

Charakterisierung von Rezeptortyrosinkinasen in Tumorzellen

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

Fakultät Chemie und Chemische Biologie

Technische Universität Dortmund

Vorgelegt von

M. Sc. Christian Becker

Aus Medebach

Dortmund, November 2016

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh
2. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Summerer

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Dezember 2011 bis März 2016 unter der Leitung von Prof. Dr. Daniel Rauh an der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden die Bachelorarbeiten von Frau Ina Landel (2014) und Herrn Tim Marius Wunderlich (2015).

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
Kurzfassung.....	VII
Abstract.....	IX
1 Einleitung	1
1.1 Die Familie der Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und ihr Wirken in der Signaltransduktion	1
1.2 Die Struktur und Regulation der EGF-Rezeptoren	3
1.3 <i>Small Molecules</i> als Kinaseinhibitoren.....	8
1.4 EGFR in der Medizin und in der Wirkstoffforschung	10
2 Zielsetzung.....	15
3 Beobachtung konformationeller Änderungen in der Rezeptortyrosinkinase EGFR.....	17
3.1 Design der FLiK-Konstrukte	18
3.2 Expression in Insektenzellen (Exkurs).....	22
3.3 Isolierung und Markierung der FLiK-Konstrukte	24
3.3.1 Reinigung von EGFR-FLiK.....	25
3.3.2 Markierung mit Acrylodan.....	28
3.3.3 Bestimmung von Dissoziationskonstanten.....	31
3.3.4 Bestimmung von Bindungskinetiken	34
3.4 Zusammenfassung	38
4 Kristallisationsstudien an EGFR mit neuartigen Inhibitoren	39
4.1 Konstruktdesign und die Expression in Insektenzellen.....	40
4.2 Isolierung der EGFR-Kristallisationskonstrukte	44
4.2.1 Analyse von Phosphorylierungsstufen	47
4.3 Kristallisation von EGFR-WT und EGFR-T790M.....	49
4.4 Zusammenfassung	66
5 Identifikation neuer HER2-Inhibitoren	67

5.1	Konstruktdesign und Expression von HER2 in Insektenzellen	68
5.2	Reinigung der HER2-Konstrukte.....	70
5.3	Kristallisation des HER2-Wildtyp	71
5.4	Bestimmung enzymatischer Parameter für den Aktivitätsassay.....	74
5.5	<i>High Throughput Screening</i> zur Identifikation von selektiven Inhibitoren der HER2 Exon 20 Insertionsmutante	75
5.6	Zusammenfassung.....	81
6	Material und Methoden	83
6.1	Verbrauchsmaterial.....	83
6.2	Verwendete Reagenzien, Nährmedien, Zellen und Kits.....	84
6.3	Verwendete Geräte	84
6.4	Plasmide	86
6.5	Mutagenese	86
6.6	Proteinexpression in Insektenzellen	87
6.6.1	Isolierung der Bacmid-DNA.....	88
6.6.2	Transfektion und erste Generation rekombinanter Baculoviren	88
6.6.3	Virusamplifikation - zweite und dritte Virusgeneration	88
6.6.4	Präparative Expression in Insektenzellen	89
6.7	Proteinisolierung	89
6.7.1	EGFR – FLiK-Konstrukte	90
6.7.2	HER2 und EGFR – Kristallisationskonstrukte	92
6.8	Massenspektren	94
6.9	Aktivitätsassay	94
6.10	FLiK-Assay	95
6.10.1	Messung der Dissoziationskonstanten	95
6.10.2	Messung der Bindungskinetiken	96
6.11	Röntgenstrukturanalyse	96
6.11.1	<i>Fine-Screens</i>	97
6.11.2	<i>Big-Screens</i>	97

6.11.3	<i>Additive-Screens</i>	97
7	Literatur.....	99
8	Anhang.....	107
8.1	Ergebnisse des FLiK-Assay mit dem DFG+5-Konstrukt.....	107
8.2	<i>Hit</i> -Substanzen des HER2-Screens.....	108
8.3	Sequenzen der Konstrukte.....	114
8.3.1	EGFR-Kristallisationskonstrukt.....	114
8.3.2	EGFR – FLiK-Konstrukt.....	115
8.3.3	HER2 – Assay- und Kristallisationskonstrukte.....	116
9	Publikationen.....	119

Abkürzungen

AcNPV	<i>autographa californica nuclear polyhedrosis virus</i>
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BEVS	<i>baculovirus expression vector system</i>
CBB	Coomassie Brilliant Blau
CML	chronisch myeloische Leukämie
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
ECD	Extrazelluläre Domäne
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ESI	Elektrospray-Ionisation
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GBM	Glioblastoma multiform
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER	<i>human epidermal growth factor receptor</i>
ICD	Intrazelluläre Domäne
IEX	Ionenaustauschchromatographie
IMAC	<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>
INS	Insertionsmutante
JM	Juxtamembrandomäne
K_m	Michaelis-Menten Konstante
k_{off}	Geschwindigkeit konstante Dissoziation
k_{on}	Geschwindigkeitskonstante Assoziation
LC	<i>liquid chromatography</i>

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MD	Molekulardynamik
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MOI	<i>multiplicator of infection</i>
MR	<i>molecular replacement</i>
MS	Massenspektrometrie
MWCO	<i>molecular weight cut-off</i>
NRG	<i>neuregulin</i>
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglycol
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i>
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEC	<i>size exclusion chromatography</i>
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i> Zelllinie 9
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
SRC	<i>sarcoma proto-oncogene</i>
TFA	Trifluoressigsäure
TGF α	<i>transforming growth factor alpha</i>
TM	Transmembrandomäne
TOH	<i>time of harvest</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{ex}	Anregungswellenlänge

Kurzfassung

Die Rezeptortyrosinkinasen der Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren, EGFR (HER1) und HER2 bis HER4, stehen an der Spitze eines komplexen Regulationsnetzwerks über das verschiedene Prozesse des Zellwachstums und des Lebenszyklus der Zelle gesteuert werden. Wachstumsfaktoren binden an den extrazellulären Teil der Rezeptoren und aktivieren die intrazelluläre Kinasedomäne, die wiederum das Signal innerhalb der Zelle auf weitere Effektorproteine überträgt. Die Gene der EGF-Rezeptoren wurden als Proto-Onkogene identifiziert, da genetische Läsionen, die zu einer Fehlregulation und Überaktivität der EGF-Rezeptoren führen, ursächlich für die Entstehung bestimmter Krebserkrankungen sind. So resultiert die Punktmutation EGFR-L858R beispielsweise in einer überaktiven Kinasedomäne, was zur Entstehung des nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC) führt. Die Entdeckung einiger niedermolekularer organischer Moleküle als EGFR-Kinaseinhibitoren und deren Weiterentwicklung zur zielgerichteten Krebstherapie war ein Meilenstein der modernen Medizin und medizinischen Chemie. Die Ursache der Krebsentstehung ist äußerst vielfältig und mit Ausnahme einiger Beispiele, wie NSCLC, nicht auf eine einzige genetische Läsion reduzierbar. Erlotinib und Gefitinib werden als Inhibitoren der ersten Generation in der Erstlinientherapie von NSCLC mit EGFR-L858R Aktivierungsmutation eingesetzt und sind Beispiele für die moderne zielgerichtete Krebstherapie mit Kinaseinhibitoren. Mit fortschreitender Behandlung entwickeln sich in EGFR-Resistenzmutationen (T790M und C797S) gegen die erste und ebenfalls gegen die zweite und dritte Wirkstoffgeneration. Eine konstante Entwicklung neuer Inhibitoren gegen neu auftretende Wirkstoffresistenzen ist daher eine stetige Herausforderung für die medizinische Chemie.

Die konformationelle Plastizität von EGFR ist von fundamentaler Bedeutung für dessen Regulationsmechanismus. Die α C Helix und die Aktivierungsschleife sind zentrale Elemente in der Kinasedomäne von EGFR und zeigen charakteristische Änderungen ihrer Konformation beim Übergang zwischen aktivem und inaktivem Zustand. Im aktiven Zustand liegt die Aktivierungsschleife unstrukturiert vor und mit einer in Richtung der ATP-Bindetasche geneigten α C Helix. Im Gegensatz dazu bildet sich im inaktiven Zustand ein kurzes, helikales Segment innerhalb der Aktivierungsschleife und die α C Helix neigt sich von der ATP-Bindetasche weg. Wir fragten uns, ob diese charakteristischen Konformationsänderungen in EGFR für den Aufbau eines Assaysystems genutzt werden können, um neuartige EGFR-Inhibitoren zu identifizieren. Acrylodan ist ein Fluorophor mit ausgeprägter Solvatochromie und reagiert auf Änderungen der Polarität seiner Mikroumgebung mit einer bathochromen Verschiebung im Fluoreszenzemissionsspektrum. Eine Modifikation der Aktivierungsschleife

mit Acrylodan erlaubt die Beobachtung der zuvor beschriebenen Konformationsänderung, da Acrylodan von EGFR in den beiden Stadien unterschiedlich stark abgeschirmt wird. So konnte mit dem acrylodanmarkierten EGFR das Prinzip des FLiK-Assay (*Fluorescent Labels in Kinases*) auf EGFR ausgeweitet werden. Die Änderung im Emissionsspektrum wird auch durch Inhibitoren induziert die EGFR in der inaktiven Konformation stabilisieren (z.B. Lapatinib), aber nicht von Inhibitoren die die aktive Konformation stabilisieren (z.B. Gefitinib). Viele der bekannten EGFR-Inhibitoren stabilisieren die aktive Konformation. Der EGFR-FLiK erlaubt es Inhibitoren zu identifizieren, die EGFR in der inaktiven Konformation stabilisieren und so den bisher weniger bekannten chemischen Raum für neuartige Wirkstoffe in der Krebstherapie zu erschließen.

Die Kristallisation von Inhibitoren im Komplex mit ihrem Zielmolekül ermöglicht die Aufklärung des molekularen Wirkmechanismus und erlaubt die rationale Weiterentwicklung und Optimierung der Inhibitoren. Zur Unterstützung von Projekten der Wirkstoffentwicklung gegen EGFR-Resistenzmutationen wurde ein Kristallisationssystem für den EGFR-WT und die EGFR-T790M Mutante etabliert. Mit Hilfe der Röntgenkristallographie und der Strukturaufklärung einiger Pyrazolopyrimidine in EGFR-T790M konnten wertvolle Einsichten gewonnen werden, wie zukünftige Inhibitorgenerationen in Hinsicht auf ihre Selektivität und Affinität weiter optimiert werden können.

Neben EGFR ist auch HER2 als direktes Mitglied der Rezeptorfamilie ein Zielprotein der zielgerichteten Krebstherapie. Die Insertionsmutante A775_G776insYVMA im Exon 20 der Kinasedomäne von HER2 führt zu deren Überaktivierung. Diese Mutation wird auch im Kontext von NSCLC gefunden. Allerdings weniger als primäre Treibermutation sondern auch als erworbene Resistenzmutation gegen EGFR-Inhibitoren. In diesem Falle blockiert ein Inhibitor das Signal vom überaktiven EGFR woraufhin die Krebszelle das onkogene Signal über die HER2-Insertionsmutante umleitet, um ihr Überdauern zu gewährleisten. Ein aktivitätsbasiertes Assaysystem wurde etabliert um im Hochdurchsatz insbesondere nach spezifischen Inhibitoren der Exon 20 Insertionsmutante zu suchen. So konnten aus einer Substanzbibliothek der Arbeitsgruppe einige Fragmente identifiziert werden, die bemerkenswert selektiv die Exon 20 Insertion inhibieren und die weitere Wirkstoffentwicklung in neue Richtungen führen könnten.

Abstract

The receptor tyrosine kinases of the epidermal growth factor receptor family, EGFR (HER1) and HER2 to HER4, are at the top of a complex regulation network which regulates several process in cell growth and in the life cycle of the cell. Growth factors bind to the extracellular domain of the receptor which activates the intracellular kinase domain and transduce the signal to further effector proteins. The genes of the EGF-receptors were identified as proto-oncogenes, since genetic lesions can cause a dysregulation and over activation of the receptor which result in the emergence of cancer. A point mutation in the kinase domain, like L858R, cause an overly active kinase domain and as a result non-small cell lung cancer (NSCLC). The discovery of small molecules as EGFR kinase inhibitors and their progression to targeted cancer therapy was a milestone in modern medicine and medicinal chemistry. The cause of cancer emergence is diverse and with the exception of some examples, like NSCLC, often not linked to a single genetic lesion. The first generation inhibitors erlotinib and gefitinib are used in first-line treatment of EGFR-L858R dependent NSCLC and are prime examples in modern targeted cancer therapy with kinase inhibitors. Resistance mutations occur in EGFR (T790M and C797S) with an ongoing duration of the treatment which render first generation inhibitors ineffective, as well as the second and third generation of inhibitors. A continuous development of novel Inhibitors targeting newly emerging drug resistances is a constant challenge in medicinal chemistry.

The conformational plasticity of EGFR is a fundamental mechanism in the receptor regulation. The α C helix and the activation loop are central elements within the kinase domain and undergo characteristic conformational changes during the transition between active and inactive state. In the active state the activation loop is unstructured, with the α C helix oriented towards the ATP binding site. In the inactive state a short helical segment forms within the activation loop and the α C helix is turned away from the ATP binding site. We asked ourselves if these characteristic conformational changes are suitable to build an assay system that allows for the identification of novel EGFR inhibitors. Acrylodan is a fluorophore with pronounced solvatochromism and reacts to changes in polarity of its microenvironment with a bathochromic shift in its fluorescence emission spectra. A modification of the activation loop with acrylodan allows the detection of previously described conformational changes, since acrylodan is shielded by the protein in different degrees. In that way the FLiK-assay principle (*Fluorescence Labels in Kinases*) was applied to EGFR. The changes in emission spectra were further induced by inhibitor binding to and stabilizing the inactive conformation of EGFR (e.g. lapatinib), but not by inhibitors binding the active state (e.g. gefitinib). Many known EGFR

inhibitors stabilize EGFR in its active state. The EGFR-FLiK allows the identification of inactive state stabilizing inhibitors and to further exploit so far less known chemical space for novel drugs in cancer therapy.

The crystallization of an inhibitor in complex with its target protein allows the elucidation of its molecular mode of action and allows further rational development and improvement. A crystallization system for EGFR-WT and EGFR-T790M was established to support drug development projects in the group. Important insight could be achieved by X-ray crystallography and structure elucidation of some pyrazolopyrimidines in EGFR-T790M which allow for further improvement of future inhibitor generation in regard of affinity and selectivity.

Besides EGFR, the family member HER2 is a target in targeted cancer therapy as well. The insertion mutant A775_G776insYVMA within the exon 20 of the kinase domain results in their over activation. This particular mutation is also found in NSCLC. However, the insertion mutation less common as primary driver mutation in the context of NSCLC and being found as acquired resistance mutation against EGFR inhibitors. In this case the signal from overactivated EGFR is blocked by an inhibitor, whereupon the cell bypasses the oncogenic signal over the HER2 insertion mutant to ensure cell survival. An activity based assay was established to search for inhibitors, especially for the exon 20 insertion mutants, in a high throughput format. In that way, some fragments were identified out of a substance library that inhibit the HER2 insertion with remarkable selectivity and might guide future drug development to new directions.

1 Einleitung

1.1 Die Familie der Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren und ihr Wirken in der Signaltransduktion

Im Jahr 1986 wurde Stanley Cohen für die Entdeckung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) und seine Forschung auf dem Gebiet der Wachstumsfaktoren mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Die Entdeckung von EGFR und dessen Funktionen im Organismus war ein wichtiger Meilenstein in der Biochemie und auf dem Weg zur modernen Medizinischen Chemie.^[1] Ein weiterer Meilenstein aus dieser Zeit war die Entdeckung des ersten viralen Onkogens vSrc im retroviralen Genom des *rous sarcoma virus* und einige Jahre später die Entdeckung seines humanen Homologs cSrc. Mit dem für eine Tyrosinkinase codierenden cSrc konnte erstmals die Existenz von Onkogenen und Proto-Onkogenen sowie der direkte Einfluss einzelner Mutationen auf die Transformation gesunder Zellen in Krebszellen nachgewiesen werden.^[2] Neben cSrc wurden im Laufe der Jahre weitere (Proto-)Onkogene identifiziert, wie z.B. EGFR, ABL, RAS, cMyc und viele andere. Wie cSrc besitzt auch EGFR mit dem *erythroblastic leukemia viral oncogene homolog* (vErbB) ein retrovirales Homolog.^[3] EGFR ist Teil einer Rezeptor-Familie bestehend aus vier strukturell und funktionell eng verwandter Membranproteine, die nach EGFR als *human epidermal growth factor receptor* HER1 bis HER4 oder nach dem viralen Onkogen als ErbB1 bis ErbB4 bezeichnet werden. Die Gene der HER-Familie codieren für Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und regulieren unter anderem über den RAS-RAF-MEK-ERK und den PI3K-AKT-mTOR Signalweg eine hoch komplexe und verzweigte Signalkaskade.^[4,5] Der Organismus steuert über die Freisetzung von Wachstumsfaktoren sowie deren Erkennung und Bindung durch die EGF-Rezeptoren elementare Prozesse in der Differenzierung, Proliferation und Apoptose der Zellen.^[6-11] Nach heutigem Kenntnisstand ist es daher leicht vorstellbar, dass eine Störung in der Rezeptorregulation eine unkontrollierte Proliferation der Zelle auslösen kann. Bei einer solchen Störung, beispielsweise hervorgerufen durch eine Mutation im Gen des Rezeptors, wird aus dem Proto-Onkogen das aktive Onkogen, als treibende Kraft in der Transformation gesunder Zellen zu Krebszellen. In der Klinik werden verschiedene Arten von onkogener Aktivierung unterschieden.^[12,13] Beispielsweise wurde in einer bestimmten Untergruppe von Brustkrebs eine zusätzliche Kopie des HER2-Gens gefunden, hervorgerufen durch eine

Genamplifikation, wodurch im normalen Zyklus der Proteinbiosynthese die Anzahl an Rezeptoren auf der Zelloberfläche steigt. In Folge dessen steigt ebenfalls die Stärke des Signals in Richtung zellinneres sobald Wachstumsfaktoren an den extrazellulären Domänen der Rezeptoren binden.^[14] Eine weitere Genamplifikation kann die Gene der Wachstumsfaktoren selbst betreffen, was dann zu einer erhöhten Konzentration an Wachstumsfaktoren im System führen kann und damit ebenfalls eine verstärkte Rezeptoraktivierung hervorruft.^[15-18] Andere Möglichkeiten der Aktivierung können des Weiteren durch Punktmutationen, Deletionen oder Insertionen, wie z.B. L858R oder E746_T751delLREA in EGFR oder A775_G776insYVMA in HER2 ausgelöst werden. Hier wird durch eine Mutation innerhalb der Kinasedomäne von EGFR oder HER2 die enzymatisch aktive Konformation stabilisiert, bzw. das dynamische Gleichgewicht zwischen enzymatisch aktiver und inaktiver Konformation verschoben, so dass die Kinase eine gesteigerte Aktivität und gesteigerte Signalrate aufweist (z.B. im nicht-kleinzelligen Lungenkrebs).^[19-22] Chromosomentranslokationen oder Genfusionen können ebenfalls die Aktivität von Kinasen beeinflussen. Beispielsweise führt eine Chromosomentranslokation zur Formation des sogenannten Philadelphia-Chromosoms und zur Expression des auf diesem Chromosom codierten BCR-ABL Fusionsproteins. Infolge der Genfusion wird ein regulatorisches Segment der ABL Kinase durch ein Segment der *breakpoint cluster region* (BCR) ersetzt was in einer konstitutiven Aktivierung der Kinase resultiert und zur Entstehung chronisch myeloischer Leukämie führt.^[23] Neben Onkogenen existieren auch Tumorsuppressorgene, die eine negative Regulation auf einen Signalweg ausüben der z.B. das Zellwachstum kontrolliert. Geht diese negative Regulation durch eine *loss of function* Mutation (z.B. PTEN *loss*) verloren steigt infolge dessen die Signaltransduktion durch den betreffenden Signalweg.^[24,25] Die EGFR-Familie besteht aus vier strukturell eng miteinander verwandten Proteinen (HER1 bis 4), welche eine extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne, eine Transmembrandomäne und eine intrazelluläre Proteinkinasedomäne besitzen, von der aus das externe Signal innerhalb der Zelle weiterverbreitet wird.^[26] Der enzymatisch aktive Teil ist die Kinasedomäne, die wiederum eine mit den über 500 Mitgliedern des humanen Kinoms gemeinsame, hoch konservierte Struktur aufweist.^[27] Proteinkinasen gehören zur Gruppe der Transferasen. Bereitgestellt vom Kosubstrat Adenosintri-phosphat (ATP) katalysieren Proteinkinasen den Transfer einer Phosphatgruppe auf Aminosäuren, die eine Hydroxylgruppe in ihrer Seitenkette tragen. Neben den Proteinkinasen finden sich im Organismus noch weitere Kinasen, die z.B. Lipide oder verschiedene Zuckermoleküle phosphorylieren und Aufgaben im Aufbau von Lipidmembranen oder im Metabolismus übernehmen. Bei Proteinkinasen wird, je nachdem auf welche Seitenkette die Phosphatgruppe übertragen wird, zwischen Serin/Threonin- und Tyrosinkinase unterschieden.^[28] Eine weiterer Typ, die Histidin-Kinase, wurde in Menschen und Tieren bisher nur in den

Mitochondrien gefunden, spielt aber in Pflanzen, Pilzen und Prokaryonten eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion. Die Phosphorylierung eines Proteins gehört zu den posttranslationalen Modifikationen und dient der Steuerung unzähliger physiologischer Prozesse, wie z.B. der oben beschriebenen Regulation des Zellwachstums, aber u.a. auch der Regulation des Zellzyklus, Immunsystems, Nervensystems und der Transkriptionskontrolle. Aufgrund der chemischen Struktur eines Phosphats wird bei einer Phosphorylierung eine hohe punktuelle, negative Ladungsdichte auf das Substrat übertragen. Diese Ladung kann in Proteinen Konformationsänderungen induzieren, indem ionische Interaktionen oder Netzwerke von Wasserstoffbrücken beeinflusst werden, wodurch beispielsweise die katalytische Aktivität eines Enzyms aktiviert oder deaktiviert werden kann. Eine andere Möglichkeit chemische Informationen über eine Phosphorylierung zu übertragen, ist die Ausbildung von Interaktionsflächen für weitere Proteine oder die Gerüstfunktion in Proteinkomplexen. Zum Beispiel bilden phosphorylierte Tyrosinseitenketten eine Schnittstelle für regulatorische SH2-Domänen und vermitteln so weitere Protein-Protein-Interaktionen für die Signalweiterleitung.^[29] Den Kinasen gegenüber stehen die Phosphatasen, die die Hydrolyse phosphorylierter Hydroxylgruppen katalysieren. So kann die Zelle durch das dynamische Zusammen- oder Gegenspiel von Kinasen und Phosphatasen verschiedene Prozesse regulieren.^[30]

1.2 Die Struktur und Regulation der EGF-Rezeptoren

Wie bereits erwähnt bestehen EGFR sowie HER2 und die weiteren HER's aus einer extrazellulären Liganden Bindungsdomäne an der die Wachstumsfaktoren binden, einer Transmembrandomäne, über die der Rezeptor in der Membran verankert ist und einer intrazellulären Domäne mit Kinasefunktion. Die extrazelluläre Domäne (ECD) besteht bei den vier Rezeptoren aus vier Subdomänen und bindet, je nach Rezeptor, verschiedene Vertreter aus der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (z.B. EGF, TGF- α , NRG, usw.).^[31,32] Im ligandengebundenen, aktivierten Zustand liegt EGFR im Dimer vor, entweder als Homodimer mit einem weiteren EGFR Protein oder als Heterodimer mit HER2, HER3 oder HER4. Allerdings können auch inaktive, ligandenfreie Rezeptordimere (*preformed dimers*) beobachtet werden, die aber auch dem gleichen Aktivierungsmechanismus unterliegen.^[33-36] Die EGF-Bindestelle in der ECD wird durch die Subdomänen I bis III gebildet (Abbildung 1). Bei der Bindung von EGF findet eine Konformationsänderung statt, in deren Verlauf der Dimerisierungsarm in Subdomäne II freigelegt wird.^[37] Dieser Dimerisierungsarm bildet eine Interaktionsfläche für

die Protein-Protein-Interaktion zwischen den zwei Monomeren und forciert somit die Bildung des Homo- bzw. Heterodimers. Im nicht aktivierten Zustand liegt die ECD in einer geschlossenen (*tethered*) Konformation vor, in der der Dimerisierungsarm von den anderen Subdomänen abgeschirmt wird und die Interaktion verhindert wird.^[26] Für HER2 ist derzeit kein Ligand bekannt der an der ECD bindet, allerdings befindet sich die ECD dieses Rezeptors auch ohne gebundenen Liganden in einem permanent aktiven Zustand. Durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrückenbindungen und ionischen Wechselwirkungen in der ECD, welches bei EGFR nicht vorhanden ist, wird die aktivierte Struktur mit einem ausgebildeten Dimerisierungsarm stabilisiert.^[38] Diese strukturelle Besonderheit hat auch zur Folge, dass HER2 der bevorzugte Partner bei der Bildung von Heterodimeren in der HER-Familie ist.^[39]

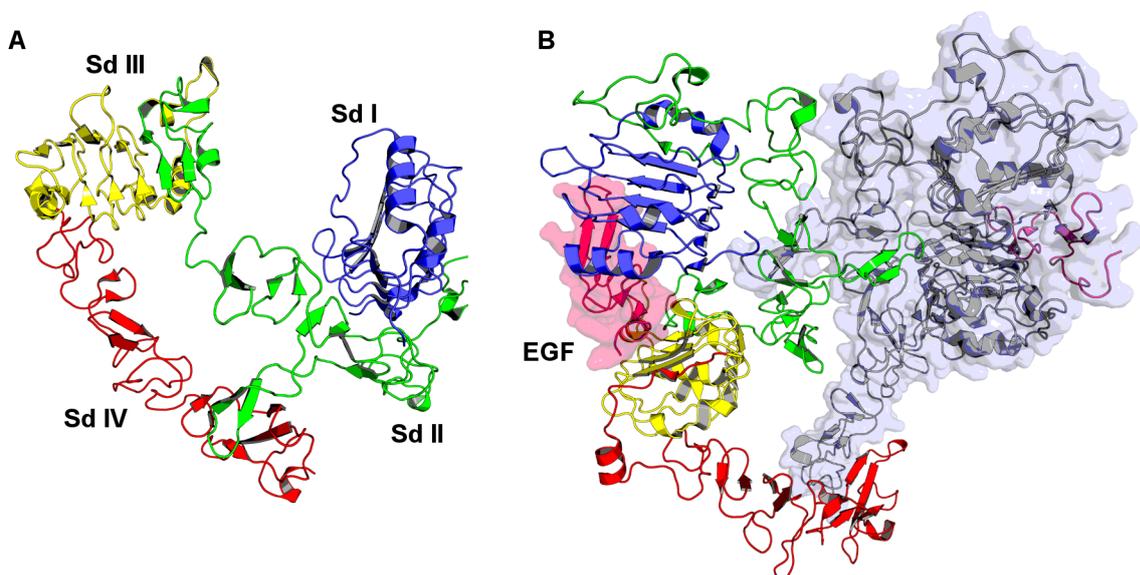


Abbildung 1. (A) Monomere, ligandenfreie extrazelluläre Domäne von EGFR (PDB-ID: 4UV7). (B) Struktur der homodimeren extrazellulären Domäne von EGFR mit gebundenem EGF (PDB-ID: 3NJP). Subdomäne (Sd) I bis IV in Blau - Grün - Gelb - Rot. EGF in Magenta.

Über die Transmembrandomäne (TM) wird die strukturelle Änderung innerhalb der ECD über die Membran in das Zellinnere übertragen. Die TM ist ein einzelnes helikales Segment bestehend aus 44 Aminosäuren mit zwei charakteristischen *CG4 like motif* Interaktionsmotiven, je eines am N-terminalen Ende der Helix (T⁶⁴⁸G⁶⁴⁹-X₂-G⁶⁵²A⁶⁵³) sowie am C-terminalen Ende (A⁶⁶¹-X₃-G⁶⁶⁵) wobei über dieses im ligandenfreien Zustand (*preformed dimer*) die Interaktion der beiden TM stattfindet. Bindet ein Ligand an die ECD ändert sich ebenso die Ausrichtung der beiden Transmembranhelices und der Interaktionsbereich wechselt vom C-terminalen zum N-terminalen CG4-Motif (Abbildung 2).^[40,41] Diese strukturelle Änderung leitet das, durch die Bindung von EGF ausgelöste, Signal weiter in Richtung intrazelluläre Domäne.

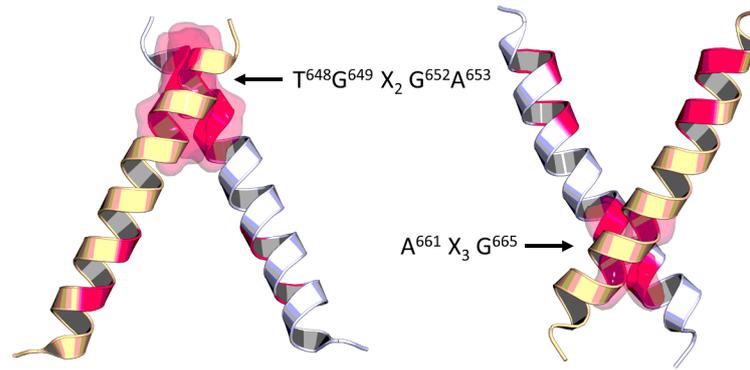


Abbildung 2. Modell der Transmembrandomäne von EGFR im Dimer und schematische Darstellung der Interaktion über die CG4 like motifs $T^{648}G^{649}X_2G^{652}A^{653}$ (N-terminal, EGF gebundener Rezeptor) und $A^{661}X_3G^{665}$ (C-terminal, EGF freier Rezeptor).

Die intrazelluläre Domäne (ICD) des Rezeptors besteht neben der Kinasedomäne noch aus einem Juxtamembransegment (JM) und dem tyrosinreichen C-terminalen Schweif (*C-terminal tail*). Studien legen nahe, dass das JM in einer ungeordneten Struktur vorliegt, sofern an der ECD kein Ligand gebunden ist. Bindet dagegen beispielsweise EGF oder TGF- α , bildet sich im JM ein helikales Segment, welches mit einem weiteren helikalen Segment eines weiteren EGF-Rezeptors in Wechselwirkung tritt.^[42,43] Die Interaktion des JM im dimeren Rezeptor bedingt eine weitere Konformationsänderung und Umlagerung der Kinasedomänen. Im ligandenfreien *preformed dimer* liegt die Kinasedomäne in einem autoinhibierten symmetrischen Dimer vor (Abbildung 3).

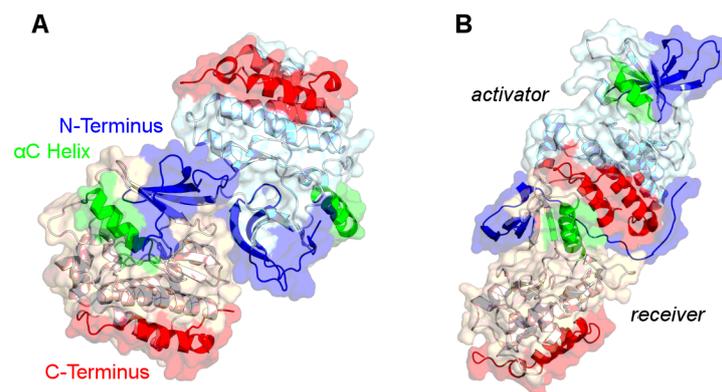


Abbildung 3. (A) Kinasedomäne von EGFR im symmetrischen, inaktiven Dimer. (B) EGFR-Kinasedomäne im asymmetrischen, aktiven Dimer. Bereiche in Blau repräsentieren das N-terminale Ende der einzelnen Kinasedomäne, die roten Bereiche markieren den C-Terminus. In Grün markiert die αC Helix als essentieller Teil der Interaktionsfläche bei der Formation des asymmetrischen Dimers. Die obere (hellblaue) Kinase ist in der *activator* Position, die untere (hellbraune) in der aktivierten *receiver* Position. (PDB-IDs: 2GS7 und 4RIW, modifiziert).

Erst durch die Aktivierung des Rezeptors ordnen sich die Kinasedomänen im asymmetrischen Dimer an, wobei eine Kinase die *activator* Position einnimmt und die Kinase in der *receiver* Position aktiviert (Abbildung 3). Erst durch diese Anordnung und Aktivierung im asymmetrischen Dimer kommt es im *C-terminal tail* zu einer Reihe von Autophosphorylierungen an diversen Tyrosinseitenketten, die dann wiederum weitere Effektorproteine rekrutieren und somit das Signal in der Zelle weiterleiten.^[36,44-48] Innerhalb der Kinasedomäne werden zwei Subdomänen unterschieden zwischen denen die ATP-Bindetasche gebildet wird. Die N-terminale Subdomäne ist überwiegend aufgebaut aus β -Faltblättern wohingegen die C-terminale Subdomäne reich an α -Helices ist (Abbildung 4). Verbunden sind die beiden Subdomänen über die Scharnierregion (*hinge region*). Diese stellt eine flexible Verbindung her und erlaubt die dynamische Orientierung beider Subdomänen zueinander. Weitere konservierte, charakteristische Strukturelemente sind der Türsteherrest (*gatekeeper*) am Anfang der Scharnierregion, die Aktivierungsschleife (*A-loop*) mit dem typischen DFG-Motiv (Asp-Phe-Gly), die glycinreiche Schleife (Gly-X-Gly-X-X-Gly Motiv) und die α C Helix. Der Türsteherrest kontrolliert über seine Größe und Polarität den Zugang zur ATP-Bindetasche und einer dahinterliegenden hydrophoben Tasche. Die Bindung des Kofaktors ATP wird durch Interaktionen mit der glycinreichen Schleife und über die Koordination der Phosphatgruppen mit Mg^{2+} -Ionen, durch Interaktionen des Aspartats im DFG-Motiv und über Wasserstoffbrücken zur Scharnierregion realisiert.^[27,49-52] Die Abspaltung des γ -Phosphats und dessen Übertragung auf das Substrat wird durch ein katalytisches Lysin in der N-terminalen Subdomäne realisiert. Auch wenn die grundlegende Struktur der Kinasen hoch konserviert ist gibt es dennoch einige Unterschiede in deren Aktivierungsmechanismen. Ein typischer Aktivierungsmechanismus ist die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife, damit einhergehend die Umlagerung dieser und des DFG-Motivs von der *DFG-out* in die *DFG-in* Konformation. In der inaktiven Konformation der Kinase (*DFG-out*) besetzt die Seitenkette des Phenylalanins im DFG-Motiv die ATP-Bindetasche und verhindert die Bindung von ATP. Als Teil der ATP-Bindetasche befindet sich nahe der α C Helix die sogenannte allosterische Tasche, die im aktiven Zustand (*DFG-in*) durch das Phenylalanin besetzt wird und somit Raum für die Bindung von ATP schafft. Diese Mechanismen und der Übergang von *DFG-out* zu *DFG-in* sind beispielsweise bei Src-Kinasen zu beobachten (z.B. PDB-ID: 2QQ7, *DFG-in*; 3TZ7, *DFG-out*). Auch wenn die *DFG-out/in* Umlagerung eine der bekannteren Mechanismen in Proteinkinasen ist, ist diese nur bei einem vergleichsweise kleinen Teil des Kinoms zu finden.^[53-55] Auch in der HER-Familie ist diese Art der Aktivierung nicht zu beobachten. Zwar gibt es hier ebenfalls eine Konformationsänderung in der Aktivierungsschleife, diese geht allerdings nicht mit einer ausgeprägten Umlagerung des DFG-Motivs einher. Charakteristisch für die HER-Familie ist die Verlagerung der α C Helix von der *α C-out* in die *α C-in* Konformation während der

Ausbildung des asymmetrischen Dimers. Im asymmetrischen Dimer nehmen die beiden beteiligten Kinasen unterschiedliche Positionen ein. Die Kinase in der *activator* Position interagiert über ihren C-Terminus mit einem hydrophoben Bereich am N-Terminus, nahe der α C Helix, der *receiver* Kinase.^[45] Damit stabilisiert die *activator* Kinase eine kompaktere Konformation der *receiver* Kinase mit einer einwärts, in Richtung der ATP-Bindetasche gerichteten α C Helix (*α C-in*). In der α C Helix befindet sich ein Glutamat, dessen Seitenkette in der *α C-in* Konformation in Richtung der ATP-Bindetasche bzw. in Richtung des katalytischen Lysins orientiert ist. Durch die räumliche Nähe der schwach basischen Carbonylfunktion zum primären Amin in der Lysinseitenkette wird dessen Acidität bzw. Nucleophilie erhöht und die Abspaltung des ATP- γ -Phosphats unterstützt. Ein ähnlicher Mechanismus wird beispielsweise auch in den Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) beobachtet.^[56] Die so aktivierte HER-Kinase transphosphoryliert verschiedene Tyrosinseitenketten im *C-terminal tail*, was wiederum weitere Effektorproteine rekrutiert die das Signal weiterleiten. Interessanterweise hat die Kinasedomäne von HER3 den gleichen strukturellen Aufbau wie die anderen Familienmitglieder, besitzt aber aufgrund einiger nativer Mutationen an katalytisch wichtigen Positionen in der ATP-Bindetasche, nur etwa ein Tausendstel der enzymatischen Aktivität von EGFR. HER3 wird daher zur Klasse der Pseudokinasen gezählt.^[47,57-60] Auch wenn HER3 als Pseudokinase keine ausgeprägte enzymatische Aktivität besitzt ist der Rezeptor dennoch in der Lage Dimere auszubilden. Im Dimer fungiert die intrazelluläre Kinasedomäne als *activator* Kinase, bevorzugt im Dimer mit HER2, und ermöglicht so die Phosphorylierung des *C-terminal tail* sowie die Signaltransduktion

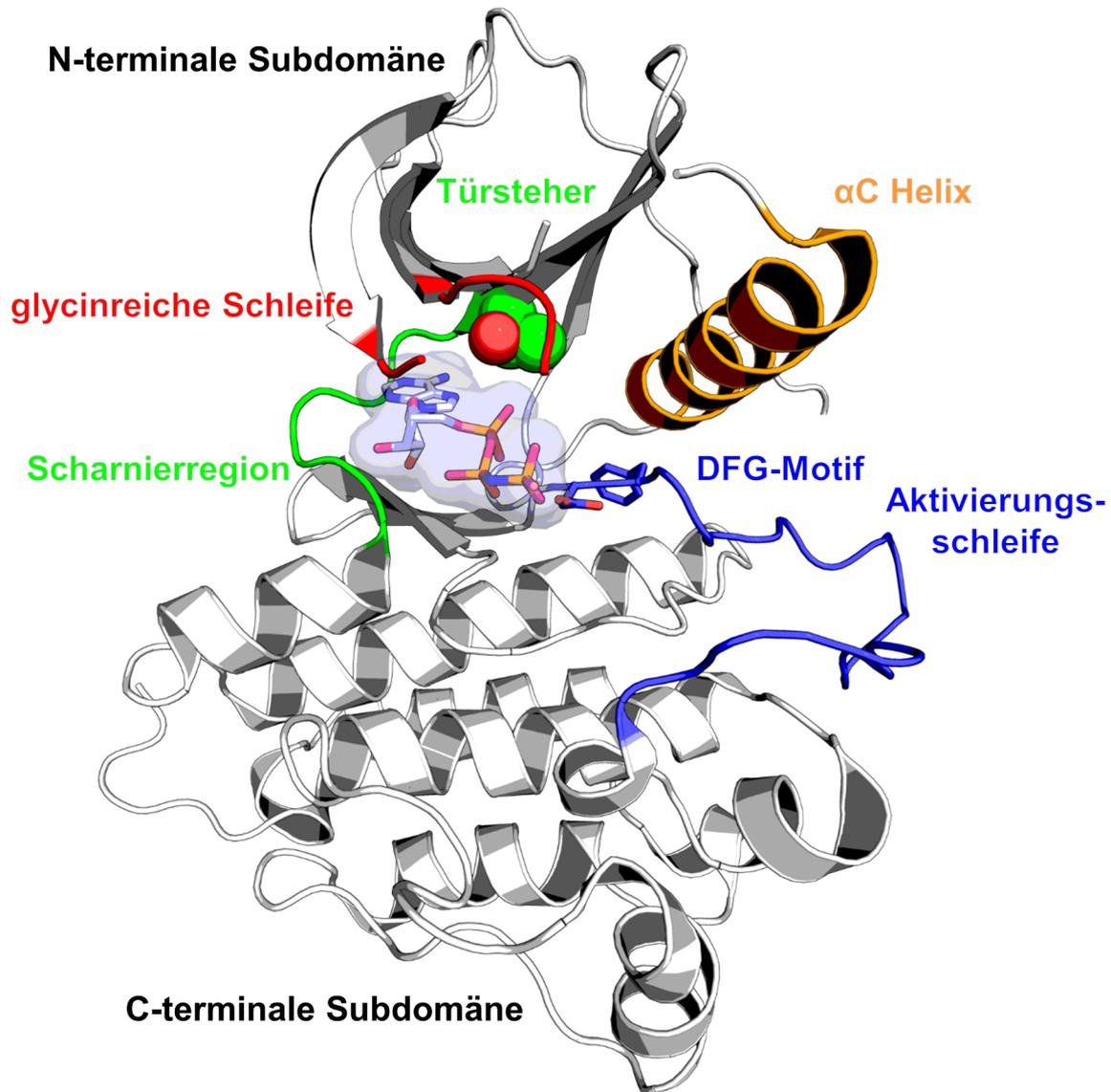


Abbildung 4. Allgemeiner Aufbau einer Proteinkinase am Beispiel von EGFR-Wildtyp mit AMP-PNP in der ATP-Bindetasche (PDB-ID: 3VJ0).

1.3 *Small Molecules* als Kinaseinhibitoren

Niedermolekulare Verbindungen oder auch *small molecules* erwiesen sich in den letzten Jahrzehnten als wertvolles Werkzeug in der chemischen Biologie. In der Erforschung von Kinasen werden sie überwiegend als Inhibitoren der enzymatischen Aktivität eingesetzt und erlauben Einblicke wie verschiedene Kinasen in komplexen Signalnetzwerken in der Zelle interagieren. Aus dem anfänglichen Einsatz als chemische Werkzeuge in der Forschung sind einige wertvolle Therapeutika entstanden die z.B. Einsatz in der Krebstherapie fanden.^[61]

Klassifiziert werden diese niedermolekularen Kinaseinhibitoren üblicherweise in Typ I bis Typ IV, kovalente Inhibitoren und Substratanaloga.^[27] Aufgrund hoher Ähnlichkeiten in Sequenz und Struktur unter den Proteinkinasen, ist es eine Herausforderung Inhibitoren zu entwickeln, die selektiv gegen eine bestimmte Kinase oder Kinasefamilie wirken. Substrate sind oft andere Proteine oder Subdomänen und haben eine verhältnismäßig große Interaktionsfläche für eine Protein-Protein-Interaktion. Substratanaloga sind hingegen oft kürzere Peptidfragmente, die ähnlich dem natürlichen Substrat aufgebaut sind und mit diesem um die Bindestelle konkurrieren.^[62,63] Inhibitoren vom Typ I, Typ II und Typ III binden in der aktiven Tasche bzw. in der ATP-Bindetasche. Die weitere Klassifizierung in die verschiedenen Typen erfolgt aufgrund des spezifischen Bindungsmodus.^[64-66] Typ I Inhibitoren (z.B. Dasatinib in Src, PDB-ID 3G5D) verhalten sich ATP-kompetitiv, bilden Interaktionen zur Scharnierregion aus und binden die Kinase in der aktiven (*DFG-in*) Konformation.^[67] Viele der bekannten reversiblen EGFR-Inhibitoren, wie z.B. Erlotinib, können dem Typ I zugeordnet werden und stabilisieren EGFR in der aktiven *α C-in* Konformation. Typ II Inhibitoren erstrecken sich von der Scharnierregion in Richtung der allosterischen Tasche im Bereich der α C Helix und stabilisieren die inaktive (*DFG-out*) Konformation der Kinase, z.B. Imatinib in Abl (PDB-ID 2HYI).^[68] Für EGFR sind nur wenige Inhibitoren bekannt, die die inaktive Konformation stabilisieren und eher einen Typ I/II-Hybrid darstellen, wie z.B. Lapatinib.^[69] Typ III Inhibitoren binden ausschließlich in dieser allosterischen Tasche ohne Verbindung zur Scharnierregion und oft mit Interaktionen zum DFG-Motiv und zur α C Helix, z.B. RL37 in Src (PDB-ID 3F3U).^[70] Rein allosterische Inhibitoren, die entfernt vom aktiven Zentrum binden werden als Typ IV klassifiziert. Diese allosterischen Inhibitoren beeinflussen die enzymatische Aktivität durch eine nicht-kompetitive Bindung mit Kofaktoren oder Substraten. Sie modulieren die Konformation des Enzyms, stabilisieren oder induzieren bestimmte konformationelle Änderungen oder interferieren bei der Protein-Protein-Interaktion mit anderen regulatorischen Proteinen oder Domänen. Diese Inhibitorklasse verspricht Vorteile in Bezug auf die Selektivität über andere Kinasen, allerdings sind allosterische Bindestellen nicht immer verfügbar oder bekannt. Ein bekannter Typ IV Kinaseinhibitor ist beispielweise MK-2206 in AKT (PDB-ID 3O96).^[71] Einige Kinasen verfügen im Bereich des aktiven Zentrums über ein Lösungsmittel-exponiertes Cystein. Durch eine Modifikation des Inhibitors mit einem Elektrophil, wie einem Michael-Akzeptor, kann eine Addition des Inhibitors an dieses Cystein stattfinden und so eine irreversible Bindung ausbilden. Viele der bekannten irreversiblen EGFR-Inhibitoren (z.B. WZ4002) zeigen neben der kovalenten Bindung ebenfalls ein Typ I-Bindungsmuster, in Hinblick auf ihren Bindungsmodus in der ATP-Bindetasche und die Stabilisierung der aktiven Konformation.^[72] Die Bindung eines reversiblen Inhibitors an die Kinase steht immer im dynamischen Gleichgewicht zwischen Assoziation und Dissoziation.

Durch eine kovalente Bindung des Inhibitors bleibt die Kinase inhibiert bis sie von der Zelle degradiert wird. Befürchtungen, dass die Inhibitoren mit einem Elektrophil in der Zelle unspezifisch mit jedem Nukleophil reagieren könnten was dem Lösemittel zugänglich ist (z.B. Glutathion), konnten in der Praxis durch die Wahl geeigneter Elektrophile mit angepasster Reaktivität entkräftet werden. Beispiele für solche irreversible Verbindungen in der Klinik sind AZ9219 oder CO1686 zur Therapie des wirkstoffresistenten nicht-kleinzelligem Lungenkarzinoms (EGFR-L858R/T790M).^[73-75] Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit der Kinasen ist die Selektivität der Inhibitoren ein wichtiger Faktor. Trifft ein Inhibitor neben seiner Zielkinase noch weitere Kinasen kann dies zu ernststen Nebenwirkungen (*adverse effects*) führen. Eine Selektivität für eine onkogene Mutante über ihren Wildtyp ist ebenfalls erstrebenswert, z.B. BCR-ABL über ABL oder EGFR-L858R über EGFR-WT. Es ist leicht vorstellbar, dass die Inhibition einer Wildtyp-Kinase außerhalb des Tumorgewebes schwerwiegende Folgen haben kann, was letztendlich auch zum Scheitern einer Therapie führen kann.

1.4 EGFR in der Medizin und in der Wirkstoffforschung

Über Jahrzehnte bestand die klassische Krebstherapie darin einen Tumor operativ zu entfernen, das Wachstum der Krebszellen mittels Zytostatika zu hemmen, einen Tumor mit ionisierender Strahlung zu zerstören oder einer Kombination aus den verschiedenen Methoden. Viele dieser Methoden sind mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden und stellen eine extreme Belastung für den Patienten dar ohne Garantie, dass der Patient eine permanente oder zumindest temporäre Heilung erfährt. Mit der Entdeckung und Identifizierung der (Proto-)Onkogene rückte auch EGFR in den Fokus der pharmazeutischen Forschung und im Laufe der letzten Jahre wurden EGFR und HER2 bis HER4 als Treiber mit verschiedenen Krebsarten in Verbindung gebracht, wie z.B. in NSCLC, Glioblastoma, Brustkrebs, Hautkrebs, Magenkarzinom, u.a., was wiederum das Konzept der zielgerichteten EGFR-Therapie beflügelte.^[76-91] Frühe Beispiele für verschiedene Strategien in der zielgerichteten Tumorthherapie sind Trastuzumab zur Behandlung von Brustkrebs sowie Imatinib zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie und gastrointestinaler Stromatumoren (GIST).^[92-95] Trastuzumab ist ein monoklonaler Antikörper dessen komplementäres Antigen die extrazelluläre Domäne von HER2 darstellt. Durch die Bindung des Antikörpers wird die Dimerisierung von HER2 blockiert und in Folge dessen auch die Signaltransduktion durch den Rezeptor. Imatinib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor zur Inhibition

der onkogenen Kinasemutanten BCR-ABL in CML und cKIT in GIST (Stammzellfaktor-Rezeptors, z.B. Exon 11 Mutationen). Mit Imatinib zeigte sich zum ersten Mal im klinischen Umfeld welches Potential in der zielgerichteten Krebstherapie mit *small molecules* steckt, da Imatinib in Patienten weniger Nebenwirkungen hervorrief als die bis dato angewandten konventionellen Therapien und dem Patienten während der Therapie zu einer gesteigerten Lebensqualität verhalf. Ein weiteres Therapiefeld für Kinaseinhibitoren eröffnete sich durch die Identifizierung von EGFR-Aktivierungsmutationen und deren Rolle in der Krebsentstehung. Punktmutationen in Exon 21 (L858R) sowie Deletionen in Exon 19 (E746_T751delLREA) sind als Treibermutationen für die Entstehung des nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (*non small cell lung cancer*, NSCLC) verantwortlich.^[96,97] Lungenkrebs gehört zu den am häufigsten auftretenden Krebserkrankungen und in Deutschland erkranken jährlich etwa 38.000 Männer und Frauen. NSCLC stellt hierbei eine besonders aggressive Form des Lungenkrebs (ca. 80 % aller Lungenkrebspatienten) dar.^[98,99] Allerdings zeigte sich bei Sequenzanalysen des Genoms von NSCLC-Patienten ein differenzierteres Bild. NSCLC lässt sich demnach nicht nur auf eine einzige genetische Läsion reduzieren. Bei etwa 40 % der Patienten ist auf genetischer/molekularer Ebene nicht bekannt was die Krankheit auslöst. Andere häufig gefundene Auslöser waren beispielsweise Mutationen in KRAS, BRAF, MET, ALK und HER2.^[100,101] Dies zeigt, dass die zielgerichtete Therapie von NSCLC mit EGFR-Mutationen nur ein Baustein in der Behandlung einer komplexen Krankheit darstellt und dass eine genetische Analyse des Krebsgenoms des Patienten für eine effektive Therapie von zentraler Bedeutung ist. Erlotinib und Gefitinib wurden als Erstlinientherapie zur gezielten Behandlung von Patienten mit EGFR-L858R Mutation oder EGFR Exon19 Deletion zugelassen und waren zu Beginn der Therapie äußerst erfolgreich. Allerdings trat ein Problem auf was dazu führte, dass der zuvor für besiegt gehaltene Krebs erneut aufflammte. Durch eine zusätzlich erworbene sekundäre Mutation in EGFR-L858R an der Position der Türsteheraminosäure T790M wurden die Inhibitoren unwirksam.^[102] Mit der Zeit zeigte sich, dass diese sekundäre Resistenzmutation nach einigen Monaten der Therapie bei vielen Patienten auftrat. Im Wildtyp besitzt EGFR einen vergleichsweise kleinen, polaren Threonin-Türsteher, der bei der erworbenen Resistenz zu einem größeren, unpolaren Methionin-Türsteher mutiert. Das gleiche Schema wurde auch bei anderen Kinasen beobachtet, beispielsweise bei der Behandlung von BCR-ABL mit Imatinib, wo ebenfalls eine Resistenzmutation des Türsteherrests (T315I) auftritt.^[103] ATP-kompetitive Kinaseinhibitoren stehen in starker Konkurrenz mit der hohen intrazellulären ATP-Konzentration (1 bis 10 mM) um ihre Bindestelle im aktiven Zentrum. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Michaelis-Menten Konstante (K_m) für ATP in der EGFR-L858R Mutante erhöht, wodurch sich die Affinität von ATP verringert und sich in Folge dessen die Effektivität ATP-kompetitiver Inhibitoren erhöht.

Durch die sekundäre T790M-Mutation wird der ATP- K_m wieder abgesenkt und die ATP-kompetitiven Inhibitoren verlieren an Effektivität. Einen zusätzlichen Einfluss hat die Größe des Türsteherrestes. Hierbei können sich auf Grund der Größen- und Polaritätsunterschiede ebenfalls negative Effekte auf die Bindung des Inhibitors ergeben.^[104-106] Auch wenn die zielgerichtete Krebstherapie aufgrund der Resistenzentwicklung zunächst einen Rückschlag erleben musste, bestand weiterhin ein erhebliches Potential für diese Therapieform. Auf der Suche nach EGFR-Inhibitoren der zweiten Generation rückten kovalente, irreversible Inhibitoren in den Fokus. Diese Inhibitoren sind mit elektrophilen funktionellen Gruppen versehen und können in EGFR eine Michael-Addition mit einem nucleophilen Thiol einer Cysteinseitenkette (Cys797) am Rande der ATP-Bindetasche eingehen. Die Inhibitoren der zweiten Generation, wie Afatinib oder Dacomitinib, erwiesen sich zunächst als sehr Effektiv und auch erste klinische Studien verliefen erfolgversprechend, doch die hohen Erwartungen konnten in der Klinik als Therapie gegen EGFR-L858R/T790M aufgrund mangelnder Wirksamkeit im Patienten letztendlich nicht erfüllt werden.^[73,98,107-110]

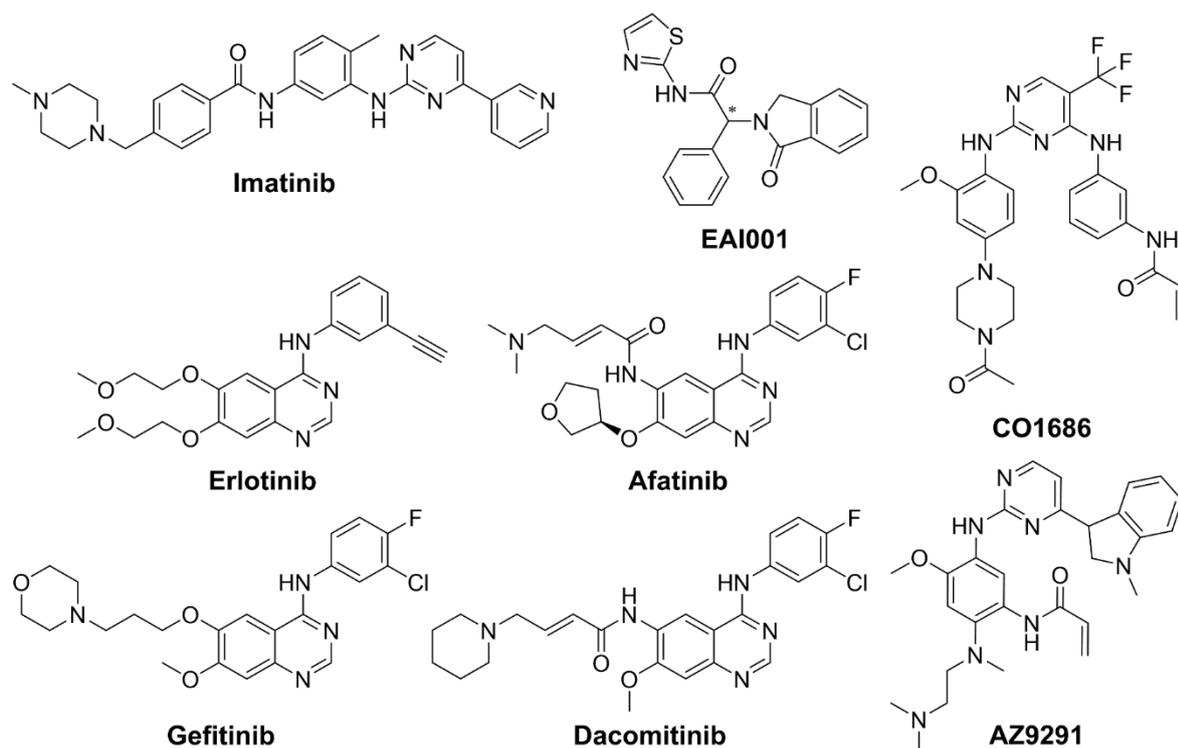


Abbildung 5. Beispiele für verschiedene Tyrosinkinaseinhibitoren.

Viele Inhibitoren der ersten und zweiten Generation, ob mit oder ohne Elektrophil, basieren auf einem Chinolin- oder Chinazolingrundgerüst. In den letzten Jahren konnten neuartige chemische Strukturen identifiziert werden, die nicht auf den bis dato bekannten Grundgerüsten basieren und hochpotent gegen die resistenten Krebszellen waren. Die Verbindung WZ4002 und insbesondere deren Nachfolger CO1686 und AZ9291 zählen seit

vielversprechenden Ergebnissen in späten klinischen Studien zur dritten Generation. So wurde AZ9291 (Osimertinib) im Sommer 2016 von der US-amerikanischen *Food and Drug Administration* und der Europäischen Arzneimittel-Agentur zur Behandlung von EGFR-L858R/T790M zugelassen.^[72,111,112] Unglücklicherweise konnten Studien bereits eine neue Resistenzentwicklung gegen die Inhibitoren der dritten Generation offenlegen, noch bevor diese breiten klinischen Einsatz erfuhren. Durch die Mutation des Cys797 zu einem Serin verlieren auch die Inhibitoren der dritten Generation an Wirkung, da die Hydroxylgruppe in der Seitenkette des Serins unter physiologischen Bedingungen keine Michael-Addition mit den kovalenten Inhibitoren eingehen kann.^[113,114] Die direkten Resistenzmutationen in EGFR sind allerdings nicht die einzige Möglichkeit wie die Tumorzelle ihr Überleben sichert und das onkogene Signal aufrechterhalten kann. Aktivierungsmutanten in HER2, wie die A775_G776insYVMA Insertionsmutanten, können z.B. als neue Treibermutationen neben EGFR-Mutationen auftreten.^[115-118] Ein seit einiger Zeit bekannter Resistenzmechanismus ist die Umleitung und Aufrechterhaltung des Signals durch andere Rezeptoren. Beispielsweise kann die Krebszelle bei einer Genamplifikation der Rezeptortyrosinkinase cMET das onkogene Signal am inhibierten EGFR-Signalweg vorbeileiten und so ihr Überleben gewährleisten.^[119] Wird EGFR z.B. durch Erlotinib inhibiert übernehmen in einigen Krebszellen auch die EGFR verwandten Rezeptoren HER2 oder HER3 die Aufrechterhaltung des onkogenen Signals.^[20,117,120-122] Diese verschiedenen Resistenzmechanismen verdeutlichen die komplexe Resistenzproblematik und machen die Identifizierung neuer Inhibitoren und die Entwicklung neuer Therapien noch anspruchsvoller. Im Sommer 2016 wurde mit EAI001 erstmals eine neue Klasse von EGFR-Inhibitoren beschrieben die nicht ATP-kompetitiv in einem Typ III artigen Bindungsmodus binden.^[123] Zusammen mit Lapatinib ist EAI001 ein Beispiel für eine alternative Klasse an Inhibitoren, die EGFR in der inaktiven Konformation binden und möglicherweise einen neuen chemischen Raum sowie alternative Strategien zur Adressierung von Wirkstoffresistenzen in EGFR eröffnen. Die Entwicklung der EGFR-Inhibitoren verdeutlicht zum einen die Chancen, die sich in der Therapie zielgerichteten Therapie mit diesen ergeben, aber zugleich auch eines der größten Probleme, nämlich die permanente Evolution der Krebszellen. Da sich die Krebszellen aufgrund ihrer genetischen Instabilität schnell verändern und anpassen können wird es auch in Zukunft zu weiteren Resistenzbildungen kommen, was wiederum eine fortlaufende Entwicklung der EGFR-Inhibitoren nötig machen wird.

2 Zielsetzung

Die epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (HER1-4) sind prominente Onkogene und entscheidend an der Entstehung verschiedener Krebserkrankungen beteiligt. In den letzten Jahren der Forschung und klinischen Entwicklung haben niedermolekulare organische Kinaseinhibitoren ihren Wert und ihr Potential bei der Behandlung einiger Krebserkrankungen, wie des nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC), bewiesen. Die Entwicklung von Wirkstoffresistenzen gegen die eingesetzten Erstlinientherapeutika ist ein großes Problem in der Klinik, da viele EGFR-L858R positiven NSCLC Patienten durch eine erworbene Resistenzmutation (T790M/C797S) einen Rückfall erleiden. Auch die Instabilität und Heterogenität des Krebsgenoms macht eine einfache Behandlung schwierig. All dies macht eine konstante Entwicklungsarbeit nötig um auch in Zukunft effektive Wirkstoffe gegen diese aggressive Art des Lungenkrebs zur Verfügung stellen zu können. Nur wenige Inhibitoren, wie z.B. Lapatinib, sind bekannt die EGFR in der inaktiven Konformation stabilisieren. Beispielsweise zeigt Lapatinib vorteilhafte Eigenschaften in Bezug auf seine Selektivität und Pharmakokinetik, wodurch diese Inhibitorklasse tendenziell vorteilhaft erscheint. Da in Hochdurchsatzverfahren meist mit aktivitätsbasierten Assays nach neuen Inhibitoren gesucht wird, kann nicht unterschieden werden, ob eine Verbindung die aktive oder inaktive Konformation von EGFR stabilisiert. Mit der Anwendung des *Fluorescent Labels in Kinases* (FLiK) Assay auf EGFR ist es möglich gezielt nach chemischen Strukturen zu suchen, die EGFR in der inaktiven Konformation stabilisieren. Mit dem FLiK-Assay sollte ein Werkzeug entwickelt werden, um diesen bislang kaum untersuchten chemischen Raum weiter zu erforschen und Strukturen zu identifizieren die ähnlich wie Lapatinib die inaktive Konformation stabilisieren. Aus diesen neuen Strukturen könnten dann neuartige Inhibitoren und Modulatoren von EGFR entwickelt werden. Um dies zu erreichen ist ein Verständnis der Struktur neuer Liganden im Zielprotein von großer Bedeutung. Die Proteinkristallisation erlaubt die Aufklärung von Bindungsmodi und ermöglicht die strukturbasierte Weiterentwicklung von Liganden. Ziel war es daher ein Kristallisationssystem für EGFR zu etablieren, um die Wirkstoffentwicklung zu unterstützen. Die genetischen Ursachen für die Entstehung von NSCLC sind vielfältig und nicht auf die L858R-Aktivierungsmutation begrenzt. Gleiches gilt für die Wirkstoffresistenzen, die ebenfalls vielfältige Mechanismen zeigen können. HER2 und insbesondere die Insertionsmutation HER2 A775_G776insYVMA wurden ebenfalls als genetische Läsionen und im Kontext der Resistenzentwicklung in NSCLC identifiziert. Daher könnten HER2 spezifische Inhibitoren als ein weiterer Baustein in der Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkrebs Bedeutung finden. Mit der Etablierung eines

aktivitätsbasierten Assays für den HER2-Wildtyp und die YVMA-Insertionsmutante sowie eines Kristallisationssystems für den Wildtyp sollte die Entwicklung von HER2-Inhibitoren vorangetrieben werden.

3 Beobachtung konformationeller Änderungen in der Rezeptortyrosinkinase EGFR

Die intrinsische Regulation von Proteinkinasen ist durch diverse konformationelle Änderungen gewährleistet, die potentiell viele Möglichkeiten bieten um gezielt die Funktion der Kinase in verschiedenen Stadien bzw. Zuständen zu adressieren. [90,124] Die Therapeutika der ersten Generation (Gefitinib und Erlotinib) haben ihre Effektivität bei der Behandlung von EGFR-Aktivierungsmutationen (L858R) bewiesen und auch die kovalenten Inhibitoren der dritten Generation (CO1686 und AZ9291) zeigten ihre Effektivität gegen die sekundäre Resistenzmutation (T790M). [74,111,125] Nur gegen eine tertiäre Resistenzmutation (C797S) ist bisher noch kein effektiver Wirkstoff in der Klinik verfügbar. [112-114] Die zuvor erwähnten EGFR-Inhibitoren wurden mit dem Fokus entwickelt, die Bindung von ATP in der ATP-Bindetasche zu verhindern, dabei die Phosphorylierung des Substrats und die weiterführende Signaltransduktion zu blockieren. Interessanterweise zeigten aktuelle Studien weitere Wirkmechanismen von EGFR-Inhibitoren, wobei die Blockierung des Phosphotransfers nicht den einzigen Aspekt repräsentiert. Die intrazelluläre Kinasedomäne und die extrazelluläre Ligandenbindungsdomäne sind über die Transmembrandomäne und das Juxtamembransegment, welches ein wichtiges Element der Rezeptorregulation darstellt, verbunden. [44,45,48] Die Bindung von EGF oder TGF- α an die extrazelluläre Domäne resultiert in verschiedenen Konformationen des Juxtamembransegments. [42,43] Dieses Wechselspiel ist durch Mutationen innerhalb der Kinasedomäne, z.B. L858R, über einen allosterischen Mechanismus gestört. Interessanterweise können die vorher genannten Inhibitoren die Konformation des Juxtamembransegments durch die Bindung in der Kinasedomäne in einer Weise wiederherstellen wie es im Wildtyp der Fall ist. [126,127] Diese Entdeckung könnte den Weg bereiten um EGFR auf Basis der Konformation des gesamten Rezeptors durch *small molecules* mit neuartigen Wirkmechanismen zu modulieren. Beispielsweise bietet der 4-Anilinoquinazolininhibitor Lapatinib einzigartige Bindungseigenschaften, die das Potential von Konformationen-modulierenden Verbindungen untermauern. [69] Im Gegensatz zu anderen klassischen Kinaseinhibitoren vom Typ I, wie Gefitinib, die in der aktiven Konformation binden, stabilisiert Lapatinib die inaktive Konformation der Kinasedomäne von EGFR. [69,128] Die verfügbaren Kristallstrukturen untermauern das EGFR nicht in der Lage ist eine ausgeprägte *DFG-out* Konformation einzunehmen, ähnlich der von ABL gebunden mit Imatinib. [129] EGFR nimmt eine inaktive Konformation ein, in der die α C Helix von der ATP-Bindetasche weg zeigt (*α C-out*) und einer aktiven Konformation bei der die α C Helix nach innen

zur ATP-Bindetasche zeigt (αC -in).^[69,130] Aktuelle Computerberechnungen basierend auf molekulardynamischen Simulationen deuten darauf hin, dass EGFR möglicherweise intermediäre Zustände zwischen der aktiven und inaktiven Konformation einnehmen kann.^[131] Während dieses Übergangs erfährt die Kinasedomäne eine partielle Entfaltung (*cracking*) der Scharnierregion um, durch die Verschiebung der beiden Subdomänen zueinander, mehr Raum zu schaffen für eine Umlagerung des DFG-Motivs in der Aktivierungsschleife.^[131] Liganden, die EGFR in einer solchen intermediären Konformation binden und stabilisieren, könnten einen innovativen Ansatz bieten um krankheitsassoziierte EGFR-Mutanten zu adressieren. Vor einigen Jahren etablierten Simard et al. die FLiK Methode (*Fluorescent Labels in Kinases*), ein fluoreszenzbasiertes Assaysystem zur Detektion von Liganden und deren Bindungsmodi in den Kinasen Src, ABL, AKT und p38 α .^[132-137] Es stellte sich also die Frage ob diese Methode ebenfalls geeignet war EGRF-Inhibitoren zu identifizieren und im Hinblick auf ihren Bindungsmodus zu klassifizieren. Die Methode erlaubt es gezielt neue, noch wenig bekannte chemische Strukturen zu identifizieren und so die Entwicklung neuer Liganden zu unterstützen, die gezielt einzigartige Konformationen stabilisieren. Ziel war es auf diese Weise Inhibitoren gegen wirkstoffresistente EGFR-Mutanten zu identifizieren und neue niedermolekulare Sondenmoleküle für die chemische Biologie zu entwickeln um die komplexe und dynamische Regulation von EGFR tiefergehend zu untersuchen.

3.1 Design der FLiK-Konstrukte

Die Konstrukte umfassen die intrazelluläre Kinasedomäne, ohne Juxtamembransegment und C-terminalen Schweif. Die Struktur von EGFR im Komplex mit Lapatinib zeigt die Kinase in einem inaktiven Zustand mit einem kurzen Segment der Aktivierungsschleife in einer helikalen Struktur (PDB-ID: 1XKK).^[69] Wir stellten die Hypothese auf, dass dieses Segment von fünf Aminosäuren C-terminal vom DFG-Motiv geeignet ist, um konformationelle Änderungen zu detektieren. Sequenzanalysen und Alignments zeigten, dass in etwa 47 Kinasen ein natürliches Cystein an der DFG+2 Position vorkommt (A859C). Es lag daher nahe, dass ein Cystein an dieser Position, für die spätere selektive Modifizierung mit dem thiolreaktiven Fluorophor Acrylodan, vermutlich toleriert werden würde. Zusätzlich zum DFG+2-Konstrukt wurde auch das DFG+5-Konstrukt (L862C) konstruiert, da dies am Ende des helikalen Segments lokalisiert ist und möglicherweise eine ausgeprägte Interaktion mit der glycinreichen Schleife eingehen könnte. Um die gezielte ortsspezifische Markierung mit einem Fluorophor gewährleisten zu können wurden zusätzlich alle Oberflächen bzw. Lösemittel-exponierten Cysteine gegen

Serine mutiert. Die Konstrukte wurden im Rahmen der Diplomarbeit von S. Öcal, 2011 erzeugt.^[138]

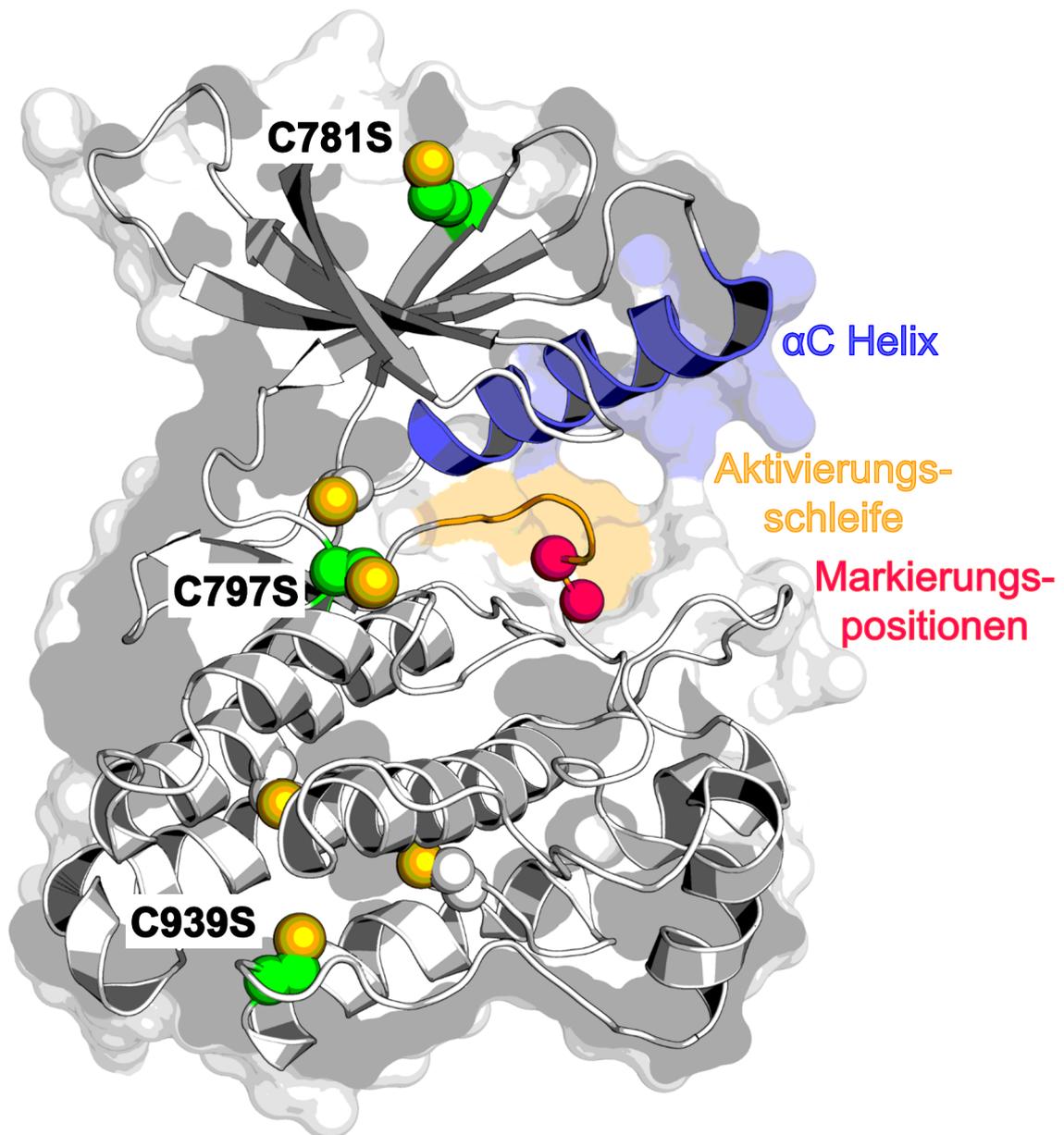


Abbildung 6. Struktur der EGFR-FLiK-Konstrukte. In grün markiert sind die Cysteine, die im Laufe des Konstruktdesigns gegen Serine ausgetauscht wurden um unspezifische Reaktionen mit Acrylodan zu vermeiden. In weiß dargestellt sind weitere Cysteine, die im Inneren der Struktur liegen und dem umgebenden Lösemittel nicht zugänglich sind. In Magenta illustriert sind die zwei Positionen der Acrylodanmarkierung in der Aktivierungsschleife. (PDB-ID: 1M14).

Wie bereits in Kapitel 1.3 erwähnt, werden Kinaseinhibitoren in vier Kategorien unterteilt. Die Typen I bis III binden in der ATP-Bindetasche und der Typ IV außerhalb der ATP-Bindetasche. Im Bereich der Kinasedomäne bindende Typ IV EGFR-Inhibitoren konnten bislang nicht identifiziert werden und eine adressierbare allosterische Bindestelle ist ebenfalls unbekannt. In der Theorie sind für die Detektion im FLiK-Assay die Typen I bis III von Relevanz, wobei die

Typen II und III, basierend auf der klassischen Einteilung, in der allosterischen Tasche nahe der α C Helix binden und durch ihre Stabilisierung der inaktiven α C-out Konformation im Assay detektiert werden sollen. Acrylodan (6-Acryloyl-2-dimethylaminonaphthalen) ist ein relativ kleines Fluorophor mit ausgeprägtem Solvatochromismus und Stokes-Verschiebung, d.h. ändert sich die Polarität des den Fluorophor umgebenden Lösemittels verschiebt sich die Wellenlänge des emittierten Lichts zu höheren Wellenlängen (bathochrome Verschiebung oder Rotverschiebung).

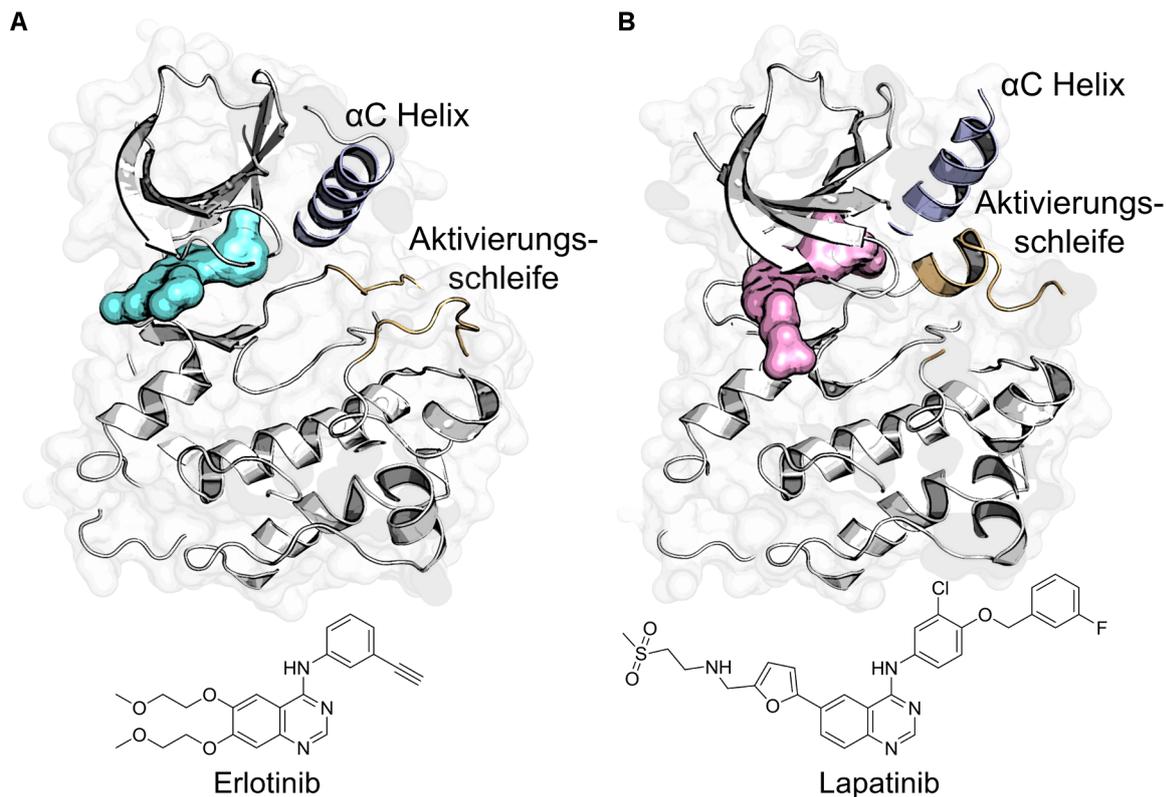


Abbildung 7. (A) EGFR im Komplex mit Erlotinib (Cyan) in der aktiven Konformation (α C Helix in der α C-in Konformation). (B) EGFR in der inaktiven Konformation im Komplex mit Lapatinib (Rosa) (α C Helix in der α C-out Konformation). Hervorgehoben sind die charakteristische kurze helikale Struktur in der inaktiven Konformation der Aktivierungsschleife (Braun) sowie die nach außen orientierte α C Helix (Dunkelblau) (PDB-codes: 1M17 und 1XKK).

Das Einbringen von Acrylodan in einen Bereich der Kinase, der wie die Aktivierungsschleife einer strukturellen Plastizität unterliegt, erlaubt es durch die Änderungen im Fluoreszenzemissionsspektrum direkt die Bindung eines Liganden zu detektieren, der eine bestimmte Konformationsänderung induziert oder stabilisiert. Kristallstrukturen von EGFR in der Apoform oder im Komplex mit ATP zeigen die Kinase in der aktiven Konformation mit ungeordneter Aktivierungsschleife. Es ist daher anzunehmen, dass die frei in Lösung existierende aktive Konformation der isolierten Kinasedomäne den Grundzustand repräsentiert, mit einer entfalteten Aktivierungsschleife und der α C Helix in der α C-in

Konformation. In diesem Zustand bindet Lapatinib an EGFR und induziert die Konformationsänderung der α C Helix sowie der Aktivierungsschleife, in der sich nun das helikale Segment formt und die chemische Mikroumgebung um Acrylodan sowie dessen Fluoreszenzemissionsspektrum verändert (Abbildung 8). Damit bietet der Assay die Möglichkeit gezielt nach Liganden bzw. Inhibitoren zu suchen, die die inaktive Konformation stabilisieren.

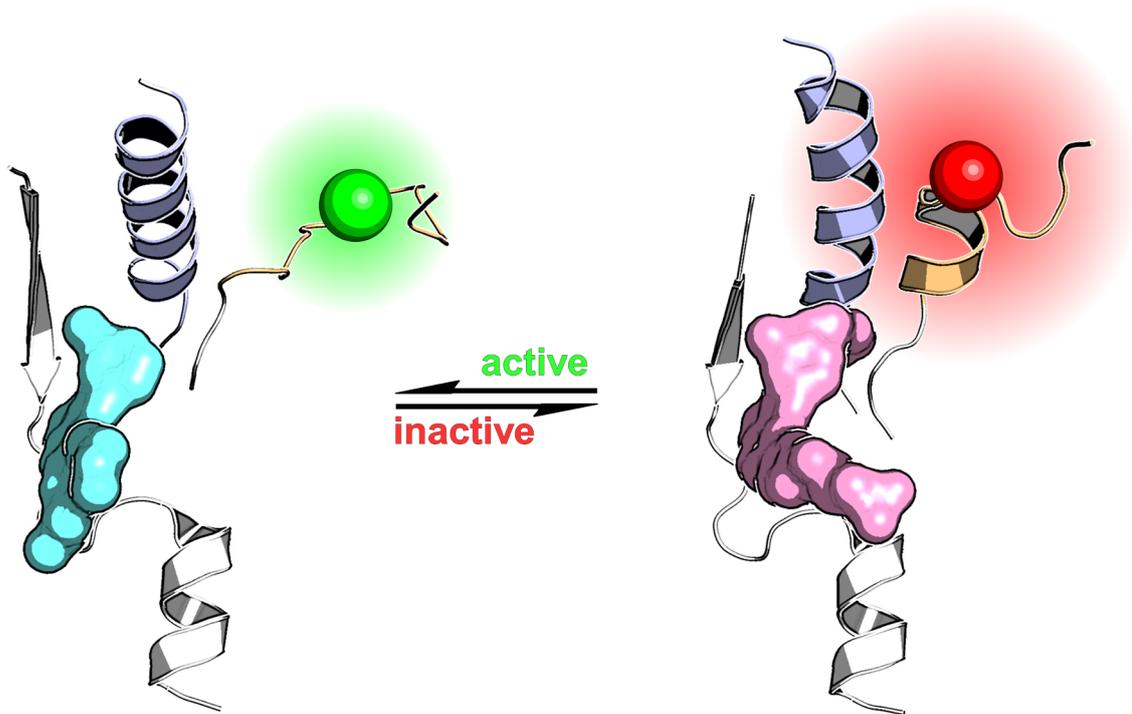


Abbildung 8. Schematische Darstellung des Assay Prinzips. Die Bindung eines Liganden induziert den Übergang von der aktiven Konformation (links) in die inaktive Konformation (rechts). Bei diesem Übergang findet eine Rotverschiebung (bathochrome Verschiebung) der Fluoreszenzemission statt, die wiederum als charakteristisches Signal detektiert werden kann.

Die in der Literatur bekannten und umfassend charakterisierten Inhibitoren Dasatinib, Gefitinib, und Lapatinib wurden als Referenzverbindungen zur Etablierung des Assays gewählt. Dasatinib ist ein typischer Typ I Kinaseinhibitor, welcher ursprünglich für Tyrosinkinasen der Src-Family entwickelt wurde und ein vergleichsweise weites Inhibitionsspektrum gegen weitere Tyrosinkinasen besitzt, u.a. auch gegen EGFR mit einer mittleren nanomolaren Dissoziationskonstante (K_d) von 120 nM.^[139,140] Gefitinib und Lapatinib wurden als EGFR-Inhibitoren entwickelt und haben niedrig nanomolare K_d -Werte von 1 nM bzw. 2.4 nM.^[69,139-142] Beide Inhibitoren werden ebenfalls als Typ I Inhibitoren klassifiziert, wobei beide in der ATP-Bindetasche binden, aber unterschiedliche Konformationen stabilisieren. Gefitinib stabilisiert die aktive Konformation analog zu Dasatinib, wohingegen Lapatinib die inaktive Konformation stabilisiert. In den folgenden Kapiteln werden die weiteren Schritte zur heterologen Expression und Reinigung der Konstrukte sowie deren

weiteren Verwendung in der Etablierung des Assays beispielhaft am DFG+2-Konstrukt dargestellt.

3.2 Expression in Insektenzellen (Exkurs)

Die verwendeten EGFR-FLiK-Konstrukte und alle weiteren in dieser Arbeit beschriebenen Konstrukte, wurden in Insektenzellen nach dem *baculovirus expression vector system* (BEVS) exprimiert. Bei diesem System werden Zellen aus dem Ovarium von *Spodoptera frugiperda*, einer Mottenart heimisch in Teilen Nord- und Südamerikas, als Wirtsorganismus genutzt und mit genetisch modifizierten Baculoviren der Art *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (*AcNPV*) infiziert. Dazu wird aus dem Virusgenom das Gen eines Proteins der Virushülle entfernt und durch die Sequenz des gewünschten Zielproteins (*protein of interest*, POI) ersetzt. Der *AcNPV* bildet sog. *occlusion bodies* als robuste Überdauerungsform, um außerhalb des Wirtsorganismus zu überleben. Innerhalb dieser *occlusion bodies* befinden sich mehrere einzelne Baculoviren eingebettet in das Hüllprotein Polyhedrin. Zum Ende des natürlichen Lebenszyklus des Virus produziert eine infizierte Zelle große Mengen Polyhedrin. Die genetisch modifizierten Baculoviren, mit dem Gen des POI anstelle des Polyhedrin, produzieren nun nicht mehr das Virushüllprotein sondern große Mengen des gewünschten POI.^[143-145] Mittlerweile sind verschiedene Methoden literaturbekannt und auch kommerziell verfügbar, die unter dem BEVS-Begriff eingeordnet werden, beispielsweise das *bac-to-bac* System (Invitrogen) oder die in dieser Arbeit verwendeten Systeme *BacMagic* (Novagen, Millipore) und *flashBac* (Oxford Technologies). Die hier beschriebenen FLiK-Konstrukte wurden nach einem modifizierten *BacMagic* Protokoll exprimiert. Diese Methode beruht auf dem Austausch der genetischen Information, die auf einem Transfervektor codiert ist, mit dem Bacmid durch homologe Rekombination innerhalb der Insektenzelle. Das Bacmid trägt das Virusgenom und enthält eine BAC-Sequenz (*bacterial artificial chromosome*), die die Kultivierung und Vervielfältigung des Bacmids in *E. coli* ermöglicht. Eine Besonderheit dieser Methode ist die Verwendung eines verkürzten Teils des ORF-1629 (*open reading frame*), der für die Entwicklung des Virus essentiell ist. Der Transfervektor codiert neben dem Gen des POI auch den zum Bacmid komplementären Teil des ORF-1629 und wird von den Bereichen der homologen Rekombination flankiert. Im nächsten Schritt folgt die Transfektion der Zelle mit Hilfe eines Transfektionsreagenz. Dieses besteht aus einer Mischung von Lipiden oder Polymeren, die Vesikel um die zu transfizierende DNA bilden und von der Insektenzelle aufgenommen werden können. Tritt ein mit Bacmid-DNA und Transfervektor beladenes

Vesikel mit der Zellmembran in Kontakt wird dessen Fracht ins Cytosol freigesetzt und zelleigene Mechanismen unterstützen die homologe Rekombination und den Genaustausch zwischen Bacmid und Transfervektor. Aufgrund der Konstruktion des Transfervektors, ist die Virusproduktion ohne das Zielgen praktisch ausgeschlossen. Dadurch werden weitere Selektionsschritte überflüssig, die in anderen BEVS-Systemen notwendig sind um positive von falsch positiven Baculoviren zu selektieren. Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist die Prozessierung des Transfervektors in *E. coli*, so kann das Konstrukt auf einfache Weise modifiziert und vervielfältigt werden. Als Besonderheit wurden die FLiK-Konstrukte in dieser Arbeit als Fusionsproteine mit dem grün fluoreszierenden Protein (eGFP) konzipiert. Das eGFP kann als Löslichkeitsvermittelnde Domäne bei der Expression des POI dienen und darüber hinaus kann über die Fluoreszenz eine einfache visuelle Überprüfung der Transfektion und Proteinexpression erfolgen. Wenn die homologe Rekombination in der Zelle erfolgreich war und der Virus die Funktionen der Zelle übernommen hat, produziert die Zelle neue Viruspartikel und das POI. Am Ende des Zyklus autolytisch die Zelle und setzt die Viruspartikel in das umgebende Medium frei. Das Medium wird von Zellresten befreit und für weitere Virusamplifikationen oder Proteinexpressionen eingesetzt. Die Konzentration an Viruspartikeln ist nach der ersten Transfektion zu gering für eine robuste Proteinexpression im präparativen Maßstab, daher werden je nach Protokoll noch weitere Virusamplifikationen nachgeschaltet. Bei der Expression in Insektenzellen können generell zwei Herangehensweisen betrachtet und diskutiert werden. Entweder die Konzentration an infektiösen Viruspartikeln (Virustiter) wird titriert und das optimale Verhältnis von Virus zu Zellen (*multiplicator of infection*, MOI) für die Expression eingestellt oder der Virus wird im Überschuss zu den Zellen gegeben, sodass statistisch jede Zelle infiziert wird. Zur Bestimmung des MOI werden sogenannte Plaque Assays oder Antikörper-basierte Assays verwendet, beide sind verhältnismäßig aufwändig durchzuführen oder kostenintensiv. Im Gegensatz zu den vorher genannten Methoden kann über die eGFP-Fluoreszenz ebenfalls der Virustiter bestimmt werden. Hierzu wird bei einer konstanten Zellzahl und einer Verdünnungsreihe an Virus getestet, ab welcher Viruskonzentration eGFP-Fluoreszenz in den Zellen sichtbar ist.^[146] Zu Beginn der Arbeiten mit dem BEVS wurden die Virustiter der einzelnen Konstrukte über die Verdünnungsmethode ermittelt, dieses wurde aber im Laufe der Zeit nicht weiter verfolgt und die Virustiter wurde fortan abgeschätzt. Da der Virustiter während der Lagerung kontinuierlich abnimmt und auch die Infektiosität der Viren sinkt, muss der Virustiter vor jeder Expression neu bestimmt werden. Aus vorherigen Arbeiten und aus den Erfahrungen anderer Anwender (*Dortmund Protein Facility*) wurde klar, dass der MOI nur bedingt Einfluss auf die Effektivität der Expression hat und ein genereller Überschuss an Virus zu einer robusteren Expression führt. Der Virus wurde insgesamt dreimal amplifiziert (P3-Virus), mit

einem finalen Virustiter von über 10^8 Viruspartikeln pro mL Medium. Für die Expression wurde ein Verhältnis von 30 mL Kultur mit 3×10^6 Zellen/mL zu 1 mL P3-Virussuspension eingestellt, was erfahrungsgemäß einem MOI von etwa 10 entspricht, d.h. einer Zelle stehen 10 Viren gegenüber. Ein weiterer Faktor für den Erfolg der Expression in Insektenzellen ist die Inkubationszeit oder auch *time of harvest* (TOH). Dieses Expressionssystem erlaubt die Verwendung verschiedener Promotoren, die in verschiedenen Phasen des Lebenszyklus der Viren aktiv sind. Es werden frühe, späte und sehr späte Promotoren unterschieden, abhängig davon welcher Promoter die Expression des POI kontrolliert kann die TOH unterschiedlich ausfallen und ebenfalls abhängig von der Stabilität des POI bzw. abhängig vom Verhalten des POI in der Zelle (evtl. toxische Eigenschaften, Degradation, o.ä.). Da für die Expressionskontrolle ein sehr später Polyhedrin-Promotor genutzt wurde, lies sich die optimale TOH auf etwa 48 h bis maximal 96 h eingrenzen.^[143-145] Da es sich bei dem BEVS in *S. frugiperda* um ein eukaryotisches Expressionssystem handelt bietet dieses Vorteile gegenüber prokaryotischen Systemen wie *E. coli*. Proteine aus höheren Organismen, wie z.B. humanes EGFR, sind durch die prokaryotische Expressionsmaschinerie oft nicht zugänglich. Die Verwendung des BEVS stellt einen guten Kompromiss dar, zwischen vergleichsweise einfacher Handhabung und effizienter Expression in einem eukaryotischen System.

3.3 Isolierung und Markierung der FLiK-Konstrukte

Die EGFR-FLiK-Konstrukte waren N-terminal mit eGFP fusioniert, sowie zur erleichterten Isolierung aus dem Zellysate mit einem Hexahistidin-Affinitätstag versehen, der sich wiederum am N-Terminus von eGFP befand (His₆-eGFP-EGFR). Die einzelnen Schritte zur Isolierung und Reinigung des POI aus den Insektenzellen waren eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie gefolgt von einer Anionenaustauschchromatographie, der Abspaltung des His₆-eGFP, einer erneuten Ni²⁺-Affinitätschromatographie und einer Größenausschlusschromatographie an einem *fast protein liquid chromatography* (FPLC) System. Da sich die FLiK-Konstrukte bei der Reinigung gleich verhielten, wird im Folgenden beispielhaft die Isolierung des DFG+2-Konstrukts besprochen, gefolgt von der Markierung mit Acrylodan. Details zu Methoden, Pufferzusammensetzungen, usw. sind im Methodenteil aufgeführt.

3.3.1 Reinigung von EGFR-FLiK

Im ersten Schritt zur Reinigung der EGFR-FLiK-Konstrukte wurde eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie durchgeführt. Ein typisches Chromatogramm mit dem dazugehörigen Gel der SDS-Page ist in Abbildung 9 gezeigt. Die Konstrukte eluieren schon bei geringen Imidazolkonzentrationen (ca. 25 mM) und enthalten noch einige Verunreinigungen durch weitere Proteine. Durch die Wahl eines geeigneten Gradienten und Fraktionierung konnte in diesem Schritt aber bereits ein guter Reinigungsgrad erreicht werden.

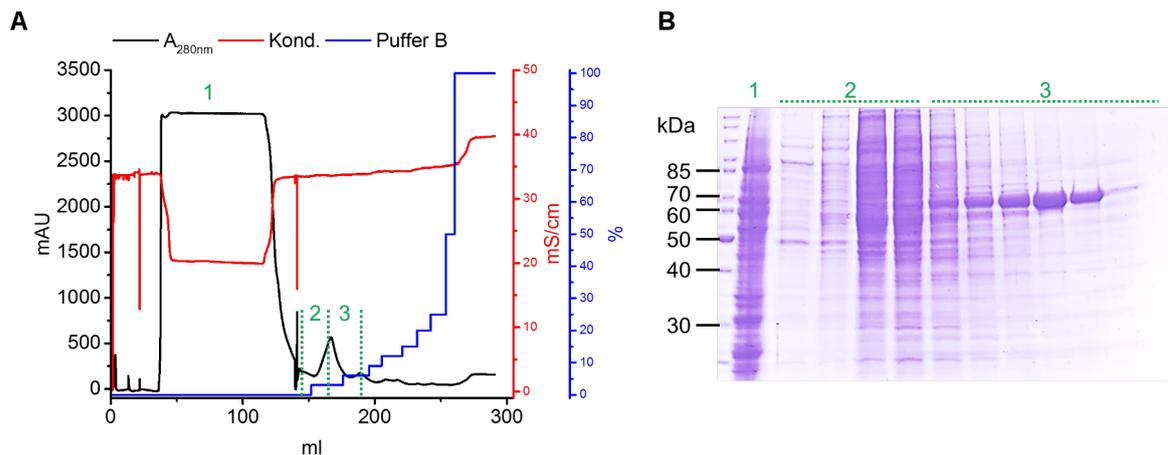


Abbildung 9. (A) Chromatogramm der Ni²⁺-Affinitätschromatographie des DFG+2 EGFR-FLiK-Konstrukts (MW 66 kDa). Schwarz: UV-Absorption bei 280 nm; Rot: Konduktivität; Blau: Anteil Elutionspuffer (500 mM Imidazol). (B) SDS-Page ausgewählter Fraktionen aus Chromatogramm (A). Aufgetragen wurde eine Probe aus dem Durchfluss der Säule (1), sowie verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks (2) und (3).

Im Anschluss an die Affinitätschromatographie konnte über eine Anionenaustauschchromatographie ein weiterer Reinigungserfolg erzielt werden. Ein beispielhaftes Chromatogramm und ein Gel der SDS-PAGE sind in Abbildung 10 zu sehen. Das His₆-eGFP-EGFR (MW 66 kDa) konnte durch einen flachen Gradienten an Elutionspuffer zunächst weiter von unerwünschten Verunreinigungen befreit werden. Durch eine folgende stufenweise Erhöhung der Konzentration an Natriumchlorid wurde das Zielprotein dann schlagartig und konzentriert von der Säule eluiert (Peak 4) um die folgenden Handgriffe und Reinigungsschritte durch ein geringeres Volumen an Proteinlösung zu erleichtern. Zu erkennen ist, dass das Zielprotein bereits mit einigen Verunreinigungen in Peak (3) eluiert, möglicherweise bedingt eine unspezifische Bindung der restlichen Proteine an das Zielprotein eine frühere Elution. In Peak (5) konnten im Gel, trotz eines verhältnismäßig intensiven UV-Signals, keine Banden identifiziert werden.

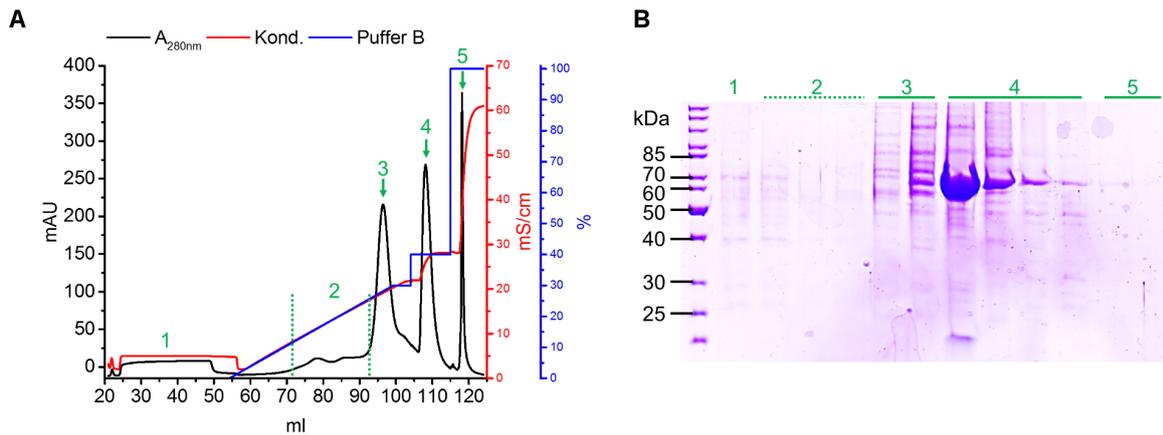


Abbildung 10. (A) Anionenaustauschchromatographie der Eluate der Ni^{2+} -Säule. Schwarz: UV-Absorption bei 280 nm; Rot: Konduktivität; Blau: Anteil Elutionspuffer (1 M Natriumchlorid). **(B)** Analyse der Fraktionen mittels SDS-Page und Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurde eine Probe des Säulendurchfluss (1), sowie Proben aus verschiedenen Zeitpunkten der Elution (2) bis (5). In Peak (4) ist eine intensive Bande bei einem Molekulargewicht von 66 kDa zu erkennen die dem EGFR-Konstrukt entspricht.

Im Anschluss der Anionenaustauschchromatographie wurden alle His₆-eGFP-EGFR enthaltenden Fraktionen vereinigt und zur Abspaltung des His₆-eGFP mit HRV-3C Protease (*PreScission* Protease) inkubiert. Die Abspaltung des His₆-eGFP wurde aus zwei Gründen erst nach dem Anionentauscher durchgeführt. Zum einen erleichtert die eGFP-Fluoreszenz die Verfolgung des Proteins während der Reinigung. Zum anderen stabilisiert die eGFP-Fusion das Konstrukt und steigert dessen Löslichkeit, sodass während der Dialyse gegen einen Puffer mit niedriger Ionenstärke kein oder nur wenig Präzipitat entsteht. Allerdings konnte nicht verhindert werden, dass nach der Abspaltung des His₆-eGFP ein Teil des ungespaltenen Proteins präzipitierte und auch ein großer Teil des gespaltenen EGFR ebenfalls im Präzipitat zu finden war (Abbildung 11 B). Vermutlich liegt ein Teil des His₆-eGFP-EGFR nach der Expression in den Insektenzellen zum Teil nicht korrekt gefaltet vor und wird durch die eGFP-Fusion in Lösung gehalten. Wird das eGFP abgespalten geht dieser Effekt verloren und EGFR präzipitiert. Möglicherweise ist die Fehlfaltung ebenfalls die Ursache für die unvollständige Spaltung, da die Interaktion der Protease mit ihrer Erkennungssequenz gehindert sein könnte. Um nach der Spaltung freies His₆-eGFP sowie ungespaltenes His₆-eGFP-EGFR von freiem EGFR abzutrennen wurde eine weitere Ni^{2+} -Säule verwendet (Abbildung 11). Das freie EGFR befand sich nun zusammen mit der Protease im Durchfluss der Ni^{2+} -Säule, wie im zugehörigen Gel zu erkennen ist. Im Elutionspeak der Säule befand sich hingegen nur noch das freie His₆-eGFP sowie ungespaltenes Fusionsprotein.

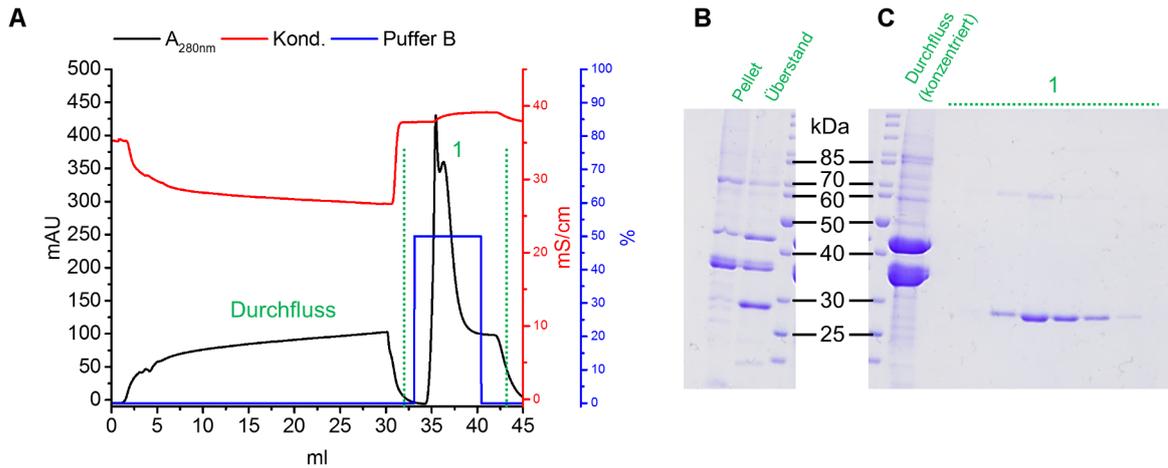


Abbildung 11. (A) Chromatogramm der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie nach Abspaltung des His₆-eGFP. Schwarz: UV-Absorption bei 280 nm; Rot: Konduktivität; Blau: Anteil Elutionspuffer (500 mM Imidazol). Molekulargewichte: His₆-eGFP-EGFR: 66 kDa, His₆-eGFP: 30 kDa, EGFR: 36 kDa, HRV-3C Protease: 45 kDa. (B) Während der Abspaltung des His₆-eGFP wurde ein weißes Präzipitat beobachtet. Eine Probe des Präzipitats nach der Zentrifugation (Pellet) sowie eine Probe des Überstandes wurden mittels SDS-Page analysiert. (C) SDS-Page Analyse des Chromatogramms aus (A). Auf dem Gel ist eine Probe des konzentrierten Durchflusses der Ni^{2+} -Säule mit dem gespaltenen EGFR zu sehen sowie Proben der Eluatfraktionen (1).

Im finalen Reinigungsschritt und zum Abtrennen der Protease wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (Abbildung 12). Es wurden zwei Peaks beobachtet, wobei der erste die Protease (ca. 45 kDa) enthielt sowie einige höher molekulare Verunreinigungen. Der zweite Peak enthielt das gewünschte EGFR-Konstrukt in hoher Reinheit (ca. 36 kDa). Die EGFR-enhaltenen Fraktionen wurden vereinigt, mittels einer Zentrifugenfiltereinheit eingengt und sofort für die Markierung mit Acrylodan eingesetzt.

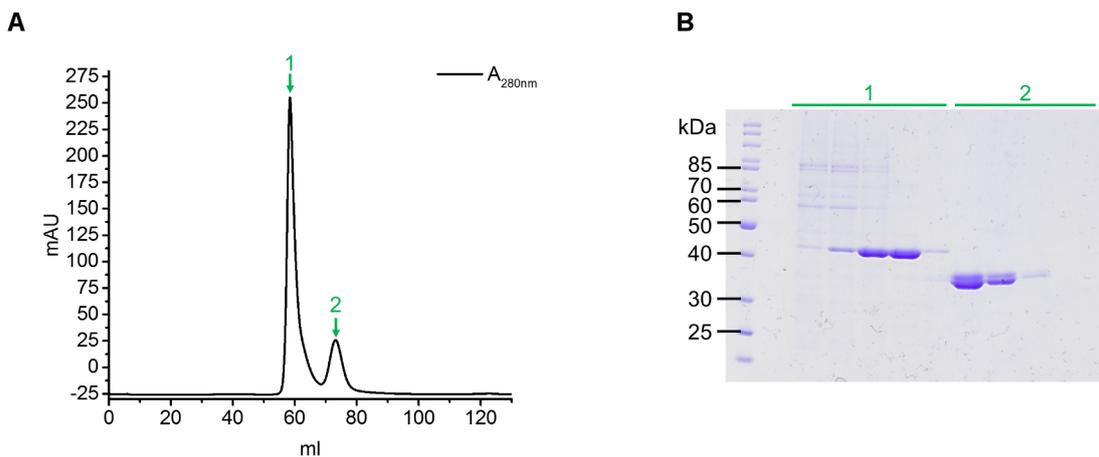


Abbildung 12. (A) Größenausschlusschromatographie des Durchflusses der Anionenaustauschchromatographie. (B) SDS-Page einiger Fraktionen aus den Peaks (1) und (2). Molekulargewicht der Protease 45 kDa und EGFR 36 kDa.

3.3.2 Markierung mit Acrylodan

Für den FLiK-Assay wurden die DFG+2 und DFG+5-Konstrukte mit Acrylodan (6-Acryloyl-2-dimethylaminonaphthalen) markiert (DFG+2ac und DFG+5ac). Aus der Literatur sind einige Fluorophore bekannt, die sich tendenziell für den Einsatz im FLiK-Assay eignen würden. Die Wahl fiel auf Acrylodan, da dieses aus vorherigen Arbeiten und aufgrund der besonders ausgeprägten Solvatochromie und Stokes-Verschiebung als eines der effektivsten Fluorophore bekannt ist.^[70,132,134,135,137] Das verwendete Acrylodanderivat trug zur Modifikation von Cysteinseitenketten einen thiolreaktiven Acrylamid-Michaelakzeptor. Da alle Cysteine aus dem Protein entfernt wurden, die dem Lösemittel direkt zugänglich waren, war eine mehrfache Markierung mit Acrylodan nicht zu erwarten. Nichts desto trotz wurde nur ein 1.5-facher molarer Überschuss an Fluorophor für die Markierung verwendet und nicht abreagiertes Acrylodan nach Ende der Inkubationszeit mit Dithiothreitol (DTT) abgefangen sowie durch Umpufferung entfernt. Überprüft wurde die Markierungsreaktion mittels LC-MS (Abbildung 13). Für das DFG+2-Konstrukt wurde nur eine Spezies im Massenspektrum gefunden, die der Proteinmasse plus Acrylodan entspricht (berechnete Masse 36443 Da, gefunden 36448 Da). Dies entspricht einer einfachen und vollständigen Markierung des DFG+2-Konstrukts mit Acrylodan. Bei dem DFG+5-Konstrukt konnten zwei Spezies identifiziert werden, das unmarkierte Protein (berechnete Masse 36176 Da, gefundene Masse 36178 Da) und das einfach mit Acrylodan markierte Protein (berechnete Masse 36401 Da, gefundene Masse 36404 Da) mit einer Ausbeute von ca. 60 %. Womöglich ist das DFG+5-Konstrukt unter den Bedingungen instabil oder eine teilweise Fehlfaltung des Proteins verhindert eine effektivere Reaktion mit Acrylodan.

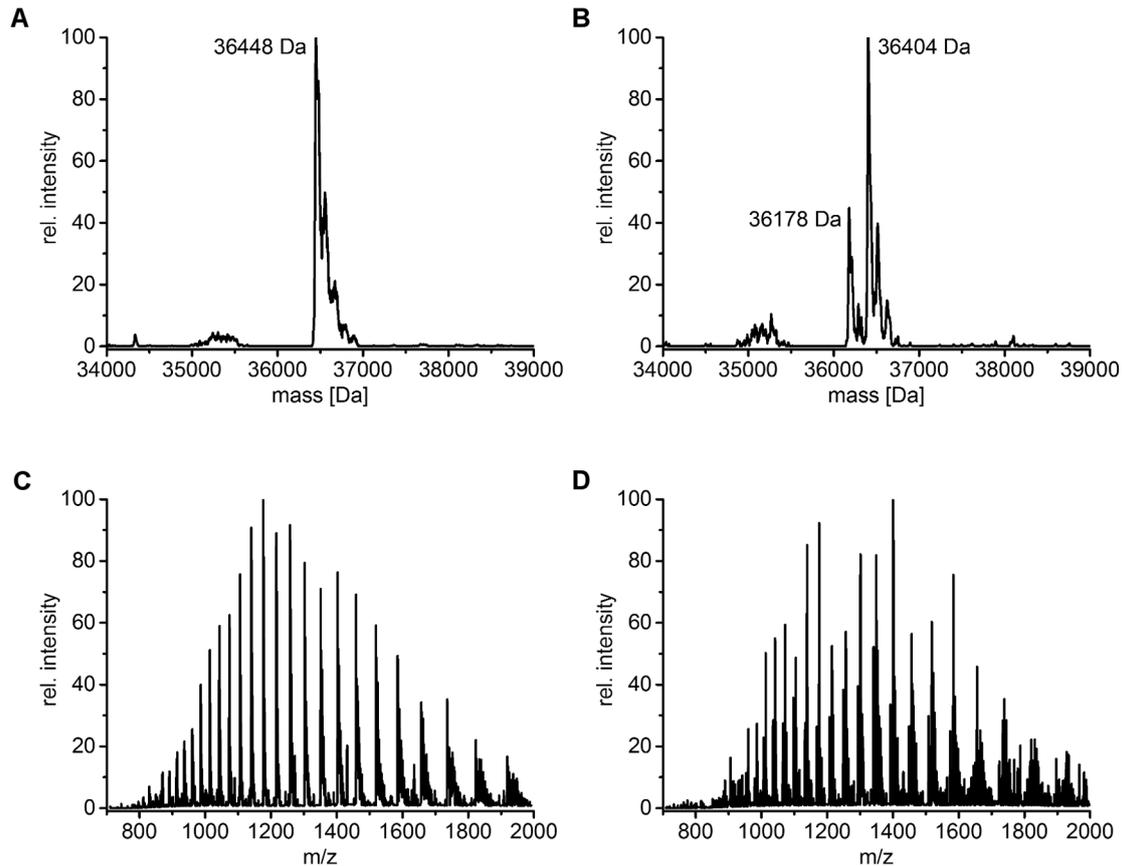


Abbildung 13. LC-MS Analyse der Markierungsreaktion mit Acrylodan (225 Da). **(A)** Eine einfache Modifikation des DFG+2-Konstrukts mit Acrylodan (berechnete Masse 36443 Da, gefunden 36448 Da) konnte bestätigt werden. Des Weiteren konnte kein unmodifiziertes DFG+2 detektiert (erwartete Masse 36218 Da) werden. **(B)** Die Markierung des DFG+5-Konstrukts mit Acrylodan verlief unvollständig. Die Reaktionslösung enthielt einfach markiertes DFG+5 (berechnete Masse 36176 Da, gefundene Masse 36178 Da) und unmodifiziertes DFG+5 (berechnete Masse 36401 Da, gefundene Masse 36404 Da). Die korrespondierenden Verteilungen von Ladung/Masse sind in **(C)** für DFG+2 und **(D)** für DFG+5 abgebildet.

Um zu überprüfen ob die eingebrachten Mutationen oder die Markierung mit Acrylodan die Struktur oder Funktion der Kinase negativ beeinflussen, wurde die Kinaseaktivität sowie der K_m -Wert für ATP und ein Substratpeptid bestimmt und mit einem unveränderten Wildtyp-Konstrukt verglichen (Abbildung 14, das Wildtyp-Protein stammte aus dem Bestand der AG-Rauh). Alle getesteten Konstrukte zeigen enzymatische Aktivität und die gemessenen Werte für den ATP- K_m und den Substrat- K_m liegen in der gleichen Größenordnung. Generell liegt die Aktivität des Wildtyps und des DFG+2-Konstrukts, mit und ohne Acrylodan, in einem ähnlichen Bereich. Das DFG+5-Konstrukt scheint hingegen geringfügig weniger aktiv. Da die Mutationsmuster bei den FLiK-Konstrukten identisch sind, ist der Unterschied in der Aktivität des DFG+5 vermutlich auf den Einfluss der Cysteinsubstitution (L862C) zur Acrylodanmarkierung zurückzuführen.

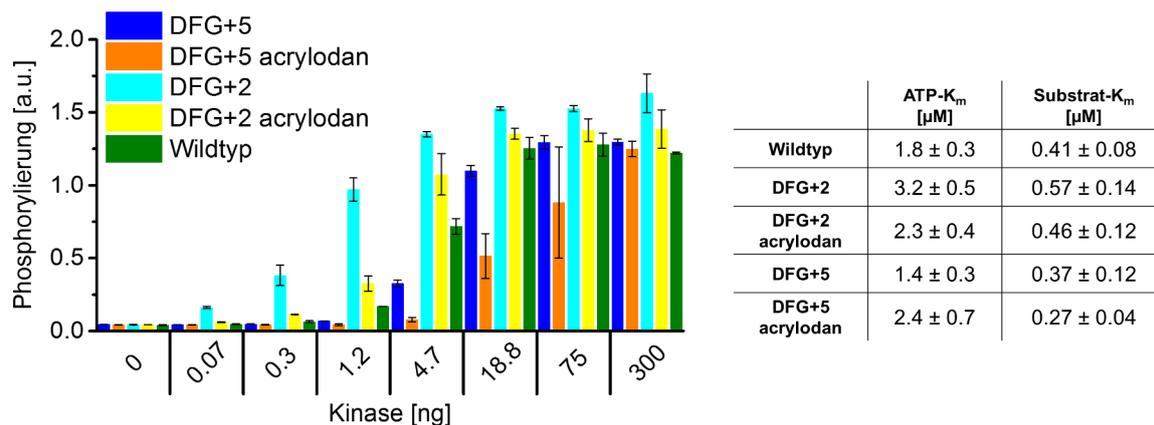


Abbildung 14. Messung der Kinaseaktivität der EGFR-FLiK-Konstrukte DFG+2 und DFG+5, mit und ohne Acrylodanmarkierung, sowie des Wildtyp-Konstrukts als Referenz. Die Kinaseaktivität wurde basierend auf der Phosphorylierung eines artifiziellen Substratpeptids mit dem Cisbio *kinEASE HTRF* Assay bestimmt.

Da nur minimale Unterschiede in den K_m -Werten zu beobachten waren und die Kinase enzymatische Aktivität besitzt konnte davon auszugehen werden, dass die Auswirkungen der Acrylodanmarkierung oder des Mutationsmusters auf die Funktion der Kinase zu vernachlässigen waren. Zusätzlich wurde noch die inhibitorische Aktivität (IC_{50}) der Referenzinhibitoren getestet (Tabelle 1). Der direkte Vergleich von IC_{50} -Werten aus verschiedenen Quellen oder Assay-Systemen ist im Falle von EGFR nur bedingt möglich, da die enzymatische Aktivität vom verwendeten Konstrukt abhängig sein kann. So hat das Juxtamembransegment eine aktivierende Wirkung auf die isolierte Kinasedomäne. Ohne es ist die Kinase enzymatisch weniger aktiv, was sich wiederum auf enzymatische Parameter und den IC_{50} eines Inhibitors auswirken kann.^[44] Generell sind alle getesteten Inhibitoren aktiv und zeigen einen ähnlichen Trend. Die IC_{50} -Werte des Wildtyps, des unmarkierten und des markierten DFG+2-Konstrukts liegen in der gleichen Größenordnung, die des DFG+5-Konstrukts fallen dagegen höher aus.

Tabelle 1. IC_{50} -Werte der Referenzinhibitoren in den verwendeten EGFR-FLiK-Konstrukten und dem Wildtyp-Konstrukt.

	IC_{50} [nM]		
	Gefitinib	Lapatinib	Dasatinib
Wildtyp	81 \pm 21	5.5 \pm 2.1	199 \pm 59
DFG+2	6.0 \pm 1.4	5.5 \pm 2.1	47 \pm 4
DFG+2 acrylodan	42 \pm 38	6.5 \pm 0.7	3200 \pm 1700
DFG+5	543 \pm 544	11 \pm 7	3200 \pm 141
DFG+5 acrylodan	82 \pm 23	35 \pm 4	3700 \pm 4600

3.3.3 Bestimmung von Dissoziationskonstanten

Im Vergleich zu indirekten Assay-Systemen in denen beispielsweise der enzymatische Umsatz eines Substrats in Gegenwart eines Inhibitors beobachtet wird, wird im FLiK-Assay direkt die Bindung eines Liganden als Fluoreszenzsignal beobachtet. Dies erlaubt die Bestimmung von Dissoziationskonstanten (K_d) sowie von kinetischen Assoziations- und Dissoziationsraten (k_{on} und k_{off}). Das Absorptionsmaximum von Acrylodan (ca. 390 nm) liegt in einem Bereich in dem *small molecules*, wie z.B. Kinaseinhibitoren, ebenfalls eine UV-Absorption zeigen können (300 nm bis 400 nm). Im Vorfeld zur K_d -Bestimmung wurden Absorptions- und Emissionsspektren von acrylodanmarkierten EGFR (DFG+2ac) und Lapatinib (positiv Kontrolle) aufgenommen um mögliche Interferenzen durch Lapatinib-Autofluoreszenz aufzuklären. In den Spektren (Abbildung 15) ist eine Überschneidung des Absorptions- und des Emissionsspektrums von Acrylodan und Lapatinib zu erkennen. Bei einer Anregung von Acrylodan bei dessen Absorptionsmaximum (389 nm) wird ebenfalls die Autofluoreszenz von Lapatinib angeregt, durch die Verschiebung der Anregungswellenlänge von 389 nm zu 420 nm konnte die Anregung der Autofluoreszenz von Lapatinib vermieden und dennoch eine starke Acrylodanfluoreszenz angeregt werden.

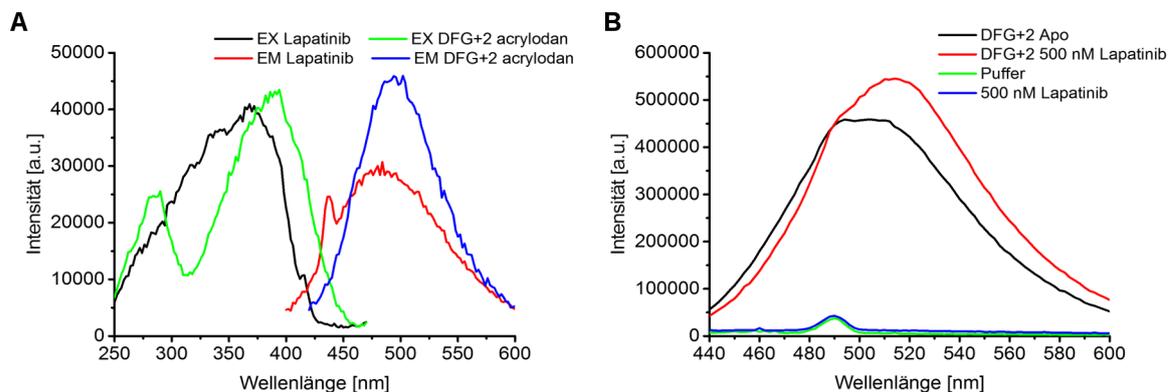


Abbildung 15. (A) Absorptions- (EX) und Emissionsspektren (EM) von Lapatinib und acrylodanmarkierten DFG+2. Deutlich zu erkennen ist, dass die Maxima im Absorptions- und im Emissionsspektrum überlagern. Bei einer Anregung von Acrylodan beim Maximum von 389 nm wird ebenfalls eine Autofluoreszenz von Lapatinib beobachtet welche den Assay stören könnte. **(B)** Durch die Verschiebung der Anregungswellenlänge von Acrylodan zu 420 nm kann die Autofluoreszenz von Lapatinib vermieden werden und trotzdem ein robustes Emissionsspektrum für Acrylodan beobachtet werden.

Um die durch die Bindung von Lapatinib hervorgerufene Verschiebung im Fluoreszenzspektrum des DFG+2ac und DFG+5ac-Konstrukts zu bestimmen, wurde zunächst in einer Küvette jeweils 50 nM einer Proteinlösung von acrylodanmarkierten DFG+2 bzw. DFG+5 vorgelegt, jeweils 100 nM Lapatinib zugegeben, 15 min inkubiert und ein Fluoreszenzspektrum gemessen (Abbildung 16). Beim DFG+5ac-Konstrukt ist nach Zugabe von Lapatinib lediglich eine relativ geringe Verschiebung im Emissionsspektrum mit einem schwachen Anstieg der Fluoreszenzintensität messbar. Das Maximum im Emissionsspektrum

des DFG+2ac-Konstrukts zeigt dagegen eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität und eine Verschiebung um ca. 14 nm zu längeren Wellenlängen.

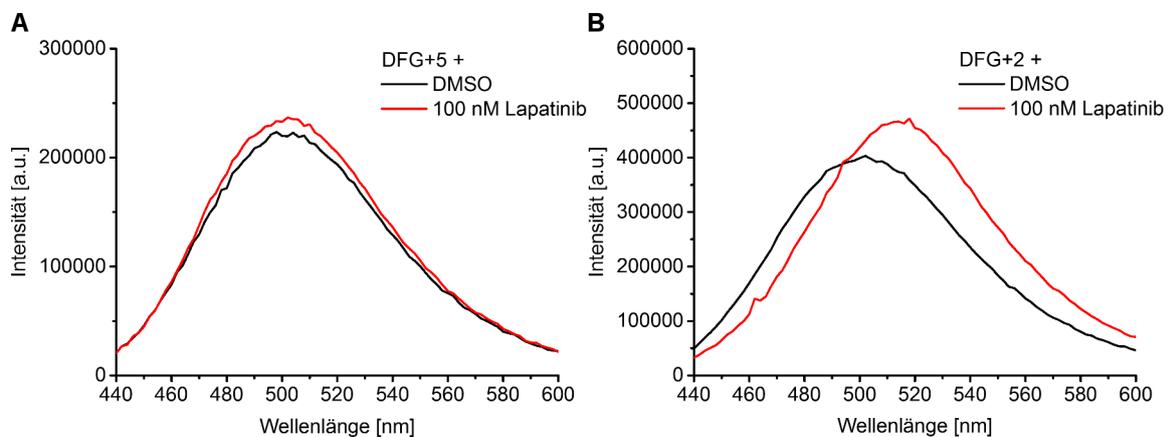


Abbildung 16. Änderungen im Fluoreszenzemissionsspektrum der acrylodanmarkierten Konstrukte DFG+5 (**A**) und DFG+2 (**B**) im Grundzustand mit DMSO (schwarz) und in Gegenwart von 100 nM Lapatinib (rot). Zu erkennen ist die bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximums von ca. 500 nm zu 514 nm im DFG+2-Konstrukt.

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in den Spektren zwischen den Markierungspositionen A859C und L862C könnten die Kristallstrukturen liefern (Abbildung 17). Die schwache Änderung im Fluoreszenzspektrum von DFG+5 ist auf eine ähnliche Umgebungspolarität in der aktiven und inaktiven Konformation zurückzuführen, da vermutlich die zuvor postulierte Interaktion mit der glycinreichen Schleife nicht soweit ausgeprägt war wie angenommen. Die Position A859C ist in der aktiven Konformation durch die gestreckte Aktivierungsschleife dem Lösemittel zugänglicher und wird in der inaktiven Konformation durch das helikale Segment vom Lösemittel stärker abgeschirmt.

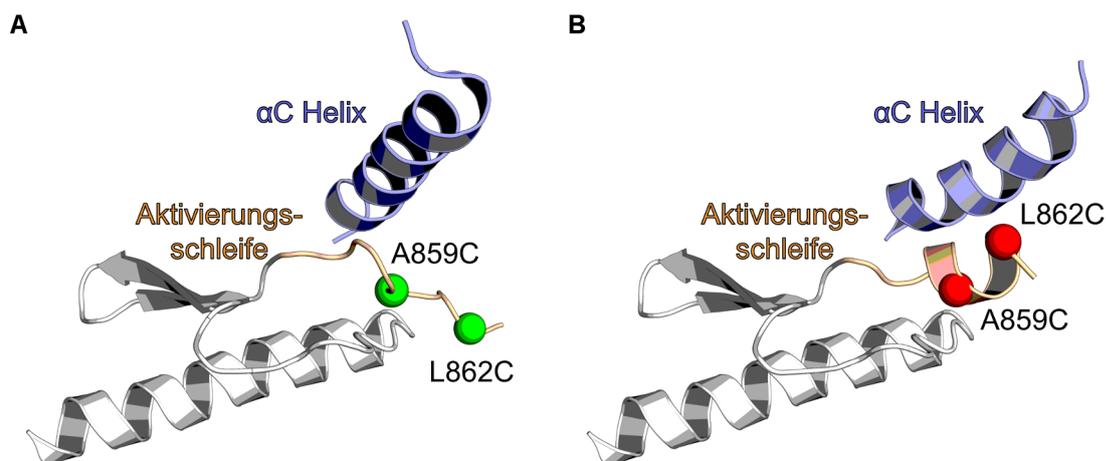


Abbildung 17. Schematische Darstellung der Positionen der Cysteinmutationen für die Einführung des Fluorophors in der aktiven Konformation (**A**) und der inaktiven Konformation (**B**). Mutation A859C entspricht dem DFG+2-Konstrukt, L862C entspricht dem DFG+5-Konstrukt. (Darstellung basiert auf den PDB-ID 1XKK und 1M14).

Zur Bestimmung von K_d -Werten wurden in Küvetten die Fluoreszenzspektren einer Konzentrationsreihe des jeweiligen Inhibitors in DFG+2ac und DFG+5ac vermessen. In Abbildung 19 sind Beispielspektren von DFG+2ac mit Dasatinib, Gefitinib und Lapatinib dargestellt. Bei Dasatinib und Gefitinib ist eine Abnahme der Fluoreszenzintensität ohne Verschiebung des Emissionsmaximums zu beobachten, was vermutlich auf die langsame Denaturierung des Proteins während der Messung, aufgrund der Durchmischung mittels Magnetrührer, zurückzuführen ist. Die Verwendung eines Magnetrührers war dennoch notwendig, um nach Zugabe der DMSO-Inhibitorlösung zur Proteinlösung eine homogene Verteilung der Komponenten zu gewährleisten. Die langsame Abnahme der Intensität ist auch bei Lapatinib zu beobachten, wird aber durch die bathochrome Verschiebung und steigende Intensität des Emissionsmaximums überlagert. Der Effekt der Proteindegradation während der Messung kann bei der Bestimmung des K_d durch die Bildung eines Quotienten zweier Wellenlängen berücksichtigt werden. Durch die Auftragung des Quotienten der Fluoreszenzintensität bei 514 nm und 464 nm ($I_{514\text{nm}}/I_{464\text{nm}}$) gegen die logarithmische Inhibitorkonzentration und anschließender Anpassung einer sigmoidalen Kurve kann aus deren Wendepunkt der K_d berechnet werden (Abbildung 19 D). Durch Dasatinib und Gefitinib wird keine Verschiebung im Emissionsspektrum hervorgerufen, daher bleibt der Quotient $I_{514\text{nm}}/I_{464\text{nm}}$ bei steigender Konzentration trotz abnehmender Intensität gleich. Bei Lapatinib ist hingegen ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Quotienten $I_{514\text{nm}}/I_{464\text{nm}}$ zu beobachten. Bei der vorher angesprochenen Auswertung konnte für Lapatinib ein K_d von 9.6 ± 2.3 nM berechnet werden, was sehr gut mit literaturbekannten Werten von 2.4 nM (ermittelt in einem biochemischen Verdrängungsassay)^[140] und 17 nM (bestimmt mittels SPR)^[147] übereinstimmt.

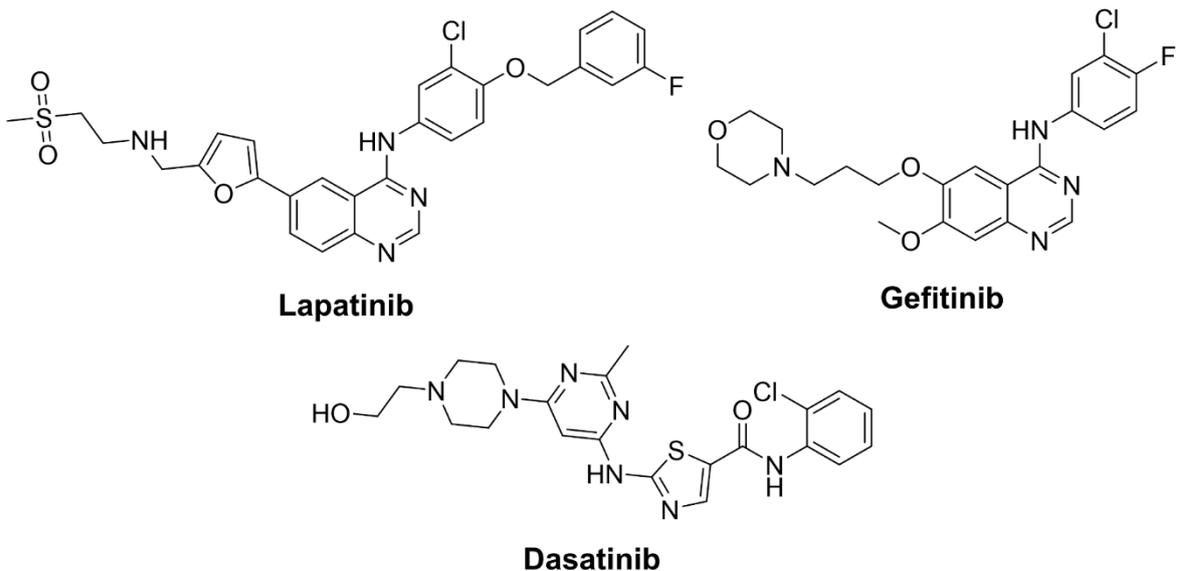


Abbildung 18. Chemische Struktur der verwendeten Referenzverbindungen.

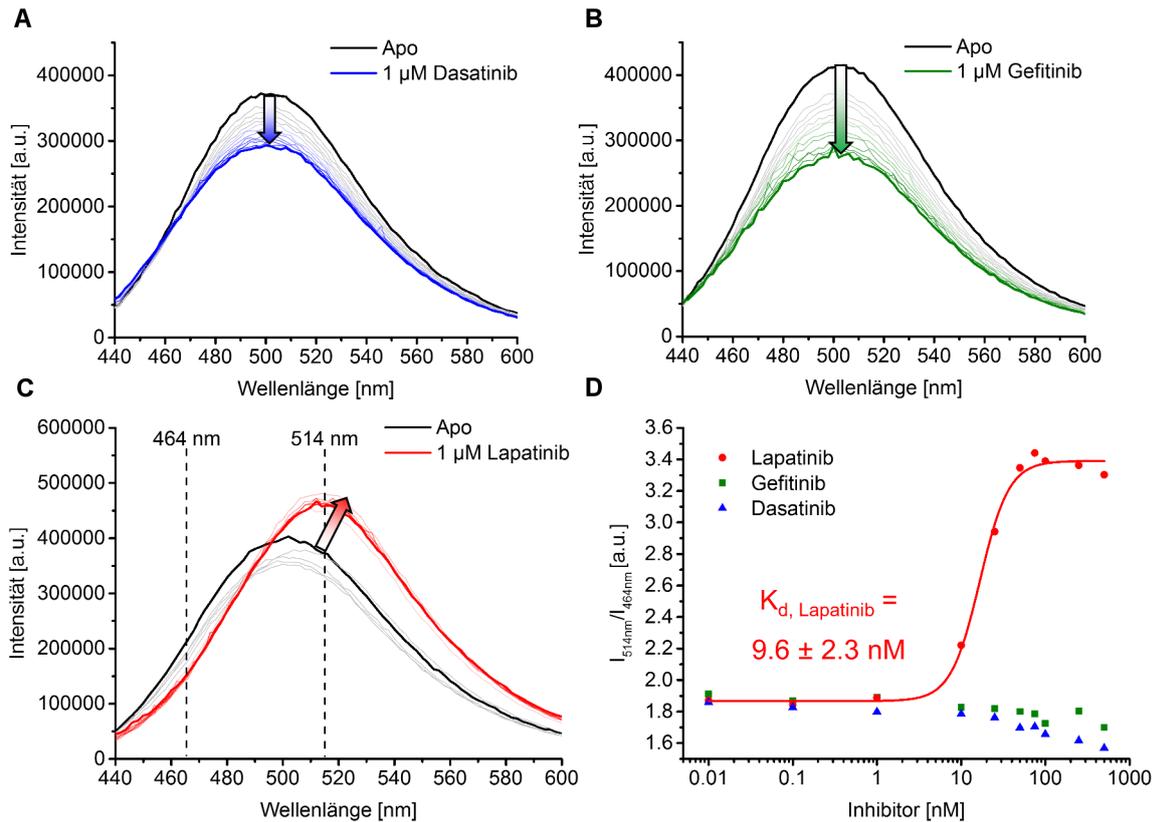
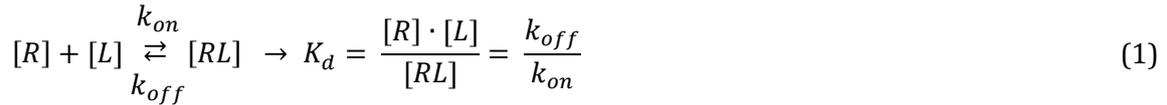


Abbildung 19. FLiK-Messung in Küvetten, Fluoreszenzspektren von 440 nm bis 600 nm bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen von 0 bis 1 µM. **(A)** Dasatinib **(B)** Gefitinib **(C)** Lapatinib. **(D)** Auftragung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensität $I_{514\text{nm}}/I_{464\text{nm}}$ gegen die logarithmische Inhibitorkonzentration. Durch Anpassen einer sigmoidalen Kurve kann aus deren Wendepunkt der K_d abgelesen werden. Nur Lapatinib zeigt einen sigmoidalen Verlauf. Gezeigt ist eine Beispielkurve, der K_d und die Standardabweichung wurden auf Basis drei unabhängiger Experimente bestimmt.

Wie in Abbildung 16 zu erkennen ist, ist die Änderung im Fluoreszenzspektrum des acrylodanmarkierten DFG+5-Konstrukts deutlich schwächer ausgeprägt als im DFG+2-Konstrukt. Nichts desto trotz ließ sich mit dem DFG+5-Konstrukt ebenfalls ein K_d -Wert von $22 \pm 4 \text{ nM}$ für Lapatinib ermitteln (Anhang, Abbildung 52). Dieser ist etwa doppelt so hoch wie der K_d im DFG+2-Konstrukt, liegt aber noch in der gleichen Größenordnung wie die genannten Literaturwerte ($2.4 \text{ nM}^{[140]}$ und $17 \text{ nM}^{[147]}$).

3.3.4 Bestimmung von Bindungskinetiken

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit des FLiK-Assay ist die Bestimmung der kinetischen Assoziations- und Dissoziationsrate k_{on} und k_{off} (Gleichung 1).



$[R]$: Rezeptorkonzentration $[L]$: Ligandkonzentration

Der k_{on} oder der k_{off} ist nicht direkt über die Messung der Fluoreszenzemission zugänglich. Über die Beobachtung der Änderung der Fluoreszenzintensität, über die Zeit bei steigender InhibitorKonzentration, kann allerdings die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit (k_{obs}) abgeleitet werden. Dazu wird eine Exponentialfunktion pseudo-erster Ordnung an den Fluoreszenzverlauf, unter Annahme eines Schlüssel-Schloss-Prinzips der Ligand-Rezeptor Interaktion, angepasst. Dies wurde mit dem Datenverarbeitungsprogramm *Origin 9.5* (*OriginLab*, Gleichung (2) und (3)) durchgeführt. Die so ermittelten k_{obs} -Werte wurden im Anschluss gegen die jeweilige Lapatinibkonzentration aufgetragen. Durch lineare Regression konnte aus der Steigung der Geradengleichung (3) dann der k_{on} und aus dem Schnittpunkt mit der Ordinatenachse der k_{off} abgelesen werden.

$$[RL]_t = [RL]_{eq} \cdot (1 - e^{-k_{obs} \cdot t}) \quad (2)$$

$$y(t) = y_0 + A \cdot e^{k_{obs} \cdot t} \quad (3)$$

$[RL]_t$: Konzentration des Rezeptor-Ligand Komplex zum Zeitpunkt t

$[RL]_{eq}$: Konzentration des Rezeptor-Ligand Komplex im Equilibrium

t: Zeit in Sekunden

y_0 : Offset

A: Amplitude

Auf diese Weise konnte ein k_{on} für Lapatinib von $0.77 \pm 0.12 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt werden. Aus der Literatur sind weitere k_{on} -Werte aus verschiedenen Quellen bzw. Assay-Systemen bekannt. Kitagawa et al.^[147] bestimmten mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) einen k_{on} von $0.098 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, Wood et al.^[69,130] bestimmten in einen biochemischen Assay einen k_{on} von $0.02 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und Shan et al.^[131] berechneten auf Grundlage von Molekulardynamik-Simulationen einen k_{on} von $3.1 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Die Berechnung aus Gleichung (1) ergab einen k_{off} von $7.5 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$, Literatur bekannte Werte liegen zwischen $1.2 \times 10^{-3} \text{s}^{-1}$ und $4 \times 10^{-5} \text{s}^{-1}$.^[69,147-149] Beim Vergleich der verschiedenen Werte für k_{on} und k_{off} aus den verschiedenen Quellen ist eine Streuung unvermeidbar. Alle Methoden beruhen auf verschiedenen Prinzipien und wurden zudem mit verschiedenen, artifiziellen EGFR-Konstrukten durchgeführt. Mittels SPR bestimmte Werte sind nur bedingt direkt mit Werten aus dem EGFR-FLiK oder aus MD-Simulationen vergleichbar. Die Frage welches der genannten Systeme liefert Werte die dem physiologischen System am nächsten kommen bleibt offen. Hier ist der interne Vergleich mit Referenzsubstanzen wichtiger für die Beurteilung der Ergebnisse. Dennoch bietet die

FLiK-Methode einige Vorteile, insbesondere im Hinblick auf den apparativen Aufwand der Messung, beispielsweise im Vergleich zu SPR-Messungen.

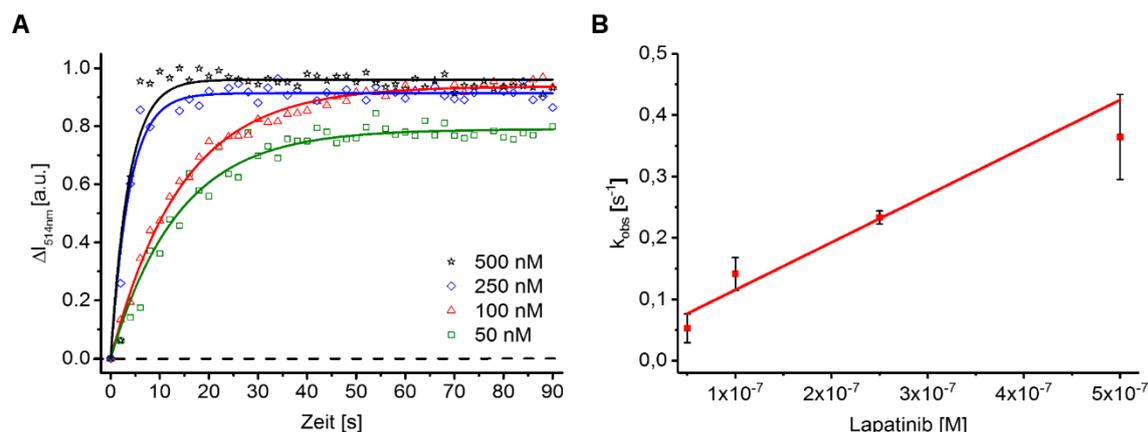


Abbildung 20. (A) Änderung der Intensität der Fluoreszenzemission bei 514 nm und bei steigender Lapatinibkonzentration. Durch anpassen einer Kurve einer Reaktionsgeschwindigkeit pseudo erster Ordnung kann die beobachtete Geschwindigkeitskonstante k_{obs} bestimmt werden. (B) Durch Auftragung des k_{obs} ($n=3$) gegen die Lapatinibkonzentration und anschließender linearer Regression kann aus der Steigung der Geraden der k_{on} und der k_{off} bestimmt werden.

Durch die Bindung von Lapatinib an das acrylodanmarkierte EGFR wird eine Konformationsänderung zur inaktiven Konformation induziert, was wiederum eine erhöhte Fluoreszenzintensität bei 514 nm hervorruft. Wird Lapatinib aufgrund des ATP-kompetitiven Bindungsmodus aus der ATP-Bindetasche verdrängt sollte sich die Konformationsänderung wieder umkehren und das Fluoreszenzsignal bei 514 nm wieder absinken. Dieser Effekt sollte durch die Verdrängung von Lapatinib mit dem nicht-hydrolysierbaren ATP-Analogon AMP-PNP erreicht werden (Abbildung 21 B). Die reversible Bindung von Lapatinib konnte auf diese Weise nicht bestätigt werden, da durch die Zugabe von AMP-PNP im Beobachtungszeitraum nur eine geringe Abnahme in der Fluoreszenzintensität hervorgerufen werden konnte, die vermutlich auf degradierendes Protein zurückzuführen war. Aus der Literatur ist bekannt, dass Lapatinib für einen Typ I Inhibitor ungewöhnlich kleinen k_{off} besitzt. Daher wurde des Weiteren versucht Lapatinib mit einem anderen Typ I Inhibitor zu verdrängen. Gefitinib besitzt eine höhere Bindungsaffinität als AMP-PNP und sollte dadurch in der Lage sein, Lapatinib effektiver zu verdrängen. Der Überschuss an Gefitinib konnte die Fluoreszenzintensität im beobachteten Zeitraum allerdings nur geringfügig absenken (Abbildung 21 A). Gefitinib ist bekannt EGFR in der aktiven Konformation zu stabilisieren, wobei auch Kristallstrukturen von EGFR in der inaktiven Konformation bekannt sind in die Gefitinib *gesoakt* werden konnte.^[150] Dies könnte bedeuten, dass Gefitinib in der Lage war Lapatinib aus dem FLiK-Konstrukt zu verdrängen, dies aber nicht wie erwartet im Fluoreszenzspektrum zu sehen war, da Gefitinib nicht in der Lage ist EGFR von der inaktiven Konformation in die aktive Konformation zu überführen.

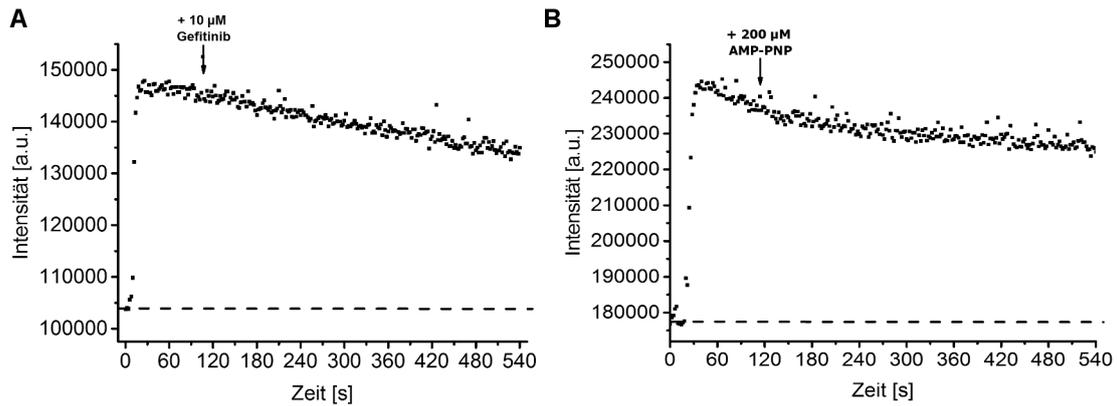


Abbildung 21. 50 nM Lapatinib wurden in einer Küvette unter ständigen Rühren zu 25 nM acrylodanmarkierten DFG+2 pipettiert. Die Fluoreszenzintensität erreichte ein stabiles Plateau für etwa 120 s bzw. 60 s. Danach wurden **(A)** 10 µM Gefitinib oder **(B)** 200 µM AMP-PNP zugegeben um Lapatinib aus der ATP-Bindetasche zu verdrängen.

Die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten und die Verdrängungsexperimente wurden ebenfalls für das DFG+5-Konstrukt durchgeführt und sind im Anhang dargestellt (Abbildung 52). Es wurde auf gleiche Weise verfahren wie bereits in den vorherigen Abschnitten für das DFG+2-Konstrukt beschrieben. Der k_{on} bzw. k_{off} für DFG+5 wurde mit $0.83 \pm 0.16 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bzw. $1.8 \times 10^{-2} \text{s}^{-1}$ berechnet und sind damit höher als im DFG+2-Konstrukt und weichen auch weiter von den literaturbekannten Werten ab.

3.4 Zusammenfassung

Die Aktivität der Rezeptortyrosinkinase EGFR wird durch ein komplexes Netzwerk konformationeller Änderungen kontrolliert. Ist dieses gestört, kann dies zur Transformation gesunder Zellen zu Krebszellen führen. Beispielsweise ist die EGFR-L858R Mutation in NSCLC eine der bekanntesten Treibermutationen und erworbene Resistenzentwicklungen stellen ein akutes Problem in der Klinik dar, was die Entwicklung neuer Inhibitoren unabdingbar macht. Neben der klinischen Anwendung zur Therapie verschiedener Krankheiten sind niedermolekulare organische Moleküle effektive Werkzeuge in der Forschung um detaillierte Einblicke in biologische Prozesse zu erlangen. EGFR-Inhibitoren modulieren oder stabilisieren aktive und inaktive Konformationen des Rezeptors und ihr Einsatz ermöglicht ein detaillierteres Verständnis der Rezeptordynamik und -regulation. Viele Liganden sind bekannt, die EGFR in der aktiven Konformation stabilisieren (Typ I) und ATP daran hindern in der aktiven Tasche zu binden. Auf der anderen Seite sind nur wenige Liganden bekannt, die EGFR in der inaktiven Konformation stabilisieren, etwa in einem Typ II- oder Typ III-artigen Bindungsmodus. Durch die Markierung der Aktivierungsschleife, zwei Aminosäuren C-terminal des DFG-Motivs, mit dem solvatochromen Fluorophor Acrylodan konnte das Prinzip des FLiK-Assays in EGFR etabliert werden. Dies ermöglicht es durch weitere Anwendungen in Zukunft gezielt nach neuen chemischen Verbindungen zu suchen, die die inaktive Konformation der Kinasedomäne stabilisieren. Für die Referenzverbindung Lapatinib, welche die inaktive Konformation stabilisiert und in einer Typ I/II Zwischenform bindet, konnte eine Dissoziationskonstante von 9.6 ± 2.3 nM bestimmt werden, welche mit bereits publizierten Werten (zwischen 2.4 nM und 17 nM) übereinstimmt. Typische Typ I Inhibitoren, wie Gefitinib und Dasatinib, wurden hingegen im FLiK-Assay nicht detektiert, da diese die aktive Konformation stabilisieren. Da der FLiK-Assay die direkte Bindung eines Liganden detektiert, war es weiterhin möglich, kinetische Bindungsstudien durchzuführen und damit Assoziationsraten (k_{on}) zu bestimmen. Für Lapatinib wurde so ein k_{on} von 0.77 ± 0.12 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ bestimmt, welcher mit anderswo publizierten Daten korreliert (zwischen 0.098 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ und 3.1 $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Mit dem EGFR-FLiK konnte ein einfaches und kostengünstiges Assay-Format entwickelt werden, welches potentiell miniaturisierbar ist und es erlaubt im Hochdurchsatz gezielt nach chemischen Strukturen zu suchen, die die inaktive Konformation der EGFR-Kinasedomäne stabilisieren. Dies ermöglicht es den bislang wenig erforschten chemischen Raum potentieller Stabilisatoren der inaktiven Konformation von EGFR zu erschließen und diesen für die Entwicklung neuer Inhibitoren gegen Wirkstoffresistente Krebszellen zu nutzen. Zusätzlich ermöglicht der Assay neue Werkzeugmoleküle für die chemische Biologie und die Erforschung der Biologie der epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren zu entwickeln.

4 Kristallisationsstudien an EGFR mit neuartigen Inhibitoren

Die Kristallisation eines Proteins, z.B. eines Enzyms oder eines Membranrezeptors, ist ein wichtiger Pfeiler in der Wirkstoffentwicklung, da hierdurch die Identifizierung und Charakterisierung von Bindestellen und Bindungsmodi von Liganden im Detail möglich wird. Bei der Proteinkristallisation und der Röntgenstrukturanalyse macht man sich die Beugung von Röntgenstrahlen an Proteinkristallen zu Nutze, um die Struktur des Proteins und eines Wirkstoffes im Komplex mit diesem auf atomarer Ebene aufzuklären. Ein allgemeines Prinzip bei der Beugung von Licht ist, dass die Wellenlänge des Lichts der Größe des zu untersuchenden Objekts entspricht. Übliche Atomradien oder Atomabstände zwischen C-C, C-O, C-N, wie sie in Proteinen zu finden sind, liegen etwa bei 100 pm bis 150 pm (1.0 Å bis 1.5 Å) und damit im Bereich der Wellenlänge von Röntgenstrahlung. Die eigentliche Beugung findet hierbei an der Elektronenhülle der Atome statt und nicht an den Atomkernen. Die Intensität der gebeugten Röntgenstrahlen an einzelnen Proteinen in Lösung ist nicht ausreichend um daraus die Struktur aufzuklären. Proteinkristalle bestehen aus einzelnen Molekülen, die sich durch eine sich wiederholende symmetrische Anordnung auszeichnen. Durch die hohe Symmetrie und die Beugung der Röntgenstrahlen an vielen einzelnen sich wiederholenden Molekülen im Kristall, wird das Signal soweit verstärkt, dass daraus die Struktur berechnet werden kann.^[151] Eine häufig verwendete Methode zur Herstellung von Proteinkristallen ist die Dampfdiffusionsmethode im sitzenden oder hängenden Tropfen. Dabei wird ein Tropfen der wässrigen Proteinlösung mit einem Tropfen der Reservoirolösung vermischt und in einem luftdicht verschlossenen Container über einer Reservoirolösung, die ein hygroskopisches Fällungsmittel enthält (beispielsweise Polyethylenglycol), inkubiert. Aus dem Proteintropfen diffundiert Wasser über die Gasphase in die Reservoirolösung, wodurch sich die Konzentration der Bestandteile des Tropfens langsam und stetig erhöht bis das Protein die Löslichkeitsgrenze überschreitet und idealerweise Kristallisationskeime bildet. Die Wahl eines geeigneten Fällungsmittels ist von zentraler Bedeutung damit Kristallisationskeime entstehen und keine unkontrollierte Proteinpräzipitation auftritt. Im nächsten Schritt wird der Proteinkristall aus dem Tropfen entfernt und in flüssigem Stickstoff eingefroren, durch einen Röntgenstrahl rotiert und ein Datensatz von Beugungsbildern/Streubildern aufgenommen. Der Datensatz ist ein Muster von regelmäßig, symmetrisch angeordneten Reflexen aus deren Abstand zueinander und deren Intensitäten eine Karte der Elektronendichte berechnet

werden kann (Abbildung 39), in die über computergestützte Methoden die einzelnen primären, sekundären und tertiären Strukturelemente des Proteins eingepasst werden.

4.1 Konstruktdesign und die Expression in Insektenzellen.

Das Konstruktdesign ist für eine erfolgreiche Kristallisation des Proteins ebenfalls von fundamentaler Bedeutung. Besteht ein Protein aus mehreren funktionellen Domänen kann dies eine besondere Herausforderung für die Kristallisation darstellen. Eine häufig verfolgte Strategie in diesem Kontext ist die Kristallisation der einzelnen isolierten Domänen anstelle des vollständigen Konstrukts. Mit dem Ziel ein Kristallisationssystem für EGFR-Kinaseinhibitoren zu etablieren, wurde für die Kristallisationsversuche ein Konstrukt gewählt, das die insolierte Kinasedomäne von EGFR mit den Aminosäuren 686 bis 1022 (Uniprot Eintrag P00533) umfasst. Das Wildtyp-Konstrukt von EGFR wurde für die Expression in *Spodoptera frugiperda* codonoptimiert, von der Firma *GeneArt* (ThermoFisher) synthetisiert und in pIEx/Bac3 Transfervektoren kloniert. Zur effektiven Isolierung aus dem Zellysat wurde das Konstrukt mit einem N-terminalen Hexahistidin-Tag modifiziert, gefolgt von einer Schnittstelle für die Thrombin-Protease. Die Mutanten EGFR-L858R, -L858R/T790M und -T790M wurden mittels ortsspezifischer Mutagenese auf Basis des Wildtyps erstellt und in *E. coli* XL10 Zellen amplifiziert. Die Transfektion zur Erzeugung des rekombinanten Baculovirus wurde von der *Dortmund Protein Facility* (DPF) nach dem *flashBac*-Protokoll in Sf9-Zellen durchgeführt. Weiterführende Testexpressionen, *time of harvest* (TOH) Analysen und die Virusamplifikationen zum P2-Virus wurden ebenfalls von der DPF vorgenommen. Die Amplifikation zum P3-Virus, die Expression im präparativen Maßstab und die Reinigung des Zielproteins wurden dann im AK-Rauh durchgeführt. Vor der weitführenden Amplifikation des P2-Virus zum P3-Virus wurde von der DPF eine Testexpression durchgeführt, die im weiteren Kapitel beschrieben wird. Für die einzelnen Analysen wurde jeweils ein Aliquot der Sf9 Zellen lysiert und in eine Vertiefung einer Mikrotiterplatte verbracht in der eine Ni²⁺-Affinitätsmatrix immobilisiert war. Die weitere Analyse erfolgte in drei Schritten: 1) Immobilisierung der Proteine mit His-Tag in der Mikrotiterplatte, 2) Auswaschen der Proteine ohne His-Tag, 3) Elution der mit einem His-Tag modifizierten Proteine mittels eines Imidazolpuffers. Proben aus dem Lysat und dem Eluat wurden anschließend über Kapillarelektrophorese (*capillary electrophoresis*, CE) analysiert.

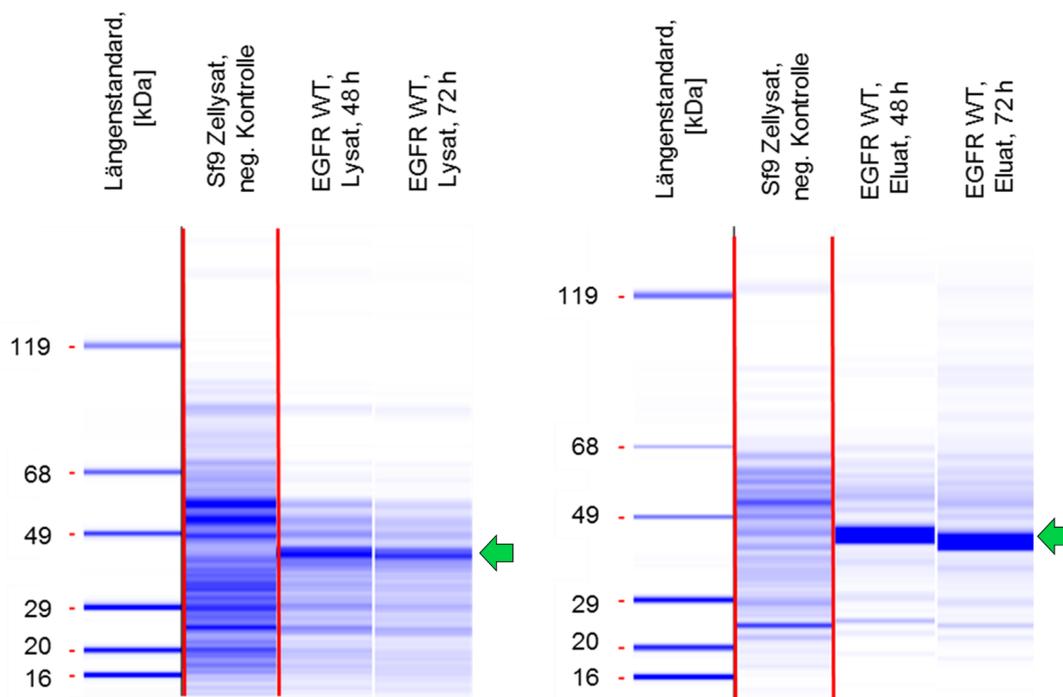


Abbildung 22. Expressionsanalyse mittels Kapillarelektrophorese von EGFR-Wildtyp (ca. 40 kDa) in Sf9 Insektenzellen. Analysiert wurden Proben des Zellysats und des Eluats einer Testreinigung über Ni-Affinitätsmatrix. Im Lysat und im Eluat ist nach einer Expressionszeit von 48 h eine Bande mit dem korrespondierenden Molekulargewicht zu EGFR-WT zu erkennen (grüner Pfeil). Die starke Bande im Eluat zeigt eine effektive Überexpression an löslichem Protein.

Durch die Gegenüberstellung einer unprozessierten Probe aus dem Rohlysat, welche alle Proteine der Insektenzelle enthält, und einer Probe aus dem Eluat des Bindungsassays, die idealerweise nur Proteine mit His-Tag enthält, lässt sich somit abschätzen wieviel lösliches Protein bei der Expression erzielt werden kann. In der Praxis ist die Bindung an die Affinitätsmatrix nicht nur auf Proteine mit His-Tag beschränkt und es findet sich i.d.R. eine mehr oder minder stark ausgeprägte unspezifische Bindung weiterer Proteine, die sich in der CE als Hintergrund detektieren lassen. Beim EGFR-WT ist im Lysat und im Eluat eine Bande mit korrespondierendem Molekulargewicht von ca. 40 kDa (Abbildung 22, grüne Pfeile) nach 48 h und 72 h sichtbar. Die Intensität der EGFR-WT Bande zeigt keine Änderung von 48 h Expressionszeit zu 72 h. Die Expressionszeit/TOH von mindestens 48 h ist ausreichend und eine längere Expression zeigt keine signifikante Zunahme an EGFR-WT Protein in der löslichen Fraktion.

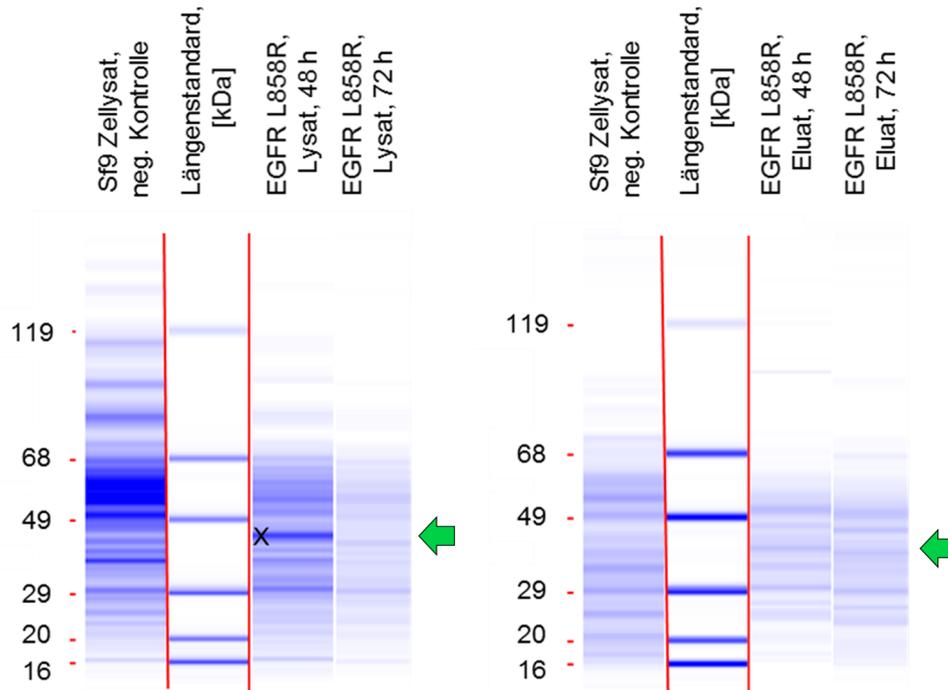


Abbildung 23. Expressionsanalyse mittels Kapillarelektrophorese von EGFR-L858R (ca. 40 kDa) in Sf9 Insektenzellen. Analysiert wurden Proben des Zellysats und des Eluats einer Testreinigung über Ni-Affinitätsmatrix. Nur im Lysat ist nach einer Expressionszeit von 48 eine Bande mit dem korrespondieren Molekulargewicht zu EGFR-L858R zu erkennen (grüner Pfeil).

Bei der CE des Lysat aus der Expression von EGFR-L858R ist nach 48 h Expression eine Bande mit dem Molekulargewicht von etwa 40 kDa erkennbar die EGFR-L858R zugeordnet werden kann (Abbildung 23). Die korrespondierenden Banden im Eluat sind allerdings sehr schwach und auch der Hintergrund der unspezifisch gebundenen Proteine im Eluat ist hoch. Diese Beobachtungen sind ein Indiz für eine ineffiziente Expression an löslichen Protein der L858R-Mutante.

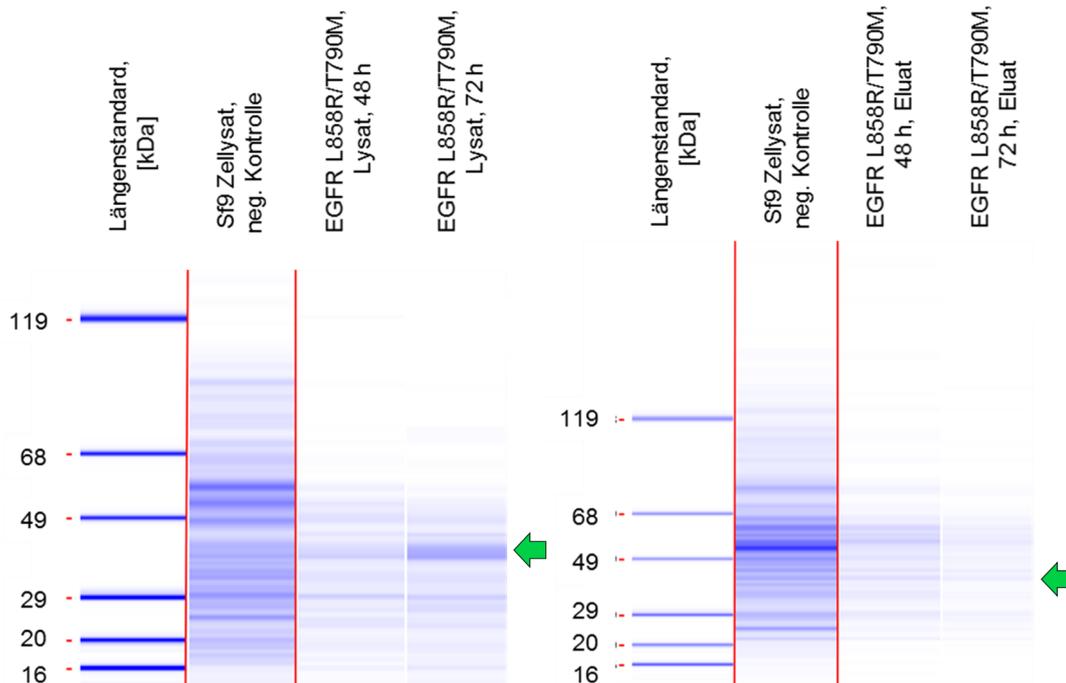


Abbildung 24. Expressionsanalyse mittels Kapillarelektrophorese von EGFR-L858R/T790M (ca. 40 kDa) in Sf9 Insektenzellen. Analysiert wurden Proben des Zellysats und des Eluats einer Testreinigung über Ni-Affinitätsmatrix. Im Lysat ist nach 72 h Expressionszeit eine Bande mit dem Molekulargewicht von EGFR-L858R/T790M sichtbar (grüner Pfeil), die korrespondierende Bande fehlt im Eluat. Dies bedeutet, dass das Protein exprimiert wurde aber nicht löslich vorlag.

Die Einführung der L858R-Mutation hatte offenbar einen negativen Einfluss auf die Stabilität des Proteins und dieser Trend konnte ebenfalls bei der L858R/T790M-Mutante weiter beobachtet werden. Nur im Lysat ist eine Bande mit entsprechenden Molekulargewicht von etwa 40 kDa erkennbar (Abbildung 23), aber keine Bande im Eluat die auf eine lösliche Überexpression schließen ließe. Durch die Kombination der beiden Mutationen wurde das Konstrukt offenbar soweit destabilisiert, dass zum größten Teil nur unlösliches Protein exprimiert wurde.

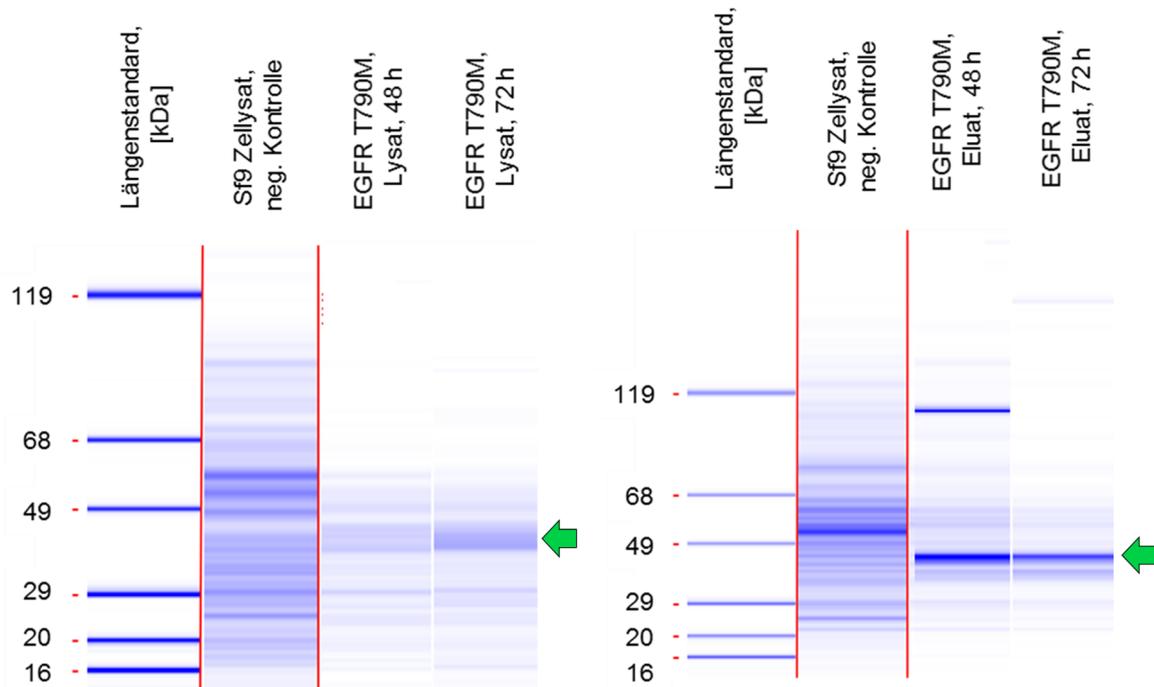


Abbildung 25. Expressionsanalyse mittels Kapillarelektrophorese von EGFR-T790M (40 kDa) in Sf9 Insektenzellen. Analysiert wurden Proben des Zellysats und des Eluats einer Testreinigung über Ni-Affinitätsmatrix. Im Lysat und im Eluat ist nach einer Expressionszeit von 48 h eine Bande mit dem korrespondierenden Molekulargewicht zu EGFR-T790M zu erkennen (grüner Pfeil). Die starke Bande im Eluat zeigt eine effektive Überexpression im Gegensatz zu EGFR-L858R und L858R/T790M und nur geringfügig schwächer als beim Wildtyp.

Sowohl im Lysat als auch im Eluat der Expression von EGFR-T790M sind in Höhe von etwa 40 kDa (Abbildung 25) deutliche Banden in der CE erkennbar. Die Banden sind weniger intensiv im Vergleich zum Wildtyp, aber deutlich stärker als bei EGFR-L858R und -L858R/T790M. Vermutlich hat die T790M-Mutation ebenfalls einen destabilisierenden Effekt auf die Proteinstruktur, aber weniger stark ausgeprägt als die L858R-Mutation. Die optimale Expressionszeit betrug zwischen 48 h und 72 h, wobei bei der Probe nach 72 h im Eluat bereits ein geringer Rückgang der Bandenintensität zu beobachten war. Aufgrund des geringeren Anteils an Protein in der löslichen Fraktion von EGFR-L858R und -L858R/T790M wurde der Fokus für die folgenden Kristallisationsversuche auf den Wildtyp und die wirkstoffresistente T790M-Mutante gelegt.

4.2 Isolierung der EGFR-Kristallisationskonstrukte

Im folgenden Kapitel wird die Isolierung der EGFR-Kristallisationskonstrukte beispielhaft anhand der wirkstoffresistenten EGFR-T790M Mutante erläutert. Details zu den einzelnen

Schritten, Pufferzusammensetzung und Methoden sind im Methodenteil beschrieben (Kapitel 6.7) Nach der Lyse der Insektenzellen wurde das EGFR-Konstrukt zunächst über eine Ni^{2+} -Affinitätschromatographie angereichert. Das POI eluierte zusammen mit einigen unspezifisch an der Säule gebundenen Proteinen, so dass noch weitere Reinigungsschritte angeschlossen wurden (Abbildung 26).

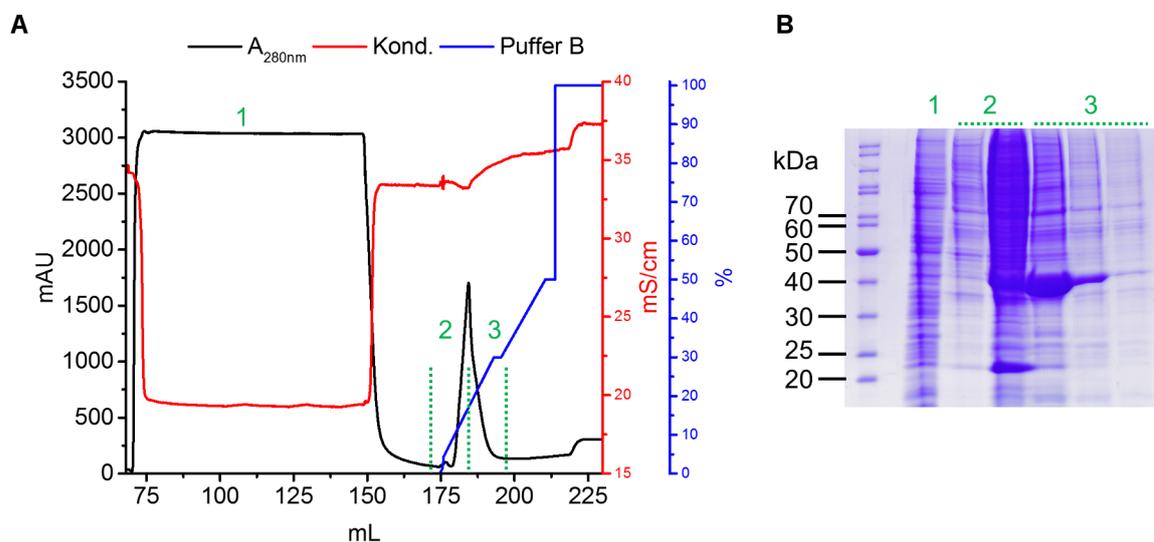


Abbildung 26. (A) Chromatogramm der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie des EGFR-T790M-Konstrukts. Schwarz: UV-Absorption bei 280 nm; Rot: Konduktivität; Blau: Anteil Elutionspuffer (Imidazol). **(B)** Coomassie-SDS-Page einiger Fraktionen aus dem Chromatogramm (A). Aufgetragen wurde eine Probe aus dem Durchfluss der Säule (1), sowie verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks (2) und (3). In Höhe von 40 kDa ist eine deutliche Bande von EGFR-T790M im Elutionspeak erkennbar.

Im Anschluss an die Ni^{2+} -Säule folgte eine Anionenaustauschchromatographie. In Vorbereitung dazu wurde eine Dialyse gegen einen Puffer mit niedriger Ionenstärke durchgeführt, währenddessen ebenfalls die Abspaltung des His_6 -Tags erfolgte. Bei der Dialyse kam es zu der Bildung eines weißen Präzipitats, welches aber zum Großteil aus Verunreinigungen bestand und nur Spuren des EGFR-Konstrukts enthielt (Abbildung 27). Durch einen stufenweisen Gradienten an Elutionspuffer konnte ein Großteil der verbliebenen Verunreinigungen über die Anionentauschersäule abgetrennt werden.

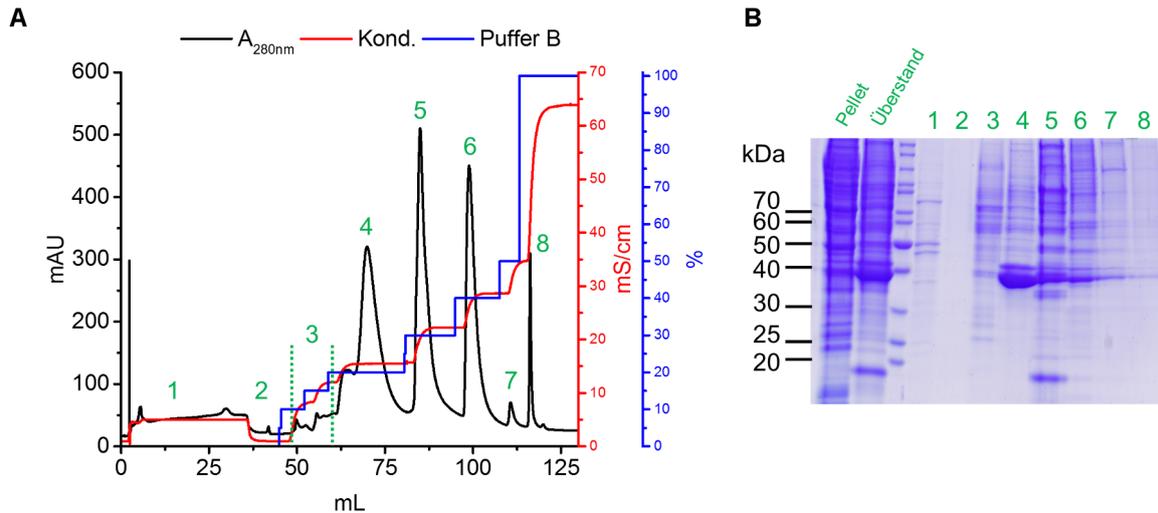


Abbildung 27. (A) Anionenaustauschchromatographie der Eluate der Ni²⁺-Säule. Schwarz: UV-Absorption bei 280 nm; Rot: Konduktivität; Blau: Anteil Elutionspuffer (Natriumchlorid). **(B)** Analyse der Fraktionen mittels SDS-Page und Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden Proben des Säulendurchfluss (1) und (2), sowie Proben aus verschiedenen Zeitpunkten der Elution (3) bis (8). Im Vorfeld wurde im Zuge der Dialyse der His₆-Tag mittels Thrombin abgespalten. Vom entstandenen weißen Präzipitat (Pellet) und dem löslichen Überstand (Überstand) wurde ebenfalls eine Probe genommen und analysiert. Ungespaltene EGFR-T790M: etwa 40 kDa, nach Thrombinspaltung: 38 kDa.

Im Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie sind fünf Peaks ((4) bis (8)) zu erkennen in denen Spuren des gespaltenen EGFR-T790M bei 38 kDa zu finden sind. Peak (4) enthält den Großteil des POI in hoher Reinheit, wobei in den anderen Peaks das POI zusammen mit verschiedenen Verunreinigungen eluierte. Mittels einer Größenausschlusschromatographie wurde anschließend die Reinheit des POI aus den Fraktionen des Peak (4) für die Kristallographie noch weiter gesteigert (Abbildung 28). Im zugehörigen Chromatogramm sind zwei Peaks zu sehen: der erste mit einigen höher molekularen Verunreinigungen und er zweite mit dem POI bei etwa 38 kDa in guter Reinheit.

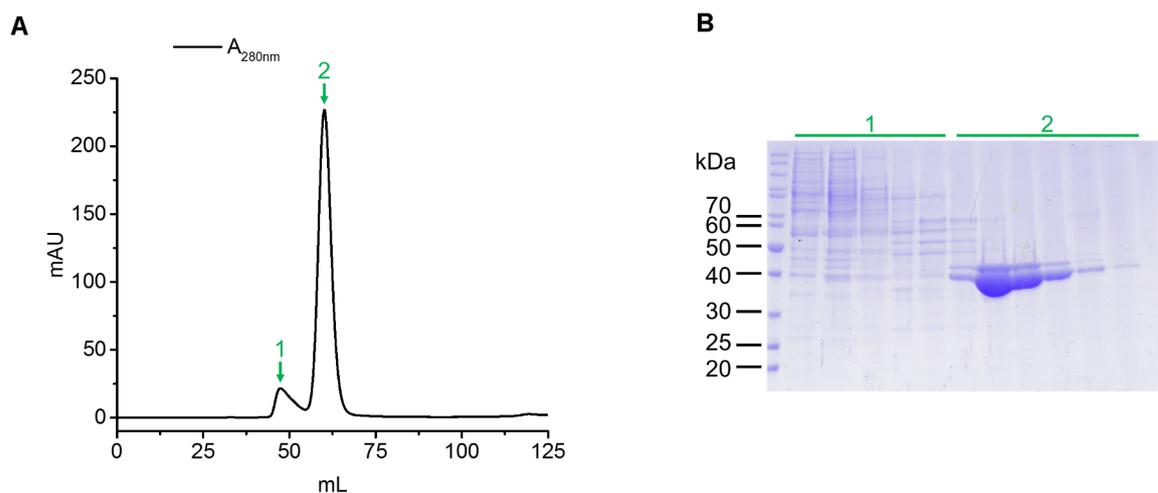


Abbildung 28. (A) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie des Eluats der Anionenaustauschchromatographie. **(B)** SDS-Page einiger Fraktionen aus den Peaks (1) und (2). In Peak (2), in Höhe von 38 kDa, ist das POI in guter Reinheit enthalten.

4.2.1 Analyse von Phosphorylierungsstufen

Ein wichtiger Parameter bei der Kristallisation von Proteinen ist das Vorliegen einer möglichst reinen und homogenen Proteinlösung. Bei der heterologen Expression von Proteinen kann es zu posttranslationalen Modifikation des POI durch den Expressionsorganismus kommen. Insbesondere kann bei der Expression einer enzymatisch aktiven Kinase durch Autophosphorylierung ein heterogenes Gemisch verschiedener Phosphorylierungszustände entstehen, so dass bei der Isolierung des exprimierten EGFR möglicherweise eine Mischung von unphosphorylierten und (mehrfach) phosphorylierten Protein erhalten wird. Durch die Ladung der Phosphorylierung auf der Oberfläche des Proteins könnten sich für die Kristallisation ungünstige Wechselwirkungen ergeben, die letztendlich die Bildung von Kristallen verhindern. Um unphosphorylierte von phosphorylierten EGFR-Spezies abzutrennen wurde vor der Kristallisation noch eine weitere Anionenaustauschchromatographie mit einem stärkeren Säulenmaterial (Mono Q, GE) durchgeführt, welches sich durch eine höhere Affinität gegenüber anionischen Molekülen auszeichnet. Durch die höhere Trennleistung der Säule konnten kleinere Unterschiede in der Gesamtladung des Proteins, hervorgerufen durch die Phosphatgruppen, aufgetrennt werden.

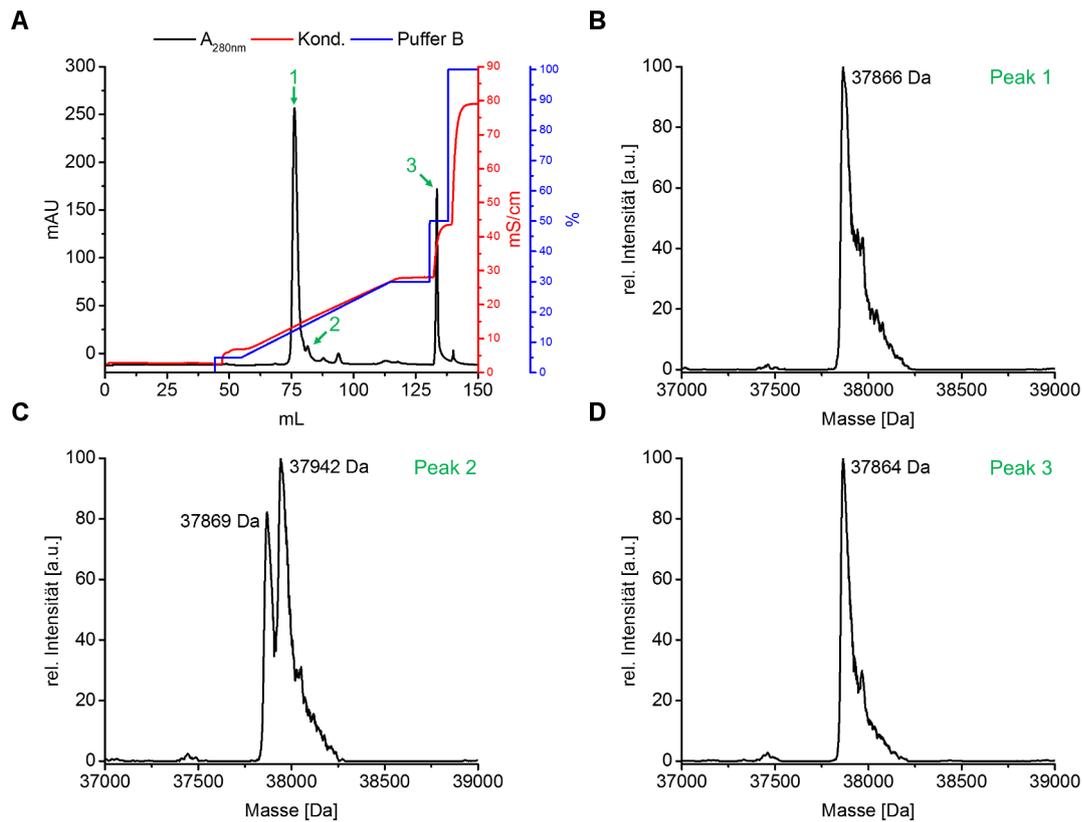


Abbildung 29. (A) Chromatogramm der Trennung von verschiedenen Phosphorylierungsstufen des EGFR-T790M mittels Mono Q Anionenaustauschchromatographie. Von den Peaks (1) bis (3) wurden Proben genommen und mittels LC-MS analysiert. Die korrespondierenden Massenspektren sind in **(B)** bis **(D)** abgebildet. Die theoretische unphosphorylierte Masse des EGFR-T790M beläuft sich auf 37871 Da, die einfach phosphorylierte Spezies besitzt eine theoretische Masse von 37951 Da. Gefunden wurde eine Spezies mit 37866 Da in Peak (1) welche dem unphosphorylierten Protein entspricht. In Peak (2) wurden sowohl unphosphorylierte als auch die einfach phosphorylierten Spezies mit 37869 Da bzw. 37942 Da gefunden. Peak (3) enthält nur die unphosphorylierte Spezies mit 37864 Da.

Bei der massenspektrometrischen Analyse von EGFR-T790M und des EGFR-WT konnte jeweils eine unphosphorylierte und eine einfach phosphorylierte Spezies identifiziert werden (Abbildung 29 und Abbildung 30). Das unphosphorylierte Protein war in beiden Fällen im großen Überschuss vorhanden und somit konnten final 3 bis 4 mg EGFR-WT sowie EGFR-T790M aus einer 2.5 L Insektenzellkultur für die nachfolgenden Kristallisationsexperimente bereitgestellt werden. Es wurde ebenfalls versucht die phosphorylierten Spezies zu isolieren, aber aufgrund des geringen Anteils am Gesamtprotein konnte keine ausreichende Menge des WT- bzw. T790M-Konstrukt isoliert werden um damit weitere Kristallisationsstudien durchzuführen. Im Peak (3) der Auftrennung der EGFR-T790M Spezies (Abbildung 30) ist ebenfalls noch unphosphoryliertes Protein zu finden. Trotz des hohen UV-Signals war es nicht möglich das Protein in ausreichender Menge zu konzentrieren. Möglicherweise enthielt der Peak oligomeres EGFR-T790M wodurch es nicht zusammen mit dem Hauptpeak (1) eluierte.

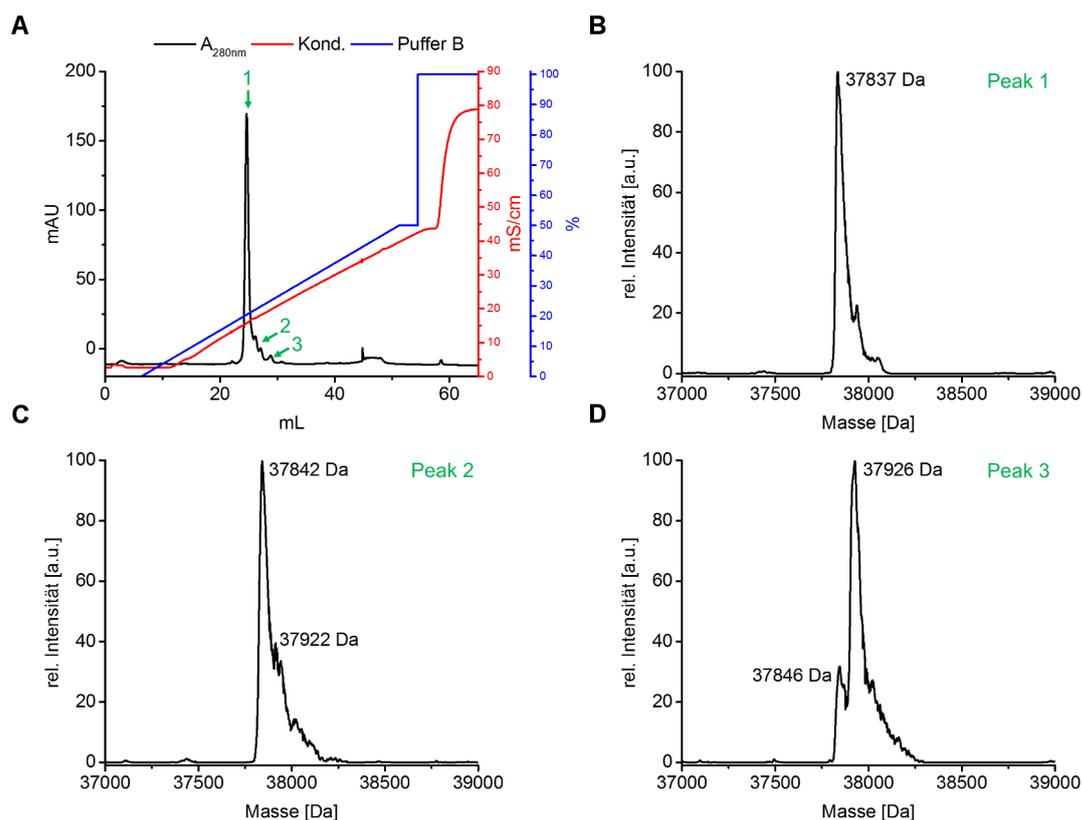


Abbildung 30. (A) Chromatogramm der Trennung von verschiedenen Phosphorylierungsstufen des EGFR-WT mittels Mono Q Anionenaustauschchromatographie. Von den Peaks (1) bis (3) wurden Proben genommen und mittels LC-MS analysiert. Die korrespondierenden Massenspektren sind in (B) bis (D) abgebildet. Die theoretische unphosphorylierte Masse des EGFR-WT beläuft sich auf 37828 Da, die einfach phosphorylierte Spezies besitzt eine theoretische Masse von 37908 Da. Gefunden wurde eine Spezies mit 37837 Da in Peak (1) welche dem unphosphorylierten Protein entspricht. In Peak (2) und Peak (3) wurden sowohl unphosphorylierte als auch die einfach phosphorylierten Spezies gefunden.

4.3 Kristallisation von EGFR-WT und EGFR-T790M

Die Kristallisation von Proteinen, insbesondere im Komplex mit verschiedenen Liganden bzw. Inhibitoren, ist eine wichtige Technik in der modernen medizinischen Chemie. Die Aufklärung der Struktur eines Liganden im Komplex mit seinem molekularen Zielprotein ermöglicht die Identifikation von Protein-Ligand-Wechselwirkungen und darauf aufbauend die gezielte Entwicklung und Optimierung des Liganden. Zur Etablierung eines Kristallisationssystems wurden Kristallisationsversuche mit einigen Referenzverbindungen durchgeführt. Die Wahl fiel auf einige aus der Literatur bekannte EGFR-Inhibitoren und einige weitere Inhibitoren die im AK-Rauh gezielt gegen EGFR-T790M entwickelt und synthetisiert wurden (Abbildung 18 und Abbildung 31).

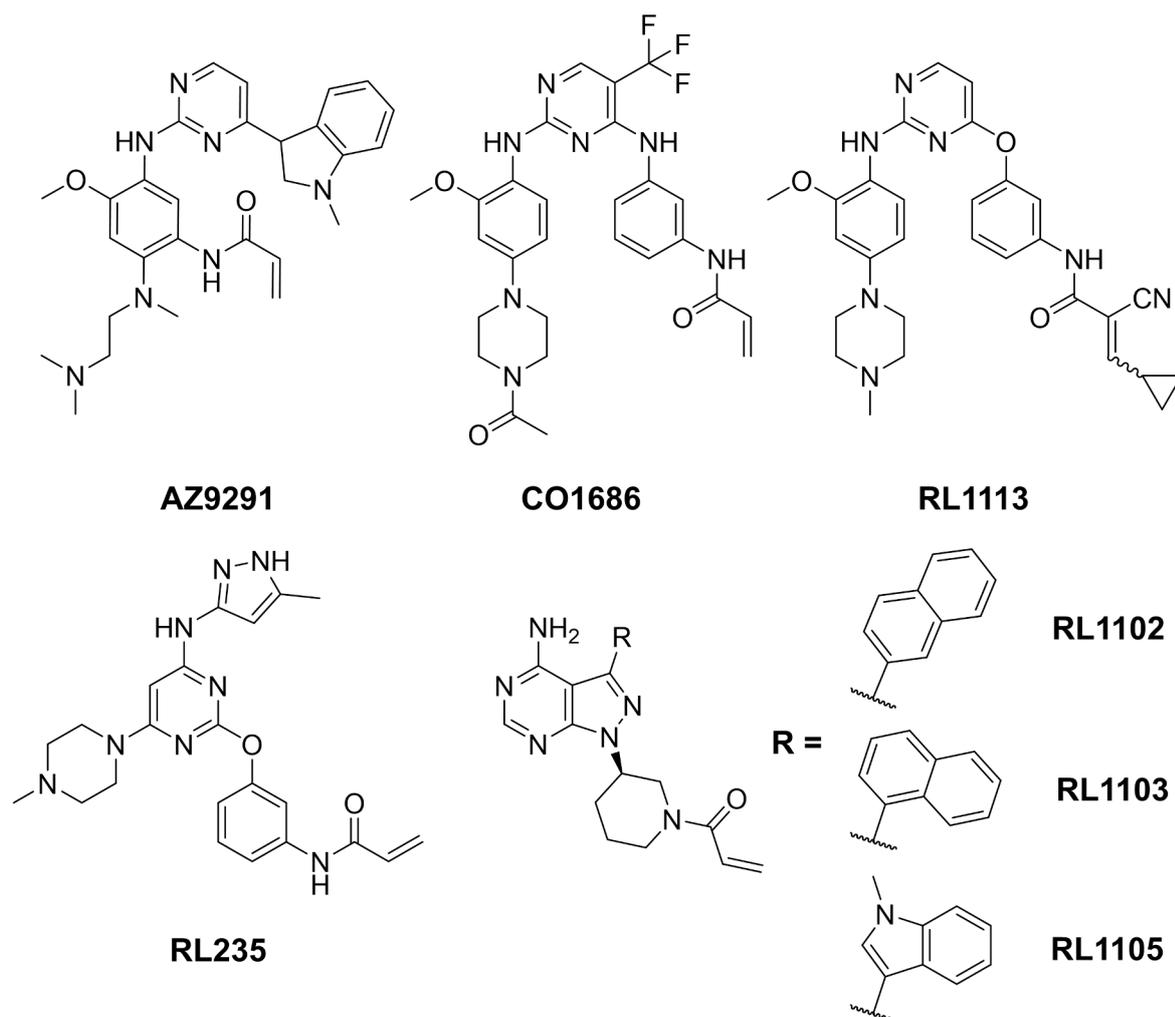


Abbildung 31. Chemische Struktur der für die Kristallisationsexperimente verwendeten EGFR-Inhibitoren. Die Verbindungen AZ9291 und CO1686 sind literaturbekannte Inhibitoren, die weiteren Verbindungen mit RL-Nummer wurden im Arbeitskreis synthetisiert.

Die zentrale Herausforderung der Proteinkristallisation ist die Suche nach einer geeigneten Bedingung zur Erzeugung von Proteinkristallen. Es wurden daher zwei Strategien verfolgt um zunächst eine Kristallisationsbedingung für den Wildtyp zu finden. Zum einen wurde ein Screen mit ca. 1000 verschiedenen Bedingungen durchgeführt (*Big-Screen*) um neue Kristallisationsbedingungen zu identifizieren und zum anderen wurden *Fine-Screens* basierend auf bereits in der Literatur beschriebenen Bedingungen durchgeführt.^[106,142,152,153] Für den *Big-Screen* wurden kommerziell erhältliche *NexTal Crystallisation Suites* (QIAGEN, JSCG Core Suite I-III, PACT, Classics I/II, MbClass I/II, ComPAS, PEGs) verwendet. Es wurden verschiedene Ansätze getestet, in denen EGFR-WT als Apoprotein und im Komplex mit verschiedenen Liganden (reversible und irreversible, z.B. Erlotinib, Lapatinib, RL235, RL1113) bei unterschiedlichen Konzentrationen an Protein eingesetzt wurde (Abbildung 32). In den etwa 1000 verschiedenen Bedingungen des *Big-Screens* waren überwiegend Tropfen mit

schwachem bis starkem Proteinpräzipitat zu beobachten und in keiner der getesteten Bedingungen konnte Kristallwachstum beobachtet werden.

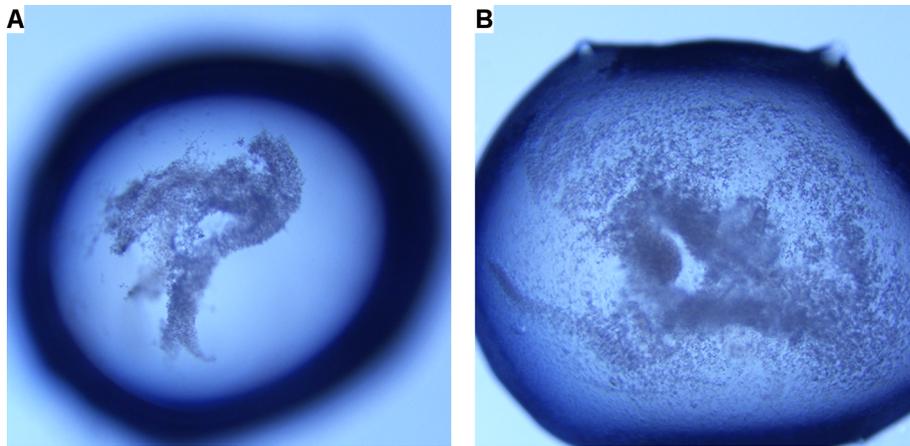


Abbildung 32. Beispielhafte Ergebnisse des Screens für **(A)** EGFR-WT Apoprotein bei 200 mM Ammoniumacetat, 20 % (w/v) PEG 3350 und **(B)** für EGFR-WT im Komplex mit RL1113 bei 200 mM Di-Na-Tartrat Dihydrat, 20 % (w/v) PEG 3350.

Für die *Fine-Screens* wurden bereits publizierte Bedingungen^[106,142,152,153] als Ausgangspunkt gewählt, wobei nur in der folgenden Bedingung erste kleine Apokristalle des EGFR-WT beobachtet werden konnten: 1000 mM Na/K-Tartrat, 100 mM Na-MES, 1 mM TCEP, pH 7, 8 mg/mL EGFR-WT (Apoprotein), bei 20 °C im hängenden Tropfen. Ausgehend von dieser Bedingung wurde dann systematisch die Konzentration an Na/K-Tartrat, der pH-Wert und die Proteinkonzentration variiert, sowie verschiedene Ansätze als Apo- und als Komplexkristalle mit verschiedenen Verbindungen (vgl. Abbildung 31 und Abbildung 33).

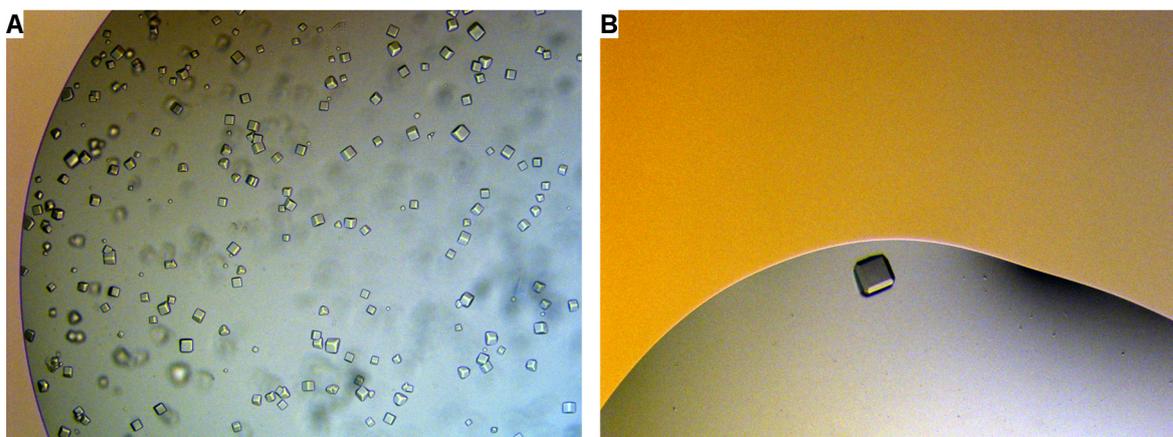


Abbildung 33. **(A)** EGFR-WT Apokristalle zu Beginn der *Fine-Screens*. (1.1 M Na/K-Tartrat, 100 mM MES pH 6.9, 20 °C, 8 mg/mL EGFR). **(B)** Durch Optimierung der Proteinkonzentration konnte die Anzahl der Kristalle reduziert und deren Größe deutlich gesteigert werden. (0.9 M Na/K-Tartrat, 100 mM MES pH 7.0, 20 °C, 3 mg/mL EGFR).

Die große Anzahl an kleinen Kristallen ließ auf eine zu hohe Zahl an Kristallisationskeimen schließen. Durch die Verringerung der Konzentration an EGFR-WT von 8 mg/mL auf 3 bis 4 mg/mL konnte die Bedingung soweit optimiert werden, dass nur noch wenige größere, kubische Kristalle entstanden. Die Kristalle konnten gefischt werden und in 20%iger (v/v) Glycerol-Kryolösung in flüssigen Stickstoff eingefroren werden. Ein Datensatz eines Apokristalls wurde am *Swiss Light Source* Synchrotron (SLS) des Paul Scherrer Instituts in Villigen (Schweiz) aufgenommen. Die Auflösung des EGFR-WT Apokristalls betrug 3.0 Å und der Kristall formte sich in der kubisch innenzentrierten Raumgruppe I23 mit einem einzigen Monomer in der Einheitszelle.

Um Kristalle von EGFR-WT im Komplex mit Inhibitoren zu erzeugen, wurde das Protein im Vorfeld der Kristallisation zusammen mit dem jeweiligen Inhibitor inkubiert. Hierbei wurden ebenfalls verschiedene Parameter variiert, die das Protein und das anschließende Kristallwachstum beeinflussen konnten. Zunächst wurde die Konzentration an Inhibitor zwischen einem 1.5- bis 5-fachen molaren Überschuss variiert. Bei vielen der getesteten Verbindungen handelte es sich um irreversible Inhibitoren, die Cys797 am Rande der ATP-Bindetasche adressieren und kovalent modifizieren. Aus LC-MS Analysen der Proteinlösungen war erkennbar, dass die Testverbindungen eine hohe Reaktivität aufwiesen und bereits bei einem doppelten molaren Überschuss in einem Zeitraum von 1 bis 2 Stunden vollständig abreagierten (vgl. Abbildung 36). Alle verwendeten Inhibitoren lagen standardmäßig als 10 mM DMSO-Stammlösung vor. Für folgende Experimente wurde der Anteil an DMSO in der Proteinlösung auf ein Minimum reduziert, da bereits bei einem Anteil von 5% Proteinpräzipitation beobachtet werden konnte. Alternativ dazu wurde versucht höher konzentrierte Inhibitorlösungen (z.B. 100 mM) einzusetzen. Dies war allerdings nur bedingt anwendbar, da die Löslichkeitsgrenze vieler Inhibitoren bereits bei einer 10 mM DMSO-Lösung erreicht war. In einem weiteren Ansatz wurde das jeweilige Volumen an 10 mM DMSO Inhibitorlösung vorgelegt und das DMSO mit einer *Speed-Dry* Zentrifuge (Zentrifugation bei 50°C und Unterdruck) entfernt, der so erzeugte Feststoff wurde dann direkt in der Proteinlösung aufgenommen und resuspendiert. Mit keiner der zuvor beschriebenen Methoden konnten Komplexkristalle erzeugt werden. Offenbar stört die Bindung des Inhibitors in EGFR-WT die Ausbildung von Kristallen. Um ein Kristallwachstum zu induzieren wurden *Micro-Seeding* Experimente mit den zuvor erzeugten Apokristallen durchgeführt. Hierzu wurden einige Apokristalle zerkleinert und die so erhaltenen Kristallfragmente in die zuvor präparierten Kristallisationstropfen überführt. Allerdings war dies nicht zielführend und es konnte lediglich die Bildung von Proteinpräzipitat im Tropfen beobachtet werden. Eine weitere alternative Methode um Komplexstrukturen zu erhalten ist das *Soaking*. Dabei werden Apokristalle zusammen mit dem Inhibitor in der Kristallisationslösung inkubiert. Aufgrund des

hohen Wasseranteils in den Kristallen kann der Inhibitor in den Kristall und in die ATP-Bindetasche diffundieren, vorausgesetzt die Bindetasche ist zugänglich und z.B. nicht durch andere Proteinmoleküle im Kristall blockiert. Problematisch erwies sich hierbei erneut die DMSO-Konzentration im Tropfen. Beispielweise entspricht 0.1 μL einer 10 mM DMSO-Stammlösung in einem 2 μL Kristallisationstropfen bereits einem Anteil von 5 % DMSO (1 mM Inhibitorkonzentration im Tropfen). Unter diesen Bedingungen waren die Apokristalle nicht stabil und lösten sich nach wenigen Minuten im Tropfen auf. Letztendlich konnten aber doch einige Komplexkristalle über das *Soaking* generiert werden. Dazu wurde das DMSO aus der Inhibitorstammlösung abgedampft und der erhaltene Feststoff in der jeweiligen Reservoirolösung des Apokristalls resuspendiert (1 mM Lösung). Nicht gelöster Feststoff wurde anschließend abzentrifugiert. Die Apokristalle wurden dann über Nacht direkt in der Reservoir-Inhibitorlösung inkubiert. Viele der Kristalle waren nach dem *Soaking* nicht mehr in der Lage Röntgenstrahlen zu streuen. Von den Kristallen die noch streuten wurden Datensätze am SLS aufgenommen, die eine vergleichsweise niedrige Auflösung ($> 3.5 \text{ \AA}$) hatten und bis auf einige Ausnahmen überwiegend keine Elektronendichte eines Liganden in der ATP-Bindetasche zeigten. Im folgenden Abschnitt werden zwei Strukturen des EGFR-Wildtyps im Komplex mit RL235 und RL1075 besprochen, die durch das *Soaking* erzeugt werden konnten. In Abbildung 34 ist die Kristallstruktur des Inhibitors RL235 im Komplex mit EGFR-WT bei einer Auflösung von 4.0 \AA in der Raumgruppe I23 dargestellt (siehe Tabelle 3 für weitere Statistiken).

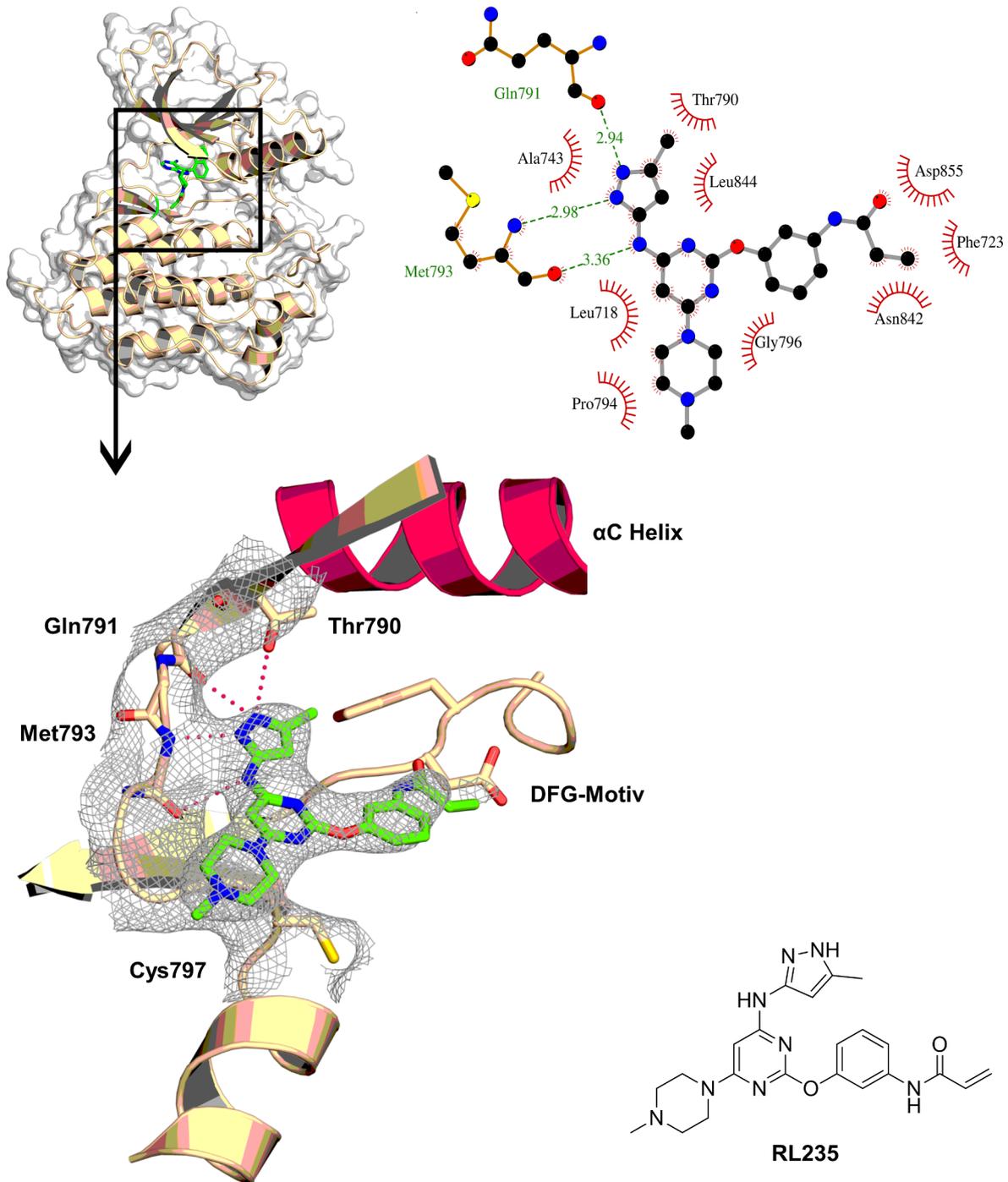


Abbildung 34. Kristallstruktur des EGFR-WT im Komplex mit RL235. Abgebildet ist der Ligand mit einem Ausschnitt seiner Elektronendichte (graues Netz). Charakteristisch sind die Wasserstoffbrücken zur Scharnierregion (rot gepunktete Linien). Zusätzlich markiert ist die Türsteher Aminosäure Thr790 und die α C Helix (Magenta). Im oberen Bereich ist der *LigPlot*^[154] des Liganden abgebildet. Im *LigPlot* sind schematisch die verschiedenen Interaktionen des Liganden mit Aminosäuren am Rande der ATP-Bindetasche dargestellt; rote Halbkreise: hydrophobe Interaktionen, Grün: Wasserstoffbrückenbindungen (Länge in Å).

Der Inhibitor RL235 wurde als irreversibler Inhibitor entwickelt und sollte eine kovalente Bindung zum Cys797 eingehen. Allerdings ist auf Basis der Elektronendichte eindeutig erkennbar, dass RL235 einen reversiblen, nicht kovalenten Bindungsmodus einnimmt. Das Methylpyrazol und das zum Pyrimidinkern verbrückende Stickstoffatom bilden drei

Wasserstoffbrücken zum Peptidrückgrat der Scharnierregion (Gln791 und Met793) aus. Außerdem konnten mit Hilfe der *LigPlot* Software noch weitere hydrophobe Interaktionen des Liganden im Bereich der ATP-Bindetasche visualisiert werden.^[154] Die zu erwartende kovalente Bindung von RL235 mit Cys797 konnte nicht bestätigt werden, da aufgrund der Orientierung des Liganden, mit dem Acrylamid-Elektrophil in Richtung der α C Helix, eine Reaktion mit Cys797 nicht möglich war. Die Reaktionszeit für die kovalente Bindung war beim *Soaking* durch die Inkubation über Nacht gegeben und aus LC-MS Studien sowie alternativen Kristallisationsstudien in der Modelkinase cSrc^[155] (vgl. PDB-ID: 5D11 und Abbildung 36) ist eine eindeutige kovalente Modifikation des Cys797 durch RL235 erkennbar. Die reversible Bindung von RL235 könnte auf einen zweistufigen Bindungsmodus hinweisen. In der ersten Stufe bindet der Inhibitor über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen reversibel in der ATP-Bindetasche, so wie es auch aus der Kristallstruktur und dem *LigPlot* erkennbar ist (Abbildung 34). In der zweiten Stufe bildet sich dann die kovalente Bindung zwischen dem Michael-Akzeptor und der Cysteinseitenkette aus. Vermutlich handelt es sich bei dieser Struktur um ein Kristallisationsartefakt, das letztendlich nicht den vollständigen Bindungsmodus und das System in Lösung beschreibt.

Neben der zuvor beschriebenen Struktur konnte noch eine weitere Struktur von EGFR-WT im Komplex mit RL1075 bei einer Auflösung von 3.7 Å in Raumgruppe I23 gelöst werden (die Struktur wurde im Rahmen der Bachelorarbeit von Ina Landel, 2014 erzeugt, der Inhibitor stammt aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Stefan Laufer, Universität Tübingen, Abbildung 35).^[156,157]

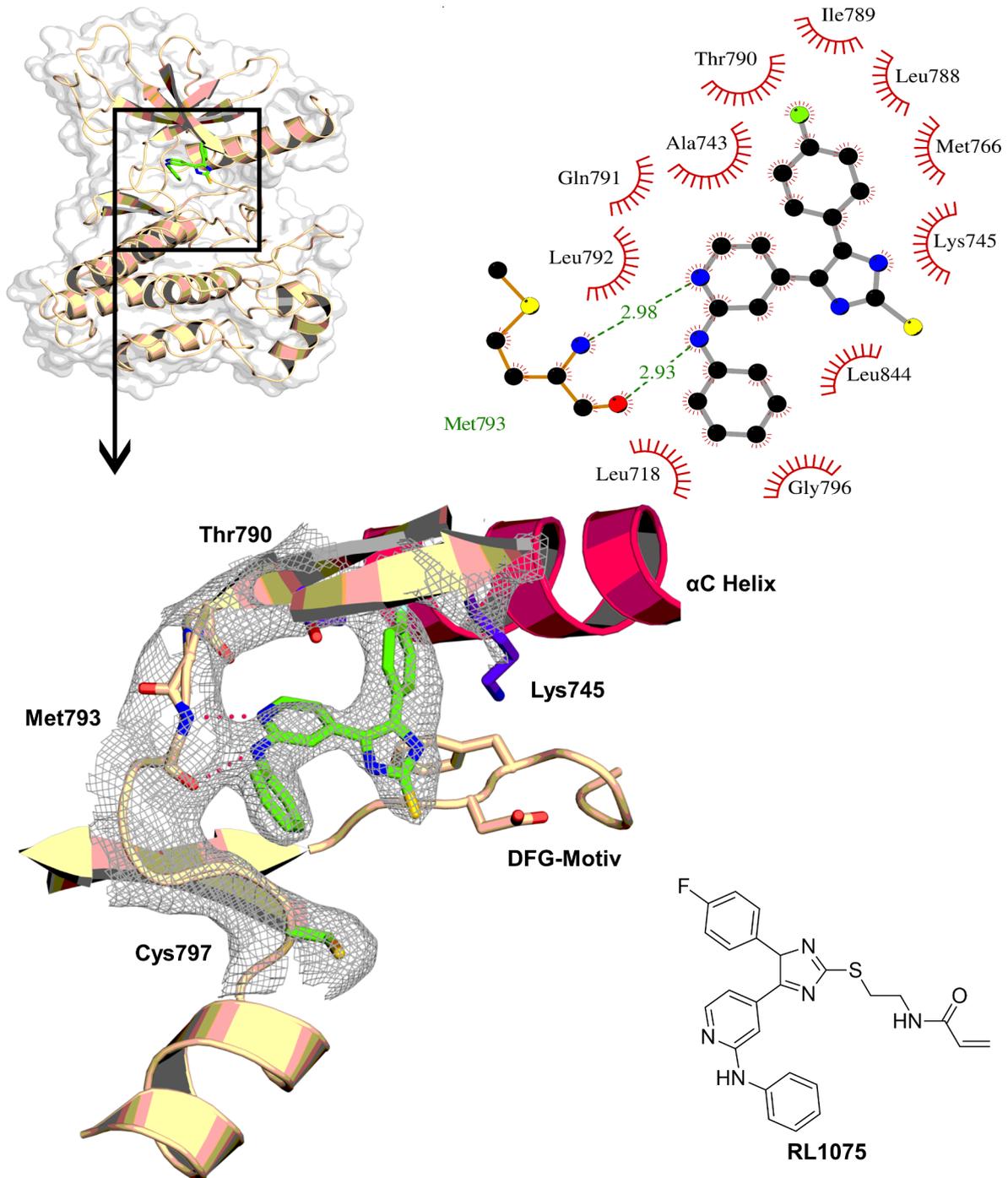


Abbildung 35. Kristallstruktur des EGFR-WT im Komplex mit RL1075. Abgebildet ist der Ligand mit einem Ausschnitt seiner Elektronendichte (graues Netz). Charakteristisch sind die Wasserstoffbrücken zur Scharnierregion (rot gepunktete Linien). Zusätzlich markiert ist die Türsteher Aminosäure Thr790, das katalytische Lys745 (Purpur) und die α C Helix (Magenta). Die Elektronendichte für den Inhibitor war unvollständig, es fehlt Elektronendichte für das N-Ethylacrylamid-Elektrophil. In der Abbildung ist nur der Teil des Inhibitors abgebildet für den Elektronendichte sichtbar war. Im oberen Bereich ist der *LigPlot*^[154] des Liganden gezeigt, ebenfalls nur der Teil, für welchen Elektronendichte sichtbar war. Im *LigPlot* sind schematisch die verschiedenen Interaktionen des Liganden mit Aminosäuren am Rande der ATP-Bindetasche dargestellt, als rote Halbkreise die hydrophoben Interaktionen, in Grün die Wasserstoffbrückenbindungen (Länge in Å).

Der Inhibitor RL1075 war ebenfalls als kovalenter Inhibitor konzipiert und sollte eine Bindung zu Cys797 ausbilden. In der Kristallstruktur fehlt die Elektronendichte für den Teil des Moleküls der den Michael-Akzeptor trägt. Sichtbar ist nur die polyzyklische Substruktur die eine Bindung zur Scharnierregion eingeht, inklusive des Schwefelatoms, das über einen Thioether zum N-Ethylacrylamid verbrückt. In Röntgenkristallstrukturen von Proteinkristallen sind Elektronendichten von Strukturen mit hoher Flexibilität und hoher Unordnung oft nicht oder nur teilweise sichtbar. Die N-Ethylacrylamidgruppe in RL1075 weist eine hohe Flexibilität auf die dazu führt, dass keine Elektronendichte für diesen Bereich des Moleküls erhalten werden konnte. Aus dieser Beobachtung lässt sich ebenfalls ableiten, dass es keine kovalente Bindung zum Cys797 gibt. Durch eine kovalente Bindung würde ebenfalls die Flexibilität des Liganden eingeschränkt und es sollte zumindest teilweise weitere Elektronendichte, besonders im Bereich um das Schwefelatom am Cys797, erkennbar werden. Auch RL1075 wurde als irreversibler EGFR-Inhibitor konzipiert, wohingegen in der Struktur nur ein reversibler Bindungsmodus erkennbar ist. Vermutlich ist das N-Ethylacrylamid zu flexibel und die Geometrie des Moleküls erlaubt es nicht eine für eine Michael-Addition optimale Orientierung zum Cys797 einzunehmen.

Zur Unterstützung der Entwicklung von Inhibitoren gegen die wirkstoffresistente T790M-Mutante sollte ebenfalls ein Kristallisationssystem für EGFR-T790M etabliert werden. Da die Kristallisation des EGFR-WT bereits realisiert werden konnte und die beiden Konstrukte lediglich in ihrer Türsteher Aminosäure unterschiedlich waren, wurde die Kristallisationsbedingung der EGFR-WT Apokristalle als Startpunkt verwendet und zusätzlich noch ein *Screening* nach weiteren alternativen Bedingungen in An- und Abwesenheit von Liganden (Abbildung 31) durchgeführt. Um das Kristallisationsfenster zu finden wurde systematisch der pH-Wert des ursprünglichen MES-Puffers (6.9 bis 7.5), die Konzentration des Fällungsmittels Na/K-Tartrat (600 mM bis 1500 mM), die Proteinkonzentration und das Verhältnis von Protein zu Kristallisationslösung im Kristallisationstropfen (Protein:Reservoir, 1:1, 1.5:1, 2:1) verändert und bei Temperaturen von 4 °C und 20 °C inkubiert. Für die Kokristallisation wurde die Proteinlösung zunächst mit den jeweiligen Inhibitoren für zwei bis drei Stunden vorinkubiert, bevor letztendlich die Kristallisationstropfen präpariert wurden. Die Zugabe der Inhibitoren erfolgte als Feststoff nach Abdampfen einer 10 mM DMSO-Stammlösung mit definierter Menge an Ligand, der anschließend direkt in der Proteinlösung resuspendiert wurde (2- bis 5-facher molarer Überschuss). Aus dieser Lösung wurde ein Aliquot abgenommen und mittels LC-MS analysiert (Abbildung 36). Die Massenspektren, die direkt aus der Kristallisationslösung bestimmt wurden, enthielten jeweils eine Hauptspezies die eindeutig dem jeweiligen Protein-Inhibitor-Addukt zuzuordnen war und was auf die anschließende Bildung von Kokristallen schließen ließ.

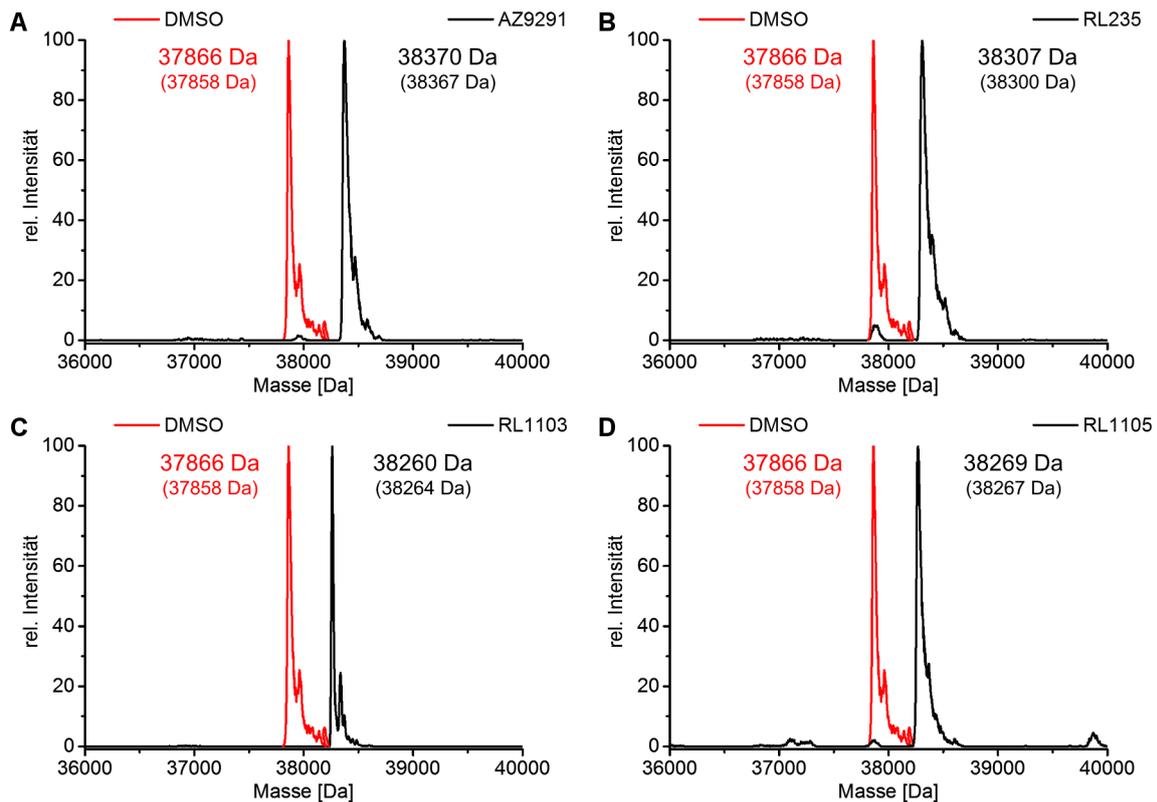


Abbildung 36. Massenspektrum einiger Kristallisationslösungen. Die zu erwartenden (theoretischen) Massen sind in Klammern dargestellt. In Rot ein Referenzspektrum von EGFR-T790M mit DMSO, in Schwarz das Spektrum des jeweiligen Inhibitors. In den vier gezeigten Spektren liegt die Masse des EGFR-Inhibitor-Komplexes im zu erwartenden Bereich. Die Reaktion des Inhibitors mit dem Protein war in den Abgebildeten Spektren praktisch vollständig (>95%) und es konnten nur Spuren von nicht modifiziertem EGFR-T790M gefunden werden.

Am häufigsten wuchsen nadelförmige Kokristalle, mit AZ9291 oder RL235 (Abbildung 37, A bis D), von kurzer kompakter Form oder feine, stark verwachsene Nadeln. Die Messungen von Datensätzen kleiner Kristalle im Bereich von < 50 μm konnte an den Röntgenbeamlines des MPI-Dortmund nicht realisiert werden. So zeigte sich bei der Messung von Datensätzen am MPI, dass die nadelförmigen Kristalle die Röntgenstrahlen nicht oder nur äußerst schwach streuten. Da zunächst nicht klar war, ob die Kristalle nicht streuten oder nur zu klein für die Messung am MPI waren, wurden ebenfalls Datensätze am Synchrotron aufgenommen. Am SLS bestätigte sich, dass keiner der Kokristalle in einer der nadelförmigen Morphologien in der Lage war die Röntgenstrahlen zu streuen. Die einzigen Kristalle, mit denen Datensätze aufgenommen werden konnten hatten eine kubische Morphologie (Abbildung 37 E), ähnlich derer der EGFR-WT Apokristalle.

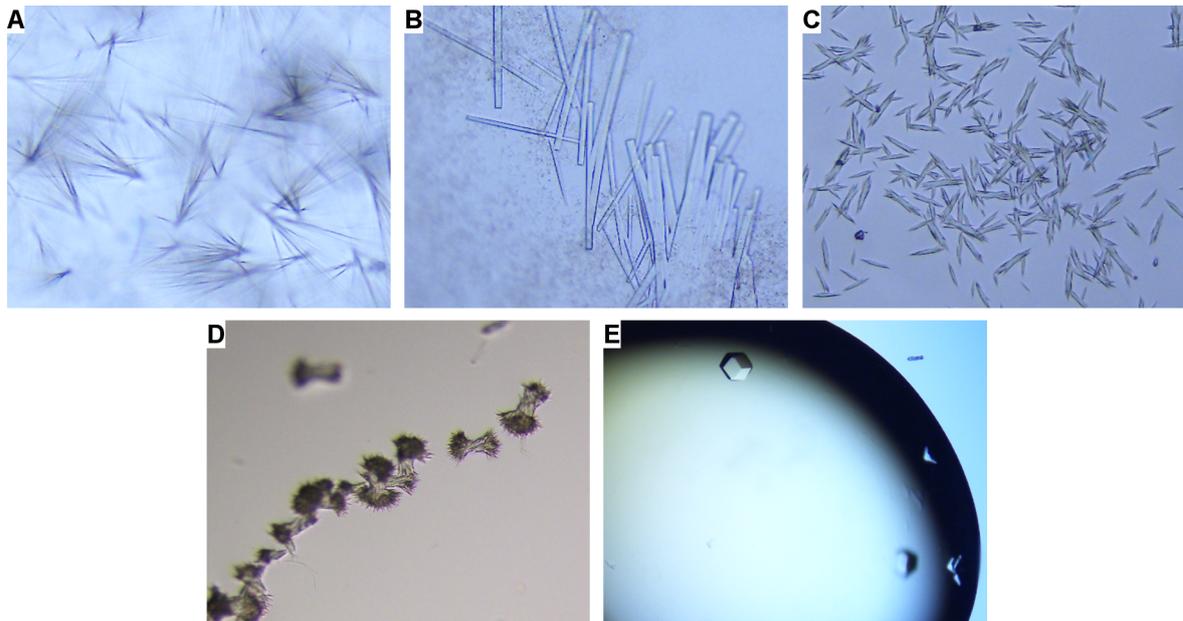


Abbildung 37. Exemplarische Übersicht der Kristallmorphologien, die während des *Fine Screens* von EGFR-T790M Kokristallen beobachtet wurden. Die Komplexkristalle wuchsen bei einer Proteinkonzentration von 3-4 mg/mL. **(A)** RL235: 950 mM Na/K-Tartrat, 100 mM MES, pH = 7,3. **(B)** AZ9291: 950 mM Na/K-Tartrat, 100 mM MES, pH = 7,2. **(C)** RL1102; 1000 mM Na/K-Tartrat, 100 mM MES, pH 7.3. **(D)** AZ9291; 800 mM Na/K-Tartrat, 100 mM MES, pH = 7,4. **(E)** RL1105; 1000 mM Na/K-Tartrat, 100 mM MES, pH 6.9.

Da die nadelförmigen Kokristalle nicht zur Strukturbestimmung genutzt werden konnten, wurde zunächst versucht die Kristallisationsbedingung der nadelförmigen Kristalle zu optimieren bzw. soweit zu modifizieren, dass sich streuende Kristalle bilden. So kann durch eine verringerte Konzentration an Fällungsmittel die Diffusionsrate des Wassers, vom Tropfen in die Reservoirolösung, verlangsamt werden. Durch eine Reduktion der Proteinkonzentration und damit der Anzahl möglicher Kristallisationskeime kann das Kristallwachstum verlangsamt werden, wodurch sich weniger und idealerweise größere Kristalle bilden. Durch Veränderungen der Konzentrationen an Fällungsmittel und Protein konnten leichte Veränderungen in der Kristallmorphologie beobachtet werden, allerdings war eine effektive Messung am MPI trotz allem nicht möglich und auch am Synchrotron konnten keine Beugungsmuster gemessen werden. Die Kristallisation bei tieferen Temperaturen kann sich ebenfalls positiv auf die Kristallisation auswirken, da die Prozesse im Kristallisationstropfen verlangsamt werden. So kann theoretisch die Bildung von Proteinpräzipitat zu Gunsten der Bildung von Kristallkeimen verlangsamt werden. Neben der Kristallisation bei 4 °C wurden auch *Micro-Seedings* und *Additive-Screens* durchgeführt. *Additive-Screens* enthalten verschiedenste Substanzen, die sich günstig auf das Kristallwachstum auswirken können. Oft sind dies niedermolekulare organische Verbindungen wie Alkohole, Polyethylenglykole, Carbohydrate, Detergenzien oder anorganische Salze. Für den *Additive-Screen* wurden Kristallisationsbedingungen gewählt in denen zuvor bereits Kristallwachstum zu beobachten war. Es zeigte sich allerdings nach einigen Tagen, dass in diesem Falle der Zusatz von Additiven

zu den Kristallisationslösungen keinen positiven Effekt auf die Kristallisation hatte, da sich mit den Additiven lediglich Proteinpräzipitat von schwacher bis starker Ausprägung bildete (Abbildung 38). Bei einer Temperatur von 4 °C wuchsen die Komplexkristalle langsamer, allerdings ohne Veränderungen in der Morphologie der Kristalle. Auch mit diesen Kristallen konnte kein Beugungsmuster aufgenommen werden. Für das *Micro-Seeding* wurden Apokristalle des EGFR-WT verwendet oder Komplexkristalle von EGFR-T790M mit RL1105. Ein interessantes, unkonventionelles Hilfsmittel zur Überführung der *Seeding*-Kristalle in den Kristallisationstropfen sind Katzenschnurrhaare. An der feinen, schuppigen Struktur des Haares sollen mikroskopisch kleine Kristallpartikel der *Seeding*-Kristalle anhaften, die sich bei der Überführung in den Kristallisationstropfen vom Haar ablösen und das Wachstum neuer Kristalle induzieren (Abbildung 38).

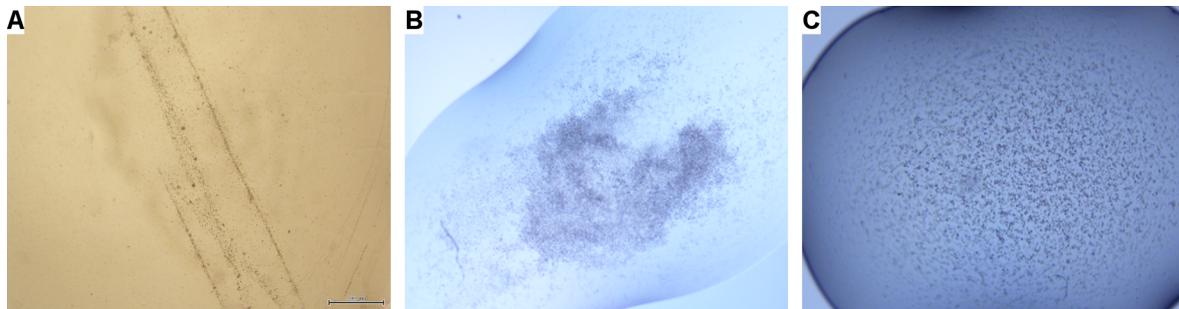


Abbildung 38. Beispielbilder der Kristallisationsversuche des *Micro Seeding* und *Additive Screens* für EGFR-T790M. **(A)** Katzenhaar-*Micro-Seeding* mit RL1105-Kokristallen von EGFR-T790M im Komplex mit RL235. **(B)** *Micro-Seeding* mit RL1105-Kokristallen von EGFR-T790M im Komplex mit AZ9291. **(C)** EGFR-T790M kokristallisiert mit RL235. 1100 mM Na/K-Tartrat, 100 mM MES, pH = 7.2, Additive: 100 mM Na-Acetat, pH = 4.6, 240 mM Na-Thiocyanat.

Auch bei diesem Ansatz kam es nicht zu Kristallwachstum, da sich die *Seeding*-Kristalle im Tropfen auflösten oder sich ausschließlich Proteinpräzipitat bildete (Abbildung 38). Bei den Kristallisationsversuchen mit den Verbindungen RL1103 und RL1105 bildeten sich hingegen kubische Komplexkristalle, mit denen am SLS Datensätze gemessen und die Struktur aufgeklärt werden konnte (Abbildung 39).

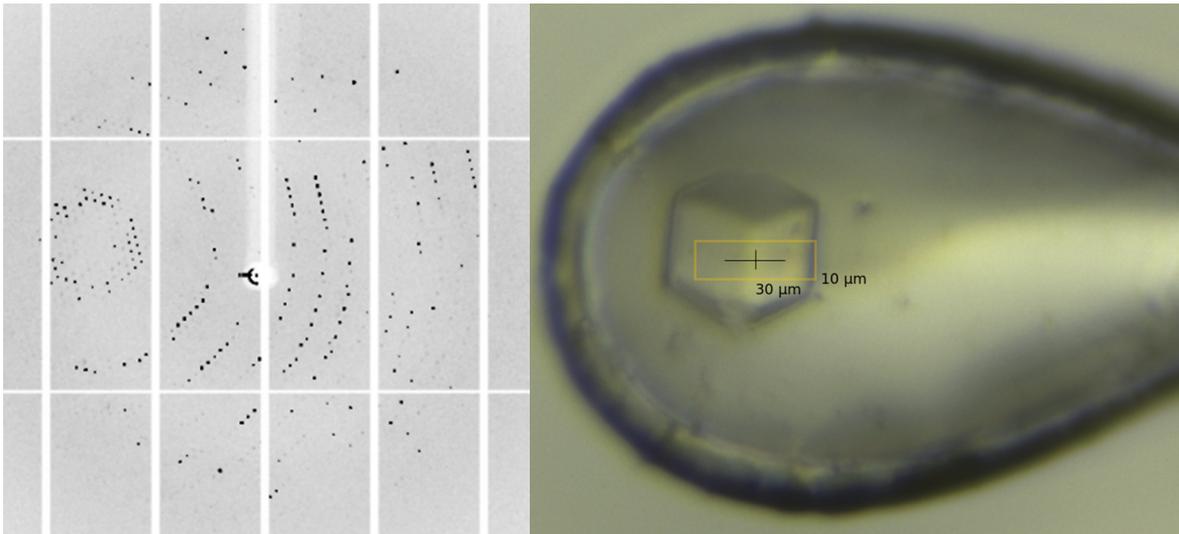


Abbildung 39. Beispiel eines Diffractionsmusters von EGFR-T790M mit RL1103 und ein Bild des Kristalls im Nylonloop bei der Aufnahme des Datensatzes.

In den beiden Strukturen von EGFR-T790M im Komplex mit RL1103 und RL1105 ist jeweils klar die Elektronendichte erkennbar, die vom Cys797 zum Inhibitor reicht und die kovalente Bindung beweist (Abbildung 40 und Abbildung 41). Die Aminosäuren Gln791 und Met793 im Peptidrückgrat der Scharnierregion formen zwei Wasserstoffbrücken zum primären Amin und zum N6 des Pyrazolopyrimidins.

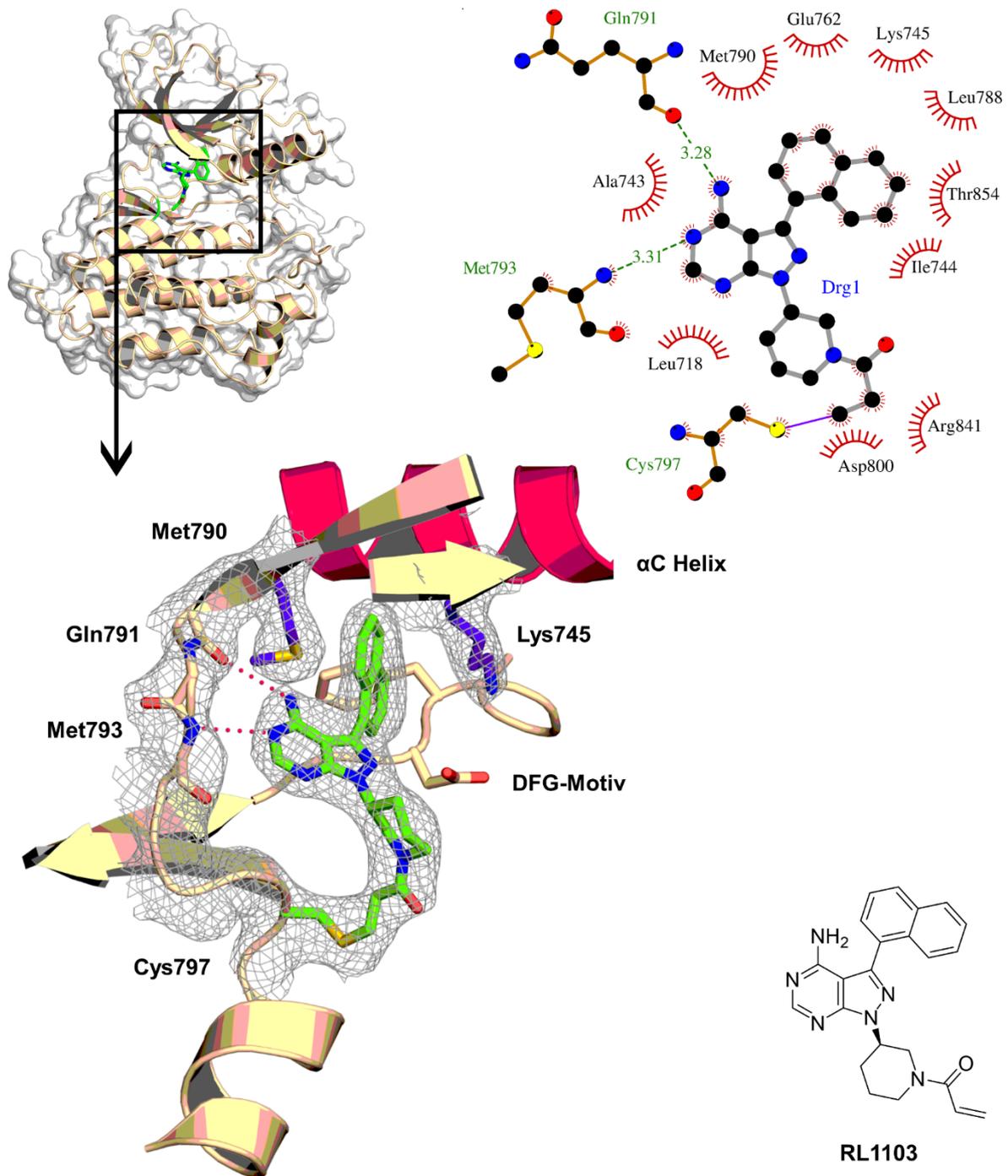


Abbildung 40. Kristallstruktur von EGFR-T790M im Komplex mit RL1103. Abgebildet ist der Ligand mit einem Ausschnitt seiner Elektronendichte (graues Netz). Charakteristisch sind die Wasserstoffbrücken zur Scharnierregion (rot gepunktete Linie). Zusätzlich markiert sind, die α C Helix (Magenta), der Türsteher Met790 und das katalytische Lys745 (Purpur). Die Elektronendichte für den Inhibitor zeigt klar die kovalente Bindung an Cys797. Im oberen Bereich ist der *LigPlot*^[154] des Liganden gezeigt. Im *LigPlot* sind schematisch die verschiedenen Interaktionen des Liganden mit Aminosäuren am Rande der ATP-Bindetasche dargestellt, als rote Halbkreise die hydrophoben Interaktionen, in Grün die Wasserstoffbrückenbindungen (Länge in Å).

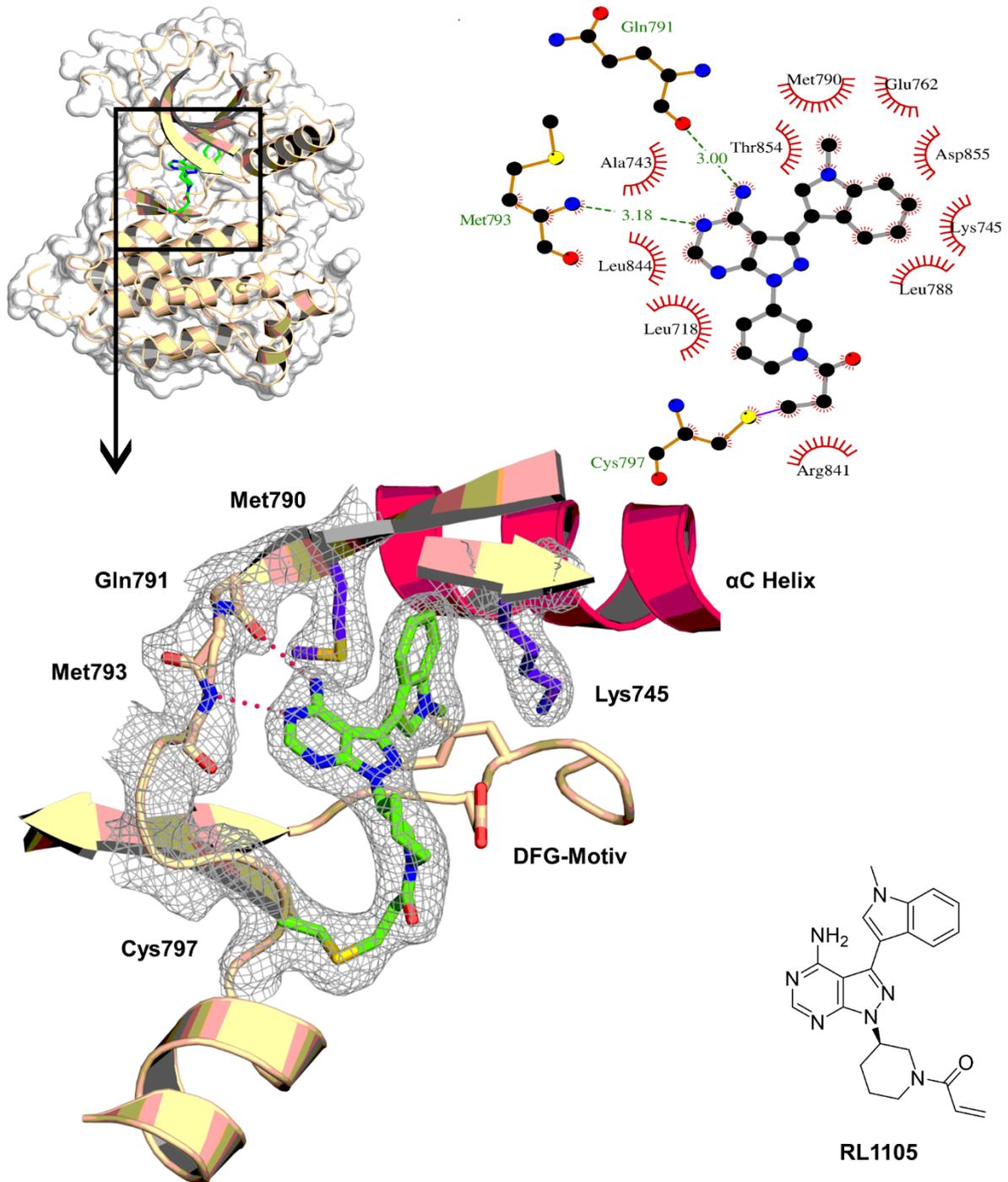


Abbildung 41. Kristallstruktur von EGFR-T790M im Komplex mit RL1105. Abgebildet ist der Ligand mit einem Ausschnitt seiner Elektronendichte (graues Netz). Charakteristisch sind die Wasserstoffbrücken zur Scharnierregion (rot gepunktete Linie). Zusätzlich markiert sind, die α C Helix (Magenta), der Türsteher Met790 und das katalytische Lys745 (Purpur). Die Elektronendichte für den Inhibitor zeigt klar die kovalente Bindung an Cys797. Im unteren Bereich ist der *LigPlot*^[154] des Liganden gezeigt. Im *LigPlot* sind schematisch die verschiedenen Interaktionen des Liganden mit Aminosäuren am Rande der ATP-Bindetasche dargestellt, als rote Halbkreise die hydrophoben Interaktionen, in Grün die Wasserstoffbrückenbindungen (Länge in Å).

Chinolin/Chinazolin EGFR-Inhibitoren der ersten Generation verlieren durch die Punktmutation T790M an Wirkung, da die kleinere Seitenkette des Thr790 durch die größere, raumfordernde Seitenkette des Methionins ersetzt wird und sich darüber hinaus der ATP- K_m durch die Mutation absenkt. Die Inhibitoren verlieren an Effektivität, da sie nicht mehr die optimale Bindungsgeometrie zur Scharnierregion einnehmen können sowie einer gesteigerten ATP-Affinität und Konkurrenz um die Bindestelle gegenüber stehen. Ein wichtiges Detail bei den Pyrazolopyrimidinen RL1103 und RL1105 ist ihr Bindungsmodus im Hinblick auf die Geometrie der Naphthyl- und Indolgruppe, die etwa im 90° Winkel zum Pyrazolopyrimidin-Kern steht und zwischen Met790 und Lys745 eingeschlossen wird. Weitere Verbindungen, die ebenfalls gegenüber der T790M-Mutante inhibitorische Aktivität zeigen (z.B. AZ9291) vermeiden die Belegung des Bereichs, der vom Methionin-Türsteher eingenommen wird. Durch die vorteilhafte Interaktion der Naphthyl- und Indolgruppe mit Met790 und Lys745 konnte eine Eigenschaft genutzt werden, die spezifisch für die wirkstoffresistente Mutante ist, um dadurch höhere Potenz gegenüber dieser zu erreichen. Weiterhin kann hierdurch die Selektivität gegenüber dem Wildtyp erhöht werden (vgl. Tabelle 2), was möglicherweise helfen könnte sogenannte *adverse effects* oder negative Effekte zu reduzieren.

Tabelle 2. Übersicht über IC_{50} und K_i der zur Kristallisation verwendeten Inhibitoren. Die Daten wurden von Marina Keul mittels eines aktivitätsbasierten Assays (HTRF KinEASE-TK, Cisbio) wie in Engel et al. beschrieben generiert. ^[155,158] *nv*: nicht verfügbar.

Inhibitor	EGFR	IC_{50} [nM]	K_i [nM]
RL235	WT	>10000	<i>nv</i>
	L858R/T790M	500 ± 300	0.64 ± 0.30
RL1103	WT	58 ± 13	47 ± 5.8
	L858R/T790M	1.9 ± 0.8	58 ± 3.3
RL1105	WT	35 ± 14	25 ± 7.2
	L858R/T790M	2.5 ± 1.4	16 ± 5.2
AZ9291	WT	2 ± 0.2	14 ± 2.3
	L858R/T790M	<1	1.5 ± 0.1

Tabelle 3. Statistiken zur Datensammlung und Verfeinerung der EGFR-Komplexstrukturen, falls vorhanden mit der PDB-ID in Klammern.

Konstrukt Inhibitor, PDB-ID in Klammern	EGFR-WT		EGFR-T790M	
	RL235	RL1075	RL1103 (5J9Z)	RL1105 (5J9Y)
Datensammlung				
Raumgruppe	I 2 3	I 2 3	I 2 3	I 2 3
Einheitszelle				
<i>a, b, c</i> (Å)	145.87, 145.87, 145.87	148.20, 148.20, 148.20	144.39, 144.39, 144.39	146.46, 146.46, 146.46
α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00	90.00, 90.00, 90.00
Auflösung (Å)	46.13 - 4.00 (4.11 - 4.00)	46.86 - 3.70 (3.79 - 3.70)	45.66 - 2.80 (2.87 - 2.80) ^a	46.31 - 2.50 (2.57 - 2.50) ^a
<i>CC</i> (1/2)	99.9 (81.4)	99.8 (49.4)	99.9 (61.7)	100.0 (84.2)
<i>I</i> / σ <i>I</i>	30.13 (3.18)	11.9 (1.3)	18.1 (1.7)	28.4 (2.8)
Vollständigkeit (%)	100.0 (100.0)	100.0 (99.8)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundanz	16.90 (5.41)	20.2 (19.8)	20.1 (19.5)	40.6 (42.0)
Verfeinerung				
Auflösung (Å)	46.13 - 4.00	46.86 - 4.00	45.66 - 2.80	46.32 - 2.50
Anzahl an Reflexen	27285	19713	11875	17313
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	24.21 / 31.96	22.09 / 32.65	18.8 / 23.4	20.3 / 24.6
Anzahl an Atomen				
Protein	2147	2077	2410	2333
Ligand/ion	32	25	30	30
Wasser	-	-	12	21
<i>B</i> -Faktoren	85.7	125.7	74.52	60.80
Protein	85.4	169.6	74.76	53.26
Ligand/ion	108.5	125.2	62.72	53.26
Wasser	-	-	57.57	50.74
R.m.s. Abweichungen				
Bindungslänge (Å)	0.0094	0.0116	0.0127	0.0172
Bindungswinkel (°)	1.5509	1.6856	1.6627	1.7747
Wellenlänge (Å)	0.999	0.979	0.920	0.919
Temperatur	100K	100K	100K	100K
Röntgenquelle	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA	SLS X10SA
Ramachandran-Auftragung:				
Seitenketten in				
bevorzugten Regionen	84.3%	82.0%	86.6%	90.4%
zusätzlich erlaubten Regionen	13.4%	16.5%	12.2%	9.2%
generell erlaubten Regionen	1.6%	1.5%	1.0%	0.4%
unerlaubten Regionen	0.8%	0.0%	0.0%	0.0%

Für alle EGFR-Komplexstrukturen wurden Diffraktionsdaten eines Einzelkristalls genutzt, um die Struktur zu lösen. Werte in Klammern repräsentieren die Auflösung für die höchste Schale.

4.4 Zusammenfassung

Um die strukturbasierte Entwicklung neuer Inhibitoren gegen wirkstoffresistente Krebszellen voranzutreiben wurde ein Kristallisationssystem für EGFR-WT und EGFR-T790M entwickelt. Es war möglich einige der potentesten Inhibitoren aus dem Arbeitskreis in EGFR-T790M zu kristallisieren und deren Bindungsmodi aufzuklären. Die aktuellste Generation von Inhibitoren (z.B. AZ9291), die sich in späten Phasen der klinischen Entwicklung befinden zeigt eine hohe inhibitorische Potenz gegenüber der EGFR-T790M Mutante, jedoch auch auf dem EGFR-Wildtyp. Dies birgt die Gefahr, dass Patienten schwere Nebenwirkungen erleiden die aus der Inhibition des EGFR-Wildtyp in gesunden Zellen resultieren. Die kristallisierten Verbindungen RL1103 und RL1105 zeigen einen einzigartigen Bindungsmodus und liefern die Erklärung für die herausragenden inhibitorischen Eigenschaften dieser Verbindungen. Als irreversible Inhibitoren, die eine kovalente Bindung zu Cys797 ausbilden, haben RL1103 und RL1105 bereits eine hohe Potenz von etwa 2 nM auf der T790M-Mutante. Besonders hervorzuheben ist jedoch die etwa 15 bis 30fache Selektivität gegenüber dem Wildtyp. Die hohe Selektivität wird durch eine direkte Interaktion des Inhibitors mit dem katalytischen Lysin und dem Methionin-Türsteherrest in EGFR-T790M (Threonin im Wildtyp) erreicht. Dieses Inhibitor-Design, welches spezifische Eigenschaften der Erlotinib-resistenten Mutanten adressiert, kann möglicherweise einen fundamentalen Beitrag leisten um in Zukunft effektivere Behandlungen von NSCLC Patienten zu ermöglichen, die mit einem geringeren Risiko an toxischen Nebenwirkungen verbunden sind.

5 Identifikation neuer HER2-Inhibitoren

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) ist nicht nur ein wichtiger Interaktionspartner im Signalweg von EGFR, sondern ebenfalls ein Onkogen und wird in einer fehlregulierten Form z.B. in Brustkrebs oder Lungenkrebs gefunden.^[13,90] Aufgrund der hohen Ähnlichkeit innerhalb der HER-Familie haben EGFR-Inhibitoren oft noch eine relativ hohe Aktivität auf den anderen HER-Proteinen (Pan-HER Inhibitoren, z.B. Afatinib, Canertinib, Neratinib).^[159] Auch wenn ein Inhibitor über das gesamte Kinom eine hohe Selektivität für die HER-Familie zeigt, so kann eine geringe Selektivität innerhalb der HER-Familie ebenfalls zu unerwünschten Effekten führen.^[160,161] Als Onkogen wird HER2 im humanen Kontext häufig in seiner amplifizierten Form oder mit einer Insertionsmutation im Exon 20 gefunden. Eine medizinisch bedeutende Aktivierungsmutation in HER2 ist die Exon 20 Insertion A775_G776insYVMA nahe der α C Helix, die auch im Kontext der erworbenen Erlotinib-Wirkstoffresistenz in NSCLC gefunden wird.^[162] Warum eine *in frame* Insertion im Exon 20 zu einer erhöhten Kinaseaktivität führt ist bislang nicht mit absoluter Sicherheit geklärt. Eine mögliche Erklärung ist eine Interferenz mit dem Regulationsmechanismus des HER2-Rezeptors. Innerhalb der Kinasedomäne vollzieht die α C Helix eine Konformationsänderung beim Übergang vom inaktiven in den aktiven Zustand, wobei die α C Helix in Richtung der ATP-Bindetasche geneigt wird (Abbildung 42).^[163] Durch die Insertion wird das dynamische Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Konformation zur Seite der aktiven Konformation verlagert und durch die erhöhte Kinaseaktivität erhöht sich in Folge auch Signaltransduktion durch den Rezeptor. Die zielgerichtete Therapie bei einer HER2-Amplifikation besteht derzeit aus der Gabe monoklonaler Antikörper (z.B. Trastuzumab) oder aus der Gabe von Lapatinib. Eine effektive, zielgerichtete Therapie von HER2 Exon 20 Insertionsmutanten wäre ein weiterer Meilenstein in der Krebstherapie. Zur gezielten Behandlung der, Lapatinib unsensitiven, Insertionsmutante befinden sich aktuell einige Pan-HER Inhibitoren in der klinischen Erprobung, dazu zählen Neratinib und Afatinib.^[164-166] Diese wurden ursprünglich als Inhibitoren gegen EGFR-T790M entwickelt, waren allerdings in diesem Kontext, und im Vergleich zu anderen TKI wie z.B. AZ9291, nicht hinreichend effektiv.^[167] Ob es einer der genannten TKI in naher Zukunft schafft für die Behandlung von HER2 Exon20 Mutationen zugelassen zu werden bleibt allerdings abzuwarten. Viele der momentan untersuchten TKIs wurden ursprünglich als EGFR-Inhibitoren entwickelt und werden aufgrund ihrer geringeren Selektivität in der HER-Familie in weiteren assoziierten Indikationen getestet.^[164] Eine gezielte Entwicklung neuer, selektiver und für HER2-Mutanten optimierte Inhibitoren könnte eine bessere, verträglichere Therapie

für die Patienten liefern. Ziel des HER2 Projektes war die Anwendung eines aktivitätsbasierten Assays zur Identifikation neuer Strukturen als spezifische HER2 A775_G776insYVMA Inhibitoren und damit einhergehend die Entwicklung geeigneter HER2-Konstrukte für Assay und Kristallisation, um im Idealfall die Bindungsmodi der neu identifizierten Verbindungen aufzuklären und als Startpunkt für die strukturbasierte Wirkstoffentwicklung zu evaluieren.

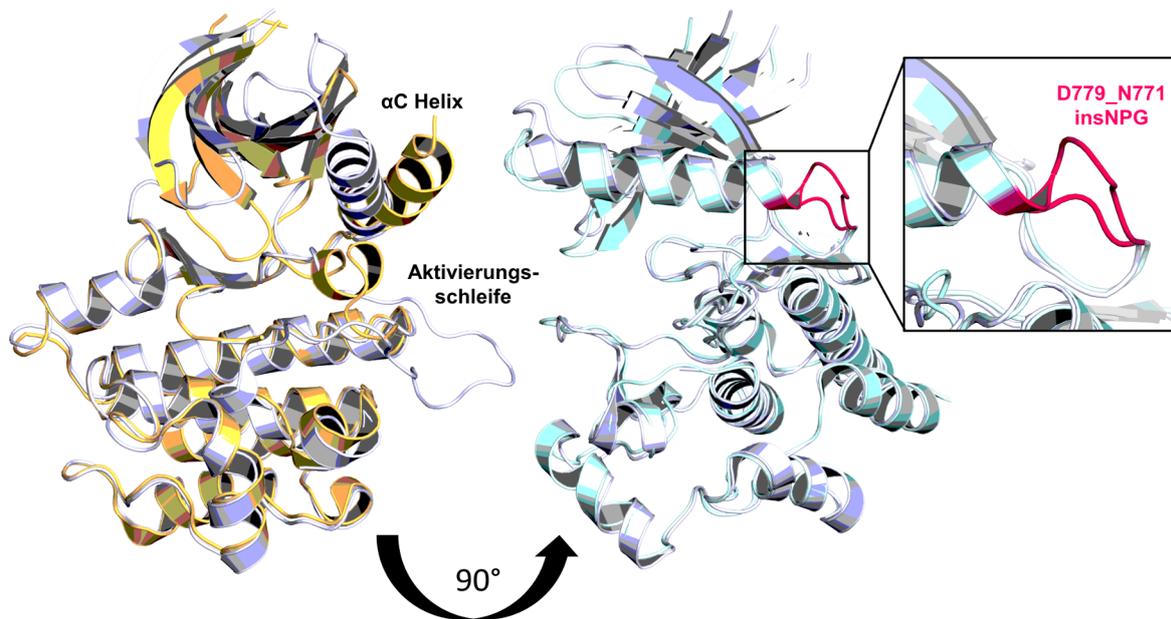


Abbildung 42. Die Überlagerung der inaktiven (Orange) und der aktiven (Hellblau) Konformation von EGFR zeigt die strukturellen Unterschiede. Charakteristisch für die inaktive Konformation sind das kurze helikale Segment in der Aktivierungsschleife und die Orientierung der α C Helix. In der aktiven Konformation ist die Aktivierungsschleife unstrukturiert und die α C Helix ist näher zur ATP-Bindetasche orientiert. Die Überlagerung mit der Struktur der EGFR Exon 20 Insertionsmutante (Cyan) zeigt die Lokalisierung der Insertion am N-terminalen Ende der α C Helix (Magenta) und die kurze Schleife die sich durch die Insertion bildet. (PDB-ID, modifiziert: 1XKK, 1M14, 4LRM).

5.1 Konstruktdesign und Expression von HER2 in Insektenzellen

Die verwendeten HER2-Konstrukte sollten sowohl für die Kristallisation als auch für den aktivitätsbasierten Assay verwendet werden und umfassten die Kinasedomäne mit den Aminosäuren 712 bis 1029 (basierend auf Uniprot Eintrag P04626, angelehnt an literaturbekannte Konstrukte). Zur erleichterten Isolierung aus den Insektenzellen wurde ein C-terminaler Hexahistidin-Tag eingefügt. Die Konstrukte wurden von *GeneArt* (ThermoFisher) synthetisiert und anschließend in die pIEx/Bac3 Transfervektoren kloniert. Die DPF übernahm anschließend die Transfektionen zur Generierung des rekombinanten Baculovirus, sowie die Expressionsanalysen (vgl. Kapitel 3.2).

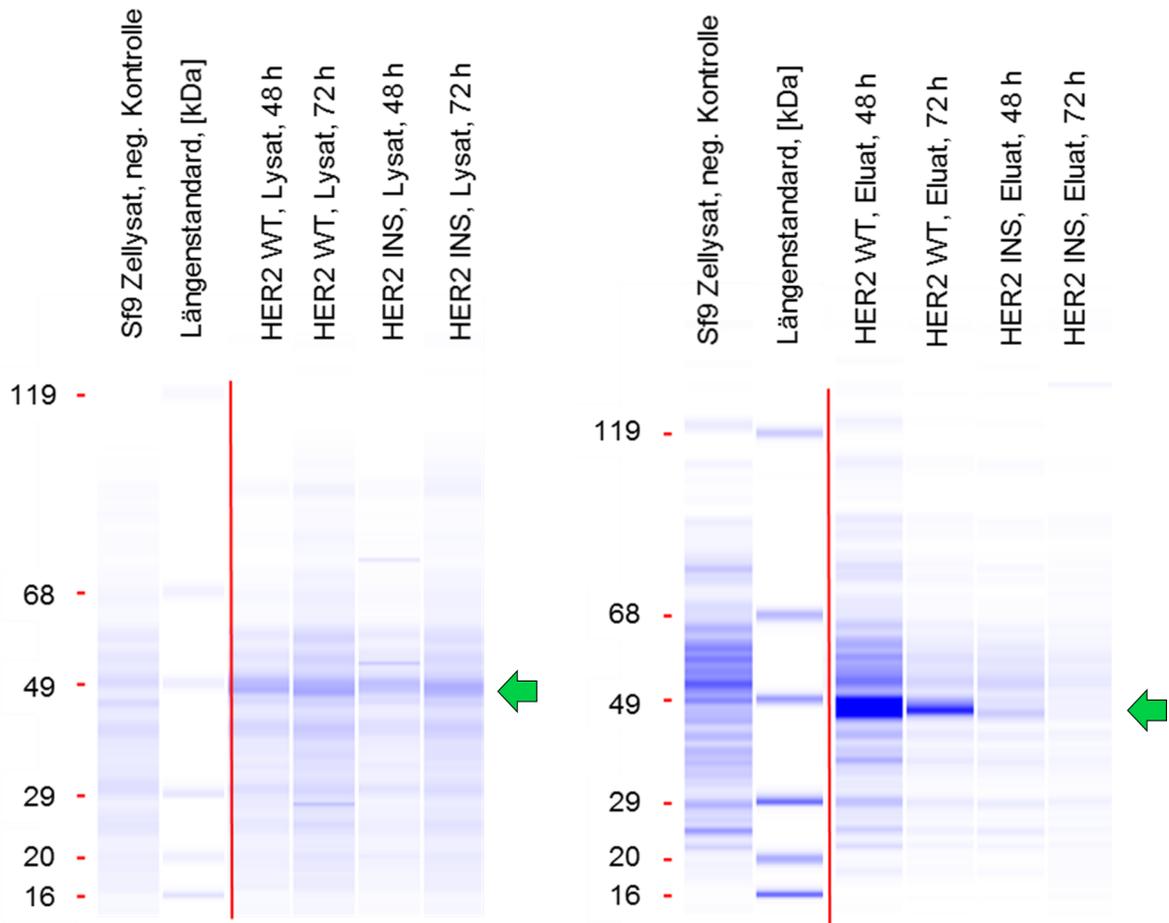


Abbildung 43. Expressionsanalyse mittels Kapillarelektrophorese von HER2-WT und HER2-INS in Sf9 Insektenzellen. Für beide Konstrukte ist im Lysat nach einer Expressionszeit von 48 h eine Bande mit dem korrespondierenden Molekulargewicht zu HER2-WT (ca. 38 kDa) und HER2-INS (ca. 39 kDa) zu erkennen (grüne Pfeile). Für HER2-WT ist im Eluat eine intensive Bande nach 48 h Expressionszeit zu beobachten. Für HER2-INS ist im Eluat nur eine sehr schwache Bande nach 48 h erkennbar.

Im Lysat der HER2 Expressionen sind für den Wildtyp und die Insertionsmutante nach 48 h und 72 h korrespondierende Banden bei ca. 38 kDa erkennbar, die eine Überexpression des jeweiligen Konstrukts zeigen (grüne Pfeile, Abbildung 43). Beim Vergleich der Banden der Eluate ist allerdings nur eine intensive Bande für den HER2-WT nach 48 h Expressionszeit erkennbar, für HER2 A775_G776insYVMA (HER2-INS) ist hingegen nur eine schwache Bande sichtbar, mit ähnlicher Intensität wie der Hintergrund. Offenbar hat die Insertion von vier zusätzlichen Aminosäuren im Exon 20 einen destabilisierenden Effekt auf das HER2-Konstrukt, so dass nur ein vergleichsweise geringer Anteil an löslichem Protein im Bindungsassay detektierbar war. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Zellen bei der präparativen Expression nach 48 h geerntet.

5.2 Reinigung der HER2-Konstrukte

Die HER2-Konstrukte wurden analog der Reinigungsprozedur für EGFR durch eine Kombination verschiedener chromatographischer Methoden aus den Insektenzellen isoliert. Im Folgenden wird der Prozess beispielhaft am HER2-Wildtyp besprochen (siehe Anhang für Details zu Methoden und Pufferzusammensetzungen, Kapitel 6.7.2).

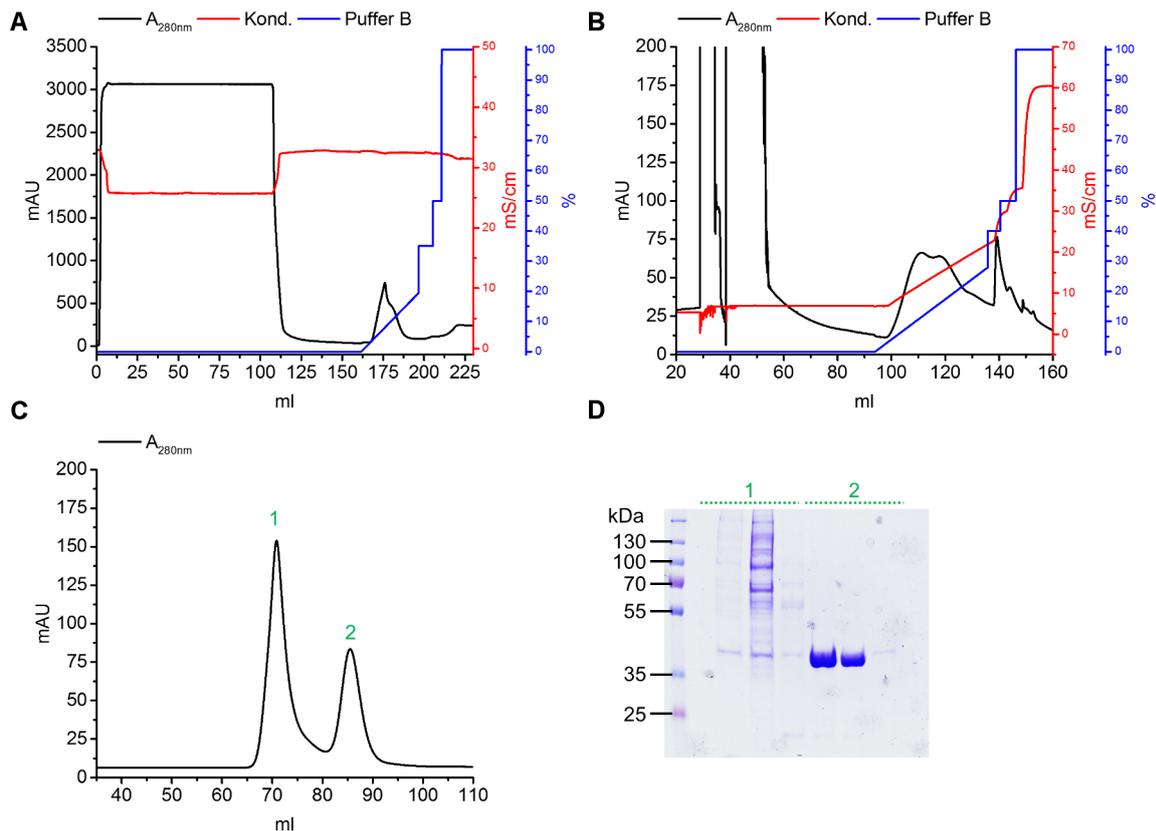


Abbildung 44. (A) Chromatogramm der Ni²⁺-Affinitätschromatographie des HER2-WT-Konstrukts (38 kDa). Schwarz: UV-Absorption bei 280 nm; Rot: Leitfähigkeit; Blau: Anteil Elutionspuffer (500 mM Imidazol). (B) Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie des HER2-WT-Konstrukts. Schwarz: UV-Absorption bei 280 nm; Rot: Leitfähigkeit; Blau: Anteil Elutionspuffer (1 M Natriumchlorid). (C) Größenausschlusschromatographie des Eluats aus der Anionenaustauschchromatographie. (D) SDS-Page einiger Fraktionen aus den Peaks (1) und (2) der SEC. Der zweite Peak im Chromatogramm der SEC enthält zu HER2-WT korrespondierende Banden in Höhe von 38 kDa.

Im ersten Schritt konnte der HER2-WT durch eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie aus dem Zellysat angereichert werden (Abbildung 44, A). Im Zuge der Probenvorbereitung für die Anionenaustauschchromatographie wurde das Eluat der Ni²⁺-Säule zunächst gegen einen Puffer mit niedriger Salzkonzentration dialysiert. Nachdem der Durchfluss des Dialysats die Anionentauschersäule passiert hatte, wurden die gebundenen Proteine mittels eines Natriumchloridgradienten eluiert. Im Chromatogramm sind einige starke Artefakt-Signale im UV-Kanal sichtbar, die vermutlich auf Partikel im Puffer zurückzuführen waren die sich

während der Chromatographie im System gebildet hatten. Im Elutionspeak waren zwei Spezies erkennbar, die aber nicht vollständig getrennt wurden. Die Fraktionen des Eluats wurden daher vereint, konzentriert und im nächsten Schritt mittels Größenausschlusschromatographie weiter prozessiert. Das Eluat aus der Anionenaustauschchromatographie wurde in der Größenausschlusschromatographie in zwei Peaks aufgetrennt. Im Gel der SDS-Page sind für den ersten Peak größtenteils Banden von Verunreinigungen mit höherem Molekulargewicht sichtbar und nur Spuren des HER2-WT bei etwa 38 kDa. Im Gel mit Proben aus dem zweiten Peak ist das HER2-WT Protein in hoher Reinheit enthalten. Am Ende konnten ca. 3 bis 4 mg HER2-WT aus einer 2.5 L Insektenzellkultur isoliert werden, im Falle von HER2-INS waren es hingegen nur etwa 0.4 mg.

5.3 Kristallisation des HER2-Wildtyp

Auch bei der Suche und späteren Weiterentwicklung von neuen mutantenspezifischen HER2-Inhibitoren sind Kristallisationsversuche von großer Hilfe. Daher wurden die in der Literatur beschriebenen Kristallisationsbedingungen^[168] getestet und parallel dazu ein *Screening* nach neuen Bedingungen durchgeführt um Apo- und Komplexkristalle zu erzeugen. Die Ausbeuten vom Wildtyp und der Insertionsmutante bei der heterologen Expression in Insektenzellen waren höchst unterschiedlich, wobei die Ausbeute für den Wildtyp deutlich über der der Mutante lag (4 mg bzw. 0.4 mg). Ein kritischer Parameter bei der Proteinkristallisation ist die Bereitstellung einer ausreichenden Menge an Proteinlösung mit entsprechend hoher Konzentration, um die Löslichkeitsgrenze im Kristallisationsprozess schnell zu übersteigen. Der Wildtyp konnte bis zu einer Konzentration von 9 bis 10 mg/mL durch langsames, schrittweises konzentrieren erreicht werden. Teile der im folgenden beschriebenen Arbeiten sind im Rahmen der Bachelorarbeit von T.M. Wunderlich im Jahre 2015 entstanden.^[169]

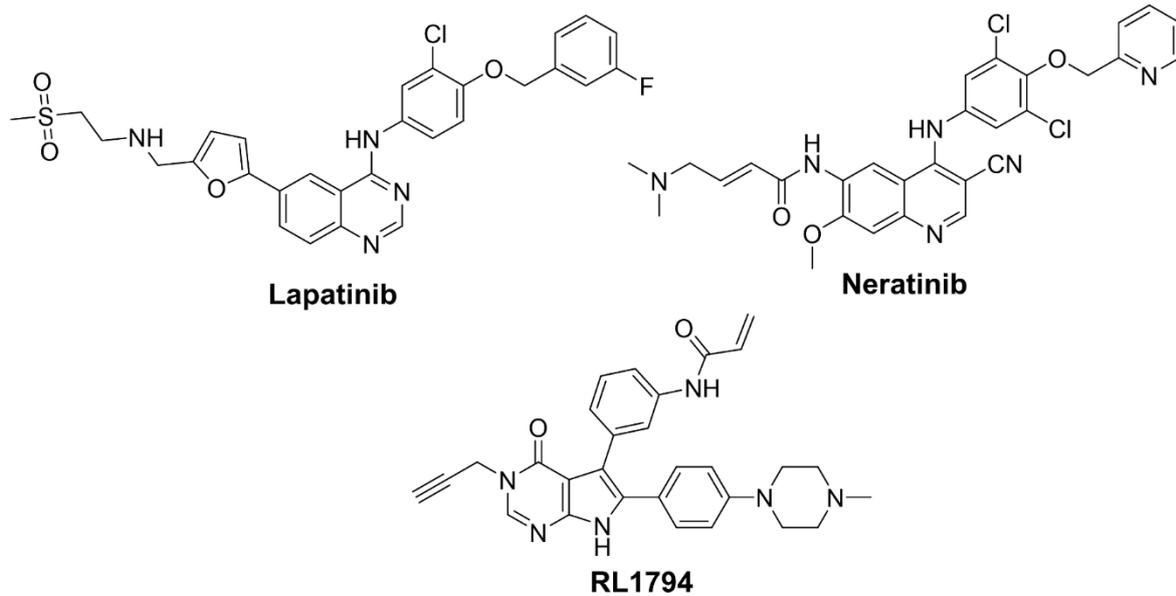


Abbildung 45. Chemische Strukturen der für die HER2-Kokristallisation verwendeten Verbindungen.

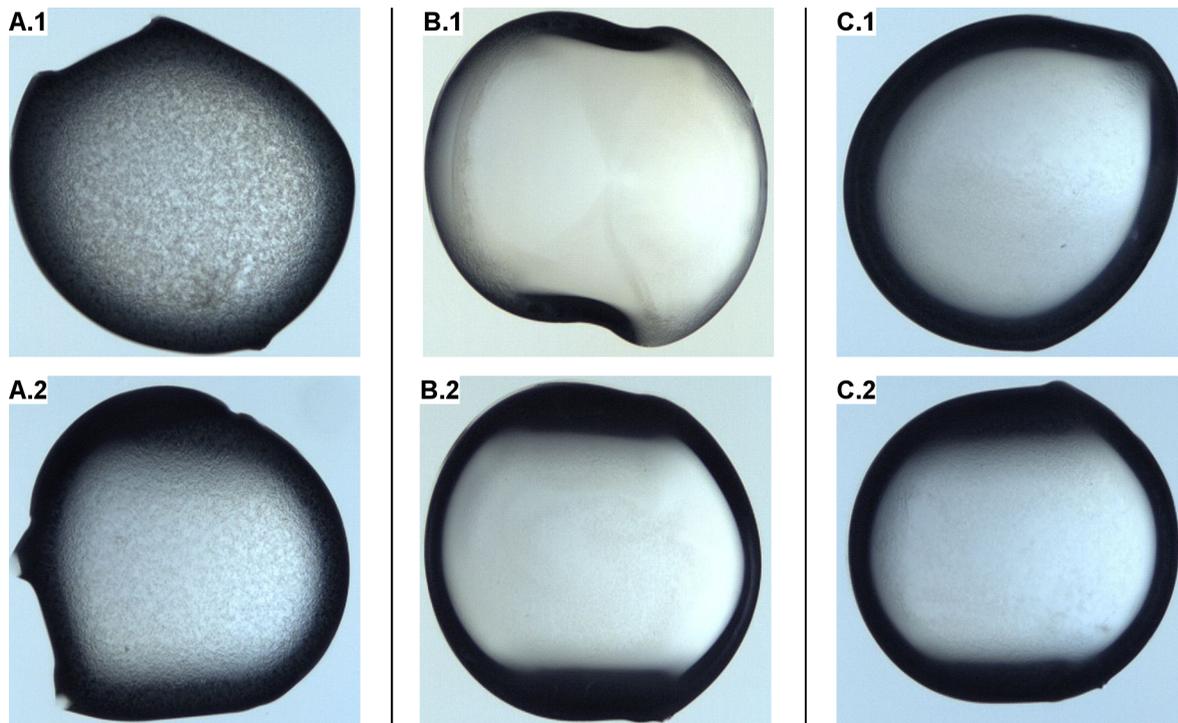


Abbildung 46. Beispielergebnisse aus dem HER2-WT Screen im Komplex mit RL1794. **(1)** 7 mg/mL und **(2)** 3.5 mg/mL Proteinkonzentration. **(A)** 20 % Ethylenglycol, **(B)** 0.1 M Phosphat-Citrat, 2 M Ammoniumsulfat, **(C)** 0.1 M TRIS, 0.01 M Nickel(II)chlorid, 1 M Lithiumsulfat.

Um Bedingungen zur Kokristallisation des HER2-WT zu identifizieren wurden etwa 1000 Bedingungen durchmustert, in denen Proteinkonzentrationen von 7 mg/mL und 3.5 mg/mL mit dem Apoprotein und verschiedenen Inhibitoren eingesetzt wurden. Getestet wurden neben den in der Literatur bekannten Inhibitoren Lapatinib und Neratinib auch der im AK-Rauh synthetisierte Inhibitor RL1794 (Abbildung 46). Im *Screen* konnten keine

Bedingungen identifiziert werden, in denen es zu Kristallwachstum kam. Einige Bedingungen zeigten mehr oder minder stark ausgeprägte Proteinpräzipitation, andere Bedingungen blieben klar und ohne Reaktion. Weitere Kokristallisationsversuche mit RL1794, Lapatinib und Neratinib wurden unternommen, angelehnt an literaturbekannte Bedingungen (Abbildung 47). Das Verhalten der Tropfen bzw. des Proteins im Tropfen war über die verschiedenen *Fine-Screens* sehr inkonsistent. Bei grundsätzlich gleichem Aufbau der *Screens* konnten keine Trends beobachtet werden, weder bei Änderungen des pH-Werts, der Fällungsmittelkonzentration oder der Proteinkonzentration.

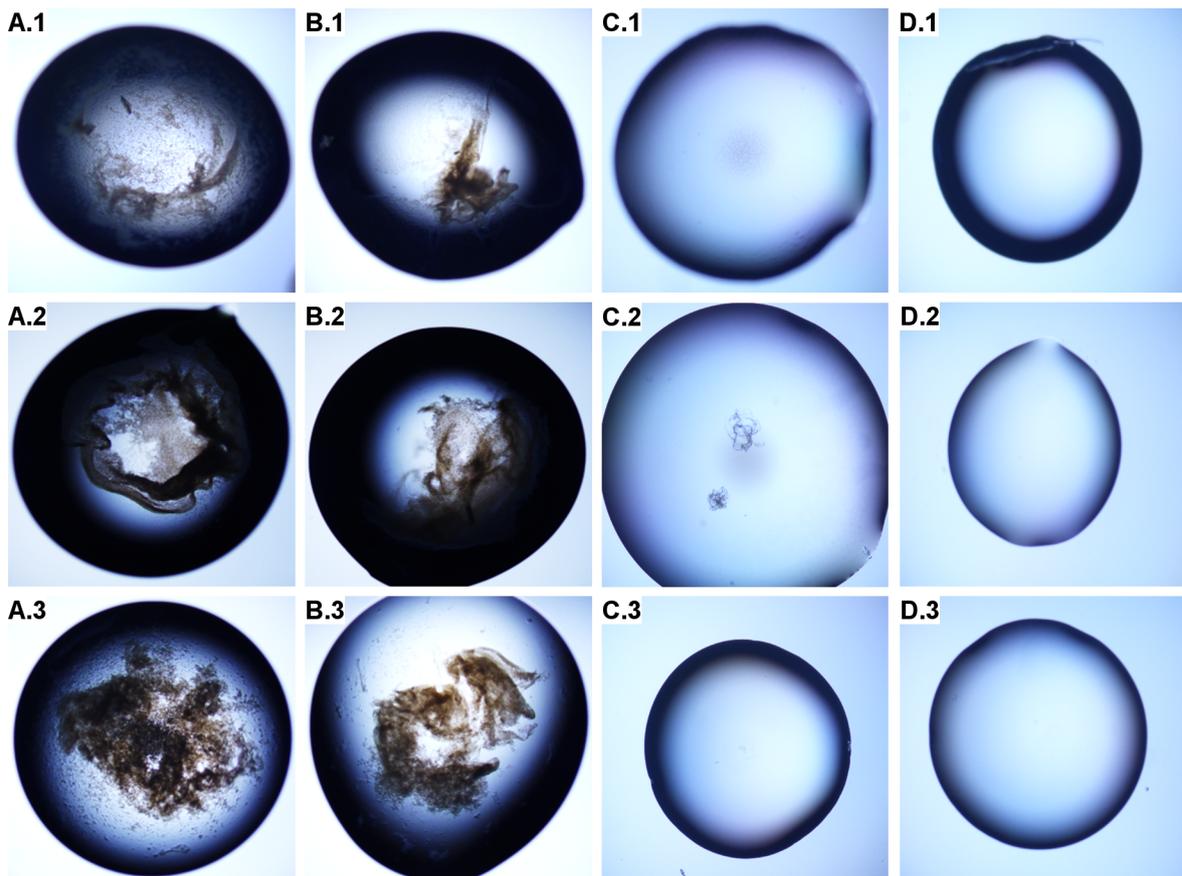


Abbildung 47. Beispielhafte Ergebnisse der Kristallisationsversuche von HER2-WT.^[25] **(A.1) - (A.3)** Apokristallisation. pH 6.4, 14 % / pH 6.5, 18 % / pH 6.6, 22 % PEG3350, mit 0.2 M $(\text{NH}_4)_2\text{Tartrat}$, 0.1 M PIPES, Apokristallisation, 7 mg/mL Protein, nach 2 Tagen Inkubation. **(B.1) - (B.3)** Lapatinib Kokristallisation. pH 6.4, 14 % / pH 6.5, 18 % / pH 6.6, 22 % PEG3350, mit 0.15 M $(\text{NH}_4)_2\text{Tartrat}$, 0.05 M $\text{Na}_2\text{Tartrat}$, 0.1 M Bis-TRIS, 7 mg/mL Protein, nach 2 Tagen Inkubation. **(C.1) - (C.3)** Neratinib Kokristallisation. pH 6.2, 11 %, / pH 6.7, 17 % / pH 7.2, 23 % PEG3350, mit 0.15 M $(\text{NH}_4)_2\text{Tartrat}$, 0.05 M $\text{Na}_2\text{Tartrat}$, 0.1 M Bis-TRIS, 7 mg/mL Protein, nach 20 Tagen Inkubation. **(D.1) - (D.3)** Neratinib Kokristallisation. pH 6.2, 11 %, / pH 6.7, 17 % / pH 7.2, 23 % PEG3350, mit 0.15 M $(\text{NH}_4)_2\text{Tartrat}$, 0.05 M $\text{Na}_2\text{Tartrat}$, 0.1 M Bis-TRIS, 3 mg/mL Protein, nach 20 Tagen Inkubation.

Bei Proteinkonzentrationen von 3 mg/mL blieben die Tropfen klar, wohingegen bei einer Konzentration von 7 mg/mL einige Tropfen starke Präzipitation zeigten. Allerdings blieben gleichzeitig andere Tropfen bei 7 mg/mL klar oder zeigten nur wenig Proteinpräzipitat. Daher wurden auch höhere Konzentrationen von 10 mg/mL getestet bei denen jedoch ausschließlich Präzipitat beobachtet werden konnte.

Bereits kleine Unterschiede in der Probenvorbereitung oder bei der Herstellung der Kristallisationslösungen können Auswirkungen auf das Kristallisationsverhalten haben. Um diesen Einfluss so gering wie möglich zu halten wurde das Protein bzw. die verschiedenen Chargen auf die gleiche Weise aus den Zellen isoliert und umgehend für die Kristallisation verwendet. Ebenfalls gleich waren die verwendeten Grundsubstanzen für die Kristallisationspuffer. Möglicherweise könnten bei einer alternativen Strategie die Konstrukte in zukünftigen Ansätzen um eine Proteaseschnittstelle erweitert werden um den His-Tag nach der Reinigung entfernen zu können. Dies könnte sich unter Umständen positiv auf die Kristallisation auswirken.

5.4 Bestimmung enzymatischer Parameter für den Aktivitätsassay

Die Suche nach neuen HER2-Inhibitoren sollte über einen aktivitätsbasierten Assay im Hochdurchsatzformat in 384 *well plates* realisiert werden. Bei dem verwendeten System phosphoryliert die Kinase ein artifizielles und biotinyliertes Substratpeptid, welches anschließend durch einen fluorophormarkierten Antikörper, mit Phospho-Tyrosin als Antigen, detektiert wird. Mit der Zugabe eines zweiten, mit Streptavidin konjugierten, Fluorophors bildet sich ein FRET-Paar (Förster-Resonanzenergietransfer) über dessen Signal die Phosphorylierung des Peptids quantifiziert werden kann. In Vorbereitung für den *Screen* wurden einige essentielle Parameter für den Assay bestimmt (Abbildung 48). Zunächst wurde die optimale Menge an Kinase, für jede einzelne Vertiefung (*well*) der Assay-Platte, über eine Konzentrationsreihe an Kinase bestimmt und die optimale Reaktionszeit durch eine zeitabhängige Messung der Substratphosphorylierung bestimmt. Hier wurde für den HER2-WT eine Menge von 20 ng/*well* (0.5 pmol) und für HER2-INS 0.01 ng/*well* (0.3 fmol) bestimmt, bei einer optimalen Reaktionszeit von 40 min für beide Konstrukte. Zwei weitere wichtige Parameter waren die K_m -Werte für ATP und das artifizielle Substratpeptid. Für HER2-WT wurde der ATP- K_m mit $4 \pm 1 \mu\text{M}$ und der Substrat- K_m mit $0.7 \pm 0.2 \mu\text{M}$ bestimmt. Für HER2-INS wurden Werte im gleichen Rahmen bestimmt, mit einem ATP- K_m von $8 \pm 2 \mu\text{M}$ und einem Substrat- K_m von $0.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$. Sowohl die Werte für den ATP- K_m als auch für den Substrat- K_m liegen für die beiden Konstrukte innerhalb der gleichen Größenordnung. Im Vergleich zum Wildtyp hat die Insertion von vier Aminosäuren im Exon 20 nur minimale Auswirkungen auf die genannten K_m -Parameter. Allerdings erwies sich die Insertionsmutante im Vergleich zum Wildtyp, wie zu erwarten, als deutlich aktiver.

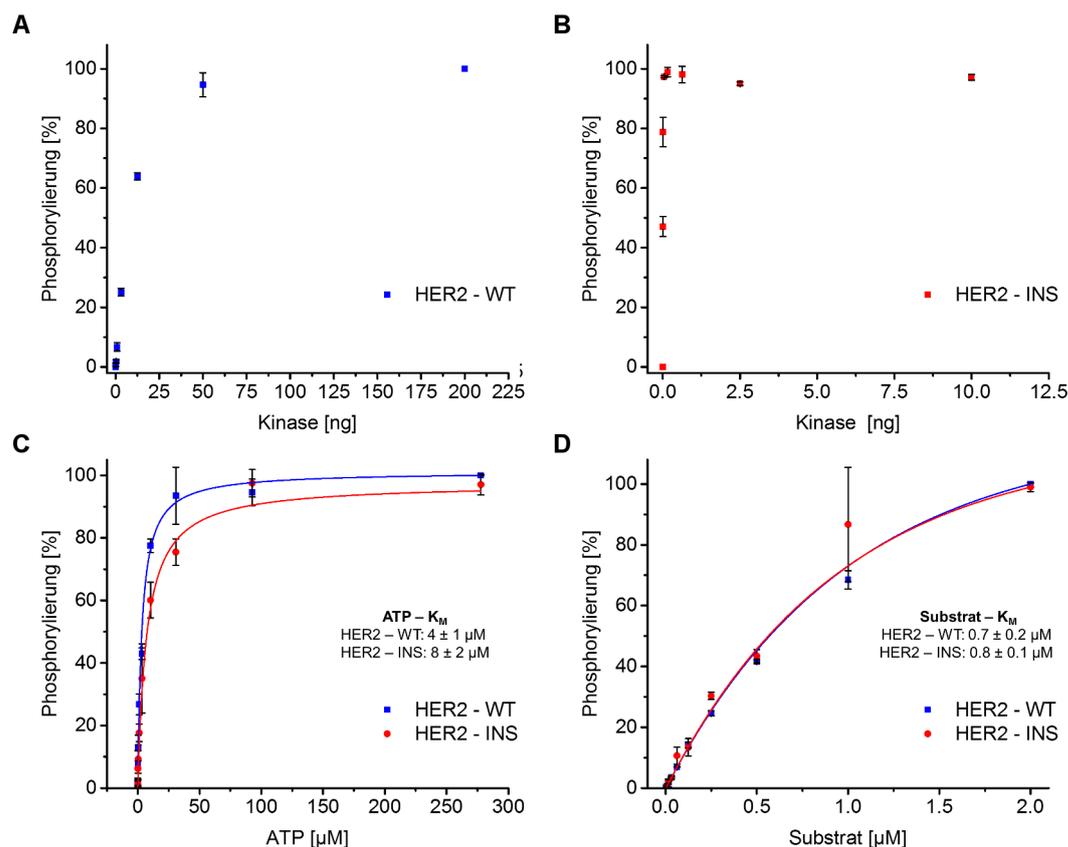


Abbildung 48. (A) und (B) Auftragung der Substratphosphorylierung gegen die Menge an eingesetzter Kinase. Bestimmung der K_m -Werte für ATP (C) und das Substratpeptid (D). (n=3).

5.5 High Throughput Screening zur Identifikation von selektiven Inhibitoren der HER2 Exon 20 Insertionsmutante

Auf der Suche nach neuen Verbindungen, die einen inhibitorischen Effekt in HER2 und insbesondere auch auf der Exon 20 Insertionsmutante zeigen, wurde eine Substanzbibliothek der Arbeitsgruppe mit ca. 1100 Verbindungen durchmustert. In der Bibliothek waren kommerziell erhältliche Moleküle der *BioFocus*-Bibliothek enthalten, beispielsweise einige Verbindungen und Fragmente aus der Klasse der Thiazole, Thiazolacetamide und Thiazolharnstoffe. Weitere Verbindungen und Fragmente stammten aus der internen Substanzbibliothek des AK-Rauh, die einige verschiedene Vorstufen, Intermediate und finale Verbindungen umfasst die gezielt als Kinaseinhibitoren entwickelt wurden, beispielsweise Chinoline, Chinazoline, Pyrazolopyrimidine und Pyrazolharnstoffe. Für den *Screen* wurde der HER2-Wildtyp und die Insertionsmutante HER2 A775_G776insYVMA in dem zuvor erläuterten

aktivitätsbasierten Assay bei 10 μM und 1 μM Substanzkonzentration vermessen. Beim *Screen* wurde die Restaktivität der Kinase gemessen, d.h. in wie weit reduziert die jeweilige Testsubstanz, bei 1 μM und 10 μM , die Phosphorylierungsrate der Kinase im Vergleich zu einer nicht inhibierten Reaktion mit DMSO (100 % Kontrolle, DMSO-Referenz). Zur Auswertung und Visualisierung der Ergebnisse wurde das Programm SARANEA^[170] verwendet, welches die strukturellen Ähnlichkeiten der chemischen Verbindungen berechnet, sortiert und in Cluster einordnet (Abbildung 49 und Abbildung 50). Strukturell verwandte Verbindungen finden sich so innerhalb eines Clusters, entfernter Verwandte Strukturen werden über *Edges* weiter Verknüpft.

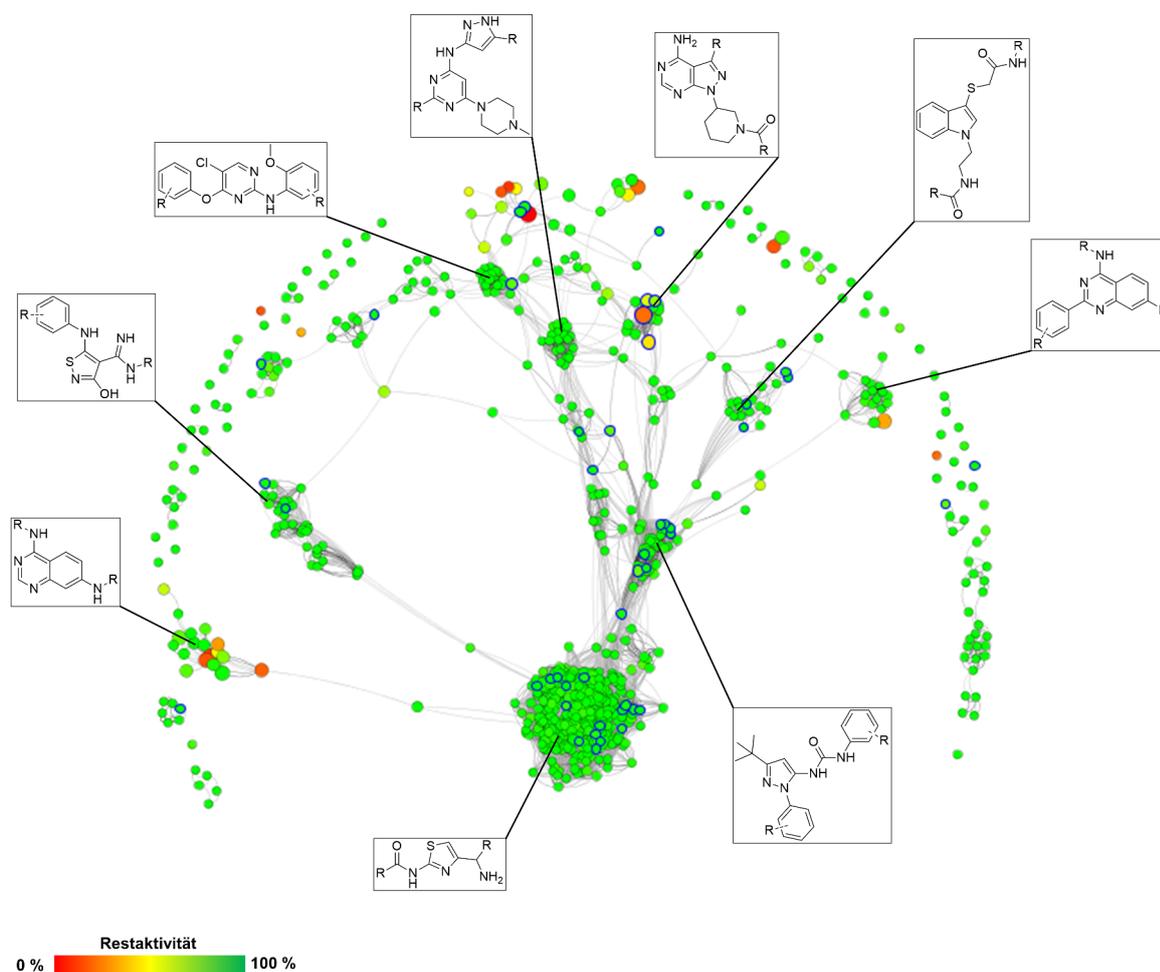


Abbildung 49. Grafische Darstellung der *Screening* Ergebnisse der CGC-Bibliothek für den HER2-WT mithilfe der Software SARANEA.^[170] Die Software bildet Verbindungs-Cluster aufgrund struktureller Ähnlichkeiten. Jeder Kreis repräsentiert eine Verbindung, die Größe der Kreise beschreibt dabei die strukturelle Diskontinuität, die Farbe die Restaktivität der Kinase mit DMSO als 100 % Referenz. Die blau umrandeten Kreise markieren eine Auswahl der Verbindungen, die für die Validierung ausgewählt wurden (vgl. Anhang Tabelle 8). Zudem sind für einige Cluster die charakteristischen Grundgerüste abgebildet.

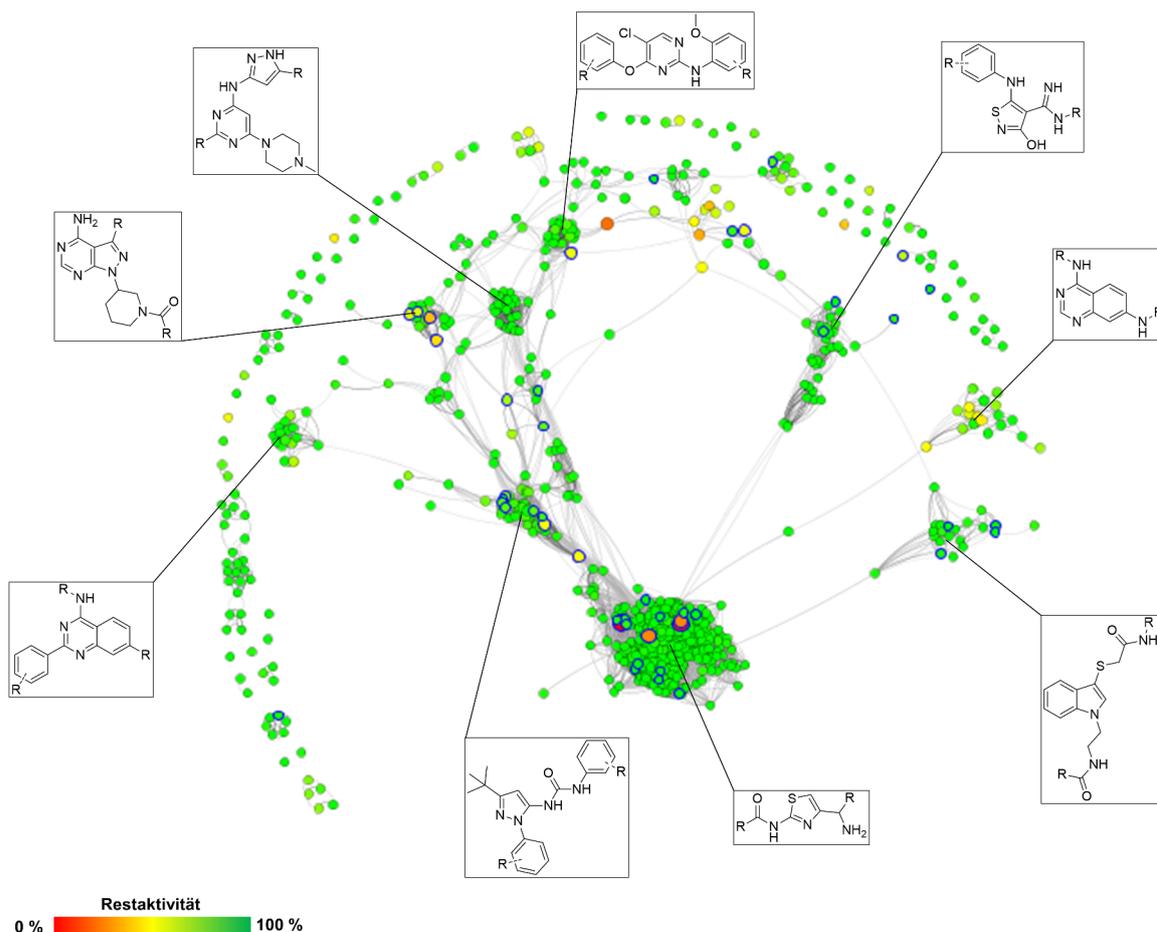


Abbildung 50. Grafische Darstellung der *Screening* Ergebnisse der CGC-Bibliothek für den HER2-INS mithilfe der Software SARANEA.^[170] Die Software bildet Verbindungs-Cluster aufgrund struktureller Ähnlichkeiten. Jeder Kreis repräsentiert eine Verbindung, die Größe der Kreise beschreibt dabei die strukturelle Diskontinuität, die Farbe die Restaktivität der Kinase mit DMSO als 100 % Referenz. Die blau umrandeten Kreise markieren eine Auswahl der Verbindungen, die für die Validierung ausgewählt wurden (vgl. Anhang Tabelle 8). Zudem sind für einige Cluster die charakteristischen Grundgerüste abgebildet.

Im *Screen* konnten einige Substanzen identifiziert werden, die bei einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ sowohl beim Wildtyp als auch bei der Insertionsmutante eine Reduktion der Kinaseaktivität auf weniger als 30 % hervorriefen. Allerdings waren die potentesten Inhibitoren aus der Klasse der Chinazoline und Chinoline, beides Substanzklassen die bereits seit einiger Zeit als „klassische“ Inhibitoren der HER-Familie bekannt sind und auch bereits kommerziell und klinisch sehr erfolgreich sind (z.B. Erlotinib, Gefitinib, Lapatinib). Auf der Suche nach neuen, bisher weniger bekannten oder beachteten Substanzklassen wurde das Augenmerk auf Substanzen gerichtet, die zwar eine vergleichsweise geringe Potenz zeigten, dafür aber eine Selektivität zwischen Wildtyp und Mutante aufwiesen. Zur weiteren Validierung und zum Ausschluss falsch positiver Messergebnisse wurden im Folgenden mit ca. 40 Substanzen, die die zuvor beschriebenen Eigenschaften zeigten, IC_{50} -Werte bestimmt (Tabelle 4). Zunächst wenig überraschend war, dass bei der Validierung ebenfalls einige Verbindungen auftauchten, die in der Arbeitsgruppe ursprünglich als EGFR-Inhibitoren

entwickelt wurden. Hierzu zählen z.B. die Klasse der Pyrazolopyrimidine wie RL1084, RL1085 und RL1122, die analog zu RL1103 und RL1105 (siehe Kapitel 4.3), als kovalente Inhibitoren konzipiert waren und vermutlich ebenfalls kovalent über das korrespondierende Cys805 in HER2 binden. RL1081 ist ebenfalls ein EGFR-Inhibitor und ein Analogon zu RL1075 (siehe Kapitel 4.3). Die Substanzen bzw. Fragmente RL64, RL98, RL42 und RL1073 (Skepinone-L, AK Prof. Laufer) sind in der Literatur eher als Inhibitoren der MAPK-Kinase p38 α bekannt. Die bei der Validierung potenteste Substanz war RL64 mit einem IC_{50} von 11 nM gegenüber HER2-INS und einem etwa zehnfach höheren IC_{50} von 162 nM gegenüber HER2-WT. RL98 lieferte einen IC_{50} von 29 nM in der Mutante und 9 μ M auf dem Wildtyp. Dieses Ergebnis war zunächst unerwartet, da RL64 und RL98 hohe strukturelle Ähnlichkeiten mit dem p38 α Inhibitor BIRB-796 aufweisen. Dieser ist allerdings nicht für eine hohe inhibitorische Aktivität gegen HER-Kinasen bekannt (K_d in EGFR-WT 7 μ M).^[141,171-173] Lapatinib und EAI001 sind bekannte Inhibitoren für HER2 bzw. EGFR und binden in der allosterischen Tasche nahe der α C Helix.^[69,123] Beim Vergleich der Kristallstrukturen von Lapatinib, EAI001 und BIRB-796 (Abbildung 51) sind Überschneidungen in den Bindungsmodi der einzelnen Inhibitoren erkennbar. Auch wenn den isolierten BIRB-796-Fragmenten RL64 und RL98 ein offensichtliches Element zur Bindung an die Scharnierregion fehlt, zeigen diese dennoch eine hohe Potenz auf der HER2-Insertionsmutante. Die Überlagerungen der Teilstrukturen in der allosterischen Tasche nahe der α C Helix (Abbildung 51, D) deuten auf einen möglichen Bindungsmodus von RL64 und RL98 in HER2 hin, mit dem die hohe Potenz erklärt werden könnte. Als Startpunkt für eine frühe SAR-Studie könnten Teilstrukturen von RL64 und RL98 z.B. mit den kovalenten Pyrazolopyrimidinen kombiniert werden. Die Pyrazolopyrimidinstruktur könnte so als Element zur Bindung an die Scharnierregion genutzt und chemisch in Richtung der α C Helix verlängert werden, um so einen Inhibitor zu entwickeln der potent und selektiv gegen die HER2 Exon 20 Insertionsmutanten ist und damit womöglich unerwünschte inhibitorische Effekte auf den HER2-Wildtyp zu minimieren.

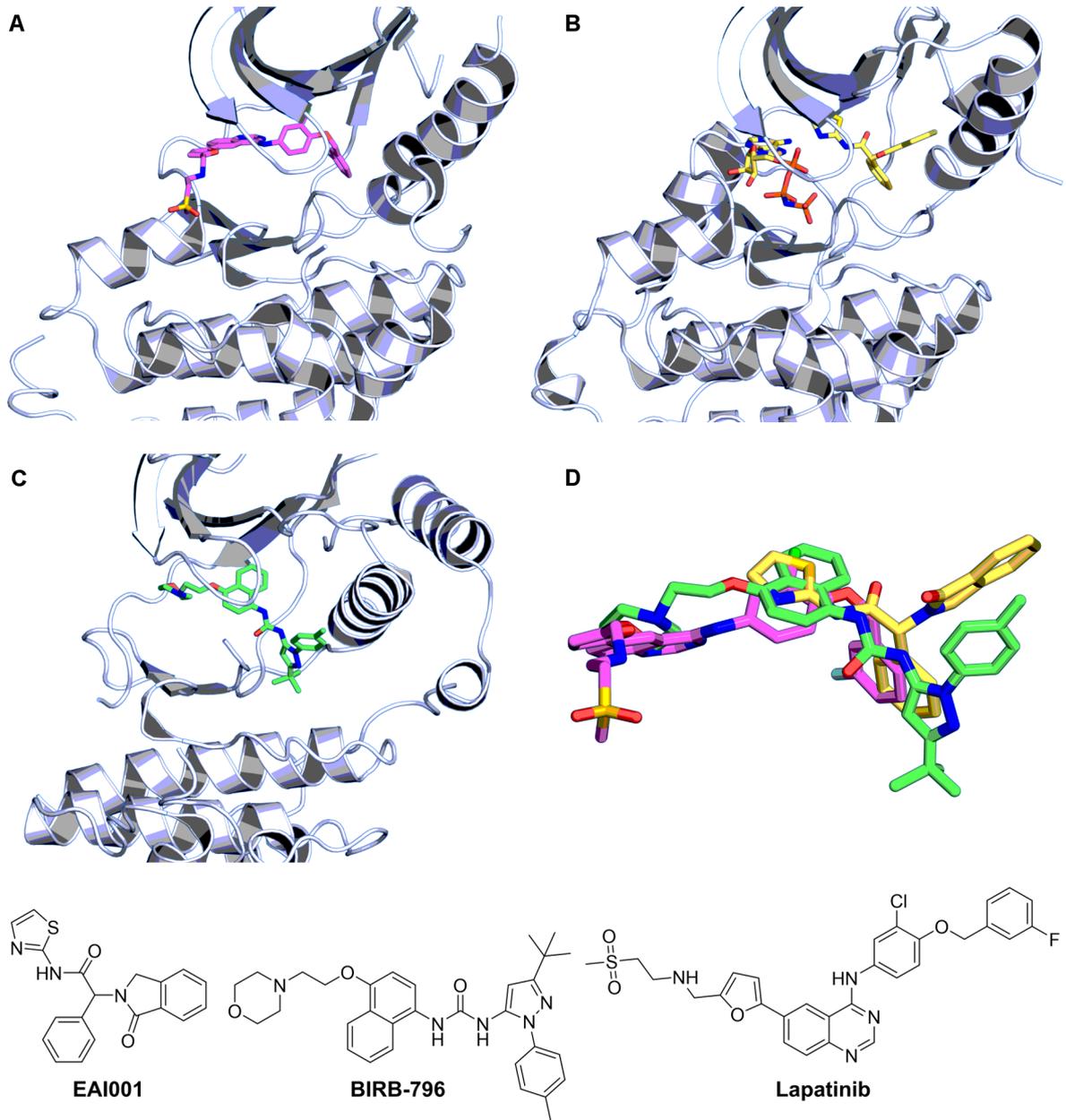
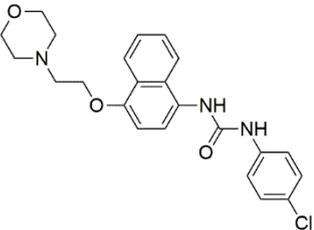
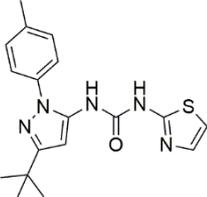
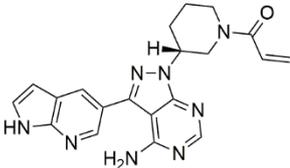
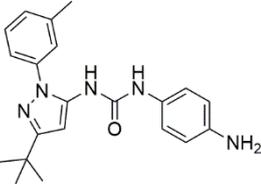
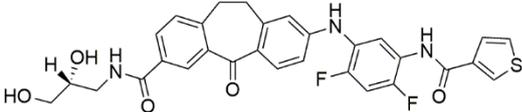
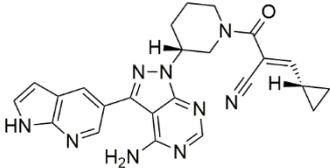
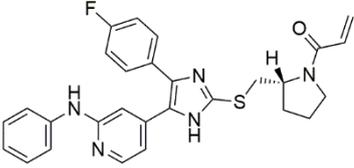
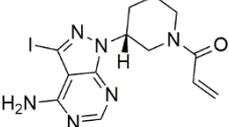


Abbildung 51. Ausschnitte der Kristallstrukturen von **(A)** Lapatinib in EGFR (PDB-ID: 1XKK), **(B)** EAI001 in EGFR (Kokristall mit ATP, PDB-ID: 5D41) und **(C)** BIRB-796 in p38α (PDB-ID: 1KV2). **(D)** Superposition der isolierten Strukturen von Lapatinib (Magenta), EAI001 (Gelb) und BIRB-796 (Grün).

Tabelle 4. Aufstellung der Verbindungen die bei der Hit-Validierung des Primär-Screens (@ 1 μ M) einen IC_{50} von unter 1 μ M auf der HER2-Insertionsmutante aufwiesen (sortiert nach steigendem IC_{50} für die Mutante). WT – Wildtyp, INS – A775_G776insYVMA Mutante.

Verbindung	Struktur	Screen Restaktivität		Hit-Validierung IC_{50} [nM]	
		INS	WT	INS	WT
RL 0064		51 %	91 %	11	162
RL 0098		50 %	92 %	29	8971
RL 1085		45 %	31 %	123	244
RL 0042		50 %	64 %	149	10000
RL 1073		59 %	68 %	312	686
RL 1122		54 %	54 %	422	814
RL 1081		78 %	87 %	451	1081
RL 1084		55 %	40 %	576	614

5.6 Zusammenfassung

Fehlregulationen des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 wurden in den letzten Jahren mit verschiedenen Krebsarten in Verbindung gebracht. Unter anderem wurden HER2-Mutationen als Treibermutationen in Brustkrebs und verschiedenen Arten von Lungenkrebs gefunden, aber auch im Kontext der erworbenen Wirkstoffresistenz gegen Erstlinientherapeutika gegen EGFR-Aktivierungsmutationen. Viele der bekannten Inhibitoren basieren auf ähnlichen Chinolin/Chinazolin-Grundgerüsten und sind innerhalb der HER-Familie relativ unselektiv. Auf der Suche nach neuen chemischen Strukturen, die selektiv die HER2 Exon 20 Insertionsmutante inhibieren, wurde ein aktivitätsbasiertes Assaysystem für die verwendeten HER2-Konstrukte etabliert und damit eine Substanzbibliothek der Arbeitsgruppe durchmustert. Es konnten einige interessante chemische Strukturen bzw. Fragmente identifiziert werden, die bislang nicht für potente HER-Inhibition bekannt waren. Die chemische Information und die Fragmente können so in die Forschung der Arbeitsgruppe einfließen oder indirekt neue Ansatzpunkte aufzeigen um die Wirkstoffentwicklung weiter anzutreiben. Bislang konnte jedoch der Aufbau eines Kristallisationssystems für den HER2-Wildtyp oder die Insertionsmutante nicht realisiert werden. Ein Grund hierfür war die geringe Ausbeute der Insertionsmutante in der heterologen Expression, die für weiterführende Kristallisationsexperimente zu gering ausfiel. Auch wenn es gelang für den Wildtyp ausreichend Protein zu erhalten konnte hier jedoch in keiner getesteten Kristallisationsbedingung ein Kristallwachstum beobachtet werden.

6 Material und Methoden

Sofern nicht anders angegeben wurden alle verwendeten Standardchemikalien und -reagenzien von folgenden Anbietern bezogen: Sigma-Aldrich, Alfa Aesar, Acros Organics, Serva, Carl-Roth und VWR.

6.1 Verbrauchsmaterial

Zellkulturflaschen	Falcon T-25, Corning, VWR
24-Well Kristallisationsplatten	EasyXtal 24-Well Tool X-Seal, Qiagen
96-Well Kristallisationsplatten	TTP Laptech, 96-well sitting drop iQ plate
Mikrotiterplatten	MICROPLATTE, 384 well, small volume, med. binding, schwarz, Greiner BIO-ONE; MICROPLATTE, 384 well, med. binding, big volume, weiß, Greiner BIO-ONE
Küvetten	Rotilabo®-Einmal-Küvette, PS, 4.5 mL, Carl Roth,
Zentrifugenfiltereinheit	Amicon Ultra-4/-15, 10 kDa MWCO, Merck Millipore
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Dialyseschlauch	Spectra/Por MWCO 12–14 kDa, Spectrumlabs
Entsalzungssäulen	Polyacrylamide Spin Desalting Columns, ThermoFisher
FPLC-Säulen	HiTrap Q FF, GE Healthcare HiLoad 26/60 Superdex 75, GE Healthcare HiLoad 16/60 Superdex 75, GE Healthcare Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare Mono Q 5/50 GL, GE Healthcare
HPLC-Säulen:	Vydac® 214TP5215 C4, GRACE, Columbia, MD, US Acclaim PepMap100 C18, 5 µm, 100 Å, 300 µm ID × 5 mm, Dionex
IMAC-Säulenmaterial:	Ni-NTA Superflow, Qiagen

6.2 Verwendete Reagenzien, Nährmedien, Zellen und Kits

- Insect GeneJuice Transfection Reagent, Merck, Millipore
- QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen
- HTRF KinEASE Assay, Cisbio
- Bacmax dna purification kit, Epicentre Illumina
- DyeEx 2.0 Spin Kit, Qiagen
- BacMagic Transfection Kit, Novagen, Merck Millipore
- EX-CELL 405 Serum-Free Medium, Sigma Aldrich
- *Spodoptera frugiperda*, Sf9 cells in Sf-900 III SFM, ThermoFischer
- EX-CELL 405 Serum-Free Medium, Sigma Aldrich
- *Escherichia coli* XL10 Gold, Stratagene
- Pierce™ Protease Inhibitor Tablets, EDTA-free, ThermoFischer
- Benzonase Nuclease, Sigma Aldrich
- Thrombin, Sigma Aldrich,
- PfuUltra II Fusion HS, Agilent Technologies
- PageRuler™ Unstained Protein Ladder, ThermoFischer
- PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, ThermoFischer
- *DpnI*, *Bsu36I*, *NcoI*, New England BioLabs

6.3 Verwendete Geräte

Dispergierer	T18 basic Ultra-Turrax, IKA, Staufen, DE
Fluoreszenzspektrophotometer	Fluoromax-4 Spectrofluorometer, HORIBA, Kyoto, Japan
FPLC	ÄKTA pure, GE Healthcare, Uppsala, SE
Gelelektrophorese	Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, US
Hochdruckhomogenisator	M-110L Microfluidizer Materials Processor, Microfluidics, Wastwood, MA, US
Inkubator	Incubator Shaker Series I26, New Brunswick Scientific, Enfield, CT, US
LCMS	Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectro- meter, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US; Nanospray Flex Ion Source, Thermo Fisher Scientific,

	Waltham, MA, US
	1100 HPLC-System, Agilent, Santa Clara, CA, USA mit Finnigan LCQ Advantage Max, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA oder LTQ XL™ Linear Ion Trap Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US
Mikrotiterplatten-Lesegerät: Mosquito	Infinite M1000, Tecan, Männedorf, CH LCP-Mosquito, TTP-Laptech, Melbourn Hertfordshire, UK
Plattenschüttler	MixMate, Eppendorf, Hamburg, DE
Spektrophotometer	BioPhotometer plus, Eppendorf Research, Hamburg, DE NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US
Thermocycler	TPersonal, Biometra GmbH, Göttingen, DE
Thermoschüttler	Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg, DE
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner, VWR International, Radnor, PA, US
Ultraschalldesintegrator	Digital Sonifier, BRANSON ULTRASCHALL, Dietzenbach, DE
Umwälzthermostat	Polystat cc2, Huber, Offenburg, DE F12-ED, Julabo, Seelbach, DE
Vakuumkonzentrator	Concentrator plus, Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifugen & Rotoren:	FiberLite F8-6x1000y, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US SA-600 Fixed Angle Rotor, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US Sorvall Evolution RC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, DE Centrifuge 5702R, Eppendorf, Hamburg, DE Centrifuge 5804R, Eppendorf, Hamburg, DE Centrifuge 5424, Eppendorf, Hamburg, DE Concentrator plus, Eppendorf, Hamburg, DE

6.4 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden für die Expression in *Spodoptera frugiperda* Codon-optimiert und bei GeneArt (ThermoFisher) synthetisiert. Alle Expressionsvektoren basieren auf dem kommerziell erhältlichen pIEx/Bac3 Transfervektor (Novagen, Millipore). Die EGFR-Konstrukte basieren auf dem Uniprot-Eintrag P00533 und umfassen die Aminosäuren 686 bis 1022 (Kristallisationskonstrukt) und 702 bis 1016 (FLiK-Konstrukt). Die HER2-Konstrukte basieren auf dem Uniprot-Eintrag P04262 mit den Aminosäuren 712-1012 (Kristallisations- und Assaykonstrukt). Zur erleichterten Isolierung aus dem Zellysat sind alle Konstrukte mit einem Hexahistidin-Tag modifiziert (bei EGFR N-terminal, bei HER2 C-terminal). Die EGFR-FLiK-Konstrukte sind zusätzlich mit einer Sequenz versehen die für das Grünfluoreszierende Protein (eGFP) codiert. Das eGFP-Gen wurde aus pEGFP-N1 Vektor (GeneBank-ID: U55762.1) entnommen. Dies erlaubt zum einen eine einfache visuelle Überprüfung der Expression in Insektenzellen und zum anderen vermittelt eGFP die Löslichkeit des Konstrukts. Details zu den verwendeten Sequenzen sind im Anhang zu finden (Kapitel 8.3).

6.5 Mutagenese

Zur Substitution einzelner Aminosäuren wurden Basenpaare durch ortsgerichtete Mutagenese in den Konstrukten ausgetauscht (QuickChange, Stratagene). Die Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes sowie das verwendete PCR-Programm sind in Tabelle 5 und Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 5. Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für ortsgerichtete Mutagenese.

DNA	150 bis 300 ng
10x Pfu Ultra II Puffer	2.5 μ L
Primer I (10 μ M)	0.5 μ L
Primer II (10 μ M)	0.5 μ L
dNTP-Mix (25mM)	0.5 μ L
Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase	0.5 μ L
QuickChange Solution	0.5 μ L
Wasser	auffüllen auf 25 μ L

Tabelle 6. PCR-Programm.

1	Denaturierung	95 °C	5 min	30 Zyklen
2	Denaturierung	95 °C	30 s	
3	Annealing	57 °C	30 s	
4	Elongation	72 °C	120 sec	
5	Elongation	72 °C	10 min	
6	Pause	4 °C		

Im Anschluss an die Mutagenese-PCR wurden die PCR-Ansätze mit 1 U *DpnI* (nach Herstellerangebe) für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend chemisch kompetente *E. coli* XL10 Gold Zellen mit der DNA transformiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde dann die Plasmid-DNA aus den *E. coli* Zellen isoliert. Zur Plasmid Isolierung wurde *QIAspin Miniprep Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet, die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte über die Messung der Absorption bei 260 nm. Alle Konstrukte wurden mittels DNA-Sequenzierung von der ZE-Biotechnologie am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund analysiert. Die Probenvorbereitung erfolgte mittels *BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing kit* (Applied Biosystems) und *DyeEx 2.0 Spin Kit* (Qiagen) nach Herstellerprotokoll.

6.6 Proteinexpression in Insektenzellen

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Proteine wurden in Insektenzellen exprimiert. Zur Generierung rekombinanter Baculoviren wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet. Die HER2- und EGFR-Kristallisationskonstrukte wurden von der *Dortmund Protein Facility* (DPF, MPI-Dortmund) nach dem *FlashBac* Protokoll (Oxford Technologies) transfiziert und bis zur zweiten Generation des Baculovirus prozessiert. Die nachfolgende Proteinexpression im präparativen Maßstab erfolgte in den Laboren des AK-Rauhs. Die EGFR-FLiK-Konstrukte wurden nach einem modifizierten *BacMagic* Protokoll transfiziert, welches im folgenden Abschnitt näher beschrieben wird. Die Transfektion zur Erzeugung des rekombinanten Baculovirus erfolgte ausschließlich in Sf9 Zellen. Als Nährmedium für alle Arbeiten mit Insektenzellen wurde ausschließlich EX-CELL 405 Serum-Free Medium von Sigma Aldrich ohne weitere Zusätze verwendet.

6.6.1 Isolierung der Bacmid-DNA

Für das modifizierte *BacMagic* Protokoll wurde zunächst die Bacmid Virus DNA mit dem *Bacmax DNA purification kit* (epicentre) nach Herstellerprotokoll aus einer *E. coli* Übernachtskultur isoliert (Antibiotikaresistenz Kanamycin und Chloramphenicol). Die Bacmid-DNA wurde von Dr. Yaowen Wu (CGC Dortmund) zur Verfügung gestellt. Das isolierte Bacmid wurde anschließend mit *Bsu36I* Restriktionsendonuklease (New England Biolabs) nach Herstellervorgabe inkubiert und linearisiert. Im Anschluss wurde das Enzym für 20 min bei 72 °C inaktiviert. Das auf diese Art präparierte Bacmid wurde dann bei 4 °C bis 8 °C gelagert.

6.6.2 Transfektion und erste Generation rekombinanter Baculoviren

Für die Transfektion wurden in einer 25 cm² Zellkulturflasche 2.5 x 10⁶ Sf9-Zellen angesiedelt (5 ml mit einer Zelldichte von 0.5 x 10⁶ Zellen /mL) und bei 27 °C für mindestens eine Stunde inkubiert. In dieser Zeit haften die Zellen an die Oberfläche der Flasche an und bildeten eine einzelne konfluente Zellschicht (*Monolayer*). Bevor 2.5 mL des Transfektions-Mix (Zusammensetzung in Tabelle 7) zu den Zellen gegeben wurde, wurde dieser zuvor durch leichtes Schwenken durchmischt und 15 bis 30 min bei Raumtemperatur inkubiert (eine längere Inkubation kann die Transfektionseffizienz verringern). Das überstehende Medium aus der Kulturflasche wurde entfernt und der Transfektions-Mix hinzugefügt. Die Zellen wurden dann mit dem Mix für mindestens acht Stunden oder über Nacht bei 27 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 2.5 mL frisches Medium zu den Zellen gegeben und für weitere fünf bis sieben Tage inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit befindet sich der P1-Baculovirus im Überstand der Zellen. Dieser wurde abpipettiert, sterilfiltriert und bei 4 °C bis 8 °C im Dunkeln bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Tabelle 7. Zusammensetzung des Transfektions-Mix. Vor der Verwendung muss der Mix für 15 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden.

EX-CELL titer high 405	2.5 mL
Insect gene juice	16 µL
Transfervektor	2000 ng
Bacmid	1000 ng

6.6.3 Virusamplifikation – zweite und dritte Virusgeneration

Da der Virustiter der P1-Generation für eine Proteinexpression ist im präparativen Maßstab zu niedrig ist, muss dieser zunächst bis zur dritten Virusgeneration (P3) amplifiziert werden.

Hierzu wurden zunächst 200 μL des P1-Virus zu einer 10 mL Kultur mit 1×10^6 Zellen/mL pipettiert und für drei bis vier Tage bei 27 °C inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen bei 2500 g für 10 min abzentrifugiert und der Überstand mit dem P2-Virus sterilfiltriert und bei 4 °C bis 8 °C im Dunkeln gelagert. Für die Generierung des P3-Virus wurden 20 μL P2-Virus zu einer 100 mL Kultur mit 0.5×10^6 Zellen/mL pipettiert und für drei bis vier Tage bei 27 °C inkubiert. Die Zellen wurden bei 2500 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand mit dem P3-Virus sterilfiltriert und bei 4 °C bis 8 °C im Dunkeln gelagert. P2-Virus kann bei -80 °C mit einem Zusatz von 5 % fetalem Kälberserum gelagert werden. Vor jeder präparativen Expression wurde die entsprechende Menge an P3-Virus frisch aus dem P2-Virus hergestellt.

6.6.4 Präparative Expression in Insektenzellen

Für die Expression im präparativen Maßstab wurden 5 L Erlenmeyerkolben mit einem Kulturvolumen von 800 bis 1000 mL und einer Zelldichte von 2.5×10^6 bis 3×10^6 Zellen/mL verwendet. Zu den Insektenzellen wurden dann 25 bis 30 mL des zuvor amplifizierten P3-Virus pipettiert und die Kultur für 48 bis 72 h bei 27 °C und 120 U/min inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen bei 2500 g für 15 min sedimentiert. Das Pellet wurde anschließend mit eiskaltem PBS-Puffer (pH 7.5) vorsichtig gewaschen bis der Überstand klar war (drei- bis fünfmal). Pellets die nicht sofort verwendet wurden, wurden bis auf weiteres in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

6.7 Proteinisolierung

Die im Folgenden beschriebenen Reinigungsschritte wurden an den FPLC-Systemen Äkta-pure oder Äkta-FPLC (GE Healthcare) bei 4 °C durchgeführt, Puffer und Proteinlösungen wurden vorher filtriert (0.2 μm oder 0.45 μm). Zur Analytik wurden die Proteine mittels SDS-Page^[174] und LC-MS analysiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Absorption bei 280 nm, Extinktionskoeffizienten wurden mit der ExpASY ProtParam Web-Anwendung auf Grundlage der Aminosäuresequenz berechnet.^[175] Alle Säulen wurden vor Gebrauch mit dem jeweiligen Puffer äquilibriert.

6.7.1 EGFR – FLiK-Konstrukte

➤ Zellyse

Das Zellpellet wurde im drei bis vierfachen Volumen Puffer (500 mM NaCl, 50 mM TRIS, 10 mM Imidazol, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8 bei 4 °C) resuspendiert, mit Benzonase (Millipore, Verwendung nach Herstellerangabe) und Protease-Inhibitor (Pierce, Thermo Verwendung nach Herstellerangabe) versetzt und mittels Hochdruckhomogenisator in acht bis zehn Zyklen lysiert. Mittels Zentrifugation bei 40.000 g für zweimal 60 min wurden die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt, der lösliche Überstand wurde anschließend abgenommen und filtriert (0.45 µm).

➤ 1. Affinitätschromatographie

Der lösliche, filtrierte Überstand wurde auf eine zuvor mit Puffer A (500 mM NaCl, 50 mM TRIS, 10 mM Imidazol, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8 bei 4 °C) äquilibrierte, selbstgepackte Ni²⁺-NTA Säule (*fast flow* Material von GE Healthcare) geladen, bei einer Flussrate von 0.5 bis 1 mL/min. Proteine ohne His-Tag sowie unspezifisch gebundene Proteine wurden mit Puffer A von der Säule gewaschen. Die Elution des His₆-eGFP-EGFR erfolgte mit einem stufenweise ansteigenden Gradienten an Puffer B (500 mM NaCl, 50 mM TRIS, 500 mM Imidazol, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8 bei 4 °C). Die Eluatfraktionen wurden über SDS-Page analysiert. Fraktionen mit dem Zielprotein wurden vereint und zur Vorbereitung auf die folgende Anionenaustauschchromatographie gegen zwei Liter Dialysepuffer (50 mM NaCl, 20 mM TRIS, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8 bei 4 °C) über Nacht bei 4°C dialysiert.

➤ Anionenaustauschchromatographie

Das Dialysat aus dem vorherigen Schritt wurde zunächst filtriert (0.22 µm Porengöße) und mit einer Flussrate von 0.7 mL/min auf eine zuvor mit Puffer C (75 mM NaCl, 20 mM TRIS, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8 bei 4°C) äquilibrierte Säule (2 x 1 mL Q HP, GE Healthcare) geladen. Nicht bindende Proteine wurden zunächst von der Säule gewaschen bevor die Elution über einen Gradienten von 30 % über 50 min mit Puffer D (1 M NaCl, 20 mM TRIS, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8 bei 4°C) erfolgte. Nach einer Analyse über SDS-Page wurden EGFR enthaltende Fraktionen vereint.

➤ **Abspaltung des Affinitätstags**

Zur Abspaltung des His₆-eGFP wurde die Proteinlösung mit HRV-3C Protease (Verhältnis 1:20, Protease:Protein) über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurde auftretendes Präzipitat bei 4500 g für 20 min abzentrifugiert und der Überstand filtriert (0.22 µm Porengröße).

➤ **2. Affinitätschromatographie**

Wie zuvor beschrieben wurde die Säule mit Puffer A äquilibriert bevor die Proteinlösung mit einer Flussrate von 1.5 mL auf die Säule aufgetragen wurde. Der Durchfluss der Säule wurde gesammelt und enthielt gespaltenes EGFR. Reste an ungespaltenen His₆-eGFP-EGFR sowie His₆-eGFP wurden mit 50 % Puffer B von der Säule gewaschen und verworfen. Der Durchfluss wurde dann in einer Zentrifugeneinheit (MWCO 10 kDa) auf < 2 mL konzentriert und im Anschluss bei 16.000 g für 20 min zentrifugiert um evtl. Schwebstoffe und denaturiertes Protein abzutrennen.

➤ **Größenausschlusschromatographie**

Die Proteinlösung wurde auf eine zuvor mit Puffer E (200 mM NaCl, 20 mM HEPES, 10 % (v/v) Glycerol, pH 7.5 bei 4 °C) äquilibrierte Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 75 µg, GE Healthcare) geladen und bei einem Fluss von 1 mL/min aufgetrennt. EGFR enthaltene Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und mittels einer Zentrifugeneinheit (MWCO 10 kDa) auf ca. 2 bis 3 mg/mL konzentriert.

➤ **Markierung mit Acrylodan**

Das im vorherigen Schritt präparierte EGFR wurde im 4 bis 5 fachen Volumen mit Puffer F (200 mM NaCl, 20 mM HEPES, 20 % (v/v) Glycerol, pH 7.5 bei 4 °C) verdünnt und mit 1.5 fachen molaren Überschuss an Acrylodan versetzt. Acrylodan war in DMF oder MeCN gelöst wobei der Anteil an DMF oder MeCN in der Reaktionslösung unter 0.1% gehalten wurde. Die Markierungsreaktion erfolgte über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln und Lichtausschluss. Nach dem Ende der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 1 mM DTT gestoppt und die Lösung wurde fünfmal mit Puffer F (+ 1 mM DTT) in einer Zentrifugeneinheit gewaschen und auf ca. 2 mg/mL ankonzentriert. Die Markierungsreaktion wurde im Anschluss über Massenspektrometrie bestätigt.

6.7.2 HER2 und EGFR – Kristallisationskonstrukte

➤ Zellyse

Das Insektenzellpellet wurde im drei bis vierfachen Volumen Puffer A resuspendiert, mit Proteaseinhibitor und Benzonase (Verwendung nach Herstellerangaben) versetzt und bei 4 °C gerührt bis das Pellet vollständig resuspendiert war. Anschließend folgte der Zellaufschluss mit einem Hochdruckhomogenisator (acht bis zehn Zyklen) und die Zentrifugation für zweimal 60 min bei 40.000 g und 4 °C, um unlösliche Zellbestandteile abzutrennen. Vor der weiteren Verwendung an der FPLC wurde der Überstand filtriert (0.45 µm Porengröße).

➤ 1. Affinitätschromatographie

Mit einer Flussrate von 0.7 mL/min wurde der lösliche Überstand auf eine zuvor mit Puffer A (500 mM NaCl, 50 mM TRIS, 10 mM Imidazol, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8 bei 4 °C) äquilibrierte Ni-NTA Säule geladen und nicht bindende Proteine von der Säule gewaschen. Die Elution des Zielproteins erfolgte mit einem Gradienten von 30 % über 20 min an Puffer B (Puffer A + 500 mM Imidazol). Fraktionen mit Zielprotein wurden vereint.

➤ Abspaltung des Affinitätstags und Dialyse

Im Unterschied zu den EGFR-Konstrukten haben die HER2-Konstrukte keine Proteaseschnittstelle zur Abspaltung des Affinitätstags, daher wurden die HER2-Konstrukte nur gegen 2 L Dialysepuffer (75 mM NaCl, 20 mM TRIS, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8 bei 4 °C) über Nacht bei 4 °C dialysiert. Bei den EGFR-Konstrukten wurde während der Dialyse auch der Affinitätstag abgespalten. Dazu wurde die absolute Proteinkonzentration der vereinigten Eluate aus dem vorherigen Schritt über die Absorption bei 280 nm abgeschätzt und entsprechend der Herstellerangaben Thrombin-Protease (Millipore) hinzugefügt. Die Proteinlösung wurde dann über Nacht bei 4 °C gegen 2 L Dialysepuffer (50 mM NaCl, 20 mM TRIS, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 7.5 bei 4 °C) dialysiert. Bei der Dialyse auftretendes Präzipitat wurde durch Zentrifugation (4500 g, 20 min) und Filtration (0.22 µm) abgetrennt.

➤ **Anionenaustauschchromatographie**

Die Proteinlösung wurde mit einem Fluss von 0.7 mL/min auf eine zuvor mit Puffer C (75 mM NaCl, 20 mM TRIS, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8 bei 4 °C) äquilibrierte Säule (2 x 1 mL Q HP, GE Healthcare) geladen. Nicht bindende Proteine wurden zunächst von der Säule gewaschen bevor die Elution über einen stufenweisen Gradienten mit Puffer D (Puffer C + 1M NaCl) erfolgte. Die Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereint und mittels Zentrifugeneinheit (MWCO 10 kDa) auf 2 mL konzentriert sowie im Anschluss bei 16.000 g für 20 min zentrifugiert um evtl. präzipitiertes Protein abzutrennen.

➤ **Größenausschlusschromatographie**

Die Proteinlösung wurde dann auf eine zuvor mit Puffer G (300 mM NaCl, 30 mM TRIS, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8 bei 4 °C) äquilibrierte Säule (HiLoad 16/600 75 µg, GE Healthcare) geladen und bei einem Fluss von 1 mL/min aufgetrennt. Im Falle von EGFR wurden die Fraktionen vereint, auf ca. 1 bis 2 mL eingeeengt und in einer weiteren Anionenaustauschchromatographie eingesetzt. Die HER2 enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, vereinigt und mittels einer Zentrifugeneinheit (MWCO 10 kDa) konzentriert. Hierbei war zu beachten, die Proteinkonzentration nur langsam zu steigern um auftretende Proteinpräzipitation bei Konzentrationen über 5 mg/mL zu vermeiden. Das Protein wurde dann bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

➤ **2. Anionenaustauschchromatographie**

Das EGFR-Konzentrat wurde mit Waschpuffer (50 mM NaCl, 20 mM TRIS, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8 bei 4 °C) auf 10 mL aufgefüllt und mit einer Flussrate von 1 mL/min auf eine äquilibrierte Mono Q Säule (5/50 GL, GE Healthcare) geladen. Die Elution erfolgte über einen Gradienten von 5 % auf 30 % über 60 min mit Elutionspuffer (1 M NaCl, 20 mM TRIS, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerol, pH 8 bei 4°C). Fraktionen der einzelnen Peaks wurden vereint und bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

6.8 Massenspektren

Die massenspektrometrische Analyse der Proteine erfolgte mit einem 1100 HPLC-System (Agilent), gekoppelt an ein Massenspektrometer (Finnigan LCQ Advantage Max oder LTQ XL linear ion trap, Thermo Fisher Scientific) mit einer Elektrospray-Ionenquelle. Die Auftrennung der Proben erfolgte über eine Vydac 214TP C4 HPLC Säule (GRACE) bei 30 °C mit einer Flussgeschwindigkeit von 0.21 mL/min über 25 min. Jeweils 10 µL Proteinlösung wurden mit 80 % Lösungsmittel A (0.1 % TFA in Wasser) und 20 % Lösungsmittel B (0.1 % TFA in Acetonitril) über 5 min auf die Säule geladen und anschließend mit einem linearen Gradienten auf 30 % A über 10 min aufgetrennt. Die Säule wurde mit 10 % A (linearer Gradient über 2 min, anschließend 2 min konstant) gewaschen und wieder auf die Startbedingung äquilibriert (linearer Gradient auf 80 % A / 20 % B über 1 min, anschließend für 5 min konstant). Für die MS Experimente wurde während des gesamten Gradienten der m/z-Massenbereich von 700 bis 2000 gescannt. Die Auswertung und Dekonvolutierung der Massenspektren wurde mit *Xcalibur 2.0.7* und *ProMass Deconvolution 2.8* (Thermo Fisher Scientific Inc.) durchgeführt.

6.9 Aktivitätsassay

Die Überprüfung der enzymatischen Aktivität sowie die Bestimmung von Michaelis-Menten-Konstanten K_m für ATP und das Substrat, von IC_{50} und K_i Werten wurden mit dem *KinEASE HTRF Assay* von Cisbio durchgeführt. Der Assay beruht auf der Phosphorylierung eines artifiziellen, biotinylierten Substratpeptids durch die zu untersuchende Kinase. An das phosphorylierte Substratpeptid bindet ein phosphospezifisches Antikörper-Eu³⁺-Kryptat-Konjugat. Ein weiteres Fluorophor-Streptavidin-Konjugat (XL665) bildet im Falle einer Phosphorylierung des Substratpeptids ein FRET-Paar (Förster-Resonanzenergietransfer) über dies der Grad der Phosphorylierung quantifiziert und daraus die Aktivität der Kinase bestimmt werden kann. Da jedes Protein bzw. jede verwendete Kinase unterschiedlich ist und auch die enzymatische Aktivität zwischen verschiedenen Proteinchargen schwanken kann, muss der Assay für jedes Protein und für jede neue Charge angepasst werden. Dazu gehören die Bestimmung der optimalen Proteinkonzentration, die Reaktionszeit, sowie die Bestimmung des K_m für ATP und das Substratpeptid. Im ersten Schritt wird über eine Konzentrationsreihe die optimale Konzentration an eingesetzter Kinase bestimmt. Davon ausgehend wird im nächsten Schritt die optimale Reaktionszeit bestimmt, in der die Reaktion nach bestimmten Zeitintervallen gestoppt wird. Zum Schluss wird jeweils der K_m für das Substratpeptid und ATP

über eine Konzentrationsreihe an Substrat bzw. ATP bestimmt. Für die EGFR und HER2-Konstrukte wurde entsprechend des Benutzerhandbuchs die optimale Kinasekonzentration bestimmt, die optimale Reaktionszeit und der ATP/Substrat- K_M .^[176] Bei der IC_{50} Bestimmung der Referenzinhibitoren für die EGFR-FLiK-Konstrukte wurden die Inhibitoren vor dem Start der Kinasereaktion 30 min mit der Kinase bei Raumtemperatur inkubiert bevor die Reaktion mit der ATP-Zugabe gestartet wurde.

6.10 FLiK-Assay

Für die im Folgenden beschriebenen Experimente wurden die mit acrylodanmarkierten Proteine auf 50 nM mit FLiK-Puffer (20 mM HEPES, 200 mM NaCl, pH 7.5) verdünnt. Die Messungen wurden an einem Fluoromax Fluoreszenzspektrometer (Horiba) bei 20 °C in Einweg-Kunststoffküvetten (Carl-Roth) durchgeführt. Das Assayvolumen betrug 3.0 mL, die maximale Konzentration an DMSO wurde unter 0.1 % gehalten und zur Durchmischung der Reaktionslösung wurde ein Magnetührstäbchen hinzugefügt.

6.10.1 Messung der Dissoziationskonstanten

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstante K_d wurde eine Verdünnungsreihe an Inhibitor getestet. Dazu wurde in der Küvette die Proteinlösung vorgelegt und schrittweise die Konzentration an Inhibitor erhöht, 10 s bei maximaler Geschwindigkeit gerührt und für 5 min inkubiert bevor die das Fluoreszenzspektrum aufgenommen wurde. Die Gerätespezifischen Einstellungen waren wie folgt: die λ_{ex} und λ_{em} Bandbreiten betragen 3 nm, die Anregungswellenlänge war 420 nm, die Fluoreszenzspektren wurden im Bereich von 440 nm bis 600 nm in 2 nm Schritten aufgenommen, Integrationszeit 0.3 s mit 3 akkumulierten Spektren. Zur Auswertung wurden die mit dem integrierten Korrekturfaktor („Dunkelstrom-Korrektur“) korrigierten Spektren verwendet. Zur Bestimmung des K_d -Wertes wurde das Verhältnis der Intensität bei 514 nm zu 464 nm gebildet und gegen die logarithmierte Inhibitorkonzentration aufgetragen. An die so erhaltene Kurve wurde mit dem Datenverarbeitungsprogramm *Origin* (OriginLab) eine sigmoidale Kurve angelegt (*Logistic-Fit*) deren Wendepunkt dem K_d entspricht.

6.10.2 Messung der Bindungskinetiken

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation des Inhibitors an die Kinase (k_{on}) und die Dissoziation von der Kinase (k_{off}) wurde die zeitabhängige Änderung der Fluoreszenzintensität bei 514 nm bei verschiedenen Inhibitorkonzentrationen untersucht. Dazu wurde in einer Küvette 3.0 mL Proteinlösung mit einer Konzentration von 50 nM vorgelegt und unter konstantem Rühren die Fluoreszenzemission gemessen. Die eigentliche Messung wurde gestartet sobald sich ein konstantes Signal eingestellt hatte. Der Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen wurde über eine spezielle, vom Umgebungslicht abgeschirmte, Zugangsöffnung hinzugefügt sodass die Messung durch einfallendes Streulicht nicht verfälscht wurde. Die Einstellung des Gerätes waren wie folgt: die für λ_{ex} und λ_{em} Bandbreiten betragen 3 nm, Anregungswellenlänge bei 420 nm, Emissionswellenlänge bei 514 nm, Integrationszeit 0.3 s, Messintervall 1 s. An die erhaltenen Kurven wurde dann eine exponentielle Kurve pseudo-erster Ordnung (k_{obs}) angelegt und aus dieser die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit abgeleitet (Kapitel 3.3.3). Jeder errechnete k_{obs} wurde gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen und eine lineare Regressionsgerade zur k_{on} Bestimmung angelegt.

6.11 Röntgenstrukturanalyse

Die zu kristallisierenden Proteine wurden entweder direkt nach der Isolierung zur Kristallisation verwendet oder, falls die Proteinlösung zuvor bei -80°C gelagert wurde, wurde zunächst eine Gelfiltration durchgeführt um oligomerisiertes Protein abzutrennen. Als Säule wurde eine Superdex 10/30 GL 75 pg (GE Healthcare) verwendet. Wie in Kapitel 6.7.2 beschrieben wurde Puffer G verwendet (Flussrate 0.8 mL/min). Als Kristallisationsmethode wurde die Dampfdiffusionsmethode im hängenden (Qiagen Easy Xtal Platten) oder im sitzenden Tropfen (TTP Laptech IQ Plates) genutzt. Alle verwendeten Puffer und Kristallisationslösungen wurden vor Verwendung filtriert ($0.22\ \mu\text{m}$ Porengröße) und Proteinlösungen bei 16.000 g für 20 min zentrifugiert um entstandenes Präzipitat abzutrennen. Datensätze wurden an der *Swiss Light Source* am Paul-Scherer Institut in Villigen (Schweiz) aufgenommen. Die Indexierung, Integration und Skalierung der Reflexe erfolgte mit der XDS Software^[177]. Für die folgenden Schritte des molekularen Ersatz, der Strukturverfeinerung wurden die CCP4i^[178] und COOT^[179] Softwarepakete verwendet.

6.11.1 *Fine-Screens*

➤ **EGFR-Wildtyp**

Die Kristalle des Wildtyps wurden als Apokristalle, ohne Liganden, angesetzt. Dazu wurde 1 µL der Proteinlösung mit einer Konzentration von 3 bis 4 mg/mL mit 1 µL Reservoirlösung; 100 mM MES pH 6.8 bis 7.1, 900 bis 1500 mM Na/K-Tartrat, gemischt und bei 20 °C für 72 h inkubiert. Für die Aufnahme des Datensatzes wurden die Kristalle in Reservoirlösung mit 20 % Glycerol als Gefrierschutz eingetaucht und in flüssigen Stickstoff eingefroren.

➤ **EGFR-T790M**

Zur Erzeugung von Komplexstrukturen von Inhibitoren in EGFR-T790M wurden 3.5 mg/mL Protein mit einem dreifachen molaren Überschuss an Inhibitor eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend bei 16.000 g für 15 min zentrifugiert. Die Tropfen wurden aus 1 µL Protein und 1 µL Reservoirlösung angesetzt und für 72 bis 96 h bei 20 °C inkubiert. Die Reservoirlösung bestand aus 100 mM MES pH 6.9 bis 7.1, 900 bis 1100 mM Na/K-Tartrat. Für die Aufnahme des Datensatzes wurden die Kristalle in Reservoirlösung mit 20 % Glycerol als Gefrierschutz eingetaucht und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

6.11.2 *Big-Screens*

Für die Suche nach neuen Kristallisationsbedingungen im Hochdurchsatzverfahren wurden kommerziell erhältliche *Crystallization Suites* von Qiagen verwendet, darunter waren *JCSG Core I-IV, Classics I+II, ComPAS, PEGs, PACT, MbClass I+II*. Die Screens wurden mithilfe eines *LCQ Mosquito* Pipettierroboters in *TTP labtech IQ plates* angesetzt und mit einem *Formulatrix Imager* bei 4 °C und 20 °C überwacht.

6.11.3 *Additive-Screens*

Verwendet wurden die *Opti-Salts Suite* von QIAGEN und *Additive-Screen HT* von Hampton Research. Die *Screens* lagen als 10-fach konzentrierte Lösung vor und mussten mit einer entsprechend angepassten Reservoirlösung (1.1-fach) verdünnt werden. Genutzt wurden ebenfalls *TTP Laptech IQ Plates*. Die Inkubation erfolgte analog zu den *Big-Screens* bei 20 °C oder 4 °C.

7 Literatur

- [1] S. Cohen, *Bioscience reports* **1986**, *6*, 1017-1028.
- [2] D. Stehelin, H. E. Varmus, J. M. Bishop, P. K. Vogt, *Nature* **1976**, *260*, 170-173.
- [3] P. K. Vogt, *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 639-648.
- [4] K. Oda, Y. Matsuoka, A. Funahashi, H. Kitano, *Molecular Systems Biology* **2005**, *1*, 2005.0010-2005.0010.
- [5] Y. Yarden, M. X. Sliwkowski, *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, *2*, 127-137.
- [6] M. D. Marmor, K. B. Skaria, Y. Yarden, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2004**, *58*, 903-913.
- [7] C. Sweeney, K. L. Carraway, 3rd, *Oncogene* **2000**, *19*, 5568-5573.
- [8] N. Prenzel, O. M. Fischer, S. Streit, S. Hart, A. Ullrich, *Endocrine-related cancer* **2001**, *8*, 11-31.
- [9] N. E. Hynes, K. Horsch, M. A. Olayioye, A. Badache, *Endocrine-related cancer* **2001**, *8*, 151-159.
- [10] T. Holbro, G. Civenni, N. E. Hynes, *Exp Cell Res* **2003**, *284*, 99-110.
- [11] T. Holbro, N. E. Hynes, *Annual review of pharmacology and toxicology* **2004**, *44*, 195-217.
- [12] M. A. Pierotti, Sozzi G., C. M. Croce, in *Mechanisms of oncogene activation*, 6th edition ed. (Ed.: H.-F. C. Medicine), **2003**.
- [13] R. Roskoski Jr, *Pharmacological Research* **2014**, *79*, 34-74.
- [14] D. Slamon, G. Clark, S. Wong, W. Levin, A. Ullrich, W. McGuire, *Science* **1987**, *235*, 177-182.
- [15] L. Dolle, I. El Yazidi-Belkoura, E. Adriaenssens, V. Nurcombe, H. Hondermarck, *Oncogene* **0000**, *22*, 5592-5601.
- [16] E. Tagliabue, F. Castiglioni, C. Ghirelli, M. Modugno, L. Asnaghi, G. Somenzi, C. Melani, S. Menard, *J Biol Chem* **2000**, *275*, 5388-5394.
- [17] N. E. Hynes, G. MacDonald, *Curr Opin Cell Biol* **2009**, *21*, 177-184.
- [18] R. N. Jorissen, F. Walker, N. Pouliot, T. P. Garrett, C. W. Ward, A. W. Burgess, *Exp Cell Res* **2003**, *284*, 31-53.
- [19] Y. B. Zheng, Y. Yu, B. Chen, J. L. Hu, T. Jing, X. P. Zhang, *Cancer Invest* **2016**, *34*, 123-129.
- [20] S. Peters, S. Zimmermann, *Transl Lung Cancer Res* **2014**, *3*, 84-88.
- [21] N. Omar, B. Yan, M. Salto-Tellez, *Pathogenesis* **2015**, *2*, 1-9.
- [22] R. Bose, S. M. Kavuri, A. C. Searleman, W. Shen, D. Shen, D. C. Koboldt, J. Monsey, N. Goel, A. B. Aronson, S. Li, C. X. Ma, L. Ding, E. R. Mardis, M. J. Ellis, *Cancer Discov* **2013**, *3*, 224-237.
- [23] J. D. Rowley, *Cancer* **1990**, *65*, 2178-2184.
- [24] P. A. Steck, M. A. Pershouse, S. A. Jasser, W. K. A. Yung, H. Lin, A. H. Ligon, L. A. Langford, M. L. Baumgard, T. Hattier, T. Davis, C. Frye, R. Hu, B. Swedlund, D. H. R. Teng, S. V. Tavtigian, *Nat Genet* **1997**, *15*, 356-362.
- [25] M. Keniry, R. Parsons, *Oncogene* **0000**, *27*, 5477-5485.
- [26] K. M. Ferguson, *Annual review of biophysics* **2008**, *37*, 353-373.
- [27] M. Rabiller, M. Getlik, S. Kluter, A. Richters, S. Tuckmantel, J. R. Simard, D. Rauh, *Arch Pharm (Weinheim)* **2010**, *343*, 193-206.
- [28] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, *Science* **2002**, *298*, 1912-1934.
- [29] R. B. Russell, J. Breed, G. J. Barton, *FEBS Lett* **1992**, *304*, 15-20.
- [30] J. Jin, T. Pawson, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **2012**, *367*, 2540-2555.
- [31] C. Lu, L.-Z. Mi, M. J. Grey, J. Zhu, E. Graef, S. Yokoyama, T. A. Springer, *Molecular and Cellular Biology* **2010**, *30*, 5432-5443.
- [32] B. Linggi, G. Carpenter, *Trends Cell Biol* **2006**, *16*, 649-656.

- [33] R. H. Tao, I. N. Maruyama, *J Cell Sci* **2008**, *121*, 3207-3217.
- [34] Nicholas J. Bessman, A. Bagchi, Kathryn M. Ferguson, Mark A. Lemmon, *Cell Reports* **2014**, *9*, 1306-1317.
- [35] K. M. Ferguson, P. J. Darling, M. J. Mohan, T. L. Macatee, M. A. Lemmon, *EMBO J* **2000**, *19*, 4632-4643.
- [36] Y. Huang, S. Bharill, D. Karandur, S. M. Peterson, M. Marita, X. Shi, M. J. Kaliszewski, A. W. Smith, E. Y. Isacoff, J. Kuriyan, *eLife* **2016**, *5*, e14107.
- [37] K. M. Ferguson, M. B. Berger, J. M. Mendrola, H. S. Cho, D. J. Leahy, M. A. Lemmon, *Mol Cell* **2003**, *11*, 507-517.
- [38] T. P. Garrett, N. M. McKern, M. Lou, T. C. Elleman, T. E. Adams, G. O. Lovrecz, M. Kofler, R. N. Jorissen, E. C. Nice, A. W. Burgess, C. W. Ward, *Mol Cell* **2003**, *11*, 495-505.
- [39] M. A. Olayioye, R. M. Neve, H. A. Lane, N. E. Hynes, *EMBO J* **2000**, *19*, 3159-3167.
- [40] K. S. Mineev, E. V. Bocharov, Y. E. Pustovalova, O. V. Bocharova, V. V. Chupin, A. S. Arseniev, *Journal of Molecular Biology* **2010**, *400*, 231-243.
- [41] E. V. Bocharov, P. E. Volynsky, K. V. Pavlov, R. G. Efremov, A. S. Arseniev, *Cell Adh Migr* **2010**, *4*, 284-298.
- [42] A. Doerner, R. Scheck, A. Schepartz, *Chem Biol* **2015**, *22*, 776-784.
- [43] R. A. Scheck, M. A. Lowder, J. S. Appelbaum, A. Schepartz, *ACS Chem Biol* **2012**, *7*, 1367-1376.
- [44] N. Jura, N. F. Endres, K. Engel, S. Deindl, R. Das, M. H. Lamers, D. E. Wemmer, X. Zhang, J. Kuriyan, *Cell* **2009**, *137*, 1293-1307.
- [45] N. Jura, X. Zhang, N. F. Endres, M. A. Seeliger, T. Schindler, J. Kuriyan, *Mol Cell* **2011**, *42*, 9-22.
- [46] E. Kovacs, R. Das, Q. Wang, T. S. Collier, A. Cantor, Y. Huang, K. Wong, A. Mirza, T. Barros, P. Grob, N. Jura, R. Bose, J. Kuriyan, *Molecular and Cellular Biology* **2015**, *35*, 3083-3102.
- [47] X. Zhang, J. Gureasko, K. Shen, P. A. Cole, J. Kuriyan, *Cell* **2006**, *125*, 1137-1149.
- [48] X. Zhang, K. A. Pickin, R. Bose, N. Jura, P. A. Cole, J. Kuriyan, *Nature* **2007**, *450*, 741-744.
- [49] B. Nolen, S. Taylor, G. Ghosh, *Mol Cell* **2004**, *15*, 661-675.
- [50] S. S. Taylor, A. P. Kornev, *Trends Biochem Sci* **2011**, *36*, 65-77.
- [51] D. Bossemeyer, *FEBS Lett* **1995**, *369*, 57-61.
- [52] D. Fabbro, S. W. Cowan-Jacob, H. Moebitz, *Br J Pharmacol* **2015**, *172*, 2675-2700.
- [53] F. Zuccotto, E. Ardini, E. Casale, M. Angiolini, *J Med Chem* **2010**, *53*, 2681-2694.
- [54] S. B. Hari, E. A. Merritt, D. J. Maly, *Chem Biol* **2013**, *20*, 806-815.
- [55] Daniel K. Treiber, Neil P. Shah, *Chemistry & Biology* **2013**, *20*, 745-746.
- [56] P. D. Jeffrey, A. A. Russo, K. Polyak, E. Gibbs, J. Hurwitz, J. Massague, N. P. Pavletich, *Nature* **1995**, *376*, 313-320.
- [57] S. L. Sierke, K. Cheng, H. H. Kim, J. G. Koland, *Biochem J* **1997**, *322 (Pt 3)*, 757-763.
- [58] N. Jura, Y. Shan, X. Cao, D. E. Shaw, J. Kuriyan, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 21608-21613.
- [59] T. Xie, S. M. Lim, K. D. Westover, M. E. Dodge, D. Ercan, S. B. Ficarro, D. Udayakumar, D. Gurbani, H. S. Tae, S. M. Riddle, T. Sim, J. A. Marto, P. A. Janne, C. M. Crews, N. S. Gray, *Nat Chem Biol* **2014**, *10*, 1006-1012.
- [60] F. Shi, S. E. Telesco, Y. Liu, R. Radhakrishnan, M. A. Lemmon, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**, *107*, 7692-7697.
- [61] R. Roskoski, Jr., *Pharmacol Res* **2015**, *100*, 1-23.
- [62] A. Levitzki, E. Mishani, *Annu Rev Biochem* **2006**, *75*, 93-109.
- [63] R. Morphy, *J Med Chem* **2010**, *53*, 1413-1437.
- [64] A. C. Dar, K. M. Shokat, *Annu Rev Biochem* **2011**, *80*, 769-795.
- [65] A. Backes, B. Zech, B. Felber, B. Klebl, G. Muller, *Expert Opin Drug Discov* **2008**, *3*, 1427-1449.
- [66] A. Backes, B. Zech, B. Felber, B. Klebl, G. Muller, *Expert Opin Drug Discov* **2008**, *3*, 1409-1425.
- [67] M. Getlik, C. Grutter, J. R. Simard, S. Kluter, M. Rabiller, H. B. Rode, A. Robubi, D. Rauh, *J Med Chem* **2009**, *52*, 3915-3926.

- [68] S. W. Cowan-Jacob, G. Fendrich, A. Floersheimer, P. Furet, J. Liebetanz, G. Rummel, P. Rheinberger, M. Centeleghe, D. Fabbro, P. W. Manley, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2007**, *63*, 80-93.
- [69] E. R. Wood, A. T. Truesdale, O. B. McDonald, D. Yuan, A. Hassell, S. H. Dickerson, B. Ellis, C. Pennisi, E. Horne, K. Lackey, K. J. Alligood, D. W. Rusnak, T. M. Gilmer, L. Shewchuk, *Cancer Res* **2004**, *64*, 6652-6659.
- [70] J. R. Simard, S. Kluter, C. Grutter, M. Getlik, M. Rabiller, H. B. Rode, D. Rauh, *Nat Chem Biol* **2009**, *5*, 394-396.
- [71] W.-I. Wu, W. C. Voegtli, H. L. Sturgis, F. P. Dizon, G. P. A. Vigers, B. J. Brandhuber, *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12913.
- [72] W. Zhou, D. Ercan, L. Chen, C. H. Yun, D. Li, M. Capelletti, A. B. Cortot, L. Chirieac, R. E. Iacob, R. Padera, J. R. Engen, K. K. Wong, M. J. Eck, N. S. Gray, P. A. Janne, *Nature* **2009**, *462*, 1070-1074.
- [73] N. Katakami, S. Atagi, K. Goto, T. Hida, T. Horai, A. Inoue, Y. Ichinose, K. Koboyashi, K. Takeda, K. Kiura, K. Nishio, Y. Seki, R. Ebisawa, M. Shahidi, N. Yamamoto, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2013**, *31*, 3335-3341.
- [74] L. V. Sequist, J. C. Soria, J. W. Goldman, H. A. Wakelee, S. M. Gadgeel, A. Varga, V. Papadimitrakopoulou, B. J. Solomon, G. R. Oxnard, R. Dziadziuszko, D. L. Aisner, R. C. Doebele, C. Galasso, E. B. Garon, R. S. Heist, J. Logan, J. W. Neal, M. A. Mendenhall, S. Nichols, Z. Piotrowska, A. J. Wozniak, M. Raponi, C. A. Karlovich, S. Jaw-Tsai, J. Isaacson, D. Despain, S. L. Matheny, L. Rolfe, A. R. Allen, D. R. Camidge, *The New England journal of medicine* **2015**, *372*, 1700-1709.
- [75] A. O. Walter, R. T. Sjin, H. J. Haringsma, K. Ohashi, J. Sun, K. Lee, A. Dubrovskiy, M. Labenski, Z. Zhu, Z. Wang, M. Sheets, T. St Martin, R. Karp, D. van Kalken, P. Chaturvedi, D. Niu, M. Nacht, R. C. Petter, W. Westlin, K. Lin, S. Jaw-Tsai, M. Raponi, T. Van Dyke, J. Etter, Z. Weaver, W. Pao, J. Singh, A. D. Simmons, T. C. Harding, A. Allen, *Cancer Discov* **2013**, *3*, 1404-1415.
- [76] L. Frederick, X. Y. Wang, G. Eley, C. D. James, *Cancer Res* **2000**, *60*, 1383-1387.
- [77] A. J. Wong, J. M. Ruppert, S. H. Bigner, C. H. Grzeschik, P. A. Humphrey, D. S. Bigner, B. Vogelstein, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1992**, *89*, 2965-2969.
- [78] R. A. Fenstermaker, M. J. Ciesielski, *Oncogene* **2000**, *19*, 4542-4548.
- [79] E. O. Olapade-Olaopa, D. K. Moscatello, E. H. MacKay, T. Horsburgh, D. P. Sandhu, T. R. Terry, A. J. Wong, F. K. Habib, *Br J Cancer* **2000**, *82*, 186-194.
- [80] J. C. Sok, F. M. Coppelli, S. M. Thomas, M. N. Lango, S. Xi, J. L. Hunt, M. L. Freilino, M. W. Graner, C. J. Wikstrand, D. D. Bigner, W. E. Gooding, F. B. Furnari, J. R. Grandis, *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 5064-5073.
- [81] I. Okamoto, L. C. Kenyon, D. R. Emlet, T. Mori, J. Sasaki, S. Hirosako, Y. Ichikawa, H. Kishi, A. K. Godwin, M. Yoshioka, M. Suga, M. Matsumoto, A. J. Wong, *Cancer Sci* **2003**, *94*, 50-56.
- [82] D. K. Moscatello, M. Holgado-Madruga, A. K. Godwin, G. Ramirez, G. Gunn, P. W. Zoltick, J. A. Biegel, R. L. Hayes, A. J. Wong, *Cancer Res* **1995**, *55*, 5536-5539.
- [83] T. J. Lynch, D. W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R. A. Okimoto, B. W. Brannigan, P. L. Harris, S. M. Haserlat, J. G. Supko, F. G. Haluska, D. N. Louis, D. C. Christiani, J. Settleman, D. A. Haber, *The New England journal of medicine* **2004**, *350*, 2129-2139.
- [84] J. G. Paez, P. A. Janne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, B. E. Johnson, M. Meyerson, *Science* **2004**, *304*, 1497-1500.
- [85] W. Pao, V. Miller, M. Zakowski, J. Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, B. Singh, R. Heelan, V. Rusch, L. Fulton, E. Mardis, D. Kupfer, R. Wilson, M. Kris, H. Varmus, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 13306-13311.
- [86] T. D. Prickett, N. S. Agrawal, X. Wei, K. E. Yates, J. C. Lin, J. R. Wunderlich, J. C. Cronin, P. Cruz, S. A. Rosenberg, Y. Samuels, *Nat Genet* **2009**, *41*, 1127-1132.

- [87] R. Gilbertson, R. Hernan, T. Pietsch, L. Pinto, P. Scotting, R. Allibone, D. Ellison, R. Perry, A. Pearson, J. Lunec, *Genes Chromosomes Cancer* **2001**, *31*, 288-294.
- [88] B. S. Jaiswal, N. M. Kljavin, E. W. Stawiski, E. Chan, C. Parikh, S. Durinck, S. Chaudhuri, K. Pujara, J. Guillory, K. A. Edgar, V. Janakiraman, R. P. Scholz, K. K. Bowman, M. Lorenzo, H. Li, J. Wu, W. Yuan, B. A. Peters, Z. Kan, J. Stinson, M. Mak, Z. Modrusan, C. Eigenbrot, R. Firestein, H. M. Stern, K. Rajalingam, G. Schaefer, M. A. Merchant, M. X. Sliwkowski, F. J. de Sauvage, S. Seshagiri, *Cancer Cell* **2013**, *23*, 603-617.
- [89] N. Cancer Genome Atlas, *Nature* **2012**, *490*, 61-70.
- [90] Y. Yarden, G. Pines, *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 553-563.
- [91] N. Sugawa, A. J. Ekstrand, C. D. James, V. P. Collins, *Proc Natl Acad Sci U S A* **1990**, *87*, 8602-8606.
- [92] J. Bange, E. Zwick, A. Ullrich, *Nat Med* **2001**, *7*, 548-552.
- [93] S. Hirota, K. Isozaki, Y. Moriyama, K. Hashimoto, T. Nishida, S. Ishiguro, K. Kawano, M. Hanada, A. Kurata, M. Takeda, G. Muhammad Tunio, Y. Matsuzawa, Y. Kanakura, Y. Shinomura, Y. Kitamura, *Science* **1998**, *279*, 577-580.
- [94] O. S. Din, P. J. Woll, *Ther Clin Risk Manag* **2008**, *4*, 149-162.
- [95] B. J. Druker, S. Tamura, E. Buchdunger, S. Ohno, G. M. Segal, S. Fanning, J. Zimmermann, N. B. Lydon, *Nat Med* **1996**, *2*, 561-566.
- [96] S. V. Sharma, D. W. Bell, J. Settleman, D. A. Haber, *Nat Rev Cancer* **2007**, *7*, 169-181.
- [97] R. Rosell, T. Moran, C. Queralt, R. Porta, F. Cardenal, C. Camps, M. Majem, G. Lopez-Vivanco, D. Isla, M. Provencio, A. Insa, B. Massuti, J. L. Gonzalez-Larriba, L. Paz-Ares, I. Bover, R. Garcia-Campelo, M. A. Moreno, S. Catot, C. Rolfo, N. Reguart, R. Palmero, J. M. Sanchez, R. Bastus, C. Mayo, J. Bertran-Alamillo, M. A. Molina, J. J. Sanchez, M. Taron, *The New England journal of medicine* **2009**, *361*, 958-967.
- [98] J. M. Heuckmann, D. Rauh, R. K. Thomas, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2012**, *30*, 3417-3420.
- [99] Robert-Koch-Institut,
http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Lungenkrebs/lungenkrebs_node.html **2016**.
- [100] W. Pao, K. E. Hutchinson, *Nat Med* **2012**, *18*, 349-351.
- [101] LungCancerGroupCologne,
<http://lungcancergroup.de/molekularpathologie/treibermutationen/>, <http://ngm-cancer.com/molekularpathologie/treibermutationen-beim-lungenkrebs/> **2016**.
- [102] S. Kobayashi, T. J. Boggon, T. Dayaram, P. A. Janne, O. Kocher, M. Meyerson, B. E. Johnson, M. J. Eck, D. G. Tenen, B. Halmos, *The New England journal of medicine* **2005**, *352*, 786-792.
- [103] C. Roche-Lestienne, V. Soenen-Cornu, N. Grardel-Duflos, J. L. Lai, N. Philippe, T. Facon, P. Fenaux, C. Preudhomme, *Blood* **2002**, *100*, 1014-1018.
- [104] Ketan S. Gajiwala, J. Feng, R. Ferre, K. Ryan, O. Brodsky, S. Weinrich, John C. Kath, A. Stewart, *Structure* **2013**, *21*, 209-219.
- [105] L. Huang, L. Fu, *Acta Pharmaceutica Sinica B* **2015**, *5*, 390-401.
- [106] C.-H. Yun, K. E. Mengwasser, A. V. Toms, M. S. Woo, H. Greulich, K.-K. Wong, M. Meyerson, M. J. Eck, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2008**, *105*, 2070-2075.
- [107] S. H. Ou, R. A. Soo, *Drug Des Devel Ther* **2015**, *9*, 5641-5653.
- [108] S. S. Ramalingam, K. O'Byrne, M. Boyer, T. Mok, P. A. Janne, H. Zhang, J. Liang, I. Taylor, E. I. Sbar, L. Paz-Ares, *Ann Oncol* **2016**, *27*, 423-429.
- [109] A. J. Gonzales, K. E. Hook, I. W. Althaus, P. A. Ellis, E. Trachet, A. M. Delaney, P. J. Harvey, T. A. Ellis, D. M. Amato, J. M. Nelson, D. W. Fry, T. Zhu, C. M. Loi, S. A. Fakhoury, K. M. Schlosser, K. E. Sexton, R. T. Winters, J. E. Reed, A. J. Bridges, D. J. Lettiere, D. A. Baker, J. Yang, H. T. Lee, H. Teclé, P. W. Vincent, *Mol Cancer Ther* **2008**, *7*, 1880-1889.
- [110] D. Li, L. Ambrogio, T. Shimamura, S. Kubo, M. Takahashi, L. R. Chirieac, R. F. Padera, G. I. Shapiro, A. Baum, F. Himmelsbach, W. J. Rettig, M. Meyerson, F. Solca, H. Greulich, K. K. Wong, *Oncogene* **2008**, *27*, 4702-4711.

- [111] D. A. Cross, S. E. Ashton, S. Ghiorghiu, C. Eberlein, C. A. Nebhan, P. J. Spitzler, J. P. Orme, M. R. Finlay, R. A. Ward, M. J. Mellor, G. Hughes, A. Rahi, V. N. Jacobs, M. Red Brewer, E. Ichihara, J. Sun, H. Jin, P. Ballard, K. Al-Kadhimi, R. Rowlinson, T. Klinowska, G. H. Richmond, M. Cantarini, D. W. Kim, M. R. Ranson, W. Pao, *Cancer Discov* **2014**, *4*, 1046-1061.
- [112] P. A. Jänne, J. C. Yang, D. W. Kim, D. Planchard, Y. Ohe, S. S. Ramalingam, M. J. Ahn, S. W. Kim, W. C. Su, L. Horn, D. Haggstrom, E. Felip, J. H. Kim, P. Frewer, M. Cantarini, K. H. Brown, P. A. Dickinson, S. Ghiorghiu, M. Ranson, *The New England journal of medicine* **2015**, *372*, 1689-1699.
- [113] K. S. Thress, C. P. Paweletz, E. Felip, B. C. Cho, D. Stetson, B. Dougherty, Z. Lai, A. Markovets, A. Vivancos, Y. Kuang, D. Ercan, S. E. Matthews, M. Cantarini, J. C. Barrett, P. A. Jänne, G. R. Oxnard, *Nat Med* **2015**, *21*, 560-562.
- [114] D. Ercan, H. G. Choi, C. H. Yun, M. Capelletti, T. Xie, M. J. Eck, N. S. Gray, P. A. Jänne, *Clin Cancer Res* **2015**.
- [115] A. C. Garrido-Castro, E. Felip, *Translational Lung Cancer Research* **2013**, *2*, 122-127.
- [116] H. Shigematsu, T. Takahashi, M. Nomura, K. Majmudar, M. Suzuki, H. Lee, Wistuba, II, K. M. Fong, S. Toyooka, N. Shimizu, T. Fujisawa, J. D. Minna, A. F. Gazdar, *Cancer Res* **2005**, *65*, 1642-1646.
- [117] S. E. Wang, A. Narasanna, M. Perez-Torres, B. Xiang, F. Y. Wu, S. Yang, G. Carpenter, A. F. Gazdar, S. K. Muthuswamy, C. L. Arteaga, *Cancer Cell* **2006**, *10*, 25-38.
- [118] S. Peters, S. Zimmermann, *Translational Lung Cancer Research* **2014**, *3*, 84-88.
- [119] J. A. Engelman, K. Zejnullahu, T. Mitsudomi, Y. Song, C. Hyland, J. O. Park, N. Lindeman, C. M. Gale, X. Zhao, J. Christensen, T. Kosaka, A. J. Holmes, A. M. Rogers, F. Cappuzzo, T. Mok, C. Lee, B. E. Johnson, L. C. Cantley, P. A. Janne, *Science* **2007**, *316*, 1039-1043.
- [120] J. Ma, H. Lyu, J. Huang, B. Liu, *Molecular Cancer* **2014**, *13*, 105-105.
- [121] G. Vlacich, Robert J. Coffey, *Cancer Cell* **2011**, *20*, 423-425.
- [122] T. J. Kruser, D. L. Wheeler, *Experimental Cell Research* **2010**, *316*, 1083-1100.
- [123] Y. Jia, C.-H. Yun, E. Park, D. Ercan, M. Manuia, J. Juarez, C. Xu, K. Rhee, T. Chen, H. Zhang, S. Palakurthi, J. Jang, G. Lelais, M. DiDonato, B. Bursulaya, P.-Y. Michellys, R. Epple, T. H. Marsilje, M. McNeill, W. Lu, J. Harris, S. Bender, K.-K. Wong, P. A. Jänne, M. J. Eck, *Nature* **2016**, *534*, 129-132.
- [124] X. Wang, K. M. Batty, P. J. Crowe, D. Goldstein, J. L. Yang, *Frontiers in oncology* **2015**, *5*, 2.
- [125] A. J. Barker, K. H. Gibson, W. Grundy, A. A. Godfrey, J. J. Barlow, M. P. Healy, J. R. Woodburn, S. E. Ashton, B. J. Curry, L. Scarlett, L. Henthorn, L. Richards, *Bioorg Med Chem Lett* **2001**, *11*, 1911-1914.
- [126] M. A. Lowder, A. E. Doerner, A. Schepartz, *J Am Chem Soc* **2015**, *137*, 6456-6459.
- [127] J. K. Sinclair, E. V. Denton, A. Schepartz, *J Am Chem Soc* **2014**, *136*, 11232-11235.
- [128] K. Wrzesinski, R. L. I, K. Kulej, R. R. Sprenger, B. Bjorndal, B. J. Christensen, R. K. Berge, N. J. O, A. Rogowska-Wrzesinska, *J Proteomics* **2013**, *84*, 61-77.
- [129] B. Nagar, W. G. Bornmann, P. Pellicena, T. Schindler, D. R. Veach, W. T. Miller, B. Clarkson, J. Kuriyan, *Cancer Res* **2002**, *62*, 4236-4243.
- [130] Y. Shan, M. P. Eastwood, X. Zhang, E. T. Kim, A. Arkhipov, R. O. Dror, J. Jumper, J. Kuriyan, D. E. Shaw, *Cell* **2012**, *149*, 860-870.
- [131] Y. Shan, A. Arkhipov, E. T. Kim, A. C. Pan, D. E. Shaw, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 7270-7275.
- [132] R. Schneider, C. Becker, J. R. Simard, M. Getlik, N. Bohlke, P. Janning, D. Rauh, *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 9138-9141.
- [133] C. Becker, S. Ocal, H. D. Nguyen, T. Phan, M. Keul, J. R. Simard, D. Rauh, *Chembiochem* **2016**, *17*, 990-994.
- [134] M. Getlik, J. R. Simard, M. Termathe, C. Grütter, M. Rabiller, W. A. van Otterlo, D. Rauh, *PLoS One* **2012**, *7*, e39713.
- [135] J. R. Simard, C. Grütter, V. Pawar, B. Aust, A. Wolf, M. Rabiller, S. Wulfert, A. Robubi, S. Klüter, C. Ottmann, D. Rauh, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 18478-18488.

- [136] J. R. Simard, S. Klüter, C. Grütter, M. Getlik, M. Rabiller, H. B. Rode, D. Rauh, *Nat Chem Biol* **2009**, *5*, 394-396.
- [137] Z. Fang, J. R. Simard, D. Plenker, H. D. Nguyen, T. Phan, P. Wolle, S. Baumeister, D. Rauh, *ACS Chem Biol* **2015**, *10*, 279-288.
- [138] S. Oecal, *Technische Universität Dortmund* **2011**, *Diplomarbeit*.
- [139] J. S. Tokarski, J. A. Newitt, C. Y. J. Chang, J. D. Cheng, M. Wittekind, S. E. Kiefer, K. Kish, F. Y. F. Lee, R. Borzillerri, L. J. Lombardo, D. Xie, Y. Zhang, H. E. Klei, *Cancer Research* **2006**, *66*, 5790-5797.
- [140] M. W. Karaman, S. Herrgard, D. K. Treiber, P. Gallant, C. E. Atteridge, B. T. Campbell, K. W. Chan, P. Ciceri, M. I. Davis, P. T. Edeen, R. Faraoni, M. Floyd, J. P. Hunt, D. J. Lockhart, Z. V. Milanov, M. J. Morrison, G. Pallares, H. K. Patel, S. Pritchard, L. M. Wodicka, P. P. Zarrinkar, *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 127-132.
- [141] M. I. Davis, J. P. Hunt, S. Herrgard, P. Ciceri, L. M. Wodicka, G. Pallares, M. Hocker, D. K. Treiber, P. P. Zarrinkar, *Nat Biotechnol* **2011**, *29*, 1046-1051.
- [142] C.-H. Yun, T. J. Boggon, Y. Li, M. S. Woo, H. Greulich, M. Meyerson, M. J. Eck, *Cancer Cell*, *11*, 217-227.
- [143] S. Geisse, in *Methods in Biotechnology, Vol. 24* (Ed.: R. Pörtner), Humana Press Inc., , Totowa, NJ, pp. 489-507.
- [144] R. G.F., Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, **2011**.
- [145] *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols, Vol. 338*, 2 ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- [146] H. J. C. a. W. E. Bentley, *Baculovirus and Insect Cell Expression Protocols: Monitoring and Visualization of Baculovirus Infection Using Green Fluorescent Protein Strategy, Vol. 338*, 2 ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- [147] D. Kitagawa, M. Gouda, Y. Kirii, *Journal of biomolecular screening* **2014**, *19*, 453-461.
- [148] J. A. Goodrich, J. F. Kugel, *Binding and Kinetics for Molecular Biologists* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, **2007**.
- [149] R. A. Copeland, *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, 2 ed., Wiley-VCH. Inc., New York, **2000**.
- [150] J. H. Park, Y. Liu, M. A. Lemmon, R. Radhakrishnan, *Biochem J* **2012**, *448*, 417-423.
- [151] G. Rhodes, in *Crystallography Made Crystal Clear (Third Edition)*, Academic Press, Burlington, **2006**.
- [152] J. A. Blair, D. Rauh, C. Kung, C.-H. Yun, Q.-W. Fan, H. Rode, C. Zhang, M. J. Eck, W. A. Weiss, K. M. Shokat, *Nat Chem Biol* **2007**, *3*, 229-238.
- [153] J. Stamos, M. X. Sliwkowski, C. Eigenbrot, *Journal of Biological Chemistry* **2002**, *277*, 46265-46272.
- [154] A. C. Wallace, R. A. Laskowski, J. M. Thornton, *Protein Eng* **1995**, *8*, 127-134.
- [155] J. Engel, A. Richters, M. Getlik, S. Tomassi, M. Keul, M. Termathe, J. Lategahn, C. Becker, S. Mayer-Wrangowski, C. Grütter, N. Uhlenbrock, J. Krüll, N. Schaumann, S. Eppmann, P. Kibies, F. Hoffgaard, J. Heil, S. Menninger, S. Ortiz-Cuaran, J. M. Heuckmann, V. Tinnefeld, R. P. Zahedi, M. L. Sos, C. Schultz-Fademrecht, R. K. Thomas, S. M. Kast, D. Rauh, *J Med Chem* **2015**.
- [156] I. Landel, *Technische Universität Dortmund* **2014**, *Bachelorarbeit*.
- [157] M. Günther, M. Juchum, G. Kelter, H. Fiebig, S. Laufer, *Angewandte Chemie International Edition* **2016**, *55*, 10890-10894.
- [158] J. Engel, C. Becker, J. Lategahn, M. Keul, J. Ketzer, T. Muhlenberg, L. Kollipara, C. Schultz-Fademrecht, R. P. Zahedi, S. Bauer, D. Rauh, *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55*, 10909-10912.
- [159] X. Wang, K. M. Batty, P. J. Crowe, D. Goldstein, J.-L. Yang, *Frontiers in oncology* **2015**, *5*, 2.
- [160] C. Widakowich, G. de Castro, E. de Azambuja, P. Dinh, A. Awada, *The Oncologist* **2007**, *12*, 1443-1455.
- [161] V. Hirsh, *Current Oncology* **2011**, *18*, 126-138.

- [162] M. E. Arcila, J. E. Chaft, K. Nafa, S. Roy-Chowdhuri, C. Lau, M. Zaidinski, P. K. Paik, M. F. Zakowski, M. G. Kris, M. Ladanyi, *Clinical Cancer Research* **2012**, *18*, 4910-4918.
- [163] H. Yasuda, E. Park, C.-H. Yun, N. J. Sng, A. R. Lucena-Araujo, W.-L. Yeo, M. S. Huberman, D. W. Cohen, S. Nakayama, K. Ishioka, N. Yamaguchi, M. Hanna, G. R. Oxnard, C. S. Lathan, T. Moran, L. V. Sequist, J. E. Chaft, G. J. Riely, M. E. Arcila, R. A. Soo, M. Meyerson, M. J. Eck, S. S. Kobayashi, D. B. Costa, *Science translational medicine* **2013**, *5*, 216ra177-216ra177.
- [164] U.S. National Institutes of Health, <https://clinicaltrials.gov/>, **2016**.
- [165] J. De Greve, E. Teugels, C. Geers, L. Decoster, D. Galdermans, J. De Mey, H. Everaert, I. Umelo, P. In't Veld, D. Schallier, *Lung Cancer* **2012**, *76*, 123-127.
- [166] L. Gandhi, R. Bahleda, S. M. Tolaney, E. L. Kwak, J. M. Cleary, S. S. Pandya, A. Hollebecque, R. Abbas, R. Ananthkrishnan, A. Berkenblit, M. Krygowski, Y. Liang, K. W. Turnbull, G. I. Shapiro, J.-C. Soria, *Journal of Clinical Oncology* **2014**, *32*, 68-75.
- [167] K. S. Nguyen, J. W. Neal, H. Wakelee, *World J Clin Oncol* **2014**, *5*, 576-587.
- [168] K. Aertgeerts, R. Skene, J. Yano, B. C. Sang, H. Zou, G. Snell, A. Jennings, K. Iwamoto, N. Habuka, A. Hirokawa, T. Ishikawa, T. Tanaka, H. Miki, Y. Ohta, S. Sogabe, *J Biol Chem* **2011**, *286*, 18756-18765.
- [169] T. M. Wunderlich, *Technische Universität Dortmund* **2015**, *Bachelorarbeit*.
- [170] E. Lounkine, M. Wawer, A. M. Wassermann, J. Bajorath, *Journal of Chemical Information and Modeling* **2010**, *50*, 68-78.
- [171] C. Pargellis, L. Tong, L. Churchill, P. F. Cirillo, T. Gilmore, A. G. Graham, P. M. Grob, E. R. Hickey, N. Moss, S. Pav, J. Regan, *Nat Struct Biol* **2002**, *9*, 268-272.
- [172] J. Regan, S. Breitfelder, P. Cirillo, T. Gilmore, A. G. Graham, E. Hickey, B. Klaus, J. Madwed, M. Moriak, N. Moss, C. Pargellis, S. Pav, A. Proto, A. Swinamer, L. Tong, C. Torcellini, *J Med Chem* **2002**, *45*, 2994-3008.
- [173] Y. Kuma, G. Sabio, J. Bain, N. Shpiro, R. Marquez, A. Cuenda, *J Biol Chem* **2005**, *280*, 19472-19479.
- [174] U. K. Laemmli, *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- [175] E. Gasteiger, C. Hoogland, A. Gattiker, S. Duvaud, M. R. Wilkins, R. D. Appel, A. Bairoch, **2005**.
- [176] Cisbio, *HTRF® KinEASE™*, <http://www.cisbio.com/drug-discovery/tr-fret-basics>, <http://www.cisbio.com/usa/drug-discovery/htrf-kinease>, **2016**.
- [177] W. Kabsch, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66*, 125-132.
- [178] M. D. Winn, C. C. Ballard, K. D. Cowtan, E. J. Dodson, P. Emsley, P. R. Evans, R. M. Keegan, E. B. Krissinel, A. G. Leslie, A. McCoy, S. J. McNicholas, G. N. Murshudov, N. S. Pannu, E. A. Potterton, H. R. Powell, R. J. Read, A. Vagin, K. S. Wilson, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2011**, *67*, 235-242.
- [179] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66*, 486-501.

8 Anhang

8.1 Ergebnisse des FLiK-Assay mit dem DFG+5-Konstrukt

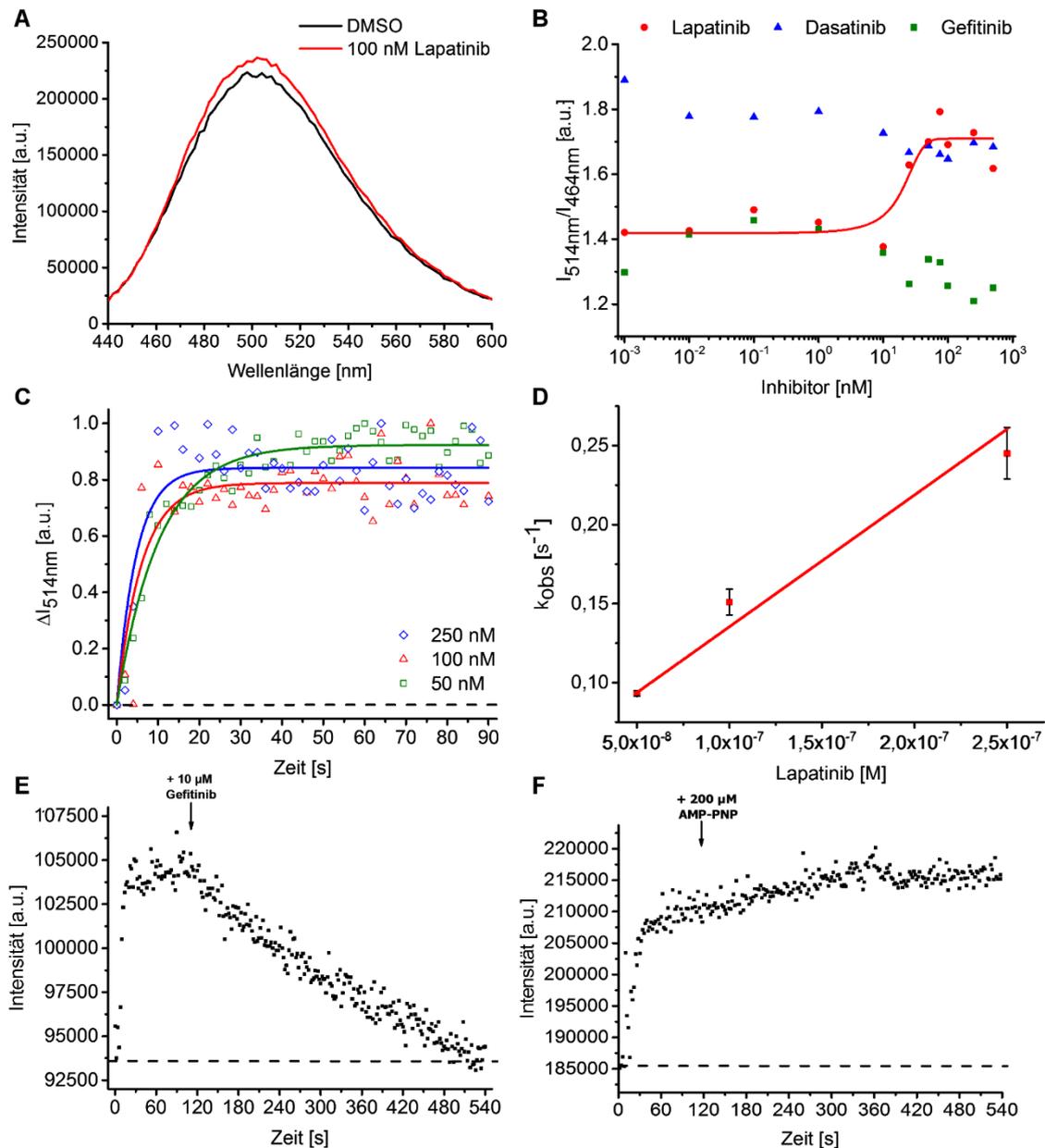
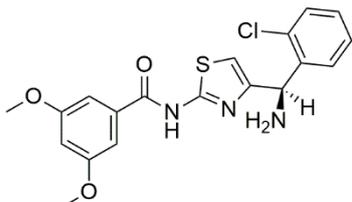
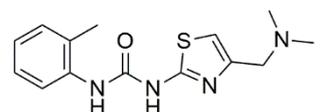
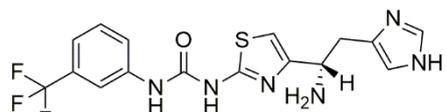
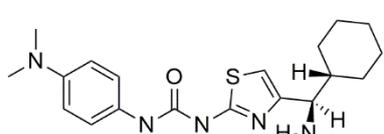
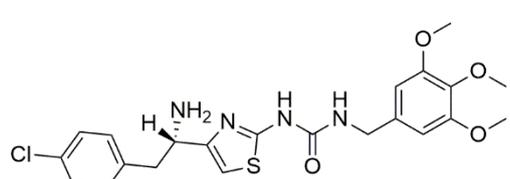
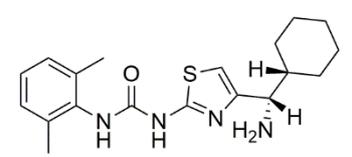
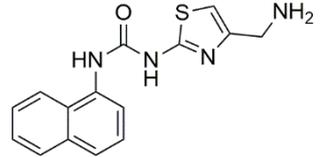
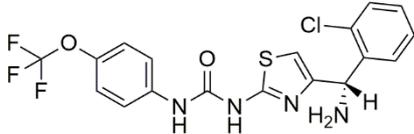
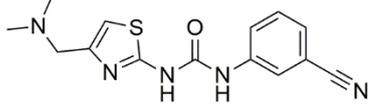
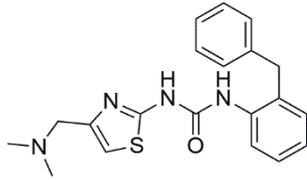
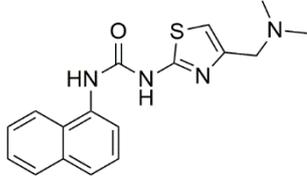
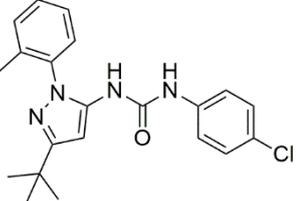
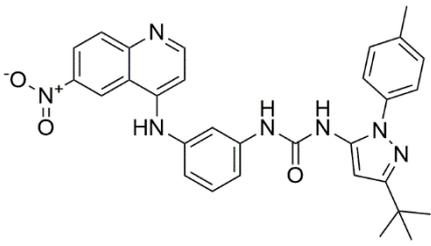
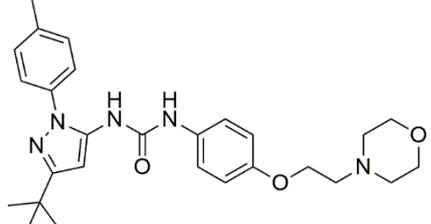
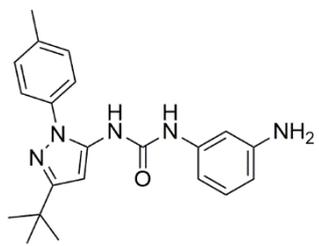
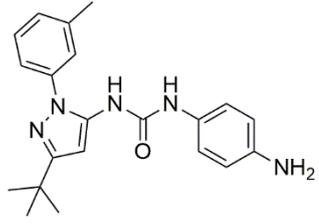


Abbildung 52. FLiK-Messung in Küvetten. **A)** Änderung im Fluoreszenzemissionsspektrum des acrylodanmarkierten Konstrukts DFG+5, im Grundzustand mit DMSO (schwarz) und in Gegenwart von 100 nM Lapatinib (rot). **B)** Beispielhafte Auftragung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensität $I_{514\text{nm}}/I_{464\text{nm}}$ gegen die logarithmische Inhibitor-Konzentration. Durch Anpassen einer sigmoidalen Kurve kann aus deren Wendepunkt der K_D abgelesen werden. Nur Lapatinib zeigt den erwarteten sigmoidalen Verlauf. **C)** Änderung der Intensität der Fluoreszenzemission bei steigender Lapatinibkonzentration. Durch Kurvenanpassung einer Kurve einer Reaktionsgeschwindigkeit pseudo erster Ordnung kann die beobachtete Reaktionsgeschwindigkeit k_{obs} bestimmt werden. **D)** Durch Auftragung des k_{obs} gegen die Lapatinibkonzentration und anschließender linearer Regression können der k_{on} und der k_{off} bestimmt werden. 50 nM Lapatinib wurden in einer Küvette unter ständigen Rühren zu 25 nM acrylodanmarkierten DFG+5 pipettiert. Die Fluoreszenzintensität erreichte ein stabiles Plateau und nach 120 s wurden **E)** 10 μM Gefitinib oder **F)** 200 μM AMP-PNP zugegeben um Lapatinib aus der ATP-Bindetasche zu verdrängen und das Signal in Folge dessen wieder abzusenken.

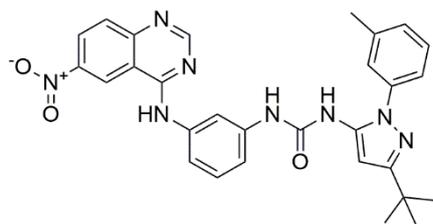
8.2 Hit-Substanzen des HER2-Screens

Tabelle 8. Aufstellung der Verbindungen aus dem Screen der CGC-Bibliothek mit dem HER2-Wildtyp und der Insertionsmutante die für die Hit-Validation ausgewählt wurden.

	Struktur	Screen Restaktivität		Hit-Validierung IC_{50} [nM]	
		INS	WT	INS	WT
BF 055		94 %	100 %	10000	10000
BF 098		90 %	93 %	10000	10000
BF 241		26 %	98 %	10000	10000
BF 349		100 %	84 %	10000	10000
BF 369		99 %	90 %	10000	10000
BF 371		100 %	95 %	10000	10000
BF 394		35 %	88 %	10000	10000
BF 402		35 %	82 %	10000	10000

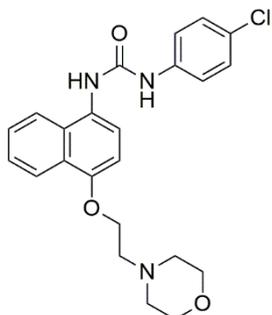
BF 490		92 %	100 %	10000	10000
BF 491		90 %	100 %	10000	10000
BF 494		24 %	93 %	10000	10000
RL 0015		84 %	94 %	5364	10000
RL 0024		91 %	98 %	501	4143
RL 0039		82 %	100 %	10000	10000
RL 0041		79 %	98 %	3953	10000
RL 0042		50 %	64 %	150	10000

RL
0061



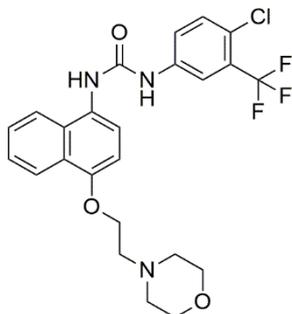
63 % 88 % 10000 10000

RL
0064



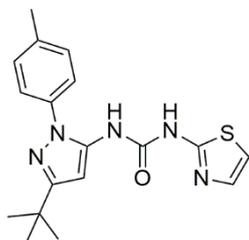
51 % 91 % 11 161

RL
0065



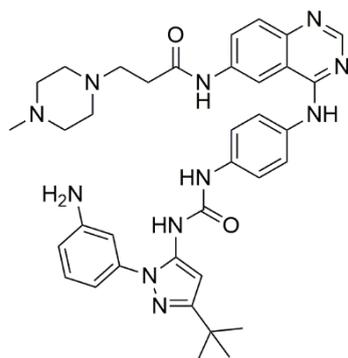
87 % 91 % 8830 10000

RL
0098

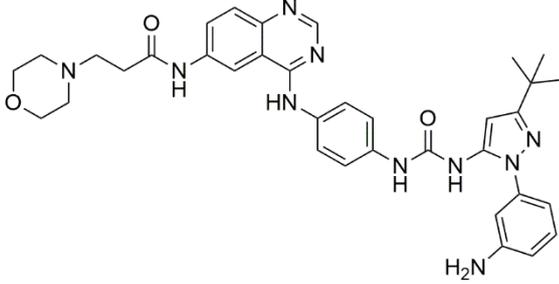
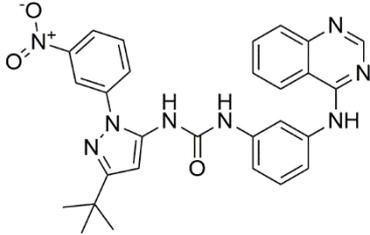
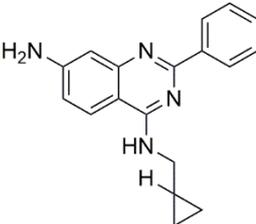
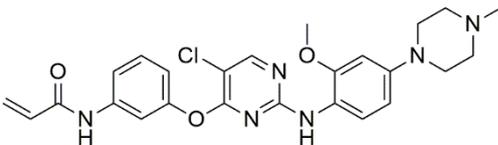
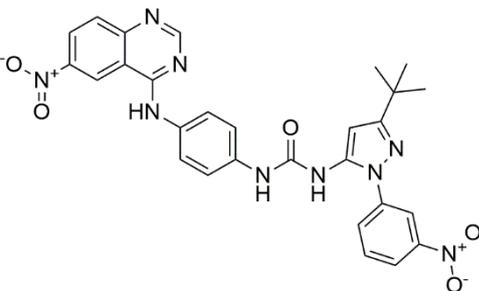
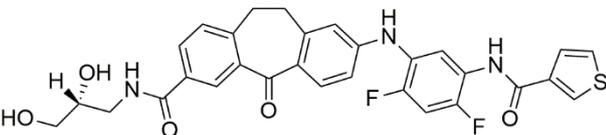
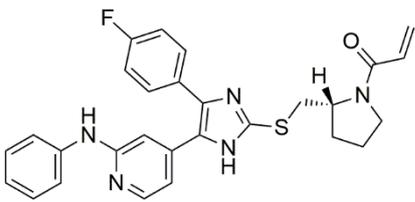


50 % 92 % 29 8971

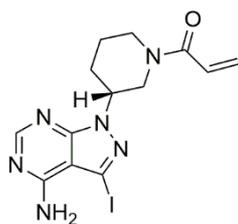
RL
0104



63 % 68 % 659 2035

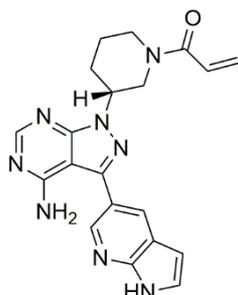
RL 0105		77 %	94 %	1046	4409
RL 0127		78 %	100 %	1514	3609
RL 0164		94 %	96 %	10000	10000
RL 0202		52 %	68 %	118	312
RL 1000		78 %	96 %	10000	10000
RL 1073		59 %	68 %	312	686
RL 1081		78 %	87 %	451	1081

RL
1084



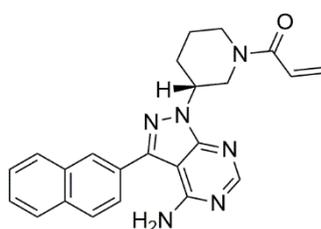
55 % 40 % 578 614

RL
1085



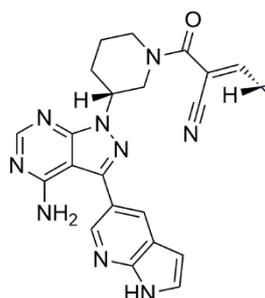
45 % 31 % 125 244

RL
1102



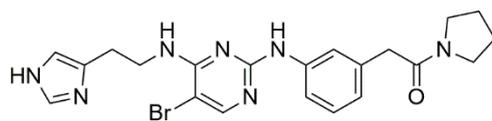
41 % 19 % 133 167

RL
1122



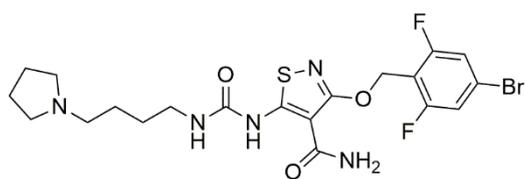
54 % 54 % 4223 814

RL
1615



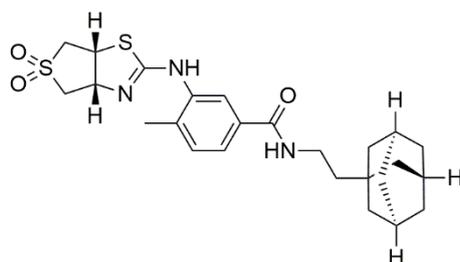
100 % 94 % 10000 8076

RL
1616



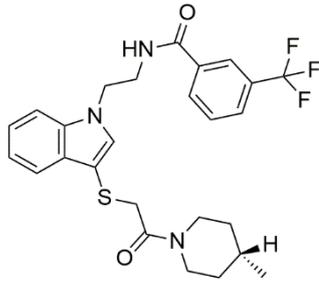
100 % 94 % 8977 10000

RL
1617



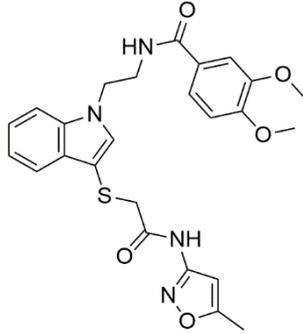
96 % 95 % 10000 10000

RL
1623



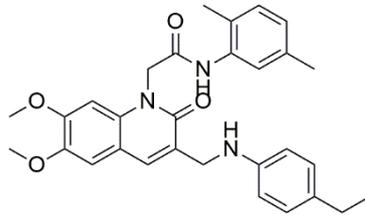
100 % 88 % 10000 10000

RL
1638



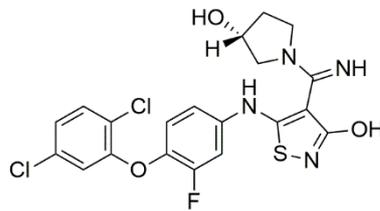
95 % 100 % 10000 10000

RL
1639



86 % 100 % 10000 10000

RL
1696



87 % 100 % 10000 10000

8.3 Sequenzen der Konstrukte

8.3.1 EGFR-Kristallisationskonstrukt

Aminosäuresequenz des EGFR-Kristallisationskonstrukts. Unten aufgeführt ist das Wildtyp Basiskonstrukt auf dem alle weiteren Konstrukte aufgebaut sind.

EGFR Konstrukt	Länge (AS)	Molekulargewicht [Da]	pI	Extinktionskoeffizient bei 280 nm [M ⁻¹ cm ⁻¹]
WT				
ungespalten	347	39518.6	6.02	52370
gespalten	333	37827.7	5.67	
L858R				
ungespalten	347	39561.7	6.11	52370
gespalten	333	37870.8	5.79	
L858R / T790M				
ungespalten	347	39591.8	6.11	52370
gespalten	333	37900.9	5.79	
T790M				
ungespalten	347	39548.7	6.02	52370
gespalten	333	37857.8	5.67	

Aminosäuresequenz EGFR-WT:

Mutationspositionen	His-Tag	Thrombin-Schnittstelle
10 MGHHHHHHVD	20 LVPRGSHMAS	30 GEAPNQALLR
40 ILKETEFKKI	50 KVLGSGAFGT	60 VYKGLWIPEG
70 EKVKIPVAIK	80 ELREATSPKA	90 NKEILDEAYV
100 MASVDNPHVC	110 RLLGICLTST	120 VQLITQLMPF
130 GCLLDYVREH	140 KDNIGSQYLL	150 NWCVQIAKGM
160 NYLEDRLVH	170 RDLAARNVLV	180 KTPQHVKITD
190 FGLAKLLGAE	200 EKEYHAEGGK	210 VPIKWMALES
220 ILHRIYTHQS	230 DVWSYGVTVW	240 ELMTFGSKPY
250 DGIPASEISS	260 ILEKGERLPQ	270 PPICTIDVYM
280 IMVKCWMIDA	290 DSRPKFRELI	300 IEFSKMARDP
310 QRYLVIQGDE	320 RMHLPSPTDS	330 NFYRALMDEE
340 DMDDVVDADÉ	YLIPQQG	

DNA-Sequenz EGFR-WT::

```

CCATGGGCCA TCATCACCAC CACCACGTGG ACCTGGTGCC CCGTGGTTCT CACATGGCTT      60
CCGGCGAGGC TCCCAACCAG GCTCTGCTGC GTATCCTGAA GGAAACCGAG TTCAAGAAGA      120
TCAAGGTCCCT GGGTTCCGGT GCTTTCGGCA CCGTGTACAA GGGCCTGTGG ATCCCCGAGG      180
GCGAGAAAGT GAAGATCCCC GTGGCTATCA AGGAAGTTCG CGAGGCTACC TCCCCCAAGG      240
CTAACAAAGGA AATCCTGGAC GAGGCTTACG TGATGGCCTC CGTGGACAAC CCCCACGTGT      300
GCCGTCTGCT GGGAATCTGC CTGACCTCCA CCGTGCAGCT GATCACCCAG CTGATGCCCT      360
TCGGTTGCTT GCTGGACTAC GTGCGCGAGC ACAAGGACAA CATCGGTTC CAGTACCTGC      420
TGAAGTGGTG CGTGCAGATC GCTAAGGGCA TGAAGTACCT CGAGGACCGT CGTCTGGTGC      480
ACCGTGACCT GGCTGCTCGT AACGTGCTGG TCAAGACCCC CCAGCACGTG AAGATCACCG      540
ACTTCGGCCCT GGCTAAGCTG CTGGGTGCTG AGGAAAAGGA ATACCACGCT GAGGGTGGCA      600
AGGTGCCCAT CAAGTGGATG GCTCTCGAGT CCATCCTGCA CCGTATCTAC ACCCACCAGT      660
CCGACGTGTG GTCCTACGGT GTCACCGTGT GGGAGCTGAT GACTTTCGGC TCCAAGCCCT      720
ACGACGGTAT CCCCCTTCC GAGATCTCCT CCATCCTCGA GAAGGGCGAG CGTCTGCCCT      780
AGCCTCCTAT CTGCACCATC GACGTGTACA TGATCATGGT CAAGTGTCTG ATGATCGACG      840
CTGACTCCCG TCCCAAGTTC CGCGAGCTGA TCATCGAGTT CTCCAAGATG GCTCGTGACC      900
CCCAGCGTTA CCTGGTCAAT CAGGGCGACG AGCGTATGCA CTTGCCTTCC CCCACCGACT      960
CCAACTTCTA CCGTGCTCTG ATGGACGAAG AGGACATGGA CGACGTGGTG GACGCTGACC     1020
AGTACCTGAT CCCCAGCAG GGCTAATAAC CTCAGG                                     1056

```

8.3.2 EGFR – FLiK-Konstrukt

EGFR Konstrukt	Länge (AS)	Molekulargewicht [Da]	pI	Extinktionskoeffizient bei 280 nm[M ⁻¹ cm ⁻¹]
DFG+2 (A859C)				
ungespalten	581	66010.6	5.88	74260
gespalten	318	36607.3	5.70	52370
DFG+5 (L862C)				
ungespalten	581	65968.5	5.88	74260
gespalten	318	36119.7	5.70	52370

Aminosäuresequenz DFG+2 und DFG+5:

His-Tag Markierungspositionen	eGFP	PreScission-Schnittstelle	Cys-Mutationen
10	20	30	40
MAHHHHHHHHH	HHGALEVLV	SKGEELFTGV	VPILVELDGD
50	60	70	80
VNGHKFSVSG	EGEGDATYGK	LTLKFICTTG	KLPVPWPTLV
110	120	130	140
DFFKSAMPEG	YVQERTIFFK	TTLTYGVQCF	SRYPDHMKQH
150	160	170	180
EYNYNSHNVY	IMADKQKNGI	DDGNYKTRAE	VKFEGDTLVN
190	200	210	220
STQSALSNDP	NEKRDMVLL	KVNFKIRHNI	EDGSVQLADH
230	240	250	260
YVQERTIFFK	YVQERTIFFK	YQNTPIGDG	PVLLPDNHYL
270	280	290	300
KVLGSGAFGT	VYKGLWIPEG	ILKETEFKKI	KVLGSGAFGT
LFQGP	ALLR	ILKETEFKKI	KVLGSGAFGT

310 320 330 340 350 360
 EKVKIPVAIK ELREATSPKA NKEILDEAYV MASVDNPHVC RLLGISLTST VQLITQLMPF
 C781S
 370 380 390 400 410 420
 G^SLLDYVREH KDNIGSQYLL NWCVQIAKGM NYLEDRLVH RDLAARNVLV KTPQHVKITD
 C797S
 430 440 450 460 470 480
 FGLAKLIGAE EKEYHAEGGK VPIKWMALES ILHRIYTHQS DVWSYGVTVW ELMTFGSKPY
 A859C L862C
 490 500 510 520 530 540
 DGIPASEISS ILEKGERLPQ PPISTIDVYM IMVKCWMIDA DSRPKFRELI IEF^SKMARDP
 C939S
 550 560 570 580
 QRYLVIQGD E RMHLPSPTDS NFYRALMDEE DMDDVVDADE Y

DNA-Sequenz DFG+2:

ATGGCACATC ACCACCATCA TCACCATCAC CACCACGGTG CACTTGAAGT CCTCTTGGTG 60
 AGCAAGGGCG AGGAGCTGTT CACCGGGGTG GTGCCATCC TGGTCGAGCT GGACGGCGAC 120
 GTAAACGGCC ACAAGTTCAG CGTGTCCGGC GAGGGCGAGG GCGATGCCAC CTACGGCAAG 180
 CTGACCCTGA AGTTCATCTG CACCACCGGC AAGCTGCCCG TGCCCTGGCC CACCCTCGTG 240
 ACCACCCTGA CCTACGGCGT GCAGTGCTTC AGCCGCTACC CCGACCACAT GAAGCAGCAC 300
 GACTTCTTCA AGTCCGCCAT GCCCGAAGGC TACGTCCAGG AGCGCACCAT CTTCTTCAAG 360
 GACGACGGCA ACTACAAGAC CCGCGCCGAG GTGAAGTTCG AGGGCGACAC CCTGGTGAAC 420
 CGCATCGAGC TGAAGGGCAT CGACTTCAAG GAGGACGGCA ACATCCTGGG GCACAAGCTG 480
 GAGTACAAC^T ACAACAGCCA CAACGTCTAT ATCATGGCCG ACAAGCAGAA GAACGGCATC 540
 AAGGTGAACT TCAAGATCCG CCACAACATC GAGGACGGCA GCGTGCAGCT CGCCGACCAC 600
 TACCAGCAGA ACACCCCAT CCGCGACGGC CCCGTGCTGC TGCCCGACAA CCACTACCTG 660
 AGCACCCAGT CCGCCCTGAG CAAAGACCC AACGAGAAGC GCGATCACAT GGTCCTGCTG 720
 GAGTTCGTGA CCGCCGCCGG GATCACTCTC GGCATGGACG AGCTGTACAA GCTTGAAGTC 780
 CTCTTTCAGG GACCCGGGGC TCTGCTGCGT ATCCTGAAGG AAACCGAGTT CAAGAAGATC 840
 AAGTCCCTGG GTTCCGGTCT TTTCCGGCAC GTGTACAAGG GCCTGTGGAT CCCCAGGGC 900
 GAGAAGGTCA AGATCCCCGT GGCTATCAAG GAACTGCGCG AGGCTACCTC CCCCAGGCT 960
 AACCAAGAAA TCCTGGACGA GGCTTACGTG ATGGCTTCCG TGGACAACCC CCACGTGTGC 1020
 CGTCTGCTGG GCATCTCCCT GACCTCCACC GTGCAGCTGA TCACCAGCT GATGCCCTTC 1080
 GGTTCCTGTC TGGACTACGT GCGCGAGCAC AAGGACAACA TCGGTTC^{CC}CA GTACCTGCTG 1140
 AACTGGTGCG TGCAGATCGC TAAGGGCATG AACTACCTCG AGGACCGTCG TCTGGTGCAC 1200
 CGTGACCTGG CTGCTCGTAA CGTGCTGGTC AAGACCC^{CC} AGCACGTGAA GATCACCGAC 1260
 TTCGGCCTGT GCAAGCTGCT GGGTGTGAG GAAAAGGAAT ACCACGCTGA GGGTGGCAAG 1320
 GTGCCATCA AGTGGATGGC TCTCGAGTCC ATCCTGCACC GTATCTACAC CCACCAGTCC 1380
 GACGTGTGGT CCTACGGTGT CACCGTGTGG GAGCTGATGA CTTTCGGTTC CAAGCCCTAC 1440
 GACGGTATCC CCGCTCCGA GATCTCCTCC ATCCTCGAGA AGGGCGAGCG TCTGCCCCAG 1500
 CCCCCATCT CCACCATCGA CGTGATCATG ATCATGGTCA AGTGTGGAT GATCGACGCT 1560
 GACTCCCGTC CCAAGTTCG CGAGCTGATC ATCGAGTTCT CCAAGATGGC TCGTGACCCC 1620
 CAGCGTTACC TGGTCATCCA GGGCGACGAG CGTATGCACC TCCCTCCCC CACCGACTCC 1680
 AACTTCTACC GTGCTCTGAT GGACGAAGAG GACATGGACG ACGTGGTGA CGCTGACGAG 1740
 TACTAA 1746

8.3.3 HER2 – Assay- und Kristallisationskonstrukte

EGFR Konstrukt	Länge (AS)	Molekulargewicht [Da]	pI	Extinktionskoeffizient bei 280 nm[M ⁻¹ cm ⁻¹]
HER2 - WT				
	339	38236.0	6.02	49390
HER2 - INS				
	343	38700.6	6.02	50880

Aminosäuresequenz HER2 - WT:**His-Tag**

10 20 30 40 50 60
 MSGGAAPNQÄ LLRILKETEL RKVKVLGSGA FGTVYKGIWI PDGENVKIPV AIKVLRENTS

70 80 90 100 110 120
 PKANKEILDE AYVMAGVGSF YVSRLLGICL TSTVQLVTQL MPYGCLLDHV RENRGRLSQ

130 140 150 160 170 180
 DLLNWCMIÄ KGMSYLEDVR LVHRDLAARN VLVKSPNHVK ITDFGLARLL DIDETEYHAD

190 200 210 220 230 240
 GGKVPKIKWMA LESILRRRFT HQSDVWSYGV TVWELMTFGA KPYDGIPIRE IPDLLEKGER

250 260 270 280 290 300
 LPQPPICTID VYMIMVKCWM IDSECRPRFR ELVSEFSRMA RDPQRFVVIQ NEDLGPASPL

310 320 330
 DSTFYRSLLE DDDMGDLVDA EEYLVPQQGÄ AASHHHHHH

DNA-Sequenz HER2 - WT:

ATGGGCTCTG GTGCTGCTCC CAACCAGGCT CTGCTGCGTA TCCTGAAGGA AACCGAGCTG 60
 CGCAAAGTGA AGGTGCTGGG TTCCGGTGCT TTCGGCACCG TGTACAAGGG CATCTGGATC 120
 CCCGACGGCG AGAACGTGAA GATCCCCGTG GCTATCAAGG TGCTGCGCGA GAACACCTCC 180
 CCCAAGGCTA ACAAGGAAAT CCTGGACGAG GCTTACGTGA TGGCTGGTGT CGGTTCCCCC 240
 TACGTGTCCC GTCTGCTGGG AATCTGCCTG ACCTCCACCG TGCAGCTGGT CACCCAGCTG 300
 ATGCCCTACG GTTGCCCTGT GGACCACGTC CGCGAGAACC GTGGTCGTCT GGGTTCTCAG 360
 GACCTGCTGA ACTGGTGCAT GCAGATCGCT AAGGGCATGT CCTACCTCGA GGACGTGCGT 420
 CTGGTGCACC GTGACCTGGC TGCTCGTAAC GTGCTGGTCA AGTCCCCCAA CCACGTCAAG 480
 ATCACCGACT TCGGCCCTGGC TCGCCTGCTG GACATCGACG AGACTGAGTA CCACGCTGAC 540
 GGTGGCAAGG TGCCCATCAA GTGGATGGCT CTCGAGTCCA TCCTGCGTCG TCGTTTCACC 600
 CACCAGTCCG ACGTGTGGTC CTACGGTGTG ACCGTGTGGG AGCTGATGAC CTTCCGGTGT 660
 AAGCCCTACG ACGGTATCCC CGCTCGCGAG ATCCCTGACC TGCTGGAAAA GGGCGAGCGT 720
 CTGCCCCAGC CTCCCATCTG CACTATCGAC GTGTACATGA TCATGGTCAA GTGCTGGATG 780
 ATCGACTCCG AGTGCCGTCC CCGTTTCCGC GAGCTGGTGT CCGAGTTCTC CCGTATGGCT 840
 CGTGACCCCC AGCGTTTTCGT GGTATCCAG AACGAGGACC TGGGTCCCCTG TTCCCCTCTG 900
 GACTCCACCT TCTACCGTTC CTTGTTGGAG GACGACGACA TGGGCGACCT GGTGGACGCT 960
 GAGGAATACC TGGTGCCCCA GCAGGGTGCT GCTGCTTCTC ATCACCATCA CCACCACTAA 1020

Aminosäuresequenz HER2 - INS:**His-Tag** **A775_G776insYVMA**

10 20 30 40 50 60
 MGSGAAPNQA LLRILKETEL RKVKVLGSGA FGTVYKGIWI PDGENVKIPV AIKVLRENTS
 70 80 90 100 110 120
 PKANKEILDE AYVMA**YVMA**G VGSPYVSRLL GICLTSTVQL VTQLMPYGCL LDHVRENRRGR
 130 140 150 160 170 180
 LGSQDLLNWC MQIAKGMSYL EDVRLVHRDL AARNVLVKSP NHVKITDFGL ARLLDIDETE
 190 200 210 220 230 240
 YHADGGKVPI KWMALESILR RRFTHQSDVW SYGVTVWELM TFGAKPYDGI PAREIPDLLE
 250 260 270 280 290 300
 KGERLPQPPI CTIDVYMIMV KCWMIDSECR PRFRELVSEF SRMARDPQRF VVIQNEIDLGP
 310 320 330 340
 ASPLDSTFYR SLLEDDDMGD LVDAEEYLVP QQGAAAS**HHH** **HHH**

DNA-Sequenz HER2 - INS:

ATGGGCTCTG GTGCTGCTCC CAACCAGGCT CTGCTGCGTA TCCTGAAGGA AACCGAGCTG 60
 CGCAAAGTGA AGGTGCTGGG TTCCGGTGCT TTCGGCACCG TGTACAAGGG CATCTGGATC 120
 CCCGACGGCG AGAACGTGAA GATCCCCGTG GCTATCAAGG TGCTGCGCGA GAACACCTCC 180
 CCCAAGGCTA ACAAGGAAAT CCTGGACGAG GCTTACGTGA TGGCTACGT CATGGCTGGT 240
 GTCGGTTCCC CCTACGTGTC CCGTCTGCTG GGAATCTGCC TGACCTCCAC CGTGCAGCTG 300
 GTCACCCAGC TGATGCCCTA CGGTTGCTG TTGGACCACG TCCGCGAGAA CCGTGGTCTG 360
 CTGGGTTCTC AGGACCTGCT GAACTGGTGC ATGCAGATCG CTAAGGGCAT GTCCTACCTC 420
 GAGGACGTGA GTCTGGTGCA CCGTGACCTG GCTGCTCGTA ACGTGCTGGT CAAGTCCCCC 480
 AACCACGTCA AGATCACCGA CTTCGGCCTG GCTCGCCTGC TGGACATCGA CGAGACTGAG 540
 TACCACGCTG ACGGTGGCAA GGTGCCCATC AAGTGGATGG CTCTCGAGTC CATCCTGCGT 600
 CGTCGTTTCA CCCACCAGTC CGACGTGTGG TCCTACGGTG TCACCGTGTG GGAGCTGATG 660
 ACCTTCGGTG CTAAGCCCTA CGACGGTATC CCCGTCGCG AGATCCCTGA CCTGCTGGAA 720
 AAGGGCGAGC GTCTGCCCA GCCTCCCATC TGCACTATCG ACGTGACAT GATCATGGTC 780
 AAGTGCTGGA TGATCGACTC CGAGTGCCGT CCCCGTTTC GCGAGCTGGT GTCCGAGTTC 840
 TCCCGTATGG CTCGTGACCC CCAGCGTTTC GTGGTCATCC AGAACGAGGA CCTGGGTCCC 900
 GCTTCCCCTC TGGACTCCAC CTTCTACCGT TCCTTGTTGG AGGACGACGA CATGGGCGAC 960
 CTGGTGGACG CTGAGGAATA CCTGGTGCCC CAGCAGGGTG CTGCTGCTTC TCATCACCAT 1020
 CACCACCACT AA 1032

9 Publikationen

J. Engel* and **C. Becker*** (*equal contribution), J. Lategahn, M. Keul, J. Ketzner, T. Mühlenberg, L. Kollipara, C. Schultz-Fademrecht, R.P. Zahedi, S. Bauer and D. Rauh, **Insights into the inhibition of drug-resistant EGFR.** *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55*, 10909-10912

C. Becker, S. Öcal, H. D. Nguyen, T. Phan, M. Keul, J. R. Simard and D. Rauh, **Monitoring conformational changes in the receptor tyrosine kinase EGFR.** *ChemBioChem.* **2016**, *17(11)*, 990-994.

J. Engel, A. Richters, M. Getlik, S. Tomassi, M. Keul, M. Termathe, J. Lategahn, **C. Becker**, S. Mayer-Wrangowski, C. Grütter, N. Uhlenbrock, J. Krull, N. Schaumann, S. Eppmann, P. Kibies, F. Hoffgaard, J. Heil, S. Menninger, S. Ortiz-Cuaran, J. M. Heuckmann, V. Tinnefeld, R. P. Zahedi, M. L. Sos, C. Schultz-Fademrecht, R. K. Thomas, S. M. Kast, D. Rauh, **Targeting Drug Resistance in EGFR with Covalent Inhibitors: A Structure-Based Design Approach.** *Journal of medicinal chemistry* **2015**, *58*, 6844-6863.

P. Schröder, T. Förster, S. Kleine, **C. Becker**, A. Richters, S. Ziegler, D. Rauh, K. Kumar, H. Waldmann, **Neuritogenic Militarinone-Inspired 4-Hydroxypyridones Target the Stress Pathway Kinase MAP4K4.** *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, *54*, 12398-12403.

R. Schneider, **C. Becker**, J. R. Simard, M. Getlik, N. Bohlke, P. Janning, D. Rauh, **Direct binding assay for the detection of type IV allosteric inhibitors of Abl.** *Journal of the American Chemical Society* **2012**, *134*, 9138-9141.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Daniel Rauh für die Möglichkeit in seinem Arbeitskreis zu promovieren, für die interessante und fordernde Aufgabenstellung und seine Unterstützung während der Zeit der Dissertation. Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Daniel Summerer für die Übernahme des Koreferats.

Ein großer Dank gilt natürlich der Arbeitsgruppe, die stets für eine sehr gute Arbeitsatmosphäre sorgte und auch stets wertvolle Unterstützung leisten konnte. Aber besonders erwähnen möchte ich Julian Engel, Dr. Svenja Mayer-Wrangowski, Dr. Andre Richters und Dr. Zhizhou Fang für viele konstruktive Gespräche und Hilfestellungen im Labor, aber auch für viele fröhliche Momente außerhalb der Arbeitszeit und natürlich auch für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Des Weiteren danke ich Arthur Porfetye für die Unterstützung bei der Proteinkristallographie. Meinen ehemaligen Studenten Marina Keul, Ina Landel und Tim Marius Wunderlich danke ich für ihre Unterstützung bei verschiedenen Projekten.

Petra Alhorn und Martina Reibner danke ich für jegliche Hilfe und Unterstützung bei der Bewältigung von bürokratischen Problemen. Simone Eppmann und Andreas Arndt danke ich ebenfalls für verschiedenste Hilfestellungen die mir die Arbeit im Labor erleichtert haben.

Ebenfalls danken möchte ich den zentralen Einrichtungen des MPI-Dortmund. Insbesondere den Mitarbeiterinnen der ZE-Biotechnologie für die Versorgung mit Nährmedien und Walburga Hecker für die DNA-Sequenzierung. Danken möchte ich an dieser Stelle auch Astrid Sander, Tina Rogowski und Deike Sievert von der Dortmund Protein Facility für die Unterstützung rund um die Arbeit mit Insektenzellen. Dr. Petra Janning und Dr. Ingrid Vetter danke ich für die praktische und theoretische Unterstützung bei der Massenspektrometrie und Proteinkristallographie.

Ich danke meinen Freunden für die gute Zeit, die ich in Dortmund verbracht habe, den alten die mich seit dem ersten Semester bis heute begleitet haben und den neuen die ich während der Promotion kennen gelernt habe.

Der größte Dank gilt letztendlich meinen Eltern, meiner Familie und meiner Freundin Ira, für deren bedingungslose Unterstützung während der letzten Jahre.