition unterschiedlicher Verbindungen in EGFR und cSrc übereinstimmen. Erlotinib fungierte als Kontrollinhibitor, da für diesen IC₅₀-Werte publiziert worden waren.⁹⁹ Die gemessenen Werte stimmten mit den publizierten Werten überein. Die Trends der Inhibitoren lagen im gleichen Größenbereich, allerdings waren die Inhibitionswerte der cSrc-Kinase um ein Vielfaches höher als bei EGFR, was cSrc als Modellsystem für EGFR etwas einschränkte.

2.2.2.3.3 Profilierung irreversibler EGFR-Inhibitoren gegen 80 NSCLC-Zelllinien mit biochemischer Validierung

Aus der Literatur ist bekannt, dass auch die irreversiblen Inhibitoren, das heißt, die Verbindungen, die die Türstehermutation biochemisch überwinden können, keinen ausreichenden Effekt in der Klinik gezeigt haben, wenn die T790M-Mutation vorlag.^{79,100,101} In einer Profilierungsstudie wurden 19 in der Arbeitsgruppe Rauh synthetisierte sowie einige kommerziell erhältliche EGFR-Inhibitoren* in 80 genetisch definierten NSCLC-Zelllinien untersucht. Diese Analyse sollte zum einen Aufschluss darüber geben, welche NSCLC-Mutationen von EGFR-Inhibitoren in der Zelle erfolgreich inhibiert werden können und zum anderen sollten durch die Vielzahl der getesteten Verbindungen

* Erlotinib und Lapatinib wurden aus Tabletten extrahiert und aufgereinigt (siehe Kapitel 5.2.9).

dungen Einblicke darüber gewonnen werden, welche Molekülfragmente für die Enzymhemmung entscheidend sind. Zur Validierung wurde jeder Inhibitor biochemisch mit dem HTRF-Assay auf Inhibition der klinisch relevanten EGFR-L858R und EGFR-L858R/T790M-Mutanten getestet. Die Profilierungsstudie ergab, dass jeder EGFR-Inhibitor die Zelllinien ohne Türstehermutation gut hemmen kann. Allerdings waren die irreversiblen Inhibitoren den reversiblen überlegen. Bei Zelllinien, die zusätzlich eine T790M-Mutation trugen, kam es bei allen Inhibitoren zu einer drastischen Aktivitäts-einbuße.



Inhibitor	IC ₅₀ in nM		
	EGFR- <i>wt</i>	EGFR-L858R	EGFR-L858R/ T790M
BIBW-2992	<1	<1	<1
Dasatinib	30 ±10	11 ±15	19000 ±21000
Erlotinib	<1	<1	90±37
Lapatinib	1,2 ±0,9	11 ±7,5	19000 ±9900
PD168393	<1	<1	<1
RL2	<1	<1	1,7 ±1,4
RL3	<1	<1	9 ±3
RL6	<1	<1	1000 ±1300
RL7	<1	<1	190 ±69
RL10	<1	<1	15 ±8
RL11	2,0 ±0,5	<1	31 ±4
RL12	10 ±3	<1	14 ±6
RL13	1,9 ±0,6	<1	18 ±10
RL14	<1	<1	<1
RL20	<1	<1	6,5 ±3,6
RL23	<1	<1	3,2 ±1,6
RL25	16 ±6	2,8 ±2,6	520 ±280
RL45	122 ±24	57,4 ±40	725 ±420
RL49	4400 ±1130	20 ±25	406 ±166
RL50	1,7 ±0,5	<1	130 ±16
RL51	7350 ±1050	57 ±30	> 50000
RL58	<1	<1	170 ±37

Tabelle 3: IC₅₀-Bestimmungen der in der Profilierungsstudie eingesetzten Inhibitoren EGFR-L858R und EGFR-L858R/T790M. Die IC₅₀-Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei Wiederholungen, die jeweils in Zweifachbestimmung generiert wurden. Die in den Strukturen blau markierten Bereiche stellen die zur Ausbildung der kovalenten Bindung dienenden reaktiven Gruppen dar. Die orange gezeichneten Gruppen binden in die allosterische Bindungstasche der Kinase. Die IC₅₀-Werte für EGFR-*wt* wurden von Dr. H. Rode bestimmt.

Es ist bekannt, dass BIBW2992 mit der Seitenkette 4-(Dimethylamino)butanamid Interaktionen mit D800 außerhalb der Scharnierregion eingehen kann.⁷³ Eine interessante Fragestellung war in diesem Fall, ob der reversible Inhibitor RL58 besser bindet als andere Inhibitoren und durch Interaktionen mit D800 möglicherweise ähnlich wirksam wie sein irreversibles Analogon BIBW2992 ist. Es bestätigte sich, dass RL58 circa fünf

Mal potenter war als der reversible Inhibitor Erlotinib. Jedoch war RL58 deutlich schwächer wirksam als BIBW2992. Das bedeutet, dass die irreversible Bindung wesentlich zur inhibitorischen Wirkung beiträgt. Auf der Suche nach potenten Inhibitoren für Zelllinien mit Türstehermutationen wurde die Zweierkombination von dem irreversiblen Inhibitor BIBW2992 mit jeweils einem der Inhibitoren MEK-Inhibitor (PD0325901), PI3K/mTor-Inhibitor (PI-103) oder dem Src-Inhibitor Dasatinib untersucht. MEK, PI3K und Src sind nachgeschaltete Signalproteine, die einen wesentlichen Einfluss auf die EGFR-Signaltransduktion haben. Es stellte sich heraus, dass die Kombination von BIBW2992 mit dem PI3K/mTor-Inhibitor PI-103 auch bei Verwendung von therapeutisch anwendbaren Dosen einen signifikanten Effekt hatte. Die Kombination mit den anderen Kinaseinhibitoren war nicht erfolgreich.⁷⁵ Somit scheint die Resistenzumgehung mit einer Kombinationsbehandlung von zwei Stoffen, die in dieselbe Signalkaskade eingreifen, eine erfolgsversprechende Therapie zu sein. Ähnliches versucht man auch bei Arzneistoffresistenzen der BCR-Abl-Kinase.¹⁰² Einen alternativen Ansatz zur Überwindung der Türstehermutanten in EGFR haben Zhou *et al.* gewählt. Hierbei wurden irreversible Inhibitoren entwickelt, die außerhalb der hydrophoben Tasche binden und somit nicht mit T790M in Kontakt kommen.¹⁰²

Die biochemischen IC₅₀-Untersuchungen wurden zur Überprüfung und Validierung von EGFR-Inhibition durchgeführt. In Tabelle 3 wird gezeigt, dass alle in der Studie getesteten Verbindungen eine Inhibition der EGFR-Kinase zeigen. Es stellte sich heraus, dass die meisten Verbindungen die L858R-Aktivierungsmutante sehr wirksam hemmen. Weiterhin konnte belegt werden, dass die irreversiblen EGFR-Inhibitoren auch wirksam die Türstehermutante gehemmt haben. Etwas weniger wirksam waren die reversiblen Analoga. Mit diesem aktivitätsbasierten Assaysystem ließ sich keine differenzierte Aussage über die Inhibition unterhalb eines IC₅₀-Wertes von 1 nM machen. Limitierender Faktor war hierbei die Enzymkonzentration, da es bei sehr affinen Verbindungen anstelle einer wirkungsabhängigen Inhibition zu einer Titration der Kinasekonzentration kommt (Kapitel 2.2.2.6).

Die Begründung für die große Diskrepanz zwischen hochpotenter biochemischer Inhibition und nur schwacher Inhibition in zellulären Systemen ist noch nicht aufgeklärt worden. Es ist möglich, dass in dem sehr komplex regulierten membranständigen EGF-Rezeptor weitere Konformationsänderungen durch die Türstehermutation verursacht werden, die noch nicht entdeckt wurden.

2.2.2.4 Strukturbiologische Betrachtung der Resistenzumgebung mittels irreversibler Inhibitoren

In den vorhergehenden Kapiteln wurde gezeigt, dass irreversible Inhibitoren in der Lage sind, auch wirkstoffresistente Mutanten zu hemmen. Unklar war allerdings, wie genau diese Inhibitoren die Resistenzmutation umgehen können, da es auch bei irreversiblen Inhibitoren zu einer sterischen Hinderung zwischen dem Chinazolin-Inhibitor und der sterisch anspruchsvollen Seitenkette des Türstehers kommen muss. In der AG Rauh wurde angenommen, dass der Inhibitor entweder eine Konformationsänderung eingeht, durch die er sich vom Methionin entfernt oder dass sich die Seitenkette des Methionins aus der Bindungstasche wegdreht, sodass der Inhibitor in seiner Bindung nicht mehr beeinträchtigt wird. Um diese Frage zu beantworten, wurden strukturbiologische Untersuchungen verschiedener Protein-Inhibitor-Komplexe durchgeführt. Hierzu diente wiederum die cSrc als Modell für EGFR (siehe Kapitel 2.2.2.1). Die Struktur der cSrc-DM im Komplex mit dem irreversiblen Inhibitor RL3 lieferte dabei einen wichtigen Einblick, wie irreversible Chinazolininhibitoren an die Türstehermutante binden (Abbildung 17).⁸⁵ Über eine Michael-Addition bildet der Inhibitor eine kovalente Bindung mit C345 unterhalb der Scharnierregion der Kinase aus. Zusätzlich interagiert dieser über eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rückgrat von M341 im Zentrum der Scharnierregion. An dieser Position werden sowohl bei der cSrc-Kinase als auch in vielen anderen Kinasen Interaktionen über Wasserstoffbrückenbindungen mit Kinaseinhibitoren eingegangen. Eine Überlagerung der Proteinkristallstruktur von cSrc-SM mit cSrc-DM im Komplex mit einem irreversiblen Inhibitor lässt erkennen, dass das Methionin der Apo-Form mit dem irreversiblen Inhibitor kollidiert (Abbildung 17). Ferner wird durch die Struktur gezeigt, dass der Inhibitor eine Konformation stabilisiert, in der sich die raumeinnehmende Methionin-Seitenkette aus dem hydrophoben Bereich herausdreht. Dadurch hat der Inhibitor genügend Platz, in der Scharnierregion und im durch den Türsteher kontrollierten hydrophoben Bereich zu binden.⁸⁵

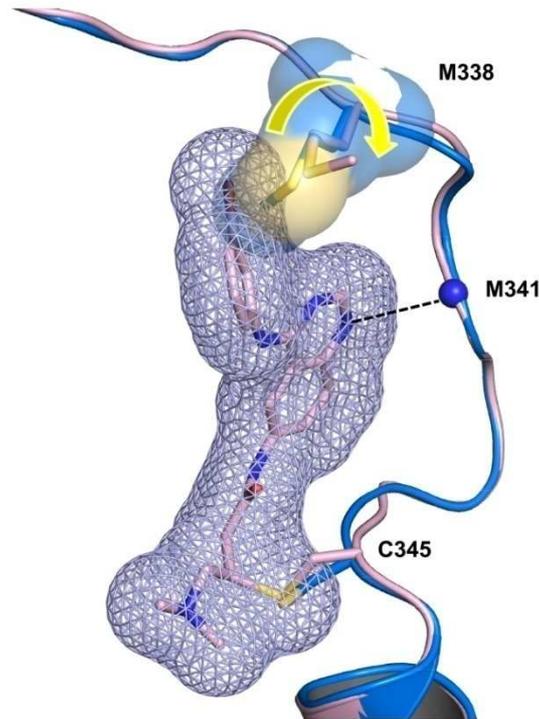


Abbildung 17: Überlagerung der Proteinkristallstruktur der cSrc-DM (rosa) im Komplex mit RL3 (rosa) und der cSrc-DM Apo-Form (blau) im Bereich des Türstehers M345 (PDB-Einträge 2QI8⁸⁵ und 2QQ7⁸⁵). Der irreversible Chinazolininhibitor geht eine kovalente Bindung mit C345 ein und bildet mit N1 des Chinazolingerüsts eine Wasserstoffbrücke zu M338 in der Scharnierregion. Im Vergleich zur Apo-Form der cSrc-DM ist der Methionin-Türsteher nach außen gedreht (Pfeil).

Diese spezielle Konformation ist energetisch ungünstig, weshalb die IC_{50} -Werte der Türstehermutante höher sind, als in EGFR *wt* oder cSrc-SM (Kapitel 2.2.2.2). Da reversible Inhibitoren diese Konformation nicht permanent stabilisieren können, ist der Energieaufwand zur Bindung an die Scharnierregion höher als bei irreversiblen Inhibitoren, was sich auch in den Inhibitionswerten widerspiegelt. Die konformelle Änderung der Methionin-Seitenkette wurde auch in weiteren Proteinkristallstrukturen von anderen Arbeitsgruppen beobachtet oder postuliert.^{58,61,62} In Abbildung 18A wird die Proteinkristallstruktur von EGFR-T790M als Apo-Form überlagert mit EGFR *wt* im Komplex mit dem irreversiblen Inhibitor HKI-272 gezeigt. Die Kristallstruktur von EGFR-T790M im Komplex mit HKI-272 ist in Abbildung 18B abgebildet. Auch hier wird deutlich, dass der Inhibitor mit der raumeinnehmenden Aminosäure Methionin der EGFR-Apoform kollidiert. Der Inhibitor verschafft sich Platz, indem er die Seitenkette des Methionins in eine Position außerhalb der Bindungsregion drängt.

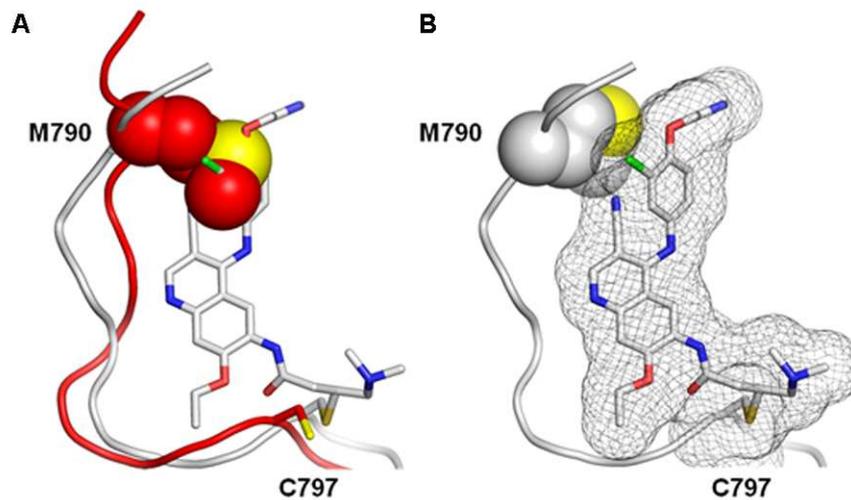


Abbildung 18: (A) Überlagerung von EGFR-T790M Apo-Form (rot) und EGFR-T790M im Komplex mit HKI-272 (grau, PDB-Eintrag 2JIT⁶¹). (B) EGFR-T790M im Komplex mit HKI-272 (PDB-Eintrag 2JIV⁶¹). Der Inhibitor stabilisiert wie in der cSrc-Kinase eine Konformation, in der das Methionin von der Bindungsregion weggedreht ist.

Allerdings wird in der Literatur diese sterische Hinderung nicht als Grund für die bei den reversiblen Inhibitoren beobachtete Wirkstoffresistenz gesehen. Vielmehr machen Yun *et al.*⁶¹ eine erhöhte Affinität zu ATP und die damit verbundene verstärkte Konkurrenz zwischen ATP und Inhibitor um die Bindung an die katalytische Domäne verantwortlich. Um diese kontroversen Ansichten zur Resistenzentwicklung näher zu beleuchten, wurden Aktivitätsstudien mit unterschiedlichen Mutanten durchgeführt (vergleiche Kapitel 2.2.2.5). Außerdem wurde ein Assaysystem entwickelt, mit dem der direkte Einfluss der Türsteher-Aminosäure auf die Affinität irreversibler Inhibitoren detektiert werden konnte (vergleiche Kapitel 2.2.2.7).

2.2.2.5 Katalytische Parameter der cSrc- und EGFR-Kinase

Entartete Zellproliferation entsteht häufig durch Mutationen, die die katalytische Aktivität von Enzymen erhöhen. Da auch Kinasen dieses Phänomen zeigen, wurden die Methionin-Türstehermutanten auf erhöhte Aktivität untersucht, da zum Zeitpunkt der Durchführung noch keine Ergebnisse hierzu veröffentlicht worden waren. Es wurden die Parameter K_m , k_{cat} und k_{cat}/K_m für die beiden Varianten EGFR *wt* und T790M sowie cSrc-SM und cSrc-DM bestimmt. Der K_m -Wert ist ein Maß für die Affinität eines Substrates an das Enzym. Die Wechselzahl k_{cat} beschreibt die Geschwindigkeitsrate, mit der im Falle von Kinasen die Phosphatgruppe übertragen wird. Beide Parameter sind für

den enzymatischen Umsatz ausschlaggebend, weshalb zur Charakterisierung eines Enzyms die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m angegeben wird.

<i>Kinase</i>	$K_m \text{ ATP} (\mu\text{M})$	$k_{cat} (\text{sec}^{-1})$	$k_{cat}/K_m (\text{sec}^{-1} * \mu\text{M}^{-1})$
cSrc-SM	25 ± 3	0,042	0,00184
cSrc-DM	$5 \pm 1,5$	0,272	0,05891
EGFR wt	$4 \pm 1,3$	0,251	6,85E-05
EGFR-T790M	$0,50 \pm 0,07$	0,051	1,34E-4

Tabelle 4: Katalytische Parameter von cSrc- und EGFR-Mutanten zur Untersuchung des Einflusses der Türstehermutation auf die Kinaseaktivität.

Die Affinität von ATP war bei beiden Türstehermutanten im Vergleich zu EGFR *wt* beziehungsweise cSrc-SM um ein Fünf- bis Siebenfaches erhöht. Die Geschwindigkeitskonstante k_{cat} war nur bei der cSrc-Kinase erhöht und bei der EGFR-Kinase erniedrigt. Die katalytische Effizienz k_{cat}/K_m war auch bei beiden Türstehermutanten erhöht, jedoch wesentlich stärker ausgeprägt bei der cSrc-Kinase. Außerdem konnte bestätigt werden, dass die Türstehermutation keinen sterisch bedingten negativen Einfluss auf die Bindungsaffinität von ATP hat, sondern dass die Türstehermutation die katalytische Aktivität der Kinase signifikant steigert. Ähnliche Beobachtung haben Azam *et al.*⁶⁶ für EGFR und andere Tyrosinkinase gemacht. Sie konnten zeigen, dass die sterisch anspruchsvolle Türstehermutante, meist Methionin oder Isoleucin, ein aus Aminosäuren bestehendes Rückgrat^{76,103-107} stabilisiert, die in direktem Kontakt miteinander stehen und den N- und C-terminalen Bereich der katalytischen Domäne verknüpfen. Dieses vorwiegend aus hydrophoben Aminosäuren bestehende Rückgrat (Leucin, Methionin, Phenylalanin und Histidin) begünstigt wiederum die Stabilisierung einer aktiven Kinasekonformation. Folglich kommt es zu einem erhöhten katalytischen Umsatz. Die verstärkte Aktivierung ist besonders ausgeprägt, wenn die T790M-Mutation in *cis* mit einer weiteren Aktivierungsmutation, zum Beispiel mit der L858R-Mutante und oder der Deletion E746/A750, einhergeht.^{108,109} Eine erhöhte Affinität von ATP in Anwesenheit einer zusätzlichen Aktivierungsmutation konnte auch in biochemischen Untersuchungen festgestellt werden. Die mit dem HTRF-Assay ermittelten K_m -Werte für EGFR-L858R ergaben $4,5 \pm 2,3 \mu\text{M}$ und für EGFR-L858R/T790M $0,86 \pm 0,31 \mu\text{M}$.

Mit den in Tabelle 4 dargestellten Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass es bei arzneistoffresistenten Mutanten zu einer Erhöhung der katalytischen Kinaseaktivität

kommt. Dieses trägt dazu bei, dass die Affinität von reversiblen Inhibitoren gegenüber den Türstehermutanten wesentlich vermindert ist.

2.2.2.6 Zeitabhängige Inhibition von irreversiblen Inhibitoren

Bislang wurde in der Arbeit die Inhibitionsstärke von irreversiblen Inhibitoren mittels IC_{50} -Messungen bestimmt. Da die Inhibition zeitabhängig erfolgt, musste eine Präinkubationszeit von einer Stunde eingehalten werden. Wie später gezeigt wird, lassen sich die Inhibitionseigenschaften dieser Verbindungen damit nur approximativ beschreiben. Um irreversible Inhibitoren nun genauer charakterisieren zu können, ist es unerlässlich, deren kinetischen Eigenschaften zu untersuchen. Dazu wurden verschiedene Inhibitionstests durchgeführt, welche im Folgenden detailliert beschrieben sind. Hierzu gehört die k_{inact}/K_i -Bestimmung nach Kitz *et al.*¹¹⁰, die Bestimmung von k_{inact} und K_i über zeitabhängige IC_{50} -Bestimmungen¹¹¹ sowie die Detektion der [Inhibitor-Enzym]-Komplexbildung mittels intrinsischer Fluoreszenz von irreversiblen Inhibitoren. Bevor auf die einzelnen Bestimmungsmethoden eingegangen wird, soll zunächst die Bindungskinetik irreversibler Inhibitoren genauer erläutert werden.

Bindungskinetik irreversibler Inhibitoren

Irreversible Inhibitoren folgen einem zeitabhängigen Bindungsmechanismus, der in zwei Stufen abläuft. Die Inhibition beginnt mit einer reversiblen Anlagerung des Liganden über Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Wechselwirkungen an die Bindungstasche des Enzyms (Komplex $[EI]_a$). Befindet sich die reaktive Gruppe des Inhibitors in einer geometrisch günstigen Lage zu einem reaktiven Aminosäurerest, erfolgt die Ausbildung der kovalenten Bindung (Komplex $[EI]_i$), die gleichzeitig der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist.

Aufgrund der irreversiblen Komplexbildung von Inhibitor (I) und Enzym (E) werden beide Spezies dem Fließgleichgewicht entzogen. Dadurch sinkt die Konzentration an aktivem Enzym stetig. Der Vorgang folgt einer Reaktion zweiter Ordnung (k repräsentiert die Geschwindigkeitskonstante der irreversiblen Komplexbildung).

$$v = -\frac{d[EI]}{dt} = -\frac{d[E]}{dt} = -\frac{d[I]}{dt} = k_{+1} * [E] * [I] \quad (1)$$

Liegt der Inhibitor wie in vielen Assaysystemen im Überschuss vor, erfolgt die Komplexbildung nach Reaktion pseudo-erster Ordnung und ist damit nur noch von der Enzymkonzentration (E) und der Geschwindigkeitskonstanten abhängig.

$$v = -\frac{d[E]}{dt} = k_{+1} * [I] * [E] = k_{+1}' * [E] \quad (2)$$

Inhibitor-Enzym-Komplexbildung

Für irreversible Inhibitoren kann die Geschwindigkeit (v) der Inhibitor-Enzym-Komplexbildung in Abhängigkeit der Zeit (t) anhand folgender Gleichung beschrieben werden:

$$v = e^{-k_{obs} * t} \quad (3)$$

Im Gegensatz zu k_{inact} , mit der die maximale Geschwindigkeitsrate ausgedrückt wird, beschreibt k_{obs} die Geschwindigkeitsrate der $[EI]_i$ -Komplexbildung für eine gegebene Inhibitorkonzentration. k_{obs} setzt sich zusammen aus:

$$k_{obs} = \left(\frac{k_{inact}}{1 + \frac{K_i}{[I]}} \right) \quad (4)$$

Ersetzt man in Gleichung (3) die Geschwindigkeit (v) gegen den Anteil an aktivem Enzym $[E]_a/[E]_0$, lautet die Formel:

$$\frac{[E]_a}{[E]_0} = \exp\left(-\frac{k_{inact} t}{1 + \frac{K_i}{[I]}}\right) \quad (5)$$

Bei semi-logarithmischer Auftragung ergibt sich eine lineare Abhängigkeit von der Konzentration an aktivem Enzym und dem Term $[(k_{inact})/(1+K_i/[I])]$.

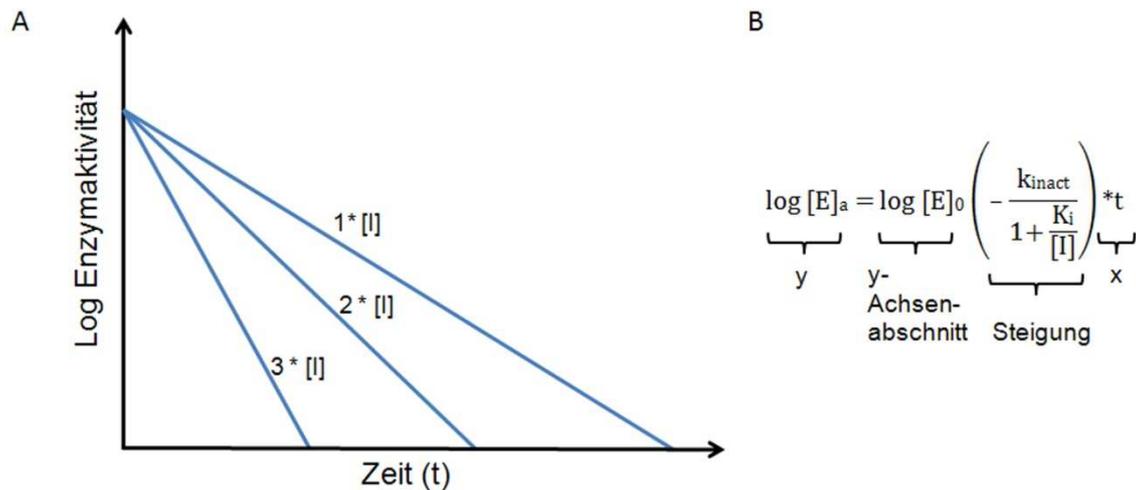


Abbildung 19: Grafische Darstellung (A) der logarithmischen Form der Gleichung 5 (B) zur Bestimmung von k_{inact} .

Die Gleichung (3) dient als Grundlage für die Detektion von irreversiblen Inhibitoren mit dem fluoreszenzbasierten Chinazolin-Assay (Kapitel 2.2.2.7). Aus der Formel ist zu entnehmen, dass für die irreversible Bindung die reversible Affinitätskonstante K_i und die Inhibitorkonzentration ebenso entscheidend sind wie die Geschwindigkeitskonstante (k_{inact}) und die Zeit (t).

Bestimmung der inhibitorischen Potenz

Methodenentwicklungen zur Charakterisierung von irreversiblen Inhibitoren wurden intensiv für Toxizitätsstudien bei Cytochrom P₄₅₀-Enzymen durchgeführt.^{112,113} Kitz *et al.*¹¹⁰ haben hierfür die inhibitorische Potenz (K_i/k_{inact}) eingeführt, welche über die reversible Affinitätskonstante K_i und die Geschwindigkeitsrate k_{inact} ermittelt werden kann, indem diese ins Verhältnis zueinander gesetzt werden. Äquivalent der katalytischen Effizienz (k_{cat}/K_m) einer enzymkatalysierten Reaktion verwendet man die inhibitorische Potenz (k_{inact}/K_i) zur Einordnung der Effizienz von irreversiblen Inhibitoren.¹¹⁴ Zur Bestimmung von k_{inact} und K_i wird zunächst k_{obs} für verschiedene Inhibitorkonzentrationen mit der Gleichung [$v = e^{(-k_{obs} * t)}$] bestimmt. Trägt man anschließend k_{obs} gegen die dazu gehörende Inhibitorkonzentration auf, so ergibt sich eine hyperbole Kurve, deren maximaler y-Achsenabschnitt k_{inact} darstellt. K_i wird durch die Inhibitorkonzentration bei $k_{inact}/2$ bestimmt (Abbildung 20).

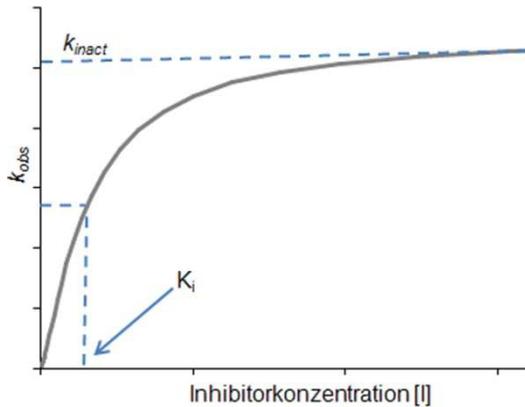


Abbildung 20: Grafische Bestimmung der inhibitorischen Potenz mithilfe von K_i und k_{inact} .

Diese Methode wurde intensiv mit dem Omnia[®]-Assay untersucht. Durch die starke Eigenfluoreszenz einiger irreversibler Inhibitoren war eine Auswertung nicht möglich.

Bestimmung von k_{inact} und K_i über zeitabhängige IC_{50} -Werte

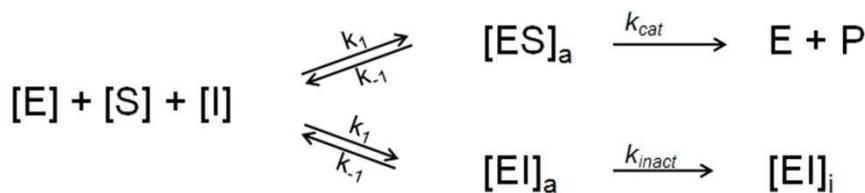


Abbildung 21: Reaktionsschema der Produktformation einer enzymkatalysierten Reaktion in Anwesenheit eines irreversiblen Inhibitors.

Abbildung 21 zeigt das Reaktionsschema zur Inhibition der Produktformation mit irreversiblen Inhibitoren. Das Enzym [E] und das Substrat [S] haben eine spezifische Affinität zueinander und bilden einen [Enzym-Substrat]-Komplex $[ES]_a$. Dieser Vorgang ist reversibel und wird durch die Gleichgewichtskonstante K_m beschrieben. Aus dem $[ES]_a$ -Komplex entstehen anschließend mit der Geschwindigkeit k_{cat} das Produkt (P) und das Enzym $[E]_a$, das für den nächsten Katalysezyklus zur Verfügung steht. In Anwesenheit eines irreversiblen Inhibitors bildet sich nun parallel dazu ein Enzym-Inhibitor-Komplex $[EI]_a$. Die Affinität von Enzym und Inhibitor [I] dieser reversiblen Komplexformation wird durch die Geschwindigkeitskonstante K_i bestimmt. Die Geschwindigkeit der nachfolgenden irreversiblen Inaktivierung des Enzyms durch den Inhibitor wird mithilfe von k_{inact} ausgedrückt.

Die Geschwindigkeit der Produktbildung (V_0) wird nach Michaelis-Menten mit folgender Gleichung beschrieben:

$$V_0(t) = \frac{d}{dt} P_0(t) = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (6)$$

P_0 = Produkt

V_{\max} = maximale Geschwindigkeit

S = Substrat

Durch die zeitabhängige Inaktivierung des Enzyms lautet die Gleichung in Anwesenheit von irreversiblen Inhibitoren (I):

$$V_i(t) = \frac{d}{dt} P_i(t) = \frac{V_{\max}(t) \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (7)$$

P_i = Produktinhibition

Aufgrund der zeitabhängigen Verringerung der totalen Enzymkonzentration nimmt auch die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} mit der Zeit ab, da $V_{\max}(t) = k_{inact} * [E] * (t)$ ist.

Unter Betrachtung der Inhibitions Gleichung nach Cheng und Prusoff¹¹⁵

$$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) \quad (8)$$

sowie der Michaelis-Menten-Gleichung unter Berücksichtigung irreversibler Inhibitoren kann der IC_{50} -Wert auch folgendermaßen ausgedrückt werden:¹¹⁶

$$IC_{50}(t) = \left(\frac{K_i}{k_{inact} * t}\right) \left(1 + \frac{[S]}{K_m}\right) * 0,693 \quad (9)$$

Somit gehen sowohl die zeitliche Änderung von V_{\max} als auch die reversible Inhibitionskonstante (K_i) und die Inhibitorkonzentration mit in die Gleichung ein. V_{\max} ist in diesem Fall zeitabhängig, da er von dem Anteil an aktivem Enzym (E_{cat}) abhängig ist ($V_{\max} = k_{cat} * E_{cat}$), das sukzessive dem Reaktionsgleichgewicht entzogen wird.

Abbildung 22 zeigt experimentell bestimmte IC_{50} -Werte dreier irreversibler Inhibitoren in Abhängigkeit der Inkubationszeit. Nach zweistündiger Inkubation zeigen allen Inhibitoren deutlich erniedrigte IC_{50} -Werte. Dieses Verfahren lieferte aber beim Test mehrerer Inhibitoren nur schlecht reproduzierbare Werte, sodass auch diese Methode nicht für die Charakterisierung irreversibler Inhibitoren verwendet werden konnte.

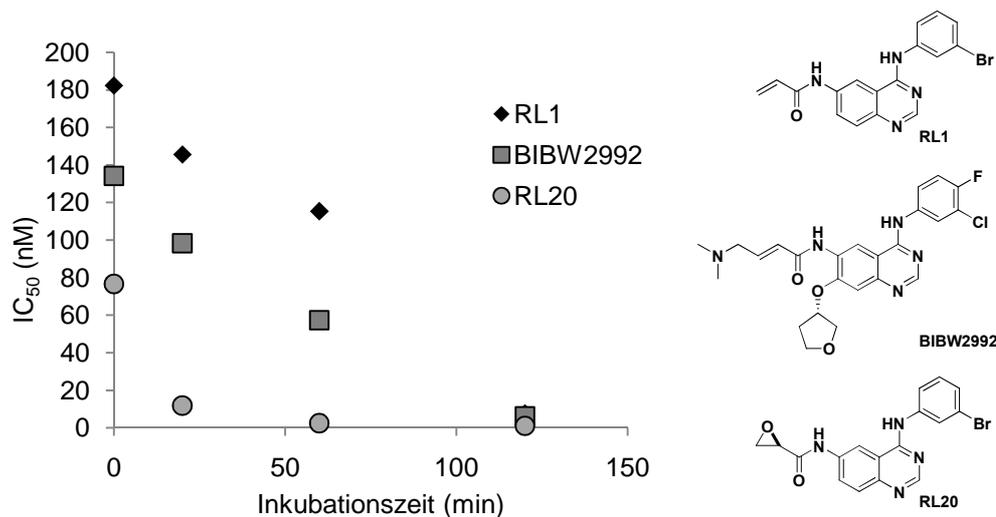


Abbildung 22: Zeitabhängige Inhibition der cSrc-SM mit irreversiblen Inhibitoren. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen.

Erfolgreich zur Charakterisierung irreversibler Inhibitoren war hingegen die direkte Messung der Inhibitor-Kinase-Komplexformierung, die in Kapitel 2.2.2.7 ausführlich beschrieben wird. Als Anmerkung sei an dieser Stelle gesagt, dass kinetisch betrachtet die in Kapitel 2.2.2.3 aufgeführten IC₅₀-Bestimmungen theoretisch nicht korrekt sind, da die Langmuirsche Adsorptionsisotherme, die als Basis für IC₅₀-Bestimmungen dient, ein Fließgleichgewicht zweier Reaktanden voraussetzt, welches bei irreversibler Bindung von Inhibitoren an ein Protein nicht vorhanden ist. Jedoch werden diese in der Praxis als hilfreiches Instrument zur Charakterisierung irreversibler Inhibitoren eingesetzt. Dabei sind allerdings zwei wesentliche Dinge zu berücksichtigen. Zum einen sollte man Inhibitoren nur vergleichen, wenn gleiche Inkubationszeiten sowie identische Enzym- und Substratkonzentrationen verwendet wurden. Zum anderen lassen sich bei sehr potenten Inhibitoren im picomolaren Bereich keine sigmoidalen Kurven nach Klotz¹¹⁷ generieren, da es zu einer reinen, auf Enzymaktivität basierenden Titration der Kinase kommt (Abbildung 23).

Titration der enzymatisch aktiven Kinase (active site titration)

Theoretisch genügt ein einziges potentes irreversibles Inhibitormolekül, um ein Enzymmolekül dauerhaft zu inaktivieren. Titriert man das Enzym mit solch einem Inhibitor, so sollte sich die Konzentration an aktivem Enzym aus dem Lot des Schnittpunktes der Tangenten einer Enzymtitration ergeben, bei der die Enzymaktivität gegen die InhibitorKonzentration aufgetragen ist (Abbildung 23).

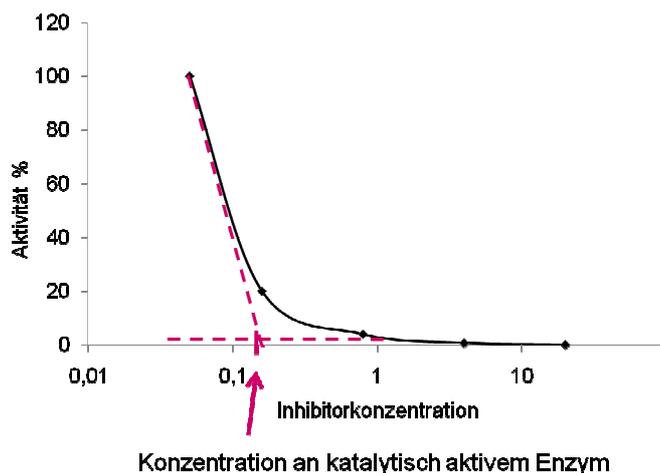


Abbildung 23: Diagramm einer typischen Enzymtitration mit einem irreversiblen Inhibitor zur Bestimmung der Konzentration an katalytisch aktivem Enzym.

In der Praxis lässt sich diese Titration auch mit potenten reversiblen Inhibitoren durchführen, da der so erhaltene IC_{50} -Wert direkt von der Enzymkonzentration $[E]$ abhängig ist.

$$IC_{50} = \frac{1}{2} [E] * K_i \quad (10)$$

Zur Bestimmung der Wechselzahl k_{cat} wurde der Gehalt an aktiver Kinase mit der beschriebenen Enzymtitrationen durchgeführt (Kapitel 2.2.2.5).

2.2.2.7 Assayentwicklung zur Charakterisierung von irreversiblen Inhibitoren

In Kapitel 2.2.2.6 wurde beschrieben, dass die auf der Langmuirschen Adsorptionsisotherme basierende IC_{50} -Bestimmung als Maß der Inhibitionsstärke zur Charakterisierung von Liganden dient. Dies setzt allerdings voraus, dass ein Gleichgewicht zwischen freiem Ligand und dem Ligand-Protein-Komplex vorliegt, was jedoch bei einem kovalenten Inhibitor nicht der Fall ist. Somit ist die IC_{50} -Bestimmung für irreversible Inhibitoren nur bedingt anwendbar. Bei sehr starken Inhibitoren lässt sich keine Dosiswirkungskurve ableiten, da die Inhibitionsmessung eher einer Titrationskurve entspricht, welche mit der Inaktivierung der Kinase einhergeht. Somit ist die Sensitivität der Messung stark herabgesetzt. Aus diesem Grund lassen sich genaue IC_{50} -Werte für irreversible Inhibitoren mittels aktivitätsbasierter Assaysysteme nur schwer bestimmen. Eine bessere Beurteilung der Inhibitionsstärke würden hingegen kinetische Untersuchungen liefern. Kitz und Wilson haben die Bestimmung der inhibitorischen Potenz

eingeführt, die äquivalent zur katalytischen Effizienz k_{cat}/K_m ist (siehe Kapitel 2.2.2.6).¹¹⁸ Des Weiteren haben Maurer *et al.*¹¹⁶ und Krippendorf *et al.*¹¹¹ gezeigt, dass sich K_i und k_{inact} über IC_{50} -Bestimmungen bei verschiedenen Inkubationszeiten ermitteln lassen. Diese Untersuchungen sind zwar kinetisch betrachtet interessant, aber sehr aufwendig und oft ungenau, da sehr viele Faktoren in die Berechnungen einfließen, die fehlerbehaftet sein können. Außerdem werden für diese Studien idealerweise „*real-time*“-Assaysysteme benötigt. Systeme speziell für Kinasen wie der Omnia[®]-Assay^{119,120} oder der gekoppelte NAD^+ / $NADH$ -Pyruvatkinaseassay¹²¹ sind kommerziell erhältlich. Beide wurden für die cSrc-Kinase getestet, allerdings zeigen sie aufgrund von starker Eigenfluoreszenz der Chinazolinderivate erhebliche Interferenzen, die die Systeme nicht kompensieren konnten.

Auf der Suche nach einem robusten, sensitiven und kostengünstigen Detektionssystem zur Charakterisierung irreversibler Inhibitoren wurde ein Assay entwickelt, mit dem die Inhibition von irreversiblen Inhibitoren mittels intrinsischer Fluoreszenz von Chinazolinderivaten gemessen wird. Weiterhin gibt dieses System Aufschluss über den sterischen Einfluss der Türstehermutation, die zur Wirkstoffresistenz führt.

Aufbau des Assaysystems zur Detektion irreversibler Inhibitoren

Chinazoline weisen aufgrund des starren konjugierten aromatischen Doppelringssystems eine starke Eigenfluoreszenz auf.^{122,123} In Tabelle 5 sind alle Verbindungen aufgeführt, die zur Entwicklung des Assaysystems und zur Untersuchung der Inhibitorreaktivität genutzt wurden. Sie bestehen aus einem Chinazolin- oder Chinolingerüst (RL23) und verfügen über unterschiedliche reaktive Gruppen in der 6-Position der Grundgerüste. Erlotinib sowie RL6 und RL7 sind die reversiblen Analoga zu RL1 und RL3 und wurden als Negativkontrollen eingesetzt.

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X	Y
RL1		H	Br	H	N	N
RL23		H	Br	H	H	N
RL6		H	Br	H	N	N
Erlotinib				H	N	N
RL3		H	Br	H	N	N
RL7		H	Br	H	N	N
BIBW2992			Cl	F	N	N
RL26		H	Br	H	N	
RL11		H	Br	H	N	N
RL14		H	Br	H	H	N
RL13		H	Br	H	H	N
RL20		H	Br	H	H	N

Tabelle 5: Chemische Strukturen aller Verbindungen, die für die Etablierung des Assays und zur Untersuchung der Reaktivität unterschiedlicher irreversibler Verbindungen genutzt wurden.

Das Assayprinzip ist in Abbildung 24 dargestellt und beruht auf der intrinsischen Fluoreszenzänderung durch die Ausbildung einer kovalenten Bindung zum reaktiven Cystein in der ATP-Bindungstasche der Kinase. Da sich dieses Cystein in einer elektropositiven Umgebung am Anfang einer α -Helix befindet, wird dessen Thiolgruppe negativ polarisiert und ist besonders reaktiv gegenüber Michael-Akzeptoren.⁸⁰ Dies führt zu einer starken Erhöhung der Reaktivität gegenüber Elektronenakzeptoren, wie sie bei irreversiblen EGFR-Inhibitoren zu finden sind. Bringt man nun Kinase und Inhibitor zusammen, erfolgt zunächst eine reversible Interaktion mit dem Protein, die durch die Geschwindigkeitskonstanten der Hin- (k_{+1}) und Rückreaktion (k_{-1}) bestimmt wird. Liegt

der Inhibitor in der ATP-Bindungstasche geometrisch passend vor, bildet er eine kovalente Bindung zur Thiolgruppe des Cysteins aus. Dies führt zu einer hyperchromen Verschiebung des Fluoreszenzspektrums, die nur bei der Bindung von irreversiblen Inhibitoren zu beobachten ist. Vermisst man reversible Analoga, bleibt die Fluoreszenzänderung aus.

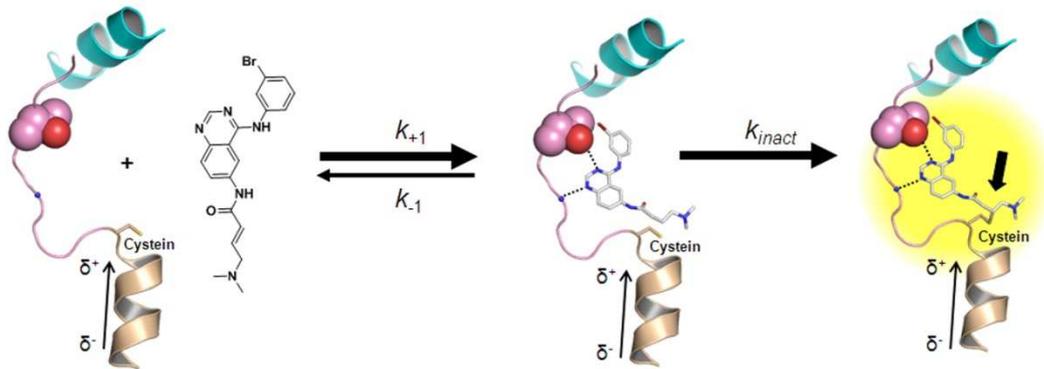


Abbildung 24: Schematische Darstellung des Assaysystems zur Detektion irreversibler Inhibitoren. Bei der Zusammenführung von Kinase und Inhibitor kommt es zunächst zur reversiblen Anlagerung des Inhibitors an die Kinase. Im zweiten Schritt wird die kovalente Bindung zum reaktiven Cystein ausgebildet, welches sich am Eingang der ATP-Bindungstasche befindet. Dieses induziert eine Fluoreszenzänderung, die fluorimetrisch erfasst werden kann.

Validierung des Assaysystems

In Abbildung 25 sind die typischen Emissionsspektren reversibler und irreversibler Inhibitoren in An- und Abwesenheit der zu untersuchenden Kinase dargestellt. Alle Kurvenverläufe weisen ein Maximum im Bereich von 420 nm und eine langsam abflachende Schulter im Bereich von 450-470 nm auf. Die Spektren der Inhibitoren sind praktisch identisch mit Ausnahme des für die Detektion entscheidenden Spektrums des irreversiblen Inhibitors in Kombination mit der Kinase. Dieses ist über den gesamten Spektralbereich leicht hyperchrom verschoben.

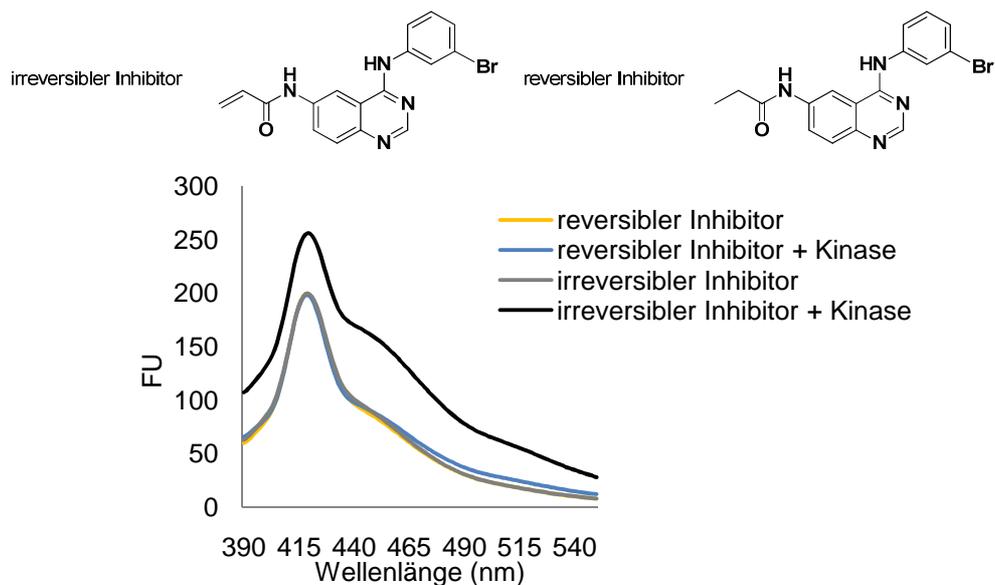


Abbildung 25: Emissionsspektrum von reversiblen und irreversiblen Inhibitoren in An- und Abwesenheit von Kinase. Nur der irreversible Inhibitor zeigt in Anwesenheit der zu modifizierenden Kinase eine Fluoreszenzänderung (schwarz).

Neben der Validierung der optimalen Emissionswellenlänge wurde auch das Anregungsspektrum der Chinazolinverbindungen untersucht, um sicherzustellen, dass alle Inhibitoren im jeweiligen optimalen UV-Bereich gemessen wurden. Abbildung 26 zeigt die UV-Spektren einzelner Inhibitoren in Anwesenheit von 1 μM Kinase. Außer RL14 und RL11, die generell eine stärkere Anregung zeigen, weisen alle Spektren einen ähnlichen Kurvenverlauf auf. Alle Verbindungen haben ein Maximum bei 300 und 365 nm. Die Vermessung ließ sich unter Verwendung beider Anregungswellenlängen durchführen. Für alle aufgeführten Versuche wurde letztere verwendet.

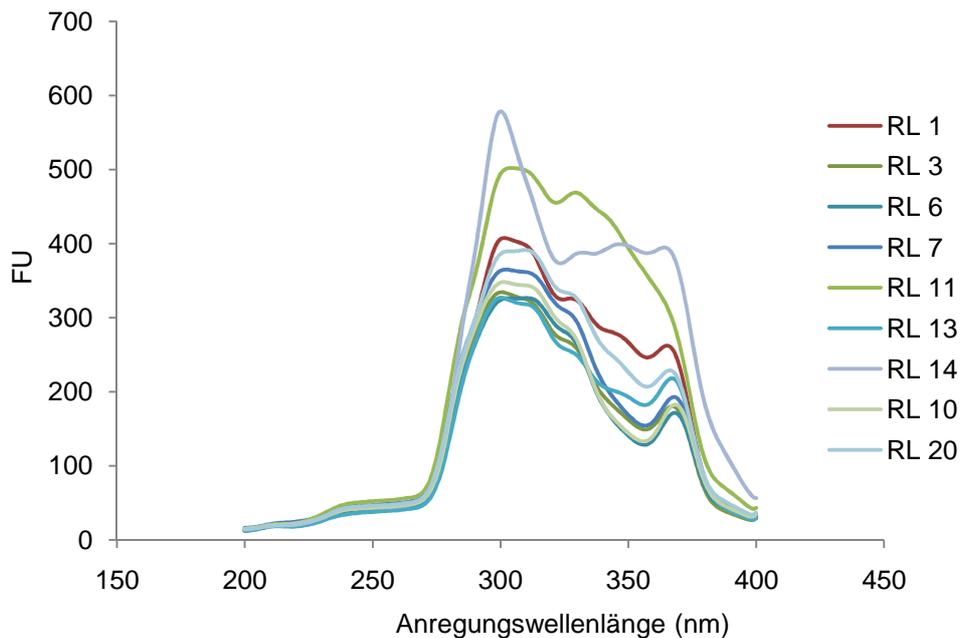


Abbildung 26: Anregungsspektren von Chinazolinverbindungen in Anwesenheit von cSrc-SM. Alle Verbindungen zeigen Maxima bei 300 und 365 nm.

Misst man die zeitabhängige Fluoreszenzänderung im Fluoreszenzmaximum, ergibt sich ein Kurvenverlauf, wie in Abbildung 27 dargestellt. Hier wird der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzänderung mit der cSrc-SM und unterschiedlichen Inhibitoren untersucht. RL1 und RL3 sind irreversible EGFR-Inhibitoren, deren maximale Fluoreszenzintensität nach 40 min beziehungsweise nach 60 min erreicht sind. Die reversiblen EGFR-Inhibitoren Erlotinib, RL6 und RL7 zeigen keine Fluoreszenzänderung. Im Maximum des Kurvenverlaufs kann man davon ausgehen, dass alle Inhibitormoleküle umgesetzt und eine kovalente Bindung mit der Kinase eingegangen sind. Da die Kinase im Überschuss vorliegt, wird gewährleistet, dass nur ein Teil modifiziert wird und Mehrfachmodifikationen nicht stattfinden.

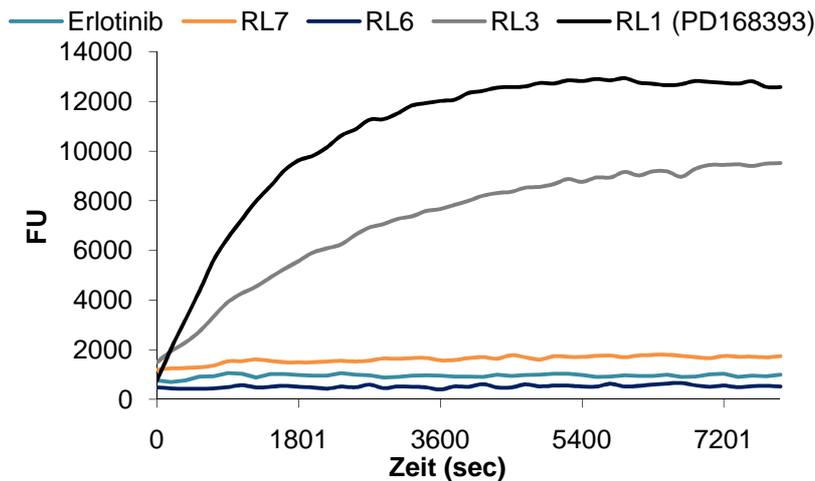


Abbildung 27: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität verschiedener reversibler und irreversibler Inhibitoren, die bei einer Emissionswellenlänge von 420 nm gemessen wurden. Erlotinib, RL6 und RL7 sind reversible EGFR-Inhibitoren, RL1 ist das irreversible Analogon zu RL7 und RL3 ist das Analogon zu RL6.

Nachdem die optimalen Anregungs- und Emissionswellenlängen gefunden worden waren, wurde untersucht, ob die Steigung der in Abbildung 27 dargestellten Kurven einer Inhibitor- und Kinasekonzentrationsabhängigkeit unterliegt. Dies ist die Voraussetzung zur kinetischen Untersuchung irreversibler Inhibitoren mit diesem System. Abbildung 28 zeigt den zeitlichen Verlauf der kovalenten Inhibitor-Kinase-Komplexbildung mit der Verbindung RL1 bei unterschiedlichen Kinasekonzentrationen. Das Verhältnis von Kinase zu Inhibitor war 1:1,5. Die Negativkontrolle für den Versuch enthielt den Inhibitor ohne Zusatz von Kinase und wurde bereits von den Rohdaten abgezogen. Die Steigungen der Kurven sind direkt proportional zur Kinasekonzentration. Konzentrationen unterhalb von $0,25 \mu\text{M}$ konnten nicht mehr detektiert werden; bei allen weiteren Untersuchungen wurde daher eine Kinasekonzentration von $0,5 \mu\text{M}$ eingesetzt.

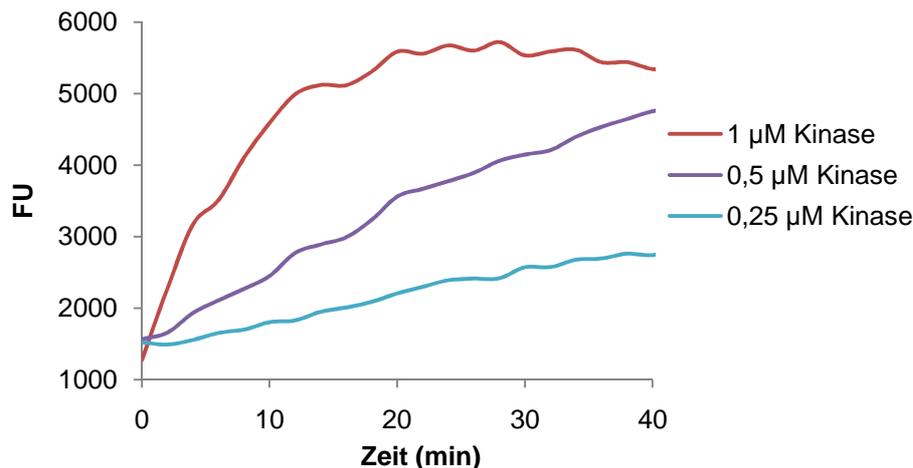


Abbildung 28: Messung der irreversiblen Komplexbildung von Kinase und RL1 bei unterschiedlichen Kinasekonzentrationen.

Bei der angepassten Kinasekonzentration von $0,5 \mu\text{M}$ wurde dann der detektierbare Konzentrationsbereich des Inhibitors ermittelt. Die Fluoreszenzintensität ist dabei von der Anzahl der angeregten Moleküle abhängig.



A^* = Anzahl der angeregten Moleküle

k = Geschwindigkeitskonstante der Strahlungsdeaktivierung durch Fluoreszenz

$I_F(t)$ = Fluoreszenzintensität pro Zeit

Abbildung 29 zeigt die Komplexbildungskurve bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen von RL1. Die Hintergrundfluoreszenz (Inhibitor ohne Protein) wurde jeweils von den Rohdaten subtrahiert. Im Konzentrationsbereich von $0,4$ - $12,5 \mu\text{M}$ ist die Steigung der Kurve direkt proportional zur Inhibitorkonzentration; jedoch enden die Plateaus der einzelnen Kurven auf unterschiedlichen Ebenen. Dies resultiert zum einen aus der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Konzentration des fluoreszierenden Inhibitors. Zum anderen ist nicht auszuschließen, dass es bei hohen Inhibitorkonzentrationen zu einer unspezifischen Bindung des Inhibitors an andere an der Proteinoberfläche assoziierte Cysteine kommt. Allerdings konnte zumindest bei niedrigen Konzentrationen massenspektrometrisch nachgewiesen werden, dass die Kinase nur einfach modifiziert vorlag (Kapitel 2.2.2.2). Außerdem ist bekannt, dass in der Regel nur wenige Cysteine an der Oberfläche von Proteinen lokalisiert sind, da sie eine hohe Reaktivität gegenüber verschiedenen chemischen Verbindungen aufweisen.¹²⁴

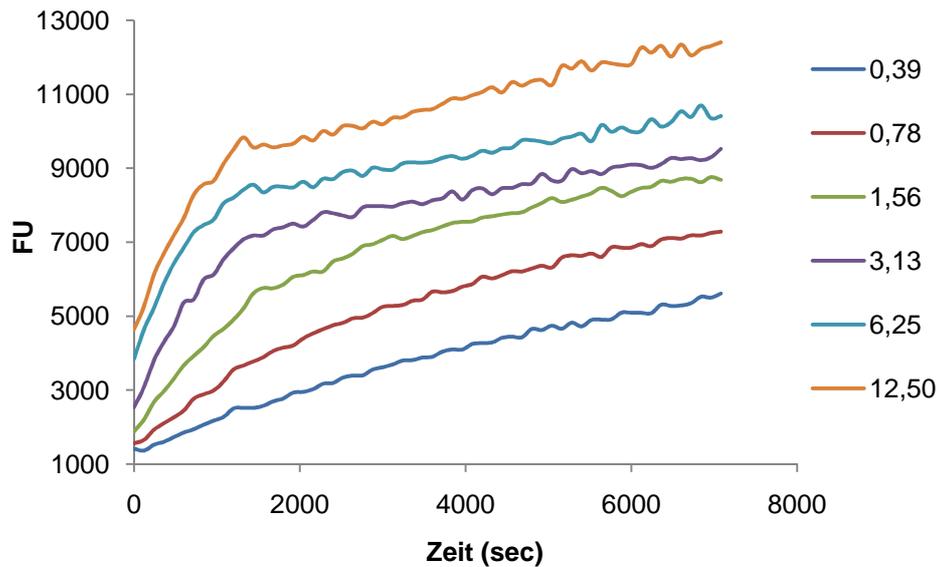


Abbildung 29: Messung der irreversiblen Bindung von RL1 an cSrc-SM in Abhängigkeit verschiedener Inhibitorkonzentrationen (μM).

Bestimmung der Reaktivität von irreversiblen Kinaseinhibitoren

Um irreversible Inhibitoren nach ihrer Reaktivität zu klassifizieren, wurde ein robuster Parameter gesucht, mit dem man präzise Aussagen zur Reaktivität machen kann. Es wurde zunächst versucht, die Parameter k_{inact} und K_i über die Steigung der jeweiligen Inhibitor-Kinase-Formierungskurven bei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen zu berechnen (siehe Kapitel 2.2.2.6). Für die Bestimmung eignet sich die Titration des Inhibitors mit diesem System nicht, da keine sinnvollen Werte für k_{inact} und K_i erhalten werden konnten. Daraufhin wurde eine Methode entwickelt, die mit der Messung der Komplexbildung bei nur einer Inhibitorkonzentration auskommt. Diese ist schnell und unkompliziert durchführbar und wird im Folgenden dargestellt. Hierbei wird die Steigung der initialen Geschwindigkeit der Komplexbildung bei einer einzelnen Inhibitorkonzentration bestimmt. Die Auswertung der Bindungskurven verläuft dabei über drei Schritte: Zunächst wird zu jedem bestimmten Zeitpunkt das Hintergrundsignal, also die Fluoreszenzintensität des Inhibitors ohne Zusatz des Enzyms, subtrahiert. Dann wird jeder Punkt der Kurve ins Verhältnis zum Plateau gesetzt, das auf 100 % normiert wurde. Somit umgeht man Abweichungen durch unterschiedliche spektrometrische Eigenschaften. Zuletzt bestimmt man die Steigung des Initialanstieges der Kurve. Da in jedem Experiment gleiche Inhibitor- und Kinasekonzentrationen verwendet wurden, ist die berechnete Geschwindigkeit abhängig von der maximalen Geschwindigkeitsrate k_{inact} und dem K_i -Wert. Somit lassen sich zum einen die irreversiblen Inhibitoren nach Bindungsreaktivität klassifizieren, zum anderen kann man Aussagen

zur Reaktivität mit verschiedenen Kinasemutanten treffen. Diese Methode der Quantifizierung wurde sowohl mit der cSrc-SM als auch mit der wirkstoffresistenten Variante cSrc-DM durchgeführt. Abbildung 30 stellt initiale Geschwindigkeiten einer Reihe von irreversiblen Inhibitoren dar, die sich vornehmlich in der Beschaffenheit des an 6-Position geknüpften Michael-Akzeptors unterscheiden. Je höher die Geschwindigkeitsrate, desto potenter ist der Inhibitor. Auffallend ist, dass die Reaktivitäten aller Inhibitoren bei der wirkstoffresistenten cSrc-DM (blaue Balken) im Vergleich zur cSrc-SM (graue Balken) signifikant kleiner sind.

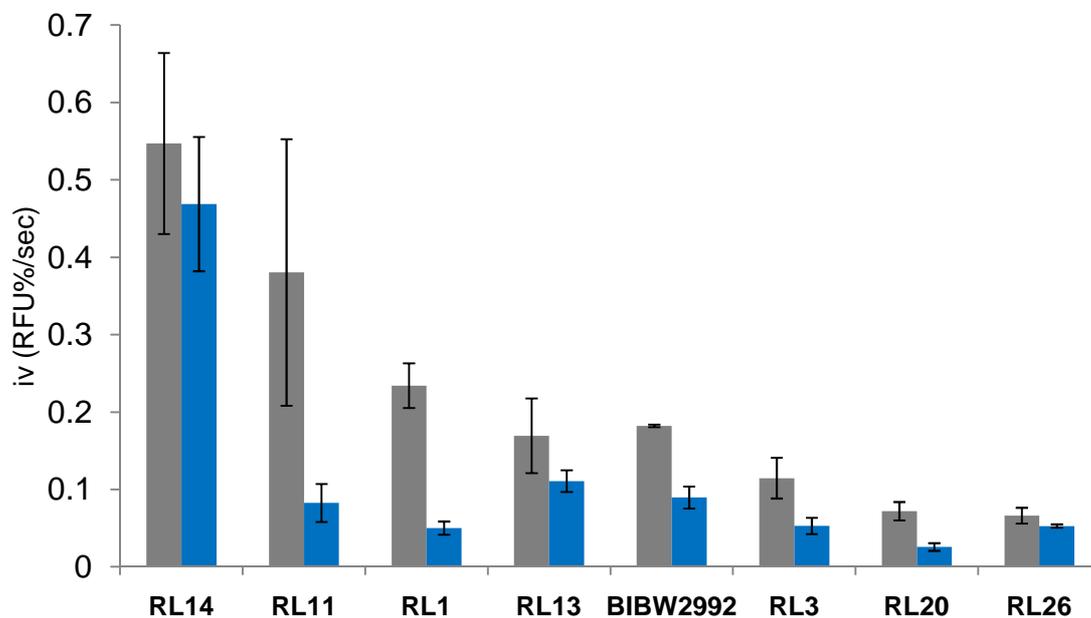


Abbildung 30: Werte für die initialen Reaktionsgeschwindigkeiten (iv) verschiedener irreversibler Chinazolininhibitoren gegenüber der cSrc-SM (grau) und der cSrc-DM (blau).

Wie beschrieben, trägt die cSrc-DM eine T338M-Mutation, bei der die sterisch anspruchsvolle Methioninseitenkette den Zugang zum hydrophoben Bereich oberhalb des Türsteherrestes in der ATP-Bindungstasche erschwert. Außerdem verschwindet mit der Methioninmutation eine wichtige mögliche Interaktion über eine Wasserstoffbrückenbindung vom N3 des Chinazolins zum ursprünglichen Threonin. Somit können diese Inhibitoren nur noch schwach binden. Irreversible Inhibitoren sind allerdings in der Lage, diese Hindernisse zu umgehen, indem sie eine Konformation stabilisieren, in der die Methioninseitenkette von der hydrophoben Tasche weggedreht ist. Manche irreversiblen Inhibitoren nehmen auch eine Konformation ein, in der sie eine sterische Kollision

mit dem Türsteherrest unter Verlust der Wasserstoffbrückenbindung zu M338 verhindern. Der potenteste Inhibitor ist RL14, welcher eine Acrylsulfonamid-Gruppe als Elektrophil besitzt. Die Verbindung zeigt den geringsten Aktivitätsverlust gegenüber der wirkstoffresistenten Variante. Der Trifluoropentenylamid enthaltende Inhibitor RL11 ist ebenfalls sehr potent in der cSrc-SM, jedoch wesentlich weniger potent in der cSrc-DM. RL1, RL13 und BIBW2992 haben ungefähr das gleiche Reaktivitätsprofil. Am schwächsten bindet RL26, der durch die zusätzliche Nitrilgruppe in der 3-Position des Chinazolinrings ein angelagertes Wassermolekül imitiert. Diese Verbindung zeigt allerdings einen sehr geringen Reaktivitätsverlust gegenüber der cSrc-DM. Möglicherweise stabilisiert die Nitrilgruppe den Bindungsmodus des Inhibitors, indem er den Verlust der Wasserstoffbrückenbindung zu M338 ausgleicht.

In einer weiteren Untersuchung wurden die experimentell bestimmten initialen Geschwindigkeiten mit IC_{50} -Werten und berechneten Bindungsenthalpien* verglichen. Die Berechnung der Enthalpie beruht auf der Publikation von Oballa *et al.*,¹²⁵ bei der nur die Reaktionsenthalpie betrachtet wird, die bei der Bindung einer Thiolgruppe an die mit verschiedenen Michael-Akzeptoren substituierten Chinazoline frei wird. Je niedriger die Werte, desto reaktiver ist das Elektrophil. Die räumliche Umgebung des Inhibitors in der Bindungstasche wird hingegen nicht berücksichtigt. Aus diesem Grund korrelieren die Enthalpie-Werte nur geringfügig mit den initialen Geschwindigkeiten. Die positive Enthalpie bei der Bindung von RL13 resultiert aus der Dissoziation des freigesetzten Chloridions in Wasser, was in die Berechnung miteinbezogen wurde. Wesentlich bessere Übereinstimmungen findet man hingegen beim Vergleich der initialen Geschwindigkeiten mit den korrespondierenden IC_{50} -Werten. Bei beiden Methoden beeinflussen sowohl die Geometrie des Inhibitors zum reaktiven Cystein als auch die dreidimensionale Gestalt der ATP-Bindungstasche das Ergebnis. Dies bedeutet, dass mit dem oben aufgeführten System eine valide Aussage über die Tendenz eines Inhibitors gemacht werden kann, einen irreversiblen Inhibitor-Kinase-Komplex zu bilden.

Auffällig ist die Diskrepanz zwischen der berechneten Bindungsenthalpie und dem Wert der initialen Geschwindigkeit des irreversiblen Inhibitors RL20 (Tabelle 6). Dieses Phänomen kann mithilfe des HSAB-Prinzips nach Pearson erklärt werden.¹²⁶ Demnach ist das Epoxid, welches bei RL20 als Elektrophil agiert, eine harte Lewis-Säure und bildet stärkere Komplexe mit harten Basen als mit weichen Basen wie der Thiolgruppe eines Cysteins. Weichere Elektrophile wie das Acrylamid oder das Acryl-

* Die Bindungsenthalpien wurden von Mitarbeitern unseres Kollaborationspartners MSD bestimmt.

sulfonamid reagieren hingegen viel besser mit der Cysteinseitenkette, wie in Abbildung 30 und Tabelle 6 zu sehen ist.

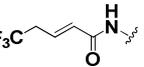
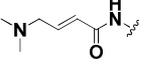
Nr.	Elektrophil	ΔH (kcal/mol)	iv (RFU%/sec)	IC ₅₀ (nM) (t = 90min)
RL20		-30,2	0,072 ± 0,010	1831 ± 1184
RL14		-16,9	0,547 ± 0,168	2 ± 0,9
RL1		-13,6	0,234 ± 0,029	115 ± 51
RL11		-11,9	0,380 ± 0,172	30 ± 12
RL3		-7,7	0,115 ± 0,026	236 ± 37
RL13		0,96	0,169 ± 0,048	653 ± 231

Tabelle 6: Vergleich von berechneten Reaktionsenthalpien (ΔH) mit biochemisch ermittelten Initialgeschwindigkeiten der Inhibitor-Komplex-Bildung und IC₅₀-Werten.

In Kapitel 2.2.2.5 wurden bereits die beiden kontroversen Ansichten zur Arzneistoffresistenz diskutiert. Zum einen sollte eine erhöhte ATP-Affinität und ein damit verstärkter katalytischer Umsatz von ATP die Inhibitoren aus der ATP-Bindungstasche verdrängen und zum Verlust der Potenz von Inhibitoren führen. Zum anderen wurde gezeigt, dass es zu einer sterischen Beeinträchtigung im Bereich der hydrophoben Seitentasche kommt. Die allgemein beobachteten verminderten Geschwindigkeiten bei der Chinazolin-Kinase-Komplexbildung für die cSrc-DM bestätigen, dass die raumeinnehmende Aminosäure einen negativen sterischen Einfluss auf die Bindung des Inhibitors hat. Da mit diesem Assay die Reaktivität irreversibler Inhibitoren gegenüber verschiedenen Mutanten unter Ausschluss katalytischer Aktivität, das heißt in Abwesenheit von ATP, untersucht werden kann, lässt sich diese Diskrepanz allein auf sterische Effekte zurückführen.

Des Weiteren zeigte sich, dass sehr potente Verbindungen wie RL14 kaum einen Reaktivitätsverlust in der arzneistoffresistenten cSrc-Variante haben. Die Entwicklung extrem potenter EGFR-Inhibitoren als alternativer Ansatz in der Arzneistoffentwicklung wäre allerdings fraglich, da schon bei dem moderat potenten Inhibitor BIBW2992 unerwünschte Nebenwirkungen durch Inhibition der EGFR-Kinase in Haut- und Schleimhautarealen auftreten.¹⁰¹

Beeinflussung der Chinazolin-Kinase-Komplexbildung durch ATP

Nachdem nun die sterische Beeinträchtigung des Inhibitors durch den Türsteherrest bestätigt werden konnte, sollte die Affinität des Inhibitors in Anwesenheit von ATP untersucht werden. Dazu wurde 1 mM ATP eingesetzt, was dem Gehalt an ATP in der Zelle entsprechen sollte (Gehalt in der Zelle circa 1-10 mM²⁵). Zunächst wurden die Reaktionsverläufe von RL1 mit und ohne ATP für die cSrc-SM und -DM aufgenommen. Beim Vergleich der initialen Geschwindigkeiten stellte sich heraus, dass bei Zusatz von ATP die Komplexbildung beeinträchtigt wird. Dies war zu erwarten, da die Anwesenheit von ATP zu einer kompetitiven Verdrängung der Inhibitoren führt. Vergleicht man nun die Reduktion der Geschwindigkeit prozentual bezogen auf die Reaktion ohne ATP in den beiden cSrc-Mutanten, so stellt sich heraus, dass die Reduktion bei der cSrc-DM höher ist als bei der cSrc-SM. Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass die Affinität gegenüber ATP in der cSrc-DM höher ist als in der cSrc-SM und dadurch mehr Moleküle in der ATP-Bindungstasche assoziiert sind, die von dem irreversiblen Inhibitor verdrängt werden müssen.

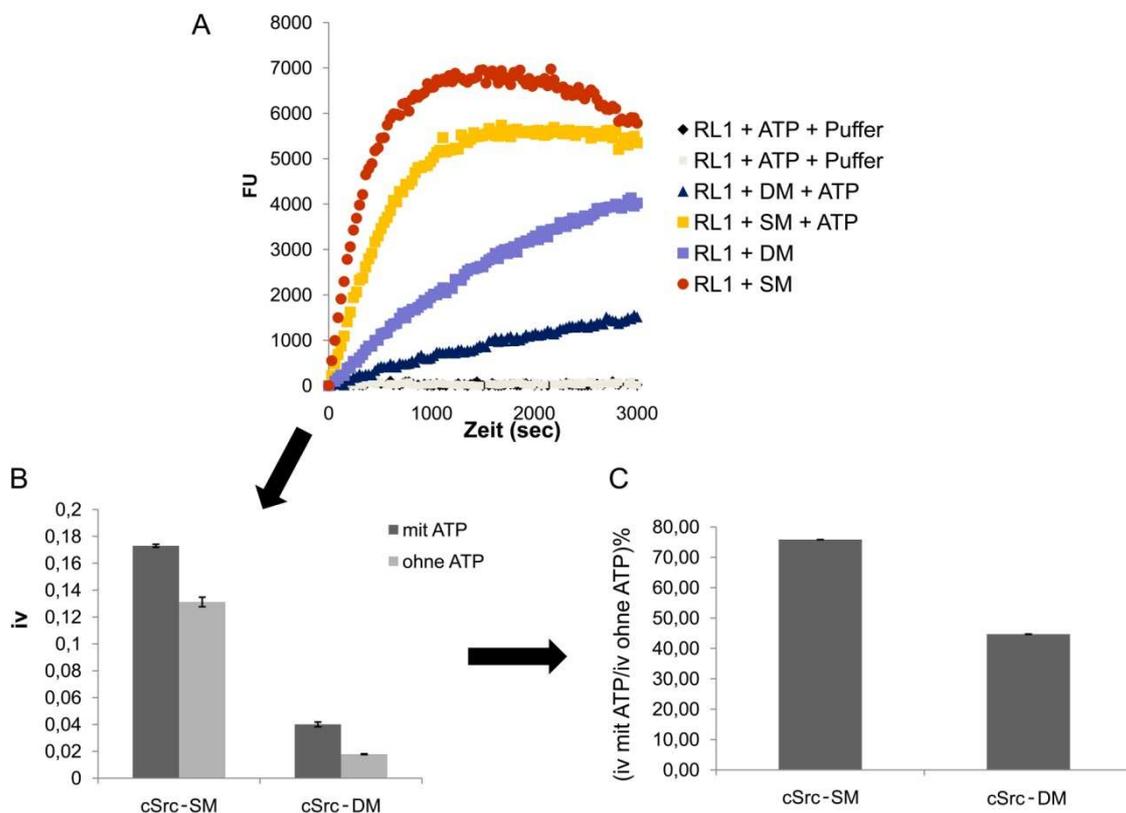


Abbildung 31: (A) Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenzintensität von RL1 in An- und Abwesenheit von 1 mM ATP in cSrc-SM und -DM. (B) Bestimmung der initialen Geschwindigkeiten für die aufgenommenen Spektren. (C) Prozentualer Vergleich der initialen Geschwindigkeit (iv) in An- und Abwesenheit von 1 mM ATP in cSrc-SM und -DM.

Adaptation des Assaysystems auf andere Kinasen

Bis jetzt wurden die Versuche zur Potenz von Chinazolininhibitoren nur mit der cSrc-Kinase durchgeführt. Da die cSrc-Kinase nur ein Modellsystem für EGFR darstellt, wurde der Assay auf klinisch relevante EGFR-Mutanten übertragen, um genauere Aussagen zum sterischen Einfluss der Türsteher-Seitenkette machen zu können. Wie sich in Kapitel 2.2.2.3.3 an den IC_{50} -Werten ableiten lässt, sind die Chinazolinverbindungen extrem potent in EGFR. Da diese Inhibitoren sehr schnell an EGFR binden, musste die Geschwindigkeit artifiziell verlangsamt werden, um die Komplexbildung mit einem Plattenfluorimeter bestimmen zu können. Dazu wurde das reversible Analogon RL6 bei der Vermessung von RL1 hinzugefügt. Bei den Untersuchungen wurden die Varianten EGFR-L858R und EGFR-L858R/T790M eingesetzt, die eine zusätzliche Aktivierungsmutation enthalten, welche häufig bei NSCLC auftritt. Die Resultate sind in Abbildung 32 zusammengefasst. Wie zu erwarten, zeigte RL1 auch hier eine signifikant niedrigere Reaktivität gegenüber der EGFR-Türstehermutante (EGFR-L858R/T790M). Die Untersuchung mit dem Chinolin RL23, bei dem die Komplexbildung ohne Zusatz von reversiblen Inhibitor detektiert werden konnte, ergab das gleiche Ergebnis (Abbildung 32). Somit lässt sich auch in EGFR zeigen, dass die Türstehermutation einen negativen sterischen Einfluss auf die Bindung der getesteten Inhibitoren hat.

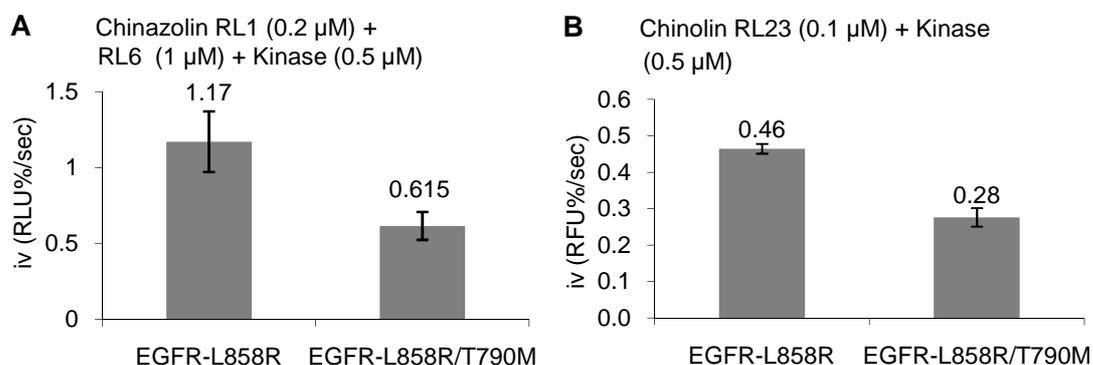


Abbildung 32: Reaktivitätsbestimmungen in klinisch relevanten EGFR-Mutanten mit dem Chinazolinderivat RL1 (A) und dem Chinolinderivat RL23 (B). Zur Detektion mit einem Mikrotiterplattenspektrometer musste die Inhibitor-Kinase-Komplexbildung von RL1 mit dem reversiblen Analogon RL6 verlangsamt werden.

Diese Methode wurde auch genutzt, um die Bindung irreversibler Inhibitoren an eine modifizierte GSK3-Kinase zu charakterisieren. Dazu wurde ähnlich wie bei cSrc mittels zielgerichteter Mutagenese ein Cystein am Eingang der ATP-Bindungstasche einge-

fügt*. Somit kann auf einfache und kostengünstige Art die Bindung von fluoreszierenden irreversiblen Inhibitoren nachgewiesen werden. Dieses ist auch für Proteine interessant, die enzymatisch inaktiv sind oder für die keine aktivitätsbasierten Assaysysteme vorliegen. Chinazoline, die eine Dreifachbindung (RL2: Propiolamid und RL10: Butinamid) als Michael-Akzeptor tragen, konnten nicht detektiert werden. Jedoch wurde massenspektrometrisch nachgewiesen, dass trotzdem eine kovalente Modifikation der Kinase stattfindet.

2.3 Zusammenfassung

Eine erhöhte EGFR-Amplifikation ist in vielen Fällen die Ursache eines Bronchialkarzinoms (NSCLC). Da das Wachstum der Tumorzelle hierbei direkt abhängig von der Aktivität der EGFR-Kinase ist, wird diese in der Arzneimittelforschung auch als Zielprotein (Target) genutzt. Der Tyrosinkinasehemmer Gefitinib kann das Tumorwachstum signifikant wirksamer aufhalten, als das klassische Zytostatikum Taxol.^{55,56} Nach anfänglich gutem Ansprechen der Therapie mit Tyrosinkinasehemmern stellt sich allerdings nach 6-12 Monaten eine Wirkstoffresistenz gegen diese Substanzklasse ein, die durch die Mutation T790M in der ATP-Bindungstasche ausgelöst wird.²⁶ Diese verhindert aufgrund der sterisch anspruchsvollen Methionin-Seitenkette die Bindung des Inhibitors an die Kinase. Inhibitoren der 2. Generation binden vorwiegend irreversibel über eine elektrophile Addition an eine Cysteinseitenkette der EGFR-Kinase.

In der vorliegenden Arbeit wurden zunächst aktivitätsbasierte Assaysysteme aufgebaut, die zuverlässige Bestimmungen zur Wirkung von Kinaseinhibitoren ermöglichen. Diese dienen zur Strukturaktivitätsbestimmung sowie zur Validierung der cSrc-Kinase als Modellsystem für EGFR. Die Ergebnisse dieses Forschungsprojektes zeigten, dass zumindest in biochemischen Testsystemen die irreversiblen EGFR-Inhibitoren die wirkstoffresistenten Mutanten sehr viel wirksamer inhibieren konnten als die reversiblen Inhibitoren der ersten Generation. Die meisten IC_{50} -Werte der irreversiblen Inhibitoren lagen im niedrig-molaren Bereich. Die auf einem Chinazolingrundgerüst basierenden Inhibitoren zeigten im Vergleich zu EGFR eine deutlich schwächere Hemmung der Modell-Kinase cSrc. Dennoch stimmten die Trends der inhibitorischen Wirkung in der cSrc-Kinase mit den Trends der Inhibition von EGFR weitestgehend überein

* Die Untersuchung wurde von Dipl. Biol. S. Tückmantel durchgeführt.

Um die Entwicklung von Verbindungen zur Hemmung von wirkstoffresistenten Kinasemutanten effizient voranzutreiben, wurde in der Arbeitsgruppe Rauh die Proteinkristallstruktur eines irreversiblen Inhibitors in einer wirkstoffresistenten Mutante gelöst. Es stellte sich heraus, dass irreversible Kinaseinhibitoren eine Konformation der Kinase stabilisieren, in der die raumeinnehmende Aminosäure Methionin nach außen gedreht ist und der Inhibitor Platz hat zu binden.

Im Rahmen dieser Arbeit bestand eine Aufgabe darin, diese Beobachtung biochemisch näher zu beleuchten. Da irreversible Inhibitoren einer anderen Reaktionskinetik folgen als die reversiblen Inhibitoren, sind die auf der Langmuirschen Adsorptionsisotherme basierenden IC_{50} -Bestimmungen nur bedingt geeignet. Deshalb wurde ein robustes Assaysystem zur Charakterisierung von irreversiblen Inhibitoren entwickelt, mit dem allein die Geschwindigkeit der Komplexbildung von irreversiblen Kinaseinhibitoren untersucht wurde. Auf den Zusatz von ATP und Substrat konnte dabei verzichtet werden. Das verwendete Detektionssystem beruht auf Änderung der fluorimetrischen Eigenschaft von Chinazolinen bei Ausbildung der kovalenten Bindung an die Kinase.

Mit diesem System konnten zwei wesentliche Punkte zur Fragestellung untersucht werden. Zum einen konnte eine Klassifizierung nach Reaktivität der irreversiblen Inhibitoren vorgenommen werden, was zuverlässige Aussagen über Strukturwirkungsbeziehungen von irreversiblen EGFR-Inhibitoren erlaubte. Da die Geschwindigkeit der Inhibitor-Kinase-Komplexbildung durch die raumeinnehmende Mutation stark reduziert war, konnte zum anderen bestätigt werden, dass die zur Resistenz führende Mutation eine sterische Hinderung der irreversiblen Inhibitoren verursacht. Ferner wurde untersucht, ob der Wirkstoffresistenz eine Erhöhung der katalytischen Aktivität zugrunde liegt. Hierfür wurden Aktivitätsstudien mit EGFR- sowie mit cSrc-Mutanten durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass wirkstoffresistente Mutanten über eine erhöhte katalytische Aktivität verfügen, die die Bindung von Inhibitoren an die ATP-Bindungstasche erschwert.

Es ist festzuhalten, dass die Hinderung durch eine sterisch anspruchsvolle Aminosäure die Bindung des Inhibitors ebenso negativ beeinflusst wie auch die gesteigerte katalytische Aktivität der wirkstoffresistenten Kinasemutanten. Da irreversible Inhibitoren nicht mit ATP in Konkurrenz treten und eine permanente Inaktivierung der Kinase erlauben, kann die Wahl des irreversiblen Inhibitors einen entscheidenden Vorteil zur Überwindung von Arzneistoffresistenzen bringen. Außerdem kann die Umgehung der

Kollision mit der raumeinnehmenden Aminosäure durch ein gezieltes Wirkstoffdesign einen weiteren Fortschritt zur Überwindung von wirkstoffresistenten Mutanten bringen. Betrachtet man beide Faktoren zusammen, lautet die Strategie, solche irreversible EGFR-Inhibitoren zu entwickeln, die außerhalb des Bereiches der sterisch anspruchsvollen Aminosäure binden.

Ein Teil der Ergebnisse dieses Projektes wurde in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Michalczyk A, Klüter S, Rode HB, Simard JR, Grütter C, Rabiller M, Rauh D. Structural insights into how irreversible inhibitors can overcome drug resistance in EGFR. *Bioorg Med Chem* **16**, 3482-3488 (2008).

Sos ML, Rode HB, Heynck S, Peifer M, Fischer F, Klüter S, Pawar VG, Reuter C, Heuckmann JM, Weiss J, Ruddigkeit L, Rabiller M, Koker M, Simard JR, Getlik M, Yuza Y, Chen TH, Greulich H, Thomas RK, Rauh D. Chemogenomic profiling provides insights into the limited activity of irreversible EGFR Inhibitors in tumor cells expressing the T790M EGFR resistance mutation. *Cancer Res* **70**, 868-874 (2010).

Klüter S, Simard JR, Rode HB, Pawar V, Raaijmakers CA, Barf TA, Grütter C, Rabiller M, van Otterlo WAL, Rauh D. Characterization of irreversible kinase inhibitors by directly detecting covalent bond formation: a tool for dissecting kinase drug resistance. *eingereicht*.

Review:

Rabiller M, Getlik M, Klüter S, Richters A, Tückmantel S, Simard JR, Rauh D. Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases. *Arch Pharm (Weinheim)* **343**, 193-206 (2010).

3 Detektion von Stabilisatoren der inaktiven Kinasekonformation

3.1 Allgemeiner Teil

In der Wirkstoffentwicklung für die Zielproteine der Kinasen hat man sich zunächst auf die ATP-Bindungstasche fokussiert, indem ATP-analoge Substanzen entwickelt wurden.²³ Die eingeschränkte Selektivität vieler dieser Verbindungen limitierte vor allem den Einsatz bei chronischen Krankheiten ein. Außerdem ist der chemische Strukturraum der Verbindungen, die an die ATP-Bindungstasche binden, in kurzer Zeit von Pharmafirmen patentrechtlich geschützt worden. Dies bedingte die Suche nach neuen Inhibitoren mit einem innovativen Bindungsmodus. Die Proteinkristallstruktur des Inhibitors Imatinib im Komplex mit der Abl-Kinase¹²⁷ deckte eine neue Form der Inhibition auf, bei der die inaktive Konformation der Kinase stabilisiert wird.²⁸ Dieses eröffnete den Weg für eine neue Inhibitiorklasse der Kinasen (Typ-II), für die schnell viele neue Verbindungen gegen unterschiedliche Kinasen entwickelt wurden. Limitiert wurde dieser Prozess durch das Fehlen eines geeigneten Detektionssystems, das solche Verbindungen direkt aus größeren Substanzkolektionen identifizieren kann.¹²⁸ Der klassische Weg zur Bestimmung allosterischer Inhibitoren, also von solchen, die nicht am katalytischen Zentrum, sondern außerhalb angreifen und somit eine konformative Änderung der Substratbindungstasche induzieren, verläuft über IC_{50} -Bestimmungen, die bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen werden.^{114,129} Der IC_{50} -Wert sollte sich bei allosterischen Inhibitoren nicht verändern, wohingegen sich bei ATP-kompetitiven Inhibitoren der IC_{50} -Wert mit höheren ATP-Konzentrationen durch Konkurrenz von ATP und Molekül um die gleiche Bindungsstelle erhöht.

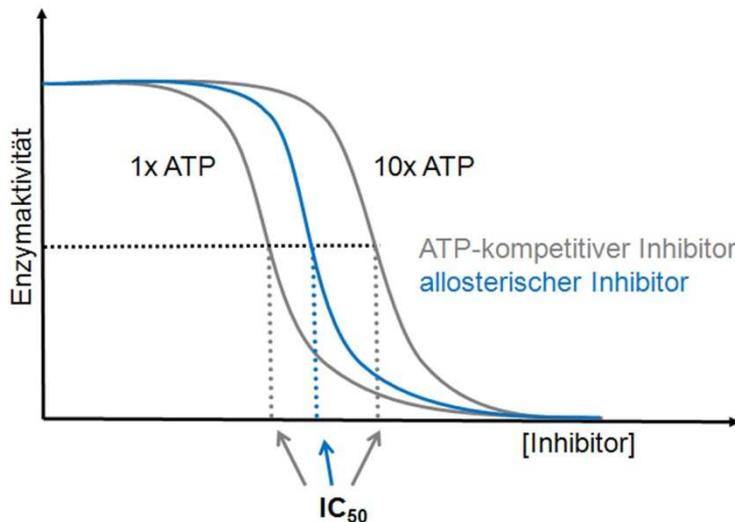


Abbildung 33: Darstellung des unterschiedlichen Verhaltens der IC₅₀-Kurven bei ATP-kompetitiven und allosterischen Inhibitoren. Während der IC₅₀-Wert bei allosterischen Inhibitoren auch bei höheren ATP-Konzentrationen gleich bleibt, nimmt der IC₅₀-Wert bei ATP-kompetitiven Inhibitoren mit zunehmender ATP-Konzentration zu.

Dieses Verfahren ist zum einen sehr aufwendig und zum anderen folgen DFG-*out*-Inhibitoren nicht unbedingt dem beschriebenen klassischen Modell allosterischer Inhibitoren, sondern treten zum gewissen Maße auch in Konkurrenz mit ATP.¹³⁰ Dieses ist auf das sensible Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Kinasekonformation zurückzuführen.^{27,131} Liegt die Kinase durch Anlagerung eines DFG-*out*-Inhibitors in der inaktiven Konformation vor, kann durch Zusatz von ATP das Gleichgewicht Richtung aktive Kinasekonformation verschoben werden. Die Aktivierungsschleife sowie die Helix-C-Kette in der katalytischen Tasche sind sehr flexibel, sodass je nach Dominanz von ATP oder Inhibitor das Gleichgewicht zur aktiven oder inaktiven Kinase verschoben werden kann.

3.2 Spezieller Teil

3.2.1 Aufgabenstellung

Auf der Suche nach neuen DFG-*out*-Inhibitoren ist ein Assaysystem von besonderem Interesse, dass die Detektion von kleinen Molekülen ermöglicht, die die inaktive Konformation der Kinase stabilisieren.¹³² Auch wenn diese Verbindungen oft mit aktivitätsbasierten Assaysystemen detektiert werden können, so sind schwach bindende DFG-*out*-Inhibitoren bei diesen Assaysystemen aufgrund der durch ATP stabilisierten aktiven Kinasekonformation benachteiligt. Bei niedriger Affinität, sind DFG-*out*-

Inhibitoren nicht in der Lage, das Gleichgewicht von der aktiven Kinasekonformation zur inaktiven Kinasekonformation zu verschieben. Zur erfolgreichen Etablierung des Assaysystems sind folgende Anforderungen an das Assaysystem zu berücksichtigen: Verzicht auf Radioaktivität, eine gute Robustheit, mit einem Z-Faktor zwischen 0,5-1,0 und eine hohe Sensitivität, um sowohl sehr affine, als auch schwach wirksame Inhibitoren zu finden. Um die Adaption auf automatisierte Technologien im höheren oder mittleren Substanzdurchsatz zu ermöglichen, sollte das Pipettierschema möglichst einfach gehalten sein („mix and read“) und der Assay in kleinen Volumina (10-50 μL) durchführbar sein.¹³³ Weiterhin ist ein Detektionsprinzip zu wählen, bei dem der Störeinfluss der getesteten Verbindungen auf das Detektionssystem möglichst gering ist.¹³⁴

3.2.2 Projektstudie zur Wahl eines geeigneten Assaysystems

Um den genannten Anforderungen an das Detektionssystem für *DFG-out*-Inhibitoren gerecht zu werden, sind unterschiedliche Methoden in Betrachtung gezogen worden, die auf Verdrängung einer Sonde durch Liganden der *DFG-out*-Konformation beruhen. Hierzu sind zwar bekannte hochaffine Liganden für das Zielprotein erforderlich, jedoch ist das System vielseitig anwendbar. Außerdem müssen viele Kinasen für aktivitätsbasierte Inhibitionstests mithilfe von zusätzlichen Kinasen oder Proteinen präaktiviert werden. Zudem sind die zur Phosphorylierung dienenden Substrate für seltene, unbekannte Kinasen oft nicht verfügbar. Diese Engpässe können mit einem auf Verdrängung basierenden Assaysystem umgangen werden.^{135,136} Ein weiterer Vorteil ist, dass der Assay auf weitere Kinasen adaptiert werden kann und dieser somit generisch eingesetzt werden kann.

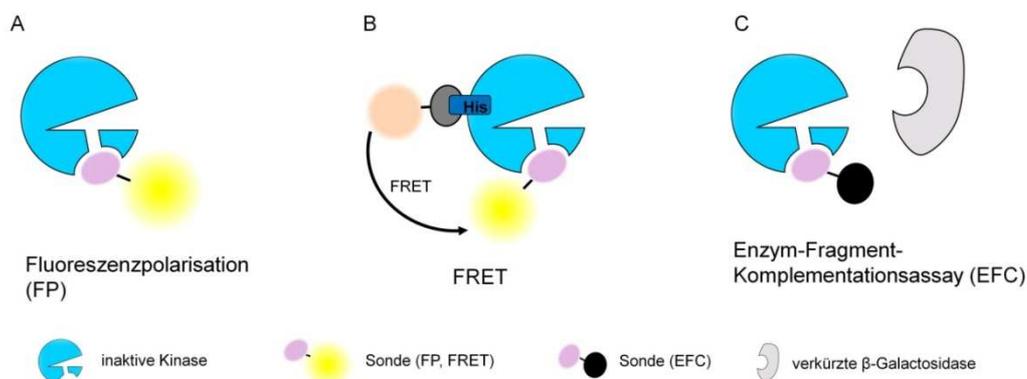


Abbildung 34: Methoden zur Detektion von Stabilisatoren der inaktiven Kinasekonformation basierend auf dem Verdrängungsprinzip. (A) Fluoreszenzpolarisationsassay, (B) FRET-Assay, (C) EFC-Assay.

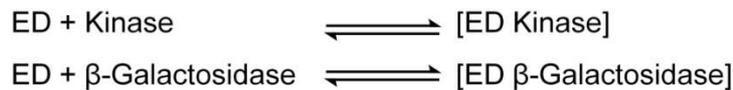
Zur Detektion der Verdrängungsreaktion ist die Sonde je nach Methode mit unterschiedlichen Detektionsreagenzien ausgestattet. Im einfachsten Fall (Abbildung 34A) enthält die Sonde einen polarisierbaren Fluoreszenzfarbstoff wie zum Beispiel (Fluorescein).¹³⁷ Ist die Sonde an die Kinase gebunden, findet hohe Polarisation statt. Wird sie jedoch von einem Inhibitor verdrängt, ist die Sonde frei rotierbar, was mit einer Verminderung der Fluoreszenzpolarisation einhergeht. Weiterhin ist eine Detektion über FRET (Förster-Resonanzenergietransfer) denkbar, bei dem ein Fluorophor über einen Antikörper mit dem Protein verknüpft ist und ein weiterer mit der Sonde verknüpft wird.¹³⁶ Gelangen beide Fluorophore in die räumliche Nähe (1,5-10 nm), kann ein Elektronentransfer über Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden. Wird die Sonde von Inhibitoren verdrängt, nimmt auch der Energietransfer ab. Der Enzym-Fragment-Komplementationsassay (EFC) macht von einer Sonde, die ein Peptid der β -Galactosidase enthält, Gebrauch.¹³⁸ In der Detektionsreaktion wird eine verkürzte inaktive Form der β -Galactosidase hinzugegeben, die bei Zusammenführung mit dem Peptid in den aktiven Zustand gelangt. Die Aktivität kann über Zugabe eines chemilumineszenten Substrates ausgelesen werden. Ein nicht auf Verdrängungsreaktion beruhender Ansatz nutzt die Konformationsänderung der Aktivierungsschleife zur Detektion von DFG-*out*-Inhibitoren.³⁰ Die Aktivierungsschleife wird mit einem lösungsmittelsensitiven Fluorophor markiert, der je nach Konformation der Aktivierungsschleife die Fluoreszenz ändert. Stabilisiert ein Inhibitor die DFG-*out*-Konformation, ist die Aktivierungsschleife nach außen exponiert und der Fluorophor wird von der Hydrophilie des Wassers beeinflusst.

3.2.3 Ergebnisse und Diskussion

3.2.3.1 Design und Aufbau des Assaysystems

Alle in Abbildung 34 dargestellten Systeme sind mögliche Detektionsprinzipien zur Identifizierung von DFG-*out*-Inhibitoren. Das EFC-System ist eine gut beschriebene Technologie, die im Bereich der Rasterung von Substanzbibliotheken nach Inhibitoren für viele Zielproteine wie zum Beispiel für Kinasen, Proteasen, Hormonrezeptoren oder G-Protein gekoppelte Rezeptoren, breite Anwendung findet.¹³⁸⁻¹⁴¹ Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit das EFC-System als Detektionsansatz für DFG-*out*-Inhibitoren ausgewählt.

A



B

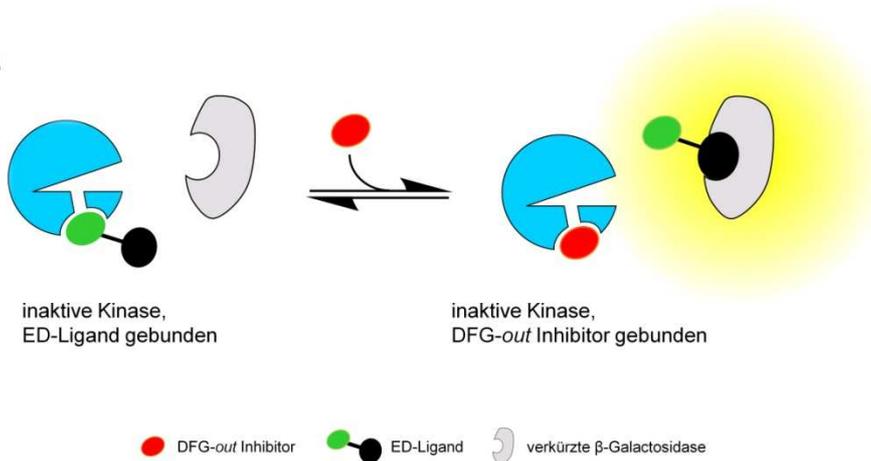


Abbildung 35: Schematische Darstellung des EFC-Assays zur Detektion von Stabilisatoren der inaktiven Kinasekonformation (DFG-out-Inhibitor). (A) Die Sonde (ED) geht sowohl eine Gleichgewichtsreaktion mit der Kinase als auch mit der verkürzten β -Galactosidase ein. (B) Die Sonde (ED-Ligand) bindet an eine allosterische Region in der ATP-Bindungstasche. Liegt die Sonde durch Verdrängung eines Inhibitors frei in Lösung, bindet sie an die verkürzte β -Galactosidase, was mittels Chemilumineszenz detektiert werden kann.

Das Prinzip beruht auf α -Komplementation der β -Galactosidase¹⁴², bei der eine Sonde mit einem Ligand generiert wird, die an die Zielregion im Protein bindet, für die Inhibitoren gesucht werden. Über einen kurzen Linker ist der Ligand mit einem circa 40 Aminosäuren langen Peptid (α -Fragment) der β -Galactosidase verknüpft, auch „Enzyme Donor“ (ED) genannt.^{143,144} Dieses Peptid bindet mit hoher Affinität ($K_d \sim 1\text{nM}$) an eine mutierte Form der β -Galactosidase, Enzym Akzeptor (EA) genannt, bei der ein Stück des N-terminalen Endes durch Mutagenese abgeschnitten wurde. Fusioniert der ED-Teil an die Enden des EA-Fragmentes, so formiert sich das Enzym zu einem aktiven Tetramer. Die Aktivität kann mit Zugabe eines Substrates über Chemilumineszenz nachgewiesen werden und ist von der Menge an aktiver β -Galactosidase und damit der Menge an ED-Ligand abhängig, die durch andere Liganden der Bindetasche verdrängt werden.¹³⁸

Anforderungen an das EFC-System:

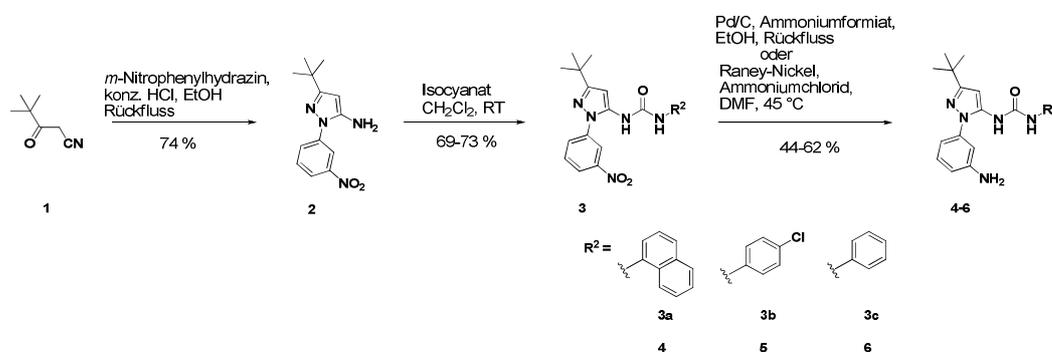
Um das EFC-System zur Detektion von Inhibitoren zu etablieren, müssen einige Anforderungen erfüllt sein. Zunächst sind Inhibitoren der adressierten Bindungstasche er-

forderlich, die eine hohe Affinität ($K_d < 50$ nM) aufweisen.^{143,145} Für neu gefundene Ligandbindungsstellen sind potente Inhibitoren oft rar. Mit der p38 α -Kinase wurde ein Protein gewählt, für die Inhibitoren der allosterischen Bindetasche zur Stabilisation der inaktiven Kinasekonformation bekannt sind.^{146,147} Ferner ist p38 α in der Literatur gut beschrieben und ist ein Zielprotein (*Target*) in der Arzneistoffentwicklung zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen und Krebs.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Das Molekül benötigt zur Konjugation an den Linker eine freie Amin- oder Hydroxyl-Gruppe, die so in das Molekül eingefügt wird, das die Sonde im Komplex mit der Kinase frei und ohne sterische Hinderung aus der Bindetasche herausragt. Die Pyrazolharnstoffe bilden eine Verbindungs-kategorie, deren Inhibition über einen allosterischen Mechanismus durch Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen vom Stickstoff des Harnstoffes zum DFG-Motiv der Aktivierungsschleife und vom Sauerstoff des Harnstoffes zum Glutamat der Helix-C verläuft.^{151,152} In der allosterischen Region werden mit dem Phenylrest hydrophobe Wechselwirkungen eingegangen.¹²⁷

Primär binden diese Inhibitoren an die p38 α -Kinase, durch unzureichende Selektivität binden einige Inhibitoren aber auch an weitere Kinasen.^{152,153} Zur Pyrazolharnstoff-Kategorie gehört der Typ-II-Inhibitor BIRB-796, eine Verbindung, die in der klinischen Studie zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen war.⁸³

Zur Herstellung der Sonde wurden zunächst mehrere Pyrazolharnstoffverbindungen synthetisiert, deren Affinität mit einem orthogonalen Assaysystem bestimmt wurden. Die Verbindung mit der höchsten Affinität sollte im Anschluss an das ED-Peptid konjugiert werden.

3.2.3.2 Synthese der molekularen Sonde



Schema 1: Synthese der Pyrazolharnstoffverbindungen mit Aminfunktion zur Konjugation an den Peptidteil der Sonde.

Die Synthese der Pyrazolharnstoffe erfolgte zunächst über die Herstellung des Pyrazols durch eine *Pinner*-artige Reaktion des 4,4-Dimethyl-3-oxopentannitrils mit *m*-Nitrophenylhydrazin in konzentrierter Salzsäure und Ethanol unter Rückfluss zur Formierung des 3-Tertiärbutyl-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin.¹⁵² Im nächsten Schritt folgte eine Additionsreaktion, bei der die Harnstoffgruppe mit den jeweiligen Isocyanaten in Dichlormethan bei Raumtemperatur gebildet wurde. Zuletzt wurde die sich am Phenylrest befindende Nitrogruppe mit Ammoniumformiat und Palladium auf Kohle als Katalysator reduziert. Die Reduktion der Verbindung **5** erfolgte unter milden Bedingungen mit Ammoniumchlorid und Raney-Nickel als Katalysator, um eine Abspaltung der Chloridgruppe zu verhindern.

Bindungsstudien der Pyrazolharnstoffverbindungen

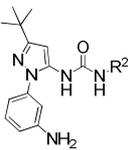
	K _d -Bestimmung		
			
R ₂ =	4	5	6
K _d (nM)	12 ± 2,3	55 ± 5,5	197 ± 21

Abbildung 36: Affinitätskonstanten (K_d) der hergestellten Pyrazoloureaverbindungen. Die Naphtyl-Verbindung **4** zeigte die höchste Affinität und wurde zur Konjugation an den ED-Liganden verwendet.

Für die Verwendung eines Liganden als molekulare Sonde im EFC-Assay sollte die Affinität (K_d) unterhalb von 50 nM liegen. Um den potentesten Liganden dieser Serie zu bestimmen, wurden von Dr. J. Simard mit der in der Arbeitsgruppe Rauh entwickelten FLiK-Technology Bindungsstudien durchgeführt (Abbildung 36).^{29,154} Verbindung **4** zeigte die höchste Affinität und erfüllte die Voraussetzung, um dieses an das ED-Peptid zu konjugieren. Die unterschiedlichen Affinitäten resultierten aufgrund unterschiedlicher Hydrophobizitäten und Umfang der Phenyl-, Chlorphenyl-, und Naphtylreste, die für die Wechselwirkung in der hydrophoben Seitentasche wichtig sind. Die höchste Bindungsaffinität ergab sich mit dem Naphtylrest (**4**).

Die Konjugation von **4** an den Linker und das ED-Peptid erfolgte in Kollaboration mit der Firma DiscoverX® unter Verwendung eines patentierten ED-Peptides.^{143,144}

3.2.3.3 Validierung des EFC-Assays

Proteinkristallstruktur der molekularen Sonde im Komplex mit p38 α

Zur Validierung, dass die synthetisierte Verbindung an die inaktive Kinasekonformation bindet und den gewünschten Bindungsmodus einnimmt, wurde die Kristallstruktur von p38 α im Komplex mit **4** gelöst. Die strukturellen Untersuchungen sowie die Proteinexpression und -aufreinigung der p38 α -Kinase wurden von Dipl. Chem. M. Getlik und Dr. C. Grütter durchgeführt.

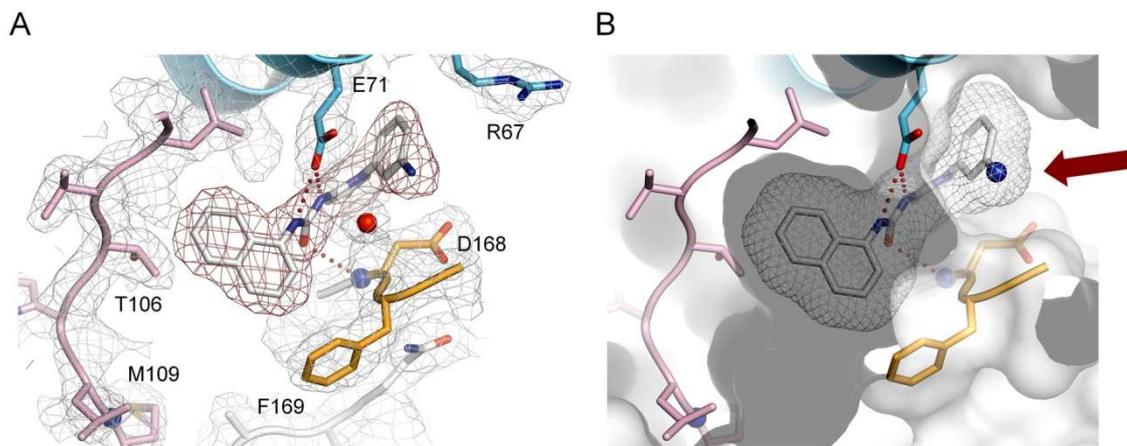


Abbildung 37: Proteinkristallstruktur von p38 α im Komplex mit der Verbindung **4**, die als Ligand-bindender Teil der Sonde fungiert. (PDB-Eintrag 3HV7¹⁵⁵)

Wie erwartet, bindet der Ligand **4** an die sogenannte DFG-*out*-Konformation der Kinase, bei der das Phenylalanin des DFG-Motivs in Richtung Scharnierregion gerichtet ist und den Zugang für ATP und ATP-kompetitive Inhibitoren versperrt. Dabei tritt **4** in hydrophobe Wechselwirkung mit einer hydrophoben Tasche, die hinter dem Türsteher T106 lokalisiert ist (Abbildung 37A). Weiterhin werden zwei für Stabilisatoren der inaktiven Konformation klassische Wasserstoffbrückenbindungen zum Glutamat E71 in der Helix-C sowie zum Aspartat D168 ausgebildet. Die allosterische Tasche wird vom Anillin besetzt, wobei die Position desamins zur Verknüpfung mit dem Linker-Fragment von Bedeutung war. Wie in Abbildung 37B ersichtlich, ragt die Aminogruppe aus der Tasche heraus und erfüllt somit die Anforderung als Ankerpunkt zur Konjugation des ED-Peptides.

Validierung des EFC-Assaysystems

Nachdem die vollständige Synthese des ED-Liganden durchgeführt worden war, erfolgte die Etablierung des Assaysystems, welches im Wesentlichen aus zwei Schritten besteht. Zuerst findet die Konkurrenzreaktion zwischen Ligand und Inhibitor um die

Bindungsposition in der Kinase statt, gefolgt von einer Detektionsreaktion, in der der freie ED-Ligand an den Enzym-Akzeptor (EA) bindet, der daraufhin das chemilumineszierende Substrat umsetzt. Das resultierende chemilumineszierende Signal dient zur Bestimmung des Anteils an Inhibitor, der an die Kinase gebunden hat.

Damit eine größere Anzahl an Verbindungen getestet werden konnte, musste die Generierung von zuverlässigen und reproduzierbaren Daten gesichert sein. Dazu wurden die einzelnen Reagenzien des Assays so angepasst, dass beide Reaktionen im Fließgleichgewicht ablaufen und das ausgelesene Signal indirekt proportional zum an die Kinase gebundenen Inhibitoranteil ist. Um dieses zu erreichen, wurden die Kinase- und ED-Konzentration und die Inkubationszeit angepasst. Hierbei wurden Konzentrationen gewählt, die im linearen Bereich einer Titrationskurve des jeweils zu optimierenden Parameters liegen.

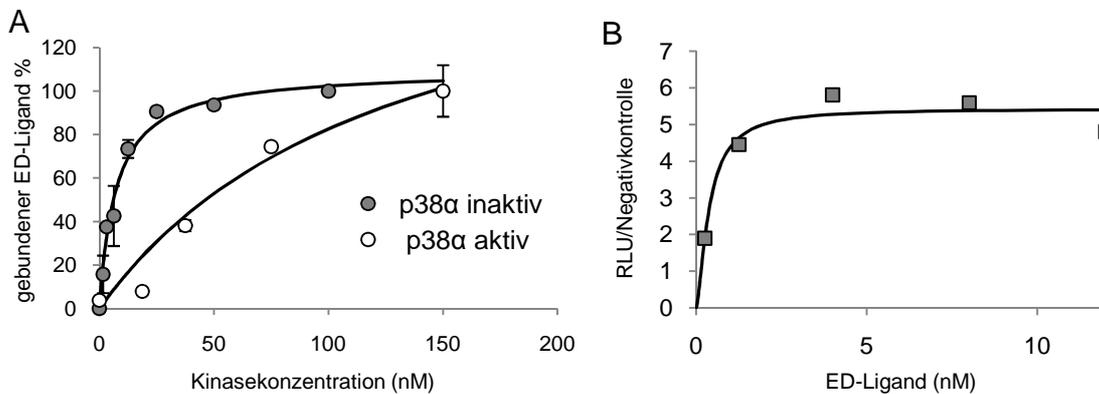


Abbildung 38: (A) Titration der aktiven und inaktiven p38α-Kinase gegen 1,25 nM ED-Ligand.¹⁵⁵ (B) Titration des ED-Liganden gegen inaktive p38α-Kinase.

Die Optimierung der beiden Parameter ist in Abbildung 38 dargestellt. Anhand dieser Versuchsreihe wurde für alle weiteren Untersuchungen mit dem EFC-Assay die Kinasekonzentration auf 12,5 nM (inaktive Kinase) beziehungsweise 75 nM (aktive Kinase) festgesetzt. Die optimierte Kinasekonzentration der inaktiven Kinase ist im Vergleich zu anderen biochemischen Assaysystemen recht niedrig, was vorteilhaft gegenüber stark bindenden Liganden ist und dadurch die Sensitivität des Assays erhöht. Da die Sonde an die inaktive Kinasekonformation bindet, ist die inaktive Kinase gegenüber der aktiven Kinase begünstigt, was sich auch in den berechneten K_d -Werten des ED-Liganden widerspiegelt. Dieser lag für die inaktive Kinase bei $3 \pm 0,75$ nM und für die aktive Kinase bei 72 ± 20 nM. Eine solche Diskrepanz wurde schon von anderen Forschungsgruppen beobachtet.^{156,157} Zur Optimierung des dynamischen Bereiches, der zwischen 3-6 liegen sollte, wurde eine ED-Titration mit der zuvor angepassten Kinasekonzentration durchgeführt.¹⁴⁵ Die erhaltenen Lumineszenz-Werte wurden mit

der Negativkontrolle (keine Kinase) ins Verhältnis gesetzt. Anhand der in Abbildung 38A dargestellten Kurve wurde eine ED-Ligand-Konzentration von 1,25 nM für alle weiteren Bestimmungen gewählt.

Zuletzt wurde die Inkubationszeit der Kinase-Inhibitor-Reaktion eingestellt. Da aus der Literatur bekannt ist, dass einige DFG-*out*-Inhibitoren einer zeitabhängigen Inhibition folgen, wurden Inkubationszeiten über einen Zeitraum von 12 h getestet.^{127,158} Hierzu wurden IC₅₀-Bestimmungen nach verschiedenen Kinase-Inkubationszeiten durchgeführt. Allerdings wurden keine signifikanten Änderungen des IC₅₀-Wertes in Abhängigkeit von der Zeit festgestellt. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die allosterische Seite, an die der Inhibitor bindet, direkt für ihn zugänglich ist, da die molekulare Sonde die inaktive Kinasekonformation stabilisiert. In aktivitätsbasierten Assaysystemen muss ein TypII/III-Inhibitor zunächst das Gleichgewicht auf die Seite der inaktiven Kinasekonformation verschieben, bevor dieser binden kann.

Untersuchung der DMSO- und Glyceroltoleranz

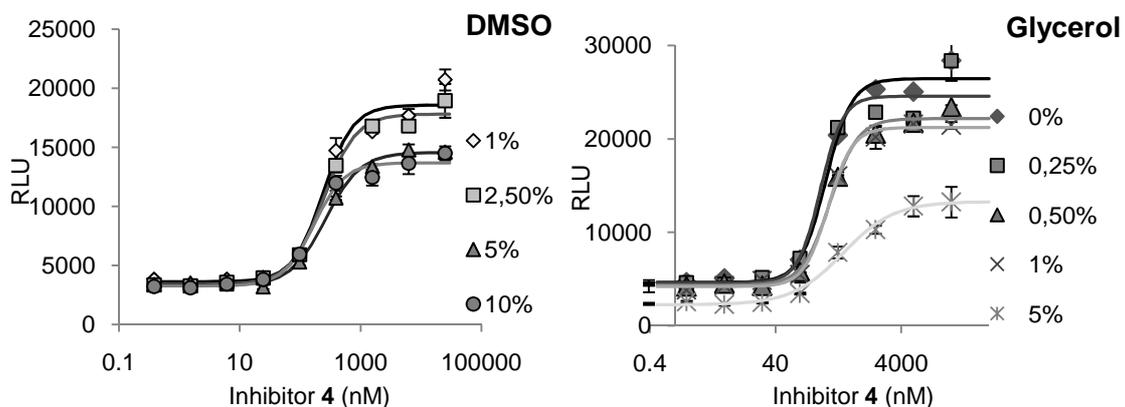


Abbildung 39: Anpassung der DMSO- und Glycerol-Konzentration. Titration des Liganden **4** in Anwesenheit von unterschiedlichen Konzentrationen an DMSO und Glycerol.

Da der Fokus dieses Assaysystems auf der Vermessung von Inhibitoren lag, wurde die DMSO-Toleranz untersucht, da die meisten Inhibitoren in DMSO gelöst sind. Des Weiteren sind einige zur Lagerung des Proteins dienende Puffer mit bis zu 50 % Glycerol versetzt. Um außerdem ein Maß für die Robustheit des Assays gegenüber Glycerol zu bekommen, wurden auch hierfür die maximal tolerierbaren Konzentrationen untersucht. Für diese Versuchsreihe wurde der freie Ligand **4** mit Zusatz der jeweiligen Anteile an DMSO und Glycerol titriert. Für DMSO ergaben Konzentrationen bis zu 2,5 % den größten dynamischen Bereich, bei Zusatz von Glycerol nahm der dynami-

sche Bereich* schon bei 1 % deutlich ab und sank bei 5 % Glycerol schon auf die Hälfte. Somit ist der Assay gegen Glycerol nicht besonders robust. Darauf muss besonders geachtet werden, da vor allem bei kommerziell erhältlichen Kinasen ein hoher Anteil an Glycerol enthalten ist.

3.2.3.4 Übertragung des Assaysystems auf andere Kinasen

Nach der erfolgreichen Etablierung des Assaysystems auf die p38 α -Kinase bestand die Frage, ob dieses Assaysystem auch für andere Kinasen zur Detektion von Typ-II/III-Inhibitoren eingesetzt werden kann. Zunächst musste überprüft werden, an welche Kinasen die molekulare Sonde bindet. Hierfür wurden zwei Wege eingeschlagen. Bei dem einen wurden die im Labor vorhandenen Kinasen mit dem EFC-Assay und dem aktivitätsbasiertem HTRF-Assay untersucht, bei dem anderen wurde eine Selektivitätsprofilierung von Typ-III-Inhibitoren durchgeführt.

Zunächst wurden alle in der Arbeitsgruppe Rauh vorhandenen Kinasen mit dem für p38 α etablierten Protokoll getestet. Zu diesen Kinasen zählten: cRaf, bRaf, Abl, APK, VEGFR, GSK3 *ustilago maydis*, GSK3 *human*, cSrc, EGFR, EPHA3. Jedoch war es mit diesen Kinasen nicht möglich, das Assaysystem aufzusetzen. Um einen Einblick zu bekommen, mit welcher Affinität die Pyrazolharnstoffverbindungen an einige dieser getesteten Kinasen binden, wurden IC₅₀-Werte für **4**, **5**, **6** aufgenommen. Hierfür wurde zunächst der HTRF-Assay auf die jeweiligen Kinasen angepasst (siehe Kapitel 2.2.2.3), bevor IC₅₀-Werte generiert wurden, die in Tabelle 7 zusammengefasst sind.

Kinase	IC ₅₀ (μ M)		
	4	5	6
p38 α	0,09 \pm 0,04	2 \pm 0,9	1,1 \pm 0,26
cSrc	11 \pm 2	6,2 \pm 1	30 \pm 3
EGFR	7,2 \pm 2,7	3,8 \pm 0,6	2,1 \pm 0,4
VEGFR2	2 \pm 0,3	0,56 \pm 0,1	10 \pm 3
VEGFR3	1,9 \pm 2	0,9 \pm 0,3	1,9 \pm 0,4
EPHA3	21 \pm 2	k. I.	k. I.

Tabelle 7: Mit dem HTRF-Assay ermittelte IC₅₀-Werte der Verbindungen **4**, **5** und **6** für verschiedene Kinasen. Definition k. I.: keine Inhibition.

* Der dynamische Bereich beschreibt die Differenz zwischen höchstem und niedrigstem Signal.

Abgesehen von Verbindung **4** bei p38 α binden alle Inhibitoren im mikromolaren Bereich. Die Inhibitionswerte der getesteten Verbindungen sind somit zu schwach, um diese als Sonde für die oben genannten Kinasen verwenden zu können. Allerdings muss beachtet werden, dass die Liganden an die inaktive Konformation der Kinase binden. In einem aktivitätsbasierten Assay liegt das Gleichgewicht jedoch stark auf der Seite der aktiven Konformation, was die hohen IC₅₀-Werte erklärt. Abgesehen von p38 α , zeigte die Verbindung **5** in der VEGFR2-Kinase die beste Inhibition aus dieser Serie.

Kristallstruktur der cSrc-Kinase mit Typ-III-Inhibitoren

Da die Verbindungen **4**, **5** und **6** auch die cSrc-Kinase hemmten und noch keine Typ-III-Inhibitoren für cSrc bekannt waren, bestand das Interesse, den Bindungsmechanismus dieser Inhibitor-Klasse aufzuklären. Es stellte sich die Frage, ob auch in der cSrc-Kinase die allosterische Bindungstasche für organische Verbindungen zugänglich ist und inwiefern diese Inhibitoren das DFG-Motiv sowie die Helix-C beeinflussen.

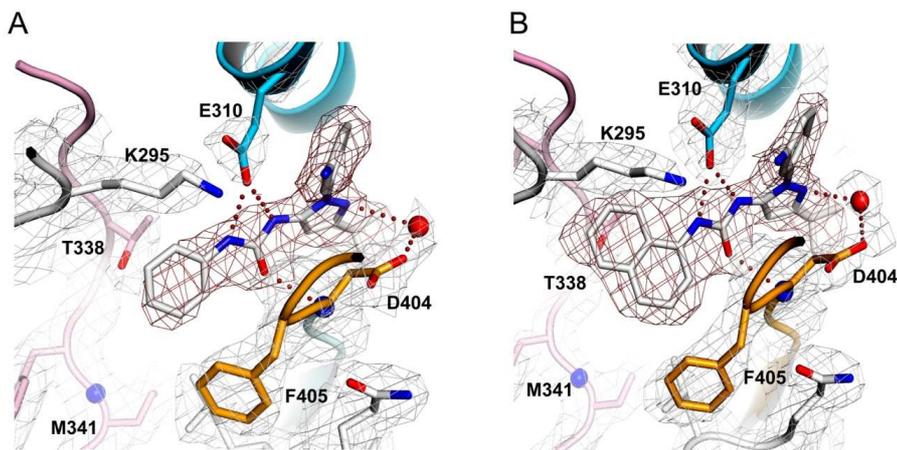


Abbildung 40: (A+B) Proteinkristallstrukturen der cSrc-SM im Komplex mit den Typ-III-Inhibitoren **6** (PDB-Eintrag 3F3U²⁹) und **4** (PDB-Eintrag 3F3T²⁹) (grau). Die Elektronendichten ($2F_0-F_c$) für cSrc (grau) und die Inhibitoren (rot) sind bei 1σ konturiert. Wasserstoffbrückenbindungen sind als rot gepunktete Linien eingezeichnet. Das Phenylalanin des DFG-Motivs (orange) ist in Richtung der Scharnierregion positioniert und zeigt eine typische DFG-out-Konformation. E310 von Helix-C (blau) sowie das Aspartat des DFG-Motivs (D404) interagieren mit der Harnstoffgruppe der beiden Verbindungen. Die Scharnierregion mit M341 wird von keiner der Verbindungen besetzt.

Für strukturbiochemische Untersuchungen wurde zuerst die cSrc-SM, wie in Kapitel 2.2.2.1 beschrieben, in *E. coli*-Zellen exprimiert und mit der FPLC-Anlage aufgereinigt. Die Kristallisationsbedingungen wurden von Seeliger *et al.*¹⁵⁷ übernommen. Die Kristalle wuchsen innerhalb von zwei Tagen in der Raumgruppe P1 und die aufgenommenen Datensätze* hatten eine Auflösung von 2,5 Å. Die Proteinkristallstrukturen wurden

* Der Datensatz wurde am Synchrotron Swiss Light Source in Villigen aufgenommen.

von Dr. C. Grütter gelöst und verfeinert. In Abbildung 40 sind die Proteinkristallstrukturen von cSrc-SM im Komplex mit den Verbindungen **4** und **6** dargestellt. Diese binden, wie angenommen analog zur p38 α -Kinase an die inaktive Kinasekonformation (Abbildung 40). Ausgehend hiervon wurde der für die p38 α -Kinase erfolgreich etablierte FLiK-Assay von Dr. J. Simard auf die cSrc-Kinase adaptiert. Diese Technologie ermöglichte die Identifizierung von Typ-II/III-Inhibitoren über Detektion der positionsändernden Aktivierungsschleife.²⁹

Selektivitätsprofilierung von Typ-III-Inhibitoren

Um Informationen darüber zu erhalten, an welche Kinasen die Pyrazolharnstoffverbindungen binden, wurde eine Selektivitätsstudie gegen 58 Kinasen, die repräsentativ aus fast allen Familien des Kinasestammbaumes ausgewählt wurden, durchgeführt. Hierfür wurde Verbindung **4** sowie die zu Verbindung **5** strukturell ganz ähnliche Verbindung **8** eingesetzt. Die Studie wurde bei der Firma Ambit Bioscience (San Diego, CA, USA) in Auftrag gegeben. Das Prinzip dieser Profilierung basiert auf einem Verdrängungsassay, bei dem eine gegen die ATP-Bindungstasche gerichtete molekulare Sonde an eine feste Phase konjugiert ist. Die in diesem Assay verwendeten Kinasen tragen ein T7-Phagenfragment und können über diese Sonde an die feste Phase binden. Bindet nun eine der zu testenden Verbindungen an diese Kinasen, wird die Fusion mit der Sonde verhindert. Findet keine Anlagerung an die Kinase statt, so kann diese weiterhin ungehindert einen Komplex mit der Sonde eingehen, was mit einem Phagen-Display-Assay oder mit RT-PCR quantifiziert werden kann.^{95,159}

Die Auswertung ist in Abbildung 41 dargestellt. Verbindung **4** bindet in dem KINOMEscanTM-Assay an 13 verschiedene Kinasen mit guter Affinität. (Bei diesen ist der Anteil an Kinase, der an die Sonde gebunden hat, geringer als 30 %.) Bei Verbindung **8** wurden 16 Kinasen gefunden, die unterhalb des Grenzwertes liegen. Möglicherweise können auch diese Kinasen eine DFG-*out*-Konformation einnehmen und stellen Zielproteine für Typ-II/III-Inhibitoren dar. Ein wichtiges Selektivitätsmerkmal für **4** und **8** scheint der Türsteher zu sein.

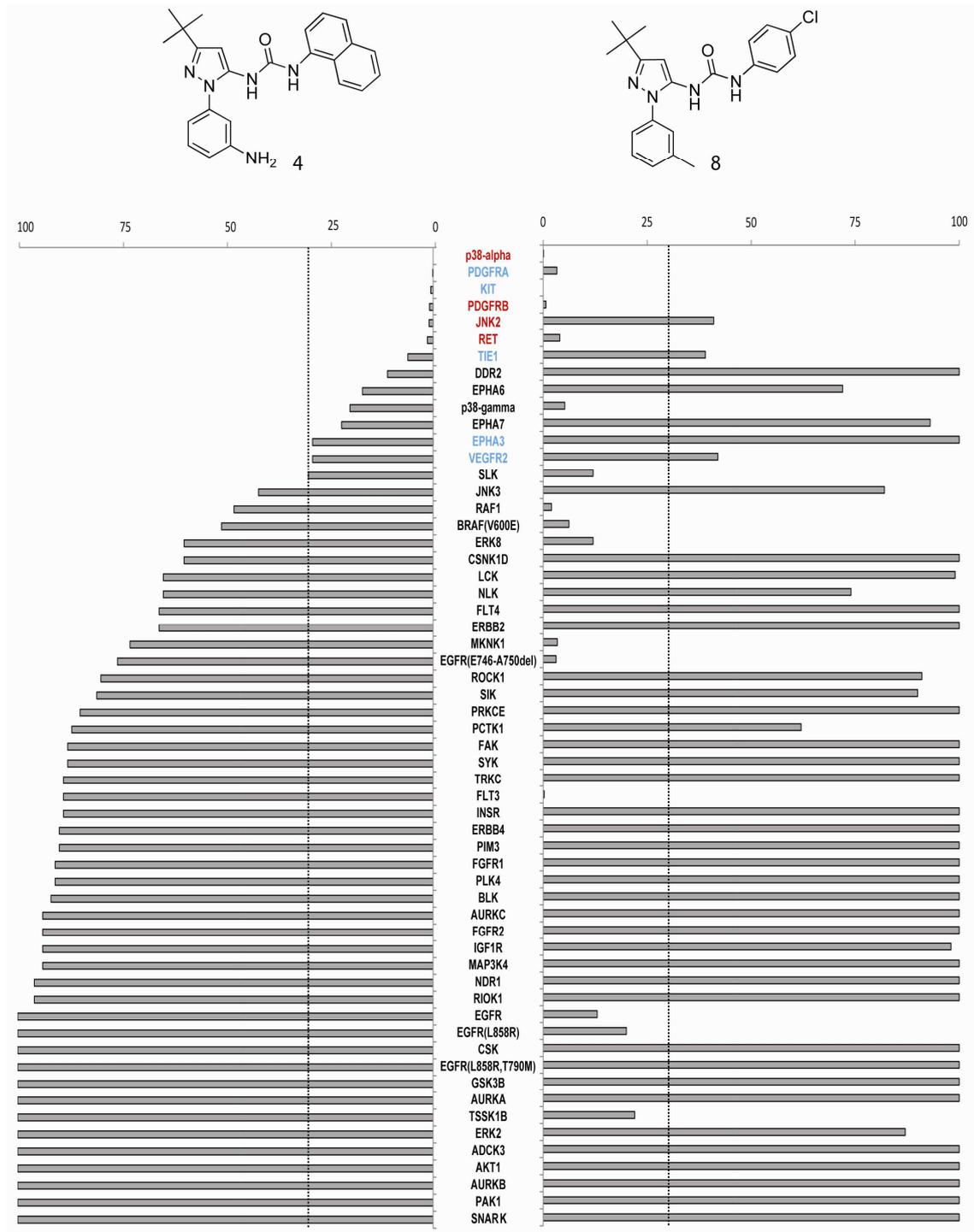


Abbildung 41: Selektivitätsprofilierung der Typ-III-Inhibitoren **4** (links) und **8** (rechts), die mit dem KINOMEScan™-Assay von Ambit Bioscience durchgeführt wurden. Bei den rot eingefärbten Kinasen konnte der EFC-Assay etabliert werden. Die blau gefärbten Kinasen konnten im EFC-Assay nur für Kinasetitrationsen eingesetzt werden. Aufgetragen ist die Menge der an die molekulare Sonde gebundenen Kinase in Prozent. Je kürzer der Balken, desto stärker binden die Testverbindungen an die jeweilige Kinase. Die schwarzgestrichelte Linie markiert den von der Firma Ambit gesetzten Grenzwert, unterhalb der eine Verbindung als Ligand deklariert wird.

Dieser muss möglichst klein sein, damit der Ligand ausreichend Platz hat, in die dahinterliegende hydrophobe Tasche zu binden. Diese Ergebnisse der Selektivitätsstudie waren im Einklang mit den Ergebnissen der Targetvalidierung von Verbindung **4** in

K562-Zellen,^{*} die mit der „KINAXO Cellular Target Profiling[®]“-Methode durchgeführt wurde.^{†,160} Ausgehend von dieser Studie konnte der EFC-Assay für vier weitere Zielproteine, DDR2, RET, JNK2 und PDGFR-A, etabliert werden (Abbildung 42). Hierfür wurde die Detektion dahingehend verändert, dass kurz nach Zugabe der Detektionsreagenzien (EA und chemilumineszierendes Substrat) direkt die Chemilumineszenzmessung erfolgte. Das etablierte System für die JNK2-Kinase diente zur Vermessung einer Kollektion von Typ-II/III-Inhibitoren für Strukturaktivitätsbeziehungen.

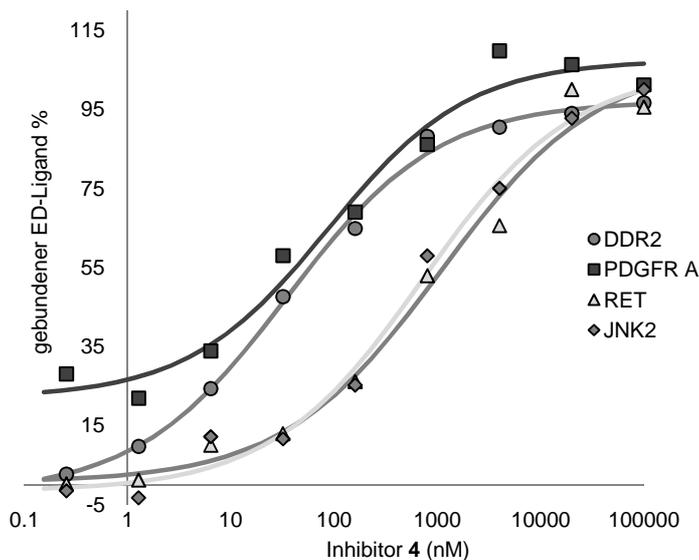


Abbildung 42: Etablierung des Assaysystems auf vier weitere Kinasen. Das Diagramm stellt die Dosiswirkungskurve von **4** mit DDR2, PDGFR A, RET und JNK2 dar.¹⁵⁵

3.2.3.5 SAR-Studien mit dem EFC-Assay

Charakterisierung einer Kollektion mit verschiedenen Kinaseinhibitoren

Nachdem das EFC-System optimiert und angepasst worden war, konnten IC₅₀-Bestimmungen für p38 α sowie für JNK2 durchgeführt werden. Die wichtigste Voraussetzung für diese IC₅₀-Bestimmungen war, dass die Sonde durch den freien Liganden **4** verdrängt werden konnte. Dieses Kriterium wurde erfüllt bei resultierendem IC₅₀-Wert im nanomolaren Bereich (Tabelle 8). Weiterhin war die Übereinstimmung der Inhibitionswerte mit einem orthogonalen System wichtig. Hierfür wurde der HTRF-Assay genutzt, mit dem weitestgehend deckungsgleiche Ergebnisse erzielt wurden. Unter den 30

^{*} Zellen einer Leukämie-Zelllinie (K-562) menschlichen Ursprungs.

[†] Die Experimente wurden im Rahmen einer Kollaboration von der Firma Kinaxo durchgeführt. Das Projekt ist derzeit noch nicht abgeschlossen.

untersuchten Verbindungen gab es Typ-I-, -II- und -III-Inhibitoren, die bekannt waren, p38 α zu inhibieren. Staurosporine und Verbindung **10** dienten als Negativkontrolle. Verbindung **10** kann aufgrund der raumeinnehmenden 2,6-Dichloro-3-trifluormethyphenyl-Gruppe die allosterische Tasche nicht besetzen, was zum Affinitätsverlust führte. Weiterhin zeigten die getesteten Verbindungen keine Interferenzen mit der β -Galactosidase Aktivität. Der Z-Faktor, ein Maß für die Robustheit eines Assaysystems, lag bei 0,7–0,8 für den EFC-Assay und zeigte, dass das System stabil genug ist, um im Hochdurchsatzverfahren verwendet werden zu können.¹⁶¹

$$\text{Z-Faktor} = 1 - \frac{3 * (\sigma_P + \sigma_N)}{|\mu_P - \mu_N|} \quad (11)$$

σ = Standardabweichung

μ = Mittelwert

P = Positivkontrolle

N = Negativkontrolle

Überraschend war, dass mit dem Assaysystem auch potente Typ-I-Inhibitoren detektiert werden konnten. Es ist allerdings vorstellbar, dass diese, eine genügend hohe Bindungsaffinität vorausgesetzt, eine aktive Kinasekonformation erzwingen können, was zur Verdrängung des ED-Liganden führt. Zudem befindet sich die Naphtylgruppe der Sonde in einer hydrophoben Tasche, die auch von einigen Typ-I-Inhibitoren zur Bindung genutzt wird.

Des Weiteren sollte untersucht werden, wie sich der EFC-Assay in Anwesenheit von ATP verhält. Bei Konzentrationen im millimolaren Bereich ist ATP in der Lage, die Sonde zu verdrängen. Bei der aktiven Kinase ist diese Verdrängung stärker ausgeprägt als bei der inaktiven Form. Auch hier spielt wahrscheinlich das Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Kinase eine Rolle. Diese Versuchsreihe unterstreicht die Beobachtung, dass die Kinase in einem äußerst sensiblen Gleichgewicht zwischen den beiden Zuständen vorliegt, welches sehr einfach durch spezifische Liganden beeinflusst werden kann.

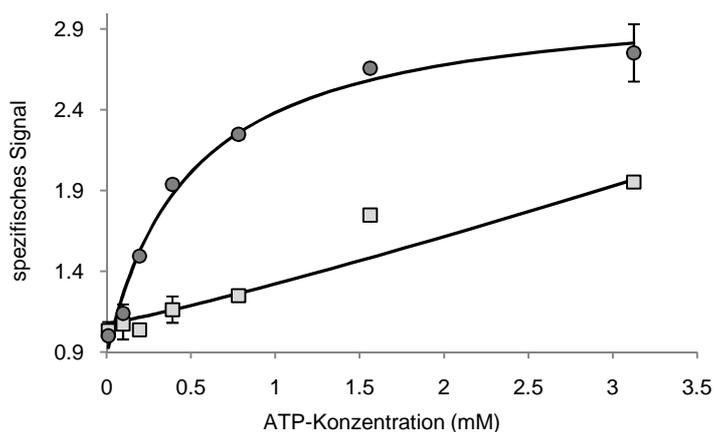


Abbildung 43: ATP-Titration mit dem EFC-Assay. Die dunkelgrauen Punkte zeigt die Titration für die aktive Kinase, die Hellgrauen die für die inaktive Kinase. Bei ATP-Konzentration im millimolaren Bereich, wird der ED-Ligand durch ATP verdrängt.

Proteinkristallografische Analyse

Zur besseren Interpretation der Messergebnisse mit dem EFC-Assay und zum besseren Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehungen einzelner Liganden wurden die Proteinkristallstrukturen von p38 α im Komplex mit den Chinolinen **19**, **21** und **22** sowie mit Verbindung **11**, einem Derivat von **12** (BIRB 796), gelöst.*

* Die Proteinkristallografie wurde von Dr. C. Grütter durchgeführt.

Proteinkristallstruktur im Komplex mit **11** und **12**

Die oben durchgeführten Inhibitionsstudien zeigten, dass das BIRB-796 Analogon **12** circa zehnfach schlechter bindet als **11** (BIRB-796). Dieses unterscheidet sich allerdings von **11** nur dadurch, dass es anstelle der Naphtylgruppe eine Phenylgruppe trägt. Regan *et al.*¹⁵² erklärten den Affinitätsverlust dadurch, dass die frei bewegliche Phenylgruppe eine ungünstige Orientierung der Ethoxyaminomorpholin-Gruppe hervorruft, wodurch die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung an die Scharnierregion beeinträchtigt wird. Die Proteinkristallstruktur von p38 α im Komplex mit Verbindung **12** zeigte allerdings, dass die Wasserstoffbrückenbindung zur Scharnierregion (M109) vorhanden ist. Überlagert man diese mit der Proteinkristallstruktur von **11** (PDB-Eintrag 1KV2),¹²⁷ wird ersichtlich, dass die Naphtylgruppe von **11** tief in eine hydrophobe Seitentasche hineinragt, was bei **12** nicht der Fall ist (Abbildung 44A). Dies führt zu einer besseren Affinität gegenüber **12**, da der hydrophobe Wechselwirkungsanteil bei **11** signifikant größer ist. Ansonsten nehmen beide Verbindungen den gleichen Bindungsmodus ein, bei der die Kinase in der DFG-*out*-Konformation vorliegt und der Inhibitor Wasserstoffbrückenbindungen zur Helix-C (E71) sowie zum Aspartat des DFG-Motivs (D168) ausbildet.

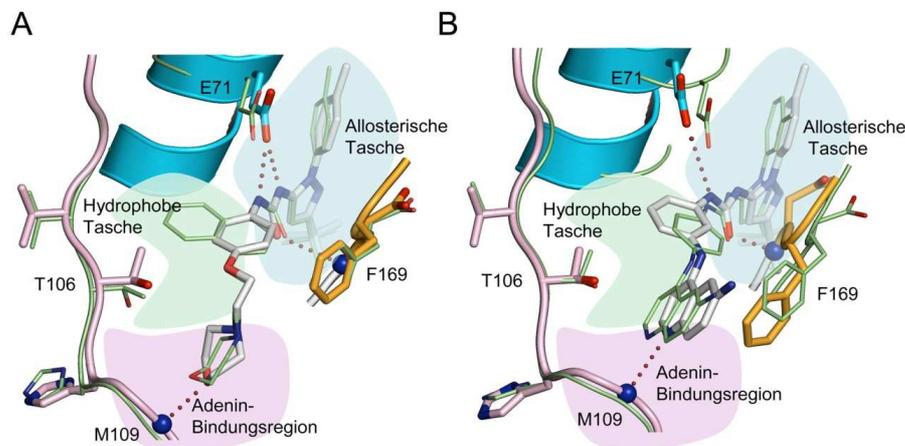


Abbildung 44: Proteinkristallstruktur mit verschiedenen Pyrazolharnstoffverbindungen. Die farblich unterlegten Areale in (A) und (B) veranschaulichen die verschiedenen von Typ-II-Inhibitoren besetzten Bereiche der ATP-Bindungstasche. (A) Überlagerung der Proteinkristallstrukturen von **11** (grün, PDB-Eintrag 1KV2¹²⁷) und **12** (grau, PDB-Eintrag 3HV6¹⁵⁵) verdeutlichen, dass **11** sehr viel tiefer in die hydrophobe Tasche hineinragt. (B) Die Überlagerung der Proteinkristallstruktur von **21** (grau, 1,3-verknüpft, PDB-Eintrag 3HV5¹⁵⁵) mit **19** (grün, 1,4-verknüpft, PDB-Eintrag 3HV3¹⁵⁵), zeigt, dass **21** die hydrophobe Tasche stärker besetzt.

Proteinkristallstrukturen im Komplex mit 1,3-verknüpften und 1,4-verknüpften Pyrazolharnstoffderivaten

Aus der in Tabelle 8 aufgeführten Versuchsreihe ging hervor, dass 1,3-verknüpfte Pyrazolharnstoffe die p38 α -Kinase wesentlich potenter hemmen können, als die 1,4-verknüpften Analoga. Zur Aufklärung dieser Beobachtung wurde die Proteinkristallstruktur von den Chinolinen **21** und **19** gelöst (Abbildung 44B). Bei Überlagerung der beiden Proteinkristallstrukturen zeigte sich, dass beide Inhibitoren die inaktive Kinasekonformation stabilisieren (DFG-out) und die typischen Interaktionen eines Typ-II-Inhibitors eingehen. Die Bedeutsamkeit der hydrophoben Tasche kam auch in dieser SAR-Studie zum Tragen. Der Affinitätsunterschied liegt erneut der besseren Ausfüllung der hydrophoben Tasche zugrunde. Der gleiche Trend wurde auch bei den Chinazolin-Derivaten **14** und **16** und den Analoga **17** und **18** beobachtet und konnte ebenfalls strukturell belegt werden.¹⁵⁴

Interessant waren auch die biochemischen Untersuchungen dieser Hybridverbindungen in der JNK2-Kinase (Tabelle 8), einer zu p38 α strukturell ähnlichen Kinase. Auffällig war zunächst, dass die Chinoline **19** und **27** sehr viel besser gebunden haben als die Chinazoline **14**, **17**, **18**. Außerdem tendierten 1,4-verknüpfte Hybridinhibitoren zu einer besseren Bindung als die Inhibitoren mit 1,3-Verknüpfung (**14** und **17**, sowie **19** und **27**). Dies kann wiederum durch den Zugang zur hydrophoben Tasche erklärt werden. Die JNK2-Kinase trägt als Türsteher ein Methionin, welches im Vergleich zum Threonin in p38 α sehr viel mehr Raum im Bereich der hydrophoben Tasche einnimmt. Die 1,4-verknüpften Verbindungen können wahrscheinlich durch die freie Drehbarkeit der Phenylgruppe die sterisch anspruchsvolle Aminosäure besser umgehen und dadurch besser binden. Gleiches zeigte sich auch bei der Türstehermutation T338M in cSrc.⁵⁹ Um hochauflösende Kristallstrukturen mit Typ-II-Inhibitoren zu erhalten, wurden mit einer Kristallisations-Screening-Kampagne optimierte Kristallisationsbedingungen gesucht. Mit den bekannten Kristallisationsbedingungen konnten keine verwertbaren Proteinkristalle mit Typ-II-Inhibitoren generiert werden. Ein Teil dieser Arbeit wurde publiziert.⁵⁹

*Proteinkristallstruktur von p38 α im Komplex mit **21** und **22***

Der potenteste Inhibitor der getesteten Kollektion aus Tabelle 8 war die Nitro-Verbindung **22**. Die dazu analoge Amin-Verbindung **21** bindet dreimal schwächer als **22**. Gleiches konnte auch bei anderen Nitroverbindungen beobachtet werden (siehe Ta-

belle 8). Zur Aufklärung der Strukturaktivitätsbeziehung wurden für **21** und **22** die Proteinkomplexstrukturen gelöst (Abbildung 45).

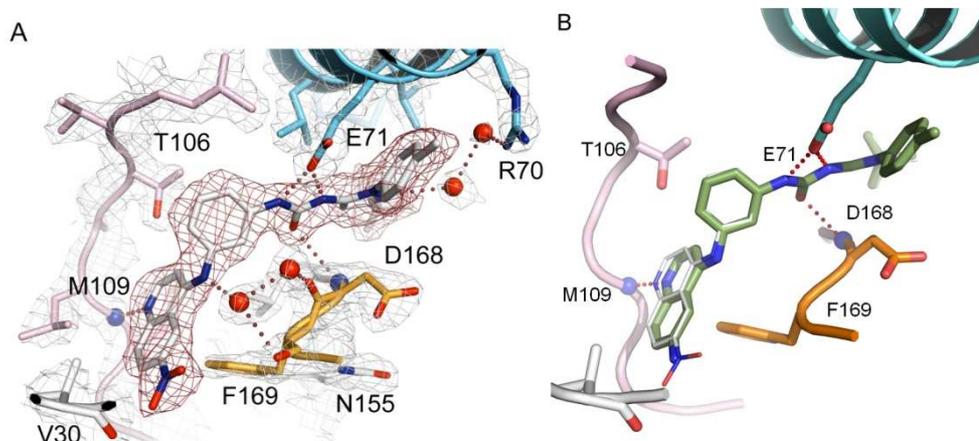


Abbildung 45: (A) Proteinkristallstruktur der inaktiven p38α-Kinase im Komplex mit dem potentesten Inhibitor (**22**) der gemessenen Inhibitor Kollektion. Die $2F_0-F_c$ Elektronendichte des Liganden (rot) und des Proteins (grau) sind bei 1σ konturiert (PDB-Eintrag 3HV5¹⁵⁵). (B) Überlagerung der mit den Verbindungen **22** und **21** enthaltenen Proteinkristallstrukturen (PDB-Eintrag 3HV5 und 3HV4¹⁵⁵).

Die Verbindungen **21** und **22** nehmen den gleichen Bindungsmodus ein und führen die gleichen, für Typ-II-Inhibitoren klassischen, Wechselwirkungen mit der Kinase aus. Anhand dieser Kristallstrukturen konnte der beobachtete Unterschied in den Bindungsaffinitäten somit nicht erklärt werden. Zum besseren Verständnis der Protein-Ligand-Wechselwirkung wurden daher die freien Bindungsenthalpien für die beiden Verbindungen **21** und **22** mit dem Hyde-Programm berechnet.¹⁶² Mit diesem Programm wird die freie Bindungsenthalpie (ΔG_{total}) eines Protein-Ligand-Komplexes als Summe über die Beträge aller Rezeptor- und Ligand-Atome i zur Wasserstoffbrücken- und Desolvatationsenthalpie ermittelt.

$$\Delta G_{\text{total}} = \sum_i (\Delta G^i_{\text{Wechselwirkung}} + \Delta G^i_{\text{Desolvatation}}) \quad (12)$$

Zur Bestimmung der Desolvationsenthalpie werden die plogP-Werte einzelner Atome im Molekül bestimmt. Zur Bestimmung der Wechselwirkungsenthalpie ($\Delta G_{\text{Wechselwirkung}}$) einer polaren Gruppe mit einem Lösungsmittelmolekül wird die ideale Wechselwirkungsenergie der polaren Gruppe mit einem Wassermolekül in der Gasphase berechnet. Vor der Berechnung wurde eine Geometrieoptimierung der Kristallstrukturen mit ProTos und Optimise durchgeführt. Anhand der berechneten Bindungsenthalpien wird in Abbildung 46 verdeutlicht, dass durch die Nitrogruppe eine wesentlich größere Wechselwirkungsenthalpie erzeugt wird als durch die Aminfunktion. Da die Desolvatationsenthalpie ($\Delta G_{\text{Desolvatation}}$) beider Moleküle identisch

ist, wirkt sich dies direkt auf die totale Bindungsenthalpie der Protein-Ligand-Wechselwirkung aus, was die erhöhte Bindungsaffinität von **22** erklärt. Die computer-gestützte Analyse wurde von Mitarbeitern der Firma Bayer CropScience (Monheim) durchgeführt.

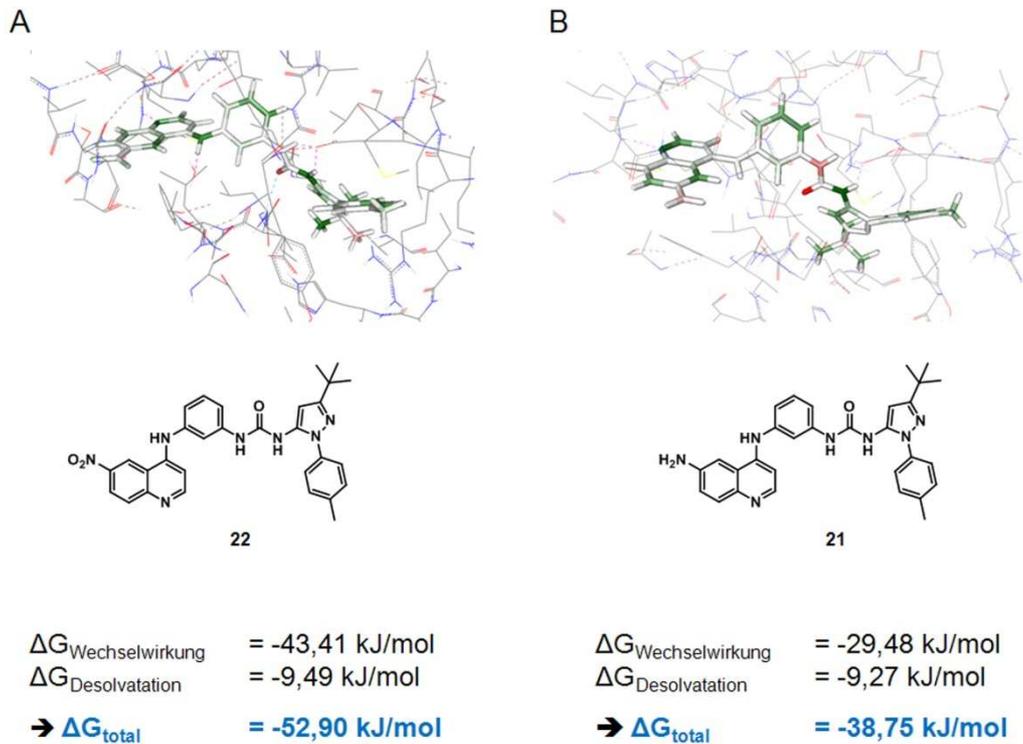


Abbildung 46: Berechnung der freien Bindungsenthalpie mit dem Hyde Programm nach Geometrieoptimierung der Kristallstrukturen mit ProTos und Optimised. (A+B) Farbcodierte Darstellung von Ligand **22** (PDB-Eintrag 3HV5¹⁵⁵) und Ligand **21** (PDB-Eintrag 3HV4¹⁵⁵). In grün sind jeweils die negativen, stabilisierenden Beiträge zur Bindungsenthalpie dargestellt, die rot markierten Atome zeigen die positiven und damit destabilisierenden Beiträge zur Bindungsenthalpie. Die errechneten Bindungsenthalpien für die beiden Protein-Ligand-Komplexe sind unter der chemischen Struktur aufgelistet.

Zudem wurden weitere physikochemische Unterschiede identifiziert: Aufgrund eines +M-Effektes der Aminfunktion bei **21** ist das Stickstoffatom des Chinolingrundgerüsts basischer als mit einer Nitrogruppe (-M-Effekt). Dieses wirkt sich günstig auf die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung mit der Scharnierregion aus, was allerdings keinen großen Einfluss auf die gesamte Bindungsenthalpie zu haben scheint. Stärker ins Gewicht fällt wohl der unterschiedliche Dipolmoment beider Verbindungen. Physikochemische Berechnungen der Firma Bayer CropScience haben gezeigt, dass Verbindung **22** und **21** über einen in Größe und Richtung unterschiedlichen Dipolvektor verfügen, welcher sich bei Verbindung **22** günstiger auf die Wechselwirkungen in der Scharnierregion der ATP-Bindungstasche auswirkt als bei Verbindung **21**.*

* Die Berechnungen wurden mit der MOCCA-Analyse generiert.

3.3 Zusammenfassung

Auf dem Gebiet der Wirkstoffentwicklung für die Zielproteine der Kinasen gab es in den letzten zehn Jahren rasante Fortschritte.¹⁸ Jedoch bleiben einige Herausforderungen, wie zum Beispiel die eingeschränkte Inhibitorselektivität einiger Typ-I-Inhibitoren sowie die durch Mutationen ausgelösten Wirkstoffresistenzen.^{23,26,163} Liganden, die einen alternativen Bindungsmodus einnehmen und an die inaktive Kinasekonformation binden, eröffnen neue Möglichkeiten in der Überwindung dieser Hürden.²¹ Zur Detektion von Kinaseinhibitoren werden vorwiegend Assaysysteme eingesetzt, die auf enzymatischer Aktivität beruhen und den durch Inhibitoren induzierten Rückgang der Substratphosphorylierung messen. Diese Methoden bedingen aber, dass sich die Kinase vorwiegend in der aktiven DFG-*in*-Konformation befindet, was die Detektion von Stabilisatoren der inaktiven Konformation (DFG-*out*) einschränkt.

Um der Nachfrage nach einem adäquaten Assaysystem für Typ-II/III-Inhibitoren entgegenzukommen, wurde ein Detektionssystem entwickelt, welches auf die Verdrängung eines Typ-III-Liganden beruht, der die inaktive Kinasekonformation stabilisiert, und somit das Auffinden neuer Typ-II/III-Inhibitoren begünstigt. Dieser Ligand wurde aus einer kleinen synthetisch hergestellten Kollektion als Verbindung mit höchster Affinität zur p38 α -Kinase ausgewählt, und dessen allosterischer Bindungsmechanismus strukturbiologisch bestätigt. Das Detektionssystem beruht auf der bekannten Enzym-Fragment-Komplementations-Technologie der β -Galactosidase¹³⁹ und zeichnet sich vor allem durch ein robustes Verhalten gegenüber störende Fluoreszenzinterferenzen durch die zu testenden Verbindungen aus.¹³⁴

Nach erfolgreicher Etablierung des Assaysystems für die p38 α -Kinase wurden Bindungsstudien mit teils bekannten sowie vorwiegend von der AG Rauh hergestellten Inhibitoren durchgeführt. Inhibitionsmessungen mit einem orthogonalen Assaysystem zeigten gleiche Inhibitionstendenzen der einzelnen Verbindungen. Die interessantesten Hits dieser Versuchsreihe wurden für SAR-Studien kristallisiert. Die Ergebnisse zeigten, dass eine hydrophobe Seitentasche im ATP-Bindungsbereich einen großen Einfluss auf die Affinität der Verbindungen hat. Nach einer von der Firma Ambient-Bioscience durchgeführten Kinaseprofilierung mit dem Liganden, der zur Herstellung der Sonde verwendet wurde, konnte das Assaysystem auf weitere Kinasen adaptiert werden. Für die JNK2-Kinase wurden mehrere Kinaseinhibitoren vermessen, die weitere Struktur-Aktivitäts-Studien ermöglichten. Ein guter Z-Faktor,¹⁶¹ der auf ein robustes, sensibles

Assaysystem hindeutet und die Verminderung des Reaktionsvolumens auf 20 μ L macht das Assaysystem für die Vermessung von Substanzen in größerem Umfang tauglich. Da zudem die rekombinante Herstellung der p38 α -Kinase gut etabliert ist, ist die Vermessung einer größeren Substanzkollektion ein mögliches Projekt zum Fortführen dieser Arbeit. Des Weiteren wäre auch ein Screening-Projekt mit der JNK2-Kinase interessant, da es zwar publizierte JNK2-Kinaseinhibitoren gibt, jedoch die Selektivität gegenüber der strukturell ähnlichen p38 α -Kinase noch große Schwierigkeiten bereitet.¹⁶⁴ Mit dem hier etablierten System könnte die Affinität einzelner Verbindungen in beiden Kinasen getestet werden.

Ein Teil der Ergebnisse dieses Projektes wurde in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Simard JR, Klüter S, Grütter C, Getlik M, Rabiller M, Rode HB, Rauh D. A new screening assay for allosteric inhibitors of cSrc. *Nat Chem Biol* **5**, 394-396 (2009).

Getlik M, Grütter C, Simard JR, Klüter S, Rabiller M, Rode HB, Robubi A, Rauh D. Hybrid compound design to overcome the gatekeeper T338M Mutation in cSrc. *J Med Chem* **52**, 3915-3926 (2009)

Klüter S, Grütter C, Naqvi T, Rabiller M, Simard JR, Pawar V, Getlik M, Rauh D. Displacement assay for the detection of stabilizers of inactive kinase conformations. *J Med Chem* **53**, 357-367 (2010).

Simard JR, Grütter C, Pawar V, Aust B, Wolf A, Rabiller M, Wulfert S, Robubi A, Klüter S, Ottmann C, Rauh D. High-throughput screening to identify inhibitors which stabilize inactive kinase conformations in p38alpha. *J Am Chem Soc* **131**, 18478-18488 (2009)

4 Assaysystem zur Detektion von allosterischen Inhibitoren der Abl-Kinase

4.1 Allgemeiner Teil

4.1.1 Aufbau und Funktion der Abl-Kinase

Die Tyrosinkinase Abl (*cellular Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*) ist ein in der Nähe der Zellmembran verschiedener Körperzellen vorkommendes Protein, das in vielen zellulären Prozessen, wie beispielsweise der Zellmigration, -adhäsion, -differenzierung sowie Apoptose involviert ist.^{165,166} Die Abl-, Src- und auch Tec-Familie bilden eine Superfamilie der Tyrosinkinasen, die N-terminal zur katalytischen Domäne eine SH2- und SH3-Domäne besitzen. Diese drei Abschnitte sind unter allen Vertretern dieser Superfamilie stark konserviert. Geringere Homologie gibt es in den Bereichen, die C-terminal zur Kinasedomäne liegen. Die Abl-Kinase verfügt in diesem Abschnitt über eine Exonregion mit DNA- und Aktin-bindenden Domänen und weiteren funktionellen Elementen wie beispielsweise Kernlokalisationssequenzen und ein Kernexportsignal, die der schnellen Relokalisation von Abl zwischen Zellkern und Zytoplasma dienen.

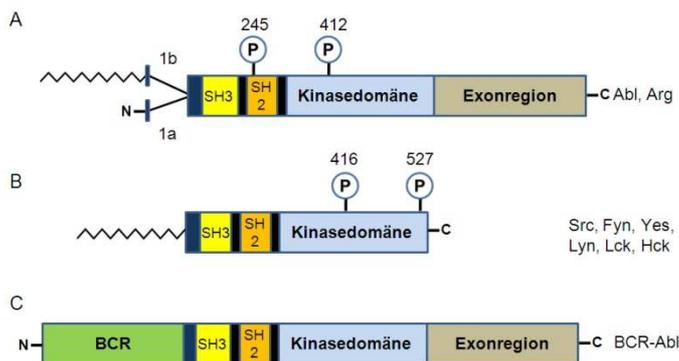


Abbildung 47: Darstellung des Aufbaus der Tyrosinkinase Abl (A), Src (B) und des Onkoproteins BCR-Abl (C). Strukturell ähnliche Kinasen zu (A) und (B) sind rechts aufgelistet.²⁰

Durch unterschiedliches *Splicing* können bei der Abl-Kinase zwei N-terminal-versehene Proteinsequenzen, nämlich Variante 1a und 1b gebildet werden. Die Variante 1b kann von der N-Myristoyltransferase in der „Cap“-Region, die N-terminal zur SH3-Domäne liegt, myristoyliert werden.¹⁶⁵ Dies dient zur Autoinhibition der katalyti-

schen Aktivität. Die SH2- und SH3-Domäne unterstützen diese Autoregulation.²⁰ Die Tyrosinkinase der Src-Familie werden auch myristoyliert, was allerdings nicht zur Autoregulation dient. Stattdessen übernimmt die Autoinhibition bei der Src-Kinase eine Phosphatgruppe in Position T527 durch Bindung an die eigene SH2-Domäne, wodurch die inaktive Kinasekonformation induziert wird.¹⁶⁷

Autoinhibition der Abl-Kinase

Die Regulation der Autoinhibition wird auch als „Schalter-Klammer-Riegel“-Mechanismus bezeichnet.¹⁶⁷

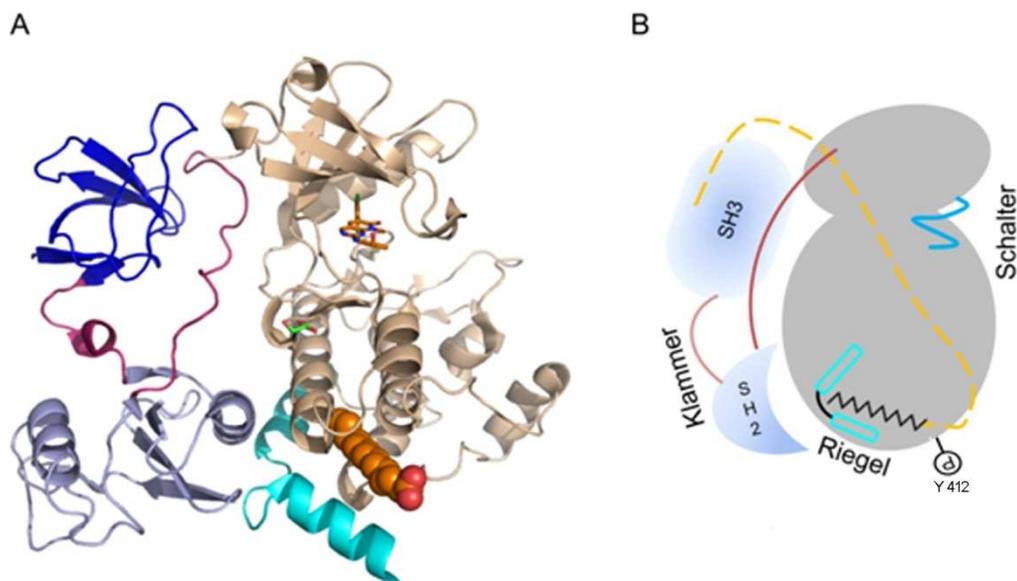


Abbildung 48: (A) Proteinkristallstruktur der Abl-Kinase bestehend aus katalytischer (hellbraun), SH2- (hellblau) und SH3-Domäne (marine-blau) (PDB-Eintrag 1OPK).²⁰ Myristat (orange) bindet an die hydrophobe Tasche der Helix-I (türkis). In der ATP-Bindungs tasche bindet der Typ-I-Inhibitor PD166326 (orange). Der SH2-Linker und der SH3-Linker sind in rot dargestellt. (B) Schematische Darstellung des „Schalter-Klammer-Riegel“-Mechanismus der Abl-Kinase.

Hierbei fungiert die Aktivierungsschleife, die sich in der katalytischen Domäne zwischen dem N- und C-terminalen Bereich befindet, als Schalter. Dieser bewegt sich „Ein“ und „Aus“ und zwingt die Kinase in die katalytisch aktive und inaktive Konformation. Die Phosphorylierung in Position Y412 kann das Gleichgewicht zur aktiven Konformation verschieben. Die „Klammer“ wird von der SH3- und SH2-Domäne gebildet, die sich distal zur katalytischen Domäne befindet und die inaktive Konformation der Kinase stabilisiert. Hierbei bildet die SH3-Domäne mit dem N-terminalen Bereich der katalytischen Domäne sowie mit dem SH2-Linker einen stabilen Komplex. Die SH2-Domäne bindet über ein Netzwerk an Wasserstoffbrückenbindun-

gen und elektrostatischen Wechselwirkungen an eine teils hydrophobe Region im C-terminalen Bereich der katalytischen Domäne. Aufgrund eines starren Zwischenstücks zwischen SH2- und SH3-Domäne sowie der beschriebenen Interaktionen der SH2- und SH3-Domäne mit der katalytischen Domäne wird der Zugang für ATP und Substrat in der ATP-Bindungstasche erschwert. Dieser Komplex wird durch den sogenannten „Riegel“, einer am N-terminalen Bereich der SH3-Domäne lokalisierten myristoylierten Region, stabilisiert. Hierbei bindet Myristat in eine hydrophobe Tasche im C-terminalen Bereich der Kinase und induziert eine Konformationsänderung der Helix-I. Durch die Bindung des am N-Terminus konjugierten Myristats wird der sogenannte „Klammer“-Effekt wirksam, indem die SH2-Domäne fest an den C-Terminus der katalytischen Domäne bindet.¹⁶⁸ Außerdem können zusätzliche mit Fettsäuren modifizierte Proteine, wie beispielsweise Fus1, die inaktive Kinasekonformation stabilisieren.¹⁶⁹

4.1.2 Die Rolle von BCR-Abl in Zusammenhang mit der chronisch myeloischen Leukämie (CML)

Das wie sein Proteinprodukt genannte Gen cAbl ist auf dem Chromosom 9, Genlocus q34 codiert. Es stellt ein Protoonkogen dar, bei dem durch chromosomale Translokation zwischen Chromosom 22 und 9 das Onkogen BCR-Abl entsteht.¹⁷⁰

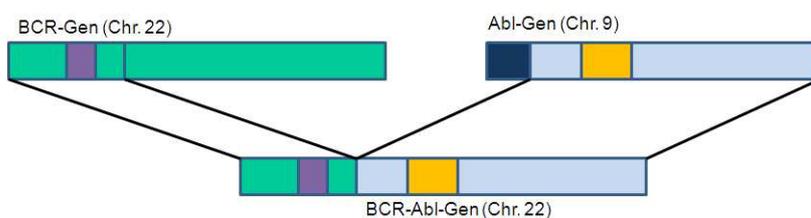


Abbildung 49: Schematische Darstellung der Zusammensetzung des Philadelphia-Chromosoms BCR-Abl. Grün: BCR-Gen, Violett: Abl-aktivierende Region, hellblau: Abl-Gen, gelb: Katalytische Domäne von Abl, dunkelblau: *Cap*-Region zur Autoregulation von Abl. Chr.: Chromosom

Dieses Genprodukt wird auch Philadelphia-Chromosom genannt und war die erste identifizierte Chromosomenveränderung, die mit der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht wurde.¹⁷¹ Das neue Genprodukt enthält N-terminal das BCR-Protein und C-terminal die Abl-Kinase (Abbildung 49). Bei der Fusion von BCR und Abl wird die autoregulatorische *Cap*-Region der Kinase eliminiert. Dieser Verlust führt zu einer permanenten katalytischen Aktivität der Kinase, was mit einem unkontrollierten Zellwachstum einhergeht. Das Philadelphia-Chromosom tritt häufig in pluripotenten

Stammzellen auf, die daraufhin genetisch veränderte Zellen produzieren.^{165,170} Die pathologische Veränderung tritt jedoch nur in den Leukozyten auf und stellt die Ursache für chronisch myeloische Leukämie (CML) bei 90-95 % der auftretenden Fälle dar. Aufgrund der konstitutiven Kinaseaktivität von Abl werden zur Behandlung dieser Form der Leukämie Kinaseinhibitoren eingesetzt.^{172,173}

4.1.3 Abl-Inhibitoren der ersten Generation

Die Entwicklung des ersten in der Krebstherapie eingesetzten Kinaseinhibitors Imatinib (Glivec®) begann in den 80er Jahren mit der Optimierung von 2-Aminopyrimidinen, als Inhibitoren der Proteinkinase C.^{174,175} Im Jahr 2001 wurde Imatinib als BCR-Abl- und Abl-Inhibitor für die Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) zugelassen. Aufgrund der guten Inhibition von KIT und PDGFR erfolgte ein Jahr später die Zulassung für die schwer therapierbaren gastrointestinalen Stromatumore (GIST).¹⁷⁶ Außerdem zeigte Imatinib einen Effekt bei DDR1-bedingten Hirntumoren sowie beim Merkelzellkarzinom.⁸³

Bei 90 % aller mit Imatinib behandelten CML-Patienten erfolgte für die Dauer von einem Jahr eine totale Remission des Blutbildes. Allerdings treten in der Langzeitbehandlung, wie bei anderen Kinaseinhibitoren, Resistenzen auf. Diese können aufgrund von mutationsbedingten Veränderungen der BCR-Abl-Kinase auftreten (BCR-Abl-abhängig) oder aufgrund einer Veränderung der Signaltransduktion von Abl entstehen.¹⁷⁷⁻¹⁷⁹ Hierbei kommt es zur Aktivierung von Kinasen der Src-Familie, die BCR-Abl phosphorylieren und damit aktivieren (BCR-Abl-unabhängig). Für letztere Resistenzmechanismen werden dualspezifische Abl/Src-Kinaseinhibitoren eingesetzt.¹⁶⁵ Weitaus häufiger finden Resistenzen durch Mutationen in der Abl-Kinase statt. Bislang sind mehr als 100 Mutationen an 57 verschiedenen Positionen der Kinase bekannt. Davon liegen 30-40 % aller Mutationen in der glycinreichen Schleife durch Steigerung der katalytischen Aktivität.¹⁶⁵ Die stärksten Auswirkungen hat jedoch die Türstehermutation T315I, die oberhalb der Scharnierregion liegt. Bis jetzt ist noch kein Inhibitor bekannt, der alleinig die dadurch resultierende Resistenz überwinden kann.

Bindungsmechanismus Imatinib

Imatinib ist ein Typ-II-Inhibitor und bindet somit an die inaktive Konformation der Abl-Kinase.¹⁸⁰ Wie charakteristisch für diese Klasse, bildet Imatinib über eine Amidfunktion Wasserstoffbrückenbindungen zum Aspartat des DFG-Motivs und zum Glutamat der Helix-C. Weiterhin werden Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Anilinopyrimidin (Amin) zum Türsteher-Methionin gebildet sowie mit dem Stickstoff des Pyridins zu M318 der Scharnierregion. Mit der Benzamidgruppe verankert sich der Inhibitor in der hydrophoben allosterischen Tasche, die nur in der inaktiven Kinase-Konformation zugänglich ist. Weiterhin besetzt der hydrophobe 2,4-substituierte Toluolrest die hydrophobe Tasche hinter dem Türsteher und die glycinreiche Schleife legt sich zusätzlich über den Inhibitor. Der N-Methylpiperazin-Rest verbessert die Löslichkeit und die orale Bioverfügbarkeit der Verbindung.

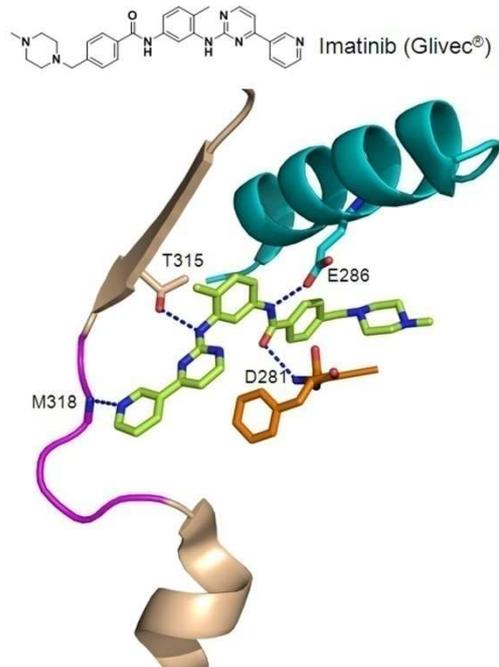


Abbildung 50: Proteinkristallstruktur der Abl-Kinase im Komplex mit Imatinib (PDB-Eintrag 1OPJ²⁰). Folgende Regionen der ATP-Bindungstasche sind dargestellt: Scharnierregion (pink), Helix-C (hellblau), DFG-Motiv (orange) und Imatinib (grün).

4.1.4 Abl-Inhibitoren der zweiten Generation

Inhibitoren der zweiten Generation wurden entwickelt, um die zur Resistenz von Imatinib führenden sekundären Mutationen zu überwinden. Zwei prominente Vertreter dieser Klasse sind Nilotinib (Tasigna[®]) und Dasatinib (Sprycel[®]).¹⁸¹ Der zu Imatinib in

Struktur und Bindungsmechanismus ganz ähnliche Inhibitor Nilotinib bindet 30-mal stärker als Imatinib und inhibiert die meisten BCR-Abl-Mutanten in physiologischen Konzentrationen.¹⁸ Auch diese Verbindung bindet an die inaktive Kinasekonformation und interagiert mit der Scharnierregion über den N-Pyridin-Substituenten. Die Inhibitionsverbesserung wurde vor allem durch Interaktionen einer 5-Trifluorphenylbenzoesäure mit der hydrophoben, allosterischen Tasche erzielt. Somit wird eine günstigere topologische Anpassung an die Kinase erzielt als bei Imatinib.

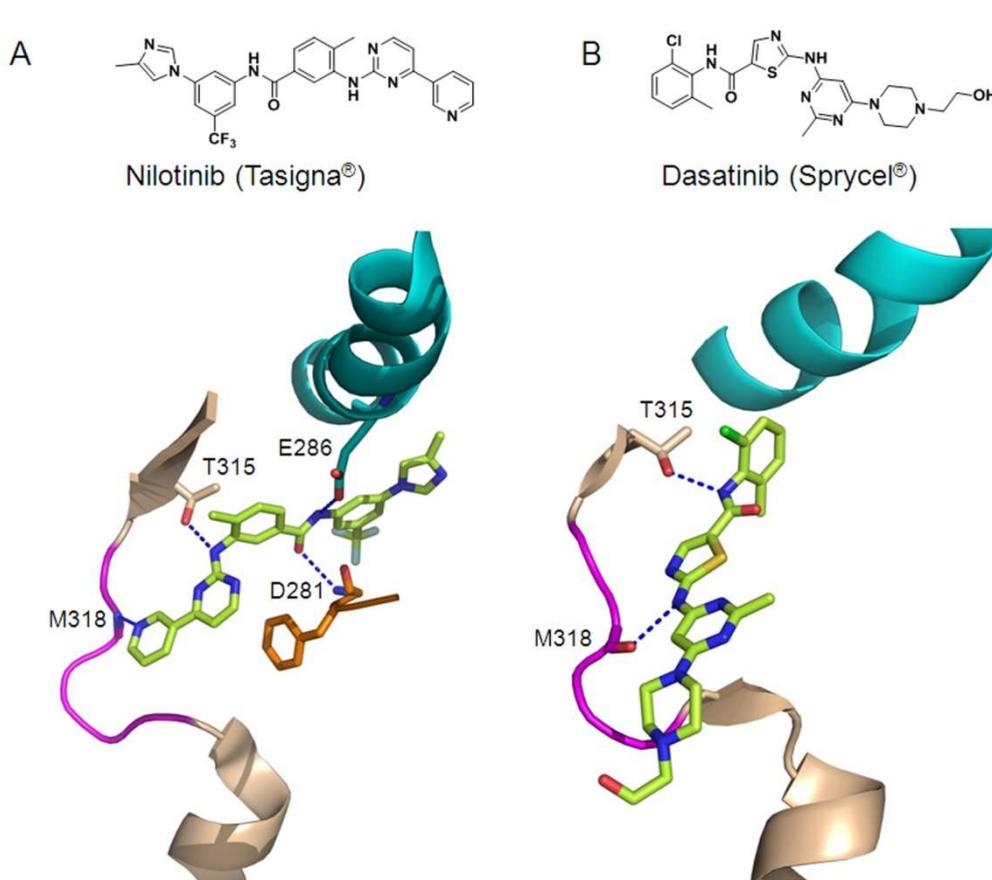


Abbildung 51: Inhibitoren der zweiten Generation. (A+B) Proteinkristallstruktur der Abl-Kinase im Komplex mit Nilotinib (PDB-Eintrag 3CS9¹⁸²) (A) und Dasatinib (PDB-Eintrag 2GQG¹⁸³) (B). Folgende Regionen der ATP-Bindungstasche sind dargestellt: Scharnierregion (türkis), Helix-C (hellblau), DFG-Motiv (orange) und Imatinib (grün).

Anders als Imatinib und Nilotinib bindet der Src/Abl-dualspezifische Inhibitor Dasatinib an die aktive Kinasekonformation. Wie charakteristisch für ATP-kompetitive Inhibitoren, werden Interaktionen zur Scharnierregion (M318) sowie zum Türsteher T315 ausgebildet. Wie schon für Nilotinib beschrieben, inhibiert auch Dasatinib sehr viele Mutanten, die die Inhibition von Imatinib beeinträchtigen. Allerdings bleibt ähnlich wie bei EGFR die Inhibition der Türstehermutante eine schwierige noch nicht gelöste Aufgabe.

Zur Umgehung dieser prominenten Mutante, die den Erfolg vieler Kinaseinhibitoren in der Krebstherapie beeinträchtigt, haben Zhang *et al.*¹⁸⁴ Studien mit der Kombinationstherapie eines allosterischen Inhibitors und einem potenten Typ-II-Inhibitor durchgeführt. Erst der synergistische Effekt zweier Verbindungen, die unabhängig voneinander die Kinaseaktivität hemmen, ermöglicht die wirksame Inhibition der Türstehermutante. Weisberg *et al.*¹⁸⁵ zeigten in *in vivo* Studien, dass die kombinatorische Behandlung einen signifikanten Tumorrückgang bei Mäusen mit T315I-positiver CML hervorruft.¹⁸⁶

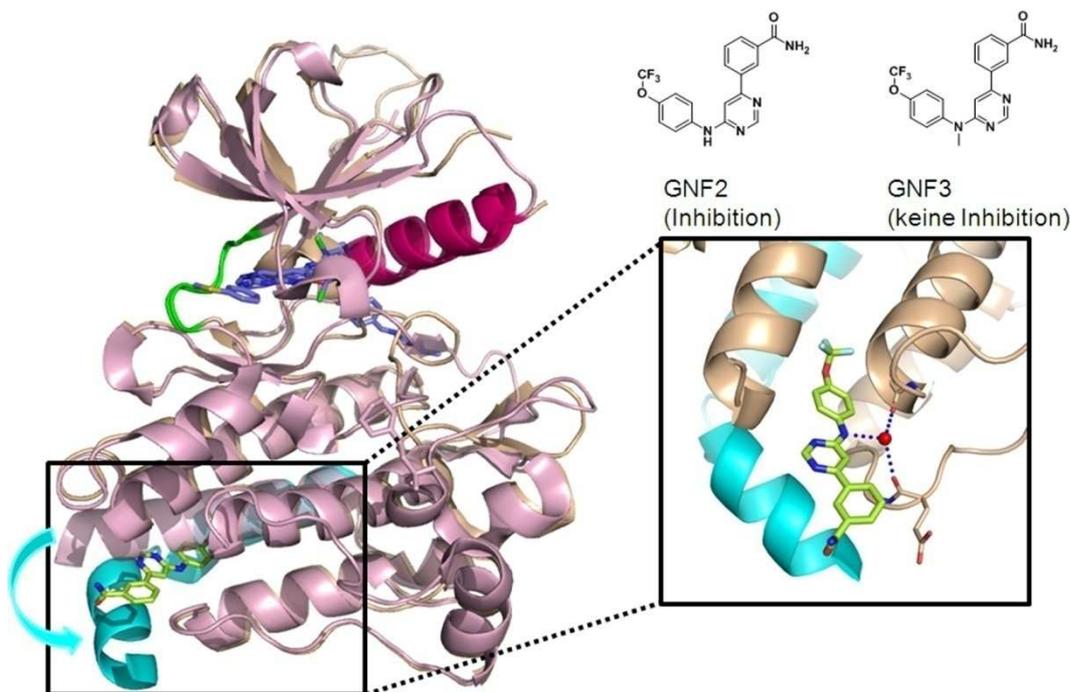


Abbildung 52: Überlagerung von den Proteinkristallstrukturen der katalytischen Domänen 3KV5¹⁸⁴ und 1OPJ²⁰. Die Scharnierregion ist in grün gekennzeichnet, die Helix-C in magenta. In der ATP-Bindungstasche befindet sich jeweils ein Inhibitormolekül. Die Komplexstruktur 1M52¹⁸⁷ enthält PD173955 und die Komplexstruktur 3K5V enthält Imatinib. GNF2 bindet in der Struktur 3K5V an die Myrystoylbindungstasche und induziert eine Krümmung der Helix-I (blau), was zur Inhibition der Kinase führt.

Dieser allosterische Inhibitor GNF2 bindet an die Myristoylbindungstasche am C-Terminus der katalytischen Domäne.¹⁸⁸ Es konnte gezeigt werden, dass der Inhibitor nur bindet, wenn in biochemischen Tests auf ein oft verwendetes Detergenz mit Fettsäure-Modifikation verzichtet wird.¹⁸⁹ Da auch die Kokristallisation dieser Verbindung mit der Kinase nicht trivial war, war der Wirkmechanismus dieser Substanzklasse lange unbekannt. Erst kürzlich haben Zhang *et al.*¹⁸⁴ die Kristallstruktur des allosterischen Inhibitors GNF2 in Kombination mit Imatinib publiziert. Hauptsächlich bindet dieser Inhibitor über hydrophobe Wechselwirkungen in der Myristoylbindungstasche. Eine für die Inhibition entscheidende Interaktion ist die Ausbildung einer Wasserstoffbrücken-

bindung vom sekundären Amin zu einem strukturierten Wassermolekül. Verbindungen ohne Amidfunktion wie das Analogon GNF3 können nicht an die Kinase binden.¹⁸⁸ Die Anlagerung des Inhibitors induziert, wie auch bei Bindung des endogenen Substrates, eine Krümmung der Helix-I.^{20,168} Dadurch bindet die SH2-Domäne an den C-Terminus der Kinase und zwingt die SH3-Domäne in eine Position, die die inaktive Kinasekonformation stabilisiert. Anhand von NMR-Studien konnte gezeigt werden, dass die Bindung von GNF2 an die Myristoylbindungstasche auch ohne Verknüpfung über die SH-2- und SH-3-Domäne zur ATP-Bindungstasche die Kinase in die inaktive Konformation zwingt.¹⁸⁴ Jahnke *et al.*¹⁹⁰ haben eine Kollektion an Inhibitorfragmenten mit einem Konformations sensitiven Assay durchmustert und herausgefunden, dass die Krümmung der Helix-I an der Position V525 ausschlaggebend für die Inhibition der katalytischen Aktivität ist. Ferner konnten Fragmente identifiziert werden, die zwar an die Myristoylbindungstasche binden, jedoch keine Krümmung der Helix-I auslösen beziehungsweise die Krümmung durch eine sterische Hinderung an Position I521 blockieren. Diese Verbindungen zeigen sogar einen aktivierenden Effekt auf die katalytische Aktivität und eröffnen als Kinaseaktivatoren neue therapeutische Ansätze im Bereich der DNA-Reperatur und nach radiologischen Behandlungen.

4.2 Spezieller Teil

4.2.1 Aufgabenstellung

Durch die Zulassung des BCR-Abl-Inhibitors Glivec[®] (Imatinib) wurde die belastende, oft ineffiziente Chemotherapie von der zielgerichteten Tumorthherapie bei chronisch myeloischer Leukämie abgelöst.¹⁹¹ Diese Therapie verbesserte nicht nur die Lebensqualität, sondern verschaffte eine komplette hämatologische Remission bei 95 % der behandelten Patienten.¹⁹² Nach langandauernder Tumorbehandlung mit Imatinib stellten sich jedoch, wie auch schon bei der Behandlung mit anderen Tyrosinkinaseinhibitoren, Resistenzen ein, die auf Mutationen in der ATP-Bindungstasche zurückzuführen sind.¹⁷⁷ Die Überwindung dieser aggressiven entarteten Zellproliferation stellt die Forschung bis heute vor ein ungelöstes Problem. Die im Jahr 2006 von Adrian *et al.*¹⁸⁸ publizierte Verbindung GNF2 nimmt einen alternativen Bindungsmodus ein und brachte bei Anwendung in Kombination mit Imatinib einen Fortschritt hinsichtlich der Überwindung von arzneistoffresistenten Tumorzelllinien von BCR-Abl. Die Verbindung GNF2 bindet

an die zur Autoinhibition dienende Myristoylbindungstasche und stabilisiert dadurch die inaktive Kinasekonformation. Begründet durch die unzureichende Information über den regulatorischen Einfluss von GNF2 in den Zellstoffwechsel sowie durch den nur gering erfassten chemischen Strukturraum für Liganden dieser Myristoylbindungstasche, sollte in dieser Arbeit ein Assaysystem entwickelt werden, das die direkte Identifizierung von GNF2-analogen Verbindungen ermöglicht. Anforderungen an dieses Detektionssystem umfassen die Generierung von robusten sensitiven und reproduzierbaren Ergebnissen sowie die Anwendbarkeit im Hochdurchsatzscreening. Nach zuvor erworbenen positiven Erfahrungen mit dem Prinzip des Verdrängungsassays (Kapitel 3.2.3) wurde in diesem Projekt ein GNF2-basierter Verdrängungsassay entwickelt. Zur Etablierung dieses Systems wurde die lösliche Kinase in reiner Form benötigt sowie eine fluoreszierende Sonde und eine kleine Anzahl an Verbindungen zur Validierung des Assayssystems.

Detektionsprinzip basierend auf Fluoreszenzpolarisation

Die Fluoreszenzpolarisation ist eine verbreitete Methode zur Detektion von biomolekularen Interaktionen, wie beispielsweise DNA-DNA-Interaktionen oder Protein-Protein-Interaktionen.¹⁹³⁻¹⁹⁵ In der Wirkstoffentwicklung wird die Technologie auch zur Identifizierung neuer Liganden für Zielproteine genutzt, auf dessen Konzept der in diesem Projekt angewandte Verdrängungsassay beruht. Als Detektionsreagenz wurde der nicht-fluoreszierende Ligand GNF2 verwendet, der über einen Linker mit Fluorescein verknüpft wurde. Die Diskriminierung zwischen gebundener und frei vorliegender Sonde erfolgt durch Polarisationsmessung. Wird ein fluoreszierendes Molekül mit polarisiertem Licht angeregt, emittiert dieses wiederum polarisiertes Licht, was unter anderem von der Größe des Moleküls abhängig ist. Ist die Sonde an die Kinase gebunden, fällt die Polarisation größer aus als im ungebundenen Zustand. Wird die Sonde von einem Liganden verdrängt, liegt dieser frei in der Lösung vor, was durch Fluoreszenzpolarisation detektiert werden kann (Abbildung 53).

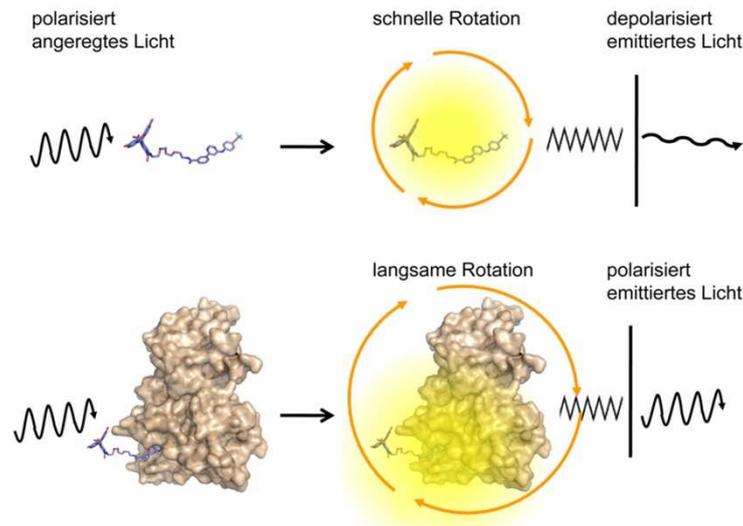


Abbildung 53: Prinzip des Fluoreszenzpolarisations-Assays zur Detektion von Liganden der Myristoylbindungstasche von Liganden. Das Modell basiert auf der Kristallstruktur mit dem PDB-Eintrag 3K5V.¹⁸⁴

4.2.2 Ergebnisse und Diskussion

4.2.2.1 Expression und Aufreinigung der Abl-Kinase aus dem Zelllysate

Zur Etablierung des neuen Assaysystems für die Abl-Kinase musste zunächst ein solider Grundstock an Protein, bestehend aus verschiedenen Konstrukten der Abl-Kinase, hergestellt werden. Hierfür wurden drei verschiedene Abl-Kinasekonstrukte verwendet (siehe Abbildung 54). Das Konstrukt ASS enthielt die katalytische Domäne sowie die Src-Homologie-Domänen-2 und -3, die zur Autoinhibition der Kinase dienen und eine regulatorische Verknüpfung der Helix-I zur ATP-Bindungstasche herstellen. Die Konstrukte Acat und ASF codierten nur die katalytische Domäne der Abl-Kinase und unterschieden sich lediglich durch drei Aminosäuren am C-Terminus. Die rekombinante Expression und Aufreinigung dieser Kinasekonstrukte erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Seeliger *et al.*⁸⁶, in dem die Expression der im pET28a-Vektor befindlichen Kinase mit Polyhistidinanhang in einer *E. coli*-BL21-Zellkultur beschrieben ist. Die Expression von Abl in Bakterienzellen setzte die Koexpression der Phosphatase YopH voraus, um eine übermäßige und dadurch schädliche Phosphorylierung von *E. coli*-Proteinen zu verhindern. Hierzu wurden zwei verschiedene YopH-Konstrukte ohne Affinitätsanhang verwendet; die YopH-Volllänge (1-468) und ein kürzeres Konstrukt (164-468), welches im Gegensatz zur Volllänge nicht an Ni-NTA-Sepharose bindet und

dadurch die Reinigung von Abl vereinfacht.¹⁹⁶ Die Aufreinigung erfolgte in drei Schritten mit einer Nickelaffinitätschromatografie, gefolgt von einer Anionenaustauschchromatografie und anschließender Gelfiltration. Bei den Chargen, die einen Polyhistidinanhang am N-Terminus der Kinase enthielten, erfolgte eine proteolytische Spaltung über Nacht nach der Nickelaffinitätschromatografie. Die Ausbeuten nach vollständiger Aufreinigung betragen zwischen 8 und 12 mg/L Expressionskultur. Ein SDS-Page-Gel mit Proteinproben des gesamten Aufreinigungsprozesses ist in Abbildung 54 dargestellt. Nach der Aufreinigung lagen alle Konstrukte in > 98 % Reinheit vor.

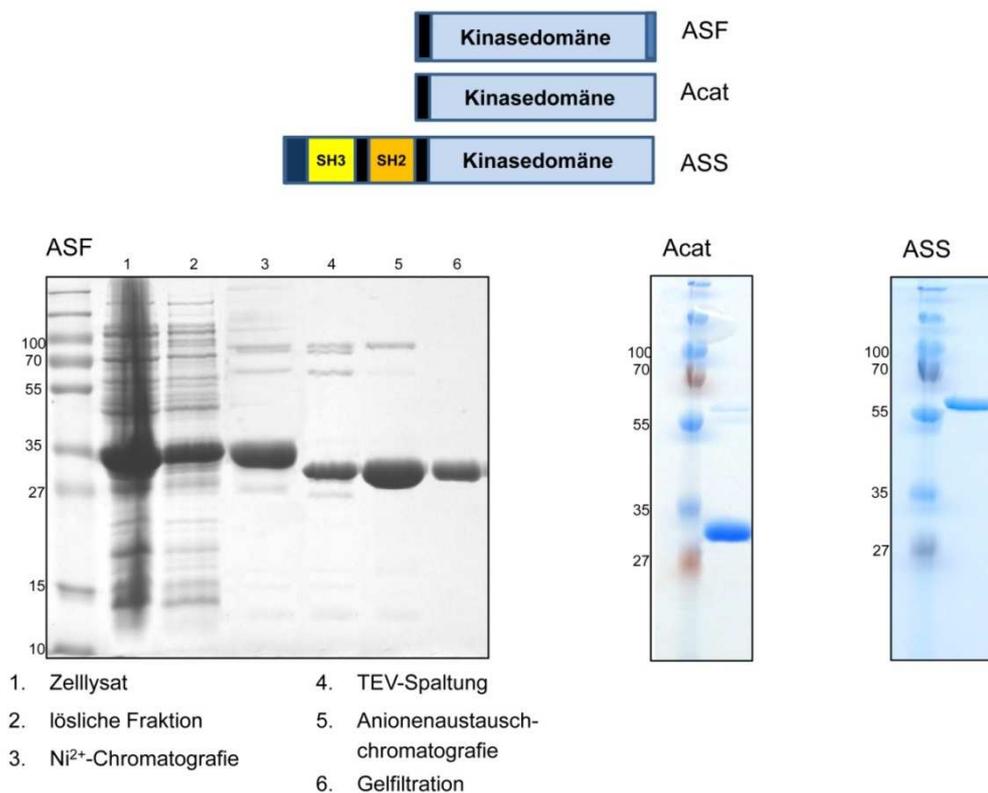


Abbildung 54: SDS-Page-Gele der drei aufgereinigten Abl-Konstrukte ASF, Acat und ASS. Das Gel der ASF illustriert alle Proteinproben der Proteinaufreinigung, für Acat und ASS ist jeweils die Proteinprobe nach der finalen Gelfiltration dargestellt. Die Reinheit aller Abl-Konstrukte betrug ≥ 95 %.

4.2.2.2 GNF2-basierter EFC-Assay

Aufgrund der positiven Erfahrungen mit dem EFC-Assay für Typ-III-Inhibitoren (Kapitel 3.3.3) wurde dieses Assayprinzip zunächst zur Etablierung für den GNF2-basierten Assay verwendet. Hierzu wurde ein GNF2-Derivat über ein Verbindungsfragment jeweils C- und N-terminal an ein zur β -Galactosidase gehörendes Peptid (ED) konjugiert.¹⁵⁵ Die Synthese der Sonde erfolgte in Kollaboration mit DiscoverX und MSD. Zur Optimierung des Assaysystems wurden insgesamt vier verschiedene Sonden entwickelt, die sich in ihrem Verbindungsfragment beziehungsweise in der Länge des

ED-Liganden unterschieden. Verschiedene Peptidlängen wurden eingesetzt, da diese einen Einfluss auf die Affinität des ED-Liganden zur β -Galactosidase haben. Durch Anlagerung des ED-Liganden an die verkürzte Variante der β -Galactosidase wird diese aktiv, was mittels eines chemilumineszierenden Substrates detektiert wird.

Zunächst wurde mit den in Abbildung 55 A-B dargestellten Sonden gearbeitet. Da die Sonde A das bessere Signal/Rausch-Verhältnis aufwies, wurde diese für weitere Untersuchungen verwendet.

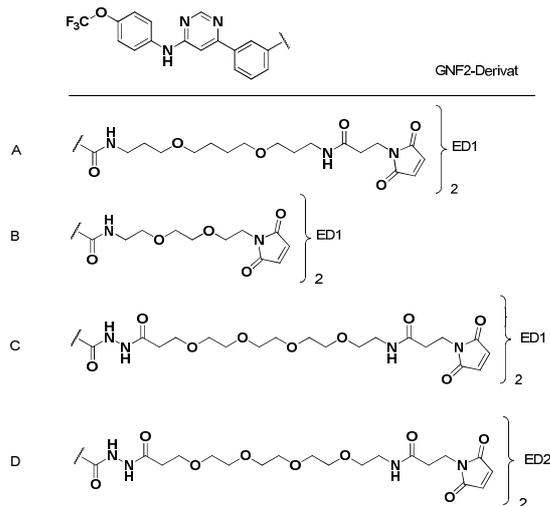


Abbildung 55: Schematische Darstellung der eingesetzten ED-Liganden. ED1 und ED2 unterscheiden sich in ihrer Peptidlänge. (ED: Enzym Donor)

Zur Etablierung des Assaysystems wurden zuerst die Konzentrationen der einzelnen Reagenzien angepasst. Eine Kinasetitration unter Verwendung einer hohen Konzentration (12,5 nM) an ED-Ligand zeigte eine deutliche konzentrationsabhängige Lumineszenzkurve (Abbildung 56). Ein niedriges Lumineszenzsignal bei hohen Kinasekonzentrationen deutet darauf hin, dass die Sonde an die Kinase bindet und somit der β -Galactosidase zur Aktivierung nicht mehr zur Verfügung steht. Dieses Experiment wurde bei unterschiedlichen Inkubationszeiten der Detektionsreaktion durchgeführt (15-180 min). Die Differenz des Signals der Negativkontrolle (ED-Ligand ohne Kinase) zum Signal der Kinase-reaktion erhöht sich mit längerer Inkubationszeit. Somit wurde für weitere Versuche eine Kinasekonzentration von circa 75 nM und eine Inkubationszeit von 180 min gewählt. Entscheidend für die Etablierung eines Assaysystems ist die dosisabhängige Verdrängung der Sonde durch den freien Liganden, welcher in diesem Assay aus GNF2 besteht. Die Verdrängung ist trotz einer Vielzahl an Optimierungsversuchen nicht gelungen. Zunächst wurde die kommerziell erworbene Abl-Kinase gegen eigens hergestellte Kinase ausgetauscht (Kapitel 4.2.2.1), da man davon ausgegangen

ist, dass eine hohe Glycerolkonzentration im Kinasepuffer die Reaktion stört. Allerdings konnte auch mit einer nahezu glycerolfreien Kinaselösung das Problem nicht gelöst werden.

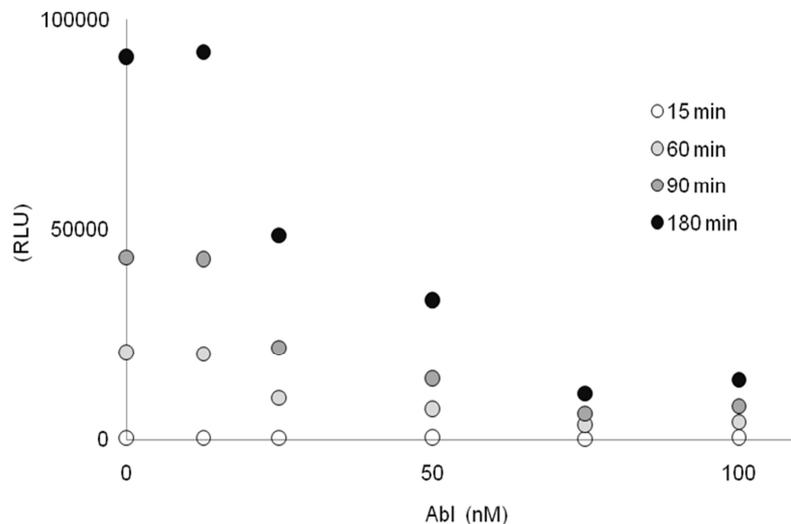


Abbildung 56: Kinasetitration mit dem EFC-Assay unter Verwendung von 12,5 nM Sonde A.

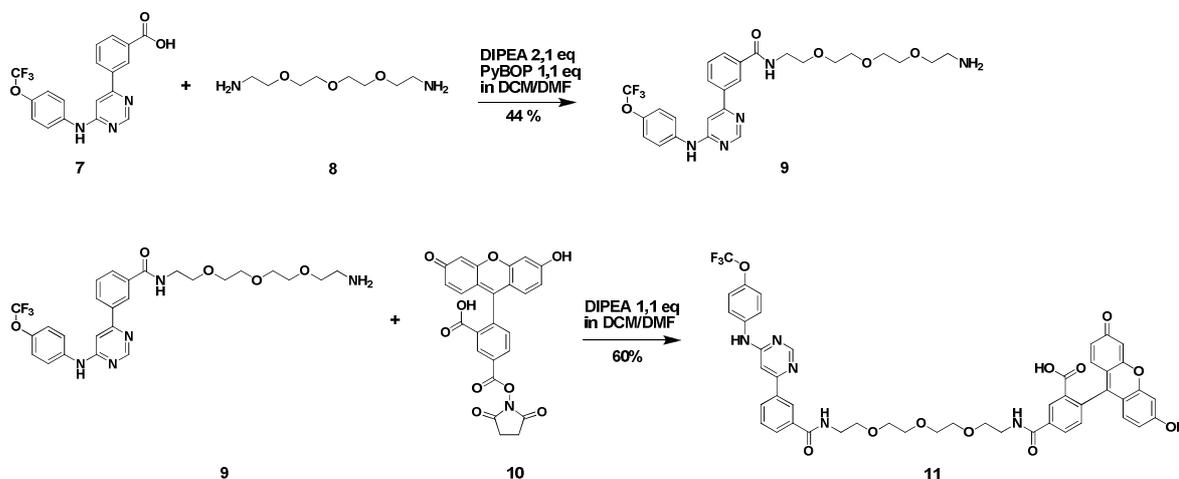
Eine weitere Überlegung zur Umgehung des Problems war, dass der Abstand zwischen ED-Peptid und GNF2-Derivat nicht optimal war, sodass es entweder zur sterischen Hinderung mit der Kinase oder zum Verlust der Affinität des Moleküls zur Kinase kam. Somit wurden weitere Sonden hergestellt (Abbildung 55 C-D). Allerdings brachte auch dieses keinen Erfolg. Der Vermutung liegt nahe, dass die Affinität der Sonde für dieses System nicht ausreicht, um ein robustes Signal für eine dosisabhängige Titration des freien Liganden zu erzielen. Weitere Schwierigkeiten bereiteten eine schwache Löslichkeit der Sonden in wässriger Lösung.

Eine Methode, die mit einer weniger komplexen Sonde auskommt und somit einen geringeren Affinitätsverlust des GNF2-Derivates verursacht, ist die Fluoreszenzpolari- sation. Die Synthese der molekularen Sonde sowie die Etablierung des Systems sind in den folgenden Kapiteln beschrieben.

4.2.2.3 Synthese eines Sondenmoleküls

Im Folgenden wird die Synthese des Sondenmoleküls für den Verdrängungsassay zur Detektion von allosterischen Inhibitoren beschrieben. Die molekulare Sonde besteht aus dem Liganden GNF2, welcher an die Myristoylbindungstasche binden soll, sowie dem über ein Verbindungsstück konjugierten Fluorophor Fluorescein. Die Synthese erfolgte

ausgehend von dem GNF-Derivat RL31 (**7**), welches in der AG Rauh zuvor hergestellt wurde.



Schema 2: Synthese der molekularen GNF2-Sonde ausgehend vom GNF2-Derivat (**7**). Nach Darstellung des pegylierten GNF2-Derivates über eine Amidkupplung wurde der Fluorophor Fluorescein konjugiert.

An die freie Carboxylgruppe von **7** wurde über eine Amidkupplung mit DIPEA und PyBOP das Diamin (**8**) konjugiert. PyBOP diente hier zur Bildung eines Aktivesters. Um eine 1:1-Umsetzung zu erzielen, wurde ein 6-facher Überschuss des Diamins verwendet. Nach vollständiger Umsetzung von RL31 erfolgte die Aufreinigung von **9** mit präparativer HPLC. In einer zweiten Amidkupplungsreaktion wurde Fluorescein über die reaktive Maleimidoximgruppe an das freie Amin der PEG-Brücke konjugiert. Die Synthese erfolgte wiederum unter Verwendung der Hünig-Base DIPEA. Anschließend wurde **11** als finales Produkt mit präparativer HPLC aufgereinigt.

4.2.2.4 Etablierung des Assaysystems

Nachdem die Abl-Kinase exprimiert und aufgereinigt wurde und die molekulare Sonde hergestellt war, konnte das auf Fluoreszenzpolarisation basierende Assaysystem etabliert werden. Dazu wurde zuerst der K_d -Wert der molekularen Sonde ermittelt, um die optimalen Assaykonzentrationen bestimmen zu können.¹³⁷ Die für IC_{50} -Bestimmungen eingesetzte Konzentration der Sonde sollte im Bereich des K_d -wertes liegen. Dieser betrug 30 nM, was auf eine hohe Bindungsaffinität hindeutete. Dies war eine gute Voraussetzung zur Generierung eines sensitiven, robusten Assaysystems. Eine weitere Bedingung zur Durchführung von FP-basierten Affinitätsstudien ist, dass die molekulare Sonde durch den unmarkierten Liganden, in diesem Fall GNF2, verdrängt werden kann. Damit soll eine unspezifische Bindung der Sonde ausgeschlossen werden.

Eine Titration des freien Liganden ist in Abbildung 57 dargestellt und illustriert eine konzentrationsabhängige Verdrängung der molekularen Sonde. Der daraus resultierende IC_{50} -Wert von 150 nM entspricht dem mit einem aktivitätsbasierten zellulären Assaysystem bestimmten publizierten Wert.¹⁸⁸

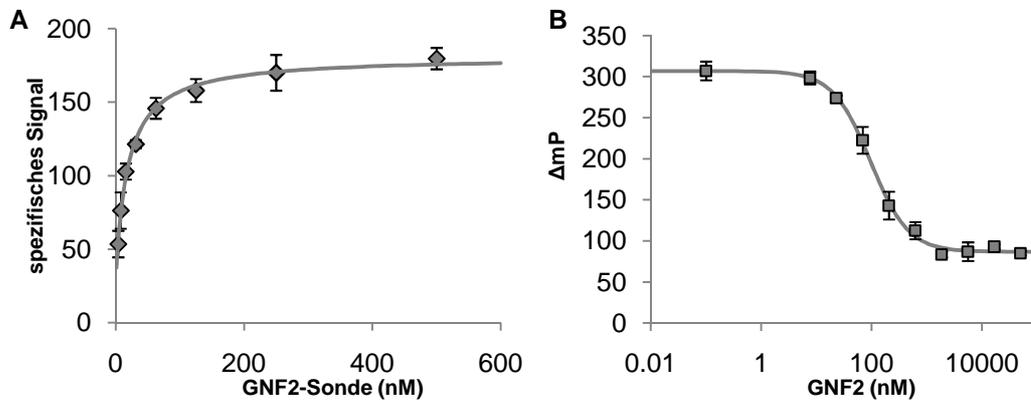


Abbildung 57: (A) Titration der GNF2-Sonde mit ASS zur Bestimmung der optimalen Assaykonzentration. Die Titration zeigt einen K_d -Wert von 30 nM. (B) Konzentrationsabhängige Verdrängung der Sonde durch GNF2.

Um für das Assaysystem einen möglichst großen dynamischen Bereich zu gewährleisten und dessen Robustheit zu testen, wurden die im Puffer vorliegende Salzkonzentration sowie die DMSO-Konzentration angepasst.¹⁹⁷ Die Optimierung der Salzkonzentration sollte die Stabilität der Kinase verbessern. Die Titration der Kinase mit unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen zeigte keine Abhängigkeit des dynamischen Bereiches von der Salzkonzentration (Abbildung 58A). Daher wurde für die nachfolgenden Messungen eine Salzkonzentration von 200 mM verwendet, damit die Stabilität der Kinase gewährleistet war.

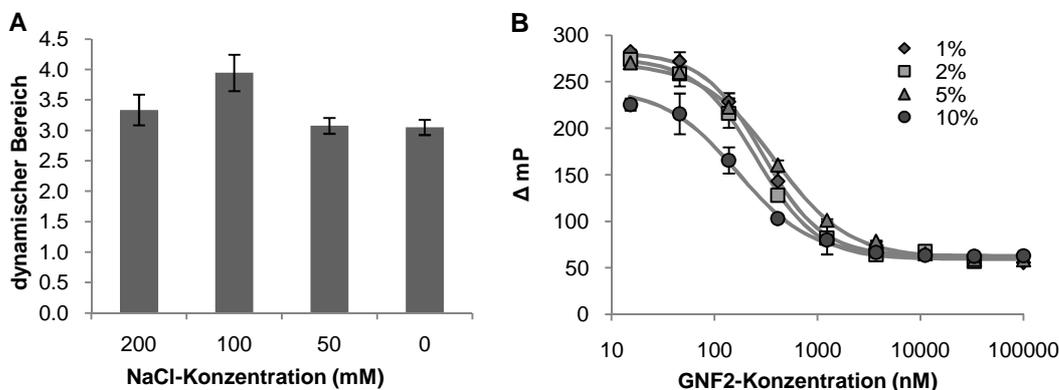


Abbildung 58: (A) Grafische Darstellung des dynamischen Bereiches mit unterschiedlichen Konzentrationen an NaCl. (B) Konzentrationsabhängige Verdrängung der Sonde durch GNF2 bei unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen.

Die DMSO-Verträglichkeit des Assaysystems wurde anhand von Dosiswirkungskurven mit dem Inhibitor GNF2 bei unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen untersucht (Abbildung 59B). Bis zu einer DMSO-Konzentration von 5 % war keine Beeinträchtigung zu beobachten. Bei höheren Konzentrationen verkleinert sich der dynamische Bereich, was wahrscheinlich auf eine Instabilität der Kinase, ausgelöst durch DMSO, zurückzuführen ist. Die routinemäßig für IC_{50} -Bestimmungen eingesetzten DMSO-Konzentrationen von 1 % beeinträchtigen jedoch nicht die Stabilität des Assaysystems. Der bei diesen Messungen beobachtete dynamische Bereich lag im Allgemeinen zwischen 3 und 4 und weist auf ein großes Fenster zwischen Positiv- und Negativkontrolle hin. Dies lässt auf ein robustes Assaysystem schließen.

Nachdem die erfolgreiche Verdrängung des unmarkierten Liganden GNF2 gezeigt werden konnte und die übrigen Assayparameter angepasst worden waren, erfolgte eine zeitabhängige Untersuchung der Verdrängung der GNF2-Sonde mit verschiedenen Verbindungen. Hierfür wurden IC_{50} -Werte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten von Kinase und Inhibitor bestimmt. Die Werte zeigten, dass die Assoziation von GNF2 an die Myristoylbindungstasche, unter gleichzeitiger Verdrängung der Sonde, erst nach 30 Minuten abgeschlossen war (Abbildung 59A).

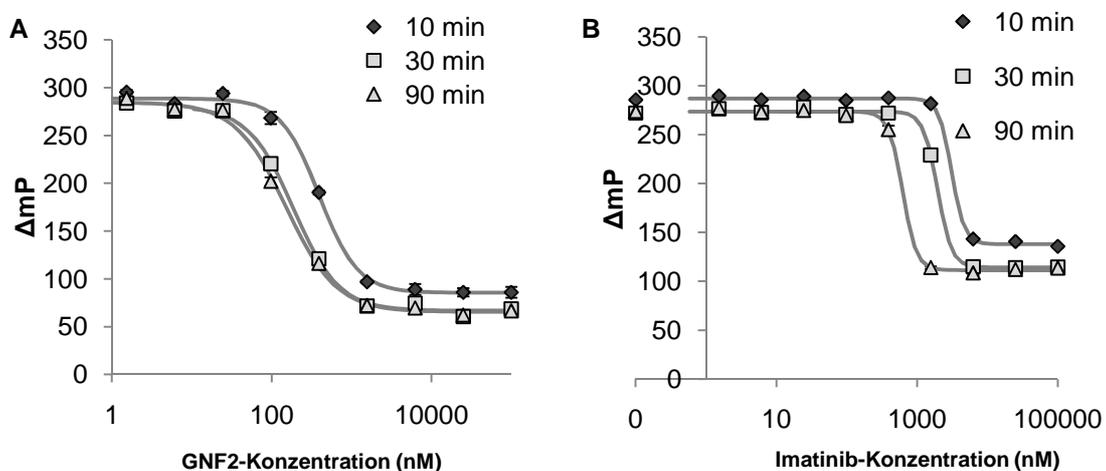


Abbildung 59: Zeitabhängige IC_{50} -Bestimmung von (A) GNF2 und (B) Imatinib mit dem GNF2-basierten FP-Assaysystem.

Überraschenderweise konnten auch Inhibitoren detektiert werden, die an die ATP-Bindungstasche binden. Jedoch wiesen diese Verbindungen eine stark zeitverzögerte Inhibition auf, bei der sich die IC_{50} -Werte im Zeitraum von 10 bis 90 Minuten stark erniedrigen (Abbildung 59B; Linksverschiebung der Kurve). Somit lassen sich prinzipiell ATP-kompetitive Inhibitoren von allosterischen Inhibitoren unterscheiden, da bei der

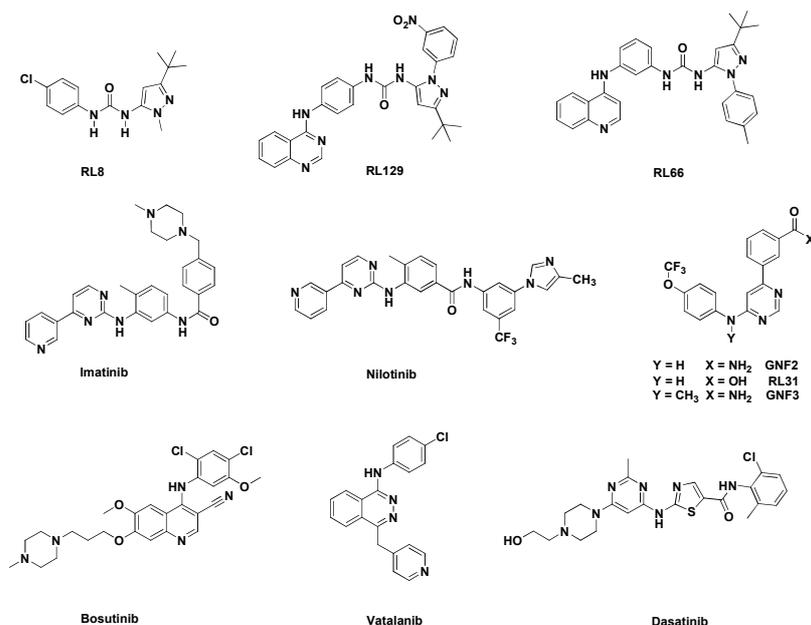
Anlagerung von Liganden an die ATP-Bindungstasche eine zeitaufwendige Konformationsänderung stattfindet, die schließlich zur Verdrängung der Sonde führt.

Validierung des Assaysystems mit unterschiedlichen Inhibitoren



Abbildung 60: Ablaufplan der Inhibitionsbestimmung von 40 zufällig ausgewählten Verbindungen der RL-Substanzkollektion.

Nachdem gezeigt wurde, dass GNF2 die Sonde aus der Myristoylbindungstasche verdrängen kann, wurde im nächsten Schritt untersucht, wie sich das System bei unterschiedlichen Verbindungen hinsichtlich Robustheit, Reproduzierbarkeit und Sensitivität verhält. Hierfür wurden 40 zufällig ausgewählte Inhibitoren der RL-Substanzbibliothek sowie die Negativkontrolle GNF3, der unmarkierte Ligand RL31 und Dasatinib verwendet. Als Maß für die Inhibitionsstärke der 40 getesteten Verbindungen diente die prozentuale Verdrängung der Sonde, bezogen auf die Verdrängung von GNF2 unter Verwendung von 25 µM Inhibitor. Hierbei wurden diejenigen Inhibitoren als Hits deklariert, deren Verdrängung der Sonde mehr als 25 % bezogen auf die Positivkontrolle GNF2 ausmachte. Unter den 40 getesteten Verbindungen wurden 7 Hits gefunden, die dieses Kriterium erfüllten. Die Hit-Validierung erfolgte durch IC_{50} -Bestimmungen mit dem FP- und dem HTRF-Assay (Tabelle 9).



<i>IC</i> ₅₀ (nM)					
Inhibitortyp	Verbindung	FP-ASS	HTRF-ASS	FP-Acat	HTRF-Acat
allosterisch	GNF2	162 ± 11	1000 ± 500	2680 ± 400	-
Negativ-kontrolle	GNF3	-	-	-	-
allosterisch	RL31	145 ± 3	270 ± 140	nb	-
Typ III (p38α)	RL8	30000 ± 9000	> 30 μM	-*	-
Typ I	Bosutinib	-	72 ± 23	-	2,3 ± 0,8
Typ II	RL63	-	-	-	73 ± 34
Typ II	RL129	> 30 μM	23700 ± 13900	-	4,1 ± 0,2
Typ I	Vatalanib	> 30 μM	3400 ± 370	-	2830 ± 1700
Typ II	Nilotinib	82 ± 6	49 ± 9	-*	11,4 ± 1,4
Typ II	Imatinib	611 ± 69	400 ± 64	-*	735 ± 711
Typ I	Dasatinib	76 ± 27	67 ± 9	-*	< 1 nM

Tabelle 9: *IC*₅₀-Werte von Hits, die in einer Kollektion von 40 Substanzen gefundenen wurden. Zur Hit-Validierung wurde der GNF2-Verdrängungsassay (FP) sowie der aktivitätsbasierte HTRF-Assay verwendet. ASS definiert das Konstrukt mit katalytischer und regulatorischer Domäne und Acat kennzeichnet das Konstrukt der katalytischen Domäne von Abl. Blau hervorgehobene Verbindungen wurden der Versuchsreihe als Kontrollinhibitoren hinzugefügt. Die Abkürzung „nb“ bedeutet „nicht bestimmt“, da nicht genug Substanz vorlag. Die Asterixe markieren die Verbindungen, bei denen eine Verdrängung der molekularen Sonde stattgefunden hat, jedoch die Affinität zur Ermittlung eines *IC*₅₀-Wertes zu schwach war.

Hierzu wurden die Abl-Konstrukte ASS (katalytische- und regulatorische Domänen der Abl-Kinase) sowie Acat (ausschließlich katalytische Domäne) verwendet. Mit dem FP-ASS-Assay konnten nicht nur die Myristatmimetika detektiert werden, sondern auch Inhibitoren des Typs I-III. Die mit dem FP-ASS-Assay ermittelten IC_{50} -Werte stimmten für alle Inhibitionstypen weitestgehend mit den IC_{50} -Werten überein, die mit dem HTRF-Assay ermittelt wurden. Der FP-Acat-Assay sollte die Diskriminierung von ATP-kompetitiven Inhibitoren und Liganden der Myristoylbindungstasche ermöglichen, da die regulatorische Verknüpfung mit der ATP-Bindetasche nicht vorhanden ist. Wie erwartet konnte mit Acat nur der IC_{50} -Wert von GNF2 ermittelt werden. Jedoch induzieren auch die Inhibitoren RL6, Dasatinib, Imatinib und Nilotinib eine geringfügige Dissoziation der Sonde von der Myristoylbindungsstelle. Dies resultiert mit großer Wahrscheinlichkeit aus einer Verknüpfung der im C-Terminus lokalisierten Helix-I mit der ATP-Bindungstasche über ein Aminosäure-Netzwerk, welches die katalytische Aktivität von Abl regulieren soll.¹⁸⁴ Außerdem ist nicht auszuschließen, dass die genannten Verbindungen auch schwache Liganden der Myristoylbindungstasche sind. Dieses könnte vor allem auf RL8 zutreffen, da für diese Verbindung keine Inhibition mit dem aktivitätsbasierten HTRF-Acat-Assay nachgewiesen werden konnte. Alle anderen ATP-kompetitiven Inhibitoren konnten hiermit, wie erwartet, detektiert werden.

4.2.2.5 Verdrängungs-Assaysystem basierend auf zeitaufgelöster Fluoreszenzdetektion

Ein alternatives Testsystem, das bei Hochdurchsatzverfahren vorteilhaft gegenüber einem Fluoreszenzpolarisationsassay ist, stellt die zeitaufgelöste FRET-Messung dar.¹³⁴ Hierbei wird ein Terbium-markierter Antihistidin-Antikörper eingesetzt, der an den Polyhistidinanhang der Abl-Kinase bindet und mit dem Fluorescein markierten GNF2-Molekül ein zeitaufgelöstes FRET-Paar bildet (Abbildung 61). Dieses Prinzip zeichnet sich generell durch niedrigere Fluoreszenzinterferenzen von Testsubstanzen aus, da bei der Mehrzahl an fluoreszierenden Testsubstanzen die Fluoreszenz nach kurzer Zeit abklingt und somit die Emissionsenergie nicht auf die Sonde übertragen werden kann.¹³⁶ Ein weiterer Vorteil eines solchen Assaysystems ist, dass die verwendete Kinase und die Sonde in sehr niedrigen Konzentrationen eingesetzt werden können. Hierdurch wird das System sensitiver bezüglich schwach bindenden Liganden, was beim Durchmustern einer Substanzbibliothek nach neuen Hits sehr nützlich ist. Auch für dieses

Assaysystem wurde eine konzentrationsabhängige Verdrängung der molekularen Sonde beobachtet, was die Voraussetzung für die weitere Adaptation auf ein HTS-taugliches Format darstellt.

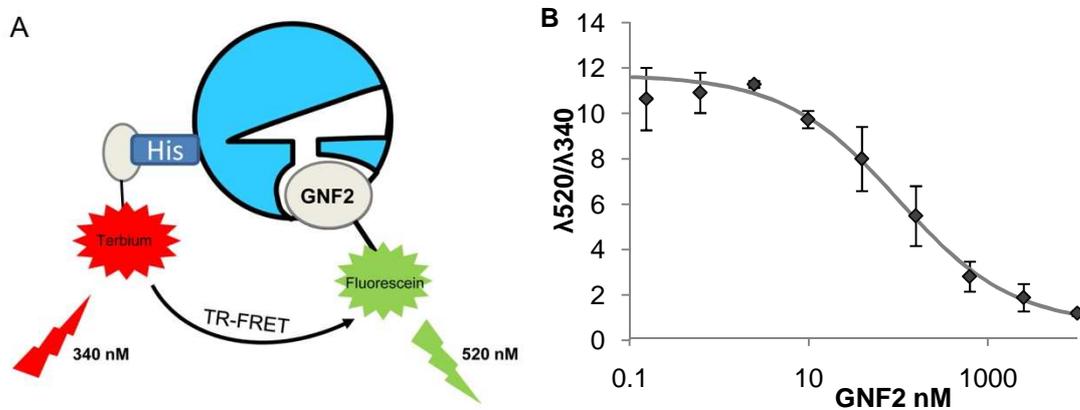


Abbildung 61: (A) Schematische Darstellung des TR-FRET Prinzips für den GNF2-basierten Verdrängungsassay. (B) Konzentrationsabhängige Verdrängung der molekularen Sonde durch GNF2.

4.3 Zusammenfassung

Die Enzymklasse der Proteinkinasen bringt vielversprechende Zielproteine für die Tumorbehandlung hervor. Jedoch stößt die Wirkstoffentwicklung trotz des immensen Erfolges einiger Kinaseinhibitoren auf viele Hindernisse, von denen Selektivität, Wirkstoffresistenzentwicklung und ein mit Patenten großflächig abgedeckter Strukturraum zuerst genannt seien. Eine Strategie zur Überwindung dieser Hürden ist die Entwicklung von allosterischen Inhibitoren. Zur Identifizierung solcher Verbindungen aus großen Substanzbibliotheken werden allerdings neue Detektionssysteme benötigt, die bis jetzt nur beschränkt oder gar nicht vorhanden sind.

Ein solches System wurde in dieser Arbeit zur Identifizierung von Liganden der Myristoylbindungstasche in Abl entwickelt. Ausgehend von dem allosterischen Inhibitor GNF2, der die Kinaseaktivität hemmt, indem er an die Myristoylbindungstasche in Abl bindet, wurde ein auf Verdrängung basierender Fluoreszenzpolarisationsassay entwickelt. Der Assay liefert robuste und reproduzierbare Ergebnisse mit einem Z-Faktor von 0,8. Mit diesem Assay wurde eine kleine Substanzkollektion mit zwei unterschiedlich langen Abl-Kinase-Konstrukten untersucht, die zuvor in *E. coli* exprimiert und chromatografisch aufgereinigt wurden. Bei Verwendung des Konstrukts ASS, welches neben der katalytischen Domäne auch die regulatorischen SH2- und SH3-Domänen enthielt, konnten auch potente ATP-kompetitive Inhibitoren detektiert werden. Mit dem Konstrukt Acat, das nur die katalytische Domäne codierte, konnten ATP-kompetitive

Inhibitoren nur äußerst schwach die Sonde von der Bindungstasche verdrängen. Vermutlich ist dies auf das Fehlen der regulatorischen Domänen bei Acat zurückzuführen, die eine Verknüpfung der Myristoylbindungstasche zur ATP-Bindungstasche herstellen.

Dieses System zeichnet sich nicht nur durch seine Robustheit und Sensitivität aus, es basiert zudem auf einem simplen Pipettierprotokoll, was vor allem zum Durchmustern von größeren Substanzkollektionen von Vorteil ist. Zudem ist das Assaysystem kostengünstig und ermöglicht somit auch die Anwendung dieses Detektionsprinzips im akademischen Umfeld. Da für die Myristoylbindungstasche bis jetzt nur GNF2-analoge Liganden bekannt sind, stellt die Rasterung einer größeren Substanzkollektion mit dem GNF2-FP-Assay einen guten Ausgangspunkt zur Identifizierung neuer Liganden der Myristoylbindungstasche dar.

Zur Verminderung von Fluoreszenzinterferenzen durch Testsubstanzen wurde das Assaysystem basierend auf der zeitaufgelösten FRET-Messung weiterentwickelt. Eine weitere Optimierung der Sonde diesbezüglich könnte die Verwendung von Fluorophoren bringen, die bei höheren Wellenlängen emittieren, da kleine Moleküle in diesem Bereich weniger Strahlung abgeben. Außerdem wären Untersuchungen zur Aktivität von GNF2 bei weiteren Kinasen interessant. Hierfür ist eine zellbasierte Targetidentifizierung erforderlich, da allosterische Inhibitoren oft nicht in aktivitätsbasierten Assaysystemen identifiziert werden können. Werden zusätzliche Zielproteine von GNF2 gefunden, könnte der in dieser Arbeit entwickelte FP-Assay auf diese Kinasen adaptiert werden.

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Geräte

Geräte für Proteinexpression, -aufreinigung und andere biologische Versuche:

Anionenaustauschersäule; HiTrap QFF	GE Healthcare (Waukesha, WI, USA)
Autoklav Varioklav 75S	H+P Labortechnik (Oberschleißheim, GER)
Avanti J-26 mit Rotor JA-10	Beckman Coulter (Krefeld, GER)
Brutschrank WTC	Binder (Tuttlingen, GER)
Elektrophoresesystem Mini-PROTEAN 3	Bio-Rad (Hercules CA, USA)
FPLC-System Äkta	GE Healthcare (Waukesha, WI, USA)
Geldokumentationssystem FluorChem™	Biozym (Hessisch Oldendorf, GER)
Gelfiltrationssäule; Hi Load 26/60, Superdex 75	GE Healthcare (Waukesha, WI, USA)
Hochdruckhomogenisator M-110S	Microfluidics Corp (Newton, MA USA)
Hochleistungsdispersierer T18 basic	IKA-Gruppe (Staufen, GER)
Ultra-Turrax	
Inkubationsschüttler Innova 4430	New Brunswick Scientific (Edison, NY USA)
JLA 8,1 Beckman	Coulter (Krefeld, GER)
Kühlzentrifugen Avanti J-25	Beckman Coulter (Krefeld, GER)
Nanodrop ND-1000	Thermo Scientific (Waltham MA, USA)
Nickelchelate-Affinitätssäule; HisTrap FF	GE Healthcare (Waukesha, WI, USA)
Photometer Eppendorf Biophotometer	Eppendorf (Hamburg, GER)
Pipetten Research® Einkanalpipette (0,1-2,5 µL, 0,5-10 µL, 2-20 µL, 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 500-5000 µL)	Eppendorf (Hamburg, GER)
Stromgeber PowerPac™ HC	Bio-Rad (Hercules CA, USA)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, GER)
Tischzentrifuge Centrifuge 5415	Eppendorf (Hamburg, GER)

Tischzentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus (Hanau, GER)
<i>Geräte für Enzym-Assays</i>	
Eppendorf Research [®] Mehrkanalpipette (20-300 μ L, 5-100 μ L, 0,5-10 μ L)	Eppendorf (Hamburg, GER)
Matrix elektronische Mehrkanalpipette (2-125 μ L, 0,5-12,5 μ m)	Thermo Scientific (Waltham MA, USA)
Tecan Safire2 [™]	Tecan (Crailsheim, GER)
JASCO FP-6500 Spektrofluorimeter	Jasco (Essex, UK)
Spectramax [®] M5	Molecular Devices (Sunnyvale, CA USA)

Geräte für organische Synthese und chemische Experimente

HPLC Agilent 1100 Series	Agilent Technologies (Böblingen, GER)
Lyophilisator HetoPower Dry LL1500	Thermo Scientific (Waltham MA, USA)
Digital Sonifier Units Models S-250D	Branson (Danbury, CT, USA)
Finnigan LCQ Advantage Max Massenspektrometer	Thermo Scientific (Waltham MA, USA)

Alle weiteren Geräte entsprachen dem üblichen Laborstandard.

Kernmagnetresonanzspektroskopie

¹H- und ¹³C-NMR-Spektren wurden auf einem Varian Mercury 400 Spektrometer (400 MHz ¹H-NMR, 100.6 MHz ¹³C-NMR) aufgenommen.

Die chemischen Verschiebungen sind in ppm angegeben und beziehen sich auf Tetramethylsilan (TMS, $\delta = 0$ ppm) als internen Standard. Die Kopplungskonstanten J sind in Hertz (Hz) angegeben. Die Signalmultiplizitäten wurden wie folgt abgekürzt: s = Singulett, d = Dublett, dd = Duplett von Dubletts, t = Triplet, m = Multiplet, br = breites Signal, td = Triplet von Dubletts, ddd = Dublett von Dubletts von Dubletts.

Chromatografie

Zur Dünnschichtchromatografie wurden DC-Fertigplatten, beschichtet mit Kieselgel 60_{F254} der Firma Merck, verwendet. Die entsprechenden Laufmittel sind bei den jeweiligen Substanzen angegeben. Zur Detektion wurde UV-Licht der Wellenlänge 254 nm verwendet.

Säulenchromatografische Trennungen erfolgten mit Flash-Kieselgel der Firma J. T. Baker (Korngröße 40-70 μ m).

Präparative HPLC-Trennungen erfolgten auf einem Varian (Pro Star 215) Gerät mit VP 250/21 Nucleodur C-18 Gravity 5 μ Säule der Firma Macherey-Nagel. Die Detektion erfolgte bei 214 nm. Es wurden die Protokolle **P1** und **P2** verwendet.

Außerdem wurde das LC-8a Gerät der Firma Shimadzu mit TRC-10 Fraktionssammler und SP 125/10 Nucleodur C-18 Gravity 5 μ Säule in Kombination mit einer SP50/10 Nucleodur C-18 Gravity 5 μ Vorsäule der Firma Macherey-Nagel verwendet. Die Detektion erfolgte bei 210 und 254 nm. Es wurde das Protokoll **P3** verwendet.

Protokolle für Laufmittelsysteme:

P1: Dauer des Laufes: 56 min; Start: 5 % ACN; Gradient in 35 min auf 35 % ACN, in 2 min auf 100 % ACN; Flussrate: 25 mL/min

P2: Dauer des Laufes: 55 min; Start: 10 % ACN für 5 min; Gradient in 25 min auf 65 % ACN, in 4 min auf 100 % ACN; Flussrate: 25 mL/min

P3: Dauer des Laufes: 60 min; Start: 15 % ACN für 2 min; Gradient in 38 min auf 5 % ACN, in 10 min auf 100 % ACN; Flussrate: 8 mL/min

Es wurden die Lösungsmittelgemische ACN + 0,1 % TFA sowie H₂O + 0,1 % TFA verwendet. Die Lösungsmittel der Produktfraktionen wurden anschließend durch Lyophilisation entfernt.

Massenspektrometrie

Flüssigchromatografie in Verbindung mit Massenspektrometrie (LC-MS) wurde mit dem Thermo Finnigan LCQ Advantage Max ESI-Spektrometer durchgeführt, welches an ein HPLC System von Agilent (1200 series), bestückt mit einer Eclipse XDB-C18, 5 μ m Säule (Säulendurchmesser: 150×4,60 mm), gekoppelt war. Für die Analyse wurde H₂O mit 0,1 % HCOOH (LM A) und Acetonitril mit 0,1% HCOOH (LM B) bei einer Flussrate von 1 mL/min verwendet.

Der Gradient verlief von 0 bis 1 min mit 75 % LM A/25 % LM B; von 1 bis 10 min: von 75 % LM A/25 % LM B nach 0 % LM A/100 % LM B; von 10 bis 12 min: 0 % LM A/100 % LM B; von 12 bis 15 min: von 0 % LM A/100 % LM B nach 90 % LM A/10 % LM B.

Hochaufgelöste Massenspektrometrie (ESI-MS) wurde auf dem Gerät Thermo LTQ Orbitrap von Thermo Electron durchgeführt, welches an ein "Accela" HPLC System, bestückt mit einer "Hypersil GOLD" Säule von Thermo Electron, gekoppelt war.

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Abdeckfolie (transparent), <i>Thin Seal</i>	Excel scientific, Inc. (Wrightwood CA, USA)
Alufolie (klebend) Thermowell™	Corning (New York NY, USA)
Dialysekassette Slide-A-Lyzer MWCO 10000	Pierce (Rockford, IRL)
Dialyseschlauch Spectral/Por MWCO 12-14000	SpectrumLabs (Greensboro, NC, USA)
<i>Dialysis Button</i> 50 µL	Hampton research (Aliso Viejo, CA USA)
Matrix Pipettenspitzen (12,5 µL, 125 µL)	Thermo Scientific (Waltham MA, USA)
Matrix Reagenz Reservoirs	Thermo Scientific (Waltham MA, USA)
Mikrotiterplatten 384 well (100 µL) (weiß, schwarz)	Greiner Bio-One (Solingen, GER)
Mikrotiterplatten 384 well (20 µL) (weiß, schwarz)	Greiner Bio-One (Solingen, GER)
Mikrotiterplatten 96 deep well (transparent, weiß, schwarz)	Greiner Bio-One (Solingen, GER)
Ni-NTA-Agarose Ni-NTA superflow	Qiagen (Hilden, GER)
Pipettenspitzen <i>epTIPS</i> (0,1-10 µL, 2-200 µL, 20-300 µL, 50-1000 µL, 100-5000 µL)	Eppendorf (Hamburg, GER)
Plasmidpräparation Quiaspin Miniprep Kit 250	Quiagen (Hilden, GER)
Plastikküvette 4,5 mL	Carl Roth (Karlsruhe, GER)
Proteinentsalzungssäule	Pierce (Rockford, IRL)
Sterilfilter FP 30 (0,45 µm und 0,22 µm)	CA-S (Schleicher & Schuell, Dassel, GER)
Zentrifugenfiltereinheit Amicon Ultra MWCO 10000	Millipore (Billerica, MA, USA)

5.1.3 Feinchemikalien und molekularbiologische Reagenzien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Fermentas (St. Leon Rot, GER)
--------------------------	-------------------------------

2-Mercaptoethanol	Promega (Mannheim, GER)
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Roth (Karlsruhe, GER)
Acrylamid / N,N-Methylenbisacrylamid	Applichem (Darmstadt, GER)
Adenosintriphosphat (ATP)	CST (Boston, MA, USA)
Agarose	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva (Heidelberg, GER)
Ampicillin	Gerbu (Gaiberg, GER)
Brij-58 (Polyoxyethylen-20-cetyl-ether)	Merck (Darmstadt, GER)
BSA (Bovine Serum Albumin)	Sigma-Aldrich (Steinheim, GER)
Chloramphenicol	Roth (Karlsruhe, GER)
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva (Heidelberg, GER)
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva (Heidelberg, GER)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Acros (Everberg, BEL)
EDTA (Ethyldiamin-N,N,N',N'-Tetraacetat)	Gerbu (Gaiberg, GER)
EGTA (Glycol- bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraacetat)	Roth (Karlsruhe, GER)
Essigsäure	J.T. Baker (Deventer, NED)
Glycerol	Alta Aesar (Karlsruhe, GER)
Hefeextrakt	Sigma (Steinheim, GER)
Imidazol	Serva (Heidelberg, GER)
IPTG (Isopropyl- β -D-thiopyranosid)	Roth (Karlsruhe, GER)
Kanamycin	Gerbu (Gaiberg, GER)
L-Glutathion (reduziert)	Serva (Heidelberg, GER)
NaCl	Sigma-Aldrich (Steinheim, GER)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe, GER)
Ponceau S	Sigma-Aldrich (Steinheim, GER)
Prestained Protein Ladder Plus	Fermentas (St. Leon Rot, GER)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, GER)
Streptomycin	Serva (Heidelberg, GER)
TEMED	Roth (Karlsruhe, GER)
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Roth (Karlsruhe, GER)
Trichloressigsäure	Roth (Karlsruhe, GER)
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth (Karlsruhe, GER)

Trypton	Sigma-Aldrich (Steinheim, GER)
Tween-20	Sigma-Aldrich (Steinheim, GER)

Die hier nicht aufgeführten Standardchemikalien wurden im analytischen Reinheitsgrad von den Firmen Baker, Gerbu, Merck, Roth, Serva und Sigma-Aldrich bezogen.

Reagenzien und Lösungsmittel für chemische Synthese

Reaktionen mit hydrolyse- und oxidationsempfindlichen Reagenzien wurden in sorgfältig ausgeheizten Apparaturen durchgeführt. Die Substanzzugabe erfolgte über ein Septum oder unter Argongegenstrom. Lösungsmittel (abs.) wurden ohne weitere Reinigung verwendet. Alle weiteren Chemikalien wurden bei den Firmen Acros, Aldrich, Sigma, Fluka und Merck erworben.

5.1.4 Reagenzien für biochemische Untersuchungen:

HTRF [®] TK KinEASE [™] Assay	Cisbio (Bagnols /Cèze Cedex, FRA)
Luciferase Assay; ATP Determination Kit	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Omnia [™] Tyr Peptid 2 Assay	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Quick Start [™] Bradford; Protein Assay	Bio-Rad (Hercules, CA, USA)
Z'lyte Assay [™] ; für cSrc- und Abl-Kinase: Tyr2; für EGFR-Kinase Tyr4: für GSK-3 Kinase: ST9	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
α -GST-d2-Konjugat	Cisbio (Bagnols /Cèze Cedex, FRA)
α -Phospho-ATF2-Cryptatantikörper	Cisbio (Bagnols /Cèze Cedex, FRA)

5.1.5 Enzyme

Abl1	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Abl1	Millipore (Billerica, MA, USA)
Aktive p38 α	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
ATF-2 Fusionsprotein (mit GST)	CST, Inc (Beverly MA, USA)
cSrc-C345S (SM)	siehe Methoden
cSrc-C345S/T338M (DM)	siehe Methoden
DDR2	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
EGFR-L858R	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
EGFR-L858R/T790M	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

EGFR-T790M	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
	Millipore (Billerica, MA, USA)
EGFR <i>wt</i>	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
	Millipore (Billerica, MA, USA)
Endonuklease (Benzonase™)	Novagen (Madison, USA)
EPHA3	Bestand (CGC - AG Rauh)
GSK3 <i>ustilago maydis</i>	Bestand (CGC - AG Rauh)
GSK3 β human	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Inaktive JNK2	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
	Millipore (Billerica, MA, USA)
Inaktive p38 α	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Inaktive p38 α	Bestand (CGC - AG Rauh)
Kit	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
Lysozym	Sigma-Aldrich (Steinheim, GER)
MET	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
MKK6	Invitrogen (Karlsruhe, GER)
MKK6	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
PDGFR A	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
PDGFR B	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
PKC theta	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
PreScission-Protease™	Bestand (CGC - AG Rauh)
TEV-Protease	Bestand (CGC - AG Rauh)
Thrombin	GE Healthcare (Waukesha, WI, USA)
Tie	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
VEGFR1	CST, Inc (Beverly MA, USA)
VEGFR2	CST, Inc (Beverly MA, USA)
VEGFR3	CST, Inc (Beverly MA, USA)

5.1.6 Gene

Die Kinasegene der Firma Geneart (Regensburg, GER) sind synthetisch hergestellt und sind codon-optimiert für die Expression in E.coli. Die Sequenzen der Kinasegene befinden sich im Anhang.

5.1.7 Bakterienstämme

BL21 DE3 cSrc-DM, YopH, GroEL	Bestand (CGC - AG Rauh)
BL21 DE3 cSrc-SM, YopH, GroEL	Bestand (CGC - AG Rauh)
BL21(DE3) (YopH/GroEL)	(Seeliger, Young <i>et al.</i> 2005)
BL21(DE3) Singles™ Competent Cells	Novagen, USA
XL 10 gold	Stratagene, USA

5.1.8 Computerprogramme / Server

©RSCB PDB (Protein Data Bank)	by Rutgers & UCSD www.rcsb.org
BioWorks 3.1 Software	Thermo Scientific, USA
ChemBioDraw Ultra 12.0	CambridgeSoft® (Cambridge MA, USA)
Expasy (Expert Protein Analysis System)	www.expasy.ch by SIB (swiss institute for bioinformatics)
NCBI (Pubmed)	National Center for Biotechnology (Information, Bethesda MD, USA)
SciFinder®	CAS, ACS (Columbus OH, USA)
XL fit	IDBS (Guildford Surrey, UK)

5.2 Methoden

5.2.1 Rekombinante Expression verschiedener Konstrukte der cSrc- und Abl-Kinase in *Escherichia coli*⁸⁶

Für die Expression der cSrc- und Abl-Konstrukte wurde ein weitestgehend einheitliches Protokoll verwendet. Unterschiede in den Koexpressionskomponenten sowie die verwendeten Protease-Schnittstellen sind unten dargestellt. Alle Kinasen wurden als Hexahistidin-Fusionsproteine zusammen mit der Phosphatase YopH aus *Yersinia enterocolitica*¹⁹⁸ in *E. coli* BL21 koexprimiert. Für cSrc wurde zusätzlich das Chaperon GroEL koexprimiert.⁸⁴ Die Konstrukte lagen im Vektor pET-28a (Novagen, USA) vor. Das Gen der Phosphatase YopH lag im Vektor pCDFDuet-1 (Novagen, USA) vor und das Gen des Chaperons GroEL befand sich im pACYC Vektor (Novagen, USA). Die Expressionen wurden mit sterilem TB (Terrific Broth)-Medium (2,4 % (w/v) Hefeextrakt, 1,2 % (w/v) Trypton, 0,4 % (w/v) Glycerin) durchgeführt, welches die Antibiotika Kanamycin 50 µg/mL, Streptomycin 50 µg/mL und Chloramphenicol 25 µg/mL entsprechend der in den Vektoren vorliegenden Resistenzgene enthielt. Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C in 150 mL Medium in einem 500 mL Erlenmeyerkolben mit Schikane herangezogen. Nach 16 h Inkubation wurde die Vorkultur 1:50 in jeweils 2 L TB-Medium verdünnt, welches in einem 5-L-Erlenmeyerkolben mit Schikane vorlag. Die weitere Aufzucht erfolgte bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,6. Danach wurde die Temperatur auf 18 °C herabgesenkt und die Proteinsynthese des Zielproteins mit Zusatz von 0,2 mM IPTG gestartet. Nach einer Expressionszeit von 16-20 h wurden die Zellen geerntet. Die gesamte Inkubation erfolgte unter konstantem Schütteln (100 U/min).

<i>Kinase</i>	<i>Koexpression (Chaperon)</i>	<i>Koexpression (Phosphatase)</i>	<i>Protease- schnittstelle</i>
cSrc-SM	GroEL	YopH	TEV
cSrc-DM	GroEL	YopH	TEV
AJeff	-	YopH	PreScision
ASS	-	YopH KD	Thrombin
Acat	-	YopH KD	Thrombin
ASF	-	YopH KD	TEV

Tabelle 10: Übersicht über die Koexpression und Proteaseschnittstellen in den Konstrukten der Abl- und cSrc-Kinase.

5.2.2 Proteinaufreinigung mit FPLC⁸⁶

Ernte und Zellyse

Nach der Expression wurden die Bakterienkulturen durch 40-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 4500 g sedimentiert und das Zellpellet bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert. Für die nachfolgende Zellyse wurde das Pellet aufgetaut, dreifach mit Puffer A (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, pH 8,0) verdünnt und mit einem Ultra-Turrax-Homogenisator behandelt. Nach Zugabe von Endonuklease (20 U/mL) wurden die Zellen mit einem Hochdruckhomogenisator in 5-10 Wiederholungen aufgeschlossen. Zur Abtrennung der Zellreste und unlöslichen Zellbestandteile wurde das Zellysate für 35 min bei 25000 U/min (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand, der das lösliche Protein enthielt, wurde vorsichtig abdekantiert und steril filtriert.

Nickelchelate-Affinitätschromatografie

Der erste chromatografische Aufreinigungsschritt der Hexahistidin-Fusionsproteine erfolgte mit einer selbstgepackten 30-mL-Ni-NTA-Säule, die zuvor mit Puffer A äquilibriert worden war. Dazu wurde das Zellysate über eine 50-mL-Probenschleife unter Verwendung einer Flussrate von 1,5 mL/min auf die Säule aufgetragen. Zur Entfernung ungebundener Proteine wurde anschließend mit drei Säulenvolumen Puffer A nachgewaschen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-50 % Puffer B (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, pH 8,0) über 30 min. Die Fraktionen des größten UV-Signales wurden in 4 mL Einheiten in 15 mL Falcon-Röhrchen gesammelt und mit einem SDS-Gel analysiert.

Abspaltung des Polyhistidinanhangs

Die nach der Nickelchelate-Affinitätschromatografie erhaltenen Proteinfraktionen wurden zusammengefasst und bei 4 °C über Nacht gegen einen Liter Dialysepuffer (50 mM Tris (pH 7,5), 5 % Glycerol, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA und 1 mM DTT) dialysiert. Diese fand in einem Dialyseschlauch unter Verwendung eines Magnetrührers zur Diffusionserleichterung statt. Für Proteine mit einer TEV-Schnittstelle wurde der Polyhistidinanhang durch Zugabe von 50 µg/mL TEV-Protease während der Dialyse entfernt. Für die Kinasekonstrukte, die eine Thrombinschnittstelle enthielten, musste zuvor das im Puffer enthaltene Histidin durch Dialyse entfernt werden. Die Spaltung des Polyhistidinanhangs erfolgte anschließend unter Zugabe von 5 U/mL Thrombin.

Anionenaustauschchromatografie

Vor der Durchführung der Anionenaustauschchromatografie musste die Kinase in ein schwach salzhaltiges Milieu umgepuffert werden. Dazu wurden die Proteinlösung mit einer Zentrifugeneinheit (MWCO 10000, Amicon Ultra, Millipore) auf ein Volumen von etwa 10 mL eingengt und anschließend dreifach mit Puffer QA (50 mM Tris (pH 7,4), 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 % (v/v) Glycerol) verdünnt. Zur besseren Trennung und Erhöhung der Ladekapazität wurden zwei Sepharose-Q-FF-Säulen (GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 1 mL in Reihe geschaltet. Nach Äquilibration der Säulen mit Puffer QA wurde die Probe mit einer Flussrate von 1 mL/min unter Verwendung einer 50-mL-Probenschleife geladen. Anschließend wurde mit drei Säulenvolumen Puffer QA nachgewaschen. Die Elution der Kinase fand unter gradueller Zuführung von 0-100 % Puffer QB (50 mM Tris (pH 7,4), 600 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 % (v/v) Glycerol) innerhalb von 30 min statt. Die gesammelten Fraktionen wurden in 2 mL Eppendorf-Röhrchen gesammelt und mithilfe eines SDS-Gels analysiert.

Größenausschlusschromatografie

Vor der Durchführung der Größenausschlusschromatografie wurden die zuvor erhaltenen Proteinfractionen auf ein Volumen von 2 mL aufkonzentriert. Nach Äquilibration der Größenausschlusschromatografie-Säule (Sephadex HiLoad 26/60 Superdex 75) mit Gelfiltrationspuffer (20 mM Tris (pH 7,4) 200 mM NaCl, 1 mM DTT, 5 % (v/v) Glycerol) erfolgte die Probenapplikation mit einer 2-mL-Probenschleife. Die fortlaufende Auftrennung der Probenlösung fand bei einer Flussrate von 2 mL/min statt. Die Fraktionierung und Analysierung erfolgte wie bei der Anionenaustauschchromatografie. Das aufgereinigte Protein wurde auf etwa 10 mg/mL aufkonzentriert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

5.2.3 Proteinanalytische Verfahren

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach Laemmli¹⁹⁹

Dieses Verfahren diente zur Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen. Zur elektrophoretischen Trennung wurde ein SDS-haltiges Polyacrylamidgel verwendet, welches von negativ geladenem SDS-Puffer (Natriumdodecylsulfat) zur Überdeckung der Eigenladung von Proteinen umgeben war.

Die Proteine wurden in 10-15 % Polyacrylamidgelen in einer Gelapparatur nach Studier²⁰⁰ aufgetrennt. Das sich oberhalb des Trenngels befindliche Sammelgel enthielt zur Verbesserung der Trennschärfe 5 % Polyacrylamid. Zum Größenvergleich der Proteine diente der Standardmarker „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ von MBI-Fermentas.

Gelherstellung

Zusammensetzung zur Herstellung von vier SDS-Polyacrylamidgelen:

	<i>Trenngel 12 %</i>	<i>Sammelgel 5 %</i>
Acrylamid/ Bisacrylamid (30 %/0,8 %)	8 mL	2 mL
4X Trenngel- / Sammelgelpuffer	5 mL	3 mL
H ₂ O bidest.	7 mL	7 mL
APS-Lösung (10 % (w/v) in H ₂ O)	140 µL	80 µL
TEMED	16 µL	28 µL

4x Trenngelpuffer: 1,5 M Tris*HCl (pH 8,8), 0,4 % SDS (w/v)

4x Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris*HCl (pH 6,8), 0,4 % SDS (w/v)

Zuerst wurde die Polymerlösung für das Trenngel hergestellt und anschließend sofort in eine Gelkammer von Bio-Rad gegossen. Um eine Austrocknung zu verhindern, wurde die Lösung mit Isopropanol überschichtet. Nach circa 30-minütiger Polymerisation waren die Gele fest genug, dass nach Entfernung des Isopropanols die Sammelgel-Polymerlösung aufgeschichtet und ein Probenkamm in das Sammelgel gesteckt werden konnte. Nach weiteren zwanzig Minuten waren die Gele vollständig auspolymerisiert.

Probenvorbereitung:

SDS-Probenpuffer: 100 mM Tris*HCl (pH 6,8), 20 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 200 mM (v/v) β-Mercaptoethanol

TBE-Puffer: 89 mM TRIS (pH 8,0), 89 mM Borsäure, 2 mM Na₂-EDTA

Färbelösung: 0,1 % (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R-250, 40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure²⁰¹

Entfärbelösung: 10 % (v/v) Ethanol, 5 % (v/v) Essigsäure

Für die Herstellung der SDS-Proben wurde nach einem einheitlichen Schema vorgegangen, welches nachfolgend dargestellt ist. Bei SDS-Proben, die aus Zellexpressionen hervorgingen, wurden die Schritte 1-10 durchgeführt. Bei Proteinproben, die aus Zelllysaten oder Aufreinigungen stammten, wurde bei Schritt 5 begonnen:

1. Die gesammelten Zellsuspensionen von 1 mL wurden für 5 min bei 8000 g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die Zellpellets einer Probenreihe wurden mit SDS-Probenpuffer so resuspendiert, dass ungefähr gleiche Konzentrationen auf das Gel aufgetragen werden konnten. Dazu wurde die Probe mit dem geringsten Zellgehalt in 300 μ L TBE-Puffer resuspendiert. Die anderen Proben wurden dann entsprechend gemessener optischer Dichte so verdünnt, dass sie der Zellkonzentration der kleinsten Probe entsprachen.
2. Die Proben wurden bei folgenden Bedingungen sonifiziert: 15 % Amplitude, Impuls: 1,5 s an, 1,0 s aus, jeweils 5 Wiederholungen. Die so erhaltenen Proteinlösungen repräsentierten die Gesamtproteinfraktionen.
3. Zu 20 μ L der Proteinfraktionen aus Schritt 2 wurden jeweils 20 μ L SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95 °C im Thermomixer (Eppendorf) erhitzt.
4. Für die Herstellung der löslichen Proteinfraktionen wurden jeweils 100 μ L der Gesamtproteinfraktionen für 5 min bei 13000 U/min und 4 °C zentrifugiert.
5. Die Denaturierung der löslichen Proteinfraktion aus 4. erfolgte wie unter 3. beschrieben.
6. Die erhitzten Proben wurden für 5 min auf Eis gekühlt und anschließend kurz abzentrifugiert.
7. Je nach Proteinkonzentration wurde 3-20 μ L Probe auf ein SDS-Gel in einer Gelapparatur von Bio-Rad aufgetragen.
8. Das SDS-Gel wurde circa 30 min bei einer konstanten Spannung von 90 V laufen gelassen, gefolgt von einer Erhöhung der Spannung auf 120 V, bis die Lauf-front das untere Ende der Gele erreicht hatte.
9. Zur Detektion wurden die Proteine zunächst für 45 min in einem Coomassie-Färbepad gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde anschließend in einem

Entfärbegrad entfernt. Dazu wurde das Gel in Entfärbelösung eingelegt und in einer Mikrowelle kurz erhitzt. Anschließend wurde das Entfärbegrad konstant geschwenkt und die Entfärbelösung in circa einstündigen Abständen mehrfach ausgetauscht.

10. Die Geldokumentation erfolgte mit dem Geldokumentationssystem FluorChem™ von Biozym und Alpha-Innotech.

Silberfärbung:

Die Silberfärbung von SDS-Gelen beruht auf der Reduktion von Silberionen an Thiol- und Carboxylresten²⁰²⁻²⁰⁴ sowie auf der Reduktion von freiem metallischen Silber durch Proteine.^{205,206} Die Reduktion ist dabei abhängig von dem Redox-Potenzial zwischen der Proteinprobe und dem umgebenden Milieu. Je nach Färbemethode können hier Proteinbanden positiv oder negativ geladen sein.²⁰⁴ In diesem Protokoll wurde die Methode mit positiv geladenen Proteinbanden angewendet. Die Silberfärbung erfolgte in saurem Milieu nach Nesterenko *et al.*⁸⁷

Das Protokoll zu Silberfärbung von SDS-Gelen ist nachfolgend tabellarisch aufgeführt:

<i>Aktion</i>	<i>Reagenz</i>	<i>Zeit</i>
Fixieren	60 mL 50 % (v/v) Aceton + 1,5 mL 50 % (w/v) TCE + 25 µL 37 % (v/v) HCHO	5 min
Waschen	H ₂ O	5 min
1. Vorbehandlung	60 mL 50 % (v/v) Aceton	5 min
2. Vorbehandlung	60 mL H ₂ O + 0,1 mL 10 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃ *5 H ₂ O	1 min
Waschen	H ₂ O	3 x 5 s
Imprägnieren	60 mL H ₂ O + 0,8 mL 20 % (w/v) AgNO ₃ + 0,6 mL 37 % (v/v) HCHO	8 min
Waschen	H ₂ O	2 x 5 s
Entwickeln	60 mL H ₂ O + 1,2 g Na ₂ CO ₃ + 25 µL 37 % (v/v) HCHO + 25 µL 10 % (w/v) Na ₂ S ₂ O ₃	10-60 s
Stoppen	1 % (v/v) Essigsäure	30 s
Waschen	H ₂ O	3 x 5 s

*Bradford-Proteinbestimmung*²⁰⁷

Diese Proteinbestimmung beruht auf der Absorptionsänderung des Farbstoffes Coomassie-Blau bei Anlagerung an Arginin und hydrophobe Aminosäurereste. Zur Proteinquantifizierung wurde die Quick-Start™ Bradford Proteinlösung von Bio-Rad verwendet. Um kleinere Proteinmengen verwenden zu können, wurde die Absorption bei

595 nm in transparenten 96-well-Platten (Greiner) mit dem Mikrotiterplattenspektrometer (Tecan Safire2) gemessen. Zunächst wurde eine Proteinstandardreihe mit γ -Globulin (1,25–25 $\mu\text{g/mL}$) sowie mit der zu vermessenden Proteinprobe, die im Konzentrationsbereich von 1–15 $\mu\text{g/mL}$ lag, erstellt. Dann wurden zu 150 μL Proteinlösung 150 μL Bradford-Lösung gegeben. Die Proteinkonzentration wurde anschließend aus der resultierenden Absorption bei 595 nm anhand der erstellten γ -Globulin-Proteinstandardreihe ermittelt.

Anmerkung: Da unterschiedliche Proteinbestimmungen großen Schwankungen unterliegen, wurden alle Kinasen, die eigenständig produziert wurden und für enzymatische Assays verwendet wurden, mit dieser Methode quantifiziert. Dies lieferte die zuverlässigsten Werte.

Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Proteinabsorption

Diese Methode beruht auf der Proteinabsorption bei einer Wellenlänge von 280 nm, welche hauptsächlich durch Tyrosin- und Tryptophanreste verursacht wird. Nach Lambert-Beer lässt sich die Konzentration (c) einer Lösung mithilfe des Extinktionskoeffizienten (ϵ_λ), der Extinktion (E_λ) und der Schichtdicke (d) der Küvette bestimmen.

$$E_\lambda = \epsilon_\lambda * c * d \quad (13)$$

Basierend auf dieser Methode wurde die Proteinbestimmung mit einem Nano-Drop ND-1000 von Thermo Scientific und dem Biophotometer von Eppendorf durchgeführt. Das zur Berechnung der Proteinkonzentration benötigte Molekulargewicht und der Extinktionskoeffizient einzelner Kinasen wurden mit dem Programm ProtParam des ExPASy Bioinformatikservers bestimmt.²⁰⁸

Massenspektrometrische Untersuchungen modifizierter Proteine

Methode 1 (Entsalzung mit dem *Dialyse Button* von Hampton Research): Eine Lösung aus 12,5 μM cSrc-DM wurde mit einem äquimolaren Anteil an Inhibitor (DMSO < 1 %) versetzt und für 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Pufferbestandteile sowie der überschüssige Inhibitor mit Hampton Research *Dialysis Buttons* mittels Dialyse gegen demineralisiertes Wasser entfernt. Zur Analyse wurden 4 μL Protein-Inhibitor-Lösung mit 16 μL demineralisiertem Wasser und 20 μL 2 % (v/v) Acetonitril/Ameisensäure vereint. Aliquote von 20 μL wurden mit dem ESI-

MS Finnigan LCQ Advantage Massenspektrometer von Thermo vermessen. Die Auswertung und Dekonvolution der MS-Spektren erfolgte mit dem BioWorks 3.1 (SR1) Programm von Thermo Scientific.

Methode 2 (Entsalzung mit Proteinentsalzungssäulen von Pierce):

Eine Lösung aus 62,5 μM cSrc-DM (entsprechend 2 mg/mL Protein) wurde mit einem äquimolaren Anteil an Inhibitor (DMSO < 1 %) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Entsalzung über eine Proteinentsalzungssäule. Im Anschluss wurden zu 27 μL Probe 11 % Acetonitril zugesetzt und, wie in Methode 1 beschrieben, massenspektrometrisch vermessen und ausgewertet.

5.2.4 Aktivitätsbasierte Assaysysteme

Z'lyte™ Assay

Dieser aktivitätsbasierte Assay der Firma Invitrogen nutzt ein am N- und C-Terminus fluorophormarkiertes Peptid, das von der getesteten Kinase phosphoryliert wird. In einer nachfolgenden Detektionsreaktion wird dem Ansatz Chymotrypsin zugesetzt, welches das nicht phosphorylierte Peptid spaltet. Dadurch kann zwischen den beiden an das Peptid geknüpften Fluorophoren kein FRET gemessen werden, woraus sich der Phosphorylierungsgrad und somit die Enzymaktivität bestimmen lässt. Die Volumina der Ansätze für Kinase- und Detektionsreaktion betragen jeweils 10 μL , die in schwarzen 384-well-(20 μL)-Platten durchgeführt werden. Der für cSrc und Abl verwendete Kinasepuffer enthielt 50 mM HEPES (pH 7,5), 0,01 % Brij-35, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA. Für EGFR bestand der Kinasepuffer aus 25 mM HEPES (pH 7,5), 0,01 % Brij-35, 2 mM MnCl_2 , 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 2,5 mM CaCl_2 und 0,1 mg/mL BSA. Der Assay enthielt drei Kontrollen, die für jeden Versuch mitbestimmt wurden. Als Positivkontrolle (100 % Phosphorylierung) wurde ein präphosphoryliertes Peptid eingesetzt. Die Negativkontrolle (0 % Phosphorylierung) enthielt Peptid und Kinase, aber kein ATP. Bei Inhibitionsmessungen wurde mit der dritten Kontrolle die ungehemmte Kinasereaktion determiniert, das heißt, es lagen Kinase, Peptid und ATP vor.

K_m-Bestimmung mit dem Z'lyte™ Assay:

Pipettierschema:

Reaktion	Reagenzien	µL/ Kavität	Inkubations- zeit (min)
Kinase- reaktion	2x Kinase cSrc-SM 0,125 ng/µL, cSrc-DM 0,04 ng/µL, EGFR wt 0,313 ng/µL, EGFR-T790M 1,25 ng/µL + 2x 1 ng/µL Peptid	5 µL	9 verschiedene Zeiten von 5- 120 min
	2x ATP, Verdünnungen von 400 – 0,142 µM	5 µL	
Entwick- lung	“Entwicklungsreagenz” (Chymotrypsin), verdünnt laut Vorschrift	5 µL	60
Stoppreak- tion	Stoppreagenz	5 µL	60

Vor der K_m-Bestimmung wurde die optimale Enzymkonzentration, wie in Kapitel 2.2.2.6 beschrieben, bestimmt. Je nach Enzymcharge wurde 1-15 nM cSrc-Kinase eingesetzt. Der Assay wurde zu jeder Zeit licht- und evaporationsgeschützt mit Aluminiumfolie abgedeckt. Folgende Parameter wurden für die FRET-Messungen mit dem Mikrotiterplattenfluorimeter verwendet:

<i>Parameter</i>	<i>Einstellung</i>
Anregungswellenlänge	400 nm
Anregungsbandbreite	12 nm
Emissionswellenlänge	445 nm & 520 nm
Emissionsbandbreite	12 nm
Integrationszeit	1000 µs
Anzahl Messungen	10
Verstärkung (gain)	optimal
z-Position	12600 µm

Für die FRET-Messungen mit dem Safire2 oder dem Spectramax®M5 Plattenfluorimeter wurden die oben angegebenen Messparameter verwendet. Die bei den Wellenlängen 470 nm und 520 nm gemessenen Fluoreszenzwerte wurden dividiert ($\lambda_{520}/\lambda_{470}$) und der prozentuale Anteil an phosphoryliertem Peptid (% P) mit folgender Gleichung berechnet:

$$\% P = 1 - \frac{((\lambda_{520}/\lambda_{470}) * \lambda_{520} (100\%)) - \lambda_{470} (100\%)}{(\lambda_{470} (0\%) - \lambda_{470} (100\%)) + ((\lambda_{520}/\lambda_{470}) * (\lambda_{520} (100\%) - \lambda_{520} (0\%)))}$$

Die weitere Auswertung erfolgte mit dem Programm XL-fit nach Kapitel 5.3.2.

IC₅₀-Bestimmung mittels Z'lyte Assay:

Die IC₅₀-Bestimmung erfolgte nach folgendem Pipettierschema:

Reaktion	Reagenzien	µL/ Kavität	Inkubations- zeit (min)
Kinase- reaktion	2x Kinase cSrc-SM 0,125 ng/µL, cSrc-DM 0,04 ng/µL, EGFR wt 0,313 ng/µL, EGFR-T790M 1,25 ng/µL + 100x Inhibitor (1-5 % DMSO)	5 µL	60
	2x ATP cSrc-SM: 25 µM, cSrc-DM: 15 µM, EGFR wt: 7 µM, EGFR-T790M: 2 µM + 2x Peptid cSrc: 1 µM, EGFR: 0,5 µM	5 µL	
Entwick- lung	“Entwicklungsreagenz” (Chymotrypsin), verdünnt laut Vorschrift	5 µL	60
Stoppreak- tion	Stoppreagenz	5 µL	60

Die Präinkubation von Inhibitor und Kinase betrug 40 – 120 min. Die weitere Auswertung erfolgte nach Kapitel 5.3.2.

Bestimmung des Gehalts an aktiver Kinase:

Die Bestimmung des Gehalts an enzymatisch aktiver Kinase erfolgte über eine Titrierung mit den Inhibitoren Staurosporin (für cSrc) beziehungsweise RL1 (für EGFR). Die Auswertung fand in drei Schritten statt: Zuerst wurde der Phosphorylierungsgrad des Peptides gegen die Inhibitorkonzentration semilogarithmisch aufgetragen und die Parameter der Hill-Gleichung mittels XL-fit bestimmt. Dann wurde mit den Punkten auf dem abfallenden Ast der Kurve eine Geradengleichung ($y = m \cdot x + b$) formuliert. Im letzten Schritt wurde die Gleichung nach x umgeformt und für y der Wert des unteren Plateaus der sigmoidalen Kurve aus der Hill-Gleichung eingesetzt (vergleiche Kapitel 5.3.2). Die so erhaltenen x-Werte entsprechen dem Gehalt an enzymatisch aktiver Kinase in Mol/L. Dieses basiert auf der Annahme, dass nur ein Inhibitormolekül an das aktive Zentrum der Kinase bindet.

HTRF[®] TK KinEASE[™] Assay

Dieser kommerzielle Assay der Firma Cisbio ist mit einem universellen (Poly-Tyr)-Peptid ausgestattet und ermöglicht die Vermessung zahlreicher Tyrosinkinase. Der Assay verläuft über zwei Schritte, einer Kinasereaktion und einer Entwicklungsreaktion. In der Kinasereaktion phosphoryliert die Kinase das biotinylierte (Poly-Tyr)-

Peptid. In der Entwicklungsreaktion wird ein fluoreszierender Europiumcryptat-Phosphoantikörper zur Kinasereaktion zugegeben, der an das phosphorylierte Peptid bindet. Die Entwicklungslösung enthält zusätzlich ein fluoreszenzmarkiertes Streptavidin, welches das mit dem Peptid konjugierte Biotin komplexiert. Da der Phosphoantikörper nur das phosphorylierte Peptid erkennt, (Abbildung 67) kann der Phosphorylierungsgrad über zeitaufgelöste FRET-Messung bestimmt werden. Für die Reaktionen wurden weiße 384-well-(20 μ L)-Platten von Greiner verwendet. Die FRET-Messung erfolgte auf dem Mikrotiterplattenspektrometer (Tecan Safire2) nach dem unten angegebenen Protokoll. Die Auswertung erfolgte durch Ermittlung des Quotienten aus den Fluoreszenzwerten, die bei 665 nm und 317 nm gemessen wurden.

Zur Etablierung des Assays für verschiedene Kinasen musste zuerst die Konzentration der Reagenzien, sowie die Inkubationszeit angepasst werden. Die Protokolle der einzelnen Anpassungsversuche sind nachfolgend tabellarisch dargestellt. Im Allgemeinen wurde folgendermaßen vorgegangen: Zur Optimierung der Kinasereaktionen wurden verschiedene Konzentrationen des anzupassenden Reagenzes eingesetzt, und die damit erhaltenen Phosphorylierungsgrade gegen die jeweiligen Reagenzkonzentrationen aufgetragen. Diese Messwerte ergaben hyperbole Kurven, aus denen dann die optimalen Konzentrationen, für IC_{50} - und K_m -Bestimmungen abgelesen werden konnten. Um die Stabilität des Assays zu überprüfen, wurden immer zwei Kontrollen eingesetzt. Eine Negativkontrolle, die nur Peptid und Kinase enthielt und eine Positivkontrolle, bei der zusätzlich noch ATP zugegeben wurde.

<i>Kinase</i>	<i>ATP (μM)</i>	<i>Substrat (nM)</i>	<i>Kinasereaktionszeit (min)</i>	<i>Kinasekonzentration (ng/μL)</i>
cSrc-SM	15	150	30	0,18
cSrc-DM	0,8	0,08	15	0,07
EGFR-wt	1,5-2,7	100	30	1,5
EGFR-L858R	4,5	110	30	0,3
EGFR-T790M	3,0	100	30	0,3
EGFR-L858R/T790M	1,0	50	30	0,15
VEGFR1	5,3	100	30	0,5
VEGFR2	14	100	30	0,8
VEGFR3	14	100	30	0,8
EPHA3	140	1400	60	1,8
p38 α (aktiv)	2,7	191	45	1
JNK2 (aktiv)	0,1	60	30	0,7
Abl	30	200	60	0,075-20

Je nach Konstrukt/Charge

Bestimmung der optimalen Kinasekonzentration:

Pipettierschema:

Reaktion	Reagenzien	$\mu\text{L}/$ Kavität	Inkubationszeit (min)
Kinase-reaktion	2x Kinase, Verdünnungen von 10 ng/ μL bis 0,02 ng/ μL	5 μL	30
	2x 100 μM ATP + 2x 1 μM Peptid	5 μL	
Entwicklung	Europiumcryptat-Phosphoantikörper	5 μL	60
	2x SA-XLL665 62,5 nM	5 μL	

Hierbei wurde die Enzymaktivität bei unterschiedlichen Kinasekonzentrationen gemessen. Die optimale Konzentration ergab sich aus der höchsten, sich im linearen Bereich der Kurve befindenden, Konzentration.

Bestimmung der optimalen Reaktionszeit der Kinase:

Pipettierschema:

Reaktion	Reagenzien	$\mu\text{L}/$ Kavität	Inkubationszeit (min)
Kinase-reaktion	2x Kinase, zuvor optimiert	5 μL	120, 90, 60, 30, 15 min
	2x 100 μM ATP + 2x 1 μM Peptid	5 μL	

Entwick- lung	Europiumcryptat-Phosphoantikörper	5 μ L	60
	2x SA-XLL665 62,5 nM	5 μ L	

Hierbei wurde der Phosphorylierungsgrad nach unterschiedlichen Reaktionszeiten gemessen. Die optimale Reaktionsdauer ergab sich aus der höchsten sich im linearen Bereich der hyperbolen Kurve befindenden Reaktionszeit.

Bestimmung des K_m -Wertes für ATP:

Pipettierschema:

Reaktion	Reagenzien	μ L/ Kavität	Inkubations- zeit (min)
Kinase- reaktion	2x Kinase, zuvor optimiert + 2x 1 μ M Peptid	5 μ L	zuvor opti- miert
	2x ATP, Verdünnungen von 300 – 0,142 μ M	5 μ L	
Entwick- lung	Europiumcryptat-Phosphoantikörper	5 μ L	60
	2x SA-XLL665 62,5 nM	5 μ L	

Hierbei wurde die Enzymaktivität bei unterschiedlichen ATP-Konzentrationen gemessen. Der K_m -Wert ergab sich nach Michaelis-Menten aus der Konzentration der halbmaximalen Geschwindigkeit, hier also aus der gemessenen halbmaximalen Enzymaktivität. Der Wert wurde mit dem XL-fit Programm ermittelt. (Vergleiche Kapitel 5.3.1.)

Bestimmung des K_m -Wertes für das Substrat-Peptid:

Pipettierschema:

Reaktion	Reagenzien	μ L/ Kavität	Inkubations- zeit (min)
Kinase- reaktion	2x Kinase, zuvor optimiert +2x 100 μ M ATP	5 μ L	zuvor opti- miert
	2x Peptid, Verdünnungen von 4 – 0,00192 μ M	5 μ L	
Entwick- lung	Europiumcryptat-Phosphoantikörper	5 μ L	60
	2x SA-XLL665 entsprechend der Peptidkonzentration im Verhältnis Peptid/Streptavidin: 1/8	5 μ L	

Hierbei wurde die Enzymaktivität bei unterschiedlichen Peptidkonzentrationen gemessen. Die Berechnung des K_m -Wertes für das Substratpeptid erfolgte analog zur Bestimmung des K_m -Wertes für ATP.

Bestimmung des optimalen Biotin/Streptavidin-Verhältnisses:

Pipettierschema:

Reaktion	Reagenzien	$\mu\text{L}/$ Kavität	Inkubations- zeit (min)
Kinase- reaktion	2x Kinase und + 2x ATP, zuvor optimiert	5 μL	zuvor opti- miert
	2x Peptid, zuvor optimiert	5 μL	
Entwick- lung	Europiumcryptat-Phosphoantikörper	5 μL	60
	2x SA-XLL665, entsprechend der Peptid- konzentration im Verhältnis Peptid/Streptavidin: 1/2, 1/4, 1/8	5 μL	

Hierbei wurde die Enzymaktivität bei unterschiedlichen Biotin/Streptavidin-Verhältnissen gemessen, wobei die Menge an biotinyliertem Peptid konstant gehalten wurde. Das optimale Verhältnis ergab sich aus der Konzentration an streptavidin-modifiziertem SA-XLL665, mit dem das besten Signal/Rausch-Verhältnis erzielt werden konnte.

Protokoll zur IC_{50} -Bestimmung:

Pipettierschema:

Reaktion	Reagenzien	$\mu\text{L}/$ Kavität	Inkubations- zeit (min)
Kinase- reaktion	2x Kinase, zuvor optimiert + 100x Inhibitor (2 % DMSO)	5 μL	zuvor opti- miert
	2x ATP +2x Peptid, zuvor optimiert	5 μL	
Entwick- lung	Europiumcryptat-Phosphoantikörper	5 μL	60
	2x SA-XLL665, entsprechend Peptidkonzentration, im Verhältnis Peptid/Streptavidin: 1/8	5 μL	

Vor Beginn der Kinasereaktion wurde die Kinase mit dem Inhibitor in 384-well- (100 μL)-Platten inkubiert. Je nach Inhibitionstyp betrug die Inkubationszeit 40 – 120 min. Die Auswertung erfolgte über die 4-Parameter-Gleichung nach Hill mit dem Programm XL-fit. Für weitere Informationen zur IC_{50} -Bestimmung siehe Kapitel 5.3.2.

Pufferzusammensetzung verschiedener Kinasen für den aktivitätsbasierten HTRF-Assay:

Pufferzusammensetzung:

HEPES 50 mM (pH7,0), NaN₃ 0,02 %, BSA 0,01 %, Orthovanadate 0,1 mM

<i>Kinase</i>	<i>Kinase Kit/ Antikörper</i>	<i>Pufferzusätze</i>
cSrc, EGFR,	TK	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT
VEGFR, -2,- 3, EGFR	TK	5 mM MgCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ , 1 mM DTT
EPHA3	TK	5 mM MgCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ , 1 mM DTT + SEB-Zusatz
Abl	TK	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT + SEB- Zusatz. (Versuche für Kapitel 4.2.2.4 enthielten keinen SEB-Zusatz.)
p38α/JNK2	GST-ATF2 Fusionsprotein (200 nM), Europiumcryptat markierter Antiphosphoantikörper (0,016 ng/μL), D2-markierter Anti-GST- Antikörper (12,5 nM)	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, Tween-80 0,01 %

Messparameter für die HTRF-Messung mit einem TecanSafire2 Mikrotiterplattenfluorimeter:

<i>Parameter</i>	<i>Einstellung</i>
Anregungswellenlänge	317 nm
Anregungsbandbreite	20 nm
Emissionswellenlänge	620 nm & 665 nm
Emissionsbandbreite	20 nm
Wartezeit	60 μs
Integrationszeit	500 μs
Anzahl Messungen	10
Verstärkung (gain)	optimal
z-Position	12900 μm

5.2.5 Versuche zur Charakterisierung irreversibler Inhibitoren

Puffer

Für alle Versuche zur Charakterisierung irreversibler Verbindungen mittels intrinsischer Fluoreszenz wurde folgender Puffer verwendet:

50 mM HEPES (pH 7,45), 200 mM NaCl, 0,01 % Brij-35 oder Tween-20

Aufnahme von Anregungs- und Emissionsspektren

Die Messung erfolgte auf dem JASCO FP-6500 Spektrofluorimeter in 4,5 mL Küvetten (Roth) unter Verwendung von 0,15 μM Inhibitor in An- und Abwesenheit von 0,1 μM Kinase in einem Volumen von 3 mL. Die Anregungswellenlänge für die Emissionsspektren lag bei 350 nm. Gemessen wurde bei einer Emissionswellenlänge von 420 nm.

Assayvalidierung und Charakterisierung irreversibler Inhibitoren

Diese Versuche wurden mit dem Mikrotiterplattenspektrometer (Tecan Safire2) in schwarzen 384-well-(20 μL)-Platten mit einem finalen Volumen von 14 μL durchgeführt. Es wurden jeweils 7 μL Inhibitor vorgelegt und die Reaktion mit Zugabe von 7 μL Kinaselösung gestartet. Nach Zugabe des Inhibitors wurde die Reaktion sofort fluorimetrisch aufgenommen.

Bestimmung der idealen Inhibierungsreaktionsgeschwindigkeit

Die Titration unterschiedlicher Kinasekonzentrationen wurde im Verhältnis von Kinase zu Inhibitor 1:1,5 durchgeführt. Dabei wurden Kinasekonzentrationen von 0; 0,02; 0,1; 0,5 und 1 μM eingesetzt. Das weitere Assayschema entsprach dem oben beschriebenen Protokoll.

Inhibitortitration

Die Titration erfolgte bei einer Kinasekonzentration von 0,5 μM und variierenden Inhibitorkonzentrationen von 50-0,4 μM .

Charakterisierung irreversibler Inhibitoren

cSrc: Die Messung erfolgte mit 1 μM Inhibitor und einem Überschuss von Kinase (5 μM). Für Inhibitionsmessungen in Anwesenheit von ATP wurde zusätzlich zu der Inhibitorlösung 2x 1 mM ATP hinzugegeben.

EGFR: Die Messung erfolgte mit 0,2 μM RL1 sowie einem Zusatz von 1 μM RL7 bei einer Kinasekonzentration von 1 μM .

Die Messung des weniger reaktiven Inhibitors RL23 erfolgte ohne weitere Zusätze bei einer Konzentration von 0,1 μM und 0,5 μM Kinase.

Geräteeinstellungen zur Bestimmung der intrinsischen Eigenfluoreszenz irreversibler Inhibitoren:

<i>Parameter</i>	<i>Einstellung</i>
Anregungswellenlänge	368 nm
Anregungsbandbreite	5 nm
Emissionswellenlänge	420 nm
Emissionsbandbreite	15 nm
Integrationszeit	40 μ s
Kinetikintervall	cSrc 30 sec, EGFR 4 sec
Verstärkung (gain)	110
z-Position	12300 μ m

Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von irreversiblen Kinaseinhibitoren

Die Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit verlief in drei Schritten. Nach Aufnahme des zeitabhängigen Fluoreszenzanstiegs (Abbildung 62, (**Diagramm 1**)) wurden die Werte der Kurven normiert, das heißt der obere Sättigungsbereich wurde auf 100% festgelegt und alle weiteren Datenpunkte ins Verhältnis zu diesem gesetzt (Abbildung 62, (**Diagramm 2**)). Somit ließen sich die Fluoreszenzkurven aller Verbindungen untereinander vergleichen. Aus dem linearen Anfangsbereich dieser normierten Kurven wurden dann die initialen Steigungen ermittelt, welche der initialen Geschwindigkeit der Inhibitor-Komplex-Formierung entsprachen. Je größer der Wert der initialen Geschwindigkeit, desto reaktiver ist der untersuchte Inhibitor. Die ermittelten Werte sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Bestimmungen.

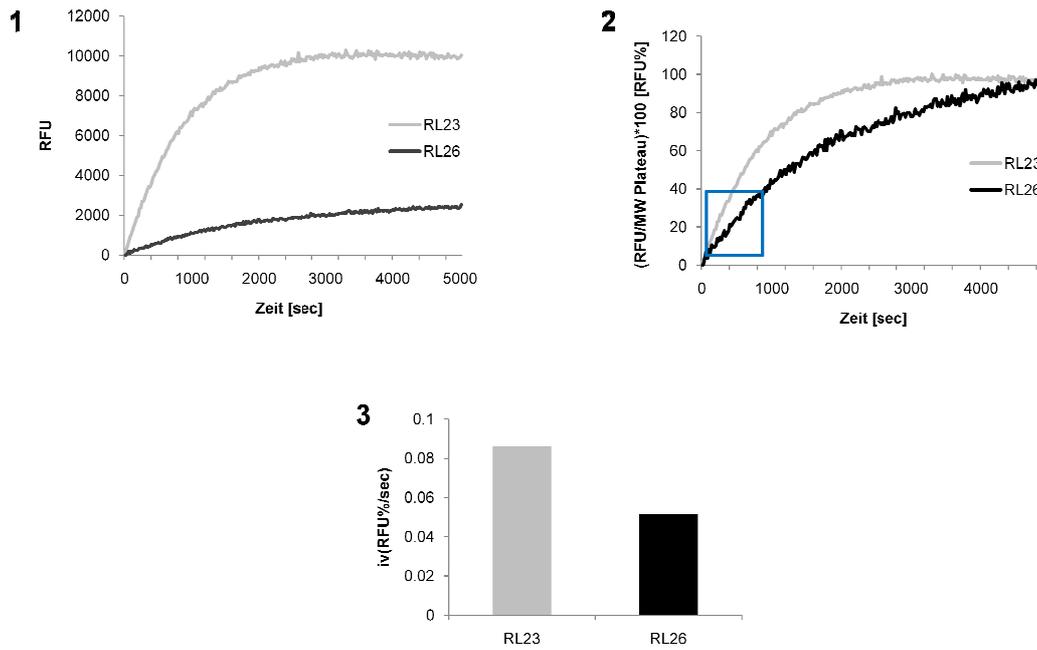


Abbildung 62: Bestimmung der initialen Reaktionsgeschwindigkeit von irreversiblen Kinaseinhibitoren.

Bestimmung der IC_{50} -Werte irreversibler Inhibitoren

Die Bestimmung der in Kapitel 2.2.2.3.2 beschriebenen IC_{50} -Werte für die irreversible Inhibitoren der cSrc-Kinase wurde mit dem HTRF-Assay nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Pipettierschema:

Reaktion	Reagenzien	$\mu\text{L}/$ Kavität	Inkubations- zeit (min)
Kinase- reaktion	2x Kinase (0,18 ng/ μL) + 50x Inhibitor (2 % DMSO)	5 μL	30
	2x ATP (15 μM) + 2x Peptid (0,150 μM)	5 μL	
Entwick- lung	Europiumcryptat-Phosphoantikörper	5 μL	60
	2x SA-XLL665, entsprechend der Peptidkonzentration, im Verhältnis Peptid/Strepavidin: 1/4 (0,01875 μM)	5 μL	

Vor Beginn der Kinasereaktion wurde die Kinase mit dem Inhibitor in 384-well-(100 μL)-Platten für 90 min inkubiert. Weitere Informationen zur Durchführung stehen in Kapitel 4.3.3.

5.2.6 EFC-Assaysystem

Die Versuche wurden in weißen 384-well-(20 μL)-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Messung der Chemilumineszenz fand auf dem Tecan Safire2 Mikrotiterplatten-

spektrometer statt. Die Zusammensetzung des Puffers für die Kinase-reaktion mit dem EFC-Assay bestand aus folgenden Reagenzien:

35 mM HEPES (pH 7,4), 20 mM NaCl, 0,4 mM EGTA, 0,01 % Tween-20, 10 mM MgCl₂, 0,1 % BSA

Kinasetitration

5 µL Kinase einer definierten Konzentration wurden mit 5 µL ED-Ligand (1,25 nM) in einer Mikrotiterplatte für 2 h inkubiert, bevor die Detektionsreagenzien, bestehend aus 5 µL EA und 5 µL CL-Substrat, hinzugegeben wurden. Die Mischung wurde anschließend für eine Stunde inkubiert. Beide Reagenzien wurden dem „*Kinase Binding Assay Detection Kit*“ von DiscoverX entnommen.

IC₅₀-Bestimmungen mit dem EFC-Assay

Zunächst wurden neun Inhibitorlösungen in DMSO hergestellt, die bezogen auf die finale Konzentration 100-fach konzentriert vorlagen. Anschließend wurden diese in EFC-Puffer so verdünnt, dass eine zweiprozentige DMSO/Puffer Lösung entstand. Im nächsten Schritt wurden 2,5 µL einer 4x Kinaselösung (finale Konzentrationen: 12,5 nM (p38α) und 150 nM (JNK2)) und 2,5 µL einer 4x ED-Ligand-Lösung (1,25 nM finale Konzentration) mit 5 µL der zuvor hergestellten Inhibitorverdünnung für 2 h in der Mikrotiterplatte inkubiert. Im Anschluss folgte die Detektionsreaktion (siehe oben) und die Messung der Chemilumineszenz auf dem Tecan Safire2 Mikrotiterplattenspektrometer. Die finale DMSO-Konzentration betrug 1 % und die Inhibitor-konzentrationen lagen im Bereich von 100 µM bis 1,5 nM. Die Ergebnisse sind Mittelwerte aus mindestens drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen, die jeweils in Zweifachbestimmungen ausgeführt wurden.

ATP-Titration mit dem EFC-Assay

Zunächst wurden sechs zweifach konzentrierte ATP-Verdünnungen in EFC-Puffer hergestellt. Anschließend wurden 2,5 µL einer 4x Kinaselösung (finale Konzentrationen: 12,5 nM (inaktive p38α) und 75 nM (aktive p38α)) und 2,5 µL einer 4x ED-Ligand-Lösung (1,25 nM finale Konzentration) mit 5 µL der zuvor hergestellten ATP-Verdünnung für 2 h in einer Mikrotiterplatte inkubiert. Im Anschluss folgte die Detektionsreaktion (siehe oben).

Dosiswirkungskurve von Inhibitor 4 mit PDGFR A, DDR2, RET, JNK2

Für die Inhibitortitration wurde das gleiche Protokoll wie für die IC₅₀-Bestimmungen verwendet, mit Ausnahme der Reaktionszeit für die Detektionszeit, die nur 10 min betrug, bevor die Mikrotiterplatte ausgelesen wurde (siehe oben). Die Kinasen wurden bei folgenden Konzentrationen eingesetzt: 75 nM PDGFR A (enzymatisch aktiv), DDR2 (enzymatisch aktiv), RET (enzymatisch aktiv), JNK2 (enzymatisch inaktiv).

DMSO/Glycerol-Titration

Der Versuchsaufbau und die Versuchsdurchführung entsprachen denen einer IC₅₀-Bestimmung mit dem EFC-Assay, unter Verwendung von Verbindung **4** als Inhibitor und inaktiver p38 α -Kinase. Zu der für die Verdünnung des Inhibitors verwendete zwei-prozentigen DMSO/Puffer-Lösung wurden die entsprechenden Mengen an DMSO beziehungsweise Glycerol zugemischt.

Aktivierung der p38 α -Kinase

Aktive MKK6-T207E/T211E (Invitrogen) mit einer Konzentration von 0,83 μ g/mL wurde zusammen mit inaktiver p38 α -Kinase (3,33 μ g/mL) in Aktivierungspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM Na₃VO₄, 0,01 % NP-40, 0,1 mg/mL BSA, 2 mM DTT, 10 mM MgCl₂ und 1 mM EGTA) verdünnt und mit 200 μ M ATP bei 30 °C für 1 h unter konstantem Rühren inkubiert. Anschließend wurde nicht verbrauchtes ATP über Nacht mittels Dialyse gegen einen Puffer der Zusammensetzung 25 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl und 10 % (v/v) Glycerol entfernt.

Kristallisationsexperimente der cSrc-Kinase mit Typ-II- und Typ-III-Inhibitoren

Die Kristallisationen wurden in EasyXtal-Platten von Qiagen durchgeführt und fanden bei 20 °C statt.

1.) Kristallisationsbedingungen für Typ-III-Inhibitoren:

Die Kristalle wurden durch die Wasserdampfdiffusionsmethode mit hängenden Tropfen erhalten. Dazu wurden 500 μ M des Inhibitors (in 2 % DMSO) mit 330 μ M Kinase, welche in Puffer mit 20 mM Tris (pH 8,0), 100 mM NaCl und 1 mM DTT vorlag, für 2 h vorinkubiert. Zur Kristallisation wurden 1 μ L Protein-Inhibitor-Lösung mit 1 μ L Reservoirlösung (0,1 mM MES (pH 6,9), 4 % Glycerol, 10 % PEG 4000 und 50 mM Natriumacetat) vereint. Plattenförmige trikline Kristalle der Raumgruppe P1 wuchsen innerhalb eines Tages heran.

2.) Kristallisationsbedingungen für Typ-II-Inhibitoren:

Um gut streuende Kristalle zu erhalten, mussten für diese Inhibitoren zunächst geeignete Kristallisationsbedingungen gefunden werden. Hierzu wurde 500 μM Inhibitor mit 180 μM Kinase in 20 mM Tris (pH 8,0), 100 mM NaCl und 1 mM DTT vereint und für 4 h inkubiert. Die Kristallisationsversuche erfolgten in 96-well-Kristallisationsplatten (Corning) mit der Wasserdampfdiffusionsmethode mit sitzenden Tropfen unter Verwendung der Kristallisationslösungs-Kollektionen JCSG Core I, JCSG Core II, JCSG Core III, JCSG Core IV, JCSG+, The PEGs suite und Cryos suite von Quiagen. Hierbei wurden mit einem Kristallisationsroboter (Mosquito; (TTP LabTech Ltd., Melbourn, UK) je 0,2 μL der Kristallisationslösungen mit 0,2 μL Kinase-Inhibitor-Komplexlösung gemischt. Die weitere Optimierung der so gefundenen Kristallisationsbedingungen führte zur Verwendung der Kristallisationslösung 122 mM MES (pH 6,4), 11 % PEG 20000 und 22,5 % (v/v) Glycerol für die Kristallisation von cSrc im Komplex mit Dasatinib sowie zur Verwendung der Kristallisationslösung bestehend aus 85 mM MES (pH 6,5), 10,2 % PEG 20000, 15 % (v/v) Glycerol für die Kokristallisation von Typ-II-Inhibitoren. Dazu wurde 1 μL Kinase-Inhibitor-Komplexlösung mit 0,5 μL Reservoirlösung vereint. Plattenförmige, trikline Kristalle der Raumgruppe P1 wuchsen innerhalb von einer Woche heran.

5.2.7 Fluoreszenzpolarisationsassay

Die Versuche wurden in schwarzen 384-well-(20 μL)-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Messung der Fluoreszenzpolarisation fand auf dem Tecan Safire2 Mikrotiterplattenspektrometer unter Verwendung einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm statt. Der G-Faktor von Fluorescein wurde zuvor für den Tecan Safire² bestimmt und lag bei 1,154. Unter Verwendung eines Puffers bestehend aus 50 mM HEPES (pH 7,4), 200 mM NaCl und 10 mM MgCl_2 betrug das finale Volumen nach Optimierung 15 μL . Auf Zusatz von Detergenzien im Puffer wurde bewusst verzichtet. Die Reaktionen fanden evaporationsgeschützt im Dunkeln bei Raumtemperatur statt. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal mit Zweifachbestimmungen wiederholt.

Titration der GNF-2 Sonde gegen ASS

Nach zuvor eingestellter Kinasekonzentration erfolgte die Titration der Sonde unter Verwendung von 7,5 μL ASS (500 nM) und je 7,5 μL ED-Ligand in unterschiedlicher Konzentration, variierend von 5-500 nM pro Reaktionsansatz. Die Inkubationszeit betrug 2 h, bevor die Reaktion ausgelesen wurde. Die Negativkontrolle enthielt den ED-Liganden in den entsprechenden Konzentrationen ohne Zusatz von ASS. Die Auswertung erfolgte durch Auftragung der Differenz zwischen Negativkontrolle und dem Messwert bei Zugabe von Sonde und ASS gegen die Konzentration an GNF2-Sonde. Zur Bestimmung des K_d -Wertes wurde folgende Gleichung verwendet:

$$y = (\text{BL}_{\text{max}} * x) / (\text{K}_d + x) \quad (14)$$

IC₅₀-Bestimmungen mit dem FP-Assay / Verdrängungsstudien mit dem FP-Assay

Zunächst wurden neun, bezogen auf die finale Konzentration, 100-fach konzentrierte Inhibitorlösungen in DMSO hergestellt, die anschließend in FP-Puffer so verdünnt wurden, dass eine zweiprozentige DMSO/Puffer Lösung entstand. Im nächsten Schritt wurde 7,5 μL einer Mischung aus Kinase (finale Konzentration: 500 nM (für ASS und Acat)) und GNF2-Sonden (finale Konzentration: 200 nM (für ASS und Acat)) mit 7,5 μL der zuvor hergestellten Inhibitorverdünnungen für 1 h in einer Mikrotiterplatte inkubiert. Im Anschluss folgte die Detektionsreaktion (siehe oben) und die Messung der Fluoreszenzpolarisation auf dem Tecan Safire2 Mikrotiterplattenspektrometer. Die finale DMSO-Konzentration betrug 1 % und die Inhibitorkonzentrationen lagen im Bereich von 100 μM - 1,5 nM. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm XLfit unter Verwendung der Hill-Gleichung. Die 4-Punktbestimmung erfolgte analog dem Protokoll für die IC₅₀-Bestimmung mit Ausnahme der verwendeten Inhibitorkonzentrationen, die final bei 50, 25, 2,5 und 0,5 μM lagen. Zur Auswertung wurde der Grad der Sondenverdrängung durch die getestete Substanz, bezogen auf GNF2, nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Verdrängung \%} = [(\text{Testsubstanz}_{25\mu\text{M}}\text{-GNF2}_{0.005\mu\text{M}}) / \text{GNF2}_{25\mu\text{M}}] * 100 \quad (15)$$

Bestimmung des dynamischen Bereiches für den FP-Assay:

Zur Bestimmung des dynamischen Bereiches wurde die Fluoreszenzpolarisation einer Positivkontrolle (Kinase + GNF2-Sonde) und einer Negativkontrolle (GNF2-Sonde) mit Zusatz unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen (0-200 mM) aufgenommen. Das

eingesetzte Format entsprach dem für die IC₅₀-Bestimmungen optimierten Format. Der dynamische Bereich ergab sich aus der Differenz der Positiv- und der Negativkontrolle.

5.2.8 TR-FRET Assay mit GNF2-Sonde

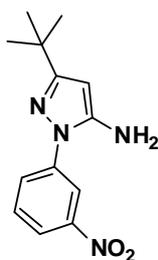
Der Versuch wurde in weißen 384-well-(20µL)-Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Messung der Fluoreszenz fand auf dem Tecan Safire2 Mikrotiterplattenspektrometer statt unter Verwendung der Anregungswellenlänge von 340 nm und der Emissionswellenlängen von 495 nm und 520 nm. Unter Verwendung eines Puffers mit 50 mM HEPES (pH 7,4), 200 mM NaCl und 10 mM MgCl₂ betrug das finale Volumen des Reaktionsansatzes 15 µL. Auf Zusatz von Detergenzien wurde bewusst verzichtet. Die Reaktionen fanden evaporationsgeschützt im Dunkeln bei Raumtemperatur statt.

Verdrängung der molekularen Sonde mit GNF2:

Zunächst wurden neun Inhibitorverdünnungen entsprechend denen zur IC₅₀-Bestimmung mit dem FP-Assay hergestellt. Zu 7,5 µL der jeweiligen Inhibitorlösung wurden 7,5 µL einer Mischung bestehend aus 10 nM ASS (mit Polyhistidinanhang), 4 nM Terbium-Antikörper und 120 nM GNF2-Sonde hinzugefügt. Die Reaktionsdauer belief sich auf 2 h, bevor die Fluoreszenz ausgelesen wurde. Zur Analyse wurde der Quotient der bei 520 nm und 495 nm ermittelten Fluoreszenzwerte gegen die GNF2-Konzentration semilogarithmisch nach Klotz *et al.*¹¹⁷ aufgetragen.

5.2.9 Chemische Synthese

5.2.9.1 Darstellung von 3-(*tert*-Butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin (2)



Eine Lösung aus 2.00 g (1 eq, 7.68 mmol) 3-Nitrophenylhydrazin-Hydrochlorid und 1.53 g (1.1 eq, 8.45 mmol) 4,4-Dimethyl-3-oxopentanonitril (1) wurde bei 90 °C in EtOH (10 mL) und HCl (2 mL) über Nacht unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zusatz von 20 % NaOH gestoppt. Das Produkt wurde dreimal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na₂SO₄ getrocknet, bevor das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt wurde.

Ausbeute: 1.14 g (4.38 mmol, 57.0 %), gelber pulveriger Feststoff.

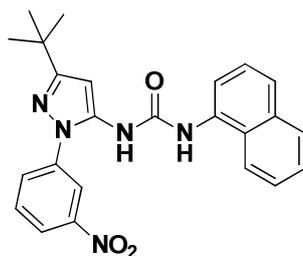
DC-Laufmittel: Ethylacetat/Petrolether: 3/7

HR-MS (ESI-MS): 261.13460 berechnet für C₁₃H₁₇N₄O₂ [M+H]⁺, gefunden: 261.13456.

¹H-NMR (CDCl₃): δ = 8.45 (t, *J* = 2.1 Hz, 1H); 8.09 (m, 2H); 7.73 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H); 5.48 (br, 2H); 5.47 (s, 1H); 1.23 (s, 9H).

¹³C-NMR (CDCl₃): δ = 162.12, 148.09, 147.96, 140.59, 130.48, 127.70, 119.59, 115.99, 88.22, 31.93, 30.03.

5.2.9.2 Darstellung von 1-(3-(*tert*-Butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(naphthalen-1-yl)harnstoff (3a)



Eine Mischung aus 400 mg (1 eq, 1.50 mmol) von zuvor hergestelltem Pyrazolamin (2) und 242 mg (1.13 eq, 1.70 mmol) Naphthylisocyanat wurde für 12 h bei RT in DCM (5 mL) unter Argon gerührt. Nach vollständiger Umsetzung des Pyrazolamins wurde das Lösungsmittel am Vakuum entfernt. Es folgte eine Umkristallisation mit Ethylacetat/Hexan.

Ausbeute: 445 mg (1.05 mmol, 69.0 %), weißer pulveriger Feststoff.

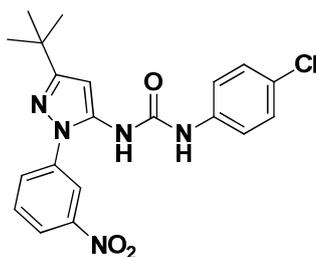
DC-Laufmittel: Ethylacetat/Petrolether: 3/7

HRMS (ESI-MS): berechnet: 430.18737 für $C_{24}H_{24}N_5O_3$ $[M+H]^+$, gefunden: 430.18691.

1H -NMR (DMSO- d_6): δ = 9.06 (s, 1H), 8.92 (s, 1H), 8.45 (s, 1H), 8.24 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 8.12 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.95 (m, 2H), 7.84 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.80 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.67 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 7.54 (m, 2H), 7.45 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 6.48 (s, 1H), 1.31 (s, 9H).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ = 161.92, 152.69, 148.13, 139.77, 137.77, 133.83, 133.68, 130.84, 129.54, 128.34, 126.68, 126.00, 125.78, 125.74, 123.89, 121.66, 121.37, 118.94, 117.74, 98.26, 32.20, 30.06.

5.2.9.3 Darstellung von 1-(3-(*tert*-Butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-chlorophenyl)harnstoff (3b)



Eine Mischung aus 400 mg (1 eq, 1.50 mmol) der zuvor hergestellten Pyrazolverbindung (2) und 265 mg (1.13 eq, 1.70 mmol) Chlorphenylisocyanat wurden bei RT für 15 h in DCM (5 mL) unter Argon gerührt. Nach kompletter Umsetzung des Pyrazol-Eduktes wurde das Produkt dreimal mit 100 mL Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet, bevor das Lösungsmittel mit dem Rotationsverdampfer und unter Hochvakuum verflüchtigt wurde. Das Produkt wurde über präparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 414 mg (1.00 mmol, 73.0 %), weißer pulveriger Feststoff.

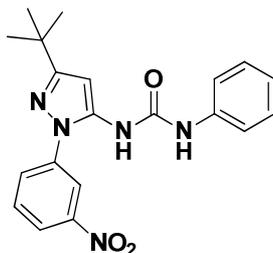
DC-Laufmittel: Ethylacetat/Petrolether: 3/7

1H -NMR (DMSO- d_6): δ = 9.16 (s, 1H), 8.58 (s, 1H), 8.37 (t, J = 2.1 Hz, 1H), 8.21 (ddd, J = 0.94, 2.3, 8.3 Hz, 1H), 8.05 (ddd, J = 1.0, 2.1, 8.1 Hz, 1H), 7.80 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.42 (m, 2H), 7.30 (m, 2H), 6.43 (s, 1H), 1.30 (s, 9H).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ = 161.89, 152.05, 148.11, 139.65, 138.25, 137.50, 130.81, 129.45, 128.64, 125.78, 121.38, 119.92, 117.78, 98.49, 32.19, 30.04.

HRMS (ESI-MS): berechnet: 414.13274 und 416.12979 für $C_{20}H_{21}^{35}ClN_5O_3$ und $C_{20}H_{21}^{37}ClN_5O_3 [M+H]^+$, gefunden: 414.13240 und 416.12945.

5.2.9.4 Darstellung von 3-(*tert*-Butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-phenylharnstoff (3c)



390 mg 3-(*tert*-Butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-amin (1 eq, 1.50 mmol) wurde mit 204 mg Phenylisocyanat (1.1 eq, 1.70 mmol) in 6 mL DCM unter Schutzgas (Argon) für 15 h gerührt. Nach kompletter Umsetzung des Pyrazol-Eduktes wurde das Produkt mit Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet, bevor das Lösungsmittel mit dem Rotationsverdampfer und unter Hochvakuum verflüchtigt wurde. Das Produkt wurde über präparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 314 mg (0.825 mmol, 55.0 %), weißer pulveriger Feststoff.

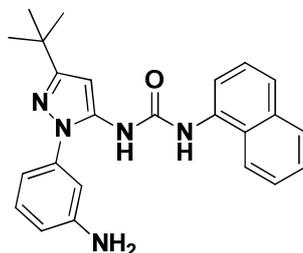
DC-Laufmittel: Ethylacetat/Petrolether: 3/7

HRMS (ESI-MS) berechnet: 380.17172 für $C_{20}H_{22}N_5O_3 [M+H]^+$, gefunden: 380.17200.

1H -NMR (DMSO- d_6): δ = 9.00 (s, 1H), 8.84 (s, 1H), 8.38 (t, 2.1 Hz, 1H), 8.22 (ddd, J = 0.8, 2.2, 8.2 Hz, 1H), 8.06 (ddd, J = 0.9, 2.1, 8.1 Hz, 1H), 7.81 (t, J = 8.2 Hz, 1H), 7.39 (dd, J = 1.1, 8.6 Hz, 2H), 7.26 (m, 2H), 6.97 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 6.42 (s, 1H), 1.31 (s, 9H).

^{13}C -NMR (DMSO- d_6): δ = 161.89, 152.03, 148.11, 139.67, 139.26, 137.71, 130.78, 129.49, 128.78, 123.23, 121.35, 118.37, 117.84, 98.10, 32.18, 30.05.

5.2.9.5 Darstellung von 1-(1-(3-Aminophenyl)-3-(*tert*-butyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(naphthalen-1-yl)harnstoff (4)



Zunächst wurden 100 mg (1 eq, 0.23 mmol) der zuvor hergestellten Substanz 1-(3-(*tert*-Butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(naphthalen-1-yl)harnstoff (3a), 88.1 mg (6 eq, 1.40 mmol) Ammoniumformiat, 5 mL EtOH und eine katalytische Menge Pd/C für die Reaktion eingesetzt und für 3 h unter Rückfluss und Schutzgas bei 90 °C erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung des Nitro-Eduktes wurde das Pd/C durch Filtration über Celite® entfernt und das Produkt dreimal mit 50 mL Ethylacetat extrahiert. Das flüchtige Lösungsmittel wurde am Vakuum entfernt. Das Produkt wurde über präparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 40.0 mg (0.10 mmol, 44.0 %), weißer pulveriger Feststoff.

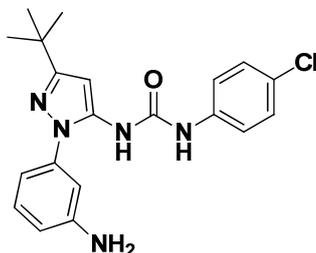
DC-Laufmittel: Ethylacetat/Petrolether: 1/1

HRMS (ESI-MS): berechnet: 400.21319 für C₂₄H₂₆N₅O [M+H]⁺, gefunden: 400.21217.

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 9.12 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 8.04 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.94 (dd, *J* = 7.9, 21.3 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.55 (m, 2H), 7.47 (td, *J* = 2.1, 7.8 Hz, 1H), 7.18 (td, *J* = 2.1, 7.9 Hz, 1H), 6.75 (s, 1H), 6.64 (dd, *J* = 7.8, 15.0 Hz, 2H), 6.39 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 5.4 (s, 2H), 1.28 (s, 9H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 160.21, 151.76, 149.74, 139.15, 137.19, 134.01, 133.64, 129.49, 128.33, 125.98, 125.87, 125.76, 125.64, 123.20, 121.43, 117.72, 112.91, 111.44, 109.94, 93.71, 31.94, 30.22.

5.2.9.6 Darstellung von 1-(1-(3-Aminophenyl)-3-(*tert*-butyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-chlorophenyl)harnstoff (5)



Eine Mischung aus 108 mg (1 eq, 0.26 mmol) der zuvor hergestellten Substanz 1-(3-(*tert*-Butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-(4-chlorophenyl)harnstoff (3b), 41.9 mg (3 eq, 0.78 mmol) Ammoniumchlorid und Raney-Nickel (2 mL in wässriger Lösung) wurde in DMF (2 mL) für 1 h bei 45 °C unter Schutzgas erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung des Nitro-Eduktes wurde das Produkt mit Wasser (3 x 10 mL) gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Vakuum entfernt.

Ausbeute: 62.0 mg (0.161 mmol, 62.0 %), weißer pulveriger Feststoff.

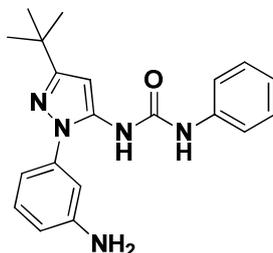
DC-Laufmittel: Ethylacetat/Petrolether: 1/1

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 9.24 (s, 1H), 8.38 (s, 1H), 7.44 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.14 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.68 (s, 1H), 6.59 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 6.34 (s, 1H), 5.43 (br, 2H), 1.26 (s, 9H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 160.20, 151.16, 149.73, 139.02, 138.44, 136.87, 129.53, 128.68, 125.53, 119.55, 112.97, 111.42, 109.97, 93.87, 31.99, 30.26.

HRMS (ESI-MS): berechnet: 384.15856 für C₂₀H₂₃³⁵ClN₅O [M+H]⁺ und 386.15561 für C₂₀H₂₃³⁷ClN₅O, gefunden: 384.15938 und 386.15635.

5.2.9.7 Darstellung von 1-(1-(3-Aminophenyl)-3-(*tert*-butyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-phenylharnstoff (6)



Eine Mischung aus 100 mg (1.0 eq, 0.26 mmol) der zuvor hergestellten Substanz 3-(*tert*-Butyl)-1-(3-nitrophenyl)-1*H*-pyrazol-5-yl)-3-phenylharnstoff (3c), 100 mg (6.15 eq, 1.60 mmol) Ammoniumformiat, 10 mL EtOH und eine katalytische Menge Pd/C wurde für 3 h unter Rückfluss und Schutzgas bei 90 °C erhitzt. Nach vollständiger Umsetzung des Nitro-Eduktes wurde das Pd/C durch Filtration über Celite[®] entfernt und das Produkt dreimal mit 50 mL Ethylacetat ausgeschüttelt. Das flüchtige Lösungsmittel wurde am Vakuum entfernt. Das Produkt wurde über präparative HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 52.0 mg (0.148 mmol, 57.0 %), beiger pulveriger Feststoff.

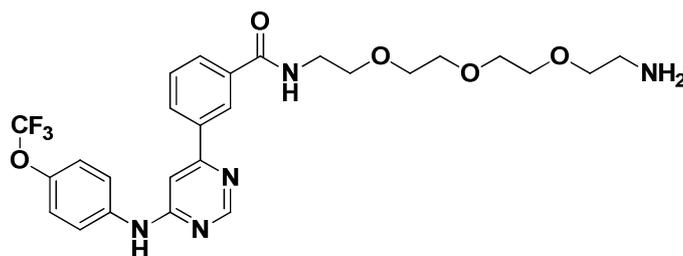
DC-Laufmittel: Ethylacetat/Petrolether: 1/1

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ = 9.08 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.41 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.26 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.22 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 6.97 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 6.83 (s, 1H), 6.74 (dd, *J* = 7.6, 18.4 Hz, 2H), 6.35 (s, 1H), 1.27 (s, 9H).

¹³C-NMR (DMSO-d₆): δ = 160.16, 151.19, 149.69, 139.42, 139.04, 137.06, 129.47, 128.78, 121.98, 117.98, 112.93, 111.44, 109.98, 93.64, 31.94, 30.23.

HRMS (ESI-MS): berechnet: 350.19754 für C₂₀H₂₄N₅O₁ [M+H]⁺, gefunden: 350.19759.

5.2.9.8 Darstellung von *N*-(2-(2-(2-(2-Aminoethoxy)ethoxy)ethoxy)ethyl)-3-(6-((4-(trifluoromethoxy)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)benzamide (9)



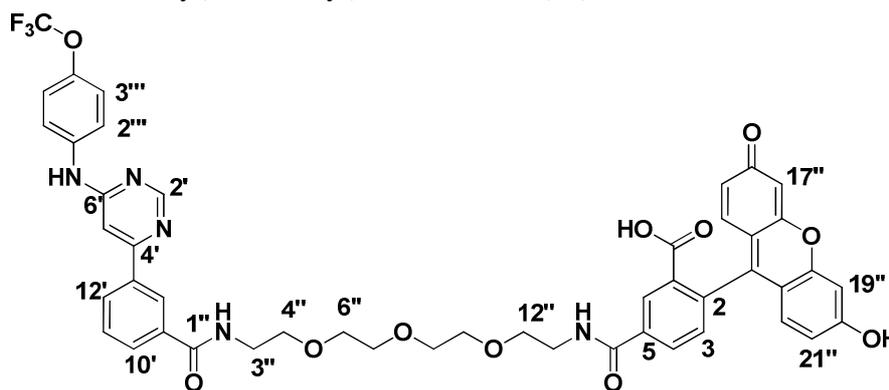
Zunächst wurden 11.0 mg (1 eq, 0.029 mmol) (6 eq, 0.176 mmol) 3-(6-((4-(Trifluoromethoxy)phenyl)amino)-pyrimidin-4-yl)-Benzoessäure (8), 17.1 mg (2.1 eq, 0.032 mmol) PyBOP[®] und 7.60 mg (1.1 eq, 0.059 mmol) DIPEA in 2 mL DCM gelöst und für circa 15 min im Rundkolben gerührt. Danach wurde 33.8 mg (6 eq, 0.176 mmol) 2,2'-((Oxybis(ethan-2,1-diyl))bis(oxy))diethanamin mit DCM und etwas DMF gelöst, langsam dem zuvor aktivierten Edukt hinzugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Das Produkt wurde dreimal mit 5 mL Ethylacetat extrahiert und über HPLC aufgereinigt.

Ausbeute: 6.8 mg, (0.0128 mmol, 44.0 %), beiger pulveriger Feststoff.

DC-Laufmittel: DCM/MeOH/HCOOH: 7/3/1

HRMS (ESI-MS): berechnet: 535.2406 für C₂₆H₃₂F₃N₅O₄ [M+H]⁺, gefunden: 535.2406.

5.2.9.9 Darstellung von 2-(6-Hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-5-((1-oxo-1-(3-(6-((4-(trifluoromethoxy)phenyl)amino)pyrimidin-4-yl)phenyl)-5,8,11-trioxa-2-azatridecen-13-yl)carbamoyl)-benzoessäure (11)



2.50 mg (1 eq, 6.67 μ mol) der zuvor hergestellten Substanz 2-(6-Hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)-5-((1-oxo-1-(3-(6-((4(trifluoromethoxy)phenyl)amino)-pyrimidin-4-yl)phenyl)-5,8,11-trioxa-2-azatridecen-13-yl)carbamoyl)benzoessäure (9) wurde in 5 mL DCM/DMF (9/1) gelöst und 30 min bei RT präaktiviert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 4.00 mg (1,2 eq, 8.50 μ mol) 5-(((2,5-Dioxopyrrolidin-1-yl)oxy)carbonyl)-2-(6-hydroxy-3-oxo-3*H*-xanthen-9-yl)benzoessäure. Die Kopplungsreaktion verlief über

Die Extraktion erfolgte durch gründliches Mörsern der Arzneistoff haltigen Tabletten, bevor die Masse in Wasser und Bicarbonat aufgenommen wurde. Danach wurde der Arzneistoff mit Ethylacetat, später fünfmal mit 200 mL DCM extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden über Na_2SO_4 getrocknet, bevor das Lösungsmittel mit dem Rotationsverdampfer entfernt wurde. Die trockene Substanz wurde mit HPLC präparativ gereinigt.

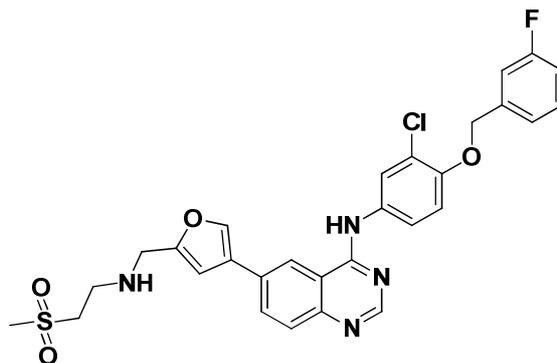
DC-Laufmittel: DCM/MeOH: 8/2

ESI-MS: berechnet: 393.44 für $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, gefunden: 393.44.

5.2.9.11 Extraktion des Arzneistoffes Lapatinib aus der Tablettenform

Inhaltsstoffe des Arzneimittels Tykerb[®]:

Bestandteil	Verwendung
Povidon	Trockenbindemittel, Füllmittel
Mikrokristalline Cellulose	Füllmittel
Stärke	Füllmittel
Magnesiumstearat	Schmiermittel
Polysorbat 80	Schmiermittel
Titandioxid	Farbpigment
Macrogol 400	Polyethylenglycol, Filmbildner
Hypromellose	Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC), Filmbildner
Sunset Yellow aluminium lake	Oranger Filmüberzug
Lapatinib	Arzneistoff



Lapatinib wurde nach der gleichen Methode wie Erlotinib aus der Tablettenform extrahiert. Die trockene Substanz wurde mit HPLC präparativ gereinigt.

DC-Laufmittel: DCM/MeOH: 8/2

ESI-MS: berechnet: 581.27 für $C_{29}H_{26}ClFN_4O_4S$ $[M+H]^+$, gefunden: 581.27.

5.2.10 Molekularbiologische Untersuchungen

DNS-Transformation mittels Hitzeschock

Die Transformation der mutierten DNS erfolgte mittels Hitzeschock²⁰⁹ in XL10-gold bzw. BL21 (DE3) YopH/GroEL CaCl₂-kompetenten *E. coli*-Zellen. Hierzu wurden 150 µL transformationskompetente Zellen mit 5-10 µl DNS versetzt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock von 30 sec bei 42 °C. Anschließend folgte eine fünfminütige Inkubationszeit auf Eis, dann wurden die Zellen mit 150 µL vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und zur Regeneration 60 min bei 37 °C und 350 U/min inkubiert. Die Selektion der Transformanden erfolgte über Nacht auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika.

Präparation von Plasmid DNS aus Escherichia coli

Die Präparation von Plasmid-DNS erfolgte unter Verwendung des QIASpin Miniprep Kits der Firma Qiagen, Hilden.

DNS-Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von dem Unternehmen Eurofins MWG Operon in Ebersberg und bei GATC Biotec in Konstanz durchgeführt.

5.3 Zusatzinformationen

5.3.1 Enzymatische Assays zur IC₅₀- und K_m-Bestimmung

Enzyme wie zum Beispiel Kinasen katalysieren biologische Prozesse und beschleunigen die Geschwindigkeit chemischer Reaktionen. Die Reaktionsgleichung lässt sich nach einem einfachen Modell aufsetzen. Enzym und Substrat bilden zuerst einen Übergangszustand, genannt Enzym-Substrat-Komplex (ES). Die Geschwindigkeitskonstante, mit der der Komplex gebildet wird, ist k_1 , die Konstante der Rückreaktion lautet k_{-1} . Aus dem ES-Komplex bildet sich mit der Geschwindigkeitskonstante k_2 , auch k_{cat} genannt, das Produkt P. Das Enzym E regeneriert sich, sodass ein neues Substrat gebunden werden kann. Die Rückreaktion von k_2 kann meistens vernachlässigt werden.¹¹⁴



Abbildung 63: Gleichgewichtsreaktion der enzymatischen Produktformation.

Die am weitesten verbreitete Gleichung, die die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration beschreibt, stammt von Henri, Michaelis und Menten^{210,211}.

$$v = \frac{[S] V_{\text{max}}}{[S] + K_m} \quad (16)$$

v	=	Geschwindigkeit der Reaktion
V_{max}	=	maximale Geschwindigkeitskonstante
$[S]$	=	Substratkonzentration
K_m	=	Michaelis-Menten-Konstante

Für das Kinetikmodell nach Michaelis-Menten müssen die Reaktanden im Fließgleichgewicht vorliegen. Dieses ist gewährleistet, wenn $[S] \gg [E]$ ist. Die Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit läuft im Bereich der initialen Geschwindigkeit ab. Dieses ist der Bereich, bei dem weniger als 10 % Substrat verbraucht wurde beziehungsweise sich nicht mehr als 10 % Produkt gebildet hat, sodass die Rückreaktion nicht abläuft. Die initiale Geschwindigkeit hängt von der Substrat- und Enzymkonzentration ab und bildet den Anfangsbereich einer Reaktion, in der sich die Geschwindigkeit nicht in Abhängigkeit der Zeit ändert. In diesem Bereich findet keine unerwünschte Produktinhibi-

tion, Reaktionsumkehr oder eine durch Substratsättigung induzierte Beeinträchtigung des Detektionssystems von enzymatischen Assays statt. Außerhalb dieses initialen Bereiches ist die Reaktion bezogen auf die Enzymkonzentration nicht linear und die Kinetik und gemessene Enzyminhibitionen sind nicht reproduzierbar oder nicht aussagekräftig. Die maximale Geschwindigkeitskonstante V_{\max} ist von der Enzymkonzentration $[E]$ und der Wechselzahl k_{cat} abhängig ($V_{\max} = k_{cat} * [E]$). Über diese Gleichung wird auch die Wechselzahl bestimmt. Die Gleichgewichtskonstante K_m ist ein Maß für die Affinität eines Substrats an das Enzym und gibt die Substratkonzentration an, bei der 50 % aller Enzymmoleküle das Substrat gebunden haben. Der K_m -Wert ist nicht von der Enzymkonzentration abhängig. Um in enzymatischen Assaysystemen kompetitive Inhibitoren zu detektieren, ist es wichtig, dass die Reaktion bei Bedingungen mit initialer Geschwindigkeit ablaufen und dass die Substratkonzentrationen um den K_m -Wert oder niedriger liegen.

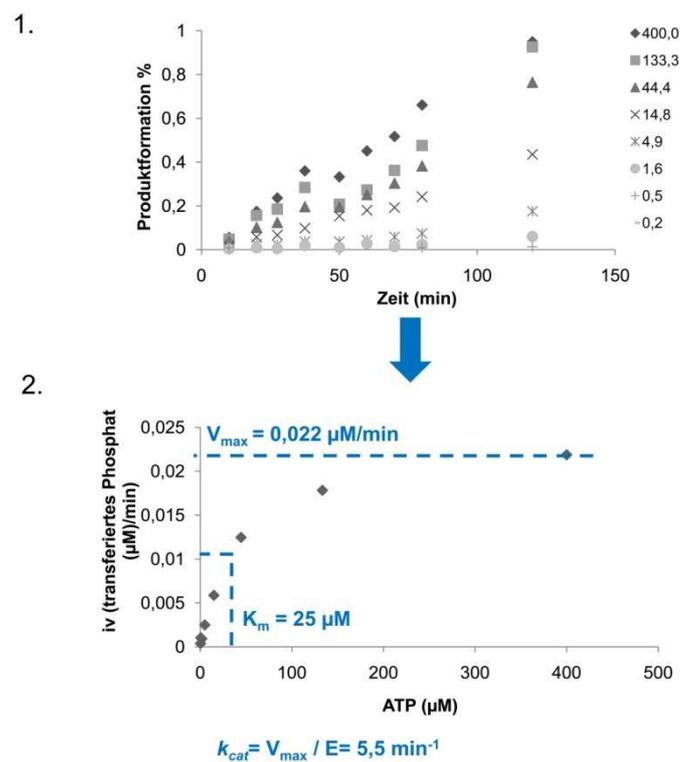


Abbildung 64: Die Ermittlung des K_m -wertes und der Wechselzahl k_{cat} erfolgt in zwei Schritten: 1. Zeitabhängige ATP-Titration zur Ermittlung des Bereiches der initialen Geschwindigkeit. In der rechten Spalte sind die ATP-Konzentrationen in μM dargestellt. 2. K_m - und V_{\max} -Bestimmung über die Darstellung der initialen Geschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

Außerdem sollten der pH-Wert der Lösung und die Pufferbedingungen optimiert und ähnlich der in der Zelle vorherrschenden Bedingung sein.

5.3.2 IC₅₀-Bestimmung von reversiblen und irreversiblen Kinaseinhibitoren

Die Bestimmung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) eines Hemmstoffes dient als Maß der Inhibitionsstärke. Der Wert gibt die Konzentration an, bei der die enzymatische oder inhibitorische Aktivität um 50 % reduziert wird. Zur Bestimmung wird eine Dosiswirkungskurve generiert, bei der die Hemmstoffkonzentration (x-Achse) logarithmisch gegen die Enzymaktivität (y-Achse) aufgetragen wird. Die Gleichung, die den IC₅₀ beschreibt, leitet sich von der Gleichung der Langmuirschen Adsorptionsisotherme ab¹¹⁴ und wird am häufigsten durch eine 4-Parameter-Gleichung (*Hill-Steigungs-Modell*) errechnet, in der die y-Werte die Aktivität in % und die x-Werte die entsprechende Inhibitorkonzentration darstellen.²¹²

IC₅₀-Gleichung abgeleitet von der Langmuirschen Adsorptionsisotherme lautet.

$$y = \frac{1}{1 + \frac{x}{IC_{50}}} \quad (17)$$

Gleichung (18) stellt das Hill-Steigungs-Modell zur Berechnung des IC₅₀-Wertes analog zur Abbildung 65 dar. (obere Ebene (E.) und untere Ebene (E.) stellen das obere und untere Plateau dar). x determiniert die Dosis des Inhibitors, y die Enzymaktivität oder Wirkung des Inhibitors. Der Hill-Koeffizient stellt gleichzeitig die Steigung der Kurve dar und sollte bei eins liegen. Größere Abweichungen resultieren aus Abweichungen vom Massenwirkungsgesetz.²¹³

$$y = \text{untere E.} + \frac{(\text{obere E.} - \text{untere E.})}{1 + \left(\frac{x}{\text{rel. IC}_{50}}\right)^{\text{Hill-Koeffizient}}} \quad (18)$$

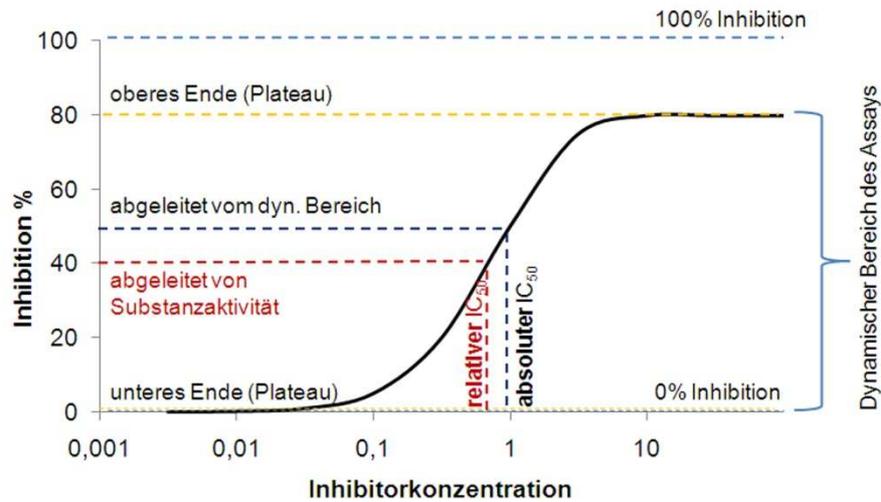


Abbildung 65: Dosiswirkungskurve mit Darstellung des relativen und absoluten IC_{50} -Wertes.

Abbildung 65 zeigt eine Dosiswirkungskurve und stellt den Unterschied zwischen relativem und absolutem IC_{50} heraus. Der relative IC_{50} leitet sich vom Wendepunkt der Inhibitionskurve ab. Der absolute IC_{50} resultiert aus der InhibitorKonzentration, die die Enzymaktivität bezüglich einer 100 % Aktivitätskontrolle um 50 % reduziert. Es sollten beide Werte in Betracht gezogen werden, da große Abweichungen voneinander wichtige Informationen geben können. So kann zum Beispiel eine Inkompatibilität des Inhibitors mit dem Detektionssystem vorliegen, verursacht durch erhöhte Inhibitor-Eigenfluoreszenz, Präzipitation oder ungenaue Messkontrollen. Außerdem könnten partielle Antagonisten vorliegen.²¹⁴ Da sich der IC_{50} von der Langmuirschen Adsorptionsisotherme ableitet, sei an dieser Stelle gesagt, dass man nicht zwingend Enzymaktivitäten messen muss, es kann auch die Protein-Ligand-Komplexbildung gemessen werden, die bei Titration des Liganden zum IC_{50} -Wert führt. Im Fall von kompetitiven Inhibitoren ist dieser von der Substratkonzentration, von der Enzymkonzentration und, nicht zu vernachlässigen, auch von der Assay-Technologie abhängig.

5.3.3 Aktivitätsbasierte Assay-Technologien

Der Goldstandard für Kinaseassays ist der traditionelle Radioaktivitätsassay, bei dem radioaktives ATP eingesetzt wird, um den Phosphatgruppenübertrag mit einem Scintillationsgerät zu detektieren.^{88,89,128} Der Assay ist sehr sensitiv, allerdings wird er aufgrund von gesundheitsschädlicher radioaktiver Strahlung häufig von alternativen Technologien wie Fluoreszenz-, Lumineszenz- oder Fluoreszenzpolarisationsystemen abgelöst. Im Gegensatz dazu haben sich Assaysysteme, die auf reinen Absorptionsmes-

sungen beruhen, mangels Robustheit und starker Interferenz mit Inhibitoren nicht durchsetzen können.²¹⁵ Die in dieser Arbeit eingesetzten aktivitätsbasierten Assaysysteme werden an dieser Stelle im Einzelnen beschrieben:

Z'lyte™-Assay^{216,217}

Der Z'lyte-Assay beruht auf FRET (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer)-Messung zwischen den zwei Fluorophoren Fluorescein und Coumarin, die an das von der Kinase zu phosphorylierende Peptid jeweils am C- und N-Terminus konjugiert sind. Im Falle einer Phosphorylierung wird in einer Detektionsreaktion der nicht phosphorylierte Peptidanteil von der Protease Chymotrypsin gespalten und somit das FRET-System destruiert. Zur Analyse wird der Quotient aus der Fluoreszenzintensität bei der Emissionswellenlänge des FRET-Donors, also dem Coumarin, und der Fluoreszenzintensität des FRET-Akzeptors, also dem Fluorescein gebildet (C/F). Der Assay wird in schwarzen 384 well-(20µL)-Platten durchgeführt und ist HTS-tauglich.

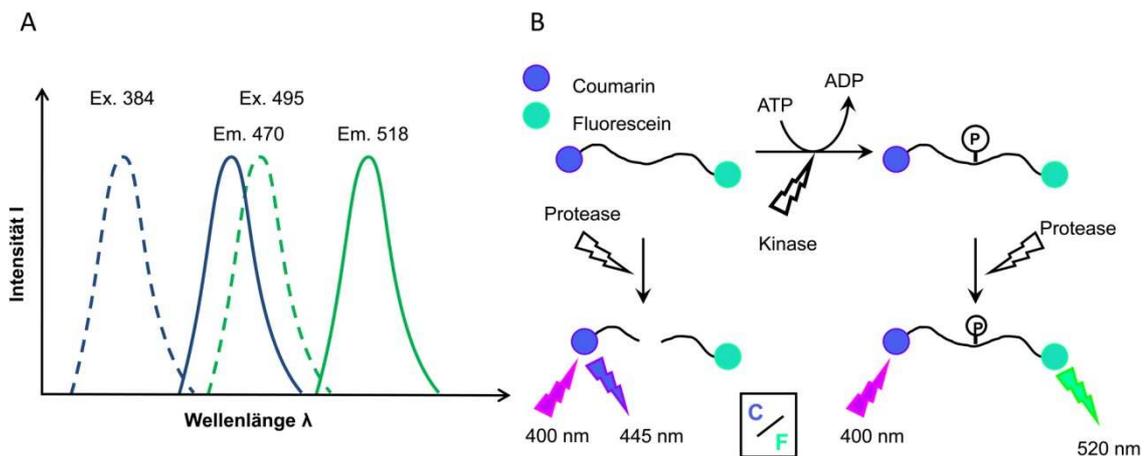


Abbildung 66: (A) Absorptionsspektren (gestrichelt) und Emissionsspektren (durchgehend) von Coumarin (blau) und Fluorescein (grün). Durch Überlappung des Emissionsspektrums von Coumarin mit dem Absorptionsspektrum von Fluorescein kommt es zur Anregung des Fluorescein-Farbstoffes, welches durch Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden kann. (B) Schematische Darstellung des FRET-basierten Z'lyte-Assays. Anregungswellenlänge (Ex.), Emissionswellenlänge (Em.).

Exkurs FRET: Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer²¹⁸ kann zwischen zwei Fluorophoren beobachtet werden, bei denen das Emissionsspektrum des einen Fluorophors mit dem Absorptionsspektrum des anderen überlappt. Die Energie des angeregten Fluorophors wird nicht in Form von Fluoreszenz frei, sondern wird strahlungslos durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen auf den Fluorophor-Akzeptor übertragen, der somit zur Fluoreszenz angeregt wird. Folgende Voraussetzungen müssen gewährleistet sein, damit FRET stattfinden kann: Für die strahlungsfreie Energieübertragung auf einen Ak-

zeptor muss das Emissionsspektrum des FRET-Donors mit dem Absorptionsspektrum des FRET-Akzeptors überlappen. Außerdem müssen die Fluorophore parallele elektronische Schwingungsebenen haben, der Abstand der beiden Moleküle darf nicht zu groß sein und die Emissionsintensität muss groß genug sein, damit der Fluorophor-Akzeptor angeregt werden kann.

HTRF[®]-Assay²¹⁹⁻²²¹

Beim HTRF-Assay wird die Phosphorylierung eines biotinylierten Substrates gemessen. Zur Detektion wird ein gegen Phosphatgruppen gerichteter Europiumcryptat-markierter Antikörper als FRET-Donor verwendet. Als FRET-Akzeptor wird der biogene Fluorophor Allophycocyanin (XL665) eingesetzt, der an Streptavidin konjugiert ist. In einer Detektionsreaktion lagert sich der Antikörper an das phosphorylierte Peptid. Außerdem bildet Streptavidin einen Komplex mit Biotin, sodass die Bestimmung des Anteils an phosphoryliertem Peptid über TR-FRET Messung erfolgen kann. Bei der zeitaufgelösten (TR)-FRET Messung erfolgt die Emissionsmessung circa 60 μ s nach der Exzitation. Dadurch können Störungen durch Eigenfluoreszenzen der Testsubstanzen vernachlässigt werden, was einen großen Vorteil im Hochdurchsatz-Screening-Verfahren (HTS) bringt. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Messung bei höheren Wellenlängen erfolgt. Die meisten Testverbindungen sind aromatisch planar und haben somit unerwünschte fluoreszierende Eigenschaften, die die Messung stören könnten. Da aromatische Verbindungen bei kürzeren Wellenlängen emittieren als XL665, kann es somit nicht zu Interferenzen kommen.

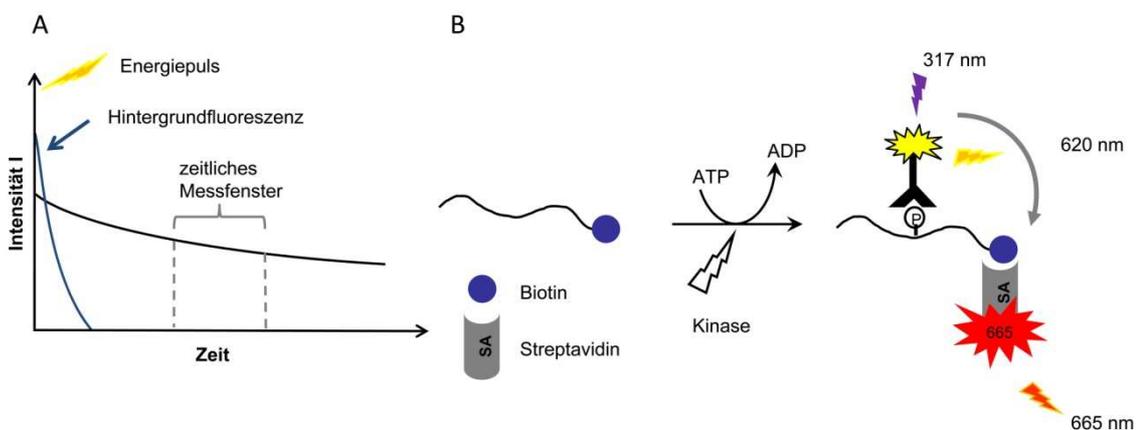


Abbildung 67: (A) Grafische Darstellung der zeitaufgelösten FRET-Messung. Nach der Anregung erfolgt die Fluoreszenzmessung erst nach einer Verzögerung von circa 60 μ s. Dies ermöglicht, die Hintergrundfluoreszenz zu umgehen. (B) Schematische Darstellung des HTRF-Assayprinzips.

6 Literaturverzeichnis

1. Hanks, S.K., Quinn, A.M. & Hunter, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**, 42-52 (1988).
2. Ullrich, A. & Schlessinger, J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61**, 203-212 (1990).
3. Pawson, T. Protein modules and signalling networks. *Nature* **373**, 573-580 (1995).
4. Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**, 1912-34 (2002).
5. Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **103**, 211-225 (2000).
6. Dzeja, P.P. & Terzic, A. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* **206**, 2039-2047 (2003).
7. Rabiller, M. *et al.* Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases. *Arch Pharm (Weinheim)* **343**, 193-206 (2010).
8. Bublil, E.M. & Yarden, Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 124-134 (2007).
9. Gschwind, A., Fischer, O.M. & Ullrich, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **4**, 361-370 (2004).
10. Jope, R.S., Yuskaitis, C.J. & Beurel, E. Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): inflammation, diseases, and therapeutics. *Neurochem Res* **32**, 577-595 (2007).
11. Johnson, G.L., Dohlman, H.G. & Graves, L.M. MAPK kinase kinases (MKKKs) as a target class for small-molecule inhibition to modulate signaling networks and gene expression. *Curr Opin Chem Biol* **9**, 325-331 (2005).
12. Drmanac, R. *et al.* Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science* **327**, 78-81 (2010).
13. Lander, E.S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921 (2001).
14. Venter, J.C. *et al.* The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351 (2001).
15. Pleasance, E.D. *et al.* A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* **463**, 191-196 (2009).
16. Chanda, S.K. & Caldwell, J.S. Fulfilling the promise: drug discovery in the post-genomic era. *Drug Discov Today* **8**, 168-174 (2003).
17. Davidov, E., Holland, J., Marple, E. & Naylor, S. Advancing drug discovery through systems biology. *Drug Discov Today* **8**, 175-183 (2003).
18. Johnson, L.N. Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds. *Q Rev Biophys* **42**, 1-40 (2009).
19. Zheng, J. *et al.* 2.2 A refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **49**, 362-365 (1993).
20. Nagar, B. *et al.* Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* **112**, 859-871 (2003).
21. Backes, A.C., Zech, B., Felber, B., Klebl, B. & Müller, G. Small-molecule inhibitors binding to protein kinase. Part II: the novel pharmacophore approach of type II and type III inhibition *Expert Opin Drug Discovery* **3**, 1427-1449 (2008).

22. Huse, M. & Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275-282 (2002).
23. Backes, A.C., Zech, B., Felber, B., Klebl, B. & Müller, G. Small-molecule inhibitors binding to protein kinases. Part I: exceptions from the traditional pharmacophore approach of type I inhibition. *Expert Opin Drug Discovery* **3**, 1409-1425 (2008).
24. Traxler, P. & Furet, P. Strategies toward the design of novel and selective protein tyrosine kinase inhibitors. *Pharmacol Ther* **82**, 195-206 (1999).
25. Beis, I. & Newsholme, E.A. The contents of adenine nucleotides, phosphagens and some glycolytic intermediates in resting muscles from vertebrates and invertebrates. *Biochem J* **152**, 23-32 (1975).
26. Jänne, P.A., Gray, N. & Settleman, J. Factors underlying sensitivity of cancers to small-molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 709-723 (2009).
27. Zuccotto, F., Ardini, E., Casale, E. & Angiolini, M. Through the "gatekeeper door": exploiting the active kinase conformation. *J Med Chem* **53**, 2681-2694 (2010).
28. Liu, Y. & Gray, N.S. Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations. *Nat Chem Biol* **2**, 358-364 (2006).
29. Simard, J.R. *et al.* A new screening assay for allosteric inhibitors of cSrc. *Nat Chem Biol* **5**, 394-396 (2009).
30. Simard, J.R. *et al.* Development of a fluorescent-tagged kinase assay system for the detection and characterization of allosteric kinase inhibitors. *J Am Chem Soc* **131**, 13286-13296 (2009).
31. Bogoyevitch, M.A. & Fairlie, D.P. A new paradigm for protein kinase inhibition: blocking phosphorylation without directly targeting ATP binding. *Drug Discov Today* **12**, 622-633 (2007).
32. Ogiso, H. *et al.* Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* **110**, 775-787 (2002).
33. Ferguson, K.M. *et al.* EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* **11**, 507-517 (2003).
34. Bocharov, E.V. *et al.* Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state. *J Biol Chem* **283**, 6950-6956 (2008).
35. Red Brewer, M. *et al.* The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain. *Mol Cell* **34**, 641-651 (2009).
36. Lemmon, M.A. & Schlessinger, J. Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization. *Trends Biochem Sci* **19**, 459-463 (1994).
37. Jura, N. *et al.* Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* **137**, 1293-1307 (2009).
38. Hubbard, S.R. The juxtamembrane region of EGFR takes center stage. *Cell* **137**, 1181-1813 (2009).
39. Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P.A. & Kuriyan, J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **125**, 1137-1149 (2006).
40. Zandi, R., Larsen, A.B., Andersen, P., Stockhausen, M.T. & Poulsen, H.S. Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* **19**, 2013-2023 (2007).
41. Irmer, D., Funk, J.O. & Blaukat, A. EGFR kinase domain mutations - functional impact and relevance for lung cancer therapy. *Oncogene* **26**, 5693-5701 (2007).
42. www.european-lung-foundation.org.

43. D'Addario, G. & Felip, E. Non-small-cell lung cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **19 Suppl 2**, ii39-40 (2008).
44. Bunn, P.A., Jr. Novel therapies for non-small-cell lung cancer: a 2008 update. *Clin Lung Cancer* **10 Suppl 1**, S6 (2009).
45. Fukuoka, M. *et al.* Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* **21**, 2237-2246 (2003).
46. Gerber, D.E. EGFR Inhibition in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Drug Dev Res* **69**, 359-372 (2008).
47. Levitzki, A. & Mishani, E. Tyrosine kinase inhibitors and other tyrosine kinase inhibitors. *Annu Rev Biochem* **75**, 93-109 (2006).
48. Sharma, S.V., Bell, D.W., Settleman, J. & Haber, D.A. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 169-181 (2007).
49. Weinstein, I.B. Cancer. Addiction to oncogenes—the Achilles heel of cancer. *Science* **297**, 63-64 (2002).
50. Muhsin, M., Graham, J. & Kirkpatrick, P. Gefitinib. *Nat Rev Drug Discov* **2**, 515-516 (2003).
51. Sequist, L.V. First-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in EGFR mutation: positive non-small cell lung cancer patients. *J Thorac Oncol* **3**, S143-145 (2008).
52. Lynch, T.J. *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **350**, 2129-2139 (2004).
53. Jiang, J. *et al.* Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML. *Blood* **104**, 1855-1858 (2004).
54. Pao, W. *et al.* Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* **2**, e73 (2005).
55. Mok, T.S. *et al.* Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* **361**, 947-957 (2009).
56. Gazdar, A.F. Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer. *N Engl J Med* **361**, 1018-1020 (2009).
57. Silvestri, G.A. & Rivera, M.P. Targeted therapy for the treatment of advanced non-small cell lung cancer: a review of the epidermal growth factor receptor antagonists. *Chest* **128**, 3975-3984 (2005).
58. Kobayashi, S. *et al.* EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* **352**, 786-792 (2005).
59. Getlik, M. *et al.* Hybrid Compound Design To Overcome the Gatekeeper T338M Mutation in cSrc. *J Med Chem* **52**, 3915-3926 (2009).
60. Jacobs, M.D. *et al.* Pim-1 ligand-bound structures reveal the mechanism of serine/threonine kinase inhibition by LY294002. *J Biol Chem* **280**, 13728-13734 (2005).
61. Yun, C.H. *et al.* The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2070-2075 (2008).
62. Yun, C.H. *et al.* Structures of lung cancer-derived EGFR mutants and inhibitor complexes: mechanism of activation and insights into differential inhibitor sensitivity. *Cancer Cell* **11**, 217-227 (2007).
63. Alaimo, P.J., Knight, Z.A. & Shokat, K.M. Targeting the gatekeeper residue in phosphoinositide 3-kinases. *Bioorg Med Chem* **13**, 2825-2836 (2005).

64. Liu, Y., Shah, K., Yang, F., Witucki, L. & Shokat, K.M. A molecular gate which controls unnatural ATP analogue recognition by the tyrosine kinase v-Src. *Bioorg Med Chem* **6**, 1219-26 (1998).
65. Carter, T.A. *et al.* Inhibition of drug-resistant mutants of ABL, KIT, and EGF receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 11011-11016 (2005).
66. Azam, M., Seeliger, M.A., Gray, N.S., Kuriyan, J. & Daley, G.Q. Activation of tyrosine kinases by mutation of the gatekeeper threonine. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 1109-1118 (2008).
67. Stamos, J., Sliwkowski, M.X. & Eigenbrot, C. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem* **277**, 46265-46272 (2002).
68. Yoshida, T. *et al.* Effects of Src inhibitors on cell growth and epidermal growth factor receptor and MET signaling in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer cells with acquired MET amplification. *Cancer Sci* **101**, 167-172 (2009).
69. Pao, W. *et al.* KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib. *PLoS Med* **2**, e17 (2005).
70. Sos, M.L. *et al.* PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. *Cancer Res* **69**, 3256-3261 (2009).
71. Riely, G.J. Second-generation epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **3**, 146-149 (2008).
72. Wood, E.R. *et al.* A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res* **64**, 6652-6659 (2004).
73. Wissner, A. & Mansour, T.S. The development of HKI-272 and related compounds for the treatment of cancer. *Arch Pharm (Weinheim)* **341**, 465-477 (2008).
74. Kobayashi, S. *et al.* An alternative inhibitor overcomes resistance caused by a mutation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* **65**, 7096-7101 (2005).
75. Sos, M.L. *et al.* Chemogenomic profiling provides insights into the limited activity of irreversible EGFR Inhibitors in tumor cells expressing the T790M EGFR resistance mutation. *Cancer Res* **70**, 868-874 (2010).
76. Kwak, E.L. *et al.* Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7665-7670 (2005).
77. Li, D. *et al.* BIBW2992, an irreversible EGFR/HER2 inhibitor highly effective in preclinical lung cancer models. *Oncogene* **27**, 4702-4711 (2008).
78. Yu, Z. *et al.* Resistance to an irreversible epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor in EGFR-mutant lung cancer reveals novel treatment strategies. *Cancer Res* **67**, 10417-10427 (2007).
79. Godin-Heymann, N. *et al.* The T790M "gatekeeper" mutation in EGFR mediates resistance to low concentrations of an irreversible EGFR inhibitor. *Mol Cancer Ther* **7**, 874-879 (2008).
80. Kortemme, T. & Creighton, T.E. Ionisation of cysteine residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to unusual thiol pKa values in proteins of the thioredoxin family. *J Mol Biol* **253**, 799-812 (1995).
81. Wissner, A. *et al.* Dual irreversible kinase inhibitors: quinazoline-based inhibitors incorporating two independent reactive centers with each targeting different cysteine residues in the kinase domains of EGFR and VEGFR-2. *Bioorg Med Chem* **15**, 3635-3648 (2007).

82. Wood, E.R. *et al.* 6-Ethynylthieno[3,2-d]- and 6-ethynylthieno[2,3-d]pyrimidin-4-anilines as tunable covalent modifiers of ErbB kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 2773-2778 (2008).
83. www.clinicaltrials.gov.
84. Blair, J.A. *et al.* Structure-guided development of affinity probes for tyrosine kinases using chemical genetics. *Nat Chem Biol* **3**, 229-238 (2007).
85. Michalczyk, A. *et al.* Structural insights into how irreversible inhibitors can overcome drug resistance in EGFR. *Bioorg Med Chem* **16**, 3482-3488 (2008).
86. Seeliger, M.A. *et al.* High yield bacterial expression of active c-Abl and c-Src tyrosine kinases. *Protein Sci* **14**, 3135-3139 (2005).
87. Nesterenko, M.V., Tilley, M. & Upton, S.J. A metallo-dependent cysteine proteinase of *Cryptosporidium parvum* associated with the surface of sporozoites. *Microbios* **83**, 77-88 (1995).
88. Olive, D.M. Quantitative methods for the analysis of protein phosphorylation in drug development. *Expert Rev Proteomics* **1**, 327-341 (2004).
89. Ma, H., Deacon, S. & Horiuchi, K. The challenge of selecting protein kinase assays for lead discovery optimization. *Expert Opin Drug Discov* **3**, 607-621 (2008).
90. Sills, M.A. *et al.* Comparison of assay technologies for a tyrosine kinase assay generates different results in high throughput screening. *J Biomol Screen* **7**, 191-214 (2002).
91. Krohn, K.A. & Link, J.M. Interpreting enzyme and receptor kinetics: keeping it simple, but not too simple. *Nucl Med Biol* **30**, 819-826 (2003).
92. Hanke, J.H. *et al.* Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* **271**, 695-701 (1996).
93. Liu, Y. *et al.* Structural basis for selective inhibition of Src family kinases by PP1. *Chem Biol* **6**, 671-678 (1999).
94. Bain, J., McLauchlan, H., Elliott, M. & Cohen, P. The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* **371**, 199-204 (2003).
95. Fabian, M.A. *et al.* A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* **23**, 329-336 (2005).
96. Omura, S. *et al.* A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **30**, 275-282 (1977).
97. Meggio, F. *et al.* Different susceptibility of protein kinases to staurosporine inhibition. Kinetic studies and molecular bases for the resistance of protein kinase CK2. *Eur J Biochem* **234**, 317-322 (1995).
98. Tanramluk, D., Schreyer, A., Pitt, W.R. & Blundell, T.L. On the origins of enzyme inhibitor selectivity and promiscuity: a case study of protein kinase binding to staurosporine. *Chem Biol Drug Des* **74**, 16-24 (2009).
99. Thomas, S.M. & Grandis, J.R. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of EGFR inhibitors under clinical investigation. *Cancer Treat Rev* **30**, 255-268 (2004).
100. Wong, K.K. HKI-272 in non small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* **13**, 4593-4596 (2007).
101. Eskens, F.A. *et al.* A phase I dose escalation study of BIBW 2992, an irreversible dual inhibitor of epidermal growth factor receptor 1 (EGFR) and 2 (HER2) tyrosine kinase in a 2-week on, 2-week off schedule in patients with advanced solid tumours. *Br J Cancer* **98**, 80-85 (2008).

102. Zhou, W. *et al.* Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. *Nature* **462**, 1070-1074 (2009).
103. Kornev, A.P., Haste, N.M., Taylor, S.S. & Eyck, L.F. Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17783-17788 (2006).
104. Vikis, H. *et al.* EGFR-T790M is a rare lung cancer susceptibility allele with enhanced kinase activity. *Cancer Res* **67**, 4665-4670 (2007).
105. Blencke, S., Ullrich, A. & Daub, H. Mutation of threonine 766 in the epidermal growth factor receptor reveals a hotspot for resistance formation against selective tyrosine kinase inhibitors. *J Biol Chem* **278**, 15435-15440 (2003).
106. Blencke, S. *et al.* Characterization of a conserved structural determinant controlling protein kinase sensitivity to selective inhibitors. *Chem Biol* **11**, 691-701 (2004).
107. Suda, K., Onozato, R., Yatabe, Y. & Mitsudomi, T. EGFR T790M mutation: a double role in lung cancer cell survival? *J Thorac Oncol* **4**, 1-4 (2009).
108. Engelman, J.A. *et al.* Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. *J Clin Invest* **116**, 2695-2706 (2006).
109. Godin-Heymann, N. *et al.* Oncogenic activity of epidermal growth factor receptor kinase mutant alleles is enhanced by the T790M drug resistance mutation. *Cancer Res* **67**, 7319-7326 (2007).
110. Kitz, R. & Wilson, I.B. Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. *J Biol Chem* **237**, 3245-3249 (1962).
111. Krippendorff, B.F., Neuhaus, R., Lienau, P., Reichel, A. & Huisinga, W. Mechanism-based inhibition: deriving $K(I)$ and $k(inact)$ directly from time-dependent $IC(50)$ values. *J Biomol Screen* **14**, 913-923 (2009).
112. Zhang, Z.Y. & Wong, Y.N. Enzyme kinetics for clinically relevant CYP inhibition. *Curr Drug Metab* **6**, 241-257 (2005).
113. Fowler, S. & Zhang, H. In vitro evaluation of reversible and irreversible cytochrome P450 inhibition: current status on methodologies and their utility for predicting drug-drug interactions. *AAPS J* **10**, 410-424 (2008).
114. Copeland, R.A. *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis.* (Wiley-VCH, New York, 2000).
115. Cheng, Y. & Prusoff, W.H. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **22**, 3099-3108 (1973).
116. Maurer, T.S., Tabrizi-Fard, M.A. & Fung, H.L. Impact of mechanism-based enzyme inactivation on inhibitor potency: implications for rational drug discovery. *J Pharm Sci* **89**, 1404-1414 (2000).
117. Klotz, I.M. Numbers of receptor sites from Scatchard graphs: facts and fantasies. *Science* **217**, 1247-1249 (1982).
118. Fersht, A. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.* W. H. Freeman (1998).
119. Shults, M.D. & Imperiali, B. Versatile fluorescence probes of protein kinase activity. *J Am Chem Soc* **125**, 14248-14249 (2003).
120. Shults, M.D., Janes, K.A., Lauffenburger, D.A. & Imperiali, B. A multiplexed homogeneous fluorescence-based assay for protein kinase activity in cell lysates. *Nat Methods* **2**, 277-283 (2005).
121. Lindsley, J.E. Use of a real-time, coupled assay to measure the ATPase activity of DNA topoisomerase II. *Methods Mol Biol* **95**, 57-64 (2001).

122. Luth, A. & Lowe, W. Syntheses of 4-(indole-3-yl)quinazolines: a new class of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Eur J Med Chem* **43**, 1478-1488 (2008).
123. Chu, M.L. *et al.* Biophysical and X-ray crystallographic analysis of Mps1 kinase inhibitor complexes. *Biochemistry* **49**, 1689-1701 (2010).
124. Mendoza, V.L. & Vachet, R.W. Probing protein structure by amino acid-specific covalent labeling and mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* **28**, 785-815 (2009).
125. Oballa, R.M. *et al.* A generally applicable method for assessing the electrophilicity and reactivity of diverse nitrile-containing compounds. *Bioorg Med Chem Lett* **17**, 998-1002 (2007).
126. Pearson, R.G. Acids and Bases. *Science* **151**, 172-177 (1966).
127. Pargellis, C. *et al.* Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. *Nat Struct Biol* **9**, 268-272 (2002).
128. Jia, Y., Quinn, C.M., Kwak, S. & Talanian, R.V. Current in vitro kinase assay technologies: the quest for a universal format. *Curr Drug Discov Technol* **5**, 59-69 (2008).
129. Eisenthal, R. & Danson, M.J. *Enzyme Assays*, (2002).
130. Annis, D.A., Nazef, N., Chuang, C.C., Scott, M.P. & Nash, H.M. A general technique to rank protein-ligand binding affinities and determine allosteric versus direct binding site competition in compound mixtures. *J Am Chem Soc* **126**, 15495-15503 (2004).
131. Eswaran, J. & Knapp, S. Insights into protein kinase regulation and inhibition by large scale structural comparison. *Biochim Biophys Acta* **1804**, 429-432 (2010).
132. Alton, G.R. & Elizabeth, L.A. Targeting the unactivated conformations of protein kinases for small molecule drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **3**, 4433-4437 (2008).
133. Mayr, L.M. & Bojanic, D. Novel trends in high-throughput screening. *Curr Opin Pharmacol* **9**, 580-588 (2009).
134. Comley, J. Assay Interference a limiting factor for HTS? *Drug Discovery World* (2003).
135. Zaman, G.J., Garritsen, A., de Boer, T. & van Boeckel, C.A. Fluorescence assays for high-throughput screening of protein kinases. *Comb Chem High Throughput Screen* **6**, 313-320 (2003).
136. Lebakken, C.S. *et al.* Development and applications of a broad-coverage, TR-FRET-based kinase binding assay platform. *J Biomol Screen* **14**, 924-935 (2009).
137. Owicki, J.C. Fluorescence polarization and anisotropy in high throughput screening: perspectives and primer. *J Biomol Screen* **5**, 297-306 (2000).
138. Vainshtein, I. *et al.* A high-throughput, nonisotopic, competitive binding assay for kinases using nonselective inhibitor probes (ED-NSIP). *J Biomol Screen* **7**, 507-514 (2002).
139. Zaman, G.J., van der Lee, M.M., Kok, J.J., Nelissen, R.L. & Loomans, E.E. Enzyme fragment complementation binding assay for p38alpha mitogen-activated protein kinase to study the binding kinetics of enzyme inhibitors. *Assay Drug Dev Technol* **4**, 411-420 (2006).
140. Eglen, R.M. & Singh, R. Beta galactosidase enzyme fragment complementation as a novel technology for high throughput screening. *Comb Chem High Throughput Screen* **6**, 381-387 (2003).
141. Eglen, R.M. Enzyme fragment complementation: a flexible high throughput screening assay technology. *Assay Drug Dev Technol* **1**, 97-104 (2002).

142. Matthews, B.W. The structure of E. coli beta-galactosidase. *C R Biol* **328**, 549-556 (2005).
143. Naqvi, T., Rouhani, R. & Singh, R. Improved receptor detection. Vol. WO 03/02154 (A2) ((Discoverx, Inc., USA). Application: WO, 2003).
144. Naqvi, T., Rouhani, R. & Singh, R. Short enzyme fragment donor. Vol. US 7,135,325. (2006) ((Discoverx, Inc., USA). Application: WO, 2006).
145. www.discoverx.com.
146. Lee, M.R. & Dominguez, C. MAP kinase p38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with p38alpha protein. *Curr Med Chem* **12**, 2979-2994 (2005).
147. Dominguez, C., Powers, D.A. & Tamayo, N. p38 MAP kinase inhibitors: many are made, but few are chosen. *Curr Opin Drug Discov Devel* **8**, 421-430 (2005).
148. Cohen, P. Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 317-324 (2009).
149. Gaestel, M., Kotlyarov, A. & Kracht, M. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. *Nat Rev Drug Discov* **8**, 480-499 (2009).
150. Bradham, C. & McClay, D.R. p38 MAPK in development and cancer. *Cell Cycle* **5**, 824-828 (2006).
151. Cirillo, P.F., Pargellis, C. & Regan, J. The non-diaryl heterocycle classes of p38 MAP kinase inhibitors. *Curr Top Med Chem* **2**, 1021-1035 (2002).
152. Regan, J. *et al.* Pyrazole urea-based inhibitors of p38 MAP kinase: from lead compound to clinical candidate. *J Med Chem* **45**, 2994-3008 (2002).
153. Regan, J. *et al.* Structure-activity relationships of the p38alpha MAP kinase inhibitor 1-(5-tert-butyl-2-p-tolyl-2H-pyrazol-3-yl)-3-[4-(2-morpholin-4-yl-ethoxy)naphthalen-1-yl]urea (BIRB 796). *J Med Chem* **46**, 4676-4686 (2003).
154. Simard, J.R. *et al.* Development of a Fluorescent-Tagged Kinase Assay System for the Detection and Characterization of Allosteric Kinase Inhibitors. *J Am Chem Soc* **27**, 33296-33304 (2009).
155. Klüter, S. *et al.* Displacement assay for the detection of stabilizers of inactive kinase conformations. *J Med Chem* **53**, 357-367 (2010).
156. Frantz, B. *et al.* The activation state of p38 mitogen-activated protein kinase determines the efficiency of ATP competition for pyridinylimidazole inhibitor binding. *Biochemistry* **37**, 13846-13853 (1998).
157. Seeliger, M.A. *et al.* c-Src binds to the cancer drug imatinib with an inactive Abl/c-Kit conformation and a distributed thermodynamic penalty. *Structure* **15**, 299-311 (2007).
158. Thurmond, R.L., Wadsworth, S.A., Schafer, P.H., Zivin, R.A. & Siekierka, J.J. Kinetics of small molecule inhibitor binding to p38 kinase. *Eur J Biochem* **268**, 5747-5754 (2001).
159. Karaman, M.W. *et al.* A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* **26**, 127-132 (2008).
160. Sharma, K. *et al.* Proteomics strategy for quantitative protein interaction profiling in cell extracts. *Nat Methods* **6**, 741-744 (2009).
161. Zhang, J.H., Chung, T.D. & Oldenburg, K.R. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **4**, 67-73 (1999).
162. Reulecke, I., Lange, G., Albrecht, J., Klein, R. & Rarey, M. Towards an integrated description of hydrogen bonding and dehydration: decreasing false positives in virtual screening with the HYDE scoring function. *ChemMedChem* **3**, 885-897 (2008).

163. Bikker, J.A., Brooijmans, N., Wissner, A. & Mansour, T.S. Kinase domain mutations in cancer: implications for small molecule drug design strategies. *J Med Chem* **52**, 1493-1509 (2009).
164. Bogoyevitch, M.A. & Arthur, P.G. Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JuNK no more? *Biochim Biophys Acta* **1784**, 76-93 (2008).
165. Azam, M. & Daley, G.Q. Anticipating clinical resistance to target-directed agents: the BCR-ABL paradigm. *Mol Diagn Ther* **10**, 67-76 (2006).
166. Hantschel, O. & Superti-Furga, G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 33-44 (2004).
167. Hantschel, O. *et al.* A myristoyl/phosphotyrosine switch regulates c-Abl. *Cell* **112**, 845-857 (2003).
168. Nagar, B. *et al.* Organization of the SH3-SH2 unit in active and inactive forms of the c-Abl tyrosine kinase. *Mol Cell* **21**, 787-798 (2006).
169. Lin, J. *et al.* Oncogenic activation of c-Abl in non-small cell lung cancer cells lacking FUS1 expression: inhibition of c-Abl by the tumor suppressor gene product Fus1. *Oncogene* **26**, 6989-6996 (2007).
170. Kurzrock, R., Kantarjian, H.M., Druker, B.J. & Talpaz, M. Philadelphia chromosome-positive leukemias: from basic mechanisms to molecular therapeutics. *Ann Intern Med* **138**, 819-830 (2003).
171. Nowell, P.C. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* **132**, 1488-1501 (1960).
172. Goldman, J.M. & Melo, J.V. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **344**, 1084-1086 (2001).
173. Druker, B.J. *et al.* Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* **344**, 1038-1042 (2001).
174. Zimmermann, J. *et al.* Phenylamino-pyrimidine (PAP) derivatives: a new class of potent and selective inhibitors of protein kinase C (PKC). *Arch Pharm (Weinheim)* **329**, 371-376 (1996).
175. Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J. & Matter, A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 493-502 (2002).
176. Liegl-Atzwanger, B., Fletcher, J.A. & Fletcher, C.D. Gastrointestinal stromal tumors. *Virchows Arch* **456**, 111-127 (2010).
177. Gorre, M.E. *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**, 876-880 (2001).
178. Roumiantsev, S. *et al.* Clinical resistance to the kinase inhibitor STI-571 in chronic myeloid leukemia by mutation of Tyr-253 in the Abl kinase domain P-loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 10700-10705 (2002).
179. Shah, N.P. *et al.* Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* **2**, 117-125 (2002).
180. Schindler, T. *et al.* Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science* **289**, 1938-1942 (2000).
181. Weisberg, E., Manley, P.W., Cowan-Jacob, S.W., Hochhaus, A. & Griffin, J.D. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* **7**, 345-356 (2007).
182. Weisberg, E. *et al.* Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* **7**, 129-141 (2005).

183. Tokarski, J.S. *et al.* The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res* **66**, 5790-5797 (2006).
184. Zhang, J. *et al.* Targeting Bcr-Abl by combining allosteric with ATP-binding-site inhibitors. *Nature* **463**, 501-506 (2010).
185. Weisberg, E. *et al.* Beneficial effects of combining a type II ATP competitive inhibitor with an allosteric competitive inhibitor of BCR-ABL for the treatment of imatinib-sensitive and imatinib-resistant CML. *Leukemia*, 1-3 (2010).
186. Weisberg, E. *et al.* Discovery of a small-molecule type II inhibitor of wild-type and gatekeeper mutants of BCR-ABL, PDGFRalpha, Kit, and Src kinases: novel type II inhibitor of gatekeeper mutants. *Blood* **115**, 4206-4216 (2010).
187. Nagar, B. *et al.* Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* **62**, 4236-4243 (2002).
188. Adrian, F.J. *et al.* Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation. *Nat Chem Biol* **2**, 95-102 (2006).
189. Choi, Y. *et al.* N-myristoylated c-Abl tyrosine kinase localizes to the endoplasmic reticulum upon binding to an allosteric inhibitor. *J Biol Chem* **284**, 29005-29014 (2009).
190. Jahnke, W. *et al.* Binding or bending: distinction of allosteric Abl kinase agonists from antagonists by an NMR-based conformational assay. *J Am Chem Soc* **132**, 7043-7048 (2010).
191. Müller, B.A. Imatinib and its successors-how modern chemistry has changed drug development. *Curr Pharm Des* **15**, 120-133 (2009).
192. Savage, D.G. & Antman, K.H. Imatinib mesylate-a new oral targeted therapy. *N Engl J Med* **346**, 683-693 (2002).
193. Checovich, W.J., Bolger, R.E. & Burke, T. Fluorescence polarization-a new tool for cell and molecular biology. *Nature* **375**, 254-256 (1995).
194. Dandliker, W.B., Hsu, M.L., Levin, J. & Rao, B.R. Equilibrium and kinetic inhibition assays based upon fluorescence polarization. *Methods Enzymol* **74 Pt C**, 3-28 (1981).
195. Jameson, D.M. & Sawyer, W.H. Fluorescence anisotropy applied to biomolecular interactions. *Methods Enzymol* **246**, 283-300 (1995).
196. Muratore, K.E. *et al.* Comparative analysis of mutant tyrosine kinase chemical rescue. *Biochemistry* **48**, 3378-3386 (2009).
197. Müller, J., Schust, J. & Berg, T. A high-throughput assay for signal transducer and activator of transcription 5b based on fluorescence polarization. *Anal Biochem* **375**, 249-254 (2008).
198. Bliska, J.B., Guan, K.L., Dixon, J.E. & Falkow, S. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1187-1191 (1991).
199. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
200. Studier, F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels. *J Mol Biol* **79**, 237-248 (1973).
201. Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. & Ehrhardt, W. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262 (1988).

202. Switzer, R.C., 3rd, Merril, C.R. & Shifrin, S. A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **98**, 231-237 (1979).
203. Oakley, B.R., Kirsch, D.R. & Morris, N.R. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **105**, 361-363 (1980).
204. Merril, C.R., Dunau, M.L. & Goldman, D. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **110**, 201-207 (1981).
205. Rabilloud, T. Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* **11**, 785-794 (1990).
206. Rabilloud, T. Silver staining of 2-D electrophoresis gels. *Methods Mol Biol* **112**, 297-305 (1999).
207. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
208. Gasteiger, E. *et al.* ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **31**, 3784-3788 (2003).
209. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580 (1983).
210. Henry. Theorie generale de l'action de quelques diastases. *Comptes rendues l'Academie des sciences* **135**, 916-919 (1902).
211. Michaelis, M. Die Kinetik der Invertin-Wirkung. *Biochemische Zeitschrift* **49**, 333-369 (1913).
212. NIH Chemical Genomics Center, J.I., Doug Auld, Eli Lilly. Assay Guidance Manual <http://www.ncgc.nih.gov/guidance/>.
213. Prinz, H. & Schonichen, A. Transient binding patches: a plausible concept for drug binding. *J Chem Biol* **1**, 95-104 (2008).
214. May, L.T., Leach, K., Sexton, P.M. & Christopoulos, A. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**, 1-51 (2007).
215. Dannelly, H.K. & Roseman, S. NAD⁺ and NADH regulate an ATP-dependent kinase that phosphorylates enzyme I of the *Escherichia coli* phosphotransferase system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11274-6 (1992).
216. Rodems, S.M. *et al.* A FRET-based assay platform for ultra-high density drug screening of protein kinases and phosphatases. *Assay Drug Dev Technol* **1**, 9-19 (2002).
217. <http://www.invitrogen.com>.
218. Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **437**, 55-75 (1947).
219. Kolb A.J., K.P.V., Hayes D.J., Park Y.-W., Pernell C., Major J.S., Mathis G. Tyrosine kinase assays adapted to homogeneous time-resolved fluorescence *Drug Discov Today* **3**, 333-336 (1999).
220. Jia, Y., Quinn, C.M., Gagnon, A.I. & Talanian, R. Homogeneous time-resolved fluorescence and its applications for kinase assays in drug discovery. *Anal Biochem* **356**, 273-281 (2006).
221. www.htrf.com.

7 Anhang

7.1 Sequenzen

cSrc-C345S (SM)

Tyrosinkinase aus *gallus gallus*, Aminosäuren 251-533

Vektor: pSKB3 mit TEV Spaltungssequenz (Novagen), Schnittstellen: NdeI & XhoI

MW: 32706 / pI: 5,6

GHMQTQGLAKDAWEIPRESLRLEVKLGQGCFGEVWMGTWNGTTRVAIKTLKPGTMSPEA
FLQEAQVMKKLRHEKLVQLYAVVSEEP IYIVTEYMSKGCLLDFLKGEMGKYLRLPQLVD
MAAQIASGMAYVERMNYVHRDLRAANILVGENLVCKVADFGLARLIEDNEYTARQGAKE
PIKWTAPEAALYGRFTIKSDVWSFGILLTELTTKGRVPYPGMVNREVL DQVERGYRMPC
PPECPESLHDL MCQCWRKDPEERPTFEY LQAFLEDYFTSTEPQYQPGENL

cSrc-C345S/T338M (DM)

Tyrosinkinase aus *gallus gallus*, Aminosäuren 251-533

Vektor: pSKB3 mit TEV Spaltungssequenz (Novagen), Schnittstellen: NdeI & XhoI

MW: 32736 / pI: 5,6

GHMQTQGLAKDAWEIPRESLRLEVKLGQGCFGEVWMGTWNGTTRVAIKTLKPGTMSPEA
FLQEAQVMKKLRHEKLVQLYAVVSEEP IYIVMEYMSKGCLLDFLKGEMGKYLRLPQLVD
MAAQIASGMAYVERMNYVHRDLRAANILVGENLVCKVADFGLARLIEDNEYTARQGAKE
PIKWTAPEAALYGRFTIKSDVWSFGILLTELTTKGRVPYPGMVNREVL DQVERGYRMPC
PPECPESLHDL MCQCWRKDPEERPTFEY LQAFLEDYFTSTEPQYQPGENL

GroEL

Chaperon aus *E. coli*

Vektor pACYC (Novagen), Schnittstellen: unbekannt

MW: 56743 / pI: 4,81

(vermutlich)

MAAKDVKFGNDAGVKMLRGNVNLADAVKVT LGPKGRNVVLDKSF GAPTITKDGVSVARE
IELEDKFENMGAQMVKEVASKANDAAGDGT TTTATVLAQAIITEGLKAVAAGMNPMDLKR
GIDKAVTVAVEELKALSVPCSDSKAIAQVGTSADEVGKLI AEAMDKVGKEGVITVEDGT
GLQDEL DVVEGMQFDRGYLSPYFINKPETGAVELESPFILLADKKISNIREMLPVLEAV
AKAGKPLLI IAEDVEGEALATAVVNTMRGIVKVA AVKAPGFGDRRKAMLQDIATLTGGT

VISEEIGMELEKATLEDLGQAKRVVINKD'TTTIIDGVGEEAAIQGRVAQIRQQIEEATS
 DYDREKLQERVAKLAGVAVIKVGAATEVEMKEKKARVEDALHATRAAVEEGVVAGGGVA
 LIRVASKLADLRGQNEQNVGIKVALRAMEAPLRQIVLNCGEEPSVVANTVKGGDGNYG
 YNAATEEYGNMIDMGILDPTKVTRSALQYAASVAGLMITTECMVTDLPKNDAAADLGAAG
 GMGGMGGMGGMM

YopH

Tyrosinphosphatase aus *Yersinia enterocolitica*, Aminosäuren 1-468

Vektor: pCDFDuet (Novagen), Schnittstelle: NcoI & AvrII

MW 50954 / pI: 9,0

MNLSLSDLHRQVSRLVQQESGDCTGKLRGNVAANKETTFQGLTIASGARESEKVFAQTV
 LSHVANIVLTQEDTAKLLQSTVKHNLNNEYELRSVGNNGNSVLVSLRSDQMTLQDAKVLLE
 AALRQESGARGHVSSHSHSVLHAPGTPVREGLRSHLAPRTPPLPPRERPHTSGHHGAGE
 VRATAPSTVSPYGPPEARAEELSSRLTTLRNTLTPATNDPRYLQACGGEKLNFRDIQCCR
 QTAVRADLNANYIQVGNTRTIACQYPLQSQLESHFRMLAENRTPVLAVLASSEIANQR
 FGMPDYFRQSGTYGSITVESKMTQQVGLGDGIMADMYTLTIREAGQKTISVPVVHVGNW
 PDQTAVSSEVTKALASLVDQTAETKRNMYESKGS SAVADDSKLRPVIHCRAGVGRTAQL
 IGAMCMNDSRNSQLSVEDMVSQMRVQRNGIMVQKDEQLDVLIKLAEGQGRPLLNS

YopH katalytische Domäne

Tyrosinphosphatase aus *Yersinia enterocolitica*, Aminosäuren 164-468

Vektor: pCDFDuet (Novagen), Schnittstelle: NcoI & EcoRI

MW 33446 / pI: 8,74

MRERPHTSGHHGAGEARATAPSTVSPYGPPEARAEELSSRLTTLRNTLAPATNDPRYLQAC
 GGEKLNFRDIQCCRQTAVRADLNANYIQVGNTRTIACQYPLQSQLESHFRMLAENRTP
 VLAVLASSEIANQRFGMPDYFRQSGTYGSITVESKMTQQVGLGDGIMADMYTLTIREA
 GQKTISVPVVHVGNWPDQTAVSSEVTKALASLVDQTAETKRNMYESKGS SAVGDDSKLR
 PVIHCRAGVGRTAQLIGAMCMNDSRNSQLSVEDMVSQMRVQRNGIMVQKDEQLDVLIKL
 AEGQGRPLLNS

Abl cat (katalytische Domäne)

Tyrosinkinase aus *homo sapiens*, Aminosäuren 266-550

Vektor: pET28a (Novagen), Schnittstelle: NdeI & NdeI

MW 40942 / pI: 5,54

MSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTVAVKTLKEDTMEVEEFLKE
 AAVMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYGNLLDYLRECNRQEVNAVVLLYMAT
 QISSAMEYLEKKNFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAKFPIK
 WTAPESLAYNKFSIKSDVWAFGVLLWEIATYGMSPYPGIDLSQVYELLEKDYRMERPEG
 CPEKVYELMRACWQWNPSPDRPSFAEIHQAFETMFQESSISDEVEKELGKQ

Abl SS (katalytische Domäne mit SH2- und SH3-Domäne)

Tyrosinkinase aus *homo sapiens*, Aminosäuren 19-549

Vektor pET28a (Novagen), Schnittstelle NdeI & NdeI

MW 60148 / pI: 6,1

MGQQPGKVLGDQRRPSLPALHFIKGAGKKESSRHGGPHCNVFEHEALQRPVASFEPQ
 GLSEAARWNSKENLLAGPSENDPNLFVALYDFVASGDNTLSITKGEKLRVLGYNHNGEW
 CEAQTKNGQGWVPSNYITPVNSLEKHSWYHGPVSRNAAEYLLSSGINGSFVRESESSP
 GQRSISLRYEGRVYHYRINTASDGKLYVSSERSFNLAELVHHHSTVADGLITTLHYPA
 PKRNKPTVYGVSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTVAVKTLKED
 TMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIIIEFMTYGNLLDYLRECNRQEV
 NAVVLLYMATQISSAMEYLEKKNFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDTYT
 AHAGAKFPIKWTAPESLAYNKFSIKSDVWAFGVLLWEIATYGMSPYPGIDLSQVYELLE
 KDYRMERPEGCPEKVYELMRACWQWNPSPDRPSFAEIHQAFETMFQESSISDEVEKELGK

Abl Jeff (katalytische Domäne mit Mutationen zur Fluoreszenzmarkierung)

Tyrosinkinase aus *homo sapiens*, Aminosäuren 266-550

Vektor: pOPINF, Schnittstelle: NdeI & NdeI

MW 32968/ pI: 5,1

SPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTVAVKTLKEDTMEVEEFLKEA
 AVMEIKHPNLVQLLGVSTREPPFYIITEFMTYGNLLDYLRESNRQEVNAVVLLYMATQI
 SSAMEYLEKKNFIHRDLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAKFPIKWT
 APESLAYNKFSIKSDVWAFGVLLWEIATYGMSPYPGIDLSQVYELLEKDYRMERPEGSP
 EKVYELMRACWQWNPSPDRPSFAEIHQAFETMCQESSISDEVEKELGKQ

Abl SF (katalytische Domäne)

Tyrosinkinase aus *homo sapiens*, Aminosäuren 266-552

Vektor: pET28a (Novagen) mit TEV-Spaltungssequenz, Schnittstelle: NdeI & XhoI

MW 33056 / pI: 5,3

GHMSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTVAVKTLKEDTMEVEEFL
KEAAVMKEIKHNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYGNLLDYLRECNRQEVNAVLLYMA
TQISSAMEYLEKKNFHRNLAARNCLVGENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAKFPIK
WTAPESLAYNKFSIKDVWAFGVLLWEIATYGMSPYPGIDLSQVYELLEKDYRMERPEGC
PEKVYELMRACWQWPSDRPSFAEIHQAFETMFQESSISDEVEKELGKQGV

7.2 Lebenslauf

Sabine Klüter

Geburtsdatum, -ort 24. August 1980, Herne

Staatsangehörigkeit deutsch

Familienstand ledig

Schulische Ausbildung

1987–1991 Grundschule Hemer

1991–2000 Gymnasium

06/2000 Allgemeine Hochschulreife, Walburgisgymnasium Menden

Akademische Laufbahn

04/2001 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, Studium der Pharmazie

02/2003 1. Staatsexamen Pharmazie

05/2005 2. Staatsexamen Pharmazie

08/2006 3. Staatsexamen Pharmazie (Approbation als Apothekerin)

08/2006-
06/2010 Anfertigung der Doktorarbeit am Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft in Dortmund unter der Leitung von Prof. Dr. Herbert Waldmann in der Arbeitsgruppe von Dr. Daniel Rauh zum Thema „Strukturbasierte Entwicklung von Assaysystemen und Charakterisierung von orthosterischen und allosterischen Kinaseinhibitoren“.

08/2006-
06/2010 Teilnahme am Graduiertenstudium der „*International Max-Planck-Research School-CB*“ in Dortmund.

Dortmund im Mai 2010

7.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht beziehungsweise erleichtert haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H. Waldmann für die Möglichkeit bedanken, die Doktorarbeit unter seiner Leitung am Chemical Genomics Centre der Max-Planck-Gesellschaft in Dortmund anzufertigen.

Meinem Gruppenleiter, Herrn Dr. Daniel Rauh, danke ich für die interessante Aufgabenstellung und die stete Unterstützung meiner Arbeit.

Dem Direktor der IMPRS-CB, Herrn Prof. Dr. M. Engelhard, danke ich für die Aufnahme in das PhD-Programm und die gute Betreuung während der Promotionszeit.

Mein Dank gebührt auch den Kollaborationspartnern des Chemical Genomics Centres, vor allem Herrn Prof. Dr. P. Schreier und Herrn Dr. Michael Beck (Bayer CropScience) sowie den Herren Dr. G. Zaman und Dr. R. Buijsman (MSD), die mir Unterstützung und gute Ratschläge bezüglich neuer Screening-Methoden entgegengebracht haben. Frau Dr. T. Naqvi und Herrn Dr. S. Kumar danke ich für die Kollaboration im Rahmen des EFC-Assay Projekts.

Frau Dr. P. Janning danke ich für Ihre Hilfen bei den massenspektrometrischen Untersuchungen.

Besonders herzlich möchte ich mich bei den Postdocs Dr. M. Rabiller, Dr. C. Grütter und Dr. J. Simard für Ihre kollegiale Hilfsbereitschaft im täglichen Laborbetrieb und ihre wertvollen Ratschläge bei der Entwicklung von Assaysystemen bedanken. Dr. Grütter und Frau A. Michalczyk seien auch für die Auswertung strukturbioologischer Daten gedankt.

Den Chemikern Dr. H. Rode, Dr. V. Pawar, M. Getlik, L. Ruddigkeit und A. Richters danke ich für die Bereitstellung von synthetisierten Verbindungen. Für gute Ratschläge bei speziellen praktischen Arbeiten zur organischen Synthese bedanke ich mich bei M. Getlik und P. Hauske.

Der AG Rauh danke ich für die gute Arbeitsgemeinschaft. Bei Dr. C. Grütter, Matthäus Getlik, Zhizhou Fang und Beate Aust möchte ich meinen Dank für die schnelle und kritische Durchsicht des Manuskripts aussprechen.

Nicht vergessen möchte ich, denen zu danken, die während der Doktorandenzeit als Kollegen auch sehr gute Freunde geworden sind. Hierfür danke ich Sabine Möcklinghoff und Grütti.

Ein großer Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder Tim für Ihre großzügige Unterstützung während meiner bisherigen Laufbahn.

Claudia B., Barbara K., Meike M., Sophia K., Kathrin M. und Annika S. danke ich für Ihre fortwährende Freundschaft auch über große räumliche Distanzen sowie für manche Hilfsbereitschaft.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.
Dortmund, Juni 2010

(Sabine Klüter)