

# **Strukturbasierte Entwicklung von Assaysystemen und Charakterisierung von orthosterischen und allosterischen Kinaseinhibitoren**

Dissertation Sabine Klüter / TU Dortmund

Die Proteinkinasen stellen eine wichtige Enzymklasse für die Regulation der Signaltransduktion dar. Sie steuern diese diffizil regulierten, intrazellulären Signalkaskaden durch Übertragung der  $\gamma$ -Phosphatgruppe von ATP auf andere Proteine. Fehlregulationen dieser komplexen Stoffwechselwege können Krankheiten wie Krebs, Diabetes oder Autoimmunkrankheiten verursachen. Somit gehören die Kinasen in den letzten Jahren zu den wichtigsten Zielproteinen der Pharmaindustrie.

Die klassischen Kinaseinhibitoren binden an die ATP-Bindungstasche. Zwar können diese hoch affin an die entsprechenden Kinasen binden, jedoch fällt die Selektivität dieser Inhibitoren gegenüber anderen Vertretern der Kinasefamilie oft sehr gering aus. Außerdem treten bei den Kinaseinhibitoren, die als Medikamente in der Langzeitbehandlung von Tumoren Anwendung finden, häufig Wirkstoffresistenzen auf. Diese resultieren häufig auf Grund von Mutationen in der ATP-Bindungstasche, sodass die Bindungen zwischen Ligand und Protein geschwächt werden und der Inhibitor somit weniger potent ist. Zur Umgehung dieser Problematiken wird verstärkt nach neuen Substanzklassen mit alternativen Bindungsmodi gesucht. Darunter fallen irreversible Inhibitoren, Stabilisatoren der inaktiven Kinasekonformation sowie allosterische Kinaseinhibitoren. Die spezifische Identifizierung und Charakterisierung dieser speziellen Inhibitionstypen mit herkömmlichen Assaysystemen ist sehr aufwendig ist und erlaubt keine Durchmusterung größerer Substanzbibliotheken. Das Ziel dieser Arbeit war, für die drei verschiedenen Bindungsmechanismen Assaysysteme zu entwickeln, die eine direkte Identifizierung unterschiedlicher Inhibitionstypen zulassen. Hierfür wurden zunächst die zu adressierenden Kinasen cSrc, Abl und p38 $\alpha$  rekombinant in *E. coli* exprimiert und anschließend aufgereinigt. Zur Detektion dienten verschiedene organische Moleküle als Sonden, die an die zu adressierende Bindungstasche binden. Hierbei wurde von unterschiedlichen Messprinzipien wie Fluoreszenz, Chemilumineszenz und Fluoreszenzpolarisation Gebrauch gemacht. Zur möglichen HTS-Anwendung wurden die Assaysysteme in 384er Mikrotiterplatten etabliert und mit

bekannten Inhibitoren validiert. Die Bindung relevanter Liganden wurde zur Ableitung von Strukturaktivitätsbeziehungen röntgenkristallographisch untersucht.

## **1. Einfluss von irreversiblen Inhibitoren auf wirkstoffresistente Kinasemutanten**

Irreversible Inhibitoren folgen durch graduelle Elimination des Anteils an enzymatisch aktivem Enzym einer zeitabhängigen Kinetik. Somit ist die  $IC_{50}$ -Bestimmung besonders bei hoch potenten Inhibitoren kein geeignetes Maß zur Charakterisierung der Inhibitionsstärke. Deshalb wurde ein Assaysystem entwickelt, das auf Eigenfluoreszenz irreversibler Inhibitoren beruht. Bei Ausbildung der kovalenten Bindung einer elektrophilen Gruppe mit der Seitenkette eines spezifischen Cysteins in der ATP-Bindungstasche kommt es zur Änderung der intrinsischen Fluoreszenz des Inhibitormoleküls. Dieses diente als Detektionssystem und ermöglichte eine Klassifizierung irreversibler Verbindungen anhand ihrer Reaktivität durch die Detektion der Komplexbildungsgeschwindigkeit. Zusätzlich konnte hiermit der Einfluss einer zur Wirkstoffresistenz führenden Mutation in der ATP-Bindungstasche untersucht werden. Es konnte unabhängig von katalytischer Aktivität gezeigt werden, dass die raumeinnehmende Aminosäure die Geschwindigkeit der Komplexbildung von Inhibitor und Enzym herabsetzt, was auf eine sterische Interferenz zurückzuführen ist.

## **2. Detektion von Stabilisatoren der inaktiven Kinasekonformation**

Viele Kinasen liegen im inaktiven Zustand in einer speziellen Konformation vor die von der aktiven stark abweicht. Hierbei wird entweder die Anlagerung von ATP oder die Katalyse des Phosphatgruppentransfers unterbunden. Strukturell gesehen öffnet sich in der inaktiven Konformation ein hydrophober Bereich in der Nähe der ATP-Bindungstasche. Dieser ist für Liganden zugänglich, die die inaktive Kinasekonformation stabilisieren. Solche Liganden sind für die p38 $\alpha$  Kinase bereits bekannt. Basierend auf dieser Information wurde eine Sonde entwickelt, die an die inaktive Kinasekonformation der p38 $\alpha$  Kinase bindet. Das Assaysystem basiert auf Enzym-Fragment-Komplementation, bei der eine verkürzte und damit inaktive Variante der  $\beta$ -Galactosidase eingesetzt wird. Zusätzlich enthält die Sonde ein Peptid-Fragment

der  $\beta$ -Galactosidase. Wird die Sonde von ihrer Bindungstasche verdrängt, liegt diese frei im System vor und kann einen Komplex mit der verkürzten  $\beta$ -Galactosidase eingehen. Diese wird dadurch enzymatisch aktiv, was mit Chemilumineszenz nachgewiesen werden kann. Das System wurde zum Test einer Reihe von Inhibitoren mit unterschiedlichen Bindungsmechanismen verwendet. Für schwache Liganden der inaktiven Konformation eignet sich dieser Assay besonders gut, da bei vielen anderen Assaysystemen die Kinase in der aktiven Konformation vorliegt und diese Liganden somit übersehen werden können. Es konnte gezeigt werden, dass der Ligand der Sonde auch an weitere Kinasen bindet. Daraufhin wurde dieses Assaysystem für insgesamt fünf verschiedene Kinasen aufgebaut.

### **3. Assaysystem zur Detektion von allosterischen Inhibitoren der Abl-Kinase**

Die Abl-Kinase verfügt über einen Autoinhibitionsmechanismus, bei der die inaktive Kinasekonformation durch SH2- und SH3-Domänen sowie durch eine myristoylierte Region, die an die sogenannte Myristoylierungstasche bindet, stabilisiert wird. Adrian *et al.* haben gezeigt, dass auch kleine organische Moleküle an diese Region binden können und die Aktivität der Kinase herabsetzen. Um tiefere Einblicke in diese Regulationsform und deren Liganden zu erhalten, wurde ein Assaysystem zur Detektion von Liganden der Myristoylbindungstasche aufgebaut. Der auf Verdrängung einer Sonde beruhende Assay basiert auf Fluoreszenzpolarisation. Hierfür wurde eine Sonde generiert, die aus einem Liganden der Myristoylierungstasche sowie dem Fluorophor Fluoreszein besteht. Bei Verdrängung der Sonde durch weitere Liganden liegt diese frei in Lösung vor wodurch sich die Fluoreszenzpolarisation ändert. Dies dient als Maß für die Verdrängung der Sonde durch eine getestete Substanz. Da dieser Assay mit nur wenigen Pipettierschritten durchgeführt werden kann, konnten sehr einfach viele Moleküle in kurzer Zeit getestet werden. Die Ergebnisse waren äußerst robust und reproduzierbar.