

Biochemische, kinetische und zelluläre Charakterisierung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Jörn Weisner

Februar 2020

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

*“Research is to see what everybody has seen
and think what nobody has thought.”*

Albert Szent-Györgyi

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juni 2014 bis Juli 2019 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Daniel Rauh im Fachbereich Chemische Biologie der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Im Rahmen der dieser Arbeit sind die Bachelorarbeiten von Jana Flegel (2015) und Janina Niggenaber (2015) sowie die Masterarbeiten von Rebekka Scheinpflug (2015/2016), Tim Zegar (2016/2017) und Melina Vogt (2018/2019) entstanden.

PUBLIKATIONEN UND PATENTE

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen und Patente entstanden, in denen bereits Teile dieser Arbeit veröffentlicht wurden:

PUBLIKATIONEN:

[1] J. Weisner[‡], R. Gontla[‡], L. van der Westhuizen, S. Oeck, J. Ketzer, P. Janning, A. Richters, T. Mühlenberg, Z. Fang, A. Taher, V. Jendrossek, S. C. Pelly, S. Bauer, W. A. van Otterlo, D. Rauh. Covalent-Allosteric Kinase Inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, 54(35), 10313-10316.

[2] M. Bührmann, J. Hardick, J. Weisner, L. Quambusch, D. Rauh. Covalent Lipid Pocket Ligands Targeting p38 α MAPK Mutants. *Angew Chem Int Ed Engl* **2017**, 56(43), 13232-13236.

[3] P. Wolle[‡], J. Weisner[‡], M. Keul[‡], I. Landel, J. Lategahn, D. Rauh. RASPELD to Perform High-End Screening in an Academic Environment toward the Development of Cancer Therapeutics. *ChemMedChem* **2018**, 13(19), 2065-2072.

[4] B. Wiedemann[‡], J. Weisner[‡], D. Rauh. Chemical modulation of transcription factors. *Medchemcomm* **2018**, 9(8), 1249-1272.

[5] P. Roser[‡], J. Weisner[‡], J. R. Simard, D. Rauh, M. Drescher. Direct monitoring of the conformational equilibria of the activation loop in the mitogen-activated protein kinase p38 α . *Chem Commun (Camb)* **2018**, 54(85), 12057-12060.

[6] N. Uhlenbrock[‡], S. Smith[‡], J. Weisner, I. Landel, M. Lindemann, T. A. Le, J. Hardick, R. Gontla, R. Scheinpflug, P. Czodrowski, P. Janning, L. Depta, L. Quambusch, M. P. Müller, B. Engels, D. Rauh. Structural and Chemical Insights into the Covalent-allosteric Inhibition of the Protein Kinase Akt. *Chem Sci* **2019**, 10(12), 3573-3585.

[‡] geteilte Erstautorenschaft

[7] **J. Weisner**[‡], I. Landel[‡], C. Reintjes[‡], N. Uhlenbrock[‡], M. Trajkovic-Arsic, N. Dienstbier, J. Hardick, S. Ladigan, M. Lindemann, S. Smith, L. Quambusch, R. Scheinpflug, L. Depta, R. Gontla, A. Unger, H. Müller, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, G. Günther, A. Maghnouj, M. P. Müller, M. A. Pohl, C. Teschendorf, H. Wolters, R. Viebahn, A. Tannapfel, W. Uhl, J. G. Hengstler, S. A. Hahn, J. T. Siveke, D. Rauh. Preclinical Efficacy of Covalent-Allosteric AKT Inhibitor Borussertib in Combination with Trametinib in KRAS-mutant Pancreatic and Colorectal Cancer. *Cancer Res* **2019**, 79(9), 2367-2378.

[8] M. Schehr, C. Ianes, **J. Weisner**, L. Heintze, M. P. Müller, C. Pichlo, J. Charl, E. Brunstein, J. Ewert, M. Lehr, U. Baumann, D. Rauh, U. Knippschild, C. Peifer, R. Herges. Limitations of Photoswitchable Inhibitor Approach: 2-azo-, 2-diazocine-thiazols and 2-azo-imidazoles as Photoswitchable Kinase inhibitors against p38 α Mitogen-activated Protein Kinase and Casein Kinase 1 δ . *Photochem Photobiol Sci* **2019**, 18(6), 1398-1407.

[9] L. Quambusch, I. Landel, L. Depta, **J. Weisner**, N. Uhlenbrock, M. P. Müller, F. Glanemann, K. Althoff, J. T. Siveke, D. Rauh. Covalent-Allosteric Inhibitors to Achieve Akt Isoform-Selectivity. *Angew Chem Int Ed Engl* **2019**, *accepted*. doi: 10.1002/anie.201909857.

[10] P. Roser[‡], **J. Weisner**[‡], D. Rauh, M. Drescher. Conformational Selection vs. Induced Fit: Insights into the Binding Mechanisms of Kinase Inhibitors. **2020**, *revised*.

PATENTE:

R. Gontla, **J. Weisner**, D. Rauh. Kinase inhibitors and their use in cancer therapy. WO 2016/177746 A1

INHALTSVERZEICHNIS

Publikationen und Patente	i
Inhaltsverzeichnis	iii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1 Einleitung	1
1.1 Präzisionsmedizin und -onkologie	2
1.2 Proteinkinasen	6
1.2.1 Struktur und Funktion.....	6
1.2.2 Klinische Relevanz	10
1.2.3 Kinaseinhibitoren.....	11
1.2.4 Kovalente Kinaseinhibitoren	17
1.3 Akt (Proteinkinase B/PKB)	21
1.3.1 Allgemeines und Isoformen	21
1.3.2 Struktur	23
1.3.3 PI3K/Akt-Signalweg.....	25
1.3.4 Klinische Relevanz	27
1.3.5 Akt-Inhibitoren.....	30
2 Motivation und Zielsetzung	37
3 Kovalent-allosterische Akt-Inhibitoren	40
3.1 Struktur-basiertes Design einer fokussierten Substanzbibliothek	41
3.2 Massenspektrometrische Bindungsanalysen.....	47
3.2.1 Proteinexpression und- reinigung.....	47
3.2.2 ESI-MS-Analytik	48
3.2.3 ESI-MS/MS-Analytik.....	50
3.3 Biochemische und kinetische Charakterisierung.....	54
3.4 Strukturbiologische Untersuchungen an Akt1	64
3.4.1 Allgemeines	64
3.4.2 Konstruktdesign und Testexpression	65
3.4.3 Präparative Expression und Reinigung von Akt1 ^{xtal}	67
3.4.4 Kristallisation von Akt1 ^{xtal}	73

3.4.5	Analyse des Bindungsmodus	76
3.5	Derivatisierung der Substanzbibliothek	83
3.6	Biochemische und kinetische Evaluierung der erweiterten Substanzbibliothek.....	86
3.7	Profilierung der Kinase-Selektivität.....	91
3.8	Zelluläre Evaluierung.....	95
3.8.1	Evaluierung der Anti-Proliferativen Wirksamkeit	96
3.8.2	Western-Blot Analysen.....	100
3.9	<i>In vitro</i> DMPK-Profilierung.....	103
3.10	<i>In vivo</i> MTD- und PK-Studien.....	106
3.11	<i>In vivo</i> -Wirksamkeitsstudie.....	111
3.12	Akt-Inhibitoren in KRAS-mutierten Modellsystemen.....	114
3.13	<i>In vivo</i> -Wirksamkeit in PDAC/CRC-PDX-Modellen	117
3.14	Zusammenfassung und Ausblick.....	121
4	Chemische Modulation der Keap1/Nrf2-PPI	127
4.1	Adressierung des Keap1/Nrf2-Signalwegs	130
4.2	Entwicklung eines FP-basierten Kompetitionsassays zur Identifizierung von Nrf2-Modulatoren	132
4.2.1	Heterologe Expression und Reinigung von Kelch ^{wt}	133
4.2.2	Bindungsstudien an Kelch ^{wt}	134
4.3	Hochdurchsatz-Screening der <i>in-house</i> Substanz-Bibliothek.....	139
5	Analyse von Konformations-Gleichgewichten in p38α MAPK.....	143
5.1	Allgemeines	143
5.2	Elektronenspinresonanz-Spektroskopie.....	145
5.3	Charakterisierung von p38 α -Inhibitoren mittels EPR-Spektroskopie... ..	148
5.3.1	Konstruktdesign und -etablierung.....	148
5.3.2	EPR-spektroskopische Messungen an p38 α	150
6	Kurzfassung	155
7	Abstract	159
8	Material und Methoden	163
8.1	Generelle Anmerkungen.....	163
8.1.1	Geräte	164

8.1.2	Verbrauchsmaterialien	165
8.1.3	Enzyme, Reagenzien und Kits.....	166
8.1.4	Testsubstanzen	167
8.1.5	Zelllinien und Bakterienstämme	168
8.1.6	Medien und Zellkulturreagenzien.....	169
8.1.7	Antikörper.....	170
8.2	Molekular- und Mikrobiologische Methoden.....	171
8.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	171
8.2.2	Reinigung von PCR-Produkten.....	172
8.2.3	Klonierung mittels Restriktion und Ligation.....	173
8.2.4	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	173
8.2.5	Isolierung von Plasmid-DNA.....	174
8.2.6	DNA-Sequenzierung	174
8.2.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	175
8.3	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	176
8.4	Zellkultur – Insektenzellen.....	177
8.4.1	Zellkultivierung.....	177
8.4.2	Inkulturnahme von Insektenzellen	177
8.4.3	Kryokonservierung von Insektenzellen	178
8.4.4	Transfektion von Insektenzellen (P1-Virus)	178
8.4.5	P2-Virus-Amplifikation	179
8.4.6	P3-Virus-Amplifikation	180
8.4.7	Heterologe Proteinexpression in Insektenzellen.....	180
8.5	Proteinisolation und –reinigung	181
8.5.1	Allgemeines	181
8.5.2	p38 α -Konstrukte	182
8.5.3	Keap1-Kelch-Konstrukte	183
8.5.4	Akt1-Konstrukte	185
8.6	Kristallisation von Akt1 ^{xtal}	187
8.7	Zellkultur – Säugerzellen	188
8.7.1	Zellkultivierung.....	188
8.7.2	Inkulturnahme von Säugerzellen.....	189
8.7.3	Kryokonservierung von Säugerzellen	190

8.7.4	CellTiter-Glo®-Viabilitätsassay.....	190
8.7.5	Western Blot.....	192
8.8	Massenspektrometrie.....	194
8.8.1	ESI-MS.....	194
8.8.2	Tryptischer Verdau und LC-ESI-MS/MS-Analyse.....	195
8.9	HTRF®-Assays.....	198
8.9.1	Akt.....	199
8.9.2	p38 α	200
8.9.3	Kinetische Untersuchungen mittels HTRF®.....	200
8.10	Analyse der DMPK-Parameter.....	202
8.11	Analyse der <i>in vivo</i> PK-Parameter.....	204
8.12	<i>In vivo</i> -Wirksamkeitsstudien.....	205
8.13	Fluoreszenzpolarisations-Assays.....	206
8.14	EPR-spektroskopische Messungen an p38 α	209
9	Literaturverzeichnis.....	210
10	Anhang.....	242
10.1	Proteinsequenzen.....	242
10.1.1	Akt1.....	242
10.1.2	Kelch.....	243
10.1.3	p38 α	244
10.2	Massenspektren.....	245
10.3	MS/MS-Analytik.....	246
10.4	Proteinanalytik.....	248
10.5	Analyse des Bindungsmodus.....	249
10.6	Energieprofil von 8.....	251
10.7	Biochemische und kinetische Evaluierung auf Akt1 ^{E17K}	252
10.8	Selektivitätsprofilierung.....	254
10.9	Zellzahloptimierung.....	256
10.10	Löslichkeitsstudien.....	257
10.11	Hit-Strukturen.....	258
10.12	Reinigung von p38 α	259
10.13	HTRF®-Ergebnisse für p38 α	260

10.14 MS-Analytik für p38 α	261
Danksagung	263
Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)	267

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

4PL	logistischen Funktion mit vier Parametern
Abl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
AEC.....	Anionenaustauschchromatographie
ALK.....	<i>anaplastic lymphoma kinase</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AML.....	akute myeloische Leukämie
AMP-PNP	Adenylylimidodiphosphat
AP	Adenosin-Bindungstasche (<i>adenosine pocket</i>)
APL.....	Alkylphospholipid
ARE	<i>antioxidant response element</i>
ATF2	<i>activating transcription factor 2</i>
ATP.....	Adenosintriphosphat
AUC	<i>area under the curve</i>
<i>Bam</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
BCA.....	Bicinchoninsäure
BCR.....	<i>breakpoint cluster region</i>
BEVS	<i>Baculovirus Expression Vector System</i>
BSA.....	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
BTB	<i>broad complex, tramtrack, bric-à-brac</i>
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
bZIP.....	<i>basic-region leucine zipper</i>
CAAI.....	kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren (<i>covalent-allosteric Akt inhibitors</i>)
CBB.....	Coomassie Brilliant Blau
CDX.....	<i>cell line derived xenograft</i>
CFTR.....	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
c-Kit.....	Stammzellfaktor-Rezeptor
cLogP.....	berechneter Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
CML.....	chronische myeloische Leukämie

CNC.....	<i>cap'n'collar</i>
COPD.....	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>
CRC.....	<i>colorectal carcinoma</i>
CST.....	Cell Signaling Technology
CTG.....	CellTiter-Glo®
CTR.....	C-terminale Region
CW.....	<i>continuous wave</i>
dd.....	doppelt destilliert (<i>bidestillatus</i>)
DDR1/2.....	<i>discoïdin domain-containing receptor 1/2</i>
DEER.....	<i>double electron-electron resonance</i>
DMEM.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMPK.....	<i>drug metabolism and pharmacokinetics</i>
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP.....	Desoxynukleosidtriphosphat
<i>Dpn</i>	<i>Diplococcus pneumoniae</i>
EGFR.....	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
EMA.....	Europäische Arzneimittel-Agentur
EPR.....	Elektronenspinresonanz (<i>electron paramagnetic resonance</i>)
ER.....	Estrogenrezeptor
ESI-MS.....	<i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
EZI.....	Elektron-Zeeman-Interaktion
F-12.....	<i>Nutrient Mixture F-12</i>
FBS.....	Fötales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FLiK.....	<i>fluorescent labels in kinases</i>
FOXO1.....	<i>forkhead box protein O1</i>
FP.....	Fluoreszenzpolarisation
FRET.....	Förster-Resonanzenergietransfer
<i>g</i>	Schwerebeschleunigung (<i>standard gravitational acceleration</i>), 9.81 m/s ²
GIST.....	gastrointestinaler Stromatumor
GLUT1.....	Glucosetransporter 1
GPCR.....	G-Protein-gekoppelter Rezeptor (<i>G protein-coupled receptor</i>)
GSK3.....	Glykogensynthase-Kinase 3

GST	Glutathion-S-Transferase
GWAS	genomweite Assoziationsstudien (<i>genome-wide association studies</i>)
HBP	hydrophobe Rückseitentasche (<i>hydrophobic back pocket</i>)
HCD	<i>high energy collision dissociation</i>
HDI	Index der menschlichen Entwicklung (<i>Human Development Index</i>)
Her2	humaner epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2
HGP	Humangenomprojekt (<i>human genome project</i>)
HM	hydrophobes Motiv
HSP	hydrophobe Subtasche (<i>hydrophobic subpocket</i>)
HTRF	<i>homogeneous time-resolved fluorescence</i>
HTS	Hochdurchsatz-Screening (<i>high-throughput screening</i>)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IC ₅₀	halb-maximale inhibitorische Konzentration
IKK	<i>inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase</i>
IL1B	Interleukin-1 beta
IL6	Interleukin-6
IP ₄	Inositol-(1,3,4,5)-tetrakisphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IVR	<i>intervening region</i>
Keap1	<i>Kelch-like ECH-associated protein 1</i>
K _i	Inhibitionskonstante
k _{inact}	maximale Inaktivierungsrate
K _M	Michaelis-Konstante
LC-MS	<i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
LC-MS/MS	<i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
min	Minute(n)
MKK6	<i>dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 6</i>
MMFF94	<i>Merck molecular force field 94</i>
MOI	Infektionsverhältnis (<i>multiplicity of infection</i>)

MRP	<i>multidrug resistance-associated protein 1</i>
MTD	maximal tolerierbare Dosis
mTORC2	<i>mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
MTSSL	(1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl)-Methanthiosulfonat
MW _{calc}	berechnetes Molekulargewicht
MW _{obs}	beobachtetes Molekulargewicht
NADK	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Kinase
NADP ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiert)
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziert)
<i>Nco</i>	<i>Nocardia corallina</i>
<i>Nde</i>	<i>Neisseria denitrificans</i>
Ni-AC	Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
NQO1	NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase 1
Nrf2	<i>nuclear factor erythroid 2-related factor 2</i>
NSCLC	nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (<i>non-small cell lung cancer</i>)
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTR	N-terminale Region
NZI	Kern-Zeeman-Interaktion (<i>nuclear Zeeman interaction</i>)
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
p.o.	peroral
p70S6K	p70S6-Kinase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAMPA	<i>parallel artificial membrane permeability assay</i>
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PD	<i>progressive disease</i>
PDAC	<i>pancreatic ductal adenocarcinoma</i>
PDB	<i>protein data bank</i>
PDGFR	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PDK1	<i>phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
PDX	<i>patient-derived xenograft</i>

PEG MME 2000.....	Polyethylenglycol-Monomethylether 2000
PES	Polyethersulfon
pfu	infektiöse Viruspartikel (<i>plaque-forming units</i>)
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
P-gp.....	P-Glykoprotein
PH	Pleckstrin-Homologie
PHLPP	<i>PH domain and leucine rich repeat protein phosphatases</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIF	PDK1-interagierendes Fragment
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKB.....	Proteinkinase B, Akt
PP2A	<i>protein phosphatase 2</i>
PPI	Protein-Protein-Interaktion(en)
PR	partielle Remission (<i>partial response</i>), Progesteronrezeptor
PRDX1	Peroxiredoxin-1
PTEN.....	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTM.....	posttranslationale Modifikation(en)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QD	<i>quaque die</i>
QOD.....	<i>quaque altera die</i>
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
Ras.....	G-Protein Ras, <i>rat sarcoma</i>
RASPELD.....	<i>Robotics-Assisted Screening Platform for Efficient Ligand Discovery</i>
RCC.....	Nierenkrebs (<i>renal cell carcinoma</i>)
RECIST	<i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
RIPA.....	<i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
ROCK	Rho-assozierte Proteinkinase
ROS.....	<i>reactive oxygen species</i>
ROS1	<i>proto-oncogene tyrosine-protein kinase ROS</i>
RP2D.....	empfohlene Phase 2-Dosis (<i>recommended phase 2 dosage</i>)
rpm.....	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSK	ribosomale S6-Kinase
RSV	Rous-Sarkom-Virus
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S6	ribosomales Protein S6
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung (<i>structure-activity relationship</i>)
SD	<i>stable disease</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEC	Größenausschluss-Chromatographie (<i>size-exclusion chromatography</i>)
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SGK3	<i>serum- and glucocorticoid-inducible protein kinase 3</i>
SH2	<i>Src-Homology 2</i>
SHIP	<i>SH2-domain-containing inositol 5'-phosphatase</i>
sMaf	<i>small musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
STK	Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase
STR	<i>short tandem repeat</i>
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris-buffered saline</i>)
TF	Transkriptionsfaktor
TFA	Trifluoressigsäure
TK	Tyr-spezifische Proteinkinase
TNBC	triple-negativer Brustkrebs (<i>triple-negative breast cancer</i>)
tPSA	<i>topological polar surface area</i>
TSC1/2	<i>tuberous sclerosis proteins 1 and 2</i>
VEGFR	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>World Health Organization</i>)
wt	Wildtyp
β -ME	β -Mercaptoethanol
λ_{em}	Emissionswellenlänge
λ_{exc}	Anregungswellenlänge

1 EINLEITUNG

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation WHO waren Krebserkrankungen im Jahr 2015 in 91 von 172 Ländern an Position 1 und 2 der häufigsten Todesursachen sowie an Position 3 und 4 in weiteren 22 Ländern bei Personen unter 70 Jahren.^[1] Schätzungen für das Jahr 2018 zufolge gab es weltweit 18.1 Millionen Krebsneuerkrankungen sowie 9.6 Millionen Krebs-bedingte Todesfälle; Lungenkrebs ist hierbei die am häufigsten diagnostizierte sowie tödlichste Krebsform, gefolgt von Brust-, Prostata- und Kolorektalkarzinomen hinsichtlich der Inzidenz bzw. Kolorektal-, Magen- und Leberkarzinomen bezüglich der Mortalität.^[1] Koronare Herzerkrankungen, Atemwegserkrankungen und Infektionskrankheiten stellen weitere Haupttodesursachen dar.^[2] Von großer Bedeutung ist hierbei die globale Verteilung und somit die länderspezifische Prävalenz der Krankheitstypen, wobei insbesondere die Diskrepanz zwischen Industrie- und Entwicklungsländern, welche u. a. auf der unterschiedlichen Lebenserwartung basiert, signifikant ist. Tendenziell ist eine hohe Kongruenz zwischen Krebs als Todesursache bei Personen unter 70 Jahren und dem Index der menschlichen Entwicklung (*Human Development Index*, HDI), welcher das Bruttonationaleinkommen pro Kopf, Lebenserwartung und Dauer der schulischen Ausbildung in einem Land berücksichtigt, zu beobachten.^[3-4] Die sozioökonomische Entwicklung von Ländern mit einem niedrigen HDI, welche zunehmend als sogenannte „Verwestlichung“ beschrieben wird, spiegelt sich ebenfalls in der geänderten Verteilung diagnostizierter Krebstypen wider; nichtsdestotrotz spielen lokale Risikofaktoren innerhalb einer Population nach wie vor eine tragende Rolle bei der Entwicklung von Krankheiten.^[5-6]

Die steigende Inzidenz von Krebserkrankungen unterstreicht deren Relevanz in der modernen Medizin des 21. Jahrhunderts und verdeutlicht die Signifikanz der Wirkstoffentwicklung und -optimierung im Forschungsfeld der Onkologie.

1.1 Präzisionsmedizin und -onkologie

Mit der Initiierung des Humangenomprojekts (HGP, *human genome project*) im Jahr 1990 und dessen Abschluss im Jahr 2003 sollte die vollständige Sequenz des 3.4 Milliarden Basenpaare-umfassenden humanen Genoms entschlüsselt werden, um die Gesamtheit aller humanen Gene zu identifizieren und somit detaillierte Genotyp-Phänotyp-Korrelationen, insbesondere jene pathogener Natur, aufstellen zu können.^[7] Wie von FRANCIS S. COLLINS im Jahr 1999 postuliert, sollte die Dekodierung der zugrundeliegenden Gene eine Vorhersage und Diagnose von (genetisch bedingten) Krankheiten sowie deren Vorbeugung und Behandlung bis zum Jahr 2010 ermöglichen (Abbildung 1).^[8-9]

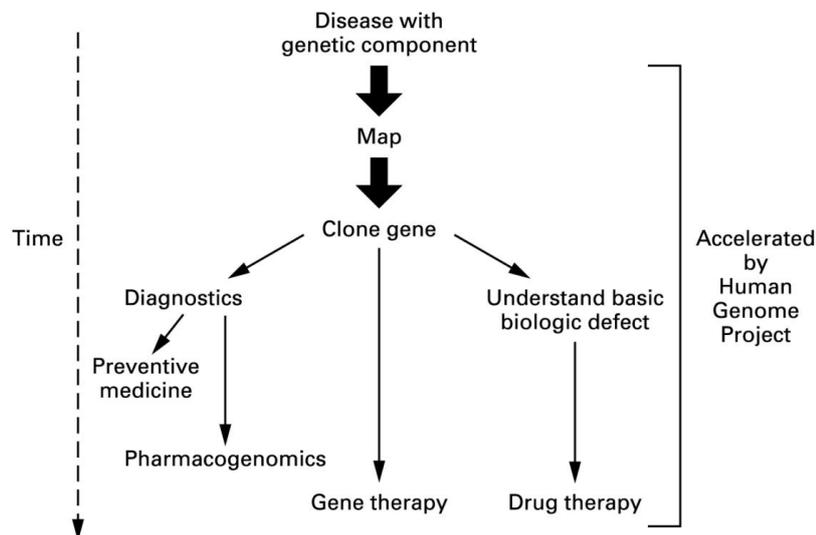


Abbildung 1. Schematische Darstellung der „Genetischen Revolution in der Medizin“ unter dem Einfluss des HGP.^[8] Die Identifikation von genetischen Einwirkungen bei Erkrankungen soll durch die Kartierung und Klonierung aller Gene im Rahmen des Humangenomprojekts beschleunigt werden, wodurch wiederum die Entwicklung von diagnostischen Methoden sowie therapeutischen Ansätzen gefördert wird.

Entgegen der erhofften „Transformation in der therapeutischen Medizin“ kann bis heute nur in wenigen Fällen eine monogene Alteration für die gezielte therapeutische Intervention ausgenutzt werden.^[10-11] Erfolgreiche Fallbeispiele hierfür sind die Wirkstoffe Ivacaftor und Lumacaftor zur Behandlung von Mukoviszidose mit definierten Läsionen im *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)*-Gen, welches für einen epithelialen Chloridionen-Kanal codiert.^[12-14]

Die damals von COLLINS geforderten Rahmenparameter sind seit 2011 als Konzept der Präzisionsmedizin etabliert, welche durch das Verständnis einer Krankheit auf elementarer Ebene als Grundlage für die Entwicklung einer zielgerichteten Therapie definiert ist.^[15] Häufig wird dieses Konzept auch als „Verabreichung der richtigen Arznei bei dem richtigen Patienten zum richtigen Zeitpunkt“ umschrieben.^[16-17] Besondere öffentliche Bekanntheit erlangte dieses Konzept im Jahr 2015, als der ehemalige US-Präsident Barack Obama in seiner Ansprache zur Lage der Nation (*State of the Union Address*) eine „neue Präzisionsmedizin-Initiative zur Heilung von Krankheiten wie Krebs und Diabetes“ ankündigte.^[18-19] Neben den genetischen Gegebenheiten eines Patienten sind auch externe Rahmenbedingungen wie Umwelteinflüsse und Lebensstil maßgeblich an der Pathogenese beteiligt, was unter anderem durch häufig unzureichend prädiktive genomweite Assoziationsstudien (GWAS, *genome-wide association studies*) dargelegt wurde.^[20-21] Zukünftig könnte jedoch die Belastbarkeit und Prädiktivität von GWAS-basierten Korrelationsansätzen durch die gesteigerte Verfügbarkeit von sequenzierten Genomen und optimierten Referenzdatensätzen sowie unter Zuhilfenahme großer „Omics-Datensätze“ (*lipidomics, proteomics, transcriptomics, etc.*) in Kombination mit *machine learning*-Technologien und künstlicher Intelligenz gesteigert werden.^[21-26]

Im Fall von Krebserkrankungen wird auch speziell der Begriff der Präzisionsonkologie verwendet, der die molekulare Tumorprofilierung, die Identifikation adressierbarer genetischer Läsionen (Amplifikation, Überexpression, Fusion, Punktmutation) sowie die maßgeschneiderte Therapie beinhaltet und im Bereich der Präzisionsmedizin die größten Erfolge vorzuweisen hat.^[27-28] Bei Tumorerkrankungen sind neben monogenen Ursachen, z. B. genetische *gain-of-function*-Alterationen im epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) beim nicht-kleinzelligen Lungenkrebs (NSCLC, *non-small cell lung cancer*) oder im Stammzellfaktor-Rezeptor (c-Kit) bei gastrointestinalen Stromatumoren (GIST),^[29-30] häufig eine Vielzahl von fehlregulierten Signalwegen und Prozessen an Tumorgenese, Wachstum und Metastasierung beteiligt.^[31] Diese Mannigfaltigkeit kann durch die Koexistenz von Treibermutationen, z. B. *loss-of-function*-Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie *PTEN*, *TP53*, *RB1* und *VHL* oder *gain-of-function*-

Läsionen in Onkogenen wie *PIK3CA* und *IDH1*, auftreten, die jedoch keine Rolle eines prädiktiven Biomarkers einnehmen müssen, wodurch ein Therapieerfolg nicht vorhergesagt werden kann.^[32-34] Üblicherweise finden sich in Tumoren zwei bis acht von bislang ca. 140 bekannten, individuellen Treibermutationen, die in zwölf Signalwege unterteilt werden können und drei zentrale, zelluläre Prozesse steuern: Zellschicksal, Zellüberleben und Genominstandhaltung.^[35]

Bereits im Jahr 2000 wurden sechs Prozesse von DOUGLAS HANAHAN und ROBERT A. WEINBERG als *hallmarks of cancer* definiert; hierzu gehören die Umgehung der Apoptose, Eigenversorgung mit Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber Antiwachstumssignalen, fortwährende Angiogenese, das unbegrenzte Replikationspotential sowie die Fähigkeit zur Gewebeinvasion und Metastasierung.^[36] Diese *hallmarks* wurden 2011 in der nächsten Generation um vier auszeichnende Eigenschaften erweitert, welche die Deregulierung des zellulären Energiestoffwechsels, die genomische Instabilität, die Immunevasion und die Bildung einer Tumor-fördernden, entzündlichen Mikroumgebung beinhalten (Abbildung 2).^[37]

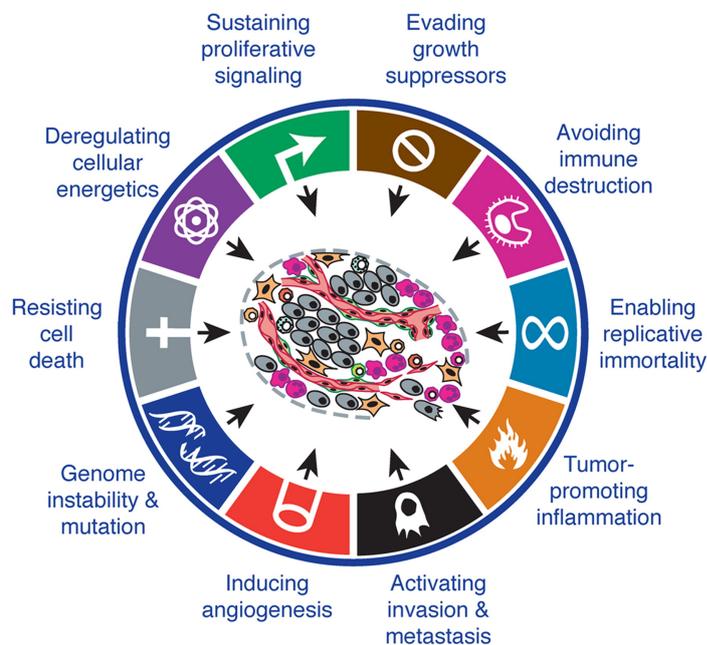


Abbildung 2. Grafische Übersicht der *hallmarks of cancer* nach HANAHAN und WEINBERG.^[37] Diese Eigenschaften repräsentieren wichtige Funktionen und Prozesse, die Krebszellen sich zunutze machen und dadurch gekennzeichnet sind. Des Weiteren dienen diese Eigenschaften als Grundlage für zielgerichtete, therapeutische Ansätze für die Behandlung von Krebserkrankungen.

Eine Vielzahl dieser Prozesse, u. a. Metabolismus und Angiogenese, wird durch Proteinkinase-vermittelte Signalwege reguliert, welche spätestens seit der ersten Zulassung eines niedermolekularen Kinaseinhibitors, Imatinib (Gleevec®), durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) im Jahr 2001 im zentralen Fokus der modernen Medizinalchemie stehen und das Hauptthema der vorliegenden Arbeit darstellen (siehe Kapitel 1.2).

1.2 Proteinkinasen

Die Familie der Proteinkinasen umfasst 518 Mitglieder, die im humanen Genom codiert sind und damit ca. 2-3 % des Genoms ausmachen.^[38] Von diesen besitzen nachweislich ca. 9 % (48 von 518) keine enzymatische Aktivität und sind demnach nicht-katalytisch an der Signaltransduktion beteiligt. Diese werden aufgrund ihrer konservierten Struktur sowie der Sequenzhomologie den Pseudokinasen zugeordnet.^[38-40] Unabhängig von der enzymatischen Aktivität werden beide Kinasetypen der Klasse der Transferasen, welche Phosphor-enthaltende Gruppen übertragen, zugeordnet (EC 2.7.-.-).^[41] Die enzymatische Reaktion beinhaltet die Übertragung des endständigen γ -Phosphats des Kofaktors Adenosintri-phosphat (ATP) in Gegenwart von divalenten Metallkationen, wie beispielsweise Mg^{2+} oder Mn^{2+} , auf die Hydroxyl-Gruppen der Seitenketten der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin, woraus sich eine Klassifizierung in Serin/Threonin-spezifische (STK), Tyrosin-spezifische (TK) sowie dual-spezifische Proteinkinasen ergibt.^[42-46] Ob diese Transfer-Reaktion einem assoziativen, S_N2 -artigen oder einem dissoziativen, S_N1 -artigen Mechanismus unterliegt, ist bis heute nicht abschließend geklärt.^[47-50] Seltener vertreten und ausschließlich in Prokaryoten vorkommend sind Histidin-Kinasen, welche die Übertragung einer Phosphatgruppe auf die Imidazol-Seitenkette unter Bildung einer Stickstoff-Phosphor-Bindung katalysieren.^[51] Die Phosphorylierung als reversible posttranslationale Modifikation (PTM) wird bei bis zu 25-30 % aller Proteine beobachtet und repräsentiert damit die häufigste und zugleich wichtigste PTM.^[52-53] Proteinphosphatasen wirken den -kinasen entgegengesetzt und katalysieren die Dephosphorylierung von Substratproteinen.^[54-55]

1.2.1 Struktur und Funktion

Zurzeit existieren in der Proteindatenbank (PDB, *protein data bank*) mehr als 5000 Einträge mit Strukturen von humanen Proteinkinasen.^[56-57] Die katalytische Domäne von Proteinkinasen ist innerhalb der Familie, aber auch zwischen den einzelnen Subgruppen (AGC, CAMK, CK1, CMGC, STE, TK, TK-L, RGC, atypisch) hochkonserviert.^[44, 58] Neben der typischen Kinasedomäne enthalten

Proteinkinasen meist weitere funktionelle, regulatorische Domänen, die die Aktivität, Lokalisation, Interaktion oder Substratspezifität regulieren.^[59-60] Beispiele hierfür sind u. a. die Phosphotyrosin-bindende *Src-Homology 2* (SH2)-Domäne, die Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (PIP₃)-bindende Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne, oder die DNA-bindende Zinkfinger-Domäne.^[61-63]

Der typische Aufbau von Kinasedomänen ist in Abbildung 3A am Beispiel der cAMP-abhängigen Proteinkinase/Proteinkinase A (PKA) dargestellt, dessen Struktur erstmals im Jahr 1991 von KNIGHTON *et al.* beschrieben wurde.^[64-68] Die β -Faltblattreiche N-terminale Subdomäne (*N-lobe*) ist über eine flexible Scharnierregion (*hinge region*) mit der α -Helix-reichen C-terminalen Subdomäne (*C-lobe*) verbunden. Zwischen den beiden Subdomänen befindet sich das aktive Zentrum bzw. die ATP-Bindungstasche. Die regulatorische Glycin-reiche Schleife (*glycine-rich loop*) mit dem konservierten GxGxxG-Motiv innerhalb der N-terminalen Subdomäne positioniert das β - und γ -Phosphat von ATP für den Phosphorylgruppen-Transfer auf das Proteinsubstrat. Ein weiteres wichtiges Element mit regulatorischer und indikativer Funktion ist die α C-Helix, welche ein konserviertes Glutamat beinhaltet, das in der aktiven Kinasekonformation, auch *α C-in* genannt, eine Salzbrücke mit dem sog. katalytischen Lysin im β 3-Faltblatt ausbildet und dadurch ebenfalls die korrekte Positionierung der Phosphatgruppen ermöglicht. Die Faltblätter β 1 und β 2, welche durch die Glycin-reiche Schleife verbunden sind, bewirken zusammen mit der Scharnierregion die Ausrichtung der Adenineinheit des ATPs. Zu Beginn der Scharnierregion ist überdies die Türsteher-Aminosäure (*gatekeeper*) lokalisiert, welche abhängig von ihrer Größe und Polarität die Zugänglichkeit der ATP-Bindungstasche sowie einer dahinterliegenden, hydrophoben Tasche (*hydrophobic back pocket*) reguliert und zugleich die Bindungsaffinität von Liganden bestimmt. Ebenso treten an dieser Position häufig Wirkstoffresistenz-vermittelnde Mutationen auf (siehe Kapitel 1.2.3). Eine konservierte saure Aminosäure (Asp/Glu) am C-terminalen Ende der Scharnierregion ist für die Stabilisierung der Riboseeinheit verantwortlich, wobei Wasserstoffbrücken-bindungen (H-Brücken) zwischen der Seitenkette und der 2'- und 3'-Hydroxygruppe der Ribose ausgebildet werden.

Ein Aspartat am äußeren Rand der Bindungstasche agiert als katalytische Base, indem es die Deprotonierung der Ser/Thr/Tyr-Seitenkette des gebundenen, zu phosphorylierenden Substratproteins ermöglicht, und dadurch den nukleophilen Angriff auf das γ -Phosphoratom von ATP erleichtert.^[69]

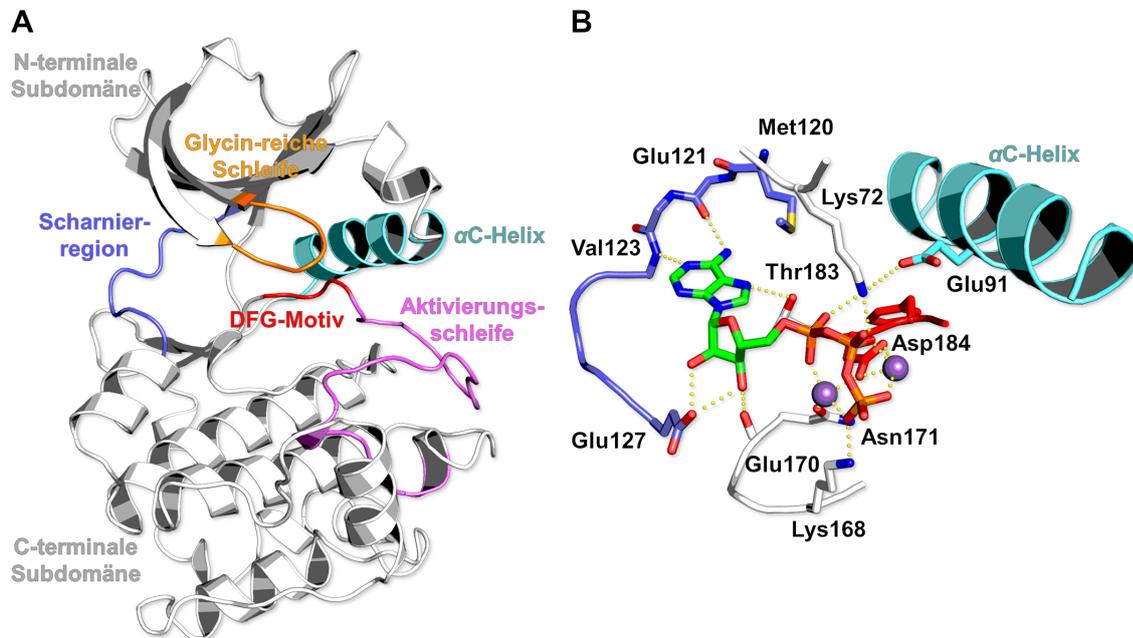


Abbildung 3. **A**, Kristallstruktur der katalytischen Kinasedomäne der Proteinkinase A (PDB: 1ATP) inklusive Zuordnung der wichtigsten Strukturelemente: N-/C-terminale Subdomäne (weißgrau), Scharnierregion (hellblau), Glycin-reiche Schleife (orange), α C-Helix (cyan), Aktivierungsschleife (pink), DFG-Motiv (rot). **B**, Bindungsmodus von ATP (Kohlenstoffatome in grün) in der aktiven Tasche der Proteinkinase A. Die Ausrichtung von ATP wird durch diverse H-Brücken (gelbe Punkte) zum Protein sowie die Mn^{2+} -vermittelte (violette Sphären) Koordination der terminalen Phosphatgruppen durch Asp184 stabilisiert. Die Farbgebung von Scharnierregion und α C-Helix entspricht Panel **A**.^[66]

Die Aktivierungsschleife (*activation loop*, *A-loop*), deren Beginn das konservierte DFG-Motiv (Asp-Phe-Gly) darstellt, ist ein weiteres kritisches Strukturelement, welches die katalytische Aktivität der Kinase determiniert, indem es die ATP-Bindungstasche blockiert oder zugänglich macht. Häufig werden konformationelle Änderungen der Aktivierungsschleife durch deren Phosphorylierung induziert, was zu einer Umordnung bzw. einer Neuausbildung von förderlichen Interaktionen führt. In der aktiven Konformation (*DFG-in*) bildet die Phe-Seitenkette meist hydrophobe Kontakte mit der α C-Helix aus, während die Asp-Seitenkette in Richtung der ATP-Tasche orientiert ist und durch Koordination von zwei Mg^{2+} -Ionen die β - und γ -ständigen Phosphatgruppen von ATP positioniert.

Im inaktiven Zustand (*DFG-out*) hingegen ragt die Phe-Seitenkette in die ATP-Bindungstasche hinein und die Aspartat-vermittelte Positionierung der terminalen Phosphatgruppen ist nicht mehr gewährleistet. Des Weiteren können zwei Seitenketten-Assemblierungen innerhalb der Kinasedomäne, das katalytische Rückgrat (*catalytic spine, C-spine*) und das regulatorische Rückgrat (*regulatory spine, R-spine*), als Indikator für den Aktivitätszustand der Kinase herangezogen werden. Beide Rückgrat-Regionen bestehen aus hydrophoben Aminosäuren der N- und C-terminalen Subdomänen und sind für die Positionierung des Proteinsubstrats (*R-spine*) und des Kofaktors ATP (*C-spine*) verantwortlich.^[70] Im aktiven Zustand sind die Aminosäuren des *R-spine* linear aligniert, im inaktiven *DFG-out*-Zustand hingegen zueinander versetzt. Für eine vollständige und korrekt regulierte katalytische Kompetenz ist somit eine Vielzahl verschiedener Faktoren von kritischer Bedeutung.^[67-68, 71]

Proteinkinasen spielen eine essenzielle Rolle in nahezu jedem intrazellulären Signalweg.^[38, 55, 71-73] Die Einführung von negativer Ladungsdichte in das Substratprotein hat zumeist eine Verschiebung von konformationellen Gleichgewichten zur Folge.^[68, 74] Dies ist durch eine Änderung der elektrostatischen Eigenschaften der phosphorylierten Region bedingt, wodurch bspw. repulsive Kräfte entstehen oder attraktive Wechselwirkungen ermöglicht werden.^[74-75] Dadurch bedingte Konformationsänderungen gehen meist mit funktionellen Auswirkungen einher, bei denen die Phosphorylierungen sowohl aktivierender als auch inhibitorischer Natur sein können.^[76-77] Darüber hinaus können durch Phosphorylierung von Aminosäureseitenketten neue Epitope entstehen, die die Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) ermöglichen.^[74, 78-79] Neben strukturellen und funktionellen Modifikationen können somit auch Lokalisationsänderungen induziert werden, wodurch die Relevanz von Proteinkinasen in zellulären Prozessen unterstrichen wird, zugleich aber auch das damit einhergehende Risiko von fehlregulierten Proteinkinasen deutlich wird.^[72, 80] Solche Fehlregulationen können z. B. in Folge von genetischen Läsionen in den Kinase-kodierenden Genen entstehen oder durch dysfunktionale Aktivatoren bedingt sein.^[81]

Daher können Proteinkinasen neben der Steuerung von physiologischen Abläufen auch an der Entstehung und Entwicklung einer Vielzahl von Krankheiten beteiligt sein, was sie zu zentralen Zielstrukturen im Bereich der modernen Medizinalchemie und Wirkstoffentwicklung im akademischen und industriellen Umfeld macht.^[72, 82-83]

1.2.2 Klinische Relevanz

Die klinische Bedeutung von Proteinkinasen ist auf die elementaren Erkenntnisse von STEVE MARTIN, PETER H. DUESBERG UND PETER K. VOGT (1970) sowie DOMINIQUE STEHELIN, J. MICHAEL BISHOP UND HAROLD E. VARMUS (1976) zurückzuführen, welche auf den initialen Arbeiten von PEYTON ROUS (1911) und dessen Entdeckung des Rous-Sarkom-Virus (RSV) aufbauten.^[84-88] Diese konnten zunächst die transformierenden Eigenschaften des RSV dem retroviralen Onkogen *v-Src* zuschreiben, welchem im weiteren Verlauf das humane Homolog und Protoonkogen *c-Src* zugeordnet werden konnte, nachdem dieses im Genom von nicht-infizierten Zellen identifiziert wurde.^[88] Obwohl bereits zu Beginn der Forschungsarbeiten vermutet wurde, dass es sich bei dem Genprodukten von *v-Src* und *c-Src* um Proteinkinasen handelt, konnte diese Hypothese erst 1978 unabhängig voneinander durch RAYMOND L. ERIKSON und J. MICHAEL BISHOP bestätigt werden.^[89-92] Sowohl ROUS (1966) als auch BISHOP und VARMUS (1989) wurden für ihre Arbeiten zur Identifizierung und Charakterisierung von (Proto-)Onkogenen mit dem Nobelpreis für Physiologie oder Medizin ausgezeichnet.^[93-94] Diese Meilensteine der Forschung trugen maßgeblich zur Evaluation der fundamentalen Rolle von Proteinkinasen in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen bei. Hierzu zählen die Regulation von Zellproliferation, Zellwachstum, Metabolismus, Überleben und Apoptose, aber auch die Entstehung und Entwicklung diverser Krankheiten im Falle einer Fehlregulation, welche eine gestörte Homöostase der o. g. Abläufe bedingt; dies kann bspw. bei Krebserkrankungen, aber auch bei neurodegenerativen und entzündlichen Erkrankungen der Fall sein.^[95-97]

Die somit nachgewiesene, treibende Rolle einzelner Proteine in der Pathogenese ebnete den Weg zur Entwicklung zielgerichteter Wirkstoffe. Die bis dahin bevorzugt angewandten Therapieansätze bestanden aus der operativen Entfernung von

Tumorgewebe (Resektion), der Radiotherapie mit ionisierender Strahlung sowie der Behandlung mit chemotherapeutischen Agenzien wie den Zytostatika Mechlorethamin (Mustargen®) und Vincristin (Oncovin®).^[98-102] Heutzutage stellen Proteinkinasen eine der wichtigsten Zielstrukturklassen im Bereich der Wirkstoffentwicklung dar.^[72, 82]

1.2.3 Kinaseinhibitoren

Erste Ansätze in der zielgerichteten Adressierung von Proteinkinasen stellten Isochinolinsulfonamide dar, welche mikromolare Affinitäten für die Proteinkinasen A, C und G aufwiesen.^[103] Mit der Entdeckung und Isolierung von Staurosporin aus *Streptomyces staurosporeus* wurde im Jahr 1986 erstmals ein hochpotenter Kinasehemmer beschrieben, der die Proteinkinase C mit subnanomolarer Potenz inhibierte.^[104] Eine Limitation dieses Naturstoffs und seiner Derivate war und ist bis heute die unzureichende Selektivität, weswegen er auch als pan-Kinaseinhibitor beschrieben und verwendet wird.^[105-107] Die ersten bahnbrechenden Erfolge in der gezielten und selektiven Adressierung von Proteinkinasen konnten mit monoklonalen Antikörpern erzielt werden. Hierbei ist insbesondere der von Genentech entwickelte, humanisierte Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) zu nennen, welcher den humanen epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor 2 (Her2) bindet und im Jahr 1998 von der FDA sowie im Jahr 2000 von der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) für die Behandlung von Her2-positivem, metastasierendem Brustkrebs zugelassen wurde und dadurch einen Paradigmenwechsel in der Tumortherapie einläutete.^[108-109] Weitere therapeutische Antikörper, die von der FDA für die Behandlung von Tumorerkrankungen, u. a. auch in Kombination mit weiteren Wirkstoffen wie Docetaxel (Taxotere®), zugelassen sind, umfassen Panitumumab (Vectibix®), Cetuximab (Erbix®) sowie Pertuzumab (Perjeta®).^[110-112] Diese sind ebenfalls gegen Her2 bzw. EGFR gerichtet, wobei sie die extrazellulären Domänen ihrer Zielstrukturen erkennen, dadurch die Dimerisierung oder Ligandenbindung unterdrücken und schließlich die Signaltransduktion ins Zellinnere inhibieren.^[113]

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, wurde im Jahr 2001 der Wirkstoff Imatinib als erster niedermolekularer Kinaseinhibitor durch die FDA für die Behandlung von Philadelphia-Chromosom-positiver, chronischer myeloischer (CML) und akuter lymphatischer Leukämie (ALL) sowie von c-Kit-mutierten gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) zugelassen.^[114-118] Ursprünglich als Inhibitor der Abl-Tyrosinkinase im onkogenen und konstitutiv aktivem Fusionsproteins BCR (*breakpoint cluster region*)-Abl design und entwickelt, konnte in Folgestudien auch eine potente Inhibition der membranständigen Rezeptoren c-Kit und PDGFR (*platelet-derived growth factor receptor*) beobachtet werden, woraus sich ein breites Indikationsspektrum und u. a. die Verwendung in der Erstlinientherapie für GIST-Patienten ergibt.^[119-120]

Seit der Zulassung von Imatinib im Jahr 2001 wurden bis Ende des Jahres 2018 45 weitere *small molecule* Proteinkinaseinhibitoren zugelassen (Abbildung 4).^[83, 121] Auffällig hierbei ist, dass diese Wirkstoffe lediglich 22 verschiedene Mitglieder des humanen Kinoms als Primärzielstrukturen adressieren, was einer Abdeckung von nur 4.2 % entspricht. Für insgesamt 496 Proteinkinasen (inkl. Pseudokinasen) gibt es keinen zugelassenen niedermolekularen Inhibitor, der diese als primäre Zielstruktur adressiert.^[83] Zudem zählen neben der Onkologie als Hauptindikationsgebiet nur sehr wenige andere Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis (Tofacitinib [Xeljanz®], Baricitinib [Olumiant®]), idiopathische pulmonale Fibrose (Nintedanib [Vargatef®]) oder die chronische Immun-Thrombozytopenie (Fostamatinib [Tavalisse®]) zum Therapiespektrum jener Kinasehemmer.^[83, 122-126]

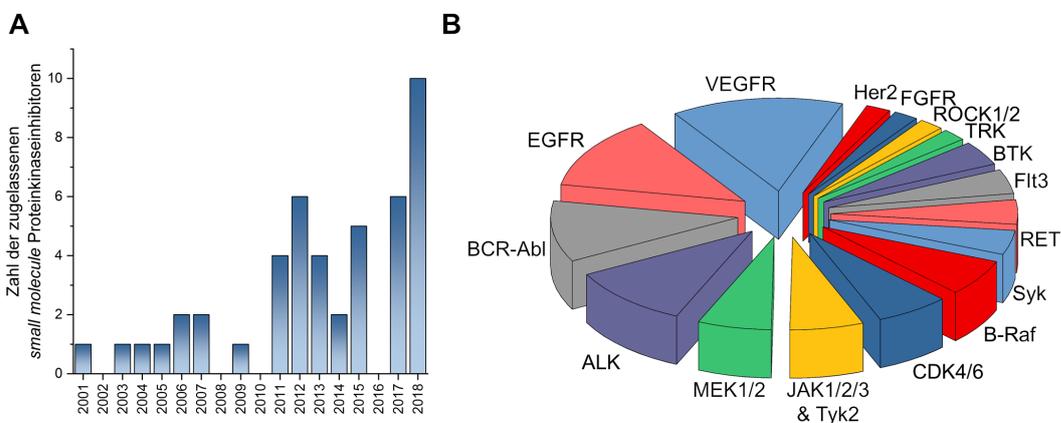


Abbildung 4. A, Grafische Darstellung der Anzahl an zugelassenen Proteinkinaseinhibitoren pro Jahr. **B**, Verteilung der 46 zugelassenen, zielgerichteten Proteinkinaseinhibitoren nach ihren Primärzielstrukturen; Lenvatinib (Lenvima®) als dualer VEGFR/RET-Inhibitor wurde beiden Targets separat zugeteilt, so dass in der Summe 47 Zuordnungen getätigt wurden.^[83]

Ursprünglich wurden niedermolekulare Inhibitoren von Proteinkinasen in drei Klassen (Typ I, II und III) unterteilt (Abbildung 5).^[68] Diese Klassifizierung erfolgte entsprechend der von dem jeweiligen Inhibitor stabilisierten Konformation der Proteinkinase: Typ I-Inhibitoren binden innerhalb der ATP-Bindungstasche unter Ausbildung von H-Brücken mit der Scharnierregion unter Stabilisierung einer aktiven Konformation der Kinasedomäne mit einem katalytisch-kompetenten Zustand des DFG-Motivs (*DFG-in*, Abbildung 5A); Typ II-Inhibitoren stabilisieren eine inaktive Konformation der Kinase, wobei sie unter Interaktion mit der Scharnierregion partiell die Adenosin-Bindungstasche besetzen und unter Verdrängung des DFG-Phe in die hydrophobe Tasche nahe der α C-Helix binden (*DFG-out*, Abbildung 5B); Typ III-Inhibitoren wurden hingegen als nicht-ATP-kompetitive Liganden beschrieben, die die allosterische, hydrophobe Tasche nahe der α C-Helix besetzen und keine der Interaktionen mit dem Protein ausbilden, die typischerweise für ATP beobachtet werden (Abbildung 5C).^[127]

Durch die stetig steigende Anzahl verfügbarer Ko-Kristallstrukturen von Proteinkinasen in Komplex mit Liganden und dem damit verbundenen enormen Informationsgewinn, erlaubte diese Klassifizierung schon bald keine eindeutige Beschreibung von Inhibitortypen und Konformationen mehr und erforderte die Festlegung spezifischer Kriterien zur Einordnung von Bindungsmodi bzw. Inhibitortypen. Eine aktuelle Übersicht der bekannten Bindungsmodi samt der zugehörigen, strukturellen Eigenschaften der Kinasekonformation wurde im Jahr 2016 von ROSKOSKI JR. publiziert, welche die Konzepterweiterungen von ZUCCOTTO *et al.*, GAVRIN und SAIAH, sowie LAMBA und GOSH beinhaltet.^[128-131] Demnach erfolgt die Einteilung in insgesamt sieben Gruppen (Typ I, I $\frac{1}{2}$, II, III, IV, V, VI), wobei Typ I $\frac{1}{2}$ und II unter Berücksichtigung des Besetzungszustands von ATP-Bindungstasche und hydrophober Tasche, Ausrichtung von Aktivierungsschleife, DFG-Asp/Phe, α C-Helix und regulatorischem Rückgrat sowie reversibler/kovalenter Interaktion nochmals in Subgruppen unterteilt sind.

Ein Großteil der heutzutage zugelassenen Proteinkinase-Inhibitoren weist einen ATP-kompetitiven Typ I-Bindungsmodus auf, darunter auch die Wirkstoffe Erlotinib (Tarceva®) und Gefitinib (Iressa®, Abbildung 5A), deren Grundstrukturen auf die erstmalig im Jahr 1989 beschriebenen Tyrphostine zurückgehen und welche als EGFR-Inhibitoren der ersten Generation für die Behandlung von NSCLC mit treibenden Aktivierungsmutationen im EGFR, darunter EGFR^{ex19del} und EGFR^{L858R}, ihre Zulassung erhielten.^[132-135] Weitere Beispiele für die erfolgreiche Entwicklung von Typ I-Inhibitoren sind Bosutinib (Bosulif®) und Brigatinib (Alunbrig®) zur Behandlung von BCR-Abl-positiver AML (akute myeloische Leukämie) bzw. ALK/ROS1-positivem NSCLC.^[136-137] Eine eindeutige Zuordnung von Liganden hinsichtlich des Bindungstyps ist nicht immer gewährleistet bzw. kann von diversen Umständen abhängig sein, wie z. B. von der Verfügbarkeit von Komplex-Kristallstrukturen, dem Vorhandensein mehrerer Kristallstrukturen mit unterschiedlichen Bindungseigenschaften, wie es beispielsweise für Erlotinib (PDB: 1M17, Typ I; PDB: 4HJO, Typ I½B) beobachtet werden kann, oder auch vom adressierten Zielprotein.^[138-140]

Lange Zeit wurden ATP-kompetitive Typ I-Inhibitoren als wenig erfolgsversprechende Liganden betrachtet, da aufgrund der adressierten, hochkonservierten ATP-Bindungstasche keine ausreichende Selektivität gegenüber anderen Proteinkinasen und damit einhergehende *off-target*-Effekte erwartet wurden. Erst mit der Entdeckung neuer Chemotypen wie den Triarylimidazolen SB202190 und SB203580, welche in das aktive Zentrum binden, in Kombination mit einem gesteigerten strukturellen Verständnis von Proteinkinasen wurden die Zweifel an einer unüberwindbaren Selektivitätshürde ausgeräumt.^[141] Nichtsdestotrotz bedarf es häufig einer langwierigen Optimierung von potenziellen Wirkstoffen, um eine optimale Ausnutzung der gegebenen Bindetasche und somit eine ausreichende Selektivität für das Zielprotein zu erreichen. Ein weiterer limitierender Faktor von ATP-kompetitiven Inhibitoren ist die intrinsische Konkurrenz mit dem genannten Kofaktor um dieselbe Bindungsstelle innerhalb der Kinase, dessen intrazelluläre Konzentrationen bis zu 10 mM betragen kann.^[72] Die Affinität des synthetischen Liganden zum Protein muss also um ein Vielfaches höher sein als jene von ATP, um einen spezifischen *on-target*-Effekt *in vitro* und *in vivo* erwarten zu können.^[142]

Imatinib weist als erster zugelassener Proteinkinaseinhibitor einen Typ IIA-Bindungsmodus auf (Abbildung 5B), bei dem er sowohl die ATP-Bindungstasche als auch die hydrophobe Tasche besetzt und das DFG-Phe verdrängt.^[143] Initial wurde für derartige Liganden ein intrinsischer Selektivitätsvorteil gegenüber Typ I-Modulatoren erhofft, wobei die Bindungsmodi von Typ I- und Typ II-Inhibitoren jedoch größtenteils kongruent sind.^[128] Ein möglicher (klinischer) Vorteil der Stabilisierung von inaktiven Kinasekonformationen konnte somit bislang nicht erreicht werden.^[140] So zeigt Imatinib neben einer potenten Inhibition von BCR-Abl auch eine hohe Affinität für weitere Kinasen, u. a. c-Kit, PDGFR α , DDR1/2 und LCK.^[144] Eine daraus resultierende Polypharmakologie kann jedoch auch von Nutzen bei der Therapie von malignen Erkrankungen sein.^[145-146] Weitere Beispiele für zugelassene Typ II-Inhibitoren sind Axitinib (Inlyta®) und Ponatinib (Iclusig®) für die Therapie von fortgeschrittenem, VEGFR-positivem Nierenkrebs (*renal cell carcinoma*, RCC) bzw. BCR-Abl-positiver CML/ALL.^[147-148]

Typ III-Inhibitoren besetzen die hydrophobe Tasche neben der ATP-Bindungstasche und gelten somit als nicht- bzw. unkompetitive Liganden, die eine simultane Bindung von ATP erlauben, wobei die katalytische Aktivität dennoch inhibiert wird. Aufgrund des geringeren Konservierungsgrads dieser allosterischen Tasche wird solchen Inhibitoren eine höhere Selektivität im Vergleich zu Typ I- und Typ II-Inhibitoren zugesprochen. Für Trametinib (Mekinist®) als bekannten und zugelassenen Typ III-Inhibitor zur Behandlung von BRAF^{V600E/V600K}-mutiertem, metastasierendem Hautkrebs, für den jedoch keine Komplex-Kristallstruktur mit den Zielproteinen MEK1/2 vorliegt, konnte diese Typ III-bedingte Selektivität gegenüber 180 weiteren Proteinkinasen eindrucksvoll demonstriert werden.^[149-150] Ein weiteres Beispiel ist Cobimetinib (Cotellic®), dessen Kristallstruktur im Komplex mit MEK1 gelöst werden konnte (Abbildung 5C) und hierbei eine Stabilisierung der DFG-*in*- und α C-*out*-Konformation aufweist.^[151] Dieser allosterische MEK-Inhibitor ist für die Behandlung von nichtoperablem oder metastasierendem Hautkrebs mit detektierbaren Alterationen in Codon 600 zugelassen.^[152]

Typ IV-Inhibitoren weisen ebenfalls einen allosterischen Bindungsmodus auf, wobei die adressierte Tasche jenseits der ATP-Bindungstasche liegt. Derartige Liganden wie bspw. GNF-2, welcher die regulatorische Myristoyl-Bindungstasche von BCR-Abl besetzt und dadurch eine autoinhibitorische Konformation stabilisiert, regulieren durch allosterische, indirekte Mechanismen die Kinaseaktivität.^[153-154] Bis zum heutigen Tag sind keine Liganden vom Typ IV durch die FDA oder EMA zugelassen. Nichtsdestotrotz bieten sie aufgrund ihrer intrinsischen hohen Selektivität, welche durch die Adressierung seltener und somit gering konservierter Bindungstaschen zustande kommt, nach wie vor interessante und wenig untersuchte Ansatzpunkte für die medizinalchemische Forschung.^[155]

1.2.4 Kovalente Kinaseinhibitoren

Die von ROSKOSKI JR. als Typ VI klassifizierten, irreversiblen Proteinkinase-Inhibitoren sind zumeist ATP-kompetitive Liganden, die durch Dekorierung mit einer reaktiven Gruppe, dem sog. *warhead*, irreversibel mit dem Protein unter Ausbildung einer kovalenten Bindung reagieren können.^[128] Hierbei sind insbesondere die nukleophilen, Thiol-haltigen Seitenketten von Cysteinen von Bedeutung, die mithilfe von geeigneten Elektrophilen adressiert werden können. Solche „klassischen“ *warheads* enthalten dabei meist ein α,β -ungesättigtes Keton oder Carbonsäureamid, eine sog. Acrylgruppe, welche über das elektrophile β -Kohlenstoffatom in einer Michael-Addition mit dem nukleophilen Thiol(at) irreversibel reagieren kann.^[156] Dabei wurden kovalente Inhibitoren in der Medizinalchemie und Wirkstoffentwicklung lange Zeit aufgrund ihrer potenziellen Toxizität, welche durch unspezifische kovalente Modifikation sowie Haptenisierung hervorgerufen werden kann, nur marginal berücksichtigt.^[157-158]

Ein weiterer relevanter Nachteil ist die Entstehung von Resistenzmutationen, bei denen die nukleophile Aminosäure oft durch eine weniger bzw. nicht-nukleophile Aminosäure ersetzt wird und dadurch nicht länger mit Elektrophilen adressiert werden kann.^[159] Allerdings konnten vor allem im Bereich der Onkologie herausragende Erfolge mit kovalenten Kinasemodulatoren erzielt werden, wie u. a. die Beispiele Osimertinib (Tagrisso®), Acalabrutinib (Calquence®) und Neratinib

(Nerlynx®) beweisen, deren Anwendungsgebiete in der Behandlung von EGFR^{mut.}-positivem NSCLC, Non-Hodkin-Lymphomen bzw. Her2-positivem Brustkrebs liegen.^[160-162]

Diese zum Teil weiterentwickelten Typ I-Liganden mit ihrem ATP-kompetitiven Bindungsmodus haben aufgrund ihrer kovalenten Bindungseigenschaften den Vorteil eine gesteigerte bzw. maximale Verweildauer (*drug target residence time*) am Zielprotein zu erreichen, so dass der inhibitorische Effekt des Liganden lediglich durch die Degradation und die Neusynthese des entsprechenden Zielproteins umgangen bzw. aufgehoben werden kann.^[159, 163] Einhergehend mit der erhöhten Verweildauer ist meistens eine gesteigerte inhibitorische Potenz im Vergleich zum reversibel bindenden Analogon zu beobachten, da nach erfolgter Bindungsausbildung keine Dissoziation des Liganden mehr möglich ist.^[164] Diese beiden Parameter resultieren zudem in einer Verstärkung sowie Verlängerung der induzierten pharmakodynamischen Wirkung, so dass der Inhibitor-vermittelte Effekt auf das biologische System bzw. den Organismus von gesteigerter Dauer ist. Ein weiterer potenzieller Vorteil solcher kovalenten Liganden ist die gesteigerte Selektivität gegenüber verwandten Kinasen, die die kovalent adressierte Aminosäure des Zielproteins nicht aufweisen.^[165] Des Weiteren kann die oftmals zugrundeliegende Möglichkeit des rationalen Designs, welche durch die Verfügbarkeit von Komplex-Kristallstrukturen mit reversiblen Liganden und die Identifikation von umliegenden, adressierbaren Aminosäuren gegeben ist, als Vorteil betrachtet werden.^[157] Zusätzlich zu Proteinkinasen sind auch weitere Targets etabliert, für die ebenfalls zugelassene irreversible Wirkstoffe vorhanden sind.^[163] Dazu zählen z. B. der H⁺/K⁺-ATPase-Inhibitor Esomeprazole (Esomep®, Nexium®) und der ADP-Rezeptor Subtyp P2Y₁₂-Inhibitor Clopidogrel (Plavix®), welche für die Therapie von Refluxösophagitis bzw. zur Vorbeugung von Atherothrombose eingesetzt werden und darüber hinaus *blockbuster*-Status besitzen.^[166-167]

Neben den zuerst etablierten Acrylgruppen, welche bei den zugelassenen kovalenten Kinaseinhibitoren überrepräsentiert sind, wurden weitere *warheads* entwickelt, die abgesehen von der Modifikation von Cysteinen auch die irreversible Adressierung weiterer Aminosäuren ermöglichen, jedoch bis auf eine Ausnahme

(But-2-inamid bei Acalabrutinib) noch nicht in einem zugelassenen Wirkstoff enthalten sind und größtenteils bei der Entwicklung selektiver, molekularer Sonden zum Einsatz kommen. Hierzu zählen u. a. Sulfonylfluoride (Ser/Thr/Lys/Tyr), Vinylsulfone (Lys/Cys/His), Oxaziridine (Met) und Isoxazoliumsals (Asp/Glu).^[157-158]

Die biochemische Charakterisierung von *warhead*-dekorierten Liganden ist aufgrund des geänderten Bindungsmechanismus im Vergleich zu reversiblen Inhibitoren von besonderer Bedeutung. Statt eines binären *on/off*-Gleichgewichts, das für reversible Agenzien die Grundlage bietet, muss für kovalente Modulatoren der zusätzliche Schritt der kovalenten und irreversiblen Bindungsausbildung berücksichtigt werden, bei dem sowohl Ligand als auch Enzym dauerhaft aus der Gleichgewichtsreaktion entfernt werden (Abbildung 6).

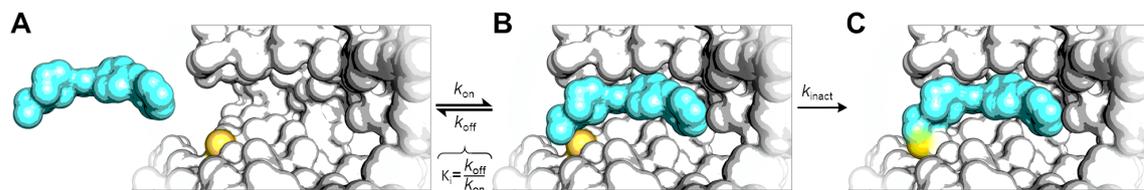


Abbildung 6. Schematische Darstellung des Bindungsmechanismus kovalenter Kinaseinhibitoren. Ligand (cyan) und Protein (weiß, **A**) formen im ersten Schritt einen reversiblen Komplex (**B**). Diese reversible Affinität ist definiert als Verhältnis der *off-rate* (k_{off}) zur *on-rate* (k_{on}), also der Dissoziationskonstanten K_i des Inhibitors. Im zweiten Schritt erfolgt die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen der reaktiven Gruppe des Liganden und der Thiol-Seitenkette (gelb, **C**) des Cysteins mit der Geschwindigkeitskonstante k_{inact} (maximale Inaktivierungsrate).

Im Fall von reversiblen, ATP-kompetitiven Liganden wird die inhibitorische Potenz durch deren Affinität zur Zielstruktur bestimmt, welche häufig als Dissoziationskonstante (K_i) im Gleichgewichtszustand angegeben wird und dabei das Verhältnis von *off-rate* (k_{on} , $[M^{-1}s^{-1}]$, Geschwindigkeitskonstante für die Dissoziation) zu *on-rate* (k_{off} , $[s^{-1}]$, Geschwindigkeitskonstante für die Assoziation) widerspiegelt.^[142, 168-169] Eine geringwertige Dissoziationskonstante entspricht somit einer hohen Affinität. Im Kontext von enzymatischen Assay-Systemen für die Charakterisierung von Kinaseinhibitoren spielen die verwendete Substratkonzentration S sowie die Affinität des Substrats für das Enzym, repräsentiert durch die Michaelis-Konstante K_M , eine wichtige Rolle.^[170] Gemäß der Cheng-Prusoff-Gleichung (Gleichung (1)) definieren K_i , K_M und S zusammen die

halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC_{50}) eines kompetitiven Inhibitors, welche üblicherweise als globaler Parameter zur Darstellung der antagonistischen Potenz verwendet wird:^[171]

$$IC_{50} = \left(1 + \frac{S}{K_M}\right) \cdot K_i \quad (1)$$

(IC_{50} : halbmaximale inhibitorische Konzentration; S: eingesetzte Substratkonzentration;
 K_M : Michaelis-Konstante; K_i : Dissoziationskonstante des Inhibitors)

Da der o. g. Gleichgewichtszustand im Fall von kovalenten Inhibitoren zeitabhängig ist und für lange Inkubationszeiten eine vollständige irreversible Modifikation eintritt, ist die Charakterisierung von irreversiblen Liganden anhand des IC_{50} -Wertes unzureichend. D. h. je länger die Reaktion in Gegenwart des Inhibitors abläuft, desto weniger aktives Enzym steht der Katalyse-Reaktion zur Verfügung und desto niedriger ist der beobachtete IC_{50} .^[163] Für eine angemessene Evaluierung kovalenter Verbindungen ist daher die detaillierte Bestimmung der kinetischen Parameter K_i (Dissoziationskonstante) und k_{inact} (maximale Inaktivierungsrate) vonnöten, um eine Unterscheidung der reversiblen Affinität und der Geschwindigkeit der kovalenten Bindungsbildung vornehmen zu können.^[172-174] Des Weiteren kann das Verhältnis k_{inact}/K_i , welches die Effizienz der Bindungsbildung in Abhängigkeit von der Affinität und der maximalen Inaktivierungsrate darstellt, als entscheidendes Charakteristikum für die Evaluierung von kovalenten Verbindungen und für die Interpretation ihrer Struktur-Aktivitäts-Beziehung (SAR, *structure-activity relationship*) verwendet werden.^[175] KRIPPENDORFF *et al.* haben im Jahr 2009 die Zeitabhängigkeit des IC_{50} von den Parametern K_i und k_{inact} wie folgt mathematisch beschrieben:^[172]

$$IC_{50}(t) = K_i \left(1 + \frac{S}{K_M}\right) \cdot \left(\frac{2 - 2e^{-\eta_{IC_{50}} \cdot k_{inact} \cdot t}}{\eta_{IC_{50}} \cdot k_{inact} \cdot t} - 1\right) \quad (2)$$

$$\eta_{IC_{50}} = \frac{IC_{50}(t)}{K_i \left(1 + \frac{S}{K_M}\right) + IC_{50}(t)} \quad (3)$$

(IC_{50} : halb-maximale inhibitorische Konzentration; t: Vorinkubationszeit; K_i : Inhibitionskonstante;
 S: Substratkonzentration; K_M : Michaelis-Konstante; k_{inact} : maximale Inaktivierungsrate)

1.3 Akt (Proteinkinase B/PKB)

Die Ser/Thr-spezifische Proteinkinase B, auch bekannt als PKB oder Akt, wurde vor ca. 30 Jahren erstmals als virales Onkogen des transformierenden Retrovirus AKT8 identifiziert.^[176] Kurz darauf erfolgte die Klonierung und Charakterisierung des zellulären Homologs sowie die Zuordnung der insgesamt drei Isoformen, Akt1/2/3 bzw. PKB $\alpha/\beta/\gamma$, innerhalb des humanen Genoms. Wenige Jahre später konnte eine Abhängigkeit der Akt-Aktivität vom *second messenger* PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate) aufgezeigt werden, welcher wiederum von der Lipidkinase PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) und dem Tumorsuppressor PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) reguliert wird. Beide Proteine konnten bereits zuvor mit einer direkten Rolle in der Pathogenese diverser Krankheiten assoziiert werden.^[177-180] Hieraus ergab sich ein nach wie vor ungebrochenes Interesse an der Stellung von Akt als biologische Zielstruktur in den Bereichen der klinischen Forschung, Wirkstoffentwicklung und Medizinalchemie, sowohl im akademischen als auch im industriellen Umfeld, was anhand der annähernd 80000 Einträge für den Suchbegriff „Akt“ seit dem Jahr 1995 in der Meta-Datenbank „PubMed“ deutlich wird.^[181]

1.3.1 Allgemeines und Isoformen

Die Akt-Isoformen 1-3 gehören zur Gruppe der AGC-Kinasen (Familien der Proteinkinasen A, G und C), welche aus 63 verwandten Ser/Thr-spezifischen Proteinkinasen besteht, zu denen u. a. auch PDK1 (*phosphoinositide-dependent kinase-1*), RSK (ribosomale S6-Kinase) und ROCK gehören.^[182] Ihre zelluläre Funktion liegt in der Integration extrazellulärer Stimuli, die z. B. durch GPCRs oder RTKs in das Zellinnere übertragen werden, sowie der Vermittlung und Transduktion auf nachgeschaltete Effektoren; damit sind sie Teil des PI3K/Akt-Signalwegs, über den eine Vielzahl von zellulären Prozessen gesteuert wird (siehe Kapitel 1.3.3).^[183]

Die drei Isoformen weisen untereinander eine Sequenzhomologie von über 80 % und damit auch gewisse strukturelle Ähnlichkeiten auf.^[184] Allerdings konnte gezeigt werden, dass trotz der hohen Homologie Unterschiede im Substratspektrum, in den physiologischen Funktionen, aber auch in der globalen Expression vorliegen.^[185-187] So werden bspw. Zellwachstum und Angiogenese vor allem von Akt1, die Glukosehomöostase von Akt2 und die neuronale Entwicklung von Akt3 reguliert.^[185] Neben den physiologischen Funktionen der Akt-Isoformen sind auch nicht-redundante und sogar gegensätzliche Funktionen, wie z. B. in der Pathophysiologie von Krebserkrankungen, identifiziert worden.^[188-191]

In Brustkrebsmodellen konnte bspw. gezeigt werden, dass Akt1 eine suppressive Wirkung auf die Migrations- und Invasionsfähigkeit jener Zellen besitzt, wohingegen Akt2 diese Funktionen fördert.^[188, 192-194] Während die Koexpression von aktiviertem Akt1 und Her2 die Tumorgenese im Brustepithel von Mäusen beschleunigte, wurde eine verringerte Metastasierung im Vergleich zu einer Expression von Her2 allein beobachtet.^[195] Dem gegenüber steht ein unverändertes Tumorgenese-Potential bei der Koexpression von aktiviertem Akt2 und Her2 im Vergleich zu Her2 allein sowie eine signifikant gesteigerte Metastasierung im Falle einer Akt2/Her2-Koexpression relativ zu Akt1/Her2-Ko- bzw. Her2-Expression.^[188] Weiterhin wurde eine Schlüsselrolle von Akt2, nicht aber von Akt1/3, für das Überleben und die Erhaltung von *PTEN-loss-of-function* Brust- und Pankreastumoren beschrieben, wobei der Zellzyklusregulator p21 als essenzieller Akt2-Effektor in diesem genetischen Kontext identifiziert wurde.^[196]

Spezifische Funktionen von Akt3 hängen in vielen Fällen mit dessen Überexpression und/oder Amplifikation zusammen, wie es u. a. bei triple-negativem Brustkrebs (ER-/PR-/Her2-, TNBC, *triple-negative breast cancer*) beobachtet wurde. Ähnlich wie bei Akt1, ging ein *knock-down* von Akt3 in TNBC-Krebszellen mit einer verminderten Fähigkeit der Migration einher;^[193] außerdem wurde ein *knock-down* von Akt3 mit einer Inhibition des 3D-Zellwachstums von MDB-MB-231-Zellen assoziiert, wohingegen ein derartiger Effekt nicht für Akt1 und Akt2 nachgewiesen werden konnte. Ähnliche Isoform-spezifische Funktionen konnten auch in *in vivo*-Tumorenograft-Modellen abgebildet werden.^[193] Die oben beschriebenen Funktionen der jeweiligen Akt-Isoformen unterstreichen das große

pharmazeutische Interesse an dieser Proteinkinase und dessen Rolle in der physiologischen Homöostase sowie der Entstehung von Krankheiten (siehe Kapitel 1.3.4, 1.3.5).

1.3.2 Struktur

Für die erforderliche Feinregulation von Akt in der intrazellulären Signaltransduktion sind der Multidomänen-Charakter (Abbildung 7A) und die dreidimensionale Struktur von Akt (Abbildung 7B) von grundlegender Bedeutung.^[197] Zusätzlich zur konservierten, katalytisch-aktiven Kinasedomäne (Position 146-408) codiert das *AKT*-Gen für zwei regulatorische Domänen: Eine N-terminale PH-Domäne (Position 5-117) für die Bindung des Membran-assoziierten *second messenger* PIP₃ und ein C-terminales hydrophobes Motiv (HM, Position 409-480), welches das konservierte Strukturelement F/Y-x-x-F/Y-S/T/E/D-F/Y, das sog. PDK1-interagierende Fragment (PIF), enthält; dieses kommt innerhalb der AGC-Familie konserviert vor und ermöglicht die Bindung in eine hydrophobe Tasche innerhalb der N-terminalen Subdomäne von AGC-Kinasen, der sog. PIF-*pocket* (Abbildung 7C).^[197-199] Diese hydrophobe Tasche wird unter Mitwirkung der geordneten α B- und α C-Helices aufgespannt und tritt somit nur in der aktiven Konformation des Proteins auf.^[200] Die PH- und die Kinasedomäne werden über einen ca. 30 Aminosäuren-umfassenden flexiblen Linker verbunden, dem bislang keine direkte physiologische Rolle zugeschrieben wurde. Er ermöglicht jedoch die Einnahme einer inaktiven PH-*in*-Konformation, bei der die PH- und Kinasedomäne unter Ausbildung von H-Brücken und ionischen Interaktionen einen assoziierten Komplex formen, in dem das aktive Zentrum nicht ausgebildet werden kann, sowie eine potenziell aktive PH-*out*-Konformation, bei der die PH-Domäne dissoziiert von der Kinasedomäne vorliegt und die Bildung der ATP-Bindungstasche zwischen N- und C-terminaler Subdomäne erlaubt.^[201-202]

Die Regulation der Aktivität, Lokalisation und Interaktion mit anderen Proteinen erfolgt durch eine große Diversität verschiedener PTM (Phosphorylierung, Ubiquitinierung, Acetylierung, Methylierung, Hydroxylierung, Glykosylierung, SUMOylierung), welche sich über die gesamte Proteinsequenz erstrecken.^[203-204]

Besonders hervorzuheben sind drei Phosphorylierungen, die die Stabilität und Aktivität von Akt maßgeblich regeln. Hierbei ist die Einbringung einer Phosphatgruppe an Position Thr450 während der Translation für eine intramolekulare Rückfaltung des C-terminalen HM auf die N-terminale Subdomäne nötig, um das Protein vor proteasomalem Abbau zu schützen und die Stabilität somit zu erhöhen.^[205] Aktivierende Phosphorylierungen an den Positionen Thr308 und Ser473 (in Akt1; analoge Stellen für Akt2 und Akt3) induzieren strukturelle Umlagerungen der Aktivierungsschleife (von *DFG-out* nach *DFG-in*) bzw. des C-terminalen HM (Besetzung der *PIF-pocket*, Ausrichtung der α B- und α C-Helices, Abbildung 7) um eine allosterische Stabilisierung der katalytisch-kompetenten ATP-Bindungstasche zu erhalten.^[200]

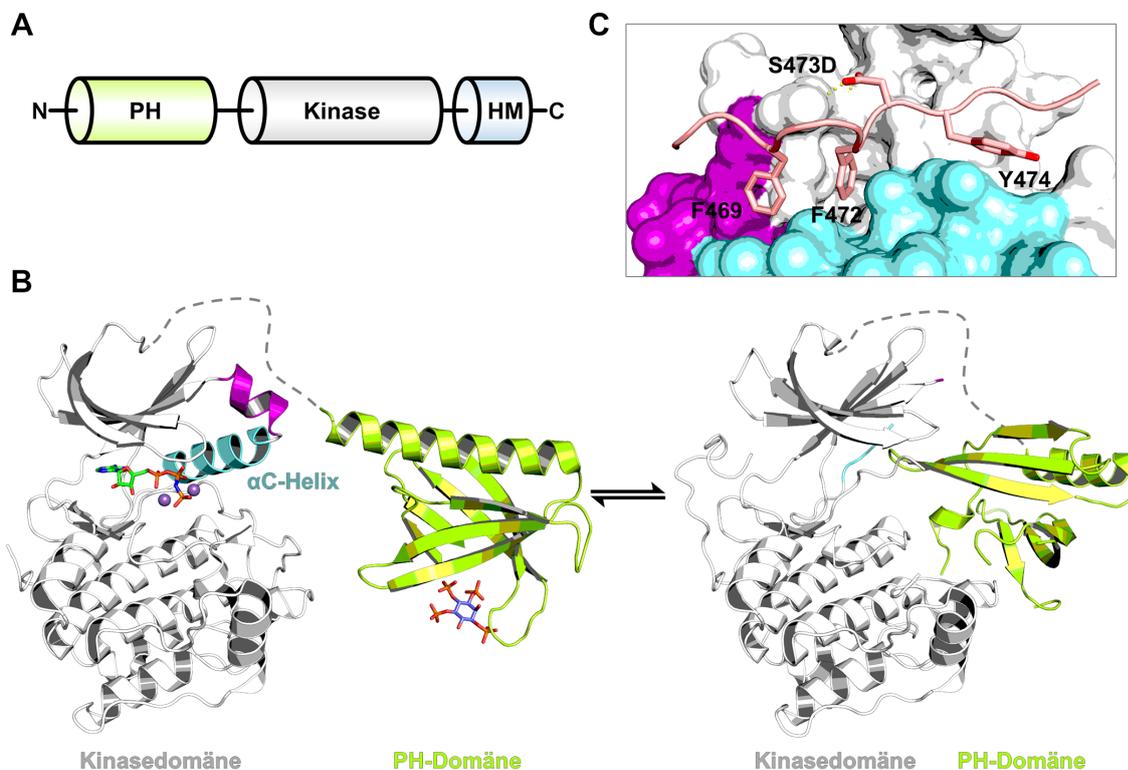


Abbildung 7. Aufbau und dreidimensionale Struktur von Akt. **A**, Schematische Darstellung von Akt mit der N-terminalen PH-Domäne (hellgrün), der katalytischen Kinasedomäne (grau) und dem regulatorischen C-terminalen hydrophoben Motiv (HM, blau). **B**, Dreidimensionale Strukturen der Kinase- (grau) und PH-Domäne (hellgrün) von Akt in der *PH-out*-Konformation (links, PDB: 4EKK und 1H10) sowie der *PH-in*-Konformation (rechts, PDB: 5KCV). Der verknüpfende Linker zwischen beiden Domänen ist als grau gestrichelte Linie angedeutet. Die α C-Helix ist zur besseren Orientierung in cyan eingefärbt, die α B-Helix in violett. Als gebundene Liganden sind AMP-PNP (Kohlenstoffatome in grün) sowie zwei Mn^{2+} -Ionen (violette Sphären) in der aktiven Kinasedomäne und IP_4 in der PH-Domäne (Kohlenstoffatome in hellblau) enthalten. Das HM ist für eine bessere Übersichtlichkeit ausgeblendet. **C**, Das PDK1-interagierende Fragment (PIF) innerhalb des C-terminalen HM von Akt faltet in der *PH-out*-Konformation in die *PIF-pocket* innerhalb der N-terminalen Subdomäne unmittelbar oberhalb der α B- (violett) und α C-Helices (cyan) unter Ausbildung von zwei H-Brücken des Phosphomimetikums S473D sowie diverser hydrophober Kontakte von F469, F472 und Y474.

Die Substratbindung erfolgt durch Erkennung von positiv-geladenen Arginin-Seitenketten an den Positionen P(-5) und P(-3) N-terminal zur Phosphorylierungsstelle innerhalb des Substrats, wobei das allgemeine Substratmotiv R-x-R-x-x-S/T lautet.^[206-207] Besonders bevorzugt sind zudem Substrate mit sterisch anspruchsvollen Seitenketten an Positionen P(+1) und einem Threonin-Rest an Position P(-2).^[207]

1.3.3 PI3K/Akt-Signalweg

Als zentraler Regulator im PI3K/Akt-Signalweg ist Akt an der Steuerung einer Vielzahl essenzieller Prozesse beteiligt (Abbildung 8). Hierzu zählen u. a. Zellwachstum, Apoptose, und Glukosemetabolismus; also fundamentale Funktionen, die auch mit den *hallmarks of cancer* assoziiert sind (siehe Kapitel 1.1, 1.3.4).^[203] Dabei werden membran-ständige Rezeptoren (GPCRs und RTKs) durch extrazelluläre Signale wie Insulin, Cytokine oder Wachstumsfaktoren stimuliert, was in der PI3K-vermittelten Synthese vom *second messenger* PIP₃ resultiert, wodurch wiederum PH-Domänen-Proteine wie PDK1 und Akt an die Plasmamembran rekrutiert werden. Neben der Rezeptor-bedingten Aktivierung von PI3K kann dessen Funktion auch durch Interaktion mit kleinen GTPasen der Ras-Familie reguliert werden.^[208-209] Hierdurch wird Akt vom intramolekularen, auto-inhibierten Zustand (PH-*in*) in die offene PH-*out*-Konformation überführt.^[210] Die somit zugängliche Aktivierungsschleife wird an Position Thr308 von PDK1 phosphoryliert, was in einer geringen basalen Aktivität resultiert.^[211] Die ebenfalls PIP₃-abhängige, mTORC2-vermittelte Phosphorylierung an Ser473 innerhalb des HMs führt schließlich zur vollständigen Aktivierung und ermöglicht die Phosphorylierung von Effektorproteinen, wie z. B. S6, TSC1/2 und GSK3 α/β .^[211-212] Bislang wurden deutlich über 100 Substratproteine von Akt identifiziert;^[183] erst kürzlich konnte die Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Kinase (NADK), welche die Vorstufe (NADP⁺) des primären Kofaktors (NADPH) für den reduktiven Metabolismus darstellt (vgl. *hallmarks of cancer*, Kapitel 1.1), dem Akt-Substratspektrum zugeordnet werden.^[213] Die Effektorselektivität kann dabei von der Expression im jeweiligen Gewebe, dem Status der PTMs, der aktivierten Akt-

Isoform sowie dem extrazellulären Stimulus abhängig sein.^[185, 214] Die Signalterminierung wird durch die PTEN-medierte Dephosphorylierung von PIP₃ zu PIP₂ *upstream* von Akt sowie durch die direkt inaktivierende Dephosphorylierung der Reste pThr308 und pSer473 in Akt erzielt.^[203]

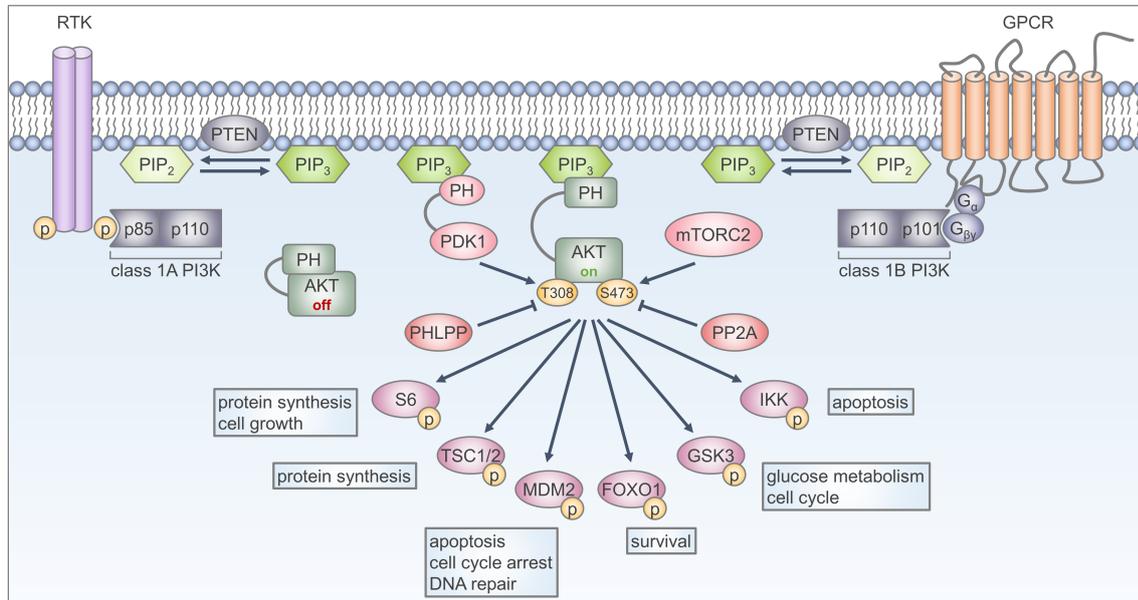


Abbildung 8. Schematische Darstellung des PI3K/Akt-Signalwegs. Extrazelluläre Signale werden von RTKs oder GPCRs verarbeitet und in das Zellinnere übertragen wodurch PI3Ks aktiviert werden, welche Membran-assoziiertes PIP₂ durch Phosphorylierung zu PIP₃ umsetzen. Dieser Lipid-basierte *second messenger* fungiert als Ankerpunkt für PH-Domänen-enhaltende Protein, darunter PDK1 und Akt, welche somit zur Plasmamembran rekrutiert werden. Dort kann Akt an T308 durch PDK1 phosphoryliert und aktiviert werden. Die vollständige Aktivierung erfolgt durch weitere Phosphorylierung an S473 durch mTORC2. In seiner aktiven Form kann Akt eine Vielzahl von Effektor-Proteinen phosphorylieren und dadurch positiv oder negativ regulieren, z. B. S6, TSC1/2, MDM2, FOXO1, GSK3 und IKK. Dadurch werden zelluläre Prozesse wie Proteinsynthese, Zellwachstum, Apoptose, Zellzyklus(-arrest), DNA-Reparatur, Zellüberleben und Glukosemetabolismus gesteuert. Die Inaktivierung dieser Signalwege wird durch die PTEN-katalysierte Dephosphorylierung von PIP₃ zu PIP₂ initiiert und führt weiterhin zur Dephosphorylierung und Inaktivierung von Akt durch PHLPP und PP2A. *Feedback loops* und die Verknüpfungen mit dem Ras/Raf/MEK/Erk-Signalweg sind für eine bessere Übersicht nicht gezeigt. GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor (*G protein-coupled receptor*), RTK: Rezeptor-Tyrosinkinase, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinasen, p85: regulatorische Untereinheit PIK3R1/2; p101: regulatorische Untereinheit PIK3R5, p110: katalytische Untereinheit PIK3CA/B/G/D, PIP₂: Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat, PIP₃: Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat, PTEN: *phosphatase and tensin homolog*, PHLPP: *PH domain and leucine rich repeat protein phosphatases*, PP2A: *protein phosphatase 2*, mTORC2: *mechanistic target of rapamycin complex 2*, PDK1: *phosphoinositide-dependent kinase-1*, S6: ribosomales Protein S6, TSC1/2: *tuberous sclerosis proteins 1 and 2*, MDM2: *mouse double minute 2 homolog*, FOXO1: *forkhead box protein O1*, GSK3: Glykogensynthase-Kinase 3, IKK: *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase*. [Adaptiert von MANNING und TOKER,^[203] HENNESSY *et al.*,^[215] COSTA und BOSCH,^[216] sowie CellSignaling Technology.^[217]]

Neben der Aktivierung von Akt durch PIP₃-Produktion an der Plasmamembran kann dies auch an Endomembranen beobachtet werden. Dabei kann PIP₃ sowohl an Endomembranen *in situ* generiert werden, als auch durch *membrane trafficking* dorthin gelangen.^[218-219] Ebenfalls kann PI(3,4)P₂, aber nicht PI(4,5)P₂, als Membrananker für Akt und die aktivierende Kinase PDK1 fungieren. Die Synthese von PI(3,4)P₂ erfolgt hierbei aus PIP₃ durch SHIP (*SH2-domain-containing inositol 5'-phosphatase*)-vermittelte Katalyse oder mithilfe von Klasse II PI3Ks unter Verwendung von PI(4)P als Substrat.^[220-221] Entgegen der initialen Erwartung, dass aktiviertes, Membran-ständiges Akt ins Cytosol diffundieren und dort ebenfalls Effektoren phosphorylieren kann, konnte kürzlich detailliert gezeigt werden, dass die Akt-Aktivität von der direkten PH-Domänen-vermittelten Membranassoziation abhängig ist und somit nur die Phosphorylierung von ebenfalls Membran-gebundenen oder Membran-nahen Protein katalysiert werden kann.^[210, 222] Bei Verlust der PIP₃- bzw. PI(3,4)P₂-Bindung fungiert die PH-Domäne als Autoinhibitor, indem sie zurück auf die Kinasedomäne faltet, die Aktivierungsschleife und das HM von der Kinasedomäne löst und dadurch die Dephosphorylierung von pThr308 und pSer473 induziert.^[210, 222] Hierdurch wird eine strenge räumliche und zeitliche Regulation der Akt-Aktivität gewährleistet, die direkt proportional zum „Input“ ist und die Substratspezifität weiter erhöht und sogar auf einzelne zelluläre Kompartimente beschränkt.

1.3.4 Klinische Relevanz

Die zentrale Schlüsselrolle von Akt in der physiologischen Signaltransduktion unterstreicht zugleich die Implikation seiner Fehlregulation in der Entstehung und dem Voranschreiten diverser Krankheitsbilder wie Krebs, Diabetes sowie kardiovaskulärer und neurologischer Erkrankungen.^[223-224] Die Überaktivierung von Akt, die durch genetische Alterationen in regulatorischen Aktivatorproteinen (EGFR, PI3K, PTEN, Ras) oder direkt in Akt induziert werden kann, hat dabei häufig eine Entartung von Signalwegen zur Folge, die Zellüberleben, -wachstum und -proliferation kontrollieren;^[225-226] dadurch ist Akt eines der am häufigsten überaktivierten Proteine in zahlreichen humanen Tumorerkrankungen, darunter

Brust-, Prostata- und Pankreaskarzinome.^[227] Die häufig beobachtete Überaktivierung von Akt in Krebspatienten besitzt in wenigen Fällen zwar einen prognostischen Wert, der Schlüsse auf den zu erwartenden Krankheitsverlauf und/oder dessen Schwere zulässt, wobei (hyper-)phosphoryliertem und überaktiviertem Akt bislang jedoch keine prädiktiven Eigenschaften zugewiesen werden konnten.^[228-231] Ein unmittelbarer linearer Zusammenhang eines alterierten Onkogens *upstream* von Akt und der Akt-vermittelten Funktionsregulation von *downstream*-Effektoren ist damit oft nicht gegeben. Im Fall von PI3K und Akt wurde z. B. eine Entkopplung der beiden enzymatischen Aktivitäten beschrieben, wodurch eine Unabhängigkeit beider Proteine voneinander erreicht wird.^[232] Die Regulation von Zellproliferation, -überleben und Tumorwachstum kann dann bspw. durch PI3K-vermittelte Induktion von PDK1, MAPK, SGK3 und BTK erfolgen.^[232-235] Diese Ergebnisse illustrieren eine wichtige akquirierte Eigenschaft von Krebszellen, ihre Signaltransduktion durch sog. *bypass*-Mechanismen umstellen zu können, wobei ehemals kritische Enzyme wie bspw. Akt ihre zentrale Regulationsfunktion verlieren. Eine intrinsische Redundanz innerhalb von Signalwegen kann diese Eigenschaft weiter fördern.^[203, 236-237] Eine direkte Konsequenz aus der Etablierung von *bypass signaling* ist das Auftreten von Wirkstoffresistenzen.^[236, 238-240]

Eine Ausnahme bezüglich der Tumor-treibenden Eigenschaften von alteriertem Akt stellt neben der seltenen Überexpression/Amplifikation von Akt2 die somatische Akt1^{E17K}-Mutation dar, welche erstmals im Jahr 2007 von CARPTEN *et al.* beschrieben wurde und seitdem ein prominentes Ziel der klinisch-onkologischen Forschung darstellt.^[241-244] Diese Punktmutation innerhalb der PH-Domäne bewirkt die Substitution eines negativ-geladenen Glutamats durch die positiv-geladene Aminosäure Lysin, was eine Ladungsinversion in der PIP₃-Bindungstasche und eine geänderte Substrataffinität (PI(4,5)P₂, IP₄) zur Folge hat.^[241, 245] Erst im Jahr 2017 konnte nachgewiesen werden, dass neben einem prognostischen Wert der Akt1^{E17K}-Mutation auch die Eigenschaften eines prädiktiven Biomarkers in gewissen Patientenpopulationen erfüllt sind und eine gezielte Inhibition von Akt in diesem genetischen Kontext demnach zu einer Tumorremission führen kann (Abbildung 9).^[244]

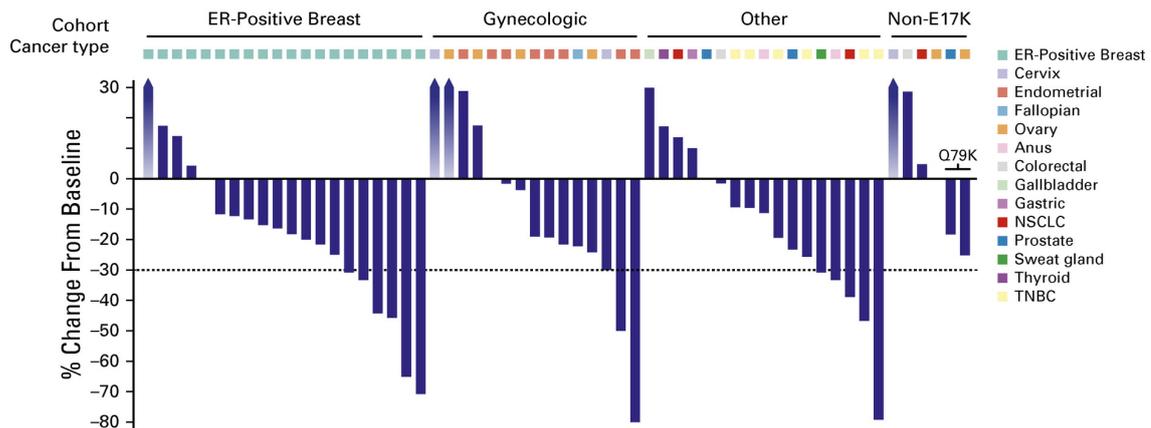


Abbildung 9. Übersicht der Therapieresultate bei Akt1^{E17K}-positiven Tumorpatienten nach Behandlung mit dem Akt-Inhibitor AZD5363 (siehe Kapitel 1.3.5).^[244] Die Akt1^{E17K}-Mutation tritt insbesondere bei ER-positivem Brustkrebs sowie gynäkologischen Tumorerkrankungen auf und kann dort in Subpopulationen als prädiktiver Biomarker betrachtet werden. Ab einer Änderung des Tumorumfanges um -30 % nach Therapiebeginn (*Change from Baseline*) wird von einer partiellen Remission (PR, *partial response*) entsprechend der RECIST 1.1-Kriterien gesprochen.^[246] Diese klinischen Daten belegten erstmals, dass Akt1^{E17K} ein therapeutisches Target in onkologischen Erkrankungen darstellt.

Auch wenn eine genetische Alteration im PI3K/Akt-Signalweg nicht zwangsläufig tumortreibende Eigenschaften vermittelt, so können damit insbesondere gegenüber der Strahlen- und Chemotherapie auch Resistenz-schaffende Funktionen einhergehen.^[247-250] Somit kann auch im Falle von Tumorerkrankungen, deren Ursprung nicht in der genetischen Läsion von Akt liegt, eine Behandlung mit Akt-Inhibitoren sinnvoll sein, um einer Entstehung derartiger Resistenzen vorzubeugen oder deren Effekt abzuschwächen.^[250] Neben der Akt-bedingten Resistenz-Vermittlung weisen Krebszellen auch einen veränderten Metabolismus mit erhöhter anaboler Tendenz auf, wobei überaktiviertes Akt eine gesteigerte Glukoseaufnahme durch GLUT1-Überexpression sowie eine hochregulierte Glykolyse induziert.^[251-253] Eine Kombinationsstrategie unter Verwendung von Akt-Inhibitoren kann somit als vielversprechender Ansatz in der Behandlung diverser Krebsarten betrachtet werden, um hierdurch als *hallmarks of cancer* bekannte Funktionen zu adressieren.

1.3.5 Akt-Inhibitoren

Eine enorme Bandbreite verschiedener Strategien zur therapeutischen Adressierung von Akt wurde im Verlauf der letzten zwei Jahrzehnte seit dessen Entdeckung entwickelt; hierzu zählen ATP-kompetitive Typ I-Inhibitoren (Abbildung 10) sowie allosterische Liganden (Abbildung 11), welche im Folgenden beschrieben werden.^[254-255]

Die ersten hochpotenten Inhibitoren, welche für Akt identifiziert wurden, waren Staurosporin und verwandte Bisindolylmaleimid-Analoga mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich, welche jedoch keinerlei Selektivität für Akt zeigten (siehe Kapitel 1.2.3).^[256] Ein weiterer Naturstoff-basierter Ansatz erfolgte auf Grundlage von Balanol, einem Azepan-Derivat aus *Verticillium balanoides*, wobei die Selektivitätsprofile der Folgeverbindungen gegenüber PKA, PKC, PKG und weiteren STKs nicht ausreichend optimiert werden konnten.^[257] Ansonsten stellten ATP-kompetitive Isochinolinsulfonamid-Derivate, z. B. H-89 und NL-71-101 (Abbildung 10B), den ersten Startpunkt der gezielten Akt-Inhibitorentwicklung dar, obwohl sie ursprünglich für die verwandte AGC-Kinase PKA designiert wurden. NL-71-101 zeigte allerdings *in vitro* eine 2.4-fache Selektivität für Akt gegenüber PKA (3.7 vs. 9.0 μM) und induzierte bei hohen mikromolaren Konzentration einen proapoptischen Effekt in OVCAR-3 Krebszellen.^[258] In einem Hochdurchsatz-Screening (HTS, *high-throughput screening*) der Firma Abbott konnte ein trans-3,4'-Bispyridinylethylen-Derivat als moderat potenter Inhibitor von Akt1 identifiziert werden ($K_i = 5.3 \mu\text{M}$), dessen anschließende Optimierung in Verbindung A-443654 resultierte.^[259] Trotz der signifikant gesteigerten Potenz dieser Substanz ($K_i = 160 \text{ pM}$), der erhöhten Selektivität gegenüber PKA (40-fach) und der antitumoralen Wirkung in Xenograft-Mausmodellen, konnte A-443654 aufgrund seines unzureichenden pharmakokinetischen Profils (kurze Halbwertszeit, hohe Clearance, keine orale Bioverfügbarkeit) klinisch nicht weiterentwickelt werden.^[254, 260] Im Jahr 2008 publizierte GlaxoSmithKline die Entwicklung des Oxadiazol-Derivats GSK690693, dessen Entwicklung aufgrund seiner schwerwiegenden hyperglykämischen Effekte nach klinischen Studien der Phase 1 eingestellt wurde.^[261-262] Aufbauend auf dem 2007 erstmals für Akt-Inhibitoren beschriebenen 7-Phenylpurin-Grundgerüst, wurde im darauffolgenden Jahr der

weiterentwickelte Pyrrolopyrimidin-basierte Inhibitor CCT128930 mit einer 26-fachen Selektivität gegenüber PKA sowie potenter *in vitro*-Wirksamkeit publiziert, der jedoch zugleich eine geringe orale Bioverfügbarkeit sowie einen schnellen *in vivo*-Metabolismus aufwies.^[263-265] Nach weiteren medizinalchemischen Optimierungszyklen konnte dann im Jahr 2012 von AstraZeneca der hochpotente pan-Akt-Inhibitor AZD5363 (Capivasertib) entwickelt werden.^[266-268] Dieser zeichnet sich durch eine niedrige nanomolare Potenz, eine erhöhte *in vivo*-Wirksamkeit sowie ein überschaubares Nebenwirkungsprofil aus; allerdings konnten auch für diesen Inhibitor Selektivitätsprobleme gegenüber anderen AGC-Kinasen beobachtet werden, wobei PKA und p70S6K äquipotent inhibiert werden.^[267] Nichtsdestotrotz wird Capivasertib derzeit in diversen klinischen Studien der Phasen 1 und 2 für die Behandlung diverser Tumorerkrankungen untersucht, darunter Prostata-, Brust- und Ovarialkarzinome, wobei sowohl Mono- als auch Kombinationstherapieansätze verfolgt werden (s.a. NCT02338622, NCT02077569, NCT02423603).^[269-272] Zudem konnten mithilfe des Therapeutikums Capivasertib die tumortreibenden Eigenschaften und somit die klinische Relevanz der Akt1^{E17K}-Mutation nachgewiesen werden.^[244]

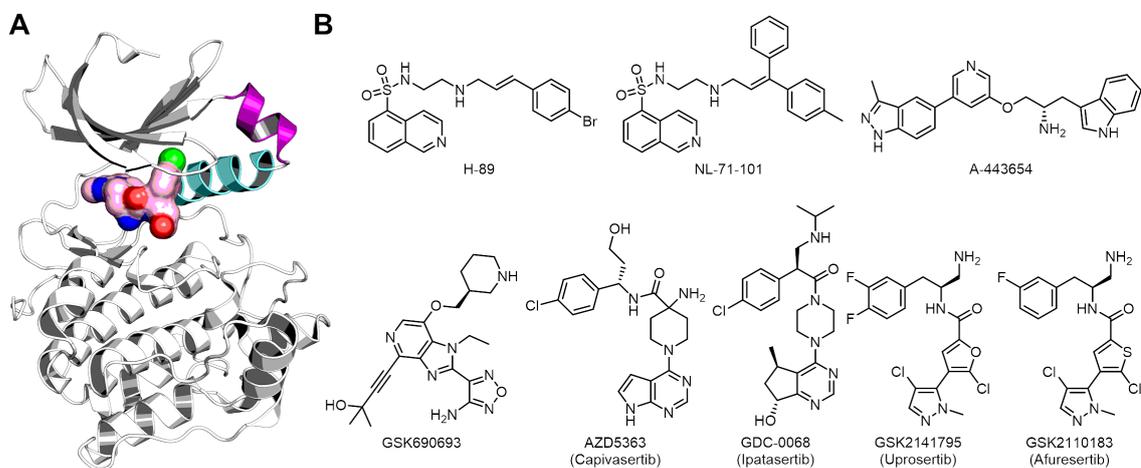


Abbildung 10. Bindungsmodus und chemische Strukturen von ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren. **A**, Kristallstruktur von Akt1(141-480) im Komplex mit AZD5363 (Capivasertib, Kohlenstoffatome in rosa); α B- (violett) und α C-Helices (cyan) liegen geordnet vor und stabilisieren die ATP-Bindungstasche. **B**, Chemische Strukturen einer Auswahl von im Text genannten ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren.

Neben Capivasertib befindet sich noch ein weiterer ATP-kompetitiver Akt-Inhibitor in mehreren klinischen Studien der Phasen 1 und 2.^[273] Das von Array BioPharma entwickelte Dihydrocyclopentapyrimidin-Derivat GDC-0068 (Ipatasertib) wurde 2012 erstmals beschrieben und verfügt wie auch Capivasertib über eine inhibitorische Wirkung gegenüber allen Akt-Isoformen, zeigt jedoch ein überlegenes Selektivitätsprofil mit lediglich zwei *off-targets* (PKG und p70S6K, $IC_{50} < 1 \mu M$).^[274-276] Der Wirkstoff ist oral bioverfügbar, hat eine geringere hyperglykämische Wirkung und wird zur Zeit für die Behandlung von soliden Tumoren evaluiert (s.a. NCT01896531, NCT02162719, NCT03853707).^[277-278] Des Weiteren befinden sich noch zwei strukturell ähnliche Wirkstoffe von GlaxoSmithKline in der klinischen Entwicklung, GSK2110183 (Aføresertib) und GSK2141795 (Uprosertib).^[279]

Neben dem klassischen Ansatz der orthosterischen, ATP-kompetitiven Inhibitoren, werden auch allosterische, Alkylphospholipid (APL)-basierte Inhibitoren entwickelt. Diese PIP₃-Mimetika sollen die Bindung der PH-Domäne an den *second messenger* und damit die Membranrekrutierung und Akt-Aktivierung unterdrücken. Prominente Beispiele hierfür sind Edelfosin, Miltefosin, Erufosin und Perifosin.^[250, 280-281] Da sie die regulatorische PH-Domäne adressieren, verfügen sie ebenfalls über eine geringe intrinsische Selektivität für Akt, was sowohl mit stark ausgeprägten, anti-proliferativen Eigenschaften, aber auch mit einem breiten Spektrum von Nebenwirkungen einhergeht.^[282] Zusätzlich zu ihren PIP₃-mimetischen Eigenschaften können sie aufgrund ihrer Detergenz-artigen Strukturen in die Zellmembran insertieren und somit die Phospholipid-Zusammensetzung und die Bildung von Membran-Mikrodomänen perturbieren.^[283] Die zu beobachtende antitumorale Wirkung in *in vivo*-Modellen ist höchstwahrscheinlich nicht auf eine spezifische Inhibition von Akt zurückzuführen, so dass bislang keiner der genannten APLs für onkologische Indikationen zugelassen wurde; lediglich Miltefosin ist seit 2014 für die Behandlung von Leishmaniose von der FDA zugelassen.^[284]

Eine vielversprechende Strategie zur spezifischen, allosterischen Adressierung von Akt wurde im Jahr 2005 zufällig von der amerikanischen Firma Merck & Co. identifiziert.^[285] In einem Aktivitäts-basierten HTS zeigte das 2,3-Diphenylchinoxalin Akt-I-1,2 eine inhibitorische Wirkung gegenüber den Vollängen-Konstrukten von Akt1 ($IC_{50} = 2.7 \mu M$) und Akt2 ($IC_{50} = 21 \mu M$), nicht aber

auf den Proteinkonstrukten ohne PH-Domäne.^[285] Kinetische Experimente zeigten weiterhin, dass diese Substanz nicht-kompetitiv gegenüber ATP bindet. Hieraus wurde ein PH-Domänen-abhängiger Bindungsmechanismus postuliert, bei dem diese Inhibitor-Klasse zwischen Kinase- und PH-Domäne bindet. Eine Vielzahl an Folgeexperimenten sowie medizinisch-chemischer Optimierungszyklen führte schließlich zur Entwicklung allosterischer Akt-Inhibitoren wie z. B. Akti-1/2, welche nicht nur selektiv gegenüber verwandten AGC-Kinasen waren, sondern zudem Isoform-spezifische Profile aufwiesen und somit Eigenschaften, die bis dato weder für ATP-kompetitive Liganden noch für PIP₃-Mimetika nachgewiesen werden konnten, erfüllen.^[286-294] Der exakte Bindungsmodus konnte erstmals im Jahr 2010 anhand der Kristallstruktur eines PH- und Kinase-Domänen-umfassenden Konstrukts von Akt1 im Komplex mit Akti-1/2 dargestellt werden (Abbildung 11).^[201] Dieser besteht aus einer kritischen π - π -Interaktion zwischen der Indolseitenkette von Trp80 und dem Imidazochinoxalin-Grundgerüst des kleinen Moleküls sowie diversen H-Brücken zwischen Ligand und Protein. Hydrophobe Kontakte zwischen Akti-1/2 und den Seitenketten von Ile84, Leu210 und Tyr272 stabilisieren zudem die Molekül-vermittelte PH-*in*-Konformation. Entsprechend der Klassifizierung nach ROSKOSKI JR. (siehe Kapitel 1.2.3, Tabelle 1) sind diese Liganden somit als Typ IV-Inhibitoren einzustufen.^[128]

Die erste klinische Studie eines allosterischen, PH-Domänen-abhängigen Akt-Inhibitors erfolgte im Jahr 2009 mit der Verbindung MK-2206, welche auf dem ursprünglichen Screening-Hit Akt-I-1/2 basierte und eine gute Verträglichkeit bei einer maximal tolerierbaren Dosis von 60 mg jeden zweiten Tag ergab (QOD, *quaque altera die*); hyperglykämische Effekte waren zudem weniger stark ausgeprägt als bei ATP-kompetitiven Inhibitoren.^[295-296] Obwohl dieser Wirkstoff in vielen Studien für die Behandlung diverser Krebsarten untersucht wurde, sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit anderen zielgerichteten und chemotherapeutischen Agenzien, wurden bislang keine Phase 3-Studien initiiert. Die zugrundeliegenden Limitationen bestehen in der unzureichenden Verfügbarkeit prädiktiver Biomarker bzw. einer unzulänglichen Patientenstratifikation und der damit verbundenen mangelnden Wirksamkeit; überlappende Nebenwirkungen mit Kombinationswirkstoffen stellen ebenfalls ein bislang unüberwindbares Problem dar.^[297-301]

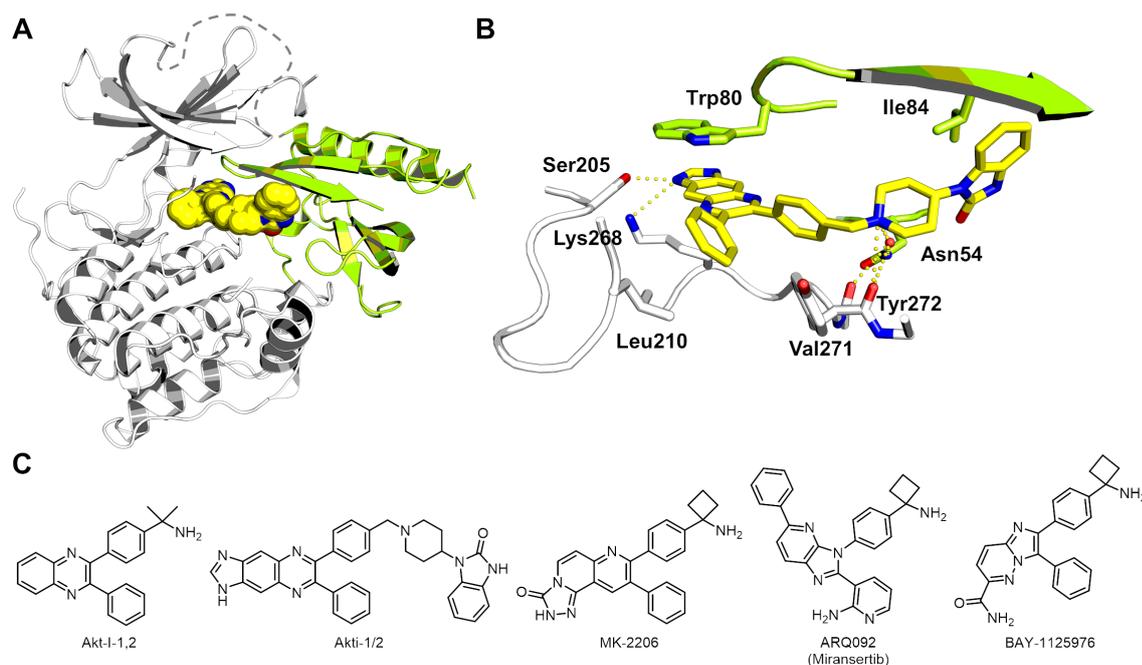


Abbildung 11. Bindungsmodus und chemische Strukturen von allosterischen Akt-Inhibitoren. **A**, Kristallstruktur von Akt1(2-443) im Komplex mit Akti-1/2 (Kohlenstoffatome in gelb); α B- und α C-Helix liegen ungeordnet vor und sind nicht aufgelöst. Der verknüpfende Linker zwischen beiden Domänen ist als gestrichelte Linie angedeutet. **B**, Wichtige aromatische Interaktionen, hydrophobe Kontakte und H-Brücken (gelbe Kugeln) von Akti-1/2 mit Akt1 in der allosterischen Bindungstasche. **C**, Chemische Strukturen einer Auswahl von allosterischen, PH-Domänen-abhängigen Akt-Inhibitoren.

Im Jahr 2012 präsentierte ArQule eine zweite Kristallstruktur von Akt1 in der geschlossenen PH-*in*-Konformation im Komplex mit einem allosterischen Inhibitor inklusive der zugehörigen SAR einer fokussierten Substanzbibliothek.^[302] Basierend auf einem Imidazopyridin-Grundgerüst konnte eine Leitstruktur identifiziert werden, die eine hohe Selektivität für die drei Akt-Isoformen und eine potente *in vitro*- und *in vivo*-Wirksamkeit aufwies, allerdings nur unzureichende Plasmakonzentrationen nach oraler Administration erreichte.^[302] Die Folgeverbindung ARQ092 (Miransertib) besitzt verbesserte pharmakokinetische Eigenschaften *in vivo* und wurde daraufhin als klinischer Kandidat für Studien der Phase 1 ausgewählt (NCT01473095), in denen die maximal tolerierbare Dosis (MTD) sowie die empfohlene Phase 2-Dosis (RP2D, *recommended phase 2 dosage*) von 60 mg *qod* identifiziert wurde. Zu den häufigsten Wirkstoff-induzierten aber behandelbaren Nebenwirkungen zählten dabei Hyperglykämie (32 %), makulopapulöser Hautausschlag (31 %), sowie Übelkeit und Juckreiz (je 21 %).^[303-306]

Die therapeutische Wirksamkeit von Miransertib gegenüber onkologischen sowie Überwuchs-Erkrankungen wird zurzeit in drei Phase 2-Studien untersucht (NCT03094832, NCT02476955, NCT03317366). Zudem wird derzeit ein allosterischer Akt-Inhibitor der zweiten Generation, ARQ751, in einer Phase 1-Studie analysiert (NCT02761694). Erste Ergebnisse deuten auf eine gute Verträglichkeit mit einer MTD und RP2D von 75 mg *qod* sowie einer potenziellen antitumoralen Wirksamkeit gegenüber PIK3CA/Akt/PTEN-alterierten Tumoren hin.^[307-308]

BAY-1125976 ist ein weiterer allosterischer Akt-Inhibitor, der MK-2206 und Miransertib in seiner Cyclobutylamin-Einheit ähnelt, jedoch ein Imidazopyridazin-Grundgerüst aufweist, welches wahrscheinlich die kritische π - π -Interaktion mit dem Trp80 der PH-Domäne ausbildet.^[309] Eine erste Phase 1-Studie ist zwar abgeschlossen, Ergebnisse liegen hierfür jedoch noch nicht vor (NCT01915576). Trotz der enormen Bemühungen einen therapeutisch wirksamen Akt-Inhibitor zu entwickeln, wurde bis heute keinem der o.g. investigativen Wirkstoffe eine Arzneimittelzulassung erteilt.

2 MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

Der Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase Akt, welche der Familie der AGC-Kinasen zuzuordnen ist und insgesamt drei Isozyme umfasst, kommt eine zentrale Rolle in der zellulären Signaltransduktion zuteil, wobei sie elementare physiologische Prozesse wie Zellproliferation, -wachstum und -migration, Glukosemetabolismus, Apoptose und Proteinbiosynthese reguliert. Damit geht eine kritische Position in der Pathogenese diverser Krankheiten im Falle einer Fehlregulation von Akt einher. Hierzu zählen neben Diabetes auch eine Vielzahl neurologischer, kardiovaskulärer sowie onkologischer Erkrankungen. Eine aberrante Signaltransduktion kann einerseits durch genetische Läsionen in Akt-Aktivator-Proteinen wie membranständigen Rezeptor-Tyrosinkinasen oder in den unmittelbar vorgeschalteten Enzymen PI3K und PTEN ausgelöst werden. Andererseits konnten aber auch krebstreibende und -fördernde Alterationen für die Proteinkinase Akt selbst gefunden werden, welche die Amplifikation und Überexpression sowie die somatische Punktmutation Akt1^{E17K} umfassen, deren treibende Eigenschaften bei soliden Tumoren und dem Proteus-Syndrom, einer Überwuchskrankheit, nachgewiesen werden konnten. Ebenfalls können nachgeschaltete Effektorproteine durch genetische Läsionen gestört sein, so dass über Feedback-Mechanismen die reguläre Akt-Aktivität beeinflusst wird. Auch ohne Alterationen innerhalb des PI3K/Akt-Signalwegs, die die Tumorentstehung und -entwicklung fördern, kann Akt bei der Entstehung von Resistenzen gegenüber Chemo- und Strahlentherapie involviert sein. Die beschriebenen Eigenschaften und Funktionen von Akt in der zellulären (Patho-)Physiologie und die sich daraus ergebende breite Verteilung der potenziellen Anwendungsgebiete erheben diese Proteinkinase zu einer zentralen Zielstruktur der modernen Wirkstoffforschung.

Während der letzten zwei Jahrzehnte wurden verschiedene therapeutische Ansätze für die molekulare Modulation von Akt entwickelt. Hierzu zählen neben ATP-kompetitiven und PIP₃-kompetitiven insb. allosterische Inhibitoren, die innerhalb einer einzigartigen Bindungstasche zwischen PH- und Kinasedomäne binden und dadurch die inaktive und geschlossene PH-*in*-Konformation stabilisieren. Während die beiden erstgenannten Inhibitortypen aufgrund ihrer Bindungsmodi eine geringe

intrinsische Selektivität für Akt aufweisen, zeigen allosterische, PH-Domänen-abhängige Inhibitoren neben einer ausgezeichneten Selektivität für die drei Akt-Isoformen ebenfalls minimierte *off-target*-vermittelte Toxizitäten. Damit stellt dieser Ansatz eine vielversprechende Strategie für die gezielte Modulation der Proteinkinae Akt dar.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte basierend auf dem Konzept der allosterischen Akt-Liganden eine neuartige Inhibitor-Klasse mit einem kovalent-allosterischen Bindungsmodus in biochemischen und zellulären Systemen charakterisiert und anschließend hinsichtlich des Inhibitionsprofils optimiert werden. Das zugrunde liegende Rational bestand hierbei aus der Verschmelzung der Selektivitätsvorteile der allosterischen Liganden mit der maximierten pharmakodynamischen Wirksamkeit kovalenter Inhibitoren, um somit hochpotente und selektive Moleküle zu entwickeln, die als molekulare Sonden oder gar als Wirkstoffvorläufer verwendet werden können.

Hierfür sollten zunächst in einer gezielten Strukturanalyse der Interdomänen-Bindungstasche potenziell reaktive Aminosäuren identifiziert werden, die als kovalente Ankerpunkte für *warhead*-dekorierte Liganden fungieren können. In einem Struktur-basierten Designansatz sollte in der Folge eine fokussierte Bibliothek kleiner organischer Moleküle entworfen werden, die die identifizierten Aminosäuren kovalent adressieren können. Zur Evaluierung dieser Verbindungen sollten massenspektrometrische sowie kinetische, Aktivitäts-basierte und zelluläre Assays etabliert werden, die die Aufstellung von einer SAR erlauben. Diese sollten des Weiteren durch strukturbiochemische Untersuchungen gestützt werden. Unter Berücksichtigung der pharmakokinetischen Eigenschaften der neuentwickelten organischen Moleküle sollte schließlich eine Leitstruktur identifiziert werden, die in abschließenden *in vivo*-Wirksamkeitsstudien profiliert werden sollte.

In einem zweiten Projekt sollte ein Fluoreszenzpolarisations-basiertes Assay-System zur Identifizierung von Modulatoren der Keap1:Nrf2-Protein-Protein-Interaktion entwickelt werden. Der Transkriptionsfaktor Nrf2 sowie der antagonistische Regulator Keap1 repräsentieren die Schaltzentrale der zellulären Redox-, Metabolismus- und Proteinhomöostase und vermitteln hierbei wichtige

entgiftende, zytoprotektive Funktionen. Diese Eigenschaften können jedoch auch von Tumorzellen für die Resistenzentwicklung gegenüber chemotherapeutischen Agenzien und oxidativem Stress ausgenutzt werden, was durch eine hohe Mutationsfrequenz dieser beiden Proteine und einer daraus resultierenden geringeren Therapieerfolgsquote unterstrichen wird. Daher sollte die Interaktionsvermittelnde Kelch-Domäne des E3-Ligase-Adapter-Proteins Keap1 heterolog in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden, um Bindungsanalysen mit Fluorophormarkierten, peptidischen Nrf2-Mimetika durchführen zu können. Nach Identifikation einer HTS-Assay-kompatiblen Protein/Peptid-Kombination sollte die *in-house* Substanzbibliothek der AG Rauh nach Inhibitoren der Keap1/Nrf2-Interaktion durchmustert werden.

Ein weiteres Projekt dieser Arbeit bestand aus der Weiterentwicklung der zuvor in der AG Rauh etablierten FLiK-Technologie unter Verwendung von positionsspezifisch eingebrachten, paramagnetischen Spinmarkern (*spin labels*) zur Detektion Liganden-induzierter konformationeller Änderungen innerhalb der Aktivierungsschleife der MAP-Kinase p38 α mittels Elektronenspinresonanz (EPR, *electron paramagnetic resonance*)-Spektroskopie. Im Gegensatz zu einer Fluoreszenz-basierten Analyse (FLiK) sollen hierdurch Gleichgewichtszustände quantifiziert und Konformationsänderungen thermodynamisch untersucht werden, um ein besseres Verständnis der molekularen Einflüsse von kleinen organischen Liganden auf die Proteindynamik zu gewinnen.

3 KOVALENT-ALLOSTERISCHE AKT-INHIBITOREN

Allosterische Liganden wie MK-2206 und Miransertib, die die Interdomänen-Bindungstasche in Akt besetzen und dadurch die inaktive PH-*in*-Konformation stabilisieren, weisen eine vorteilhafte Selektivität für die drei Akt-Isoformen gegenüber anderen Proteinkinasen auf.^[310-311] Verglichen mit ATP-kompetitiven Typ I-Inhibitoren wie Capivasertib und Ipatasertib, die neben Akt auch PKA, PKG und p70S6K potent inhibieren, induzieren allosterische Liganden somit eine geringere Dosis-limitierende *off-target*-Toxizität. Trotz ihrer spezifischen Interaktion mit und Inhibition von Akt, wurde bislang für keinen dieser Liganden eine Arzneimittelzulassung erteilt. Die Gründe hierfür sind vielfältiger Natur: Neben dem Mangel an validierten prädiktiven Biomarkern, die einen Therapieerfolg mittels Akt-Inhibition vorhersagen könnten, sind die ausbleibenden Erfolge in klinischen Studien zum Teil auch der unzureichenden Patientenauswahl anhand von Biomarkern bzw. einem fehlerhaften Studiendesign geschuldet.^[244, 312] Darüber hinaus ist eine Translation von präklinischen Erfolgen auf Patienten-relevante Systeme nur selten gegeben. Hieraus leitet sich ein Bedarf an innovativen Substanzen ab, die für die Aufklärung der pathophysiologischen Funktionen von Akt im klinischen Kontext von Hilfe sein könnten und/oder verbesserte Wirkstoffeigenschaften aufweisen und somit neue Therapiemöglichkeiten erlauben. Da mit kovalenten Kinaseinhibitoren wie Osimertinib und Acalabrutinib (siehe Kapitel 1.2.3) bahnbrechende Erfolge in der gezielten Therapie von EGFR-mutiertem NSCLC bzw. Non-Hodgkin-Lymphomen erzielt werden konnten, sollte das Konzept der allosterischen Akt-Inhibition in einem Struktur-basierten Ansatz um den Faktor der irreversiblen Modifikation der adressierten Kinase und somit einer maximierten Verweildauer am Zielprotein erweitert werden.^[313-315]

Vorab sei angemerkt, dass die organischen Synthesen der hier dargestellten und getesteten chemischen Verbindungen, sofern sie nicht kommerziell erhältlich waren, von Mitgliedern der AG Rauh durchgeführt wurden, d. h. von Dr. Rajesh Gontla, Dr. Steven Smith, Dr. Niklas Uhlenbrock oder Marius Lindemann, und teilweise oder vollständig in ihren Dissertationen beschrieben sind bzw. sein werden und/oder bereits publiziert sind.^[316-318]

3.1 Struktur-basiertes Design einer fokussierten Substanzbibliothek

Für eine detaillierte Analyse der Interdomänen-Bindungstasche von Akt1 standen zwei Kristallstrukturen im Komplex mit Akti-1/2 (PDB: 3O96) und Verbindung **1** (PDB: 4EJN) mit Auflösungen von 2.7 Å bzw. 2.2 Å zur Verfügung (Abbildung 12). In einem ersten Schritt wurden die beiden Kristallstrukturen überlagert und alle Aminosäuren im Abstand von maximal 12 Å um die jeweiligen Liganden ausgewählt und als Bindungstasche definiert. Anschließend wurden nur Cystein-, Tyrosin- und Lysinseitenketten für eine potenzielle kovalente Adressierung berücksichtigt, da für diese entsprechende biokompatible *warheads* etabliert sind (Abbildung 12A). Dabei konnten vier Tyrosine, zwei Lysine sowie vier Cysteine, die in räumlicher Nähe zu den beiden Liganden stehen, identifiziert werden. Tyr263, Lys268 und Tyr272 innerhalb der Kinasedomäne befinden sich im geringen Abstand zu den aromatischen Grundgerüsten der Liganden, während sich Tyr18, Cys296, Cys310 und Tyr326 in der Nähe der östlichen Molekülhälfte, beginnend bei der verbrückenden Methylengruppe, befinden. Die Seitenkette von Lys276 liegt mindestens 7.6 Å vom nächsten Atom des jeweiligen Liganden entfernt und wurde für eine weitere Analyse daher nicht berücksichtigt; die maximale zu überbrückende Distanz wurde auf 6 Å festgelegt, da die Einbringung einer reaktiven Einheit mit einer Kettenlänge von vier Atomen, abhängig von der Konformation und Zusammensetzung, zu einer Verlängerung des Moleküls um ca. 4-5 Å führt. Cys60 und Cys77 innerhalb der PH-Domäne bilden eine Disulfidbrücke aus, sind mehr als 7 Å von einem Liganden-Atom entfernt und kamen damit nicht als adressierbare Aminosäuren in Frage. Cys296 und Cys310 liegen in der Kristallstruktur (PDB: 4EJN) zwar auch als Disulfidbrücke vor, sind aber als zellulärer Redoxsensor bekannt, wobei sie im oxidierten Zustand den proteasomalen Abbau von Akt induzieren.^[319-320] Da in der Kristallstruktur im Komplex mit Akti-1/2 (PDB: 3O96) Cys310 nicht aufgelöst war und dementsprechend auch keine Disulfidbrücke enthalten war, wurde die im ersten Fall zu beobachtende Disulfidbrücke als Artefakt betrachtet, welches im Rahmen der Proteinexpression, -reinigung oder -kristallisation entstanden sein könnte.

Für Tyr263 und Lys268 wurden zum Teil stabilisierende, intramolekulare H-Brücken zum Proteinerückgrat identifiziert, weshalb diese Seitenketten ebenfalls nicht weiter berücksichtigt wurden. Tyr272 wiederum ist durch aromatische Interaktionen und als Teil einer hydrophoben Subtasche (nicht gezeigt) an der Ligandenbindung beteiligt. Die Seitenkette von Tyr272 ist darüber hinaus entgegengesetzt zu den Liganden orientiert und wurde ebenfalls nicht als möglicher Ankerpunkt für potentiell kovalent bindende Inhibitoren in Betracht gezogen. Des Weiteren sind Tyr18 und Tyr326 an der H-Brücken-vermittelten Interaktion zwischen PH- und Kinasedomäne beteiligt und der für Tyrosin-Seitenketten etablierte Sulfonylfluorid-*warhead* wurde bislang lediglich in *in vitro*-Experimenten getestet, so dass eine Biokompatibilität nicht vorausgesetzt werden konnte. Die Cysteine an den Positionen 296 und 310 zeigten in den überlagerten Kristallstrukturen eine vielversprechende Ausrichtung gegenüber der Benzimidazoloneinheit von Akti-1/2 mit ungefähren Abständen von 4.4 bis 4.9 Å, so dass diesen Resten das größte Potential für eine kovalente Adressierung zugeschrieben wurde (Abbildung 12).

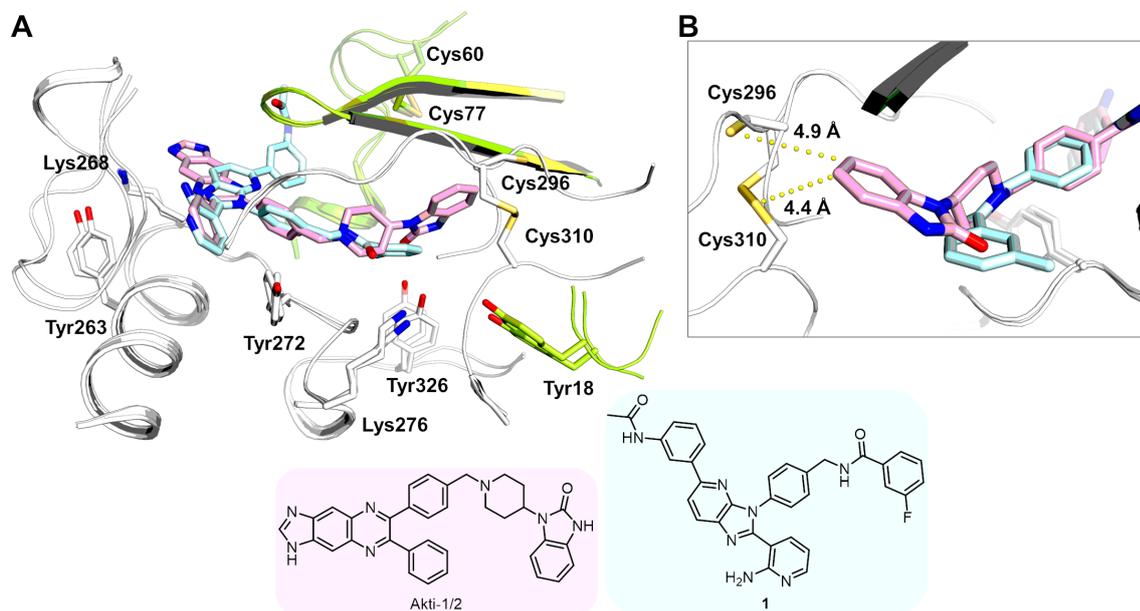


Abbildung 12. Schematische Darstellung der Bindungstasche von allosterischen Akt-Inhibitoren. **A**, Überlagerung der Kristallstrukturen von Akt1 in Komplex mit Akti-1/2 (Kohlenstoffatome in rosa, PDB: 3096) bzw. Verbindung **1** (Kohlenstoffatome in cyan, PDB: 4EJN). Aminosäuren, die innerhalb eines Abstands von 12 Å um die Liganden liegen, sind als Sekundärstrukturen dargestellt und die Seitenketten von Cysteinen, Tyrosinen und Lysinen als *sticks* präsentiert. **B**, Die Benzimidazoloneinheit von Akti-1/2 ist in Richtung der Cysteine an den Positionen 296 und 310 orientiert. Die kürzesten Abstände zwischen Ligand und Cystein-Seitenketten liegen bei 4.9 bzw. 4.4 Å.

Da Cysteine als bevorzugte Nukleophile für die kovalente Proteinadressierung in Kombination mit biokompatiblen, elektrophilen, reaktiven Acrylgruppen etabliert sind (siehe Kapitel 1.2.4), wurden diese beiden Aminosäuren als Ziel für ein Struktur-basiertes Moleküldesign ausgewählt. Aufgrund des hohen Überlappungsgrads der alignierten Kristallstrukturen (RMSD = 0.747 Å über 288 C α -Atome nach fünf durchgeführten Zyklen) wurde für die nachfolgenden Modellierungstudien lediglich die Komplexkristallstruktur von Akt1 mit Akti-1/2 verwendet.

Für die Modellierungsstudien, welche mit der Software LigandScout 4.3 (Inte:Ligand GmbH) durchgeführt wurden, wurde von einer 1,6-Naphthyridinon-Einheit anstelle des Imidazochinoxalin-Grundgerüst von Akti-1/2 ausgegangen, wodurch Ausgangsverbindung **2** erhalten wurde. Für diese Verbindung konnte in vorausgegangenen Arbeiten bereits erfolgreich eine Synthesestrategie etabliert werden. Zudem zeigte sie eine potente Inhibition von Akt1 in einem aktivitäts-basierten HTRF[®]-Assay (IC₅₀ = 33 ± 5 nM), so dass sie als optimale Ausgangsverbindung für ein Struktur-basiertes Design von *warhead*-dekorierten, allosterischen Liganden identifiziert wurde.^[321-322] Ein analoger Bindungsmodus konnte für **2** mithilfe einer *in silico*-Modellierung basierend auf der Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit Akti-1/2 (PDB: 3096) ebenfalls validiert werden (Abbildung 13).

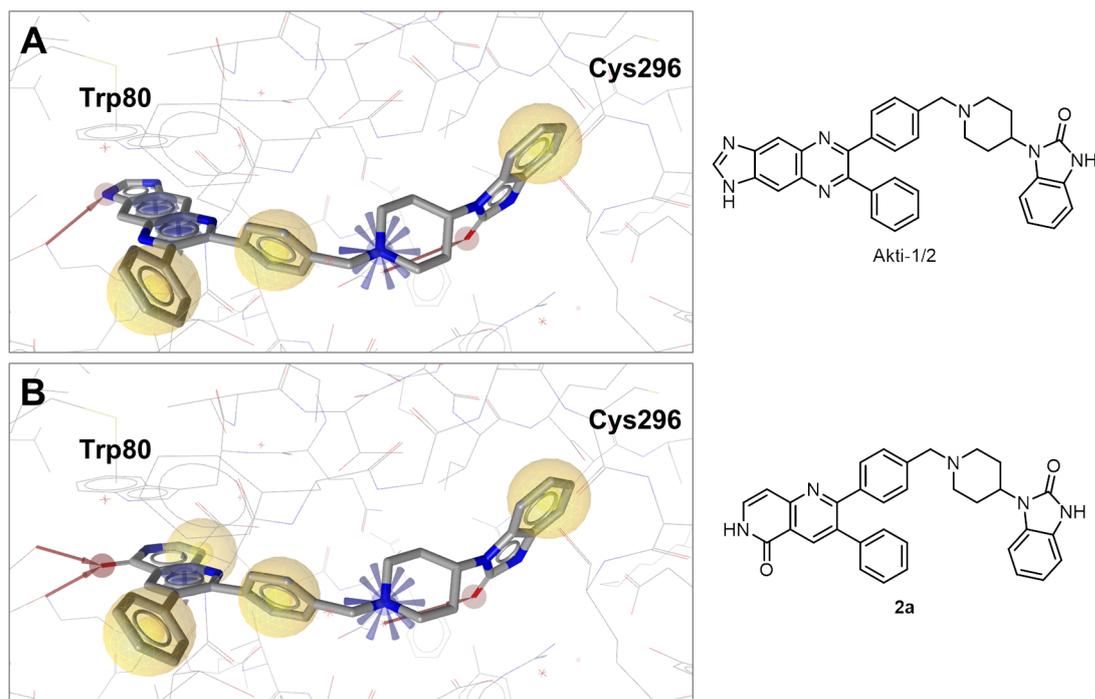


Abbildung 13. Basierend auf der Komplexkristallstruktur von Akt1 mit Akti-1/2 (PDB: 3096) erstellte Pharmakophor-Modelle von Akti-1/2 (A) bzw. 2 (B). Der Austausch des Grundgerüsts wirkt sich nicht auf den Bindungsmodus sowie die Ausrichtung der Benzimidazoloneinheit aus. Rote Pfeile: H-Brücken-Akzeptor; gelbe Sphären: hydrophobe Kontakte; blaue Ringe: aromatische Interaktionen; blauer Kegel: positiv ionisierbar. Die Abbildungen wurden mit LigandScout 4.3 (Inte:Ligand GmbH) erstellt.

Im Rahmen des Computergestützten Designs von Acrylgruppen-tragenden Molekülen wurden ausgehend von Parentalverbindung **2** die gewünschten strukturellen Änderungen vorgenommen (Abbildung 14). Das Hauptaugenmerk lag dabei auf einer einfachen synthetischen Zugänglichkeit der entworfenen Verbindungen. Die Substanzen **3a** und **4** sind strukturell sehr ähnlich zu **2**, wobei die Benzimidazoloneinheit beibehalten und mit einem Acrylamid modifiziert wurde. Der Chlor-Substituent in *ortho*-Position zum Acrylamid in Verbindung **4** entstammt dabei einem kommerziell erhältlichen Synthesebaustein und könnte die Bindungsaffinität oder die physikochemischen Eigenschaften der Zielverbindung beeinflussen, so dass beide Verbindungen modelliert werden sollten.^[316, 318] Allen Molekülen liegt das 1,6-Naphthyridinon-*scaffold* zugrunde, welches im Fall von **6** zudem an N6 methyliert ist. Alle entworfenen Verbindungen weisen zudem ein tertiäres Benzylamin auf, entweder in der offenkettigen Variante (**6**) oder als Bestandteil eines Piperidin- (**2**, **3a**, **4-5**, **7**, **9a**) bzw. Piperazinrings (**8**). In Anlehnung an das zyklische Imidazolone (**2**, **3a**, **4**), enthalten die Verbindungen **7** und **9a** flexible

Harnstoff- bzw. Amid-Linker. Die Substanzen **5**, **6** und **8** variieren in der Linkerlänge zwischen dem Acrylamid-dekorierten Phenylring und dem benzyllischen Amin. Die entworfene, fokussierte Substanzbibliothek deckt somit einen großen chemischen Raum ab und weist zudem unterschiedliche physikochemische Eigenschaften (tPSA: 56.22-114.93; cLogP: 3.63-5.94; pK_a: 7.922-9.247) auf.

Für die Modellverbindungen **3a**, **4-8**, **9a** wurde anschließend basierend auf der Akti-1/2-Komplexkristallstruktur unter Vorgabe einer reversiblen Bindung eine Kraftfeld-basierte Energieminimierung (*Merck molecular force field 94* [MMFF94]) durchgeführt.^[323] Das Protein wurde hierbei als starrer Körper betrachtet, dem keine konformationellen Freiheitsgrade zugestanden wurden. Die Koordinaten der generierten Substanz-Konformationen wurden für eine bessere Visualisierung mittels PyMOL exportiert (Abbildung 14).^[312] Die erzielten Abstände zwischen dem vermeintlich nukleophilen Schwefel der Cys296-Seitenkette und den jeweiligen C_β-Atomen der Acrylamideinheiten lagen zwischen 3.6 und 5.9 Å. Da für jede Modellverbindung nur eine Konformation generiert wurde, ist der Abstandsbereich vergleichsweise schmal und wäre bei einer Berücksichtigung von größeren Konformations-Ensembles pro Verbindung vermutlich breiter ausgefallen. Die entworfenen Modellverbindungen zeigen vielversprechende Bindungsposen, die denen von Akti-1/2 ähneln und die bei Berücksichtigung einer intrinsischen Molekül- und Proteindynamik für eine kovalente Bindungsausbildung zwischen Cystein und *warhead* geeignet sein könnten.

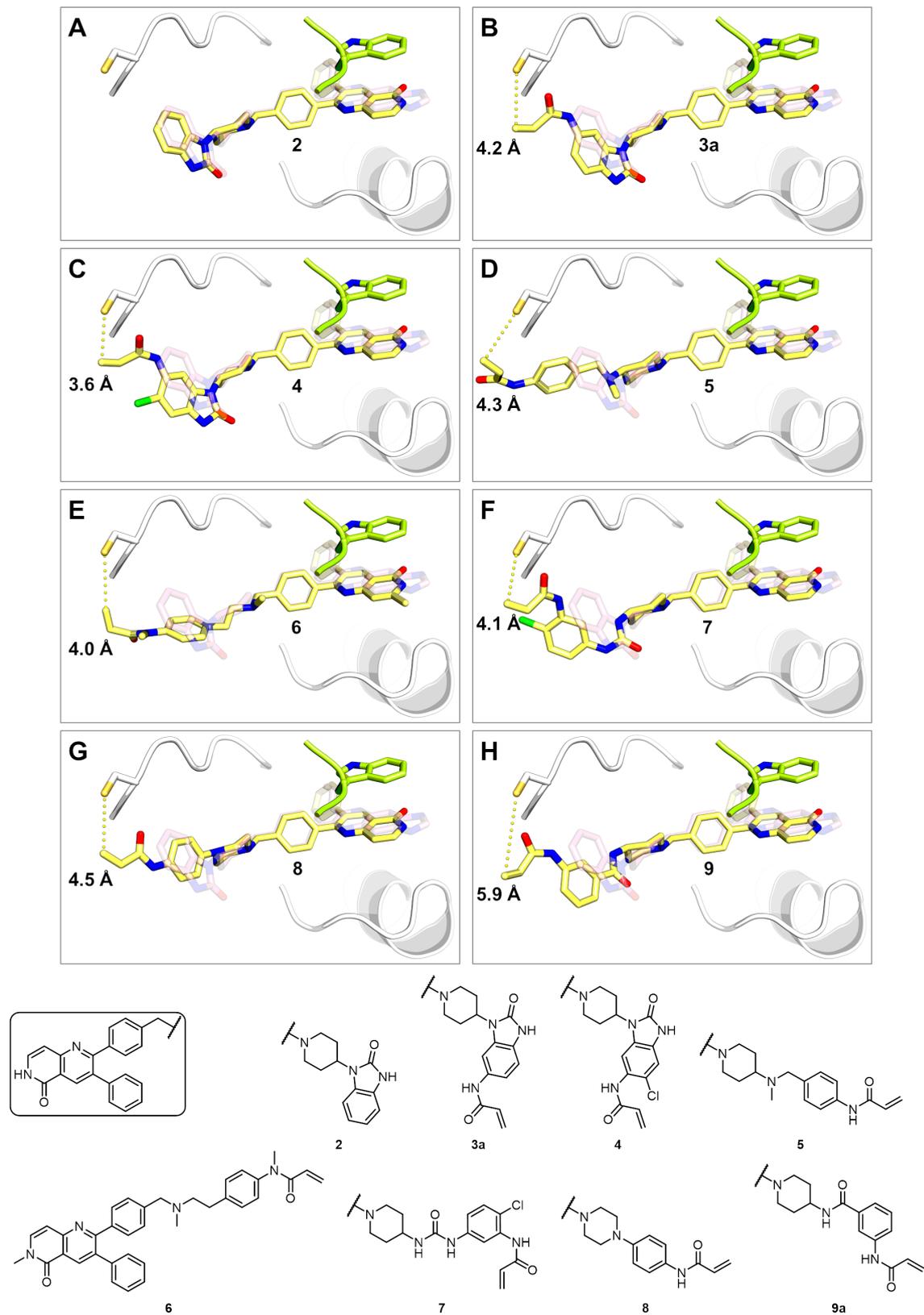


Abbildung 14. Chemische Strukturen und modellierte Bindungsposen (A-H, Kohlenstoffatome in gelb) der auf Parentalverbindung 2 aufbauenden Modellsbstanz 3a, 4-8 und 9a. Zum Vergleich der Bindungsposen ist Akti-1/2 als halbtransparentes Molekül gezeigt (Kohlenstoffatome in rosa). Abstände zwischen C β -Atomen der Acrylamid-warheads und dem Schwefelatom der Cys296-Seitenkette sind angegeben.

3.2 Massenspektrometrische Bindungsanalysen

3.2.1 Proteinexpression und- reinigung

Nachdem die sieben oben gezeigten Modellverbindungen (**3a**, **4-8** und **9a**) designt und erfolgreich synthetisiert wurden, sollten initiale massenspektrometrische Analysen mit Akt1^{wt} erfolgen, um eine kovalente Bindungsbildung nachzuweisen. Hierfür wurde ein entsprechendes N-terminal Hexahistidin-markiertes Proteinkonstrukt (His₆-Akt1^{wt}) heterolog exprimiert (siehe Kapitel 8.4) und anschließend säulenchromatographisch gereinigt (siehe Kapitel 8.5.4). Die Generierung des rekombinanten Baculovirus sowie die anschließende Testexpression wurden zuvor von der Dortmund Protein Facility (DPF) am MPI Dortmund durchgeführt. Im ersten Schritt wurde eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie (Ni-AC) durchgeführt, um das Zielprotein über seinen Hexahistidin-Tag aus dem Zellysate zu isolieren (Abbildung 15). Die Probe wurde dabei langsam auf eine Ni²⁺-NTA-Matrix aufgetragen sowie anschließend mit Puffer gewaschen und mit Imidazol-haltigem Puffer B stufenweise von der Säule eluiert (Abbildung 15, Peaks 1-3). Die analytische SDS-PAGE der gesammelten Fraktionen zeigte eine Anreicherung des vermeintlichen Zielproteins (MW_{calc} ≈ 59 kDa) in den Fraktionen der Peaks 2 und 3 auf einer Höhe zwischen 55 und 70 kDa. Die Fraktionen dieser beiden Peaks, welche die höchste Reinheit aufwiesen, wurden für die anschließende Größenausschluss-Chromatographie (SEC) vereinigt und auf ein Volumen von ca. 2 mL eingengt.

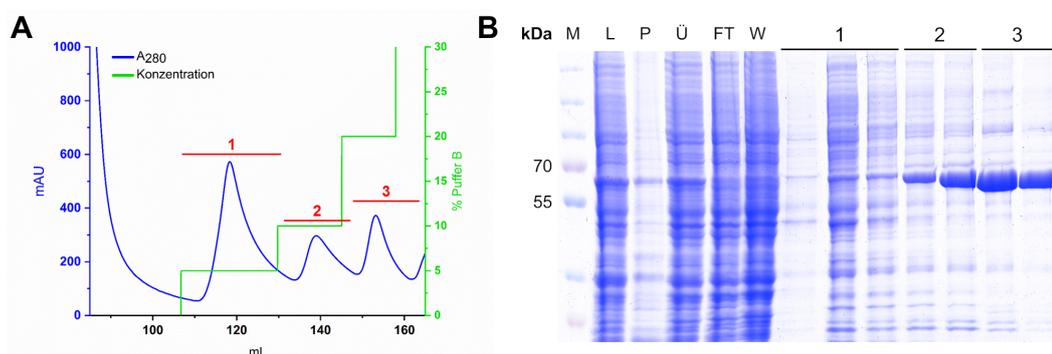


Abbildung 15. **A**, Chromatogramm der Ni-AC von His₆-Akt1^{wt}. Blau: Absorption bei 280 nm; grün: Konzentration des Imidazol-haltigen Elutionspuffers. **B**, Analyse der Fraktionen der Ni-AC mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. L: Lysat; P: Pellet; Ü: löslicher Überstand; FT: Durchfluss; W: Waschfraktion; 1-3: Eluatpeaks; M: Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

Da für massenspektrometrische Untersuchungen eine Abspaltung des His₆-Tags nicht nötig ist und lediglich die Proteinausbeute verringern würde, erfolgte vor der SEC keine entsprechende Spaltung. Die eingegangenen, vereinigten Fraktionen A4-B1 wurden mit einer langsamen Flussrate auf eine HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare) aufgetragen und isokratisch eluiert (Abbildung 16A). Das erhaltene Chromatogramm zeigte eine erfolgreiche Auftrennung der Probe in drei separierte Peaks. Die zugehörigen Fraktionen wurden anschließend wiederum *via* SDS-PAGE und Coomassie Brilliant Blau (CBB)-Färbung analysiert (Abbildung 16B) und zeigten eine erfolgreiche Reinigung des zuvor angereicherten Zielproteins ($MW_{\text{calc}} \approx 59 \text{ kDa}$) im dritten Peak. Die Verunreinigungen in den Peaks 1 und 2 können Proteinen mit einem höheren Molekulargewicht bzw. aggregierten Proteinen zugeordnet werden. Die Fraktionen des dritten Peaks wurden vereinigt, auf ca. 7-10 mg/mL konzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die finale Ausbeute betrug durchschnittlich 2.5-3.0 mg Protein pro Liter Expressionskultur.

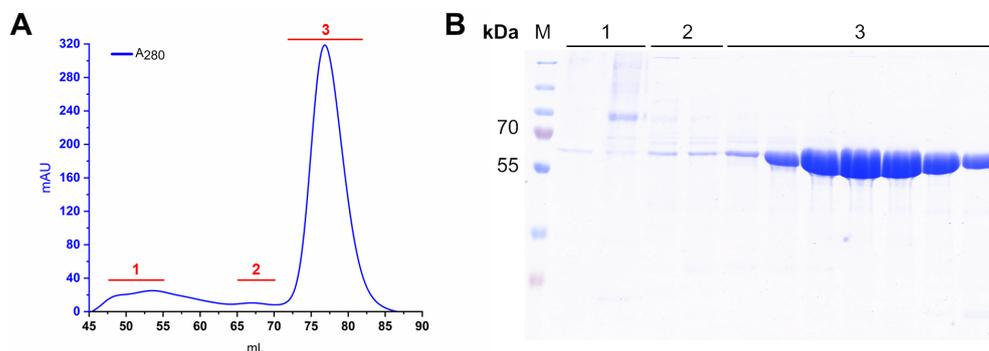


Abbildung 16. A, Chromatogramm der SEC von His₆-Akt1^{wt}. Blau: Absorption bei 280 nm. **B**, Analyse der Fraktionen der SEC mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. 1-3: Eluatpeaks; M: Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

3.2.2 ESI-MS-Analytik

Das erfolgreich gereinigte Akt1^{wt}-Konstrukt konnte anschließend für massenspektrometrische Analysen zur Evaluierung des Bindungsmodus der synthetisierten Modellverbindungen verwendet werden. Dazu wurde das Protein mit den jeweiligen Testsubstanzen oder einem äquivalenten Volumen an DMSO (Kontrolle) versetzt und für 60 min auf Eis inkubiert.

Die ESI-MS-Analytik erfolgte wie in Kapitel 8.8.1 beschrieben und die erhaltenen Rohspektren wurden mit der Software ProMass Deconvolution™ (Thermo Fisher Scientific) dekonvolviert und analysiert (Abbildung 17). Auffällig ist hierbei zunächst die Anwesenheit mehrerer Spezies im Spektrum des apo-Proteins (DMSO-Kontrolle), mit einem Hauptpeak bei 59238 Da. Dies entspricht einer exakten Differenz von 240 Da zum theoretischen Molekulargewicht von Akt1^{wt} (58998 Da). Dieses Phänomen ist für Akt, welches in Insektenzellen exprimiert wurde, jedoch bekannt und ist auf eine mehrfache Phosphorylierung zurückzuführen, wobei der beobachtete Hauptpeak der dreifach phosphorylierten Spezies (3 x 80 Da) entspricht.^[222, 321, 324] Literatur-bekannt Phosphorylierungs-Positionen sind Ser124, Ser129 und Thr450, die wahrscheinlich für eine erhöhte Proteinstabilität verantwortlich sind.^[222] Aus diesem Grund wurde die apo-Masse (MW_{calc}) von Akt1^{wt} als 59238 Da definiert und Massenzunahmen, die durch Bildung kovalenter Addukte entstehen, in Relation zu diesem Wert gesetzt.

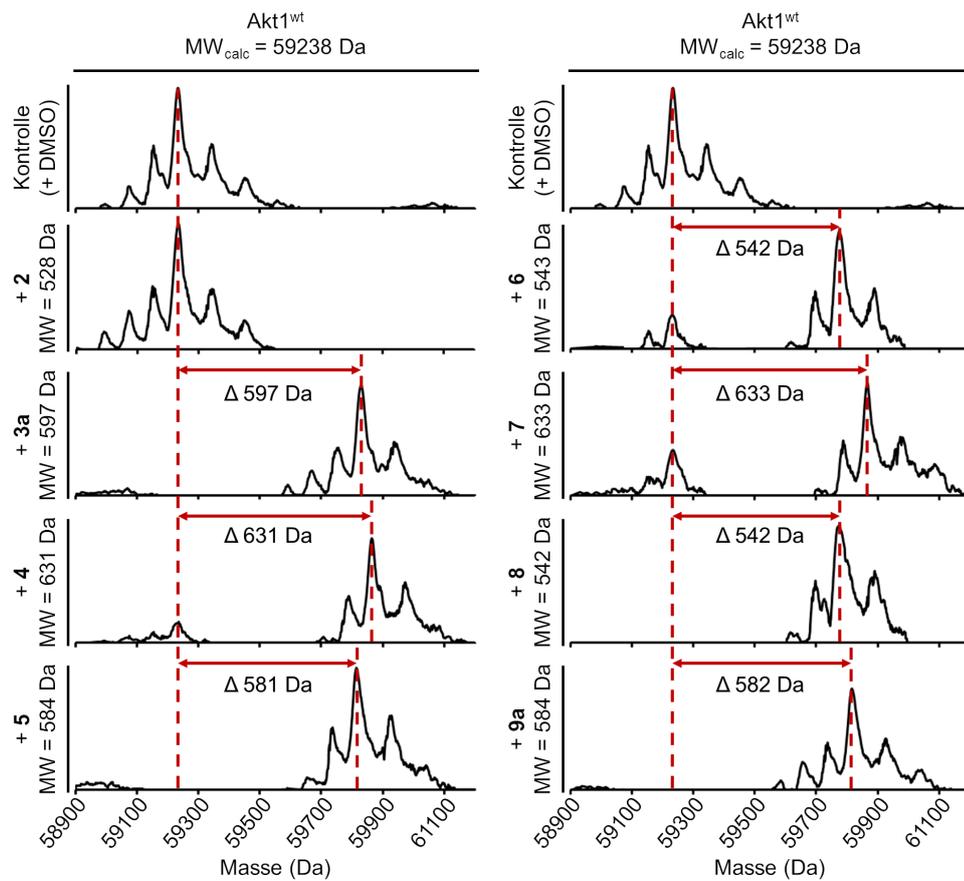


Abbildung 17. Dekonvolvierte ESI-Massenspektren von Akt1^{wt} nach Inkubation mit DMSO (Kontrolle) bzw. den synthetisierten Testverbindungen **2**, **3a**, **4-8**, **9a**.

Für Parentalverbindung **2** konnte bei Verwendung eines zehnfachen molaren Überschusses von Ligand zu Protein keine kovalente Modifikation von Akt1^{wt} detektiert werden. Dies entspricht aufgrund des Nichtvorhandenseins eines reaktiven *warheads* den Erwartungen und erlaubt gleichzeitig die Schlussfolgerung, dass eine Massenzunahme nur im Fall einer kovalenten Adduktbildung zu beobachten ist und die reversible Liganden-stabilisierte PH-*in*-Konformation unter den experimentellen Bedingungen der ESI-MS-Analysen nicht stabil ist. Abgesehen von Verbindung **2**, konnte jedoch für alle *warhead*-modifizierten Testverbindungen eine Massenverschiebung beobachtet werden, der mit einer maximalen Abweichung von ± 3 Da den Molekulargewichten der jeweiligen eingesetzten Substanzen entsprach, was bezüglich der Proteinmasse einem Fehler von 0.005 % (50 ppm) entspricht und somit zu vernachlässigen ist. Die Ergebnisse für Verbindungen **6** und **7** zeigten neben der Adduktmasse auch die Anwesenheit von verbliebenem apo-Protein, was für eine unvollständige Modifikation des Proteins aufgrund einer geringeren Affinität oder einer langsamer erfolgenden Bindungsbildung sprechen könnte. Eine valide Quantifizierung von Markierungsreaktionen an Proteinen ist mittels Massenspektrometrie von intakten Proteinen im Rahmen der gewählten experimentellen Bedingungen nicht gewährleistet, weshalb die Ergebnisse daher qualitativ zu bewerten sind. Die Massenspektren, die einen breiteren Massenbereich auf der Abszisse abdecken, sind im Anhang dargestellt (siehe Kapitel 10.2, Abbildung 57). Da keine mehrfache Modifikation zu beobachten war, deutet dies auf eine stöchiometrische Bindung der kovalenten Testverbindungen an Akt1^{wt} hin.

3.2.3 ESI-MS/MS-Analytik

Die ESI-MS-Analytik der intakten Proteine zeigte zwar eine kovalente Bindungsbildung an, jedoch erlaubte dies keine Rückschlüsse hinsichtlich der adressierten bzw. modifizierten Aminosäure(n). Möglicherweise könnte auch ein reaktives, Lösungsmittel-exponiertes Cystein für die beobachtete Adduktbildung verantwortlich sein.

Um entsprechende Aminosäuren zu identifizieren, wurden erneut Proteinproben in der Gegenwart der Testverbindungen (außer Verbindung **4**) bei 4 °C inkubiert, in der Folge mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einem tryptischen In-Gel-Verdau unterzogen (siehe Kapitel 8.8.2). Die so entstandenen tryptischen Peptide, welche ein C-terminales Lysin oder Arginin aufweisen, wurden daraufhin in Tandem-Massenspektrometrie-Experimenten hinsichtlich der kovalenten Modifikation von Cysteinen, die der Adduktmasse der Testverbindungen entspricht, gezielt analysiert.¹

Die Analyse erfolgte hierbei über die massenspektrometrische Detektion der Parental- und Fragment-Ionen, welche durch kollisionsinduzierte Dissoziation erzeugt wurden. Eine Datenbank der möglichen tryptischen Peptide sowie der erzeugbaren Fragment-Ionen wurde basierend auf der Sequenz des exprimierten Proteinkonstrukts Akt1^{wt} generiert und diente als Grundlage für den Abgleich der detektierten Ionenmassen. Die Ergebnisse zeigten für alle Testverbindungen eine kovalente Modifikation von Cys296. Darüber hinaus konnte für **7** und **9a** eine kovalente Modifikation von Cys310 beobachtet werden, was für eine gewisse strukturelle Flexibilität des jeweiligen *warheads* bzw. der Aktivierungsschleife, welche sowohl Cys296 als auch Cys310 enthält, sowie eine generelle Adressierbarkeit beider Cysteine spricht. Die Analytik für Verbindung **9a** ist exemplarisch in Abbildung 18 dargestellt; die übrigen Ergebnisse sind im Anhang (siehe Kapitel 10.3, Abbildung 58 bis Abbildung 62) zu finden.

Die Bezeichnung der generierten und detektierten Fragment-Ionen entspricht dabei der etablierten Nomenklatur nach ROEPSTORFF und FOHLMAN, welche zudem von JOHNSON *et al.* überarbeitet wurde und eine Zuordnung der entstehenden Fragmente zum ursprünglichen N- bzw. C-Terminus des Parentalions zugrunde legt.^[325-326] Fragment-Ionen der b-Serie enthalten den ursprünglichen N-Terminus, jene der y-Serie hingegen den C-Terminus, wobei eine Spaltung von Amidbindungen, welche statistisch am häufigsten auftritt, diese Fragmente erzeugt. Fragment-Ionen, die

¹ Die experimentelle ESI-MS/MS-Analytik sowie die Computergestützte Identifikation von kovalent-modifizierten, tryptischen Peptiden wurde von Dr. Petra Janning, Walburga Hecker, Malte Metz und Andreas Brockmeyer durchgeführt.

nicht durch Spaltung von Peptidbindungen entstehen, werden in a-/x- bzw. c-/z-Serien unterteilt, sind jedoch deutlich seltener zu finden. Die im Index genannte Zahl beschreibt zudem die Zahl der im Fragment-Ion enthaltenen Anzahl an Aminosäuren.

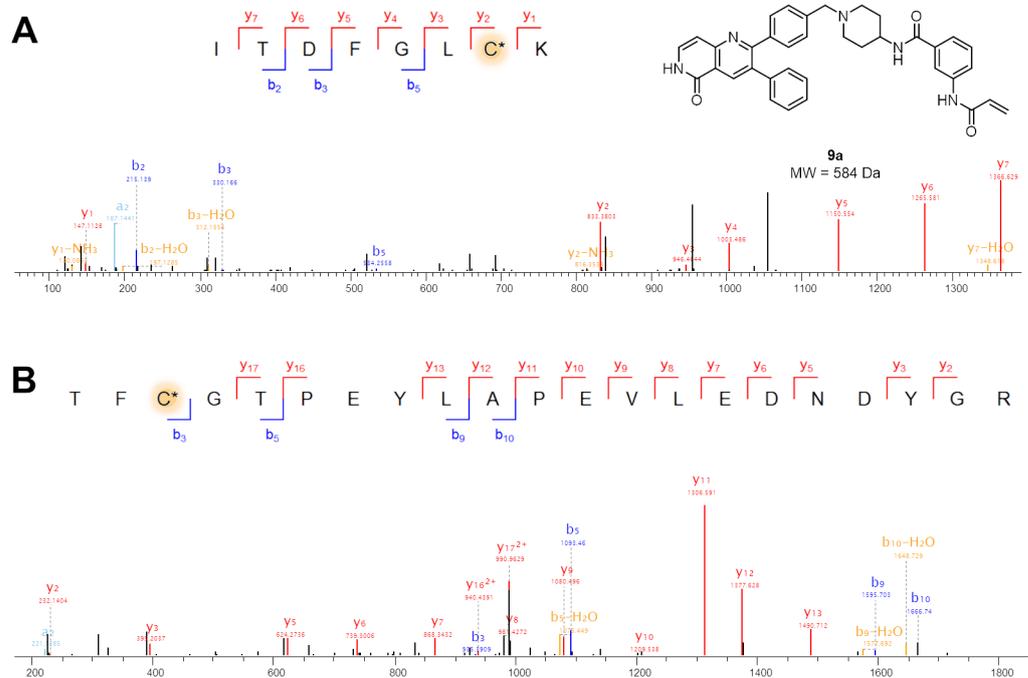


Abbildung 18. ESI-MS/MS-Analytik von Akt1^{wt} nach Inkubation mit Verbindung **9a** und tryptischem In-Gel-Verdau. Gezeigt sind die Fragment-Ionen-Spektren für die tryptischen Peptide Ile290-Lys297 und Thr308-Arg328, die Cys296 (**A**) bzw. Cys310 (**B**) enthalten (orange unterlegt). Die Bezeichnung der Peptidfragmente der b- bzw. y-Serie entspricht der Nomenklatur nach ROEPSTORFF und FOHLMAN.^[325] Fragment-Ionen, an denen **9a** kovalent gebunden ist, z. B. die Fragmentionen y_2^+ bis y_7^+ im Fall von Cys296 (**A**), weisen ein erhöhtes Masse/Ladungs-Verhältnis auf. Die Differenz zwischen dem y_1^+ - (147.1128 m/z) und dem y_2^+ -Fragment-Ion (833.3803 m/z) von Δ 686.2675 m/z entspricht der Masse des Addukts von [(Cys+**9a**)-H₂O]; das ungelabelte Cystein würde zu einer Differenz von ca. Δ 103 m/z führen.

Für Verbindung **9a** ermöglichten die detektierten Fragment-Ionen y_2^+ bis y_7^+ den Nachweis des kovalent modifizierten Cys296, welches im tryptischen Peptid Ile290-Lys297 enthalten war, da diese eine Zunahme des beobachteten Masse-zu-Ladungsverhältnisses um ca. m/z 584 aufwiesen, welche dem Molekulargewicht von Verbindung **9a** zugeordnet werden konnte. Im Fall des Cys310-haltigen tryptischen Peptids Thr308-Arg328 hingegen deuteten die detektierten Fragment-Ionen der b-Serie (b_3^+ , b_5^+ , b_9^+ , b_{10}^+) auf eine irreversible Bindung von **9a** hin.

In Gegenwart der übrigen getesteten Verbindungen konnten ebenfalls ausschließlich Modifikationen an den Positionen 296 und 310 nachgewiesen werden. Eine relative Quantifizierung der modifizierten Peptide war unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht realisierbar, so dass keine Abschätzung der Reaktivitäten der einzelnen Cysteine bzw. der Testverbindungen möglich war. Ebenso kann eine Modifikation von Cys310 durch die übrigen Verbindungen nicht vollends ausgeschlossen werden, da eine ausbleibende Detektion von kovalent modifizierten Peptiden bspw. durch eine unzureichende Ionisierung hervorgerufen werden könnte.

Zusammengefasst lieferten diese Ergebnisse einen erstmaligen Nachweis der selektiven und kovalenten Adressierung von Akt1^{wt} mithilfe von *warhead*-dekorierten, PH-Domänen-abhängigen Liganden (Typ IV + VI), die aus dem initialen Struktur-basierten Design hervorgingen.

3.3 Biochemische und kinetische Charakterisierung

Nachdem der kovalente Bindungsmodus der dargestellten Testsubstanzen erfolgreich nachgewiesen wurde, sollten die Verbindungen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Potenz gegenüber Akt1 evaluiert werden. Hierfür wurde kommerziell erhältliches Akt1^{wt} (ProKinase) verwendet, welches zuvor durch Inkubation mit PDK1 an Thr308 phosphoryliert und damit aktiviert wurde. Die im Rahmen dieser Arbeit exprimierten und gereinigten Akt-Konstrukte wurden nicht durch PDK1 phosphoryliert, weshalb sie nur eine äußerst geringe basale Aktivität aufwiesen und für eine Aktivitäts-basierte Charakterisierung nicht verwendet werden konnten.

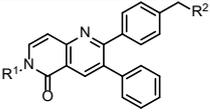
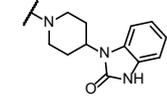
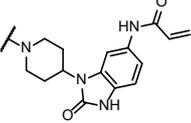
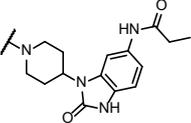
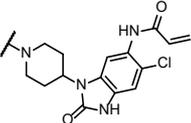
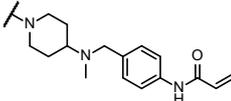
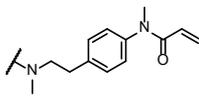
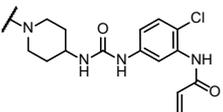
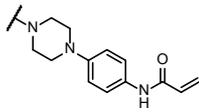
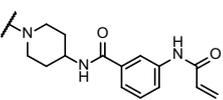
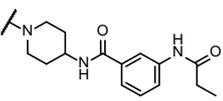
Die Analyse der Testverbindungen erfolgte mithilfe des bereits in vorausgegangen Studien verwendeten HTRF® KinEASE™ STK S3-Assays der Firma Cisbio (siehe Kapitel 8.9.1). Dieser beruht auf der Kinase-katalysierten Phosphorylierung eines Biotin-markierten Peptidsubstrats, welche im Anschluss an die erfolgte Modifikation mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zwischen Donorfluorophor-markiertem Anti-phospho-Antikörper und Akzeptorfluorophor-markiertem Streptavidin quantifiziert werden kann. Durch Zugabe einer Inhibitor-Verdünnungsreihe können die zugehörigen IC₅₀-Werte bestimmt werden.

Initial erfolgte die Assay-Etablierung den Herstellerangaben entsprechend, um eine bestmögliche Assay- und Datenqualität zu gewährleisten:^[327] Im ersten Schritt wurde durch eine Enzymtitration die optimale Kinasekonzentration ermittelt, welche 80 % des maximalen Assaysignals ergibt. Im Anschluss wurde durch kinetische Experimente die optimale Reaktionsdauer ermittelt, um eine lineare Korrelation zwischen Assaysignal und Inkubationszeit und somit eine maximale Assaysensitivität zu erhalten. Da die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms von der eingesetzten Substrat- und ATP-Konzentration abhängig ist, wurden in separaten Experimenten die zugehörigen Michaelis-Konstanten ($K_{M,ATP}$ und $K_{M,Substrat}$), bei denen die Reaktionsgeschwindigkeit halbmaximal ist, ermittelt und die entsprechenden Konzentrationen im weiteren Verlauf verwendet. Dies erlaubt zudem eine reproduzierbare Charakterisierung von ATP-kompetitiven Inhibitoren, deren apparente Affinität zu der Kinase von der eingesetzten ATP-Konzentration

abhängig ist.^[328] Abschließend wurden unter Verwendung der etablierten Assaybedingungen, welche in Kapitel 8.9 zusammengefasst sind, Referenzverbindungen mit Literatur-bekanntem IC_{50} -Werten vermessen, um die Qualität und Vergleichbarkeit der produzierten Assayergebnisse bewerten zu können. Danach erfolgte die entsprechende Charakterisierung der Testverbindungen **2-9** (Tabelle 2). Um eine bessere Bewertung der Testsubstanzen vornehmen und den Einfluss der kovalenten Bindungsbildung quantifizieren zu können, wurden von **3a** sowie **9a** die reversiblen Gegenstücke (**3b**, **9b**) synthetisiert, welche statt der elektrophilen Acrylamid-Gruppe eine gesättigte, unreaktive Propionamid-Einheit aufweisen.

Die experimentell bestimmten IC_{50} -Werte der allosterischen (Akti-1/2, MK-2206, Miransertib) und ATP-kompetitiven (GSK690693, Capiwasertib und Ipatasertib) Referenzverbindungen korrelierten gut mit den Literatur-bekanntem Ergebnissen,^[261, 267, 276, 290, 296, 306] weshalb eine akzeptable Assay- und Datenqualität angenommen wurde. Für ATP-kompetitive Akt-Inhibitoren wurden nanomolare halbmaximale inhibitorische Konzentrationen bestimmt ($IC_{50} = 0.9-3.5$ nM), wohingegen die allosterischen Liganden im Mittel vergleichsweise geringere inhibitorische Aktivitäten aufwiesen ($IC_{50} = 1.5-27.5$ nM). Parentalverbindung **2** ($IC_{50} = 33$ nM) wurde bereits in früheren Studien profiliert und zeigte dort eine ähnliche Aktivität wie Akti-1/2 ($IC_{50} = 28$ nM), was aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit nachvollziehbar war. Die neu synthetisierten Verbindungen wiesen eine breite Varianz ($IC_{50} = 0.8-387$ nM) auf, wobei vier der kovalenten Liganden einen IC_{50} -Wert unter 10 nM zeigten und damit in einem ähnlichen Aktivitätsbereich lagen wie die Referenzverbindungen. Ein Vergleich der kovalenten Liganden **3a** und **9a** mit ihren reversiblen Analoga **3b** und **9b** offenbarte eine ca. zehnfache Aktivitätsabnahme im Fall der gesättigten Verbindungen, was auf einen kovalenten Bindungsmodus von **3a** und **9a** hindeutet und damit in Einklang mit den Ergebnissen der massenspektrometrischen Untersuchungen steht (siehe Kapitel 3.2).

Tabelle 2. Übersicht der IC₅₀-Werte der Naphthyridinon-basierten Verbindungen gegenüber Akt1. Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung (n = 3).

Verbindung			Akt1 ^{wt}
	R ¹	R ²	IC ₅₀ / nM
2	H		33 ± 5.4 ^[322]
3a	H		0.8 ± 0.3
3b	H		10 ± 2.7
4	H		1.2 ± 0.3
5	H		242 ± 53
6	CH ₃		387 ± 133
7	H		9.1 ± 1.5
8	H		126 ± 31
9a	H		3.6 ± 0.8
9b	H		43 ± 8
Akti-1/2			28 ± 11
MK-2206			10 ± 2.1
GSK690693			2.2 ± 0.7
Capivasertib			0.9 ± 0.1
Ipatasertib			3.5 ± 0.6

Ebenfalls wird dadurch der mögliche Vorteil kovalenter Inhibitoren unterstrichen, ihr Zielprotein potenter zu hemmen. Die Verbindungen **3a** und **4**, welche sich lediglich im Chlor-Substituenten an der Benzimidazoloneinheit unterscheiden, zeigten vergleichbar hohe inhibitorische Potenzen gegenüber Akt1 (**3a**, $IC_{50} = 0.8$ nM; **4**, $IC_{50} = 1.2$ nM) und repräsentierten damit die besten Inhibitoren innerhalb dieser fokussierten Substanzbibliothek, gefolgt von dem Benzamid **9a** ($IC_{50} = 3.6$ nM) und dem Harnstoff-Derivat **7** ($IC_{50} = 9.1$ nM).

Deutlich weniger potent hingegen waren das Phenylpiperazin **8** ($IC_{50} = 126$ nM), Methylphenylamin **5** ($IC_{50} = 242$ nM) und Ethylphenylamin **6** ($IC_{50} = 387$ nM). Diese Substanzen haben die fehlende Amidgruppe im Linker zwischen Phenylacrylamid und tertiärem Stickstoff gemein, was in einer erhöhten (**5** und **6**) bzw. einer geringeren (**8**) Flexibilität resultiert und offenbar weniger favorisierte Bindungseigenschaften bedeutet. Verbindungen **7** und **9a**, die statt der zyklischen Benzimidazoloneinheit von **3a** und **4** eine lineare aber dennoch rigide Harnstoff- bzw. Amid-Einheit besitzen, zeigen eine deutlich höhere inhibitorische Potenz.

Dieser Datensatz erlaubte eine erste Einsicht in das Inhibitionsprofil der dargestellten fokussierten Substanzbibliothek. Da kovalente Inhibitoren jedoch einen zeitabhängigen Inhibitionsmechanismus aufweisen, ist die Bestimmung von IC_{50} -Werten mittels Endpunktmessungen unzureichend (siehe Kapitel 1.2.4). Um die Aufstellung einer detaillierten SAR zu ermöglichen, wurde für die *warhead*-modifizierten Testverbindungen deshalb eine Methodik etabliert, die die Bestimmung der kinetischen Parameter K_i und k_{inact} erlaubt (siehe Kapitel 1.2.4 und Kapitel 8.9.3).

Diese beinhaltet zeitaufgelöste IC_{50} -Messungen, bei denen die Vorinkubationszeit zwischen Kinase und Testsubstanz variiert wird, so dass durch anschließende Auftragung der resultierenden IC_{50} -Werte gegen die Zeit unter Verwendung der von KRIPPENDORFF *et al.* beschriebenen, XLfit-basierten Analysemethodik (siehe Kapitel 1.2.4, Gleichung (2)) die kinetischen Parameter K_i und k_{inact} abgeleitet werden können. Diese erlauben eine Unterteilung des apparenten IC_{50} -Werts in die reversible Affinität und die kovalente Bindungsbildung, wodurch der zweistufige Bindungsmechanismus angemessen beschrieben wird. Eine Übersicht der

grafischen Auftragungen der zeitaufgelösten IC_{50} -Bestimmungen ist in Abbildung 19 dargestellt. Die experimentell bestimmten kinetischen Parameter K_i und k_{inact} sowie der Quotient k_{inact}/K_i , welcher die Effizienz der Bindungsbildung repräsentiert, sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

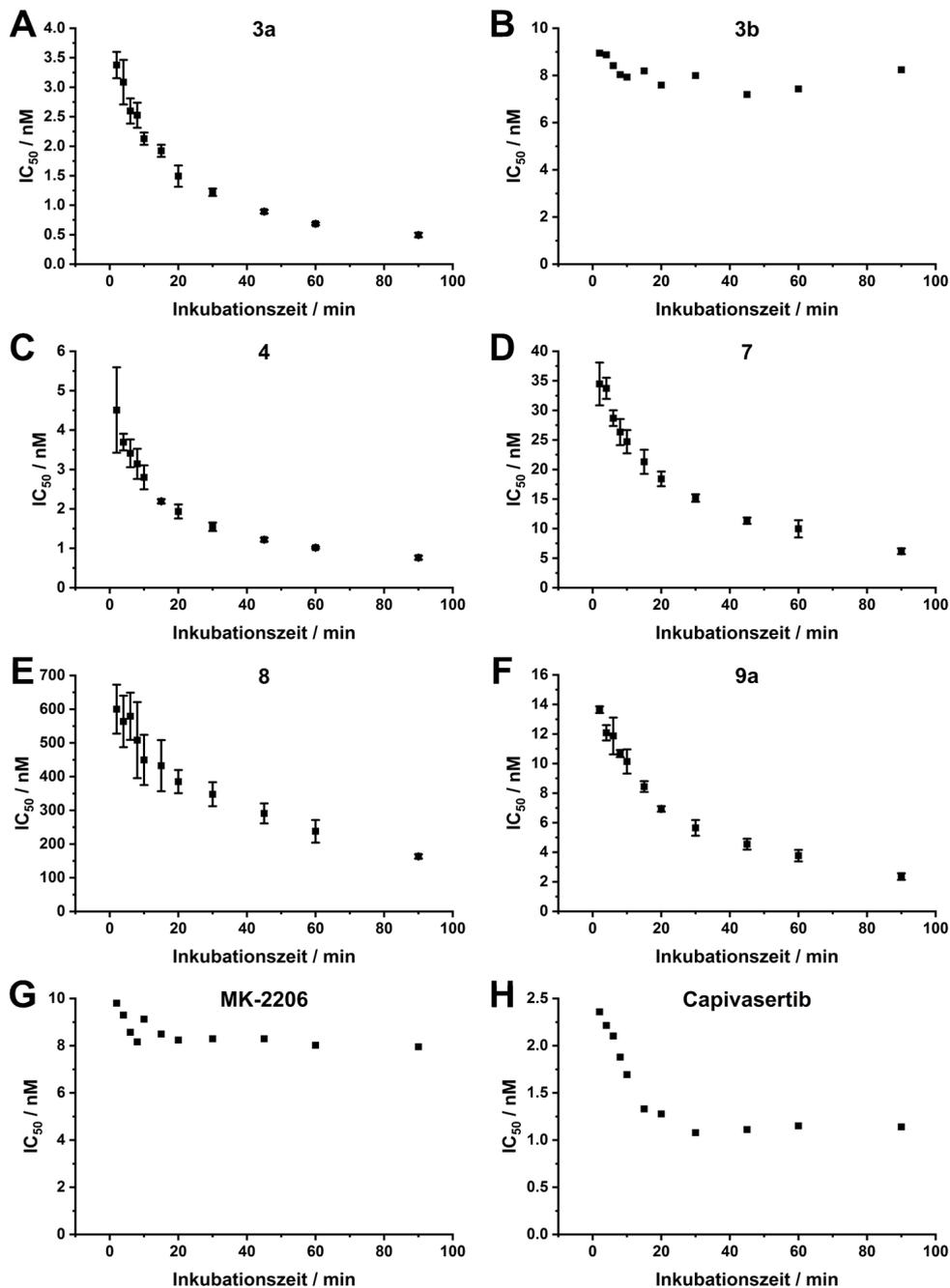
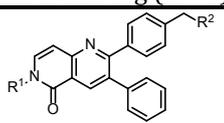
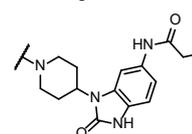
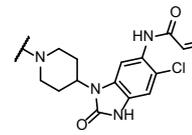
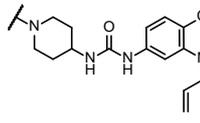
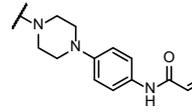
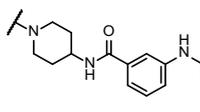


Abbildung 19. Kinetische Evaluierung der Test- und Referenzverbindungen durch zeitaufgelöste IC_{50} -Bestimmung mittels HTRF®-Assay. Die Vorinkubationszeiten der Kinase in Gegenwart der Inhibitoren wurden variiert (2-90 min), während die Reaktions- und Stoppdauer konstant gehalten wurden. Aus diesen Auftragungen wurden die kinetischen Parameter K_i und k_{inact} abgeleitet (Tabelle 3).^[172] Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Messungen (3a, 4, 7, 8, 9a); die reversiblen Inhibitoren 3b, MK-2206, Capiwasertib wurden nur einmal vermessen. Die y-Achsen sind den Bereichen der jeweiligen IC_{50} -Werte entsprechend skaliert.

Tabelle 3. Kinetische Evaluierung der fokussierten Substanzbibliothek. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 3$).

Verbindung	Akt1 ^{wt}				
	R ¹	R ²	K _i / nM	k _{inact} / min ⁻¹	k _{inact} /K _i / $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
3a	H		2.2 \pm 0.3	0.111 \pm 0.020	0.853 \pm 0.038
3b^a	H		3.5 \pm 1.9	0.001 \pm 0.001	0.006 \pm 0.001
4	H		4.1 \pm 0.7	0.110 \pm 0.023	0.447 \pm 0.074
7	H		18 \pm 3.6	0.081 \pm 0.019	0.080 \pm 0.008
8	H		145 \pm 23	0.054 \pm 0.006	0.006 \pm 0.002
9a	H		6.8 \pm 1.3	0.083 \pm 0.016	0.202 \pm 0.035
MK-2206 ^a			4.1 \pm 1.5	0.001 \pm 0.001	0.006 \pm 0.001
Capivasertib ^a			0.9 \pm 0.3	0.020 \pm 0.007	0.365 \pm 0.148

^aEinfachmessung

Die grafischen Auftragungen zeigten einen zeitabhängigen Inhibitionsmechanismus der kovalenten Liganden **3a**, **4**, **7**, **8** und **9a**, wobei die final detektierten IC_{50} -Werte bis zu achtmal niedriger waren als die initial beobachteten halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen.ⁱⁱ Um einen direkten Vergleich mit reversibel-bindenden Liganden zu ermöglichen, wurden die Verbindungen **3b**, MK-2206 und Capivasertib ebenfalls kinetisch vermessen. Für **3b** und MK-2206 war jedoch kein derartiger Trend zu beobachten, was darauf schließen lässt, dass sich ein Reaktionsgleichgewicht bereits nach kurzer Zeit eingestellt hatte.

Lediglich für die ATP-kompetitive Referenzsubstanz Capivasertib konnte ein ähnlicher zeitlicher Inhibitionsverlauf beobachtet werden wie für die kovalenten Liganden. Die detektierte Abnahme des IC_{50} -Werts fiel jedoch deutlich geringer aus (ca. 2.5-fach), wobei aufgrund der fehlenden reaktiven Gruppe sowie der gelösten Komplexkristallstruktur (PDB: 4GV1) ein kovalenter Bindungsmechanismus allerdings ausgeschlossen werden kann. Da die Ergebnisse aus einer Einzelmessung stammen, könnte eine hohe Ungenauigkeit bei den frühen Messzeitpunkten (2-10 min), die auch durch die hohe Standardabweichung bei den kovalenten Verbindungen **4** und **8** illustriert wird, diesen Verlauf erklären. Ein weiterer Grund könnte eine sehr langsame Assoziationsrate sein, wodurch sich ein Reaktionsgleichgewicht erst nach längerer Inkubationszeit einstellte. Die aus diesen zeitabhängigen Messreihen abgeleiteten kinetischen Parameter erlaubten eine exakte Beschreibung und Quantifizierung der kovalenten Inhibitionsprofile (Tabelle 3). Die dabei ermittelten Dissoziationskonstanten lagen im Bereich von 2.2 nM bis 145 nM, während die maximalen Inaktivierungsraten eine geringere Schwankung mit Werten von 0.054 min^{-1} bis 0.111 min^{-1} zeigten. An dieser Stelle sei angemerkt, dass eine Cystein-spezifische Bestimmung der maximalen Inaktivierungsrate nicht möglich war und die hier präsentierten Daten einen Mittelwert über beide Cysteine widerspiegeln. Die Benzimidazol-Derivate **3a** ($K_i = 2.2 \text{ nM}$, $k_{\text{inact}} = 0.111 \text{ min}^{-1}$) und **4** ($K_i = 4.1 \text{ nM}$, $k_{\text{inact}} = 0.111 \text{ min}^{-1}$) wiesen sowohl die höchsten Affinitäten als auch die schnellsten Inaktivierungsraten auf,

ⁱⁱ Die Verbindungen **5** und **6** wurden aufgrund des hohen Kosten- und Zeitaufwands sowie den vergleichsweise schlechten inhibitorischen Potenzen nicht kinetisch charakterisiert.

gefolgt von Benzamid **9a** ($K_i = 6.8 \text{ nM}$, $k_{\text{inact}} = 0.083 \text{ min}^{-1}$), Harnstoff **7** ($K_i = 18 \text{ nM}$, $k_{\text{inact}} = 0.081 \text{ min}^{-1}$) und Phenylpiperazin **8** ($K_i = 145 \text{ nM}$, $k_{\text{inact}} = 0.054 \text{ min}^{-1}$). Der Trend der Verhältnisse k_{inact}/K_i war dementsprechend identisch. Auch für die reversiblen Testverbindungen wurden diese Parameter basierend auf der von KRIPPENDORF *et al.* beschriebenen Methode ermittelt, wobei die jeweilige Inaktivierungsrate k_{inact} ebenfalls anhand der experimentell erhaltenen Daten gefittet wurde. **3b** ($K_i = 3.5 \text{ nM}$, $k_{\text{inact}} = 0.001 \text{ min}^{-1}$) und MK-2206 ($K_i = 4.1 \text{ nM}$, $k_{\text{inact}} = 0.001 \text{ min}^{-1}$) zeigten hierbei ähnliche Werte, Capiwasertib ($K_i = 0.9 \text{ nM}$, $k_{\text{inact}} = 0.02 \text{ min}^{-1}$) wies hingegen eine höhere Affinität (geringeres K_i) sowie eine vermeintlich existente Inaktivierungsrate ($> 0.001 \text{ min}^{-1}$) auf, welche jedoch, wie bereits oben beschrieben, als Artefakt betrachtet werden kann. Unter Voraussetzung einer Inaktivierungsrate von $k_{\text{inact}} = 0.001 \text{ min}^{-1}$ wird jedoch eine nahezu identische Dissoziationskonstante von $K_i = 0.7 \text{ nM}$ erhalten.

Obwohl die verwendete Analysemethode für die Beschreibung von kovalent bindenden Liganden entwickelt wurde, sind die erhaltenen Dissoziationskonstanten vergleichbar mit jenen Ergebnissen, die sich aus den IC_{50} -Werten in Kombination mit der Cheng-Prusoff-Gleichung (siehe Kapitel 1.2.4, Gleichung (1)) ergeben würden. Da die im Assay verwendete Substratkonzentration der Michaelis-Konstante gleichkam, sollte die Dissoziationskonstante K_i gemäß der Cheng-Prusoff-Gleichung der Hälfte des IC_{50} -wertes entsprechen. Dieser Trend konnte sowohl für **3b** ($\text{IC}_{50} = 10 \text{ nM}$, $K_i = 3.5 \text{ nM}$), für MK-2206 ($\text{IC}_{50} = 10 \text{ nM}$, $K_i = 4.1 \text{ nM}$) als auch für Capiwasertib ($\text{IC}_{50} = 0.9 \text{ nM}$, $K_i = 0.9 \text{ nM}$ bzw. 0.7 nM) beobachtet werden. Auf dieser Grundlage wurden die bestimmten K_i -Werte als valide betrachtet.

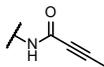
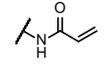
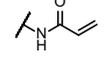
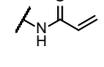
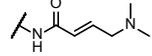
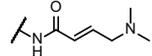
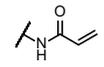
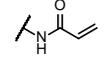
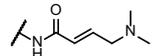
Eine Beurteilung der ermittelten maximalen Inaktivierungsraten k_{inact} sowie ein Vergleich mit Literaturdaten anderer Akt-Inhibitoren war nicht möglich, da die hier beschriebenen Verbindungen erstmalig einen kovalenten Inhibitionsmechanismus gegenüber Akt aufwiesen. Um dennoch eine relative Einschätzung vornehmen zu können, wurden publizierte k_{inact} -Werte von irreversiblen, ATP-kompetitiven BTK- und EGFR-Inhibitoren als Bewertungsgrundlage verwendet (Tabelle 4). Jene Liganden besitzen unterschiedliche *warheads* (Acrylamid, 4-Dimethylaminobut-2-enamid, But-2-inamid) und zeigen eine breite Verteilung der Inaktivierungsraten

von 0.054 min^{-1} (Afatinib, EGFR^{wt}) bis 1.630 min^{-1} (Ibrutinib, BTK^{wt}). Die experimentell bestimmten k_{inact} -Werte der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren (CAAI, *covalent-allosteric Akt inhibitors*) sind somit im unteren (langsamen) Segment anzusiedeln.

Neben Unterschieden in der intrinsischen Reaktivität der elektrophilen C_{β} -Atome der jeweiligen *warheads*, spielen auch die direkte Umgebung des adressierten Cysteins und somit die physikochemischen Eigenschaften der Bindungstasche eine tragende Rolle (vgl. EGFR^{wt} vs. EGFR^{L858R/T790M}), die sich auf die Acidität, also den pK_a -Wert, und die Nukleophilie des Cysteins auswirken können. Im Fall der Proteinkinasen BTK und EGFR befindet sich das jeweils adressierte Cystein am C-terminalen Ende der Scharnierregion (siehe Kapitel 1.2.1) und zugleich am N-Terminus einer α -Helix. Diese Position wird durch das Gesamtdipolmoment der α -Helix, welches sich aus der Alignierung der Carbonylgruppen ergibt, stark polarisiert und resultiert in einer Absenkung des pK_a -Wertes des Cysteins um bis zu zwei pH-Einheiten, was eine gesteigerte Acidität sowie erhöhte Nukleophilie zur Folge hat.^[329-330] Hierdurch könnten die zum Teil deutlich höheren Inaktivierungsraten der kovalenten BTK- und EGFR-Inhibitoren erklärt werden. Des Weiteren kann die Ausrichtung des *warheads* relativ zum Cystein im reversiblen Komplex die Modifikationsgeschwindigkeit stark beeinflussen.

Neben der zu optimierenden Affinität, welche durch positive Wechselwirkungen zwischen Ligand und Enzym die reversible Komplexbildung abbildet, ist demnach auch Optimierungsspielraum hinsichtlich der Bildungsgeschwindigkeit der kovalenten Bindung gegeben. Um diese beiden Parameter, welche schließlich die inhibitorische Potenz einer Substanz definieren, auf atomarer Ebene zu verstehen und damit optimieren zu können, sollte in der Folge durch strukturbiochemische Untersuchungen an Akt1^{wt} mittels Röntgenkristallographie der exakte Bindungsmodus der neuartigen CAAI aufgeklärt werden.

Tabelle 4. Übersicht der maximalen Inaktivierungsraten von Literatur-bekanntem Verbindungen.

Inhibitor	warhead	Target	$k_{\text{inact}} / \text{min}^{-1}$
Acalabrutinib			0.336 ^{[331], a}
Ibrutinib		BTK ^{wt}	1.630 ^[331]
Spebrutinib			0.840 ^[331]
Canertinib			0.174 / 0.660 ^[332]
Afatinib			0.054 / 0.144 ^[332]
Neratinib		EGFR ^{wt} / EGFR ^{L858R/T790M}	0.108 / 0.066 ^[332]
Osimertinib			0.430 / 0.330 ^[333]
Rociletinib			0.180 / 0.290 ^[333]
Nazartinib			0.310 / 0.150 ^[333]

^a Für das Acrylamid-Derivat von Acalabrutinib wurde eine 3.75-fach schnellere Inaktivierungsrate bestimmt.

3.4 Strukturbiologische Untersuchungen an Akt1

3.4.1 Allgemeines

Mithilfe der Röntgenkristallographie kann die dreidimensionale Struktur von kleinen Molekülen wie Penicillin bis hin zu makromolekularen Komplexen wie dem Ribosom auf atomarer Ebene aufgelöst werden, wodurch z. B. Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion eines Proteins aufgeklärt werden können. Neben der möglichen Aufklärung von Substrat- oder Kofaktor-Bindungsmechanismen und damit verbundenen Übergangszuständen eines Proteins, können mittels Röntgenstrukturanalyse auch Wechselwirkungen zwischen Proteinen und exogenen Liganden wie bspw. Inhibitoren untersucht werden, wodurch rationale Designstrategien in der Wirkstoffforschung ermöglicht werden.

Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie, bei der elektromagnetische Strahlung im sichtbaren Bereich, d. h. zwischen 400 und 700 nm, verwendet wird, bedarf es bei Kristallstrukturanalyse einer Strahlung von deutlich kürzerer Wellenlänge, um eine atomare Auflösung zu erreichen. Die Auflösung ist als kleinste Distanz zwischen zwei Strukturen, die als separate Objekte wahrgenommen werden können, definiert und direkt von der Wellenlänge der eingesetzten Strahlung abhängig. So wird bspw. für die Unterscheidung zweier Kohlenstoffatome einer C-C-Einfachbindung mit einer Distanz von 1.54 Å Strahlung mit einer geringeren Wellenlänge benötigt (üblicherweise ca. 1 Å).

Darüber hinaus werden für die Strukturaufklärung von Makromolekülen Kristalle benötigt, da die Beugung von Röntgenstrahlen an einzelnen Molekülen bzw. derer Elektronenhülle (noch) nicht mit ausreichender Sensitivität detektiert werden kann. Kristalle ergeben sich aus der dreidimensionalen, periodischen Anordnung der sogenannten Einheitszelle, die sich wiederum aus der Summe aller möglichen Symmetrieoperationen der asymmetrischen Einheit ergibt.

Die Kristallogeneese stellt häufig den limitierenden Faktor während der Strukturaufklärung dar, da hierfür einerseits sehr reines und homogenes Protein benötigt wird, andererseits spezifische, proteinabhängige Kristallisationsparameter

verwendet werden müssen (Temperatur, Protein- und Fällungsmittelkonzentration, pH-Wert), deren Vorhersage bislang nicht möglich ist und diese somit nur durch experimentelle Untersuchungen identifizierbar sind.

Im Fall einer erfolgreichen Etablierung von Kristallisationsbedingungen kann im Anschluss ein Datensatz aufgenommen werden. Dieser besteht aus einzelnen Diffraktionsbildern, die unter Rotation des Kristalls im monochromatischen Röntgenstrahl detektiert werden und Beugungsmuster von regelmäßig angeordneten Reflexen enthalten. Mithilfe Computergestützter Techniken kann aus den Abständen der Reflexe zueinander sowie deren Intensitäten eine Elektronendichtekarte berechnet werden, welche die Modellierung einer dreidimensionalen Struktur basierend auf der Aminosäuresequenz des kristallisierten Proteins erlaubt.

Die Etablierung eines Kristallisationssystems für Akt1^{xtal} (siehe Kapitel 10.1.1) und die Aufnahme von Datensätzen erfolgte im Rahmen der Masterarbeit von Rebekka Scheinpflug und ist in dieser bereits beschrieben.^[334] Die Strukturlösung, -verfeinerung und -analyse wurde wiederum von Ina Landel durchgeführt und wird in ihrer Dissertation beschrieben sein.

3.4.2 Konstruktdesign und Testexpression

Eine erfolgreiche Kristallisation von Proteinen kann durch deren Design, z. B. durch Einbringung definierter Mutationen zur Erniedrigung der Oberflächenentropie oder durch Exzision von potentiell flexiblen Bereichen, begünstigt werden. So wurden von WU *et al.* (Array BioPharma) und ASHWELL *et al.* (ArQule) in der Vergangenheit bereits zwei Kristallisationskonstrukte für Akt1 beschrieben, die eine Verkürzung des Proteins um das C-terminale hydrophobe Motiv gemein haben.^[201, 302] Darüber hinaus enthält das von ArQule verwendete Proteinkonstrukt drei sequenzielle Mutationen am Übergang von PH-Domäne zu Linkerregion, welche die Substitution eines Triglutamatchusters durch drei Alaninreste mit geringerer konformationeller Entropie bewirken. In beiden Fällen wurde zudem im Verlauf der Proteinreinigung der flexible His₆-Affinitätstag samt Linker durch proteolytische Spaltung entfernt.

Aufgrund der höheren Auflösung der von ASHWELL *et al.* publizierte Kristallstruktur (PDB: 4EJN, 2.2 Å) im Vergleich zur Struktur von Array BioPharma (PDB: 3O96, 2.7 Å) wurde im Rahmen dieser Arbeit ein analoges Konstrukt verwendet. Im Detail enthält dieses Konstrukt die Aminosäuren 2-446 von Akt1, die Entropie-reduzierenden Mutationen E114-116A, sowie einen N-terminalen His₆-Tag gefolgt von einer TEV-Schnittstelle. Im Folgenden wird dieses Konstrukt als (His₆-)Akt1^{xtal} bezeichnet (Abbildung 20).

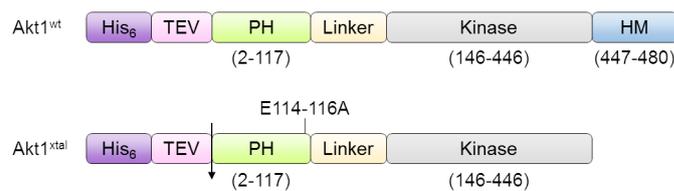


Abbildung 20. Schematische Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Proteinkonstrukte. Akt1^{wt} wurde als Vollängen-Konstrukt ohne Abspaltung des His₆-Tags verwendet, wohingegen Akt1^{xtal} für die Kristallisation die Aminosäuren 2-446 enthält und im Verlauf der Proteinreinigung durch TEV-vermittelte Proteolyse vom His₆-Tag abgespalten wurde (schwarzer Pfeil).

Die Synthese des entsprechenden Gens, welches für die Expression in Insektenzellen Codon-optimiert wurde sowie die nachfolgende Subklonierung in den pIEx/BacTM-3-Vektor (Novagen) mittels *NcoI* und *BamHI* erfolgte durch die Firma GeneArt (Thermo Fisher Scientific). Die Generierung des rekombinanten Baculovirus sowie die erste Amplifikation erfolgten durch die Dortmund Protein Facility (DPF) unter Verwendung des flashBACTM-Systems (Oxford Expression Technology) (siehe Kapitel 8.4.4 und Kapitel 8.4.5). Initiale Testexpressionen mit dem P2-Virus in Sf9- und Hi5-Insektenzellen und anschließende Affinitäts-basierte Bindungsassays bewiesen eine Überexpression des Zielproteins sowie dessen Isolierbarkeit aus der löslichen Fraktion nach Zellaufschluss (siehe Kapitel 10.4, Abbildung 63). Da der Bindungsassay eine höhere Reinheit des Zielproteins nach Expression in Sf9-Insektenzellen zeigte (Abbildung 63B), wurden die Folgeexperimente ausschließlich in dieser Insektenzelllinie durchgeführt. Auf Basis des bereitgestellten P2-Virus wurde durch eine erneute Amplifikation zur Titer-Erhöhung der P3-Virus erhalten, mit welchem eine zeitabhängige Testexpression bei verschiedenen Infektionsverhältnissen (MOI, *multiplicity of infection*) in Sf9-Zellen durchgeführt wurde (Abbildung 22). Hierdurch sollten die optimalen Bedingungen für präparative Expressionen identifiziert werden.

Eine exakte Titerbestimmung des P3-Virus, z. B. mittels Plaqueassay oder quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR),^[335-336] wurde nicht durchgeführt, stattdessen wurde jeweils ein Titer des P3-Virus von 1.0×10^9 infektiöser Viruspartikel (pfu, *plaque-forming units*) pro Milliliter angenommen, welche auf identischen Isolationsbedingungen des Virus (70-80 % Zellviabilität) basierte. Die analytische SDS-PAGE der entsprechenden Zelllysate zeigte keine signifikante Überexpression innerhalb der ersten 48 Stunden unabhängig von der MOI. Hingegen konnte eine deutliche Überexpression nach 72 und 96 Stunden beobachtet werden, wobei keine prägnanten Unterschiede zwischen den getesteten MOI identifiziert werden konnten. Die präparativen Expressionskulturen wurden daher in der Folge mit einer MOI von 10, d. h. mit zehn infektiösen Viruspartikeln pro Insektenzelle, infiziert und nach dreitägiger Inkubation bei 27 °C geerntet.

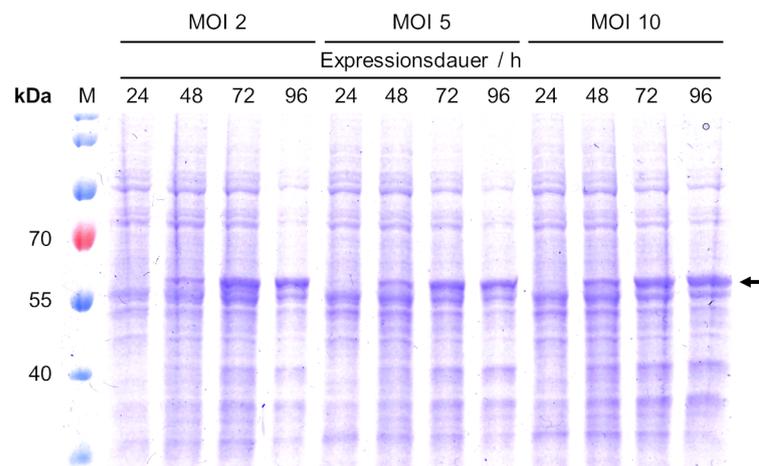


Abbildung 21. Gel der SDS-PAGE nach anschließender CBB-Färbung von Zelllysaten der zeitabhängigen Testexpressionen von His₆-Akt1^{xtal} in Sf9-Insektenzellen. M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder; MOI: *multiplicity of infection*; der schwarze Pfeil verweist auf die relevanten Proteinbanden.

3.4.3 Präparative Expression und Reinigung von Akt1^{xtal}

Mit den zuvor ermittelten experimentellen Bedingungen erfolgten die Proteinexpressionen im präparativen Maßstab, üblicherweise mit Kulturvolumina von drei bis sechs Litern. Da die Reinigung von Akt1^{wt} bereits erfolgreich etabliert worden war, wurde eine ähnliche Reinigungsstrategie für Akt1^{xtal} gewählt, bei der jedoch im letzten Schritt eine Aufteilung der Probe für die Durchführung von zwei separaten Größenausschlusschromatographien unter Verwendung der von Wu *et al.*

bzw. ASHWELL *et al.* beschriebenen SEC-Puffern erfolgen sollte, um im Anschluss die publizierten Kristallisationsbedingungen testen zu können.^[201, 302] In Folge der heterologen Expression und dem Zellaufschluss wurde eine erste Ni-AC zur Isolation des His₆-markierten Zielproteins aus dem Zelllysat durchgeführt (Abbildung 22). Nach Auftragung der Probe auf die Ni²⁺-NTA-Matrix erfolgte ein Waschschriff zur Entfernung von unspezifisch bzw. schwach gebundenen Proteinen sowie die Elution des Zielproteins mit einem linearen Gradienten von 0-100 % des Imidazol-haltigen Ni-Puffer B (Abbildung 22A). Die erhaltenen Fraktionen des Eluatpeaks 1 wurden mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung des resultierenden Gels analysiert und zeigten eine Anreicherung des Zielproteins (MW_{calc} ≈ 55.1 kDa) auf einer Höhe von ca. 55 kDa in jenem Eluatpeak (Abbildung 22B). Auch in der Durchflussfraktion konnte eine Bande auf der erwarteten Höhe des Zielproteins detektiert werden, was für eine mögliche Überladung des Säulenmaterials oder eine zu hohe Flussrate während der Probenauftragung sprechen könnte. Durch Verwendung einer größeren Ni²⁺-NTA-Säule bzw. durch eine langsamere Auftragung konnte ein Verlust des Zielproteins in nachfolgenden Reinigungen jedoch minimiert werden.

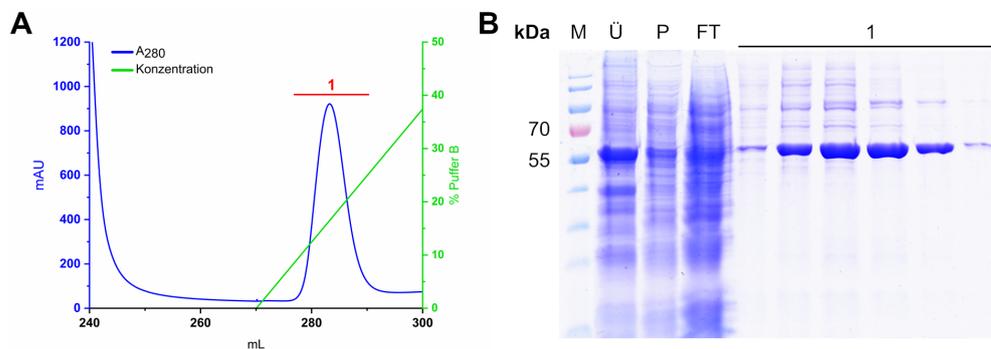


Abbildung 22. A, Chromatogramm der Ni-AC von His₆-Akt1^{xtal}. Blau: Absorption bei 280 nm; grün: Konzentration des Imidazol-haltigen Elutionspuffers. **B**, Analyse der Fraktionen der Ni-AC mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. Ü: löslicher Überstand; P: Pellet; FT: Durchfluss; 1: Eluatpeak; M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

Da die Literatur-bekanntesten Bedingungen die Kristallisation von Akt1 in Abwesenheit des Affinitätstags beschreiben, erfolgte auch bei diesem Reinigungsprotokoll eine TEV-vermittelte proteolytische Spaltung des His₆-Tags während die vereinigten Fraktionen des Eluatpeaks über Nacht gegen AEC-Puffer A dialysiert wurden. Vor der Durchführung der Anionenaustauschchromatographie wurde das Dialysat von TEV-Protease, ungeschnittenem His₆-Akt1^{xtal} sowie

geschnittenem His₆-Tag durch erneute Auftragung auf eine Ni²⁺-NTA-Säule befreit (Abbildung 23), wobei das geschnittene Zielprotein Akt1^{xtal} die Säulenmatrix passieren konnte. Die SDS-PAGE zeigte eine hohe Reinheit des geschnittenen Akt1^{xtal}-Proteins (MW_{calc} ≈ 51670 Da) in Durchflusspeak 1, wohingegen die Verunreinigungen aus der ersten Ni-AC sowie die His₆-markierte TEV-Protease in den Eluatfraktionen 2 und 3 enthalten waren. Zudem war in jenen Eluatfraktionen eine prominente Bande auf Höhe von ca. 55 kDa zu erkennen, was auf eine unvollständige TEV-vermittelte Spaltung des His₆-Tags hindeutet. Durch die Verwendung größerer Mengen TEV-Protease konnte dieses Problem jedoch in folgenden Reinigungen umgangen werden. Eine Unterscheidung der geschnittenen und ungeschnittenen Spezies ist anhand des gefärbten Polyacrylamid-Gels nicht möglich gewesen, wobei die Proteinreinigung mit der Durchflussfraktion der zweiten Ni-AC dennoch fortgeführt wurde.

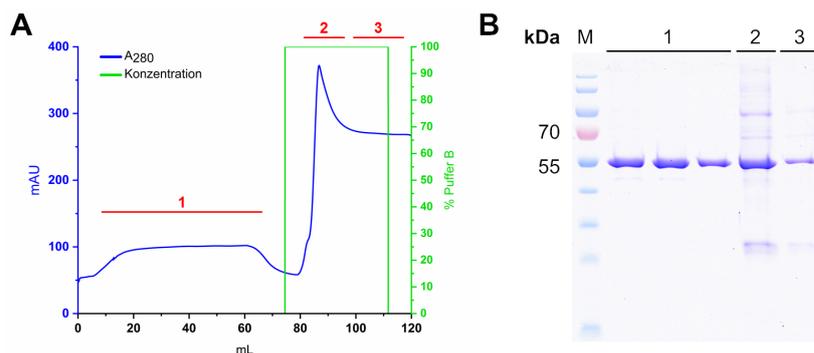


Abbildung 23. **A**, Chromatogramm der zweiten Ni-AC von Akt1^{xtal} nach TEV-vermittelter Abspaltung des His₆-Tags. Blau: Absorption bei 280 nm; grün: Konzentration des Imidazol-haltigen Elutionspuffers. **B**, Analyse der Fraktionen der zweiten Ni-AC mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. 1: Durchfluss; 2-3: Eluatfraktionen; M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

Trotz der bereits erzielten hohen Reinheit wurde das bereits in AEC-Puffer A vorliegende Zielprotein, also der Durchfluss der zweiten Ni-AC, auf eine Anionenaustauschchromatographie-Säule geladen, um den für die Kristallisation benötigten Reinheitsgrad zu gewährleisten. Die Elution erfolgte durch lineare Steigerung der Konzentration des NaCl-haltigen AEC-Puffers B, wobei das Chromatogramm vier schlecht aufgelöste Signalpeaks zeigte, deren Signalintensität mit steigender NaCl-Konzentration zunahm (Abbildung 24A). Die zugehörigen Fraktionen wurden erneut mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung analysiert, wodurch

die Anwesenheit des Zielproteins in allen getesteten Fraktionen nachgewiesen werden konnten. Zudem zeigte das CBB-gefärbte Gel der SDS-PAGE Banden ober- und unterhalb der Zielproteinbande in den Eluatpeaks 2-4, welche jedoch von deutlich schwächerer Intensität waren (Abbildung 24B). Da eine Unterscheidung der Zielproteinspezies der jeweiligen Eluatpeaks anhand der SDS-PAGE nicht möglich war, wurden die Proben mittels ESI-Massenspektrometrie analysiert. Die dekonvolvierten Massenspektren korrelierten mit dem theoretischen Molekulargewicht von Akt1^{xtal} ($MW_{\text{calc}} \approx 51670$ Da), unterschieden sich jedoch um jeweils ca. 80 Da zueinander (Abbildung 24C), was für die zusätzliche Einbringung von je einer Phosphatgruppe spricht.

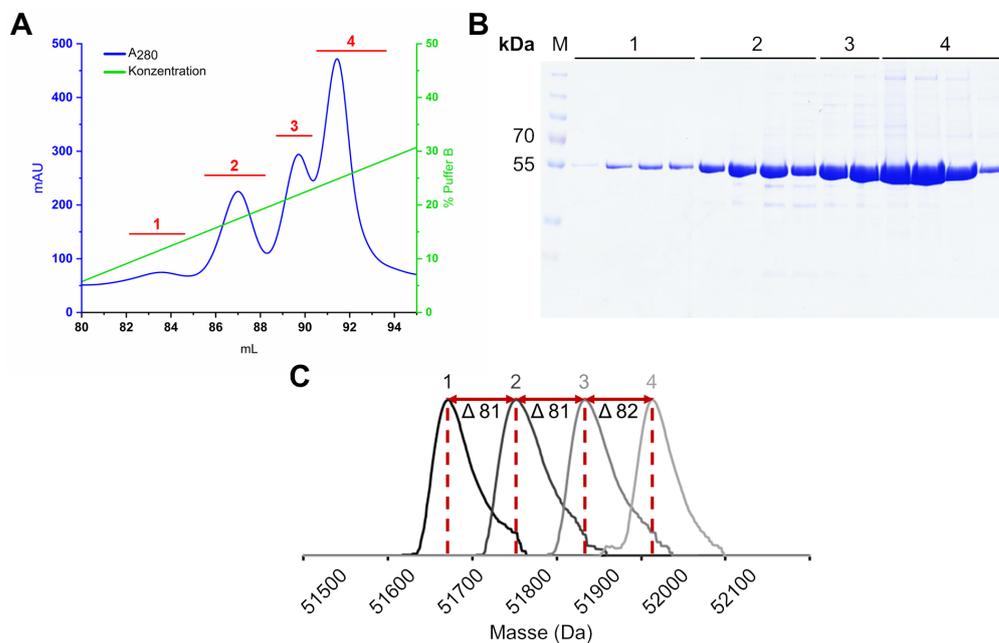


Abbildung 24. **A**, Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie von Akt1^{xtal}. Blau: Absorption bei 280 nm; grün: Konzentration des NaCl-haltigen AEC-Puffer. **B**, Analyse der Fraktionen der AEC mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. 1-4: Eluatpeaks; M: Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder. **C**, Überlagerung der dekonvolvierten, normalisierten Massenspektren der Eluatpeaks 1-4. Die detektierten Massen betragen 51671 Da (Peak 1), 51752 Da (Peak 2), 51833 Da (Peak 3) und 51913 Da.

Das in Peak 4 enthaltene Akt1^{xtal} liegt somit insgesamt dreifach phosphoryliert vor, was allerdings nicht bedeuten muss, dass ein einheitliches Phosphorylierungsmuster innerhalb dieser Proteinspezies vorhanden ist. Im Rahmen der MS/MS-Analytik (siehe Kapitel 3.2) wurden die Proben von Akt1^{wt} auch qualitativ hinsichtlich der Anwesenheit von Phosphorylierungen untersucht. Hierbei konnten Ser124, Ser129, Ser422, Thr450 und Ser475 mit hoher Wahrscheinlichkeit als phosphorylierte Aminosäuren identifiziert werden. Da Akt1^{xtal} die Reste 2-446 umfasst und somit Thr450 und Ser475 nicht als Phosphorylierungsstellen in Frage kommen, bleiben Ser124, Ser129 und Ser422 als potentielle Phosphat-tragende Aminosäuren. Weitere Literatur-bekannt Phosphorylierungsstellen sind zudem Thr146 am N-terminalen Bereich der Kinasedomäne sowie Thr160 innerhalb der Glycin-reichen Schleife.^[222]

Da die Proteinausbeute der einzelnen Peaks für die separate Reinigung nicht ausgereicht hätte, wurden die Fraktionen der Peaks 1-4 vereinigt und für die anschließende SEC im Zentrifugalkonzentrator auf ca. 2 mL eingengt. In diesem vorletzten Schritt sollten Proteinaggregate ebenso wie Oligomere abgetrennt werden, um eine möglichst reine, homogene und monodisperse Lösung des Zielproteins zu erhalten. Das resultierende Chromatogramm zeigte einen symmetrischen Hauptpeak mit einer flachen Schulter im Bereich kleinerer Retentionszeiten, welche somit höhermolekularen Strukturen zuzuordnen ist (Abbildung 25A).

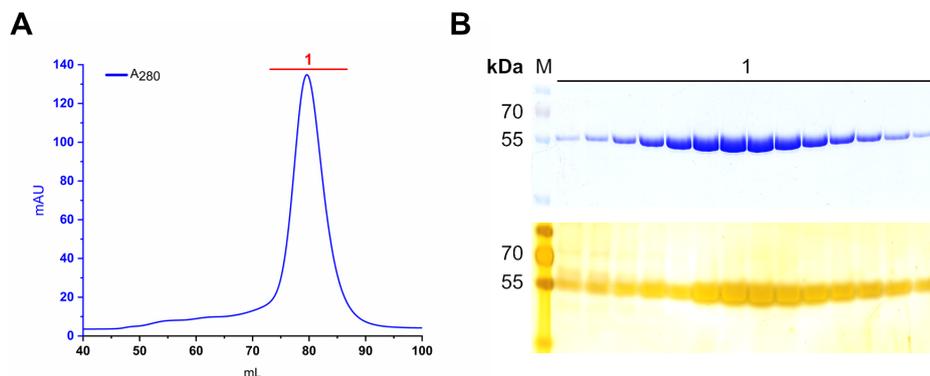


Abbildung 25. **A**, Chromatogramm der ersten SEC von Akt1^{xtal}. Blau: Absorption bei 280 nm. **B**, Analyse der Fraktionen der SEC mittels SDS-PAGE und CBB- (oben) sowie Silberfärbung (unten). 1: Eluatpeak; M: Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

Um die Reinheit der Proteinlösung final zu überprüfen, wurde neben der CBB- auch eine Silberfärbung (SilverXpress™ Silver Staining Kit, Thermo Fisher Scientific) des Gels der SDS-PAGE durchgeführt, welche mit einem Detektionslimit von ca. 5-10 ng Protein eine deutlich höhere Sensitivität im Vergleich zur CBB-Färbung aufweist (Abbildung 25B).^[337] Während das CBB-gefärbte Gel eine einzelne Bande pro Bahn auf der zu erwartenden Höhe zeigte, konnten anhand der Silberfärbung noch höhermolekulare Verunreinigungen in den ersten zwei Fraktionen des Eluatpeaks ausgemacht werden, was mit einer früheren Elutionszeit korreliert. Die reinsten Fraktionen wurden vereinigt, im Zentrifugalkonzentrator auf ca. 10 mg/mL eingengt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Mithilfe der gewählten Proteinreinigungsstrategie konnte über vier separate Chromatographie-Schritte hinweg hochreines Zielprotein isoliert werden. Die Ausbeute betrug lediglich 0.5 mg Akt1^{xtal} pro Liter Expressionskultur. Einerseits geht mit jeder durchgeführten Chromatographie ein Verlust einher, so dass die vergleichsweise geringe Ausbeute nachvollziehbar ist. Andererseits konnten wie beschrieben im Verlauf der Reinigung Problematiken identifiziert werden (Zielprotein im Durchfluss der ersten Ni-AC; unvollständige proteolytische Spaltung), deren Behebung zu einer Maximierung der Proteinausbeute führte, so dass im optimalen Fall bis zu 1.2 mg Protein pro Liter Expressionskultur erhalten werden konnten.

Um die Literatur-bekanntesten Kristallisationsbedingungen optimal reproduzieren zu können, wurde das gereinigte Akt1^{xtal} in separaten Ansätzen mittels analytischer SEC in die entsprechenden Lagerpuffer überführt. Im Fall von Wu *et al.* bestand dieser Lagerpuffer aus 25 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol und 5 mM DTT;^[201] ASHWELL *et al.* wiederum hatten einen Lagerpuffer bestehend aus 25 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl und 10 % (v/v) Glycerol verwendet.^[302] Trotz der nur geringen Unterschiede sollte ein möglicher negativer Einfluss des Lagerpuffers auf die Kristallisation ausgeschlossen werden. Da die Chromatogramme beider Gelfiltrationschromatographien exakt kongruent waren, ist in Abbildung 26 repräsentativ jenes Chromatogramm der SEC für die Bedingungen nach Wu *et al.* dargestellt. Eine Analyse der Probenreinheit mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung

wurde nicht mehr durchgeführt, da diese zuvor mittels Silberfärbung bereits validiert wurde (Abbildung 25). In beiden Fällen wurde je ein symmetrischer Eluatpeak mit einer kleinen Schulter bei geringerer Elutionszeit erhalten. Für die nachfolgenden Kristallisationsansätze wurden ausschließlich die Fraktionen des Eluatpeaks 1 verwendet.

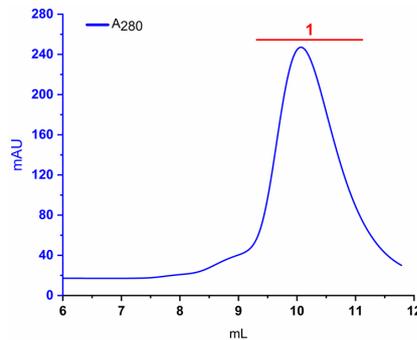


Abbildung 26. Chromatogramm der zweiten SEC von Akt1^{xtal} für den finalen Pufferwechsel. Blau: Absorption bei 280 nm. 1: Eluatpeak.

3.4.4 Kristallisation von Akt1^{xtal}

Mit dem gereinigten und in den unterschiedlichen Puffern vorliegenden Akt1^{xtal} wurden in der Folge initiale Kristallisationsexperimente angesetzt, welche die publizierten Bedingungen reproduzieren sollten (Tabelle 5), wobei das Protein in Konzentrationen von 1, 3 und 5 mg/mL eingesetzt wurde.ⁱⁱⁱ Anstelle der kokristallisierten Liganden Akti-1/2 bzw. **1** wurde Verbindung **3a** als vielversprechendster Ligand mit der höchsten Affinität für Akt1 ($K_i = 2.2$ nM, Tabelle 3) für die Kristallisationsansätze mit Akt1^{xtal} ausgewählt. Nach einstündiger Inkubation bei 4 °C und anschließender Zentrifugation wurde der klare Überstand für die Kristallisation verwendet. Die vollständige kovalente Modifikation von Akt1^{xtal} durch Verbindung **3a** wurde massenspektrometrisch validiert. Um die bekannten Bedingungen über einen breiteren Bereich abzudecken, wurden jeweils drei pH-Werte sowie fünf Fällungsmittelkonzentrationen für die Kristallisation getestet. Für die Bedingung nach WU *et al.* entsprach dies pH-Werten des

ⁱⁱⁱ Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente wurden im Rahmen der Masterarbeit von Rebekka Scheinpflug durchgeführt.

Acetat/Citrat-Puffers von 5.2, 6.5 und 7.5 sowie Fällungsmittelkonzentrationen von 5, 10, 15, 21 und 25 % (w/v) PEG MME 2000.^[201] Die Bedingung nach ASHWELL *et al.* wurde mit pH-Werten des Tris-Puffers von 7.0, 7.5 und 8.0 sowie Ethylenglycol-Konzentrationen von 5, 10, 15, 20 und 25 % (v/v) variiert.^[302] Zusätzlich wurden die Kristallisationsansätze jeweils bei 4 °C und 20 °C durchgeführt, so dass in diesem initialen Schritt eine Vielzahl von Bedingungen ähnlich zu den bereits bekannten simultan getestet wurden.

Tabelle 5. Übersicht der Literatur-bekanntesten Kristallisationsbedingungen für Akt1.

	Wu <i>et al.</i> (PDB: 3O96)^[201]	ASHWELL <i>et al.</i> (PDB: 4EJN)^[302]
Puffer	12.5 mM Na-Acetat, 37.5 mM Na-Citrat, pH 5.2	50 mM Tris/HCl pH 7.5
Fällungsmittel	21 % (w/v) PEG MME 2000	15 % (v/v) Ethylenglycol, 16 % (v/v) 1-Butanol,
Additive	-	10 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0.1 % (v/v) β-ME
Temperatur	20 °C	4 °C
Protein	4.7 mg/mL Akt1(2-443)	Akt1(2-446_E114-116A)
Ligand	250 μM Akti-1/2	1

PEG MME 2000: Polyethylenglycol-Monomethylether 2000; β-ME: β-Mercaptoethanol.

Die Kristallisation erfolgte in 15-*well* Platten nach der Methode des hängenden Tropfens durch Dampfdiffusion. Die Kavitäten wurden mit je 500 μL Reservoirlösung befüllt und die Tropfen wiederum wurden aus je 1 μL Reservoirlösung sowie je 1 μL der Protein-Inhibitor-Lösung angesetzt. Die verschlossenen Platten wurden bei den genannten Temperaturen inkubiert und regelmäßig auf Kristallwachstum überprüft. Für die Bedingung nach ASHWELL *et al.* konnte nach 28 Tagen kein Wachstum von Kristallen beobachtet werden, während unter den Bedingungen von WU *et al.* bereits nach einem Tag Inkubationszeit kleine Kristalle in einer Vielzahl von Kavitäten sowohl bei 4 °C als auch bei 20 °C beobachtet werden konnten. Im weiteren Verlauf stellte sich heraus, dass die reale Konzentration des verwendeten Acetat/Citrat-Puffers lediglich 5 mM (1.25 mM Na-Acetat/3.75 mM Na-Citrat) statt 50 mM (12.5 mM Na-Acetat/37.5 mM Na-Citrat) betrug. Somit konnten durch einen glücklichen Zufall neue Bedingungen für die

Kristallisation von Akt1 identifiziert werden. Spätere Ansätze unter Verwendung der ursprünglichen Pufferkonzentration von 50 mM Na-Acetat/Na-Citrat (pH 5.2-7.5) führten ebenfalls zu keinem Kristallwachstum.

Die neu identifizierten Bedingungen ermöglichten ein Kristallwachstum ab einer PEG MME 2000-Konzentration von 10 % (w/v) sowohl bei 4 °C als auch bei 20 °C. Zudem war eine deutliche Präferenz für höhere pH-Werte (pH 6.5 bis 7.5) zu erkennen. Bei 4 °C wuchsen über einen längeren Zeitraum deutlich kleinere Proteinkristalle im Vergleich zu jenen bei 20 °C und zeigten darüber hinaus eine Form von Instabilität, da sie sich nach ca. 8-10 Tagen wieder auflösten, während bei einer Temperatur von 20 °C die Proteinkristalle schneller wuchsen und zudem stabiler waren. Unterschiede in der Diffraktionsqualität der jeweiligen Kristalle konnten nicht beobachtet werden. Ab einer Konzentrationen von 5 mg/mL tendierte das Protein zu präzipitieren, wohingegen bei 1 mg/mL nur selten Kristallwachstum beobachtet wurde. Daraus ergaben sich die folgenden Parameter, die für die weiteren Kristallisationsansätze verwendet wurden und eine erfolgreiche Ko-Kristallisation von Akt1^{xtal} im Komplex mit den Testverbindungen **3a**, **7**, **8** und **9a** ermöglichte (Abbildung 27):^{iv} 5 mM Acetat/Citrat-Puffer (1.25 mM Na-Acetat/3.75 mM Na-Citrat) pH 6.5-7.5, 15-25 % (w/v) PEG MME 2000, 20 °C, 3 mg/mL Akt1^{xtal}.

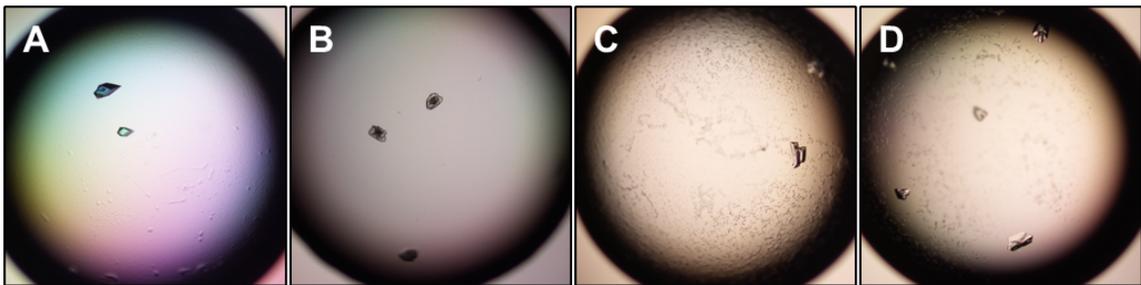


Abbildung 27. Proteinkristalle von Akt1^{xtal} im Komplex mit Verbindung **3a** (A), **7** (B), **8** (C) und **9** (D).

^{iv} Die Verbindungen **3a**, **8** und **9** wurden von Rebekka Scheinflug ko-kristallisiert; Verbindung **7** wurde von Ina Landel erfolgreich ko-kristallisiert.

Von den zum Teil stark verwachsenen Kristallen konnten für die genannten Verbindungen erfolgreich Datensätze an der *Swiss Light Source* (SLS) des Paul Scherrer Instituts (Villigen, Schweiz) aufgenommen werden, die die Lösung der Komplexkristallstrukturen mit Auflösungen zwischen 2.3 und 2.7 Å ermöglichten.^v Die Proteinkomplexe kristallisierten in einer orthorhombischen Einheitszelle ($a \neq b \neq c$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), welche je ein Proteinmolekül mit der Raumgruppe $P2_12_12_1$ enthielt. Die vollständigen Datenstatistiken sind in den Referenzen [318] und [346] zusammengefasst.

3.4.5 Analyse des Bindungsmodus

Die gelösten Komplexkristallstrukturen (Abbildung 28, Abbildung 64 bis Abbildung 66) ermöglichten einen detaillierten Einblick in den Bindungsmechanismus der kovalent-allosterischen Liganden und sollten damit zur Aufstellung einer SAR unter Zuhilfenahme der erhobenen biochemischen und kinetischen Daten beitragen.

Die Kristallstrukturen zeigen eine fast vollständige Auflösung des verwendeten Proteinkonstrukts, wobei lediglich die Aminosäureregionen 42-51 (PH-Domäne), 113-145 (Linkerregion), 185-205 (α B- und α C-Helix) sowie Bereiche der Aktivierungsschleife (297-312) und des C-Terminus (439-446) nicht oder nur teilweise aufgelöst sind. Alle Inhibitoren binden wie erwartet in die allosterische Tasche, die in der kompakten, geschlossenen Konformation von Akt1 an der Grenzfläche zwischen PH- und Kinasedomäne gebildet wird. Somit stabilisieren sie einen inaktiven Zustand von Akt1, in welchem das aktive Zentrum nicht ausgebildet werden kann. Die α B- und α C-Helices innerhalb der N-terminalen Subdomäne liegen dementsprechend ungeordnet vor und sind nicht aufgelöst. Die Aktivierungsschleife mit ihrem indikativen DFG-Motiv ist ebenfalls nur teilweise aufgelöst, da sie durch die gebundenen Liganden in Richtung der ATP-Bindungstasche gedrückt wird und dadurch ungeordnet und flexibel vorliegt. Das Protein liegt in allen

^v Die Strukturlösung und -verfeinerung wurde von Ina Landel durchgeführt.

Kristallstrukturen im DFG-out-Zustand vor. Obwohl der *A-loop* aufgrund seiner hohen Flexibilität generell nur schlecht aufgelöst ist, scheint die Ausbildung einer kovalenten Bindung die Ausrichtung des jeweils modifizierten Cysteins ausreichend zu stabilisieren, so dass die Elektronendichte um die jeweiligen Cysteine an den Positionen 296 bzw. 310 in allen Strukturen aufgelöst ist. Hierbei fällt auf, dass die Verbindungen **3a**, **8** und **9a** eine Bindung zum Cys296 ausbilden, Verbindung **7** hingegen eine Modifikation des Cys310 bewirkt, welche im ursprünglich durchgeführten Struktur-basierten Design vernachlässigt wurde. Diverse überlappende Interaktionen zwischen Ligand und Protein sind in allen vier Kristallstrukturen zu erkennen. Hierzu zählen einerseits die π - π -Interaktion zwischen dem Naphthyridinon-Grundgerüst des Liganden und der Indolseitenkette von Trp80, welche das *scaffold* des Moleküls im Protein ausrichtet. Zudem werden hydrophobe Kontakte von Leu210, Leu264 und Ile290 zum Phenylring des Liganden in 3-Position und aromatische Interaktionen zwischen Tyr272 und beiden Phenylringen des Inhibitors gebildet. Des Weiteren bestehen hydrophobe Kontakte von Val270 zum nordwestlichen Molekülteil des Liganden im Bereich der 1-, 6- und 7-Position des *scaffolds*. Das basische, tertiäre Amin der Piperidin- bzw. Piperazin-Einheit befindet sich zudem in räumlicher Nähe der sauren Seitenkette von Asp292 des DFG-Motivs. Auch wenn an dieser Stelle keine direkte Interaktion zu erkennen ist, ist ein positiver Beitrag der räumlichen Nähe der entgegengesetzten Ladungen zur Protein-Ligand-Komplexbildung wahrscheinlich.

Verbindung **3a** weist neben den o. g. Interaktionen, die alle Liganden gemein haben, hydrophobe Kontakte der Benzimidazolgruppe zur Seitenkette von Ile84 innerhalb der PH-Domäne auf (Abbildung 28B, C). Des Weiteren sorgt die NH-Gruppe von Glu85 im Proteinrückgrat durch Ausbildung einer H-Brücke zum Carbonyl-Sauerstoff der Acrylamid-Einheit vermutlich für eine Präorganisation des reaktiven *warhead* zur nukleophilen Seitenkette von Cys296, wodurch eine Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen diesen beiden Gruppen begünstigt wird. Aufgrund der vergleichsweise geringen Auflösung von 2.9 Å war der Einbau von Wassermolekülen in die Elektronendichte nur unzureichend möglich, wobei jedoch ein Wassermolekül, welches am H-Brücken-Netzwerk zwischen Benzimidazol-Stickstoff, Glu17, Arg273 und Tyr326 beteiligt ist, der Elektronendichte eindeutig zugeordnet werden konnte.

Verbindung **7** wies als einzige eine kovalente Bindung zu Cys310 auf (Abbildung 28D, E, Abbildung 64), was bereits durch die Ergebnisse der Tandem-Massenspektrometrie-Analysen vorhergesagt wurde. Eine Bindung zu Cys296, welches im Rahmen der MS/MS-Analytik ebenfalls im modifizierten Zustand detektiert wurde, konnte anhand der Elektronendichte nicht beobachtet werden. Ein Großteil der Wassermoleküle, welche aufgrund der hohen Auflösung von 2.3 Å in die Elektronendichte eingebaut werden konnten, vermittelten Wasserstoffbrücken-Netzwerke zwischen PH- und Kinasedomäne. Zudem wurden H-Brücken-mediierte Interaktionen zwischen dem Stickstoffatom in 6-Position des Grundgerüsts und den Seitenketten von Ser205 und Lys268 sowie zwischen dem tertiären Amin des Piperidinrings und den Carbonyl-Sauerstoffatomen im Proteinerückgrat der Aminosäuren Val271 und Tyr272 ausgebildet. Anstelle von Glu85, welches in dieser Kristallstruktur Interaktionen zu einem Wassermolekül zeigt, fungiert in diesem Fall der Carbonyl-Sauerstoff von Glu17 im Proteinerückgrat als mutmaßlicher Präorganisator des Michael-Akzeptors durch Ausbildung einer H-Brücke zur NH-Gruppe des Acrylamid-*warheads*, wodurch wiederum eine kovalente Bindungsbildung zu Cys310 ermöglicht wird. Die Thiol-Seitenkette von Cys296 ist ebenfalls aufgelöst und befindet sich in räumlicher Nähe zum Harnstoff-Linker des Liganden (3.3 Å), welcher im Vergleich zum zyklischen Harnstoff-Derivat (Imidazolon) von Verbindung **3a** um fast 180° rotiert vorliegt. Trotz der rotatorischen Freiheit des Phenylrings erscheint eine Modifikation der Seitenkette von Cys296 in dieser Konformation als wenig favorisiert.

A

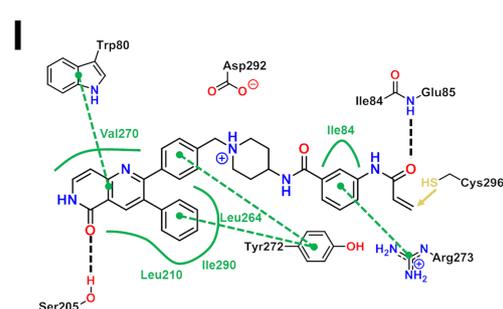
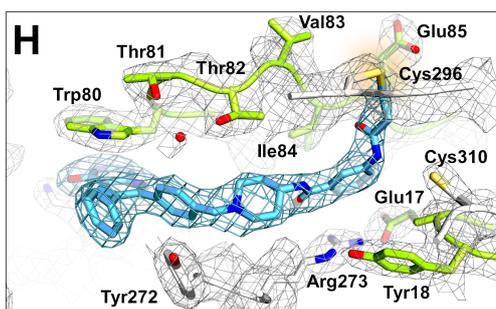
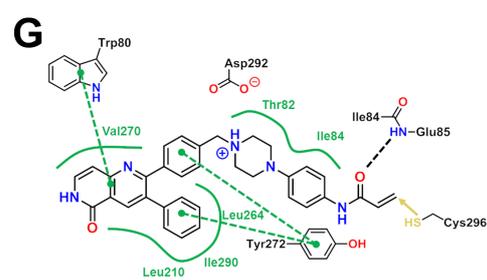
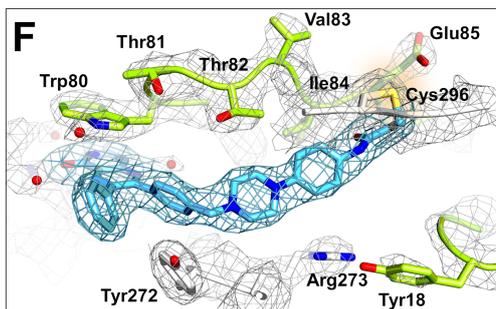
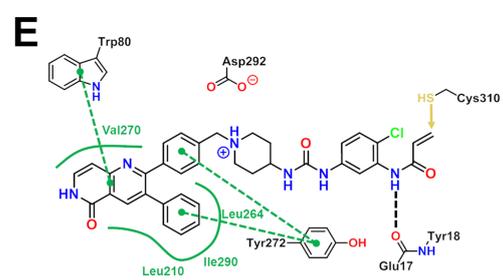
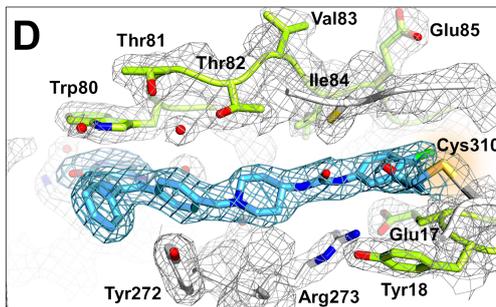
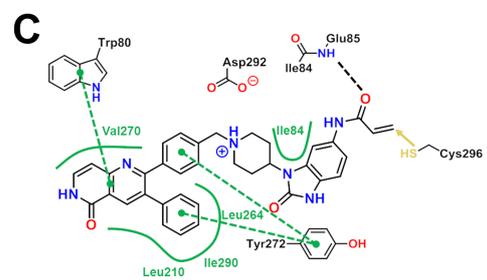
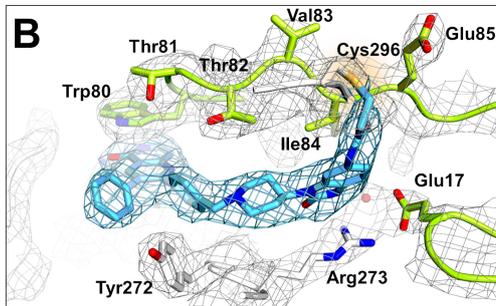
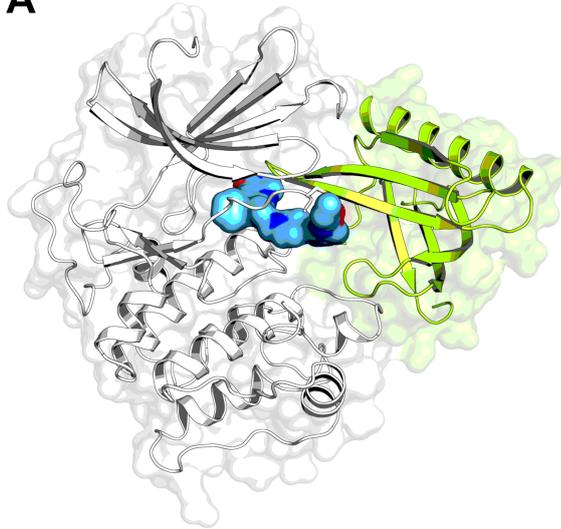


Abbildung 28. Röntgenkristallstrukturen von Akt1^{x_{tal}} im Komplex mit Verbindung **3a** (**A-C**; PDB: 6HHF; Auflösung 2.9 Å), Verbindung **7** (**D-E**; PDB: 6HHG; Auflösung 2.3 Å), Verbindung **8** (**F-G**; PDB: 6HHH; Auflösung 2.7 Å) und Verbindung **9a** (**H-I**; PDB: 6HHI; Auflösung 2.7 Å). **A, 3a** (hellblau) bindet in der allosterischen Tasche zwischen PH-Domäne (grün) und Kinasedomäne (weiß) unter Ausbildung einer kovalenten Bindung zu Cys296. **B/D/F/H**, Detailansichten der Inhibitoren in der allosterischen Tasche. Die Elektronendichten (2Fo-Fc) der Liganden (blaues Netz) und der umliegenden Aminosäuren (graues Netz) ist bei 1 σ konturiert. Die aufgelöste Elektronendichte am gelb unterlegten Cys296 (**B/F/H**) bzw. Cys310 (**D**) verdeutlicht die ausgebildete kovalente Bindung. **C/E/G/I**, Die 2D-Liganden-Interaktions-Diagramme (generiert mit Poseview^[338]) illustrieren schematisch die wichtigsten Interaktionen zwischen den Liganden und dem Protein. Grüne gestrichelte Linien: aromatische Interaktionen; grüne durchgezogene Linien: hydrophobe Kontakte; schwarze gestrichelte Linien: H-Brücken.

Für Verbindung **8** wurde erneut eine kovalente Modifikation von Cys296 detektiert, wobei der rigide Phenylpiperazin-Linker durch hydrophobe Kontakte zu den Seitenketten von Thr82 und Ile84 orientiert wird (Abbildung 28F, G, Abbildung 65). Eine Stabilisierung des *scaffold* erfolgte zudem durch Wasser-vermittelte H-Brücken der Amid-Gruppe des *scaffold* und Ser205 (Seitenkette und Carbonyl-Sauerstoff im Rückgrat) sowie der Seitenkette von Lys268. Wie bereits in der Komplexstruktur mit Verbindung **3a** beobachtet, wird auch bei Ligand **8** der *warhead* durch Interaktion der NH-Gruppe von Glu85 mit dem Carbonyl-Sauerstoff des Acrylamids wahrscheinlich vororientiert, was eine Bindungsausbildung zu Cys296 potentiell erleichtert. Auffällig ist hierbei die geänderte Ausrichtung des terminalen C β -Atoms der ursprünglichen Acrylamidgruppe gegenüber der NH-Gruppe. Diese stehen sich in einer *cis*-artigen Konformation ($E = 48.339$ kcal/mol, Abbildung 67) gegenüber, welche im Vergleich zur sonst zu beobachteten *trans*-Konformation ($E = 47.886$ kcal/mol, Abbildung 67) energetisch weniger bevorzugt ist. Diese ungünstige Orientierung des *warhead*, welche jedoch für die Bildung einer kovalenten Bindung nötig ist, könnte möglicherweise das schlechtere biochemische und kinetische Profil von **8** und insbesondere die geringere Inaktivierungsrate ($k_{\text{inact}} = 0.054 \text{ min}^{-1}$, Tabelle 3) begründen.

Für Testsubstanz **9a** wurde eine direkte H-Brücke zwischen dem Carbonyl-Sauerstoff des Grundgerüsts und der Seitenkette von Ser205 detektiert, welche die Naphthyridinon-Einheit in der Bindungstasche stabilisiert (Abbildung 28H, I, Abbildung 66). Ebenso konnten hydrophobe Kontakte zwischen der Seitenkette von Ile84 und dem Phenyl-Linker im östlichen Molekülteil beobachtet werden. Wasser-vermittelte H-Brücken konnten u. a. aufgrund der Auflösung von 2.7 Å und nur

wenigen eingebauten Wassermolekülen nicht ausgemacht werden. Die zuvor schon beobachtete Vororientierung des *warhead* durch Ausbildung einer H-Brücke zwischen Glu85 und Amid-NH des Michael-Akzeptor-Systems konnte hier ebenfalls beobachtet werden und erlaubte dadurch potentiell die kovalente Modifikation von Cys296. Entgegen der identifizierten Modifikation von Cys310 durch Verbindung **9a** im Rahmen der Tandem-MS-Analysen, war in der Kristallstruktur keine zusätzlich Elektronendichte an diesem Cystein vorhanden.

Trotz der insbesondere im Bereich des östlichen Molekülteils zum Teil unterschiedlichen Interaktionsmuster, wiesen die Bindungsposen aufgrund der Naphthyridinon-Grundgerüst-vermittelten Ausrichtung der Liganden eine hohe Deckungsgleichheit auf (Abbildung 29). Die Orientierung des Phenylpiperazin-Linkers von Verbindung **8** zeigt jedoch deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Verbindungen **3a**, **7** und **9a**, die wahrscheinlich durch eine höhere Rigidität zustande kommen und eine kovalente Adressierung erschweren. Ebenfalls könnte die geringere Basizität des Piperazinringes im Vergleich zur Piperidineinheit, welche möglicherweise in einer verminderten attraktiven Wechselwirkung mit der sauren Seitenkette von Asp292 resultiert, die Bindungaffinität negativ beeinflussen. Auch wenn für die Verbindungen **5** und **6** keine Komplexkristallstrukturen gelöst werden konnten, verdeutlichen die biochemischen und kinetischen Daten im Zusammenspiel mit den erfolgreich gelösten Kristallstrukturen, dass der Linker, welcher den reaktiven *warhead* mit dem aromatischen Grundgerüst verknüpft, weder zu lang und flexibel (**5** und **6**) noch zu kurz und rigide (**8**) sein sollte, da dies zu Einbußen der reversiblen Affinität führt und eine weniger favorisierte Ausrichtung des Michael-Akzeptors zu einem der Cysteine bewirken könnte. Verbindungen **3a**, **4**, **7** und **9a** enthalten linear- oder zyklisch-verknüpfte Amid- bzw. Harnstoff-Linker, die durch ihre eingeschränkte Flexibilität in Kombination mit einer ausreichenden Länge eine affine Ligandenbindung ermöglichen und zudem eine Vororientierung des Michael-Akzeptors gegenüber den nukleophilen Cysteinen gewährleisten, wodurch eine schnelle Bindungsbildung gefördert wird.

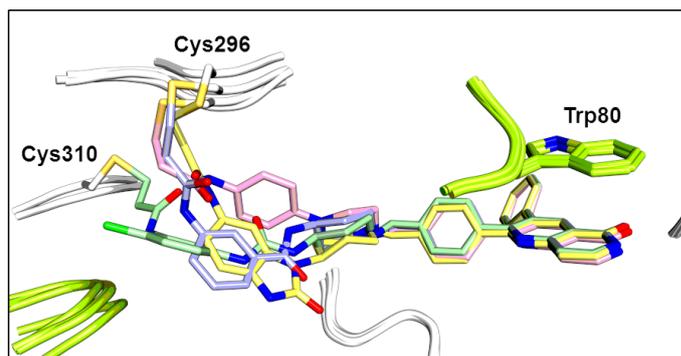


Abbildung 29. Überlagerung der Bindungsposen der Verbindungen **3a** (gelb), **7** (grün), **8** (pink) und **9a** (hellblau). Die 1,6-Diphenyl-naphthyridinon-Grundgerüste sind deckungsgleich zueinander. Die Unterschiede in den Affinitäten zum Protein und den maximalen Inaktivierungsraten sind in den variierenden östlichen Molekülteilen begründet.

Die Testverbindungen der fokussierten Bibliothek, welche einem *in silico*-Design basierend auf zwei publizierten Komplexkristallstrukturen entstammten, zeigten unterschiedliche Affinitäten und maximale Inaktivierungsraten gegenüber Akt1 und stellten die Grundlage für den erstmaligen Machbarkeitsnachweis (*proof of concept*) der kovalent-allosterischen Inhibition dieser Kinase dar. Der vorhergesagte Bindungsmechanismus konnte anhand von Röntgenstrukturanalysen validiert werden. Im weiteren Verlauf sollte die Substanzbibliothek erweitert und Assaysysteme zur Evaluation der zellulären Wirksamkeit der Testverbindungen etabliert werden.

3.5 Derivatisierung der Substanzbibliothek

Durch gezielte Derivatisierung der Verbindungen **3a** und **9a**, welche innerhalb der ursprünglichen Substanzbibliothek die höchsten Affinitäten und Inaktivierungsraten gegenüber Akt1^{wt} aufwiesen, sollte ein besseres Verständnis der SAR dieser Substanzklasse erhalten werden und kritische Struktur motive für eine affine Interaktion mit dem Protein identifiziert werden. Auch Verbindung **4** zeigte vielversprechende biochemische und kinetische Aktivitäten, stellte jedoch nur ein Nebenprodukt bei der Synthese von **3a** dar und konnte zudem nur in sehr geringen Ausbeuten erhalten werden, weshalb der Chlor-Substituent für die weitere Derivatisierung **3a** als Parentalmolekül nicht berücksichtigt wurde. Die Substanzen **10-13** wurden basierend auf Verbindung **3a** entworfen, die Verbindungen **14-20** stellen Derivate von **9a** dar (Abbildung 30).

Die Verbindungen **10-13** wurden von Parentalverbindung **3a** abgeleitet und enthalten kleine Modifikationen im *scaffold*, im Linker, an der Benzimidazolone-Gruppe sowie am *warhead*. Derivat **10** ist anstelle der Acrylamideinheit mit einem 4-Dimethylaminobut-2-enamid-*warhead* dekoriert, welcher auch in den zugelassenen Kinaseinhibitoren Afatinib (Giotrif®) und Neratinib (Nerlynx®) (siehe Kapitel 3.3) zu finden ist. Das tertiäre Amin kann hierbei als Brønsted-Base agieren, wodurch zum einen die Deprotonierung der Thiol-tragenden Cystein-Seitenketten erleichtert und dessen Nukleophilie somit gesteigert werden kann.^[339] Zum anderen kann die erhöhte Polarität im Vergleich zum Acrylamid eine gesteigerte Wasserlöslichkeit bewirken.^[339] Die modifizierte räumliche Zugänglichkeit des C_β-Atoms sollte sich zudem auf die maximale Inaktivierungsrate auswirken. Verbindung **11** trägt eine zusätzliche Methylgruppe am Stickstoff in 1-Position der Benzimidazoloneinheit, welche im Fall der Parentalverbindung an der Ausbildung von Wasser-vermittelten H-Brücken zu Seitenketten des Proteins beteiligt war. Die Flexibilität des 1-Benzylpiperidin-Linkers, der die östliche mit der westlichen Molekülhälfte verbindet, wurde durch Derivatisierung zum 1-Benzoylpiperidin (**12**) aufgrund des partiellen Doppelbindungscharakters der enthaltenen Amidbindung eingeschränkt. Eine solche Einschränkung der Flexibilität kann jedoch entropische Vorteile bringen, sofern die präorganisierte Ligandenkonformation ihre Bindungskompatibilität für das Zielprotein beibehält.

Der Carbonyl-Sauerstoff des Naphthyridinon-*scaffold*, welcher in den Kristallstrukturen wiederholt an der Ausbildung von direkten sowie Wasser-vermittelten H-Brücken zum Protein beteiligt war, liegt in Verbindung **13** methyliert vor, wodurch die Eigenschaft als Wasserstoffbrücken-Akzeptor zu fungieren beeinflusst wurde, während die Aromatizität des Grundgerüsts zur Ausbildung der π - π -Interaktion mit der Indolseitenkette von Trp80 erhalten blieb.

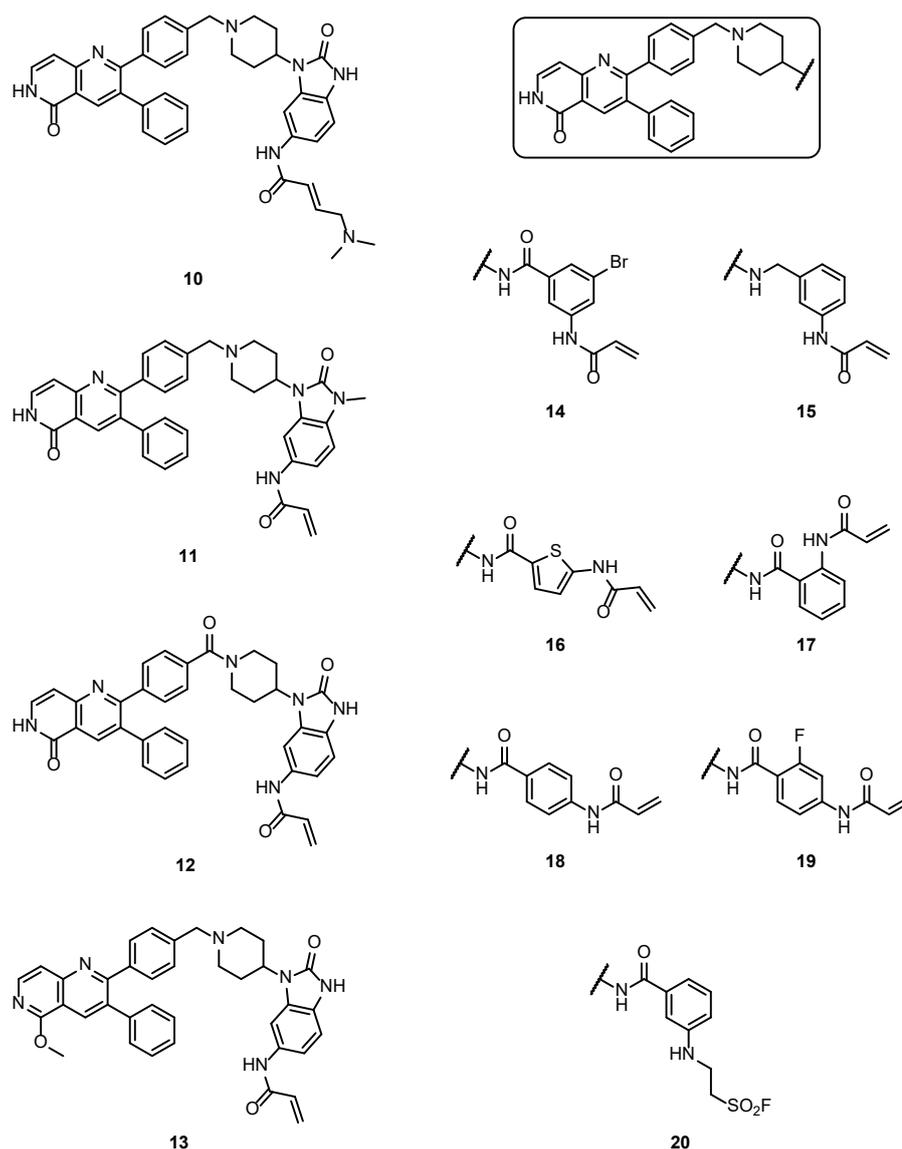


Abbildung 30. Chemische Strukturen der neu synthetisierten Verbindungen der erweiterten Substanzbibliothek.

Für die Derivatisierung von Verbindung **9a** wurde die westliche Molekülhälfte einschließlich des 1-Benzylpiperidinlinkers beibehalten, wobei sich die eingebrachten Modifikationen somit auf das Benzamidmotiv sowie die Art und Position des reaktiven *warhead* beschränkten. Die Verbindungen **14** und **15** sind analog zum Parentalmolekül **9a** aufgebaut und unterscheiden sich im sterisch anspruchsvollen Brom-Substituenten in 5-Position am Phenylring (**14**) bzw. in der zum flexibleren Benzylamin reduzierten Amidgruppe (**15**), wodurch die räumliche Ausnutzung der allosterischen Bindungstasche sowie die Präorganisation der planaren Benzamid-Einheit untersucht werden sollten. Substanz **16** enthält anstelle des Phenylrings eine bioisostere Thiophen-Gruppe. Bioisostere Motive zeichnen sich durch ähnliche strukturelle und physikochemische Eigenschaften im Vergleich zur Ursprungseinheit aus, können aber zu einer Steigerung der Bioaktivität sowie Reduzierung der Toxizität oder metabolischen Labilität beitragen.^[340] Die räumliche Ausrichtung des Acrylamid-*warhead* und die damit verbundene Reaktivität gegenüber den Cysteinen sollte des Weiteren durch die *ortho*- bzw. *para*-substituierten Regioisomere **17**, **18** und **19** untersucht werden, wobei Verbindung **19** in 2-Position des Phenylrings zusätzlich einen Fluor-Substituenten enthält. Mit Verbindung **20**, welche in *meta*-Position anstelle der reaktiven Acrylamid-Gruppe mit einem Ethylamin-verbrückten Sulfonylfluorid-*warhead* dekoriert ist, sollte die Verfügbarkeit weiterer modifizierbarer Seitenketten in der allosterischen Bindungstasche getestet werden. Hierbei kommen als Reaktionspartner des Sulfonylfluorids insbesondere Ser, Thr, Tyr und Lys in Frage (siehe Kapitel 1.2.4).^[157]

3.6 Biochemische und kinetische Evaluierung der erweiterten Substanzbibliothek

Die in Kapitel 3.5 beschriebenen, neu synthetisierten Verbindungen wurden in der Folge erneut einer biochemischen und kinetischen Evaluierung hinsichtlich ihrer inhibitorischen Wirksamkeit, Bindungsaffinität und Inaktivierungsrate unterzogen (Tabelle 6). Die Mehrheit der Testsubstanzen zeigte halb-maximale inhibitorische Potenzen und Affinitäten im unteren nanomolaren Bereich sowie maximale Inaktivierungsraten im Bereich von 0.04 min^{-1} bis 0.14 min^{-1} .

Verbindung **10**, welche als Derivat von Substanz **3a** ($K_i = 0.8 \text{ nM}$; $k_{\text{inact}} = 0.103 \text{ min}^{-1}$) mit einem verlängerten 4-Dimethylaminobut-2-enamid-*warhead* ausgestattet wurde, wies sowohl eine geringere Affinität ($K_i = 33 \text{ nM}$) als auch eine verminderte Reaktivität auf ($k_{\text{inact}} = 0.050 \text{ min}^{-1}$). Eine erhoffte höhere Inaktivierungsrate, bedingt durch eine eventuelle Amin-vermittelte Deprotonierung der Cysteine, ist somit mutmaßlich nicht eingetreten; zusätzlich scheint das C_β -Atom durch die elongierte Kohlenwasserstoffkette weniger elektrophil zu sein. Der 15-fache Verlust der Affinität kann sowohl sterisch bedingt sein oder durch eine mögliche repulsive Wechselwirkung des basischen tertiärenamins mit dem Protein erklärt werden. Für das *N*-methylierte Derivat **11** war eine fünffach geringere Affinität zu beobachten ($K_i = 11 \text{ nM}$), welche durch den Verlust des H-Brücken-Akzeptors innerhalb des Benzimidazolons erklärt werden kann. Die experimentell bestimmte Inaktivierungsrate war hingegen etwas höher ($k_{\text{inact}} = 0.121 \text{ min}^{-1}$), so dass unter Berücksichtigung der Standardabweichungen die Inaktivierungsraten von **11** und **3a** als ähnlich zu bewerten sind. Für die Amid-verbrückte Verbindung **12** wurde eine >3000-fach schlechtere Inhibition ($\text{IC}_{50} = 3400 \text{ nM}$) als für **3a** gemessen, wobei eine kinetische Evaluierung deshalb aus Gründen der Zeit- und Kostenersparnis nicht stattfand. Die Einschränkung der Flexibilität durch Einführung der Amidbindung führte scheinbar zu einer ungünstigen Ausrichtung im mittleren Molekülteil, wodurch eine affine Bindung an das Protein verhindert wurde. Testverbindung **13** wiederum, welche durch *O*-Methylierung des Grundgerüsts erhalten wurde, wies eine verminderte Affinität ($K_i = 8.9 \text{ nM}$) sowie eine vergleichbare Inaktivierungsrate ($k_{\text{inact}} = 0.089 \text{ min}^{-1}$). Auch hier führte der Verlust des H-Brücken-Akzeptors zu einer weniger affinen Bindung an das Protein.

Tabelle 6. Übersicht der Ergebnisse der biochemischen und kinetischen Evaluierung der erweiterten Substanzbibliothek. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 3$).

Verb.	scaffold	R ¹	Akt1 ^{wt}			
			IC ₅₀ / nM	K _i / nM	k _{inact} / min ⁻¹	k _{inact} /K _i / $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
3a ^a			0.8 \pm 0.3	2.2 \pm 0.3	0.103 \pm 0.016	0.853 \pm 0.038
10			18 \pm 4.9	33 \pm 2.4	0.050 \pm 0.009	0.025 \pm 0.002
11			3.0 \pm 0.3	11 \pm 1.5	0.121 \pm 0.016	0.190 \pm 0.025
12			3400 ^b	n.b.	n.b.	n.b.
13			8.9 \pm 3.0	19 \pm 2.9	0.089 \pm 0.028	0.078 \pm 0.015
9a ^a			3.6 \pm 0.8	6.8 \pm 1.3	0.083 \pm 0.016	0.202 \pm 0.035
14			3.7 \pm 0.7	7.6 \pm 1.1	0.078 \pm 0.022	0.168 \pm 0.025
15			192 \pm 45	327 \pm 27	0.071 \pm 0.004	0.004 \pm 0.001
16			14 \pm 6.1	39 \pm 4.6	0.088 \pm 0.010	0.038 \pm 0.005
17			11 \pm 2.5	27 \pm 4.2	0.138 \pm 0.031	0.085 \pm 0.018
18			285 \pm 65	362 \pm 74	0.042 \pm 0.007	0.002 \pm 0.001
19			53 \pm 16	99 \pm 10	0.085 \pm 0.008	0.014 \pm 0.002
20 ^c		1600 ^b	n.b.	n.b.	n.b.	

^a Die Ergebnisse für **3a** und **9a** entsprechen denen aus Kapitel 3.3; ^b Einfachmessung; ^c Vermessung erfolgte durch Lena Quambusch; Verb.: Verbindung; n.b.: nicht bestimmt

Anhand der Derivate von Benzamid **9a** konnten weitere Rückschlüsse auf die SAR gezogen werden. Die in *meta*-Position des östlichen Phenylrings bromierte Substanz **14** ($K_i = 7.6 \text{ nM}$; $k_{\text{inact}} = 0.078 \text{ min}^{-1}$) wies ein identisches Profil zu Parentalverbindung **9a** ($K_i = 6.8 \text{ nM}$; $k_{\text{inact}} = 0.083 \text{ min}^{-1}$) auf. Darauf basierend gehen von dem raumgreifenden Brom-Substituenten keine positiven Wechselwirkungen mit dem Protein aus, jedoch bietet diese Position damit Spielraum für die weitere Derivatisierung und Einbringung kleinerer organischer Substituenten, wie z. B. Amin-, Hydroxyl-, Methyl-, Trifluormethyl-, Ethyl- oder Isopropylgruppen.

Die Proteinkristallstruktur von Akt1^{xtal} im Komplex mit Parentalsubstanz **9a** zeigt in der Nähe der 5-Position ein Wassermolekül sowie die Seitenkette von Glu17, welche möglicherweise für eine affinere Bindung des Liganden adressiert werden können (PDB: 6HHI; Abbildung 28H, I). Die Reduktion des Benzamids **9a** zum Benzylamin **15** resultierte in einem signifikanten, ca. 50-fachen Verlust der Affinität ($K_i = 192 \text{ nM}$), wohingegen die Inaktivierungsrate nur marginal beeinflusst wurde ($k_{\text{inact}} = 0.071 \text{ min}^{-1}$). Im Zuge der reversiblen Komplexbildung scheint die höhere Flexibilität des Liganden im ungebundenen Zustand eine Entropie-bedingte Abnahme der Affinität zu bewirken; da in der Komplexkristallstruktur von **9a** keine Interaktionen des Carbonyl-Sauerstoffs der Amidgruppe detektiert werden konnten, scheint der enthalpische Beitrag zur Affinitätssenkung eher gering auszufallen. Des Weiteren zeigten bereits die Verbindungen **5** ($\text{IC}_{50} = 242 \text{ nM}$) und **6** ($\text{IC}_{50} = 378 \text{ nM}$), welche im östlichen Molekülteil ebenfalls eine erhöhte Flexibilität besitzen, deutlich geringere inhibitorische Potenzen. Eine Amid- bzw. Harnstoff-Einheit (**7**) scheint an dieser Position im Molekül neben dem zyklischen Imidazolone somit bevorzugt zu sein.

Die Verwendung des bioisosteren Thiophens in Verbindung **16** bewirkte eine ca. sechsfache Verminderung der Affinität ($K_i = 39 \text{ nM}$) bei gleichbleibender Inaktivierungsrate ($k_{\text{inact}} = 0.088 \text{ min}^{-1}$). Im Gegensatz zur Benzamid-Gruppe (**9a**) liegt das Thiophencarboxamid im ungebundenen, Energie-minimierten Zustand nicht nahezu planar in einer Ebene. Stattdessen sind die Carbonylgruppe und der Thiophenring um ca. 60° zueinander verdreht (nicht gezeigt). Diese Konformation könnte sich im reversiblen Bindungsschritt nachteilig auswirken, was in einer wie

hier beobachteten geringeren Affinität resultieren würde. Die Ausrichtung des *warhead* im Protein-Ligand-Komplex sowie dessen Reaktivität wurden hingegen nicht beeinflusst.

Die Verbindungen **17** und **18** repräsentierten Regioisomere des Parentalmoleküls **9a**. Die experimentell bestimmten Affinitäten fielen im Fall der *ortho*-substituierten Substanz **17** ca. vierfach ($K_i = 27$ nM), im Fall der *para*-substituierten Verbindung **18** sogar ca. 50-fach geringer ($K_i = 362$ nM) aus im Vergleich zu **9a**. Interessant war hierbei allerdings, dass die detektierte Reaktivität des *ortho*-Derivats **17** ($k_{\text{inact}} = 0.138$ min⁻¹) höher war als die von **9a** ($k_{\text{inact}} = 0.083$ min⁻¹) bzw. die des *para*-Regioisomers **18** ($k_{\text{inact}} = 0.042$ min⁻¹).

Diese Daten veranschaulichen besonders deutlich, wie wichtig eine detaillierte Charakterisierung der kinetischen Parameter im Fall von kovalent bindenden Liganden ist und weshalb eine IC₅₀-Bestimmung anhand von Endpunktmessungen nicht ausreichend ist. Auch wenn die ermittelten Daten keine direkte Erklärung für den beobachteten Trend liefern, illustrieren die Ergebnisse die unterschiedlichen Bindungseigenschaften der getesteten Regioisomere und legen die Möglichkeit nahe, dass durch weitere Optimierung die höhere Affinität von Verbindung **9a** mit der gesteigerten Reaktivität von **17** kombiniert werden kann. Ebenfalls interessant ist das 2-Fluor-substituierte *para*-Regioisomer **19**, welches im Vergleich zum unsubstituierten Gegenstück **18** sowohl eine gesteigerte Affinität ($K_i = 99$ nM) als auch Inaktivierungsrate ($k_{\text{inact}} = 0.085$ min⁻¹) besitzt. Aufgrund der hohen Elektronegativität des Fluor-Substituenten und den damit einhergehenden elektronenziehenden Eigenschaften (negativer induktiver Effekt) könnten die geänderten elektronischen Eigenschaften des aromatischen Phenylrings möglicherweise die Bindung des Liganden an das Protein begünstigen. Ebenso könnte der negative induktive Effekt des Fluor-Substituenten die Reaktivität des elektrophilen Michael-Akzeptors erhöhen oder durch Einschränkung der rotatorischen Freiheit des Phenylrings die Ausrichtung des *warhead* zum adressierten Cystein optimieren.

Verbindung **20**, welche sich im Sulfonylfluorid-*warhead* vom Ausgangsmolekül **9a** unterscheidet, inhibierte Akt1^{wt} deutlich weniger potent ($IC_{50} = 1600$ nM), weshalb keine kinetische Evaluation vorgenommen wurde. Die geringe Potenz deutet jedoch auf einen dramatischen Affinitätsverlust hin, der auch durch eine mögliche kovalente Bindung zum Protein nicht kompensiert werden kann.

Das Verhältnis k_{inact}/K_i erlaubt zwar eine globale, quantitative Klassifizierung der kovalenten Liganden unter Berücksichtigung beider kinetischen Parameter (Affinität und maximale Inaktivierungsrate), wobei für die Aufstellung einer detaillierten SAR jedoch eine individuelle Betrachtung dieser Eigenschaften empfohlen wird, wie die hier präsentierten Daten verdeutlichen. Die ausführliche kinetische Charakterisierung der synthetisierten Testverbindungen ermöglichte die Identifizierung der Liganden mit der besten Affinität (**3a**) sowie der maximalen Reaktivität (**17**) und unterstreicht somit das vorhandene Optimierungspotential dieser Substanzklasse.

Auch wenn die Erweiterung der fokussierten Bibliothek nicht in der Generierung eines überlegeneren Inhibitors relativ zu **3a** und **9a** mündete, konnten kritische Struktur motive sowie potentielle zukünftige Stellschrauben beschrieben werden, die insbesondere für eine affine reversible Bindung von Bedeutung sind. Hierzu gehören die nicht-substituierte Carbonylgruppe des Naphthyridinon-*scaffold*, der flexible 1-Benzylpiperidin-Linker sowie die rigide Amid-/Harnstoff-Verbrückung im östlichen Molekülteil. Basierend auf den Verbindungen **9a** und **14**, welche im Vergleich zum Benzimidazolone **3a** mehr Raum zur Derivatisierung anbieten, konnte zudem die 5-Position im Phenylring als potentiell geeignete Substitutionsstelle ausgemacht werden, um weitere vorteilhafte Kontakte zum Protein auszubilden. Um ein noch besseres Verständnis der zugrundeliegenden molekularen Ursachen zu erhalten, sollten zukünftig Komplexkristallstrukturen der dargestellten Verbindungen gelöst werden.

3.7 Profilierung der Kinase-Selektivität

Nachdem mit Verbindung **3a** ein potenter, kovalent-allosterischer Akt-Inhibitor identifiziert werden konnte, der mit nanomolarer Affinität reversibel an Akt1 bindet und mit einer hohen Inaktivierungsrate das Protein irreversibel modifiziert, sollte in einer Profilierungsstudie die Selektivität dieses neuartigen Liganden gegenüber dem humanen Kinom untersucht werden. Obwohl in vorausgegangenen Publikationen eine exzellente Selektivität von PH-Domänen-abhängigen Akt-Inhibitoren beschrieben wurde (siehe Kapitel 1.3.5), galt es den Einfluss der reaktiven Acrylamid-Einheit auf die Proteinselektivität zu eruieren. Hierbei standen insbesondere Proteinkinasen im Fokus, die ähnliche (strukturelle) Merkmale wie Akt aufweisen; dazu zählen a) Proteinkinasen der AGC-Familie, b) Proteinkinasen, die eine regulatorische PH-Domäne enthalten und/oder c) Proteinkinasen, die Cysteine analog zu Cys296 und Cys310 im Bereich der Aktivierungsschleife aufweisen. Eingeschränkt wurde die Auswahl durch eine limitierte Verfügbarkeit von Multidomänen-Enzymen bei kommerziellen Anbietern von Profilierungsscreens, da oftmals auf Kinasedomäne-Konstrukte zurückgegriffen wird. Die finale Auswahl umfasste 100 Proteinkinasen (inkl. Akt1-3 als Vollängenkonstrukte), von denen 15 in ihrer Wildtyp-Sequenz eine PH-Domäne enthalten (fünf hiervon wurden für die Profilierung jedoch ohne PH-Domäne verwendet), 29 Mitglieder der AGC-Familie sowie 49 Proteinkinasen die mindestens ein Cystein in ihrer Aktivierungsschleife analog zu Cys296 bzw. Cys310 in Akt aufweisen; nur auf Akt1-3 trafen alle drei Merkmale zu. 36 der 100 Kinasen hingegen erfüllten keines der drei genannten Kriterien und wurden anhand von publizierten Profilierungsergebnissen für Akt-Inhibitoren ausgewählt (Abbildung 31).^[322, 341]

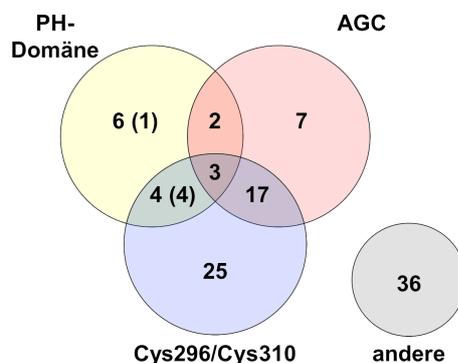


Abbildung 31. Zusammensetzung des profilierten Kinasepanels. Zahl in Klammern beschreibt jene Kinasen, die eine PH-Domäne aufweisen, aber ohne diese in der Profilierung verwendet wurden.

Eine Gesamtübersicht der getesteten Kinasen inkl. ihrer Eigenschaften ist in Tabelle 29 zusammengefasst. Die Kinase-Profilierung erfolgte in Gegenwart von 1 μM **3a**, jeweils beim Kinase-spezifischen, apparenten ATP- K_M und wurde vom SelectScreen Profiling Service (Thermo Fisher Scientific) mit zwei Messungen pro Kinase durchgeführt. Die Ergebnisse der Profilierungsstudie für Verbindung **3a** sind in Tabelle 30 aufgelistet und in Abbildung 32 grafisch dargestellt.

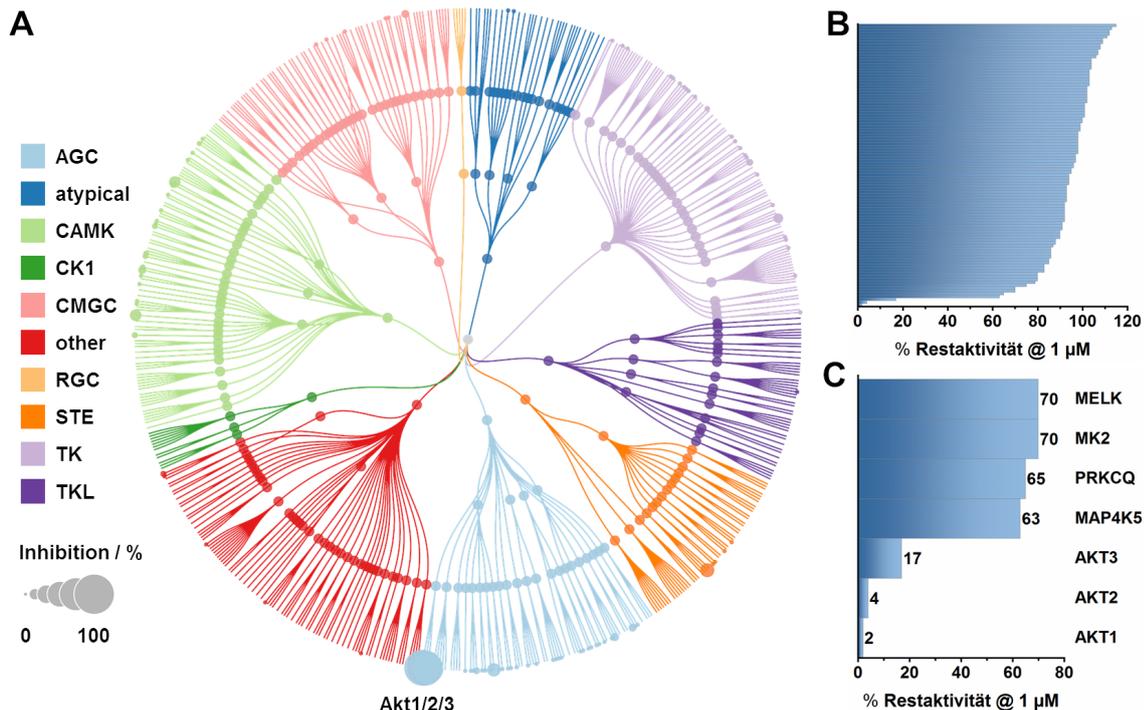


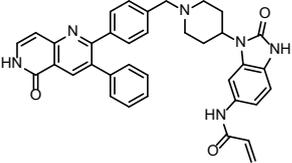
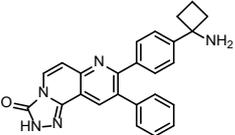
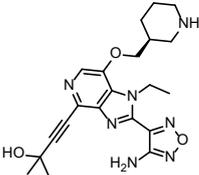
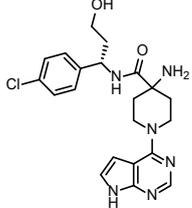
Abbildung 32. Profilierung der Kinaseselektivität. **A**, Verbindung **3a** wurde bei einer Konzentration von 1 μM gegen ein Panel von 100 Proteinkinasen hinsichtlich der inhibitorischen Wirksamkeit getestet. Die Proteinkinasen sind entsprechend ihrer Familienzugehörigkeit sortiert und in radialer Form des phylogenetischen Baumes (*kinome tree*) nach MANNING *et al.* dargestellt.^[38] Die innenliegenden Punkte stellen Sub-/Familien dar; die äußeren Punkte repräsentieren profilierte Kinasen und die Größe dieser Punkte ist proportional zur Inhibition. Die Kinase-Profilierung wurde beim jeweiligen apparenten ATP- K_M vom SelectScreen Profiling Service (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die Abbildung wurde mit der Coral WebApp erstellt und mit der Erlaubnis von Cell Signaling Technology, Inc. (www.cellsignal.com) generiert.^[342] **B**, Balkendiagramm der enzymatischen Restaktivität (%) der 100 profilierten Proteinkinasen bei 1 μM von Verbindung **3a**. **C**, Nahansicht von (**B**) der sieben am stärksten inhibierten Kinasen (0-70 % Restaktivität).

Bei der verwendeten Konzentration von 1 μM der Verbindung **3a** wurden nur drei Proteinkinasen zu über 50 % inhibiert, nämlich Akt1 (98 %), Akt2 (96 %) und Akt3 (83 %) (Abbildung 32A). Für die weiteren 97 getesteten Kinasen liegt der IC_{50} -Wert also oberhalb von 1 μM . Dem Wasserfalldiagramm (Abbildung 32B), in welchem die enzymatische Restaktivität der Kinasen bei 1 μM **3a** aufgetragen ist, ist zu

entnehmen, dass ein Großteil der Kinasen zu weniger als 20 % inhibiert wird (≥ 80 % Restaktivität). Lediglich vier weitere Kinasen zeigten eine Inhibition von ≥ 30 %, nämlich MAP4K5 (63 % Restaktivität), PKC θ (65 % Restaktivität) sowie MK2 und MELK (je 70 % Restaktivität). Keine dieser Proteinkinasen enthält eine PH-Domäne, bloß PKC θ ist der AGC-Familie zuzuordnen, und nur PKC θ , MK2 und MELK besitzen analoge Cysteine (Abbildung 32C). Aus diesem Profilierungs-Screen wird deutlich, dass der neuartige Inhibitor **3a**, welcher für Akt einen PH-Domänen-abhängigen Bindungsmodus aufweist, äußerst spezifisch die drei Isoformen von Akt inhibiert, ohne dabei *off-targets* zu adressieren, die strukturelle und/oder sequenzielle Ähnlichkeiten zu Akt aufweisen. Des Weiteren kann eine gewisse Isoform-Selektivität aus den Profilierungsergebnissen abgeleitet werden, wobei **3a** ein potenterer Inhibitor von Akt1 (98 % bei 1 μ M) und Akt2 (96 % bei 1 μ M) im Vergleich zu Akt3 (83 % bei 1 μ M) ist.

Um diesen Trend näher zu untersuchen, wurden in Aktivitäts-basierten HTRF®-Assays die IC₅₀-Werte von **3a** und einer Auswahl von Referenzverbindungen gegenüber Akt2^{wt} und Akt3^{wt} ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Neben der deutlich weniger potenten Inhibition von Akt3 (IC₅₀ = 641 nM), welche bereits in der Profilierungsstudie beobachtet werden konnte, ist zudem eine erhöhte Selektivität für Akt1 (IC₅₀ = 0.8 nM) gegenüber Akt2 (IC₅₀ = 55 nM) erkennbar. Ein vergleichbares Inhibitionsprofil konnte auch für die Referenzverbindung MK-2206 detektiert werden. Hervorzuheben ist hierbei, dass der ca. 10-fache Potenzvorteil von **3a** gegenüber MK-2206 auf Akt1^{wt} deutlich weniger stark ausgeprägt ist für Akt2 (ca. 3-fach) und Akt3 (ca. 1.5-fach). Sofern auch diese beiden Isoformen kovalent von **3a** adressiert werden, hat diese Form der Inhibition deutlich geringere Vorteile als im Fall von Akt1.

Tabelle 7. Inhibitionsprofil von **3a** und Referenzverbindungen gegenüber Akt1/2/3. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3).

Verbindung	Struktur	IC ₅₀ / nM		
		Akt1 ^{wt}	Akt2 ^{wt}	Akt3 ^{wt}
3a		0.8 \pm 0.3	55 \pm 10	641 \pm 134
MK-2206		10 \pm 2.1	157 \pm 45	951 \pm 291
GSK690693		2.2 \pm 0.7	3.1 \pm 1.1	9.4 \pm 2.5
Capivasertib		0.9 \pm 0.1	5.3 \pm 1.4	8.0 \pm 2.3

Die ATP-kompetitiven Verbindungen GSK690693 und Capivasertib zeigen hohe inhibitorische Aktivitäten gegenüber allen drei Isoformen und sind bis zu 100-fach potentere Inhibitoren von Akt3 im Vergleich zu **3a** und MK-2206. Dies deutet auf eine weniger konservierte allosterische Bindungstasche innerhalb der drei Isoformen hin, wohingegen die ATP-Bindungstasche einen deutlich höheren Grad der Konservierung aufweist. Diese strukturellen Unterschiede der allosterischen Tasche könnten potentiell ausgenutzt werden, um Isoform-spezifische Akt-Inhibitoren zu entwickeln. Derartige Ansätze wurden bereits im Rahmen der Masterarbeit von Lena Quambusch erfolgreich etabliert und werden derzeit in Folgestudien optimiert.^[343]

3.8 Zelluläre Evaluierung

Neben einer gesteigerten Potenz sowie einem kovalenten Bindungsmodus gegenüber den reversiblen allosterischen Akt-Inhibitoren wie MK-2206, führte die Einbringung der reaktiven *warhead*-Gruppe zu einem Erhalt der typischen Selektivität der allosterischen Liganden. Aufbauend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen der *in vitro*-Studien, sollte im nächsten Schritt die Wirksamkeit der neu dargestellten Verbindungen in zellulären Systemen überprüft werden. Da Alterationen im PI3K/Akt-Signalweg in einer Vielzahl von Krebsarten gefunden werden (siehe Kapitel 1.3.4), bei denen sie eine neoplastische Transformation sowie eine Abhängigkeit von der Signalweg-Aktivität induzieren können, stellen derartig mutierte Krebszelllinien geeignete Modelle zur Testung der anti-proliferativen Effizienz der kovalenten Akt-Inhibitoren dar. Eine einfach umzusetzende phänotypische Analysemethode repräsentiert hierbei die Messung der Viabilität der Krebszellen, welche mithilfe von kommerziell erhältlichen Systemen wie dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega) realisiert werden kann. In späteren Untersuchungen sollte zudem mithilfe von Western Blot-Analysen die gezielte *on-target*-Adressierung von Akt sowie die Inhibition der nachgeschalteten Effektoren überprüft werden. Um eine Testung der Substanzen in relevanten Systemen durchführen zu können, wurden Zelllinien ausgewählt, die in früheren Publikationen bereits für die Charakterisierung von Akt-Inhibitoren verwendet wurden.^[302, 309, 311] Ein weiteres Hauptkriterium stellte die Anwesenheit von genetischen Läsionen im PI3K/Akt-Signalweg dar, wie bspw. *gain-of-function* Mutationen im Protoonkogen PI3K oder *loss-of-function* Alterationen im Tumorsuppressor PTEN. Ebenso sollten Krebszelllinien verwendet werden, die aufgrund von KRAS-Mutationen unabhängig vom PI3K/Akt-Signalweg sein sollten und somit als Toxizitätskontrolle eingesetzt werden können. Ein Abgleich der Mutationsprofile erfolgte anhand der COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*)-Datenbank.^[344]

Für die zelluläre Charakterisierung wurden final acht verschiedene Krebszelllinien ausgewählt, die sich in ihrem Mutationsstatus und Ursprungsgewebe unterscheiden: AN3-CA (Endometrium; PIK3R1^{R557_K561>Q}, PTEN^{R130fs}), BT-474 (Brust; PIK3CA^{K111N}), KU-19-19 (Harnblase; PIK3CA^{R1023Q}, Akt1^{E17K/E49K}), MCF-7

(Brust; PIK3CA^{E545K}), T-47D (Brust; PIK3CA^{H1047R}), ZR-75-1 (Brust; PTEN^{L108R}), Dan-G (Pankreas; KRAS^{G12V}), HPAF-II (Pankreas; KRAS^{G12D}). Die hier genannten Alterationen beziehen sich ausschließlich auf den PI3K/Akt- bzw. KRAS-Signalweg und decken nicht das vollständige Mutationsspektrum der Zelllinien ab. Die experimentelle Durchführung sowie die Datenanalyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Ina Landel.

3.8.1 Evaluierung der Anti-Proliferativen Wirksamkeit

Um eine möglichst exakte Analyse der anti-proliferativen Aktivität vornehmen zu können, wurde in initialen Studien eine Bestimmung der optimalen Zellzahl pro Kavität einer 384-*well* Mikrotiterplatte für jede Zelllinie durchgeführt. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass das erhaltene Assay-spezifische Lumineszenzsignal direkt proportional zur Zellviabilität bzw. zur Zahl lebender Zellen ist. Die Zelldichten wurden so ausgewählt, dass ein möglichst hohes Lumineszenzsignal erhalten wurde, welches in linearer Abhängigkeit zur Zellzahl pro Kavität steht (*dynamic range*). Die grafischen Auftragungen der detektierten Lumineszenz gegen die Zellzahl pro *well* sind in Abbildung 68 dargestellt und die schließlich eingesetzten Zelldichten sind Tabelle 22 zu entnehmen.

Für die Charakterisierung der Testsubstanzen wurden die Zellen an Tag 0 ausplattiert, 24 Stunden später mit den jeweiligen Verbindungen behandelt und nach weiteren 96 Stunden ausgelesen (siehe Kapitel 8.7.4). Als Kontrollsubstanzen wurden hier neben etablierten Akt-Inhibitoren zusätzlich Doxorubicin als unspezifisches chemotherapeutisches Zytostatikum und der MEK-Inhibitor Trametinib, welcher aktiv gegenüber KRAS-mutierten Zelllinien ist, eingesetzt (Tabelle 8). In zellulären Assays spielen neben der reinen inhibitorischen Aktivität einer Substanz gegenüber dem adressierten Zielprotein weitere Eigenschaften wie Löslichkeit, Zellpermeabilität, Stabilität und Plasmaproteinbindung eine tragende Rolle, da sie die Verfügbarkeit der Substanz und somit die reale Konzentration im Cytoplasma bestimmen. Zell-basierte Assays sind daher im Bereich der Wirkstoffforschung von grundlegender Bedeutung, da sie eine erste Abschätzung der Effektivität einer Substanz in komplexen biologischen Systemen ermöglichen.

Tabelle 8. Zelluläre Evaluierung der kovalent-allosterischen Testverbindungen und Referenzsubstanzen. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3).

Verb.	EC ₅₀ / nM							
	AN3-CA	BT-474	KU-19-19	MCF-7	T-47D	ZR-75-1	Dan-G	HPAF-II
3a	190 \pm 80	370 \pm 50	7800 \pm 640	280 \pm 90	48 \pm 15	5 \pm 1	2900 \pm 790	>10000
3b	5900 \pm 2500	>10000	n.b.	5700 \pm 2100	2900 \pm 1700	720 \pm 330	5200 \pm 1800	8700 \pm 3900
4	160 \pm 70	260 \pm 70	2300 \pm 900	140 \pm 60	25 \pm 8	2 \pm 1	1300 \pm 860	>10000
7	2100 \pm 500	1800 \pm 460	1700 \pm 250	1100 \pm 320	340 \pm 130	39 \pm 13	1900 \pm 640	8500 \pm 2200
8	3600 \pm 1300	4600 \pm 1100	>10000	1200 \pm 260	830 \pm 80	120 \pm 20	n.b.	n.b.
9a	380 \pm 40	460 \pm 130	>10000	340 \pm 110	95 \pm 20	11 \pm 3	1100 \pm 250	6500 \pm 1600
9b	>10000	>10000	n.b.	8400 \pm 1000	>10000	850 \pm 320	8600 \pm 2500	>10000
10	>10000	>10000	>10000	>10000	2100 \pm 350	430 \pm 140	n.b.	n.b.
11	230 \pm 80	110 \pm 20	7200 \pm 2100	32 \pm 8	11 \pm 2	2 \pm 1	>10000	>10000
12	>10000	>10000	n.b.	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
13	980 \pm 310	2100 \pm 1100	n.b.	710 \pm 320	200 \pm 70	19 \pm 6	1800 \pm 550	>10000
14	570 \pm 110	620 \pm 190	6400 \pm 1200	220 \pm 90	180 \pm 30	10 \pm 3	970 \pm 290	>10000
15	3200 \pm 820	4000 \pm 910	6800 \pm 1500	2200 \pm 630	1900 \pm 580	380 \pm 60	n.b.	n.b.
16	940 \pm 250	1100 \pm 210	3100 \pm 850	1200 \pm 520	180 \pm 50	33 \pm 9	1200 \pm 590	2600 \pm 1100
17	1400 \pm 370	2300 \pm 700	5500 \pm 1500	1000 \pm 620	41 \pm 19	22 \pm 7	n.b.	n.b.
18	3500 \pm 1700	5200 \pm 1900	>10000	2800 \pm 690	1400 \pm 450	150 \pm 50	8800 \pm 2600	>10000
19	1300 \pm 200	1900 \pm 400	6100 \pm 1100	2400 \pm 1000	550 \pm 90	73 \pm 25	1300 \pm 470	3500 \pm 900
20	>10000	>10000	n.b.	>10000	>10000	>10000	n.b.	n.b.
MK	970 \pm 320	1700 \pm 300	7100 \pm 400	570 \pm 110	580 \pm 250	63 \pm 21	1500 \pm 360	8000 \pm 1500
Mira	610 \pm 180	540 \pm 130	4500 \pm 780	270 \pm 130	200 \pm 30	35 \pm 17	1500 \pm 460	4800 \pm 1100
Ipa	930 \pm 460	2400 \pm 750	>10000	5000 \pm 1800	440 \pm 110	220 \pm 80	4100 \pm 830	>10000
Capi	870 \pm 280	1600 \pm 450	>10000	2700 \pm 560	480 \pm 100	190 \pm 70	>10000	>10000
Doxo	30 \pm 9	620 \pm 130	70 \pm 20	150 \pm 30	130 \pm 40	100 \pm 30	90 \pm 40	340 \pm 110
Tram	>10000	n.b.	n.b.	>10000	>10000	>10000	240 \pm 60	61 \pm 27

EC₅₀: halbmaximale effektive Konzentration, bei der die Viabilität im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen um 50 % reduziert wurde; Verb.: Verbindung; n.b.: nicht bestimmt; MK: MK-2206; Mira: Miransertib; Ipa: Ipatasertib; Capi: Capivasertib; Doxo: Doxorubicin; Tram: Trametinib. AN3-CA (Endometrium; PIK3R1^{R557_K561>Q}, PTEN^{R130fs}), BT-474 (Brust; PIK3CA^{K111N}), KU-19-19 (Harnblase; PIK3CA^{R1023Q}, Akt1^{E17K/E49K}), MCF-7 (Brust; PIK3CA^{E545K}), T-47D (Brust; PIK3CA^{H1047R}), ZR-75-1 (Brust; PTEN^{L108R}), Dan G (Pankreas; KRAS^{G12V}), HPAF-II (Pankreas; KRAS^{G12D}).

Die hier verwendeten Zelllinien zeigten unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber den Test- und Kontrollsubstanzen. Während für die Brustkrebszelllinien T-47D und ZR-75-1 EC₅₀-Werte bis in den unteren nanomolaren Bereich detektiert wurden, lagen die halbmaximalen effektiven Konzentrationen für AN3-CA, BT-474 und MCF-7 im Mittel eher im hohen nano- bis unteren mikromolaren Bereich.

Die Harnblasenkrebszelllinie KU-19-19, welche neben den Alterationen Akt1^{E17K/E49K} und PIK3CA^{R1023Q} zusätzlich die Mutation NRAS^{Q61R} aufweist, ist deutlich resistenter gegenüber Akt-Inhibitoren mit bestenfalls mikromolaren Aktivitäten der Testsubstanzen. Biochemische und kinetische Analysen unter Verwendung von Akt1^{E17K} zeigten einen deutlichen Aktivitätsverlust der allosterischen Liganden für diese Mutante (Tabelle 28), wobei die hier entwickelten, kovalent bindenden Inhibitoren deutliche Affinitätsvorteile gegenüber den reversiblen Referenzverbindungen aufwiesen. Da jedoch für die ATP-kompetitiven Liganden vergleichbare Potenzen wie für Akt1^{wt} detektiert wurden (IC₅₀ = 0.3-3.5 nM), ist die für die KU-19-19-Zelllinie beobachtete Resistenz gegenüber Akt-Inhibition vermutlich der NRAS^{Q61L}-Mutation zuzuschreiben. Die KRAS-alterierten Pankreaskrebszelllinien Dan-G und HPAF-II zeigten ebenfalls keine signifikante Sensitivität für Akt-Inhibition. Lediglich das unspezifische Chemotherapeutikum Doxorubicin, ein zytostatischer DNA-Interkalator, zeigt potente anti-proliferative Aktivitäten auf allen Zelllinien.

Grundsätzlich ist festzuhalten, dass die beobachteten Aktivitätstrends der Testsubstanzen für die getesteten Zelllinien ähnlich ausfallen. Die Verbindungen **3a**, **4**, **9a**, **11**, **13** und **14** induzieren in den Zelllinien mit Alterationen im PI3K/Akt-Signalweg die am stärksten ausgeprägten anti-proliferativen Effekte und korrelieren somit mit den zuvor ermittelten biochemischen Inhibitionsprofilen. Auch für die Verbindungen **7**, **16** und **17**, welche Akt1^{wt} im zellfreien System potent inhibierten, waren prägnante anti-proliferative Aktivitäten zu beobachten. Lediglich Verbindung **10**, welche eine gute biochemische Inhibition aufwies, verlor gegenüber den strukturell ähnlichen Benzimidazolonderivaten deutlich an inhibitorischer Aktivität im zellulären Kontext. Ein Grund hierfür könnte der stark basische Charakter der Verbindung sein, welcher von den zwei tertiären Aminen herrührt, und die Zellpermeabilität möglicherweise absenkt. Besonders auffällig ist zudem der extreme Aktivitätsverlust der reversiblen Inhibitoren **3b** und **9b** im Vergleich zu ihren kovalent bindenden Gegenstücken **3a** und **9a**. Während die reversiblen Analoga im zellfreien System ca. 10-fach weniger potent sind als die kovalenten Liganden, weisen sie im zellbasierten Assay sogar 20- bis 100-fach schlechtere Wirksamkeiten auf, was einen potentiellen Vorteil von kovalenten Liganden,

nämlich die gesteigerte Potenz, unterstreicht. Auch im Vergleich zu den etablierten Akt-Inhibitoren MK-2206, Miransertib, Ipatasertib und Capivasertib, welche zurzeit in diversen klinischen Studien der Phase 1 und 2 untersucht werden, zeigen die kovalent-allosterischen Testverbindungen Wirksamkeitsvorteile. Eine weitere Auffälligkeit liegt in der generell geringeren zellulären Wirksamkeit der ATP-kompetitiven Inhibitoren Ipatasertib und Miransertib relativ zu den allosterischen Inhibitoren; besonders stark ist dieser Effekt bei den Brustkrebszelllinien MCF-7 und ZR-75-1 ausgeprägt. Kürzlich wurden von VIVANCO *et al.* Konformationsabhängige Funktionen von Akt beschrieben, die nicht durch katalytische Prozesse bedingt werden d. h. trotz der Inhibitor-vermittelten Blockierung der Kinaseaktivität, wurden phänotypische Unterschiede zwischen allosterischer und ATP-kompetitiver Inhibition von Akt beobachtet.^[345] Die von Typ I-Inhibitoren stabilisierte, offene PH-*out*-Konformation von Akt ermöglichte dabei die Induktion von Signaltransduktionsprozessen, die das Zellüberleben positiv regulieren. Diese Effekte konnten durch Stabilisierung der PH-*in*-Konformation, vermittelt durch allosterische Liganden, hingegen nicht induziert werden. Diese Konformationsabhängigen und Katalyse-unabhängigen Funktionen könnten auch den hier beobachteten Unterschied zwischen allosterischen und ATP-kompetitiven Inhibitoren erklären. Um derartige Funktionen auf molekularer Ebene untersuchen zu können, ist die Entwicklung von chemischen Sondenmolekülen von großem Interesse und wird in der AG Rauh daher intensiv verfolgt; im Rahmen dieser Arbeit wird dieser Aspekt der chemisch-biologischen Forschung jedoch nicht weiter beleuchtet.

Im Kontext der zell-basierten Evaluierung der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren konnten hochpotente Verbindungen identifiziert werden, die in relevanten Krebszelllinien mit genetischen Läsionen im PI3K/Akt-Signalweg eine den reversiblen Liganden überlegene Wirksamkeit zeigten. Für Verbindung **3a**, welche das vielversprechendste biochemische/kinetische Profil aufwies und auch auf zellulärer Ebene eine starke Wirksamkeit zeigte, sollte in der Folge anhand von Western Blot-Analysen der molekulare Wirkmechanismus der anti-proliferativen Wirkung eruiert werden.

3.8.2 Western-Blot Analysen

Unter Verwendung von phospho-spezifischen Antikörpern, die gegen Akt und seine Effektoren gerichtet sind, sollte die *on-target*-Inhibition auf zellulärer Ebene untersucht werden. Neben den beiden kritischen Phosphorylierungsstellen in Akt, Thr308 und Ser473, welche als Indikatoren für die enzymatische Aktivität verwendet werden können, sollte der Phosphorylierungszustand der nachgeschalteten Substrate 4E-BP1, S6 und PRAS40 in Dosis-Wirkungs-Studien untersucht werden. Diese sind u. a. an der Regulation der Proteinbiosynthese sowie des Zellwachstums und -überlebens beteiligt. Zudem sollte durch gezielte Untersuchung des Zustands der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), welche in Folge von Caspase-3-vermittelter, proteolytischer Aktivierung als Initiator der Apoptose fungiert, der Ursprung der anti-proliferativen Wirksamkeit des Inhibitors aufgedeckt werden.

Als Modellsysteme wurden die Krebszelllinien ZR-75-1 (Brust), AN3-CA (Endometrium) und Dan-G (Pankreas) verwendet, da diese unterschiedliche Sensitivitäten gegenüber Verbindung **3a** aufwiesen, aus verschiedenen Ursprungsgeweben stammen und sich zudem im Mutationsstatus unterscheiden. Die Behandlung der Zellen, die Aufbereitung der Zelllysate und die Durchführung der Western Blots ist in Kapitel 8.7.5 beschrieben und erfolgte in Zusammenarbeit mit Ina Landel. Abhängig vom jeweiligen EC_{50} -Wert (Tabelle 8) wurde der Konzentrationsbereich der eingesetzten Verbindung **3a** angepasst.

Für die drei getesteten Zelllinien konnte eine Dosis-abhängige Dephosphorylierung von Akt an Thr308 und Ser473 beobachtet werden, was mit einer Liganden-vermittelten Inhibition gleichzusetzen ist (Abbildung 33). Für ZR-75-1 und AN3-CA resultierte die Akt-Inhibition in der Runterregulierung der Substrate 4E-BP1, S6 und PRAS40, d. h. die Akt-vermittelte Signaltransduktion wurde effektiv gehemmt. Für die Pankreaskarzinom-Zelllinie Dan-G hingegen bewirkten auch hohe Konzentrationen bis zu 10 μ M von **3a** keine Dephosphorylierung von 4E-BP1; für S6 konnte mit steigender Inhibitorkonzentration sogar eine Zunahme der Phosphorylierung an Ser235/236 detektiert werden. Lediglich für PRAS40 war eine Runterregulierung ab einer Konzentration von 1 μ M **3a** erkennbar.

Weitere Unterschiede zeigten sich bei der Untersuchung der PARP bzw. der proteolytisch gespaltenen Version cPARP. Für ZR-75-1 und AN3-CA konnte bei den höchsten eingesetzten Inhibitorkonzentrationen eine Akkumulation der gespaltenen Form von PARP ermittelt werden, was für eine gezielte Induktion von Apoptose in Folge der Inhibitor-Behandlung spricht. Ein derartiger Effekt war für Dan-G nicht erkennbar, was mit der vergleichsweise hohen Resistenz gegenüber Verbindung **3a**, die im Viabilitätsassay zuvor bestimmt wurde, korreliert.

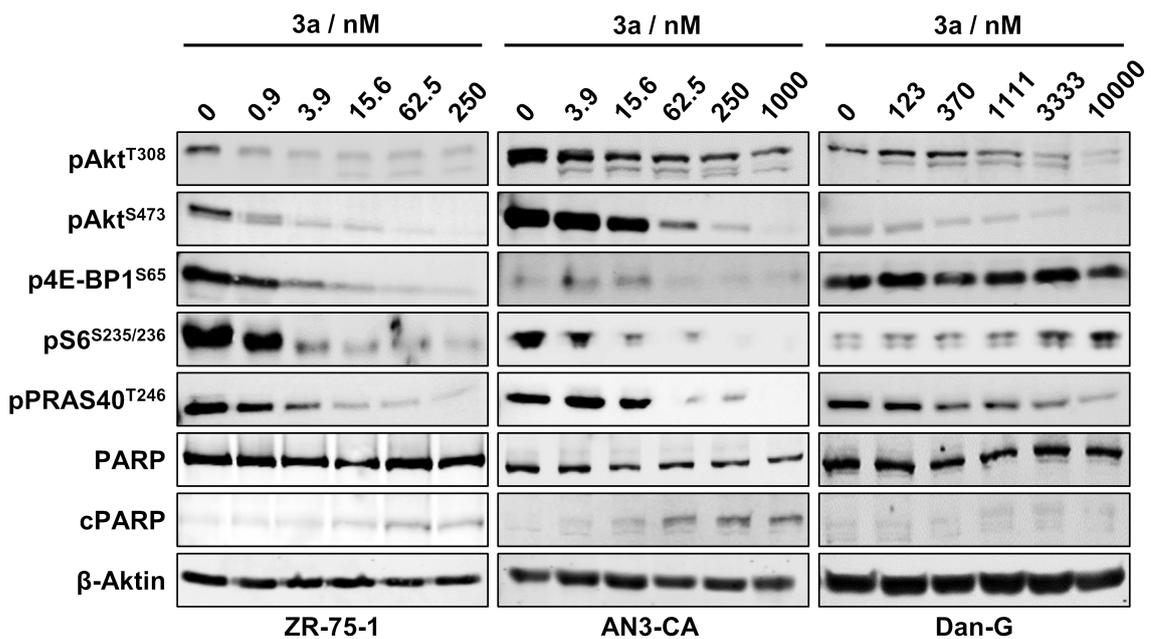


Abbildung 33. Western Blots der Zelllinien ZR-75-1, AN3-CA und Dan-G nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen von Verbindung **3a** für 24 h. Im Anschluss wurde der Phosphorylierungszustand von Akt, 4E-BP1, S6 und PRAS40 untersucht. Die Spaltung von PARP zu cPARP (*cleaved* PARP) dient als Indikator für die Apoptoseinduktion; β -Aktin diente als interne Beladungskontrolle.^[346]

Mithilfe der hier gezeigten Western Blots konnte einerseits die gezielte Inhibition von Akt durch Verbindung **3a** im zellulären Kontext validiert werden, andererseits konnten Unterschiede des Wirkmechanismus zwischen den Zelllinien auf molekularer Ebene identifiziert werden. Während die potente Inhibition der Akt-vermittelten Signaltransduktion im Fall von AN3-CA und ZR-75-1 in der Apoptoseinduktion durch Spaltung von PARP resultierte, existieren in der Zelllinie Dan-G offensichtlich Kompensationsmechanismen, die in Folge der Akt-Inhibition durch **3a** eine verstärkte Phosphorylierung von S6 vermitteln und u. a. dadurch die Induktion der Apoptose, repräsentiert durch cPARP, unterdrücken, wodurch eine

vergleichsweise höhere Resistenz gegen den Akt-Inhibitor vermittelt wird. Die beschriebene Kompensation kann möglicherweise durch die vorliegende KRAS^{G12V}-Mutation erklärt werden, die eine konstitutive Aktivierung des Raf/MEK/Erk-Signalwegs vermittelt, welcher ebenfalls an der Regulation von S6 beteiligt ist.

3.9 *In vitro* DMPK-Profilierung

Nachdem der molekulare Wirkmechanismus der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren am Beispiel von Verbindung **3a** in ausgewählten Krebszelllinien dekonstruiert wurde und in Verbindung mit den zuvor erlangten biochemischen und zellulären Ergebnissen das Potential dieser Substanzklasse unterstreicht, sollte deren potentielle Verwendbarkeit in Tiermodellen durch Profilierung der *in vitro* DMPK (*drug metabolism and pharmacokinetics*)-Parameter (Löslichkeit, Zellpermeabilität, mikrosomale Stabilität, Plasmastabilität, Plasmaproteinbindung; Tabelle 9) für eine Auswahl von Testverbindungen analysiert werden. Die experimentelle Durchführung und Datenanalyse erfolgte durch Julia Hardick und die Lead Discovery Center GmbH.

Tabelle 9. *In vitro* pharmakokinetische Eigenschaften von kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren und Referenzverbindungen.

	3a	4	7	9a	11	14	MK	Ipa
SolRank @pH 7.4 / μM	14	20	77	109	36	29	-	-
PAMPA @pH 7.4 / %Flux	<5	0	<5	18	24	0	-	-
Caco-2 P_{app} A→B / $10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$	0.4	0.6	2.2	0.4	-	-	-	-
Caco-2 P_{app} B→A / $10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$	40	107	129	98	-	-	-	-
Caco-2 Efflux (B→A/A→B)	101	178	59	245	-	-	-	-
CL_{int} HLM / $\mu\text{L min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$	5	5	24	8	19	12	1	12
CL_{int} MLM / $\mu\text{L min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$	30	34	67	8	60	20	2	6
Plasmastabilität_{human} / %	99	-	-	-	-	-	-	-
Plasmastabilität_{murin} / %	99	91	70	85	-	-	-	-
Plasmaproteinbindung_{human} / %	99	-	-	-	-	-	-	-
Plasmaproteinbindung_{murin} / %	99	99	99	99	-	-	-	-

PAMPA: *parallel artificial membrane permeability assay*; P_{app} : apparente Permeabilität; A: apikale Seite; B: basolaterale Seite; CL_{int} : intrinsische Clearance; HLM: humane Lebermikrosomen; MLM: murine Lebermikrosomen; MK: MK-2206; Ipa: Ipatasertib.

Die kinetischen Löslichkeiten der Testsubstanzen in wässrigem Medium bei pH 7.4 lagen mit Ausnahme von Verbindung **9a** unterhalb von 100 μM , was vergleichsweise gering ist und auf den stark hydrophoben Charakter der Substanzen zurückzuführen ist.^[347]

Ebenfalls gering fielen die im PAMPA-Assay bestimmten passiven Permeabilitäten der Verbindungen über eine artifizielle Lipidmembran aus, wobei **3a**, **4**, **7** und **14** praktisch nicht durch die Membran diffundierten (<5 %); für die Verbindungen **9a** und **11** konnte ein Flux von lediglich 18 bzw. 24 % detektiert werden.^[348-349]

Mithilfe des Caco-2-Assays kann unter Verwendung jener epithelialer Darmkrebszelllinie die intestinale Permeabilität und Absorption der Testverbindungen bestimmt werden, wodurch potentiell Rückschlüsse auf die orale Bioverfügbarkeit in Tiermodellen ermöglicht werden.^[350-352] Durch Bestimmung der Permeation von der apikalen zur basolateralen Seite (A→B) sowie entgegengesetzter Richtung (B→A) kann das globale Efflux-Verhältnis (B→A/A→B) ermittelt werden, welches die bevorzugte Tendenz von Influx (<1) bzw. Efflux (>1) widerspiegelt. Für alle getesteten Verbindungen konnte nur eine sehr geringe Permeation von der apikalen zur basolateralen Seite beobachtet werden ($0.4\text{--}2.2 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$), während simultan eine hohe auswärtsgerichtete Permeation ($40\text{--}129 \times 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$) gegeben war, was zu sehr hohen Efflux-Verhältnissen von 59 bis 245 führte. Die auswärtsgerichtete Permeation kann sowohl durch passive Diffusion als auch durch aktiven Transport, bspw. vermittelt durch den Effluxtransporter P-Glykoprotein (P-gp), erfolgen. Basierend auf den hier präsentierten Ergebnissen wird vermutet, dass keine der getesteten Verbindungen eine ausreichende orale Bioverfügbarkeit in Tiermodellen erzielen wird.

Die sowohl in humanen wie auch in murinen Lebermikrosomen ermittelte intrinsische Clearance (CL_{int}) bzw. Stabilität gegenüber dem hepatischen Phase I-Metabolismus zeigte für die Verbindungen **3a**, **4**, **9a** und **14** sowie für die Referenzverbindungen MK-2206 und Ipatasertib vielversprechende Ergebnisse, lediglich die Verbindungen **7** und **11** schienen empfindlicher gegenüber metabolisierenden Enzymen der Phase I zu sein;^[353-354] hierzu zählen u. a. Cytochrom P450 Monooxygenasen, Dehydrogenasen und Esterasen, die durch Einbringung zumeist polarer und reaktiver Gruppen die anschließende Konjugation mit Glutathion oder Glucuronsäure im Phase II-Metabolismus vorbereiten.^[355-356] Das Harnstoffderivat **7** wies neben der höchsten intrinsischen Clearance (HLM: $24 \mu\text{L min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$; MLM: $67 \mu\text{L min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) auch eine partiell ausgeprägte Instabilität in murinem Plasma auf (30 % Modifikation nach einer Stunde bei 37 °C).

Diese kann sowohl vom reaktiven Michael-Akzeptor herrühren oder aufgrund anderer enthaltener Struktur motive gegeben sein. Auch **4** und **9a** wurden während der Inkubation in murinem Plasma zu 9 bzw. 15 % modifiziert, was jedoch als akzeptabel bewertet werden kann. Verbindung **3a** hingegen zeigte exzellente Stabilitäten in humanem und murinem Plasma (je 99 %).

Die hohe Plasmaproteinbindung, welche für alle Verbindungen beobachtet wurde, ist ein häufig beobachtetes Phänomen im Bereich der (kovalenten) Kinaseinhibitoren, muss jedoch nicht mit negativen Konsequenzen bei der *in vivo* Verwendung assoziiert sein.^[357-358] Zwar steht nur die ungebunden vorliegende Fraktion für den Zelleintritt und die Vermittlung der pharmakodynamischen Effekte zur Verfügung, jedoch beeinflusst die Plasmaproteinbindung auch die pharmakokinetischen Eigenschaften und kann z. B. die Metabolisierung von Wirkstoffen verlangsamen (Depoteffekt).^[359]

Die *in vitro* DMPK-Profilierung zeigte in der Summe die Schwachstellen der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren auf, die vor allem in ihrer schlechten Wasserlöslichkeit und den unzureichenden Permeationseigenschaften liegen. Mit **3a** konnte dennoch eine Verbindung innerhalb dieser Substanzklasse identifiziert werden, die eine geringe intrinsische Clearance in Kombination mit einer ausgezeichneten Plasmastabilität aufweist. Aufgrund dieser positiven Eigenschaften kann Verbindung **3a** als Leitstruktur betrachtet werden, deren Verwendbarkeit in Tiermodellen mittels *in vivo* MTD- und PK-Studien nachfolgend analysiert werden sollte.

3.10 *In vivo* MTD- und PK-Studien

Um neue chemische Entitäten in tierischen Modellen testen zu können, müssen diese für eine intravenöse oder intraperitoneale Applikation in gelöster Form vorliegen, wofür ein geeignetes Lösungsmittel benötigt wird. Aufgrund des oftmals stark lipophilen Charakters derartiger Substanzen, ist deren intrinsische Löslichkeit in wässrigen Medien häufig gering, was auch für die kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren beobachtet wurde (Tabelle 9). Da die Verwendung organischer Lösemittel wie DMF oder DMSO aufgrund ihrer Toxizität bzw. ihrer unzureichenden Biokompatibilität jedoch sehr limitiert ist, kommen im Zuge der Formulierungsfindung häufig pharmazeutische Hilfsstoffe wie Kosolventien (Ethanol, Polyethylenglykole), Puffersysteme (Citrat, Phosphat), Komplexbildner (Cyclodextrine), Lipide (Pflanzenöle, Lecithine [Phosphatidylcholine]) und grenzflächenaktive Substanzen (Polysorbate) mit emulgatorischen Eigenschaften zum Einsatz, die eine gesteigerte Löslichkeit in wässrigen Medien vermitteln und eine Applikation der Substanz ermöglichen sollen.

Im Zuge der Identifizierung eines geeigneten Vehikels für Verbindung **3a** wurden diverse gängige Formulierungen getestet (Tabelle 31), welche die Kosolventien Ethanol, DMSO, PEG200 und PEG400, Phosphatpuffer, den Komplexbildner β -Cyclodextrin, sowie die nicht-ionischen Tenside Cremophor EL und Solutol in verschiedenen Kombinationen enthielten. Keiner der drei letztgenannten Lösungsvermittler konnte dazu beitragen die Löslichkeit von **3a** in wässrigem Medium zu erhöhen, so dass selbst bei einer geringen theoretischen Konzentration von 2 mg/mL bzw. 3.35 mM der Substanz **3a** Suspensionen erhalten wurden. Auch in DMSO/PBS (20:80) sowie DMSO/PBS/PEG200 (10:40:50) konnte keine vollständige Löslichkeit der Verbindung erreicht werden. Mit vier der getesteten Formulierungen konnte der Feststoff von **3a** jedoch vollständig gelöst werden, wobei Konzentrationen von 2 mg/mL (3.35 mM) (DMSO/PEG200 [10:90], DMSO/PEG400 [10:90], PBS/PEG200 [60:40]) bzw. 5 mg/mL (8.38 mM) (DMSO/PEG200 [20:80]) erhalten wurden.

Für die nachfolgenden Mausstudien wurden abhängig von der Applikationsform unterschiedliche Formulierungen verwendet; im Fall der intravenösen (i.v.) Verabreichung wurde die Substanz in reinem DMSO gelöst, während die Verbindung für die intraperitoneale (i.p.) und perorale (p.o.) Applikation in PBS/PEG200 (60:40) formuliert wurde. Die Durchführung der Mausstudien erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jan G. Hengstler am Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund (IfADo), während die LC-MS/MS-Analytik der Plasmaproben von der Lead Discovery Center GmbH durchgeführt wurde.

Zunächst sollte die maximal tolerierbare Dosis (MTD) der Verbindung **3a** in Mäusen (Stamm: RjOrl:SWISS) nach intraperitonealer Verabreichung identifiziert werden. Angefangen bei einer einmaligen Dosis von 10 mg/kg (mit 10 mL/kg), sollte die Konzentration im weiteren Verlauf nach jeweils drei Tagen um je 20 mg/kg gesteigert werden. Da jedoch bereits bei einer Dosis von 30 mg/kg erste Anzeichen von Substanz-induzierter Toxizität zu beobachten waren, wurde die Dosis nach weiteren drei Tagen wieder auf 20 mg/kg reduziert und aufgrund ausbleibender Toxizitätserscheinungen als MTD für **3a** definiert.

Im nächsten Schritt sollten die *in vivo* pharmakokinetischen Eigenschaften nach intravenöser, intraperitonealer und peroraler Applikation ermittelt werden. Hierfür wurden Dosierungen von 2 mg/kg (i.v.) bzw. 20 mg/kg (i.p., p.o.) verwendet. Nach verabreichter Einmaldosis erfolgte jeweils nach 5, 15, 45 und 135 Minuten eine Blutentnahme durch Punktion der *Vena facialis* und daraus resultierender submandibulärer Blutung; diese Methode stellt im Vergleich zur Blutentnahme aus dem retrobulbären Venenplexus oder der *Vena saphena* eine schonendere und stressfreiere Alternative für die Tiere dar.^[360-361] Die erhaltenen Plasmakonzentrations-Zeit-Profile und die daraus abgeleiteten pharmakokinetischen Parameter sind in Abbildung 34 und Tabelle 10 dargestellt.

Unabhängig von der Applikationsform wurde die Substanz gut vertragen und es konnten keine Anzeichen von akuter Toxizität bei den behandelten Mäusen beobachtet werden. Die Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven zeigten abhängig von der Applikationsform deutliche Unterschiede. Für die i.v.-Dosierung war ein typischer exponentieller Konzentrationsabfall über die Zeit detektierbar; bei dieser

Art der Applikation gelangt die vollständige Substanzmenge unmittelbar ins Blut und bedarf somit keiner intestinalen Absorption und unterliegt zudem keiner hepatischen Metabolisierung (First-Pass-Effekt).

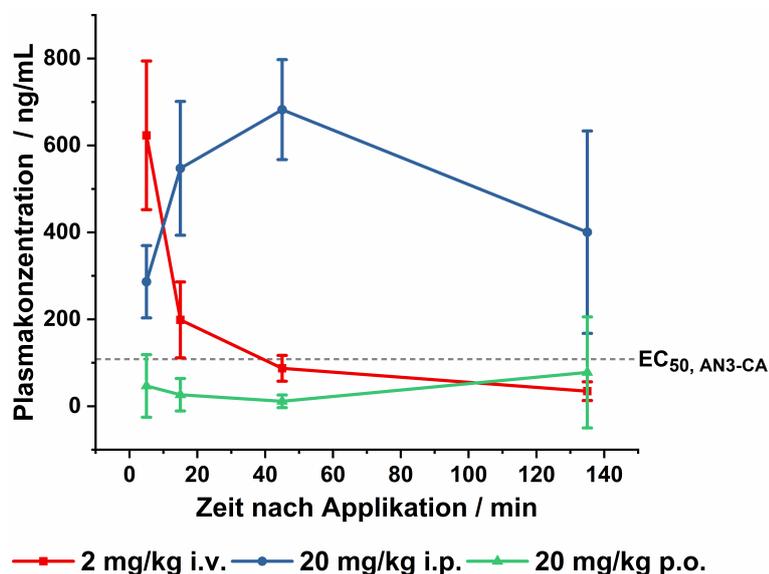


Abbildung 34. Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven von Verbindung **3a** nach intravenöser (i.v., rot), intraperitonealer (i.p., blau) und oraler (p.o., grün) Applikation in 8-10 Wochen alten Mäusen (RjOrl:SWISS). Für die intravenöse Verabreichung (2 mg/kg, 1 mL/kg) wurde die Substanz in DMSO gelöst, für die intraperitoneale und orale Applikation (je 20 mg/kg, 10 mL/kg) wurde **3a** in PBS/PEG200 (60:40) formuliert. Nach 5, 15, 45 und 135 min wurden Blutproben durch submandibuläre Blutung in Folge der Punktion der *Vena facialis* an alternierenden Stellen entnommen.^[360-361] Das Blutplasma wurde durch Zentrifugation isoliert und die Bestimmung der Plasmakonzentration von **3a** erfolgte mittels LC-MS/MS-Analyse. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 3$). Die gestrichelte Linie (grau) repräsentiert beispielhaft den EC_{50} -Wert für **3a** in AN3-CA-Zellen (Tabelle 8).

Anhand dieses Profils kann die maximal mögliche Exposition abgeleitet werden, welche sich aus der Fläche unterhalb der zugehörigen Kurve (*area under the curve*, AUC) ergibt und bei $304 \text{ h} \cdot \text{ng/mL}$ liegt. Die Kombination aus geringer Halbwertszeit ($t_{1/2} = 0.85 \text{ h}$) und mittlerem bis hohem Verteilungsvolumen im Gleichgewichtszustand ($V_{ss} = 4.94 \text{ L/kg}$) resultiert in einer hohen Clearance ($CL = 5.77 \text{ L/h/kg}$), welche sich aus Metabolisierung und Exkretion zusammensetzt. Im Vergleich hierzu wies die Plasmakonzentrationskurve nach intraperitonealer Applikation eine Peakkonzentration von $C_{max} = 682 \text{ ng/mL}$ nach $T_{max} = 0.75 \text{ h}$ auf, wobei eine Exposition von $AUC_{0-t} = 1201 \text{ h} \cdot \text{ng/mL}$ detektiert wurde. Relativ zur verwendeten Dosis und zur Exposition bei intravenöser Verabreichung ergibt sich hieraus eine Bioverfügbarkeit von $F_{0-t} = 39.6 \%$, was als akzeptabel betrachtet

werden kann. Auch bei dieser Applikationsform ist keine intestinale Absorption erforderlich, allerdings gelangt die applizierte Substanz aus dem Peritonealraum (Bauchföhle, *Cavitas peritonealis*) über die Portalvene (*Vena portae*) in die Leber, wo die Verbindung durch metabolische Prozesse umgesetzt wird, bevor sie in die systemische Zirkulation gelangt. Clearance und Verteilungsvolumen konnten mangels Datenpunkten in der terminalen Phase für diese Applikationsroute nicht analysiert werden.

Tabelle 10. *In vivo* pharmakokinetische Eigenschaften von Verbindung **3a**.

PK Parameter	i.v. (2 mg/kg)	i.p. (20 mg/kg)	p.o. (20 mg/kg)
$t_{1/2}$ / h	0.85	n.a.	n.a.
T_{max} / h	0.08	0.75	2.25
C_0 / ng/mL (μ M)	1104 (1.85)	-	-
C_{max} / ng/mL (μ M)	623 (1.04)	682 (1.14)	78 (0.13)
AUC_{0-t} / h*ng/mL	304	1201	85
CL / L/h/kg	5.77	n.a.	n.a.
V_{ss} / L/kg	4.94	n.a.	n.a.
F_{0-t} / %	-	39.6	2.8

$t_{1/2}$: Halbwertszeit; T_{max} : Zeitpunkt, bei der die maximale Konzentration erreicht ist; C_0 : extrapolierte Anfangskonzentration; C_{max} : maximale (detektierte) Konzentration; AUC_{0-t} : Fläche unter der Plasmakonzentrationskurve bis zum letzten analysierten Zeitpunkt (135 min); CL: Clearance; V_{ss} : Verteilungsvolumen im Gleichgewichtszustand (*steady state*); F_{0-t} : Bioverfügbarkeit. n.a.: nicht auswertbar aufgrund von unzureichenden Datenpunkten in der terminalen Phase (i.p.) bzw. eines Konzentrationsanstiegs in der terminalen Phase (p.o.).

In Folge der oralen Verabreichung konnte Verbindung **3a** nur in Spuren im Plasma nachgewiesen werden. Die maximale Konzentration von $C_{max} = 78$ ng/mL wurde erst nach $T_{max} = 2.25$ h erreicht, zeigt jedoch eine sehr hohe Standardabweichung und ist somit als nicht belastbar zu betrachten. Eine Bioverfügbarkeit von $F_{0-t} < 5$ % kann durch eine ungenügende intestinale Absorption während der Darmpassage und durch den anschließenden First-Pass-Effekt erklärt werden. Diese Beobachtungen korrelieren wiederum mit den Ergebnissen des Caco-2-Assays (Tabelle 10), die eine schlechte Resorption über das Darmepithel prognostiziert hatten, und unterstreichen zudem das Optimierungspotential dieser Leitstruktur.

Der in Abbildung 34 dargestellte EC_{50} -Wert der AN3-CA-Zelllinie (190 nM bzw. 113 ng/mL) indiziert, dass bei intraperitonealer Dosierung ein Plasmaspiegel von **3a** oberhalb dieser Konzentration über den betrachteten Zeitraum von 135 min erreicht wird. Von Vorteil könnte ebenfalls der kovalente Bindungsmodus dieser Substanz sein, der die Dauer der pharmakodynamischen Effekte maximieren könnte und somit ggfs. der hohen Clearance, welche im Fall der intravenösen Verabreichung detektiert wurde, entgegenwirkt. Eine ausreichende Tumorpenetration der Substanz vorausgesetzt, könnte die erzielte Plasmakonzentration für eine *in vivo*-Wirksamkeit in AN3-CA-Xenograft-Studien ausreichend sein, was in Folgestudien näher untersucht werden sollte.^{vi}

^{vi} Xenograft-Studien mit den Brustkrebszelllinien T-47D und ZR-75-1 wären aufgrund ihrer höheren Sensitivität gegenüber der Substanz **3a** ebenfalls von Interesse gewesen, konnten aber wegen der benötigten Estradiol-Zufuhr während der Anwachphase dieser Tumortypen nicht realisiert werden.

3.11 *In vivo*-Wirksamkeitsstudie

Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse der *in vivo* PK-Studie, sollte anhand von Leitstruktur **3a** der Machbarkeitsnachweis erbracht werden, dass kovalent-allosterische Akt-Inhibitoren eine antitumorale Wirksamkeit in PI3K/Akt-Signalweg-alterierten Xenograft-Modellen vermitteln können. Hierfür sollten Zelllinien-abgeleitete Xenografts (CDX, *cell line derived xenografts*) unter Verwendung der endometrialen Zelllinie AN3-CA (PIK3R1^{R557_K561>Q}, PTEN^{R130fs}) zunächst etabliert werden, um anschließend die *in vivo*-Wirksamkeit von **3a** zu analysieren. Diese Arbeiten erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Stephan A. Hahn an der Ruhr-Universität Bochum.

Hierfür wurde nach subkutaner Implantation von zuvor präparierten Tumorstückchen in den Schulterblattbereich von NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}-Mäusen und Erreichen eines Tumolvolumens von ca. 200 mm³ die Behandlung mit Verbindung **3a** begonnen (20 mg/kg i.p., einmal täglich [QD, *quaque die*]). Eine zweite Therapiekohorte wurde zusätzlich mit dem MEK-Inhibitor Trametinib behandelt; die tägliche Applikation von 0.5 mg/kg dieses Inhibitors erfolgte auf peroraler Route an fünf Tagen pro Woche gefolgt von zwei Tagen Behandlungspause, wohingegen Tiere der Kontrollkohorte nicht behandelt wurden. Die Tumorumfänge wurden dreimal wöchentlich erfasst und nach Abschluss der Studie gegen die Behandlungsdauer aufgetragen (Abbildung 35). Aus dieser Auftragung wird deutlich, dass für keine der getesteten Behandlungsstrategien eine stabile Erkrankung (SD, *stable disease*) oder gar eine partielle Remission (PR, *partial response*) erreicht werden konnte, stattdessen zeigten beide Therapiekohorten einen progressiven Krankheitsverlauf (PD, *progressive disease*). PR (-30 % ab Therapiebeginn) bzw. PD (+20 % ab Therapiebeginn) sind entsprechend der *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (RECIST) 1.1 Kriterien definiert, wobei stabile Erkrankungen zwischen diesen beiden Grenzwerten liegen. Für beide Therapiekohorten konnte lediglich ein verlangsamtes Tumorwachstum im Vergleich zur Kontrollkohorte detektiert werden, weshalb diese Xenograft-Studie bereits nach sieben (Kontrolle, **3a**) bzw. acht Tagen (Trametinib + **3a**) beendet wurde. Zu diesen Zeitpunkten entsprach das durchschnittliche Tumorumfang in beiden Kohorten bereits dem ca. 4-fachen Volumen seit Therapiebeginn.

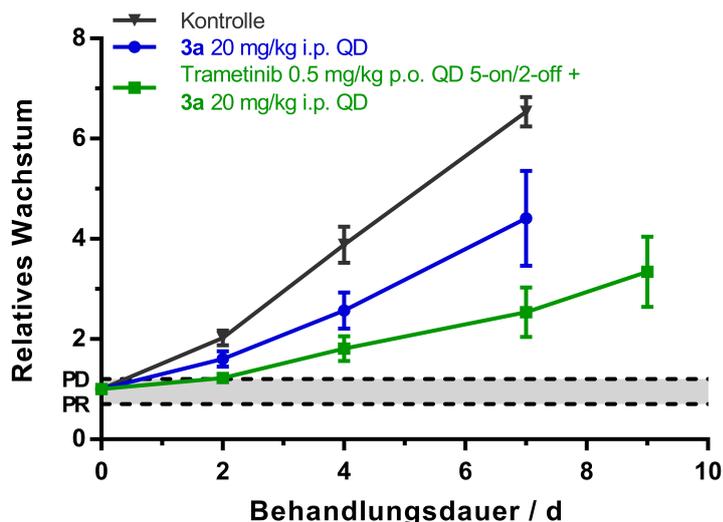


Abbildung 35. *In vivo*-Wirksamkeitsstudie von Verbindung **3a** als Monotherapie (blau) oder in Kombination mit dem MEK-Inhibitor Trametinib (grün) in subkutanen Xenograft-Modellen der Endometrium-Zelllinie AN3-CA in NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}-Mäusen. Das relative Wachstum (Tumolvolumen) wurde über den angegebenen Zeitraum überwacht. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung (Kontrolle: $n = 3$; **3a**, Trametinib + **3a**: $n = 4$). Die gestrichelten Linien indizieren eine partielle Remission (PR, -30 % im Vergleich zum Startwert) bzw. eine progressive Krankheit (PD, +20 % im Vergleich zum Startwert) entsprechend der *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (RECIST) 1.1 Kriterien. QD: einmal täglich (*quaque die*).

Unabhängig vom zuvor ermittelten Plasmaprofil von Verbindung **3a** und dem *in vitro* bestimmten EC₅₀-Wert der AN3-CA-Zelllinie (Abbildung 34), welcher zumindest über den betrachteten Zeitraum von 135 min unterhalb der erreichten Plasmakonzentration lag, konnte in den Xenograft-Studien bei einer täglichen Applikation der maximal tolerierbaren Dosis von 20 mg/kg keine Wirksamkeit beobachtet werden, die zu einem stabilen Krankheitsbild oder sogar einer (partiellen) Tumorrückbildung führte. Auch die Kombination mit dem MEK-Inhibitor Trametinib, welcher für eine Runterregulierung des Raf/MEK/Erk-Signalwegs und eine Unterdrückung von möglichen *bypass*-Mechanismen eingesetzt wurde, zeigte keinen Behandlungserfolg. Die exakten Gründe für diese Beobachtungen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht eruiert, mögliche Erklärungsansätze sollen in der Folge aber diskutiert werden.

Die während der PK-Studie ermittelten Plasmaprofile (Abbildung 34) repräsentieren die Gesamtkonzentration der Verbindung **3a** in der löslichen Fraktion des Vollbluts ungeachtet des Bindungszustands der Substanz. Die *in vitro* detektierte sehr hohe Plasmaproteinbindung (99 %) legt jedoch nahe, dass die reale Konzentration des ungebundenen, freien Inhibitors deutlich geringer ist.

Unter Annahme einer 100-fach geringeren realen Konzentration würde zu keinem Zeitpunkt die halbmaximale effektive Konzentration tatsächlich erreicht werden. Darüber hinaus würde eine halbmaximale Inhibition in Xenograft-Experimenten bestenfalls einen stabilen Krankheitsverlauf induzieren; für eine (partielle) Remission wäre eine Betrachtung des EC₈₀-Wertes wahrscheinlich von größerem prognostischem Wert. Zwar sollte der irreversible Bindungsmodus für einen verlängerten pharmakodynamischen Effekt auch bei geringerer Exposition sorgen, dennoch kann im Fall einer unzureichenden Exposition und ggfs. einer mangelhaften Penetration des Tumorgewebes nur ein Bruchteil der vorhandenen Akt-Moleküle in den Tumorzellen gebunden und inhibiert werden. Um diese Hypothese näher zu beleuchten, könnten pharmakodynamische Analysen wie z. B. Western Blots oder immunhistochemische Untersuchungen von Tumorgewebsproben durchgeführt werden, die Aufschluss über den Aktivitätszustand von Akt geben könnten.

Da auch die Kombinationstherapie mit Trametinib keinen Behandlungserfolg brachte, kann ein Raf- bzw. MEK-vermittelter Kompensationsmechanismus ausgeschlossen werden. Wie jedoch in Kapitel 1.3.4 beschrieben, können auch andere PI3K-regulierte Kinasen kompensatorische Funktionen übernehmen; hierzu zählen u. a. PDK1, SGK3 und BTK. Aufgrund der vorliegenden Alterationen in PI3K und PTEN könnte z. B. mithilfe von PI3K-spezifischen Inhibitoren die genaue Rolle dieses Akt-Aktivators in der Vermittlung von *bypass signalling* sowie die zelluläre Abhängigkeit von diesem Onkogen untersucht werden. Auch hier könnten pharmakodynamische Untersuchungen zur Aufklärung und Identifikation von involvierten Proteinen beitragen.

Auch der allosterische Referenzinhibitor Miransertib, welcher momentan in klinischen Studien der Phase I und II analysiert wird, wurde in AN3-CA-basierten Xenograft-Modellen mit mäßigem Erfolg getestet.^[311] Bei täglicher oraler Verabreichung von 100 mg/kg wurden Plasmalevel von bis zu 2 µM erreicht, die ebenfalls nur in verzögertem Tumorwachstum (55 % gegenüber unbehandelter Kontrolle nach 10 Tagen) resultierten. Somit ist die Verwendung bzw. die Relevanz von AN3-CA-Xenograft-Modellen für die Evaluierung der präklinischen Wirksamkeit von Akt-Inhibitoren möglicherweise generell kritisch zu betrachten.

3.12 Akt-Inhibitoren in KRAS-mutierten Modellsystemen

Neben der endometrialen Zelllinie AN3-CA standen keine weiteren kommerziell erhältlichen, Xenograft-kompatiblen Modellsysteme zur Verfügung; die im Fall der sensitiven Brustkrebszelllinien T-47D und ZR-75-1 erforderliche Estradiol-Supplementierung während der Tumorimplantation konnte, wie bereits oben angemerkt, in den kooperierenden Arbeitsgruppen nicht realisiert werden. Aus diesem Grund sollte die Verwendbarkeit und die Wirksamkeit von Verbindung **3a** in KRAS-mutierten, Patienten-abgeleiteten Zelllinien und Xenograft-Modellen des Pankreas- und Kolorektalkarzinoms untersucht werden. Das Rational für diesen Ansatz beruht auf der ausgeprägten Resistenzentwicklung und der Wiederkehr von KRAS-mutierten Tumoren (Rezidiv, *relapse*) im Anschluss an eine initiale Remission dieser Tumortypen in Folge der Behandlung mit MEK-Inhibitoren wie Trametinib; als mögliche Ursache hierfür wird eine Inhibitor-vermittelte Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs und damit einhergehende kompensatorische Funktionen vermutet.^[362-364] Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine vollständige KRAS-Ablation in der Überaktivierung von PI3K und den nachgeschalteten Signalweg-Komponenten resultiert.^[365] Trotz der zuvor beobachteten moderaten inhibitorischen Aktivität gegenüber den KRAS-mutierten Pankreaskarzinom-Zelllinien Dan-G und HPAF-II (Tabelle 8), könnte die gezielte Inhibition von Akt insbesondere in Kombination mit Inhibitoren des MAPK-Signalwegs neue Therapiestrategien ermöglichen.

Um diese Hypothese der synergistischen Effekte von simultaner Akt- und MEK-Inhibition zu validieren, wurde zuerst die proprietäre, Patienten-abgeleitete, KRAS-mutierte Pankreaskarzinom-Zelllinie Bo103 für *in vitro* Analysen verwendet. Diese primäre Zelllinie (*early passage cell line*) entstammte der Gewebeprobe eines Patienten des Ruhr-Universität Comprehensive Cancer Center (RUCCC) und wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan A. Hahn an der Ruhr-Universität Bochum für die *in vitro* Kultivierung etabliert. In initialen Viabilitätsstudien wurden die anti-proliferativen Wirksamkeiten von Verbindung **3a** und Trametinib sowie deren Kombination gegenüber dieser Primärzelllinie untersucht (Abbildung 36). Die Behandlung mit **3a** führte auch bei hohen Konzentrationen bis zu 30 μM nur zu einer geringen Reduktion der Zellviabilität ($\sim 50\%$), was anhand der fehlenden

Alteration im PI3K/Akt-Signalweg zu erklären ist. Die Trametinib-Behandlung hingegen zeigte eine höhere Wirksamkeit im Vergleich zu **3a**, allerdings konnte auch bei einer Konzentration von 30 μM keine vollständige Eliminierung der Zellviabilität beobachtet werden ($\sim 70\%$). Trotz der Abhängigkeit dieser Zelllinie von der KRAS^{mut}-vermittelten Signaltransduktion scheint die Viabilität einer Subpopulation nicht durch MEK-Inhibition beeinflusst zu werden. Dies könnte auf eine hohe genetische Heterogenität innerhalb dieser Zelllinie bzw. innerhalb des ursprünglichen Tumors hindeuten. Derartige intratumorale Unterschiede stellen in der klinischen Forschung ein gravierendes Problem dar, da sie - Stand heute - oft nur unzureichend detektiert werden können und für die Vermittlung von Resistenzen gegen gezielte Therapieansätze verantwortlich sein können.^[366] Im Gegensatz zu den Behandlungen mit nur einem Wirkstoff, konnte bei der kombinierten Verwendung von **3a** und Trametinib eine nahezu vollständige Hemmung der Zellviabilität ($\sim 95\%$) ab einer Gesamtkonzentration von ca. 5 μM (2.5 μM **3a** + 2.5 μM Trametinib) erreicht werden; die halbmaximale effektive Konzentration lag für die Kombinationsbehandlung bei ca. 80 nM. Diese Ergebnisse legen einen synergistischen Mechanismus von Akt- und MEK-Inhibition in dieser Primärzelllinie nahe, der eine potente anti-proliferative Wirksamkeit vermittelt, wohingegen die Inhibitoren bei Einzelanwendung nur eine unzureichende Hemmung der Zellviabilität erlauben.

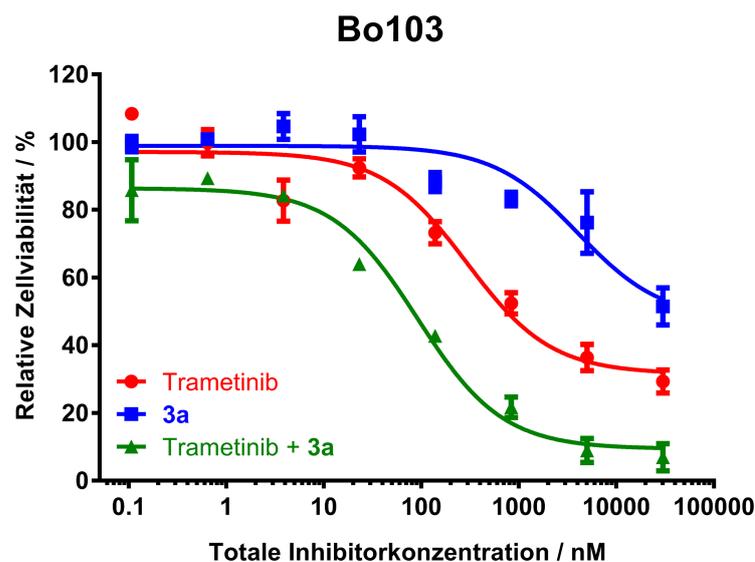


Abbildung 36. Viabilitätsstudien mit der KRAS-mutierten Pankreaskarzinom-Zelllinie Bo103 zur Charakterisierung der anti-proliferativen Eigenschaften von Akt-Inhibitor **3a**, MEK-Inhibitor Trametinib und deren Kombination.

Um diese synergistischen Effekte auf molekularer Ebene zu analysieren, wurden Bo103-Zellen wie zuvor mit den einzelnen Inhibitoren oder deren Kombination behandelt, für anschließende Western Blot-Studien lysiert und der lösliche Überstand gelelektrophoretisch aufgetrennt. Neben dem Aktivierungszustand von Akt und Erk (als Effektor von MEK) wurde wiederum das Phosphorylierungslevel von S6 und 4E-BP1 untersucht, um mögliche Korrelationen mit der anti-proliferativen Wirksamkeit der Substanzen aufzudecken (Abbildung 37). Die Behandlung mit **3a** resultierte in einer Dosis-abhängigen Dephosphorylierung von Akt^{S473} verbunden mit einer moderaten Runterregulierung von pS6^{S235/S236}. Die zellulären Level von p4E-BP1^{S65} zeigten hingegen keine signifikanten Änderungen. Ähnliche Beobachtungen wurden für die Behandlung mit Trametinib gemacht, wobei pErk1/2^{T202/Y204} und pS6^{S235/S236} runterreguliert wurden. Ausschließlich bei der Kombinationsbehandlung konnte eine nahezu vollständige Dephosphorylierung von pS6^{S235/S236} in Folge der simultanen Inhibition von Akt und MEK erzielt werden, die im Fall der Monotherapie weder für **3a** noch für Trametinib erreicht wurde. Zudem konnte eine geringe Runterregulierung von p4E-BP1^{S65} detektiert werden. Diese synergistischen Effekte der beiden Inhibitoren könnten eine Erklärung für die gesteigerte anti-proliferative Wirksamkeit der Kombinationstherapie darstellen und repräsentieren somit das Rational diese Wirkstoffkombination in Mausmodellen zu testen.

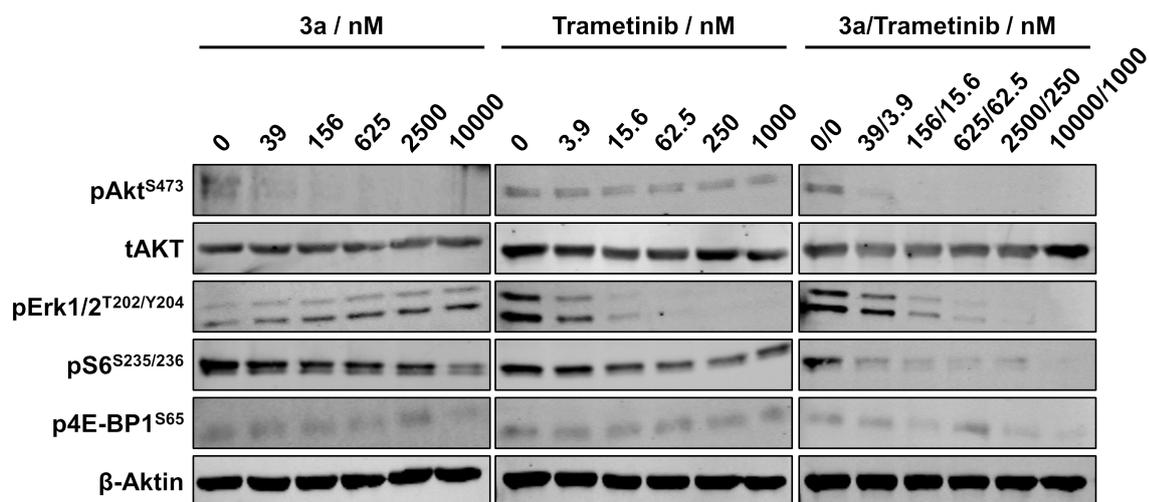


Abbildung 37. Western Blots der Primärzelllinie Bo103 nach Behandlung mit **3a**, Trametinib oder der Kombination aus beiden Inhibitoren bei den angegebenen Konzentrationen für 24 h. β -Aktin fungierte als interne Beladungskontrolle.

3.13 *In vivo*-Wirksamkeit in PDAC/CRC-PDX-Modellen

Nachdem die Effizienz dieser Kombinationsbehandlung *in vitro* nachgewiesen werden konnte, sollte eine Übertragbarkeit auf relevante *in vivo*-Modelle untersucht werden. Hierzu wurden KRAS-mutierte, Patienten-abgeleitete Xenograftmodelle (PDX, *patient-derived xenograft*) des Pankreas- (PDAC, *pancreatic ductal adenocarcinoma*) und Kolorektalkarzinoms (CRC, *colorectal carcinoma*) verwendet, deren Etablierung ebenfalls in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan A. Hahn an der Ruhr-Universität Bochum erfolgt war. Um einen direkten Vergleich der Wirksamkeiten zu ermöglichen, wurden neben der Kontrollkohorte, die nach der Tumorimplantation keine Behandlung erfuhr, drei Therapiekohorten pro Tumormodell eingesetzt: die erste Therapiegruppe wurde einmal täglich an fünf aufeinander folgenden Tagen pro Woche (5-on/2-off) mit 0.5 mg/kg Trametinib (p.o.) behandelt; die zweite Kohorte erhielt eine tägliche Behandlung mit 20 mg/kg der Verbindung **3a** (i.p.); die dritte Kohorte wurde mit beiden Substanzen in identischen Therapieschemata wie bei der Monotherapie behandelt. Insgesamt wurden acht PDX-Modelle verwendet; drei hiervon stammten aus Pankreaskarzinomen (Bo73, Bo85, Bo103) und fünf aus Kolorektalkarzinomen (BoC14, BoC78, BoC105, BoC137, BoC147).

Alle PDX-Modelle wiesen eine hohe Sensitivität gegenüber dem MEK-Inhibitor Trametinib auf (Abbildung 38), so dass in sechs Fällen ein stark verlangsamtes Tumorwachstum und in zwei Fällen (BoC137, BoC147) sogar ein stabiles Krankheitsbild nach 28-tägiger Behandlung beobachtet werden konnte. Die Monotherapie mit dem Akt-Inhibitor **3a** führte in nur einem Modell (BoC105) zu einem merklich verlangsamten Tumorwachstum, wohingegen in den restlichen sieben Modellen keine antitumorale Wirksamkeit von **3a** festgestellt werden konnte. Die hohe Wirksamkeit von Trametinib als Monotherapeutikum war bei der Profilierung der Kombinationstherapie besonders zu berücksichtigen. Um belastbare Aussagen über mögliche synergistische Effekte bei der Kombinationsbehandlung treffen zu können, wurde daher die statistische Signifikanz auf den Unterschied im Tumolvolumen zwischen Kombinationskohorte und Kontroll- bzw. Trametinib-Kohorte zum finalen Zeitpunkt ermittelt.

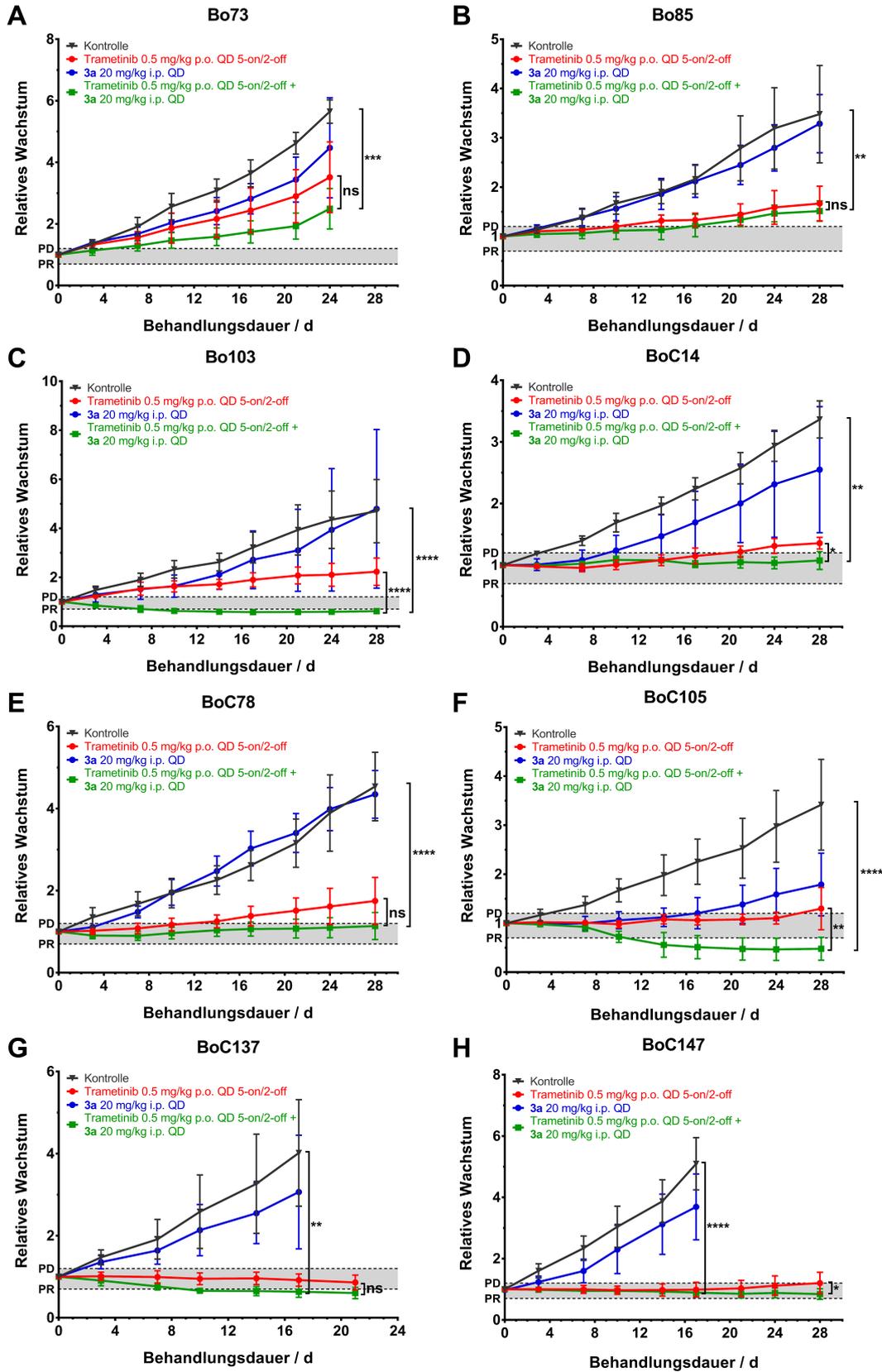


Abbildung 38. *In vivo*-Wirksamkeitsstudie von 3a, Trametinib und deren Kombination in PDX-Modellen des Pankreas- (Bo) bzw. Kolorektalkarzinoms (BoC). Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 3$). Die gestrichelten Linien indizieren eine partielle Remission (PR, -30 % im Vergleich zum Startwert) bzw. eine progressive Krankheit (PD, +20 % im Vergleich zum Startwert) entsprechend der *Response Evaluation Criteria in Solid Tumors* (RECIST) 1.1 Kriterien. QD: einmal täglich (*quaque die*); ns: nicht signifikant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

Insgesamt resultierte die Kombinationstherapie in zwei progressiven Krankheitsverläufen (Bo73, Bo85), drei stabilen Krankheitsbildern (BoC14, BoC78, BoC147) sowie drei partiellen Remissionen (Bo103, BoC105, BoC137) nach Abschluss der Behandlung. Ein qualitativer Vergleich zwischen Kombinationstherapie und Monotherapie mit Trametinib deutete also einen generellen Wirksamkeitsvorteil der **3a**/Trametinib-Kombination an.

Die Pankreaskarzinommodelle Bo73 und Bo80 zeigten zwar prägnante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollkohorte, relativ zur Trametinib-Kohorte war jedoch keine signifikante Differenz zur Kombinationskohorte zu erkennen. Für BoC78 und BoC137 konnten mithilfe der Wirkstoffkombination zwar vermeintliche Vorteile gegenüber Trametinib erzielt werden, diese waren jedoch nicht von statistischer Signifikanz.

Die besten Ergebnisse konnten für Bo103 und BoC105 erzielt werden, wobei die **3a**/Trametinib-Kombination jeweils eine dauerhafte partielle Remission induzierte, die Trametinib-Monotherapie hingegen das Tumorwachstum nur verlangsamte (PD); in beiden Fällen waren die Unterschiede hoch signifikant (Bo103: $P < 0.0001$; BoC105: $P < 0.01$). Auch in den Kolorektalkarzinom-PDX-Modellen BoC14 und BoC147 war der Unterschied zwischen Kombinations- (SD) und Trametinib-Kohorte (PD) signifikant ($P < 0.05$). Die Ergebnisse der *in vivo*-Wirksamkeitsstudie sind in Abbildung 39 grafisch zusammengefasst.

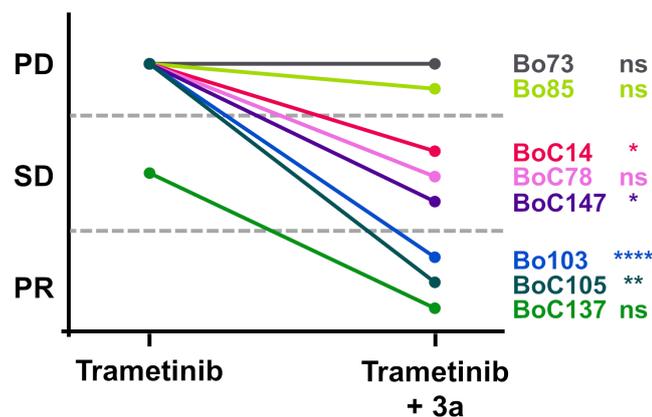


Abbildung 39. Übersicht der Krankheitsverläufe (PD, SD, PR) in den PDX-Modellen in Abhängigkeit von der verwendeten Therapie (Trametinib vs. Trametinib + **3a**). ns: nicht signifikant; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$; ****: $P < 0.0001$.

Anders als in den zuvor durchgeführten AN3-CA-Xenografts, konnte in den PDX-basierten Modellen die *in vivo*-Wirksamkeit von Verbindung **3a** erstmals in klinisch relevanten Systemen nachgewiesen werden. Diese zeigte sich zwar nicht in einem Monotherapieansatz, was jedoch anhand der fehlenden Alterationen im PI3K/Akt-Signalweg und der KRAS^{mut}-Abhängigkeit erklärt werden kann. Stattdessen konnte durch die rationale Kombination des kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors **3a** mit dem MEK-Inhibitor Trametinib dessen Effektivität als Einzeltherapeutikum in vier von acht Modellsystemen signifikant gesteigert werden. Das damit erbrachte *proof of concept* illustriert das Potential des Konzepts der kovalent-allosterischen Adressierung von Akt im Kontext der klinischen Forschung und verdeutlicht zugleich die Notwendigkeit der medizinalchemischen Optimierung dieser Substanzklasse. Aufgrund der bedeutungsvollen Resultate, die unter Verwendung des erstmalig beschriebenen – *first-in-class* – kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors **3a** erzielt werden konnten, erhielt dieser den Namen Borussertib.

3.14 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen das Konzept der kovalent-allosterischen Akt-Inhibition erfolgreich zu etablieren und neben der biochemischen und zellulären Aktivität dieser neuartigen Substanzklasse auch das *proof of concept* der *in vivo*-Wirksamkeit zu demonstrieren. Die identifizierte Leitstruktur Borussertib zeigte hierbei antitumorale Aktivitäten in klinisch relevanten PDX-Modellen des KRAS-mutierten Pankreas- bzw. Kolorektalkarzinoms und stellt somit einen innovativen Ansatz in der zielgerichteten Krebstherapie dar.

Basierend auf publizierten Röntgenkristallstrukturen der Proteinkinase Akt1 im Komplex mit reversiblen allosterischen Liganden wurde in einem struktur-basierten Design eine fokussierte Bibliothek von Liganden entworfen, welche durch Dekoration mit Michael-Akzeptor-Systemen die Cysteine an Position 296 und 310 im Bereich der Aktivierungsschleife von Akt kovalent adressieren sollten. Hierdurch sollte die ausgezeichnete Selektivität der allosterischen Binder mit der maximierten Verweildauer von irreversiblen Liganden kombiniert werden. Die neu entworfenen Moleküle wurden in massenspektrometrischen Analysen hinsichtlich ihres Bindungsmodus gegenüber Akt1, welches zuvor heterolog in Sf9-Insektenzellen exprimiert und säulenchromatographisch gereinigt wurde, charakterisiert. Hierdurch konnte die kovalente und stöchiometrische Adduktbildung zwischen den dargestellten Liganden und dem Protein nachgewiesen werden. Mithilfe von LC-MS/MS-Analysen nach tryptischem Verdau konnten zudem die ursprünglich identifizierten Cysteine 296 und 310 als Inhibitor-modifizierte Aminosäuren ausgemacht werden. Nachfolgende biochemische und kinetische Evaluierungen demonstrieren zudem die potente *in vitro* Wirksamkeit dieser Substanzklasse und erlaubten die Aufstellung einer initialen Struktur-Aktivitäts-Beziehung. Die kinetischen Analysen ermöglichten des Weiteren die Bestimmung der reversiblen Bindungsaffinitäten und maximalen Inaktivierungsraten der kovalenten Liganden und somit ein besseres Verständnis der beobachteten inhibitorischen Potenzen. Unter Verwendung eines speziell designten Proteinkonstrukts, welches ebenfalls in Sf9-Insekten heterolog exprimiert und in mehrstufigen säulenchromatographischen Prozessen gereinigt wurde, konnte die Kokristallisation von Akt1 erfolgreich etabliert werden, wodurch wiederum die

Röntgenkristallstrukturen von Akt1 im Komplex mit vier kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren gelöst werden konnten und Einblicke in den Bindungsmodus erhalten wurden. Die fokussierte Substanzbibliothek wurde mittels chemischer Synthese derivatisiert und wiederum biochemisch und kinetisch charakterisiert. Anhand dieser Daten wurde mit Borussertib ein hochpotenter Akt-Inhibitor mit nanomolarer Affinität und hoher Inaktivierungsrate ($IC_{50} = 0.8 \text{ nM}$; $K_i = 2.2 \text{ nM}$; $k_{\text{inact}} = 0.103 \text{ min}^{-1}$) identifiziert. Profilierungsstudien demonstrierten die ausgezeichnete Selektivität dieser Verbindung gegenüber den drei Akt-Isoformen sowie eine stärkere Inhibition von Akt1 und Akt2 gegenüber Akt3. In zellulären Assays wurden die anti-proliferativen Wirksamkeiten dieser Inhibitoren in einem breiten Spektrum von Brust-, Endometrium- und Pankreaskrebszelllinien nachgewiesen, wobei die besten Verbindungen einstellig nanomolare Wirksamkeiten aufwiesen. Western Blot-Analysen unter Verwendung von Borussertib zeigten den spezifischen *on-target*-Effekt verbunden mit einer potenten Inhibition der Akt-vermittelten Signaltransduktion.

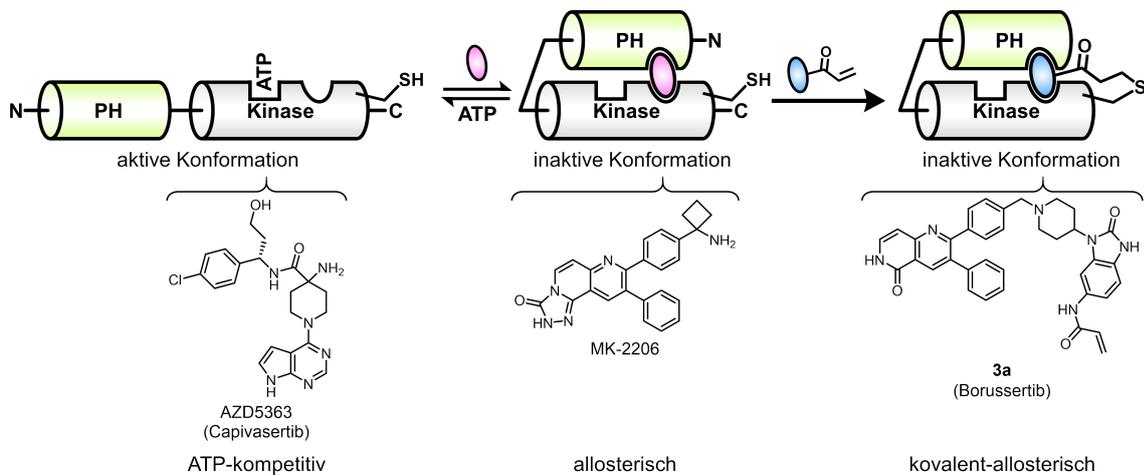


Abbildung 40. Schematische Darstellung der Inhibitionsmechanismen von Akt. ATP-kompetitive Inhibitoren wie Capivasertib binden in der aktiven Tasche und stabilisieren somit die aktive, offene Konformation. Allosterische Liganden wie MK-2206 binden reversibel an der Grenzfläche zwischen PH- und Kinasedomäne und stabilisieren dabei die inaktive, geschlossene Konformation. Kovalent-allosterische Akt-Inhibitoren wie Verbindung **3a** (Borussertib) stabilisieren irreversibel die inaktive Konformation durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zu einem Cystein in der Nähe der allosterischen Tasche.

Für eine Auswahl der potentesten Verbindungen wurden die *in vitro* pharmakokinetischen Parameter ermittelt. Diese zeigten neben einer einheitlich schlechten Löslichkeit in wässrigem Medium lediglich moderate Permeabilitäten über artifizielle Membranen sowie *monolayer* von Darmepithelzellen, was Anzeichen für eine schlechte intestinale Absorption und eine geringe orale Bioverfügbarkeit sind. Die Plasma- und Mikrosomenstabilität der Verbindungen war hingegen überdurchschnittlich hoch, ebenso wie die detektierte Plasmaproteinbindung. Unter Berücksichtigung der inhibitorischen Potenzen und PK-Eigenschaften wurde Borussertib für die anschließende Evaluierung in Mausmodellen ausgewählt.

Trotz einer relativ geringen maximal tolerierbaren Dosis von 20 mg/kg bei intraperitonealer Applikation, konnten Plasmakonzentrationen von bis zu 1.14 μM (683 ng/mL) und eine Bioverfügbarkeit von fast 40 % erreicht werden. Bei intravenöser Verabreichung war ein mittleres bis hohes Verteilungsvolumen ($V_{ss} = 4.94 \text{ L/kg}$) in Verbindung mit einer hohen Clearance ($CL = 5.77 \text{ L/h/kg}$) für Borussertib zu beobachten, während bei oraler Applikation keine signifikanten Plasmalevel erhalten wurden. Aufgrund des vielversprechenden Profils bei intraperitonealer Verabreichung wurden *in vivo*-Wirksamkeitsstudien mit Borussertib unter Verwendung der endometrialen Zelllinie AN3-CA durchgeführt, welche eine submikromolare Sensitivität gegenüber dieser Verbindung in Viabilitätsassays besaß. Dennoch konnte keine antitumorale Wirksamkeit des kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors beobachtet werden, was auf eine unzureichende Exposition oder eine geringe Abhängigkeit dieser Zelllinie von den Alterationen in PI3K bzw. PTEN hindeutet.

Da Borussertib jedoch synergistische Effekte in Kombination mit dem MEK-Inhibitor Trametinib in KRAS-mutierten, Patienten-abgeleiteten Zelllinien aufwies, wurden dessen antitumorale Eigenschaften zusätzlich in PDX-Modellen des Pankreas- sowie Kolorektalkarzinoms untersucht. Zwar bewirkte eine Monotherapie mit dem Akt-Inhibitor Borussertib keine Reduktion des Tumorumfanges, allerdings konnten die zuvor *in vitro* beobachteten synergistischen Effekte mit Trametinib in vier von acht PDX-Modellen bestätigt werden, wodurch die präklinische Wirksamkeit von Borussertib erstmalig nachgewiesen wurde.

Mit der erfolgreichen Etablierung dieses Konzepts rücken weitere Fragestellungen der System- und Tumorbilogie in den Fokus, die durch Adaption und Weiterentwicklung von Borussertib möglicherweise untersucht und beantwortet werden können. Wie an den Ergebnissen der Selektivitätsprofilierung gesehen, weist Borussertib eine potentere Inhibition von Akt1 und Akt2 im Vergleich zu Akt3 auf. Aufgrund der Isoform-spezifischen Funktionen von Akt (siehe Kapitel 1.3.1) könnte ein kovalent-allosterischer Ansatz die Entwicklung von Isoform-selektiven Inhibitoren ermöglichen, um somit bspw. gezielt die Tumorstadiums- oder Metastasierungsfähigkeiten zu unterdrücken. Die Entwicklung derartiger Strategien wird bereits aktiv in der Arbeitsgruppe Rauh verfolgt. Aufgrund möglicher Unterschiede in den Reaktivitäten bzw. Verfügbarkeiten der Cysteine an den Positionen 296 und 310 in Akt1 aber auch in Akt2 und Akt3, sollte zudem eine detaillierte Charakterisierung dieser Eigenschaften durchgeführt werden. Hierzu könnten bspw. Proteinkonstrukte verwendet werden, welche jeweils nur eins der beiden genannten Cysteine enthalten, während das jeweils andere durch ein Serin ersetzt wurde. Nach Aktivierung dieser Konstrukte mit PDK1 könnten dann Cystein-spezifische, maximale Inaktivierungsraten (k_{inact}) ermittelt werden, die für die weitere Optimierung der CAAs genutzt werden könnten.

Neben den individuellen Isoformen stellt auch die Akt1^{E17K}-Mutante eine vielversprechende Zielstruktur nicht nur in der Onkologie, sondern auch bei der Behandlung von Überwucherkrankungen wie dem Proteus-Syndrom dar. Die Krankheits-treibenden Eigenschaften dieser Mutation sind auf ein verschobenes Gleichgewicht des Aktivierungszustands von Akt1 zurückzuführen, wobei die aktive, Membran-gebundene Konformation bevorzugt vorliegt. Dies führt zu einer Resistenzvermittlung gegenüber reversiblen allosterischen Inhibitoren, wohingegen die Potenz von ATP-kompetitiven Inhibitoren, die jedoch weniger selektiv wirken, nicht beeinflusst wird (Tabelle 28). Borussertib zeigt jedoch eine ausgezeichnete Selektivität für die Akt-Isoformen sowie eine hohe inhibitorische Aktivität gegenüber der Akt1^{E17K}-Mutante. Strukturbiologische Untersuchungen an Akt1^{E17K} könnten hierbei die rationale Optimierung von Borussertib stimulieren, deren Effektivität darüber hinaus in relevanten zellulären sowie Xenograft-Modellen getestet werden sollte.

Zwar konnte die präklinische Wirksamkeit von Borussertib in KRAS-mutierten Mausmodellen validiert werden, allerdings sollte neben der Verwendungsmöglichkeit in Kombinationstherapien auch der (prä-)klinische Nutzen der Monotherapie in relevanten Modellen mit Alterationen im PI3K/Akt-Signalweg evaluiert werden. Hierfür würden sich die z. B. die kommerziellen Brustkrebszelllinien T-47D und ZR-75-1 anbieten, die *in vitro* eine hohe Sensitivität gegenüber Borussertib aufwiesen. Die Notwendigkeit der Estradiol-Supplementierung im Rahmen der Etablierung dieser Xenograft-Modelle stellt zwar eine Herausforderung dar, könnte jedoch bspw. durch Outsourcing an eine *contract research organisation* bewältigt werden. Ebenso könnte die benötigte Estradiol-Supplementierung möglicherweise durch Injektion der Tumorzellen in das Fettgewebe der Brust umgangen werden. Für die Zelllinie T-47D konnten hiermit gute Anwachsrate erzielt werden, während die Erfolgsquote bei der ZR-75-1-Zelllinie unter 50 % lag.^[367] Diese Methode könnte insbesondere bei der Verwendung von Brustkrebszelllinien sinnvoll sein, die zuvor durch retrovirale Transduktion so modifiziert wurden, dass sie konstitutiv Luciferase exprimieren. Mithilfe von *in vivo* Biolumineszenz-Imaging könnte im Anschluss das Tumorwachstum beobachtet werden.

Neben der Verwendung von kommerziellen Zelllinien wäre auch hier der Einsatz von Patienten-abgeleiteten (Primär-)Zelllinien von Interesse, da diese den Zustand im Patienten besser abbilden als Zellen, die seit Jahrzehnten *ex vivo* kultiviert wurden und sich an die artifiziellen Kultivierungsbedingungen angepasst haben.^[368] Ein besonderer Fokus sollte dabei auf Zelllinien mit genetischen Läsionen gelegt werden, die die Akt-vermittelte Signaltransduktion unmittelbar beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls die Identifizierung und Charakterisierung von prädiktiven Biomarkern von besonderer Bedeutung, die indikatorisch für das Ansprechen auf eine Therapie mit Akt-Inhibitoren sind.

Zwar stellt die Identifizierung und Etablierung von relevanten Modellsystemen eine Herausforderung dar, allerdings gilt es zeitgleich die pharmakokinetischen und -dynamischen Eigenschaften der Leitstruktur Borussertib medizinalchemisch zu optimieren. Insbesondere die schlechte Löslichkeit im wässrigen Milieu sowie die geringe Permeabilität und die damit verbundene unzureichende orale

Bioverfügbarkeit sollten bei der zweiten Generation von kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren optimiert werden, um die Ansprüche eines klinischen Kandidatenmoleküls zu erfüllen. Die in Folge der intravenösen Applikation beobachtete hohe Clearance könnte trotz des kovalenten Bindungsmodus problematisch sein, sofern keine höhere Exposition erreicht werden kann. Eine Möglichkeit zur Reduzierung der Clearance könnte hierbei die Erhöhung der metabolischen Stabilität darstellen, welche nach Identifizierung von sog. metabolischen *hotspots* möglicherweise durch rationale Derivatisierung erreicht werden kann. Trotz der bereits hohen inhibitorischen Potenz von Borussertib könnte durch eine gesteigerte Affinität oder maximale Inaktivierungsrate die pharmakodynamische Wirksamkeit weiter optimiert werden. Hierbei sollte jedoch die potentielle *on-target*-Toxizität berücksichtigt werden, die wahrscheinlich schon im Fall von Borussertib in einer vergleichsweise geringen maximal tolerierbaren Dosis resultierte und die therapeutische Breite dieses Inhibitors limitiert.

Die hier beschriebenen Eigenschaften und Anwendungsmöglichkeiten der neuartigen kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren sind in der Summe ebenso vielseitig wie vielversprechend. Die Optimierung und Evaluierung dieser Substanzklasse stellt somit eine interessante Herausforderung dar, die zukünftig in der Entwicklung eines klinischen Kandidaten resultieren könnte.

4 CHEMISCHE MODULATION DER KEAP1/NRF2-PPI

Der Transkriptionsfaktor (TF) Nrf2 (*nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) ist der Familie der *cap'n'collar* (CNC) *basic-region leucine zipper* (bZIP) Transkriptionsfaktoren zuzuordnen und besteht aus insgesamt sieben Domänen, die die Proteinstabilität, -funktionalität und -interaktion mit Bindungspartnern regulieren (Abbildung 41). Nrf2 vermittelt als zentraler Bestandteil der zellulären Entgiftungsmaschinerie die Transkription von ca. 250 Genen, die unter der Kontrolle von regulatorischen sog. *antioxidant response elements* (AREs) stehen.^[369-370] Jene Gene codieren für eine Vielzahl von Enzymen, die an der Metabolisierung von Xenobiotika, der Proteindegradation und der Regulation von Entzündungsreaktionen beteiligt sind, bspw. Peroxiredoxin-1 (PRDX1), Glutathion-S-Transferase (GST), NAD(P)H:Chinon-Oxidoreduktase 1 (NQO1), und *multidrug resistance-associated protein 1* (MRP).^[371] Hierdurch wird eine facettenreiche Zellantwort auf endo- und exogenen oxidativen Stress ermöglicht, die die Aufrechterhaltung der Homöostase gewährleistet.^[372-373]

Die Funktion von Nrf2 wird maßgeblich durch den E3 Ubiquitin-Ligase Substrat-Adapter Keap1 (*Kelch-like ECH-associated protein 1*, Abbildung 41) reguliert, welcher unter basalen Bedingungen die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von Nrf2 induziert und die intrazelluläre Konzentration von Nrf2 gering hält (Abbildung 42).^[374-377] Die Modifizierung von reaktiven Cysteinen innerhalb der regulatorischen *broad complex*, *tramtrack*, *bric-à-brac* (BTB)- und *intervening region* (IVR)-Domänen durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), Elektrophile oder Xenobiotika induziert schließlich Konformationsänderungen in Keap1, die die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von Nrf2 unterdrücken.^[376, 378] Daraus resultiert eine Akkumulation des TFs im Nukleus, wo Nrf2 die Transkription von pro-inflammatorischen Cytokin-Genen (z. B. IL6 und IL1B) unterdrückt und in Folge der Heterodimerisierung mit kleinen Maf-Proteinen (sMaf, *small musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue*) die Transkription ARE-regulierter Gene initiiert.^[377, 379]

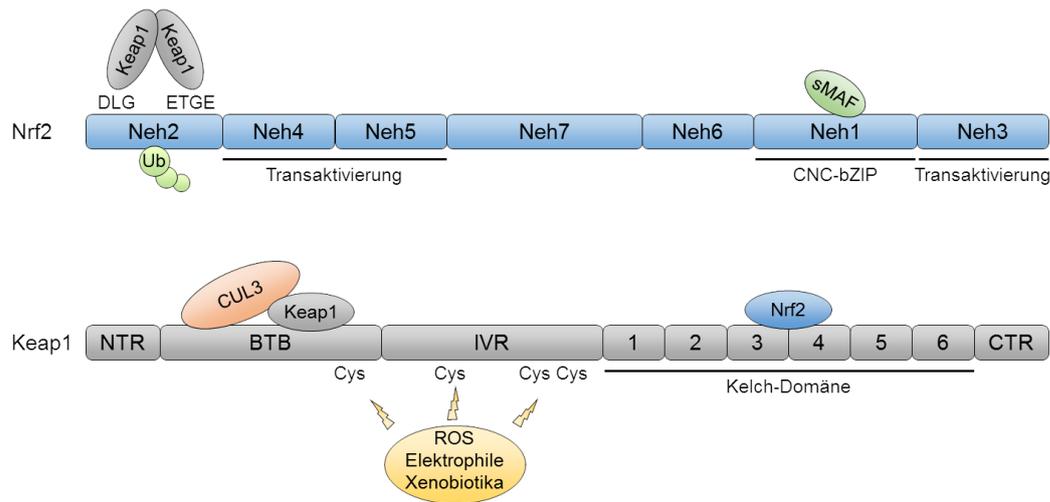


Abbildung 41. Aufbau und Domänenanordnung von Nrf2 und Keap1. Nrf2 (oben) besteht aus sieben NRF2-ECH-Homology (Neh)-Domänen. Die Neh1-Domäne vermittelt die Protein-Protein-Interaktion mit sMaf-Proteinen und die Bindung an ARE-enhaltende DNA-Sequenzen. Das DLG- und ETGE-Motiv in der Neh2-Domäne interagieren mit homodimerisiertem Keap1 und der Linker zwischen beiden Motiven kann durch CUL3 ubiquitiniert werden. Neh3-Neh5 sind für die Transaktivierung zuständig und Neh6 und Neh7 besitzen regulatorische Funktionen (nicht gezeigt). Keap1 enthält neben der N-terminalen (NTR) und C-terminalen Region (CTR) eine BTB-Domäne, welche die Homodimerisierung und Interaktion mit CUL3 vermittelt. Reaktive Cysteine in der BTB- und IVR-Domäne agieren als Sensoren für ROS und Elektrophile. Die Kelch-Domäne mit ihren sechs Kelch-repeats ermöglicht die PPI mit Nrf2. [Adaptiert von ROJO DE LA VEGA *et al.*^[380] und CUADRADO *et al.*^[381]]

Diese vielseitigen zytotoxischen Eigenschaften des Keap1/Nrf2-Signalwegs dienen somit als Schutzfunktion gegenüber Krankheiten, denen oxidativer Stress oder Entzündungsmechanismen zugrunde liegen wie z. B. kardiovaskuläre, neurodegenerative oder Atemwegserkrankungen.^[381-385] Neben den Entgiftungsfunktionen in gesunden Zellen konnte eine Nrf2-Überaktivierung auch in Tumorzellen beobachtet werden.^[386] Hierbei wird sowohl durch genetische Alterationen in Nrf2 und Keap1, aber auch durch Onkogene wie KRAS^{G12D} oder BRAF^{V619E},^[387-388] der proteasomale Abbau von Nrf2 unterdrückt und die protektiven Funktionen der resultierenden Genprodukte für die Metabolisierung von Chemotherapeutika oder für die Abwehr von entstandenen Radikalen in Folge von Strahlentherapie ausgenutzt.^[386, 389] Diese Form von „*pathway hijacking*“ ist demnach zuträglich für eine gesteigerte Tumorprogression und Metastasierung sowie für die Entstehung von Therapieresistenzen bei Krebserkrankungen.^[390-392] In der Fachliteratur werden jene pathologischen Funktionen als „*dark side of Nrf2*“ beschrieben und erheben Nrf2 und Keap1 zu attraktiven therapeutischen Zielstrukturen.^[390, 393]

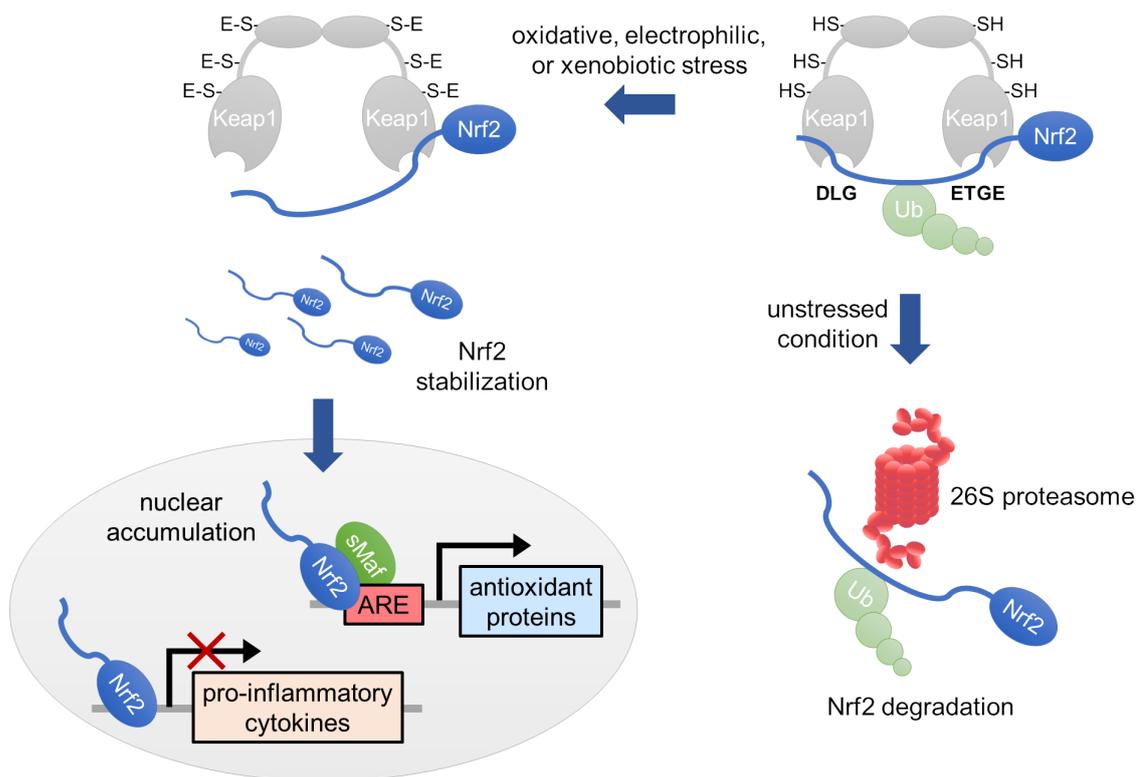


Abbildung 42. Schematische Darstellung des Keap1/Nrf2-Signalwegs. Unter basalen, ungestressten Bedingungen bindet Nrf2 über die Neh2-Domäne, welche das DLG- und ETGE-Motiv enthält, an die Kelch-Domänen von homodimerisiertem Keap1, wird durch den Cullin-RING E3 Ubiquitin-Ligase Komplex (nicht gezeigt) ubiquitiniert und im Anschluss durch das 26S-Proteasom abgebaut. In der Gegenwart von Oxidantien, Elektrophilen oder Xenobiotika werden die reaktiven Cysteine (-SH) innerhalb der BTB- und IVR-Domänen von Keap1 modifiziert, was zu konformationellen Änderungen des Keap1-Dimers führt, wodurch wiederum die Bindung des DLG-Motivs unterbunden und die Ubiquitinierung von Nrf2 verhindert wird. Neu synthetisiertes Nrf2 wird somit stabilisiert und akkumuliert schließlich im Nukleus, wo es die Transkription von pro-inflammatorischen Cytokin-Genen (z. B. IL6 und IL1B) inhibiert und in Folge der Dimerisierung mit kleinen Maf-Protein (sMaf) die Transkription von Genen, die für Entgiftungsenzyme (z. B. PRDX1, GST, NQO1, MRP) codieren, initiiert. [Adaptiert von TAGUCHI *et al.*^[376] und KOBAYASHI *et al.*^[377]]

4.1 Adressierung des Keap1/Nrf2-Signalwegs

Die vielschichtige Assoziation von Nrf2 mit den *hallmarks of cancer* (siehe Kapitel 1.1) führte ursprünglich zu der Entdeckung und Entwicklung von Naturstoff-basierten, chemopräventiven Wirkstoffen, welche durch unspezifische Modifikation der reaktiven Cysteine in Keap1 als Nrf2-Aktivatoren fungieren.^[380-381, 394] Hierzu zählt bspw. der Wirkstoff Dimethylfumarat (Tecfidera®), der für die Behandlung von Psoriasis und Multipler Sklerose zugelassen ist.^[395-397] Rationale Adressierungsansätze beruhen vor allem auf der direkten Inhibition der Protein-Protein-Interaktion (PPI) zwischen der Kelch-Domäne von Keap1, welche eine β -Propeller-Struktur aufweist, und der Neh2-Domäne von Nrf2 (Abbildung 43).^[398-399] Das DLG- und das ETGE-Motiv (Abbildung 43B, C) bilden dabei die Grundlage des sog. *hinge-and-latch*-Mechanismus, bei der das hochaffine ETGE-Motiv ($K_d = 5$ nM) konstitutiv an Keap1 gebunden vorliegt und so im basalen Zustand die Bindung des weniger affinen DLG-Motivs ($K_d = 1$ μ M) vermittelt.^[400] Kleine organische Moleküle wie das 1,4-Diaminonaphthalen-Derivat **21** und das Benzoxathiazepin-Derivat **22** (Abbildung 43D, E) besetzen die identische Bindungstasche in der Kelch-Domäne wie das DLG- und ETGE-Motiv und inhibieren so deren Bindung an Keap1.^[401-402] Die genannten Verbindungen gehen auf Hit-Strukturen zurück, die ursprünglich im Rahmen eines 2D-FIDA (*2-dimensional fluorescence intensity distribution analysis*)-basierten Hochdurchsatzscreens der ca. 270000 Substanzen-umfassenden Evotec Discovery Library (**21**, $K_d = 44$ nM)^[403] bzw. durch ein Röntgenkristallographie-basiertes Screening einer Fragment-Bibliothek (**22**, $K_d = 1.3$ nM)^[404] identifiziert wurden. Darüber hinaus existieren weitere Inhibitoren unterschiedlicher Chemotypen, deren *in vivo*-Wirksamkeit bereits in diversen Modellen nachgewiesen wurde. Aktuelle Studien beinhalten die präklinische Evaluierung derartiger Nrf2-Aktivatoren im Kontext von multipler Sklerose, chronisch obstruktiver Lungenerkrankungen (COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*), Parkinson und amyotropher Lateralsklerose (ALS);^[381] bisherige Limitationen stellen insbesondere die unzulänglichen pharmakokinetischen Eigenschaften wie die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und die geringe metabolische Stabilität dar.^[405-406] Ein bislang unzureichend evaluierter Faktor ist das mögliche Krebsfördernde Potential solcher Nrf2-Aktivatoren wie es im Fall von genetischen

Alterationen in Nrf2, die zur konstitutiven Akkumulation im Zellkern führen, beobachtet wird.^[381] Aufgrund des großen Interesses der industriellen und akademischen Forschung an der pharmakologischen Modulation dieses Signalwegs ist jedoch der zeitnahe Eintritt von Nrf2-Aktivatoren in klinische Studien zu erwarten.^[381] Nrf2-Antagonisten könnten vor allem bei der (Ko-)Therapie von Krebserkrankungen zur Anwendung kommen; abgesehen von Naturstoff-abgeleiteten, unspezifischen Ansätzen konnten bislang aber keine gezielten Strategien zur effizienten Inhibition von Nrf2 entwickelt werden.^[407]

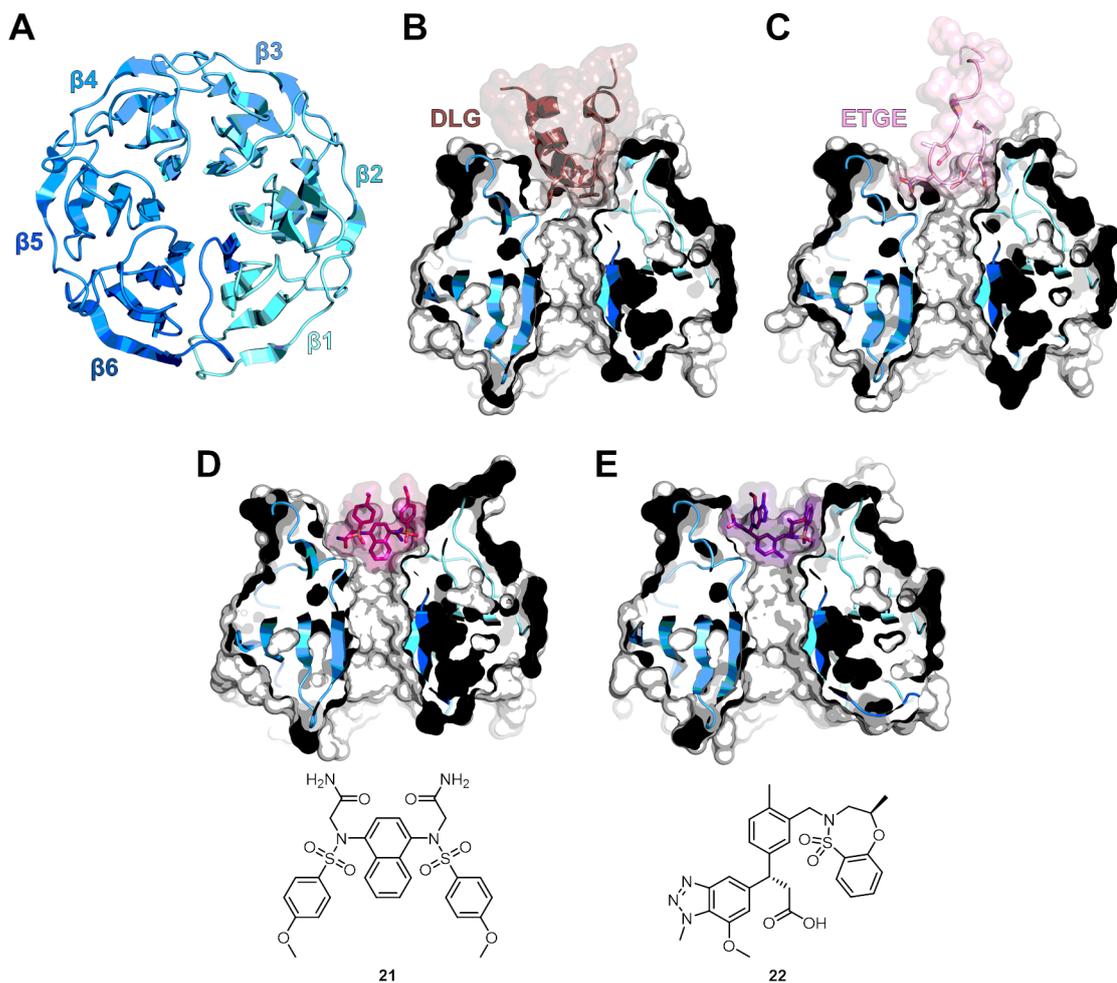


Abbildung 43. Kristallstrukturen der Kelch-Domäne von Keap1. **A**, Die Kelch-Domäne setzt sich aus sechs Kelch-repeats ($\beta 1$ - $\beta 6$, auch *blades* genannt) zusammen, die jeweils aus vier anti-parallelen β -Faltblättern bestehen und als Tertiärstruktur einen sog. β -Propeller ergeben (PDB: 2FLU). N-terminaler Bereich: cyan; C-terminaler Bereich: blau. **B/C**, Die Bindung des Keap1-Interaktionspartners Nrf2 wird über die in der Neh2-Domäne von Nrf2 befindlichen DLG- (rotbraun, PDB:3WN7) und ETGE-Motive (rosa, PDB: 2FLU) vermittelt. Die Bindungstasche wird dabei hauptsächlich durch jene *loops* gebildet, die jeweils das zweite und dritte β -Faltblatt innerhalb eines Kelch-Repeats miteinander verknüpfen. **D/E**, Die Verbindungen **21** (pink, PDB: 4XMB) und **22** (violett, PDB: 5FNU) besetzen die identische Bindungstasche wie das DLG- und ETGE-Motiv und inhibieren so die Keap1/Nrf2-PPI.

4.2 Entwicklung eines FP-basierten Wettbewerbsassays zur Identifizierung von Nrf2-Modulatoren

Die pharmakologische Adressierung des Nrf2-Signalwegs stellt wie oben beschrieben einen vielversprechenden Ansatz in der Chemoprävention und der Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten dar. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Hochdurchsatz-kompatible Assaytechnologie entwickelt werden, die die Identifizierung neuartiger Liganden mit modulatorischen Eigenschaften hinsichtlich der Keap1/Nrf2-PPI ermöglicht. Hierfür sollte im Anschluss an die Assayetablierung die ca. 30000 Substanzen-umfassende *in-house* Bibliothek durchmustert werden. Neben der Disruption dieser PPI, wie sie durch die Verbindungen **21** und **22** erreicht wird, sollte das Assaysystem auch die Charakterisierung von Liganden mit stabilisierenden Eigenschaften erlauben.

Anhand der verfügbaren Kristallstrukturen der Kelch-Domäne im Komplex mit den DLG- und ETGE-Bindungsmotiven (Abbildung 43B, C) wurde ein Assaykonzept entworfen, welches auf der Interaktion eines Fluorophor-markierten Peptidmotivs mit der Kelch-Domäne von Keap1 basiert; als Analysemethode sollte hierbei die Detektion der Fluoreszenzpolarisation (FP) dienen, die in direkter Abhängigkeit vom Bindungszustand des gelabelten Peptids steht; d. h. im gebundenen Zustand ist die rotatorische Diffusion des Fluorophors im Vergleich zum ungebundenen Zustand so stark eingeschränkt, dass eine erhöhte Fluoreszenzpolarisation detektiert werden kann.

Die Synthese der gelabelten Peptide erfolgte mittels Festphasensynthese nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie durch Bianca Wiedemann und Dr. Stefano Tomassi; die heterologe Expression in *E. coli* und die anschließende säulenchromatographische Reinigung der humanen Kelch-Domäne, welche analog zu Literaturbekannten Konstrukten die Aminosäuren 321-609 von Keap1 (Kelch^{wt}) umfasst, ist nachfolgend beschrieben.^[408]

4.2.1 Heterologe Expression und Reinigung von Kelch^{wt}

Das für die Expression verwendete Gen, welches von der Firma Biomatik synthetisiert und mittels *NcoI* und *BamHI* in den *E. coli*-kompatiblen pET-15b-Expressionsvektor (Novagen) kloniert wurde, codiert für die Kelch^{wt}-Domäne mit einem N-terminalen His₆-Tag gefolgt von einer Thrombin-Schnittstelle (siehe Kapitel 10.1.2). Die Expression erfolgte dabei in BL21 (DE3)-Zellen durch IPTG-vermittelte Induktion. Der erste Reinigungsschritt bestand aus der Isolation des Zielproteins aus dem geklärten Zelllysat mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie (Abbildung 44).

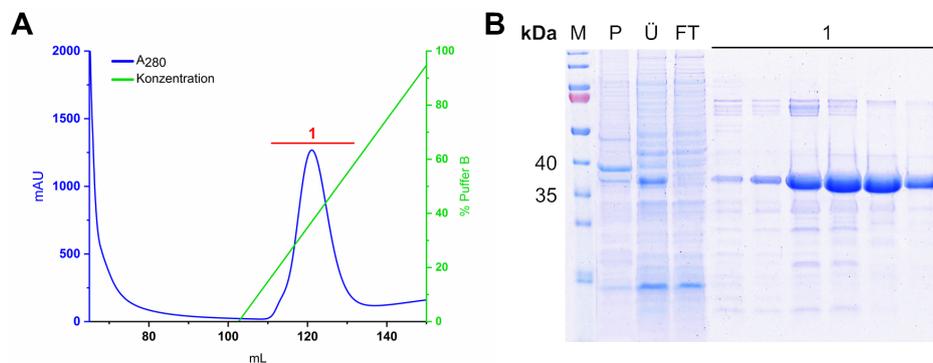


Abbildung 44. **A**, Chromatogramm der Ni-AC von Kelch^{wt}. Blau: Absorption bei 280 nm; grün: Konzentration des Imidazol-haltigen Elutionspuffers. **B**, Analyse der Fraktionen der Ni-AC mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. P: Pellet; Ü: löslicher Überstand; FT: Durchfluss; 1: Eluatpeak; M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

Für die weitere Reinigung mittels Anionenaustauschchromatographie wurden die Eluatfraktionen vereinigt und über Nacht gegen AEC-Puffer A dialysiert; eine Abspaltung des His₆-Tags erfolgte hierbei nicht. Mithilfe der AEC konnte ein Großteil der Verunreinigungen abgetrennt werden (Abbildung 45), so dass die Fraktionen des ersten Eluatpeaks für die anschließende SEC vereinigt und auf ein Volumen von ca. 2 mL eingengt wurden. Das Chromatogramm der SEC (Abbildung 46) zeigte lediglich einen symmetrischen Eluatpeak und die hohe Probenreinheit konnte mittels analytischer SDS-PAGE und CBB-Färbung bestätigt werden. Da die zugehörige Bande im elektrischen Feld oberhalb der 35 kDa-Markerbande lief, wurde die Probe zudem *via* ESI-MS analysiert; hiermit konnte die Proteinidentität eindeutig validiert werden ($MW_{\text{calc}} = 33653$ Da, $MW_{\text{obs}} = 33660$ Da). Die finale Proteinausbeute betrug ca. 14 mg pro Liter Expressionskultur.

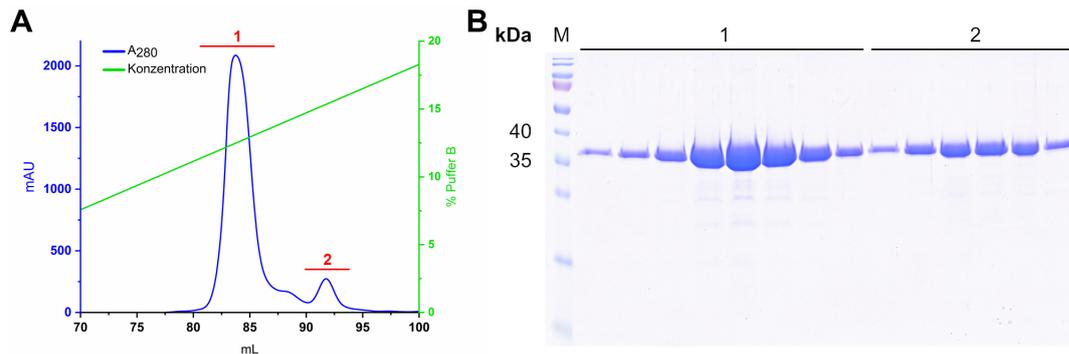


Abbildung 45. **A**, Chromatogramm der AEC von Kelch^{wt}. Blau: Absorption bei 280 nm; grün: Konzentration des NaCl-haltigen AEC-Puffer B. **B**, Analyse der Fraktionen der AEC mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. 1-2: Eluatpeaks; M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder.

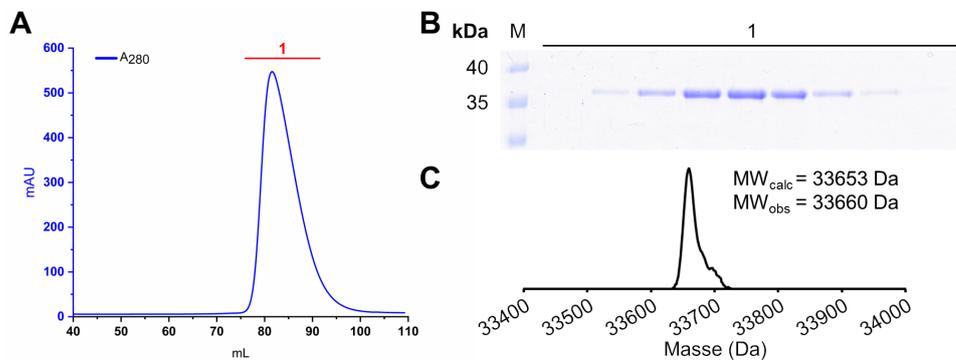


Abbildung 46. **A**, Chromatogramm der SEC von Kelch^{wt}. Blau: Absorption bei 280 nm. **B**, Analyse der Fraktionen der SEC mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. 1: Eluatpeak; M: Marker PageRuler™ Prestained Protein Ladder. **C**, Dekonvolviertes Massenspektrum von Kelch^{wt} nach der SEC.

4.2.2 Bindungsstudien an Kelch^{wt}

Für die Etablierung eines kompetitiven FP-Assays wurden ETGE-Motiv-mimikrierende Peptide verwendet, da diese eine höhere Affinität zu der Kelch-Domäne besitzen als das DLG-Motiv, so dass im Rahmen des geplanten Hochdurchsatz-Screenings geringere Mengen des Proteins benötigt werden. Im ersten Schritt wurden drei N-terminal Fluorescein-markierte ETGE-Peptide bestehend aus 6, 9 und 14 Aminosäuren (ETGE-6mer, -9mer, 14-mer)^{vii} bei einer Konzentration von 1 nM mit einer Verdünnungsreihe des gereinigten Kelch^{wt}

^{vii} Die Aminosäure-Sequenzen der verwendeten Peptide sind in Tabelle 26 (siehe Kapitel 8.13) zusammengefasst.

titriert, um die Minimalsequenz und die jeweilige Dissoziationskonstante K_d zu ermitteln (Abbildung 47A). Als nicht-bindende Negativkontrolle wurde ein Peptid verwendet, welches die identischen Reste des ETGE-9mer in einer zufälligen Reihenfolge enthält (ETGE-9mer-scrambled). Die Negativkontrolle zeigte lediglich bei hohen Proteinkonzentrationen von 100 μM einen leichten Anstieg der Fluoreszenzpolarisation, was wahrscheinlich durch eine unspezifische Interaktion mit der Kelch-Domäne begründet werden kann. Für das 6mer, 9mer und 14mer konnten vollständige Bindungskurven und Dissoziationskonstanten von 1.5 μM , 5.8 nM bzw. 8.9 nM erhalten werden, woraus eine benötigte Mindestlänge des *tracer*-Peptids von neun Aminosäuren geschlussfolgert wurde. Zudem korrelierten die bestimmten Affinitäten exzellent mit Vergleichswerten aus der Literatur (siehe Kapitel 4.1; $K_{d,ETGE} = 5 \text{ nM}$).^[400] Da zwischen dem 9mer und dem 14mer keine Unterschiede in der Affinität, dafür aber in der Signalamplitude Δ (auch: *assay window, dynamic range*) zu beobachten waren, wurde für die weitere Etablierung die ETGE-9mer-Sequenz verwendet; für Screening-Kampagnen sind Assays mit hoher Signalamplitude von Vorteil, da sie üblicherweise eine höhere Sensitivität sowie eine größere statistische Robustheit bedeuten. Das kleinere *assay window* des ETGE-14mers könnte durch einen auch im gebundenen Zustand flexiblen N-Terminus, an welchem der Fluorophor angebracht ist, zustande kommen.

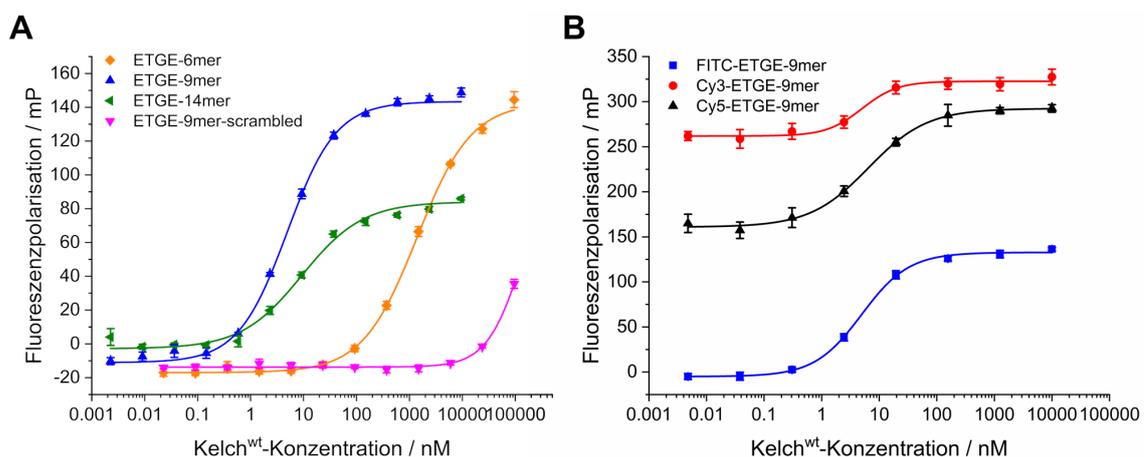


Abbildung 47. **A**, Bindungskurven von Fluorescein-markierten ETGE-basierten Peptiden unterschiedlicher Länge, welche mit Kelch^{wt} titriert wurden. **B**, Bindungskurven der Fluorescein- (FITC), Cy3- bzw. Cy5-markierten ETGE-9mer-Peptide.

Im zweiten Schritt der Etablierung sollte der optimale Fluorophor für den FP-Assay ermittelt werden. Vor dem Hintergrund, dass viele aromatische Substanzen ebenfalls fluoreszente Eigenschaften aufweisen, die aufgrund der Größe des konjugierten Systems häufig bei Anregung mit energiereichem blauen Licht zu Tage treten, werden in Fluoreszenz-basierten Assays insbesondere Fluorophore mit Anregungs- und Emissionswellenlängen jenseits von 600 nm bevorzugt verwendet, um eine Autofluoreszenz der Testverbindungen und das Auftreten von falsch-positiven Hits zu minimieren. Neben dem initial verwendeten Fluorophor Fluorescein ($\lambda_{\text{exc}} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 535 \text{ nm}$) wurden zusätzlich die Cyanin-Farbstoffe Cy3 ($\lambda_{\text{exc}} = 530 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 579 \text{ nm}$) und Cy5 ($\lambda_{\text{exc}} = 635 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 688 \text{ nm}$) hinsichtlich ihrer Verwendbarkeit in dem FP-Assay untersucht (Abbildung 47B, Tabelle 11). Die erhaltenen Dissoziationskonstanten waren mit 5.8 nM, 5.2 nM und 4.7 nM für Fluorescein, Cy3 bzw. Cy5 identisch; die *assay windows* hingegen wiesen mit 141 mP (Fluorescein), 66 mP (Cy3) und 128 mP (Cy5) deutliche Unterschiede auf. Ein Maß der statistischen Effektgröße stellt der Z-Faktor (auch: Z') dar.^[409] Dieser erlaubt die Beurteilung der Assayqualität bzgl. der Verwendung eines Assays im Hochdurchsatz-Screening und ergibt sich aus folgender Formel:

$$Z' = 1 - 3 \left(\frac{(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|} \right) \quad (4)$$

($\sigma_{p,n}$: Standardabweichungen der Positiv- (p) und Negativkontrolle (n);

$\mu_{p,n}$: Mittelwerte der Positiv- (p) und Negativkontrolle (n)

Tabelle 11. Eigenschaften und Parameter der Fluorophor-markierten ETGE-9mer-Peptide. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung ($n = 3$).

Peptid	$\lambda_{\text{exc}} / \lambda_{\text{em}}$	K_d / nM	Δ / mP	Z'
FITC-ETGE-9mer	470 nm / 535 nm	5.8 ± 1.3	141 ± 5	0.91 ± 0.04
Cy3-ETGE-9mer	530 nm / 579 nm	5.2 ± 0.5	66 ± 2	0.82 ± 0.02
Cy5-ETGE-9mer	635 nm / 688 nm	4.7 ± 0.7	128 ± 3	0.90 ± 0.03

Assays mit einem Z-Faktor unterhalb von 0.5 werden demnach als wenig robust klassifiziert und sind somit für Screening-Kampagnen ungeeignet. Z-Faktoren zwischen 0.5 und 1.0 indizieren qualitativ hochwertige, HTS-kompatible Assays. Für

die Fluorescein-, Cy3- und Cy5-markierten ETGE-9mer-Peptide wurden Z-Faktoren von 0.91, 0.82 und 0.90 erhalten; diese spiegeln die ausgezeichnete Qualität des entwickelten FP-Assays wider. Unter Berücksichtigung aller genannten Aspekte wurde das Cy5-ETGE-9mer für die Verwendung im HTS ausgewählt, wobei insbesondere die längerwelligen Anregungs- und Emissionsbereiche dieses Fluorophors bei maximaler Assay-Qualität im Vergleich zu Fluorescein entscheidend waren.

Die Etablierung des Assays erfolgte durch manuelles Pipettieren im 384-*well* Format mit einem Reaktionsvolumen von 10 μ L, der geplante Screen sollte jedoch im 1536-*well* Plattenformat und einem Volumen von 5 μ L durchgeführt werden, um eine schnelle, effiziente und kostengünstige Durchmusterung der Bibliothek mit möglichst geringem logistischen Aufwand zu gewährleisten. Um den Assay auf dieses Plattenformat zu übertragen, sollten in weiteren Studien die Referenzverbindung **27** ($EC_{50} = 29$ nM)^[410] sowie ihre Intermediate **23** bis **26** auf ihre disruptorischen Aktivitäten gegenüber der Protein-Peptid-Interaktion untersucht werden.^{viii} Für eine sensitive Detektion der Dissoziation von Kelch-Domäne und Cy5-ETGE-9mer wurde eine Konzentration von 25 nM Kelch^{wt} gewählt, welche ca. 80 % des maximalen Assaysignals ergibt (~267 mP) und das obere Ende des linearen Bereichs der Bindungskurve darstellt. Eine kompetitive, Liganden-induzierte Verdrängung des Peptids ergibt somit eine direkt proportionale Verminderung der Fluoreszenzpolarisation.^[411-412] Die Präparation der Dosis-Wirkungs-Kurven (Abbildung 48) erfolgte vollautomatisch unter Verwendung eines MultiDrop™ Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific) sowie eines Echo 520 Liquid Handler (Labcyte Inc.) (siehe Kapitel 8.13). Jeder Datenpunkt wurde in sechsfacher Ausführung bestimmt, um anschließend eine Beurteilung der Assayqualität (Z-Faktor) vornehmen zu können.

Keine der intermediären Testverbindungen **23** bis **26** führte zu einer signifikanten Verdrängung des gebundenen *tracer*-Peptids bei Konzentrationen bis 20 μ M. Ausschließlich für Verbindung **27** konnte eine vollständige Disruption des Protein-

^{viii} Die Synthese der Verbindungen **23** bis **27** wurde von Bianca Wiedemann durchgeführt.

Peptid-Komplexes beobachten werden, wobei die halbmaximale effektive Konzentration (EC_{50}) bei 246 nM und somit deutlich über dem publiziertem Wert von 29 nM lag.^[410] Die erhaltenen Daten zeigten jedoch eine ausgezeichnete Qualität mit einem Z-Faktor von 0.88 und einem *assay window* von 91 mP (~75 % des maximalen Signals), was einen erfolgreichen Transfer auf das 1536-*well* Format und eine Minimierung des Assayvolumens verdeutlicht und diesen Assay damit für die Verwendung im Hochdurchsatz-Screening zulässt.

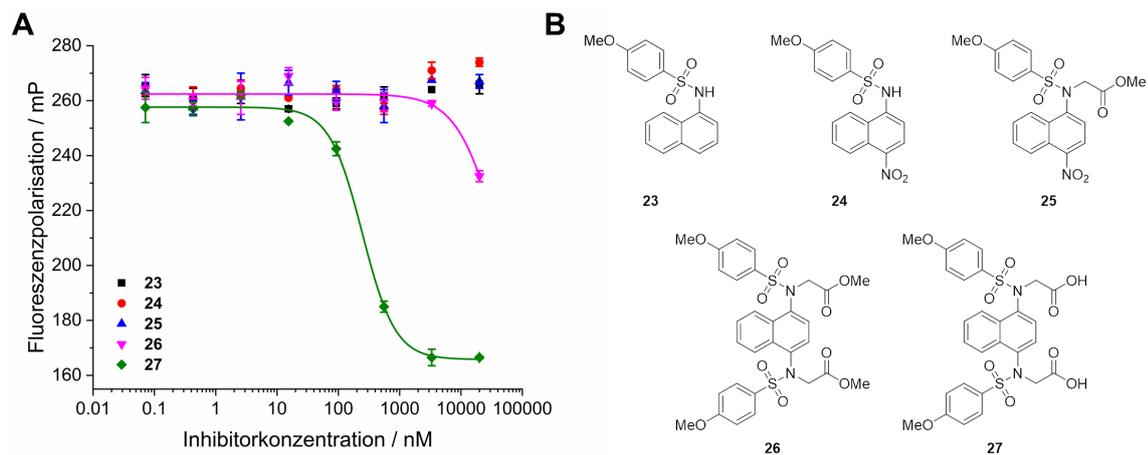


Abbildung 48. A, Kompetitiver Bindungsassay unter Verwendung von Kelch^{wt} und Cy5-ETGE-9mer zur Charakterisierung der Referenzverbindungen **23-27**. **B,** Chemische Strukturen der Verbindungen **23-27**.

4.3 Hochdurchsatz-Screening der *in-house* Substanz-Bibliothek

Unter Verwendung des entwickelten Kompetitions-Assays sollte die *in-house* Substanz-Bibliothek der AG Rauh mit ihren 30976 Verbindungen nach Inhibitoren der Keap1/Nrf2-Interaktion durchmustert werden. Für die HTS-Kampagne sollte die Arbeitsgruppen-interne, halb-automatisierte Screening-Plattform RASPELD (*Robotics-Assisted Screening Platform for Efficient Ligand Discovery*) in Anspruch genommen werden, welche sich durch ihr hochtechnologisches Equipment sowie einfache Handhabung auszeichnet und darüber hinaus vollständig von Doktoranden betrieben und instand gehalten wird.^[413]

Wie schon bei der Vermessung der Referenzverbindungen **23** bis **27** erfolgte der Screen in einem finalen Assayvolumen von 5 μ L (25 nM Kelch^{wt}, 1 nM Cy5-ETGE-9mer) unter Zugabe von je 25 nL Testsubstanz (50 μ M) bzw. DMSO als Negativkontrolle (n = 8) oder Verbindung **27** bei einer Konzentration von 10 μ M als Positivkontrolle (n = 8). Die Reaktionsmischungen wurden für eine Stunde inkubiert, so dass sich ein Gleichgewicht aus Peptid- bzw. Substanz-gebundenem Kelch^{wt} einstellen konnte, bevor die Fluoreszenzpolarisation der Assayplatten ausgelesen wurde. Der automatisierte Transfer der 30976 Testsubstanzen mit dem Echo 520 Liquid Handler (Labcyte Inc.) sowie die Vorbereitung und Dispensierung der Assaypuffer und Reaktionsmischungen dauerte insgesamt ca. dreieinhalb Stunden exkl. der Inkubationszeiten, das Auslesen der 22 Assayplatten beanspruchte weitere ca. drei Stunden. Die Durchmusterung der gesamten Substanzbibliothek inkl. der Inkubationsschritte und der anschließenden Datenanalyse war aufgrund des Hochdurchsatz-kompatiblen Equipments der RASPELD-Screening-Einheit in weniger als einem Tag abgeschlossen, was die Effizienz des verfügbaren Setups untermauert. Der durchschnittliche Z-Faktor über alle 22 Platten lag bei $Z' = 0.87 \pm 0.02$ bei einem mittleren *assay window* von $\Delta = 102 \pm 6$ mP, was im Rahmen eines Hochdurchsatz-Screenings als exzellent und qualitativ hochwertig eingestuft werden kann. Verbindungen, die mindestens eine 70 %-ige Verdrängung des *tracer*-Peptids von der Kelch-Domäne induzierten (≤ 30 % verbleibender Protein-Peptid-Komplex), wurden als Hits klassifiziert. Insgesamt erfüllten 43 Testverbindungen dieses Kriterium, was einer akzeptablen

hit rate von 0.14 % entspricht (Abbildung 49); die chemischen Strukturen der identifizierten Hits sind in Kapitel 10.11 (Abbildung 69) zusammengefasst.

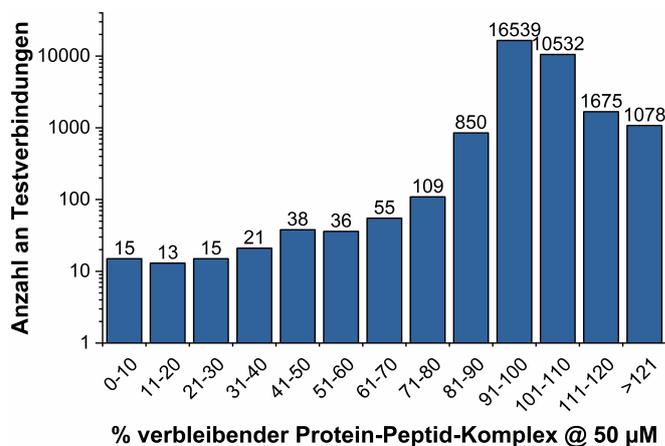


Abbildung 49. Verteilung der inhibitorischen Aktivitäten der Testverbindungen. 43 dieser Substanzen induzierten bei einer Konzentration von 50 µM eine mindestens 70 %-ige Disruption der Interaktion zwischen Kelch^{wt} und *tracer*-Peptid.

24799 Testsubstanzen zeigten keinerlei Einfluss auf die Interaktion zwischen Kelch^{wt} und *tracer*-Peptid (91-110 % verbleibender Protein-Peptid-Komplex), 1109 Substanzen induzierten eine geringe Inhibition der Komplexbildung (31-90 % verbleibender Protein-Peptid-Komplex) und weitere 2433 Substanzen führten zu einer Erhöhung der Fluoreszenzpolarisation (> 110 % verbleibender Protein-Peptid-Komplex), was mit einer gesteigerten Interaktion zwischen Kelch^{wt} und Cy5-ETGE-9mer zu erklären wäre. Ein Großteil dieser Verbindungen hatte jedoch einen deutlichen Einfluss auf die detektierte Fluoreszenzintensität, so dass ein spezifischer Stabilisationseffekt nicht gegeben sein muss. Prinzipiell ist eine Stabilisierung der Protein-Peptid-Interaktion denkbar, allerdings sollten für einen derartigen Screen andere Rahmenbedingungen verwendet werden. Einerseits wäre der Einsatz des weniger affinen DLG-Motivs favorisiert, da dieses im physiologischen Kontext für die Dissoziation von Keap1 und die Ubiquitinierung von Nrf2 maßgeblich verantwortlich ist. Andererseits sollte in diesem Fall eine geringere Proteinkonzentration eingesetzt werden, so dass ca. 20 % des maximalen Assaysignals erreicht werden und eine höhere Sensitivität für die Detektion von Stabilisatoren gegeben wäre. In dem hier präsentierten Fall stand jedoch die Identifikation neuartiger Inhibitoren im Vordergrund, so dass die 43 gefundenen Hit-Moleküle in *follow-up*-Studien validiert werden sollten.

Um den im Screen beobachteten Effekt der Substanzen zu reproduzieren, erfolgte zunächst die Analyse der Dosisabhängigkeit dieses disruptorischen Effekts, wobei die Verbindungen in einem Konzentrationsbereich von 0.2 nM bis 50 µM zum Protein-Peptid-Komplex gegeben wurden. Entgegen der zuvor getätigten Beobachtungen konnte für keine der Testsubstanzen eine spezifische disruptorische Wirksamkeit bei Konzentrationen bis 50 µM detektiert werden, lediglich für eine Verbindung konnte eine ca. 20 %-ige Inhibition im Rahmen der Hit-Validierung erhalten werden (Daten nicht gezeigt). Nichtsdestotrotz war eine Reproduzierbarkeit damit nicht gegeben, so dass die erhaltenen Hits als falsch-positive Ergebnisse eingestuft wurden.

Trotz der hohen Assayqualität und der ausgezeichneten Assayperformanz konnten im Rahmen dieses Screens keine neuartigen Inhibitoren der Keap1-Nrf2-Interaktion unter den ca. 31000 Testverbindungen identifiziert werden. Sofern keine falsch-negativen Ergebnisse generiert wurden, kann dies mit der Zusammensetzung der vorhandenen Substanzbibliothek begründet werden. Die bislang beschriebenen, kleinen organischen Disruptoren der genannten PPI müssen sehr spezielle Anforderungen erfüllen, um drei *hotspots* innerhalb der Kelch-Domäne zu adressieren. Hierzu zählen die Verfügbarkeit und die korrekte räumliche Anordnung eines aromatischen Akzeptorsystems, einer Säurefunktion sowie einer Sulfonamid-Einheit, welche die affine Bindung an Kelch^{wt} ermöglichen.^[402, 404] Sofern keine der Bibliothekssubstanzen diesem bekannten Chemotypen zuzuordnen ist und auch keine neuartigen Bindungseigenschaften aufweist, ist ein Ausbleiben von positiven Hits die logische Konsequenz. Um dennoch neue Modulatoren der Keap1/Nrf2-PPI zu entdecken, könnte die Durchmusterung einer deutlich größeren Substanzbibliothek fokussiert werden. Ebenso könnte wie oben erwähnt das Assay-Setup abgewandelt werden, um die Identifikation von Stabilisatoren zu ermöglichen. Eine solche Substanzklasse könnte potentiell den proteasomalen Abbau von Nrf2 gezielt induzieren und somit die Tumor-fördernden Eigenschaften des Transkriptionsfaktors runterregulieren.

5 ANALYSE VON KONFORMATIONS-GLEICHGEWICHTEN IN P38 α MAPK

5.1 Allgemeines

Proteinkinasen verfügen über hochdynamische Strukturen und ihre Funktionalitäten werden maßgeblich beeinflusst von derartigen dynamischen Zuständen.^[67] Proteinfunktionen wie z. B. die Ausbildung von Interaktionen, die katalytische Aktivität und die subzelluläre Lokalisation werden dabei durch Adaption von definierten konformationellen Zuständen reguliert, welche häufig in Fließgleichgewichten mit weiteren Konformationen existieren.^[67, 414] Solche Gleichgewichte und die damit verbundenen Zustandsübergänge können wiederum durch endo- und exogene Liganden oder aber auch durch post-translationale Modifikationen moduliert werden.^[415-417]

Die gezielte Analyse von globalen Proteindynamiken und insbesondere von Substrukturen innerhalb von Proteinen auf atomarer bzw. molekularer Ebene stellt eine besondere Herausforderung in den Bereichen der Strukturbiologie sowie der Chemischen Biologie dar.^[418-419] Verfügbare Techniken umfassen unter anderem die Röntgenstrukturanalyse, welche die Aufklärung von isolierten Proteinzuständen ermöglicht, und die Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie, mit welcher sowohl die Strukturaufklärung als auch die Untersuchung von Proteindynamiken möglich ist.^[420-422] Neben dem großen Potential dieser beiden Techniken beinhalten sie aber auch intrinsische Limitationen hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit: für strukturbiologische Untersuchungen mittels Röntgenstrukturanalyse werden Proteinkristalle mit ausreichender Diffraktionsqualität benötigt, wohingegen für NMR-basierte Analysen häufig Isotopen-markierte Proteine exprimiert und gereinigt werden müssen.^[423-424]

Ein alternativer Ansatz zur Analyse von konformationellen Zuständen konnte in der AG Rauh durch die Entwicklung der FLiK-Technologie (*Fluorescent Labels in Kinases*) erarbeitet werden.^[425] Diese basiert auf der positionsspezifischen Einführung eines Umgebungs-sensitiven (solvatochromen) Fluorophors und einer Liganden-induzierten Konformationsänderung, welche durch Änderungen der

Fluoreszenzeigenschaften des Fluorophors detektiert werden können. Ursprünglich als Screening-Assay für allosterische Liganden der Proteinkinase cSrc entwickelt, konnte das Konzept erfolgreich auf weitere Kinasen wie Abl, Akt und p38 α , aber auch auf Phosphatasen übertragen werden.^[322, 426-428] Im Fall von Kinasen erfolgte die Einbringung des Fluorophors Acrylodan zumeist innerhalb der Aktivierungsschleife, was eine Diskriminierung zwischen DFG-*in*- und DFG-*out*-Zustand (siehe Kapitel 1.2.1) und somit eine Unterscheidung von Inhibitoren des Typs I, II und III ermöglichte (siehe Tabelle 1).^[426] Zwar können mit dieser Technologie die Affinitäten sowie die Assoziations- und Dissoziationsraten von derartigen Liganden bestimmt werden, jedoch gewährt diese Fluoreszenz-basierte Methode keine quantitativen Informationen zu der Anzahl von existenten Konformationen, insbesondere im Liganden-freien Zustand, sowie zu Konformationsübergängen. Daher sollte die FLiK-Technologie durch Verwendung von Spinmarkern (*spin labels*, hier: MTSSL) anstelle von Fluorophoren am Beispiel der Mitogen-aktivierten Proteinkinase p38 α weiterentwickelt werden, um Liganden-induzierte Zustandsänderungen und die Dynamik der Aktivierungsschleife auf thermodynamischer Ebene analysieren zu können. Für diese Analysen sollten die Typ I-Inhibitoren SB203580, SKF-86002 und Skepinone-L sowie die Typ II-Inhibitoren Sorafenib, Regorafenib, RL45 und RL48 verwendet werden (Abbildung 53).

5.2 Elektronenspinresonanz-Spektroskopie

Die Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektroskopie beruht auf der Resonanzabsorption von Mikrowellenstrahlung durch paramagnetische Zentren. Derartige Substanzen, typischerweise Übergangsmetall-Ionen oder organische Radikale, besitzen einen permanenten magnetischen Dipol μ , welcher sich aus dem mechanischen Drehimpuls bzw. dem Spin eines ungepaarten Elektrons ergibt. Der Spin ist hierbei definiert durch seine Größe bzw. seinen Betrag und seine Orientierung im Raum, so dass er als Vektor beschrieben werden kann. Zudem ist festgelegt, dass der Spin quantisiert ist.^[429]

Das hier verwendete Nitroxid-Radikal des MTSSL-Spinmarkers verfügt über ein ungepaartes Elektron, dessen Spinvektor S die Spinquantenzahl $s = \frac{1}{2}$ besitzt. Für die z-Komponente des Spinvektors existieren daher zwei Werte $s_z = m_s \hbar = \pm \frac{1}{2} \hbar$ (\hbar : reduziertes Plancksches Wirkungsquantum). Die magnetische Spinquantenzahl $m_s = \pm \frac{1}{2}$ beschreibt dabei die Orientierung des Spins zur z-Achse, so dass für ein ungepaartes Elektron zwei Spin-Zustände, d. h. Zustand α mit $m_s = +\frac{1}{2}$ und Zustand β mit $m_s = -\frac{1}{2}$, existieren (Abbildung 50A). Beide Spin-Zustände sind energiegelich und somit entartet. In einem statischen externen Magnetfeld der Stärke B_0 wird eine Aufspaltung der entarteten Energiezustände α und β in $(2s+1)$ Level erzielt, welche durch den Zeeman-Effekt (Elektron-Zeeman-Interaktion, EZI) beschrieben wird. Ein Übergang zwischen diesen Zeeman-Leveln wird mit Mikrowellenstrahlung der Frequenz ν induziert, wobei die Resonanzbedingung (Gleichung (5)) erfüllt sein muss (Abbildung 50B).

$$\Delta E = E(m_s = +\frac{1}{2}) - E(m_s = -\frac{1}{2}) = g_e \mu_B B_0 = h\nu \quad (5)$$

(g_e : Elektron- g -Faktor; μ_B : Bohrsches Magneton; h : Plancksches Wirkungsquantum)

Die Aufspaltung der Energiezustände ist also direkt proportional zum externen Magnetfeld. Der typische experimentelle Ablauf besteht aus der Bestrahlung einer Probe mit einer konstanten Frequenz, welche abhängig vom verwendeten Gerät zwischen 1 GHz und 300 GHz liegen kann, während die Stärke des externen Magnetfelds variiert wird (0.03-12.8 T; *field sweep*). Die grafische Auftragung der gemessenen Absorption erfolgt hierbei meist in Form der ersten Ableitung (Abbildung 50C).

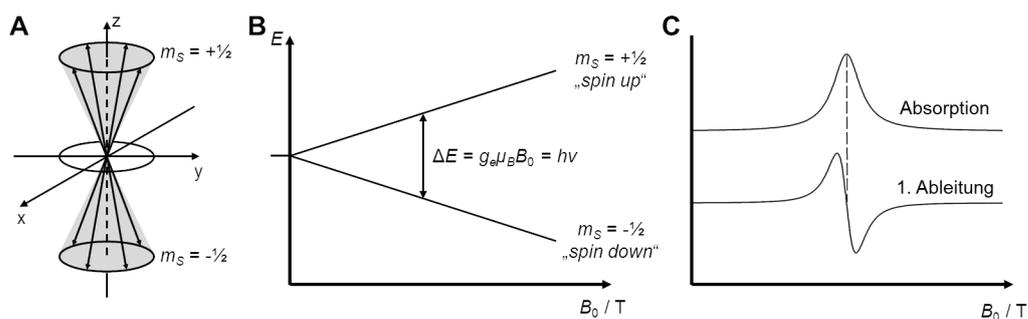


Abbildung 50. Prinzipien der EPR-Spektroskopie. **A**, Darstellung des Elektronenspins. **B**, Aufspaltung der Energieniveaus eines Elektronenspins im Magnetfeld durch die Elektron-Zeeman-Interaktion. **C**, Beispielhafte Auftragung der Resonanzabsorption und der daraus resultierenden ersten Ableitung. [Adaptiert von BRUSTOLON und GIAMELLO,^[429]]

Analog zum Elektronenspin ist auch der Kernspin I in einem externen Magnetfeld quantisiert und wird durch die Kern-Zeeman-Interaktion (NZI, *nuclear Zeeman interaction*) in $(2I+1)$ Zustände aufgespalten. Im Fall von MTSSL besitzt der beteiligte ^{14}N -Kern eine Kernquantenzahl von $I = 1$, so dass eine Aufspaltung von jedem Zeeman-Level in drei weitere Energiezustände erfolgt (Abbildung 51A). Der Term für die NZI ist in Gleichung (6) beschrieben und ist ebenfalls direkt proportional zum externen Magnetfeld B_0 .

$$\Delta E = g_N \mu_N B_0 = h\nu \quad (6)$$

(g_N : Neutron- g -Faktor; μ_N : Kernmagneton)

Zusätzlich zur EZI und NZI wird die Aufspaltung der Energiezustände durch die Hyperfein-Interaktion (HFI), d. h. durch die Wechselwirkung des magnetischen Moments des Elektronenspins mit dem magnetischen Moment von benachbarten Atomkernen, beeinflusst, wodurch die Energieniveaus der Elektronenspins erhöht oder gesenkt werden können (Abbildung 51A). Entsprechend der geltenden Auswahlregeln für Übergänge von magnetischen Dipolen ($\Delta m_S = 1$, $\Delta m_I = 0$) werden in diesem System drei induzierbare Übergänge (Abbildung 51A) beobachtet.

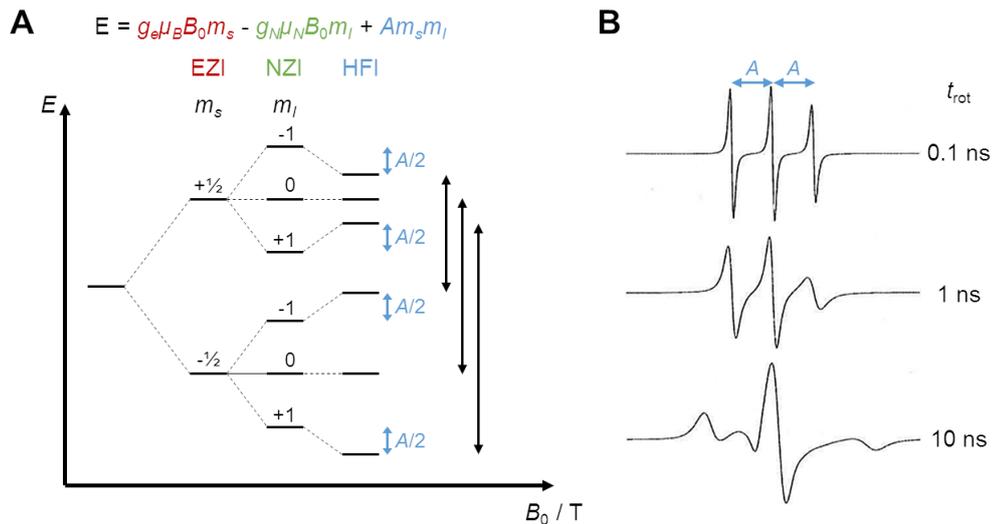


Abbildung 51. **A**, Energie-Diagramm für ein ungepaartes Elektron ($s = \frac{1}{2}$) in einem externen magnetischen Feld B_0 , welches mit einem ^{14}N -Kern ($I = 1$) wechselwirkt. Die Energieunterschiede zwischen den einzelnen Niveaus entsprechen jeweils der halben Hyperfeinkopplungskonstanten A (blau). Gemäß den Auswahlregeln ($\Delta m_s = 1$, $\Delta m_I = 0$) sind drei Übergänge (schwarze Pfeile) möglich. **B**, Die Spektralform, hier gezeigt für $\nu = 9.5$ GHz, hängt von der rotatorischen Mobilität des Spinmarkers ab. Mit zunehmender Rotationskorrelationszeit t_{rot} verbreitern sich die Resonanzlinien und die anisotropen Beiträge werden sichtbar. Im annähernd isotropen Zustand ($t_{rot} = 0.1$ ns) entsprechen die Abstände zwischen den Resonanzlinien jeweils der Hyperfeinkopplungskonstanten A .

Sowohl der g -Faktor als auch die Hyperfeinkopplungskonstante A sind abhängig von der Orientierung des MTSSL-Spinmarkers im externen Magnetfeld B_0 , d. h. sie sind anisotrop und werden daher als Tensoren dargestellt. Im Fall einer schnellen Rotation des Spinmarkers und einer damit einhergehenden geringen Rotationskorrelationszeit t_{rot} , wie es im ungebundenen Zustand in Lösung der Fall ist, wird die relative Orientierung über alle Zustände gemittelt, wodurch drei scharfe, symmetrisch verteilte Resonanzlinien in Folge einer isotropen Hyperfeinkopplungskonstanten A entstehen (Abbildung 51B). In viskosen Lösungsmitteln oder bei Einbringung des Spinmarkers in rigide Proteinstrukturen wird dessen rotatorische Mobilität hingegen eingeschränkt, die Rotationskorrelationszeit t_{rot} nimmt zu und das Resonanzspektrum wird verbreitert. Durch computergestützte, spektrale Simulationen der experimentellen Daten können die zugehörigen Rotationskorrelationszeiten t_{rot} sowie die Tensoren des g -Faktors und der Hyperfeinkopplungskonstante A ermittelt werden. Im Fall der Positions-spezifischen Einbringung des MTSSL-Markers in ein Protein werden wiederum Rückschlüsse auf dessen rotatorische Dynamik ermöglicht, die zudem durch die Flexibilität der markierten Seitenkette determiniert wird.

5.3 Charakterisierung von p38 α -Inhibitoren mittels EPR-Spektroskopie

5.3.1 Konstruktdesign und -etablierung

Die Etablierung der EPR-basierten Analysemethode sollte unter Verwendung des p38 α -Konstrukts, welches im Rahmen der FLiK-Studien generiert wurde, stattfinden. Um eine ortsspezifische Markierung zu gewährleisten, wurden die Lösungsmittel-exponierten Cysteine an den Positionen 119 und 162 durch Serine ersetzt und gleichzeitig das zu markierende Cystein an Position 172 (DFG+2) durch Austausch eines Alanins eingebracht (siehe Kapitel 10.1.3). Zudem war die Mutation F327L vorhanden, welche laut Literaturangaben zu einer konstitutiven Aktivierung der Kinase führen sollte, was in Aktivitäts-basierten Studien jedoch nicht validiert werden konnte. Im weiteren Verlauf wird dieses mutierte, aber unmarkierte Konstrukt p38 α^{SL} genannt. Die Expression und Reinigung dieses Konstrukts wurde in vorherigen Studien bereits etabliert; die Chromatogramme und SDS-PAGE-Gele der Reinigung sind im Anhang in Kapitel 10.12 (Abbildung 70, Abbildung 71, Abbildung 72) gezeigt und die Durchführung ist in den Kapiteln 8.3 und 8.5.2 beschrieben. Um den Einfluss der Mutationen sowie des eingebrachten Spinmarkers MTSSL ((1-Oxyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolin-3-methyl)-Methanthiosulfonat) auf die Integrität des Proteins zu untersuchen, wurden aktivitäts-basierte HTRF®-Assays mit p38 α^{SL} in An- und Abwesenheit des Spinmarkers sowie mit p38 α^{wt} durchgeführt (siehe Kapitel 8.9.2). Zuvor wurden die drei Proteine durch Inkubation in Gegenwart der aktivierenden Kinase MKK6, ATP und MgCl₂ an den Positionen Thr180 und Tyr182 phosphoryliert und damit aktiviert (siehe Kapitel 8.9.2). Um einen Vergleich zwischen den Proteinen zu ermöglichen, wurden die Protein-spezifischen Michaelis-Konstanten für ATP ($K_{\text{M,ATP}}$) ermittelt (siehe Kapitel 10.13, Tabelle 32); diese waren für das markierte (p38 $\alpha^{\text{SL,MTSSL}}$, $K_{\text{M,ATP}} = 42 \mu\text{M}$) und das unmarkierte Konstrukt (p38 α^{SL} , $K_{\text{M,ATP}} = 52 \mu\text{M}$) vergleichbar, jedoch ca. 4- bis 5-fach höher als die Michaelis-Konstante für p38 α^{wt} ($K_{\text{M,ATP}} = 11 \mu\text{M}$), was auf eine generell geringere Affinität des p38 α^{SL} -Konstrukts für ATP im Vergleich zu p38 α^{wt} hindeutet und wahrscheinlich auf die eingebrachten Mutationen zurückzuführen ist.

Zusätzlich wurden noch jene Verbindungen, deren Einfluss auf die Proteinkonformation im weiteren Verlauf mittels EPR-Spektroskopie untersucht werden sollte, im Aktivitäts-basierten HTRF[®]-Assay bezüglich ihrer inhibitorischen Potenz gegenüber den drei Proteinkonstrukten charakterisiert (siehe Kapitel 10.13, Tabelle 33). Alle Testsubstanzen weisen vergleichbare IC₅₀-Werte für p38 α^{wt} und p38 α^{SL} auf, die unter Berücksichtigung der Standardabweichungen um weniger als den Faktor 2 voneinander abweichen. Die halb-maximalen inhibitorischen Potenzen für p38 $\alpha^{SL,MTSSL}$ waren jedoch, abhängig von der Testverbindung, etwa um das Drei- bis Fünffache höher im Vergleich zu den unmarkierten Proteinen p38 α^{wt} und p38 α^{SL} . Im Fall der Typ II-Inhibitoren RL45 und RL48 lagen die IC₅₀-Werte sogar um das bis zu 13-fache höher. Diese Ergebnisse verdeutlichen einen vorhandenen Effekt der eingebrachten Spinmarkierungen auf die Affinität und somit auf die inhibitorische Aktivität der Testverbindungen, der im Fall der Substanzen RL45 und RL48 deutlich stärker ausgeprägt ist. Nichtsdestotrotz sollten die Effekte der genannten Verbindungen auf die Proteinkonformationen untersucht werden. In Abbildung 52 ist schematisch dargestellt, wie Unterschiede in den Liganden-induzierten DFG-*in*- bzw. DFG-*out*-Konformationen die rotatorische Mobilität des eingebrachten *spin labels* beeinflussen könnten.

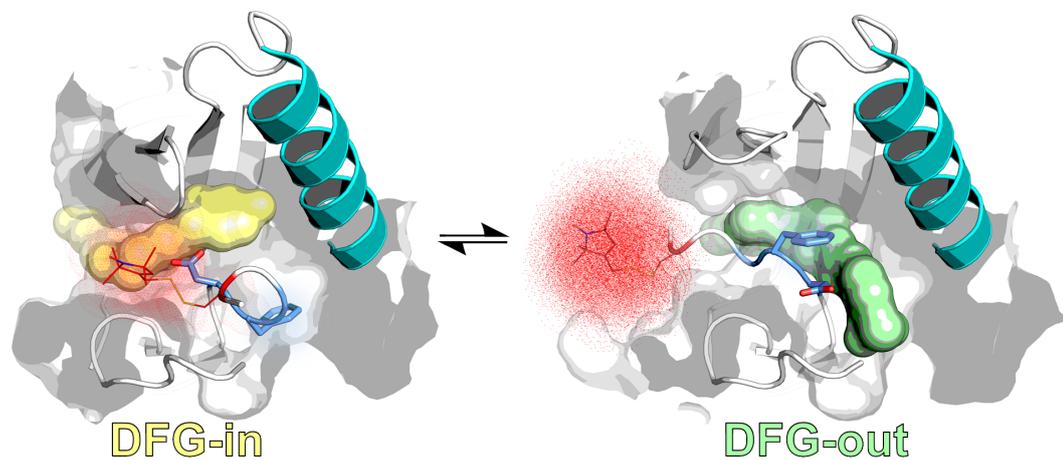


Abbildung 52. Schematische Darstellung der Liganden-induzierten DFG-*in*- (links) bzw. DFG-*out*-Konformation (rechts) von p38 α . Die Oberflächen der gebundenen Inhibitoren sind in gelb (Typ I) bzw. grün (Typ II) dargestellt; die α C-Helix ist cyan gefärbt; das DFG-Motiv ist in hellblauen sticks gezeigt; das eingebrachte *spin label* MTSSL ist in roten Linien dargestellt und die roten Punkte um den Marker herum illustrieren die möglichen Konformationen und damit die rotatorischen Mobilitäten des labels (dargestellt mit PyMOL; die Konformationen des Spinmarkers wurden mit dem Plugin mtsslWizard^[430] generiert).

5.3.2 EPR-spektroskopische Messungen an p38 α

Die experimentellen Daten der EPR-Messungen für p38 $\alpha^{\text{SL,MTSSL}}$ in Abwesenheit von Liganden (apo) wurden durch quantitative spektrale Simulationen unter Annahme eines Gleichgewichts von zwei separaten Zuständen der Aktivierungsschleife, auf welcher der Spinmarker eingebracht war, gefittet (Abbildung 53).^{ix} Diese Zustände sind gekennzeichnet durch signifikante Unterschiede in der rotatorischen Mobilität und Dynamik des *spin labels* und entsprechen somit zwei spektralen Komponenten $S_{A,B}$ in den verwendeten spektralen Simulationen; die Summe aller Zustände S ergibt sich also aus der relativen Verteilung von $S_{A,B}$ mit:

$$S = a \cdot S_A + (1 - a) \cdot S_B \quad (7)$$

(S : Summe aller Zustände; S_A : spektrale Komponente A; S_B : spektrale Komponente B;
 a : relative Menge von Komponente S_A)

Die zugehörigen Rotationskorrelationszeiten t_{rot} betragen 5.5 ns für Komponente S_A und 0.97 ns für Komponente S_B , was mit einer eingeschränkteren, geringeren rotatorischen Dynamik des *spin labels* für Komponente S_A im Vergleich zu Komponente S_B gleichzusetzen ist. Aufgrund der verfügbaren Kristallstrukturen und den bekannten DFG-*in*- und DFG-*out*-Konformationen von p38 α , wurde Komponente S_A mit der geringeren rotatorischen Mobilität dem DFG-*in*-Zustand zugeordnet, während Komponente S_B der DFG-*out*-Konformation zugeschrieben wurde. Diese Beobachtungen korrelieren ebenfalls mit den in Abbildung 52 gezeigten konformationellen Flexibilitäten des *spin labels*, die im DFG-*in*-Zustand weniger stark ausgeprägt waren. In Abwesenheit von Liganden konnte für die apo-Form von p38 $\alpha^{\text{SL,MTSSL}}$ eine Zustandsverteilung von ca. 9:1 (S_A/S_B) detektiert werden (Abbildung 54), was einer Anreicherung der DFG-*in*-Konformation entspricht. Nach Zugabe der verschiedenen Typ I- und Typ II-Inhibitoren konnten unterschiedliche Profile in den Zustandsverteilungen beobachtet werden (Abbildung 54).

^{ix} Die EPR-Messungen und -Analysen wurden von Patrick Roser aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Malte Drescher an der Universität Konstanz durchgeführt.

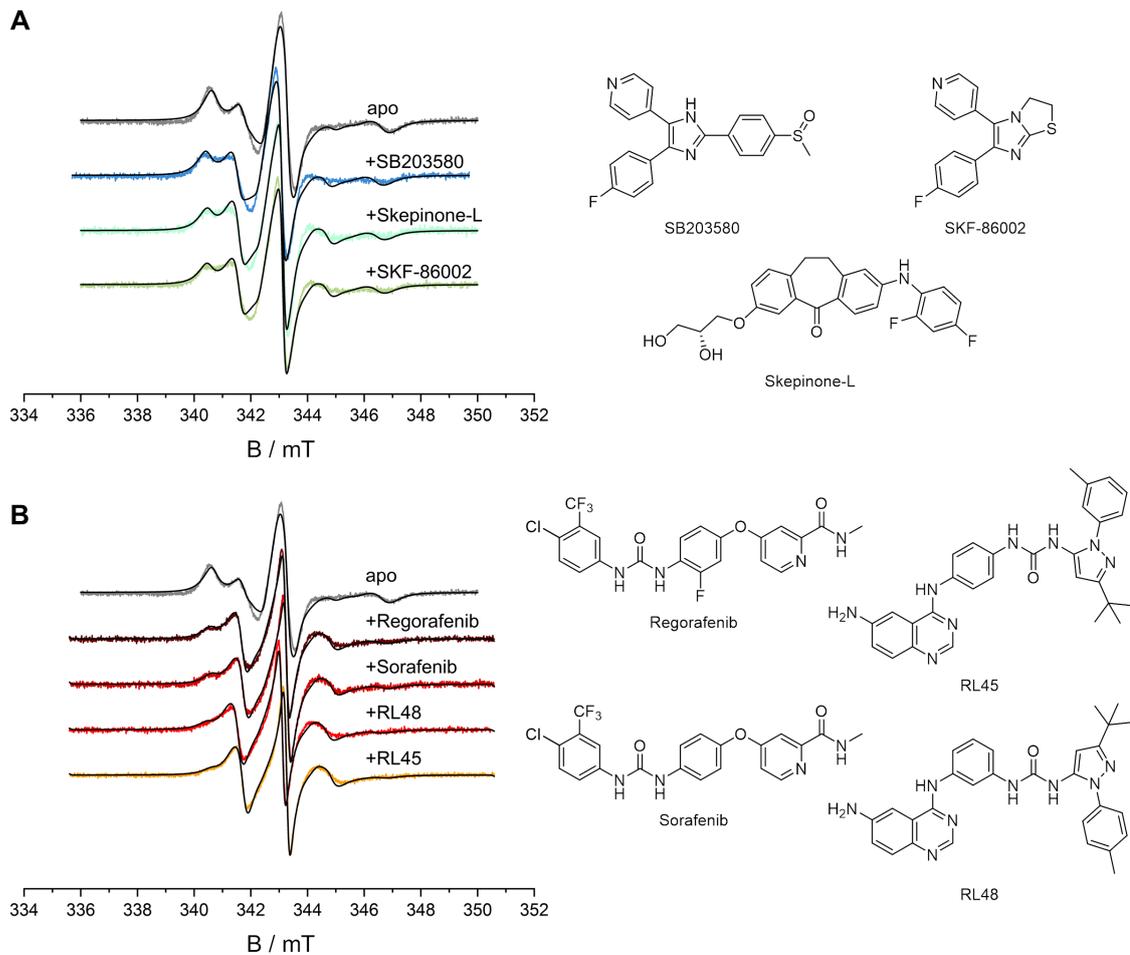


Abbildung 53. X-band EPR-Spektren für p38 $\alpha^{SL,MTSSL}$ in Abwesenheit von Liganden (apo, grau) oder in Anwesenheit von Typ I- (**A**; SB203580, SKF-86002, Skepinone-L) bzw. Typ II-Inhibitoren (**B**; Regorafenib, Sorafenib, RL45, RL48), aufgenommen bei 20 °C. Die experimentell bestimmten Datenreihen sind farblich hervorgehoben, die zugehörigen spektralen Simulationen sind in schwarz dargestellt. Die chemischen Strukturen der Testverbindungen sind rechts gezeigt.

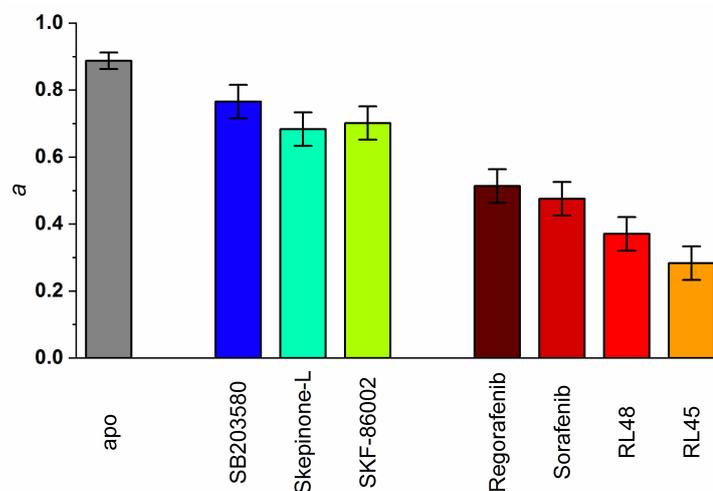


Abbildung 54. Konformationsgleichgewichte von p38 $\alpha^{SL,MTSSL}$ in Abwesenheit (apo) und Anwesenheit von Typ I- (SKF-86002, Skepinone-L, SB203580) und Typ II-Inhibitoren (RL45, RL48, Sorafenib, Regorafenib). a : relative Menge von Komponente S_A .

Für beide Inhibitor-Klassen war zwar eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der vermeintlichen DFG-*out*-Konformation (Komponente S_B) zu erkennen, diese war im Fall der Typ II-Liganden ($a = 0.28-0.51$) jedoch stärker ausgeprägt als bei Typ I-Inhibitoren ($a = 0.68-0.76$). Auch diese Beobachtungen untermauern die Annahme, dass Komponente S_A dem weniger flexiblen Zustand der Aktivierungsschleife in der DFG-*in*-Konformation zuzuordnen ist, welche klassischerweise von Liganden des Typs I stabilisiert werden, wohingegen Typ II-Inhibitoren bevorzugt die DFG-*out*-Konformation induzieren. Für beide Inhibitor-Typen ist in dem verwendeten System also keine vollständige Anreicherung eines bestimmten Zustands zu beobachten, sondern die designierten Zustände S_A und S_B sind auch nach Ligandenbindung koexistent.

Um die Liganden-vermittelte Verschiebung der Populationsgleichgewichte von DFG-*in* nach DFG-*out* näher zu untersuchen, wurden temperaturabhängige Messungen im Bereich von 5 °C bis 32.5 °C in Intervallen von je 2.5 °C in Abwesenheit und Anwesenheit der bereits zuvor verwendeten Liganden durchgeführt. Die aus den spektralen Simulationen erhaltenen Populationen von S_A und S_B wurden zur Bestimmung der Reaktionskonstanten $K = [(1-a)/a]$ verwendet (Abbildung 55A). Die Auftragung der logarithmischen Reaktionskonstanten $\ln(K)$ gegen $1/T$ nach van 't Hoff bestätigte einen linearen Zusammenhang wie er für ein Gleichgewichtssystem mit zwei Zuständen zu erwarten war, was anhand der Liganden-freien Form und der Regorafenib-gebundenen Form von p38 $\alpha^{SL,MTSSL}$ in Abbildung 55B gezeigt ist.^[431]

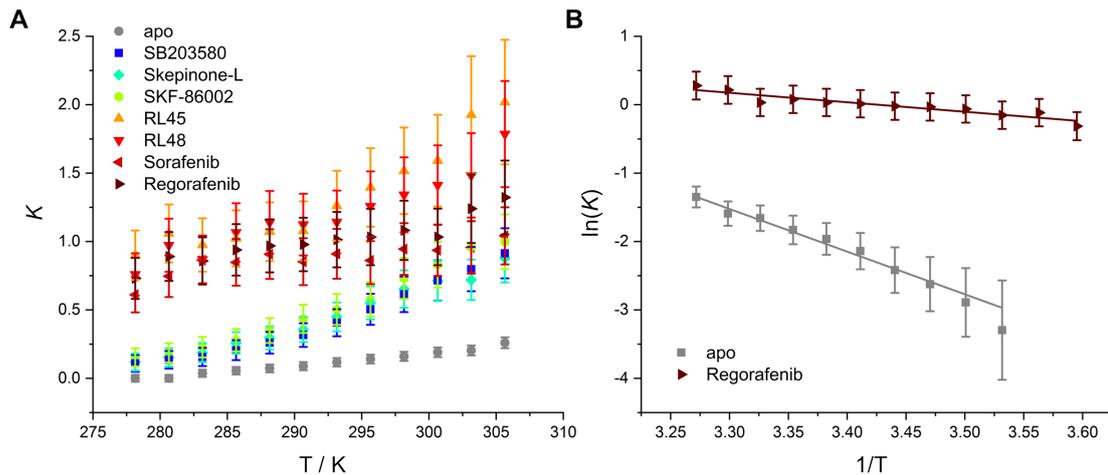


Abbildung 55. Temperaturabhängige EPR-Analysen der Gleichgewichtszustände von p38 $\alpha^{SL,MTSSL}$. **A**, Van 't Hoff-Auftragungen [$\ln(K)$ vs. $1/T$] an Abwesenheit und Anwesenheit von Regorafenib. **B**, Auftragung der Reaktionskonstanten K gegen $1/T$ für die apo-Form sowie die Liganden-gebundene Form von p38 $\alpha^{SL,MTSSL}$.

Aus diesen van 't Hoff-Plots konnten die thermodynamischen Parameter ΔH und ΔS abgeleitet werden, welche ausschließlich den Konformationsübergang von DFG-*in* (Komponente S_A) nach DFG-*out* (Komponente S_B) beschreiben und nicht etwa die Bindung der Liganden an das Protein. Hierbei entspricht der Schnittpunkt des linearen Fits mit der y-Achse dem Term $\Delta S/R$ und die Steigung des linearen Fits spiegelt $-\Delta H/R$ wider. Eine grafische Auftragung der erhaltenen Parameter ist in Abbildung 56 gezeigt.

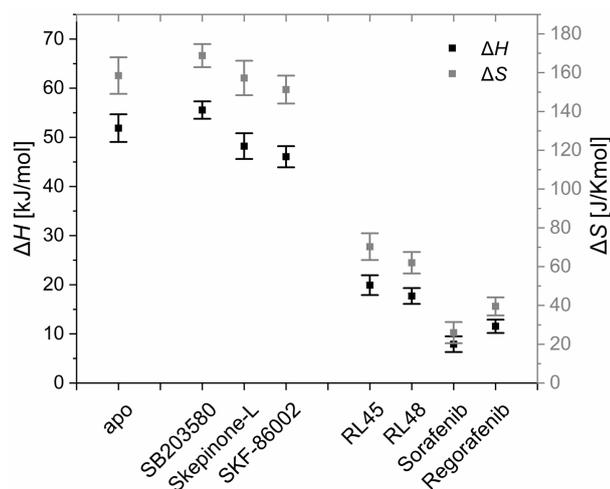


Abbildung 56. Thermodynamische Parameter der Konformationsgleichgewichte für die apo-Form sowie die Liganden-gebundene Form von p38 $\alpha^{SL,MTSSL}$.

Für den apo-Zustand von p38 $\alpha^{\text{SL,MTSSL}}$ wurde die Reaktionsenthalpie ΔH zu 51.9 ± 2.8 kJ/mol und die Reaktionsentropie ΔS zu 158.5 ± 9.4 J/Kmol bestimmt. Diese Werte liegen im Vergleich zu Ergebnissen aus Berechnungen der freien Bindungsenergie zwar höher ($\Delta H \approx -T\Delta S \approx 15.4$ kJ/mol),^[432] aber dennoch in der gleichen Größenordnung. Die experimentell bestimmte Gibbs-Energie ΔG ist positiv, was einen energetisch ungünstigen Übergang von DFG-*in* nach DFG-*out* illustriert. Für die Typ I-Inhibitoren SB203580, Skepinone-L und SKF-86002 wurden ähnliche Profile erhalten, was ebenfalls für einen nicht-favorisierten Übergang von DFG-*in* nach DFG-*out* spricht und somit mit dem allgemeinen Bindungsmodus von Typ I-Liganden übereinstimmt. Im Gegensatz dazu zeigten die Typ II-Inhibitoren deutlich andere Eigenschaften, wobei sowohl die Reaktionsenthalpie als auch die Reaktionsentropie deutlich kleiner ausfielen im Vergleich zum apo-Zustand und der Typ I-Inhibitor-gebundenen Form von p38 $\alpha^{\text{SL,MTSSL}}$. Diese vergleichsweise geringeren Reaktionsenthalpien und -entropien unterstreichen die Stabilisierung der DFG-*out*-Konformation durch Typ II-Inhibitoren und erlauben zugleich eine eindeutige Differenzierung von Typ I- und Typ II-Inhibitoren auf thermodynamischer Ebene.

Um weitere Einblicke in die konformationelle Plastizität sowie Liganden-induzierte Konformationsänderungen von p38 α zu erhalten, könnten bspw. EPR-basierte Abstandsmessungen im Protein durchgeführt werden. Mithilfe von gepulsten EPR-Experimenten wie der *double electron-electron resonance* (DEER)-Technik könnten gezielt Distanzen zwischen zwei Spinmarkern charakterisiert werden. Hierfür würde es sich anbieten die bislang verwendete Position 172 als Markierungsstelle auf der Aktivierungsschleife beizubehalten und zusätzlich rigide Strukturelemente, welche anhand von Proteinkristallstrukturen identifiziert werden können, mit Spinsonden zu markieren. Die Distanzen zwischen den jeweiligen *spin label*-Paaren könnten im Anschluss für eine Multilaterations-Analyse verwendet werden, mit welcher die exakte Position bzw. die Aufenthaltswahrscheinlichkeit des Spinmarkers auf der flexiblen Aktivierungsschleife im dreidimensionalen Raum berechnet werden kann. Gegenüber den in dieser Arbeit durchgeführten *continuous wave* (CW)-Messungen, welche quantitative Konformationsanalysen erlauben, gewähren gepulste DEER-Messungen direkten Zugang zu strukturellen Informationen und ermöglichen damit zugleich eine Modellierung von Strukturelementen, die in Kristallstrukturen nicht aufgelöst sind.

6 KURZFASSUNG

Die Proteinkinase B (auch: Akt) spielt eine essenzielle Rolle in einer Vielzahl zellulärer Signaltransduktionskaskaden, welche grundlegende Prozesse wie Proliferation, Überleben und Apoptose regulieren. Eine Fehlregulation von Akt ist mit diversen kardiovaskulären, neurodegenerativen sowie onkologischen Krankheitsbildern assoziiert. Häufig sind genetische Läsionen in den vorgeschalteten Proteinen wie PI3K und PTEN ursächlich für derartige Erkrankungen, aber auch Alterationen in membranständigen Rezeptor-Tyrosinkinasen wie EGFR und c-Kit können pathologische Änderungen in der Akt-vermittelten Signalweiterleitung bewirken. Direkte Läsionen in Akt, wie bspw. die aktivierende somatische Mutation E17K oder eine Amplifikation und Überexpression von Akt, treten weniger häufig auf, können jedoch ebenfalls als treibender Bestandteil in der Pathogenese involviert sein. Eine pharmakologische Inhibition von Akt kommt daher als vielseitige Strategie für die therapeutische Behandlung diverser Erkrankungen in Frage. Neben den klassischen ATP-kompetitiven Inhibitoren, welche zumeist unzureichende Selektivitätsprofile aufweisen und signifikante Nebenwirkungen induzieren, existieren für Akt auch allosterische Liganden, welche an der Grenzfläche zwischen regulatorischer PH-Domäne und katalytischer Kinase-Domäne binden. Dieser einzigartige Bindungsmodus gewährt eine ausgezeichnete Selektivität für das Zielprotein verbunden mit einer Minimierung der möglichen *off-target*-vermittelten Toxizitäten.

In der vorliegenden Arbeit wird das rationale Design sowie die Charakterisierung von kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren in biochemischen und zellulären Systemen beschrieben. Basierend auf Komplexkristallstrukturen mit reversibel bindenden Liganden wurden in computergestützten Modellierungsansätzen initial neue Moleküle, welche zusätzlich mit einem Cystein-reaktiven Michael-Akzeptor dekoriert sind, entworfen. Mithilfe von massenspektrometrischen und Aktivitätsbasierten Analysen konnte für eine fokussierte Substanzbibliothek auf Basis des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts ein kovalenter Bindungsmechanismus sowie eine potente Inhibition von Akt1 *in vitro* nachgewiesen werden. In weiterführenden strukturellen Untersuchungen konnten für vier der dargestellten Verbindungen Komplexkristallstrukturen mit Akt1 gelöst und hierdurch die

Besetzung der allosterischen Bindetasche in Akt1 sowie die irreversible Bindung zu Cys296 bzw. Cys310 nachgewiesen werden. Unter Verwendung von zellulären, Krebs-relevanten Modellsystemen konnte die anti-proliferative Wirksamkeit dieser neuartigen Substanzklasse abgebildet werden, welche anhand von Western Blot-Studien auf die *on-target*-Inhibition von Akt zurückgeführt werden konnte. In Folge von *in vitro* pharmakokinetischen Untersuchungen konnte mit Verbindung **3a** (Borussertib) eine Leitstruktur identifiziert werden, deren vielversprechenden Aktivitäts-, Selektivitäts- und PK-Profile eine anschließende Evaluierung in *in vivo*-Modellen erlaubten. Trotz einer unzureichenden oralen Bioverfügbarkeit sowie einer moderaten MTD von 20 mg/kg bei intraperitonealer Applikation konnte die *in vivo*-Wirksamkeit der Leitstruktur in Patient-abgeleiteten Xenograft-Modellen des Kolorektal- sowie Pankreaskarzinoms in Kombination mit dem MEK-Inhibitor Trametinib gezeigt werden. Diese Eigenschaften verdeutlichen das Potential der kovalent-allosterischen Akt-Inhibition und bilden zeitgleich das Rational für die Weiterentwicklung und Optimierung der Leitstruktur zum klinischen Kandidaten.

Ein weiteres Projekt beinhaltete die Identifikation und Charakterisierung von Modulatoren des Keap1/Nrf2-Signalwegs, welcher zytoprotektive Funktionen gegenüber oxidativem Stress und Entzündungsprozessen, die in der Entstehung von kardiovaskulären und neurodegenerativen Krankheitsbildern beteiligt sind, vermittelt. Zusätzlich kann eine Fehlregulation von Nrf2 für die Tumorentstehung und -progression förderlich sein. Unter Verwendung eines Fluorophor-markierten, Nrf2-mimikrierenden Sondenpeptids und der rekombinanten Kelch-Domäne von Keap1, welche die Protein-Protein-Interaktion mit Nrf2 vermittelt, wurde ein Hochdurchsatz-kompatibler, Fluoreszenzpolarisations-basierter Assay entwickelt. Mithilfe dieses Assays und der Screening-Plattform RASPELD wurde die ca. 30000 Substanzen-umfassende *in-house* Bibliothek nach Modulatoren der Keap1/Nrf2-PPI durchmustert. Zwar konnte keins der identifizierten Hit-Moleküle in Folgestudien als Inhibitor validiert werden, der entwickelte Assay erweitert dennoch das Portfolio der Screening-Plattform RASPELD und fungiert dabei als Grundlage für zukünftige Screening-Kampagnen auch hinsichtlich der Identifikation von möglichen Stabilisatoren der Keap1/Nrf2-Interaktion.

Desweiteren wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Elektronenspinresonanz-Spektroskopie-basierte Studien an der p38 α MAPK hinsichtlich der konformationellen Plastizität und Aktivierungsschleifendynamik durchgeführt. Hierfür wurde ein heterolog exprimiertes und positionsspezifisch mit dem *spin label* MTSSL markiertes p38 α -Konstrukt eingesetzt und in An- und Abwesenheit von Typ I- und Typ II-Inhibitoren charakterisiert. Die rotatorische Mobilität des eingebrachten Spinmarkers ermöglichte hierbei die Quantifizierung von konformationellen Zuständen in p38 α in Abhängigkeit der Ligandenbindung. Mithilfe dieser Methodik konnten zwei separate Zustände der Aktivierungsschleife identifiziert werden, welche der DFG-*in*- bzw. der DFG-*out*-Konformation zugeordnet werden konnten und im apo-Zustand im Verhältnis 9:1 vorlagen. Anders als in vorhandenen Komplexkristallstrukturen konnte für keinen der getesteten Typ I- bzw. Typ II-Inhibitoren eine vollständige Verschiebung des Konformationsgleichgewichts zugunsten eines einzelnen Zustands beobachtet werden. Stattdessen waren unabhängig vom gebundenen Liganden beide Konformationen koexistent. Temperaturabhängige Messungen erlaubten die Evaluierung des Konformationsübergangs von DFG-*in* nach DFG-*out* auf thermodynamischer Ebene. Im apo-Zustand sowie in der Typ I-Inhibitor-gebundenen Form von p38 α war die Gibbs-Energie ΔG positiv, d. h. der Konformationsübergang ist energetisch ungünstig. Für die Typ II-stabilisierte Konformation wurden im Vergleich geringere Reaktionsenthalpien und -entropien ermittelt, was wiederum für eine bevorzugte Adaption der DFG-*out*-Konformation spricht. Neben der thermodynamischen Differenzierung zwischen Typ I- und Typ II-Inhibitoren bilden die hier präsentierten Ergebnisse auch die Grundlage für detaillierte Folgestudien wie bspw. Abstands-basierte Multilaterationsansätze. Diese ermöglichen eine dreidimensionale Kartierung von flexiblen und dynamischen Strukturelementen in Proteinen, wie bspw. der Aktivierungsschleife in Proteinkinasen, die in Kristallstrukturen häufig unzureichend aufgelöst sind.

7 ABSTRACT

Protein kinase B, also known as Akt, represents a key player in numerous signal transduction cascades mediating fundamental processes such as cell proliferation, survival, and apoptosis. Therefore, dysregulation of Akt is directly associated with cardiovascular, neurodegenerative as well as oncologic diseases. Genetic lesions in upstream proteins such as PI3K and PTEN commonly drive the pathogenesis of such conditions. However, alterations in membrane-associated receptor tyrosine kinases, e. g., EGFR and c-Kit, can also represent causal drivers for defective Akt signaling. In contrast, lesions in Akt such as the activating somatic mutation E17K or amplification/overexpression of Akt are less commonly found but can mediate driving features for pathogenesis as well. Thus, pharmacologic inhibition of Akt constitutes a versatile strategy for therapeutic intervention in diverse disease settings. In addition to classical ATP-competitive inhibitors that often suffer from insufficient selectivity profiles associated with significant adverse effects, allosteric ligands targeting a less conserved pocket at the interface of the regulatory PH domain and the catalytic kinase domain of Akt have been described. This unique binding mode confers superb selectivity for the target protein over other kinases correlating with improved off-target toxicity.

The present work describes the rational design, development, and characterization of covalent-allosteric Akt inhibitors. Based on co-crystal structures in complex with reversibly binding ligands, novel molecules comprising a cysteine-reactive Michael acceptor were designed and synthesized. Using mass spectrometry and activity-based assays, a focused molecule library derived from the 1,6-naphthyridinone scaffold was demonstrated to covalently bind to and potently inhibit Akt1 *in vitro*. Subsequent structural biological analyses revealed occupation of the allosteric pocket in Akt1 and covalent bond formation to Cys296 and Cys310, respectively, for four individual compounds. Cancer cell line models were employed to assess and prove the antiproliferative activity of this novel substance class mediated by *on-target* inhibition of Akt as revealed by Western blot analyses. Following *in vitro* pharmacokinetic profiling, **3a** (borussertib) displayed favorable activity, selectivity, and PK profiles thus rendering it the lead compound.

Despite insufficient oral bioavailability and a moderate MTD following intraperitoneal application, *in vivo* efficacy was demonstrated for lead compound **3a** (borussertib) in combination with MEK inhibitor trametinib in colorectal and pancreatic patient-derived xenograft models. These features highlight the potential of covalent-allosteric Akt inhibition and represent the rationale for further development and optimization of the lead compound towards a clinical candidate.

The second part of this thesis describes the identification and characterization of modulators of the Keap1/Nrf2 pathway that mediates cytoprotective functions in response to oxidative stress and inflammatory events, both causal drivers in the development of cardiovascular and neurodegenerative diseases. Moreover, dysregulation of Nrf2 can foster tumor development and progression. Using a fluorophore-labeled, Nrf2-mimicking peptide in combination with the recombinant Kelch domain of Keap1 which mediates the protein-protein interaction with Nrf2, a high-throughput-compatible, fluorescence polarization-based assay was developed. Together with the RASPELD screening platform, this assay was employed to screen the in-house library, comprising approximately 30000 compounds, for inhibitors of the Keap1-Nrf2 interaction. Several hit molecules were identified in the primary screen; however, none of those could be validated as inhibitors in follow-up studies. Nevertheless, this new assay technology expands the portfolio of the RASPELD screening unit and thus serves as a basis for future screening campaigns.

The third part of the present thesis describes the analyses of conformational plasticity and activation loop dynamics in p38 α MAPK using electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy. Heterologously expressed and site-specifically spin-labeled p38 α was characterized in the presence and absence of type I and type II inhibitors. The rotational mobility of the introduced spin label (MTSSL) therefore enabled the quantification of conformational states in the apo and ligand-bound form. Two individual activation loop conformations were identified and allocated to the DFG-in and DFG-out conformation, respectively. In the apo state, the DFG-in conformation was favored over the DFG-out conformation. In contrast to what is resolved in complex crystal structures, neither type I nor type II inhibitors induced a complete shift in the conformational equilibrium towards one of the two states, i. e., both conformation are coexistent. Conformational changes from DFG-in to DFG-

out were assessed on a thermodynamic level by temperature-dependent analyses. Both the apo state as well as the type I-stabilized state of p38 α exhibit a positive Gibbs energy ΔG , i. e., the conformational transition is energetically unfavorable. However, the type II-stabilized conformation displays a comparably lower reaction enthalpy and entropy, indicating a favored adaptation of the DFG-out conformation. In addition to allowing a clear discrimination between type I and type II inhibitors, these EPR-based studies serve as a basis for follow-up analyses using, e. g., multilateration approaches which enable the threedimensional mapping of highly flexible and dynamic structural elements, such as the activation loop in protein kinases, that are prone to be insufficiently resolved in crystal structures.

8 MATERIAL UND METHODEN

8.1 Generelle Anmerkungen

Sofern nicht anders beschrieben, wurden Chemikalien und Reagenzien der folgenden Firmen für die Herstellung von Pufferlösungen und Kultivierungsmedien verwendet: Carl Roth (Karlsruhe, DE), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, US), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, US), SERVA (Heidelberg, DE), Fluka (Teil von Sigma-Aldrich), Merck Millipore (Burlington, MA, US), Invitrogen (Teil von Thermo Fisher Scientific), Alfa Aesar (Ward Hill, MA, US), Enzo (Farmingdale, NY, US), AppliChem (Darmstadt, DE), GERBU (Heidelberg, DE), VWR (Radnor, PA, US), Fermentas (Teil von Thermo Fisher Scientific), New England Biolabs (Ipswich, MA, US), Qiagen (Hilden, DE), Calbiochem (Teil von Merck Millipore), Bio-Rad (Hercules, CA, US), GE Healthcare (Chicago, IL, US), Pierce (Teil von Thermo Fisher Scientific), J. T. Baker (Teil von Thermo Fisher Scientific), Novagen (Teil von Merck Millipore), Acros (Teil von Thermo Fisher Scientific), Cell Signaling Technology (CST, Danvers, MA, US).

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter aseptischen Bedingungen an Sicherheitswerkbänken der Klasse 2 durchgeführt. Vor Beginn jeglicher sterilen Arbeiten wurde die Werkbank ebenso wie alle zu verwendenden Geräte mit Bacillol® AF (BODE Chemie) desinfiziert. Des Weiteren wurden ausschließlich autoklavierte bzw. sterile Einweg- und Mehrwegmaterialien verwendet.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Puffer wurden vor Verwendung über PES-Membranfilter (Porengröße: 0.22 µm, Merck Millipore) filtriert und entgast.

Fest- und Flüssignährmedien wurden von der ZE Biotechnologie des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie in Dortmund bezogen.

Zur Darstellung von Proteinstrukturen wurde die Software PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.3 (Schrödinger, New York, NY, US) verwendet.^[433]

8.1.1 Geräte

CO ₂ -Inkubatoren:	Heracell™ 150i (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US); CB 150 (WTB Binder, Tuttlingen, DE)
FPLC-Systeme:	ÄKTA pure (GE Healthcare, Chicago, IL, US); ÄKTA start (GE Healthcare, Chicago, IL, US)
Gelelektrophoresesysteme:	Mini-PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, US); Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, US)
Inkubatoren:	Minitron (Infors HT, Einsbach, DE); Multitron Pro (Infors HT, Einsbach, DE); MaxQ™ 8000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US); Certomat® BS-1 (Sartorius, Göttingen, DE)
LC-MS-System:	UltiMate 3000 Pump, Diode Array Detector, Column Compartment,, Autosampler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US); Velos Pro Dual-Pressure Linear Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US); AdvanceBio Desalting-RP Cartridge (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US)
Liquid Handling Systeme:	Echo 520 Liquid Handler (Labcyte Inc., San José, CA, US); MultiDrop™ Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)
Microfluidizer:	Model M-110L (Microfluidics, Westwood, MA, US)
Mikroskope:	EVOS FLoid (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US); EVOS XL Core (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)
Mikrotiterplatten-Lesegerät:	Infinite® M1000 (Tecan, Männedorf, CH); EnVision 2104 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, US)
Pipetten:	Research plus (Eppendorf, Hamburg, DE); Xplorer (Eppendorf, Hamburg, DE)
Plattenschüttler:	Titramax 100 (Heidolph, Schwabach, DE)

Rotoren:	Sorvall SA-600 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US); FiberLite™ F20-6x100, FiberLite™ F8-6x1000y (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)
Sicherheitswerkbänke:	HERAsafe® KS 12, KS 18 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)
Spektrophotometer:	NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)
Thermocycler:	Mastercycler® Pro (Eppendorf, Hamburg, DE)
Thermoschüttler:	ThermoMixer® C (Eppendorf, Hamburg, DE)
Vakuumkonzentrator:	Concentrator plus (Eppendorf, Hamburg, DE)
Zellzähler:	Countess II Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)
Zentrifugen:	5424, 5424R, 5804R (Eppendorf, Hamburg, DE); Sorvall Evolution RC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

8.1.2 Verbrauchsmaterialien

Dialyseschlauch/-kassette:	Slide-A-Lyzer MWCO 10000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US); Spectra/Por® 7 MWCO 10000 (Carl Roth, Karlsruhe, DE)
Mikrotiterplatten:	384-well Zellkultur Mikroplatte, µClear® (Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT); 384-well Small Volume™ HiBase Mikroplatte (Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT); 384-well low dead volume microplates (384LDV, Labcyte Inc., San José, CA, US); 384-well polypropylene microplates (384PP, Labcyte Inc., San José, CA, US)
Kristallisationsplatten:	EasyXtal 15-Well Tools (Qiagen, Hilden, DE)
Spritzenvorsatzfilter:	PES-Membran, Porengröße: 0.2/0.45 µm (Sarstedt, Nümbrecht, DE)
Zellkultur:	TC-Flasche T25/T75/T175 Standard (Sarstedt, Nümbrecht, DE); TC-Flasche T25/T75/T175 Cell+

(Sarstedt, Nümbrecht, DE); TC-Schale 35/60 Standard (Sarstedt, Nümbrecht, DE); TC-Platte 6 Well Standard (Sarstedt, Nümbrecht, DE); TC-Platte 6 Well Cell+ (Sarstedt, Nümbrecht, DE); Zellschaber 16 cm 2-Positions-Klinge (Sarstedt, Nümbrecht, DE);

Zentrifugalkonzentratoren: Vivaspin MWCO 10 kDa (Sartorius, Göttingen, DE);
Vivaspin MWCO 30 kDa (Sartorius, Göttingen, DE)

8.1.3 Enzyme, Reagenzien und Kits

T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Ipswich, MA, US)

OneTaq® Hot Start DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, US)

Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, US)

PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US)

Benzonase® Nuclease (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)

Lysozym (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)

Thrombin (SERVA, Heidelberg, DE)

Pierce™ Trypsin Protease, MS Grade (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

MAP2K6 (MKK6), S207E/T211E (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

Akt1^{wt} (ProQinase, Freiburg, DE)

Akt1^{E17K} (SignalChem, Richmond, BC, CA)

Akt2^{wt} (SignalChem, Richmond, BC, CA)

Akt3^{wt} (SignalChem, Richmond, BC, CA)

*Bam*HI-HF (New England Biolabs, Ipswich, MA, US)

*Dpn*I (New England Biolabs, Ipswich, MA, US)

*Nco*I-HF (New England Biolabs, Ipswich, MA, US)

*Nde*I (New England Biolabs, Ipswich, MA, US)

Deoxynucleotide (dNTP) Solution Set (New England Biolabs, Ipswich, MA, US)

Quick-Load® Purple 2-Log Ladder (New England Biolabs, Ipswich, MA, US)

PageRuler™ Plus PreStained Protein Ladder, PageRuler™ PreStained Protein Ladder, PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)
Chameleon Duo Pre-stained (LI-COR, Lincoln, NE, US)

Pierce™ Protease Inhibitor Tablets, EDTA-free (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)
cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)
PhosStop™, phosphatase inhibitor tablets (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)
RIPA-Puffer, 10X (New England Biolabs, Ipswich, MA, US)
Odyssey® Blocking Buffer, TBS (LI-COR, Lincoln, NE, US)
Immobilon-FL PVDF-Membran (Merck Millipore, Burlington, MA, US)

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, DE)
QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, DE)
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, US)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)
HTRF® KinEASE™ STK S3 Assay Kit (Cisbio, Codolet, FR)
anti-phospho ATF2-K (Cisbio, Codolet, FR)
anti-GST-d2 (Cisbio, Codolet, FR)

8.1.4 Testsubstanzen

Alle Testsubstanzen wurden vor Verwendung hinsichtlich ihrer Identität und Reinheit mittels LC-MS-Analyse überprüft:

GSK690693 (SelleckChem, Houston, TX, US)
AZD5363/Capivasertib (SelleckChem, Houston, TX, US)
GDC-0068/Ipatasertib (SelleckChem, Houston, TX, US)
MK-2206 (SelleckChem, Houston, TX, US)
ARQ092/Miransertib (SelleckChem, Houston, TX, US)
Doxorubicin (LC Labs, Woburn, MA, US)
Staurosporin (LC Labs, Woburn, MA, US)
Y-27632 (LC Labs, Woburn, MA, US)
Trametinib (LC Labs, Woburn, MA, US)
SB203580 (LC Labs, Woburn, MA, US)

Sorafenib (LC Labs, Woburn, MA, US)
Regorafenib (LC Labs, Woburn, MA, US)
SKF-86002 (Merck Millipore, Burlington, MA, US)
Skepinone-L (Merck Millipore, Burlington, MA, US)

8.1.5 Zelllinien und Bakterienstämme

XL10-Gold, *Escherichia coli* (Stratagene, La Jolla, US)
BL21 (DE3), *Escherichia coli* (Novagen, Merck Millipore, Burlington, MA, US)
BL21 Codon Plus (DE3) RIPL, *Escherichia coli* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US)

Sf9, *Spodoptera frugiperda* (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)
High Five™, *Trichoplusia ni* (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

AN3-CA (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, US; zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Jan G. Hengstler)
Bo103 (Tumor entnommen am Ruhr-Universität Comprehensive Cancer Center; Zelllinie etabliert und zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Stephan A. Hahn)
BT-474 (CLS Cell Lines Service, Eppelheim, DE; zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Jan G. Hengstler)
Dan-G (CLS Cell Lines Service, Eppelheim, DE; zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Jens T. Siveke)
HPAF-II (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, US; zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Jens T. Siveke)
KU-19-19 (Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, DE)
MCF-7 (CLS Cell Lines Service, Eppelheim, DE; zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. Jan G. Hengstler)
T-47D (European Collection of Authenticated Cell Lines (ECACC), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)
ZR-75-1 (European Collection of Authenticated Cell Lines (ECACC), Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)

8.1.6 Medien und Zellkulturreagenzien

Sf-900™ III SFM (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

Grace's Insect Medium, unsupplemented (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

MEM, GlutaMAX™ (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

RPMI 1640, GlutaMAX™ (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

DMEM, high glucose, GlutaMAX™ (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

DMEM/F-12, GlutaMAX™ (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech, Aidenbach, DE)

FBS, EU approved (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

Penicillin-Streptomycin, 100X (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

Trypsin-EDTA, 0.25 %, Phenolrot (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

DPBS (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

Amphotericin B (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

Natriumpyruvat (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

Geneticin™/G418 Sulfat (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

Insulin, human, rekombinant (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)

Ciprofloxacin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)

Choleratoxin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)

1-Thioglycerol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)

Trypan Blau, 0.4 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US)

Cellfectin™ II Reagent (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, US)

8.1.7 Antikörper

Tabelle 12. Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Produkt-Nr.	Hersteller
4E-BP1, p-Ser65	Kaninchen	1:1000	#13443	CST
β -Aktin	Maus	1:10000	A5441	Sigma-Aldrich
Akt, p-Ser473	Kaninchen	1:2000	#4060	CST
Akt, p-Thr308	Kaninchen	1:1000	#9275	CST
Akt, total	Maus	1:1000	#2920	CST
p44/42 (Erk1/2), p-Thr202/Tyr204	Kaninchen	1:2000	#4370	CST
PARP	Kaninchen	1:1000	#9542	CST
PRAS40, p-Thr246	Kaninchen	1:1000	#2997	CST
S6 Ribosomal Protein, p-Ser232/236	Kaninchen	1:1000	#4858	CST
anti-Mouse, DyLight 680 Conjugate	Ziege	1:10000	#5470	CST
anti-Rabbit, DyLight 800 4X PEG Conjugate	Ziege	1:20000	#5151	CST

8.2 Molekular- und Mikrobiologische Methoden

8.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA erfolgt heutzutage routinemäßig mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), welche 1985 erstmals von SAIKI *et al.* beschrieben wurde und für dessen Erfindung KARY B. MULLIS im Jahr 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde.^[434] Unter Verwendung eines DNA-Templats, Primern sowie dNTPs und einer geeigneten DNA-Polymerase, z. B. aus dem thermophilen Archaeobakterium *Pyrococcus furiosus*,^[435] können DNA-Segmente in definierten, Mg²⁺-haltigen Puffern exponentiell und mit enorm hoher Genauigkeit amplifiziert werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten PCR-basierten Reaktionen dienten der ortsspezifischen Mutagenese (Tabelle 13 und Tabelle 14) nach einem adaptierten QuikChange™ II XL Site-Directed Mutagenesis-Protokoll (Stratagene)^[436] sowie der Überprüfung von Klonierungsansätzen (Kolonie-PCR; Tabelle 15 und Tabelle 16).

Tabelle 13. Zusammensetzung der Mutagenese-PCR.

Komponente	Volumen/Menge
5X Phusion® HF Puffer	4.0 µL
10 mM dNTPs	0.4 µL
10 µM Primer F	1.0 µL
10 µM Primer R	1.0 µL
Templat-DNA	50 ng
DMSO	0.6 µL
Phusion® DNA-Polymerase	0.2 µL
ddH ₂ O	auf 20.0 µL

Tabelle 14. Temperaturprogramm der Mutagenese-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	
1 initiale Denaturierung	98 °C	30 s	
2 Denaturierung	98 °C	10 s	16 Zyklen
3 Hybridisierung	52-60 °C	15 s	
4 Elongation	72 °C	30 s pro kb	
5 finale Elongation	72 °C	10 min	
6 -	4 °C	∞	

Tabelle 15. Zusammensetzung der Kolonie-PCR.

Komponente	Volumen/Menge
5X OneTaq® HS Puffer	4.0 µL
10 mM dNTPs	0.4 µL
10 µM Primer F	0.4 µL
10 µM Primer R	0.4 µL
Templat-DNA	Zellmasse einer Kolonie
OneTaq HS DNA-Polymerase	0.1 µL
ddH ₂ O	auf 20.0 µL

Tabelle 16. Temperaturprogramm der Kolonie-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	
1 initiale Denaturierung	94 °C	30 s	
2 Denaturierung	94 °C	15 s	30 Zyklen
3 Hybridisierung	52 °C	20 s	
4 Elongation	68 °C	60 s pro kb	
5 finale Elongation	68 °C	10 min	
6 -	4 °C	∞	

8.2.2 Reinigung von PCR-Produkten

Für die nachfolgende Verwendung von amplifizierten (Mutagenese-)PCR-Produkten wurden diese mithilfe des QIAquick PCR Purification Kits (Qiagen) den Herstellerangaben folgend gereinigt und in sterilem ddH₂O eluiert.

8.2.3 Klonierung mittels Restriktion und Ligation

Für die Klonierung von Genen aus Templatvektoren wurden diese zunächst mittels PCR unter Verwendung geeigneter Primer amplifiziert, im Anschluss wie in Kapitel 8.2.2 beschrieben gereinigt und durch den Einsatz von kompatiblen Restriktionsendonukleasen für die darauffolgende Ligation in den Zielvektor vorbereitet. Der Restriktionsverdau erfolgte hierbei im CutSmart®-System (New England Biolabs) nach Herstellerangaben. Nach erneuter säulenbasierter Reinigung der enzymatisch verdauten Produkte (*inserts*), wurden diese mittels T4 DNA Ligase (New England Biolabs) in die entsprechenden Zielvektoren ligiert; hierfür wurde ein modifiziertes Quick Ligation™ Protokoll (New England Biolabs) verwendet (Tabelle 17). Für die weitere Amplifikation der ligierten Plasmide wurden diese in chemisch kompetente *E. coli* XL10-Gold transformiert (siehe Kapitel 8.2.4) und entsprechend der Antibiotikaresistenz des Zielplasmids auf LB-Agarplatten selektiert. Der Ligationserfolg wurde initial *via* Kolonie-PCR und analytischer Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 8.2.7) überprüft und mittels DNA-Sequenzierung abschließend validiert.

Tabelle 17. Zusammensetzung der Ligationsreaktion.

Komponente	Volumen/Menge
4X Quick Ligation Puffer ^a	5.0 µL
Vektor-DNA	20 pmol
<i>insert</i> -DNA	100 pmol
T4 DNA Ligase	1.0 µL
ddH ₂ O	auf 20.0 µL

^a 250 mM Tris/HCl, 40 mM MgCl₂, 4 mM DTT, 4 mM ATP, 30 % PEG 6000, pH 7.6 @ 25 °C

8.2.4 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Zur Einbringung von DNA in chemisch kompetente *E. coli* XL10-Gold oder BL21 (DE3), welche zuvor nach einer adaptierten Methode von INOUE *et al.* unter Einsatz von CaCl₂ vorbereitet wurden,^[437] wurden je 50 µL der kryokonservierten Zellen in einem Eisbad aufgetaut und mit der gewünschten Menge an DNA versetzt und gemischt. Die Reaktionsmischung wurde für 20 min bei 4 °C inkubiert, danach

für 60 s bei 42 °C erhitzt und im Anschluss für weitere 2 min auf Eis abgekühlt bevor die Zellsuspension mit 500 µL vorgewärmtem LB-Medium verdünnt und für 60 min bei 37 °C und 600 rpm geschüttelt wurde. Die Zellen wurden danach für 5 min bei 2000 *g* pelletiert, vom Überstand befreit, in 30 µL frischem LB-Medium resuspendiert und abschließend auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert.

8.2.5 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli*-XL10 Gold-Zellenerfolge mithilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben unter Verwendung von Zellmasse aus Übernachtskulturen mit Volumina von 5-10 mL. DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmungen der isolierten Plasmide wurden durch Absorptionsmessungen bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm an einem NanoDrop™ 2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

8.2.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen von isolierter Plasmid-DNA erfolgten nach der Sanger-Methode bei den Firmen GATC (Konstanz, DE), Eurofins Genomics (Ebersberg, DE) und Microsynth Seqlab (Göttingen, DE). Die Sequenzierungs-Primer wurden hierfür mit den zu sequenzierenden Plasmid-DNAs vorgemischt; die zugehörigen Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in Tabelle 18 gelistet.

Tabelle 18. Übersicht der verwendeten Primer; die Sequenzen sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

Primer	Sequenz
pIEx_seq1	GTTTCAGTTGCAAGTTGACTGG
pIEx_seq2	TACATGATGAAAGGAGGGAAGGGAG
T7_for	TAATACGACTCACTATAGGG
T7_rev	CTAGTTATTGCTCAGCGGT
K249C_for	GGCTGAGCTTTTGAAGTGCATCTCCTCAGAGTCTG
K249C_rev	CAGACTCTGAGGAGATGCACTTCAAAAGCTCAGCC
S251C_for	CTTTTGAAGAAAATCTGCTCAGAGTCTGCAAG
S251C_rev	CTTGCAGACTCTGAGCAGATTTTCTTCAAAAG
S252C_for	GAAGAAAATCTCCTGCGAGTCTGCAAGAAAC
S252C_rev	GTTTCTTGCAGACTCGCAGGAGATTTTCTTC
D294C_for	GCTTGTATTGGACTCATGCAAGAGAATTACAGCGG
D294C_rev	CCGCTGTAATTCTCTTGCATGAGTCCAATACAAGC
S119C_for	CTGAACAACATTGTGAAATGCCAGAAGCTTACAGATGAC
S119C_rev	GTCATCTGTAAGCTTCTGGCATTTCACAATGTTGTTGAG
A277C_for	CGAATGTATTTATTGGTTGCAATCCCCTGGCTGTGCG
A277C_rev	CGACAGCCAGGGGATTGCAACCAATAAATACATTCG
A309C_for	CCTTGCACATGCCTACTTTTGCCAGTACCACGATCCTGATG
A309C_rev	CATCAGGATCGTGGTACTGGCAAAAGTAGGCATGTGCAAGG
S347C_for	CCTATGATGAAGTCATCTGCTTTGTGCCACCACCC
S347C_rev	GGGTGGTGGCACAAAGCAGATGACTTCATCATAGG

8.2.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des Klonierungserfolgs wurden die Produkte der Kolonie-PCR mittels Agarose-Gelelektrophorese hinsichtlich ihrer Größe, welche Rückschlüsse auf eine erfolgreiche Ligation erlaubt, analysiert. Hierzu wurden 10 µL pro Reaktionsmischung mit 2 µL 6X Ladepuffer (60 mM Tris/HCl pH 7.5, 15 % w/v Ficoll®-400, 0.12 % Orange G) gemischt und auf ein 1 %-iges Agarosegel, welchem der fluoreszente DNA-Farbstoff SYBR™ Safe (Thermo Fisher Scientific) beigelegt wurde, aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte in TAE-Laufpuffer für 40 min bei 100 V gefolgt von der anschließenden Visualisierung an einem Gel Doc™ XR+ Gel-Dokumentationssystem (Bio-Rad) bei einer Anregungswellenlänge von 302 nm.

8.3 Heterologe Proteinexpression in *E. coli*

Für die heterologe Expression von p38 α - und Keap1-Kelch-Konstrukten in *E. coli* wurden zunächst chemisch kompetente BL21 (DE3) mit den jeweiligen Plasmiden nach dem Hitzeschock-Protokoll (siehe Kapitel 8.2.4) transformiert und auf Selektionsagar kultiviert. Für Vorkulturen wurden je 20-50 mL TB-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin versetzt, mit je einer gewachsenen Kolonie inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden aus den Vorkulturen durch 1000-fache Verdünnung in TB-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin die Hauptkulturen angesetzt und bei 37 °C, 150 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) von 0.6-0.8 wurden die Kulturen in Eisbädern auf ca. 18 °C abgekühlt, mit 0.5 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und für weitere 16-24 h bei 18 °C und 150 rpm inkubiert. Abschließend wurden die Zellen mittels Zentrifugation für 20 min bei 4000 g und 4 °C pelletiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

8.4 Zellkultur – Insektenzellen

Die heterologe Expression von Akt-Konstrukten erfolgte mithilfe des *Baculovirus Expression Vector Systems* (BEVS) in immortalisierten Sf9-Insektenzellen, welche ursprünglich aus dem Herbst-Heerwurm (*Spodoptera frugiperda*) isoliert wurden. Zellkultivierung, Transfektion, Virus-Amplifikation und Proteinexpression sind in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben.

8.4.1 Zellkultivierung

Die verwendeten Sf9-Insektenzellen wurden standardmäßig in Sf-900™ III SFM-Medium (Gibco®) in einem Schüttelinkubator bei 27 °C und 120 rpm kultiviert. Das Kulturvolumen betrug hierbei üblicherweise 50-100 mL und die Zelldichte lag in einem Bereich von $0.4-8.0 \times 10^6$ Zellen/mL. Die verwendeten Erlenmeyerkolben hatten ein fünffach größeres Nennvolumen im Vergleich zum Kulturvolumen, um eine ausreichende Umwälzung der Zellsuspension sowie Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten. Um eine Zelldichte von 8×10^6 Zellen/mL nicht zu überschreiten, wurden die Kulturen zweimal pro Woche passagiert und mit frischem Sf-900™ III SFM-Medium (Gibco®) auf $0.4-1.0 \times 10^6$ Zellen/mL verdünnt. Die individuellen Zellchargen wurden nach dem Auftauen (siehe Kapitel 8.4.2) für maximal drei Monate kultiviert und für die Transfektion (siehe Kapitel 8.4.4), Virusamplifikation (siehe Kapitel 8.4.5, 8.4.6) und Proteinexpression (siehe Kapitel 8.4.7) verwendet. Die Messung der Zellviabilität erfolgte mittels Trypanblau-Färbung unter Verwendung des Countess II Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific), wobei der anionische Diazofarbstoff abgestorbene Zellen dunkelblau anfärbt, von lebenden Zellen jedoch nicht aufgenommen wird.^[438]

8.4.2 Inkulturnahme von Insektenzellen

Für die Inkulturnahme von Insektenzellen aus frühen Passagen, welche aliquotiert und bei -150 °C für den späteren Gebrauch eingefroren waren, wurde ein Kryogefäß (2 mL, Sarstedt), welches ca. 1.8 mL Zellsuspension enthielt, in einem Wasserbad

bei 27 °C aufgetaut und der Inhalt des Kryogefäßes in 48 mL vorgewärmtes Sf-900™ III SFM-Medium (Gibco®) überführt. Die optische Dichte und Viabilität der Zellsuspension wurden im Anschluss täglich gemessen und die erste Passagierung erfolgte bei Erreichen einer Zelldichte von 2.0×10^6 Zellen/mL.

8.4.3 Kryokonservierung von Insektenzellen

Für die Kryokonservierung von Insektenzellen aus frühen Passagen wurden Zellsuspensionen in der exponentiellen Wachstumsphase ($2.0\text{-}5.0 \times 10^6$ Zellen/mL) mit einer Viabilität >95 % zunächst für 10 min bei 100 g in einem sterilen 50 mL Zentrifugenröhrchen zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde als konditioniertes Medium in ein steriles 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt, mittels Spritzenvorsatzfilter (PES-Membran, Porengröße: 0.2 µm, Sarstedt) sterilfiltriert, mit 15 % DMSO versetzt und bei 4 °C gelagert. Das Zellpellet wurde in kaltem Sf-900™ III SFM-Medium (Gibco®) resuspendiert und auf eine Zelldichte von 4.0×10^7 Zellen/mL verdünnt. Die erhaltene Zellsuspension wurde verhältnismäßig mit DMSO-haltigem, konditioniertem Medium verdünnt (2.0×10^7 Zellen/mL) und anschließend zu jeweils 1.8 mL in sterile Kryogefäße aliquotiert. Die Kryogefäße wurden wiederum in einen mit Isopropanol befüllten Gefrierbehälter (Mr Frosty™, Thermo Fisher Scientific) überführt und bei -80 °C mit einer Kühlrate von -1 °C/min langsam eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Kryogefäße für die langfristige Kryokonservierung bei -150 °C umgelagert.

8.4.4 Transfektion von Insektenzellen (P1-Virus)

Die Generierung von rekombinanten Baculoviren, die für die Proteinexpression in Insektenzellen verwendet werden können, erfolgte an der *Dortmund Protein Facility* (DPF) am Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie unter Verwendung des *flashBAC™*- bzw. *flashBAC™ ULTRA*-Systems (Oxford Expression Technology). Hierfür wurden Insektenzellen in der exponentiellen Wachstumsphase ($2.0\text{-}5.0 \times 10^6$ Zellen/mL) mit einer Viabilität >95 % zunächst mit Grace's Insect Medium, unsupplemented (Gibco®) auf eine Zelldichte von 6.0×10^5 Zellen/mL verdünnt.

Anschließend wurden je 400 μL der Zellsuspension in jede Kavität einer 24-*well* Mikroplatte (Corning) transferiert, welche anschließend für mindestens eine Stunde bei 27 °C in einer Feuchtekammer inkubiert wurde, wodurch eine Anheftung der Zellen an die beschichtete Wachstumsoberfläche der Mikrotiterplatte ermöglicht wurde. Währenddessen wurde die Transfektionslösung, bestehend aus 200 μL Grace's Insect Medium, unsupplemented (Gibco®), 2 μL Cellfectin II Reagent (Gibco®), 20 ng (1 μL) *flashBAC*[™] (ULTRA) DNA sowie 100 ng (5 μL) Transfervektor, vorbereitet und für 20-30 min bei RT inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde das Medium von den adhärenierten Zellen entfernt und diese wurden durch Zugabe von 200 μL Grace's Insect Medium, unsupplemented (Gibco®) einmalig gewaschen. Das Medium wurde erneut entfernt und durch 200 μL der Transfektionslösung unter tropfenweiser Zugabe ersetzt, gefolgt von einer fünfstündigen Inkubation bei 27 °C in einer Feuchtekammer. Anschließend wurde die Transfektionslösung abgenommen und die Zellen mit 400 μL vorgewärmtem Sf-900[™] III SFM-Medium (Gibco®), welches mit 1X Antibiotic-Antimycotic (Gibco®) ergänzt wurde, versetzt. Nach fünf- bis siebentägiger Inkubation bei 27 °C in einer Feuchtekammer wurde der Überstand in ein steriles 1.5 mL Zentrifugenröhrchen überführt, für 10 min bei 500 *g* zentrifugiert und wiederum in ein frisches 1.5 mL Zentrifugenröhrchen transferiert. Der so erhaltene P1-Virus wurde für die Amplifikation zum P2-Virus (siehe Kapitel 8.4.5) verwendet und für den weiteren Gebrauch bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

8.4.5 P2-Virus-Amplifikation

Zur Erhöhung des viralen Titers ist eine Amplifikation des P1-Virus erforderlich. Hierzu wurden 5 mL einer Sf9-Insektenzellsuspension mit einer Zelldichte von 2.0×10^6 Zellen/mL (Zellviabilität >95 %) in jede Kavität einer 24-*deep well plate* (Corning) überführt und mit 150 μL des gewünschten P1-Virus infiziert. Die Inkubation erfolgte bei 27 °C und 250 rpm für vier Tage bevor der amplifizierte P2-Virus durch Zentrifugation der Zellsuspension bei 500 *g* sowie 4 °C für 10 min und anschließenden Transfer des geklärten Überstandes in ein steriles 1.5 mL Zentrifugenröhrchen isoliert wurde. Nach Zugabe von 250 μL FBS (Gibco®) wurde

der P2-Virus bis zur Weiterverwendung bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt bzw. zu jeweils 100 µL aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C kryokonserviert gelagert.

8.4.6 P3-Virus-Amplifikation

Die für die Proteinexpression in Insektenzellen benötigten hohen Virustiter wurden durch erneute Amplifikation zum P3-Virus erhalten. Hierzu wurden 100 mL Insektenzellsuspension mit einer Dichte von 3.0×10^6 Zellen/mL und einer Viabilität >95 % mit 20 µL des amplifizierten P2-Virus infiziert und für 3-5 Tage bei 27 °C und 120 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer Zellviabilität von 70-80 % wurde die Zellsuspension in sterile 50 mL Zentrifugenröhrchen (Sarstedt) überführt, bei 2000 *g* und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand mittels Spritzenvorsatzfilter (PES-Membran, Porengröße: 0.2 µm, Sarstedt) in frische 50 mL Zentrifugenröhrchen sterilfiltriert. Der amplifizierte P3-Virus wurde bis zur Weiterverwendung, jedoch für maximal drei Monate, bei 4 °C im Dunkeln gelagert.

8.4.7 Heterologe Proteinexpression in Insektenzellen

Die Proteinexpression im präparativen Maßstab erfolgte üblicherweise in Erlenmeyerkolben mit einem Nennvolumen von 5 L. Hierzu wurden die Sf9-Insektenzellen bis zur benötigten Zellzahl kultiviert und im Anschluss mit 3 mL des P3-Virus pro 100 mL Zellsuspension (Zelldichte: 3.0×10^6 Zellen/mL, Zellviabilität: >95 %) infiziert. Die Kulturen wurden danach für 3-4 Tage bei 27 °C und 120 rpm inkubiert bevor die Insektenzellen mittels Zentrifugation bei 3000 *g* und 4 °C für 15 min geerntet wurden. Das erhaltene Zellpellet wurde einmalig mit kaltem PBS gewaschen, in sterile 50 mL Zentrifugenröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und für den weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

8.5 Proteinisolation und -reinigung

8.5.1 Allgemeines

Die im Folgenden beschriebenen Abläufe wurden bei 4 °C durchgeführt. Die säulenchromatographische Proteinreinigung erfolgte an den Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-Systemen ÄKTA™ start und ÄKTA™ pure (GE Healthcare, Chicago, IL, US) unter Verwendung der in Tabelle 19 genannten Chromatographiesäulen. Die Probenreinheit und -zusammensetzung wurde mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in 12 %-igen Tris/HCl-Polyacrylamidgelen (Tabelle 20) im Tris-Glycin-System nach LAEMMLI (25 mM Tris, 192 mM Glycin, pH 8.3, 0.1 % SDS) bei RT und 40 mA pro Gel sowie anschließender Färbung mit Coomassie Brilliant Blau (CBB) überprüft.^[439] Proteinkonzentrationsbestimmungen erfolgten durch Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 280 nm an einem NanoDrop™ 2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) unter Berücksichtigung des für das jeweilige Protein errechneten molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten nach Lambert-Beer (siehe Kapitel 10.1).^[440-441]

Tabelle 19. Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten FPLC-kompatiblen Chromatographiesäulen.

Bezeichnung	Hersteller
Ni-NTA Superflow Cartridge, 5 mL	Qiagen
HiTrap SP Fast Flow, 5 mL	GE Healthcare
HiTrap Q Fast Flow, 5 mL	GE Healthcare
Mono Q 10/100 GL	GE Healthcare
HiLoad 16/600 Superdex 75 pg	GE Healthcare
HiLoad 26/600 Superdex 75 pg	GE Healthcare
HiLoad 16/600 Superdex 200 pg	GE Healthcare
HiLoad 26/600 Superdex 200 pg	GE Healthcare
Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare
Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare

Tabelle 20. Rezepte für verwendete Sammel- und Trenngele.

Geltyp	Zusammensetzung
Sammelgel	6 % Acrylamid, 125 mM Tris/HCl (pH 6.8), 0.1 % SDS, 0.1 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 0.2 % TEMED
Trenngel	12-17 % Acrylamid, 375 mM Tris/HCl (pH 8.8), 0.1 % SDS, 0.1 % $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, 0.2 % TEMED

8.5.2 p38 α -Konstrukte

Das aus der Expressionskultur erhaltene Zellpellet wurde zunächst im doppelten Volumen Ni-AC-Puffer A (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0) resuspendiert, mit 10 μL Benzonase® (Sigma-Aldrich) pro 50 mL Probe versetzt und dispergiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit einem Microfluidizer in 5-10 Zyklen. Im Anschluss wurde das Lysat für 60 min bei 42000 *g* zentrifugiert, um die unlöslichen Zellbestandteile zu sedimentieren.

Der lösliche, proteinhaltige Überstand wurde mittels Spritzenvorsatzfilter (PES-Membran, Porengröße: 0.22 μm , Sarstedt) filtriert und mit einer Flussrate von 2 mL/min auf eine mit Ni-AC-Puffer A äquilibrierte Ni²⁺-Affinitätschromatographiesäule (Ni-NTA Superflow Cartridge 5 mL, Qiagen) aufgetragen. Nach erfolgter Beladung der Probe wurde die Säule mit Ni-AC-Puffer A gewaschen bis ein stabiles UV-Signal erhalten wurde. Die Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-100 % Ni-AC-Puffer B (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0) über einen Zeitraum von 30 min. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung analysiert und die Zielprotein-enthaltenden Fraktionen vereinigt.

Die vereinigte Lösung wurde zur Abspaltung des His₆-Tags mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PreScission Protease (in der AG Rauh exprimiert und gereinigt) versetzt, in einen Dialyseschlauch (MWCO 10000, Spectra/Por® 7, Carl Roth) überführt und über Nacht in 2 L Dialysepuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7.5) dialysiert. Anschließend wurde die dialysierte Probe mittels Spritzenvorsatzfilter (PES-Membran, Porengröße: 0.22 μm , Sarstedt) filtriert, durch Zugabe von drei Volumen AEC-Puffer A (50 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7.4) verdünnt und mit einer Flussrate von 1.5 mL/min auf eine mit AEC-Puffer A vorbereitete Anionenaustauschchromatographiesäule

(HiTrap Q Fast Flow, 5 mL, GE Healthcare) geladen. Die Säule wurde mit AEC-Puffer A gewaschen bis ein stabiles UV-Signal erhalten wurde und die Elution erfolgte mithilfe eines linearen Gradienten von 0-100 % AEC-Puffer B (50 mM Tris, 600 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7.4) über 30 min. Die erhaltenen Fraktionen wurden erneut *via* SDS-PAGE und CBB-Färbung analysiert, die Zielprotein-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und mit einem Zentrifugalkonzentrator (MWCO 10 kDa, Vivaspin, Sartorius) auf 2 mL eingeeengt.

Die konzentrierte Proteinlösung wurde für 10 min bei 20000 *g* zentrifugiert bevor sie auf eine mit SEC-Puffer (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, pH 7.4) äquilibrierte Größenausschlusschromatographiesäule geladen wurde. Die Elution erfolgte unter isokratischen Bedingungen mit SEC-Puffer bei einer Flussrate von 1 mL/min. Die gesammelten Fraktionen wurden wiederum mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung auf ihre Zusammensetzung analysiert. Jene Fraktionen, die reines und monomeres Zielprotein enthielten, wurden vereinigt, mit einem Zentrifugalkonzentrator (MWCO 10 kDa, Vivaspin, Sartorius) auf 10-25 mg/mL konzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

8.5.3 Keap1-Kelch-Konstrukte

Das Zellpellet wurde in drei Volumen Ni-AC-Puffer A (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, 2 mM DTT, pH 8.0) resuspendiert, dispergiert und nach Zugabe von 0.05 % Tween-20 sowie 10 µL Benzonase® (Sigma-Aldrich) pro 50 mL Probe für 30 min auf Eis inkubiert. Mittels Microfluidizer wurden die Zellen lysiert (5-10 Zyklen, 4 °C) und anschließend bei 42000 *g* für 60 min zentrifugiert.

Der lösliche Überstand wurde im Anschluss über eine PES-Membran (Porengröße: 0.22 µm, Sarstedt) filtriert und mit einer Flussrate von 2 mL/min auf eine mit Ni-AC-Puffer A äquilibrierte Ni²⁺-Affinitätschromatographiesäule (Ni-NTA Superflow Cartridge 5 mL, Qiagen) geladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit Ni-AC-Puffer A entfernt und die Elution der spezifisch gebundenen

Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-100 % Ni-AC-Puffer B (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, 2 mM DTT, pH 8.0) über einen Zeitraum von 45 min. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender CBB-Färbung analysiert, wobei jene Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, für die weitere Reinigung vereinigt wurden.

Zur Vorbereitung auf die darauffolgende Anionenaustauschchromatographie, wurde die vereinigte Probe über Nacht in einem Dialyseschlauch (MWCO 10000, Spectra/Por® 7, Carl Roth) gegen 2 L AEC-Puffer A (25 mM Tris, 20 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 2 mM DTT, pH 8.0) dialysiert. Die Abspaltung des His₆-Tags erfolgte optional durch Zugabe von 10 U Thrombin pro mg Protein in der vereinigten Probe. Die dialysierte Lösung wurde daraufhin filtriert (PES-Membran, Porengröße: 0.22 µm, Sarstedt) und mit einer Flussrate von 2 mL/min auf eine mit AEC-Puffer A äquilibrierte Anionenaustauschchromatographiesäule (Mono Q 10/100 GL, GE Healthcare) geladen. Im Anschluss wurde mit AEC-Puffer A gewaschen bis ein stabiles UV-Signal erhalten wurde. Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-100 % AEC-Puffer B (25 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 2 mM DTT, pH 8.0) über 60 min. Die Eluatfraktionen wurden *via* SDS-PAGE und CBB-Färbung analysiert und entsprechend der Anwesenheit des Zielproteins vereinigt und mittels Zentrifugalkonzentrator (MWCO 10 kDa, Vivaspin, Sartorius) auf ein Volumen von 2 mL eingeengt.

Für den abschließenden Reinigungsschritt wurde die konzentrierte Probe für 10 min bei 20000 *g* zentrifugiert und anschließend auf eine mit SEC-Puffer (20 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, 5 mM DTT, pH 7.5) vorbereitete Größenausschlusschromatographiesäule (HiLoad 16/60 Superdex 75 pg, GE Healthcare) geladen und isokratisch mit SEC-Puffer bei einer Flussrate von 1 mL/min eluiert. Fraktionen, welche monomeres und reines Zielprotein enthielten, wurden vereinigt, mittels Zentrifugalkonzentrator (MWCO 10 kDa, Vivaspin, Sartorius) auf 15-20 mg/mL konzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

8.5.4 Akt1-Konstrukte

Die Reinigung von Akt1-Konstrukten, welche in biochemischen/-physikalischen Assays bzw. MS-basierten Studien verwendet wurden, erfolgte in einem zweistufigen Prozess bestehend aus Ni²⁺-Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie (SEC-Puffer I). Für die Reinigung von Konstrukten, welche zur Kristallisation eingesetzt wurden, erfolgte zudem noch eine Abspaltung des His₆-Tags bei simultaner Dialyse, eine Anionenaustauschchromatographie sowie eine weitere Größenausschlusschromatographie (SEC-Puffer II).

Für den Zellaufschluss mittels Microfluidizer (5-10 Zyklen) wurde das Zellpellet zuvor im dreifachen Volumen Ni-AC-Puffer A (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0), ergänzt mit 0.1 % Triton X-100, 10 U Benzonase® (Sigma-Aldrich) pro 50 mL Probe und Pierce™ Protease Inhibitor (Thermo Fisher Scientific), resuspendiert und dispergiert. Im Anschluss wurde das Lysat für 60 min bei 42000 *g* zentrifugiert und der lösliche Überstand wurde mittels Spritzenvorsatzfilter (PES-Membran, Porengröße: 0.22 µm, Sarstedt) filtriert.

Das Filtrat wurde daraufhin mit einer Flussrate von 2 mL/min auf eine mit Ni-AC-Puffer A äquilibrierte Ni²⁺-Affinitätschromatographiesäule (Ni-NTA Superflow Cartridge 5 mL, Qiagen) geladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit Ni-AC-Puffer A entfernt und die spezifische Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-100 % Ni-AC-Puffer B (50 mM Tris, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0) über 30 min. Zielprotein-haltige Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender CBB-Färbung identifiziert und vereinigt.

Für die Spaltung des His₆-Tags wurden die vereinigten Fraktionen mit 10 mg TEV Protease (in der AG Rauh exprimiert und gereinigt) pro 100 mg Protein versetzt, in einen Dialyseschlauch (MWCO 30000, Spectra/Por® 7, Carl Roth) überführt und über Nacht gegen 2 L AEC-Puffer A (25 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0) dialysiert. Zur Abtrennung von ungespaltenem Zielprotein wurde die Lösung mit einer Flussrate von 1 mL/min auf eine zuvor äquilibrierte Ni²⁺-Affinitätschromatographiesäule (Ni-NTA Superflow Cartridge 5 mL, Qiagen)

geladen. Der erhaltene Durchfluss enthielt das geschnittene Zielprotein und wurde im Anschluss mit einer Flussrate von 1 mL/min auf eine Anionenaustauschchromatographiesäule (HiTrap Q Fast Flow, 5 mL, GE Healthcare) geladen. Nach gründlichem Waschen der Säule mit AEC-Puffer A erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 0-100 % AEC-Puffer B (25 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0). Jene Fraktionen, welche das geschnittene Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und mittels Zentrifugalkonzentrator (MWCO 30 kDa, Vivaspin, Sartorius) auf ein Volumen von 2 mL eingengt.

Die Probenlösung wurde für 10 min bei 20000 *g* zentrifugiert und der lösliche Überstand danach mit einer Flussrate von 1 mL/min auf eine mit SEC-Puffer I (50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7.3) vorbereitete Größenausschlusschromatographiesäule (HiLoad 16/60 Superdex 75 pg/200 pg, GE Healthcare) geladen und isokratisch mit SEC-Puffer I eluiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden wiederum *via* SDS-PAGE und CBB-Färbung analysiert. Fraktionen, welche monomeres, reines Zielprotein enthielten, wurden vereinigt, mittels Zentrifugalkonzentrator (MWCO 30 kDa, Vivaspin, Sartorius) auf 7-10 mg/mL konzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Die abschließende Reinigung des Kristallisationskonstrukts erfolgte durch eine analog durchgeführte Größenausschlusschromatographie unter Verwendung von SEC-Puffer II (25 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, 5 mM DTT, pH 7.5) und Superdex 75 10/300 GL bzw. Superdex 200 Increase 10/300 GL Größenausschlusschromatographiesäulen. Die reinen Proteinproben wurden erneut auf 7-10 mg/mL konzentriert und direkt für Kristallisationsexperimente verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

8.6 Kristallisation von Akt1^{xtal} x

Für die Kristallisation von Akt1^{xtal} wurde gereinigtes Protein mit einer Konzentration von 3 mg/mL in Gegenwart von drei Äquivalenten des jeweiligen Liganden für 60 min auf Eis inkubiert, bei 20000 *g* und 4 °C zentrifugiert und der lösliche Überstand in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt. Die Protein/Ligand-Lösung wurde mit Reservoirolösung (5 mM Acetat/Citrat-Puffer [1.25 mM Na-Acetat/3.75 mM Na-Citrat] pH 6.5-7.5, 15-25 % (w/v) PEG MME 2000) versetzt (1 µL + 1 µL) und nach der Methode des hängenden Tropfen in 15-*well* Kristallisationsplatten (EasyXtal 15-Well Tools, Qiagen) bei 20 °C inkubiert. Proteinkristalle wuchsen innerhalb von drei Tagen und wurden mit 20 % Ethylenglykol kryogeschützt bevor sie in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden. Diffraktionsdatensätze wurden an der PXII-X10SA *beamline* der Swiss Light Source (Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz) mit Wellenlängen nahe 1 Å aufgenommen. Die Datensätze wurden mit XDS^[442] integriert und mit XSCALE^[442] skaliert. Die Komplexkristallstrukturen wurden mittels molekularem Ersatz mit dem Programm PHASER^[443] unter Verwendung einer publizierten Kristallstruktur (PDB: 4EJN) als Templat gelöst.^[302] Mithilfe der Software COOT^[444] wurden Moleküle der asymmetrischen Einheit manuell modifiziert und die Topologie-Informationen der Liganden wurden mit dem Dundee PRODRG-Server^[445] generiert. Die Strukturverfeinerung erfolgte mit dem Programm PHENIX.REFINE^[446] und die finalen Strukturen wurden mittels Ramachandran-Plot-Analyse auf dem MolProbity-Server^[447] analysiert. Die finale Validierung der Kristallstrukturen wurde mithilfe des PDB_REDO-Servers^[448] vorgenommen.

x Die Kristallisation sowie die Strukturlösung und -verfeinerung wurden von Rebekka Scheinpflug und Ina Landel durchgeführt.

8.7 Zellkultur – Säugerzellen

8.7.1 Zellkultivierung

Die Kultivierung von Säugetierzellen erfolgte in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsoberfläche von 75 cm² (T75) bzw. 175 cm² (T175) bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden in Abständen von 4-7 Tagen passagiert bzw. sobald eine Konfluenz von ca. 80-90 % erreicht wurde. Hierzu wurden die Zellen vom Medium befreit, mit PBS gewaschen, und durch Zugabe von 2 mL 0.25 %-iger Trypsin-EDTA-Lösung und anschließender Inkubation bei 37 °C für 5-10 min von der Wachstumsoberfläche abgelöst. Durch Zugabe von 8 mL Medium wurde die Dissoziationsreaktion gestoppt und die Zellsuspension wurde für 5 min bei 200 *g* zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 10 mL frischem Medium resuspendiert, die Zellzahl und -viabilität mittels Trypanblau-Färbung unter Verwendung des Countess II Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific) bestimmt und für die weitere Kultivierung mit einer Konfluenz von 10-30 % in einem Gesamtvolumen von 10 mL ausplattiert. Die verwendeten Kultivierungsmedien inkl. Zusätze sind Tabelle 21 zu entnehmen. Die Authentizität von kommerziell erhältlichen Zelllinien wurde mittels *short tandem repeat* (STR)-Profilierung (Microsynth AG, Balgach, CH) oder *single nucleotide polymorphism* (SNP)-Analyse (Multiplexion, Heidelberg, DE) analysiert und bestätigt. Für zelluläre Analysen wurden ausschließlich Zellen verwendet, welche nach Inkulturnahme mindestens dreimal passagiert und maximal acht Wochen kultiviert wurden.

Tabelle 21. Zusammensetzung von Kultivierungsmedien für in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien.

Zelllinie	Medium
AN3-CA	MEM, GlutaMAX™; 1 mM Natriumpyruvat; 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech); 1X Penicillin-Streptomycin
Bo103 ^[449]	DMEM, high glucose, GlutaMAX™ / DMEM/F-12, GlutaMAX™ (1:1); 1.6 µg/mL Amphotericin B; 10 µM Y-27632; 10 µg/mL Ciprofloxacin; 8.4 ng/mL Cholera toxin; 5 µg/mL Insulin; 20 nM 1-Thioglycerol; 2.5 mM Natriumpyruvat; 5 % FBS, EU approved (Gibco®); 2X Penicillin-Streptomycin
BT-474	RPMI 1640, GlutaMAX™; 10 µg/mL Insulin; 20 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech); 1X Penicillin-Streptomycin
Dan-G	DMEM, high glucose, GlutaMAX™; 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech); 1X Penicillin-Streptomycin
HPAF-II	DMEM, high glucose, GlutaMAX™; 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech); 1X Penicillin-Streptomycin
KU-19-19	RPMI 1640, GlutaMAX™; 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech); 1X Penicillin-Streptomycin
MCF-7	MEM, GlutaMAX™; 1 mM Natriumpyruvat; 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech); 1X Penicillin-Streptomycin
T-47D	RPMI 1640, GlutaMAX™; 10 µg/mL Insulin; 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech); 1X Penicillin-Streptomycin
ZR-75-1	RPMI 1640, GlutaMAX™; 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech); 1X Penicillin-Streptomycin

8.7.2 Inkulturnahme von Säugerzellen

Die Inkulturnahme von kryokonservierten Säugerzellen aus frühen Passagen erfolgte durch Auftauen eines Kryogefäßes (2 mL, Sarstedt), welches bis zu 1.8 mL Zellsuspension enthielt, in einem Wasserbad bei 37 °C. Im Anschluss wurde die aufgetaute Suspension in 10 mL vorgewärmtes Kultivierungsmedium überführt, schonend durchmischt und in eine T75-Zellkulturflasche überführt. Durch vorsichtiges Hin- und Herschwenken der Zellkulturflasche wurde die Zellsuspension gleichmäßig verteilt und danach für 24 h inkubiert. Nach erfolgter Adhäsion der Zellen an der Wachstumsoberfläche der Zellkulturflasche wurde das Medium entfernt und durch frisches, vorgewärmtes Medium ersetzt. Die weitere Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 8.7.1 beschrieben.

8.7.3 Kryokonservierung von Säugerzellen

Für die Kryokonservierung wurden Säugerzellen aus frühen Passagen bei einer Konfluenz von ca. 70-80 % wie in Kapitel 8.7.1 beschrieben von der Wachstumsfläche abgelöst, zentrifugiert und anschließend in Einfriermedium (Kultivierungsmedium + 10 % DMSO) mit einer Zelldichte von 1.0×10^6 Zellen/mL resuspendiert. Die Suspension wurde zu je 1 mL in sterile Kryogefäße (2 mL, Sarstedt) aliquotiert und mithilfe eines mit Isopropanol befüllten Gefrierbehälter (Mr Frosty™, Thermo Fisher Scientific) bei -80 °C mit einer Kühlrate von -1 °C/min eingefroren. Die Endlagerung erfolgte tags darauf bei -150 °C .

8.7.4 CellTiter-Glo®-Viabilitätsassay

Zur Bestimmung der anti-proliferativen Eigenschaften von kleinen organischen Molekülen gegenüber isolierten Zelllinien wurde der CellTiter-Glo® (CTG®) Luminescent Cell Viability Assay (Promega, Madison, WI, US) verwendet. Hierzu wurden an Tag 0 pro Kavität einer 384-well Zellkultur Mikroplatte, µClear® (Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT) 25 µL Zellsuspension mit einer Viabilität $>95\%$ und der gewünschten Zelldichte mithilfe eines MultiDrop™ Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific) und einer Standard Tube Dispensing Cassette (Thermo Fisher Scientific) unter aseptischen Bedingungen dispensiert (Tabelle 22).

Tabelle 22. Zelllinien-abhängige Anzahl an Zellen, die für Viabilitätsstudien pro Kavität einer 384-well Zellkultur Mikroplatte ausgesät wurden.

Zelllinie	Zellzahl pro well
AN3-CA	800
Bo103	400
BT-474	400
Dan-G	400
HPAF-II	400
KU-19-19	400
MCF-7	200
T-47D	800
ZR-75-1	400

Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer Feuchtekammer erfolgte die Behandlung der Zellen mit den jeweiligen Testsubstanzen. Hierzu wurden Stammlösungen der zu testenden Substanzen (soweit nicht anders angegeben mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO angesetzt) in 384-well *low dead volume microplates* (384LDV, Labcyte Inc., San José, CA, US) überführt und anschließend mithilfe eines Echo 520 Liquid Handler (Labcyte Inc., San José, CA, US) in 384-well *polypropylene microplates* (384PP, Labcyte Inc., San José, CA, US) intermediär verdünnt und in die designierten Kavitäten der Assayplatte überführt. Die erhaltenen Verdünnungsreihen bestanden aus acht Datenpunkten in jeweils doppelter Ausführung und reichten von 30 µM bis 0.1 nM (für 10 mM Stammlösungen), wobei der maximale DMSO-Gehalt im Zellkulturmedium 0.4 % betrug (100 nL Testsubstanz in DMSO pro 25 µL Zellkulturmedium). Als Positivkontrolle wurde Staurosporin mit einer Konzentration von 30 µM (in DMSO) verwendet; als Negativkontrolle diente die Zugabe von 0.4 % reinem DMSO. Für beide Kontrollen wurden je 16 Kavitäten pro Assayplatte verwendet. Nach Inkubation für weitere 96 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer Feuchtekammer wurden die Assayplatten für 20 min auf RT äquilibriert und im Anschluss mit 25 µL CTG®-Reagenz/PBS (1:1) pro Kavität versetzt. Der Transfer erfolgte mit einem MultiDrop™ Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung einer Standard Tube Dispensing Cassette (Thermo Fisher Scientific). Die Assayplatten wurden daraufhin für 1 min bei 1400 rpm geschüttelt, gefolgt von einer 20-minütigen Inkubation bei RT im Dunkeln. Das Auslesen der Assayplatte erfolgte mit einem EnVision 2104 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, US), wobei die Oxyluciferin-vermittelte Lumineszenz pro Kavität über 500 ms detektiert wurde. Die erhaltenen Rohdaten wurden mithilfe der Quattro Software Suite (quattro research, Planegg, DE) normalisiert und analysiert sowie auf Basis einer logistischen Funktion mit vier Parametern (4PL) (Gleichung (8)) gefittet.

$$y = A_2 + \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \quad (8)$$

(A_1 : initialer Wert (Mittelwert der DMSO-Negativkontrolle); A_2 : finaler Wert (Mittelwert der Positivkontrolle); x : Ligandenkonzentration; x_0 : Wendepunkt (entspricht dem IC₅₀); p : Hill-Koeffizient (entspricht der Steigung im Wendepunkt))

8.7.5 Western Blot

Um den Einfluss von Testsubstanzen auf molekularer Ebene zu untersuchen, wurden Western Blot-basierte Analysen durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 2 mL Zellsuspension pro Kavität einer 6-*well* Zellkulturplatten (Sarstedt) ausgesät, so dass nach Inkubation über Nacht eine Konfluenz von 80-90 % erreicht wurde (siehe Tabelle 23) aufgeführt.

Tabelle 23. Zelllinien-abhängige Anzahl an Zellen, die für Western Blot-Studien pro Kavität einer 6-*well* Zellkulturplatte ausgesät wurden.

Zelllinie	Zellzahl pro <i>well</i>
AN3-CA	600,000
Bo103	700,000
BT-474	800,000
Dan-G	700,000
HPAF-II	500,000
KU-19-19	500,000
MCF-7	700,000
T-47D	700,000
ZR-75-1	800,000

Nach erfolgter Inkubation wurden die adhärirten Zellen vom Medium befreit, einmal mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versetzt. Anschließend wurden die Testsubstanzen in den gewünschten Konzentrationen oder DMSO hinzugegeben, so dass ein finaler DMSO-Gehalt von 0.1 % pro *well* erreicht wurde. Die Behandlung erfolgte für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂, woraufhin die Zellkulturplatten in Eisbädern platziert und dadurch auf 4 °C heruntergekühlt wurden. Anschließend wurde das Medium entfernt, die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit je 100 µL Lysepuffer (1X RIPA-Puffer, PhosStop™ Phosphatase Inhibitor, cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail) versetzt. Die Zellyse erfolgte für 30 min auf Eis unter leichtem Schütteln. Mithilfe von sterilen Zellschabern (Sarstedt) wurden die Lysate homogenisiert und anschließend in sterile, vorgekühlte 1.5 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellysate wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 14000 *g* und 4 °C geklärt und die proteinhaltigen

Überstände im Anschluss in frische 1.5 mL Zentrifugenröhrchen transferiert. Mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assays (Thermo Fisher Scientific) wurden die Proteinkonzentrationen der Lysate ermittelt; die Durchführung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers unter Verwendung von Rinderserumalbumin (BSA) als Standardprotein. Die Proteinkonzentrationen wurden durch Zugabe von Lysepuffer und 4X Probenpuffer nach LAEMMLI (250 mM Tris/HCl pH 6.8, 8 % SDS, 40 % Glycerol, 8 % β -ME, 0.02 % Bromphenolblau) auf 1 mg/mL eingestellt bevor die Proben für 10 min auf 95 °C erhitzt und für die weitere Verwendung bei -20 °C gelagert wurden.

Die Auftrennung von äquivalenten Proteinmengen der jeweiligen Proben erfolgte mittels SDS-PAGE wie in Kapitel 8.5.1 beschrieben. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mithilfe des Pierce™ Power Blotters (Thermo Fisher Scientific) und dem Pierce™ 1-Step Transfer Buffer (Thermo Fisher Scientific) nach dem *semi-dry*-Verfahren aus dem Polyacrylamidgel auf Immobilon-FL PVDF-Membranen (Merck Millipore) transferiert, welche danach einmal für 5 min mit ddH₂O gewaschen wurden bevor die Membranen zur Blockierung von freien Bindungsstellen für 60 min bei RT mit 10 mL Odyssey® Blocking Buffer, TBS (LI-COR) unter Schütteln inkubiert wurden. Im weiteren Verlauf wurden die Membranen dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen und dann über Nacht mit je 5 mL der jeweiligen Primärantikörper-Lösung, welche in Odyssey® Blocking Buffer, TBS (LI-COR) angesetzt wurde, bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert (siehe Tabelle 12). Am folgenden Tag wurden die Membranen erneut dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen, danach mit je 10 mL der Sekundärantikörper-Lösung für 60 min bei RT behandelt und abschließend wiederum dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Fluoreszenz der Fluorophor-markierten Sekundärantikörper wurde mit einem Odyssey® CLx Imaging System (LI-COR) detektiert und die erhaltenen Aufnahmen wurden mit der Software Image Studio Lite (LI-COR) final bearbeitet und ausgewertet.

8.8 Massenspektrometrie

8.8.1 ESI-MS

Die massenspektrometrische Charakterisierung von gereinigten Proteinen und der Nachweis von kovalenten Modifikationen an gereinigten Proteinen wurde an einem UltiMate 3000 HPLC-System (Thermo Fisher Scientific) in Kombination mit einem Velos Pro Dual-Pressure Linear Ion Trap Mass Spectrometer (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Für die Flüssigchromatographie wurde eine AdvanceBio Desalting-RP Cartridge (Agilent Technologies) als stationäre Phase verwendet. Als mobile Phasen wurden Lösungsmittel A, bestehend aus Wasser (Optima™ LC-MS-Qualität, Thermo Fisher Scientific) + 0.1 % Ameisensäure, sowie Lösungsmittel B, bestehend aus Acetonitril (Optima™ LC-MS-Qualität, Thermo Fisher Scientific) + 0.1 % Ameisensäure, verwendet. Die eingestellte Flussrate betrug 400 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Die Probenvorbereitung erfolgte durch Verdünnung der Proteinlösung auf eine Konzentration von 10 μM in dem jeweiligen SEC-Puffer des entsprechenden Proteins (siehe Kapitel 8.5) in Abwesenheit von DTT oder vergleichbaren Reduktionsmitteln, um eine Reduktion der elektrophilen Michael-Akzeptoren zu vermeiden. Für die Bindungsanalyse von kovalenten Liganden wurde die Proteinlösung mit 3-10 eq des jeweiligen Liganden (10 mM in DMSO) bzw. einem äquivalenten Volumen an DMSO (Negativkontrolle) versetzt, vorsichtig durchmischt und für 60 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Proteinproben für 10 min bei 20000 g zentrifugiert und somit von Präzipitat befreit. Der geklärte Überstand wurde in ein 250 μL Insert (Polypropylen, Agilent Technologies) überführt, welches in einem Schnappinggefäß (1.5 mL, 11.6 x 3.2 mm, Macherey-Nagel) platziert wurde. Die aufbereitete Probe wurde bis zur Analyse im auf 10 °C temperierten UltiMate 3000 Autosampler (Thermo Fisher Scientific) platziert.

Die Chromatographie-Kartusche wurde auf 100 % Lösungsmittels B gelagert und vor Verwendung erneut für 3 min mit Lösungsmittel B gewaschen und anschließend für 4 min mit 5 % Lösungsmittel B äquilibriert. Für die Flüssigchromatographie wurden zunächst 1-5 μL der Probenlösung injiziert und für 30 s mit 5 % Lösungsmittel B und einem anschließenden linearen Gradienten auf

80 % Lösungsmittel B über 2.5 min aufgetrennt und eluiert. Die Kartusche wurde für weitere 30 s mit 80 % Lösungsmittel B gewaschen und danach für 2 min mit 5 % Lösungsmittel B äquilibriert und für die nächst Probenanalyse vorbereitet. Intermediäre Waschschriffe erfolgten durch Spülen der Kartusche für 3.5 min mit 100 % Lösungsmittel B gefolgt von einer Kartuschenäquilibrierung über 2 min mit 5 % Lösungsmittel B.

Für die massenspektrometrische Analyse wurde eine Fragmentierungsenergie innerhalb der ESI-Ionenquelle von 5 V gewählt. Die Detektoren des ESI-Massenspektrometers waren auf ein Masse/Ladungs-Verhältnis von 524 m/z, entsprechend des in der Pierce™ LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution (Thermo Fisher Scientific) enthaltenen MRFA-Peptids, getunt. Der gescannte Masse/Ladungs-Bereich lag typischerweise zwischen 700 und 2000 m/z. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit den Software-Paketen MagTran^[450] und ProMass for Xcalibur (Novatia, PA, US) dekonvolutiert und analysiert.

8.8.2 Tryptischer Verdau und LC-ESI-MS/MS-Analyse

Für die Identifikation von Cysteinen, die durch kovalente Liganden modifiziert werden, wurden Tandem-Massenspektrometrie-Experimente nach tryptischem Proteinverdau durchgeführt. Hierfür wurden zunächst die Proteinproben wie oben beschrieben mit den jeweiligen Liganden bzw. mit DMSO (Negativkontrolle) inkubiert und anschließend nach einem modifizierten Protokoll von SHEVCHENKO *et al.* aufbereitet.^[451] Dazu wurden je 10-30 pmol einer Proteinprobe *via* SDS-PAGE separiert und mit CBB angefärbt. Die zugehörigen Proteinbanden wurden im Anschluss mithilfe eines mit Ethanol gereinigten Skalpells aus dem Gel ausgeschnitten, in ca. 1 x 1 mm große Stücke zerkleinert und in ein steriles 1.5 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Entfärbung der Gelstücke erfolgte durch Waschen in 200 µL Waschlösung 1 (25 mM NH₄HCO₃/MeCN [3:1]) bei 37 °C und 1500 rpm für 30 min, gefolgt von einem zweiten Waschschriff in 200 µL Waschlösung 2 (25 mM NH₄HCO₃/MeCN [1:1]) bei 37 °C und 1500 rpm für 15 min. Anschließend wurden die Proteinproben in 100 µL Reduktionslösung (50 mM DTT in 25 mM NH₄HCO₃) bei 37 °C und 1500 rpm für 45 min reduziert, gefolgt von der

Inkubation in 100 μL Alkylierungslösung (55 mM Iodoacetamid in 25 mM NH_4HCO_3) bei 22 °C und 1500 rpm für 60 min im Dunkeln. Daraufhin wurden die Gelstücke zweimal mit je 200 μL Waschlösung 2 für 15 min bei 22 °C und 1500 rpm gewaschen. Der Überstand wurde entfernt und die Gelstücke mit je 10 μL Acetonitril für 10 min bei 22 °C und 1500 rpm dehydriert. Im Anschluss wurde das Acetonitril entfernt und die Gelstücke in einem Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf) für 30 min bei RT getrocknet. Der tryptische Verdau wurde durch Zugabe von je 15 μL Verdaulösung (0.01 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Trypsin in 25 mM NH_4HCO_3 [10 μL 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Trypsin in 10 mM HCl, 90 μL 25 mM NH_4HCO_3]) und Inkubation bei RT für 15 min initiiert. Nach Zugabe von weiteren je 20 μL 25 mM NH_4HCO_3 wurden die Gelstücke über Nacht bei 30 °C und 1000 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von je 10 μL TFA gestoppt und anschließend für 30 min in einem Ultraschallbad bei 4 °C inkubiert, um die generierten Peptide aus der Gelmatrix zu eluieren. Der Überstand wurde in ein steriles 1.5 mL Zentrifugenröhrchen überführt und die Gelstücke final mit 30 μL Acetonitril ausgequetscht. Das Acetonitril wurde mit dem zuvor entnommenen Überstand vereint, im Vakuumkonzentrator (Concentrator 5301, Eppendorf) getrocknet und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Die Analyse der tryptisch-verdauten Proteinproben mittels Tandem-Massenspektrometrie wurde von Dr. Petra Janning, Walburga Hecker, Andreas Brockmeyer und Malte Metz durchgeführt. Hierfür wurden die Proben aufgetaut, in 20 μL 0.1 % TFA in Wasser gelöst, für 15 min im Ultraschallbad bei RT inkubiert und für 1 min bei 15000 g zentrifugiert. 3 μL jeder Probe wurden auf eine Vorsäulen-Kartusche geladen und für 5 min mit 0.1 % TFA in Wasser bei einer Flussrate von 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ entsalzt. Die entsalzten Proben wurden auf eine nano-HPLC-Chromatographiesäule rückgespült und mit einem linearen Gradienten von 5-30 % Lösungsmittel B, einer Flussrate von 300 nL/min und einer Säulentemperatur von 40 °C über einen Zeitraum von 35 min eluiert. Anschließend wurde die nano-HPLC-Chromatographiesäule mit einem linearen Gradienten auf 60 % Lösungsmittel B über 5 min gewaschen, gefolgt von einem Gradienten auf 95 % Lösungsmittel B über 5 min. Nach weiteren 5 min bei 95 % Lösungsmittel B wurde die Chromatographiesäule über 14 min auf die Startbedingungen äquilibriert. Während des gesamten

Experiments wurde eine standardmäßige „TOP10 shotgun proteomics“-Methode für die MS- und MS/MS-Analyse verwendet.^[452] Für MS-Analysen über den gesamten Massenbereich von 300-1650 m/z wurde mit einer Auflösung von 70000 gescannt. Für MS/MS-Experimente wurden bis zu zehn *high energy collision dissociation* (HCD) Scans mit einer Auflösung von 17500 für die häufigsten, mindestens doppelt geladenen Ionen durchgeführt. Die Analyse der Rohdaten erfolgte mithilfe der Software MaxQuant unter Verwendung der Aminosäuresequenz des jeweiligen Proteins.^[453] Als variable Peptidmodifikationen wurden Oxidationen (Methionin), N-terminale Acetylierungen, Carbamidomethylierungen (Cystein), Phosphorylierungen (Serin, Threonin, Tyrosin) und Liganden-basierte Modifikationen (Cystein) bei der Evaluation der Parental- und Fragmentionen berücksichtigt.^[454-455]

8.9 HTRF®-Assays

Die Bestimmung der katalytischen Aktivität der Proteinkinasen Akt und p38 α sowie die Vermessung von kleinen organischen Molekülen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Potenz gegenüber dieser Kinasen erfolgte unter Verwendung der HTRF®-Technologie der Firma Cisbio (Codolet, FR).^[456-458] Diese beruht auf der Proteinkinase-katalysierten Phosphorylierung eines Substrats, welches His₆-, GST- oder Biotin-markiert ist, und dem dadurch ermöglichten Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) zwischen Donorfluorophor-markiertem Anti-phospho-Antikörper und Akzeptorfluorophor-markiertem Anti-His₆/GST-Tag-Antikörper bzw. Streptavidin. Der Transfer von Flüssigkeiten (0.5-10 μ L) in die Mikroplatten erfolgte mithilfe eines MultiDrop™ Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific) und einer Small Tube Metal Tip Dispensing Cassette (Thermo Fisher Scientific). Der Transfer von Testverbindungen, welche in DMSO gelöst waren, erfolgte mit einem Echo 520 Liquid Handler (Labcyte Inc., San José, CA, US).

Zu Beginn des Assays wurden 2.5 μ L Kinasepuffer (siehe Tabelle 24, Tabelle 25) pro Kavität einer 384-*well* Small Volume™ HiBase Mikroplatte (Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT) transferiert, welche anschließend für 30 s bei 100 *g* zentrifugiert wurde. Anschließend wurden Verdünnungsreihen der in DMSO gelösten Testverbindungen, welche auf 384-*well low dead volume microplates* (384LDV, Labcyte Inc., San José, CA, US) formatiert waren, unter Verwendung von 384-*well polypropylene microplates* (384PP, Labcyte Inc., San José, CA, US) angesetzt. Die maximale DMSO-Konzentration pro *well* wurde auf 2 % festgelegt. Die erhaltenen Verdünnungsreihen bestanden aus acht Datenpunkten in jeweils doppelter Ausführung. Als Positivkontrolle wurde Staurosporin (20 μ M) verwendet, als Negativkontrolle hingegen diente DMSO; beide Kontrollen wurden in jeweils 16 Replikaten pro Assayplatte transferiert.

Anschließend wurden die Mikroplatten erneut für 30 s bei 100 *g* zentrifugiert. Daraufhin wurden je 5 μ L Kinaselösung (siehe Tabelle 24, Tabelle 25) pro *well* zugegeben, die Platten für 20 s bei 1500 rpm geschüttelt, wiederum für 30 s bei 100 *g* zentrifugiert und dann für 1 h bei RT im Dunkeln in einer Feuchtekammer inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von 2.5 μ L Startlösung (siehe Tabelle 24, Tabelle 25) pro Kavität initiiert. Die Mikroplatte wurde wie zuvor

geschüttelt, zentrifugiert und im Dunkeln in einer Feuchtekammer für die jeweilige Reaktionszeit (siehe Tabelle 24, Tabelle 25) inkubiert. Abschließend erfolgte die Zugabe von je 10 μL Stopplösung pro *well* gefolgt von einer einstündigen Inkubation bei RT im Dunkeln in einer Feuchtekammer.

Nach erfolgter Inkubation wurde die Platte an einem EnVision 2104 Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, US) ausgelesen. Hierfür wurden die Fluoreszenzintensitäten bei 620 nm und 665 nm 60 μs nach Anregung bei 317 nm detektiert. Für die Datenanalyse wurde die Quattro Software Suite (quattro research, Planegg, DE) verwendet. Hierbei wurden die Akzeptor/Donor-Verhältnisse ($f_{665\text{nm}}/f_{620\text{nm}}$) der Testsubstanzen auf jene der Positiv- und Negativkontrollen normalisiert, gegen die Analytkonzentrationen aufgetragen und auf Basis einer 4PL-Funktion (Gleichung (8), siehe Kapitel 8.7.4) gefittet.

8.9.1 Akt

Für die Vermessung von Akt-Konstrukten wurde das HTRF® KinEASE™ STK S3 Kit (Cisbio, Codolet, FR) verwendet, welches zuvor für die drei Isoformen von Akt durch Cisbio validiert wurde. Die verwendeten Assay-Parameter (Reaktionszeit, ATP-/Substrat-/Kinase-Konzentration) wurden initial für alle Konstrukte nach Vorgaben des Herstellers experimentell ermittelt und sind in Tabelle 24 zusammengefasst.

Tabelle 24. HTRF®-Assay-Parameter für die Vermessung von Akt-Konstrukten.

	Akt1^{wt}	Akt2^{wt}	Akt3^{wt}	Akt1^{E17K}
Kinase-puffer	50 mM HEPES, 0.1 mM Na ₃ VO ₄ , 0.02 % (w/v) NaN ₃ , 0.01 % (w/v) BSA, 5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 0.01 % (v/v) Triton X-100, pH 7.0 in ddH ₂ O			
Detektions-Puffer	50 mM HEPES, 0.1 % (w/v) BSA, 800 mM KF, 20 mM EDTA, verdünnter STK-Antikörper (nach Angabe des Herstellers), pH 7.0 in ddH ₂ O			
Kinase-lösung	260 pM Kinase in Kinasepuffer	2.35 nM Kinase in Kinasepuffer	364 pM Kinase in Kinasepuffer	40 pM Kinase in Kinasepuffer
Start-lösung	1 μM STK S3, 320 μM ATP in Kinasepuffer	2.5 μM STK S3, 360 μM ATP in Kinasepuffer	4 μM STK S3, 520 μM ATP in Kinasepuffer	1.2 μM STK S3, 160 μM ATP in Kinasepuffer
Stopp-lösung	31.25 nM SA-XL665 in Detektionspuffer	78.75 nM SA-XL665 in Detektionspuffer	125 nM SA-XL665 in Detektionspuffer	37.5 nM SA-XL665 in Detektionspuffer
Reaktionszeit	60 min	60 min	15 min	60 min

8.9.2 p38 α

Für die aktivitäts-basierte Vermessung der p38 α -Konstrukte kamen HTRF[®] Toolbox-Reagenzien der Firma Cisbio (Codolet, FR) zum Einsatz, nämlich ein d2-markierter anti-GST-Antikörper sowie ein Europium-Kryptat-markierter anti-phospho-ATF2(Thr69/71)-Antikörper. Als Kinasesubstrat wurde GST-gekoppeltes ATF2(20-79) eingesetzt, welches nach modifizierten, Literatur-bekanntem Bedingungen exprimiert und gereinigt wurde.^[459-460] Darüberhinaus wurden die p38 α -Konstrukte vor ihrer Verwendung im HTRF[®]-Assay durch Inkubation in Gegenwart von MKK6^{S207E/T211E} (Thermo Fisher Scientific) in Aktivierungspuffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 0.001 % Tween 20, pH 7.4) für 90 min bei 37 °C und 500 rpm phosphoryliert und damit aktiviert. Die Reaktionsansätze wurden schließlich noch über Nacht bei 4 °C gegen Lagerpuffer (20 mM HEPES, 50 mM NaCl, 5 % Glycerol, pH 7.1) dialysiert, auf ca. 0.2 mg/mL konzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die verwendeten Assay-Parameter (Reaktionszeit, ATP-/Substrat-/Kinase-Konzentration) wurden initial für alle Konstrukte nach Vorgaben des Herstellers experimentell ermittelt und sind in Tabelle 25 gelistet.

Tabelle 25. HTRF[®]-Assay-Parameter für die Vermessung von p38 α -Konstrukten.

	p38 α ^{wt}	p38 α ^{SL}	p38 α ^{SL,MTSSL}
Kinasepuffer	50 mM HEPES, 0.1 mM Na ₃ VO ₄ , 0.02 % (w/v) NaN ₃ , 0.01 % (w/v) BSA, 10 mM MgCl ₂ , 1 mM MnCl ₂ , 1 mM DTT, 0.01 % (v/v) Triton X-100, pH 7.0 in ddH ₂ O		
Detektions-Puffer	50 mM HEPES, 0.1 % (w/v) BSA, 800 mM KF, 20 mM EDTA, pH 7.0 in ddH ₂ O		
Kinaselösung	194 pM Kinase in Kinasepuffer	17 nM Kinase in Kinasepuffer	97 nM Kinase in Kinasepuffer
Startlösung	4 μ M GST-ATF2, 400 μ M ATP in Kinasepuffer	4 μ M GST-ATF2, 400 μ M ATP in Kinasepuffer	4 μ M GST-ATF2, 400 μ M ATP in Kinasepuffer
Stopplösung	0.667 nM anti-phospho-ATF2-Antikörper-Eu(K), 50 nM anti-GST-Antikörper-d2 in Detektionspuffer		
Reaktionszeit	7 min	10 min	20 min

8.9.3 Kinetische Untersuchungen mittels HTRF[®]

Für die kinetische Evaluierung von kovalenten Liganden und somit zur Ermittlung der kinetischen Parameter K_i (Inhibitionskonstante) und k_{inact} (maximale

Inaktivierungsrate), welche die reversible Komplexbildung bzw. die kovalente Bindungsbildung beschreiben, wurden zeitabhängige IC₅₀-Messungen durchgeführt, bei denen die Inkubationszeit der Proteinkinase in Gegenwart von Testsubstanz alteriert wurde, die übrigen Assay-Parameter jedoch beibehalten wurden.

Im Gegensatz zu den HTRF®-Assays zur IC₅₀-Bestimmung wurde hier die Kinaselösung zeitversetzt in die jeweiligen Kavitäten der 384-well Small Volume™ HiBase Mikroplatte (Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT) transferiert, so dass bei der anschließenden simultanen Zugabe der Startlösung Vorinkubationszeiten von 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 30, 45, 60 und 90 min erreicht wurden. Nach jeder Zugabe von Kinaselösung wurde die Assayplatte für 20 s bei 1500 rpm geschüttelt und anschließend für 10 s bei 100 g zentrifugiert. Die auf der Platte befindlichen Kontrollen (DMSO bzw. Staurosporin) wurden ebenfalls für 90 min mit der Kinase inkubiert. Nach Zugabe der Stopplösung und abschließender einstündiger Inkubation wurde die Assayplatte wie oben beschrieben (siehe Kapitel 8.9) ausgelesen.

Die Datenanalyse erfolgte ebenfalls mit der Quattro Software Suite (quattro research, Planegg, DE) unter Verwendung einer 4PL-Funktion (Gleichung (8), siehe Kapitel 8.7.4). Die daraus resultierenden IC₅₀-Werte wurden in Microsoft Excel 2016 (Microsoft, Albuquerque, NM, US) gegen die Vorinkubationszeiten aufgetragen und mithilfe des Add-Ins XLfit 5 (IDBS, Guildford, UK) unter Anwendung des von KRIPPENDORFF *et al.* publizierten Modells die kinetischen Parameter K_i und k_{inact} bestimmt.^[172] Dieses Modell beruht auf einem 3D Fit, dem die XLfit-kompatible Gleichung (2) zugrunde liegt und durch Vorgabe der eingesetzten Substratkonzentration S und der zuvor experimentell bestimmten Michaelis-Konstante K_M eine Näherung für K_i und k_{inact} wiedergibt.

$$IC_{50}(t) = K_i \left(1 + \frac{S}{K_M}\right) \cdot \left(\frac{2 - 2e^{-\eta_{IC_{50}} \cdot k_{inact} \cdot t}}{\eta_{IC_{50}} \cdot k_{inact} \cdot t} - 1\right) \quad (2)$$

$$\eta_{IC_{50}} = \frac{IC_{50}(t)}{K_i \left(1 + \frac{S}{K_M}\right) + IC_{50}(t)} \quad (3)$$

(IC₅₀: halb-maximale inhibitorische Konzentration; K_i: Inhibitionskonstante; S: Substratkonzentration;

K_M: Michaelis-Konstante; k_{inact}: maximale Inaktivierungsrate; t: Vorinkubationszeit)

8.10 Analyse der DMPK-Parameter^{xi}

Für die Bestimmung der kinetischen Löslichkeit wurde die entsprechende Substanz zunächst mit einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst, im Anschluss mit HEPES-Puffer (50 mM, pH 7.4) auf 500 µM verdünnt und für 90 min bei RT unter Schütteln inkubiert. Nach Filtration durch eine PVDF-Membran (Porengröße: 0.2 µm) wurde die Absorption im Bereich von 250 bis 500 nm in Intervallen von je 10 nm gemessen. Die erhaltene AUC wurde auf die Absorption der in Acetonitril verdünnten Substanz normalisiert und daraus die kinetische Löslichkeit in wässrigem Medium ermittelt.

Die Permeabilität der Verbindungen durch eine artifizielle Membran wurde mithilfe des PAMPA-Assays ermittelt. Hierfür wurde die jeweilige Substanz aus einer 10 mM Lösung in DMSO mit HEPES-Puffer (50 mM, pH 7.4) auf 500 µM verdünnt und auf ein Transwell-Insert gegeben, welches zuvor mit einer 10 %-igen Phosphatidylcholin-Lösung und 0.5 % Cholesterol in Dodecan beschichtet wurde. Das Insert wurde in Akzeptorlösung (50 % DMSO in HEPES-Puffer [50 mM, pH 7.4]) platziert und für 20 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Akzeptorlösung zwischen 250 und 500 nm in Intervallen von je 10 nm bestimmt und auf die Absorption der Referenz-Akzeptorlösung (50 % Methanol in HEPES-Puffer [50 mM, pH 7.4]) normalisiert. Hieraus wurde die Durchflussmenge (%Flux) bestimmt.

Zur Bestimmung der intestinalen Absorption wurde die Permeabilität durch einen *Caco-2-monolayer* ermittelt. Hierfür wurde die jeweilige Substanz aus einer 10 mM Stammlösung in DMSO mit Transportpuffer (1.98 g/L Glucose in 10 mM HEPES, 1X Hank's Balanced Salt Solution, pH 6.5) auf 5 µM verdünnt und auf die apikale Seite des *Zell-monolayers* auf einem Transwell-Insert gegeben, welches in Transportpuffer der basolateralen Seite (1.98 g/L Glucose in 10 mM HEPES, 1X Hank's Balanced Salt Solution, pH 7.4) platziert war. Danach wurden die Zellen für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und die Absorptionen beider

^{xi} Die Analyse der *in vitro* PK-Parameter wurde von Julia Hardick (AG Rauh) und der Lead Discovery Center GmbH durchgeführt.

Transportpuffer ermittelt. Die apparente Permeabilität (P_{app}) ergibt sich aus der Gleichung $P_{app} = (dQ/dt)/(C_0A)$, wobei C_0 die initiale Konzentration der Substanz und A die Fläche des *monolayers* ist. Dies wurde für die Transportrichtung apikal nach basolateral ($A \rightarrow B$) sowie basolateral nach apikal ($B \rightarrow A$) durchgeführt. Hohe Efflux-Verhältnisse $[(B \rightarrow A/A \rightarrow B) > 3]$ indizieren einen aktiven Transport der Substanz über P-gp oder andere aktive Transportsysteme.

Die mikrosomale Stabilität wurde in humanen und murinen Lebermikrosomen bestimmt. Hierfür wurden die Substanzen aus einer 10 mM Stammlösung in DMSO mit Phosphatpuffer (pH 7.4) auf 3 μ M verdünnt und die Reaktion durch Zugabe der Lebermikrosomen gestartet. Während einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Proben entnommen, welche unmittelbar auf Eis gekühlt und durch Zugabe von Acetonitril gequenchet wurden. Die Konzentrationen der jeweiligen Proben wurden mittels LC-MS/MS-Analyse bestimmt und mit einem exponentiellen Modell $[C(t) = C_0e^{-kt}; k = \ln(2)/t_{1/2}]$ gegen die Zeit gefittet. Anhand der Halbwertszeit $t_{1/2}$ wurde die intrinsische Clearance (CL_{int}) mit der Formel $CL_{int} = [(0.693/t_{1/2})V]/m_{Mikro}$ ermittelt. Das Reaktionsvolumen V betrug jeweils 20 μ L und die Menge an Mikrosomen m_{Mikro} betrug 10 μ g (MLM) bzw. 30 μ g (HLM).

Zur Ermittlung der Plasmastabilität wurde die jeweilige Substanz aus einer 10 mM Stammlösung in DMSO mit 100 % Plasma auf 5 μ M verdünnt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Konzentration der verbliebenen Substanz wurde LC-MS-basiert analysiert und auf die Startkonzentration normalisiert.

Zur Bestimmung der Plasmaproteinbindung erfolgte eine Gleichgewichtsdialyse der jeweiligen Substanz bei einer Konzentration von 5 μ M in 50 % (v/v) Plasma in HEPES-Puffer (pH 7.4). Die Konzentrationsbestimmung erfolgte wiederum LC-MS-basiert und erlaubte die Analyse der Protein-gebundenen Fraktion.

8.11 Analyse der *in vivo* PK-Parameter^{xii}

Zur Bestimmung der *in vivo* PK-Parameter von Verbindung **3a** wurden je drei 8-10 Wochen alte RjOrl:SWISS Mäuse (Janvier, Frankreich) durch einmalige intravenöse (2 mg/kg), intraperitoneale (20 mg/kg) bzw. perorale (20 mg/kg) Applikation mit der Substanz behandelt, welche in reinem DMSO (i.v.) bzw. PBS/PEG200 (60:40) (i.p., p.o.) formuliert war. Vollblutproben wurden nach 5, 15, 45 und 135 min durch Punktion der *Vena facialis* gewonnen und direkt bei 15000 *g* und 4 °C für 10 min zur Abtrennung des Plasmas zentrifugiert, welches anschließend bei -80 °C bis zur LC-MS/MS-basierten Analyse gelagert wurde. Die behandelten Mäuse wurden *ad libitum* mit Allein-Futter für Ratten-/Mäusehaltung (Sniff Special Diets GmbH, Deutschland) gefüttert, hatten freien Zugang zu Wasser und wurden in einem 12 h Tag/Nacht-Rhythmus gehalten. Alle Experimente erfolgten mit Genehmigung der örtlichen Behörden.

Für die LC-MS/MS-Analyse wurden je 20 µL der Plasmaproben von unbehandelten (Kontrolle) und behandelten Mäusen mit 2.5 µL DMSO und 80 µL eiskaltem Acetonitril, welches 1 µM Griseofulvin als internen Standard enthielt, versetzt und bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. 65 µL des Überstands wurden mit 65 µL H₂O (LC-MS-Qualität) verdünnt, über eine hydrophile PTFE-Membran filtriert (Porengröße: 0.45 µm, Millipore) und mittels LC-MS/MS analysiert. Eine Standardkurve wurde erhalten durch serielle Verdünnung der Substanz in DMSO (2.5 nM bis 10 µM) und anschließender Zugabe von je 2.5 µL zu 20 µL Leerplasma; die weitere Aufarbeitung erfolgte analog zu den Plasmaproben der behandelten Mäuse. Die Probenanalyse erfolgte mit einem QTRAP® 5500 LC-MS/MS-System (AB Sciex), wobei je 2 µL Probe injiziert und mit einer Poroshell C18-Säule (2.7 µm, 2.1 mm x 50 mm, Agilent Technology) bei 60 °C und 5 % Lösungsmittel B (0.1 % Ameisensäure in Acetonitril) für 0.3 min gefolgt von einem linearen Gradienten auf 100 % Lösungsmittel B über 0.6 min bei einer Flussrate von 1 mL/min aufgetrennt wurde. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software Analyst 1.6.2 (AB Sciex) und PKSolver 2.0.^[461]

^{xii} Die Mausexperimente wurden von Georgia Günther aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jan G. Hengstler durchgeführt. Die Analyse der Plasmaproben erfolgte durch die Lead Discovery Center GmbH.

8.12 *In vivo*-Wirksamkeitsstudien^{xiii}

Für die Etablierung von PDX-Modellen wurden Tumorgewebsproben (Pankreaskarzinom bzw. Kolorektalkarzinom) von Patienten des Ruhr-Universität Comprehensive Cancer Center verwendet, die zuvor im Rahmen von operativen Eingriffen erhalten wurden. Von allen Patienten wurde das schriftliche Einverständnis für diese Verwendung eingeholt. Alle Experimente erfolgten mit Genehmigung des Ethikkomitees der Ruhr-Universität Bochum (Registrierungsnummer: 3534-09, 3841-10, 16-5792). Die Tierhaltung und Tierexperimente erfolgten entsprechend der Richtlinien der institutionellen Dienststellen und mit der Genehmigung der örtlichen Behörden. Nicht-diagnostische Gewebeproben wurden innerhalb von 2-6 h nach der Operation vom zuständigen Pathologen ausgewählt. Geeignete Tumorstücke (1-2 mm) wurden in unverdünntem Matrigel (Becton Dickinson) für 15-30 min eingeweicht und anschließend subkutan im Schulterblattbereich von 5-10 Wochen alten NMRI-Fox1^{nu}/Fox1^{nu} Mäusen implantiert (beide Flanken, eine Maus pro Tumor, bis zu vier Tumorstücke pro Seite). Für die Generierung von Behandlungskohorten wurden PDX-Tumorstücke aus frühen Passagen (\leq F5 Generation) wie oben beschrieben in Nacktmäuse implantiert und bei Erreichen eines Tumolvolumens von ca. 100-200 mm³ wurden die Mäuse zu je drei bis vier Tieren in Behandlungs- und Kontrollgruppen randomisiert. Die Tumolvolumina wurden dreimal wöchentlich durch zweidimensionale Vermessung anhand der Formel $V = (\text{Länge} \times \text{Breite}^2)/2$ ermittelt. Das Therapieansprechen wurde nach den RECIST 1.1 Kriterien definiert, wobei eine Reduktion des Tumolvolumens um mind. 30 % im Vergleich zum Therapiebeginn eine partielle Remission (PR) darstellt und das Wachstum des Tumors um mind. 20 % eine progressive Krankheit (PD) darstellt; alle anderen Ergebnisse werden als stabiles Krankheitsbild (SD) betrachtet. Verbindung **3a** (20 mg/kg, i.p.) wurde täglich verabreicht, Trametinib (0.5 mg/kg, p.o.) hingegen einmal täglich an fünf aufeinander folgenden Tagen pro Woche.

^{xiii} Die Mausexperimente wurden von Silvia Lyer und Christoph Reintjes aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan A. Hahn durchgeführt.

8.13 Fluoreszenzpolarisations-Assays

Die manuelle Durchführung des FP-Assays erfolgte in schwarzen 384-*well* Small Volume™ HiBase Mikroplatten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT). Hierzu wurden pro *well* 5 μ L Peptidlösung (2 nM Fluorophor-markiertes Peptid (Tabelle 26) in Assaypuffer [10 mM HEPES, 100 mM NaCl, 0.01 % Tween-20, pH 7.4]) mit 5 μ L Proteinlösung (Kelch^{wt} mit der gewünschten Konzentration in Assaypuffer) gemischt, für 1 min bei 200 *g* zentrifugiert und für 1 h in einer Feuchtekammer inkubiert. Jeder Datenpunkt wurde in vierfacher Ausführung bestimmt und gemittelt. Zum Auslesen der Fluoreszenzpolarisation, welche sich aus Gleichung (9) ergibt, wurde ein Infinite® M1000 Plate Reader (Tecan, Männedorf, CH) verwendet; die verwendeten Einstellungen sind in Tabelle 27 zusammengefasst.

Tabelle 26. Aminosäure-Sequenzen der verwendeten Peptide. Das ETGE-Motiv ist jeweils blau markiert. Die C-Termini wurden durch das eingesetzte Rink-Amid-Harz nicht als freie Carbonsäuren sondern als Amide erhalten.

Peptid	Sequenz (N → C)
FITC-ETGE-6mer	FITC-EG-Asp-Glu- Glu-Thr-Gly-Glu -CONH ₂
FITC-ETGE-9mer	FITC-EG-Leu-Asp-Glu- Glu-Thr-Gly-Glu -Phe-Leu-CONH ₂
FITC-ETGE-14mer	FITC-EG-Phe-Ala-Phe-Phe-Ala-Gln-Leu-Gln-Leu-Asp-Glu- Glu-Thr-Gly-Glu -Phe-Leu-CONH ₂
FITC-ETGE-9mer-scrambled	FITC-EG-Glu-Leu-Glu-Thr-Asp-Leu-Glu-Phe-Gly-CONH ₂
Cy3-ETGE-9mer	Cy3-EG-Leu-Asp-Glu- Glu-Thr-Gly-Glu -Phe-Leu-CONH ₂
Cy5-ETGE-9mer	Cy5-EG-Leu-Asp-Glu- Glu-Thr-Gly-Glu -Phe-Leu-CONH ₂

FITC: Fluorescein, EG: Ethylenglycol-Linker.

Tabelle 27. Geräteeinstellungen für die FP-Messungen.

Fluorophor	λ_{exc}	λ_{em}	Flashes	Z-Position
FITC	470 \pm 2.5 nm	535 \pm 7.5 nm	20	26932 μ m
Cy3	530 \pm 2.5 nm	579 \pm 7.5 nm	20	26932 μ m
Cy5	635 \pm 2.5 nm	688 \pm 7.5 nm	20	26932 μ m

$$P = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + G \cdot I_{\perp}} \quad (9)$$

(P : Fluoreszenzpolarisation; I_{\parallel} : Fluoreszenzintensität mit paralleler Polarisation zum Anregungslicht; I_{\perp} : Fluoreszenzintensität mit senkrechter Polarisation zum Anregungslicht; G : Gerätefaktor)

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurden die erhaltenen Rohdaten mit der Software OriginPro 2019 (OriginLab Corporation) auf Basis einer logistischen Funktion mit vier Parametern (Gleichung (10)) gefittet.

$$y = A_1 + \frac{A_2 - A_1}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^p} \quad (10)$$

(A_1 : initialer Wert der Fluoreszenzpolarisation; A_2 : finaler Wert der Fluoreszenzpolarisation; x : Proteinkonzentration; x_0 : Wendepunkt (entspricht dem K_d); p : Hill-Koeffizient (entspricht der Steigung im Wendepunkt))

Die Charakterisierung von Testverbindungen und das Hochdurchsatz-Screening erfolgten in schwarzen 1536-well HiBase Mikroplatten (Greiner Bio-One, Kremsmünster, AT). Hierfür wurde zunächst jede Kavität mithilfe eines MultiDrop™ Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific) mit 2.5 µL Assaypuffer befüllt. Der Transfer der Testverbindungen erfolgte anschließend mit einem Echo 520 Liquid Handler (Labcyte Inc., San José, CA, US), wobei je 25 nL der gewünschten Konzentration transferiert wurden. Abschließend wurde jede Kavität mit 2.5 µL der Reaktionslösung (50 nM Kelch^{wt}, 2 nM Cy5-ETGE-9mer in Assaypuffer) befüllt, und nach erfolgtem Schütteln und Zentrifugieren der Assayplatte für 60 min bei RT in einer Feuchtekammer inkubiert. Das Auslesen der Platten erfolgte wie oben beschrieben. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit der Quattro Software Suite (quattro research, Planegg, DE) auf das mittlere Minimum- und Maximumsignal normalisiert und auf Basis einer 4PL-Funktion (Gleichung (8), siehe Kapitel 8.7.4) gefittet. Die in Kapitel 4.2.2 gezeigten Dosis-Wirkungskurven wurden mit der Software OriginPro 2019 (OriginLab Corporation) generiert. Für die Evaluierung der Testverbindungen **23** bis **27** wurde jeder Datenpunkt in sechsfacher Ausführung bestimmt; im Rahmen des Hochdurchsatz-Screenings wurden zur

Bestimmung des *assay window* und des Z-Faktors die Negativkontrollen (DMSO) und Positivkontrollen (10 μ M **27**) in achtfacher Ausführung pro Assayplatte vermessen; die Datenanalyse erfolgte mit der Quattro Software Suite (quattro research, Planegg, DE).

8.14 EPR-spektroskopische Messungen an p38 α

Für die Positions-spezifische Markierung mit dem *spin label* MTSSL wurde p38 α ^{SL} mit einer Konzentration von 50 μ M in SEC-Puffer (20 mM Tris, 200 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, pH 7.4) mit drei Äquivalenten MTSSL (25 mM in DMSO) versetzt und für 14-16 h bei 4 °C und konstanter Durchmischung inkubiert. Das MTSSL-markierte Protein wurde mithilfe eines Zentrifugalkonzentrators (MWCO 10 kDa, Vivaspin, Sartorius) isoliert und mehrfach gewaschen, bis kein freies *spin label* mehr mittels CW-EPR detektiert werden konnte. Das markierte Proteinkonstrukt p38 α ^{SL,MTSSL} wurde auf ca. 300 μ M konzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Proteinmodifikation wurde mittels ESI-MS nachgewiesen (Abbildung 73).

Die CW-EPR-Messungen erfolgten bei 20 °C mit einem EMX Nano X-Band Spektrometer (Bruker).^{xiv} Hierfür wurden 30 μ L der Proteinlösung mit einer Konzentration von 50-100 μ M in eine Quarzkapillare mit einem Durchmesser von 1 mm überführt. Die experimentellen Parameter wurden jeweils so optimiert, dass ein hohes Signal erhalten wurden.^[462]

^{xiv} Die CW-EPR-Messungen wurden von Patrick Roser aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Malte Drescher an der Universität Konstanz durchgeführt und sind detailliert in Referenz ^[462] Roser, Weisner *et al.* beschrieben.

9 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* **2018**, *68*, 394-424.
- [2] www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/, [Stand: 04.08.2019].
- [3] A. D. Sagar, A. Najam, The human development index: a critical review. *Ecol Econ* **1998**, *25*, 249-264.
- [4] F. Bray, A. Jemal, N. Grey, J. Ferlay, D. Forman, Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *Lancet Oncol* **2012**, *13*, 790-801.
- [5] F. Bray, I. Soerjomataram, in *Cancer: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 3)* (Eds.: H. Gelband, P. Jha, R. Sankaranarayanan, S. Horton), Washington (DC), **2015**.
- [6] M. Maule, F. Merletti, Cancer transition and priorities for cancer control. *Lancet Oncol* **2012**, *13*, 745-746.
- [7] J. D. Watson, The human genome project: past, present, and future. *Science* **1990**, *248*, 44-49.
- [8] F. S. Collins, Shattuck lecture--medical and societal consequences of the Human Genome Project. *N Engl J Med* **1999**, *341*, 28-37.
- [9] F. S. Collins, V. A. McKusick, Implications of the Human Genome Project for medical science. *JAMA* **2001**, *285*, 540-544.
- [10] M. J. Joyner, N. Paneth, Promises, promises, and precision medicine. *J Clin Invest* **2019**, *129*, 946-948.
- [11] E. A. Ashley, Towards precision medicine. *Nat Rev Genet* **2016**, *17*, 507-522.
- [12] F. J. Accurso, S. M. Rowe, J. P. Clancy, M. P. Boyle, J. M. Dunitz, P. R. Durie, S. D. Sagel, D. B. Hornick, M. W. Konstan, S. H. Donaldson, R. B. Moss, J. M. Pilewski, R. C. Rubenstein, A. Z. Uluer, M. L. Aitken, S. D. Freedman, L. M. Rose, N. Mayer-Hamblett, Q. Dong, J. Zha, A. J. Stone, E. R. Olson, C. L. Ordonez, P. W. Campbell, M. A. Ashlock, B. W. Ramsey, Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. *N Engl J Med* **2010**, *363*, 1991-2003.
- [13] F. Van Goor, S. Hadida, P. D. Grootenhuis, B. Burton, J. H. Stack, K. S. Straley, C. J. Decker, M. Miller, J. McCartney, E. R. Olson, J. J. Wine, R. A. Frizzell, M. Ashlock, P. A. Negulescu, Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, 18843-18848.
- [14] C. E. Wainwright, J. S. Elborn, B. W. Ramsey, G. Marigowda, X. Huang, M. Cipolli, C. Colombo, J. C. Davies, K. De Boeck, P. A. Flume, M. W. Konstan, S. A. McColley, K. McCoy, E. F. McKone, A. Munck, F. Ratjen, S. M. Rowe, D. Waltz, M. P. Boyle, Traffic Study Group, Transport Study Group, Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del CFTR. *N Engl J Med* **2015**, *373*, 220-231.
- [15] National Research Council (US) Committee on A Framework for Developing a New Taxonomy of Disease, in *Toward Precision Medicine: Building a*

- Knowledge Network for Biomedical Research and a New Taxonomy of Disease*, Washington (DC), **2011**.
- [16] J. Schaffhausen, What Precisely Is Precision Medicine? *Trends Pharmacol Sci* **2017**, *38*, 1-2.
- [17] R. W. Peck, Precision Medicine Is Not Just Genomics: The Right Dose for Every Patient. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2018**, *58*, 105-122.
- [18] F. S. Collins, H. Varmus, A new initiative on precision medicine. *N Engl J Med* **2015**, *372*, 793-795.
- [19] E. A. Ashley, The precision medicine initiative: a new national effort. *JAMA* **2015**, *313*, 2119-2120.
- [20] A. Korte, A. Farlow, The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant Methods* **2013**, *9*, 29.
- [21] GWAS to the people. *Nat Med* **2018**, *24*, 1483.
- [22] S. Szymczak, J. M. Biernacka, H. J. Cordell, O. Gonzalez-Recio, I. R. Konig, H. Zhang, Y. V. Sun, Machine learning in genome-wide association studies. *Genet Epidemiol* **2009**, *33 Suppl 1*, S51-57.
- [23] Z. Wei, W. Wang, J. Bradfield, J. Li, C. Cardinale, E. Frackelton, C. Kim, F. Mentch, K. Van Steen, P. M. Visscher, R. N. Baldassano, H. Hakonarson, I. B. D. Genetics Consortium International, Large sample size, wide variant spectrum, and advanced machine-learning technique boost risk prediction for inflammatory bowel disease. *Am J Hum Genet* **2013**, *92*, 1008-1012.
- [24] P. M. Visscher, N. R. Wray, Q. Zhang, P. Sklar, M. I. McCarthy, M. A. Brown, J. Yang, 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *Am J Hum Genet* **2017**, *101*, 5-22.
- [25] E. Lin, P. H. Kuo, Y. L. Liu, Y. W. Yu, A. C. Yang, S. J. Tsai, A Deep Learning Approach for Predicting Antidepressant Response in Major Depression Using Clinical and Genetic Biomarkers. *Front Psychiatry* **2018**, *9*, 290.
- [26] J. Vamathevan, D. Clark, P. Czodrowski, I. Dunham, E. Ferran, G. Lee, B. Li, A. Madabhushi, P. Shah, M. Spitzer, S. Zhao, Applications of machine learning in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* **2019**.
- [27] L. Schwartzberg, E. S. Kim, D. Liu, D. Schrag, Precision Oncology: Who, How, What, When, and When Not? *Am Soc Clin Oncol Educ Book* **2017**, *37*, 160-169.
- [28] A. M. Bode, Z. Dong, Recent advances in precision oncology research. *NPJ Precis Oncol* **2018**, *2*, 11.
- [29] W. Pao, J. Chmielecki, Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Cancer* **2010**, *10*, 760-774.
- [30] 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, Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* **1998**, *279*, 577-580.
- [31] P. D. Pharoah, A. Antoniou, M. Bobrow, R. L. Zimmern, D. F. Easton, B. A. Ponder, Polygenic susceptibility to breast cancer and implications for prevention. *Nat Genet* **2002**, *31*, 33-36.
- [32] M. J. Duffy, Predictive markers in breast and other cancers: a review. *Clin Chem* **2005**, *51*, 494-503.
- [33] T. Soussi, C. Beroud, Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer* **2001**, *1*, 233-240.

- [34] B. D. Lehmann, J. A. Bauer, X. Chen, M. E. Sanders, A. B. Chakravarthy, Y. Shyr, J. A. Pietenpol, Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* **2011**, *121*, 2750-2767.
- [35] B. Vogelstein, N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, Jr., K. W. Kinzler, Cancer genome landscapes. *Science* **2013**, *339*, 1546-1558.
- [36] D. Hanahan, R. A. Weinberg, The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
- [37] D. Hanahan, R. A. Weinberg, Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
- [38] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, *298*, 1912-1934.
- [39] J. Boudeau, D. Miranda-Saavedra, G. J. Barton, D. R. Alessi, Emerging roles of pseudokinases. *Trends Cell Biol* **2006**, *16*, 443-452.
- [40] J. Rauch, N. Volinsky, D. Romano, W. Kolch, The secret life of kinases: functions beyond catalysis. *Cell Commun Signal* **2011**, *9*, 23.
- [41] enzyme.expasy.org/EC/2.7.-.-, [Stand: 25.10.2018].
- [42] A. Lin, A. Minden, H. Martinetto, F. X. Claret, C. Lange-Carter, F. Mercurio, G. L. Johnson, M. Karin, Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* **1995**, *268*, 286-290.
- [43] M. Capra, P. G. Nuciforo, S. Confalonieri, M. Quarto, M. Bianchi, M. Nebuloni, R. Boldorini, F. Pallotti, G. Viale, M. L. Gishizky, G. F. Draetta, P. P. Di Fiore, Frequent alterations in the expression of serine/threonine kinases in human cancers. *Cancer Res* **2006**, *66*, 8147-8154.
- [44] S. K. Hanks, A. M. Quinn, T. Hunter, The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **1988**, *241*, 42-52.
- [45] E. G. Krebs, Historical perspectives on protein phosphorylation and a classification system for protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **1983**, *302*, 3-11.
- [46] W. Eckhart, M. A. Hutchinson, T. Hunter, An activity phosphorylating tyrosine in polyoma T antigen immunoprecipitates. *Cell* **1979**, *18*, 925-933.
- [47] K. Parang, J. H. Till, A. J. Ablooglu, R. A. Kohanski, S. R. Hubbard, P. A. Cole, Mechanism-based design of a protein kinase inhibitor. *Nat Struct Biol* **2001**, *8*, 37-41.
- [48] D. M. Williams, P. A. Cole, Proton demand inversion in a mutant protein tyrosine kinase reaction. *J Am Chem Soc* **2002**, *124*, 5956-5957.
- [49] Z. Wang, P. A. Cole, Catalytic mechanisms and regulation of protein kinases. *Methods Enzymol* **2014**, *548*, 1-21.
- [50] O. Gerlits, M. J. Waltman, S. Taylor, P. Langan, A. Kovalevsky, Insights into the phosphoryl transfer catalyzed by cAMP-dependent protein kinase: an X-ray crystallographic study of complexes with various metals and peptide substrate SP20. *Biochemistry* **2013**, *52*, 3721-3727.
- [51] A. H. West, A. M. Stock, Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends Biochem Sci* **2001**, *26*, 369-376.
- [52] M. Tyers, M. Mann, From genomics to proteomics. *Nature* **2003**, *422*, 193-197.
- [53] G. A. Houry, R. C. Baliban, C. A. Floudas, Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. *Sci Rep* **2011**, *1*.

- [54] A. Alonso, J. Sasin, N. Bottini, I. Friedberg, I. Friedberg, A. Osterman, A. Godzik, T. Hunter, J. Dixon, T. Mustelin, Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* **2004**, *117*, 699-711.
- [55] A. Bononi, C. Agnoletto, E. De Marchi, S. Marchi, S. Patergnani, M. Bonora, C. Giorgi, S. Missiroli, F. Poletti, A. Rimessi, P. Pinton, Protein kinases and phosphatases in the control of cell fate. *Enzyme Res* **2011**, *2011*, 329098.
- [56] H. M. Berman, J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T. N. Bhat, H. Weissig, I. N. Shindyalov, P. E. Bourne, The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **2000**, *28*, 235-242.
- [57] rcsb.org, [Stand: 08.01.2019].
- [58] A. P. Kornev, N. M. Haste, S. S. Taylor, L. F. Eyck, Surface comparison of active and inactive protein kinases identifies a conserved activation mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 17783-17788.
- [59] T. Pawson, P. Nash, Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* **2003**, *300*, 445-452.
- [60] C. Vogel, M. Bashton, N. D. Kerrison, C. Chothia, S. A. Teichmann, Structure, function and evolution of multidomain proteins. *Curr Opin Struct Biol* **2004**, *14*, 208-216.
- [61] T. Pawson, J. Schlessingert, SH2 and SH3 domains. *Curr Biol* **1993**, *3*, 434-442.
- [62] M. A. Lemmon, Pleckstrin homology (PH) domains and phosphoinositides. *Biochem Soc Symp* **2007**, 81-93.
- [63] J. M. Matthews, M. Sunde, Zinc fingers--folds for many occasions. *IUBMB Life* **2002**, *54*, 351-355.
- [64] D. R. Knighton, J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, V. A. Ashford, N. H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **1991**, *253*, 407-414.
- [65] D. R. Knighton, J. H. Zheng, L. F. Ten Eyck, N. H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, Structure of a peptide inhibitor bound to the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **1991**, *253*, 414-420.
- [66] J. Zheng, E. A. Trafny, D. R. Knighton, N. H. Xuong, S. S. Taylor, L. F. Ten Eyck, J. M. Sowadski, 2.2 Å refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **1993**, *49*, 362-365.
- [67] M. Huse, J. Kuriyan, The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **2002**, *109*, 275-282.
- [68] M. Rabiller, M. Getlik, S. Klüter, A. Richters, S. Tuckmantel, J. R. Simard, D. Rauh, Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases. *Arch Pharm (Weinheim)* **2010**, *343*, 193-206.
- [69] J. Zhou, J. A. Adams, Participation of ADP dissociation in the rate-determining step in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **1997**, *36*, 15733-15738.
- [70] H. S. Meharena, P. Chang, M. M. Keshwani, K. Oruganty, A. K. Nene, N. Kannan, S. S. Taylor, A. P. Kornev, Deciphering the structural basis of eukaryotic protein kinase regulation. *PLoS Biol* **2013**, *11*, e1001680.
- [71] J. A. Endicott, M. E. Noble, L. N. Johnson, The structural basis for control of eukaryotic protein kinases. *Annu Rev Biochem* **2012**, *81*, 587-613.

- [72] P. Cohen, Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, 309-315.
- [73] P. Cohen, The origins of protein phosphorylation. *Nat Cell Biol* **2002**, *4*, E127-130.
- [74] E. S. Groban, A. Narayanan, M. P. Jacobson, Conformational changes in protein loops and helices induced by post-translational phosphorylation. *PLoS Comput Biol* **2006**, *2*, e32.
- [75] D. J. Mandell, I. Chorny, E. S. Groban, S. E. Wong, E. Levine, C. S. Rapp, M. P. Jacobson, Strengths of hydrogen bonds involving phosphorylated amino acid side chains. *J Am Chem Soc* **2007**, *129*, 820-827.
- [76] C. Sutherland, I. A. Leighton, P. Cohen, Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* **1993**, *296 (Pt 1)*, 15-19.
- [77] N. Pullen, P. B. Dennis, M. Andjelkovic, A. Dufner, S. C. Kozma, B. A. Hemmings, G. Thomas, Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science* **1998**, *279*, 707-710.
- [78] H. Nishi, K. Hashimoto, A. R. Panchenko, Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function. *Structure* **2011**, *19*, 1807-1815.
- [79] H. Nishi, A. Shaytan, A. R. Panchenko, Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. *Front Genet* **2014**, *5*, 270.
- [80] P. Cohen, The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem* **2001**, *268*, 5001-5010.
- [81] E. K. Kim, E. J. Choi, Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* **2010**, *1802*, 396-405.
- [82] R. Roskoski, Jr., A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol Res* **2015**, *100*, 1-23.
- [83] R. Roskoski, Jr., Properties of FDA-approved small molecule protein kinase inhibitors. *Pharmacol Res* **2019**.
- [84] P. Rous, A Sarcoma of the Fowl Transmissible by an Agent Separable from the Tumor Cells. *J Exp Med* **1911**, *13*, 397-411.
- [85] P. H. Duesberg, P. K. Vogt, Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1970**, *67*, 1673-1680.
- [86] G. S. Martin, Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* **1970**, *227*, 1021-1023.
- [87] D. Stehelin, H. E. Varmus, J. M. Bishop, P. K. Vogt, DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* **1976**, *260*, 170-173.
- [88] G. S. Martin, The hunting of the Src. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**, *2*, 467-475.
- [89] M. S. Collett, R. L. Erikson, Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1978**, *75*, 2021-2024.
- [90] A. D. Levinson, H. Oppermann, L. Levintow, H. E. Varmus, J. M. Bishop, Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. *Cell* **1978**, *15*, 561-572.
- [91] M. S. Collett, J. S. Brugge, R. L. Erikson, Characterization of a normal avian cell protein related to the avian sarcoma virus transforming gene product. *Cell* **1978**, *15*, 1363-1369.

- [92] H. Oppermann, A. D. Levinson, H. E. Varmus, L. Levintow, J. M. Bishop, Uninfected vertebrate cells contain a protein that is closely related to the product of the avian sarcoma virus transforming gene (src). *Proc Natl Acad Sci U S A* **1979**, *76*, 1804-1808.
- [93] www.nobelprize.org/prizes/medicine/1966/summary/, [Stand: 04.08.2019].
- [94] www.nobelprize.org/prizes/medicine/1989/summary/, [Stand: 04.08.2019].
- [95] P. J. Roberts, C. J. Der, Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* **2007**, *26*, 3291-3310.
- [96] A. B. West, D. J. Moore, S. Biskup, A. Bugayenko, W. W. Smith, C. A. Ross, V. L. Dawson, T. M. Dawson, Parkinson's disease-associated mutations in leucine-rich repeat kinase 2 augment kinase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**, *102*, 16842-16847.
- [97] S. Kumar, J. Boehm, J. C. Lee, p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2003**, *2*, 717-726.
- [98] J. E. Fenn, R. Udelsman, First use of intravenous chemotherapy cancer treatment: rectifying the record. *J Am Coll Surg* **2011**, *212*, 413-417.
- [99] www.cancer.gov/research/progress/250-years-milestones, [Stand: 04.08.2019].
- [100] M. A. Jordan, Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr Med Chem Anticancer Agents* **2002**, *2*, 1-17.
- [101] M. Arruebo, N. Vilaboa, B. Saez-Gutierrez, J. Lambea, A. Tres, M. Valladares, A. Gonzalez-Fernandez, Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers (Basel)* **2011**, *3*, 3279-3330.
- [102] V. T. DeVita, Jr., E. Chu, A history of cancer chemotherapy. *Cancer Res* **2008**, *68*, 8643-8653.
- [103] H. Hidaka, M. Inagaki, S. Kawamoto, Y. Sasaki, Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* **1984**, *23*, 5036-5041.
- [104] T. Tamaoki, H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto, F. Tomita, Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺ dependent protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **1986**, *135*, 397-402.
- [105] P. D. Davis, L. H. Elliott, W. Harris, C. H. Hill, S. A. Hurst, E. Keech, M. K. Kumar, G. Lawton, J. S. Nixon, S. E. Wilkinson, Inhibitors of protein kinase C. 2. Substituted bisindolylmaleimides with improved potency and selectivity. *J Med Chem* **1992**, *35*, 994-1001.
- [106] S. P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen, Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **2000**, *351*, 95-105.
- [107] J. C. Uitdehaag, F. Verkaar, H. Alwan, J. de Man, R. C. Buijsman, G. J. Zaman, A guide to picking the most selective kinase inhibitor tool compounds for pharmacological validation of drug targets. *Br J Pharmacol* **2012**, *166*, 858-876.
- [108] J. Baselga, L. Norton, J. Albanell, Y. M. Kim, J. Mendelsohn, Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity

- of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Res* **1998**, *58*, 2825-2831.
- [109] D. J. Slamon, B. Leyland-Jones, S. Shak, H. Fuchs, V. Paton, A. Bajamonde, T. Fleming, W. Eiermann, J. Wolter, M. Pegram, J. Baselga, L. Norton, Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* **2001**, *344*, 783-792.
- [110] E. Van Cutsem, M. Peeters, S. Siena, Y. Humblet, A. Hendlisz, B. Neyns, J. L. Canon, J. L. Van Laethem, J. Maurel, G. Richardson, M. Wolf, R. G. Amado, Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* **2007**, *25*, 1658-1664.
- [111] D. Cunningham, Y. Humblet, S. Siena, D. Khayat, H. Bleiberg, A. Santoro, D. Bets, M. Mueser, A. Harstrick, C. Verslype, I. Chau, E. Van Cutsem, Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* **2004**, *351*, 337-345.
- [112] J. Baselga, J. Cortes, S. B. Kim, S. A. Im, R. Hegg, Y. H. Im, L. Roman, J. L. Pedrini, T. Pienkowski, A. Knott, E. Clark, M. C. Benyunes, G. Ross, S. M. Swain, Cleopatra Study Group, Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer. *N Engl J Med* **2012**, *366*, 109-119.
- [113] J. Capdevila, E. Elez, T. Macarulla, F. J. Ramos, M. Ruiz-Echarri, J. Tabernero, Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer treatment. *Cancer Treat Rev* **2009**, *35*, 354-363.
- [114] M. H. Cohen, G. Williams, J. R. Johnson, J. Duan, J. Gobburu, A. Rahman, K. Benson, J. Leighton, S. K. Kim, R. Wood, M. Rothmann, G. Chen, K. M. U, A. M. Staten, R. Pazdur, Approval summary for imatinib mesylate capsules in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res* **2002**, *8*, 935-942.
- [115] M. Deininger, E. Buchdunger, B. J. Druker, The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* **2005**, *105*, 2640-2653.
- [116] M. H. Cohen, J. R. Johnson, R. Justice, R. Pazdur, Approval summary: imatinib mesylate for one or three years in the adjuvant treatment of gastrointestinal stromal tumors. *Oncologist* **2012**, *17*, 992-997.
- [117] R. Dagher, M. Cohen, G. Williams, M. Rothmann, J. Gobburu, G. Robbie, A. Rahman, G. Chen, A. Staten, D. Griebel, R. Pazdur, Approval summary: imatinib mesylate in the treatment of metastatic and/or unresectable malignant gastrointestinal stromal tumors. *Clin Cancer Res* **2002**, *8*, 3034-3038.
- [118] D. A. Thomas, S. Faderl, J. Cortes, S. O'Brien, F. J. Giles, S. M. Kornblau, G. Garcia-Manero, M. J. Keating, M. Andreeff, S. Jeha, M. Beran, S. Verstovsek, S. Pierce, L. Letvak, A. Salvado, R. Champlin, M. Talpaz, H. Kantarjian, Treatment of Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia with hyper-CVAD and imatinib mesylate. *Blood* **2004**, *103*, 4396-4407.
- [119] K. T. Lim, K. Y. Tan, Current research and treatment for gastrointestinal stromal tumors. *World J Gastroenterol* **2017**, *23*, 4856-4866.
- [120] C. Yoo, M. H. Ryu, J. Jo, I. Park, B. Y. Ryoo, Y. K. Kang, Efficacy of Imatinib in Patients with Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha-Mutated Gastrointestinal Stromal Tumors. *Cancer Res Treat* **2016**, *48*, 546-552.

- [121] www.fda.gov/drugs/informationondrugs/approveddrugs/ucm279174.htm, [Stand: 01.02.2019].
- [122] R. Fleischmann, J. Kremer, J. Cush, H. Schulze-Koops, C. A. Connell, J. D. Bradley, D. Gruben, G. V. Wallenstein, S. H. Zwillich, K. S. Kanik, Oral Solo Investigators, Placebo-controlled trial of tofacitinib monotherapy in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **2012**, *367*, 495-507.
- [123] L. Richeldi, R. M. du Bois, G. Raghu, A. Azuma, K. K. Brown, U. Costabel, V. Cottin, K. R. Flaherty, D. M. Hansell, Y. Inoue, D. S. Kim, M. Kolb, A. G. Nicholson, P. W. Noble, M. Selman, H. Taniguchi, M. Brun, F. Le Maulf, M. Girard, S. Stowasser, R. Schlenker-Herceg, B. Disse, H. R. Collard, Impulsis Trial Investigators, Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **2014**, *370*, 2071-2082.
- [124] J. Bussel, D. M. Arnold, E. Grossbard, J. Mayer, J. Trelinski, W. Homenda, A. Hellmann, J. Windyga, L. Sivcheva, A. A. Khalafallah, F. Zaja, N. Cooper, V. Markovtsov, H. Zayed, A. M. Duliege, Fostamatinib for the treatment of adult persistent and chronic immune thrombocytopenia: Results of two phase 3, randomized, placebo-controlled trials. *Am J Hematol* **2018**, *93*, 921-930.
- [125] N. T. Connell, N. Berliner, Fostamatinib for the treatment of chronic immune thrombocytopenia. *Blood* **2019**.
- [126] D. C. Moore, T. Gebru, A. Muslimani, Fostamatinib for the treatment of immune thrombocytopenia in adults. *Am J Health Syst Pharm* **2019**.
- [127] J. Monod, J. P. Changeux, F. Jacob, Allosteric proteins and cellular control systems. *J Mol Biol* **1963**, *6*, 306-329.
- [128] R. Roskoski, Jr., Classification of small molecule protein kinase inhibitors based upon the structures of their drug-enzyme complexes. *Pharmacol Res* **2016**, *103*, 26-48.
- [129] F. Zuccotto, E. Ardini, E. Casale, M. Angiolini, Through the "gatekeeper door": exploiting the active kinase conformation. *J Med Chem* **2010**, *53*, 2681-2694.
- [130] Lori Krim Gavrin, Eddine Saiah, Approaches to discover non-ATP site kinase inhibitors. *MedChemComm* **2013**, *4*, 41-51.
- [131] V. Lamba, I. Ghosh, New directions in targeting protein kinases: focusing upon true allosteric and bivalent inhibitors. *Curr Pharm Des* **2012**, *18*, 2936-2945.
- [132] 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, EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 13306-13311.
- [133] M. H. Cohen, J. R. Johnson, Y. F. Chen, R. Sridhara, R. Pazdur, FDA drug approval summary: erlotinib (Tarceva) tablets. *Oncologist* **2005**, *10*, 461-466.
- [134] M. H. Cohen, G. A. Williams, R. Sridhara, G. Chen, R. Pazdur, FDA drug approval summary: gefitinib (ZD1839) (Iressa) tablets. *Oncologist* **2003**, *8*, 303-306.
- [135] R. M. Lyall, A. Zilberstein, A. Gazit, C. Gilon, A. Levitzki, J. Schlessinger, Tyrphostins inhibit epidermal growth factor (EGF)-receptor tyrosine kinase activity in living cells and EGF-stimulated cell proliferation. *J Biol Chem* **1989**, *264*, 14503-14509.

- [136] J. E. Cortes, D. W. Kim, H. M. Kantarjian, T. H. Brummendorf, I. Dyagil, L. Griskevicius, H. Malhotra, C. Powell, K. Gogat, A. M. Countouriotis, C. Gambacorti-Passerini, Bosutinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia: results from the BELA trial. *J Clin Oncol* **2012**, *30*, 3486-3492.
- [137] D. W. Kim, M. Tiseo, M. J. Ahn, K. L. Reckamp, K. H. Hansen, S. W. Kim, R. M. Huber, H. L. West, H. J. M. Groen, M. J. Hochmair, N. B. Leighl, S. N. Gettinger, C. J. Langer, L. G. Paz-Ares Rodriguez, E. F. Smit, E. S. Kim, W. Reichmann, F. G. Haluska, D. Kerstein, D. R. Camidge, Brigatinib in Patients With Crizotinib-Refractory Anaplastic Lymphoma Kinase-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer: A Randomized, Multicenter Phase II Trial. *J Clin Oncol* **2017**, *35*, 2490-2498.
- [138] J. Stamos, M. X. Sliwkowski, C. Eigenbrot, Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 46265-46272.
- [139] J. H. Park, Y. Liu, M. A. Lemmon, R. Radhakrishnan, Erlotinib binds both inactive and active conformations of the EGFR tyrosine kinase domain. *Biochem J* **2012**, *448*, 417-423.
- [140] Z. Zhao, H. Wu, L. Wang, Y. Liu, S. Knapp, Q. Liu, N. S. Gray, Exploration of type II binding mode: A privileged approach for kinase inhibitor focused drug discovery? *ACS Chem Biol* **2014**, *9*, 1230-1241.
- [141] A. C. Dar, K. M. Shokat, The evolution of protein kinase inhibitors from antagonists to agonists of cellular signaling. *Annu Rev Biochem* **2011**, *80*, 769-795.
- [142] Z. A. Knight, K. M. Shokat, Features of selective kinase inhibitors. *Chem Biol* **2005**, *12*, 621-637.
- [143] B. Nagar, W. G. Bornmann, P. Pellicena, T. Schindler, D. R. Veach, W. T. Miller, B. Clarkson, J. Kuriyan, Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). *Cancer Res* **2002**, *62*, 4236-4243.
- [144] D. Kitagawa, K. Yokota, M. Gouda, Y. Narumi, H. Ohmoto, E. Nishiwaki, K. Akita, Y. Kirii, Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors. *Genes Cells* **2013**, *18*, 110-122.
- [145] A. S. Reddy, S. Zhang, Polypharmacology: drug discovery for the future. *Expert Rev Clin Pharmacol* **2013**, *6*, 41-47.
- [146] A. Anighoro, J. Bajorath, G. Rastelli, Polypharmacology: challenges and opportunities in drug discovery. *J Med Chem* **2014**, *57*, 7874-7887.
- [147] K. Tzogani, V. Skibeli, I. Westgaard, M. Dalhus, H. Thoresen, K. B. Slot, P. Damkier, K. Hofland, J. Borregaard, J. Ersboll, T. Salmonson, R. Pieters, R. Sylvester, G. Mickisch, J. Bergh, F. Pignatti, The European Medicines Agency approval of axitinib (Inlyta) for the treatment of advanced renal cell carcinoma after failure of prior treatment with sunitinib or a cytokine: summary of the scientific assessment of the committee for medicinal products for human use. *Oncologist* **2015**, *20*, 196-201.
- [148] O. Frankfurt, J. D. Licht, Ponatinib--a step forward in overcoming resistance in chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, 5828-5834.
- [149] A. G. Gilmartin, M. R. Bleam, A. Groy, K. G. Moss, E. A. Minthorn, S. G. Kulkarni, C. M. Rominger, S. Erskine, K. E. Fisher, J. Yang, F. Zappacosta, R. Annan, D. Sutton, S. G. Laquerre, GSK1120212 (JTP-74057) is an inhibitor of

- MEK activity and activation with favorable pharmacokinetic properties for sustained in vivo pathway inhibition. *Clin Cancer Res* **2011**, *17*, 989-1000.
- [150] Y. Zhao, A. A. Adjei, The clinical development of MEK inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol* **2014**, *11*, 385-400.
- [151] K. D. Rice, N. Aay, N. K. Anand, C. M. Blazey, O. J. Bowles, J. Bussenius, S. Costanzo, J. K. Curtis, S. C. Defina, L. Dubenko, S. Engst, A. A. Joshi, A. R. Kennedy, A. I. Kim, E. S. Koltun, J. C. Lougheed, J. C. Manalo, J. F. Martini, J. M. Nuss, C. J. Peto, T. H. Tsang, P. Yu, S. Johnston, Novel Carboxamide-Based Allosteric MEK Inhibitors: Discovery and Optimization Efforts toward XL518 (GDC-0973). *ACS Med Chem Lett* **2012**, *3*, 416-421.
- [152] K. P. Garnock-Jones, Cobimetinib: First Global Approval. *Drugs* **2015**, *75*, 1823-1830.
- [153] F. J. Adrian, Q. Ding, T. Sim, A. Velentza, C. Sloan, Y. Liu, G. Zhang, W. Hur, S. Ding, P. Manley, J. Mestan, D. Fabbro, N. S. Gray, Allosteric inhibitors of Bcr-abl-dependent cell proliferation. *Nat Chem Biol* **2006**, *2*, 95-102.
- [154] Y. Choi, M. A. Seeliger, S. B. Panjarian, H. Kim, X. Deng, T. Sim, B. Couch, A. J. Koleske, T. E. Smithgall, N. S. Gray, N-myristoylated c-Abl tyrosine kinase localizes to the endoplasmic reticulum upon binding to an allosteric inhibitor. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 29005-29014.
- [155] Z. Fang, C. Grütter, D. Rauh, Strategies for the selective regulation of kinases with allosteric modulators: exploiting exclusive structural features. *ACS Chem Biol* **2013**, *8*, 58-70.
- [156] A. Michael, Ueber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsäureäthern zu den Aethern ungesättigter Säuren. *Journal für Praktische Chemie* **1887**, *35*, 349-356.
- [157] F. M. Ferguson, N. S. Gray, Kinase inhibitors: the road ahead. *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17*, 353-377.
- [158] M. Gehringer, S. A. Laufer, Emerging and Re-Emerging Warheads for Targeted Covalent Inhibitors: Applications in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *J Med Chem* **2019**.
- [159] A. Chaikuad, P. Koch, S. A. Laufer, S. Knapp, The Cysteinome of Protein Kinases as a Target in Drug Development. *Angew Chem Int Ed Engl* **2018**, *57*, 4372-4385.
- [160] 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, AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* **2015**, *372*, 1689-1699.
- [161] J. C. Byrd, R. R. Furman, S. E. Coutre, I. W. Flinn, J. A. Burger, K. A. Blum, B. Grant, J. P. Sharman, M. Coleman, W. G. Wierda, J. A. Jones, W. Zhao, N. A. Heerema, A. J. Johnson, J. Sukbuntherng, B. Y. Chang, F. Clow, E. Hedrick, J. J. Buggy, D. F. James, S. O'Brien, Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* **2013**, *369*, 32-42.
- [162] H. J. Burstein, Y. Sun, L. Y. Dirix, Z. Jiang, R. Paridaens, A. R. Tan, A. Awada, A. Ranade, S. Jiao, G. Schwartz, R. Abbas, C. Powell, K. Turnbull, J. Vermette, C. Zacharchuk, R. Badwe, Neratinib, an irreversible ErbB receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with advanced ErbB2-positive breast cancer. *J Clin Oncol* **2010**, *28*, 1301-1307.

- [163] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty, The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 307-317.
- [164] R. Lonsdale, R. A. Ward, Structure-based design of targeted covalent inhibitors. *Chem Soc Rev* **2018**, *47*, 3816-3830.
- [165] T. Barf, A. Kaptein, Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks. *J Med Chem* **2012**, *55*, 6243-6262.
- [166] S. Yusuf, F. Zhao, S. R. Mehta, S. Chrolavicius, G. Tognoni, K. K. Fox, Investigators Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial, Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med* **2001**, *345*, 494-502.
- [167] J. E. Richter, P. J. Kahrilas, J. Johanson, P. Maton, J. R. Breiter, C. Hwang, V. Marino, B. Hamelin, J. G. Levine, Investigators Esomeprazole Study, Efficacy and safety of esomeprazole compared with omeprazole in GERD patients with erosive esophagitis: a randomized controlled trial. *Am J Gastroenterol* **2001**, *96*, 656-665.
- [168] E. C. Hulme, M. A. Trevethick, Ligand binding assays at equilibrium: validation and interpretation. *Br J Pharmacol* **2010**, *161*, 1219-1237.
- [169] P. J. Tonge, Drug-Target Kinetics in Drug Discovery. *ACS Chem Neurosci* **2018**, *9*, 29-39.
- [170] L. Michaelis, M.L. Menten, Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochemische Zeitschrift* **1913**, *49*, 333-369.
- [171] Y. Cheng, W. H. Prusoff, Relationship between the inhibition constant (K_I) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* **1973**, *22*, 3099-3108.
- [172] B. F. Krippendorff, R. Neuhaus, P. Lienau, A. Reichel, W. Huisinga, Mechanism-based inhibition: deriving K_I and k_{inact} directly from time-dependent IC_{50} values. *J Biomol Screen* **2009**, *14*, 913-923.
- [173] R. A. Bauer, Covalent inhibitors in drug discovery: from accidental discoveries to avoided liabilities and designed therapies. *Drug Discov Today* **2015**, *20*, 1061-1073.
- [174] C. M. Harris, S. E. Foley, E. R. Goedken, M. Michalak, S. Murdock, N. S. Wilson, Merits and Pitfalls in the Characterization of Covalent Inhibitors of Bruton's Tyrosine Kinase. *SLAS Discov* **2018**, *23*, 1040-1050.
- [175] J. M. Strelow, A Perspective on the Kinetics of Covalent and Irreversible Inhibition. *SLAS Discov* **2017**, *22*, 3-20.
- [176] S. P. Staal, Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1987**, *84*, 5034-5037.
- [177] T. Maehama, J. E. Dixon, The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 13375-13378.
- [178] N. Divecha, R. F. Irvine, Phospholipid signaling. *Cell* **1995**, *80*, 269-278.
- [179] H. W. Chang, M. Aoki, D. Fruman, K. R. Auger, A. Bellacosa, P. N. Tsichlis, L. C. Cantley, T. M. Roberts, P. K. Vogt, Transformation of chicken cells by the gene encoding the catalytic subunit of PI 3-kinase. *Science* **1997**, *276*, 1848-1850.
- [180] J. Li, C. Yen, D. Liaw, K. Podsypanina, S. Bose, S. I. Wang, J. Puc, C. Miliaris, L. Rodgers, R. McCombie, S. H. Bigner, B. C. Giovanella, M. Ittmann, B. Tycko,

- H. Hibshoosh, M. H. Wigler, R. Parsons, PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* **1997**, *275*, 1943-1947.
- [181] www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=%22akt%22, [Stand: 05.06.2019].
- [182] L. R. Pearce, D. Komander, D. R. Alessi, The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2010**, *11*, 9-22.
- [183] B. D. Manning, L. C. Cantley, AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **2007**, *129*, 1261-1274.
- [184] R. W. Matheny, Jr., M. L. Adamo, Current perspectives on Akt activation and Akt-ions. *Exp Biol Med (Maywood)* **2009**, *234*, 1264-1270.
- [185] E. Gonzalez, T. E. McGraw, The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 2502-2508.
- [186] R. S. Lee, C. M. House, B. E. Cristiano, R. D. Hannan, R. B. Pearson, K. M. Hannan, Relative Expression Levels Rather Than Specific Activity Plays the Major Role in Determining In Vivo AKT Isoform Substrate Specificity. *Enzyme Res* **2011**, *2011*, 720985.
- [187] Y. R. Chin, A. Toker, The actin-bundling protein palladin is an Akt1-specific substrate that regulates breast cancer cell migration. *Mol Cell* **2010**, *38*, 333-344.
- [188] R. L. Dillon, R. Marcotte, B. T. Hennessy, J. R. Woodgett, G. B. Mills, W. J. Muller, Akt1 and akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. *Cancer Res* **2009**, *69*, 5057-5064.
- [189] R. Endersby, X. Zhu, N. Hay, D. W. Ellison, S. J. Baker, Nonredundant functions for Akt isoforms in astrocyte growth and gliomagenesis in an orthotopic transplantation model. *Cancer Res* **2011**, *71*, 4106-4116.
- [190] A. R. Clark, A. Toker, Signalling specificity in the Akt pathway in breast cancer. *Biochem Soc Trans* **2014**, *42*, 1349-1355.
- [191] A. Toker, Achieving specificity in Akt signaling in cancer. *Adv Biol Regul* **2012**, *52*, 78-87.
- [192] M. Yoeli-Lerner, A. Toker, Akt/PKB signaling in cancer: a function in cell motility and invasion. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 603-605.
- [193] Y. R. Chin, T. Yoshida, A. Marusyk, A. H. Beck, K. Polyak, A. Toker, Targeting Akt3 signaling in triple-negative breast cancer. *Cancer Res* **2014**, *74*, 964-973.
- [194] I. G. Maroulakou, W. Oemler, S. P. Naber, P. N. Tschlis, Akt1 ablation inhibits, whereas Akt2 ablation accelerates, the development of mammary adenocarcinomas in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2/neu and MMTV-polyoma middle T transgenic mice. *Cancer Res* **2007**, *67*, 167-177.
- [195] J. N. Hutchinson, J. Jin, R. D. Cardiff, J. R. Woodgett, W. J. Muller, Activation of Akt-1 (PKB-alpha) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. *Cancer Res* **2004**, *64*, 3171-3178.
- [196] Y. R. Chin, X. Yuan, S. P. Balk, A. Toker, PTEN-deficient tumors depend on AKT2 for maintenance and survival. *Cancer Discov* **2014**, *4*, 942-955.
- [197] M. Hanada, J. Feng, B. A. Hemmings, Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1697*, 3-16.

- [198] R. M. Biondi, P. C. Cheung, A. Casamayor, M. Deak, R. A. Currie, D. R. Alessi, Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA. *EMBO J* **2000**, *19*, 979-988.
- [199] N. Kannan, N. Haste, S. S. Taylor, A. F. Neuwald, The hallmark of AGC kinase functional divergence is its C-terminal tail, a cis-acting regulatory module. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**, *104*, 1272-1277.
- [200] J. Yang, P. Cron, V. M. Good, V. Thompson, B. A. Hemmings, D. Barford, Crystal structure of an activated Akt/protein kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nat Struct Biol* **2002**, *9*, 940-944.
- [201] W. I. Wu, W. C. Voegtli, H. L. Sturgis, F. P. Dizon, G. P. Vigers, B. J. Brandhuber, Crystal structure of human AKT1 with an allosteric inhibitor reveals a new mode of kinase inhibition. *PLoS One* **2010**, *5*, e12913.
- [202] C. Parikh, V. Janakiraman, W. I. Wu, C. K. Foo, N. M. Kljavin, S. Chaudhuri, E. Stawiski, B. Lee, J. Lin, H. Li, M. N. Lorenzo, W. Yuan, J. Guillory, M. Jackson, J. Rondon, Y. Franke, K. K. Bowman, M. Sagolla, J. Stinson, T. D. Wu, J. Wu, D. Stokoe, H. M. Stern, B. J. Brandhuber, K. Lin, N. J. Skelton, S. Seshagiri, Disruption of PH-kinase domain interactions leads to oncogenic activation of AKT in human cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 19368-19373.
- [203] B. D. Manning, A. Toker, AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **2017**, *169*, 381-405.
- [204] J. Guo, A. A. Chakraborty, P. Liu, W. Gan, X. Zheng, H. Inuzuka, B. Wang, J. Zhang, L. Zhang, M. Yuan, J. Novak, J. Q. Cheng, A. Toker, S. Signoretti, Q. Zhang, J. M. Asara, W. G. Kaelin, Jr., W. Wei, pVHL suppresses kinase activity of Akt in a proline-hydroxylation-dependent manner. *Science* **2016**, *353*, 929-932.
- [205] A. Balendran, A. Casamayor, M. Deak, A. Paterson, P. Gaffney, R. Currie, C. P. Downes, D. R. Alessi, PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Curr Biol* **1999**, *9*, 393-404.
- [206] A. Moritz, Y. Li, A. Guo, J. Villen, Y. Wang, J. MacNeill, J. Kornhauser, K. Sprott, J. Zhou, A. Possemato, J. M. Ren, P. Hornbeck, L. C. Cantley, S. P. Gygi, J. Rush, M. J. Comb, Akt-RSK-S6 kinase signaling networks activated by oncogenic receptor tyrosine kinases. *Sci Signal* **2010**, *3*, ra64.
- [207] T. Obata, M. B. Yaffe, G. G. Leparc, E. T. Piro, H. Maegawa, A. Kashiwagi, R. Kikkawa, L. C. Cantley, Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 36108-36115.
- [208] P. Rodriguez-Viciano, P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield, J. Downward, Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* **1994**, *370*, 527-532.
- [209] E. Castellano, J. Downward, RAS Interaction with PI3K: More Than Just Another Effector Pathway. *Genes Cancer* **2011**, *2*, 261-274.
- [210] M. Ebner, I. Lucic, T. A. Leonard, I. Yudushkin, PI(3,4,5)P3 Engagement Restricts Akt Activity to Cellular Membranes. *Mol Cell* **2017**, *65*, 416-431 e416.
- [211] D. R. Alessi, S. R. James, C. P. Downes, A. B. Holmes, P. R. Gaffney, C. B. Reese, P. Cohen, Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol* **1997**, *7*, 261-269.

- [212] D. D. Sarbassov, D. A. Guertin, S. M. Ali, D. M. Sabatini, Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **2005**, *307*, 1098-1101.
- [213] G. Hoxhaj, I. Ben-Sahra, S. E. Lockwood, R. C. Timson, V. Byles, G. T. Henning, P. Gao, L. M. Selfors, J. M. Asara, B. D. Manning, Direct stimulation of NADP(+) synthesis through Akt-mediated phosphorylation of NAD kinase. *Science* **2019**, *363*, 1088-1092.
- [214] E. Jacinto, V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S. Y. Jung, Q. Huang, J. Qin, B. Su, SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* **2006**, *127*, 125-137.
- [215] B. T. Hennessy, D. L. Smith, P. T. Ram, Y. Lu, G. B. Mills, Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4*, 988-1004.
- [216] C. Costa, A. Bosch, The Strategy of PIKing a Target: What Is AKTually Most Effective? *Clin Cancer Res* **2018**, *24*, 2029-2031.
- [217] www.cellsignal.de/contents/science-cst-pathways-pi3k-akt-signaling-resources/pi3k-akt-signaling-interactive-pathway/pathways-akt-signaling, [Stand: 04.08.2019].
- [218] L. Braccini, E. Ciruolo, C. C. Campa, A. Perino, D. L. Longo, G. Tibolla, M. Pregnolato, Y. Cao, B. Tassone, F. Damilano, M. Laffargue, E. Calautti, M. Falasca, G. D. Norata, J. M. Backer, E. Hirsch, PI3K-C2gamma is a Rab5 effector selectively controlling endosomal Akt2 activation downstream of insulin signalling. *Nat Commun* **2015**, *6*, 7400.
- [219] N. Jethwa, G. H. Chung, M. G. Lete, A. Alonso, R. D. Byrne, V. Calleja, B. Larijani, Endomembrane PtdIns(3,4,5)P3 activates the PI3K-Akt pathway. *J Cell Sci* **2015**, *128*, 3456-3465.
- [220] T. F. Franke, D. R. Kaplan, L. C. Cantley, A. Toker, Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate. *Science* **1997**, *275*, 665-668.
- [221] P. T. Hawkins, L. R. Stephens, Emerging evidence of signalling roles for PI(3,4)P2 in Class I and II PI3K-regulated pathways. *Biochem Soc Trans* **2016**, *44*, 307-314.
- [222] I. Lucic, M. K. Rathinaswamy, L. Truebestein, D. J. Hamelin, J. E. Burke, T. A. Leonard, Conformational sampling of membranes by Akt controls its activation and inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115*, E3940-E3949.
- [223] I. Hers, E. E. Vincent, J. M. Tavaré, Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* **2011**, *23*, 1515-1527.
- [224] I. Vivanco, C. L. Sawyers, The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 489-501.
- [225] J. Q. Cheng, C. W. Lindsley, G. Z. Cheng, H. Yang, S. V. Nicosia, The Akt/PKB pathway: molecular target for cancer drug discovery. *Oncogene* **2005**, *24*, 7482-7492.
- [226] T. L. Yuan, L. C. Cantley, PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **2008**, *27*, 5497-5510.
- [227] D. A. Altomare, J. R. Testa, Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene* **2005**, *24*, 7455-7464.

- [228] J. Woenckhaus, K. Steger, K. Sturm, K. Munstedt, F. E. Franke, I. Fenic, Prognostic value of PIK3CA and phosphorylated AKT expression in ovarian cancer. *Virchows Arch* **2007**, *450*, 387-395.
- [229] Z. Szijsyarto, K. D. Flach, M. Opdam, C. Palmieri, S. C. Linn, J. Wesseling, S. Ali, J. M. Bliss, M. C. U. Cheang, W. Zwart, R. C. Coombes, Dissecting the predictive value of MAPK/AKT/estrogen-receptor phosphorylation axis in primary breast cancer to treatment response for tamoxifen over exemestane: a Translational Report of the Intergroup Exemestane Study (IES)-PathIES. *Breast Cancer Res Treat* **2019**.
- [230] J. Lim, J. H. Kim, J. Y. Paeng, M. J. Kim, S. D. Hong, J. I. Lee, S. P. Hong, Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Pathol* **2005**, *58*, 1199-1205.
- [231] M. G. Schlieman, B. N. Fahy, R. Ramsamooj, L. Beckett, R. J. Bold, Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br J Cancer* **2003**, *89*, 2110-2115.
- [232] S. Faes, O. Dormond, PI3K and AKT: Unfaithful Partners in Cancer. *Int J Mol Sci* **2015**, *16*, 21138-21152.
- [233] B. Vanhaesebroeck, D. R. Alessi, The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* **2000**, *346 Pt 3*, 561-576.
- [234] M. A. Bruhn, R. B. Pearson, R. D. Hannan, K. E. Sheppard, AKT-independent PI3-K signaling in cancer - emerging role for SGK3. *Cancer Manag Res* **2013**, *5*, 281-292.
- [235] R. W. Hendriks, S. Yuvaraj, L. P. Kil, Targeting Bruton's tyrosine kinase in B cell malignancies. *Nat Rev Cancer* **2014**, *14*, 219-232.
- [236] M. J. Niederst, J. A. Engelman, Bypass mechanisms of resistance to receptor tyrosine kinase inhibition in lung cancer. *Sci Signal* **2013**, *6*, re6.
- [237] F. G. Giancotti, Deregulation of cell signaling in cancer. *FEBS Lett* **2014**, *588*, 2558-2570.
- [238] K. Yonesaka, K. Zejnullahu, I. Okamoto, T. Satoh, F. Cappuzzo, J. Souglakos, D. Ercan, A. Rogers, M. Roncalli, M. Takeda, Y. Fujisaka, J. Philips, T. Shimizu, O. Maenishi, Y. Cho, J. Sun, A. Destro, K. Taira, K. Takeda, T. Okabe, J. Swanson, H. Itoh, M. Takada, E. Lifshits, K. Okuno, J. A. Engelman, R. A. Shivdasani, K. Nishio, M. Fukuoka, M. Varella-Garcia, K. Nakagawa, P. A. Janne, Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med* **2011**, *3*, 99ra86.
- [239] L. A. Garraway, P. A. Janne, Circumventing cancer drug resistance in the era of personalized medicine. *Cancer Discov* **2012**, *2*, 214-226.
- [240] S. M. Kim, H. Kim, M. R. Yun, H. N. Kang, K. H. Pyo, H. J. Park, J. M. Lee, H. M. Choi, P. Ellinghaus, M. Ocker, S. Paik, H. R. Kim, B. C. Cho, Activation of the Met kinase confers acquired drug resistance in FGFR-targeted lung cancer therapy. *Oncogenesis* **2016**, *5*, e241.
- [241] J. D. Carpten, A. L. Faber, C. Horn, G. P. Donoho, S. L. Briggs, C. M. Robbins, G. Hostetter, S. Boguslawski, T. Y. Moses, S. Savage, M. Uhlik, A. Lin, J. Du, Y. W. Qian, D. J. Zeckner, G. Tucker-Kellogg, J. Touchman, K. Patel, S. Mousses, M. Bittner, R. Schevitz, M. H. Lai, K. L. Blanchard, J. E. Thomas, A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **2007**, *448*, 439-444.

- [242] M. S. Kim, E. G. Jeong, N. J. Yoo, S. H. Lee, Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *Br J Cancer* **2008**, *98*, 1533-1535.
- [243] K. H. Yi, J. Lauring, Recurrent AKT mutations in human cancers: functional consequences and effects on drug sensitivity. *Oncotarget* **2016**, *7*, 4241-4251.
- [244] D. M. Hyman, L. M. Smyth, M. T. A. Donoghue, S. N. Westin, P. L. Bedard, E. J. Dean, H. Bando, A. B. El-Khoueiry, J. A. Perez-Fidalgo, A. Mita, J. H. M. Schellens, M. T. Chang, J. B. Reichel, N. Bouvier, S. D. Selcuklu, T. E. Soumerai, J. Torrisi, J. P. Erinjeri, H. Ambrose, J. C. Barrett, B. Dougherty, A. Foxley, J. P. O. Lindemann, R. McEwen, M. Pass, G. Schiavon, M. F. Berger, S. Chandarlapaty, D. B. Solit, U. Banerji, J. Baselga, B. S. Taylor, AKT Inhibition in Solid Tumors With AKT1 Mutations. *J Clin Oncol* **2017**, *35*, 2251-2259.
- [245] K. E. Landgraf, C. Pilling, J. J. Falke, Molecular mechanism of an oncogenic mutation that alters membrane targeting: Glu17Lys modifies the PIP lipid specificity of the AKT1 PH domain. *Biochemistry* **2008**, *47*, 12260-12269.
- [246] E. A. Eisenhauer, P. Therasse, J. Bogaerts, L. H. Schwartz, D. Sargent, R. Ford, J. Dancey, S. Arbuck, S. Gwyther, M. Mooney, L. Rubinstein, L. Shankar, L. Dodd, R. Kaplan, D. Lacombe, J. Verweij, New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* **2009**, *45*, 228-247.
- [247] Z. Wang, Y. Huang, J. Zhang, Molecularly targeting the PI3K-Akt-mTOR pathway can sensitize cancer cells to radiotherapy and chemotherapy. *Cell Mol Biol Lett* **2014**, *19*, 233-242.
- [248] K. A. West, S. S. Castillo, P. A. Dennis, Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* **2002**, *5*, 234-248.
- [249] O. C. Schuurbiers, J. H. Kaanders, H. F. van der Heijden, R. P. Dekhuijzen, W. J. Oyen, J. Bussink, The PI3-K/AKT-pathway and radiation resistance mechanisms in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol* **2009**, *4*, 761-767.
- [250] J. Rudner, C. E. Ruiner, R. Handrick, H. J. Eibl, C. Belka, V. Jendrossek, The Akt-inhibitor Erufosine induces apoptotic cell death in prostate cancer cells and increases the short term effects of ionizing radiation. *Radiat Oncol* **2010**, *5*, 108.
- [251] R. L. Elstrom, D. E. Bauer, M. Buzzai, R. Karnauskas, M. H. Harris, D. R. Plas, H. Zhuang, R. M. Cinalli, A. Alavi, C. M. Rudin, C. B. Thompson, Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer Res* **2004**, *64*, 3892-3899.
- [252] M. Buzzai, D. E. Bauer, R. G. Jones, R. J. Deberardinis, G. Hatzivassiliou, R. L. Elstrom, C. B. Thompson, The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. *Oncogene* **2005**, *24*, 4165-4173.
- [253] C. D. Young, A. S. Lewis, M. C. Rudolph, M. D. Ruehle, M. R. Jackman, U. J. Yun, O. Ilkun, R. Pereira, E. D. Abel, S. M. Anderson, Modulation of glucose transporter 1 (GLUT1) expression levels alters mouse mammary tumor cell growth in vitro and in vivo. *PLoS One* **2011**, *6*, e23205.
- [254] C. W. Lindsley, S. F. Barnett, M. Yaroschak, M. T. Bilodeau, M. E. Layton, Recent progress in the development of ATP-competitive and allosteric Akt kinase inhibitors. *Curr Top Med Chem* **2007**, *7*, 1349-1363.
- [255] G. M. Nitulescu, D. Margina, P. Juzenas, Q. Peng, O. T. Olaru, E. Saloustros, C. Fenga, DAlpha Spandidos, M. Libra, A. M. Tsatsakis, Akt inhibitors in cancer

- treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int J Oncol* **2016**, *48*, 869-885.
- [256] T. C. Turek, E. C. Small, R. W. Bryant, W. A. Hill, Development and validation of a competitive AKT serine/threonine kinase fluorescence polarization assay using a product-specific anti-phospho-serine antibody. *Anal Biochem* **2001**, *299*, 45-53.
- [257] C. B. Breitenlechner, T. Wegge, L. Berillon, K. Graul, K. Marzenell, W. G. Friebe, U. Thomas, R. Schumacher, R. Huber, R. A. Engh, B. Masjost, Structure-based optimization of novel azepane derivatives as PKB inhibitors. *J Med Chem* **2004**, *47*, 1375-1390.
- [258] H. Reuveni, N. Livnah, T. Geiger, S. Klein, O. Ohne, I. Cohen, M. Benhar, G. Gellerman, A. Levitzki, Toward a PKB inhibitor: modification of a selective PKA inhibitor by rational design. *Biochemistry* **2002**, *41*, 10304-10314.
- [259] Q. Li, T. Li, G. D. Zhu, J. Gong, A. Claibone, C. Dalton, Y. Luo, E. F. Johnson, Y. Shi, X. Liu, V. Klinghofer, J. L. Bauch, K. C. Marsh, J. J. Bouska, S. Arries, R. De Jong, T. Oltersdorf, V. S. Stoll, C. G. Jakob, S. H. Rosenberg, V. L. Giranda, Discovery of trans-3,4'-bispyridinylethylenes as potent and novel inhibitors of protein kinase B (PKB/Akt) for the treatment of cancer: Synthesis and biological evaluation. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16*, 1679-1685.
- [260] Y. Luo, A. R. Shoemaker, X. Liu, K. W. Woods, S. A. Thomas, R. de Jong, E. K. Han, T. Li, V. S. Stoll, J. A. Powlas, A. Oleksijew, M. J. Mitten, Y. Shi, R. Guan, T. P. McGonigal, V. Klinghofer, E. F. Johnson, J. D. Levenson, J. J. Bouska, M. Mamo, R. A. Smith, E. E. Gramling-Evans, B. A. Zinker, A. K. Mika, P. T. Nguyen, T. Oltersdorf, S. H. Rosenberg, Q. Li, V. L. Giranda, Potent and selective inhibitors of Akt kinases slow the progress of tumors in vivo. *Mol Cancer Ther* **2005**, *4*, 977-986.
- [261] D. A. Heerding, N. Rhodes, J. D. Leber, T. J. Clark, R. M. Keenan, L. V. Lafrance, M. Li, I. G. Safonov, D. T. Takata, J. W. Venslavsky, D. S. Yamashita, A. E. Choudhry, R. A. Copeland, Z. Lai, M. D. Schaber, P. J. Tummino, S. L. Strum, E. R. Wood, D. R. Duckett, D. Eberwein, V. B. Knick, T. J. Lansing, R. T. McConnell, S. Zhang, E. A. Minthorn, N. O. Concha, G. L. Warren, R. Kumar, Identification of 4-(2-(4-amino-1,2,5-oxadiazol-3-yl)-1-ethyl-7-((3S)-3-piperidinylmethyl)oxy)-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-4-yl)-2-methyl-3-butyn-2-ol (GSK690693), a novel inhibitor of AKT kinase. *J Med Chem* **2008**, *51*, 5663-5679.
- [262] M. C. Crouthamel, J. A. Kahana, S. Korenchuk, S. Y. Zhang, G. Sundaresan, D. J. Eberwein, K. K. Brown, R. Kumar, Mechanism and management of AKT inhibitor-induced hyperglycemia. *Clin Cancer Res* **2009**, *15*, 217-225.
- [263] A. Donald, T. McHardy, M. G. Rowlands, L. J. Hunter, T. G. Davies, V. Berdini, R. G. Boyle, G. W. Aherne, M. D. Garrett, I. Collins, Rapid evolution of 6-phenylpurine inhibitors of protein kinase B through structure-based design. *J Med Chem* **2007**, *50*, 2289-2292.
- [264] J. J. Caldwell, T. G. Davies, A. Donald, T. McHardy, M. G. Rowlands, G. W. Aherne, L. K. Hunter, K. Taylor, R. Ruddle, F. I. Raynaud, M. Verdonk, P. Workman, M. D. Garrett, I. Collins, Identification of 4-(4-aminopiperidin-1-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as selective inhibitors of protein kinase B through fragment elaboration. *J Med Chem* **2008**, *51*, 2147-2157.
- [265] T. A. Yap, M. I. Walton, L. J. Hunter, M. Valenti, A. de Haven Brandon, P. D. Eve, R. Ruddle, S. P. Heaton, A. Henley, L. Pickard, G. Vijayaraghavan, J. J.

- Caldwell, N. T. Thompson, W. Aherne, F. I. Raynaud, S. A. Eccles, P. Workman, I. Collins, M. D. Garrett, Preclinical pharmacology, antitumor activity, and development of pharmacodynamic markers for the novel, potent AKT inhibitor CCT128930. *Mol Cancer Ther* **2011**, *10*, 360-371.
- [266] T. McHardy, J. J. Caldwell, K. M. Cheung, L. J. Hunter, K. Taylor, M. Rowlands, R. Ruddle, A. Henley, A. de Haven Brandon, M. Valenti, T. G. Davies, L. Fazal, L. Seavers, F. I. Raynaud, S. A. Eccles, G. W. Aherne, M. D. Garrett, I. Collins, Discovery of 4-amino-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamides as selective, orally active inhibitors of protein kinase B (Akt). *J Med Chem* **2010**, *53*, 2239-2249.
- [267] B. R. Davies, H. Greenwood, P. Dudley, C. Crafter, D. H. Yu, J. Zhang, J. Li, B. Gao, Q. Ji, J. Maynard, S. A. Ricketts, D. Cross, S. Cosulich, C. C. Chresta, K. Page, J. Yates, C. Lane, R. Watson, R. Luke, D. Ogilvie, M. Pass, Preclinical pharmacology of AZD5363, an inhibitor of AKT: pharmacodynamics, antitumor activity, and correlation of monotherapy activity with genetic background. *Mol Cancer Ther* **2012**, *11*, 873-887.
- [268] M. Addie, P. Ballard, D. Buttar, C. Crafter, G. Currie, B. R. Davies, J. Debreczeni, H. Dry, P. Dudley, R. Greenwood, P. D. Johnson, J. G. Kettle, C. Lane, G. Lamont, A. Leach, R. W. Luke, J. Morris, D. Ogilvie, K. Page, M. Pass, S. Pearson, L. Ruston, Discovery of 4-amino-N-[(1S)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl]-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamide (AZD5363), an orally bioavailable, potent inhibitor of Akt kinases. *J Med Chem* **2013**, *56*, 2059-2073.
- [269] G. M. Nitulescu, M. Van De Venter, G. Nitulescu, A. Ungurianu, P. Juzenas, Q. Peng, O. T. Olaru, D. Gradinaru, A. Tsatsakis, D. Tsoukalas, D. A. Spandidos, D. Margina, The Akt pathway in oncology therapy and beyond (Review). *Int J Oncol* **2018**, *53*, 2319-2331.
- [270] clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=azd5363&cntry=&state=&city=&dist=, [Stand: 21.01.2019].
- [271] P. Elvin, A. Palmer, C. Womack, M. Tall, K.E. Swales, M.D. Garrett, U. Banerji, K. Tamura, S.Y.A. Cheung, P. Lawrence, J. Lindemann, H. Ambrose, C. Stephens, B. Davies, A. Foxley, M. Pass, E.A. Harrington, J.C. Barrett, Pharmacodynamic activity of the AKT inhibitor AZD5363 in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology* **2014**, *32*, 2541-2541.
- [272] U. Banerji, E.J. Dean, J.A. Perez-Fidalgo, G. Batist, P.L. Bedard, B. You, S.N. Westin, P. Kabos, B. Davies, P. Elvin, P. Lawrence, J.W.T. Yates, H. Ambrose, P. Rugman, A. Foxley, S. Salim, E. Casson, J.P.O. Lindemann, J.H.M. Schellens, A pharmacokinetically (PK) and pharmacodynamically (PD) driven phase I trial of the pan-AKT inhibitor AZD5363 with expansion cohorts in PIK3CA mutant breast and gynecological cancers. *Journal of Clinical Oncology* **2015**, *33*, 2500-2500.
- [273] clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=gdc-0068&cntry=&state=&city=&dist=, [Stand: 21.01.2019].
- [274] J. R. Bencsik, D. Xiao, J. F. Blake, N. C. Kallan, I. S. Mitchell, K. L. Spencer, R. Xu, S. L. Gloor, M. Martinson, T. Risom, R. D. Woessner, F. Dizon, W. I. Wu, G. P. Vigers, B. J. Brandhuber, N. J. Skelton, W. W. Prior, L. J. Murray, Discovery of dihydrothieno- and dihydrofuroypyrimidines as potent pan Akt inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 7037-7041.

- [275] J. F. Blake, N. C. Kallan, D. Xiao, R. Xu, J. R. Bencsik, N. J. Skelton, K. L. Spencer, I. S. Mitchell, R. D. Woessner, S. L. Gloor, T. Risom, S. D. Gross, M. Martinson, T. H. Morales, G. P. Vigers, B. J. Brandhuber, Discovery of pyrrolopyrimidine inhibitors of Akt. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 5607-5612.
- [276] J. F. Blake, R. Xu, J. R. Bencsik, D. Xiao, N. C. Kallan, S. Schlachter, I. S. Mitchell, K. L. Spencer, A. L. Banka, E. M. Wallace, S. L. Gloor, M. Martinson, R. D. Woessner, G. P. Vigers, B. J. Brandhuber, J. Liang, B. S. Safina, J. Li, B. Zhang, C. Chabot, S. Do, L. Lee, J. Oeh, D. Sampath, B. B. Lee, K. Lin, B. M. Liederer, N. J. Skelton, Discovery and preclinical pharmacology of a selective ATP-competitive Akt inhibitor (GDC-0068) for the treatment of human tumors. *J Med Chem* **2012**, *55*, 8110-8127.
- [277] J. Lin, D. Sampath, M. A. Nannini, B. B. Lee, M. Degtyarev, J. Oeh, H. Savage, Z. Guan, R. Hong, R. Kassees, L. B. Lee, T. Risom, S. Gross, B. M. Liederer, H. Koeppen, N. J. Skelton, J. J. Wallin, M. Belvin, E. Punnoose, L. S. Friedman, K. Lin, Targeting activated Akt with GDC-0068, a novel selective Akt inhibitor that is efficacious in multiple tumor models. *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, 1760-1772.
- [278] C. Saura, D. Roda, S. Rosello, M. Oliveira, T. Macarulla, J. A. Perez-Fidalgo, R. Morales-Barrera, J. M. Sanchis-Garcia, L. Musib, N. Budha, J. Zhu, M. Nannini, W. Y. Chan, S. M. Sanabria Bohorquez, R. D. Meng, K. Lin, Y. Yan, P. Patel, J. Baselga, J. Taberero, A. Cervantes, A First-in-Human Phase I Study of the ATP-Competitive AKT Inhibitor Ipatasertib Demonstrates Robust and Safe Targeting of AKT in Patients with Solid Tumors. *Cancer Discov* **2017**, *7*, 102-113.
- [279] M. Dumble, M. C. Crouthamel, S. Y. Zhang, M. Schaber, D. Levy, K. Robell, Q. Liu, D. J. Figueroa, E. A. Minthorn, M. A. Seefeld, M. B. Rouse, S. K. Rabindran, D. A. Heerding, R. Kumar, Discovery of novel AKT inhibitors with enhanced anti-tumor effects in combination with the MEK inhibitor. *PLoS One* **2014**, *9*, e100880.
- [280] C. Gajate, F. Mollinedo, Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* **2007**, *109*, 711-719.
- [281] R. Leonard, J. Hardy, G. van Tienhoven, S. Houston, P. Simmonds, M. David, J. Mansi, Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer. *J Clin Oncol* **2001**, *19*, 4150-4159.
- [282] P. Rios-Marco, C. Marco, X. Galvez, J. M. Jimenez-Lopez, M. P. Carrasco, Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2017**, *1859*, 1657-1667.
- [283] W. J. van Blitterswijk, M. Verheij, Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1831*, 663-674.
- [284] T. Sunyoto, J. Potet, M. Boelaert, Why miltefosine-a life-saving drug for leishmaniasis-is unavailable to people who need it the most. *BMJ Glob Health* **2018**, *3*, e000709.
- [285] S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, S. Fu, P. J. Hancock, K. M. Haskell, R. E. Jones, J. A. Kahana, A. M. Kral, K. Leander, L. L. Lee, J. Malinowski, E. M. McAvoy, D. D. Nahas, R. G. Robinson, H. E. Huber, Identification and characterization of

- pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors. *Biochem J* **2005**, *385*, 399-408.
- [286] C. W. Lindsley, Z. Zhao, W. H. Leister, R. G. Robinson, S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, R. E. Jones, G. D. Hartman, J. R. Huff, H. E. Huber, M. E. Duggan, Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 761-764.
- [287] Z. Zhao, W. H. Leister, R. G. Robinson, S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, R. E. Jones, G. D. Hartman, J. R. Huff, H. E. Huber, M. E. Duggan, C. W. Lindsley, Discovery of 2,3,5-trisubstituted pyridine derivatives as potent Akt1 and Akt2 dual inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 905-909.
- [288] D. DeFeo-Jones, S. F. Barnett, S. Fu, P. J. Hancock, K. M. Haskell, K. R. Leander, E. McAvoy, R. G. Robinson, M. E. Duggan, C. W. Lindsley, Z. Zhao, H. E. Huber, R. E. Jones, Tumor cell sensitization to apoptotic stimuli by selective inhibition of specific Akt/PKB family members. *Mol Cancer Ther* **2005**, *4*, 271-279.
- [289] Z. Zhao, R. G. Robinson, S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, R. E. Jones, G. D. Hartman, H. E. Huber, M. E. Duggan, C. W. Lindsley, Development of potent, allosteric dual Akt1 and Akt2 inhibitors with improved physical properties and cell activity. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 49-53.
- [290] J. C. Hartnett, S. F. Barnett, M. T. Bilodeau, D. Defeo-Jones, G. D. Hartman, H. E. Huber, R. E. Jones, A. M. Kral, R. G. Robinson, Z. Wu, Optimization of 2,3,5-trisubstituted pyridine derivatives as potent allosteric Akt1 and Akt2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 2194-2197.
- [291] Z. Wu, R. G. Robinson, S. Fu, S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, R. E. Jones, A. M. Kral, H. E. Huber, N. E. Kohl, G. D. Hartman, M. T. Bilodeau, Rapid assembly of diverse and potent allosteric Akt inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 2211-2214.
- [292] M. T. Bilodeau, A. E. Balitza, J. M. Hoffman, P. J. Manley, S. F. Barnett, D. Defeo-Jones, K. Haskell, R. E. Jones, K. Leander, R. G. Robinson, A. M. Smith, H. E. Huber, G. D. Hartman, Allosteric inhibitors of Akt1 and Akt2: a naphthyridinone with efficacy in an A2780 tumor xenograft model. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 3178-3182.
- [293] T. Siu, J. Liang, J. Arruda, Y. Li, R. E. Jones, D. Defeo-Jones, S. F. Barnett, R. G. Robinson, Discovery of potent and cell-active allosteric dual Akt 1 and 2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 4186-4190.
- [294] T. Siu, Y. Li, J. Nagasawa, J. Liang, L. Tehrani, P. Chua, R. E. Jones, D. Defeo-Jones, S. F. Barnett, R. G. Robinson, The design and synthesis of potent and cell-active allosteric dual Akt 1 and 2 inhibitors devoid of hERG activity. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 4191-4194.
- [295] A. W. Tolcher, T. A. Yap, I. Fearen, A. Taylor, C. Carpenter, A. T. Brunetto, M. Beeram, K. Papadopoulos, L. Yan, J. S. de Bono, A phase I study of MK-2206, an oral potent allosteric Akt inhibitor (Akti), in patients (pts) with advanced solid tumor (ST). *Journal of Clinical Oncology* **2009**, *27*, 3503-3503.
- [296] H. Hirai, H. Sootome, Y. Nakatsuru, K. Miyama, S. Taguchi, K. Tsujioka, Y. Ueno, H. Hatch, P. K. Majumder, B. S. Pan, H. Kotani, MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **2010**, *9*, 1956-1967.

- [297] K. Do, G. Speranza, R. Bishop, S. Khin, L. Rubinstein, R. J. Kinders, M. Datiles, M. Eugeni, M. H. Lam, L. A. Doyle, J. H. Doroshow, S. Kummar, Biomarker-driven phase 2 study of MK-2206 and selumetinib (AZD6244, ARRY-142886) in patients with colorectal cancer. *Invest New Drugs* **2015**, *33*, 720-728.
- [298] R. K. Ramanathan, S. L. McDonough, H. F. Kennecke, S. Iqbal, J. C. Baranda, T. E. Seery, H. J. Lim, A. F. Hezel, G. M. Vaccaro, C. D. Blanke, Phase 2 study of MK-2206, an allosteric inhibitor of AKT, as second-line therapy for advanced gastric and gastroesophageal junction cancer: A SWOG cooperative group trial (S1005). *Cancer* **2015**, *121*, 2193-2197.
- [299] A. W. Tolcher, K. Khan, M. Ong, U. Banerji, V. Papadimitrakopoulou, D. R. Gandara, A. Patnaik, R. D. Baird, D. Olmos, C. R. Garrett, J. M. Skolnik, E. H. Rubin, P. D. Smith, P. Huang, M. Learoyd, K. A. Shannon, A. Morosky, E. Tetteh, Y. M. Jou, K. P. Papadopoulos, V. Moreno, B. Kaiser, T. A. Yap, L. Yan, J. S. de Bono, Antitumor activity in RAS-driven tumors by blocking AKT and MEK. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 739-748.
- [300] C. X. Ma, V. Suman, M. P. Goetz, D. Northfelt, M. E. Burkard, F. Ademuyiwa, M. Naughton, J. Margenthaler, R. Aft, R. Gray, A. Tevaarwerk, L. Wilke, T. Haddad, T. Moynihan, C. Loprinzi, T. Hieken, E. K. Barnell, Z. L. Skidmore, Y. Y. Feng, K. Krysiak, J. Hoog, Z. Guo, L. Nehring, K. B. Wisinski, E. Mardis, I. S. Hagemann, K. Vij, S. Sanati, H. Al-Kateb, O. L. Griffith, M. Griffith, L. Doyle, C. Erlichman, M. J. Ellis, A Phase II Trial of Neoadjuvant MK-2206, an AKT Inhibitor, with Anastrozole in Clinical Stage II or III PIK3CA-Mutant ER-Positive and HER2-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **2017**, *23*, 6823-6832.
- [301] E. Jonasch, E. Hasanov, P. G. Corn, T. Moss, K. R. Shaw, S. Stovall, V. Marcott, B. Gan, S. Bird, X. Wang, K. A. Do, P. F. Altamirano, A. J. Zurita, L. A. Doyle, P. N. Lara, Jr., N. M. Tannir, A randomized phase 2 study of MK-2206 versus everolimus in refractory renal cell carcinoma. *Ann Oncol* **2017**, *28*, 804-808.
- [302] M. A. Ashwell, J. M. Lapierre, C. Brassard, K. Bresciano, C. Bull, S. Cornell-Kennon, S. Eathiraj, D. S. France, T. Hall, J. Hill, E. Kelleher, S. Khanapurkar, D. Kizer, S. Koerner, J. Link, Y. Liu, S. Makhija, M. Moussa, N. Namdev, K. Nguyen, R. Nicewonger, R. Palma, J. Szwaya, M. Tandon, U. Uppalapati, D. Vensel, L. P. Volak, E. Volckova, N. Westlund, H. Wu, R. Y. Yang, T. C. Chan, Discovery and optimization of a series of 3-(3-phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amines: orally bioavailable, selective, and potent ATP-independent Akt inhibitors. *J Med Chem* **2012**, *55*, 5291-5310.
- [303] www.arqule.com/wp-content/uploads/2015/11/Poster-2-ARQ-092-101-ESMO-poster_2015-09-16_Final-Phase-1b.pdf, [Stand: 04.08.2019].
- [304] www.arqule.com/wp-content/uploads/2015/11/Poster-1-AACR_Ph_1_092_April_9_13-Phase-1.pdf, [Stand: 04.08.2019].
- [305] www.arqule.com/wp-content/uploads/2015/11/Poster-7-ARQ_092-101_Ph_1_Triple_mtg_Nov_2014-Phase-1a.pdf, [Stand: 04.08.2019].
- [306] J. M. Lapierre, S. Eathiraj, D. Vensel, Y. Liu, C. O. Bull, S. Cornell-Kennon, S. Iimura, E. W. Kelleher, D. E. Kizer, S. Koerner, S. Makhija, A. Matsuda, M. Moussa, N. Namdev, R. E. Savage, J. Szwaya, E. Volckova, N. Westlund, H. Wu, B. Schwartz, Discovery of 3-(3-(4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl)-5-phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amine (ARQ 092): An Orally

- Bioavailable, Selective, and Potent Allosteric AKT Inhibitor. *J Med Chem* **2016**, *59*, 6455-6469.
- [307] www.arqule.com/wp-content/uploads/ARQ-751-101_EORTC_AACR_NCI_poster_Final.pdf, [Stand: 04.08.2019].
- [308] www.arqule.com/wp-content/uploads/ARQ-751-101_AACR-poster2018_FINAL.pdf, [Stand: 04.08.2019].
- [309] O. Politz, F. Siegel, L. Barfacker, U. Bomer, A. Hagebarth, W. J. Scott, M. Michels, S. Ince, R. Neuhaus, K. Meyer, A. E. Fernandez-Montalvan, N. Liu, F. von Nussbaum, D. Mumberg, K. Ziegelbauer, BAY 1125976, a selective allosteric AKT1/2 inhibitor, exhibits high efficacy on AKT signaling-dependent tumor growth in mouse models. *Int J Cancer* **2017**, *140*, 449-459.
- [310] L. Yan, Abstract #DDT01-1: MK-2206: A potent oral allosteric AKT inhibitor. *Cancer Research* **2009**, *69*, DDT01-01-DDT01-01.
- [311] Y. Yu, R. E. Savage, S. Eathiraj, J. Meade, M. J. Wick, T. Hall, G. Abbadessa, B. Schwartz, Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT Pathway with an Allosteric AKT Inhibitor, ARQ 092. *PLoS One* **2015**, *10*, e0140479.
- [312] I. Brana, N. A. Pham, L. Kim, S. Sakashita, M. Li, C. Ng, Y. Wang, P. Loparco, R. Sierra, L. Wang, B. A. Clarke, B. G. Neel, L. L. Siu, M. S. Tsao, Novel combinations of PI3K-mTOR inhibitors with dacomitinib or chemotherapy in PTEN-deficient patient-derived tumor xenografts. *Oncotarget* **2017**, *8*, 84659-84670.
- [313] R. A. Copeland, D. L. Pompliano, T. D. Meek, Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 730-739.
- [314] G. Dahl, T. Akerud, Pharmacokinetics and the drug-target residence time concept. *Drug Discov Today* **2013**, *18*, 697-707.
- [315] R. A. Copeland, The drug-target residence time model: a 10-year retrospective. *Nat Rev Drug Discov* **2016**, *15*, 87-95.
- [316] J. Weisner, R. Gontla, L. van der Westhuizen, S. Oeck, J. Ketzer, P. Janning, A. Richters, T. Mühlenberg, Z. Fang, A. Taher, V. Jendrosseck, S. C. Pelly, S. Bauer, W. A. van Otterlo, D. Rauh, Covalent-Allosteric Kinase Inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, *54*, 10313-10316.
- [317] S. Smith, Design, Synthese und massenspektrometrische Analyse kovalenter und kovalent-reversibler Kinaseinhibitoren. *Dissertation* **2017**, Technische Universität Dortmund.
- [318] N. Uhlenbrock, S. Smith, J. Weisner, I. Landel, M. Lindemann, T. A. Le, J. Hardick, R. Gontla, R. Scheinpflug, P. Czodrowski, P. Janning, L. Depta, L. Quambusch, M. P. Müller, B. Engels, D. Rauh, Structural and chemical insights into the covalent-allosteric inhibition of the protein kinase Akt. *Chem Sci* **2019**, *10*, 3573-3585.
- [319] F. Ahmad, P. Nidadavolu, L. Durgados, V. Ravindranath, Critical cysteines in Akt1 regulate its activity and proteasomal degradation: implications for neurodegenerative diseases. *Free Radic Biol Med* **2014**, *74*, 118-128.
- [320] H. Murata, Y. Ihara, H. Nakamura, J. Yodoi, K. Sumikawa, T. Kondo, Glutaredoxin exerts an antiapoptotic effect by regulating the redox state of Akt. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 50226-50233.
- [321] Z. Fang, Development of a Conformation-Sensitive Assay for the Detection of Inter-Domain Interactions Mediated by Allosteric Akt Inhibitors. *Dissertation* **2013**, Technische Universität Dortmund.

- [322] Z. Fang, J. R. Simard, D. Plenker, H. D. Nguyen, T. Phan, P. Wolle, S. Baumeister, D. Rauh, Discovery of inter-domain stabilizers-a novel assay system for allosteric akt inhibitors. *ACS Chem Biol* **2015**, *10*, 279-288.
- [323] T.A. Halgren, Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry* **1996**, *17*, 490-519.
- [324] F. Gnad, J. Gunawardena, M. Mann, PHOSIDA 2011: the posttranslational modification database. *Nucleic Acids Res* **2011**, *39*, D253-260.
- [325] P. Roepstorff, J. Fohlman, Letter to the editors. *Biomedical Mass Spectrometry* **1984**, *11*, 601-601.
- [326] R. S. Johnson, S. A. Martin, K. Biemann, J. T. Stults, J. T. Watson, Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal Chem* **1987**, *59*, 2621-2625.
- [327] www.cisbio.eu/media/asset/c/i/cisbio_dd_pi_62st3peb-62st3pec-62st3pej.pdf, [Stand: 04.08.2019].
- [328] G. A. Holdgate, T. D. Meek, R. L. Grimley, Mechanistic enzymology in drug discovery: a fresh perspective. *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17*, 115-132.
- [329] G. Bulaj, T. Kortemme, D. P. Goldenberg, Ionization-reactivity relationships for cysteine thiols in polypeptides. *Biochemistry* **1998**, *37*, 8965-8972.
- [330] T. Kortemme, T. E. Creighton, Ionisation of cysteine residues at the termini of model alpha-helical peptides. Relevance to unusual thiol pKa values in proteins of the thioredoxin family. *J Mol Biol* **1995**, *253*, 799-812.
- [331] T. Barf, T. Covey, R. Izumi, B. van de Kar, M. Gulrajani, B. van Lith, M. van Hoek, E. de Zwart, D. Mittag, D. Demont, S. Verkaik, F. Krantz, P. G. Pearson, R. Ulrich, A. Kaptein, Acalabrutinib (ACP-196): A Covalent Bruton Tyrosine Kinase Inhibitor with a Differentiated Selectivity and In Vivo Potency Profile. *J Pharmacol Exp Ther* **2017**, *363*, 240-252.
- [332] P. A. Schwartz, P. Kuzmic, J. Solowiej, S. Bergqvist, B. Bolanos, C. Almaden, A. Nagata, K. Ryan, J. Feng, D. Dalvie, J. C. Kath, M. Xu, R. Wani, B. W. Murray, Covalent EGFR inhibitor analysis reveals importance of reversible interactions to potency and mechanisms of drug resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 173-178.
- [333] J. Engel, C. Becker, J. Lategahn, M. Keul, J. Ketzer, T. Mühlenberg, L. Kollipara, C. Schultz-Fademrecht, R. P. Zahedi, S. Bauer, D. Rauh, Insight into the Inhibition of Drug-Resistant Mutants of the Receptor Tyrosine Kinase EGFR. *Angew Chem Int Ed Engl* **2016**, *55*, 10909-10912.
- [334] R. Scheinpflug, Expression, Aufreinigung und Kristallisation von Akt in Komplex mit kovalent-allosterischen Inhibitoren. *Masterarbeit* **2016**, Technische Universität Dortmund.
- [335] A. Roldao, R. Oliveira, M. J. Carrondo, P. M. Alves, Error assessment in recombinant baculovirus titration: evaluation of different methods. *J Virol Methods* **2009**, *159*, 69-80.
- [336] H. R. Lo, Y. C. Chao, Rapid titer determination of baculovirus by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Biotechnol Prog* **2004**, *20*, 354-360.
- [337] W. Wray, T. Boulikas, V. P. Wray, R. Hancock, Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **1981**, *118*, 197-203.
- [338] K. Stierand, M. Rarey, Drawing the PDB: Protein-Ligand Complexes in Two Dimensions. *ACS Med Chem Lett* **2010**, *1*, 540-545.

- [339] A. Wissner, T. S. Mansour, The development of HKI-272 and related compounds for the treatment of cancer. *Arch Pharm (Weinheim)* **2008**, *341*, 465-477.
- [340] N. Brown, *Bioisosteres in Medicinal Chemistry*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2012**.
- [341] T. Nguyen, R. A. Coover, J. Verghese, R. G. Moran, K. C. Ellis, Phenylalanine-Based Inactivator of AKT Kinase: Design, Synthesis, and Biological Evaluation. *ACS Med Chem Lett* **2014**, *5*, 462-467.
- [342] K. S. Metz, E. M. Deoudes, M. E. Berginski, I. Jimenez-Ruiz, B. A. Aksoy, J. Hammerbacher, S. M. Gomez, D. H. Phanstiel, Coral: Clear and Customizable Visualization of Human Kinome Data. *Cell Syst* **2018**, *7*, 347-350 e341.
- [343] L. Quambusch, Design und Synthese kovalent-allosterischer Liganden zur isoform-selektiven Adressierung der Proteinkinase Akt. *Masterarbeit* **2017**, *Technische Universität Dortmund*.
- [344] J. G. Tate, S. Bamford, H. C. Jubb, Z. Sondka, D. M. Beare, N. Bindal, H. Boutselakis, C. G. Cole, C. Creatore, E. Dawson, P. Fish, B. Harsha, C. Hathaway, S. C. Jupe, C. Y. Kok, K. Noble, L. Ponting, C. C. Ramshaw, C. E. Rye, H. E. Speedy, R. Stefancsik, S. L. Thompson, S. Wang, S. Ward, P. J. Campbell, S. A. Forbes, COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47*, D941-D947.
- [345] I. Vivanco, Z. C. Chen, B. Tanos, B. Oldrini, W. Y. Hsieh, N. Yannuzzi, C. Campos, I. K. Mellingshoff, A kinase-independent function of AKT promotes cancer cell survival. *Elife* **2014**, *3*.
- [346] J. Weisner, I. Landel, C. Reintjes, N. Uhlenbrock, M. Trajkovic-Arsic, N. Dienstbier, J. Hardick, S. Ladigan, M. Lindemann, S. Smith, L. Quambusch, R. Scheinpflug, L. Depta, R. Gontla, A. Unger, H. Müller, M. Baumann, C. Schultz-Fademrecht, G. Günther, A. Maghnouj, M. P. Müller, M. Pohl, C. Teschendorf, H. Wolters, R. Viebahn, A. Tannapfel, W. Uhl, J. G. Hengstler, S. A. Hahn, J. T. Siveke, D. Rauh, Preclinical Efficacy of Covalent-Allosteric AKT Inhibitor Borussertib in Combination with Trametinib in KRAS-Mutant Pancreatic and Colorectal Cancer. *Cancer Res* **2019**, *79*, 2367-2378.
- [347] C. Saal, A. C. Petereit, Optimizing solubility: kinetic versus thermodynamic solubility temptations and risks. *Eur J Pharm Sci* **2012**, *47*, 589-595.
- [348] G. Ottaviani, S. Martel, P. A. Carrupt, Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability. *J Med Chem* **2006**, *49*, 3948-3954.
- [349] M. Kansy, F. Senner, K. Gubernator, Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem* **1998**, *41*, 1007-1010.
- [350] R. B. van Breemen, Y. Li, Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2005**, *1*, 175-185.
- [351] B. Press, D. Di Grandi, Permeability for intestinal absorption: Caco-2 assay and related issues. *Curr Drug Metab* **2008**, *9*, 893-900.
- [352] E. H. Kerns, L. Di, S. Petusky, M. Farris, R. Ley, P. Jupp, Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability assays in drug discovery. *J Pharm Sci* **2004**, *93*, 1440-1453.
- [353] L. Di, E. H. Kerns, Y. Hong, T. A. Kleintop, O. J. McConnell, D. M. Huryn, Optimization of a higher throughput microsomal stability screening assay for profiling drug discovery candidates. *J Biomol Screen* **2003**, *8*, 453-462.

- [354] M. Fonsi, M. V. Orsale, E. Monteagudo, High-throughput microsomal stability assay for screening new chemical entities in drug discovery. *J Biomol Screen* **2008**, *13*, 862-869.
- [355] G. N. Kumar, S. Surapaneni, Role of drug metabolism in drug discovery and development. *Med Res Rev* **2001**, *21*, 397-411.
- [356] C. Xu, C. Y. Li, A. N. Kong, Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res* **2005**, *28*, 249-268.
- [357] A. Haouala, N. Widmer, M. A. Duchosal, M. Montemurro, T. Buclin, L. A. Decosterd, Drug interactions with the tyrosine kinase inhibitors imatinib, dasatinib, and nilotinib. *Blood* **2011**, *117*, e75-87.
- [358] O. Brien Z, M. F. Moghaddam, A Systematic Analysis of Physicochemical and ADME Properties of All Small Molecule Kinase Inhibitors Approved by US FDA from January 2001 to October 2015. *Curr Med Chem* **2017**, *24*, 3159-3184.
- [359] M. A. Zeitlinger, H. Derendorf, J. W. Mouton, O. Cars, W. A. Craig, D. Andes, U. Theuretzbacher, Protein binding: do we ever learn? *Antimicrob Agents Chemother* **2011**, *55*, 3067-3074.
- [360] W. T. Golde, P. Gollobin, L. L. Rodriguez, A rapid, simple, and humane method for submandibular bleeding of mice using a lancet. *Lab Anim (NY)* **2005**, *34*, 39-43.
- [361] J. Hoggatt, A. F. Hoggatt, T. A. Tate, J. Fortman, L. M. Pelus, Bleeding the laboratory mouse: Not all methods are equal. *Exp Hematol* **2016**, *44*, 132-137 e131.
- [362] S. Misale, J. P. Fatherree, E. Cortez, C. Li, S. Bilton, D. Timonina, D. T. Myers, D. Lee, M. Gomez-Caraballo, M. Greenberg, V. Nangia, P. Greninger, R. K. Egan, J. McClanaghan, G. T. Stein, E. Murchie, P. P. Zarrinkar, M. R. Janes, L. S. Li, Y. Liu, A. N. Hata, C. H. Benes, KRAS G12C NSCLC Models Are Sensitive to Direct Targeting of KRAS in Combination with PI3K Inhibition. *Clin Cancer Res* **2019**, *25*, 796-807.
- [363] P. L. Bedard, J. Tabernero, F. Janku, Z. A. Wainberg, L. Paz-Ares, J. Vansteenkiste, E. Van Cutsem, J. Perez-Garcia, A. Stathis, C. D. Britten, N. Le, K. Carter, D. Demanse, D. Csonka, M. Peters, A. Zubel, H. Nauwelaerts, C. Sessa, A phase Ib dose-escalation study of the oral pan-PI3K inhibitor buparlisib (BKM120) in combination with the oral MEK1/2 inhibitor trametinib (GSK1120212) in patients with selected advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 730-738.
- [364] E. Manchado, S. Weissmueller, J. P. th Morris, C. C. Chen, R. Wullenkord, A. Lujambio, E. de Stanchina, J. T. Poirier, J. F. Gainor, R. B. Corcoran, J. A. Engelman, C. M. Rudin, N. Rosen, S. W. Lowe, A combinatorial strategy for treating KRAS-mutant lung cancer. *Nature* **2016**, *534*, 647-651.
- [365] M. D. Muzumdar, P. Y. Chen, K. J. Dorans, K. M. Chung, A. Bhutkar, E. Hong, E. M. Noll, M. R. Sprick, A. Trumpp, T. Jacks, Survival of pancreatic cancer cells lacking KRAS function. *Nat Commun* **2017**, *8*, 1090.
- [366] I. Dagogo-Jack, A. T. Shaw, Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nat Rev Clin Oncol* **2018**, *15*, 81-94.
- [367] G. Sflomos, V. Dormoy, T. Metsalu, R. Jeitziner, L. Battista, V. Scabia, W. Raffoul, J. F. Delaloye, A. Treboux, M. Fiche, J. Vilo, A. Ayyanan, C. Brisken, A Preclinical Model for ERalpha-Positive Breast Cancer Points to the

- Epithelial Microenvironment as Determinant of Luminal Phenotype and Hormone Response. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 407-422.
- [368] U. Ben-David, B. Siranosian, G. Ha, H. Tang, Y. Oren, K. Hinohara, C. A. Strathdee, J. Dempster, N. J. Lyons, R. Burns, A. Nag, G. Kugener, B. Cimini, P. Tsvetkov, Y. E. Maruvka, R. O'Rourke, A. Garrity, A. A. Tubelli, P. Bandopadhyay, A. Tsherniak, F. Vazquez, B. Wong, C. Birger, M. Ghandi, A. R. Thorner, J. A. Bittker, M. Meyerson, G. Getz, R. Beroukhim, T. R. Golub, Genetic and transcriptional evolution alters cancer cell line drug response. *Nature* **2018**, *560*, 325-330.
- [369] P. Moi, K. Chan, I. Asunis, A. Cao, Y. W. Kan, Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1994**, *91*, 9926-9930.
- [370] K. Itoh, T. Chiba, S. Takahashi, T. Ishii, K. Igarashi, Y. Katoh, T. Oyake, N. Hayashi, K. Satoh, I. Hatayama, M. Yamamoto, Y. Nabeshima, An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* **1997**, *236*, 313-322.
- [371] J. D. Hayes, A. T. Dinkova-Kostova, The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem Sci* **2014**, *39*, 199-218.
- [372] T. Nguyen, P. Nioi, C. B. Pickett, The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress. *J Biol Chem* **2009**, *284*, 13291-13295.
- [373] Q. Ma, Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2013**, *53*, 401-426.
- [374] D. D. Zhang, S. C. Lo, J. V. Cross, D. J. Templeton, M. Hannink, Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex. *Mol Cell Biol* **2004**, *24*, 10941-10953.
- [375] K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel, M. Yamamoto, Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* **1999**, *13*, 76-86.
- [376] K. Taguchi, H. Motohashi, M. Yamamoto, Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* **2011**, *16*, 123-140.
- [377] E. H. Kobayashi, T. Suzuki, R. Funayama, T. Nagashima, M. Hayashi, H. Sekine, N. Tanaka, T. Moriguchi, H. Motohashi, K. Nakayama, M. Yamamoto, Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. *Nat Commun* **2016**, *7*, 11624.
- [378] M. Yamamoto, T. W. Kensler, H. Motohashi, The KEAP1-NRF2 System: a Thiol-Based Sensor-Effector Apparatus for Maintaining Redox Homeostasis. *Physiol Rev* **2018**, *98*, 1169-1203.
- [379] H. Motohashi, F. Katsuoka, J. D. Engel, M. Yamamoto, Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**, *101*, 6379-6384.
- [380] M. Rojo de la Vega, E. Chapman, D. D. Zhang, NRF2 and the Hallmarks of Cancer. *Cancer Cell* **2018**, *34*, 21-43.

- [381] A. Cuadrado, A. I. Rojo, G. Wells, J. D. Hayes, S. P. Cousin, W. L. Rumsey, O. C. Attucks, S. Franklin, A. L. Levonen, T. W. Kensler, A. T. Dinkova-Kostova, Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases. *Nat Rev Drug Discov* **2019**, *18*, 295-317.
- [382] H. Y. Cho, S. R. Kleeberger, Nrf2 protects against airway disorders. *Toxicol Appl Pharmacol* **2010**, *244*, 43-56.
- [383] A. Boutten, D. Goven, E. Artaud-Macari, J. Boczkowski, M. Bonay, NRF2 targeting: a promising therapeutic strategy in chronic obstructive pulmonary disease. *Trends Mol Med* **2011**, *17*, 363-371.
- [384] M. J. Calkins, D. A. Johnson, J. A. Townsend, M. R. Vargas, J. A. Dowell, T. P. Williamson, A. D. Kraft, J. M. Lee, J. Li, J. A. Johnson, The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal* **2009**, *11*, 497-508.
- [385] J. Li, T. Ichikawa, J. S. Janicki, T. Cui, Targeting the Nrf2 pathway against cardiovascular disease. *Expert Opin Ther Targets* **2009**, *13*, 785-794.
- [386] B. Padmanabhan, K. I. Tong, T. Ohta, Y. Nakamura, M. Scharlock, M. Ohtsuji, M. I. Kang, A. Kobayashi, S. Yokoyama, M. Yamamoto, Structural basis for defects of Keap1 activity provoked by its point mutations in lung cancer. *Mol Cell* **2006**, *21*, 689-700.
- [387] S. Tao, S. Wang, S. J. Moghaddam, A. Ooi, E. Chapman, P. K. Wong, D. D. Zhang, Oncogenic KRAS confers chemoresistance by upregulating NRF2. *Cancer Res* **2014**, *74*, 7430-7441.
- [388] G. M. DeNicola, F. A. Karreth, T. J. Humpton, A. Gopinathan, C. Wei, K. Frese, D. Mangal, K. H. Yu, C. J. Yeo, E. S. Calhoun, F. Scrimieri, J. M. Winter, R. H. Hruban, C. Iacobuzio-Donahue, S. E. Kern, I. A. Blair, D. A. Tuveson, Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* **2011**, *475*, 106-109.
- [389] A. Singh, V. Misra, R. K. Thimmulappa, H. Lee, S. Ames, M. O. Hoque, J. G. Herman, S. B. Baylin, D. Sidransky, E. Gabrielson, M. V. Brock, S. Biswal, Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. *PLoS Med* **2006**, *3*, e420.
- [390] X. J. Wang, Z. Sun, N. F. Villeneuve, S. Zhang, F. Zhao, Y. Li, W. Chen, X. Yi, W. Zheng, G. T. Wondrak, P. K. Wong, D. D. Zhang, Nrf2 enhances resistance of cancer cells to chemotherapeutic drugs, the dark side of Nrf2. *Carcinogenesis* **2008**, *29*, 1235-1243.
- [391] H. Wang, X. Liu, M. Long, Y. Huang, L. Zhang, R. Zhang, Y. Zheng, X. Liao, Y. Wang, Q. Liao, W. Li, Z. Tang, Q. Tong, X. Wang, F. Fang, M. Rojo de la Vega, Q. Ouyang, D. D. Zhang, S. Yu, H. Zheng, NRF2 activation by antioxidant antidiabetic agents accelerates tumor metastasis. *Sci Transl Med* **2016**, *8*, 334ra351.
- [392] H. Satoh, T. Moriguchi, J. Takai, M. Ebina, M. Yamamoto, Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis. *Cancer Res* **2013**, *73*, 4158-4168.
- [393] T. Suzuki, H. Motohashi, M. Yamamoto, Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway. *Trends Pharmacol Sci* **2013**, *34*, 340-346.
- [394] H. Kumar, I. S. Kim, S. V. More, B. W. Kim, D. K. Choi, Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. *Nat Prod Rep* **2014**, *31*, 109-139.

- [395] R. A. Linker, D. H. Lee, S. Ryan, A. M. van Dam, R. Conrad, P. Bista, W. Zeng, X. Hronowsky, A. Buko, S. Chollate, G. Ellrichmann, W. Bruck, K. Dawson, S. Goelz, S. Wiese, R. H. Scannevin, M. Lukashev, R. Gold, Fumaric acid esters exert neuroprotective effects in neuroinflammation via activation of the Nrf2 antioxidant pathway. *Brain* **2011**, *134*, 678-692.
- [396] R. H. Scannevin, S. Chollate, M. Y. Jung, M. Shackett, H. Patel, P. Bista, W. Zeng, S. Ryan, M. Yamamoto, M. Lukashev, K. J. Rhodes, Fumarates promote cytoprotection of central nervous system cells against oxidative stress via the nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 pathway. *J Pharmacol Exp Ther* **2012**, *341*, 274-284.
- [397] R. Gold, L. Kappos, D. L. Arnold, A. Bar-Or, G. Giovannoni, K. Selmaj, C. Tornatore, M. T. Sweetser, M. Yang, S. I. Sheikh, K. T. Dawson, Define Study Investigators, Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* **2012**, *367*, 1098-1107.
- [398] C. Zhuang, Z. Miao, C. Sheng, W. Zhang, Updated research and applications of small molecule inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction: a review. *Curr Med Chem* **2014**, *21*, 1861-1870.
- [399] J. S. Pallesen, K. T. Tran, A. Bach, Non-covalent Small-Molecule Kelch-like ECH-Associated Protein 1-Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Keap1-Nrf2) Inhibitors and Their Potential for Targeting Central Nervous System Diseases. *J Med Chem* **2018**, *61*, 8088-8103.
- [400] K. I. Tong, Y. Katoh, H. Kusunoki, K. Itoh, T. Tanaka, M. Yamamoto, Keap1 recruits Neh2 through binding to ETGE and DLG motifs: characterization of the two-site molecular recognition model. *Mol Cell Biol* **2006**, *26*, 2887-2900.
- [401] A. D. Jain, H. Potteti, B. G. Richardson, L. Kingsley, J. P. Luciano, A. F. Ryuzoji, H. Lee, A. Krunic, A. D. Mesecar, S. P. Reddy, T. W. Moore, Probing the structural requirements of non-electrophilic naphthalene-based Nrf2 activators. *Eur J Med Chem* **2015**, *103*, 252-268.
- [402] T. D. Heightman, J. F. Callahan, E. Chiarparin, J. E. Coyle, C. Griffiths-Jones, A. S. Lakdawala, R. McMenemy, P. N. Mortenson, D. Norton, T. M. Peakman, S. J. Rich, C. Richardson, W. L. Rumsey, Y. Sanchez, G. Saxty, H. M. G. Willems, L. Wolfe, 3rd, A. J. Woolford, Z. Wu, H. Yan, J. K. Kerns, T. G. Davies, Structure-Activity and Structure-Conformation Relationships of Aryl Propionic Acid Inhibitors of the Kelch-like ECH-Associated Protein 1/Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (KEAP1/NRF2) Protein-Protein Interaction. *J Med Chem* **2019**, *62*, 4683-4702.
- [403] D. Marcotte, W. Zeng, J. C. Hus, A. McKenzie, C. Hession, P. Jin, C. Bergeron, A. Lugovskoy, I. Enyedy, H. Cuervo, D. Wang, C. Atmanene, D. Roecklin, M. Vecchi, V. Vivat, J. Kraemer, D. Winkler, V. Hong, J. Chao, M. Lukashev, L. Silvian, Small molecules inhibit the interaction of Nrf2 and the Keap1 Kelch domain through a non-covalent mechanism. *Bioorg Med Chem* **2013**, *21*, 4011-4019.
- [404] T. G. Davies, W. E. Wixted, J. E. Coyle, C. Griffiths-Jones, K. Hearn, R. McMenemy, D. Norton, S. J. Rich, C. Richardson, G. Saxty, H. M. Willems, A. J. Woolford, J. E. Cottom, J. P. Kou, J. G. Yonchuk, H. G. Feldser, Y. Sanchez, J. P. Foley, B. J. Bolognese, G. Logan, P. L. Podolin, H. Yan, J. F. Callahan, T. D. Heightman, J. K. Kerns, Monoacidic Inhibitors of the Kelch-like ECH-Associated Protein 1: Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2

- (KEAP1:NRF2) Protein-Protein Interaction with High Cell Potency Identified by Fragment-Based Discovery. *J Med Chem* **2016**, *59*, 3991-4006.
- [405] Z. Y. Jiang, L. L. Xu, M. C. Lu, Z. Y. Chen, Z. W. Yuan, X. L. Xu, X. K. Guo, X. J. Zhang, H. P. Sun, Q. D. You, Structure-Activity and Structure-Property Relationship and Exploratory in Vivo Evaluation of the Nanomolar Keap1-Nrf2 Protein-Protein Interaction Inhibitor. *J Med Chem* **2015**, *58*, 6410-6421.
- [406] M. C. Lu, S. J. Tan, J. A. Ji, Z. Y. Chen, Z. W. Yuan, Q. D. You, Z. Y. Jiang, Polar Recognition Group Study of Keap1-Nrf2 Protein-Protein Interaction Inhibitors. *ACS Med Chem Lett* **2016**, *7*, 835-840.
- [407] Z. Y. Jiang, M. C. Lu, Q. D. You, Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2 (Nrf2) Inhibition: An Emerging Strategy in Cancer Therapy. *J Med Chem* **2019**, *62*, 3840-3856.
- [408] S. C. Lo, X. Li, M. T. Henzl, L. J. Beamer, M. Hannink, Structure of the Keap1:Nrf2 interface provides mechanistic insight into Nrf2 signaling. *EMBO J* **2006**, *25*, 3605-3617.
- [409] J. H. Zhang, T. D. Chung, K. R. Oldenburg, A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen* **1999**, *4*, 67-73.
- [410] Z. Y. Jiang, M. C. Lu, L. L. Xu, T. T. Yang, M. Y. Xi, X. L. Xu, X. K. Guo, X. J. Zhang, Q. D. You, H. P. Sun, Discovery of potent Keap1-Nrf2 protein-protein interaction inhibitor based on molecular binding determinants analysis. *J Med Chem* **2014**, *57*, 2736-2745.
- [411] X. Huang, Fluorescence polarization competition assay: the range of resolvable inhibitor potency is limited by the affinity of the fluorescent ligand. *J Biomol Screen* **2003**, *8*, 34-38.
- [412] M. H. Roehrl, J. Y. Wang, G. Wagner, A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitors of protein-protein interactions by fluorescence polarization. *Biochemistry* **2004**, *43*, 16056-16066.
- [413] P. Wolle, J. Weisner, M. Keul, I. Landel, J. Lategahn, D. Rauh, RASPELD to Perform High-End Screening in an Academic Environment toward the Development of Cancer Therapeutics. *ChemMedChem* **2018**, *13*, 2065-2072.
- [414] E. S. Child, D. J. Mann, The intricacies of p21 phosphorylation: protein/protein interactions, subcellular localization and stability. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 1313-1319.
- [415] F. Xin, P. Radivojac, Post-translational modifications induce significant yet not extreme changes to protein structure. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 2905-2913.
- [416] D. Seeliger, B. L. de Groot, Conformational transitions upon ligand binding: holo-structure prediction from apo conformations. *PLoS Comput Biol* **2010**, *6*, e1000634.
- [417] M. J. Chalmers, S. A. Busby, B. D. Pascal, G. M. West, P. R. Griffin, Differential hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry analysis of protein-ligand interactions. *Expert Rev Proteomics* **2011**, *8*, 43-59.
- [418] D. A. Liberles, S. A. Teichmann, I. Bahar, U. Bastolla, J. Bloom, E. Bornberg-Bauer, L. J. Colwell, A. P. de Koning, N. V. Dokholyan, J. Echave, A. Elofsson, D. L. Gerloff, R. A. Goldstein, J. A. Grahnen, M. T. Holder, C. Lakner, N. Lartillot, S. C. Lovell, G. Naylor, T. Perica, D. D. Pollock, T. Pupko, L. Regan, A. Roger, N.

- Rubinstein, E. Shakhnovich, K. Sjolander, S. Sunyaev, A. I. Teufel, J. L. Thorne, J. W. Thornton, D. M. Weinreich, S. Whelan, The interface of protein structure, protein biophysics, and molecular evolution. *Protein Sci* **2012**, *21*, 769-785.
- [419] T. E. Wales, J. R. Engen, Hydrogen exchange mass spectrometry for the analysis of protein dynamics. *Mass Spectrom Rev* **2006**, *25*, 158-170.
- [420] R. Ishima, D. A. Torchia, Protein dynamics from NMR. *Nat Struct Biol* **2000**, *7*, 740-743.
- [421] I. R. Kleckner, M. P. Foster, An introduction to NMR-based approaches for measuring protein dynamics. *Biochim Biophys Acta* **2011**, *1814*, 942-968.
- [422] H. Frauenfelder, G. A. Petsko, D. Tsernoglou, Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics. *Nature* **1979**, *280*, 558-563.
- [423] N. E. Chayen, E. Saridakis, Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nat Methods* **2008**, *5*, 147-153.
- [424] V. Tugarinov, V. Kanelis, L. E. Kay, Isotope labeling strategies for the study of high-molecular-weight proteins by solution NMR spectroscopy. *Nat Protoc* **2006**, *1*, 749-754.
- [425] J. R. Simard, S. Klüter, C. Grütter, M. Getlik, M. Rabiller, H. B. Rode, D. Rauh, A new screening assay for allosteric inhibitors of cSrc. *Nat Chem Biol* **2009**, *5*, 394-396.
- [426] J. R. Simard, M. Getlik, C. Grütter, V. Pawar, S. Wulfert, M. Rabiller, D. Rauh, Development of a fluorescent-tagged kinase assay system for the detection and characterization of allosteric kinase inhibitors. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 13286-13296.
- [427] 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. *J Am Chem Soc* **2012**, *134*, 9138-9141.
- [428] R. Schneider, C. Beumer, J. R. Simard, C. Grütter, D. Rauh, Selective detection of allosteric phosphatase inhibitors. *J Am Chem Soc* **2013**, *135*, 6838-6841.
- [429] M. Brustolon, E. Giamello, *Electron Paramagnetic Resonance: A Practitioner's Toolkit*, John Wiley & Sons, Inc. , **2008**.
- [430] G. Hagelueken, D. Abdullin, O. Schiemann, mtsslSuite: Probing Biomolecular Conformation by Spin-Labeling Studies. *Methods Enzymol* **2015**, *563*, 595-622.
- [431] O. Kensch, T. Restle, B. M. Wohrl, R. S. Goody, H. J. Steinhoff, Temperature-dependent equilibrium between the open and closed conformation of the p66 subunit of HIV-1 reverse transcriptase revealed by site-directed spin labelling. *J Mol Biol* **2000**, *301*, 1029-1039.
- [432] Y. M. Huang, W. Chen, M. J. Potter, C. E. Chang, Insights from free-energy calculations: protein conformational equilibrium, driving forces, and ligand-binding modes. *Biophys J* **2012**, *103*, 342-351.
- [433] LLC. Schrödinger, **2019**.
- [434] R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, N. Arnheim, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **1985**, *230*, 1350-1354.

- [435] K. S. Lundberg, D. D. Shoemaker, M. W. Adams, J. M. Short, J. A. Sorge, E. J. Mathur, High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*. *Gene* **1991**, *108*, 1-6.
- [436] J. C. Bauer, D. A. Wright, J. C. Braman, R. S. Geha, *Vol. US00578966A*, Stratagene, US, **1998**.
- [437] H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama, High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **1990**, *96*, 23-28.
- [438] W. Strober, Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol* **2001**, *Appendix 3*, Appendix 3B.
- [439] U. K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
- [440] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel, A. Bairoch, ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. *Nucleic Acids Res* **2003**, *31*, 3784-3788.
- [441] J.D. Ingle Jr., S.R. Crouch, *Spectrochemical analysis*, Old Tappan, NJ (US); Prentice Hall College Book Division, **1988**.
- [442] W. Kabsch, Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Cryst* **1993**, *26*, 795-800.
- [443] R. J. Read, Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2001**, *57*, 1373-1382.
- [444] P. Emsley, K. Cowtan, Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2126-2132.
- [445] A. W. Schüttelkopf, D. M. F. van Aalten, PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D* **2004**, *60*, 1355-1363.
- [446] P. V. Afonine, R. W. Grosse-Kunstleve, N. Echols, J. J. Headd, N. W. Moriarty, M. Mustyakimov, T. C. Terwilliger, A. Urzhumtsev, P. H. Zwart, P. D. Adams, Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallographica Section D* **2012**, *68*, 352-367.
- [447] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkoczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L.-W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, P. H. Zwart, PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D* **2010**, *66*, 213-221.
- [448] R.P. Joosten, F. Long, G. N. Murshudov, A. Perrakis, The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCrj* **2014**, *1*, 213-220.
- [449] X. Liu, E. Krawczyk, F. A. Supryniewicz, N. Palechor-Ceron, H. Yuan, A. Dakic, V. Simic, Y. L. Zheng, P. Sripadhan, C. Chen, J. Lu, T. W. Hou, S. Choudhury, B. Kallakury, D. G. Tang, T. Darling, R. Thangapazham, O. Timofeeva, A. Dritschilo, S. H. Randell, C. Albanese, S. Agarwal, R. Schlegel, Conditional reprogramming and long-term expansion of normal and tumor cells from human biospecimens. *Nat Protoc* **2017**, *12*, 439-451.
- [450] Z. Zhang, A. G. Marshall, A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *J Am Soc Mass Spectrom* **1998**, *9*, 225-233.

- [451] A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J. V. Olsen, M. Mann, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **2006**, *1*, 2856-2860.
- [452] Y. Zhang, B. R. Fonslow, B. Shan, M. C. Baek, J. R. Yates, 3rd, Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chem Rev* **2013**, *113*, 2343-2394.
- [453] J. Cox, M. Mann, MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 1367-1372.
- [454] M. Mann, P. Hojrup, P. Roepstorff, Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol Mass Spectrom* **1993**, *22*, 338-345.
- [455] W. J. Henzel, T. M. Billeci, J. T. Stults, S. C. Wong, C. Grimley, C. Watanabe, Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**, *90*, 5011-5015.
- [456] Y. Jia, C. M. Quinn, A. I. Gagnon, R. Talanian, Homogeneous time-resolved fluorescence and its applications for kinase assays in drug discovery. *Anal Biochem* **2006**, *356*, 273-281.
- [457] F. Degorce, A. Card, S. Soh, E. Trinquet, G. P. Knapik, B. Xie, HTRF: A technology tailored for drug discovery - a review of theoretical aspects and recent applications. *Curr Chem Genomics* **2009**, *3*, 22-32.
- [458] C. Drexler, HTRF® KinEASE™: a new solution for screening serine-threonine kinases. *Nature Methods* **2006**, *3*, 487.
- [459] W. F. Waas, H. H. Lo, K. N. Dalby, The kinetic mechanism of the dual phosphorylation of the ATF2 transcription factor by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase alpha. Implications for signal/response profiles of MAP kinase pathways. *J Biol Chem* **2001**, *276*, 5676-5684.
- [460] P. V. LoGrasso, B. Frantz, A. M. Rolando, S. J. O'Keefe, J. D. Hermes, E. A. O'Neill, Kinetic mechanism for p38 MAP kinase. *Biochemistry* **1997**, *36*, 10422-10427.
- [461] Y. Zhang, M. Huo, J. Zhou, S. Xie, PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed* **2010**, *99*, 306-314.
- [462] P. Roser, J. Weisner, J. R. Simard, D. Rauh, M. Drescher, Direct monitoring of the conformational equilibria of the activation loop in the mitogen-activated protein kinase p38alpha. *Chem Commun (Camb)* **2018**, *54*, 12057-12060.

10 ANHANG

10.1 Proteinsequenzen

10.1.1 Akt1

Proteinname: RAC-alpha Serin/Threonin-spezifische Proteinkinase

Gencode: AKT1

Organismus: *Homo sapiens*

UniProtKB: P31749

Konstruktname: His₆-Akt1^{wt} (Akt1^{wt})

Besonderheiten: N-terminaler His₆-Tag, TEV-Schnittstelle, Aminosäuren 2-480

MW_{calc}: 58998 Da (mit His₆-Tag) / 55555 Da (ohne His₆-Tag)

ϵ : 68300 M⁻¹ cm⁻¹ (mit His₆-Tag) / 65320 M⁻¹ cm⁻¹ (mit His₆-Tag)

MGSTSHHHHH HDHITSLYKK AGFENLYFQS DVAIVKEGWL HKRGEYIKTW RPRYFLLKND
GTFIGYKERP QDVDQREAPL NNFSVAQCQL MKTERPRPNT FIIRCLQWTT VIERTFHVET
PEEREWTTA IQTVADGLKK QEEEEEMDFRS GSPSDNSGAE EMEVSLAKPK HRVMTNEFEY
LKLLGKGTFG KVILVKEKAT GRYYAMKILK KEVIVAKDEV AHTLTENRVL QNSRHPFLTA
LKYSFQTHDR LCFVMEYANG GELFFHLSRE RVFSEDRARF YGAEIVSALD YLHSEKNVVY
RDLKLENLML DKDGHKIDT FGLCKEGIKD GATMKTFCGT PEYLAPEVLE DNDYGRAVDW
WGLGVVMYEM MCGRLPFYNQ DHEKLFELIL MEEIRFPRTL GPEAKSLLSG LLKKDPKQRL
GGGSEDAKEI MQHRFFAGIV WQHVEKCLS PPFKPQVTSE TDTRYFDEEF TAQMITITPP
DQDDSMECVD SERRPHFPQF SYSASGTA*

Konstruktname: His₆-Akt1^{xtal} (Akt1^{xtal})

Besonderheiten: N-terminaler His₆-Tag, TEV-Schnittstelle, Aminosäuren 2-446,

Mutationen: E114-116A

MW_{calc}: 55113 Da (mit His₆-Tag) / 51670 Da (ohne His₆-Tag)

ϵ : 66810 M⁻¹ cm⁻¹ (mit His₆-Tag) / 63830 M⁻¹ cm⁻¹ (ohne His₆-Tag)

MGSTSHHHHH HDHITSLYKK AGFENLYFQG SDVAIVKEGW LHKRGEYIKT WRPRYFLLKN
DGTFIGYKER PQDVDQREAP LNNFSVAQCQ LMKTERPRPN TFIIRCLQWT TVIERTFHVE
TPEEREWTT AIQTVADGLK QQAAAEMDFR SGSPSDNSGA EEMEVSLAKP KHRVMTNEFE
YLKLLGKGTG KKVILVKEKA TGRYYAMKIL KKEVIVAKDE VAHTLTENRV LQNSRHPFLT
ALKYSFQTHD RLCFVMEYAN GGELFFHLSR ERVSEDRAR FYGAEIVSAL DYLHSEKNVV
YRDLKLENLM LDKDGHKIDT DFGLCKEGIK DGATMKTFCG TPEYLAPEVL EDNDYGRAVD
WWGLGVVMEY MMCGRLPFYN QDHEKLFELI LMEEIRFPRT LGPEAKSLLS GLLKKDPKQR
LGGGSEDAKE IMQHRFFAGI VWQHVEKKL SPPFKPQVTS ETDTRYFDEE FTAQM*

10.1.2 Kelch

Proteinname: Kelch-like ECH-associated protein 1

Genname: KEAP1

Organismus: *Homo sapiens*

UniProtKB: Q14145

Konstruktname: His₆-Kelch^{wt} (Kelch^{wt})

Besonderheiten: N-terminaler His₆-Tag, Thrombin-Schnittstelle, Aminosäuren
321-609

MW_{calc}: 33785 Da (mit His₆-Tag) / 33653 Da (ohne Start-Met)

ϵ : 58330 M⁻¹ cm⁻¹ (mit His₆-Tag) / 58330 M⁻¹ cm⁻¹ (ohne Start-Met)

MGSSHHHHHHH SGLVPRGSH APKVGRLIYT AGGYFRQSL S YLEAYNPSDG TWLRLADLQV
PRSGLAGCVV GLLLYAVGGR NNSPDGNTDS SALDCYNPMT NQWSPCAPMS VPRNRIGVGV
IDGHIYAVGG SHGCIHHNSV ERYEPERDEW HLVAPMLTRR IGVGVAVLNR LLYAVGGFDG
TNRLNSAECY YPERNEWMI TAMNTIRSGA GVCVLHNCIY AAGGYDGQDQ LNSVERYDVE
TETWTFVAPM KHRRSALGIT VHQGRIYVLG GYDGHTFLDS VECYDPD TDT WSEVTRMTSG
RSGVGVAVT*

10.1.3 p38 α

Proteinname: Mitogen-aktivierte Proteinkinase 14 / MAP Kinase p38 alpha

Genname: MAPK14

Organismus: *Homo sapiens*

UniProtKB: Q16539

Konstruktnamen: His₆-p38 α^{wt} (p38 α^{wt})

Besonderheiten: N-terminaler His₆-Tag, Thrombin-Schnittstelle, Aminosäuren 2-360

MW_{calc}: 44438 Da (mit His₆-Tag) / 41443 Da (ohne His₆-Tag)

ϵ : 51340 M⁻¹ cm⁻¹ (mit His₆-Tag) / 49850 M⁻¹ cm⁻¹ (ohne His₆-Tag)

MGSSHHHHHH SFITSLYKKA GFLVPRGSHS QERPTFYRQE LNKTIWEVPE RYQNLSPVGS
 GAYGSVCAAF DTKTGLRVAV KKLSPRFQSI IHAKRTYREL RLLKHKHENV VIGLLDVFTP
 ARSLEEFNDV YLVTHLMGAD LNNIVKQKLT TDDHVQFLIY QILRGLKYIH SADIHRDLK
 PSNLAVNEDC ELKILDFGLA RHTDDEMTGY VATRWYRAPE IMLNWMHYNQ TVDIWSVGC
 MAELLTGRTL FPGTDHIDQL KLILRLVGTP GAELLKKISS ESARNYIQSL QMPKMNANFAN
 VFIGANPLAV DLLEKMLVLD SDKRITAAQA LAHAYFAQYH DPDEPVADP YDQSFESRDL
 LIDEWKSPLY DEVISFVPPP LDQEEMES*

Konstruktnamen: His₆-p38 α^{SL} (p38 α^{SL})

Besonderheiten: N-terminaler His₆-Tag, PreScission-Schnittstelle, Aminosäuren 2-360, Mutationen: C119S/C162S/F327L/A172C

MW_{calc}: 43171 Da (mit His₆-Tag) / 41185 Da (ohne His₆-Tag)

ϵ : 49850 M⁻¹ cm⁻¹ (mit His₆-Tag) / 49850 M⁻¹ cm⁻¹ (ohne His₆-Tag)

MAHHHHHHSS GLEVLFGQSQ ERPTFYRQEL NKTWEVPER YQNLSPVGS AYGSVCAAFD
 TKTGLRVAVK KLSRPFQSI IHAKRTYREL RLLKHKHENV IGLLDVFTPA RSLEEFNDVY
 LVTHLMGADL NNIVKSQKLT DDHVQFLIYQ ILRGLKYIHS ADIHRDLKP SNLAVNEDSE
 LKILDFGLCR HTDDEMTGYV ATRWYRAPEI MLNWMHYNQT VDIWSVGCIM AELLTGRTLF
 PGTDHIDQLK LILRLVGTPG AELLKKISSE SARNYIQSLT QMPKMNANFANV FIGANPLAVD
 LLEKMLVLDL DKRITAAQAL AHAYFAQYHD PDDEPVADPY DQSLESRDLL IDEWKSPLYD
 EVISFVPPPL DQEEMES*

10.2 Massenspektren

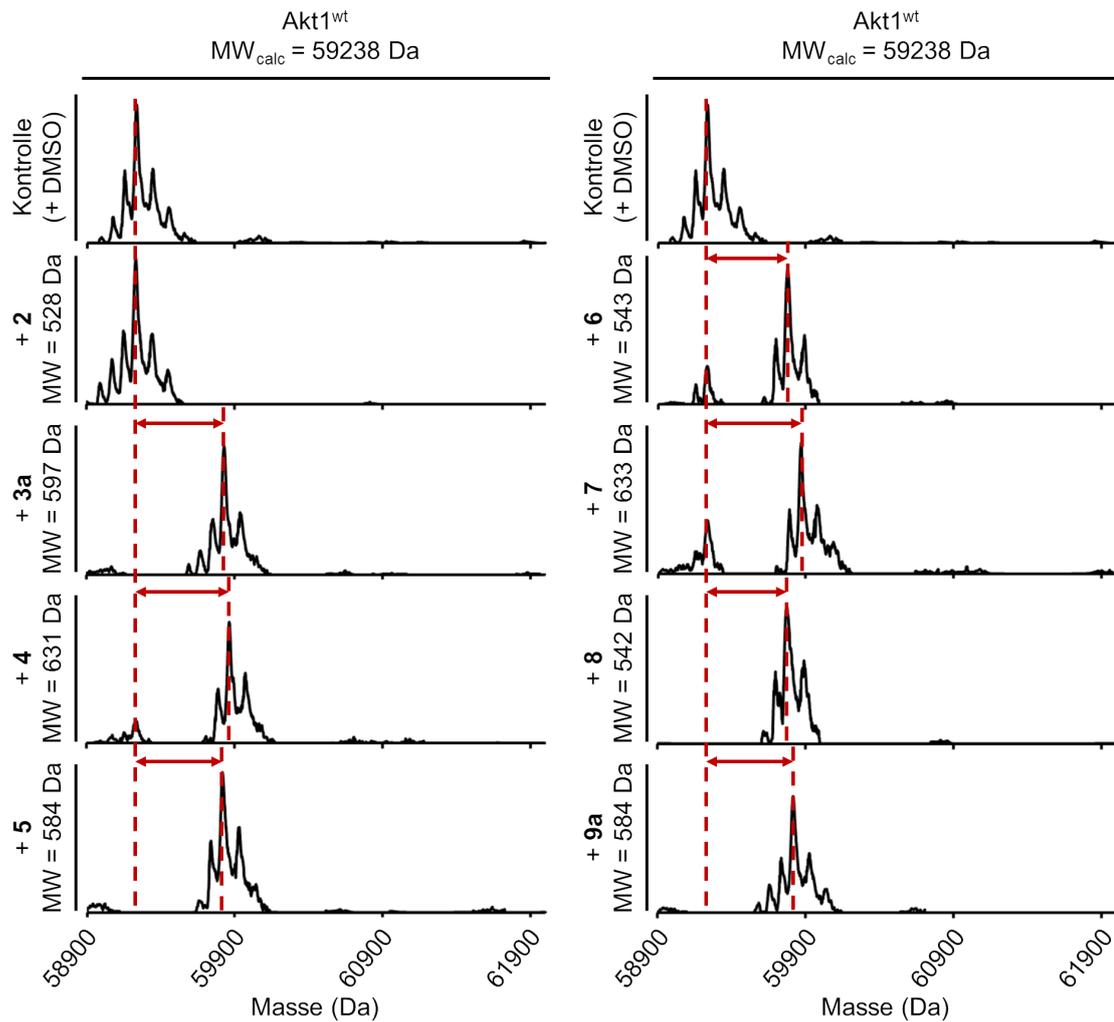


Abbildung 57. Dekonvolutierte ESI-Massenspektren von Akt1^{wt} nach Vorinkubation mit DMSO (Kontrolle) bzw. den synthetisierten Modellverbindungen **2**, **3a**, **4-8**, **9a**. Die Spektren sind identisch zu denen aus Abbildung 17, decken auf der Abszisse aber einen größeren Massenbereich ab. Die *warhead*-dekorierten Modellverbindungen induzieren ein Monolabeling von Akt1^{wt}, was für eine spezifische Interaktion und Bindungsbildung spricht.

10.3 MS/MS-Analytik

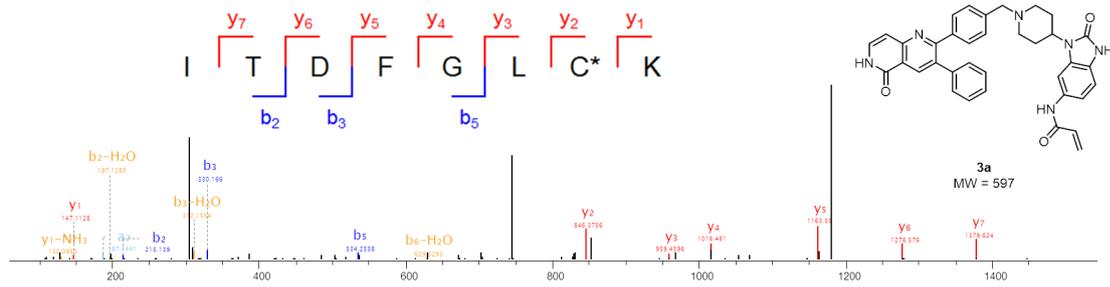


Abbildung 58. ESI-MS/MS-Analytik von Akt1^{wt} nach Inkubation mit Verbindung 3a und tryptischem In-Gel-Verdau, gezeigt ist das Fragmentationenspektrum für das tryptische Peptid Ile290-Lys297.

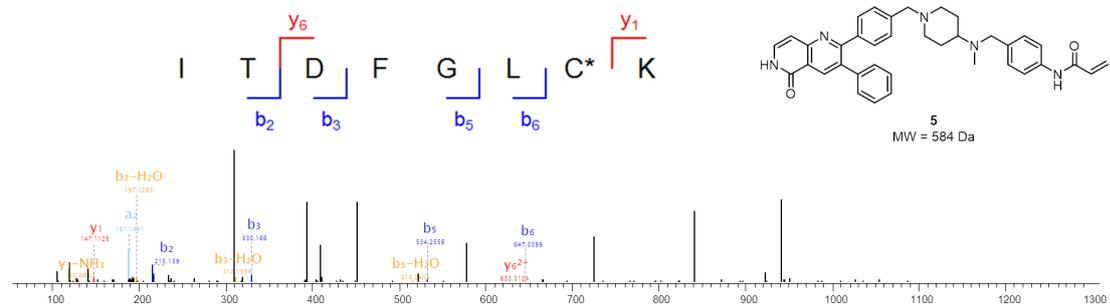


Abbildung 59. ESI-MS/MS-Analytik von Akt1^{wt} nach Inkubation mit Verbindung 5 und tryptischem In-Gel-Verdau, gezeigt ist das Fragmentationenspektrum für das tryptische Peptid Ile290-Lys297.

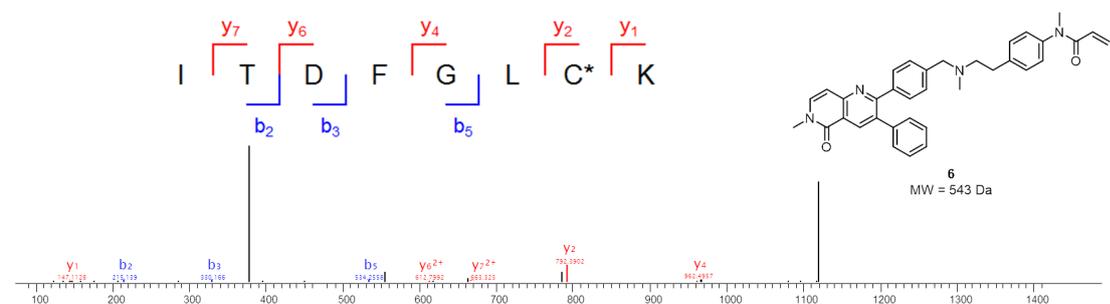


Abbildung 60. ESI-MS/MS-Analytik von Akt1^{wt} nach Inkubation mit Verbindung 6 und tryptischem In-Gel-Verdau, gezeigt ist das Fragmentationenspektrum für das tryptische Peptid Ile290-Lys297.

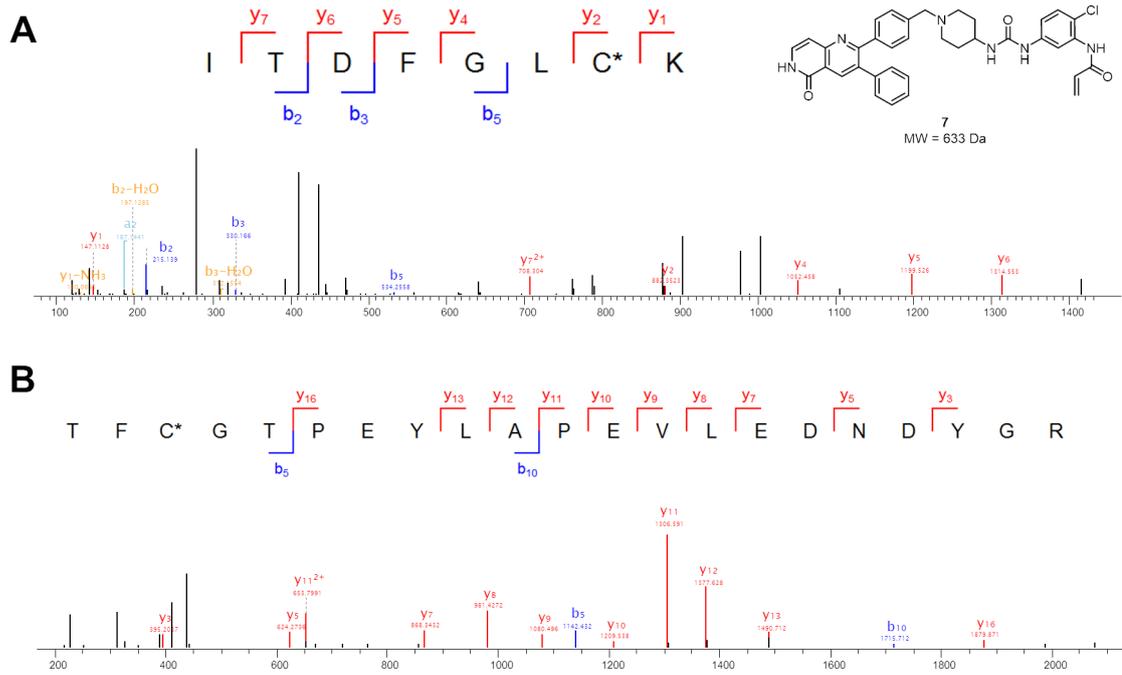


Abbildung 61. ESI-MS/MS-Analytik von Akt1^{wt} nach Inkubation mit Verbindung 7 und tryptischem In-Gel-Verdau, gezeigt sind die Fragmentationenspektren für die tryptischen Peptide Ile290-Lys297 und Thr308-Arg328, die Cys296 (A) bzw. Cys310 (B) enthalten

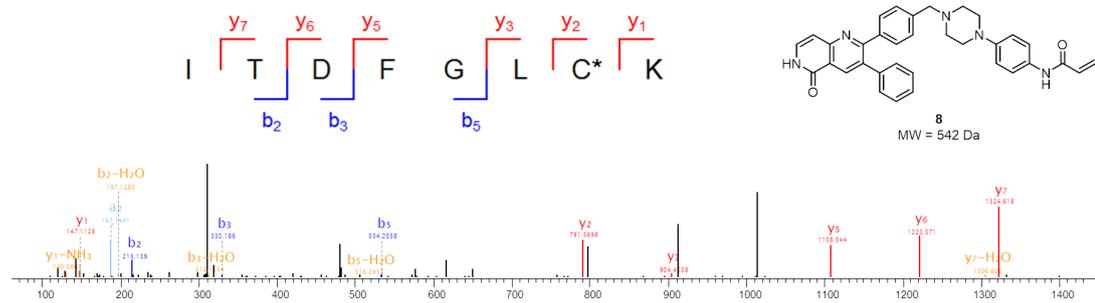


Abbildung 62. ESI-MS/MS-Analytik von Akt1^{wt} nach Inkubation mit Verbindung 8 und tryptischem In-Gel-Verdau, gezeigt ist das Fragmentationenspektrum für das tryptische Peptid Ile290-Lys297.

10.4 Proteinanalytik

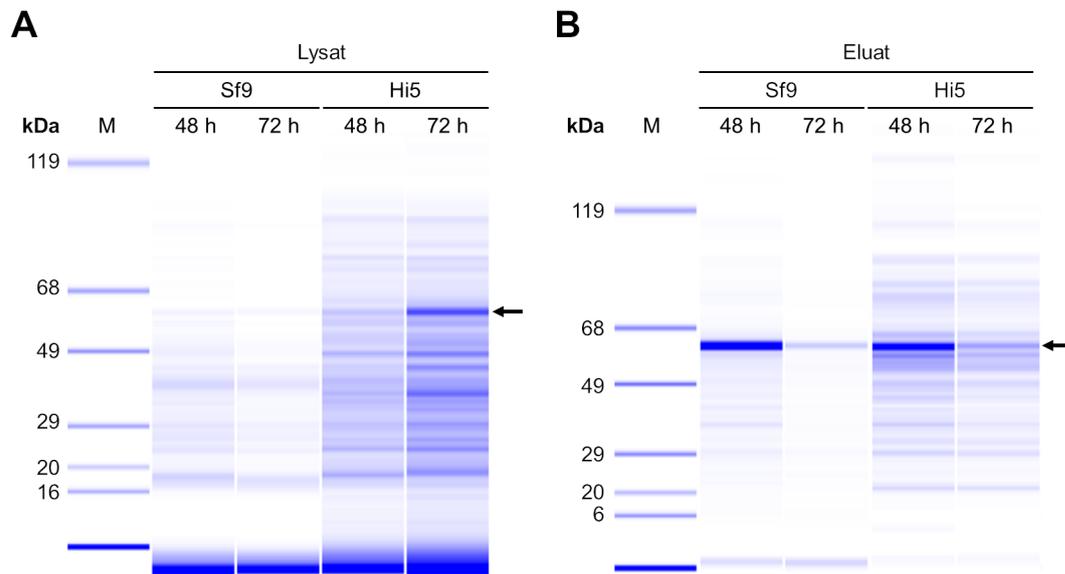


Abbildung 63. Testexpression von Akt1^{xtal} in Sf9- und Hi5-Insektenzellen und anschließende Caliper LabChip GX-Analyse des Gesamtzelllysats (**A**) und der löslichen Fraktion nach Bindungsassay (**B**). Der schwarze Pfeil markiert die Laufhöhe des vermeintlichen Zielproteins ($MW_{\text{calc}} = 55113$ Da). M: Marker.

10.5 Analyse des Bindungsmodus

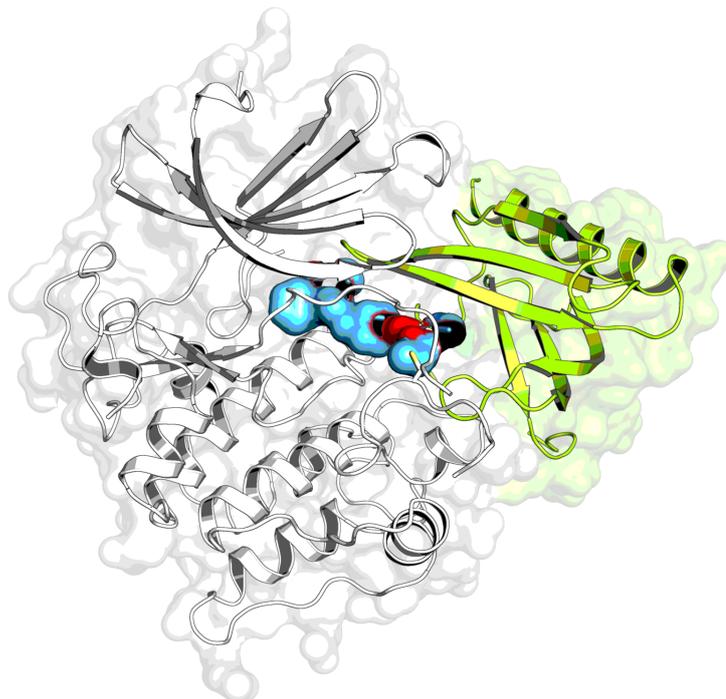


Abbildung 64. Röntgenkristallstruktur von Akt1^{xtal} im Komplex mit Verbindung 7.

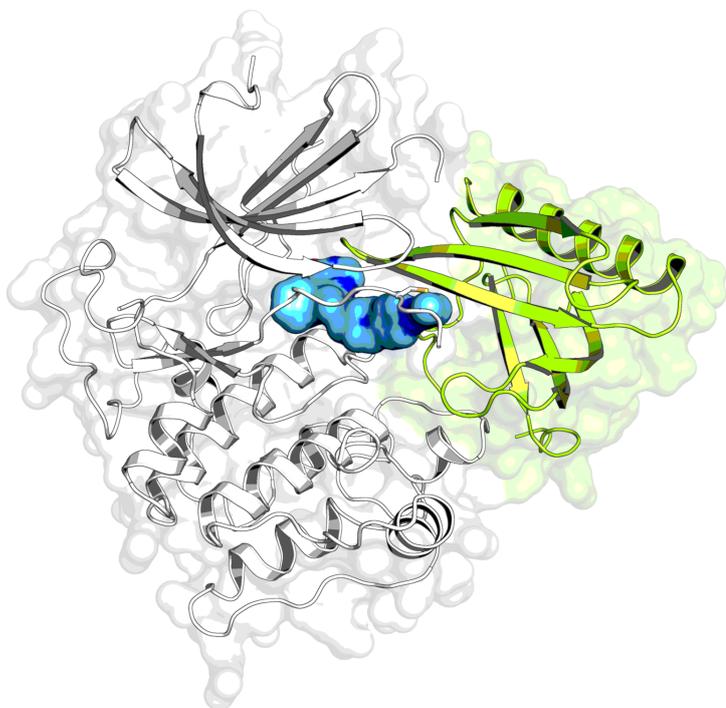


Abbildung 65. Röntgenkristallstruktur von Akt1^{xtal} im Komplex mit Verbindung 8.

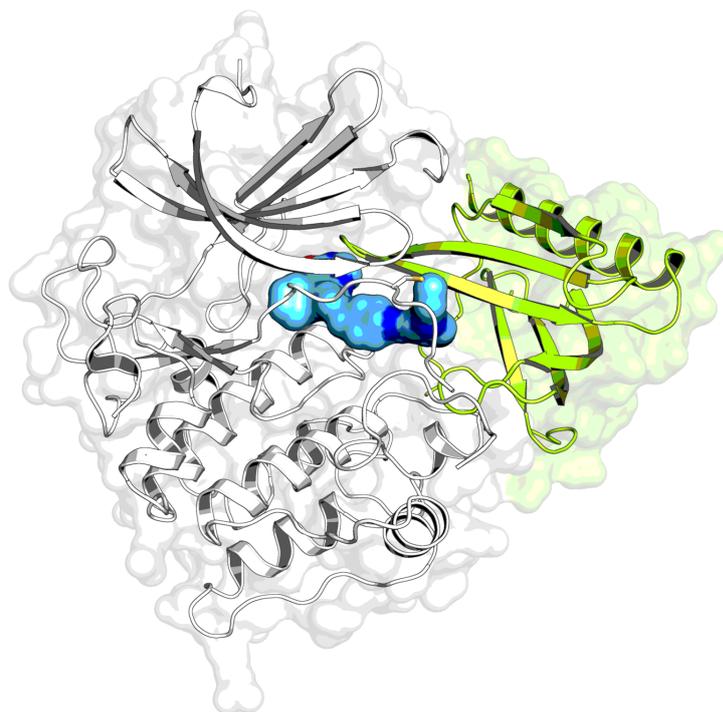


Abbildung 66. Röntgenkristallstruktur von Akt1^{xtal} im Komplex mit Verbindung 9a.

10.6 Energieprofil von **8**

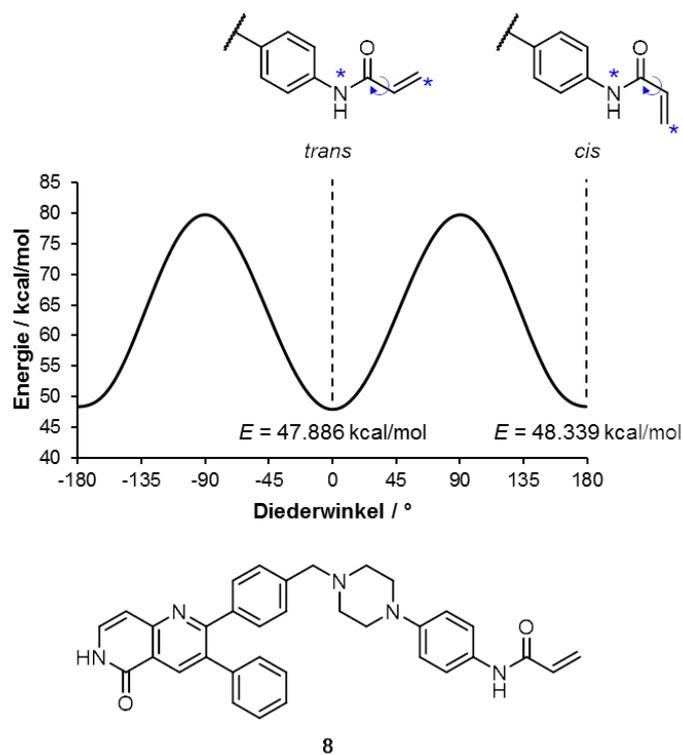
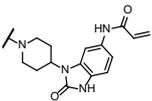
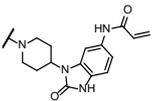
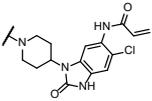
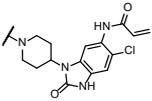
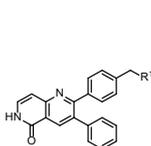
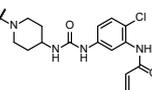
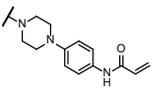
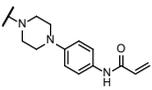
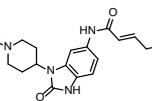
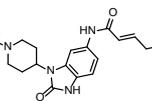
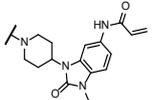
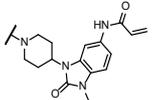
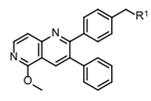
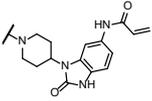
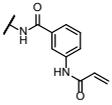
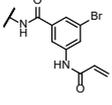
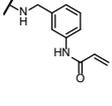
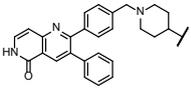
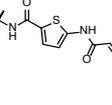
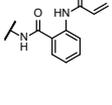
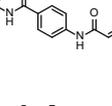
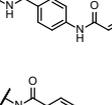
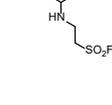


Abbildung 67. Konformationsenergie-Profil für die Michael-Akzeptor-Gruppe in **8**. Die *trans*-Konformation (hinsichtlich der N- und C β -Atome, blaue Sterne) ist gegenüber der *cis*-Konformation energetisch bevorzugt. Das Diagramm wurde erstellt mit Chem3D® (PerkinElmer).

10.7 Biochemische und kinetische Evaluierung auf Akt1^{E17K}

Tabelle 28. Übersicht der Ergebnisse der biochemischen und kinetischen Evaluierung der erweiterten Substanzbibliothek auf Akt1^{E17K}. Die Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3).

Verb.	scaffold	R ¹	Akt1 ^{E17K}			
			IC ₅₀ / nM	K _i / nM	k _{inact} / min ⁻¹	k _{inact} /K _i / μM ⁻¹ s ⁻¹
3a ^a			117 \pm 46	127 \pm 47	0.112 \pm 0.021	0.017 \pm 0.007
4			152 \pm 70	139 \pm 13	0.105 \pm 0.012	0.013 \pm 0.002
7			1600 \pm 450	n.b.	n.b.	n.b.
8			>10000	n.b.	n.b.	n.b.
10			1400 \pm 520	n.b.	n.b.	n.b.
11			950 \pm 100	n.b.	n.b.	n.b.
13			1700 \pm 320	n.b.	n.b.	n.b.

Verb.	scaffold	R ¹	Akt1 ^{wt}			
			IC ₅₀ / nM	K _i / nM	k _{inact} / min ⁻¹	k _{inact} /K _i / μM ⁻¹ s ⁻¹
9a ^a			840 ± 230	1700 ± 380	0.145 ± 0.030	0.001 ± 0.001
14			720 ± 430	500 ± 170	0.075 ± 0.042	0.002 ± 0.001
15			>10000	n.b.	n.b.	n.b.
16			990 ± 350	2200 ± 420	0.133 ± 0.021	0.001 ± 0.001
17			680 ± 260	1200 ± 120	0.168 ± 0.030	0.002 ± 0.001
18			>10000	n.b.	n.b.	n.b.
19			6200 ± 1500	n.b.	n.b.	n.b.
20 ^c			6000 ^a	n.b.	n.b.	n.b.
MK			4800 ± 1800			
Ipa			1.5 ± 0.7			

^a Einfachmessung; n.b.: nicht bestimmt; MK: MK-2206; Ipa: Ipatasertib; die Verbindungen 5, 6 und 12 wurden nicht auf der Mutante Akt1^{E17K} vermessen.

10.8 Selektivitätsprofilierung

Tabelle 29. Übersicht der profilierten Proteinkinasen.

Kinase	PH	AGC	Cys296/Cys310	Kinase	PH	AGC	Cys296/Cys310
ABL1				MET (cMet)			
ACVR1B (ALK4)				MKNK1 (MNK1)			Cys310
AKT1 (PKB alpha)	x	x	Cys296/Cys310	NEK1			
AKT2 (PKB beta)	x	x	Cys296/Cys310	NTRK2 (TRKB)			
AKT3 (PKB gamma)	x	x	Cys296/Cys310	PAK1			Cys296
ALK				PAK4			Cys296
AMPK A1/B1/G1			Cys310	PASK			Cys310
AMPK A2/B1/G1			Cys310	PDGFRA			
AURKA (Aurora A)			Cys310	PDK1 Direct	x		
AURKB (Aurora B)			Cys310	PIM1			
BMX	x			PKN1 (PRK1)		x	Cys296/Cys310
BRSK1 (SAD1)			Cys310	PLK1			Cys310
BTK	x			PRKACA (PKA)		x	
CAMK1D			Cys310	PRKCA (PKC alpha)		x	Cys296/Cys310
CAMK4 (CaMKIV)			Cys310	PRKCB1 (PKC beta I)		x	Cys296/Cys310
CDC42 BPA (MRCKA)	x ^a		Cys296	PRKCB2 (PKC beta II)		x	Cys296/Cys310
CDC42 BPB (MRCKB)	x ^a		Cys296	PRKCD (PKC delta)		x	Cys296/Cys310
CDK1/cyclin B				PRKCE (PKC epsilon)		x	Cys296/Cys310
CDK2/cyclin A				PRKCG (PKC gamma)		x	Cys296/Cys310
CHEK1 (CHK1)			Cys310	PRKCH (PKC eta)		x	Cys296/Cys310
CHEK2 (CHK2)			Cys310	PRKCI (PKC iota)		x	Cys296/Cys310
DCAMKL2 (DCK2)			Cys310	PRKCN (PKD3)	x		
DNA-PK				PRKCC (PKC theta)		x	Cys296/Cys310
EGFR (ErbB1)				PRKCZ (PKC zeta)		x	Cys296/Cys310
EPHA2				PRKD1 (PKC mu)	x	x	
EPHB4				PRKD2 (PKD2)	x		
ERBB2 (HER2)				PRKG1		x	
FGFR1				PRKG2 (PKG2)		x	
FLT3				PRKX			Cys310
FRAP1 (mTOR)				PTK2 (FAK)			
GRK4		x		RET			
GRK5		x		ROCK1	x ^a		Cys296
GRK6		x		ROCK2	x ^a		Cys296
GRK7		x		RPS6KA1 (RSK1)		x	Cys310
GSK3B (GSK3 beta)				RPS6KA2 (RSK3)		x	Cys310
IGF1R				RPS6KA3 (RSK2)		x	Cys310
ITK	x			RPS6KA4 (MSK2)		x	Cys310
JAK2				RPS6KA5 (MSK1)		x	Cys310
JAK3				RPS6KA6 (RSK4)		x	Cys310
KIT				RPS6KB1 (p70S6K)			Cys296/Cys310
LCK				SGK (SGK1)			Cys296/Cys310
MAP4K5 (KHS1)				SGK2			Cys296/Cys310
MAPK1 (ERK2)				SGKL (SGK3)			Cys296/Cys310
MAPK14 (p38 alpha)				SRC			
MAPK3 (ERK1)				STK3 (MST2)			
MAPKAPK2			Cys310	STK4 (MST1)			
MAPKAPK3			Cys310	SYK			
MARK1 (MARK)			Cys310	TBK1			
MARK2			Cys310	TEK (Tie2)		x ^a	
MELK			Cys296/Cys310	TXK			

^aDas Wildtyp-Protein enthält eine PH-Domäne, verwendet wurde jedoch ein Konstrukt welches diese nicht enthält. PH: enthält PH-Domäne; AGC: Mitglied der AGC-Familie; Cys296/Cys310: enthält Cysteine analog zu Cys296 bzw. Cys310 in Akt. Die Angaben zu PH-Domäne und Zugehörigkeit zur AGC-Familie wurden der uniprot-Datenbank entnommen (www.uniprot.com). Die Identifikation der analogen Cysteine erfolgte anhand eines Arbeitsgruppen-internen Sequenzalignments aller humanen Kinasen.

Tabelle 30. Ergebnisse der Kinaseprofilierung für Verbindung **3a**.

Kinase	% Inhibition @ 1 μ M	Kinase	% Inhibition @ 1 μ M
ABL1	2	MET (cMet)	-2
ACVR1B (ALK4)	-13	MKNK1 (MNK1)	8
AKT1 (PKB alpha)	98	NEK1	8
AKT2 (PKB beta)	96	NTRK2 (TRKB)	-15
AKT3 (PKB gamma)	83	PAK1	-9
ALK	-2	PAK4	7
AMPK A1/B1/G1	14	PASK	15
AMPK A2/B1/G1	20	PDGFRA	-12
AURKA (Aurora A)	15	PDK1 Direct	-4
AURKB (Aurora B)	7	PIM1	0
BMX	7	PKN1 (PRK1)	-4
BRSK1 (SAD1)	7	PLK1	-3
BTK	6	PRKACA (PKA)	-3
CAMK1D	9	PRKCA (PKC alpha)	10
CAMK4 (CaMKIV)	12	PRKCB1 (PKC beta I)	-7
CDC42 BPA (MRCKA)	2	PRKCB2 (PKC beta II)	9
CDC42 BPB (MRCKB)	1	PRKCD (PKC delta)	-8
CDK1/cyclin B	3	PRKCE (PKC epsilon)	-1
CDK2/cyclin A	1	PRKCG (PKC gamma)	17
CHEK1 (CHK1)	-4	PRKCH (PKC eta)	-2
CHEK2 (CHK2)	4	PRKCI (PKC iota)	6
DCAMKL2 (DCK2)	-2	PRKCN (PKD3)	14
DNA-PK	0	PRKCQ (PKC theta)	35
EGFR (ErbB1)	2	PRKCZ (PKC zeta)	-1
EPHA2	-12	PRKD1 (PKC mu)	10
EPHB4	7	PRKD2 (PKD2)	5
ERBB2 (HER2)	-3	PRKG1	5
FGFR1	25	PRKG2 (PKG2)	2
FLT3	17	PRKX	3
FRAP1 (mTOR)	-9	PTK2 (FAK)	4
GRK4	8	RET	7
GRK5	-2	ROCK1	9
GRK6	2	ROCK2	-3
GRK7	-6	RPS6KA1 (RSK1)	12
GSK3B (GSK3 beta)	20	RPS6KA2 (RSK3)	14
IGF1R	-4	RPS6KA3 (RSK2)	21
ITK	-1	RPS6KA4 (MSK2)	8
JAK2	-8	RPS6KA5 (MSK1)	2
JAK3	-11	RPS6KA6 (RSK4)	14
KIT	8	RPS6KB1 (p70S6K)	2
LCK	8	SGK (SGK1)	20
MAP4K5 (KHS1)	37	SGK2	6
MAPK1 (ERK2)	3	SGKL (SGK3)	2
MAPK14 (p38 alpha)	-1	SRC	10
MAPK3 (ERK1)	-3	STK3 (MST2)	1
MAPKAPK2	30	STK4 (MST1)	-1
MAPKAPK3	17	SYK	-3
MARK1 (MARK)	-7	TBK1	6
MARK2	-2	TEK (Tie2)	13
MELK	30	TXK	8

10.9 Zellzahloptimierung

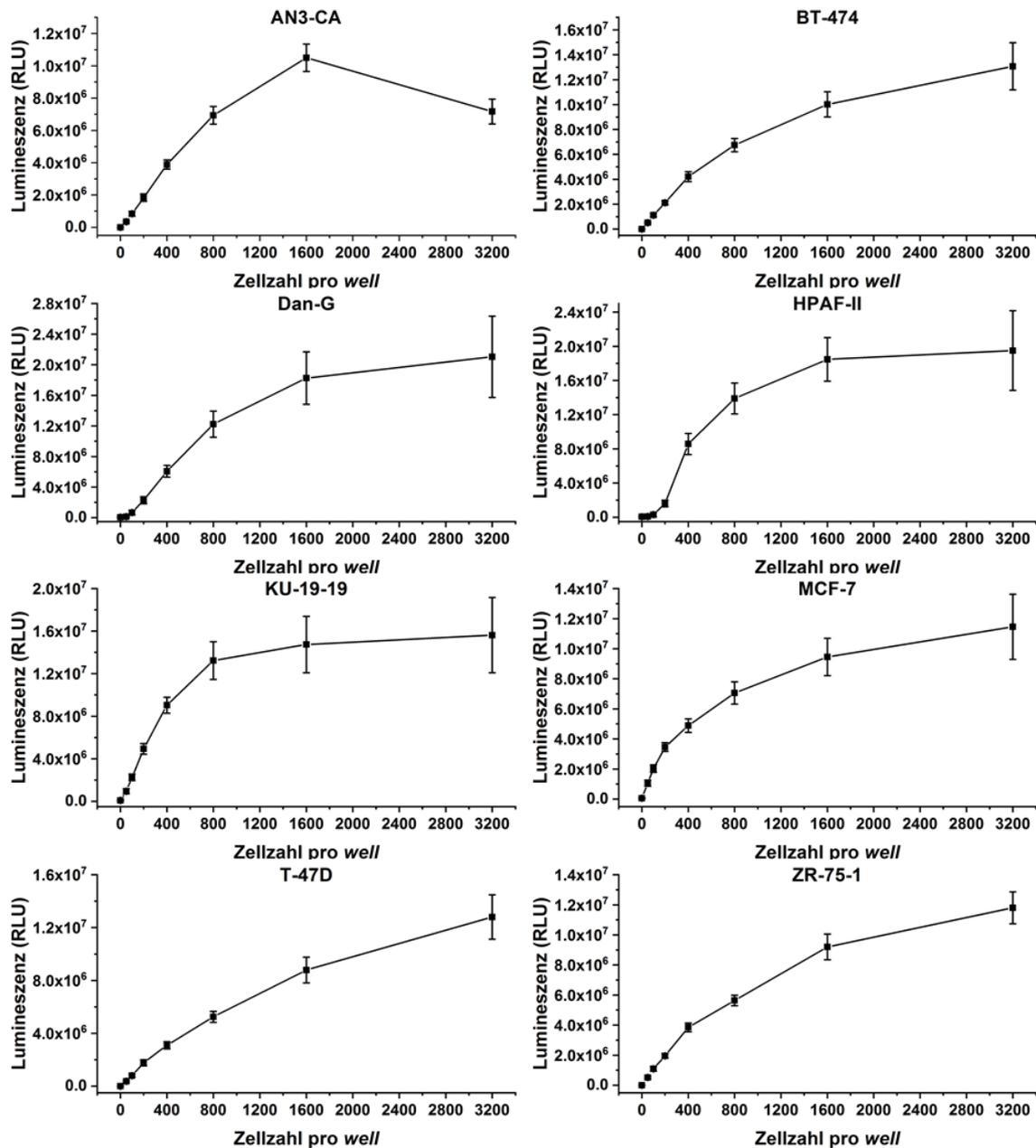


Abbildung 68. Grafische Auftrugungen der im CellTiter-Glo®-Assay detektierten Lumineszenzen gegen die verwendete Anzahl an Zellen pro well zur Bestimmung der optimalen Zellzahlen (AN3-CA: 800 Zellen pro well; BT-474: 400 Zellen pro well; Dan-G: 400 Zellen pro well; HPAF-II: 400 Zellen pro well; KU-19-19: 400 Zellen pro well; MCF-7: 200 Zellen pro well; T-47D: 800 Zellen pro well; ZR-75-1: 400 Zellen pro well).

10.10 Löslichkeitsstudien

Tabelle 31. Löslichkeitsstudien und Formulierungsfindung für Verbindung **3a**.

Formulierung	Konzentration / mg/mL (mM)	Status
DMSO/PEG200 (10:90)	2 (3.35)	löslich
DMSO/PEG200 (20:80)	5 (8.38)	löslich
DMSO/PEG400 (10:90)	2 (3.35)	löslich
DMSO/PBS (20:80)	2 (3.35)	unlöslich
DMSO/PBS/PEG200 (10:40:50)	2 (3.35)	unlöslich
PBS/PEG200 (60:40)	2 (3.35)	löslich
β -Cyclodextrin (30 % in H ₂ O)	2 (3.35)	unlöslich
Cremophor® EL/EtOH (50:50) (30 % in H ₂ O)	2 (3.35)	unlöslich
Solutol® HS 15 (20 % in H ₂ O)	2 (3.35)	unlöslich
Solutol® HS 15/DMSO (70:30) (30 % in H ₂ O)	2 (3.35)	unlöslich

PEG200: Polyethylenglycol 200; PEG400: Polyethylenglycol 400; Cremophor® EL: Polyethylenglycol (35)-Glycerolrizinoleat; Solutol® HS 15: Polyethylenglycol (15)-12-Hydroxystearat

10.11 Hit-Strukturen

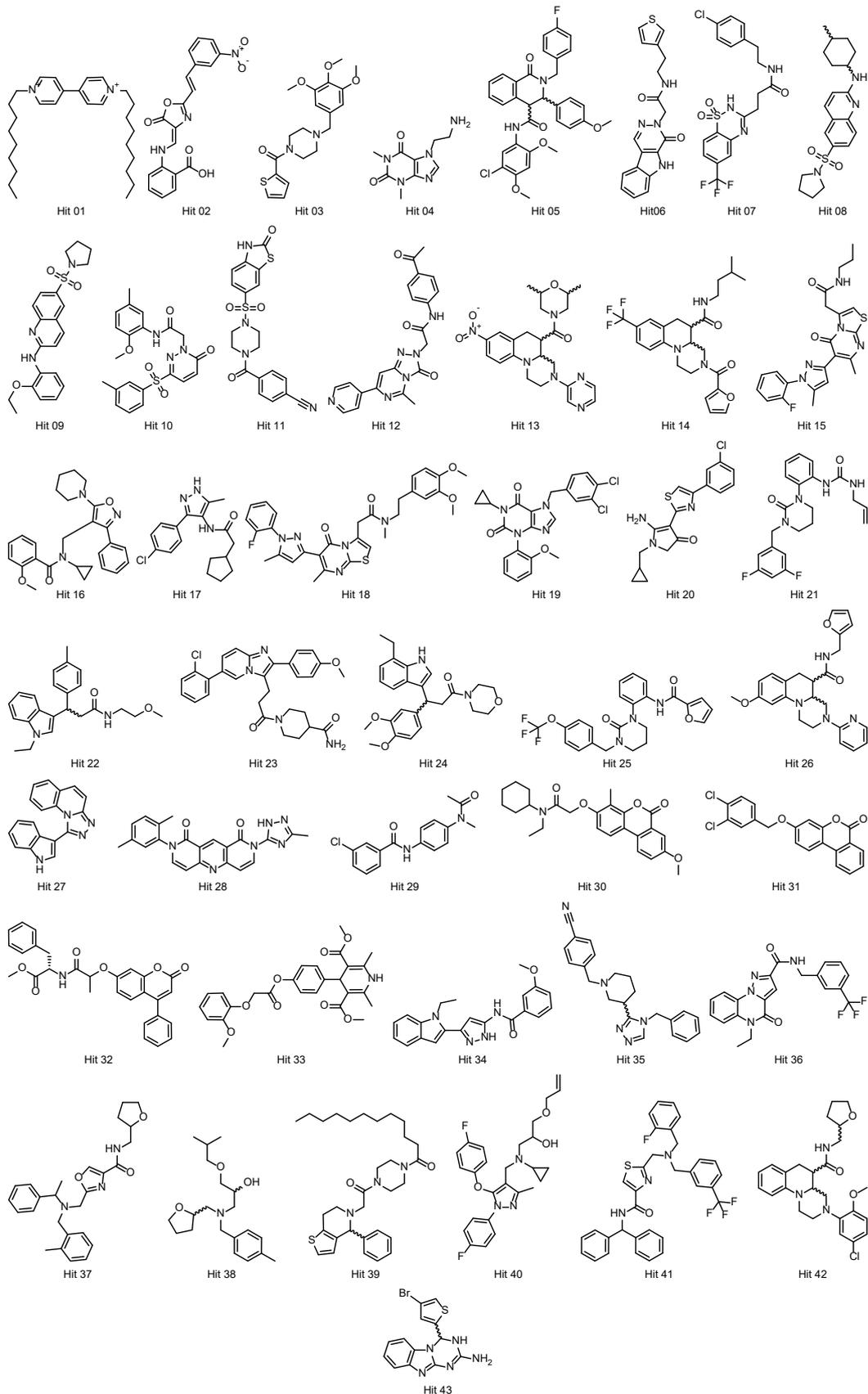


Abbildung 69. Chemische Strukturen der im Screen identifizierten Hit-Moleküle.

10.12 Reinigung von p38 α

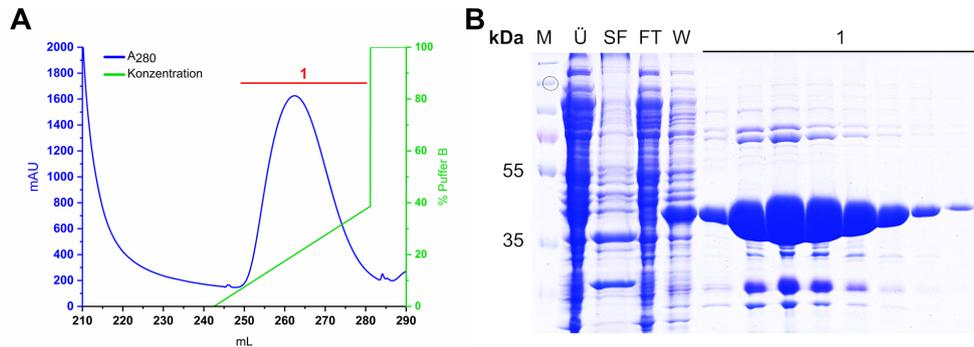


Abbildung 70. **A**, Chromatogramm der Ni-AC von His₆-p38 α ^{SL}. Blau: Absorption bei 280 nm; grün: Konzentration des Imidazol-haltigen Elutionspuffers. **B**, Analyse der Fraktionen der Ni-AC mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. Ü: löslicher Überstand; P: Pellet; FT: Durchfluss; 1: Eluatpeak; M: Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

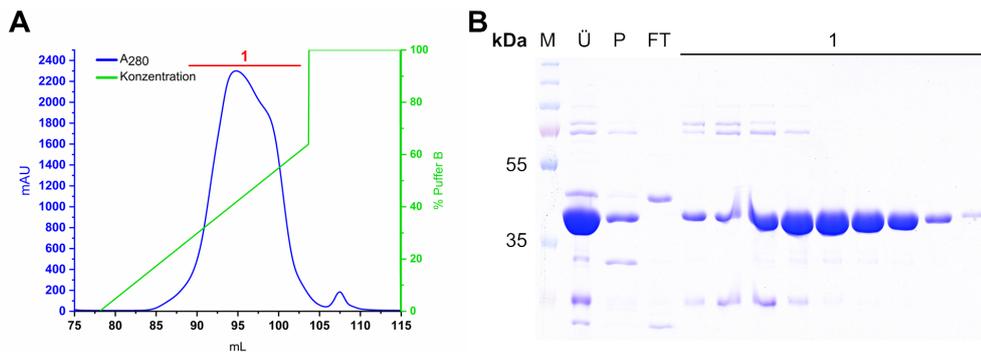


Abbildung 71. **A**, Chromatogramm der AEC von p38 α ^{SL} nach erfolgter Abspaltung des His₆-Tags mittels PreScission. Blau: Absorption bei 280 nm; grün: Konzentration des NaCl-haltigen AEC-Puffer. **B**, Analyse der Fraktionen der AEC mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. Ü: löslicher Überstand nach Abspaltung des His₆-Tags; P: unlösliche Fraktion nach Abspaltung des His₆-Tags; FT: Durchfluss; 1: Eluatpeak; M: Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

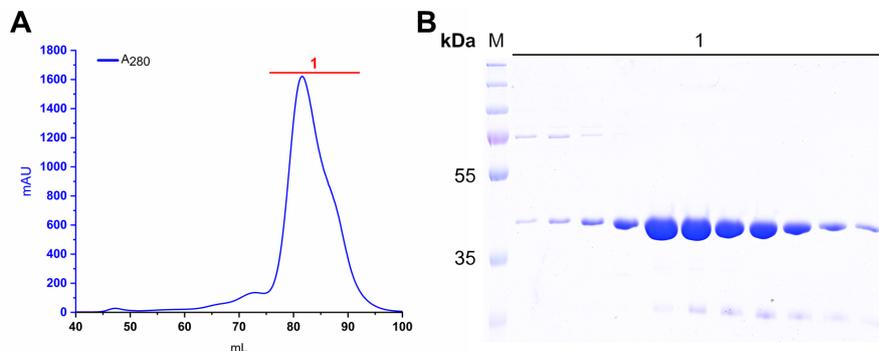


Abbildung 72. **A**, Chromatogramm der SEC von p38 α ^{SL}. Blau: Absorption bei 280 nm. **B**, Analyse der Fraktionen der SEC mittels SDS-PAGE und CBB-Färbung. 1: Eluatpeak; M: Marker PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

10.13 HTRF®-Ergebnisse für p38 α

Tabelle 32. Michaelis-Konstanten der p38 α -Konstrukte für ATP. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3).

Protein	K_{M,ATP} / μM
p38 α^{wt}	11.0 \pm 2.1
p38 α^{SL}	52.3 \pm 8.9
p38 $\alpha^{SL,MTSSL}$	42.4 \pm 7.3

Tabelle 33. Biochemische Charakterisierung der Testverbindungen auf den p38 α -Konstrukten. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung (n = 3).

Verbindung	IC₅₀ / nM		
	p38α^{wt}	p38α^{SL}	p38$\alpha^{SL,MTSSL}$
SB203580	75 \pm 34	61 \pm 8	229 \pm 68
SKF-86002	502 \pm 189	337 \pm 130	1052 \pm 291
Skepinone-L	4 \pm 2	5 \pm 3	28 \pm 5
Sorafenib	280 \pm 47	112 \pm 14	600 \pm 223
Regorafenib	203 \pm 104	73 \pm 76	308 \pm 199
RL45	149 \pm 89	139 \pm 51	1887 \pm 681
RL48	60 \pm 19	78 \pm 8	782 \pm 430

10.14 MS-Analytik für p38 α

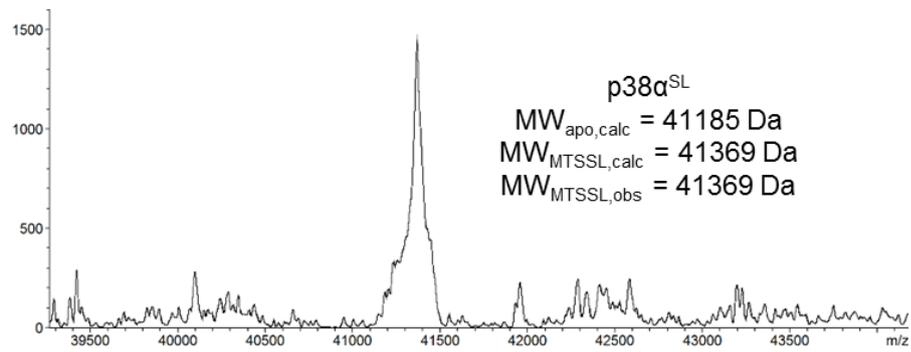


Abbildung 73. Die massenspektrometrische Analyse von p38 α ^{SL,MTSSL} illustriert die vollständige, einfache Modifikation des Proteinkonstrukts mit dem *spin label* MTSSL (MW_{MTSSL,obs} = 41369 Da).

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Daniel Rauh dafür danken, meine Doktorarbeit zu einer Vielzahl spannender Projekte und fordernder Fragestellungen in seiner Arbeitsgruppe anfertigen zu dürfen. Ebenso danke ich ihm für seine fortdauernde Unterstützung und Geduld, die zur Verfügung gestellten Mittel, die zahlreichen Diskussionen und die ermöglichten Einblicke in die interdisziplinäre, medizinalchemische Forschung während der Promotionzeit. Mein herzlicher Dank gilt zudem Prof. Dr. Daniel Summerer für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Auch möchte ich allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der AG Rauh danken, die nicht nur die Zeit in Labor, Büro und Kaffeeraum, sondern auch abseits der Arbeit in den vergangenen Jahren positiv geprägt haben, stets für eine entspannte Arbeitsatmosphäre gesorgt haben und immer für konstruktive Diskussionen zur Verfügung standen. Ebenfalls danke ich meinen Bachelor- und Masterstudentinnen und -studenten Jana Flegel, Janina Niggenaber, Rebekka Scheinpflug, Tim Zegar und Melina Vogt, die mit ihren Arbeiten zu dieser Dissertation beigetragen haben. Explizit bedanken möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Rauh, die in gemeinsamen Projekten involviert waren und diese erfolgreich gestaltet haben: Rajesh, André, Zhizhou, Mike, Julia, Lena, Patrik, Marina, Ina, Jonas, Niklas, Steven, Marius, Laura, Matthias, Bianca und Stefano.

Ein ganz besonderer Dank gilt Simone Eppmann und Andreas Arndt für jedwede Unterstützung bei der Proteinexpression und -reinigung sowie Petra Alhorn, Martina Reibner, Maria Sergani, Ulrich Schoppe und Vanessa Hohmann für ihren immerzu freundlichen administrativen und technischen Support.

Allen externen Kooperationspartnern danke ich herzlichst für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei den diversen Projekten während meiner Promotionszeit: Prof. Dr. Willem A. van Otterlo, Dr. Steven C. Pelly, Dr. Abu Taher und Leandi van der Westhuizen von der Stellenbosch University (Südafrika); Prof. Dr. Jens T. Siveke, Prof. Dr. Sebastian Bauer, Prof. Dr. Verena Jendrossek, Dr. Marija Trajkovic-Arsic, Dr. Sebastian Oeck, Dr. Thomas Mühlenberg, Niklas Dienstbier und Julia Ketzner vom

Universitätsklinikum Essen; Prof. Dr. Stephan A. Hahn, Dr. Abdelouahid Maghnouj, Dr. Svetlana Ladigan, Christoph Reintjes und Silvia Lyer von der Ruhr-Universität Bochum; Prof. Dr. Jan G. Hengstler und Georgia Günther vom Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund; Dr. Anke Unger, Dr. Heiko Müller, Dr. Matthias Baumann und Dr. Carsten Schultz-Fademrecht von der Lead Discovery Center GmbH; Dr. Laura Levy und Dr. Thorsten Genski von der Taros Chemicals GmbH & Co. KG; Prof. Dr. Malte Drescher, Patrick Roser und Juliane Stehle von der Universität Konstanz; Prof. Dr. Christian Peifer, Prof. Dr. Rainer Herges, Dr. Miriam Schehr und Linda Heintze von der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Prof. Dr. Roman K. Thomas und Prof. Dr. Martin L. Sos von der Universität zu Köln.

Des Weiteren danke ich allen Mitgliedern der gemeinsamen Einrichtungen der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der TU Dortmund und des Max-Planck-Instituts für molekulare Physiologie Dortmund: Dr. Tim Bergbrede, Tina Gazdag, Astrid Sander, Deike Sabrina Reinke und Melina Terbeck von der Dortmund Protein Facility (DPF); Dr. Petra Janning, Walburga Hecker, Jens Warmers, Malte Metz und Andreas Brockmeyer für ihre Hilfsbereitschaft bei technischen Fragen und für die ESI-MS/MS-Analytik. Ebenso danke ich Prof. Dr. Herbert Waldmann, Prof. Dr. Philippe I. H. Bastiaens, Prof. Dr. Stefan Raunser und Prof. Dr. Daniel Summerer für den Zugang zu analytischen Instrumenten in ihren Arbeitsgruppen.

Für die Durchsicht dieser Arbeit und viele hilfreiche Anmerkungen danke ich Dr. Mike Bührmann und Christoph Basner.

Ebenso danke ich allen Freunden und (ehemaligen) Kommilitonen, die die Zeit des Studiums und der Promotion auch außerhalb des Labors geprägt haben.

Mein größter Dank gebührt den Personen, die mir mein Studium ermöglicht, mich in allen Lebenslagen unterstützt und auf dem Weg hierhin stets begleitet haben: meinen Eltern und meiner Familie.

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Weisner, Jörn
Name, Vorname
(Surname, first name)

129402
Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

Wer vorsätzlich gegen eine die Täuschung über Prüfungsleistungen betreffende Regelung einer Hochschulprüfungsordnung verstößt, handelt ordnungswidrig. Die Ordnungswidrigkeit kann mit einer Geldbuße von bis zu 50.000,00 € geahndet werden. Zuständige Verwaltungsbehörde für die Verfolgung und Ahndung von Ordnungswidrigkeiten ist der Kanzler/die Kanzlerin der Technischen Universität Dortmund. Im Falle eines mehrfachen oder sonstigen schwerwiegenden Täuschungsversuches kann der Prüfling zudem exmatrikuliert werden, § 63 Abs. 5 Hochschulgesetz NRW.

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

Wer vorsätzlich eine falsche Versicherung an Eides statt abgibt, kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft werden, § 156 StGB. Die fahrlässige Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt kann mit einer Freiheitsstrafe bis zu einem Jahr oder Geldstrafe bestraft werden, § 161 StGB.

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

Any person who intentionally breaches any regulation of university examination regulations relating to deception in examination performance is acting improperly. This offence can be punished with a fine of up to EUR 50,000.00. The competent administrative authority for the pursuit and prosecution of offences of this type is the chancellor of the TU Dortmund University. In the case of multiple or other serious attempts at deception, the candidate can also be unenrolled, Section 63, paragraph 5 of the Universities Act of North Rhine-Westphalia.

The submission of a false affidavit is punishable.

Any person who intentionally submits a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to three years or a fine, Section 156 of the Criminal Code. The negligent submission of a false affidavit can be punished with a prison sentence of up to one year or a fine, Section 161 of the Criminal Code.

I have taken note of the above official notification.

Dortmund, den 04.02.2020

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Biochemische, kinetische und zelluläre Charakterisierung

kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht.

Die Arbeit hat in gegenwärtiger oder in einer anderen Fassung weder der TU Dortmund noch einer anderen Hochschule im Zusammenhang mit einer staatlichen oder akademischen Prüfung vorgelegen.

I hereby swear that I have completed the present dissertation independently and without inadmissible external support. I have not used any sources or tools other than those indicated and have identified literal and analogous quotations.

The thesis in its current version or another version has not been presented to the TU Dortmund University or another university in connection with a state or academic examination.*

***Please be aware that solely the German version of the affidavit ("Eidesstattliche Versicherung") for the PhD thesis is the official and legally binding version.**

Dortmund, den 04.02.2020

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)