

Strukturbiologische Untersuchung und Zelluläre Charakterisierung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren

DISSERTATION

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

Der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der
TECHNISCHEN UNIVERSITÄT DORTMUND

vorgelegt von

Ina Landel

geb. 23.04.1993 in Papenburg

im Dezember 2020

DISSERTATION

Strukturbiologische Untersuchung und Zelluläre Charakterisierung
kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie
Technische Universität Dortmund

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh
2. Gutachter: PD Dr. Leif Dehmelt

Dortmund, 2020

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Daniel Rauh im Zeitraum von November 2016 bis Oktober 2020 im Fachbereich der Chemischen Biologie und Medizinischen Chemie der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden die Bachelorarbeiten von Anto Filipovic (2017) und Luca Kröll (2019) sowie die Masterarbeit von Alina Teuber (2020).

PUBLIKATIONEN

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden die folgenden Publikationen.

* Diese Autoren trugen gleichermaßen zur Publikation bei.

- [1] Landel, I.*; Quambusch, L.*; Depta, L.*; Rauh, D., Spotlight on AKT: Current Therapeutic Challenges, *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, 11 (3), 225-227.
- [2] Quambusch, L.; Landel, I.; Depta, L.; Weisner, J.; Uhlenbrock, N.; Müller, M. P.; Glanemann, F.; Althoff, K.; Siveke, J. T.; Rauh, D., Covalent-Allosteric Inhibitors to Achieve Akt Isoform-Selectivity, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**, 58 (52), 18823-18829.
- [3] Uhlenbrock, N.*; Smith, S.*; Weisner, J.; Landel, I.; Lindemann, M.; Le, T. A.; Hardick, J.; Gontla, R.; Scheinpflug, R.; Czodrowski, P.; Janning, P.; Depta, L.; Quambusch, L.; Müller, M. P.; Engels, B.; Rauh, D., Structural and chemical insights into the covalent-allosteric inhibition of the protein kinase Akt, *Chem. Sci.* **2019**, 10 (12), 3573-3585.
- [4] Weisner, J.*; Landel, I.*; Reintjes, C.*; Uhlenbrock, N.*; Trajkovic-Arsic, M.; Dienstbier, N.; Ladigan, S.; Lindemann, M.; Smith, S.; Quambusch, L.; Scheinpflug, R.; Depta, L.; Gontla, R.; Unger, A.; Müller, H.; Baumann, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Guenther, G.; Maghnouj, A.; Müller, M. P.; Pohl, M.; Teschendorf, C.; Wolters, H.; Viebahn, R.; Tannapfel, A.; Uhl, W.; Hengstler, J.; Hahn, S.; Siveke, J.; Rauh, D., 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.
- [5] Wolle, P.*; Weisner, J.*; Keul, M.*; Landel, I.; Lategahn, J.; Rauh, D., RASPELD to Perform High-End Screening in an Academic Environment Toward the Development of Cancer Therapeutics, *ChemMedChem.* **2018**, 13 (19), 2065-2072.

DANKSAGUNG

Allen voran gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater Prof. Dr. Daniel Rauh, der mir mit der Bereitstellung dieses Promotionsthemas ermöglicht hat Teil eines spannenden Forschungsprojekts in seiner Arbeitsgruppe zu sein. Außerdem bedanke ich mich für die ständige Unterstützung und Wertschätzung während der gesamten Promotionszeit. Herrn Dr. Leif Dehmelt danke ich zudem herzlich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

An Dr. Matthias Müller möchte ich an dieser Stelle ebenfalls ein Dankeschön für die ständige Hilfsbereitschaft in jeglichen Fragestellungen, insbesondere bezüglich der Proteinkristallographie, richten. Vor allem die gemeinsamen SLS-Trips, wenn auch nicht immer so erfolgreich wie erhofft, werden mir in schöner Erinnerung bleiben.

Maßgebend für eine äußerst angenehme Atmosphäre während meiner Promotion waren insbesondere meine derzeitigen und ehemaligen Kollegen, deren Gesellschaft ich auch abseits des Labors sehr genossen habe: meine Büropartnerin Janina, Laura, Lisa, Julia, Lena, Marina, Marius, Niklas, Steven, Alina, Kiru, Mike, Tobi, Jörn, Sven, Hannah, Jonas W., Rajesh, Shiva, Patrik, Jonas L., Helena und Bianca. Dem Akt-Team der AG Rauh möchte ich außerdem für die zahlreichen anregenden Diskussionen und die produktive Zusammenarbeit danken. Auch meiner Masterstudentin Alina Teuber und meinen Bachelorstudenten Luca Kröll und Anto Filipovic danke ich für die Unterstützung in den verschiedenen Teilprojekten meiner Dissertation. Für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanke ich mich bei Lena Quambusch, Dr. Niklas Uhlenbrock, Laura Depta und Dr. Matthias Müller.

Ein weiterer Dank gilt dem Sekretariat mit Martina Reibner, Petra Alhorn, Maria Sergani und Ulrich Schoppe, welche immerzu freundliche Ansprechpartner in allen organisatorischen Bereichen waren. Andreas Arndt danke ich außerdem für die Unterstützung bei technischen Fragen im Labor.

Da der Erfolg des Akt-Projekts vor allem durch die interdisziplinäre Forschung mit verschiedenen externen Kooperationspartnern geprägt ist, möchte ich auch diesen Kollegen meinen besonderen Dank ausrichten. Dazu gehören Prof. Dr. Jens Siveke, Dr. Marija Trajkovic-Arsic und Niklas Dienstbier (Universitätsklinikum Essen); Prof. Dr. Stephan Hahn, Dr. Christoph Reintjes, Dr. Svetlana Ladigan, Dr. Abdelouahid Maghnouj und Silvia Lyer (Ruhr-Universität Bochum); Dr. Matthias Baumann, Dr. Julian Engel und Dr. Carsten Schultz-Fademrecht (LDC Dortmund); Dr. Laura Levy und Dr. Thorsten Genski (Taros Chemicals) sowie Prof. Dr. Jan Hengstler und sein Team (IfaDo Dortmund). Auch den Mitarbeitern der Protein Chemistry Facility des MPI Dortmund danke ich für die Virusproduktion und die Hilfestellung bei verschiedenen Fragen zur Insektenzellexpression. Den Ansprechpartnern der Crystallography and Biophysics Facility des MPI Dortmund, insbesondere Dr. Ingrid Vetter und Dr. Raphael Gasper-Schönenbrücher, danke ich außerdem für die ständige Hilfsbereitschaft und die Ermöglichung der Mitnutzung verschiedener Gerätschaften für die Proteinkristallographie.

Für die Ablenkung vom Laboralltag und den ständigen Zuspruch während meiner Promotion danke ich außerdem meinen Freunden abseits der Uni - dabei sind insbesondere Wiebke und Tobias zu nennen. Mit größter Dankbarkeit möchte ich mich an dieser Stelle an meine Familie und vor allem meine Eltern richten, die mir das Studium und die Promotion überhaupt ermöglicht haben und mich in jeder Situation unterstützt haben. Und zu guter Letzt geht mein besonderer Dank an Michael, der mir so oft alle Sorgen genommen hat und mein größter Rückhalt war – Dankeschön!

INHALTSVERZEICHNIS

PUBLIKATIONEN	I
DANKSAGUNG	III
INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
KURZFASSUNG	1
ABSTRACT	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 KREBSBEHANDLUNG DURCH PERSONALISIERTE MEDIZIN	5
1.2 ADRESSIERUNG DER PROTEINKINASE AKT	8
1.2.1 STRUKTUR UND REGULATION VON AKT	11
1.2.2 INVESTIGATIVE VERBINDUNGEN ZUR ADRESSIERUNG VON AKT	13
1.2.3 KOVALENT-ALLOSTERISCHE AKT-INHIBITOREN	16
1.3 STRUKTURBASIERTES WIRKSTOFFDESIGN	18
2 MOTIVATION UND ZIELSETZUNG	21
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	23
3.1 PRÄKLINISCHE CHARAKTERISIERUNG DES KOVALENT-ALLOSTERISCHEN AKT-INHIBITORS BORUSSERTIB	23
3.1.1 ZELLULÄRE EVALUIERUNG DES KOVALENT-ALLOSTERISCHEN AKT-INHIBITORS BORUSSERTIB	23
3.1.2 ANALYSE DES <i>IN VITRO</i> -SYNERGISMUS VON BORUSSERTIB UND TRAMETINIB	35
3.1.3 <i>IN VITRO</i> UND <i>IN VIVO</i> PHARMAKOKINETISCHE ANALYSE VON BORUSSERTIB	38
3.1.4 <i>IN VIVO</i> -PROFILIERUNG VON BORUSSERTIB IN KRAS-MUTIERTEN PDX-MODELLEN	41
3.1.5 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	44
3.2 ETABLIERUNG DER KRISTALLISATION VON AKT1^{WT}	46
3.2.1 EXKURS: PROXID – INFRASTRUKTUR FÜR PROTEINKRISTALLISATION IM AKADEMISCHEN UMFELD	46
3.2.2 KONSTRUKTDESIGN UND EXPRESSION VON AKT1 ^{WT}	48
	V

3.2.3	ETABLIERUNG DES REINIGUNGSPROTOKOLLS VON AKT1 ^{WT}	51
3.2.4	ETABLIERUNG EINES KRISTALLISATIONSSYSTEMS FÜR AKT1 ^{WT}	61
3.2.5	AUFNAHME UND PROZESSIERUNG DER AKT1 ^{WT} -DATENSÄTZE	67
3.2.6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	70
3.3	STRUKTURBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG KOVALENT-ALLOSTERISCHER AKT-INHIBITOREN	71
3.3.1	ANALYSE DER KOMPLEXSTRUKTUR VON AKT1 ^{WT} MIT BORUSSERTIB	71
3.3.2	STRUKTURANALYSE NACH DERIVATISIERUNG DES ÖSTLICHEN MOLEKÜLTEILS	76
3.3.3	STRUKTURANALYSE NEUARTIGER KOVALENT-ALLOSTERISCHER CAAIS	80
3.3.4	STRUKTURANALYSE AKT-ISOFORM-SPEZIFISCHER CAAIS	82
3.3.5	ANALYSE DER CYSTEIN-ADRESSIERUNG DURCH CAAIS	85
3.3.6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	87
3.4	ADRESSIERUNG DER AKT^{E17K}-MUTANTE DURCH KOVALENT-ALLOSTERISCHE AKT-INHIBITOREN	89
3.4.1	KRISTALLISATION VON AKT1 ^{E17K}	90
3.4.2	BIOCHEMISCHE EVALUIERUNG DER ADRESSIERUNG VON AKT1 ^{E17K}	102
3.4.3	ZELLULÄRE CHARAKTERISIERUNG VON AKT-INHIBITOREN ZUR ADRESSIERUNG VON AKT1 ^{E17K}	104
3.4.4	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	114
3.5	KRISTALLISATION VON C-KIT UND PDGFRα	116
3.5.1	DESIGN DER C-KIT- UND PDGFR α -KRISTALLISATIONSKONSTRUKTE	117
3.5.2	REINIGUNG DES C-KIT KRISTALLISATIONSKONSTRUKTS	118
3.5.3	KRISTALLISATION VON C-KIT ^{WT}	120
3.5.4	STRUKTURANALYSE DER C-KIT ^{WT} -KRISTALLSTRUKTUREN	122
3.5.5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	123
4	EXPERIMENTELLER TEIL	125
4.1	ALLGEMEINE ANMERKUNGEN	125
4.1.1	VERBRAUCHSMATERIALIEN	125
4.1.2	VERWENDETE GERÄTE	126
4.1.3	VERWENDETE PROTEINE, REAGENZIEN UND MEDIEN	127
4.1.4	BAKTERIENSTÄMME UND INSEKTENZELLINIEN	128
4.2	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	129
4.2.1	VERWENDETE PLASMIDE	129

4.2.2	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	130
4.2.3	RESTRIKTIONSVERDAU	131
4.2.4	LIGATION	131
4.2.5	PLASMIDISOLIERUNG AUS <i>E. COLI</i>	131
4.2.6	DNA-SEQUENZIERUNG	132
4.3	PROTEINEXPRESSION	132
4.3.1	PROTEINEXPRESSION IN INSEKTENZELLEN	132
4.3.2	PROTEINEXPRESSION IN <i>E. COLI</i>	133
4.4	PROTEINREINIGUNG UND BIOCHEMISCHE METHODEN	133
4.4.1	REINIGUNG DER AKT1-KONSTRUKTE	133
4.4.2	REINIGUNG DER C-KIT-KONSTRUKTE	135
4.4.3	PROTEINSTABILITÄTSASSAY	136
4.5	STRUKTURBIOLOGISCHE METHODEN	136
4.5.1	KRISTALLISATION VON AKT1	136
4.5.2	DATENSAMMLUNG UND -PROZESSIERUNG	138
4.5.3	KRISTALLISATION VON C-KIT	138
4.6	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	139
4.6.1	VERWENDETE ZELLINIEN	139
4.6.2	VIABILITÄTSASSAY	141
4.6.3	<i>IN VITRO</i> PHARMAKODYNAMISCHE UNTERSUCHUNGEN	142
4.6.4	RETROVIRALE TRANSDUKTION MURINER BA/F3-ZELLEN	144
4.7	<i>IN VIVO</i>-STUDIEN MIT PDX-MODELLEN	146
5	LITERATURVERZEICHNIS	147
6	ANHANG	167
6.1	ZELLULÄRE EVALUIERUNG DER KONTROLLVERBINDUNGEN	167
6.2	PROTEINSEQUENZEN	168
6.2.1	AKT1	168
6.2.2	C-KIT	169
6.2.3	PDGFR α	169
6.3	KINASETITRATION VON AKT1^{WT}	170

6.4	DATENSTATISTIKEN DER KOMPLEXSTRUKTUREN	171
6.4.1	DATENSTATISTIKEN DER AKT1-KRISTALLSTRUKTUREN	171
6.4.2	DATENSTATISTIKEN DER C-KIT ^{WT} -KRISTALLSTRUKTUREN	175
6.5	<i>SIMULATED ANNEALING OMIT MAP</i> DER KOMPLEXSTRUKTUR VON AKT1^{WT} MIT BORUSSERTIB	176
6.6	METHYLIERUNG VON AKT1^{E17K} ZUR KRISTALLISATION	177
6.7	VIABILITÄTSASSAY MIT MURINEN BA/F3-ZELLEN	178
6.7.1	ZELLZAHLBESTIMMUNG DER BA/F3-ZELLEN	178
6.7.2	BESTIMMUNG DES ANTI-PROLIFERATIVEN EFFEKTS VON AKT-INHIBITOREN IN PARENTALEN BA/F3	178
7	<u>EIDESTAATLICHE VERSICHERUNG (AFFIDATIV)</u>	179

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abl	engl. <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
ADME	engl. <i>adsorption, distribution, metabolism, excretion</i>
AEX	Anionenaustauschchromatographie (engl. <i>anion exchange chromatography</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	engl. <i>area under the curve</i>
BCA	Bicinchoninsäure
Bcr	engl. <i>breakpoint cluster region</i>
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
CAAI	kovalent-allosterische Akt-Inhibitoren, engl. <i>covalent allosteric Akt inhibitors</i>
CBB	Coomassie Brilliant Blau
CC _{1/2}	Korrelationskoeffizient
c-Kit	Stammzellfaktor-Rezeptor
Cl _{int}	intrinsische <i>Clearance</i>
CML	Chronische myeloische Leukämie
CTG	CellTiter-Glo Assay
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor, engl. <i>epidermal growth factor</i>
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor, engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
EPR	Elektronenspin-Resonanz (engl. <i>electron paramagnetic resonance</i>)
ER	Estrogen-Rezeptor
ESI-MS/MS	engl. <i>electrospray ionization-tandem mass spectrometry</i>
FBS	Fötale Kälberserum (engl. <i>fetal bovine serum</i>)
FOXO	Forkhead-Box-Protein
GIST	Gastrointestinale Stromatumoren

GoI	Transgen (engl. <i>gene of interest</i>)
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (engl. <i>G protein-coupled receptor</i>)
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
His ₆ -Tag	Hexahistidin-Aufreinigungsanker
HM	hydrophobes Motiv
HTRF	engl. <i>Homogeneous Time-Resolved Fluorescence</i>
HTS	Hochdurchsatz-Screening (engl. <i>high-throughput screening</i>)
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
I/σI	Signal-zu-Rauschen-Verhältnis
IL-3	Interleukin-3
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JMD	Juxtamembrandomäne
k _{inact}	Ratenkonstante der Inaktivierung
LC-MS/MS	engl. <i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MD	Molekulardynamik
mTORC2	engl. <i>mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
Nickel-IMAC	Nickel-Affinitätschromatographie (engl. <i>immobilized metal affinity chromatography</i>)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PAMPA	engl. <i>parallel artificial membrane permeability assay</i>
(c)PARP	(geschnittene, engl. <i>cleaved</i>) Poly-ADP-Polymerase-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PD	progressives Tumorwachstum (engl. <i>progressive disease</i>)
PDGFR	engl. <i>platelet-derived growth factor receptor</i>
PDB	Protein Data Bank

PDK1	Phosphoinositide-abhängige Kinase-1, (engl. phosphoinositide-dependent kinase-1)
PDX	Patienten-abgeleitetes Xenograft (engl. <i>patient derived xenograft</i>)
PEG 2000 MME	Polyethylenglycol 2000 Monomethylether
PET	Positron-Emissions-Tomographie
PH	Pleckstrin-Homologie
PHD	PH-Domäne
PHLPP1/2	engl. <i>PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase 1/2</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat
PK	Pharmakokinetik
PKA	Proteinkinase A
p.o.	peroral
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PR	partiellles Ansprechen (engl. <i>partial response</i>)
PRAS40	Prolin-reiches Akt-Substrat mit 40 kDa (engl. <i>proline-rich Akt substrate of 40 kDa</i>)
PROS	engl. <i>PIK3CA-related overgrowth spectrum</i>
ProXID	Protein Xtalization Infrastructure Dortmund
PTEN	engl. <i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Ras	G-Protein Ras, engl. <i>rat sarcoma</i>
RECIST	engl. <i>Response Evaluation Criteria in Solid Tumors</i>
RIPA	engl. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
R _{merge}	Übereinstimmung symmetrieverwandter Reflexe
R _{meas}	Redundanz-unabhängiger R-Wert
ROCK	engl. <i>Rho-associated protein kinase</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S6	Ribosomales Protein S6

SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung (eng. <i>structure activity relationship</i>)
SBDD	strukturbasiertes Wirkstoffdesign (engl. <i>structure-based drug design</i>)
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl. <i>size exclusion chromatography</i>)
SLS	Swiss Light Source
SD	stabiles Tumorstadium (engl. <i>stable disease</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. <i>Tris-buffered saline</i>)
TEV	engl. <i>tobacco etch virus</i>
TOH	engl. <i>time of harvest</i>
TSA	engl. <i>Thermal Shift Assay</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation, engl. <i>world health organization</i>
WT	Wildtyp

KURZFASSUNG

Aufgrund der Schlüsselposition der Proteinkinase Akt in diversen Signalwegen resultiert aus genetischen Läsionen vorgeschalteter Proteine, wie beispielsweise PI3K, PTEN oder der Rezeptortyrosinkinase (RTK) EGFR, eine Überaktivierung der Kinase in verschiedenen Tumorerkrankungen. Zudem sind aktivierende Mutationen der Akt-Kinase wie die E17K-Mutation bekannt, welche ursächlich für die Entstehung verschiedener maligner Erkrankungen sind. Daher ist die zielgerichtete Adressierung von Akt bereits seit zwei Jahrzehnten Bestandteil der medizinalchemischen Forschung, welche bislang jedoch keine zugelassenen Wirkstoffe hervorgebracht hat. Durch eine kovalent-allosterische Adressierung mit der Leitstruktur Borussertib konnte bereits in biochemischen Experimenten das Potential dieses innovativen Ansatzes gezeigt werden. Der kovalent-allosterische Akt-Inhibitor (CAAI) Borussertib zeichnet sich dabei durch eine herausragende inhibitorische Potenz und Selektivität im Vergleich zu den in klinischen Studien untersuchten allosterischen und ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren aus.

Um die Überlegenheit der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren weiterführend zu validieren, konnte im Rahmen dieser Arbeit mit den etablierten zellulären Modellsystemen die gesteigerte anti-proliferative Aktivität von Borussertib im Vergleich zu den Referenzinhibitoren gezeigt werden. Mit Hilfe von Western Blot-Analysen konnte außerdem die selektive Inhibition der Akt-Kinase und der nachgeschalteten Signalkaskaden durch Borussertib intrazellulär bestätigt werden. Mit dem Hintergrund einer *in vitro*-Synergie der Inhibition des Ras/MAPK- und PI3K/Akt-Signalwegs in KRas-mutierten Zelllinien wurde außerdem die *in vivo*-Wirksamkeit von Borussertib in Kombination mit dem MEK-Inhibitor Trametinib in KRas-mutierten Patienten-abgeleiteten Xenograft-Modellen (PDX) nachgewiesen. Der Erfolg dieser Kombinationstherapie verdeutlicht, trotz limitierter pharmakokinetischer Eigenschaften von Borussertib, die Effizienz der kovalent-allosterischen Adressierung von Akt als möglichen Therapieansatz. Um eine ausreichende orale Bioverfügbarkeit zu erreichen, ist jedoch die weitere Optimierung von Borussertib im Rahmen des strukturbasierten Wirkstoffdesigns (SBDD) erforderlich.

Die Etablierung eines robusten Kristallisationssystems für Akt ist für das strukturbasierte Wirkstoffdesign und die Optimierung der CAAs unerlässlich. Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch ein valides Expressions- und Reinigungsprotokoll die Akt1-Kinase in hoher Reinheit und Ausbeute erhalten und die zuvor identifizierten Kristallisationsbedingungen des Akt1-Wildtyps (Akt1^{WT}) verlässlich reproduziert werden. Mit Hilfe von Röntgenbeugungsexperimenten konnten somit durch sorgfältige Datenprozessierung 35 Kristallstrukturen von Akt1 im Komplex mit einer Vielzahl von kovalent-allosterischen Inhibitoren gelöst werden.

Die erhaltenen Komplexstrukturen bestätigten den erwarteten Bindungsmodus der CAAs und die kovalente Bindungsknüpfung an die in der Aktivierungsschleife befindlichen Cysteine Cys296 oder Cys310. Weiterhin konnten essentielle Interaktionen zwischen den Liganden und der Kinase aufgelöst und das Verständnis der Struktur-Aktivitäts-

Beziehungen (SAR) durch Kristallstrukturen mit diversen Strukturmotiven vertieft werden. Diese Erkenntnisse sind für die weitere Optimierung der CAAs von zentraler Bedeutung und ermöglichen zudem die Entwicklung weiterer Generationen an kovalent-allosterischen Inhibitoren sowie Akt-Isoform-spezifischer CAAs.

Durch den Erhalt einer Kristallstruktur der Akt1 E17K-Mutante (Akt1^{E17K}) im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Verständnis der strukturellen Veränderungen durch die Mutation erhalten sowie das strukturbasierte Design kovalent-allosterischer Inhibitoren zur effizienten Adressierung ermöglicht werden. Mit der etablierten Expressions- und Reinigungsstrategie wurden optimale Voraussetzungen für die Identifizierung von Kristallisationsbedingungen im Rahmen zahlreicher *Screening*- und Optimierungsexperimente geliefert, welche letztendlich zu vielversprechenden Bedingungen führten. Weiterhin konnte in einem Proteinstabilitäts-Assay die Überlegenheit der CAAs im Vergleich zu den allosterischen Inhibitoren hinsichtlich der Stabilisierung der inaktiven PH-*in*-Konformation gezeigt werden. Zur zellulären Charakterisierung der Akt1^{E17K}-Inhibition durch die verschiedenen Verbindungen wurde ein murines Ba/F3-Zellsystem generiert, welches eine onkogene Abhängigkeit vom Proliferationssignal der Akt1^{E17K}-Mutante aufweist. Dieses löste sowohl im Rahmen eines Viabilitätsassays als auch durch Western Blot-Analysen eine gesteigerte Effizienz der Akt-Inhibition durch eine neuartige Inhibitor-Klasse an CAAs im Vergleich zu den allosterischen und ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren auf. Somit könnten diese kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren ebenso potente Modulatoren in zukünftigen *in vivo*-Studien darstellen.

Die validierten Methoden zur Etablierung eines Kristallisationssystems konnten außerdem auf weitere Zielproteine im Rahmen eines Projekts zur Entwicklung von c-Kit- und PDGFR α -Inhibitoren, welche in der Behandlung von gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) angewandt werden sollen, transferiert werden. Nach erfolgreicher Darstellung der Kristallisationskonstrukte und Reproduktion der beschriebenen Expressions-, Reinigungs- und Kristallisationsbedingungen konnten für den c-Kit Wildtyp (c-Kit^{WT}) geeignete Kristalle für Röntgenbeugungsexperimenten sowie vielversprechende Ansätze für PDGFR α erhalten werden. Die Strukturanalyse der c-Kit^{WT}-Kristalle zeigte die inaktive Konformation der Kinase, welche vermutlich eine Bindung der im Arbeitskreis synthetisierten Typ-II-Inhibitoren verhindert. Nichtsdestotrotz liefern diese Strukturen Ansätze zur Optimierung des Kristallisationskonstrukts, welche möglicherweise zur Gewinnung von Komplexstrukturen mit den entwickelten Inhibitoren führen können.

ABSTRACT

Due to the key role of the protein kinase Akt in multiple signaling cascades, the occurrence of genetic lesions of upstream-acting proteins, like PI3K, PTEN, or the receptor tyrosine kinase (RTK) EGFR, leads to aberrant activation of the kinase in different tumor types. Furthermore, activating mutations of Akt, like the E17K-mutation, are known, result in the development of various malignant diseases. Together, this renders Akt an attractive target in medicinal chemistry for several years, but the approval of targeted drugs could not be achieved by now. Addressing Akt with covalent allosteric inhibitors (CAAI), like the lead structure Borussertib, already showed in biochemical experiments the potential of this innovative approach. The CAAI Borussertib harbors an outstanding inhibitory potency and selectivity profile compared to the clinically tested allosteric and ATP-competitive Akt inhibitors.

To demonstrate the superior efficacy of covalent-allosteric inhibitors in more detail, the present work reveals an increased anti-proliferative activity of Borussertib compared to reference inhibitors in the established cellular model systems. Furthermore, western blot analyses present the selective intracellular on-target inhibition of Akt and the inhibition of downstream-acting proteins. With respect to *in vitro* synergy of the Ras/MAPK- and PI3K/Akt signaling pathway inhibition in KRas-mutant cell lines, further studies in KRas-mutant patient-derived xenograft models (PDX) could demonstrate the *in vivo* efficacy of Borussertib in combination with the MEK inhibitor Trametinib. The success of this combination therapy, despite limited pharmacokinetic parameters of Borussertib, underlines the effectiveness of covalent-allosteric inhibition of Akt as a potential therapeutic approach. Nevertheless, there is a need for further optimization of Borussertib using structure-based drug design (SBDD) to achieve sufficient oral bioavailability.

The establishment of a robust crystallization system for Akt is essential for the structure-based drug design and optimization of the CAAIs. Therefore, with the help of a valid expression and purification protocol, the Akt1 kinase could be isolated in high yields and outstanding purity, which enabled the reproduction of the identified crystallization conditions for the Akt1 wildtype (Akt1^{WT}). Thereby, X-ray structure analysis provided 35 crystal structures of Akt1 in complex with different covalent-allosteric inhibitors after careful data processing.

The solved crystal structures confirmed the expected binding mode of the CAAIs and demonstrated the covalent bond formation with two cysteine residues, Cys296 and Cys310, located in the activation loop of Akt. Furthermore, essential interactions between the ligands and the kinase were dissolved, and a deeper understanding of the structure-activity-relationships (SAR) could be achieved with the diverse complex structures. These insights play a crucial role for the optimization of the CAAIs and enabled the development of next-generation covalent-allosteric Akt inhibitors and the design of Akt-isoform specific CAAIs.

By solving a crystal structure of the Akt1 E17K-mutant (Akt1^{E17K}), an understanding of the structural influence of the mutation should be provided, and the structure-based design of covalent allosteric inhibitors in order to address this mutant should be enabled in the present work. Through the established expression and purification strategy, optimal conditions for identifying crystallization conditions with several screenings and optimization experiments could be provided, which led to the identification of promising conditions. Furthermore, the superior efficacy of CAAs in comparison with allosteric inhibitors regarding the stabilization of the inactive PH-in conformation could be shown in a protein stability assay. To characterize the cellular Akt1^{E17K} inhibition with the different compounds, a murine Ba/F3-system exhibiting an oncogene addiction to the proliferation signal of Akt1^{E17K} could be established. The performance of viability assays and western blot analyses outlined an enhanced efficacy of the Akt inhibition by an innovative inhibitor class of CAAs compared to allosteric and ATP-competitive reference compounds. Thereby, these covalent allosteric Akt inhibitors could also function as potent modulators in future *in vivo* studies.

The validated methods for establishing a crystallization system could also be transferred to further target proteins in the context of a project for the development of c-Kit and PDGFR α -inhibitors for the treatment of GIST. After successful generation of the crystallization constructs and reproduction of the described expression, purification and crystallization conditions, the growth of suitable c-Kit wildtype (c-Kit^{WT}) crystals for X-ray structure analysis could be achieved. Besides, for PDGFR α wildtype, promising crystallization conditions could also be identified. The structure analysis of the c-Kit^{WT} crystals dissolved the inactive kinase conformation, which probably prevents the binding of the type II inhibitors developed in the working group. Nevertheless, the solved structures provide ideas for the optimization of the crystallization construct, which could enable the achievement of complex structures with the developed inhibitors.

1 EINLEITUNG

In den letzten Jahrzehnten konnte weltweit eine rapide Zunahme der diagnostizierten Krebserkrankungen verzeichnet werden, wobei schätzungsweise 18,1 Millionen neue Krebsdiagnosen und 9,6 Millionen dadurch verursachte Todesfälle im Jahr 2018 auftraten.¹ Anhand von epidemiologischen Daten der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird zudem erwartet, dass Herz-Kreislauf-Erkrankungen als derzeit häufigste Todesursache durch Krebserkrankungen in naher Zukunft abgelöst werden.² Die jeweilige Entwicklung der Inzidenz- und Mortalitätsraten variiert dabei stark in den unterschiedlichen Regionen der Welt, wobei ein Zusammenhang mit den sozioökonomischen Strukturen besteht. Insgesamt kann jedoch eine wachsende Weltpopulation und erhöhte Lebenserwartung der Bevölkerung als ursächlich für die steigende Relevanz von Krebserkrankungen angenommen werden. Auch in Bezug auf die am häufigsten auftretende Krebsart gibt es Divergenzen in den unterschiedlichen Ländern, wobei weltweit Lungen- (11,6 %), Brust- (11,6 %), Kolorektal- (10,2 %) und Prostatakarzinome (7,1 %) die Liste der häufigsten malignen Krebsformen anführen. Mit einer Mortalitätsrate von 18,4 % aller Krebsarten stellt außerdem Lungenkrebs die Tumorform mit der höchsten Letalität dar.²

Trotz steigender Relevanz der Krebserkrankungen können gleichzeitig auch deutliche Fortschritte der Möglichkeiten zur frühzeitigen Erkennung und erfolgreichen Therapie der verschiedenen Tumorarten beobachtet werden.³ Insbesondere durch die personalisierte Krebstherapie konnte dabei eine drastische Steigerung der Überlebenschancen und Lebensqualität im Vergleich zur Therapie mit den klassischen Ansätzen der Strahlen- und Chemotherapie erzielt und eine neue Ära der onkologischen Behandlung eingeleitet werden.⁴

1.1 Krebsbehandlung durch personalisierte Medizin

Viele Jahre war die Behandlung von Krebserkrankungen neben der chirurgischen Entfernung von zytotoxischer Strahlen- und Chemotherapie geprägt. Durch die fehlende Selektivität letzterer hinsichtlich der zytostatischen Effekte gegenüber malignen und normalen Zellen ist die Behandlung der Krebspatienten in den meisten Fällen mit enormen Nebenwirkungen und daher oftmals geminderter Lebensqualität verbunden.⁵ Mit neuartigen Ansätzen der selektiven Adressierung von Tumorzellen durch eine zielgerichtete Krebstherapie sollte Anfang des 21. Jahrhundert die Krebsbehandlung modernisiert werden, welche gegenüber den klassischen Therapieformen eine deutliche Steigerung der Behandlungserfolge und verbesserte Verträglichkeit versprach.⁶ Unterstützt wurde die Entwicklung der personalisierten Medizin vor allem durch die Entschlüsselung des humanen Genoms im Jahr 2003 im Rahmen des Humangenomprojekts.^{7,8} Mit dem daraus resultierenden Verständnis über die Entstehung von Krebs durch genetische Läsionen konnte somit die Basis für neue Möglichkeiten eines individualisierten Therapieansatzes geschaffen werden.⁹

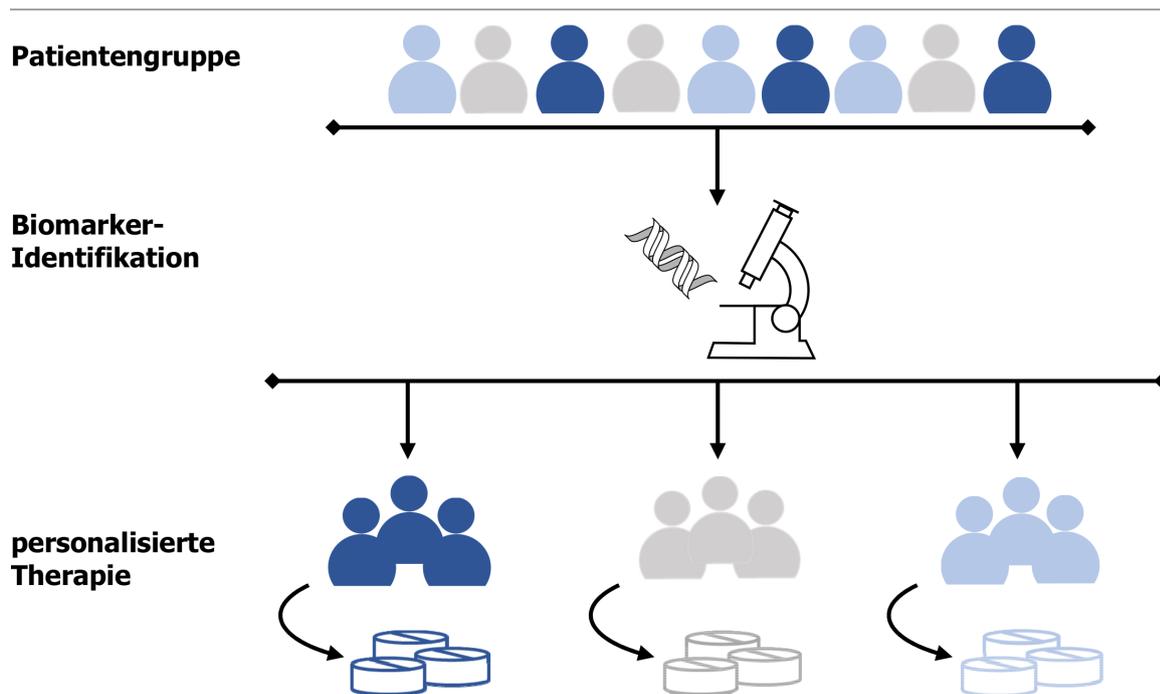


Abbildung 1: Schematische Darstellung der personalisierten Therapie. Nach diagnostischer Identifikation der Biomarker werden die Patienten in Subpopulationen unterteilt, die durch maßgeschneiderte Behandlung zum effizientesten Therapieergebnis führen soll.¹⁰

Der zielgerichteten Krebstherapie zugrundeliegend ist die von WEINSTEIN erstmalig beschriebene *oncogene addiction* einer Tumorzelle vom Proliferationssignal eines Onkogens.¹¹ Genetische Veränderungen, wie beispielsweise aktivierende Punktmutationen, Genamplifikationen, Überexpressionen eines Proteins oder *loss-of-function*-Mutationen in Tumorsuppressorgenen führen zu Dysregulationen der nachgeschalteten Signalkaskade, woraus eine Entartung der Zelle zur malignen Krebszelle und eine Abhängigkeit des Zellüberlebens vom onkogenen Signal resultiert.¹²⁻¹⁴ Eine spezifische Inhibition des zugrundeliegenden Signals, z.B. durch direkte Hemmung des identifizierten Onkogens mit kleinen chemischen Molekülen (engl. *small molecules*), führt somit zu einem *oncogenic shock* und Induktion der Apoptose, derer sich die zielgerichtete Krebstherapie zu Nutze macht.^{15,16} Durch die Selektivität einer maßgeschneiderten Therapie gegenüber den entarteten Zellen wird die Behandlungseffizienz gesteigert und die Nebenwirkungen im Vergleich zur zytostatischen Chemotherapie deutlich reduziert.¹⁷ Durch die von HANAHAN und WEINBERG eingeführten *hallmarks of cancer* wurden zudem weitere Charakteristika einer malignen Zelle definiert, welche die komplexen intramolekularen Strukturen und tumorbiologischen Einflüsse einer Krebszelle darlegen.^{18,19} Diese fundamentalen Konzepte der Tumorgenese unterstreichen die Herausforderungen einer Tumorbehandlung, welche zugleich für die zielgerichtete Krebstherapie von enormer Relevanz sind.

Das Konzept der personalisierten Krebstherapie beruht auf der Identifikation von Biomarkern, welche prädiktiv für einen möglichen Erfolg einer Behandlung sind (Abbildung 1).^{10,20} Dabei handelt es sich um molekulare Marker, wie beispielsweise Gene, Proteine oder Metabolite, die zudem im Rahmen der Präzisionsmedizin für die Diagnose sowie der

Vorhersage der therapeutischen Antwort und Entwicklung einer Krankheit verwendet werden.²¹ Die Präzisionsmedizin ist somit jedoch durch die Kenntnis derartiger Biomarker limitiert, sodass die stetige Identifizierung weiterer prädiktiver Marker zur erfolgreichen Behandlung möglichst vieler Krebspatienten von größter Bedeutung ist.²² Erschwert wird dies jedoch zusätzlich durch die häufige Entstehung einer intra- und intertumoralen Heterogenität, sodass eine zuverlässige Vorhersage einer erfolgreichen Behandlungsstrategie durch die Kenntnis eines Biomarkers nicht immer gewährleistet ist.^{23,24} Nichtsdestotrotz liefert die aufkommende Vielzahl an Datenbanken, welche die genomische und proteomische Profilierung zahlreicher Patienten weltweit zur Verfügung stellen, Plattformen zur Analyse der therapeutischen Relevanz von alterierten Proteinen und schaffen somit eine Grundlage für die Identifikation neuer Biomarker für die Prognostik.^{25,26}

Insbesondere die spezifische Adressierung von Proteinkinasen, welche essentielle Komponenten in nahezu jeder Signalkaskade darstellen, spielt eine große Rolle in der Präzisionsmedizin.^{27,28} Eines der prominentesten Beispiele stellt die Erfolgsgeschichte des Tyrosinkinase-Inhibitors Imatinib (Gleevec®) dar, welcher im Jahr 2001 die Zulassung durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) für die Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) erhielt.²⁹ Die Entwicklung des Inhibitors des Fusionsproteins Bcr-Abl gilt als Durchbruch der zielgerichteten Krebstherapie und führte zu enormen klinischen Erfolgen, wobei die 8-Jahres-Überlebensrate von 20 % auf 87 % gesteigert werden und die Lebensqualität der Patienten drastisch verbessert werden konnte.^{30,31} Nicht nur im Kontext der CML konnte ein Erfolg von Imatinib verzeichnet werden, auch für die Behandlung der relativ seltenen gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) konnte Imatinib als erste zielgerichtete Therapie mit enormer Effizienz eingesetzt werden.³²⁻³⁴ Der klinische Erfolg beruht dabei neben der Adressierung der Bcr-Abl Kinase auf der Inhibition des Stammzellfaktorrezeptors (c-Kit), deren Mutationen zusammen mit Alterationen der Rezeptortyrosinkinase (RTK) *platelet-derived growth factor receptor α* (PDGFR α) die hauptsächlichen Treiber der GIST-Erkrankungen darstellen.^{29,35,36} Durch rasch aufkommende Resistenzmutationen der adressierten Kinasen, welche die Wirksamkeit von Imatinib aufheben, ist jedoch die medizinalchemische Entwicklung von zielgerichteten Therapeutika zur Behandlung dieser Krebserkrankungen nicht abgeschlossen und weiterhin Bestandteil derzeitiger Forschung.³⁷⁻³⁹

Die bisherigen Erfolge der Präzisionsmedizin sowie ebenso die stetige Entwicklung von Resistenzmutationen unterstreichen die Notwendigkeit der Entwicklung weiterer niedermolekularer Verbindungen zur spezifischen Adressierung zahlreicher Tumortreibender Zielproteine, wie beispielsweise der Serin/Threonin-Kinase Akt.

1.2 Adressierung der Proteinkinase Akt

Mit insgesamt 518 Mitgliedern und der Beteiligung an nahezu jeder Signalkaskade stellt die Familie der Proteinkinasen eine der wichtigsten Enzymklassen dar. Die enzymatische Funktion dieser Proteine besteht dabei aus dem Transfer der endständigen γ -Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf die Hydroxylgruppe einer Substrat-Seitenkette, wobei je nach adressierter Aminosäure zwischen Tyrosin- und Serin/Threonin-Kinasen unterschieden wird.⁴⁰ Die enorme Relevanz der Phosphorylierung als posttranslationale Modifikation im Proteom, welche für die Signaltransduktion im Rahmen essentieller Prozesse in der Zelle verantwortlich ist, macht diese Enzymklasse zu attraktiven Zielproteinen in der medizinalchemischen Forschung.^{27,28} Zusätzlich führte die allgemeine Klassifizierung des Kinoms als „adressierbar“ (engl., *druggable*) zur Entwicklung zahlreicher zielgerichteter Kinaseinhibitoren in den letzten drei Jahrzehnten.⁴¹

Aufgrund der hohen funktionalen Diversität, welche die Regulation der Proliferation, des Metabolismus und des Zellüberlebens umfasst, stellt der PI3K/Akt-Signalweg eine der bedeutendsten Signalkaskaden der Zelle dar.⁴² Dementsprechend führen Dysregulationen der Komponenten dieses Signalwegs durch eine konstitutive Aktivierung zur Entartung der Zelle und Entstehung diverser Krebsarten.⁴³ Innerhalb dieses Signalwegs stellt die Serin/Threonin-Kinase Akt, auch bekannt als Proteinkinase B (PKB), eine zentrale Schlüsselfigur mit einer Vielzahl an Substraten und nachgeschalteten Signalkaskaden dar.⁴⁴ Akt umfasst dabei drei Isoformen, Akt1-3, welche mit 73 % eine hohe Sequenzhomologie aufweisen, jedoch in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden und sich in ihren Funktionen und Lokalisationen unterscheiden.^{45,46}

Die Aktivierung von Akt im Rahmen des PI3K/Akt-Signalwegs erfolgt initial über die extrazelluläre Stimulation einer RTK oder eines G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR, engl. *g-protein coupled receptor*) durch beispielsweise Zytokine oder Wachstumsfaktoren (Abbildung 2). Dies führt zur Aktivierung der Lipidkinase Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), welche die Produktion des *second messengers* Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) durch Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP₂) initiiert.^{44,47} Über die Bindung von PIP₃ durch die regulatorische *Pleckstrin Homology* (PH)-Domäne wird somit eine Rekrutierung von Akt sowie der Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase 1 (PDK1) und eine Induktion der aktiven PH-*out*-Konformation von Akt erzielt. Die Konformationsänderung ausgehend von der auto-inhibierten PH-*in*-Konformation ermöglicht die Phosphorylierung von Thr308 in der Aktivierungsschleife durch PDK1 und damit die Akt-Aktivierung.^{48,49} Durch die zusätzliche Phosphorylierung von Ser473 im hydrophoben Motiv wird die vollständige Aktivierung von Akt erreicht, welche durch den Proteinkomplex *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) *complex 2* (mTORC2) erfolgt.^{50,51} Die nachstehenden Substrate, welche durch Akt phosphoryliert werden, umfassen eine Vielzahl von Proteinen, wie z.B den Transkriptionsfaktor FOXO oder die Kinasen GSK3 und PRAS40.⁴⁷ Dabei zeichnet insbesondere die Förderung der Zellproliferation und Inhibition der Apoptose durch Inaktivierung pro-apoptotischer Proteine die durch Akt-initiierte Signalweiterleitung aus.⁵²

Die negative Regulation der Aktivierung von Akt erfolgt durch den Tumorsuppressor *phosphatase and tensin homolog* (PTEN), welcher die PIP₃-vermittelte Rekrutierung von Akt an die Plasmamembran durch Dephosphorylierung zu PIP₂ beendet.⁵³ Des Weiteren führt die Dephosphorylierung der Aktivierungsstellen durch die Protein Phosphatase 2A (PP2A) an Thr308 und die PH-Domänen *leucine-rich repeat* Protein Phosphatasen (PHLPP1/2) an Ser473 zur Inaktivierung von Akt.^{54,55}

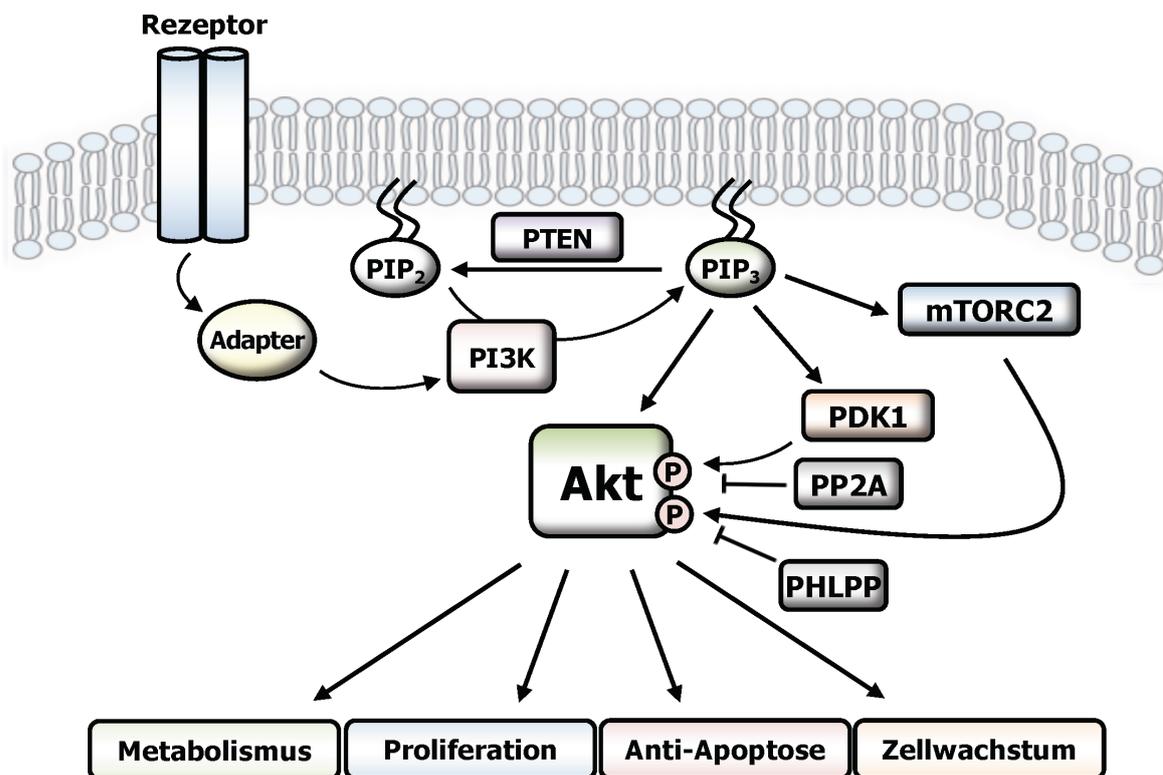


Abbildung 2: Schematische Darstellung des PI3K/Akt-Signalwegs. Nach Aktivierung eines Rezeptors durch Bindung extrazellulärer Stimuli erfolgt die Aktivierung von PI3K, welches die Produktion des membrangebundenen *second messengers* PIP₃ durch Phosphorylierung von PIP₂ initiiert. Im Anschluss an die Rekrutierung von Akt an die Membran kommt es zur Aktivierung über PDK1 und mTORC2. Terminiert wird das Akt-Signal durch Dephosphorylierung von PIP₃ über PTEN oder der Aktivierungsstellen von Akt durch PP2A und PHLPP. Die Akt-Aktivierung führt zur Induktion zahlreicher Zellantworten über die Phosphorylierung hunderter Akt-Substrate.⁴⁴

Der Relevanz der Schlüsselposition von Akt zur Förderung des Zellwachstums und -überlebens macht sich unter anderem die Tumorgenese durch eine Überaktivierung des Akt-Signals zu Nutze. Dysregulationen des PI3K/Akt-Signalwegs sind somit für die Entstehung und Metastasierung diverser Tumortypen, wie beispielsweise Brust-, Lungen- oder Endometriumkarzinomen, sowie der Entwicklung von Resistenzmechanismen verantwortlich.^{56,57} Während Fehlregulationen der Akt-Kinase selbst einen relativ geringen Anteil ausmachen, resultiert die Akt-Überaktivierung hauptsächlich aus genetischen Läsionen der vorgeschalteten Proteine. Diese umfassen unter anderem Amplifikationen und Aktivierungsmutationen in Genen von RTKs, wie z.B. dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), oder PI3K sowie *loss-of-function*-Mutationen, Deletionen oder epigenetische Modulation des Tumorsuppressorgens PTEN.^{56,58,59}

Die Fehlregulationen dieser Proteine führen zur konstitutiven Aktivierung von Akt, welche in einer dauerhaften Weiterleitung anti-apoptotischer und Proliferations-fördernder Signale resultiert und somit zu unkontrolliertem Zellwachstum führt.^{27,44} Aktivierende somatische Mutationen von Akt selbst werden jedoch relativ selten in verschiedenen Tumorerkrankungen identifiziert, wobei die E17K-Mutation die prominenteste der Akt-Läsionen darstellt.⁶⁰⁻⁶² Neben Inzidenzen in Lungen-, Kolorektal-, Eierstock-Karzinomen und Melanomen kann in ungefähr 5 % der Patienten mit Estrogenrezeptor-positivem (ER⁺)-Brustkrebs diese Alteration als Treibermutation identifiziert werden.^{26,43,63} Abgesehen von Tumorerkrankungen spielt die E17K-Mutation insbesondere auch in der Entstehung von seltenen Überwucherkrankungen, wie dem Proteus Syndrom, eine tragende Rolle und konnte als prädiktiver Biomarker für diese Krankheit definiert werden.⁶⁴ Dabei führt der Austausch der negativ geladenen Glutaminsäure-Seitenketten zur basischen Aminosäure Lysin zu einer elektrostatischen Repulsion in der inaktiven PH-*in*-Konformation, welche das Gleichgewicht in Richtung der aktiven PH-*out*-Konformation verschiebt. Daraus resultiert die Rekrutierung von Akt an die Plasmamembran und eine konstitutive Aktivität der Kinase.^{60,65} Neben der E17K-Mutation sind nur wenige weitere Mutationen, wie die L52R, Q79K und D323H, bekannt, welche ebenfalls die Interaktion der Kinase- und PH-Domäne schwächen.⁶² Des Weiteren sind Genamplifikationen von Akt2 in diversen Tumorarten zu finden und die Überexpression von Akt ist außerdem mit einer Resistenzentwicklung gegenüber zielgerichteten Therapien sowie Strahlen- und Chemotherapie verbunden.⁶⁶⁻⁶⁹

Die hohe Signifikanz des PI3K/Akt-Signalwegs in diversen Tumorerkrankungen und insbesondere die Relevanz der Überaktivierung von Akt macht diese Kinase zu einem attraktiven Zielprotein in der Medizinischen Chemie.^{43,57} Dies wird zusätzlich durch die prominente Rolle der Akt-Aktivierung als Resistenzmechanismus gegenüber der Strahlen- und Chemotherapie sowie einer zielgerichteten Inhibition bei der Behandlung von Tumoren, deren onkogene Abhängigkeit durch andere Proteine definiert wird, bestärkt.^{69,70} Eine simultane Akt-Inhibition könnte hierbei einen effektiven Therapieansatz darstellen, um diese Resistenzen zu umgehen. Die Entwicklung zielgerichteter Wirkstoffe zur Inhibition von Akt sowie der onkogenen E17K-Mutante könnte somit insgesamt zu einer erfolgreichen Behandlung zahlreicher Tumorerkrankungen im Rahmen der Präzisionsmedizin führen.

1.2.1 Struktur und Regulation von Akt

Die Serin/Threonin-Kinase Akt, oder auch PKB genannt, gehört zur Familie der AGC Kinasen, wobei eine hohe strukturelle Ähnlichkeit der katalytischen Domäne zu den weiteren Mitgliedern, wie der Protein Kinase A (PKA), besteht.⁷¹ Die Proteine unterscheiden sich jedoch im globalen Aufbau deutlich, wobei die Struktur der Isoformen Akt1-3 in drei funktionelle Domänen unterteilt werden kann – die Kinase-Domäne, die N-terminale PH-Domäne (PHD) sowie das C-terminale regulatorische Fragment (Abbildung 3A).^{72,73}

Die hoch-konservierte Kinase-Domäne beinhaltet die katalytischen Regulationselemente, wie die für die Aktivierung notwendige Phosphorylierungsstelle Thr308 in der Aktivierungsschleife mit dem DFG-Motiv sowie die α C-Helix (Abbildung 3B). Weiterhin befindet sich in direkter Nähe zur Scharnierregion, welche die N- und C-terminalen Subdomänen der Kinase-Domäne verbindet, die ATP-Bindungstasche und damit das katalytische Zentrum.⁷² Eine weitere Domäne von Akt stellt die N-terminale PH-Domäne, bestehend aus ca. 120 Aminosäuren, dar. Diese wird über einen Linker einer Länge von ca. 30 Aminosäuren mit der Kinase-Domäne verbunden. Die hohe Flexibilität der Linker-Region ist dabei entscheidend für die Regulation der Kinase über die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen der PH-*out*- und PH-*in*-Konformation. Während im aktiven Zustand die Bindung von PIP₃ durch die PH-Domäne über polare Wechselwirkungen mit den Phosphatgruppen die offene PH-*out*-Konformation induziert, faltet sich im inaktiven Zustand die PH-Domäne auf die Kinase, sodass eine geschlossene PH-*in*-Konformation vorliegt (Abbildung 3B).^{49,74} Die Stabilisierung dieses Zustands wird durch eine polare Interaktionen der Seitenketten Glu17 in der PH-Domäne und Arg273 der Kinase-Domäne gewährleistet und durch weitere elektrostatische und unpolare Wechselwirkungen unterstützt. Mit der Verdrängung der α C-Helix sowie der Induktion der DFG-*out*-Konformation zeigen die regulatorischen Elemente die für inaktive Kinasen bekannten Strukturen.^{40,74,75} In der PH-*in*-Konformation kann das aktive Zentrum nicht durch ATP besetzt werden, die Faltung der beiden Domänen führt jedoch zur Ausbildung einer allosterischen Bindungstasche zwischen der Kinase- und PH-Domäne.⁷⁴ Akt umfasst weiterhin eine C-terminale Domäne über ca. 40 Aminosäuren, welche das hydrophobe Motiv (HM) und die weitere Aktivierungsstelle Ser473 beinhaltet.⁷²

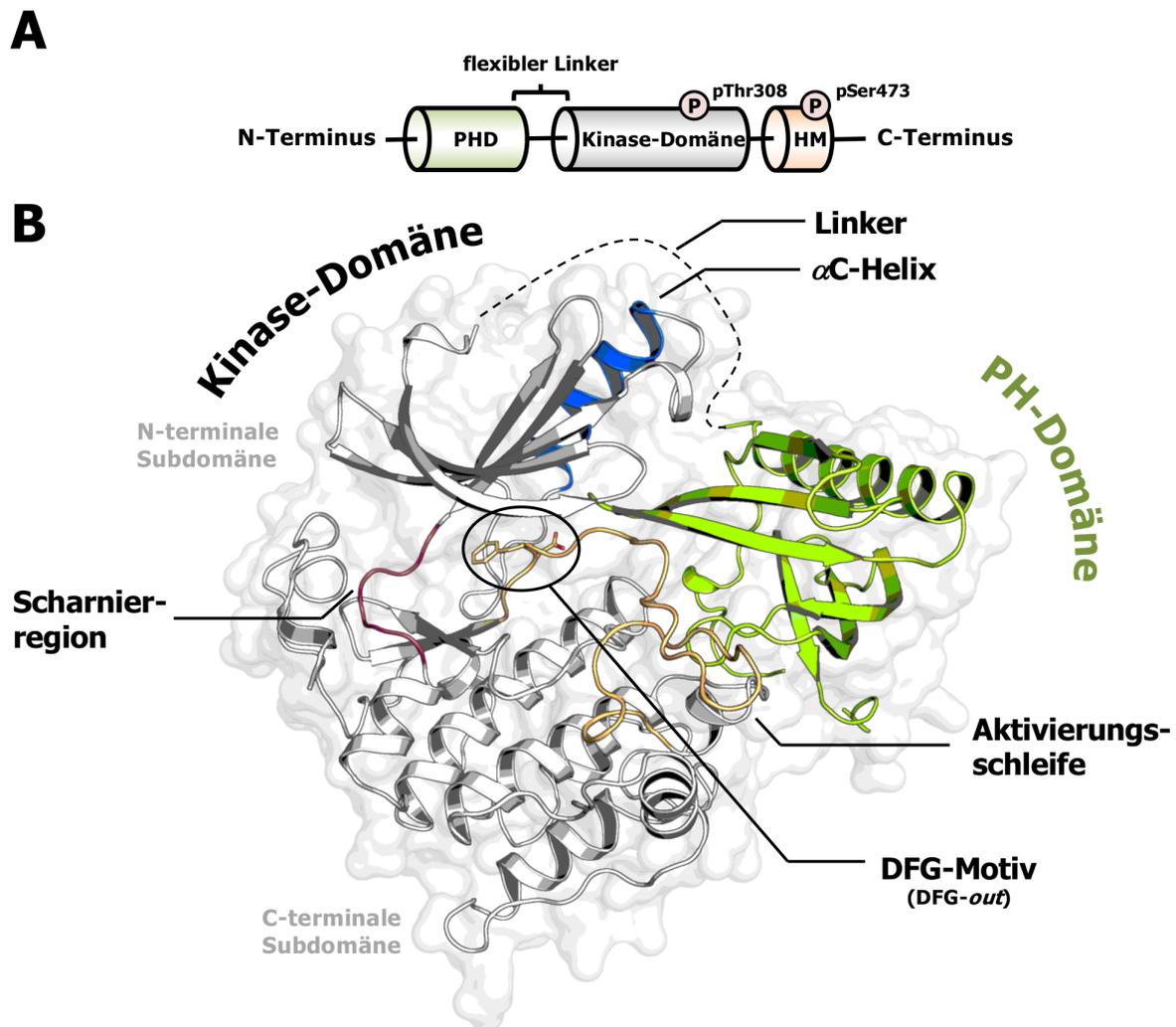


Abbildung 3: Struktur der Proteinkinase Akt. A: Überblick über die verschiedenen Domänen. Die N-terminale PH-Domäne (PHD, grün) wird über einen flexiblen Linker mit der Kinase-Domäne (grau) verbunden, welche die Phosphorylierungsstelle Thr308 enthält. Das C-terminale hydrophobe Motiv (HM, orange) trägt die Aktivierungsstelle Ser473. B: Kristallstruktur von Akt1 (PDB: 6HHJ). Die Kinase zeigt die inaktive PH-*in*-Konformation im DFG-*out*-Zustand (gelb) und herausgedrängter α C-Helix (blau). Die Aktivierungsschleife ist rot dargestellt. Die Kinase-Domäne (grau) und die PH-Domäne (grün) bilden einen Komplex, der eine allosterische Bindungstasche formt. Der Linker ist in der Kristallstruktur nicht aufgelöst und daher gestrichelt dargestellt.

Die Regulation der Kinase-Aktivität über die Verschiebung des Gleichgewichts der aktiven PH-*out*-Konformation und der inaktiven PH-*in*-Konformation spielt auch für die Entwicklung zielgerichteter Wirkstoffe zur Adressierung von Akt eine zentrale Rolle. In den letzten Jahrzehnten wurden verschiedene Inhibitor Klassen entwickelt, welche sich in der Stabilisierung der jeweiligen Konformation von Akt bedeutend unterscheiden.^{43,57,59}

1.2.2 Investigative Verbindungen zur Adressierung von Akt

Die verschiedenartigen Ansätze zur Inhibition von Akt beruhen auf der Adressierung unterschiedlicher Bindungstaschen des Proteins durch kleine Moleküle (Abbildung 4).^{43,57} Eine der ersten beschriebenen Inhibitorclassen von Akt stellen ATP-kompetitive Inhibitoren dar, welche im Feld der Kinase-Inhibitoren einen klassischen Ansatz repräsentieren und den größten Anteil der zugelassenen Wirkstoffe ausmachen.^{43,76} Dabei basiert der Wirkungsmechanismus auf der Besetzung der ATP-Bindungstasche durch den Inhibitor in der aktiven Kinase-Konformation von Akt, sodass eine ATP-Bindung und somit die Signaltransduktion verhindert wird.^{40,76} Mit dem von GlaxoSmithKline 2008 entwickelten Aminofurazan-Derivat GSK690693 wurde der erste ATP-kompetitive Akt-Inhibitor auf seine Effizienz in klinischen Studien untersucht. Aufgrund starker Nebenwirkungen, wie insbesondere Hyperglykämie, musste jedoch die klinische Entwicklung des Inhibitors beendet werden.^{77,78} Mit alternativen Grundgerüsten, wie den Pyrrolopyrimidin-Derivaten, konnte durch medizinisch-chemische Optimierung eines Vorläufermoleküls durch AstraZeneca 2012 der ebenfalls hoch-potente ATP-kompetitive Inhibitor Capivasertib entwickelt werden, welcher ein verbessertes Selektivitätsprofil zeigte.^{79,80} Capivasertib wird derzeit in mehreren Phase I/II klinischen Studien in Mono- und Kombinationstherapie zur Behandlung diverser solider Tumore untersucht.^{81,82} Aufgrund der überwiegend limitierten Effizienz in der Monotherapie wird insbesondere die Kombination mit Zytostatika in klinischen Studien getestet.⁸³ Die vielversprechendsten klinischen Daten mit einer Capivasertib-Monotherapie konnten jedoch in Patienten mit Akt1^{E17K}-mutierten soliden Tumoren erzielt werden.^{59,63} In einer ersten multihistologischen Studie profitierten Patienten mit beispielsweise ER⁺-Brustkrebs oder Endometriumkarzinomen, welche die Akt1^{E17K}-Mutation aufwiesen, von der Behandlung mit Capivasertib, die teilweise zu partieller Remission des Tumolvolumens führte. Mit dieser Studie konnte erstmals die klinische Adressierbarkeit von Akt1^{E17K} in humanen Karzinomen und die Identifizierung dieses Onkogens als prädiktiver Biomarker erfolgen.⁶³ Dennoch konnten auch durch die Behandlung mit Capivasertib dosis-limitierende Nebenwirkungen, wie Hyperglykämie, Hautausschlag und Diarrhö, beobachtet werden.^{63,81} Mit dem Wirkstoff Ipatasertib des Pharmakonzerns Genentech, welcher auf einem Cyclopentapyrimidin-Grundgerüst basiert, wird derzeit ein weiterer ATP-kompetitiver Akt-Inhibitor in Phase I/II klinischen Studien untersucht.⁸⁴⁻⁸⁹ Dabei zeigt Ipatasertib die zu Capivasertib analogen Limitationen der klinischen Effizienz in der Monotherapie solider Tumore und die bekannten Nebenwirkungen.⁸⁶

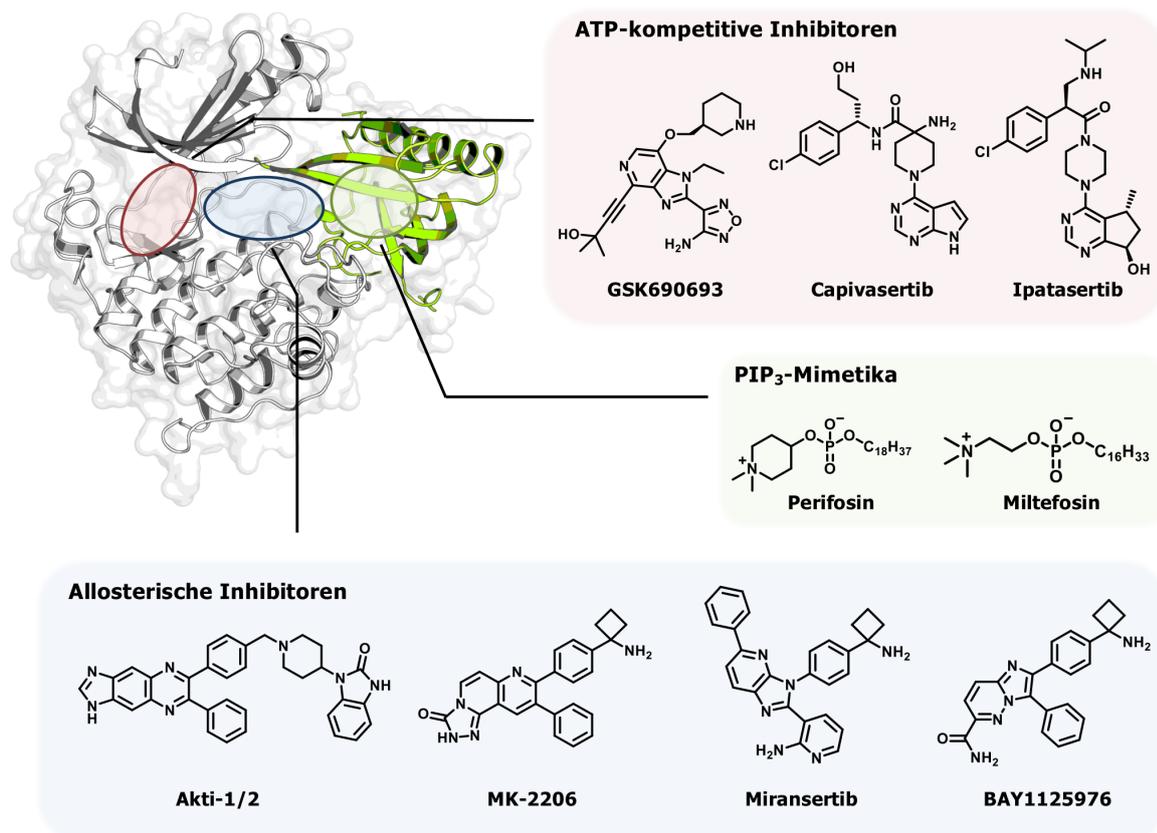


Abbildung 4: Adressierung unterschiedlicher Bindungstaschen von Akt durch die verschiedenen investigativen Akt-Inhibitoren. Rot: Strukturen der ATP-kompetitiven Inhibitoren GSK690693, Capivasertib und Ipatasertib. Grün: Strukturen der Alkylphospholipide und PIP₃-Mimetika Perifosin und Miltefosin. Blau: Strukturen der allosterischen Akt-Inhibitoren Akti-1/2, MK-2206, Miransertib und BAY1125976.

Der nur begrenzte klinische Erfolg der Monotherapie mit ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren in Akt-überaktivierten Tumoren spiegelt die Notwendigkeit einer Identifizierung geeigneter Biomarker zur effizienten Therapie von Tumoren mit Läsionen Akt-vorgeschalteter Proteine wider.⁹⁰ Die Komplexität der vom Akt-Signal abhängigen Dysregulationen erschwert jedoch die Vorhersage einer erfolgreichen Therapie, sodass prädiktive Biomarker für Tumortypen mit Alterationen im PI3K/Akt-Signalweg bisher nicht ausreichend erforscht sind. Abgesehen von Akt1^{E17K}-mutierten Tumoren ist somit die klassische Definition der onkogenen Abhängigkeit in diesen Fällen durch die komplexen Akt-Regulationsmechanismen begrenzt.^{91,92} Ein tieferes Verständnis über gewebespezifische und genotypische Ursachen der Akt-Überaktivierung ist daher für die erfolgreiche Präzisionsmedizin mit Akt-Inhibitoren von zentraler Bedeutung.^{59,92} Insbesondere die teilweise starken Nebenwirkungen der ATP-kompetitiven Inhibitoren stellen jedoch die größte Limitation dieser Inhibitor-Klasse dar. Ursächlich dafür ist die fehlende Selektivität dieser Inhibitoren, welche die hoch-konservierte ATP-Bindungstasche adressieren und somit zu *off-target*-Effekten führen. Zu den inhibierten Proteinen neben Akt gehören vor allem die verwandten Kinasen der AGC Kinase-Familie, wie PKA oder die Rho-assoziierte Proteinkinase ROCK.⁹³

Eine weitere Akt-Inhibitor-Klasse wird durch die Alkylphospholipide, wie beispielsweise Miltefosin oder Perifosin, gebildet.^{94,95} Diese PIP₃-Mimetika adressieren dabei die PH-Domäne und inhibieren die Kinase durch Verhinderung der Rekrutierung von Akt an die Plasmamembran zur Aktivierung des Proteins.^{96,97} Durch limitierende pharmakokinetische Eigenschaften dieser Verbindungen blieb jedoch ein signifikanter klinischer Erfolg aus, der zudem durch gastrointestinale Toxizität und Nebenwirkungen begleitet wurde.^{98,99} Wie auch für ATP-kompetitive Inhibitoren konnte dies auf eine verminderte Selektivität der PIP₃-Mimetika zurückgeführt werden, da auch die PH-Domäne eine hoch-konservierte Struktur im Proteom darstellt.¹⁰⁰

Die gewünschte Selektivität von Akt-Inhibitoren konnte jedoch mit allosterischen Verbindungen erzielt werden, welche im Rahmen eines Hochdurchsatz-*Screenings* (HTS, engl. *high-throughput screening*) mit 2,3-Diphenylchinoxalin-Derivaten zufällig identifiziert werden konnten.¹⁰¹ Die weitere Entwicklung hin zum Imidazochinoxalin-basierten Inhibitor Akti-1/2 und der trizyklischen Naphthyridin-basierten Verbindung MK-2206 durch Merck & Co führte zur weiteren Potenzsteigerung und einer erstmaligen gewissen Selektivität gegenüber den einzelnen Akt-Isoformen.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Der zunächst lediglich postulierte PH-abhängige Bindungsmodus dieser Inhibitoren auf Basis aktivitäts-basierter Assays konnte 2010 mit der ersten Vollängen-Kristallstruktur von Akt1 im Komplex mit Akti-1/2 bestätigt werden.^{74,101,105} Dabei wurde die Stabilisierung der inaktiven PH-*in*-Konformation durch Besetzung der allosterischen Bindungstasche deutlich, welche insbesondere durch eine π - π -Stapelwechselwirkung des Imidazochinoxalin-Grundgerüsts mit Trp80 in der PH-Domäne aufrecht erhalten wird.⁷⁴ Die Adressierung dieser einzigartigen Bindungstasche lieferte zudem die Erklärung für das deutlich gesteigerte Selektivitätsprofil der allosterischen Modulatoren im Vergleich mit den ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren.^{74,106} Diverse Phase I/II klinische Studien der Mono- und Kombinationstherapie in verschiedenen Tumorerkrankungen mit dem allosterischen Inhibitor MK-2206 sind Bestandteil der derzeitigen klinischen Entwicklung, wobei ein zufriedenstellendes Sicherheitsprofil der Verbindung sowie verminderte hyperglykämische Nebenwirkungen im Vergleich zu ATP-kompetitiven Inhibitoren gezeigt werden konnten.¹⁰⁷⁻¹¹⁰ Nichtsdestotrotz kann auch mit MK-2206 in der Monotherapie bislang kein Durchbruch einer effizienten Tumorbehandlung durch die Akt-Inhibition erzielt werden. Dies ist ebenso wie im Falle der ATP-kompetitiven Inhibitoren hauptsächlich auf das Fehlen prädiktiver Biomarker zurückzuführen.⁹²

Mit den von ArQule im Jahr 2012 entwickelten Inhibitoren Miransertib und Arq751 sowie dem Wirkstoff BAY1125976 der Bayer AG sind derzeit drei weitere allosterische Inhibitoren in Phase I/II klinischen Studien vertreten.¹¹¹⁻¹¹⁶ Das Imidazopyridin-Derivat Miransertib und der weitere Inhibitor dieser Molekülklasse, Arq751, wurden bzw. werden derzeit für die Behandlung solider Tumore mit Läsionen in PI3K, Akt oder PTEN getestet, wobei für beide Inhibitoren eine gute Tolerierbarkeit erzielt werden konnte.¹¹⁵⁻¹¹⁹ Miransertib wird außerdem in hauptsächlich durch Akt1^{E17K}-verursachten Überwucherkrankungen, wie dem Proteus Syndrom oder Syndromen des PIK3CA-*related overgrowth spectrum* (PROS), in mehreren Phase I/II Studien untersucht.⁶⁴ Erste Analysen nach der Behandlung mit Miransertib deuten dabei auf eine vorteilhafte Krankheitsentwicklung in Patienten mit

Proteus Syndrom hin.^{120,121} Der Inhibitor BAY1125976 zeigte ebenfalls in einer initialen Phase I-Studie eine gute Verträglichkeit, konnte jedoch keine signifikante Tumorremission erzielen.¹²²

Das bisherige Ausbleiben einer effizienten klinischen anti-Tumor-Effektivität mit den beschriebenen Akt-Inhibitoren unterstreicht die Notwendigkeit der Identifizierung prädiktiver Biomarker und ein Verständnis der Tumorbilogie in Patienten mit überaktiviertem Akt-Signal durch genetische Läsionen vorgeschalteter Proteine. Innovative Sondenmoleküle könnten dabei das molekulare Werkzeug zur Auflösung der komplexen Akt-Aktivierungsmechanismen liefern und somit die Herausforderungen der Therapie mit Akt-Inhibitoren überwinden. Eine derartige Inhibitor-Klasse konnte mit den kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren (CAAIs, engl. *covalent allosteric Akt inhibitors*) entwickelt werden.¹²³

1.2.3 Kovalent-allosterische Akt-Inhibitoren

In den letzten Jahrzehnten erlangten kovalente Kinaseinhibitoren aufgrund ihrer enormen Vorteile gegenüber den reversiblen Gegenspielern immer größer werdende Relevanz.^{124,125} Mit dem EGFR-Inhibitor Osimertinib konnte somit beispielsweise ein Durchbruch in der Behandlung des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC, engl. *non-small cell lung cancer*) mit der Zulassung 2017 erzielt werden.^{126,127} Die irreversible Modifikation des Zielproteins durch die derzeit prominenteste reaktive Gruppe (engl., *warhead*) innerhalb der durch die FDA zugelassenen kovalenten Kinaseinhibitoren, dem elektrophilen Acrylamid, erfolgt dabei an die nukleophile Thiolgruppe einer Cystein-Seitenkette.¹²⁴ Die enormen Vorteile, die diese irreversible Modifikation mit sich bringt, umfasst eine maximale Verweildauer des Inhibitors am Zielprotein, sodass die Inhibition lediglich durch die Re-Synthese des Proteins limitiert ist. Die langlebige Inaktivierung des Zielproteins führt daher typischerweise zu einer Potenzsteigerung, welche eine geringere und weniger häufige Dosierung ermöglicht, sodass dosis-limitierende Toxizitäten reduziert werden.^{128,129} Des Weiteren kann durch die Adressierung einer spezifischen Cystein-Seitenkette im Zielprotein eine zusätzliche Selektivität der Verbindungen erreicht werden.^{130,131} Nichtsdestotrotz birgt die Verwendung reaktiver Gruppen im Molekül auch Risiken, welche beispielsweise toxische *off-target*-Effekte mit sich ziehen können.¹³² Daher ist die sorgfältige Wahl des elektrophilen *warheads* von zentraler Bedeutung, sodass eine moderate Reaktivität vorhanden ist, die jedoch für die kovalente Modifikation der Cystein-Seitenkette ausreicht.^{124,131} Neben der therapeutischen Anwendung kovalenter Inhibitoren weist diese Verbindungsklasse auch ein enormes Potential zur Verwendung als Sondenmoleküle in der Chemischen Biologie auf. Mit Hilfe derartiger chemischer Werkzeuge können somit bisher ungeklärte Mechanismen einer Proteinregulation oder der Tumorbilogie aufgeklärt werden.^{92,133}

Mit dem Hintergrund des bislang begrenzten Verständnisses der Akt-Regulation in PI3K/Akt-alterierten Tumoren sowie unzureichender klinischer Effizienz der bisherigen Akt-Inhibitoren, wurde somit durch WEISNER und GONTLA im Jahr 2015 die Entwicklung

kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren initiiert (Abbildung 5).¹²³ Auf Grundlage der bekannten jeweiligen Stärken sollte mit dieser neuartigen Inhibitor-Klasse insbesondere die herausragende Selektivität der allosterischen Akt-Inhibitoren mit dem Vorteil der maximalen Verweildauer und Potenzsteigerung durch reversible Modulatoren kombiniert werden.

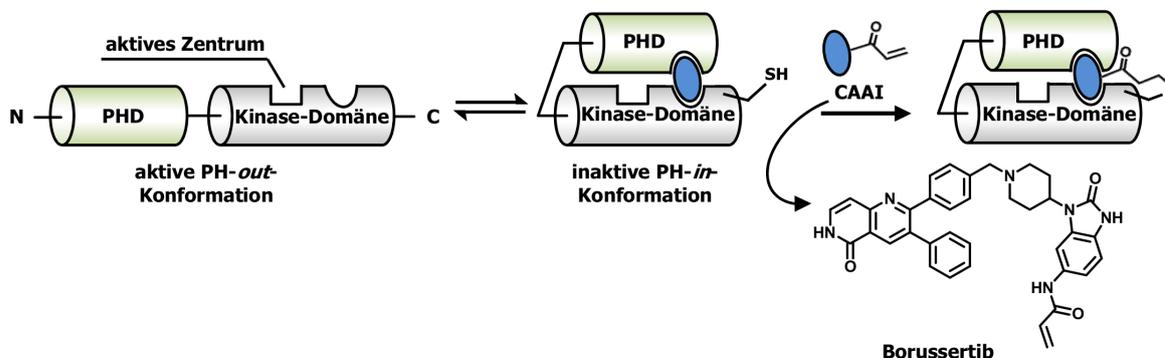


Abbildung 5: Prinzip der kovalent-allosterischen Akt-Inhibition. Die Stabilisierung der inaktiven PH-*in*-Konformation und eine hohe Selektivität wird durch Bindung in der allosterischen Tasche erreicht. Die zusätzliche Dekoration mit einem elektrophilen *warhead* führt außerdem zur kovalenten Adressierung von Cys296 und Cys310, sodass eine maximale Verweildauer des Liganden in der Bindungstasche erzielt wird. Darstellung adaptiert nach WEISNER und GONTLA *et al.*¹²³

Mit Hilfe struktureller Betrachtungen der allosterischen Bindungstasche von Akt1 im Komplex mit den allosterischen Inhibitoren Akti-1/2 und einem Imidazopyridin-Derivat konnten in der Aktivierungsschleife zwei redox-sensitive Cystein-Seitenketten, Cys296 und Cys310, identifiziert werden, welche durch eine Acrylamid-Gruppe potentiell adressiert werden können.^{74,123,134} Aus diesen strukturbasierten Analysen entstand eine Bibliothek 1,6-Naphthyridinon-basierter Inhibitoren mit verschiedenen Derivaten des östlichen Molekülteils, welche mit dem Acrylamid-*warhead* dekoriert wurden.¹³⁵⁻¹³⁸ Mit einer gesteigerten biochemischen Potenz im Vergleich mit dem allosterischen klinischen Kandidaten MK-2206 konnte dabei die Leitstruktur Borussertib, welche das Benzo[*d*]imidazol-Grundgerüst im östlichen Molekülteil aufweist, identifiziert werden.^{123,139} Massenspektrometrische Analysen konnten außerdem die kovalente Modifikation des jeweiligen Cysteins in der Aktivierungsschleife bestätigen. Weiterhin weist Borussertib ein außerordentliches Selektivitätsprofil gegenüber den 100 getesteten Kinasen auf, sodass die Gesamtheit der Daten die weitergehende präklinische Entwicklung von Borussertib unterstützt.¹²³

Die kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren stellen insgesamt einen vielversprechenden Ansatz zur effizienten Inhibition des überaktivierten Akt-Signals in Erkrankungen, welche aus Alterationen des PI3K/Akt-Signalwegs resultieren, dar. Darüber hinaus kann möglicherweise mit Hilfe chemisch-biologischer Ansätze unter Verwendung dieser innovativen Inhibitor-Klasse ein tiefgehendes Verständnis der bisher ungeklärten Mechanismen zur Akt-Regulation erreicht werden.

1.3 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Die Entwicklung der CAAs auf Grundlage struktureller Informationen ist nur eines von vielen Beispielen, welche das enorme Potential des strukturbasierten Wirkstoffdesigns (SBDD) verdeutlichen. Tatsächlich erlangt dieser rationale Ansatz immer größer werdende Beliebtheit, was vor allem auf die höhere Effizienz und ökonomischen Vorteile im Vergleich zur klassischen HTS-basierten Leitstruktur-Identifizierung zurückzuführen ist.¹⁴⁰ Dabei geht die rationale Wirkstoffforschung den zum HTS umgekehrten Weg, indem zunächst ein spezifisches Zielprotein gewählt wird und auf Grundlage der 3D-Struktur das Design, die Synthese und das *Screening* einer fokussierten Bibliothek erfolgt (Abbildung 6).^{141,142} Die Verfügbarkeit zahlreicher 3D-Strukturen klinisch relevanter Proteine sowie die stetige Entwicklung computergestützter Technologien der Medizinischen Chemie hat das SBDD in den letzten Jahrzehnten zu einer fundamentalen Methode der Wirkstoffforschung werden lassen. Das fokussierte Design einer Bibliothek an kleinen Molekülen, welche spezifisch die Bindungstasche eines Zielproteins adressieren, führt letztendlich zu einer schnelleren, kostengünstigeren und effizienteren Leitstruktur-Identifizierung und deren Optimierung.^{140,143}

Nach Auswahl eines therapeutischen Zielproteins ist der fundamentalste Schritt des iterativen SBDD-Prozesses, welcher bis zur Identifizierung einer geeigneten Leitstruktur mehrere Zyklen durchläuft, die Gewinnung der dreidimensionalen Struktur des Proteins.¹⁴³ Die prominenteste Methode zur Auflösung der Proteinstruktur stellt die Röntgenstrukturanalyse dar, welche mit ca. 89 % der fast 150.000 in der Protein Data Bank (PDB) publizierten Proteinstrukturen seit mehr als 30 Jahren den Grundstein des SBDD legt. Weitere biophysikalische Methoden, wie die NMR-Spektroskopie (ca. 8 %) oder die Cryo-Elektronenmikroskopie (ca. 3 %), lieferten bislang nur einen kleinen Teil der publizierten Proteinstrukturen.^{144,145} Die Röntgenstrukturanalyse stellt jedoch ein komplexes Feld der Grundlagenforschung dar und ist oftmals mit langwierigen und zahlreichen Experimenten zur Identifizierung von Bedingungen verbunden, welche das Wachstum von hoch-qualitativen Kristallen initiieren, die für Röntgenbeugungsexperimente geeignet sind.¹⁴⁶ Ideale Voraussetzungen für das SBDD liefert zudem ein Kristallisationssystem, welches die Generierung von Komplexstrukturen mit möglichst vielen der im Rahmen des SBDD synthetisierten Liganden ermöglicht.¹⁴⁴ Insbesondere in einem akademischen Umfeld stehen die infrastrukturellen Ressourcen, welche für diese komplexen Experimente notwendig sind, oftmals nicht zur Verfügung und limitieren somit den Erfolg des SBDD abseits der industriellen Forschung. Mit akademischen Plattformen, wie beispielsweise der Protein XtalZation Infrastructure Dortmund (ProXID), werden jedoch Infrastrukturen geliefert, welche optimale Bedingungen für eine effiziente Leitstruktur-Identifizierung und Optimierung in der Grundlagenforschung schaffen (Kapitel 3.2.1).

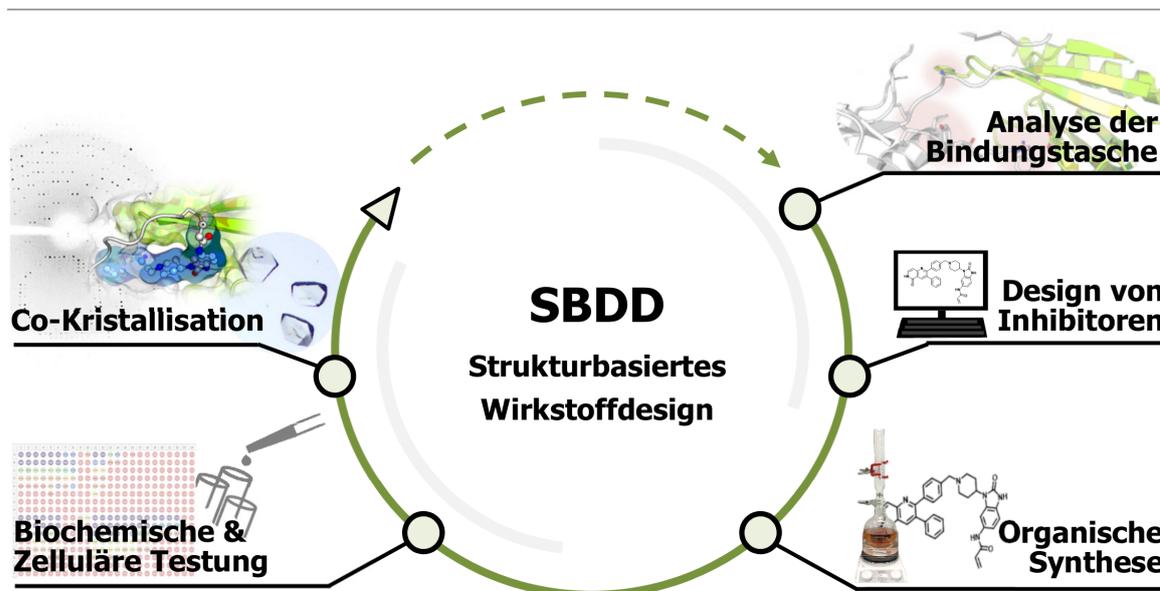


Abbildung 6: Prozess des strukturbasierten Wirkstoffdesigns. Auf Grundlage struktureller Informationen und Analyse der potentiellen Bindungstasche wird mit Hilfe computergestützter Methoden eine fokussierte Substanzbibliothek generiert. Die synthetisierten Verbindungen werden in biochemischen und zellulären Assays evaluiert und der Bindungsmodus der vielversprechendsten Kandidaten durch Co-Kristallisation mit dem Zielprotein aufgeklärt. Diese Informationen fließen in weitere Zyklen ein, sodass eine Optimierung hin zu einer Leitstruktur erfolgt.¹⁴²

Konnte ein valides System zur Kristallisation des Zielproteins etabliert werden, schließt sich die Identifizierung und Analyse einer potentiell zu adressierenden Bindungstasche und anhand dessen das *in silico* Design einer fokussierten Substanzbibliothek an (Abbildung 6).^{140,143} Dieser Schritt wird durch computergeschützte Methoden enorm unterstützt, wobei Technologien wie das strukturbasierte virtuelle *Screening* von Substanzbibliotheken diverser Datenbanken, molekulares *Docking* und Molekulardynamik-(MD)-Simulationen angewandt werden.¹⁴⁷ Mit diesen Methoden wird die Bindung kleiner Moleküle oder Fragmente unterschiedlicher Konformationen in der adressierten Tasche vorhergesagt und mit Hilfe eines *Scoring*-Systems basierend auf den potentiellen Interaktionen und Bindungsenergien ein Ranking erstellt.¹⁴⁰ Neben der Relevanz für das klassische SBDD stellt dieser Schritt außerdem im Feld des Fragment-basierten Wirkstoffdesigns ein wichtiges Werkzeug zum Wachstum der Verbindungen hin zu effizienten Modulatoren dar.¹⁴⁸ Im Vergleich zum HTS liefert dies zudem einen entscheidenden Vorteil hinsichtlich der Zeit- und Kostenersparnisse.¹⁴⁰ Anhand des Rankings kann anschließend eine fokussierte Substanzbibliothek definiert werden, wobei die synthetische Zugänglichkeit der gewählten Verbindungen ebenfalls eine wichtige Rolle spielt. Nach erfolgreicher Synthese der Substanzen schließt sich die biochemische und zelluläre Evaluierung in verschiedenen Modellsystemen an. Im Rahmen von biochemischen Assays wird somit zunächst die Affinität und Potenz der Verbindungen getestet sowie in komplexeren zellulären Modellsystemen die selektive Modulation des Zielproteins und der gewünschte phänotypische Effekt untersucht. Anhand dieser Daten können vielversprechende Liganden ausgewählt werden, deren Bindungsmodus und Interaktionsprofil im Komplex mit dem Zielprotein durch die Strukturanalyse aufgelöst wird. Durch das grundlegende Verständnis über essentielle Protein-Liganden-Interaktionen, gewonnen aus

Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Untersuchungen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR), können diese Informationen anschließend für einen weiteren Zyklus des SBDD verwendet werden.^{140,143} Dieser iterative Prozess zur Optimierung einer Leitstruktur kann letztendlich zur Entwicklung eines zielgerichteten Wirkstoffkandidaten führen, welcher eine effiziente Modulation des Zielproteins in der personalisierten Medizin ermöglicht.

2 MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

Fehlende prädiktive Biomarker und die Komplexität der Akt-Regulierung in Tumoren und Erkrankungen mit Alterationen im PI3K/Akt-Signalweg erschweren den Erfolg der bisher entwickelten Akt-Inhibitoren in klinischen Studien. Eine Zulassung von Akt-Inhibitoren zur Behandlung dieser Erkrankungen konnte daher aufgrund unzureichender Effizienz bislang nicht erfolgen. Die Signifikanz von Akt als Schlüsselprotein des PI3K/Akt-Signalwegs und die Akt-Überaktivierung in diversen Tumortypen unterstreicht jedoch die Notwendigkeit eines effektiven Modulators zur Inhibition von Akt. Die Selektivitätsnachteile der ATP-kompetitiven Akt-Inhibitoren konnten zwar durch allosterische Inhibitoren überwunden werden, dennoch bleibt weiterhin der gewünschte klinische Erfolg aus. Die Entwicklung des kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors Borussertib führte dagegen bereits in biochemischen Assays zu einer effizienteren Akt-Inhibition im Vergleich zu den klinischen Kandidaten. Durch die Kombination der erhöhten Selektivität und einer maximalen Inhibitionsdauer durch die zusätzliche irreversible Modifikation zweier Cysteine in der Aktivierungsschleife könnte diese neuartige Inhibitor-Klasse somit die bisherigen Limitationen überwinden. Weiterhin bieten diese kovalenten Inhibitoren die Möglichkeit zur Anwendung als molekulare Werkzeuge für die Identifizierung prädiktiver Biomarker und zur Untersuchung der komplexen Biologie von Tumoren mit Alterationen im PI3K/Akt-Signalweg. Anhand dieser Experimente könnte eine optimale zielgerichtete Behandlungsstrategie für die Patienten zur Verfügung gestellt werden.

Um die bereits in biochemischen Experimenten nachgewiesene Überlegenheit von Borussertib gegenüber den klinischen Kandidaten weitergehend zu validieren, sollten im Rahmen dieser Arbeit zelluläre Modellsysteme etabliert werden, welche die Untersuchung der anti-proliferativen Aktivitäten sowie der intrazellulären *on-target*-Inhibition der verschiedenen Akt-Inhibitoren ermöglichen. Mit Hilfe dieser Studien sollte die effiziente und spezifische Akt-Modulierung der CAAs evaluiert werden, um Borussertib als geeigneten Kandidaten für die weitere präklinische Entwicklung im Rahmen von *in vivo*-Wirksamkeitsstudien in Patienten-abgeleiteten Tumormodellen zu profilieren.

Ein tiefergehendes Verständnis der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sowie die strukturbasierte Optimierung der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren sind abhängig von der Etablierung eines validen Kristallisationssystems zur Erhaltung von Komplexstrukturen mit diversen CAAs. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Expressions-, Reinigungs- und Kristallisationsstrategie für die Kristallisation des Akt1 Wildtyps (Akt1^{WT}) festgelegt werden, welche eine verlässliche Reproduktion der zuvor identifizierten Kristallisationsbedingungen ermöglicht. Mit den etablierten Bedingungen sollten Komplexstrukturen mit verschiedenen kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren erhalten werden, sodass eine strukturbasierte Optimierung und das Design neuartiger CAA-Inhibitor-Klassen, wie beispielsweise Akt-Isoform-spezifischer CAAs, ermöglicht wird.

Die Adressierung der onkogenen Akt1 E17K-Mutation (Akt1^{E17K}), als Ausnahme eines prädiktiven Biomarkers in Akt-überaktivierten Tumoren und Überwuchererkrankungen, und

das Verständnis der konformationellen Veränderungen durch die Mutation in der PH-Domäne sollte durch die Röntgenstrukturanalyse unterstützt werden. Daher sollten Kristallisationsbedingungen für Akt1^{E17K} identifiziert und die Kristallstruktur des Proteins aufgelöst werden. Mit der weiteren biochemischen und zellulären Charakterisierung sollte außerdem die Inhibition dieser Mutante durch die verschiedenen Akt-Inhibitorklassen evaluiert werden. Mit Hilfe des murinen Ba/F3-Systems sollte dafür eine Zelllinie generiert werden, welche die Darstellung der onkogenen Abhängigkeit von der Akt1^{E17K}-Mutation ermöglicht und die Untersuchung der anti-proliferativen Aktivitäten und intrazellulären Inhibition des Akt-Signals erlaubt.

Die für Akt erlernten Methoden zur Etablierung eines robusten Kristallisationssystems sollten außerdem auf weitere Zielproteine zur Adressierung der Rezeptortyrosinkinasen c-Kit und PDGFR α übertragen werden, um das strukturbasierte Design von GIST-Inhibitoren zu ermöglichen. Dafür sollten zunächst die verschiedenen klinisch relevanten Onkogene dargestellt und die literaturbeschriebenen Reinigungs- und Kristallisationsbedingungen reproduziert werden, sodass eine Röntgenstrukturanalyse der Proteine im Komplex mit den im Rahmen des Projekts synthetisierten Inhibitoren durchgeführt werden kann.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Präklinische Charakterisierung des kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors Borussertib

Das enorme Potential der von WEISNER und GONTLA *et al.* entwickelten kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren (CAAI) konnte bereits in biochemischen Experimenten gezeigt werden. Insbesondere für das auf dem 1,6-Napthyridinon-Grundgerüst basierenden Molekül Borussertib wurde dabei im Vergleich mit den klinischen Kandidaten an Akt-Inhibitoren eine gesteigerte inhibitorische Aktivität nachgewiesen.¹²³ Um die mögliche therapeutische Effizienz dieser neuartigen Inhibitoriklasse zur irreversiblen Adressierung der Serin/Threonin-Kinase Akt weitergehend zu evaluieren, ist die präklinische Testung dieser Verbindungen ein essentieller Schritt. Dies beinhaltet zunächst die Betrachtung der Wirksamkeit der CAAs in komplexeren *in vitro*-Modellsystemen, wie verschiedenen humanen Krebszelllinien, zur Untersuchung des anti-proliferativen Effekts und der Pharmakodynamik. Des Weiteren stellt die Validierung der *in vitro*- und *in vivo*-Pharmakokinetik sowie der Wirksamkeit in relevanten *in vivo*-Modellen eine zentrale Rolle in der präklinischen Entwicklung der CAAs dar.

3.1.1 Zelluläre Evaluierung des kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors Borussertib

Während die biochemische Testung mit isolierten Proteinen eine einfache und schnelle Möglichkeit zur Charakterisierung von Inhibitoren bietet, hat die Verwendung zellulärer Modelle den Vorteil der Berücksichtigung komplexerer Parameter, welche für die präklinische Entwicklung bestimmend sind. Dazu gehören unter anderem die Membrangängigkeit der Verbindungen oder das Zusammenspiel und die Regulation unterschiedlicher Signalkaskaden sowie Protein-Protein-Interaktionen innerhalb einer Zelle. Zudem können die niedermolekularen Verbindungen hinsichtlich einer möglichen Zytotoxizität und *off-target*-Effekte untersucht werden. In dem in dieser Arbeit verwendeten kommerziellen CellTiter-Glo Assay (Promega) wurde zunächst der Einfluss der Akt-Inhibitoren auf die Zellproliferation verschiedener humaner Krebszelllinien mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund untersucht.* Grundlegend dafür ist die Quantifizierung der viablen und somit metabolisch aktiven Zellen über den Adenosintriphosphat-Gehalt nach der Zelllyse. Durch Umsetzung von Luciferin in das lumineszente Oxyluciferin mittels der ATP-abhängigen Luciferase-Reaktion wird ein Lumineszenzsignal erzeugt, welches eine Proportionalität zum ATP-Gehalt des Lysates aufweist. Dieses wiederum ist proportional zur Anzahl an lebenden Zellen.

* Etablierung der zellulären Testsysteme und zelluläre Evaluierung in Zusammenarbeit mit Dr. Jörn Weisner (AG D. Rauh, TU Dortmund).

Die humanen Krebszelllinien, welche als zelluläre Testsysteme im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurden, unterscheiden sich sowohl in der Art des abgeleiteten Gewebes als auch in den genetischen Läsionen derer die onkogene Abhängigkeit unterliegt (Tabelle 3-1). Um die anti-proliferative Aktivität der Akt-Inhibitoren auflösen zu können, wurden insbesondere Zellsysteme verwendet, welche Dysregulationen in dem zu adressierenden PI3K/Akt-Signalweg aufweisen. Dazu gehören die Brustkrebs-Zelllinien BT-474¹⁴⁹, MCF-7¹⁵⁰, T-47D¹⁵¹, und ZR-75-1¹⁵² sowie die Endometriumkarzinom-Zelllinie AN3-CA¹⁵³ und die Blasenkrebs-Zelllinie KU-19-19¹⁵⁴. Die genetischen Läsionen umfassen dabei *in-frame*-Deletionen in PIK3R1, *frameshift*- und Punktmutationen in PTEN sowie Aktivierungsmutationen in AKT1, PIK3CA und NRAS. Diese Zelllinien wurden außerdem für die zelluläre Evaluierung der bereits in der Literatur beschriebenen Akt-Inhibitoren verwendet.^{112,134} Neben der NRAS-mutierten Zelllinie KU-19-19 wurden außerdem die KRAS-mutierten Pankreas-Zelllinien Dan-G¹⁵⁵ und HPAF-II¹⁵⁶ charakterisiert, welche keine Abhängigkeit vom PI3K/Akt-Signalweg aufweisen und somit unter anderem der Untersuchung möglicher zytotoxischer Effekte der Akt-Inhibitoren dienen.

Tabelle 3-1: Übersicht der verwendeten humanen Krebszelllinien zur Charakterisierung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren und die jeweils relevanten genetische Läsionen nach der COSMIC-Datenbank.¹⁵⁷

Zelllinie	Gewebeart	Genetische Läsion
AN3-CA	Endometrium	PIK3R1 ^{R557_K561>Q} , PTEN ^{R130fs} , TP53 ^{R213Q}
BT-474	Brust	PIK3CA ^{K111N} , TP53 ^{E285K}
Dan-G	Pankreas	KRAS ^{G12V} , ERBB3 ^{I950T}
HPAF-II	Pankreas	KRAS ^{G12D} , TP53 ^{P151S}
KU-19-19	Blase	PIK3CA ^{R1023Q} , AKT1 ^{E17K/E49K} , NRAS ^{Q61R}
MCF-7	Brust	PIK3CA ^{E545K}
T-47D	Brust	PIK3CA ^{H1047R} , TP53 ^{L194F}
ZR-75-1	Brust	PTEN ^{L108R}

Um die inhibitorische Wirksamkeit der CAAIs auf die Zellproliferation im Rahmen des CellTiter-Glo Assays darzustellen, wurden die Zellen in einer initial bestimmten Zellzahl in 384-*well*-Mikrotiterplatten ausgesät und für 96 Stunden mit einer Verdünnungsreihe der jeweiligen Inhibitoren über einen Konzentrationsbereich von 0,1 nM bis 30 µM inkubiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit DMSO als Negativkontrolle sowie 30 µM des zytotoxischen Multikinase-Inhibitors Staurosporin als Positivkontrolle behandelt.^{158,159} Die ermittelten Lumineszenzen wurden auf diese Kontrollen normalisiert und mittels einer Vier-Parameter logistischen Regression eine Dosis-Wirkungskurve erhalten. Anhand dieser wurde anschließend die halbmaximale effektive Inhibitor-Konzentration (EC₅₀), bei welcher eine relative Zellviabilität von 50 % erreicht wird, als Maß für die zelluläre Aktivität der Verbindungen ermittelt.

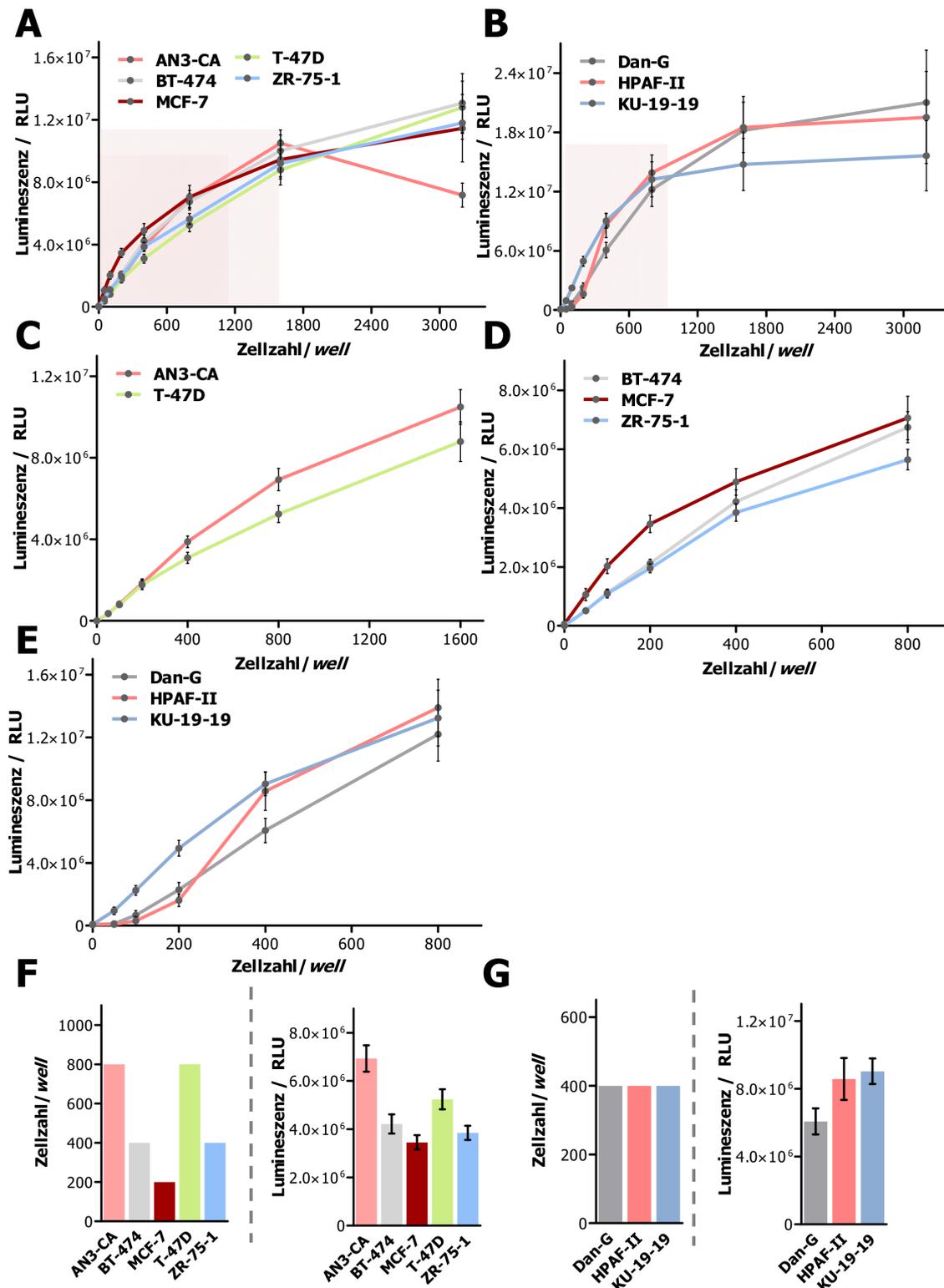


Abbildung 7: Bestimmung der verwendeten Zellzahlen im CellTiter-Glo Assay. Auftragung des Lumineszenzsignals gegen die Zellzahl/well. A: Zelllinien mit Alterationen im PI3K/Akt-Signalweg. B: Ras-mutierte Zelllinien. Die jeweiligen linearen Bereiche sind farbig unterlegt. C-D: Linearer Bereich der Zelllinien mit Alterationen im PI3K/Akt-Signalweg. E: Linearer Bereich der Ras-mutierten Zelllinien. F-G: Übersicht über die gewählten Zellzahlen/well und den entsprechenden Lumineszenzsignalen.

Die für die Bestimmung der EC_{50} -Werte verwendete Zellzahl wird in einem initialen Experiment festgelegt, sodass diese im linearen Bereich der detektierten Lumineszenzintensität liegt und eine Proportionalität zur Zellviabilität gewährleistet ist. Dafür werden die verschiedenen Zelllinien in Zellzahlen von 0-3200 Zellen/*well* in 384-*well*-Mikrotiterplatten ausgesät, nach 120 Stunden lysiert und die Lumineszenz ermittelt. Die gemessene Lumineszenz wird anschließend gegen die Zellzahl/*well* aufgetragen. Aus dem linearen Bereich der Auftragung lässt sich somit jene Zellzahl bestimmen, welche die valide Bestimmung der EC_{50} -Werte ermöglicht (Abbildung 7A-E). Aufgrund der unterschiedlichen Proliferationsraten der verschiedenen Zelllinien ergeben sich dementsprechend variierende Zellzahlen zwischen 200 und 800 Zellen/*well* (Abbildung 7F-G). Um eine Vergleichbarkeit der Daten zu ermöglichen, wurde bei der Festlegung der Zellzahlen zudem berücksichtigt, dass die jeweiligen Intensitäten des Lumineszenzsignals für die Zelllinien mit Läsionen im PI3K/Akt-Signalweg sowie der Ras-mutierten Zelllinien in einem ähnlichen Bereich liegen (Abbildung 7F-G).

Nach Festlegung geeigneter Zellzahlen wurden zur Validierung des Viabilitätsassays zunächst Dosis-Wirkungskurven verschiedener literaturbekannter Referenzinhibitoren sowie des führenden kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors Borussertib aufgenommen und anhand dessen die EC_{50} -Werte der jeweiligen Verbindungen bestimmt (Abbildung 8, Tabelle 3-2).*

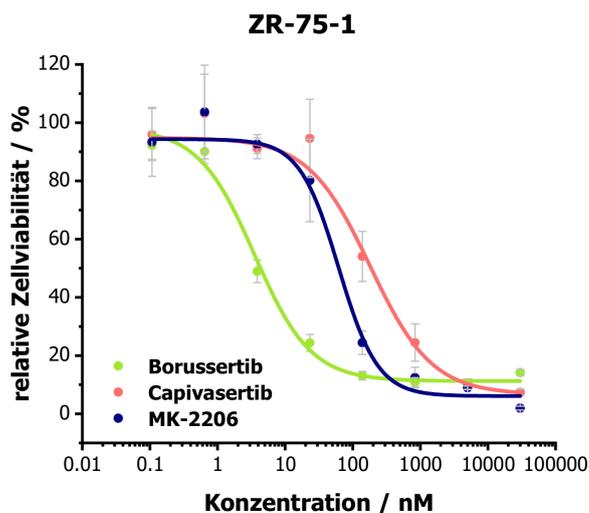


Abbildung 8: Repräsentative Dosis-Wirkungskurven der Akt-Inhibitoren in der Brustkrebszelllinie ZR-75-1. Auftragung der relativen Zellviabilität gegen die Konzentration des Inhibitors. Grün: Kovalent-allosterischer Inhibitor Borussertib, rot: ATP-kompetitiver Inhibitor Capivasertib, blau: allosterischer Inhibitor MK-2206.

* Synthese von Borussertib durch Dr. Rajesh Gontla, Dr. Niklas Uhlenbrock, Dr. Steven Smith und M. Sc. Marius Lindemann (AG D. Rauh, TU Dortmund).

Im Allgemeinen konnte zwischen den verschiedenen Zelllinien eine teilweise deutlich variierende Sensitivität beobachtet werden, wobei insbesondere die hoch-sensitive Brustkrebszelllinie ZR-75-1 heraussticht. Diese Unterschiede in den Ansprechraten der Zelllinien können sowohl auf die verschiedenen genetischen Läsionen, die ursächlich für die onkogene Abhängigkeit der Zellen sind, zurückgeführt werden als auch auf den Einfluss der unterschiedlichen Expressions- und Aktivitätslevel von Akt1. Außerdem spielen auch diverse pharmakokinetische Eigenschaften der Inhibitoren eine wichtige Rolle für eine effektive Inhibition der Zellproliferation. Ein weiterer Aspekt, welcher für die Sensitivitäten der Zelllinien bestimmend sein kann, ist die mögliche Divergenz bezüglich des Einflusses der drei Akt-Isoformen Akt1-3 auf die Zellproliferation, welche derzeit nicht vollständig aufgeklärt ist. Zudem können unterschiedliche Selektivitätsprofile der getesteten Inhibitoren für die Akt-Isoformen verschiedene anti-proliferative Effekte in den verwendeten Zelllinien hervorrufen.^{44,46} Auch die jeweiligen Bindungsmodi der ATP-kompetitiven und allosterischen Akt-Inhibitoren können unterschiedliche anti-proliferative Aktivitäten bewirken. Die Stabilisierung der inaktiven PH-*in*-Konformation durch Bindung allosterischer Inhibitoren führt wie durch VIVANCO *et al.* gezeigt neben der Aktivitäts-Inhibition zur zusätzlichen Hemmung der nicht-katalytischen Funktionen von Akt. Im Gegensatz dazu könnte die Aufrechterhaltung der beschriebenen Kinase-unabhängigen und konformations-abhängigen Funktionen, welche durch die Bindung eines ATP-kompetitiven Inhibitors weiterhin stabilisiert werden, entscheidend für die unterschiedlichen Ansprechraten sein.^{59,160}

Insgesamt zeigten die PI3K/PTEN-mutierten Zelllinien eine deutliche Sensitivität gegenüber einer Inhibition mit den verschiedenen klinischen Kandidaten an Akt-Inhibitoren (Tabelle 3-2). Abgesehen von den Sensitivitätsunterschieden zwischen den einzelnen Zellsystemen weisen die ATP-kompetitiven Inhibitoren Capivasertib^{79,93} und Ipatasertib^{84,85} sowie der allosterische Referenzinhibitor MK-2206¹⁶¹ ähnlich moderate EC₅₀-Werte innerhalb der Zelllinien AN3-CA, BT-474 und T-47D auf. In den Brustkrebszelllinien MCF-7 und ZR-75-1 zeigen die allosterischen Referenzinhibitoren gegenüber den ATP-kompetitiven Verbindungen jedoch eine deutliche Überlegenheit in der anti-proliferativen Aktivität, wobei insbesondere für den klinischen Kandidaten Miransertib^{111,134} eine gesteigerte zelluläre Potenz ersichtlich wird.

Präklinische Charakterisierung des CAAI Borussertib

Tabelle 3-2: Vergleich der anti-proliferativen Aktivitäten von Akt-Referenzinhibitoren und dem kovalent-allosterischen Akt-Inhibitor Borussertib in den unterschiedlichen Zelllinien durch Bestimmung der EC₅₀-Werte.

	CTG EC ₅₀ / nM				
	ATP-kompetitive Akt-Inhibitoren		Allosterische Akt-Inhibitoren		CAAI
	Capivasertib	Ipatasertib	MK-2206	Miransertib	Borussertib
HTRF Akt1^{WT} IC₅₀ / nM	0,9 ± 0,1	3,5 ± 0,6	10,0 ± 2,1	1,4 ± 0,6	0,8 ± 0,3
Zelllinie					
AN3-CA					
PIK3R1 ^{R557_K561>Q} PTEN ^{R130fs} TP53 ^{R213Q}	869 ± 278	925 ± 457	972 ± 322	605 ± 83	191 ± 90
BT-474					
PIK3CA ^{K111N} TP53 ^{E285K}	1605 ± 450	2371 ± 745	1682 ± 316	544 ± 128	373 ± 54
MCF-7					
PIK3CA ^{E545K}	2653 ± 555	5036 ± 1830	571 ± 111	272 ± 134	277 ± 90
T-47D					
PIK3CA ^{H1047R} TP53 ^{L194F}	475 ± 92	443 ± 6	583 ± 245	198 ± 28	48 ± 15
ZR-75-1					
PTEN ^{L108R}	191 ± 68	219 ± 83	63 ± 21	35 ± 18	5 ± 1
KU-19-19					
PIK3CA ^{R1023Q} AKT1 ^{E17K/E49K} NRAS ^{Q61R}	20866 ± 7603	24037 ± 9491	7054 ± 421	4485 ± 781	7770 ± 641
Dan-G					
KRAS ^{G12V} ERBB3 ^{I950T}	>30000	4098 ± 826	1517 ± 356	1489 ± 20	2954 ± 785
HPAF-II					
KRAS ^{G12D} TP53 ^{P151S}	27033 ± 8032	24078 ± 8882	8018 ± 1527	4753 ± 1121	17910 ± 5806

Besonders herausstechend ist jedoch die bis zu ca. 40-fach höhere Potenz des kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors Borussertib im Vergleich mit den Referenzinhibitoren auf den getesteten PI3K/PTEN-mutierten Zelllinien (Abbildung 9). Vor allem auf der Brustkrebszelllinie ZR-75-1 kann mit einem EC₅₀-Wert von 5 ± 1 nM ein signifikanter anti-proliferativer Effekt und somit eine 7- bis 12-fache Potenzsteigerung im Vergleich zu den allosterischen Referenzinhibitoren verzeichnet werden.

Im Vergleich mit den ATP-kompetitiven Referenzinhibitoren Capivasertib und Ipatasertib weist Borussertib in der Zelllinie ZR-75-1 außerdem eine 38- bzw. 43-fach erhöhte Potenz auf. Die unterschiedlichen zellulären Aktivitäten der verschiedenen Akt-Inhibitoren korrelieren dabei nur teilweise mit den biochemischen Daten, welche mittels eines aktivitätsbasierten HTRF-Assays erhoben wurden.* Während sich die zelluläre Potenzsteigerung von Borussertib gegenüber den allosterischen Inhibitoren MK-2206 und Miransertib auch in den biochemischen IC_{50} -Werten sehr gut widerspiegelt, zeigen die ATP-kompetitiven Referenzinhibitoren Capivasertib und Ipatasertib jedoch ähnlich wie Borussertib subnanomolare inhibitorische Aktivitäten im HTRF-Assay. Der deutliche Potenzverlust der ATP-kompetitiven Inhibitoren in den getesteten Zellsystemen bestärkt somit die Annahme der verringerten zellulären Effizienz dieser Inhibitoriklasse durch Aufrechterhaltung der nicht-katalytischen Funktionen der Kinase im Gegensatz zu allosterischen bzw. kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren.^{59,160} Im Vergleich zu den anderen PI3K/PTEN-mutierten Zelllinien zeigt darüber hinaus die Blasenkrebszelllinie KU-19-19, welche zusätzliche Mutationen in Akt1 und NRas aufweist, eine moderate Sensitivität gegenüber Borussertib. Dies ist jedoch auf die weitere NRas-Mutation zurückzuführen und wurde auch bereits für andere allosterische Akt-Inhibitoren, wie BAY1125976, beschrieben.¹¹² Eine generell geringe Sensitivität gegenüber einer Akt-Inhibition kann außerdem für die Pankreas-Zelllinien Dan-G und HPAF-II verzeichnet werden, deren onkogene Abhängigkeit auf einer Mutation des KRAS-Gens in Codon 12 beruht. Aufgrund der fehlenden Alterationen im PI3K/Akt-Signalweg und dem damit einhergehenden relativ hohen mikromolaren EC_{50} -Wert weisen die Daten dieser Zelllinien zudem darauf hin, dass Borussertib keine zytotoxische Aktivität zeigt. Mit weiteren Kontrollverbindungen konnte zusätzlich eine generell verursachte Zytotoxizität durch die verschiedenen Inhibitoren ausgeschlossen werden (Kapitel 6.1, Tabelle 6-1). Während beispielsweise die Inhibition anderer Signalwege, wie des Ras/MAPK-Signalwegs mit dem MEK-Inhibitor Trametinib¹⁶², in den PI3K/Akt-alterierten Zelllinien keinen signifikanten anti-proliferativen Effekt zeigt, kann dieser jedoch in den Ras-mutierten Zelllinien nachgewiesen werden.

Die gute Korrelation der erhobenen EC_{50} -Werte mit den biochemischen IC_{50} -Werten für die allosterischen Referenzinhibitoren und den CAAs unterstreichen insgesamt die erfolgreiche Etablierung der verschiedenen zellulären Modellsysteme zur Untersuchung des anti-proliferativen Effekts. Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit eine Vielzahl von weiteren CAAs mit Hilfe des CellTiter-Glo Assays zellulär charakterisiert und valide Daten erhalten werden. Des Weiteren konnte ein signifikanter Aktivitätsverlust ATP-kompetitiver Inhibitoren im zellulären Kontext aufgelöst werden, welcher das große Potential allosterischer Akt-Inhibitoren bestärkt. Die zusätzliche Potenzsteigerung durch den kovalent-allosterischen Akt-Inhibitor Borussertib unterstreicht zudem eine mögliche Optimierung der therapeutischen Effizienz durch den Ansatz der irreversiblen Akt-Inhibition.

* HTRF IC_{50} -Bestimmung durch Dr. Jörn Weisner (AG D. Rauh, TU Dortmund).

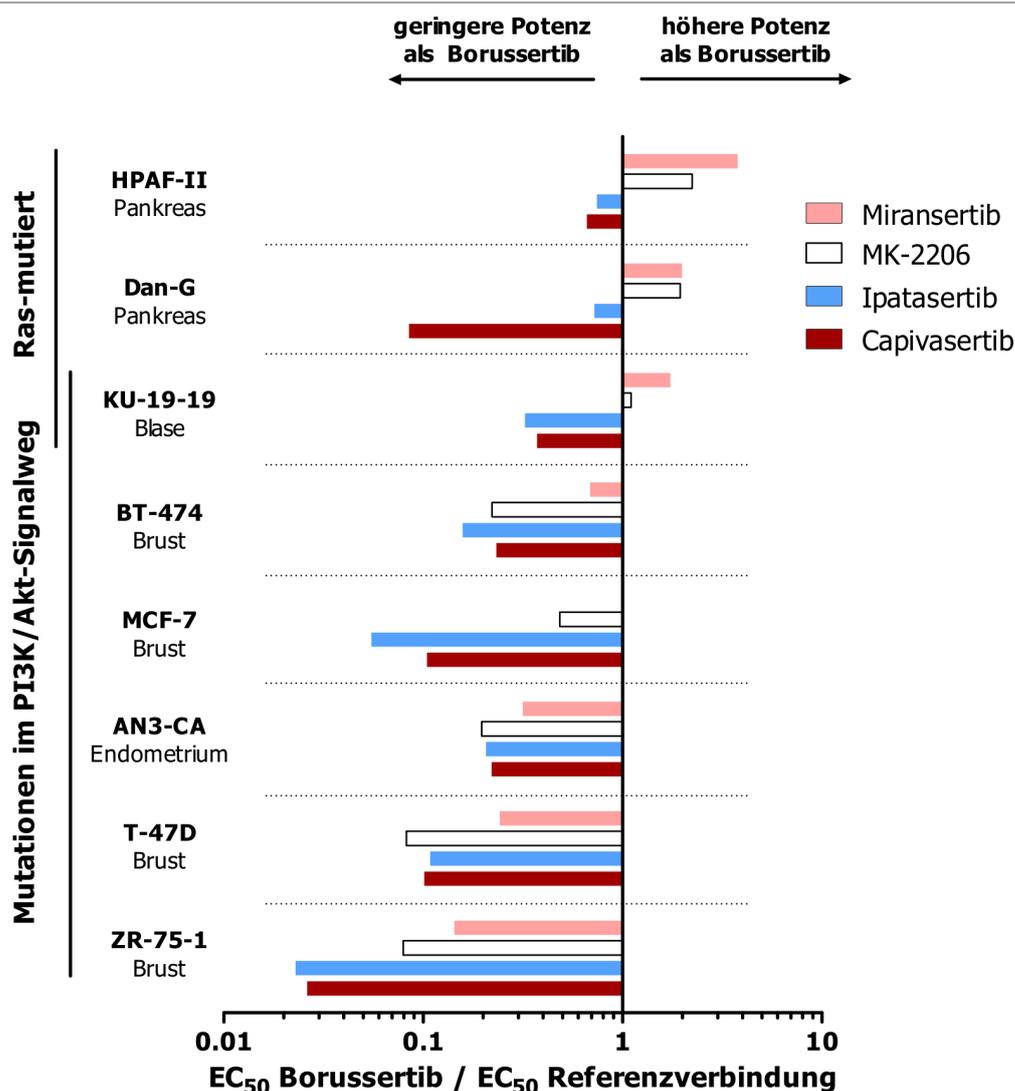


Abbildung 9: Anti-proliferative Aktivität von Borussertib im Vergleich zu ATP-kompetitiven (Capivasertib, Ipatasertib) und allosterischen (MK-2206, Miransertib) Referenzinhibitoren in den unterschiedlichen Zellsystemen. Zur Darstellung wurde der Quotient der EC₅₀-Werte von Borussertib und des jeweiligen Referenzinhibitors gebildet. Referenzinhibitoren, für welche sich ein Quotient <1 ergibt, weisen dabei eine geringere anti-proliferative Aktivität im Vergleich zu Borussertib auf, was insbesondere in den PI3K/PTEN-mutierten Zelllinien zu beobachten ist.

Um den selektiven Wirkungsmechanismus von Borussertib durch eine Akt-Inhibition intrazellulär nachweisen zu können, wurden zusätzlich Western Blot-Analysen mit den Zelllinien ZR-75-1, AN3-CA, Dan-G, T-47D und MCF-7 durchgeführt. Zudem wurden *in vitro* pharmakodynamische Veränderungen der Phosphorylierungslevel von Proteinen, welche Akt nachgeschaltet sind, sowie eine mögliche Induktion der Apoptose durch die Behandlung mit Borussertib in den Zelllinien ZR-75-1, AN3-CA und Dan-G untersucht (Abbildung 10).

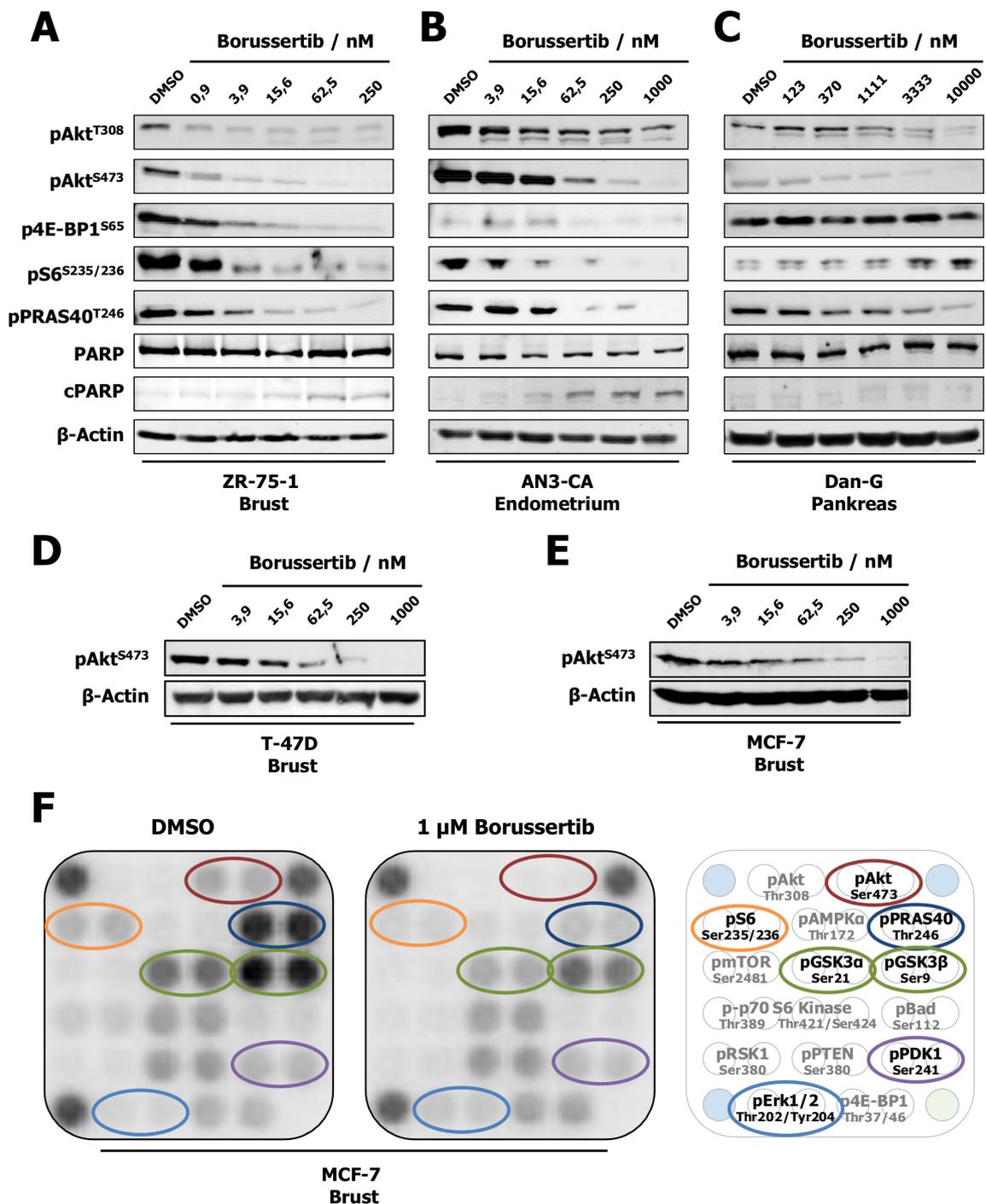


Abbildung 10: *In vitro* Pharmakodynamik-Studie von Borussertib in verschiedenen Zelllinien. A-C: Western Blot-Analyse in der Brustkrebszelllinie ZR-75-1, Endometriumkarzinom-Zellen AN3-CA und Pankreaszelllinie Dan-G zeigen dosis-abhängige Herunterregulierung von pAKT^{S473/T308}, Dephosphorylierung der *downstream*-Proteine 4E-BP1, S6 und PRAS40 sowie Apoptose-Induktion (cPARP) nach 24-stündiger Borussertib-Behandlung. D-E: Western Blot-Analysen der Brustkrebszelllinien T-47D und MCF-7 bestätigen ebenfalls die *on-target*-Inhibition von Akt durch dosis-abhängige Dephosphorylierung von pAKT^{S473} nach Borussertib-Behandlung von 24 Stunden. F: PathScan-Assay für den PI3K/Akt-Signalweg in der Brustkrebszelllinie MCF-7 zeigt zusätzlich Inhibition von pGSK3α/β sowie keine *off-target*-Inhibition von PDK1 oder des Ras/MAPK-Signalwegs. Blau: Positiv-Kontrolle, grün: Negativ-Kontrolle.

In allen getesteten Zelllinien kann eine deutliche dosis-abhängige Herunterregulierung der Phosphorylierung von Akt an den bekannten Aktivierungsstellen Thr308 und Ser473 durch eine 24-stündige Behandlung mit Borussertib erzielt werden, was die *on-target*-Inhibition von Akt bestätigt (Abbildung 10A-E).¹⁶³ Dabei ist jedoch ein Unterschied in der Effizienz der inhibierten Phosphorylierung der jeweiligen Aktivierungsstellen erkennbar. Während die Phosphorylierung von Ser473, welches in einer C-terminalen hydrophoben Schleife lokalisiert ist, mit den jeweils höchst eingesetzten Borussertib-Konzentrationen von 250 nM für ZR-75-1, 1 µM für AN3-CA, T-47D und MCF-7 sowie 10 µM für Dan-G, vollständig inhibiert wird, kann bei diesen Inhibitor-Mengen dennoch eine geringe verbleibende Phosphorylierung von Thr308 in den Zelllinien ZR-75-1, AN3-CA und Dan-G verzeichnet werden. Diese Beobachtung kann möglicherweise durch den kovalent-allosterischen Bindungsmodus von Borussertib erklärt werden, wobei neben der Stabilisierung der inaktiven Kinase-Konformation eine Adressierung der in der Aktivierungsschleife befindlichen Cysteine Cys296 und Cys310 stattfindet.¹²³ Diese Stabilisierung der geschlossenen PH-*in*-Konformation sowie die unmittelbare Nähe der Phosphorylierungsstelle Thr308 zum kovalent modifizierten Cys310 könnten dabei zu einer leicht erschwerten Zugänglichkeit für die Phosphatase PP2A führen und somit die unvollständige Dephosphorylierung von Thr308 bei den jeweils höchst eingesetzten Borussertib-Konzentrationen erklären. Nichtsdestotrotz kann eine deutliche Inhibition der Akt-nachgeschalteten Signalkaskaden durch eine Borussertib-Behandlung erreicht werden, was durch die dosis-abhängige Herunterregulierung der Phosphorylierung verschiedener *downstream*-Proteine wie 4E-BP1, das Ribosomale Protein S6 und PRAS40 in den Zelllinien ZR-75-1, AN3-CA und Dan-G verdeutlicht wird (Abbildung 10A-C).⁴⁴ Für S6 kann in der Dan-G Zelllinie jedoch eine dosis-abhängige Steigerung der Phosphorylierung nach Behandlung mit Borussertib verzeichnet werden, welche vermutlich auf eine Kompensation durch den überaktivierten Ras/MAPK-Signalweg durch die KRas^{G12V}-Mutation zurückzuführen ist.¹⁶⁴ Die intrazelluläre Inhibition der jeweiligen Protein-Phosphorylierungen spiegelt außerdem die unterschiedlichen Sensitivitäten der Zelllinien wider, die bereits im Viabilitätsassay beobachtet werden konnten, wobei die PI3K/PTEN-mutierten Zelllinien ZR-75-1 und AN3-CA deutlich höhere Sensitivitäten als die KRas-mutierte Pankreaszelllinie Dan-G aufweisen. In zusätzlichen PathScan-Experimenten mit der Brustkrebszelllinie MCF-7 konnte neben dem analogen Effekt auf den bereits gezeigten Akt-Substraten des Weiteren ein signifikant reduziertes Phosphorylierungslevel der Akt-Substrat-Isoformen GSK3 α und GSK3 β nach Behandlung mit 1 µM Borussertib für 24 Stunden nachgewiesen werden.^{*165} Zudem konnten *off-target*-Effekte von Borussertib gegenüber Proteinen des Ras/MAPK-Signalwegs oder beispielsweise der Akt-aktivierenden Kinase PDK1 ausgeschlossen werden. Um weiterhin den zu Grunde liegenden Mechanismus der anti-proliferativen Aktivität von Borussertib zu analysieren, wurde der Effekt auf die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) untersucht. Dabei handelt es sich um ein Protein, welches eine wichtige Rolle in der DNA-Reparatur einnimmt und während der

* Durchführung der PathScan-Experimente in Kooperation mit Dr. Marija Trajkovic-Arsic (AG J. Siveke, Westdeutsches Tumorzentrum, Universitätsklinikum Essen).

Apoptose der proteolytischen Spaltung durch die Proteasen Caspase-3 und Caspase-7 unterliegt, wobei zwei Polypeptide einer Größe von 24 kDa und 89 kDa (cPARP, engl. *cleaved* PARP) entstehen.¹⁶⁶ Somit kann die *in vitro* pharmakodynamische Veränderung des cPARP-Levels (Fragment mit 89 kDa) durch die Inhibitor-Behandlung einen Nachweis der Apoptose als Mechanismus des Zelltods liefern. Die Western Blot-Analysen in den Zelllinien ZR-75-1 und AN3-CA zeigen dabei eine Zunahme des Levels an gespaltenem PARP-Protein bei nanomolaren Borussertib-Konzentrationen, was auf die Induktion der Apoptose hinweist (Abbildung 10A-B). Für die Pankreas-Zelllinie Dan-G dagegen konnte auch bei Konzentrationen von 10 μ M keine signifikante PARP-Spaltung beobachtet werden (Abbildung 10C). Dies ist auf die fehlende onkogene Abhängigkeit der Zelllinie vom adressierten PI3K/Akt-Signalweg zurückzuführen und steht im Einklang mit der im CTG-Assay gemessenen moderaten anti-proliferativen Aktivität von Borussertib in den KRas-mutierten Pankreaszelllinien. Insgesamt bestätigen die *in vitro* pharmakodynamischen Analysen somit die spezifische intrazelluläre *on-target*-Inhibition von Akt sowie die effiziente Hemmung der nachgeschalteten Signalkaskaden, welche in den vom PI3K/Akt-Signalweg-abhängigen Zelllinien zur Einleitung der Apoptose führt und den anti-proliferativen Effekt von Borussertib validiert.

Um den Vorteil der kovalenten Akt-Inhibition durch Borussertib zu untersuchen, wurden außerdem *wash-out*-Experimente in AN3-CA Zellen über einen Zeitraum von 48 Stunden durchgeführt (Abbildung 11).^{*} Dafür wurden die Zellen mit 100 nM sowie 200 nM Borussertib für 24 Stunden behandelt und der Inhibitor anschließend durch Austausch des Kultivierungsmediums unter Abwesenheit des Serums entfernt. Während weiterer Kultivierung der Zellen bis zu 48 Stunden wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten Zelllysate generiert und jeweils 15 min vor der Zellyse der PI3K/Akt-Signalweg mit der Zugabe des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) stimuliert. Für beide getesteten Konzentrationen konnte nach 24-stündiger Inkubation mit Borussertib eine vollständige Abwesenheit der Akt^{S473}-Phosphorylierung verzeichnet werden. Die signifikante Reduktion der Phosphorylierung von Akt konnte weitere 24 Stunden nach der Entfernung des Inhibitors beobachtet werden, bis letztlich nach 48 Stunden eine vollständige Rückkehr des pAkt^{S473}-Signals zu erkennen ist (Abbildung 11A). Auch die Stimulation mit weiteren Wachstumsfaktoren führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Ein Vergleich mit den allosterischen Akt-Inhibitoren MK-2206 und Miransertib verdeutlicht die Überlegenheit kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren bezüglich der Inhibitionsdauer (Abbildung 11B). Bei Einsatz identischer Konzentrationen von 200 nM kann zwar für alle Verbindungen nach 24 Stunden eine effiziente Inhibition der Akt^{S473}-Phosphorylierung beobachtet werden, die Inhibition der nachgeschalteten Signalkaskaden bleibt jedoch lediglich durch die Behandlung mit Borussertib erhalten. Während die Phosphorylierungslevel von GSK3 β und S6 durch Borussertib nach 24 Stunden weiterhin signifikant reduziert sind, entsprechen die Zustände durch Behandlung mit den allosterischen Referenzverbindungen dem basalen Level.

^{*} Durchführung der *wash-out*-Experimente in Kooperation mit Dr. Christoph Reintjes (AG S. Hahn, Ruhr-Universität Bochum).

Des Weiteren kann nur mit 5- bzw. 25-fach höherer Inhibitor-Konzentration von Miransertib und MK-2206 eine ähnliche Reduktion des pAkt^{S473}-Levels über einen Zeitraum von 24 Stunden nach Entfernung der jeweiligen Inhibitoren erreicht werden (Abbildung 11C). Aufgrund der irreversiblen Inhibition durch Borussertib und der damit verbundenen verlängerten Verweildauer der Protein-Liganden-Bindung wird demnach eine verlangsamte Rückkehr der Akt-Aktivität im Vergleich zu den anderen Referenzinhibitoren erreicht, wobei die andauernde Inhibition der Kinase lediglich durch die zelluläre Re-Synthese des Proteins limitiert ist. Insbesondere im Hinblick auf die Häufigkeit der Dosierung im therapeutischem Kontext stellt dies einen entscheidenden Vorteil der CAAIs dar, da somit eine langanhaltende effiziente Wirkung zu erwarten ist.¹⁶⁷

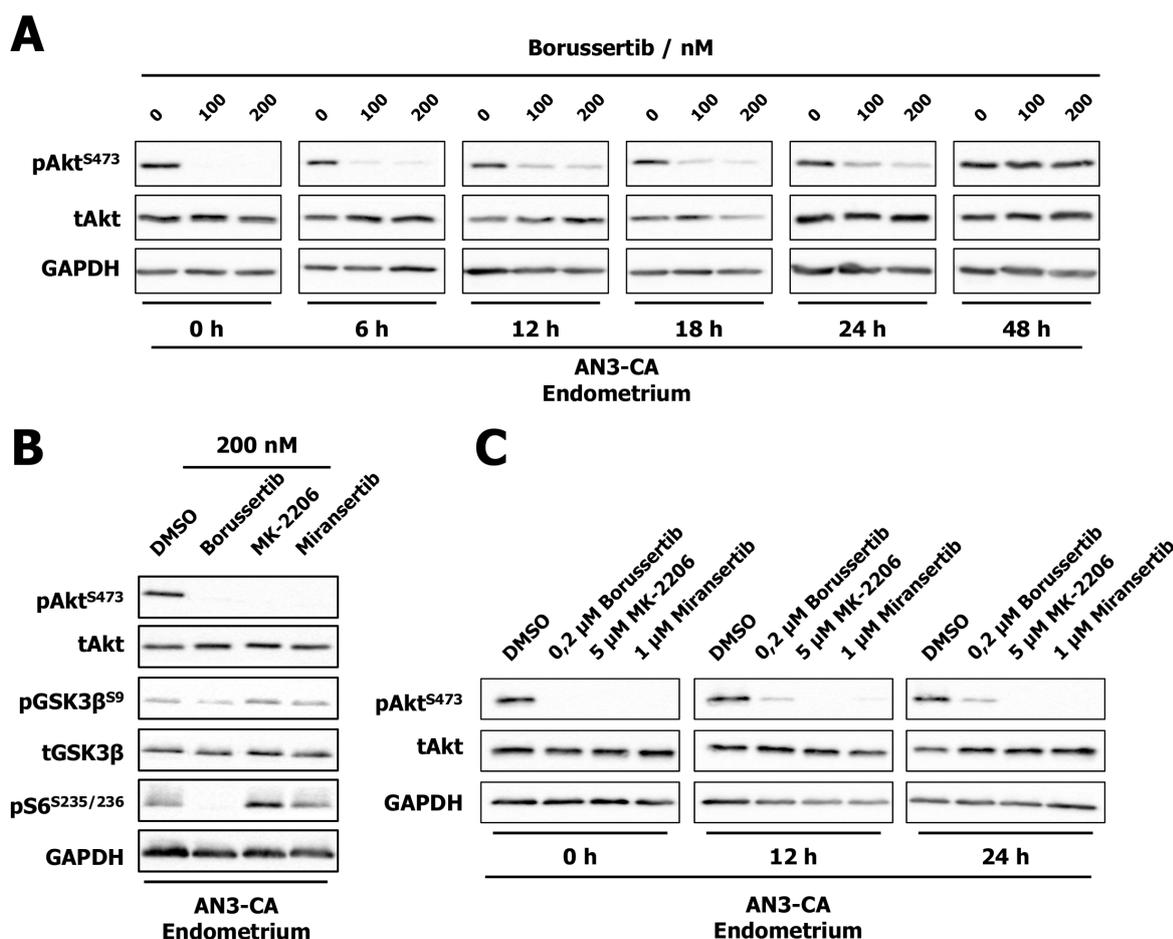


Abbildung 11: Bestimmung der zellulären Halbwertszeit der Dephosphorylierung von Akt durch kovalente Inhibition mittels Borussertib in AN3-CA Zellen. A: Behandlung der Zellen mit den entsprechenden Borussertib-Konzentrationen 24 Stunden vor dem *wash-out* und anschließende Kultivierung für die angegebenen Zeiträume. Eine deutliche Reduktion des pAkt^{S473}-Levels kann bis zu einem Zeitpunkt von 24 Stunden nach der Entfernung von Borussertib beobachtet werden. B: *In vitro* pharmakodynamische Analyse zum Vergleich der *downstream*-Inhibition durch Borussertib, MK-2206 und Miransertib. C: Vergleich des Effekts unterschiedlicher Inhibitor-Konzentrationen. Für die Referenzinhibitoren kann nur bei höheren Konzentrationen die gleiche Effizienz der Herunterregulierung von pAkt^{S473} über einen Zeitraum von 24 Stunden erreicht werden.

Zusammenfassend konnte die zelluläre Charakterisierung des kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors Borussertib zusätzlich zu den biochemischen Experimenten das enorme Potential dieser Inhibitor-Klasse verdeutlichen.

Insbesondere im Vergleich mit den ATP-kompetitiven und allosterischen Referenzinhibitoren konnte sowohl die herausragende anti-proliferative Aktivität in PI3K/PTEN-mutierten Zelllinien sowie der Wirkungsmechanismus über die dosisabhängige *on-target*-Inhibition von Akt und der effizienten Hemmung nachgeschalteter Signalkaskaden in pharmakodynamischen Analysen gezeigt werden. Zusammen mit den Erkenntnissen der verlängerten Wirkungsdauer aufgrund der irreversiblen Inhibition stellen diese Daten eine gute Grundlage für weiterführende *in vivo*-Experimente, in welcher die Effizienz von Borussertib in relevanten Tumormodellen untersucht wird, dar.

3.1.2 Analyse des *in vitro*-Synergismus von Borussertib und Trametinib

Aufgrund der hohen klinischen Relevanz KRas-mutierter Tumore ist auch die Untersuchung eines möglichen synergistischen Effekts der Akt-Inhibition durch Borussertib kombiniert mit der Inhibition des Ras/MAPK-Signalwegs von großem Interesse. Ras-mutierte Tumore stellen mit einer Häufigkeit von ca. 25 % die bedeutendste Tumorklasse dar und machen damit die kleine GTPase Ras zu einem der wichtigsten therapeutischen Zielproteine.¹⁶⁸ Dabei ist KRas die am häufigsten mutierte Isoform, welche insbesondere in Lungen-, Kolon- und Pankreastumoren eine entscheidende Rolle spielt.^{168,169} Vor allem Pankreastumore tragen in diesem Zusammenhang mit einer insgesamt schlechten Prognose und hohen Mortalitätsraten eine hohe Relevanz in der Medizinischen Chemie.¹⁷⁰ Da jedoch die direkte Adressierung des KRas-Proteins trotz intensivster Forschung bisher nicht zu den gewünschten Erfolgen führte, stellt die zielgerichtete Inhibition des nachgeschalteten Signalwegs über die Proteine Raf, MEK und Erk einen alternativen Ansatz für die Therapie der Patienten mit KRas-mutierten Tumoren dar.^{171,172} Die Monotherapie mit beispielsweise MEK-Inhibitoren unterliegt jedoch oftmals verschiedenen Resistenzmechanismen, wie der Kompensierung über die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs (Abbildung 12).^{70,173} Des Weiteren sind die Koexistenz von Mutationen im Ras/MAPK- und dem PI3K/Akt-Signalweg in fortgeschrittenen Krebserkrankungen sowie das Auftreten aktivierender PI3K-Mutationen in resistenten KRas-getriebenen Tumoren häufig auftretende Beobachtungen.^{174,175} Somit stellt die kombinierte Adressierung dieser beiden Signalwege eine naheliegende Lösung zur effektiven Behandlung KRas-mutierter Tumore dar. Erste klinische Studien mit dem MEK-Inhibitor Selumetinib sowie dem allosterischen Akt-Inhibitor MK-2206 lieferten bereits Hinweise zur Wirksamkeit der Kombinationstherapie, deuten jedoch auf Limitationen hinsichtlich der Tolerierbarkeit hin.⁷⁰ Die besondere Herausforderung liegt dabei in überlappenden Toxizitäten der Monotherapien, sodass eine feinregulierte Dosierung und Verabreichungshäufigkeit für eine gute Verträglichkeit der Kombination gewählt werden muss.⁷⁰ Zusätzlich könnte die Untersuchung weiterer Kombinationen von Akt-Inhibitoren und Inhibitoren des KRas/MAPK-Signalwegs zur effizienten und gut tolerierten Krebsbehandlung führen.

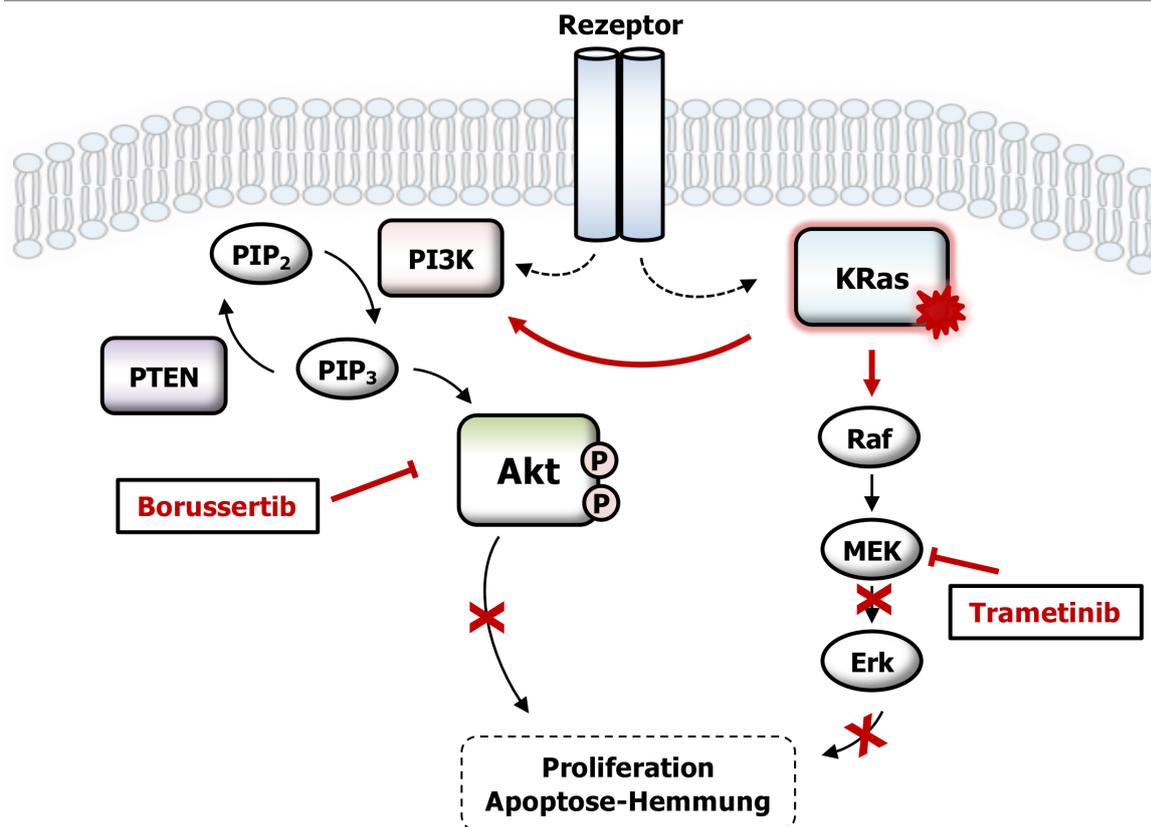


Abbildung 12: Zusammenspiel des KRas/MAPK- und des PI3K/Akt-Signalwegs in resistenten KRas-mutierten Tumoren. Durch Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs wird eine Resistenz gegenüber der Inhibition des überaktivierten KRas/MAPK-Signalwegs durch den MEK-Inhibitor Trametinib entwickelt. Dieser Resistenzmechanismus kann durch kombinierte Inhibition mit dem Akt-Inhibitor Borussertib umgangen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Untersuchung eines möglichen *in vitro* synergistischen Effektes von Borussertib in Kombination mit dem klinischen Kandidaten Trametinib (Abbildung 13A), welcher die MAP2-Kinase MEK inhibiert, erfolgen. Der Synergismus beschreibt dabei das vorteilhafte Zusammenwirken zweier Verbindungen, das zu einem Gesamteffekt führt, welcher größer ist als die Summe der einzelnen Effekte der jeweiligen Inhibitoren.¹⁷⁶ Für diese Untersuchungen wurde die KRas-mutierte (Codon 12) Patienten-abgeleiteten Pankreas-Zelllinie Bo103 verwendet (Abbildung 13).^{*†} Durch die direkte *in vitro*-Charakterisierung der primären Zelllinie in einer frühen Passage behalten die Zellen die Morphologie sowie funktionalen und genetischen Charakteristika des originalen Tumorgewebes. Somit bilden die erhaltenen Daten im Vergleich zur Verwendung immortalisierter Zelllinien Zustände ab, welche in Bezug auf den erwarteten *in vivo*-Effekt aussagekräftiger sind.¹⁷⁷

Mit Hilfe des CTG-Assays wurden zunächst Dosis-Wirkungskurven in dieser Zelllinie mit der Monobehandlung der jeweiligen Inhibitoren Borussertib und Trametinib sowie derer

* Durchführung der Synergismus-Studien in Bo103-Zellen in Zusammenarbeit mit Dr. Jörn Weisner (AG D. Rauh, TU Dortmund).

† Isolierung der primären Zelllinie Bo103 im Rahmen des Ruhr-Universität Comprehensive Cancer Centers (RUCCC) und *in vitro* Kultivierung durch AG S. Hahn, Ruhr-Universität Bochum.

Kombination aufgenommen. Auch bei der höchst eingesetzten Konzentration von 30 μM der jeweiligen Inhibitoren konnte dabei keine vollständige Inhibition der Zellviabilität erreicht werden, wobei für Borussertib eine verbleibende Zellviabilität von $51,5 \% \pm 9,5 \%$ und $29,3 \% \pm 5,9 \%$ für Trametinib gemessen wurde. Aufgrund der unvollständigen Inhibition der Zellproliferation wurden keine EC_{50} -Werte für die jeweilige Monobehandlung mit Borussertib oder Trametinib bestimmt. Die Kombination der Inhibitoren dagegen zeigt bei der höchst eingesetzten Konzentration von 15 μM des jeweiligen Inhibitors, wodurch sich eine Gesamtkonzentration von 30 μM ergibt, eine deutliche Reduktion der verbleibenden Zellviabilität auf $6,9 \% \pm 2,9 \%$. Die Bestimmung des EC_{50} -Werts mit $82,7 \pm 26,0 \text{ nM}$ unterstreicht zusätzlich den Vorteil der Kombinationsbehandlung eines Akt- und MEK-Inhibitors gegenüber den jeweiligen Monotherapien (Abbildung 13B).

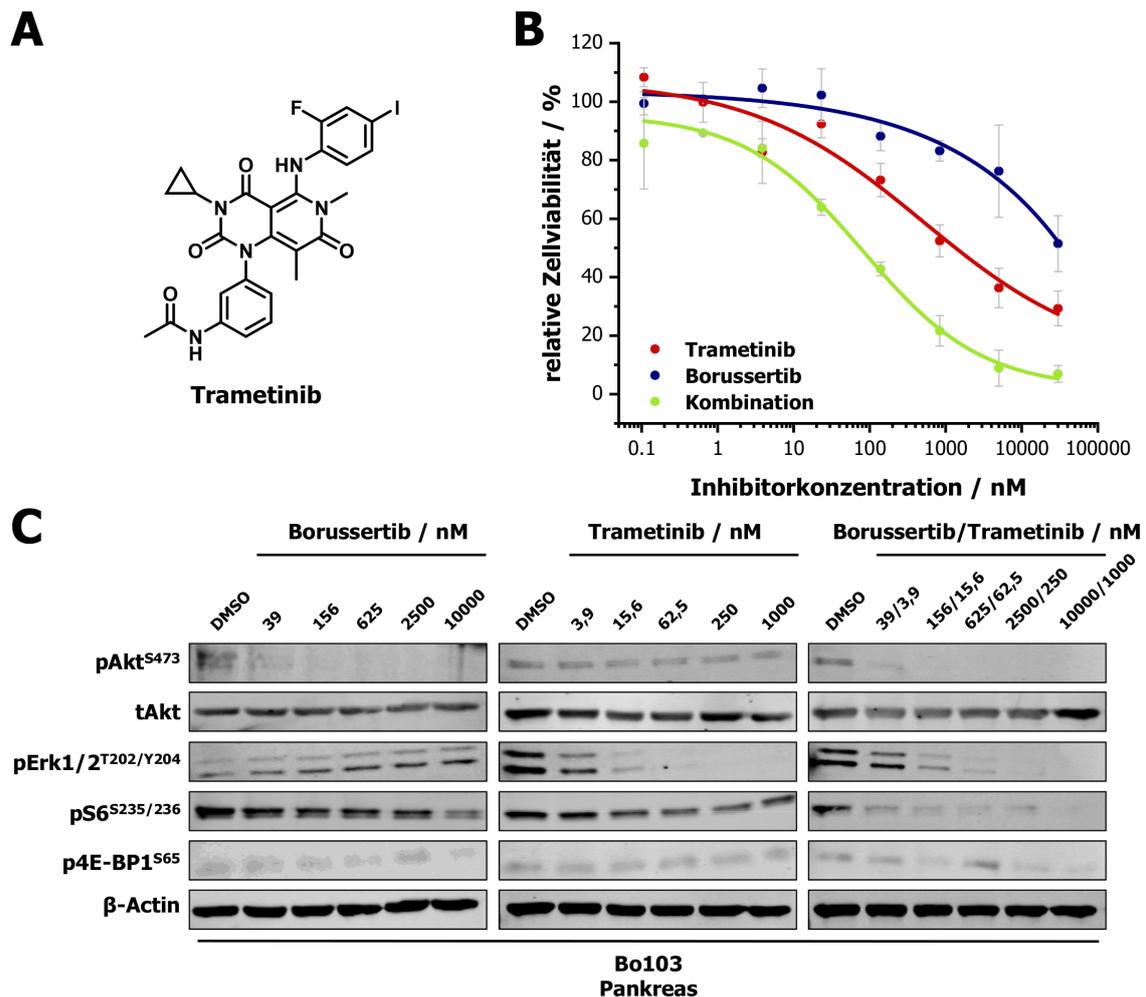


Abbildung 13: Untersuchung synergistischer Effekte von Borussertib und Trametinib in der Patienten-abgeleiteten KRas-mutierten Pankreas-Zelllinie Bo103. A: Molekülstruktur des MEK-Inhibitors Trametinib. B: Zellviabilitätsassay nach 96 Stunden Inkubation mit den jeweils einzelnen Inhibitoren Borussertib und Trametinib sowie deren Kombination. C: Western Blot-Studien zur Untersuchung der Akt- und MEK-Inhibition nach 24-stündiger Inkubation mit den jeweiligen Inhibitoren und deren Kombination in den gezeigten Konzentrationen. Die Kombinationstherapie zeigt sowohl in der Inhibition der Zellproliferation als auch in der Inhibition der jeweiligen Signalwege einen synergistischen Effekt und damit eine Überlegenheit gegenüber der Monobehandlung.

Zur Erklärung der gesteigerten anti-proliferativen Aktivität durch die Kombinationsbehandlung wurden außerdem pharmakodynamische Veränderungen in den adressierten Signalkaskaden mit Hilfe von Western Blot-Studien sowohl für die jeweils einzelnen Inhibitoren als auch derer Kombination betrachtet (Abbildung 13C). Erwartungsgemäß kann dabei eine selektive Inhibition der Akt-Aktivität sowie keine Beeinflussung des Ras/MAPK-Signalwegs für Borussertib und ein gegenteiliger Effekt für Trametinib verzeichnet werden. Die Kombination führt jedoch zur Inhibition beider adressierter Signalwege. Eine mögliche Erklärung des durch die Kombination gesteigerten anti-proliferativen Effekts liefert jedoch die Betrachtung der nachgeschalteten Proteine. Erst die Kombination der beiden Inhibitoren ruft dabei eine vollständige Reduktion des Phosphorylierungslevels von S6^{S235/236} hervor, während dies durch die jeweilige Einzelbehandlung nicht erzielt werden konnte. Für 4E-BP1 dagegen kann jedoch mit keinem der getesteten Verbindungen eine signifikante Abnahme der Phosphorylierung verzeichnet werden. Der gesteigerte Effekt auf das KRas- und Akt-nachgeschaltete Protein S6 könnte somit eine Erklärung für die erhöhte anti-proliferative Aktivität der Kombination von Borussertib und Trametinib liefern.

Insgesamt deuten die gezeigten *in vitro*-Experimente auf eine Synergie der Akt- und MEK-Inhibition in KRas-mutierten Zelllinien hin und liefern somit das Rational für weiterführende *in vivo*-Experimente der Kombination des kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors Borussertib und Trametinib in klinisch relevanten KRas-mutierten Tumormodellen.

3.1.3 *In vitro* und *in vivo* Pharmakokinetische Analyse von Borussertib

Bestärkt durch das biochemisch und zellulär gezeigte Potential der CAAIs als innovativer Ansatz der Akt-Inhibition ist es für die weitere Entwicklung dieser Inhibitor-Klasse von großer Bedeutung die *in vivo*-Wirksamkeit mit dem Vorreitermolekül Borussertib in relevanten Tiermodellen als *proof-of-concept* zu zeigen. Als initiales Experiment im Hinblick auf Effizienzstudien ist jedoch zunächst die Betrachtung der pharmakokinetischen Eigenschaften des Moleküls über die sogenannten ADME-Parameter (engl. *adsorption, distribution, metabolism, excretion*) notwendig. Dies umfasst jene Prozesse, denen eine Verbindung innerhalb des Körpers ausgesetzt ist, wie der Resorption, Verteilung, Metabolisierung und Ausscheidung des Moleküls. Um den klinischen Erfolg einer Verbindung gewährleisten zu können, muss eine sorgfältige Optimierung dieser ADME-Parameter in der präklinischen Entwicklung erfolgen.¹⁷⁸ Für Borussertib wurden daher zunächst *in vitro* verschiedene Parameter bestimmt, um einen ersten Eindruck über die pharmakokinetischen Eigenschaften zu erlangen (Tabelle 3-3).^{*†}

* Bestimmung der Löslichkeit, PAMPA- und Caco-2-Werte, Plasma-Stabilität und -Proteinbindung durch Dr. Matthias Baumann und Anke Unger (LDC Dortmund).

† Bestimmung der $t_{1/2}$ - und Cl_{int} -Werte durch M. Sc. Julia Hardick (AG. D. Rauh, TU Dortmund).

Aufgrund des hohen lipophilen Anteils von Borussertib kann lediglich eine geringe kinetische Löslichkeit von 13 μM in wässriger Lösung durch den SolRank-Assay bestimmt werden. Mit Hilfe des PAMPA-Assays wurde außerdem die Permeabilität des Moleküls untersucht, welche jedoch ebenfalls mit unter 5 % keine ausgeprägte Überwindung der Zellmembran verspricht.¹⁷⁹ Als Indikator für eine mögliche orale Applikation von Borussertib dienen die Ergebnisse des Caco-2-Assays, bei welchem der Übergang des Moleküls aus dem apikalen in das basolaterale Kompartiment und umgekehrt mit Hilfe der Dünndarmepithel-Zelllinie Caco-2 gemessen wird.¹⁸⁰ Dabei wird deutlich, dass eine hohe Effluxrate im Vergleich zur Aufnahme des Moleküls beobachtet werden kann. Dies ist möglicherweise auf einen aktiven Transport aus der Zelle über verschiedene Effluxtransporter zurückzuführen, für welche Borussertib ein Substrat darstellen könnte. Aufgrund des hohen Verhältnisses der beiden Permeabilitäten lässt sich die Effizienz von Borussertib bei oraler Gabe somit als eher gering einschätzen.

Tabelle 3-3: *In vitro* pharmakokinetische Parameter von Borussertib.

<i>In vitro</i>-PK-Parameter	Borussertib
Löslichkeit (SolRank pH 7.4) / μM	13
Permeabilität	
PAMPA / %	< 5
Caco-2 P_{app} / $10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$	
apikal (A) \rightarrow basolateral (B)	0,4
basolateral (B) \rightarrow apikal (A)	40,4
Efflux (Verhältnis Caco-2 P_{app} B \rightarrow A/A \rightarrow B)	101
Plasmastabilität murin/human / %	100/99
Plasmaprotein-Bindung murin/human / %	99/100
Phase I Mikrosomale Stabilität	
$t_{1/2}$ murin/human / min	46/99
Cl_{int} murin/human / $\mu\text{L}/\text{min}/\mu\text{g}$	30/5

Nichtsdestotrotz weisen die geringen Werte der intrinsischen *Clearance* (Cl_{int}) sowohl in murinen als auch humanen Lebermikrosomen auf eine erhöhte Stabilität von Borussertib im Phase I Metabolismus hin.¹⁸¹ Dies wird zusätzlich durch eine hohe Plasmastabilität unterstützt. Die hohe Plasmaproteinbindung von Borussertib ist eine bekannte Beobachtung für kovalente Inhibitoren, welche jedoch in der Regel nicht nachteilig für die *in vivo*-Effizienz ist und daher vernachlässigt werden kann.^{182,183}

Um außerdem das pharmakokinetische Verhalten von Borussertib *in vivo* abbilden zu können, wurde weiterhin eine intravenöse (i.v.) als auch intraperitoneale (i.p.) und perorale (p.o.) Gabe des Moleküls in Mäusen evaluiert.*† Dazu wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten von 5, 15, 45 und 135 min nach der jeweiligen Applikation Blutproben entnommen und per LC-MS/MS-Analyse die Wirkstoffkonzentration im Plasma ermittelt. Aus den resultierenden Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven wurden anschließend verschiedene pharmakokinetische Parameter abgeleitet (Abbildung 14).

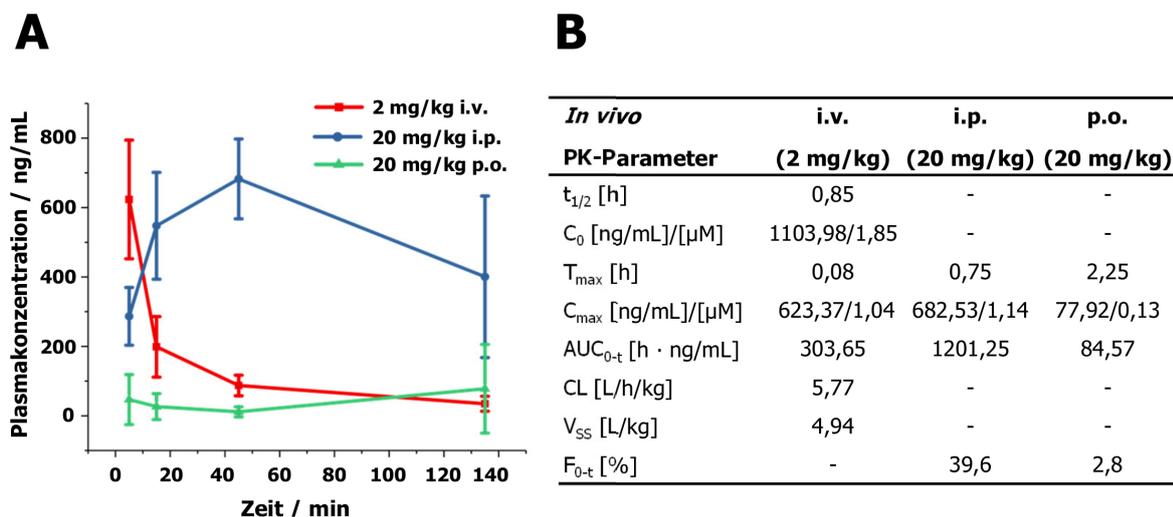


Abbildung 14: Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter von Borussertib *in vivo*. A: Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven nach intravenöser (i.v.), intraperitonealer (i.p.) und per oraler (p.o.) Applikation. B: Übersicht der jeweils ermittelten *in vivo*-PK-Parameter. $t_{1/2}$: halbmaximale Eliminationszeit, C_0 : extrapolierte Plasmakonzentration zum Zeitpunkt $t=0$, C_{max} : maximale Plasmakonzentration, T_{max} : Zeit zum Erreichen von C_{max} , AUC_{0-t} : Fläche unterhalb der Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve, CL: apparente Clearance des Moleküls aus dem Plasma, V_{SS} : apparentes Verteilungsvolumen, F_{0-t} : Bioverfügbarkeit.

Für die intraperitoneale Applikation von Borussertib mit einer Dosis von 20 mg/kg kann zunächst ein Anstieg der Plasmakonzentration bis zum Erreichen eines Maximums von 1,14 μ M nach 45 min verzeichnet werden. Bei intravenöser Gabe mit einer Dosis von 2 mg/kg Borussertib wird bereits zu Beginn der Messungen die maximale Plasmakonzentration von 1,04 μ M erreicht, welche daraufhin mit einer Halbwertszeit von 51 min abnimmt. Wie sich bereits aus der *in vitro*-Profilierung der Pharmakokinetik ableiten lässt, bleibt die perorale Bioverfügbarkeit von Borussertib bei einer Dosis von 20 mg/kg dagegen über den gesamten Zeitraum der Studie mit einer maximalen Plasmakonzentration von 0,13 μ M äußerst gering, sodass lediglich eine Bioverfügbarkeit von 2,8 % erreicht werden kann. Im Gegensatz dazu kann über eine intraperitoneale Applikation von Borussertib eine ausreichende Bioverfügbarkeit von 39,6 % gemessen werden, wodurch eine Bindung des Zielproteins in Tumoren relevanter Tiermodelle und damit eine anti-tumorale Aktivität möglicherweise erreicht werden kann.

* Durchführung der *in vivo* PK-Studien durch Georgia Günther (AG J. Hengstler, IfaDo Dortmund).

† Auswertung der Daten durch Dr. Matthias Baumann (LDC Dortmund).

3.1.4 *In vivo*-Profilierung von Borussertib in KRas-mutierten PDX-Modellen

Für die weitere Entwicklung eines investigativen Wirkstoffkandidaten ist die Untersuchung der *in vivo*-Effizienz im Rahmen einer präklinischen Tierstudie als nächster Schritt von zentraler Bedeutung. Bei der Wahl des geeigneten Tiermodells zur Validierung der anti-tumoralen Aktivität von Borussertib wurden im Rahmen dieser Arbeit dafür Patienten-abgeleitete Maus-Xenograft-Modelle (PDX) mit Pankreas- und Kolontumoren verwendet, welche Mutationen in KRas aufweisen. Im Gegensatz zu klassischen Xenograft-Modellen mit immortalisierten Zelllinien, welche typischerweise bereits etliche Subkultivierungen durchlaufen sind und dabei entscheidende Eigenschaften der Tumor-Komplexität verloren haben, wird für PDX-Modelle primäres Tumorgewebe aus einem Patienten entnommen und direkt in die Maus implantiert, sodass keine Adaption der Tumorzellen an die Kultivierung unter Zellkulturbedingungen stattfindet. Die Verwendung von PDX-Modellen hat somit gegenüber klassischen Xenograft-Modellen mit immortalisierten Zelllinien den entscheidenden Vorteil, dass die komplexen genetischen und funktionalen Charakteristika sowie die heterogene Mikroumgebung des initialen Tumorgewebes erhalten bleiben. Somit kann mit diesen Modellen die Wirkstoffeffizienz realistisch abgebildet und eine höhere Aussagekraft der Daten erzielt werden.^{184,185}

Die Verwendung KRas-mutierter Pankreas- und Kolontumormodelle für die PDX-Studien beruht auf der bereits beschriebenen enormen klinischen Relevanz dieser Tumoreinheiten, welche sich durch eine hohe Resistenzrate gegenüber der Behandlung mit Inhibitoren des Ras/MAPK-Signalwegs auszeichnen (Kapitel 3.1.2). Durch die bereits *in vitro* gezeigte Synergie von Trametinib und Borussertib sollte daher zudem die *in vivo*-Effizienz der Kombinationstherapie mit den beiden Inhibitoren in diesen PDX-Modellen untersucht werden (Abbildung 15).^{*} Auf Grundlage der erhobenen Daten in der *in vivo* pharmakokinetischen Analyse ergab sich für die Applikation von Borussertib in den Xenograft-Studien eine Dosis von 20 mg/kg intraperitoneal einmal täglich entweder in Monotherapie oder in Kombination mit 0,5 mg/kg peroral des MEK-Inhibitors Trametinib an fünf aufeinanderfolgenden Tagen pro Woche.

^{*} Durchführung der *in vivo*-PDX-Studien durch Dr. Christoph Reintjes (AG S. Hahn, Ruhr-Universität Bochum).

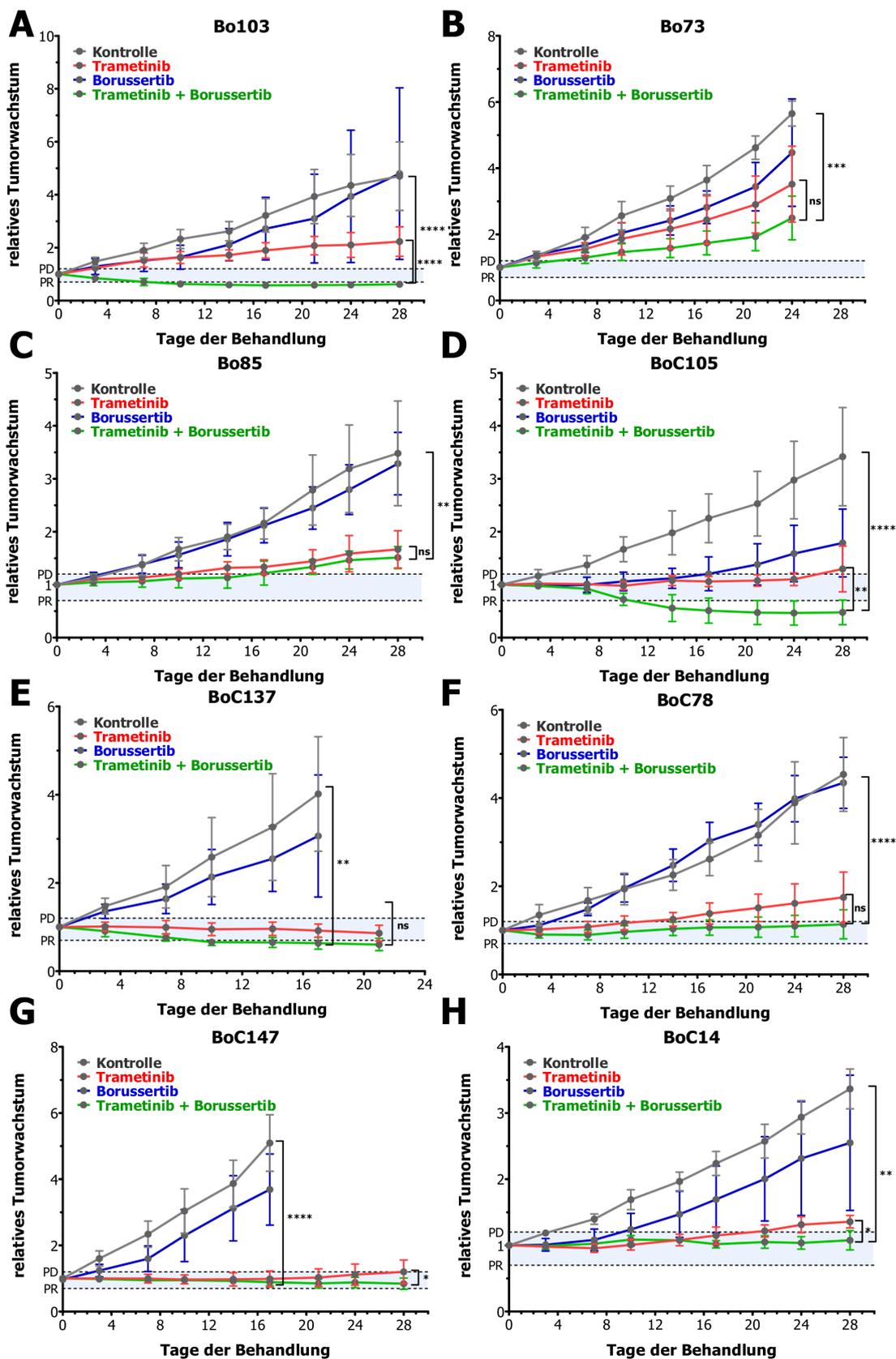


Abbildung 15: Untersuchung der anti-tumoralen Aktivität der Mono- und Kombinationstherapie von Borussertib (20 mg/kg i.p., 1x täglich) und Trametinib (0,5 mg/kg p.o., 5 Tage die Woche) in KRas-mutierten PDX-Modellen. A-C: Pankreastumormodelle. D-H: Kolontumormodelle. PD: Progressives Wachstum (+20 % von der Basislinie), PR: Partielles Ansprechen (-30 % von der Basislinie) gemäß der RECIST 1.1 Kriterien. ns: nicht signifikant, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ****: $p < 0,0001$, Zweistichproben-t-Test.

Bei Betrachtung der Pankreas-PDX-Modelle zeigt die Monotherapie mit Borussertib im Vergleich mit der Kontrollgruppe keinen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum der Tumore (PD, engl. *progressive disease*) (Abbildung 15A-C). Alle Modelle zeigen jedoch eine ausgeprägtere Reduktion des Tumolvolumens durch die Monotherapie mit Trametinib. Die Kombination der beiden Inhibitoren jedoch führt zu einem deutlich stärkeren Einfluss auf das Tumorstadium im Vergleich zu den Monotherapien, wobei für das Modell Bo103 eine partielle Remission (PR, engl. *partial response*) beobachtet werden kann (Abbildung 15A). Dies bedeutet, dass eine mindestens 30 %ige Reduktion des Tumolvolumens ausgehend von der Größe zu Beginn der Behandlung nach der 28-tägigen Kombinationstherapie erreicht werden konnte.¹⁸⁶ Die Pankreas-PDX-Modelle Bo73 und Bo85 zeigen in der Kombination weiterhin ein stetiges Tumorstadium, welches jedoch im Vergleich zu den Monotherapien verlangsamt über den Behandlungszeitraum verläuft (Abbildung 15B-C). Für die Kolon-PDX-Modelle können ähnliche Resultate beobachtet werden, wobei die Monotherapie mit Borussertib das Tumorstadium größtenteils nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 15D-H). Das PDX-Modell BoC105 zeigt allerdings ein deutlich verlangsamtetes Tumorstadium in der Monotherapie mit Borussertib im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 15D). Einen entscheidenden Vorteil gegenüber den jeweiligen Monotherapien bringt dagegen erneut die Kombination von Trametinib und Borussertib, welche zu einem partiellen Ansprechen in den Kolon-PDX-Modellen BoC105 und BoC137 führt (Abbildung 15D-E). Ein stabiles Level des Tumolvolumens (SD, engl. *stable disease*) unter der Kombinationstherapie kann außerdem für die Modelle BoC78, BoC147 und BoC14 beobachtet werden (Abbildung 15F-H).

Zur Validierung der Bindung von Borussertib und Trametinib an die jeweiligen Zielproteine im Tumor wurden weiterhin die pharmakodynamischen Veränderungen von Akt und sowie Akt- und MEK-nachgeschalteter Proteine mit Hilfe von Western Blot-Studien mit den isolierten Tumoren der BoC105-PDX-Modelle untersucht (Abbildung 16A).^{*} Anhand der Bestimmung der jeweiligen Inhibitor-Mengen in den Tumoren konnten für die mit Borussertib-behandelte Kohorte Konzentrationen von 0,15-0,44 μM sowie für die kombiniert behandelten Tumore Trametinib-Konzentrationen von 0,26-0,35 μM ermittelt werden. Somit konnten Konzentrationsbereiche in den Tumoren erreicht werden, welche eine effektive Modulation erlauben (Abbildung 16B).[†] Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigen die Tumore, welche der Monotherapie mit Borussertib unterlagen, sowohl nach fünf- als auch 28-tägiger Behandlung eine deutliche Inhibition der Akt-Phosphorylierung sowie eine Inhibition der Akt-nachgeschalteten Proteine PRAS40 und des Ribosomalen Proteins S6. Erwartungsgemäß kann für die kombinierte Therapie mit Borussertib und Trametinib eine zusätzliche Inhibition der Erk1/2-Phosphorylierung und ein verstärkter Effekt auf die Reduktion der S6-Phosphorylierung beobachtet werden. Besonders interessant ist die Betrachtung der PARP-Spaltung, welche durch die Kombinationstherapie

^{*} Isolierung der Tumor-Zelllysate in Zusammenarbeit mit Dr. Pia Wentker (LDC Dortmund) und Durchführung der Western Blot-Studien der BoC105-PDX-Modelle in Zusammenarbeit mit Dr. Jörn Weisner (AG D. Rauh, TU Dortmund).

[†] Bestimmung der Inhibitor-Konzentrationen in den Tumoren durch Dr. Matthias Baumann und Anke Unger (LDC Dortmund)

deutlich erhöht ist und somit auf eine verstärkte Induktion der Apoptose im Vergleich zur Borussertib-Monotherapie deutet. Dies spiegelt sich ebenfalls im partiellen Ansprechen der BoC105-PDX-Modelle auf die Kombination von Borussertib und Trametinib wider.

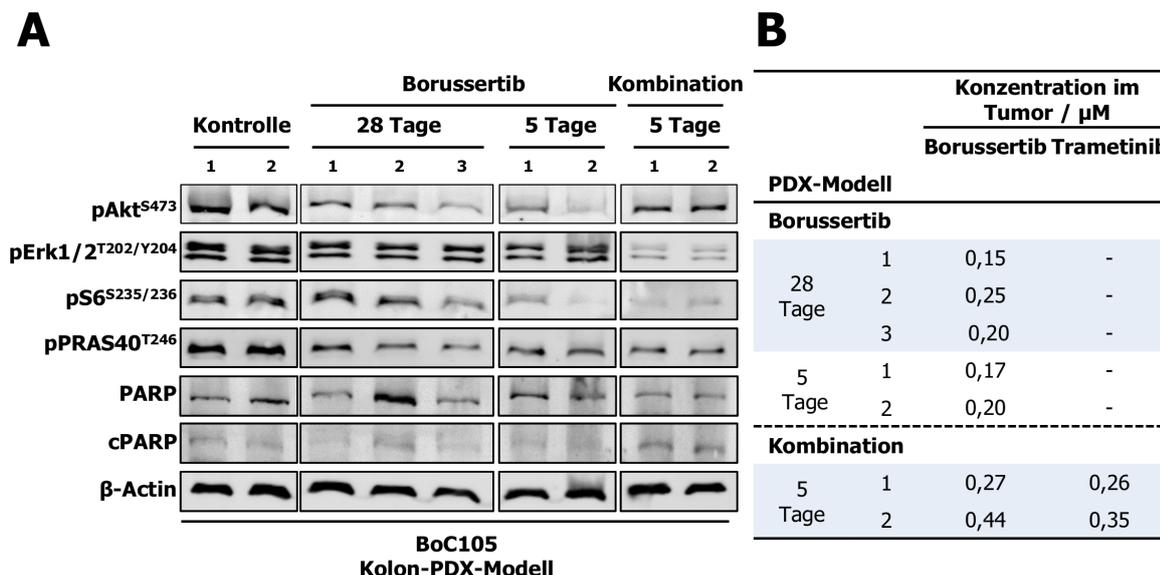


Abbildung 16: Pharmakodynamische Analyse des KRas-mutierten Kolon-PDX-Modells BoC105 nach Tumorbehandlung mit Borussertib und der Kombination von Borussertib und Trametinib. A: Western Blot-Studie mit den Tumor-Zelllysaten. 1-3: Probennummer der jeweiligen Tumore einer Kohorte. B: Bestimmung der Borussertib- und Trametinib-Konzentration im Tumor.

Insgesamt zeigen die Resultate der *in vivo*-Studien einen Vorteil der Kombinationstherapie von Trametinib und Borussertib gegenüber der Monotherapie mit dem MEK-Inhibitor, ausgelöst durch eine nachweisliche Synergie dieser Inhibitoren, in den dargestellten Pankreas- und Kolon-PDX-Modellen. Dies bestärkt somit die klinische Relevanz der simultanen Inhibition des Ras/MAPK- und des PI3K/Akt-Signalweges in Patienten mit KRas-mutierten Tumoren. Zusätzlich konnte mit Hilfe dieser PDX-Modelle erstmalig die Effizienz von Borussertib *in vivo* gezeigt werden, was das enorme Potential der kovalent-allosterischen Inhibitoren weiter unterstreicht.

3.1.5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mit Hilfe der verschiedenen etablierten Zellsysteme, vor allem in den Modellen mit Alterationen im PI3K/Akt-Signalweg, neben der biochemischen Effizienz der kovalent-allosterischen Inhibitoren auch die Überlegenheit dieser Inhibitor-Klasse im zellulären Kontext im Vergleich mit den klinischen Kandidaten in einem Viabilitätsassay sowie mit Western Blot-Studien gezeigt werden. Das Vorreitermolekül Borussertib zeigte dabei eine signifikante anti-proliferative Aktivität in den PI3K- und PTEN-alterierten Zelllinien und in der Betrachtung der pharmakodynamischen Einflüsse konnte der postulierte Wirkungsmechanismus der Akt-Inhibition durch dosis-abhängige Hemmung der Akt-Phosphorylierung und weiterer Proteine nachgeschalteter Signalkaskaden sowie die Induktion der Apoptose bestätigt werden. Der Vorteil der irreversiblen Akt-Inhibition durch die kovalente Bindung von Borussertib äußerte sich vor

allem durch eine langanhaltende Reduktion der Akt-Aktivität im Vergleich zu den allosterischen Referenzinhibitoren, welche lediglich durch die Re-Synthese des Proteins limitiert ist. *In vitro*-Studien mit einer KRas-mutierten Patienten-abgeleiteten Zelllinie weisen außerdem auf eine Synergie von Borussertib und dem MEK-Inhibitor Trametinib hin, welche insbesondere mit dem Hintergrund der hohen klinischen Relevanz der simultanen Inhibition des Ras/MAPK- und des PI3K/Akt-Signalwegs von großer Bedeutung ist. Um diese Beobachtung auch *in vivo* zu validieren, wurden zunächst die pharmakokinetischen Eigenschaften von Borussertib *in vitro* und *in vivo* bestimmt. Trotz der Limitationen in Bezug auf die Löslichkeit, Permeabilität und insbesondere die perorale Applikation konnte eine ausreichende Bioverfügbarkeit durch eine intraperitoneale Gabe von Borussertib erzielt werden, welche die weitere *in vivo*-Charakterisierung in KRas-mutierten Pankreas- und Kolon-PDX-Modellen ermöglicht. Das Erreichen einer partiellen Remission des Tumolvolumens durch die Kombination des MEK-Inhibitors Trametinib und des CAAIs Borussertib in einigen der gezeigten PDX-Modellen, demonstriert weiterhin die *in vivo*-Effizienz kovalent-allosterischer Inhibitoren. Zudem konnten ordentlichen Konzentrationen der Verbindungen in den Tumoren erreicht und die spezifische Modulation der adressierten Signalwege *in vivo* durch pharmakodynamische Analysen bestätigt werden.

Um die anti-tumorale Aktivität von Borussertib weitergehend in der Monotherapie nachweisen zu können, sollten jedoch alternative Modelle für Xenograft-Studien gewählt werden. Dafür könnten sich insbesondere Tumormodelle eignen, welche wie die bereits beschriebenen kommerziellen Zellmodelle Mutationen im PI3K/Akt-Signalweg und eine onkogene Abhängigkeit von diesen Alterationen aufweisen. Xenograft-Studien mit den besonders sensitiven Brustkrebs-Zelllinien ZR-75-1 und T-47D konnten jedoch aufgrund der notwendigen Hormon-Supplementierung mit Estradiol während des initialen Tumorstadiums durch die Kooperationspartner der AG S. Hahn (Ruhr-Universität Bochum) nicht durchgeführt werden. Derartige Modelle sind jedoch Bestandteil zukünftiger Xenograft-Untersuchungen zur Analyse der *in vivo*-Effizienz von Borussertib in der Monotherapie.

Trotz dieser sehr vielversprechenden Resultate zeigt Borussertib weiterhin Limitationen in Bezug auf die Möglichkeit der peroralen Applikation, welche für eine klinische Entwicklung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren von großem Interesse ist. Um eine Optimierung der Molekülstruktur hinsichtlich der dafür erforderlichen pharmakokinetischen Parameter zu ermöglichen, sind das Verständnis über die Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sowie das strukturbasierte Wirkstoffdesign zentrale Werkzeuge. Diese hängen jedoch stark von der Verfügbarkeit von Kristallstrukturen des Zielproteins Akt im Komplex mit verschiedenen CAAIs ab, wofür die Etablierung eines robusten Kristallisationssystems unerlässlich ist.

3.2 Etablierung der Kristallisation von Akt1^{WT}

Auf Grundlage von Komplexstrukturen eines Proteins mit verschiedenen Molekülderivaten, welche den Beitrag essentieller Protein-Liganden-Interaktionen zur biochemischen Potenz eröffnen, kann das Verständnis der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen vertieft werden. Mit Hilfe dieser Informationen wird zudem die Optimierung der Verbindungen durch systematische Modifikation der Molekülstruktur im Rahmen des strukturbasierten Wirkstoffdesigns ermöglicht. Um dieses leistungsfähige Werkzeug der Medizinischen Chemie nutzen zu können, ist die Kristallisation des Zielproteins essentiell. Dies stellt die Forschung jedoch oftmals vor Herausforderungen und bedarf vieler Optimierungen hinsichtlich verschiedener Parameter bis hin zur Etablierung eines verlässlichen Kristallisationssystems. Das Vorhandensein einer validen Infrastruktur, insbesondere in einem akademischen Umfeld, ist daher besonders wertvoll und konnte mit der ProXID-Plattform im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung gestellt werden. Im folgenden Kapitel wird die Generierung eines robusten Kristallisationssystems für das Akt1 Wildtyp-Protein (Akt1^{WT}) durch Etablierung einer Expressions- und Reinigungsstrategie, der Identifizierung von Kristallisationsbedingungen sowie Ansätze zur Optimierung der Kristallqualität und die anschließende Datenprozessierung thematisiert.*

3.2.1 Exkurs: ProXID – Infrastruktur für Proteinkristallisation im akademischen Umfeld

Um im Rahmen des strukturbasierten Wirkstoffdesigns in einem hohen Durchsatz Proteinkristalle erzeugen und unmittelbar vermessen zu können, ist eine entsprechende Infrastruktur von größter Bedeutung. Mit Hilfe der ProXID-Einheit (Protein Xtalization Infrastructure Dortmund) konnte eine solche Plattform im akademischen Umfeld des Arbeitskreises Rauh aufgebaut werden, welche die Etablierung von Kristallisationssystemen für viele verschiedene Zielproteine ermöglicht (Abbildung 17). Den Startpunkt bildet dabei das Design eines DNA-Konstrukts für die Expression des Zielproteins, wofür zunächst ein geeignetes rekombinantes Expressionssystem gewählt werden muss. Da die Kristallisation stark durch verschiedene Eigenschaften des Proteins, wie beispielsweise dessen Flexibilität, limitiert sein kann, müssen oftmals verschiedene Modifizierungen der Proteinsequenz erfolgen.¹⁸⁷ Dies beinhaltet beispielsweise die Einführung von Mutationen zur Reduktion der Oberflächenentropie oder die Deletion ganzer Proteinbereiche, wie z.B. flexibler Loop-Regionen.^{188,189} Zudem ist die Darstellung klinisch relevanter Mutanten eines Proteins oftmals von großem Interesse und erfordert ebenfalls die Durchführung zielgerichteter Mutagenesen. Mit Hilfe der generierten DNA-Konstrukte wird das Zielprotein anschließend in dem entsprechenden Expressionssystem produziert, wobei zwischen einer Vielzahl verschiedener Wirtsorganismen gewählt werden

* Teile dieses Kapitels sind in Vorarbeiten im Rahmen der Masterarbeit von M. Sc. Rebekka Scheinpflug (AG D. Rauh, TU Dortmund) entstanden. Die entsprechenden Abschnitte sind jeweils gekennzeichnet.

kann. Neben der kostengünstigen und unkomplizierten Proteinproduktion in *Escherichia coli* (*E. coli*) stellt ebenso die Baculovirus-basierte Expression in Insektenzellen ein leistungsstarkes Werkzeug der Proteinexpression klinisch relevanter Proteine dar.^{190,191} Letztere ermöglicht posttranslationale Modifikationen der eukaryotischen Proteine, wie beispielsweise Phosphorylierung, Glykosylierung oder Acetylierung, welche für die Funktion und Expression essentiell sein können.¹⁹² Für die Expression des Zielproteins in Insektenzellen, wie der *Spodoptera frugiperda*-Zelllinie Sf9¹⁹³, wird die Infektion der Zellen mit rekombinanten Baculoviren ausgenutzt. Da die in der späten Phase der viralen Genexpression produzierten Proteine Polyhedrin oder P10 nicht essentiell für die Virusreplikation sind, wird dabei deren Sequenz durch die DNA-Sequenz des Zielproteins ausgetauscht. Dadurch wird eine Überexpression des gewünschten Proteins erreicht, welche unter Kontrolle des starken Promotors des viralen Proteins steht.¹⁹⁴ Ein bekanntes System zur Proteinexpression in Insektenzellen stellt das BacMagic-System (Merck Millipore) dar. Dafür wird die Sequenz des Zielproteins in einen Transfektor eingebracht, wobei das eingefügte Gen von Rekombinationssequenzen flankiert ist. Nach Co-Transfektion des Transfektors und einer synthetischen Bacmid-DNA wird durch homologe Rekombination ein Baculovirus erzeugt, welcher die Überexpression des Zielproteins während der Virusreplikation ermöglicht.¹⁹⁵

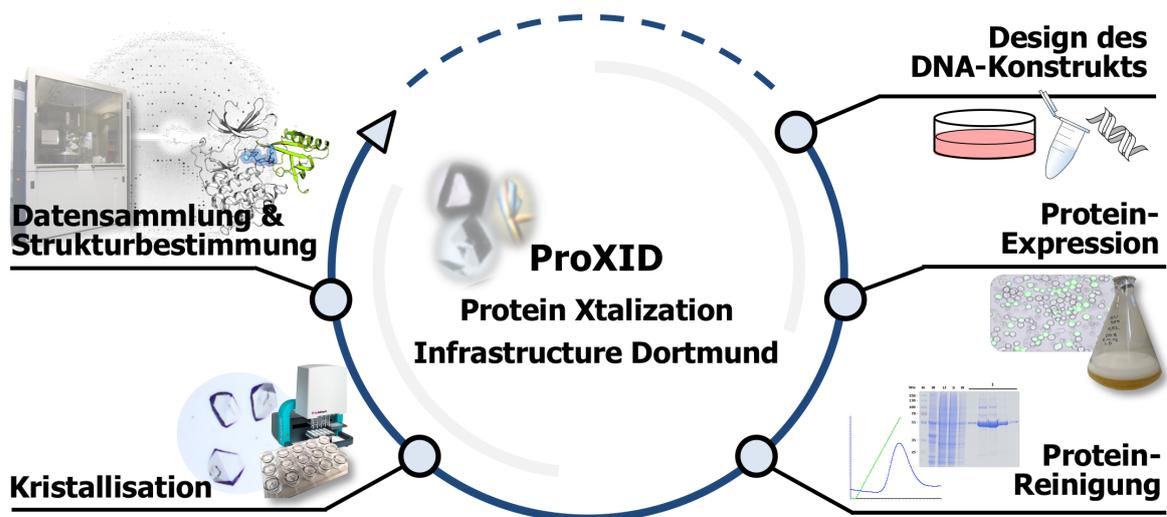


Abbildung 17: Arbeitsabläufe der Protein Xtalztion Infrastructure Dortmund (ProXID). Nach Generierung der DNA-Konstrukte erfolgt die Proteinexpression im jeweiligen Expressionssystem und die Isolierung des Proteins in hoher Reinheit. Anschließend müssen in verschiedenen *Screening*-Experimenten geeignete Kristallisationsbedingungen zur Herstellung reproduzierbarer und hoch-qualitativer Proteinkristalle identifiziert werden. Mit diesen Kristallen können am laboreigenen Röntgengenerator vollständige Diffraktionsdatensätze gesammelt werden und die Komplexstrukturen mit verschiedenen Liganden gelöst werden.

Nach erfolgreicher Proteinproduktion ist die anschließende Proteinreinigung ein zentraler Schritt der ProXID-Plattform. Um die für die Proteinkristallisation erforderliche Reinheit zu erlangen, muss das Protein durch eine Kombination verschiedener chromatographischer Methoden isoliert und ein valides Reinigungsprotokoll festgelegt werden. Konnte das Protein in ausreichenden Ausbeuten und hoher Reinheit gewonnen werden, stellt die Identifizierung der geeigneten Kristallisationsbedingung zur Erzeugung reproduzierbarer und hoch-qualitativer Proteinkristalle die oftmals größte Herausforderung dar. Dafür ist die Durchführung verschiedener *Screening*-Experimente sowie die systematische Optimierung unterschiedlichster Parameter wie beispielsweise der Inkubationstemperatur oder der Protein- und Fällungsmittelkonzentration notwendig. Gelingt durch diese Experimente tatsächlich die Identifizierung von Kristallisationsbedingungen, mit welchen im besten Fall auch Co-Kristalle mit verschiedenen Liganden erzeugt werden können, kann mit Hilfe der laborinternen Röntgenquelle die Qualität der Kristalle unmittelbar getestet und bei ausreichend guter Diffraktion der Röntgenstrahlung ein vollständiger Datensatz aufgenommen werden. Um eine höhere Auflösung der Komplexstrukturen zu erreichen, werden die Kristalle außerdem am Synchrotron Swiss Light Source (SLS) des Paul-Scherrer-Instituts (PSI Villigen, Schweiz) vermessen. Mit den erhobenen Datensätzen können durch sorgfältige Datenprozessierung und Erstellung der Proteinmodelle die Komplexstrukturen mit verschiedenen Liganden gelöst werden. Diese fließen in den Zyklus des strukturbasierten Wirkstoffdesigns ein und stellen die strukturelle Grundlage der Optimierung der Derivate bis hin zu einer vielversprechenden Leitstruktur dar.

Insgesamt werden mit den einzelnen Komponenten der ProXID-Einheit somit optimale Voraussetzungen für die Etablierung von Kristallisationssystemen geschaffen, welche zu einem maßgeblichen Erfolg einer Vielzahl von Projekten im Rahmen des strukturbasierten Wirkstoffdesigns in einem akademischen Umfeld beitragen können.

3.2.2 Konstruktdesign und Expression von Akt1^{WT}

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete DNA-Konstrukt der Akt1^{WT}-Volllänge für die Kristallisation wurde bereits in der Promotion von Dr. Jörn Weisner generiert und basiert auf der Proteinsequenz publizierter Kristallstrukturen der Akt1^{WT}-Volllänge im Komplex mit allosterischen Akt-Inhibitoren (PDB: 3O96, 4EJN).^{74,134,135} Als Expressionssystem wurde dabei die Insektenzelllinie *Spodoptera frugiperda* (Sf9) gewählt und die DNA-Sequenz für die Insektenzell-Expression codon-optimiert. Für die Expression des Proteins nach dem BacMagic-System (Merck Millipore) wurde das durch GeneArt AG synthetisierte Gen in den dafür kompatiblen Transfervektor pIEx/Bac-3 (Merck Millipore) eingebracht und N-terminal mit einem Hexahistidin-Aufreinigungsanker (His₆-Tag) versehen, um eine einfache Proteinisolierung zu ermöglichen.¹⁹⁵ Um diesen für die Kristallisation abspalten zu können, wurde außerdem die Erkennungssequenz der TEV-Protease nachfolgend eingebracht. Da gezeigt werden konnte, dass der C-terminale hydrophobe Bereich des Proteins, welcher die Aminosäuren 447-480 umfasst, während der Kristallisation durch Proteolyse abgespalten und die Dauer der Kristallisation verlängert wird, wurde dieser Bereich angelehnt an die publizierten Akt1^{WT}-Volllängen-Kristallstrukturen aus dem DNA-

Konstrukt entfernt.⁷⁴ Die Aminosäuresequenz des Kristallisationskonstrukts umfasst somit die Aminosäuren 2-446 (Uniprot-ID: P31749). Innerhalb dieser Sequenz wurden außerdem die drei Glutaminsäure-Seitenketten E114/E115/E116, welche in der Linker-Region zwischen der Kinase- und PH-Domäne von Akt1 oberflächenexponiert sind, zu Alanin-Seitenketten mutiert.¹³⁴ Dies beruht auf der Annahme, dass durch große, aufeinanderfolgende, polare Seitenketten, wie z.B. Glutamin- oder Asparaginsäure-Resten, welche sich auf der Oberfläche der Proteinstruktur befinden, eine hohe Oberflächenentropie und damit eine erhöhte Flexibilität dieses Bereiches resultiert, welche die Kristallisation des Proteins negativ beeinflussen kann. Durch Austausch dieser Seitenkette zur rigiden und unpolaren Aminosäure Alanin kann diesem Effekt entgegengewirkt werden.^{188,189,196} Wichtig ist dabei allerdings, dass diese Mutationen nicht in Strukturbereichen vorgenommen werden, die für die regulatorische Funktion des Proteins verantwortlich sind. Zusätzlich zur Kristallisation des Akt1^{WT} sollte im Rahmen dieser Arbeit auch die Identifizierung von Kristallisationsbedingungen der klinisch relevanten Akt1^{E17K}-Mutante erfolgen. Das dafür verwendete DNA-Konstrukt basiert vollständig auf dem für den Wildtyp verwendeten Expressionsvektor, wobei lediglich der Austausch der negativ geladenen Glutaminsäure an Aminosäureposition 17 zum positiv geladenen Lysin durch ortsgerichtete Mutagenese vorgenommen wurde. Des Weiteren wurden die C296S- und C310S-Mutanten basierend auf dem Konstrukt des Wildtyps generiert, welche die strukturelle Untersuchung einer möglichen Selektivität der kovalenten Adressierung der in der Aktivierungsschleife befindlichen Cysteine durch die CAAs erlauben.

Für die Expression von Akt1^{WT} nach dem BacMagic-Protokoll (Merck Millipore) wurde mit Hilfe des pIEx/Bac-3 Transfervektors, welcher das beschriebene Genkonstrukt des Zielproteins enthält, zunächst der rekombinante Baculovirus durch die Protein Chemistry Facility (ZE-PCF, MPI Dortmund) generiert und dieser für die Infektion der Insektenzellen zur Induktion der Proteinexpression von Akt1^{WT} genutzt. Dabei wurde vor der präparativen Expression zunächst eine Virusamplifikation zum Baculovirus zweiter und dritter Generation (P2- und P3-Virus) durchgeführt, um einen höheren Virustiter zu erreichen. Zu Beginn dieser Arbeit erfolgte die Insektenzellexpression zunächst in serumfreien EX-CELL 405 Medium (Sigma-Aldrich), wobei jedoch nur geringe Proteinausbeuten und ein verlangsamtes Zellwachstum beobachtet werden konnten. Der Austausch des Mediums durch das Sf-900 III SFM Medium (Gibco) konnte dagegen zu einer deutlichen Steigerung der Expressionsrate führen, sodass dieses Medium für alle weiteren Expressionen verwendet wurde. Um die optimale Inkubationszeit nach der Infektion der Insektenzellen (TOH, engl. *time of harvest*) und damit den Zeitpunkt, zu welchem das höchste Level an löslich vorliegendem Protein erreicht wird, zu bestimmen, wurde initial eine Testexpression in Sf9-Zellen als auch in der Insektenzelllinie Tnao38 durchgeführt.* Dafür wurde sowohl von der Expressionskultur der jeweiligen Zelllinie als auch von einer Sf9-Kontrollkultur, welche nicht mit dem Baculovirus infiziert wurde, nach jeweils 24, 48, 72 und 96 Stunden

* Durchführung der Testexpression in Sf9-Zellen im Rahmen der Bachelorarbeit von Cora Neugebauer (AG D. Rauh, TU Dortmund).

Etablierung der Kristallisation von Akt1^{WT}

eine Probe entnommen und die Proteinexpression mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese verfolgt (Abbildung 18). Da jedoch anschließend kein Zellaufschluss in diesen initialen Experimenten erfolgte, war eine Analyse des löslichen und unlöslichen Anteils des exprimierten Proteins im Rahmen dieser Testexpressionen nicht möglich.

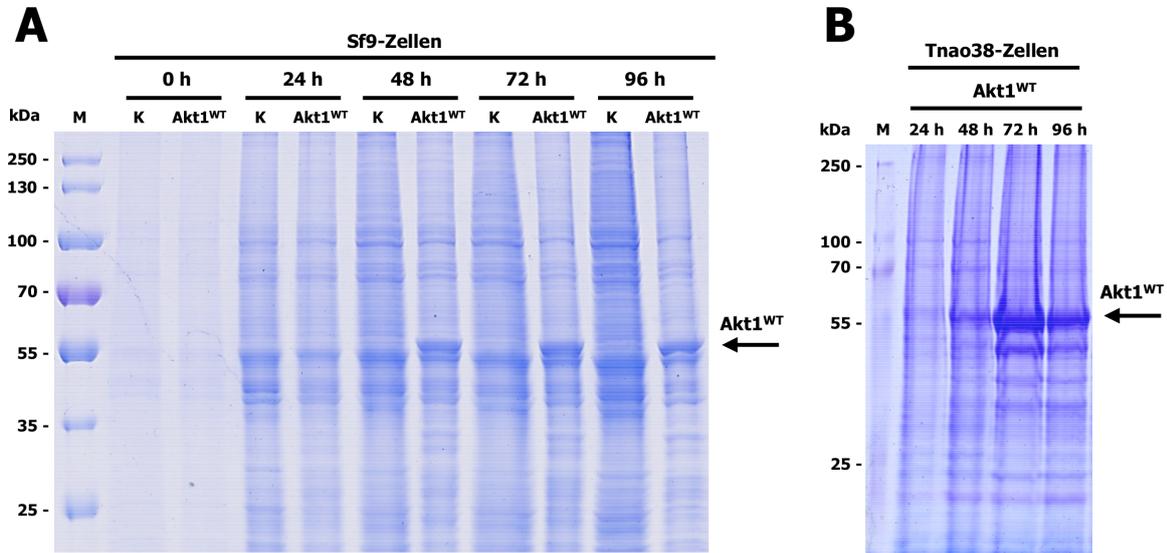


Abbildung 18: Testexpression von Akt1^{WT} in Insektenzellen. Die Proben wurden zu den gezeigten Zeitpunkten entnommen und per SDS-Gelelektrophorese analysiert. A: Testexpression in Sf9-Zellen. B: Testexpression in Tnao38-Zellen. K: Proben der Sf9-Kontrollkultur, Akt1^{WT}: Proben der Akt1^{WT}-Expressionskultur. Nach 72 Stunden kann in beiden Insektenzelllinie das höchste Proteinlevel erreicht werden.

In beiden getesteten Insektenzelllinien konnte nach 72 Stunden Expressionsdauer das höchste Level an Akt1^{WT} mit einem Molekulargewicht von 55,1 kDa detektiert werden, was durch die erhöhte Intensität der Bande auf Höhe von ca. 55 kDa deutlich wird. Damit konnte diese Inkubationszeit als optimaler Zeitpunkt für die Zellernte bestimmt werden. Insgesamt deutet die Testexpression eine höhere Proteinausbeute an Akt1^{WT} durch die Expression in Tnao38-Zellen im Vergleich zur Expression in Sf9-Zellen an, wobei jedoch auch eine leicht unterschiedliche Probenbeladung der SDS-Gele beachtet werden sollte. Diese Steigerung der Ausbeute in Tnao38-Zellen ließ sich allerdings auch durch eine Expression im höheren Maßstab und anschließende Proteinisolierung nach Zellaufschluss und Reinigung bestätigen. Aufgrund eines sich unterscheidenden Phosphorylierungsmusters des Zielproteins, welches sich im späteren Verlauf dieser Arbeit als kritisch für die Proteinkristallisation herausstellte und nachfolgend detaillierter betrachtet wird (Kapitel 3.2.4.2), wurden die Sf9-Zellen als geeignete Zelllinie für die Expression des Kristallisationskonstrukts von Akt1^{WT} gewählt.

3.2.3 Etablierung des Reinigungsprotokolls von Akt1^{WT}

Für die verlässliche Kristallisation eines Proteins muss eine hohe Ausbeute und Reinheit des isolierten Zielproteins gewährleistet sein. Oftmals ist daher die Durchführung der zahlreichen erforderlichen *Screening*-Experimente zur Identifizierung geeigneter Kristallisationsbedingungen stark durch die Proteinqualität und -ausbeute limitiert, sodass die Etablierung eines Reinigungsprotokolls einen zentralen Bestandteil eines robusten Kristallisationssystems darstellt. Nachfolgend wird die Etablierung eines geeigneten Reinigungsprotokolls des Akt1^{WT}-Kristallisationskonstrukts exemplarisch beschrieben. Im Vergleich zur initialen Reinigungsstrategie, welche im Arbeitskreis zunächst angewandt wurde, wurden im Rahmen dieser Arbeit nach sorgfältiger Evaluierung der für den Erhalt der Kristallisationsfähigkeit essentiellen Schritte einige Änderungen des Protokolls vorgenommen (Abbildung 19).¹⁹⁷

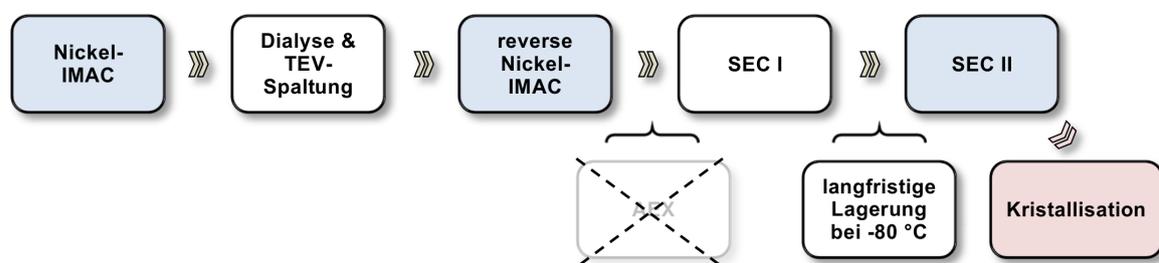


Abbildung 19: Überblick über die etablierte Reinigungsstrategie für das Akt1^{WT}-Kristallisationskonstrukt. Nach Isolierung des Proteins über eine Nickel-Affinitätschromatographie (Nickel-IMAC, engl. *Nickel immobilized metal affinity chromatography*) wird eine Dialyse über Nacht in Kombination mit der Abspaltung des His₆-Tags durch die TEV-Protease durchgeführt. Anschließend erfolgt eine reverse Nickel-IMAC und eine Größenausschlusschromatographie (SEC, engl. *size exclusion chromatography*). Nach langfristiger Lagerung bei -80 °C wird das portionierte Protein vor der Kristallisation über eine zweite Größenausschlusschromatographie (SEC II) in den Kristallisationspuffer überführt sowie Oligomere abgetrennt. Der Anionenaustauschchromatographie-Schritt (AEX, engl. *anion exchange chromatography*) des initialen Reinigungsprotokolls wurde im finalen Protokoll vernachlässigt.

Nachdem die Sf9-Zellen per Hochdruck aufgeschlossen wurden, sollten durch Ultrazentrifugation zunächst die löslichen Zellbestandteile von den unlöslichen getrennt und das Zelllysate auf eine Nickel-Affinitätschromatographiesäule aufgetragen werden (Abbildung 20). Für die Isolierung des Zielproteins wurde ausgenutzt, dass das Akt1^{WT}-Kristallisationskonstrukt N-terminal mit einem His₆-Tag versehen ist, gefolgt von einer Erkennungssequenz der TEV-Protease zur proteolytischen Abspaltung des Aufreinigungsankers vor den Kristallisationsexperimenten.

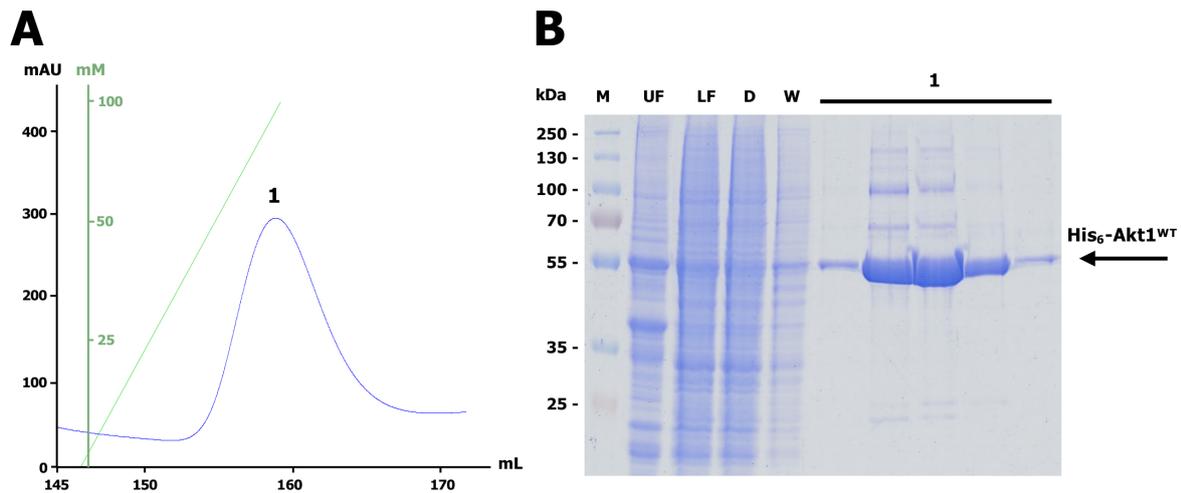


Abbildung 20: Erste Nickel-Affinitätschromatographie zur Reinigung von Akt1^{WT}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal, grün: Gradient der Imidazolkonzentration. B: SDS-Gel des ersten Reinigungsschritts. M: Marker, UF: unlösliche Fraktion, LF: lösliche Fraktion, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, 1: Fraktionen des Elutionspeak 1. Das Zielprotein konnte im Elutionspeak neben leichten Verunreinigungen isoliert werden.

Die Analyse des SDS-Gels zeigt, dass das Zielprotein mit einem Molekulargewicht von 55,1 kDa nach dem Zellaufschluss neben der löslichen Form (LF) auch zum Teil in unlöslicher Form (UF) vorliegt (Abbildung 20B). Im Vergleich zur löslichen Fraktion kann dieser Anteil jedoch vernachlässigt werden. Die Zugabe des nicht-denaturierenden Detergenzes CHAPS nach dem Zellaufschluss konnte den Anteil des unlöslichen Proteins in nachfolgenden Reinigungen jedoch leicht reduzieren. Sowohl die Durchfluss- (D) als auch die Waschfraktion (W) der Nickel-Affinitätschromatographiesäule zeigen ebenso eine Bande des Zielproteins, was möglicherweise auf eine Sättigung der Bindekapazität der verwendeten Säule zurückgeführt werden und beispielsweise durch sukzessive Auftragung und Elution des Zelllysats oder eine langsamere Beladung verhindert werden kann. Nichtsdestotrotz konnte Akt1^{WT} in einem symmetrischen Peak und ausreichender Menge durch kompetitive Verdrängung mit Hilfe eines linearen Imidazol-Gradienten von der Säule eluiert werden (Abbildung 20A). Dabei zeigt das SDS-Gel außerdem die simultane Elution weniger höher- und niedermolekularer Verunreinigungen, welche in den nachfolgenden Reinigungsschritten entfernt werden sollten.

Zur Abspaltung des His₆-Tags wurde die Proteinlösung anschließend mit der TEV-Protease im Zuge einer Dialyse, durch welche die hohe Imidazol-Konzentration reduziert werden sollte, über Nacht co-inkubiert. Im Anschluss daran wurde die TEV-Protease mittels einer reversen Nickel-Affinitätschromatographie vom Zielprotein abgetrennt (Abbildung 21).

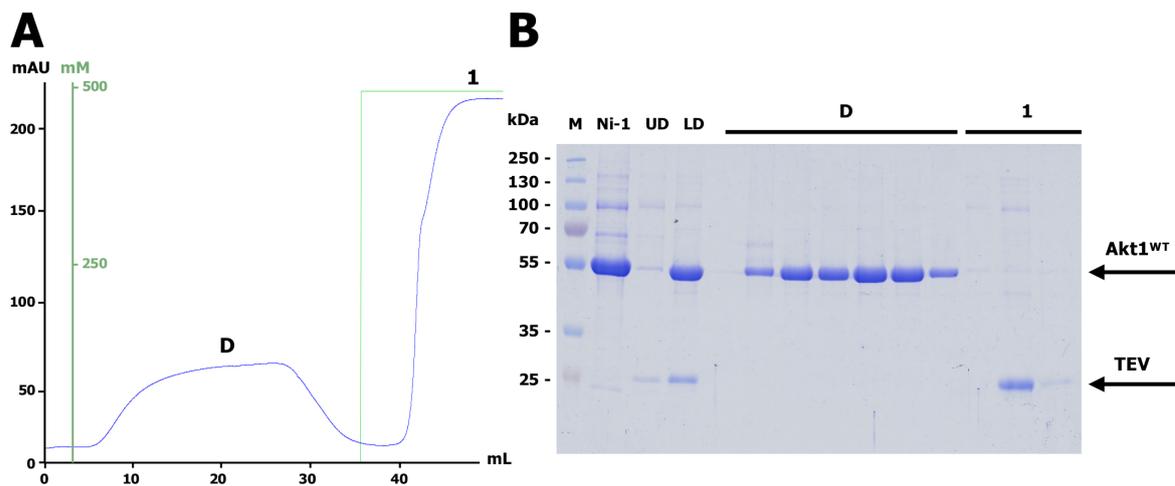


Abbildung 21: Reverse Nickel-Affinitätschromatographie zur Reinigung von Akt1^{WT}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal, grün: Imidazol-Konzentration. B: SDS-Gel der zweiten Nickel-IMAC. M: Marker, Ni-1: Elutionsfraktion der ersten Nickel-Affinitätschromatographie, UD: unlösliche Fraktion der Dialyse, LD: lösliche Fraktion der Dialyse, D: Durchfluss, 1: Fraktionen des Elutionspeak 1. Das vollständig geschnittene Zielprotein konnte im Durchfluss der reversen Nickel-Affinitätschromatographie gesammelt werden.

Im Zuge der Dialyse konnte die Entstehung eines Präzipitats in der Proteinlösung beobachtet werden, welches vor der reversen Nickel-Affinitätschromatographie durch Zentrifugation abgetrennt wurde. Die Analyse des Präzipitats (UD) auf dem SDS-Gel verdeutlicht, dass es sich dabei zum großen Teil um die nieder- und höhermolekularen Verunreinigungen handelt und sich damit die beobachtete Präzipitation während der Dialyse als vorteilig für die Reinigung von Akt1^{WT} erwies (Abbildung 21B). Des Weiteren legte der Vergleich der löslichen Fraktion nach der Proteolyse durch die TEV-Protease (LD) mit der Elutionsfraktion der ersten Nickel-Affinitätschromatographie (Ni-1) eine leichte Verschiebung der Bandenhöhe von Akt1^{WT} in Richtung eines reduzierten Molekulargewichts dar. Dies lässt auf eine erfolgreiche und vollständige Abspaltung des His₆-Tags durch die TEV-Protease schließen, wodurch das Zielprotein ein Molekulargewicht von 51,7 kDa aufweist. Dies wird insbesondere dadurch bestätigt, dass das Zielprotein ausschließlich im Durchfluss (D) der reversen Nickel-Affinitätschromatographie isoliert werden konnte. Die TEV-Protease, welche einen His₆-Tag trägt, sowie einige weitere Verunreinigungen, konnten durch die Bindung an die Nickel-Affinitätschromatographiesäule abgetrennt werden.

Obwohl das Protein nach der reversen Nickel-Affinitätschromatographie bereits eine hohe Reinheit aufweist, wurde als nächster Reinigungsschritt des initialen Protokolls und zur Reproduktion zunächst auch im Rahmen dieser Arbeit eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt (Abbildung 22). An dieser Stelle erfolgte nach Evaluierung der Notwendigkeit einer Anionenaustauschchromatographie eine Optimierung des Reinigungsprotokolls, was im Folgenden näher diskutiert wird.

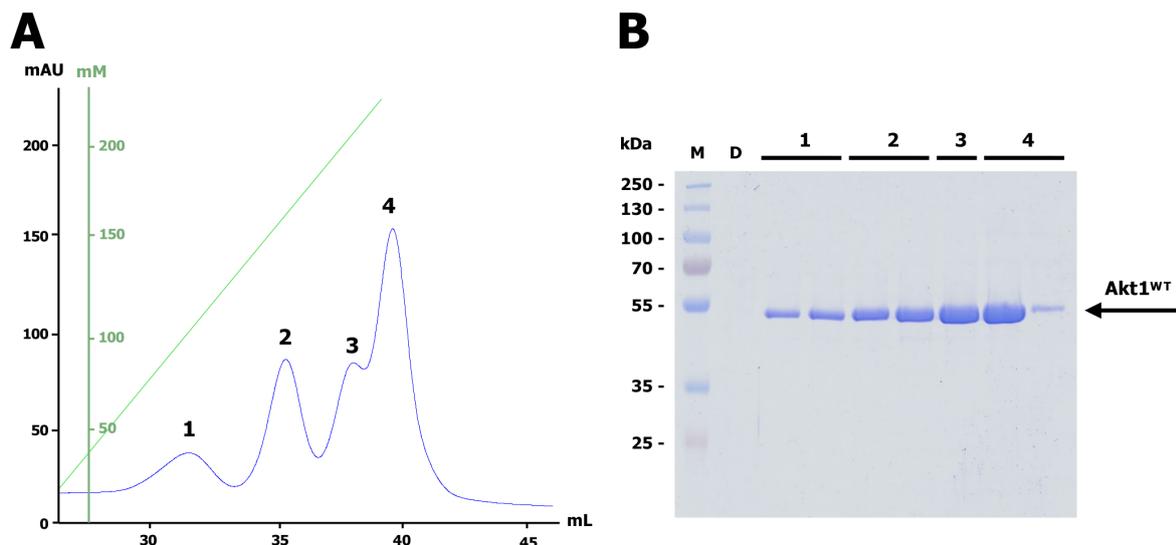


Abbildung 22: Anionenaustauschchromatographie zur Reinigung von Akt1^{WT}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal, grün: Gradient einer Natriumchlorid-Konzentration. B: SDS-Gel der AEX. M: Marker, D: Durchfluss, 1-4: Fraktionen der Elutionspeaks 1-4. Das Zielprotein konnte in verschiedenen Elutionspeaks, welche unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen entsprechen, isoliert werden.

Das Chromatogramm der initial durchgeführten Anionenaustauschchromatographie zeigt vier Elutionspeaks, welche alle dem Zielprotein zugeordnet werden konnten (Abbildung 22). In früheren massenspektrometrischen Untersuchungen konnte bereits festgestellt werden, dass es sich dabei um unterschiedliche Phosphorylierungsspezies von Akt1^{WT} handelt, wobei das unphosphorylierte, einfach-, zweifach- und dreifach-phosphorylierte Protein mit jeweils steigender Natriumchlorid-Konzentration eluiert werden.^{197*} Auffällig ist jedoch, dass die verschiedenen Spezies mit der verwendeten Anionenaustauscher-Säule (HiTrap Q HP, Cytiva) nicht klar voneinander getrennt werden konnten. Die Durchführung der Anionenaustauschchromatographie diente ursprünglich der Entfernung verbleibender Verunreinigungen, weshalb alle Fraktionen der erhaltenen Eluate anschließend wieder vereint wurden. Da jedoch ein Vergleich der Reinheit zur Proteinlösung ohne Durchführung der Anionenaustauschchromatographie keinen Unterschied zeigte und auch für die Kristallisation nicht nachteilig war, konnte dieser Reinigungsschritt für die routinemäßige Reinigung von Akt1^{WT} für die Kristallisationsexperimente vernachlässigt werden. Dies hat insbesondere den Vorteil, dass neben einem Zeitgewinn eine deutlich höhere Proteinausbeute nach der Reinigung verzeichnet werden konnte, da eine Anionenaustauschchromatographie oftmals mit einem hohen Proteinverlust einhergeht.

In ESI-MS/MS-Untersuchungen nach tryptischem Verdau der gemischten Proteinlösung mit den vier gefundenen Zuständen wurden zahlreiche Phosphorylierungsstellen identifiziert, die in unterschiedlichen Kombinationen auftreten (Abbildung 23D).[†] Neben der teilweise vorliegenden Phosphorylierung der Aktivierungsstelle Thr308 handelt es sich

* Durchführung der massenspektrometrischen Analyse im Rahmen der Masterarbeit von M. Sc. Rebekka Scheinpflug (AG D. Rauh, TU Dortmund).

† Auswertung der MS/MS-Studien durch Malte Metz und Dr. Petra Janning (AG H. Waldmann, MPI Dortmund).

bei den Phosphorylierungsstellen Ser124, Ser126, Ser129 und Thr146 um bereits literaturbekannte Modifikationen aus der Insektenzell-Expression, welche die Akt-Aktivität nicht beeinflussen.^{50,198-201} Mit Hilfe einer Kinasetitration im Rahmen des HTRF-Assays konnte außerdem eine sehr geringe Aktivität der verwendeten Proteinlösung im Vergleich mit dem *in vitro* aktivierten kommerziellen Assaykonstrukt gezeigt werden (Kapitel 0, Abbildung 64).^{*} Die Resultate der ESI-MS/MS-Studien führen insgesamt zu der Annahme, dass innerhalb des jeweiligen Phosphorylierungszustands mehrere Varianten mit verschiedenen Phosphorylierungsstellen vorliegen. Diese Heterogenität der Proteinlösung stellte sich jedoch für die Kristallisation des Proteins als unerlässlich heraus, was in einem späteren Kapitel näher diskutiert wird (Kapitel 3.2.4.2).

Zur detaillierteren Untersuchung und effizienteren Auftrennung der vorliegenden Phosphorylierungszustände von Akt1^{WT} wurde die Anionenaustauschchromatographie außerdem mit einer Proteinlösung einer anderen Expressionscharge und einer Anionenaustauscher-Säule mit höherer Trennungsleistung wiederholt. Mit Hilfe der stärkeren Anionenaustauscher-Säule (MonoQ 5/50 GL, Cytiva) konnten drei einzelne Elutionspeaks erhalten werden, welche erneut dem Zielprotein zugeordnet werden konnten (Abbildung 23A-B). Da es sich bei dem Chromatogramm und dem zugehörigen SDS-Gel der hier dargestellten Anionenaustauschchromatographie um eine andere Expressions- und Reinigungscharge handelt, ist beim Vergleich zu beachten, dass eine deutlich höhere Proteinmenge vorliegt. Nichtsdestotrotz fällt im Unterschied zum vorherigen Chromatogramm (Abbildung 22) auf, dass in der Elution mit der stärkeren Anionenaustauscher-Säule lediglich drei Elutionspeaks beobachtet werden konnten. Um dies weiter zu analysieren, wurden der Durchfluss und die Fraktionen der Elutionspeaks massenspektrometrisch untersucht (Abbildung 23C). Dabei wurde deutlich, dass lediglich die phosphorylierten Spezies an die Säule gebunden haben, während das unphosphorylierte Protein im Durchfluss isoliert wurde. Insgesamt konnten somit neben dem unphosphorylierten Protein das einfach-, zweifach- und dreifach-phosphorylierte Akt1^{WT} effizient voneinander separiert werden. Die Untersuchung der Kristallisationsfähigkeit dieser einzelnen Spezies wird ebenfalls in einem späteren Kapitel näher erläutert (Kapitel 3.2.4.2).

^{*} Durchführung der Kinasetitration für das Assaykonstrukt durch Dr. Jörn Weisner (AG D. Rauh, TU Dortmund).

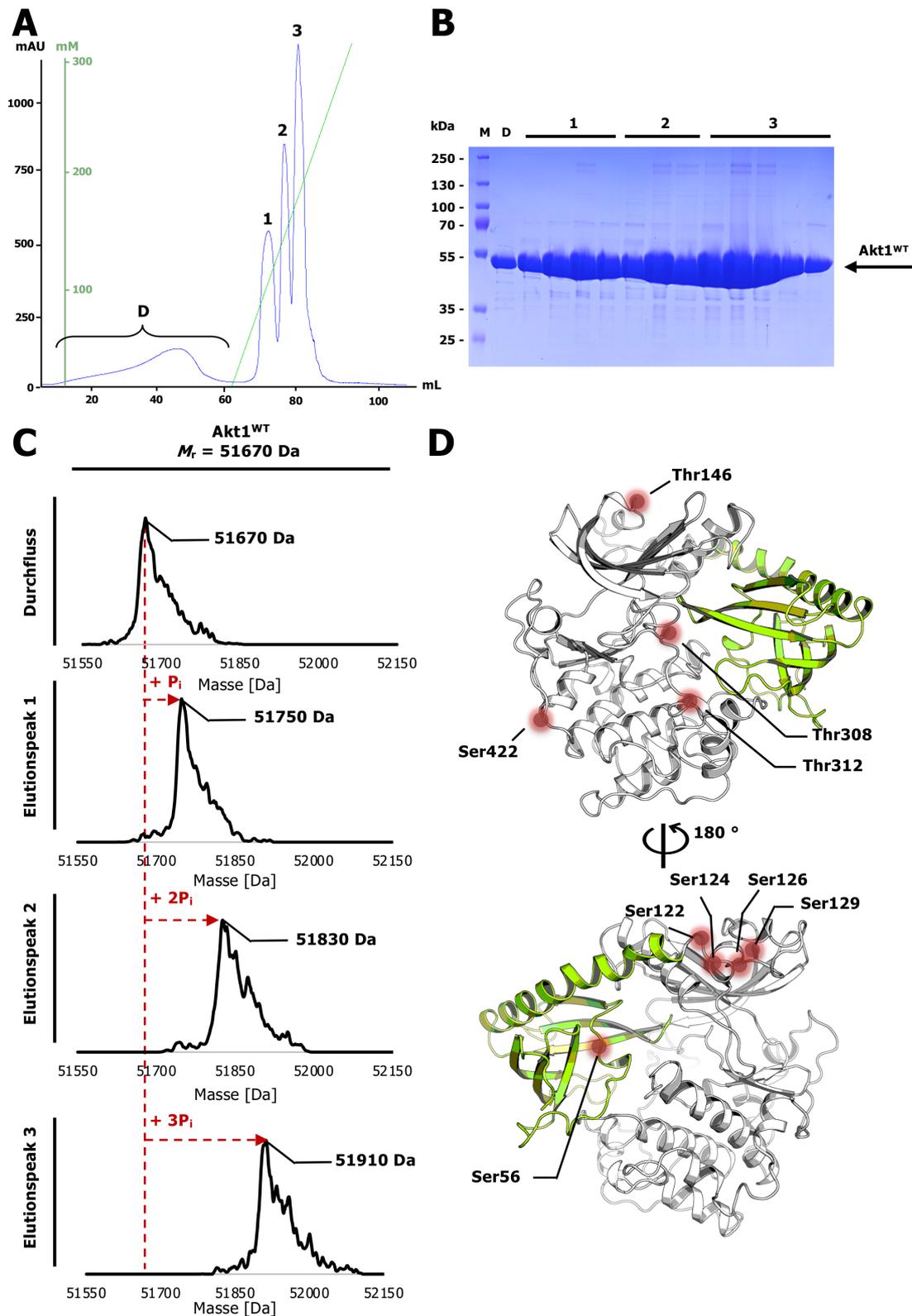


Abbildung 23: Anionenaustauschchromatographie mit der effizienteren Säule (MonoQ 5/50 GL, Cytiva) zur Auftrennung der Phosphorylierungszustände von Akt1^{WT}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal, grün: Gradient einer Natriumchlorid-Konzentration. B: SDS-Gel der AEX. M: Marker, D: Durchfluss, 1-3: Fraktionen der Elutionspeaks 1-3. C: Massenspektrometrische Analyse des Durchflusses und der Elutionspeaks. Die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände des Zielproteins konnten in drei Elutionspeaks voneinander abgetrennt werden. D: Modellierung der Positionen der identifizierten Phosphorylierungsstellen.

Wie bereits beschrieben, wurde für die routinemäßigen Kristallisationsexperimente das heterogene Gemisch der Phosphorylierungszustände verwendet und die Anionenaustauschchromatographie vernachlässigt. Um die verbleibenden Verunreinigungen zu entfernen, folgte demnach direkt im Anschluss an die reverse Nickel-Affinitätschromatographie eine Größenausschlusschromatographie (Abbildung 24).

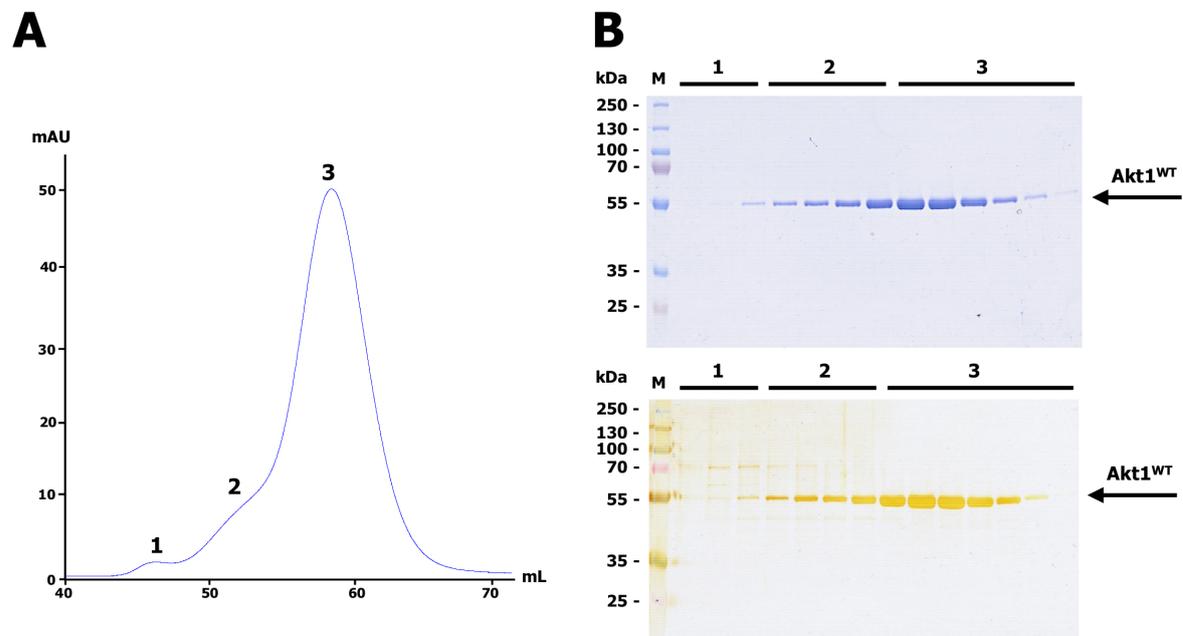


Abbildung 24: Größenausschlusschromatographie zur Reinigung von Akt1^{WT}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal. B: SDS-Gel der ersten Gelfiltration nach CBB-Färbung (oben) und Silberfärbung (unten). M: Marker, 1-3: Fraktionen der Peaks 1-3. Das Zielprotein kann in hoher Reinheit im dritten Peak isoliert werden.

Mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie konnten die verbleibenden höhermolekularen Verunreinigungen im ersten Elutionspeak sowie Oligomere im zweiten Peak, welcher lediglich eine Schulter des dritten Peaks darstellt, entfernt werden. Das Zielprotein wurde im größten, dritten Peak erhalten und weist eine außerordentlich hohe Reinheit auf, welche insbesondere durch die deutlich sensitivere Silberfärbung des SDS-Gels bestätigt wurde (Abbildung 24B). Da außerdem hohe Proteinausbeuten mit dem im Rahmen dieser Arbeit optimierten Expressions- und Reinigungsprotokoll erzielt wurden, konnte für die Hochdurchsatz-Anwendung in der Kristallisation die Proteinlösung nach Durchführung der Größenausschlusschromatographie portionsweise eingefroren werden und bei Bedarf wieder aufgetaut werden. Dies ermöglicht die Durchführung zahlreicher *Screening*-Experimente mit der Proteinlösung derselben Expressions- und Reinigungscharge und kann für ein funktionierendes Kristallisationssystem von großer Bedeutung sein.

Um das Protein in den finalen Lagerungspuffer zu überführen, welcher für die Kristallisation notwendig ist, sowie für die Abtrennung von Oligomeren nach dem Auftauprozess, wurde eine zweite Größenausschlusschromatographie durchgeführt (Abbildung 25).

Die Zusammensetzung des finalen Tris-basierten Gelfiltrationspuffers ist dabei analog zu dem für die publizierte Akt1^{WT}-Kristallstruktur beschriebenen Lagerungspuffer (PDB: 3O96), um eine Reproduktion zu gewährleisten.⁷⁴ Eine direkte Verwendung des Lagerungspuffers anstatt des HEPES-basierten Gelfiltrationspuffers in der ersten Größenausschlusschromatographie führte interessanterweise zum Verlust der Kristallisationsfähigkeit, sodass eine Verkürzung der Reinigungsroute durch Aussparung des Gelfiltrationsschritts mit dem HEPES-Puffer nicht zielführend war.

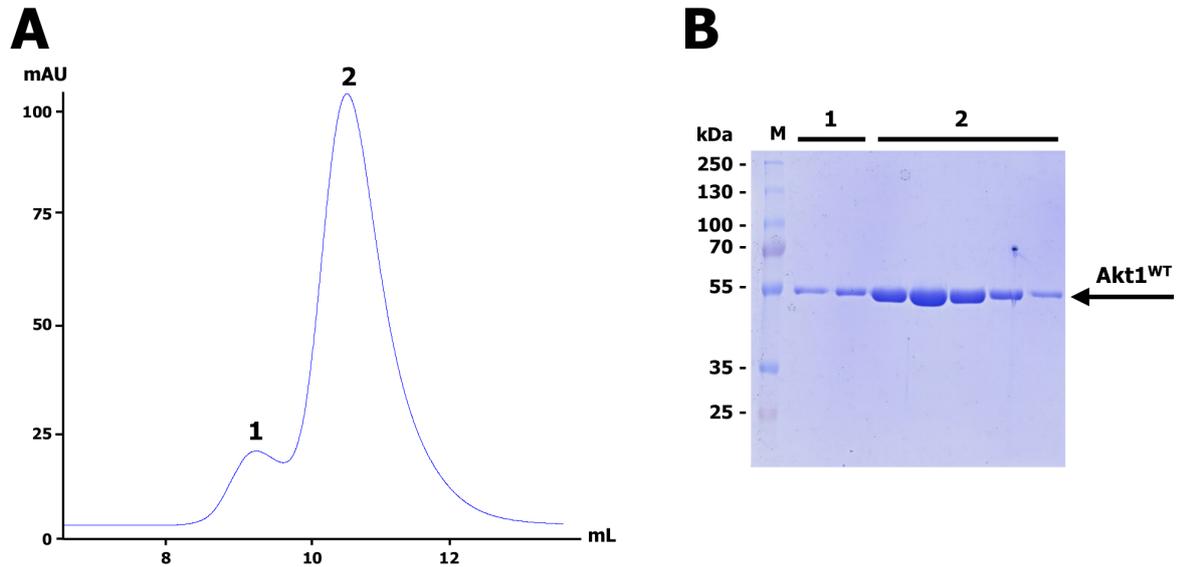


Abbildung 25: Zweite Größenausschlusschromatographie zum Pufferaustausch von Akt1^{WT}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal. B: SDS-Gel der finalen Gelfiltration. M: Marker, 1-2: Fraktionen der Peaks 1-2. Das Protein konnte von Oligomeren abgetrennt werden und in den Kristallisationspuffer überführt werden.

Durch die Abtrennung von Oligomeren im ersten Peak der zweiten Größenausschlusschromatographie konnte im zweiten Peak eine Proteinlösung erhalten werden, welche für die weiteren Kristallisationsexperimente verwendet wurde (Abbildung 25A-B). Da eine hohe Stabilität des Proteins im finalen Lagerungspuffer für die Kristallisation von besonderem Vorteil ist, wurde dies mit Hilfe eines Puffer-*Screens* im Rahmen des *Thermal Shift Assays* (TSA) überprüft (Abbildung 26A). Dieser beruht auf der Messung einer durch Temperaturerhöhung induzierten Proteindenaturierung, wobei die Entfaltung des Proteins über den fluoreszenten Farbstoff SYPRO Orange detektiert wird. Eine höhere Schmelztemperatur korreliert dabei mit einer erhöhten Proteinstabilität.^{202,203} Die Ergebnisse zeigen, dass das Protein bei der gegebenen Salzkonzentration von 100 mM Natriumchlorid und dem pH-Wert des Tris-Puffers von pH 7,5 die höchste Stabilität aufweist und dieser Puffer somit ideale Voraussetzungen für die Kristallisation des Proteins schafft.

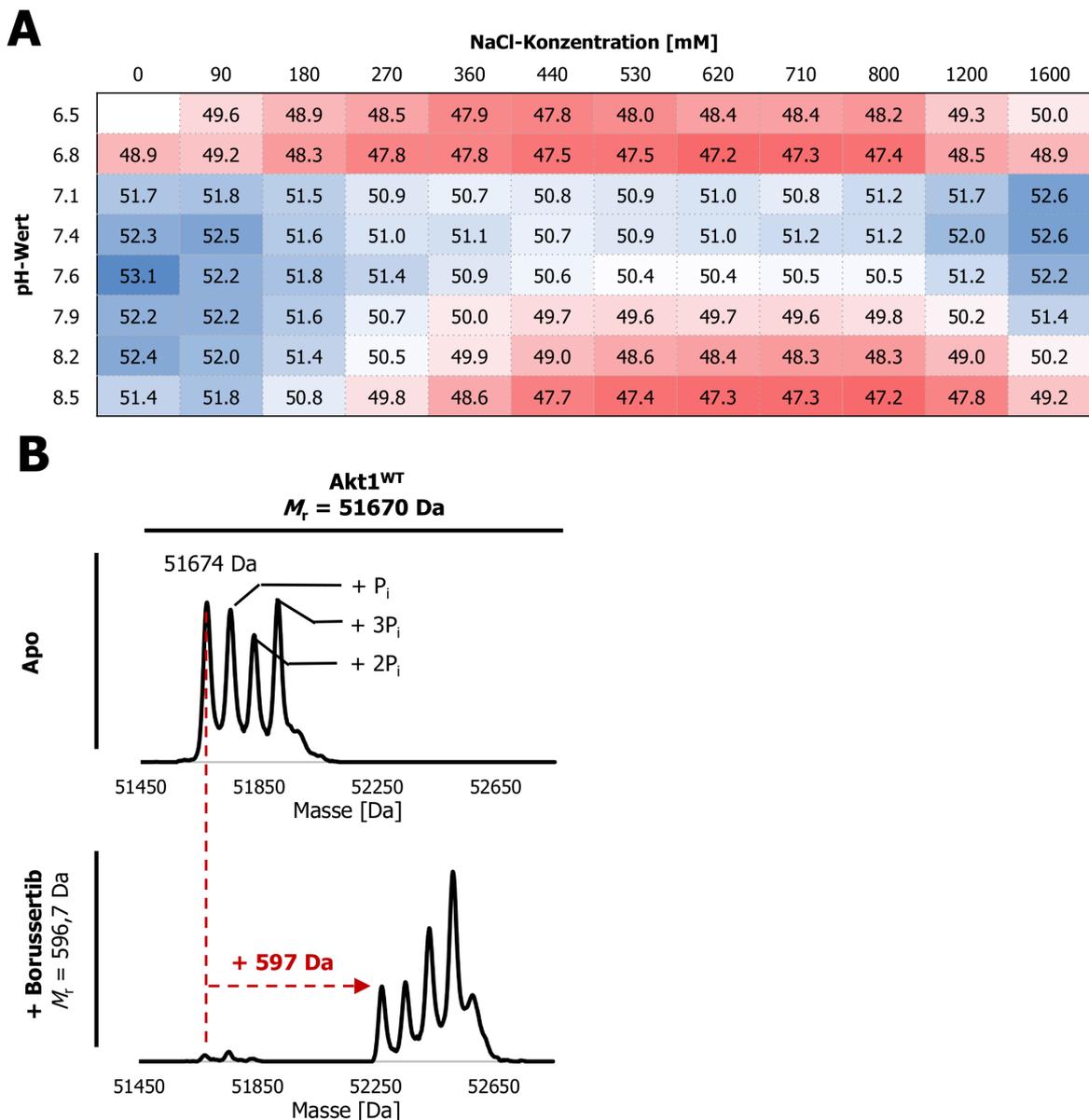


Abbildung 26: Überprüfung der Stabilität des isolierten Akt1^{WT} für die Kristallisation. A: Pufferstabilitätstest für Akt1^{WT} im Lagerungspuffer für die Kristallisation. Im gewählten Puffer weist das Protein die höchste Stabilität auf. B: Massenspektrum der für die Kristallisation verwendeten Proteinlösung und kovalente Modifikation aller Spezies durch Borussertib nach einstündiger Inkubation mit einem dreifach-molaren Überschuss des Inhibitors auf Eis.

Eine abschließende massenspektrometrische Analyse bestätigte zudem sowohl die Identität des isolierten Akt1^{WT} als auch die für die Kristallisation verwendete Heterogenität an unphosphoryliertem, einfach-, zweifach- und dreifach-phosphoryliertem Protein, wobei die verschiedenen Zustände in einem ähnlichen Verhältnis vorliegen (Abbildung 26B). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass eine valide Quantifizierung der Spezies mit Hilfe der erhaltenen Massenspektren unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht direkt möglich ist, sodass die beobachteten Verhältnisse lediglich qualitativ betrachtet werden können. Interessant ist außerdem, dass ähnliche Muster in zahlreichen voneinander unabhängigen Expressionschargen in Sf9-Zellen reproduziert werden konnten.

Des Weiteren kann eine vollständige und spezifische kovalente Modifikation aller Spezies durch den kovalent-allosterischen Inhibitor Borussertib erfolgen, was ebenfalls auf eine korrekte Faltung des Proteins deutet. Die spezifische Adressierung der Cysteine Cys296 und Cys310 in der Aktivierungsschleife konnte außerdem in früheren ESI-MS/MS-Experimenten sowie mit weiteren kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden.¹²³

Insgesamt konnten durch den optimierten Reinigungsablauf hohe Ausbeuten von bis zu 2,3 mg Protein pro Liter Expressionskultur erhalten werden, wobei das Protein die für die Kristallisation erforderliche hohe Reinheit aufweist. Insbesondere durch die Vernachlässigung der Anionenaustauschchromatographie konnte die Reinigung hinsichtlich der Ausbeute optimiert werden. Es wurde außerdem deutlich, dass neben dem unphosphorylierten Protein ein heterogenes Gemisch an verschiedenen Phosphorylierungszuständen aus der Expression in Sf9-Zellen resultiert. Mit der etablierten Reinigungsrouten werden somit optimale Bedingungen für ein funktionierendes Kristallisationssystem geschaffen, was wesentlich für die strukturbasierte Wirkstoffoptimierung der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren ist.

3.2.4 Etablierung eines Kristallisationssystems für Akt1^{WT}

Die Identifizierung von Bedingungen, die zur Kristallisation eines Proteins führen, stellt die wohl größte Herausforderung des strukturbasierten Wirkstoffdesigns dar und erfordert oftmals die Durchführung umfangreicher *Screening*-Experimente unter Variation vieler verschiedener Parameter. Besonders hilfreich ist es daher, wenn bereits Kristallisationsbedingungen für das Zielprotein publiziert sind, sodass eine Reproduktion dieser erfolgen kann. Dennoch kann eine erfolgreiche Kristallisation des gewünschten Proteins dabei nicht immer gewährleistet werden, da bereits kleinste Abweichungen in der Vorgehensweise zwischen den unterschiedlichen Laboren ausschlaggebend sein können.

3.2.4.1 Identifizierung der Kristallisationsbedingungen für die Co-Kristallisation von Akt1^{WT}

Im Falle des Akt1^{WT} standen zum Zeitpunkt der ersten Kristallisationsversuche im Rahmen der Masterarbeit von Rebekka Scheinpflug bereits publizierte Kristallstrukturen zur Verfügung (PDB: 3O96, 4EJN), deren Kristallisationsbedingungen als Startpunkte für die weitere Optimierung genutzt wurden.^{74,134,197} Für die Kristallisationsansätze wurde das Protein mit einem dreifachen Überschuss des CAAI für drei Stunden auf Eis co-inkubiert und eine vollständige kovalente Bindung des Inhibitors an alle vorliegenden Phosphorylierungszustände durch massenspektrometrische Untersuchung nachgewiesen (Abbildung 26B). Während für die Kristallisationsbedingungen der PDB-Struktur 4EJN (16 % Butanol, 10 mM Ammoniumsulfat, 0,1 % 2-Mercaptoethanol, 15 % Ethylenglycol, 50 mM Tris, pH 7.5) kein Kristallwachstum beobachtet werden konnte, bildeten sich bereits nach wenigen Tagen kubische Kristalle unter den Kristallisationsbedingungen der PDB-Struktur 3O96 (12,5 mM Natrium-Acetat, 37,5 mM Natrium-Citrat, 21 % PEG MME 2000, pH 5.2). Dabei konnte das Kristallwachstum sowohl bei 4 °C als auch bei 18 °C sowie bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen von 1-5 mg/mL verzeichnet werden. Die Kristallbildung konnte zudem über einen breiten Bereich der getesteten pH-Werte der Salze Natrium-Acetat und -Citrat von pH 5.2-7.5 sowie einem PEG 2000 MME-Konzentrationsbereich von 10-25 % (w/v) erreicht werden. Bei Wiederholung der Ansätze stellte sich allerdings heraus, dass es sich bei den initial erfolgreichen Kristallisationsversuchen im Rahmen der Masterarbeit von Rebekka Scheinpflug durch einen Rechenfehler um eine zehnfach verdünnte Konzentration von 1,25 mM Natrium-Acetat und 3,75 mM Natrium-Citrat im Vergleich zu den publizierten Bedingungen handelte. In einem erneut durchgeführten Kristallisationsexperiment mit den publizierten und somit zehnfach höher konzentrierten Salzkonzentrationen von 12,5 mM bzw. 37,5 mM konnte dagegen kein Kristallwachstum verzeichnet werden, sodass neuartige Kristallisationsbedingungen für Akt1^{WT} identifiziert wurden. Da die optische Kristallqualität bei einer Inkubationstemperatur von 18 °C und einer Proteinkonzentration von 3 mg/mL am höchsten war, wurden diese Parameter für alle weiterführenden Kristallisationsexperimente verwendet. Außerdem stellte sich heraus, dass pH-Werte von 6.5-7.5 sowie PEG 2000 MME-Konzentrationen von 12-24 % (w/v) die besten Ergebnisse

lieferten. Im Rahmen dieser Arbeit konnten somit die Kristallisationsbedingungen für die Co-Kristallisation von Akt1^{WT} final etabliert werden, sodass eine verlässliche Reproduktion gewährleistet werden konnte (Abbildung 27A). Neben der Optimierung der Expressions- und Reinigungsstrategie ermöglichte dies die Kristallisation mit diversen im Arbeitskreis synthetisierten Akt-Inhibitoren.

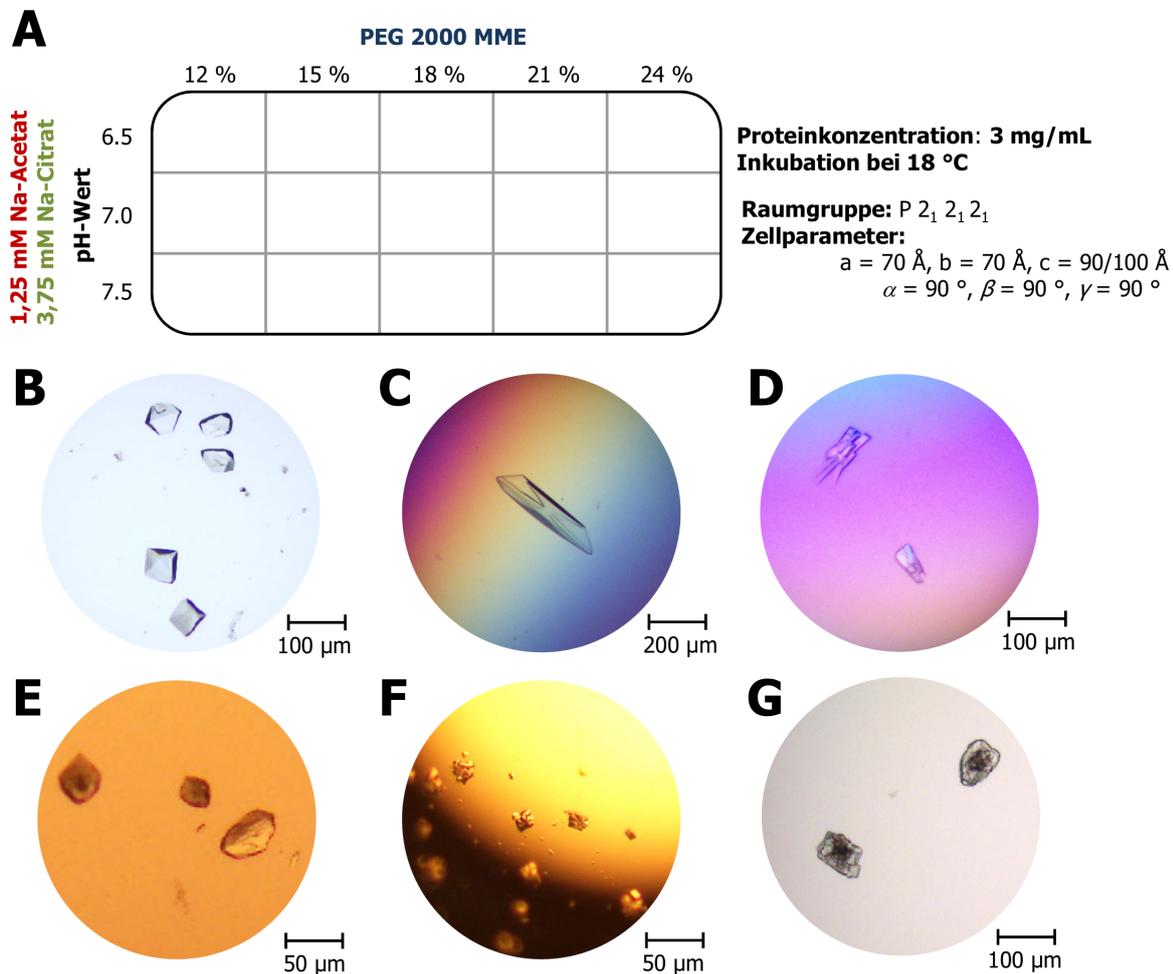


Abbildung 27: Kristallisation der Akt1^{WT}-Volllänge. A: *Fine Screen* der etablierten Kristallisationsbedingungen zur routinemäßigen Kristallisation. Die 1,25 mM Natrium-Acetat und 3,75 mM Natrium-Citrat-Lösungen decken den pH-Bereich von pH 6,5-7,5 ab und die PEG 2000 MME-Konzentration variiert zwischen 12-24 % (w/v). Es wird eine Proteinkonzentration von 3 mg/mL verwendet und die Proteinansätze nach der *hanging drop* Methode bei 18 °C inkubiert. B-G: Beobachtete Kristallmorphologien von Akt1^{WT} im Komplex mit verschiedenen Inhibitoren. Je nach Ligand konnten unterschiedliche Kristallformen beobachtet werden, die hauptsächlich stark verwachsen waren. B: RL2232, 12 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 7,0. C: RL2788, 18 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 6,5. D: RL2815, 18 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 6,5. E: RL2237, 18 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 7,0. F: RL2132, 18 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 6,5. G: RL1780, 15 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 7.5.

Üblicherweise können mit diesen Bedingungen bereits nach eintägiger Inkubation erste Kristalle erkannt werden. In einigen Ansätzen der Co-Kristallisation wurde außerdem bereits nach wenigen Minuten die Bildung von Kristallkeimen beobachtet. Die rasche Bereitschaft von Akt1^{WT} zur Co-Kristallisation unterstreicht dabei die Validität des etablierten Kristallisationssystems. Da das Kristallwachstum üblicherweise nach wenigen Tagen abgeschlossen ist, wurden die Kristalle bis zur Vermessung in einen Nylon-Loop überführt und in flüssigem Stickstoff gelagert, wobei sie zuvor in einer 40 %-igen

Ethylenglykol-Lösung cryogeschützt wurden. Die Vermessung der erhaltenen Kristalle ergibt die Kristallisation der Akt1^{WT} Co-Kristalle in der orthorhombischen Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$ mit den Zellkonstanten $a = 70 \text{ \AA}$, $b = 70 \text{ \AA}$, $c = 90 \text{ \AA}$ bzw. 100 \AA sowie $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$ und einem einzelnen Molekül in der asymmetrischen Einheit. Für die dritte Zellachse wurden sowohl eine Länge von 90 \AA als auch 100 \AA mit den verschiedenen Datensätzen identifiziert, wobei allerdings keine Korrelation mit beispielsweise der jeweiligen Kristallisationsbedingung oder dem Bindungsmodus des co-kristallisierten Liganden festgestellt werden konnte. Die erhaltenen Kristalle zeigten am SLS typischerweise Reflexe bis zu einer Auflösung von $2,0\text{-}3,0 \text{ \AA}$, wobei jedoch auch Datensätze mit einer Auflösung von bis zu $1,6 \text{ \AA}$ erhalten wurden.

Interessanterweise konnte mit den identifizierten Kristallisationsbedingungen die Apo-Form der Akt1^{WT}-Volllänge sowie das mit ATP-kompetitiven Inhibitoren co-inkubierte Protein nicht kristallisiert werden. Auch für schwach bindende und damit meist weniger potente kovalent-allosterische Inhibitoren konnte oftmals keine Kristallbildung beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass für die Kristallisation des Volllängenproteins eine Stabilisierung der inaktiven Konformation durch beispielsweise Ligandenbindung, welche die Flexibilität der PH-Domäne stark einschränkt, unerlässlich ist und mit den in dieser Arbeit co-kristallisierten Interdomänen-Bindern erreicht werden kann. Die publizierten Kristallstrukturen im Komplex mit ATP-kompetitiven Inhibitoren, in welchen lediglich die Kinase ohne die PH-Domäne betrachtet wurden, zeigen die aktive Konformation des Proteins.^{79,204} Aufgrund des erhöhten Flexibilitätsgrades dieser Konformation ist eine Kristallisation des Volllängen-Proteins im Komplex mit diesen Inhibitoren somit möglicherweise weniger begünstigt.²⁰¹ Sowohl für die Apo-Form als auch für den Komplex mit schwach-bindenden CAAs liegt das Gleichgewicht zudem vermutlich nicht ausreichend auf Seiten der weniger flexiblen inaktiven PH-*in*-Konformation, was ebenfalls die Kristallisation erschweren könnte.

Unter den identifizierten Kristallisationsbedingungen konnten verschiedene Kristallmorphologien mit einer Größe von ca. $50\text{-}200 \text{ \mu m}$ erhalten werden (Abbildung 27B-G). Neben eher selten auftretenden kubischen Einkristallen (Abbildung 27B) wurden größtenteils verwachsene Kristalle von eher kompakten (Abbildung 27E-G) bis hin zu länglichen Formen (Abbildung 27C-D) beobachtet. Insgesamt ist die Kristallqualität somit in Bezug auf die Morphologie optimierungsbedürftig, wobei der pH-Wert im *Fine Screen* oftmals keinen signifikanten Einfluss auf den Grad der Verwachsung zeigte. Auffällig war jedoch insbesondere die Abhängigkeit der Kristallmorphologie von den mit dem Protein co-inkubierten Inhibitoren. Während die 1,6-Naphthyridinon-basierten CAAs oftmals zu sehr verwachsenen Kristallen führten, konnte eine Verbesserung der Kristallqualität mit vor allem Imidazopyridin-basierten Inhibitoren verzeichnet werden. Insbesondere mit Miransertib konnten reproduzierbare Einkristalle von hoher Qualität in Bezug auf die Morphologie erhalten werden. Die erhöhte Kristallqualität mit den Imidazopyridin-basierten Verbindungen spiegelt sich zudem in der gesteigerten Diffraktion der Kristalle in Bereichen von $1,6$ bis $2,1 \text{ \AA}$ wider. Die Abhängigkeit der Kristallform von der Molekülstruktur des Liganden lässt erahnen, dass die Interaktion des westlichen

Molekülteils mit dem Protein einen erheblichen Einfluss auf die Proteinstabilität und damit auf die Kristallpackung hat.

Da die limitierte Kristallqualität der Akt1^{WT} Co-Kristalle zu überlagernden Reflexen in den Diffraktionsbildern der Röntgenbeugungsexperimente durch die Streuung mehrerer Kristallgitter führen kann, kann dies die Datenprozessierung erschweren (Abbildung 28A). Für die Aufnahme der Datensätze ist es daher besonders wichtig, einen Bereich des Kristalls zu finden, in welchem nur ein Kristallgitter durch den Röntgenstrahl über den gemessenen Winkelbereich getroffen wird. Dies kann bei stark verwachsenen Kristallen sehr zeitintensiv oder teilweise nicht möglich sein, weshalb die Optimierung der Kristallqualität von großem Interesse ist.

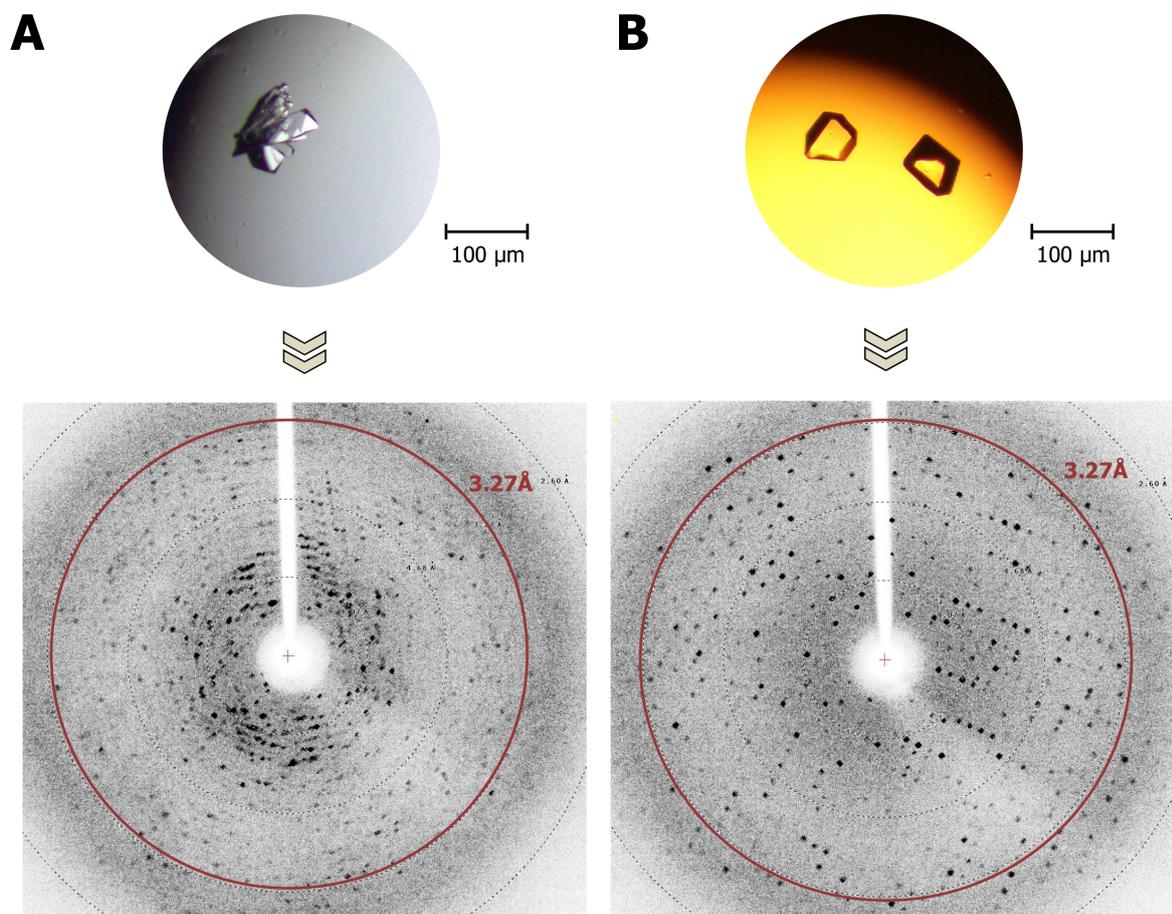


Abbildung 28: Vergleich der Diffraction der verschiedenen Kristallmorphologien von Akt1^{WT} am laboreigenen Röntgendiffraktometer. A: Diffractionsbild eines verwachsenen Akt1^{WT}-Kristalls im Komplex mit Borussertib (18 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 7,5). B: Diffractionsbild eines Miransertib-Einkristalls (18 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 6,5). Überlagernde Reflexe durch die simultane Diffraction mehrerer Kristallgitter erschweren die Datenprozessierung.

3.2.4.2 Ansätze zur Optimierung der Kristallqualität der Co-Kristalle von Akt1^{WT}

Aufgrund der limitierten Kristallqualität wurden verschiedene Ansätze zur Optimierung der Akt1^{WT} Co-Kristalle verfolgt. Für die Auflösung von Komplexstrukturen mit vielen verschiedenen Liganden ist die Kristallisation eines Proteins in der Apo-Form von besonderem Vorteil. Dies ermöglicht die Durchführung von *Soaking*-Experimenten, welche die nachträgliche Diffusion des Liganden in die Bindungstasche des Kristalls ausnutzen.²⁰⁵ Da vermutlich aufgrund der Flexibilität von Akt1^{WT} unter Abwesenheit eines Liganden allerdings keine Apo-Kristalle erhalten werden konnten, sollte ein alternativer Ansatz mittels der Verdrängung eines bereits gebundenen reversiblen Liganden aus der Bindungstasche durch einen anderen Inhibitor etabliert werden. Dieser sollte dabei bestenfalls eine ähnliche oder höhere Affinität zum Protein aufweisen.^{206,207} Aufgrund der hohen Kristallqualität in Bezug auf Morphologie und Diffraktion sowie des reversiblen Bindungsmodus wurden für die *Replacement-Soaking*-Versuche die Co-Kristalle mit dem Inhibitor Miransertib verwendet (Abbildung 28B). Dafür wurden die Miransertib-Co-Kristalle zunächst schrittweise in mehrere Tropfen der Reservoir-Lösung überführt und in diesen abschließend über Nacht inkubiert, um durch den Konzentrationsgradienten den reversiblen Inhibitor aus der Bindungstasche zu entfernen. Um die Diffusion des gewünschten Liganden in die allosterische Tasche zu erreichen, wurde der Kristall daraufhin in einen Tropfen des Inhibitors einer Konzentration von 1 mM überführt und über Nacht inkubiert. Die hohe Kristallqualität blieb während der Durchführung dieser Schritte erhalten. Jegliche Versuche unter Variation der Inkubationszeiten und des einzubringenden Liganden konnten allerdings nicht zur Verdrängung von Miransertib aus der Bindungstasche führen, was vermutlich vor allem auf die hohe Affinität des allosterischen Inhibitors zurückzuführen ist.¹¹¹ Die Betrachtung der Zugänglichkeit der allosterischen Bindungstasche zeigt zwar eine gewisse Einschränkung durch die Kristallkontakte, jedoch schließt dies die Umsetzbarkeit eines *Soaking*-Experiments nicht grundsätzlich aus. Da des Weiteren keine Co-Kristalle mit anderen reversiblen Inhibitoren generiert werden konnten, waren *Soaking*-Experimente im Rahmen dieser Arbeit insgesamt nicht realisierbar.

Die erfolgreiche Kristallisation eines Proteins hängt oftmals nicht nur von der Reinheit der Proteinlösung ab, sondern auch von dessen Homogenität. Daher ist es in der Regel von Vorteil mit einer möglichst homogenen Proteinlösung zu arbeiten.²⁰⁷ Im Falle von Akt1^{WT} wurde für die initialen Kristallisationsversuche allerdings das komplexe Gemisch des unphosphorylierten Proteins sowie der drei unterschiedlichen Phosphorylierungsspezies verwendet (Abbildung 26B). Die simultane Kristallisation der Vielzahl an heterogenen Spezies könnte jedoch möglicherweise Einfluss auf die verwachsene Kristallmorphologie haben. Um eine homogene Proteinlösung zu erhalten, wurde daher zunächst die Kristallisation des unphosphorylierten Akt1^{WT} durch Dephosphorylierung der heterogenen Proteinlösung untersucht. Dafür wurde das Proteingemisch mit einer unspezifischen λ -Phosphatase co-inkubiert und die Dephosphorylierung durch massenspektrometrische Analyse verfolgt (Abbildung 29).

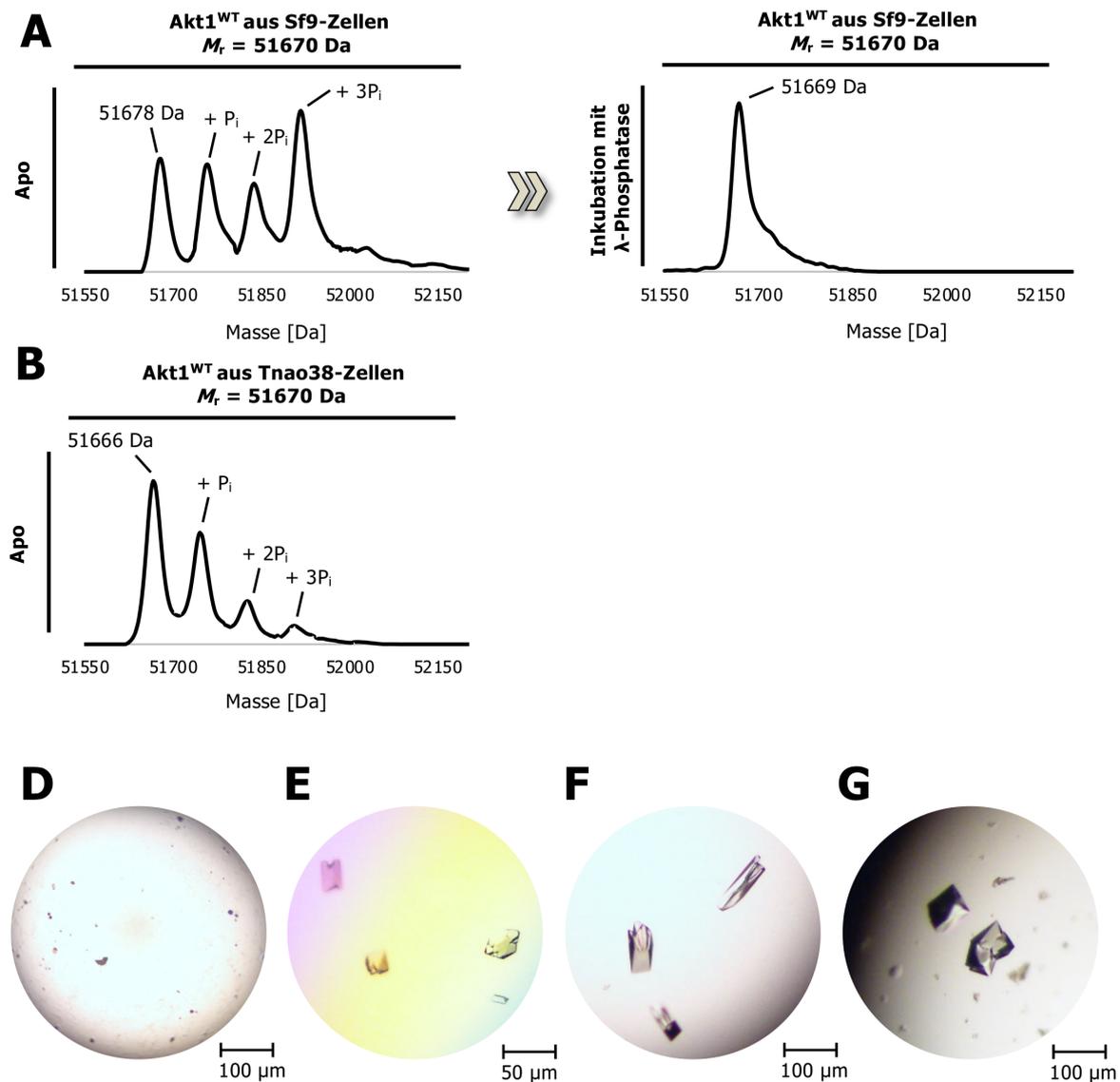


Abbildung 29: Optimierung der Akt1^{WT}-Kristallqualität. A: Massenspektrometrische Analyse der Dephosphorylierung von Akt1^{WT} aus Sf9-Zellen durch die λ-Phosphatase. Nach Inkubation über Nacht konnte eine vollständige Dephosphorylierung erreicht werden. B: Phosphorylierungsmuster von Akt1^{WT} aus der Expression in Tnao38-Zellen. Durch die Expression in einer anderen Zelllinie wird ein alternatives Phosphorylierungsmuster erhalten. D-G: Kristallisationsansätze der einzelnen Phosphorylierungszustände führt zu keiner Optimierung. D: unphosphoryliert (Miransertib, 18 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 6,5). E: einfach-phosphoryliert (RL2770, 24 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 7,0) F: zweifach-phosphoryliert (RL2788, 18 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 7,0). G: dreifach-phosphoryliert (RL2232, 18 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 6,5).

Die massenspektrometrische Untersuchung zeigt eine vollständige Dephosphorylierung von Akt1^{WT} nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C (Abbildung 29A). Mit dieser Proteinlösung wurde anschließend versucht, die für die heterogene Proteinlösung identifizierten Kristallisationsbedingungen zu reproduzieren. Dabei konnte allerdings kein Kristallwachstum beobachtet werden, was darauf hinweist, dass die Phosphorylierung des Proteins essentiell für dessen erfolgreiche Kristallisation unter den etablierten Bedingungen ist. Möglicherweise kann die Kristallisation jedoch unter neuartigen Bedingungen erfolgen, welche im Rahmen weiterer *Screening*-Experimente identifiziert werden könnten.

Durch die chromatographische Trennung der einzelnen Phosphorylierungsspezies mit Hilfe einer starken Anionenaustauscher-Säule (Kapitel 3.2.3) konnten ebenfalls homogenere Proteinlösungen erhalten werden. Um den Einfluss der einzelnen Spezies auf die Kristallisation zu analysieren, wurden auch mit diesen jeweiligen Proteinlösungen die bekannten Kristallisationsbedingungen reproduziert. Dabei konnte festgestellt werden, dass die drei Phosphorylierungszustände zwar zu Kristallwachstum führen, jedoch konnte keine Verbesserung der Kristallqualität in Bezug auf die Morphologie und Diffraktion erzielt werden (Abbildung 29E-G). Dies ist möglicherweise auch darauf zurückzuführen, dass innerhalb der aufgetrennten Spezies weiterhin eine Heterogenität in Bezug auf die verschiedenen Phosphorylierungsstellen besteht. Mit dem unphosphorylierten Protein blieb außerdem die Kristallbildung unter den bekannten Bedingungen aus (Abbildung 29D), was auch mit der Beobachtung für das dephosphorylierte Protein einhergeht und ebenfalls die Relevanz der Phosphorylierungen für die Kristallisation von Akt1^{WT} unterstreicht. Diese Annahme wird zusätzlich dadurch unterstützt, dass bei verändertem Muster im Massenspektrum einer Expressionscharge in Tnao38-Zellen, bei welchem der unphosphorylierte Anteil überwiegt, ebenfalls keine Kristalle von Akt1^{WT} erhalten werden konnten (Abbildung 29B). Somit konnte, trotz der höheren Expressionsrate, das in diesen Zellen exprimierte Akt1^{WT} nicht für die Kristallisation verwendet werden.

Insgesamt konnte mit den verschiedenen Ansätzen zur Optimierung der Kristallqualität keine Verbesserung erzielt werden. Die Experimente eröffnen jedoch, dass für die Kristallisation von Akt1^{WT} die Phosphorylierung eine entscheidende Rolle spielt. Dabei ist jedoch weiterhin unklar für welche Seitenketten des Proteins eine Phosphorylierung gegeben sein muss, sodass eine Kristallisation begünstigt ist. Da die Experimente zur Analyse dieser essentiellen Phosphorylierungsstellen jedoch sehr zeitintensiv sind, wurde die Co-Kristallisation daher weiterhin unter den etablierten Bedingungen durchgeführt. Trotz der verwachsenen Morphologie der Akt1^{WT}-Kristalle konnten dennoch die Komplexstrukturen mit diversen Liganden in den meisten Fällen gelöst werden.

3.2.5 Aufnahme und Prozessierung der Akt1^{WT}-Datensätze

Aufgrund der verwachsenen Kristallmorphologie von Akt1^{WT} Co-Kristallen ist in vielen Fällen besondere Sorgfalt sowohl bei der Aufnahme der Datensätze als auch bei der anschließenden Prozessierung der erhaltenen Diffraktionsbilder notwendig. Konnten bei verwachsenen Co-Kristallen für die Datenaufnahme Bereiche des Kristalls identifiziert werden, in welchen größtenteils keine überlagerten Reflexe und eine ausreichend gute Diffraktion beobachtet werden konnten, wurde an diesen Stellen ein vollständiger Datensatz aufgenommen. Da Akt1^{WT} unter den etablierten Bedingungen in der orthorhombischen Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$ kristallisiert, ist aufgrund der Symmetrie im Kristall eine Datenaufnahme über einen Winkel von 90° für eine Vollständigkeit der Daten ausreichend. In den meisten Fällen werden allerdings zum Erreichen einer höheren Redundanz der Reflexe Datensätze mit einem größeren Rotationswinkel aufgenommen. Die große Anzahl an aufgenommenen Diffraktionsbildern ist außerdem für verwachsene Kristalle von besonderem Vorteil, da somit jene Diffraktionsbilder gewählt werden können,

in welchen weniger überlagerte Reflexe vorliegen und die Prozessierung möglich ist. Repräsentativ für die Akt1^{WT}-Datensätze wird dies im Folgenden am Beispiel des Datensatzes eines Co-Kristalls im Komplex mit einem kovalent-allosterischen Akt-Inhibitor verdeutlicht.

Um einen ersten Eindruck über die Qualität des Datensatzes zu erhalten, erfolgt zunächst eine visuelle Begutachtung der Diffraktionsbilder. Insbesondere für verwachsene Kristalle können dabei bereits manuell Bildbereiche ausgewählt werden, welche möglichst die Diffraction einzelner Gitter zeigen. Im Falle des beispielhaften Datensatzes, welcher über einen Winkel von 360 ° in $\Delta\phi$ -Schritten von 0,2 ° aufgenommen wurde und somit 1800 Diffraktionsbilder umfasst, konnte eine Diffraction bis zu einer Auflösung von ca. 2,1 Å verzeichnet werden (Abbildung 30). Insgesamt wird jedoch deutlich, dass während der Datenaufnahme in dem fokussierten Kristallbereich die Röntgenstrahlung größtenteils an multiplen Kristallgittern gebeugt wurde (Abbildung 30A). Dies kann für die automatisierte Datenprozessierung mit dem Programm XDS problematisch sein, da die korrekte Zuordnung der Reflexe zu einem einzelnen Kristallgitter für die Indizierung erschwert ist.²⁰⁸⁻²¹⁰ In einem Rotationsbereich über ca. 30 ° dagegen konnte eine deutliche Diffraction eines einzelnen Gitters beobachtet werden. (Abbildung 30B).

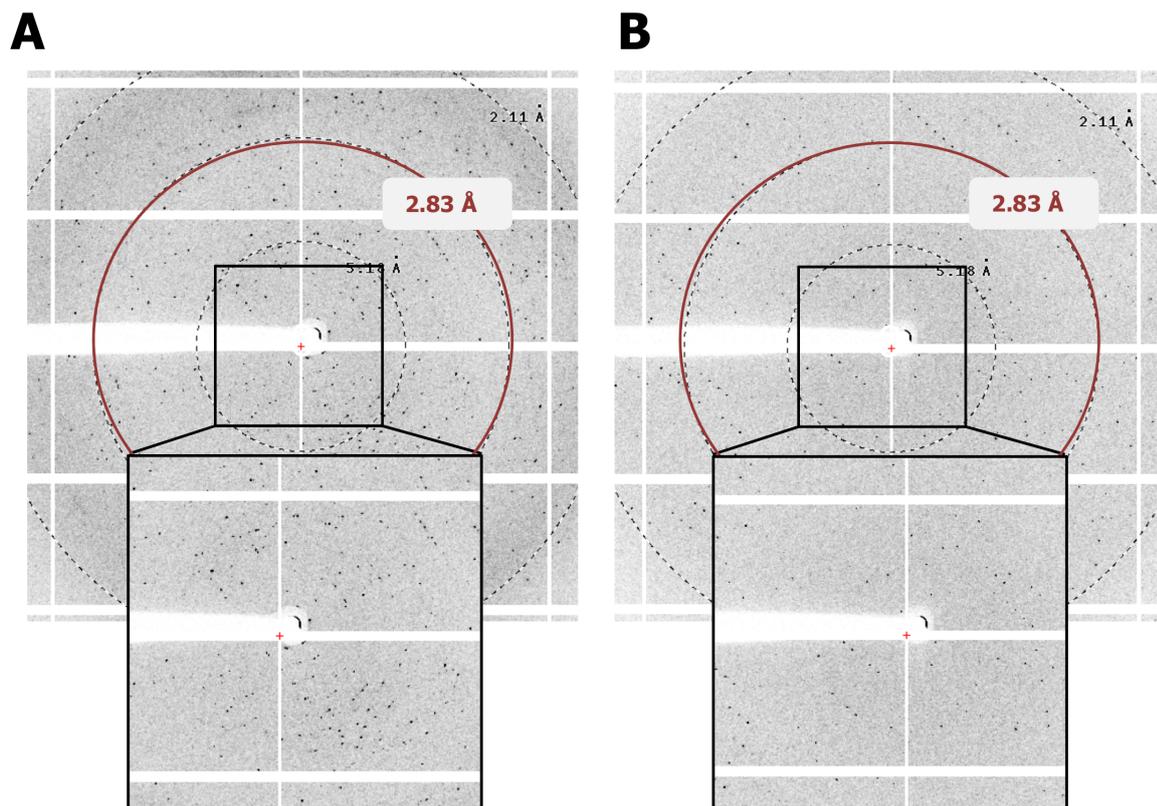


Abbildung 30: Diffraktionsbilder des Akt1^{WT}-Datensatzes im Komplex mit einem kovalent-allosterischen Akt-Inhibitor. A: Beispielhaftes Diffraktionsbild mit multiplen überlagerten Gittern. B: Beispielhaftes Diffraktionsbild bei einem Rotationswinkel des gleichen Kristalls, in dem deutlich ein einzelnes Gitter identifiziert werden kann.

Wie erwartet, konnte die Prozessierung mit dem Programm XDS über den gesamten Datenbereich von 1800 Diffraktionsbilder nicht erfolgen, da nicht ausreichend viele Reflexe indiziert werden konnten.

Durch die Definition eines Winkelbereiches (*Spot Range*) in XDS können jedoch Bereiche des Datensatzes ausgewählt und aus diesem starke Reflexe selektiert werden, die im Subprozess *IDXREF* von XDS für die Indizierung der Daten genutzt werden. Gelingt somit die Indizierung, kann häufig auch der gesamte Datensatz anhand der ermittelten Parameter prozessiert werden.^{208,209} Dies wurde auch im vorliegenden Beispiel genutzt und der Bildbereich 700-800 (Tabelle 3-4) konnte so erfolgreich indiziert und integriert werden, wobei die bereits für Akt1 bekannte Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$ mit den bekannten Zellparametern identifiziert wurde. Wurde dann der Datenbereich (*Data Range*) in XDS auf den vollständigen Datensatz erweitert, so konnte auch insgesamt eine verbesserte Datenstatistik durch eine deutlich erhöhte Vollständigkeit und Redundanz erreicht werden (Tabelle 3-4).

Tabelle 3-4: Vergleich der Datenstatistiken der gewählten Daten- und Reflexbereiche für den Akt1^{WT}-Datensatz im Komplex mit einem kovalent-allosterischen Akt-Inhibitor.

Datenaufnahme		
Datenbereich	700-800	1-1800
<i>Spot Range (IDXREF)</i>	700-800	700-800
Raumgruppe	$P 2_1 2_1 2_1$	$P 2_1 2_1 2_1$
Zellkonstanten		
a, b, c (Å)	70.09, 70.82, 91.06	70.44, 70.89, 91.25
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	43.70 – 2.50 (2.60 – 2.50)	45.63 – 2.40 (2.50 – 2.40)
R_{meas} (%)	7.2 (62.8)	9.8 (141.6)
R_{merge} (%)	5.2 (44.5)	9.5 (136.4)
$I/\sigma I$	6.64 (1.16)	15.12 (1.82)
$CC_{1/2}$	99.5 (59.5)	99.9 (78.3)
Vollständigkeit (%)	53.9 (56.8)	100.0 (100.0)
Redundanz	1.4 (1.3)	13.2 (13.7)

Durch die Prozessierung des gesamten Datenbereichs konnte insgesamt eine verbesserte Datenstatistik erreicht werden, wodurch mit 2,4 Å auch eine höhere Auflösung des Datensatzes erzielt wurde (Tabelle 3-4). Insbesondere die 3,5-fach höhere Redundanz, der verbesserte Korrelationskoeffizient $CC_{1/2}$ sowie das deutlich erhöhte Signal-zu-Rausch-Verhältnis ($I/\sigma I$) der Reflexe unterstreichen die Validität der Daten.

Am gezeigten Beispiel wird deutlich, dass die Prozessierung der Akt1^{WT}-Datensätze durch die moderate Kristallqualität in vielen Fällen nicht ohne Umwege möglich ist. Durch die beschriebene Vorgehensweise, bei welcher die Identifizierung von Bildbereichen mit der Diffraktion eines einzelnen Kristallgitters von zentraler Bedeutung ist, kann jedoch die

Prozessierung vieler Datensätze ermöglicht und die Datenstatistik insgesamt verbessert werden.

3.2.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die Etablierung eines robusten Kristallisationssystems umfasst zunächst die Optimierung der Expressionsbedingungen sowie der Reinigungsstrategie des Zielproteins. Für das Akt1^{WT}-Kristallisationskonstrukt konnten diese Schritte erfolgreich erarbeitet werden, sodass das Protein in hoher Ausbeute und Reinheit für zahlreiche Kristallisationsexperimente zur Verfügung stand. Die identifizierten Kristallisationsbedingungen von Akt1^{WT} konnten verlässlich reproduziert werden, sodass Co-Kristalle im Komplex mit verschiedenen kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren sowie dem allosterischen Inhibitor Miransertib gewonnen wurden. Insbesondere die Optimierung der Proteinausbeute durch den Wechsel des Expressionsmediums und die Verkürzung des Reinigungsprotokolls brachten dabei den entscheidenden Durchbruch für die Anwendbarkeit des Akt1^{WT}-Kristallisationssystems in einem hohen Durchsatz. Dies ist jedoch aufgrund der Kristallqualität limitiert, welche durch hauptsächlich verwachsene Kristalle eher moderat ausfällt und daher die Datenprozessierung erschwert oder teilweise unmöglich macht. Daher wurden verschiedene Ansätze verfolgt, die zur Verbesserung der Kristallmorphologie führen sollten. Sowohl *Replacement-Soaking*-Ansätze mit den Einkristallen im Komplex mit Miransertib als auch die Kristallisation des unphosphorylierten Proteins unter den bekannten Bedingungen führten allerdings zu keinem Erfolg. Möglicherweise könnten jedoch *Screening*-Experimenten mit dem un- bzw. dephosphorylierten Protein zur Identifizierung neuartiger Kristallisationsbedingungen führen, welche in einer verbesserten Kristallqualität resultieren können. Die Isolierung der einzelnen einfachen, zweifachen und dreifachen Phosphorylierungszustände und dessen Kristallisation führte ebenfalls zu verwachsenen Kristallen. Nichtsdestotrotz zeigen diese Experimente die Notwendigkeit der Phosphorylierung von Akt1^{WT} für den Kristallisationserfolg. Um die exakte Position der für die Kristallisation essentiellen Phosphorylierungsstellen zu identifizieren, könnten beispielsweise Konstrukte generiert werden, welche Phosphorylierungs-Mimetika der einzelnen per ESI-MS/MS-Analysen identifizierten Phosphorylierungsstellen sowie verschiedener Kombinationen derer aufweisen. Im Anschluss an die dafür zeitintensiven Mutagenese-, Expressions- und Reinigungsexperimente könnte das Kristallisationsverhalten dieser Mutanten analysiert und somit möglicherweise das entscheidende Phosphorylierungsmuster aufgelöst werden.

Mit Hilfe sorgfältiger Datenprozessierung konnten jedoch trotz oftmals überlagernder Reflexe in den Diffraktionsbildern zahlreiche Datensätze aufgenommen und prozessiert werden. Mit Hilfe der gelösten Komplexstrukturen wird somit eine optimale Grundlage für das strukturbasierte Design und die Optimierung der CAAs in diverse Richtungen, wie z.B. der Entwicklung neuartiger Inhibitorklassen oder Isoform-spezifischer Akt-Inhibitoren, geschaffen.

3.3 Strukturbiologische Untersuchung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren

Die Betrachtung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) beschreibt die Korrelation der chemischen Strukturen einer Sammlung verschiedener Molekülderivate mit derer jeweiligen biologischen Aktivität und ist ein wichtiges Werkzeug der Medizinischen Chemie zur Optimierung in Richtung einer Leitstruktur. Durch die im Rahmen dieser Arbeit gelösten Komplexstrukturen von Akt1 mit verschiedenen Derivaten kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren, konnten diese SAR-Studien zur Eröffnung essentieller Interaktionen der Moleküle und der Kinase Akt vertieft und das strukturbasierte Wirkstoffdesign ermöglicht werden. Im folgenden Kapitel wird eine Auswahl dieser Komplexstrukturen hinsichtlich der eröffneten Bindungsmodi und Interaktionsprofile der verschiedenen CAAs betrachtet.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit 35 Komplexstrukturen von Akt1 im Komplex mit allosterischen und kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren mit Auflösungen von 1,6-3,0 Å gelöst werden. Darunter wurden neben der Komplexstruktur mit dem reversiblen allosterischen Akt-Inhibitor Miransertib 32 Kristallstrukturen von Akt1^{WT} im Komplex mit diversen kovalent-allosterischen Inhibitoren erhalten. Zusätzlich konnten zwei Kristallstrukturen der Akt1^{C296S}-Mutante im Komplex mit CAAs generiert werden. Die in den Akt1^{WT}-Kristallstrukturen gebundenen kovalent-allosterischen Inhibitoren können dabei in die Inhibitoren der ersten (9 Kristallstrukturen) und zweiten Generation (9 Kristallstrukturen) an CAAs unterteilt werden, wobei letztere im Rahmen eines Kooperationsprojekts entstanden sind. Außerdem konnten für einen neuartigen Ansatz zur kovalent-allosterischen Adressierung von Akt acht Kristallstrukturen und für ein Projekt zur Entwicklung Akt-Isoform-spezifischer Inhibitoren sechs Komplexstrukturen gelöst werden.

3.3.1 Analyse der Komplexstruktur von Akt1^{WT} mit Borussertib

Mit Hilfe der ersten Kristallstruktur von Akt1^{WT} im Komplex mit dem kovalent-allosterischen Vorreitermolekül Borussertib, welche eine Auflösung von 2,9 Å aufweist, konnten erste Einblicke in den Bindungsmodus dieser Inhibitor-Klasse gewonnen werden (Abbildung 31). Die Co-Kristalle wurden dabei in der Masterarbeit von Rebekka Scheinpflug erhalten, während die Datenprozessierung und Verfeinerung der Komplexstruktur im Rahmen dieser Arbeit erfolgte.¹⁹⁷ Die Kristallstruktur zeigt die Akt-Kinase in der inaktiven, geschlossenen PH-*in*-Konformation, in welcher zwischen der PH- (grün) und der Kinase-Domäne (weiß) eine allosterische Interdomänentasche geformt wird (Abbildung 31A). Um diese Konformation zu ermöglichen, rotiert die regulatorische α C-Helix aus der Bindungstasche heraus und ist aufgrund der hohen Flexibilität nicht aufgelöst. Des Weiteren liegt das DFG-Motiv in der Aktivierungsschleife, welche ebenfalls nicht vollständig definiert ist, entsprechend in der für inaktive Kinasen bekannten DFG-*out*-Konformation vor.

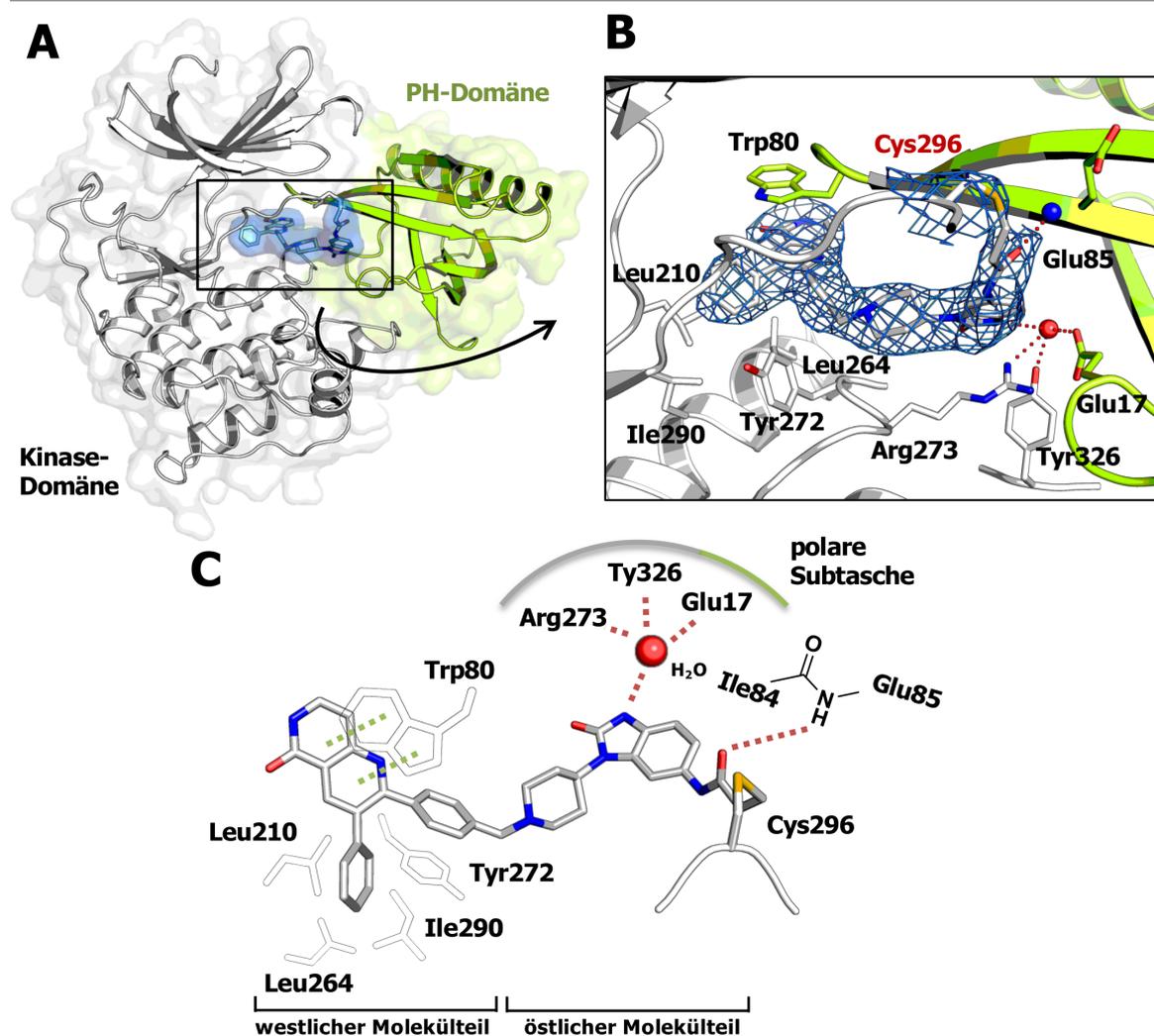


Abbildung 31: Kristallstruktur von Akt1^{WT} im Komplex mit Borussertib (PDB: 6HHF). A: Überblick der Volllängestruktur. Grün: PH-Domäne, weiß: Kinase-Domäne. B: Einblick in die allosterische Bindungstasche. Die 2F_o-F_c-Elektronendichtekarte ist mit $\sigma = 0.8$ konturiert. C: Schematische Darstellung der Protein-Liganden-Interaktionen von Borussertib in der allosterischen Bindungstasche. Die Komplexstruktur bestätigt den kovalent-allosterischen Bindungsmodus von Borussertib und löst wichtige Interaktionen des Liganden zum Protein auf.

Weiterhin wird der kovalent-allosterische Bindungsmodus von Borussertib durch die Adressierung dieser allosterischen Tasche unter Ausbildung einer kovalenten Bindung des β -Kohlenstoffatoms des Acrylamid-Michael-Akzeptors zur Thiol-Seitenkette von Cys296 in der Aktivierungsschleife bestätigt (Abbildung 31B). Von besonderer Bedeutung ist dabei jedoch, dass die kovalente Bindung an Cys296 nicht vollständig durch die 2F_o-F_c-Elektronendichte aufgelöst ist, was auch durch die F_o-F_c *simulated annealing omit*-Elektronendichtekarte verdeutlicht wird (Kapitel 6.5, Abbildung 65). Durch vorangegangene ESI-MS/MS-Studien konnte bereits die Adressierung zweier Cysteine in der Aktivierungsschleife von Akt, Cys296 und Cys310, durch Borussertib nachgewiesen werden.^{123,135} Dieser Befund wird ebenfalls durch die Elektronendichte bestätigt, welche eine unvollständige Besetzung vermutlich durch die partielle Adressierung beider Cysteine im Kristall zeigt. Im Hinblick auf den Komplex mit Borussertib könnte die Kristallstruktur jedoch Hinweise auf eine mögliche Präferenz zum Cys296 für die Ausbildung der

kovalenten Bindung liefern. Eine Betrachtung der eventuellen Cystein-Selektivität verschiedener kovalent-allosterischer Inhibitoren wird in einem späteren Kapitel beschrieben (Kapitel 3.3.5). Prinzipiell ist zudem die oftmals unvollständig aufgelöste Aktivierungsschleife von einer hohen Flexibilität geprägt, welche jedoch durch die kovalente Bindungsknüpfung eingeschränkt wird. Dies führt dazu, dass die Aminosäuren um das adressierte Cystein herum stabilisiert werden und dieser Bereich in den jeweiligen Kristallstrukturen aufgelöst ist.

Des Weiteren werden durch die Kristallstruktur wichtige Interaktionen zwischen Borussertib und Akt1 präsentiert, welche einen Beitrag zur hohen Affinität des Inhibitors leisten (Abbildung 31B-C). Für den westlichen Molekülteil, dem 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüst, eröffnet sich dabei die für allosterische Akt-Inhibitoren bereits bekannte Wechselwirkung der π - π -Stapelung mit der Indol-Seitenkette des Trp80 in der PH-Domäne.^{74,134} Eine weitere π - π -Stapelung wird zudem zwischen den Phenylresten in 2- und 3-Position und der Tyr272-Seitenkette ausgebildet. Der Phenylring in 3-Position interagiert außerdem über hydrophobe Interaktionen mit den Aminosäuren Leu210, Leu264 und Ile290 in der Kinase-Domäne. Diese in allen Kristallstrukturen wiederkehrenden Interaktionen scheinen insgesamt einen hohen Beitrag zur Präorganisation der verschiedenen Liganden im ersten reversiblen Bindungsschritt zu leisten. Dadurch wird die Ausbildung weiterer Interaktionen sowie die kovalente Bindungsbildung ermöglicht. Für den östlichen Molekülteil wird des Weiteren ein Wasser-vermitteltes Wasserstoffbrückennetzwerk des unsubstituierten N1-Atoms des Benzo[*d*]imidazolons mit den polaren Aminosäuren Glu17, Arg273 und Tyr326 deutlich. Aufgrund der relativ geringen Auflösung von 2,9 Å konnten jedoch insgesamt nur drei Wassermoleküle in der Komplexstruktur mit Borussertib modelliert werden, sodass mögliche weitere Wasser-vermittelte Interaktionen nicht aufgelöst sind. Weiterhin ist das Stickstoff-Atom des basischen Piperidin-Rings in eine polare Tasche orientiert. Die Komplexstruktur legt außerdem dar, dass die Präorientierung des Michael-Akzeptors über die Ausbildung einer Wasserstoffbrücke des Carbonyl-Sauerstoffs zum Amid-Stickstoff des Proteinrückgrats der Glu85-Seitenkette die kovalente Bindungsknüpfung zu Cys296 im zweiten irreversiblen Bindungsschritt begünstigen könnte.

Insgesamt liefert die Kristallstruktur von Akt1^{WT} im Komplex mit Borussertib eine wichtige Grundlage für die strukturbasierte Optimierung des Moleküls und das Design weiterer Derivate. Zudem können diese Einblicke von besonderer Bedeutung für die Entwicklung nächster Generationen von CAAs, beispielsweise zur Optimierung der PK-Eigenschaften von Borussertib, sowie dem Design Akt-Isoform-spezifischer kovalent-allosterischer Inhibitoren sein.

3.3.1.1 Analyse der Komplexstruktur von Akt1^{WT} mit ¹⁹F-Borussertib

Aufgrund der in Kapitel 3.1.3 beschriebenen ausgezeichneten Charakteristika in Bezug auf die *in vitro* und *in vivo*-Effizienz von Borussertib ist neben einer Tumorbehandlung auch die Verwendung des Moleküls im Rahmen der Krebsdiagnostik von großem Interesse.

Daher sollte die Anwendung des kovalent-allosterischen Akt-Inhibitors als radioaktiv-markiertes Sondenmolekül in der Positron-Emissions-Tomographie (PET) im Rahmen eines Kooperationsprojekts untersucht werden.* Derartige Experimente erlauben die Untersuchung der Inhibitor-Verteilung oder der Biomarker-Identifizierung in Tumoren mit Akt-Überexpression durch radioaktive Sonden. Die Verwendung kovalenter Sondenmoleküle ist außerdem aufgrund ihrer erhöhten Verweildauer im Tumor im Forschungsgebiet des PET-*Imagings* von besonderem Interesse.^{211,212}

Bei der Einführung des radioaktiven Isotops im Molekül ist bei der Wahl der Position insbesondere wichtig, dass die Derivatisierung nicht zu einer drastischen Veränderung der Interaktionen zwischen der Sonde und dem Zielprotein führt. Aufgrund der synthetischen Zugänglichkeit sowie unter Berücksichtigung des benötigten Raums in der allosterischen Bindungstasche wurde daher für PET-Experimente in verschiedenen Xenograft-Modellen das radioaktive ¹⁸F-Isotop am 3-Phenylring des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts von Borussertib eingebracht. Für die biochemische, zelluläre und strukturbiologische Charakterisierung der Borussertib-PET-Sonde wurde außerdem das analoge Molekül mit dem stabilen ¹⁹F-Isotop synthetisiert.† Sowohl in der biochemischen als auch zellulären Charakterisierung von ¹⁹F-Borussertib konnte dabei ein ca. 5-facher Verlust der inhibitorischen Potenz im Vergleich zu Borussertib verzeichnet werden.‡ Da die Wirksamkeit des Moleküls dennoch sehr effektiv ist, eignet sich die Verbindung weiterhin für die *in vivo*-PET-Studien. Um auch eine signifikante strukturelle Veränderung innerhalb des Protein-Liganden-Komplexes durch die Einführung des Fluor-Atoms ausschließen zu können, wurde die Komplexstruktur von Akt1^{WT} im Komplex mit ¹⁹F-Borussertib mit einer Auflösung von 2,9 Å gelöst (Abbildung 32). Aufgrund derzeit nicht abgeschlossener Studien kann die exakte Molekülstruktur von ¹⁹F-Borussertib im Rahmen dieser Arbeit allerdings nicht gezeigt werden.

Mit Hilfe der Kristallstruktur von Akt1^{WT} im Komplex mit ¹⁹F-Borussertib konnte gezeigt werden, dass die Einbringung des Fluoratoms am 3-Phenylring zu keiner strukturellen Veränderung in der unmittelbaren Umgebung der Derivatisierung führt. Die Interaktionen des westlichen Molekülteils entsprechen den für Borussertib beschriebenen Wechselwirkungen vollständig. Lediglich im östlichen Molekülteil kann eine Veränderung des Bindungsmodus im Vergleich zur Komplexstruktur mit Borussertib beobachtet werden, wobei es zur präferierten Adressierung von Cys310 in der Aktivierungsschleife kommt. Wie bereits für die Borussertib-Komplexstruktur beschrieben, liegt jedoch ebenfalls keine vollständige Besetzung vor, was sich in der unvollständigen Elektronendichte für die kovalente Bindung zu Cys310 äußert. Für den möglichen Einfluss des Fluor-Substituenten im westlichen Molekülteil auf die bevorzugte Adressierung der anderen Cystein-Seitenkette im Vergleich zu Borussertib kann die Kristallstruktur allerdings keine Erklärung liefern.

* Kooperationsprojekt mit AG T. Ritter (MPI Mülheim), AG K. Herrmann (Universitätsklinik Essen), AG J. Siveke (Universitätsklinikum Essen).

† Synthese des ¹⁹F-Borussertib durch M. Sc. Marius Lindemann (AG D. Rauh, TU Dortmund).

‡ Bestimmung des HTRF IC₅₀-Werts von ¹⁹F-Borussertib durch M. Sc. Lena Quambusch (AG D. Rauh, TU Dortmund).

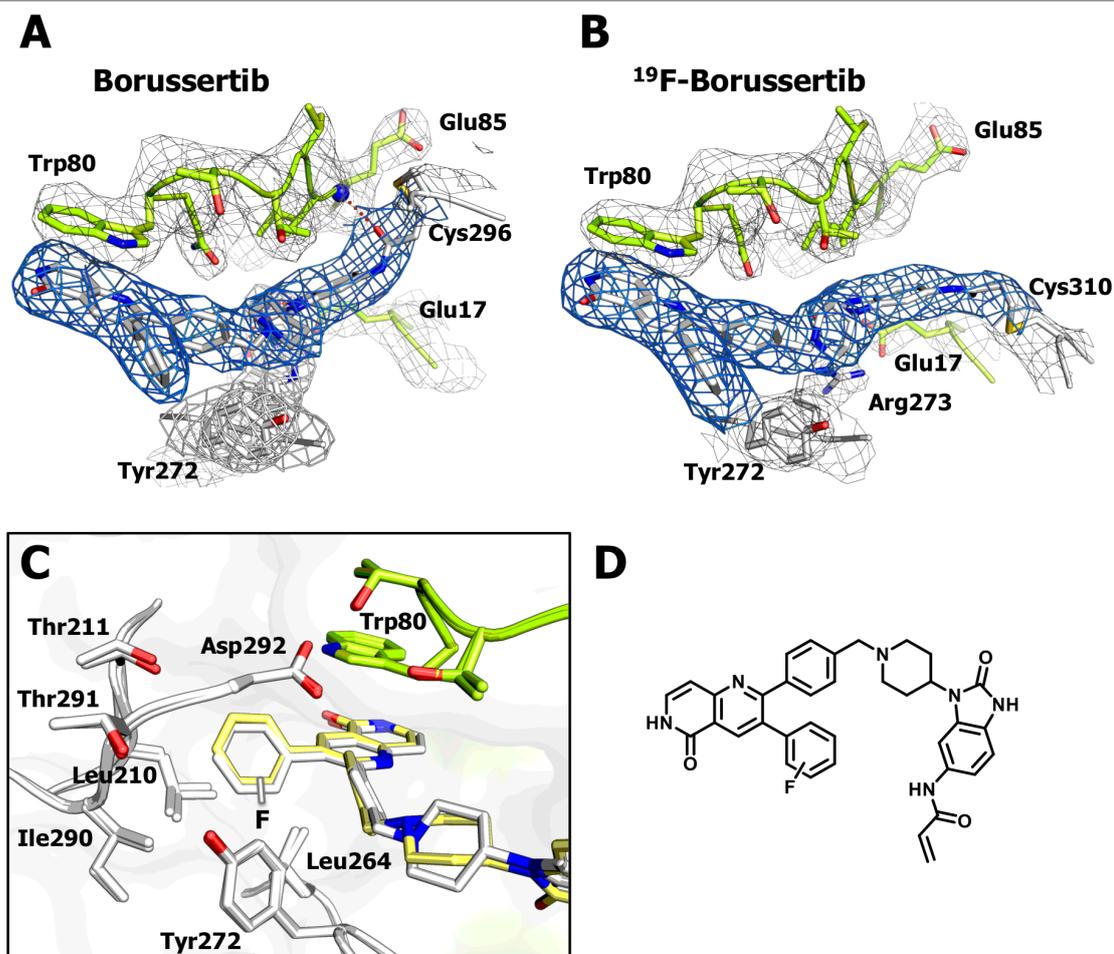


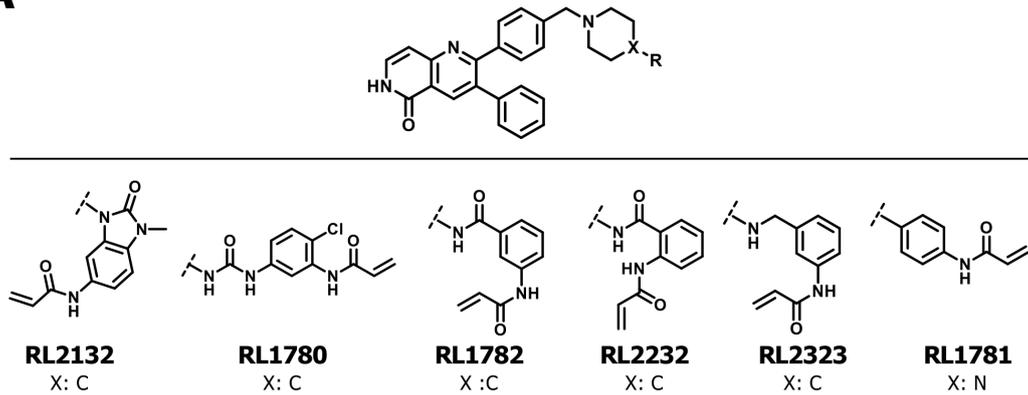
Abbildung 32: Vergleich der Komplexstrukturen von Akt1^{WT} im Komplex mit Borussertib (gelb, PDB: 6HHF) und ¹⁹F-Borussertib (weiß, unpubliziert). A: Überblick der Borussertib-Bindung in der allosterischen Tasche. B: Überblick der ¹⁹F-Borussertib-Bindung in der allosterischen Tasche. C: Umgebung des Phenylrings in 3'-Position in der hydrophoben Tasche. Die Einbringung des Fluoratoms führt in dessen unmittelbaren Umgebung zu keiner strukturellen Veränderung innerhalb des Proteins. D: Molekülstruktur des ¹⁹F-Borussertib.

Die Adressierung des Cys310 führt zu einer Umorientierung des Benzo[*d*]imidazol-Grundgerüsts, welche die kovalente Bindungsknüpfung an Cys310 ermöglicht. Zudem wird das Wasserstoffbrückennetzwerk des unsubstituierten N1-Atoms des Benzo[*d*]imidazolons mit dem konservierten Wassermolekül und den Seitenketten von Glu17, Arg273 und Tyr326 nicht ausgebildet. Dies kann jedoch vermutlich auf die moderate Auflösung von 2,9 Å zurückgeführt werden, welche dazu führt, dass das Wassermolekül in der polaren Subtasche nicht aufgelöst ist. Grundsätzlich entspricht jedoch der Bindungsmodus des ¹⁹F-Borussertib, abgesehen von der Adressierung der anderen Cystein-Seitenkette in der Aktivierungsschleife, insbesondere im westlichen Molekülteil der für Borussertib beobachteten Bindungspose. In der direkten Umgebung des eingebrachten Fluor-Substituenten kann keine strukturelle Veränderung der Proteinstruktur beobachtet werden. Die Komplexstruktur unterstreicht daher im Zusammenspiel mit den vielversprechenden biochemischen und zellulären Daten das Potential von Borussertib als radioaktive PET-Sonde, wobei keine strukturabhängigen Einflüsse auf die Wirksamkeit des ¹⁸F-Borussertib während der Bindung an das Zielprotein im Tumor zu erwarten sind.

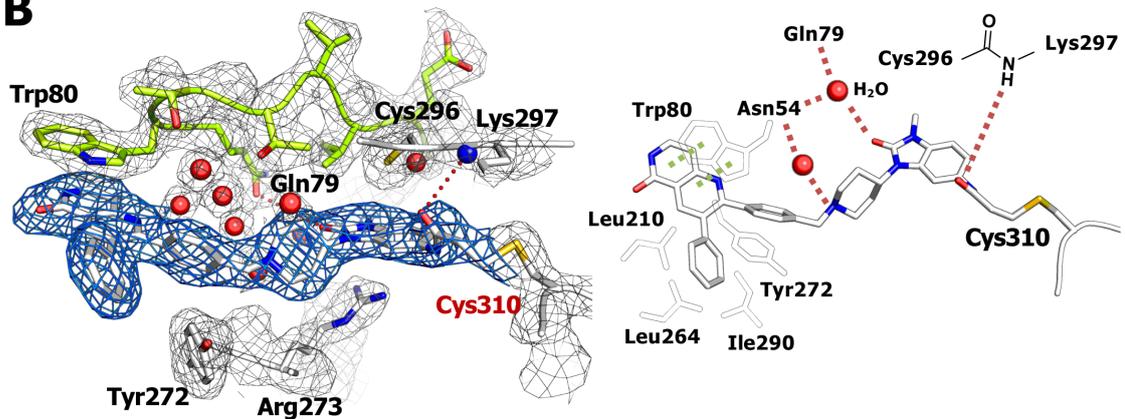
3.3.2 Strukturanalyse nach Derivatisierung des östlichen Molekülteils

Um einen Einblick in die Struktur-Aktivitäts-Beziehung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren zu erlangen, wurde das Benzo[*d*]imidazol-Grundgerüst derartig derivatisiert, sodass eine kleine Bibliothek an 1,6-Naphthyridinon-basierten Inhibitoren unterschiedlicher Flexibilität und Länge im östlichen Molekülteil erhalten wurde.* Mit Hilfe von Kristallstrukturen von Akt1^{WT} im Komplex mit einer Auswahl dieser Inhibitoren konnten die Einblicke in die SAR dieser Moleküle durch die Strukturanalyse vertieft werden (Abbildung 33A).[†] Die Komplexstruktur mit dem Inhibitor RL2132 (2,3 Å), bei welchem der N1-Stickstoff des Benzo[*d*]imidazolons methyliert vorliegt, zeigte dabei ein verändertes Interaktionsnetzwerk im Vergleich zur Borussertib-Komplexstruktur (Abbildung 33B). Durch die Methylierung des N1-Stickstoffs kann keine Beteiligung am Wasser-vermittelten Wasserstoffbrückennetzwerk mit den Aminosäure-Seitenketten Glu17, Arg273 und Tyr326 stattfinden. Nichtsdestotrotz zeigt RL2132 (IC₅₀-Wert von 3,0 nM) nur einen geringen Aktivitätsverlust und somit bestätigt die Strukturanalyse, dass die Interaktion mit dem konservierten Wassermolekül zwar energetisch vorteilhaft ist, jedoch nicht essentiell für die inhibitorische Potenz des Moleküls. Außerdem werden für RL2132 weitere Interaktionen, wie Wasser-vermittelte Wasserstoffbrücken zu Asn54 und Glu79 sowie eine Wasserstoffbrückenbindung des Carbonyl-Sauerstoffs der Acrylamid-Einheit zum Amidrückgrat von Lys297, aufgelöst. Insbesondere letztere Interaktion spielt für die kovalente Bindungsknüpfung vermutlich eine entscheidende Rolle. Dabei führt die Präorganisation des Michael-Akzeptors, welche durch die Interaktion mit Lys297 stabilisiert wird, möglicherweise zur bevorzugten Adressierung des nukleophilen Cys310 durch RL2132. Dieser veränderte Bindungsmodus im Vergleich zu Borussertib kann vermutlich außerdem auf die fehlende Interaktion mit dem konservierten Wassermolekül zurückgeführt werden, die zur Verschiebung des Benzo[*d*]imidazol-Grundgerüsts in Richtung des Cys310 und damit zu dessen präferierter Adressierung führt. Analog zur Borussertib-Komplexstruktur ist jedoch in vielen Kristallstrukturen die Elektronendichte der kovalenten Bindung zur jeweiligen Cystein-Seitenkette nicht vollständig definiert, was eine partielle Adressierung beider Thiole andeutet. Nichtsdestotrotz können oftmals klare Präferenzen der Cystein-Adressierung durch die verschiedenen CAAs anhand der Elektronendichte angezeigt werden, welche sich teilweise mit der Molekülstruktur und dem daraus folgenden Interaktom erklären lassen. Dies wird beispielsweise durch die Komplexstruktur mit dem Phenylharnstoff-Derivat RL1780 (IC₅₀-Wert von 9,1 nM, 2,3 Å) deutlich (Abbildung 33C). Die Öffnung des Benzo[*d*]imidazol-Grundgerüsts und die dadurch verbundene Verlängerung des Linkerelements hat ebenfalls die Adressierung des Cys310 zur Folge. Außerdem führt die Ausdehnung des Bindungsraumes, welche durch die verlängerte Molekülstruktur verursacht wird, zu einer Interaktion des Michael-Akzeptor-Amids zum Carbonyl-Sauerstoff des Glu17-Rückgrats. Die gute Auflösung dieser Komplexstrukturen verhilft außerdem zur Offenlegung einiger Wasser-vermittelter Wasserstoffbrückennetze, wie beispielweise der Interaktion des Piperidin-Stickstoffs mit Asn54 und Glu79.

A



B



C

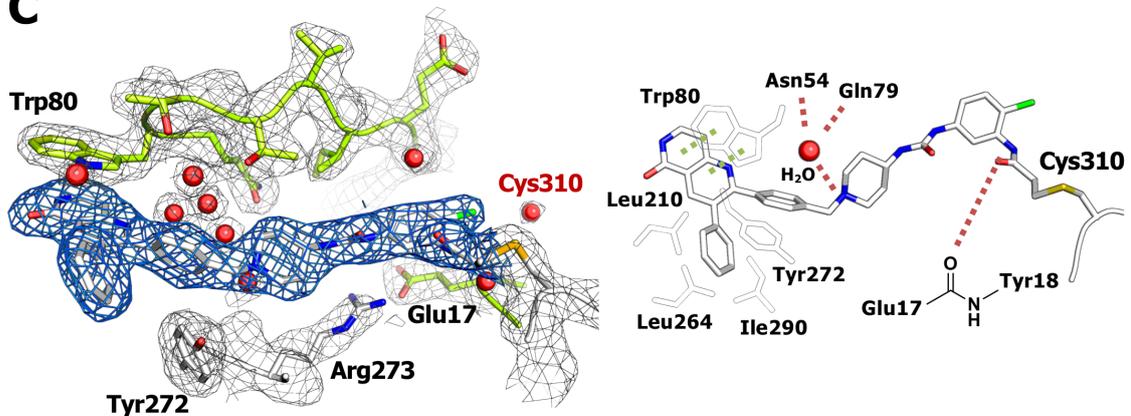


Abbildung 33: Komplexstrukturen von Akt1^{WT} mit verschiedenen kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren. A: Überblick über die chemischen Strukturen der Verbindungen. B-C: Kristallstrukturen mit den jeweiligen CAIs. Links: Einblick in die allosterische Bindungstasche, rechts: schematische Darstellung der Interaktionen. B: N-methyliertes Benzo[d]imidazolone RL2132 (PDB: 6HHJ, 2,3 Å). C: Phenylharnstoff-Derivat RL1780 (PDB: 6HHG, 2,3 Å). Die 2F_oF_c-Elektronendichtekarte ist auf $\sigma = 0.8$ konturiert.

Einen weiteren Hinweis auf den Einfluss der Linkerlänge auf die präferierte Adressierung der Cysteine liefern die Komplexstrukturen mit den Phenylamid-Derivaten RL1782

* Bestimmung der HTRF IC₅₀-Werte der CAIs durch Dr. Jörn Weisner (AG D. Rauh, TU Dortmund).
 † Synthese der CAIs durch Dr. Rajesh Gontla, Dr. Niklas Uhlenbrock und Dr. Steven Smith (AG D. Rauh, TU Dortmund).

(Acrylamid in *meta*-Position, 2,7 Å) und RL2232 (Acrylamid in *ortho*-Position, 2,8 Å). Die Verbindungen mit der verkürzten Molekülstruktur binden wiederum bevorzugt an Cys296 und weisen ein zu Borussertib analoges Interaktionsnetzwerk auf, wodurch ebenfalls der mögliche Einfluss der Linkerlänge auf die Selektivität der Cystein-Adressierung bestätigt wird (Abbildung 34A-B).

Des Weiteren zeigen die Phenylamid-Derivate RL1782 (IC₅₀-Wert von 3,6 nM) und RL2232 (IC₅₀-Wert von 11,6 nM) im Gegensatz zum frei rotierenden Phenylamin-Derivat RL2323 (IC₅₀-Wert von 192 nM, 2,7 Å) nur einen leichten inhibitorischen Aktivitätsverlust. Der Einfluss der Molekülflexibilität auf die Potenz wird dabei durch die Komplexstrukturen bestätigt, welche ein gleichbleibendes Interaktionsnetzwerk für die verschiedenen Derivate darlegt (Abbildung 34C). Somit ist der Unterschied in den Aktivitäten nicht auf veränderte Interaktionen zurückzuführen, sondern vermutlich auf die Einschränkung des Konformationsraumes bei der Ligandenbindung und dem damit einhergehenden Entropieverlust. Dieser ist für das Phenylamin durch dessen hohe Flexibilität deutlich höher als für die rigideren Phenylamid-Derivate und spiegelt sich in der verringerten inhibitorischen Potenz wider.

Auch das weiter verkürzte Phenylpiperazin-Derivat RL1781 (IC₅₀-Wert von 126 nM, 2,7 Å) weist einen drastischen Aktivitätsverlust im Vergleich zu Borussertib trotz ähnlicher Interaktionen auf (Abbildung 34D). Im Gegensatz zu Borussertib kann außerdem für das β-Kohlenstoffatom der Acrylamid-Einheit eine veränderte Konformation beobachtet werden. Während die kovalente Bindung an Cys296 für Borussertib über eine *trans*-Konformation des β-Kohlenstoffatoms erfolgt, kann für das Phenylpiperazin-Derivat RL1781 eine *cis*-Konformation in der Kristallstruktur beobachtet werden. Diese energetisch ungünstigere Ausrichtung der Acrylamid-Einheit erklärt möglicherweise den drastischen Aktivitätsverlust im Vergleich zu Borussertib. Dies wird außerdem durch den verringerten k_{inact} -Wert (0,054 s⁻¹) von RL1781 im Vergleich zu Borussertib (0,111 s⁻¹) bestätigt, was eine verminderte Rate der kovalenten Bindungsknüpfung im zweiten irreversiblen Bindungsschritt bedeutet. Die moderate Auflösung von 2,7 Å lässt diesbezüglich jedoch lediglich eine Hypothese zu, sodass für die detaillierte Betrachtung des Einflusses der Acrylamid-Konformation auf die inhibitorische Potenz Strukturanalysen mit höher aufgelösten Strukturen notwendig sind.

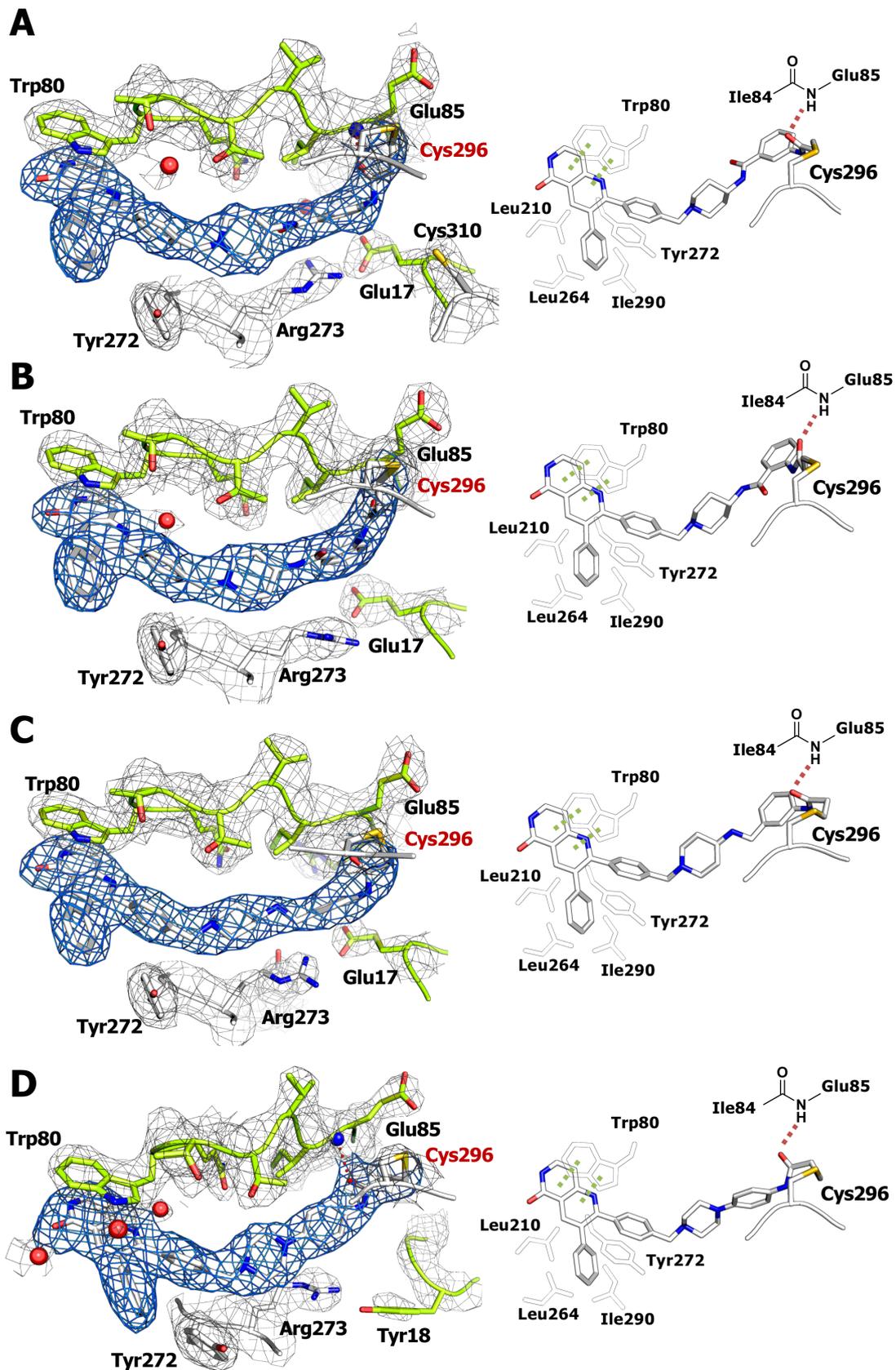


Abbildung 34: Komplexstrukturen von Akt1^{WT} mit verschiedenen kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren. Links: Einblick in die allosterische Bindungstasche, rechts: schematische Darstellung der Interaktionen. A: *meta*-Phenylamid RL1782 (PDB: 6HHI, 2,7 Å). B: *ortho*-Phenylamid RL2232 (unpubliziert, 2,8 Å) C: Phenylamin-Derivat RL2323 (unpubliziert, 2,7 Å). D: Phenylpiperazin-Derivat RL1781 (PDB: 6HHH, 2,7 Å). Die 2F_o-F_c-Elektronendichtekarte ist auf $\sigma = 0.8$ konturiert.

Mit Hilfe der Komplexstrukturen von Akt1^{WT} mit den verschiedenen CAAs, welche sich im östlichen Molekülteil unterscheiden, konnten die Erkenntnisse der SAR unterstützt werden.¹³⁸ Dabei wird ersichtlich, dass eine deutliche Verkürzung der Linkerlänge sowie die Erhöhung der Molekülflexibilität, wie im Falle der Phenylpiperazin- und Phenylamin-Derivate, einen negativen Einfluss auf die inhibitorische Potenz haben. Das Benzo[*d*]imidazol- sowie das *meta*-Phenylamid-Grundgerüst erwiesen sich durch die SAR- und Strukturanalyse dagegen als besonders vielversprechende Struktur motive für den östlichen Molekülteil. Unter Beibehaltung dieser beiden Struktureinheiten wurde daher im Verlauf der Optimierung von Borussertib der Einfluss auf das Bindungsverhalten des westlichen Molekülteils im Rahmen eines weiteren Projekts untersucht.

Da das Vorreitermolekül Borussertib, wie in Kapitel 3.1.3 bereits beschrieben, Limitationen in Bezug auf die Löslichkeit und Permeabilität aufweist, ist der Austausch des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts insbesondere aus medizinischer Sicht von besonderer Bedeutung. Der signifikante Beitrag dieses Struktur motifs zur Hydrophobizität des Moleküls hat dabei vermutlich den größten Einfluss auf sowohl die schlechte Löslichkeit als auch die niedrige Permeabilität. Daher wurde eine Molekülbibliothek von sowohl Benzo[*d*]imidazol- als auch *meta*-Phenylamid-basierten Inhibitoren erstellt, welche unterschiedliche Grundgerüste im westlichen Molekülteil aufweisen. Im Rahmen dieser Arbeit konnten anschließend zahlreiche Kristallstrukturen von Akt1^{WT} im Komplex mit diesen Inhibitoren gelöst werden, welche wichtige Einblicke in den Einfluss des westlichen Molekülteils auf die Protein-Liganden-Interaktionen liefern. Diese Kristallstrukturen sind jedoch derzeit Bestandteil aktueller Forschung und können in dieser Dissertation daher nicht gezeigt werden.

3.3.3 Strukturanalyse neuartiger kovalent-allosterischer CAAs

Ein weiterer vielversprechender Ansatz im Zuge der Optimierung der pharmakokinetischen Eigenschaften von Borussertib durch Austausch des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts stellt die Hybridisierung verschiedener Struktur motive im Rahmen des *scaffold hoppings* dar. Durch die Kombination zweier Grundgerüste, welche sich durch hervorragende *in vitro* pharmakodynamische und *in vivo* pharmakokinetische Eigenschaften auszeichnen, soll somit ein effektiver Ansatz, in welchem sich die Vorteile beider Struktur motive ergänzen, erzielt werden. Mit Hilfe der Betrachtung der Komplexstrukturen von Akt1^{WT} im Komplex mit den jeweiligen Grundgerüsten wurde deutlich, dass eine sehr gute Übereinstimmung der Bindeposen vorliegt. Dies stellt eine gute Grundlage für die Verknüpfung der Struktur motive dar.*

* Synthese der kovalent-allosterischen Hybridmoleküle durch M. Sc. Sven Brandherm (AG D. Rauh, TU Dortmund).

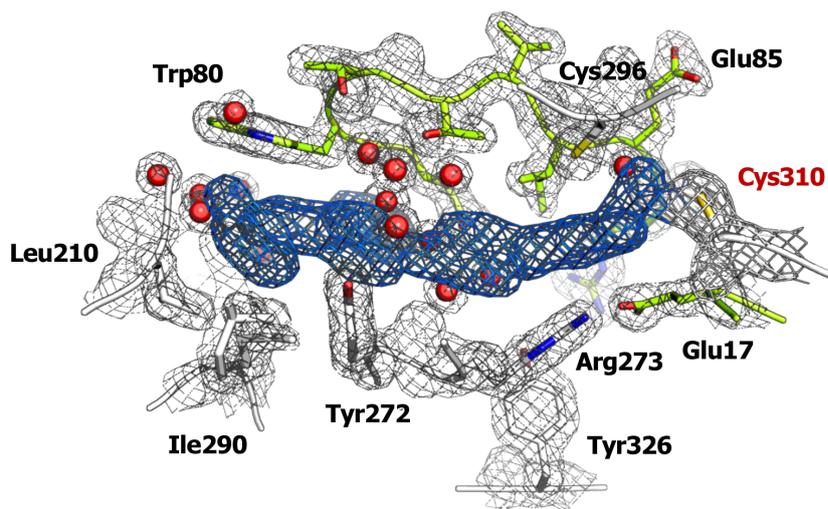


Abbildung 35: Komplexstruktur von Akt1^{WT} mit einem neuartigen Ansatz zur kovalent-allosterischen Akt-Inhibition (unpubliziert, 1,7 Å). Die Komplexstruktur legt den erwarteten Bindungsmodus dar. Die 2F_o-F_c-Elektronendichtekarte ist auf $\sigma = 0.8$ konturiert.

Der Anwendbarkeit der Hybridisierung der beiden Inhibitoren konnte durch insgesamt acht Kristallstrukturen im Komplex mit verschiedenen Derivaten bestätigt und strukturelle Erklärungen für die unterschiedlichen Potenzen gefunden werden (Abbildung 35). Dabei sind vor allem die hervorragenden Auflösungen der Komplexstrukturen, welche in einem Bereich von 1,6 Å – 2,1 Å liegen, im Vergleich mit den publizierten Kristallstrukturen von Akt1^{WT} sowie mit den bisher im Rahmen dieser Arbeit gelösten CAAI-Komplexstrukturen auffällig. Wie bereits in Kapitel 3.2.4.1 beschrieben, spricht diese Beobachtung für einen enormen Einfluss des westlichen Molekülteils auf die Protein-Liganden-Bindung und somit auf die Stabilität der Kristallpackung. Aufgrund der derzeit nicht abgeschlossenen Charakterisierung dieser Inhibitor-Klasse können die Komplexstrukturen mit diesen Verbindungen jedoch in dieser Arbeit nicht im Detail diskutiert werden, sodass lediglich die Darstellung der Elektronendichte eines dieser Hybridmoleküle beispielhaft gezeigt ist.

Insgesamt konnte mit Hilfe der biochemischen und zellulären Charakterisierung das enorme Potential dieser neuartigen Inhibitor-Klasse verdeutlicht werden. Die Strukturanalyse liefert weiterhin Hinweise auf die essentiellen Protein-Liganden-Interaktionen, welche für die hohe Affinität der Verbindungen ursächlich sind und ermöglichte das strukturbasierte Design weiterer Derivate.

3.3.4 Strukturanalyse Akt-Isoform-spezifischer CAAs

Das strukturbasierte Wirkstoffdesign stellt auch für die Entwicklung von Inhibitoren zur spezifischen Adressierung verschiedener Isoformen eines Proteins ein wichtiges Werkzeug dar. Im Falle der Akt-Kinase ist das Design Isoform-spezifischer CAAs von besonderem Interesse, da die drei Proteine Akt1, Akt2 und Akt3 trotz hoher Sequenz- und Strukturidentität unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen und Funktionen aufweisen, deren Relevanz bisher nicht vollständig verstanden ist.⁴⁵ Die Lokalisation von Akt1 fokussiert sich hauptsächlich auf das Cytosol sowie teilweise an der Plasmamembran, sodass eine Beteiligung an der Signalweiterleitung für die Proliferation und Anti-Apoptose stattfindet. Im Gegensatz dazu spielt Akt2 eine zentrale Rolle in der Glukose-Homöostase in den Mitochondrien, während Akt3 überwiegend im Nukleus exprimiert wird und beispielsweise an der neuronalen Entwicklung beteiligt ist.^{213,214} Die Diversität der Akt-Isoformen wird außerdem im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Rollen in der Tumorgenese deutlich. In Lungenkrebs konnte beispielsweise das Tumorwachstum auf ein erhöhtes Akt1-Signal zurückgeführt werden, während Akt2 einen suppressiven Effekt auf die Tumorentwicklung zeigte.²¹⁵ Dieses Beispiel unterstützt die Notwendigkeit der Entwicklung Isoform-spezifischer Akt-Inhibitoren, welche außerdem auch als Sondenmoleküle für die Untersuchung der unterschiedlichen Isoform-Funktionalitäten fungieren können.⁴⁶ Einige wenige Derivate der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren mit Derivatisierung des 1,6-Naphthyridinon-Grundgerüsts, wie RL2237, zeigten bereits leichte Tendenzen zur Isoform-Selektivität.* Basierend darauf und auf den Erkenntnissen der strukturellen Betrachtung von Unterschieden in der allosterischen Tasche der verschiedenen Isoformen wurden Pyrazinon-basierte Isoform-spezifische CAAs designt und synthetisiert.† Einige dieser Inhibitoren konnten im Komplex mit Akt1^{WT} co-kristallisiert werden und Einblicke in die strukturellen Unterschiede in der Umgebung des westlichen Molekülteils liefern (Abbildung 36). Die verwendeten Inhibitoren wiesen dabei eine Selektivität der inhibitorischen Aktivität gegenüber der Akt1-Isoform auf.⁴⁶

* Synthese von RL2237 durch Dr. Niklas Uhlenbrock (AG D. Rauh, TU Dortmund).

† Design und Synthese der Akt-Isoform-spezifischen CAAs durch M. Sc. Lena Quambusch (AG D. Rauh, TU Dortmund).

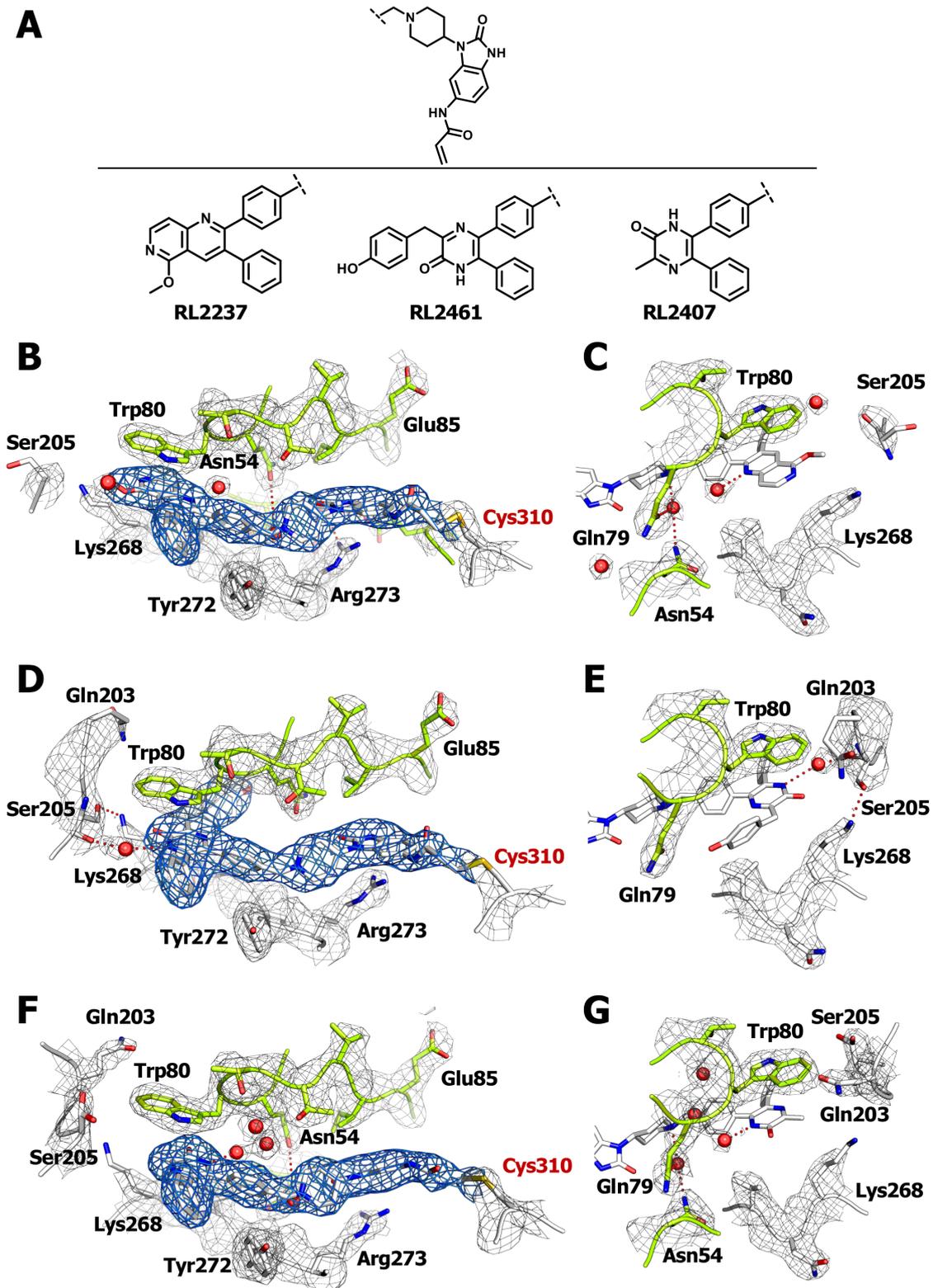


Abbildung 36: Komplexstrukturen von Akt1^{WT} mit Akt-Isoform-spezifischen CAAs. A: Überblick über die chemischen Strukturen der Verbindungen. B-G: Kristallstrukturen mit den jeweiligen CAAs. B-C: 5'-Methylnaphthyridinon-Derivat RL2237 (unpubliziert, 2,4 Å). D-E: 5'-Methylpyrazinon RL2407 (PDB: 6S9W, 2,3 Å). F-G: 6'-Hydroxybenzylpyrazinon RL2461 (PDB: 6S9X, 2,6 Å). Unterschiedliche Derivatisierung im westlichen Molekülteil führen zu kleinen strukturellen Unterschieden in der Umgebung der allosterischen Bindungstasche. Die 2F_o-F_c-Elektronendichtekarte ist auf $\sigma = 0.8$ konturiert.

Alle gelösten Komplexstrukturen mit den Isoform-spezifischen CAAs zeigten die Adressierung von Cys310, sodass die bereits beschriebenen Interaktionen des Benzo[*d*]imidazolons, wie der Stabilisierung der kovalenten Bindungsbildung über die Interaktion des Michael-Akzeptors mit dem Proteinrückgrat von Lys297, ausgebildet wurden. Für die Strukturen mit guter Auflösung (RL2237, 2,4 Å und RL2407, 2,3 Å) werden außerdem die Wasser-vermittelten Interaktionen des Piperidin-Stickstoffs mit Asn54 und Glu79 sowie mit dem Proteinrückgrat von Tyr272 abgebildet. Auch für den westlichen Molekülteil werden die essentiellen π - π -Stapelwechselwirkungen der Aromaten mit den Seitenketten von Trp80 und Tyr272 ausgebildet. Analog zum N1-Stickstoff des 5'-Methylnaphthyridinons zeigte das N1-Stickstoff des Pyrazinon-Grundgerüsts in der Komplexstruktur mit RL2407 eine Wasserstoffbrückenbindung über ein Wassermolekül zu den polaren Seitenketten von Asn54 und Glu79 (Abbildung 36B-E). Der Verlust dieser Interaktion in der Komplexstruktur mit dem 6'-Hydroxybenzylpyrazinon RL2461 ist vermutlich auf die schlechtere Auflösung von 2,6 Å zurückzuführen, sodass generell weniger Wassermoleküle während der Strukturverfeinerung modelliert werden konnten.

Die beobachteten Unterschiede für die verschiedenen Isoform-spezifischen CAAs fokussieren sich insgesamt hauptsächlich auf Veränderungen in der Schleife von Leu202 bis Arg206. Für diesen Bereich, welcher das C-terminale Ende der α C-Helix umfasst, ist jedoch auffällig, dass oftmals eine hohe strukturelle Unordnung vermutlich aufgrund der Stabilisierung der inaktiven PH-*in*-Konformation vorliegt. Dies führt dazu, dass in vielen Kristallstrukturen die α C-Helix unvollständig oder gar nicht definiert ist, was nicht unbedingt von der Auflösung des Datensatzes abhängig ist. Im Falle der hier betrachteten Komplexstrukturen mit den Akt-Isoform-spezifischen CAAs ist lediglich für die Struktur mit RL2407 die α C-Helix vollständig dargestellt. Für die Inhibitoren mit größeren Strukturmotiven im westlichen Molekülteil, wie RL2237 und RL2461, ist dieser Bereich nicht vollständig aufgelöst, was möglicherweise auf eine hohe Flexibilität durch sterische Effekte des Liganden zurückzuführen ist.

Der Vergleich der Komplexstrukturen von Borussertib und dem 5-Methylnaphthyridinon-Derivat RL2237 verdeutlicht insgesamt keine signifikanten Unterschied in der Umgebung der allosterischen Bindungstasche (Abbildung 36B-C). In der Komplexstruktur mit dem 6'-Hydroxybenzylpyrazinon-Derivats RL2461 dagegen ist die Schleife von Leu202 bis Arg206 weiter aufgelöst, sodass die Darstellung einer Interaktion der Seitenketten von Ser205 und Lys268 in der C-terminalen Subdomäne der Kinase ermöglicht wird (Abbildung 36D-E). Des Weiteren wird eine Wasser-vermittelten Interaktion des N4-Stickstoffs des Pyrazinon-Grundgerüsts mit dem Proteinrückgrat von Ser205 deutlich. Die Bindung des 5'-methylierten Pyrazinon-Derivats RL2407 führt dagegen zu einer Umorientierung des C-terminalen Endes der α C-Helix, sodass die Ausbildung der polaren Interaktion von Ser205 und Lys268 verhindert wird (Abbildung 36F-G).

Die gelösten Komplexstrukturen von Akt1^{WT} im Komplex mit verschiedenen Isoform-spezifischen CAAs liefern erste Eindrücke in Liganden-induzierte strukturelle Unterschiede innerhalb der allosterischen Bindungstasche. Um jedoch die unterschiedlichen inhibitorischen Aktivitäten der CAAs auf den verschiedenen Isoformen hinsichtlich veränderter Protein-Liganden-Interaktionen erklären zu können, sind zusätzliche Strukturanalysen im Komplex mit Akt2 und Akt3 von großem Interesse. Die Arbeiten zur Generierung von Akt2- und Akt3-Kristallen im Komplex mit verschiedenen Isoform-spezifischen CAAs sind daher Gegenstand derzeitiger Forschung in der Arbeitsgruppe Rauh. Nichtsdestotrotz konnten die erhaltenen Kristallstrukturen in Akt1^{WT} die weitere Optimierung der Isoform-spezifischen CAAs und damit die Entwicklung einer neuen Generation an Inhibitoren vorantreiben.

3.3.5 Analyse der Cystein-Adressierung durch CAAs

Die unterschiedliche Präferenz der Cystein-Adressierung durch die kovalent-allosterischen Inhibitoren in den Kristallstrukturen wirft die Frage einer möglichen Selektivität auf. Wie bereits beschrieben, konnte in ESI-MS/MS-Studien die kovalente Bindungsknüpfung an die jeweiligen in der Aktivierungsschleife befindlichen Cysteine nachgewiesen werden, wobei jedoch keine Quantifizierung erfolgte. Dieser Befund wurde in den Kristallstrukturen weiter unterstützt, da die Elektronendichte für die kovalente Bindung an entweder Cys296 oder Cys310 in den meisten Kristallstrukturen nicht vollständig aufgelöst ist. Dies spricht für eine unvollständige Besetzung durch die partiell vorliegende Modifikation des jeweils anderen Cysteins im Kristall. Dennoch war durch die Elektronendichte eine klare Präferenz der Ausbildung der kovalenten Bindung in Richtung eines der Cysteine zu erkennen, wobei in der Mehrheit der Komplexstrukturen das Cys310 modifiziert wurde. Die bevorzugte Adressierung der jeweiligen Cysteine konnte dabei jedoch nur teilweise durch die Molekülstruktur und den Bindungsmodus der Inhibitoren erklärt werden. Um dies weitergehend zu untersuchen, wurden daher massenspektrometrische Untersuchungen mit zum Kristallisationskonstrukt analogen Proteinkonstrukten durchgeführt, in welchen das jeweilige Cystein zu einem weniger nukleophilen Serin (Akt1^{C296S} und Akt1^{C310S}) mutiert wurde. Unter den gewählten experimentellen Bedingungen ist jedoch lediglich eine qualitative Betrachtung möglich.

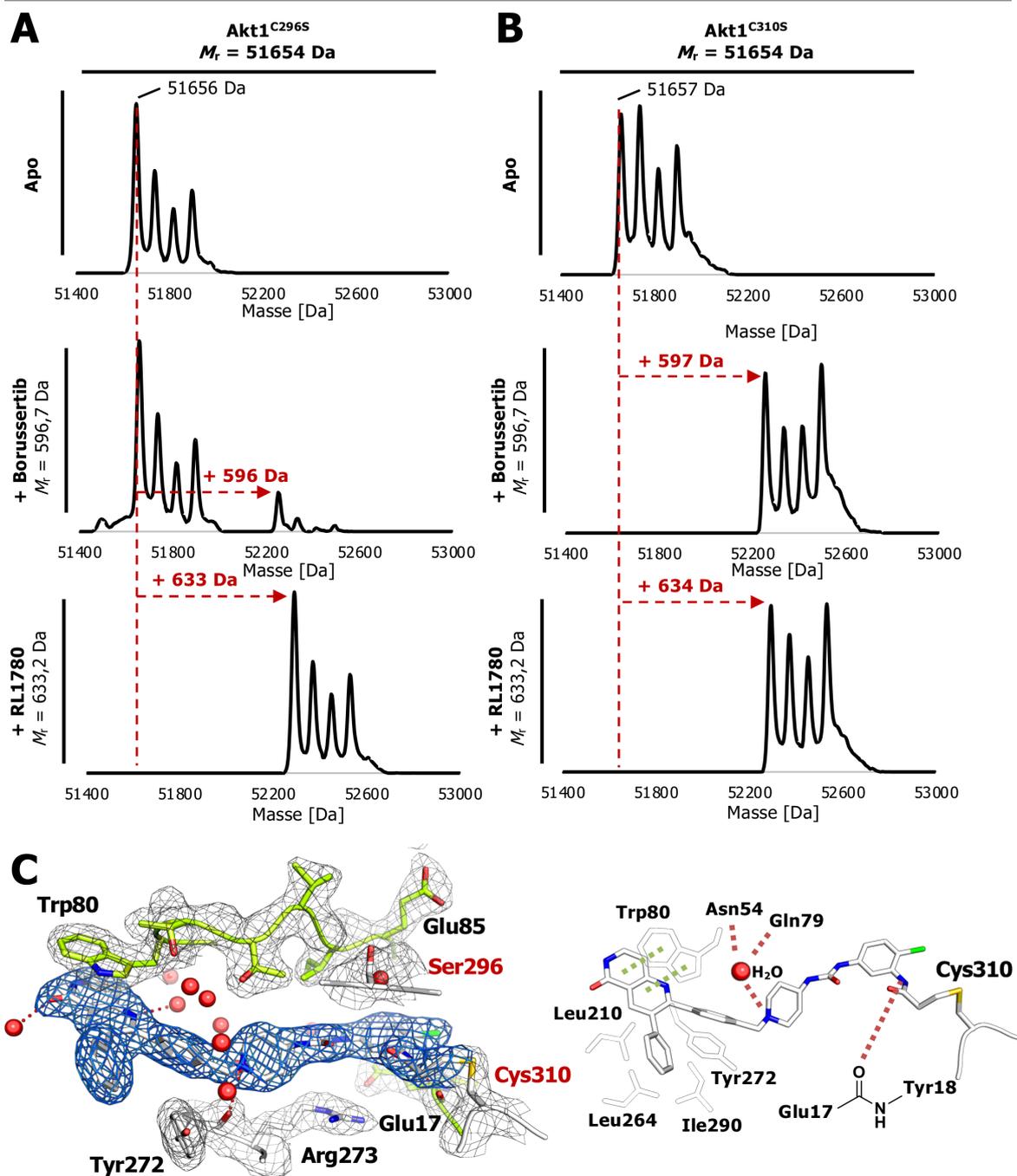


Abbildung 37: Massenspektrometrische Untersuchung einer möglichen Cystein-Selektivität der kovalent-allosterischer Inhibitoren Borussertib und RL1780 nach einstündiger Inkubation auf Eis. A: Adressierung von Cys310 durch Untersuchung der Bindung an Akt1^{C296S}. B: Adressierung von Cys296 durch Untersuchung der Bindung an Akt1^{C310S}. C: Komplexstruktur von Akt1^{C296S} mit Phenylharnstoff-Derivat RL1780 (2,1 Å). Der Ligand zeigt den gleichen Bindungsmodus wie im Komplex mit dem Wildtyp-Protein und die Elektronendichte der kovalenten Bindung zu Cys310 ist vollständig aufgelöst. Die 2F_o-Elektronendichtekarte ist auf $\sigma = 1.0$ konturiert.

Die jeweiligen Massenspektren mit Borussertib verdeutlichen unter analogen experimentellen Bedingungen eine vollständige Modifikation der Akt1^{C310S}-Mutante, während unter Abwesenheit des Cys296 keine vollständige kovalente Bindungsknüpfung an Cys310 erfolgt (Abbildung 37). Diese Ergebnisse unterstreichen die in der Kristallstruktur beobachtete Präferenz der Cys296-Adressierung durch Borussertib.

Nichtsdestotrotz zeigten die Massenspektren mit weiteren kovalent-allosterischen Inhibitoren im Gegensatz zu den Beobachtungen in den jeweiligen Komplexstrukturen keine Selektivität der Cystein-Adressierung. Dies ist beispielhaft für das Phenylurea-Derivat RL1780, welches in der Wildtyp-Kristallstruktur auf eine höhere Präferenz zur Cys310-Adressierung weist, gezeigt und ähnliche Ergebnisse konnten auch für weitere CAAs erhalten werden (Abbildung 37). Die in der Wildtyp-Struktur beobachtete Präferenz der Cys310-Adressierung durch RL1780 konnte ebenfalls nicht mit einer strukturellen Betrachtung der Mutanten aufgelöst werden. Während eine Kristallstruktur von Akt1^{C296S} im Komplex mit RL1780 erhalten werden konnte und diese eine vollständig definierte Elektronendichte der kovalenten Bindung von Cys310 aufwies, war die Co-Kristallisation mit der Akt1^{C310S}-Mutante nicht erfolgreich. Die Betrachtung der Komplexstrukturen beider Mutanten ist jedoch für die strukturelle Diskussion einer möglichen Selektivität notwendig und muss außerdem durch die Co-Kristallisation mit weiteren CAAs validiert werden.

Somit konnten mit den bisherigen MS-Experimenten und Kristallstrukturen keine Selektivitäten der Inhibitoren gegenüber der Modifikation der Cysteine aufgelöst werden. Um dennoch ein Verständnis über einen möglichen Einfluss der Molekülstruktur auf die Präferenz der Cystein-Modifikation zu erhalten, könnten kinetische Betrachtungen der dargestellten Mutanten oder weitere Komplexstrukturen zielführend sein.

3.3.6 Zusammenfassung und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit gelösten Kristallstrukturen von Akt1^{WT} im Komplex mit verschiedenen kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren konnten den postulierten Bindungsmodus der CAAs bestätigen und diverse Interaktionen zwischen dem Zielprotein und den Liganden auflösen. Somit konnte ein tiefergehendes Verständnis der strukturellen Ursachen für die unterschiedlichen Aktivitäten der Inhibitoren erhalten werden. Mit Hilfe der erstmalig gelösten Komplexstruktur mit Borussertib wurden dabei zunächst die essentiellen Wechselwirkungen bekannt, deren Einfluss auf die inhibitorische Effizienz des Vorreitermoleküls Borussertib durch Strukturanalyse mit weiteren Derivaten von CAAs vertieft wurden. Mit Hilfe der Vielzahl an Komplexstrukturen konnte somit ein Verständnis über die SAR bezüglich der Moleküllänge und Flexibilität des östlichen Molekülteils sowie der Diversität verschiedener westlicher Strukturmodule erlangt werden. Des Weiteren ermöglichten die vorhandenen Komplexstrukturen das Design weiterer innovativer Moleküle zur kovalent-allosterischen Adressierung von Akt, wobei wiederum die gelösten Kristallstrukturen mit diesen Inhibitoren zusammen mit der biochemischen und zellulären Charakterisierung den *proof-of-concept* der neuartigen Ansätze lieferten. Weiterhin konnten die vorhandenen Komplexstrukturen genutzt werden, um die gewonnenen Erkenntnisse für die Entwicklung Isoform-spezifischer Akt-Inhibitoren zu verwenden. Mit den gelösten Komplexstrukturen von Akt1^{WT} mit diesen Inhibitoren wurden außerdem erste Einblicke in den Einfluss verschiedener westlicher Grundgerüste auf die Proteinstruktur erhalten.

Die in den Kristallstrukturen beobachteten Präferenzen der Cystein-Adressierung konnten nur teilweise durch das jeweilige Interaktionsprofil der Inhibitoren aufgelöst werden, was durch massenspektrometrische Experimente mit den jeweiligen Cystein-Mutanten und den bisherigen Kristallstrukturen ebenfalls nicht im Detail erklärt werden konnte. Für eine Untersuchung einer möglichen Selektivität der Inhibitoren in Bezug auf die Cystein-Modifikation könnte jedoch die Betrachtung der kinetischen Profile der Verbindungen auf den Cystein-Mutanten zielführend sein. Möglicherweise könnten dabei beispielsweise Unterschiede in den Geschwindigkeitskonstanten der kovalenten Bindungsknüpfung (k_{inact}) in einem aktivitäts-basierten Assay eine bevorzugte Adressierung eines der beiden Cysteine eindeutig darlegen. Dies erfordert jedoch eine ausreichend hohe Kinase-Aktivität der jeweiligen Proteinmutanten, welche beispielsweise durch Expression in Säugetierzellen erreicht werden könnte. Weiterhin könnten möglicherweise zeitaufgelöste MS-Experimente kinetische Unterschiede der kovalenten Bindungsknüpfung auflösen.

Insgesamt liefern die gewonnenen Kristallstrukturen eine optimale Grundlage für die Anwendung des strukturbasierten Wirkstoffdesigns im Rahmen der kovalent-allosterischen Adressierung von Akt und könnten auch für die Entwicklung zukünftiger Inhibitoren von zentraler Bedeutung sein.

3.4 Adressierung der Akt^{E17K}-Mutante durch kovalent-allosterische Akt-Inhibitoren

Die Überaktivierung der Akt-Kinase in einer Vielzahl von Tumoren resultiert größtenteils aus genetischen Läsionen vorgeschalteter Komponenten des PI3K/Akt-Signalwegs. In den letzten zwei Jahrzehnten wurden zudem aktivierende Mutationen der Akt-Kinase selbst in verschiedenen soliden Krebs- oder Überwucherkrankungen, wie dem Proteus-Syndrom, identifiziert, welche ursächlich für die Entstehung dieser Krankheiten sind.^{62,64} Unter diesen Alterationen dominiert mit einem 80 %-igen Anteil insbesondere die Akt1 E17K-Mutation (Akt1^{E17K}) in der PH-Domäne der Kinase, welche 2007 erstmals von CARPTEN *et al.* beschrieben wurde.^{26,60} Mit der Auflösung der ersten Vollängen-Kristallstruktur des Akt1-Wildtyps im Komplex mit dem allosterischen Inhibitor Akti-1/2 konnte außerdem die Relevanz von Glu17 in der PH-Domäne für die Stabilisierung der inaktiven PH-*in*-Konformation durch Ausbildung einer Salzbrücke zu Arg273 in der Kinase-Domäne nachgewiesen werden. Auf Grundlage dieser Beobachtung wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Austausch durch die positiv-geladene Lysin-Seitenkette zu einer elektrostatischen Repulsion in der inaktiven PH-*in*-Konformation führt (Abbildung 38). Dies resultiert in einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der aktiven PH-*out*-Konformation.⁷⁴ Die erhöhte Affinität zu den *second messengern* PIP₂ und PIP₃ unterstützt außerdem die konstitutive Lokalisation an der Membran.²¹⁶

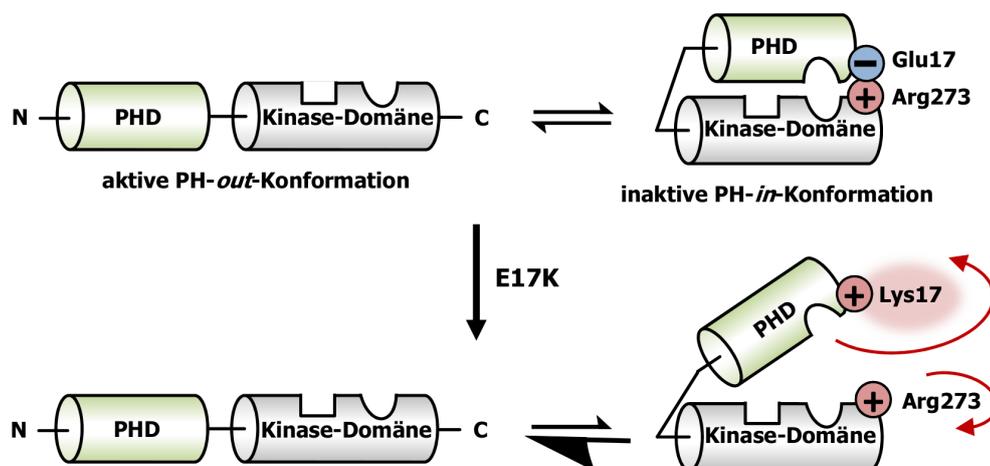


Abbildung 38: Schematische Darstellung der Auswirkung der E17K-Mutation. Durch Austausch des negativ-geladenen Glu17 durch das basische Lysin kommt es zu einer elektrostatischen Repulsion in der inaktiven PH-*in*-Konformation und Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der aktiven PH-*out*-Konformation.

Die E17K-Mutante von Akt, welche in 5 % der Patienten mit ER⁺-Brustkrebs zu finden ist, stellt eine interessante Zielstruktur in der Medizinischen Chemie dar.²⁶ Während durch die Adressierung der Akt1^{E17K}-Mutante mit dem ATP-kompetitiven Inhibitor Capivasertib bereits erste Erfolge in Patienten mit soliden Tumoren erzielt werden konnten, konnte jedoch *in vitro* eine geringere Sensitivität gegenüber dem allosterischen Inhibitor MK-2206 beobachtet werden.^{62,63,217} Um dennoch den Selektivitätsvorteil dieser Inhibitor-Klasse ausnutzen zu können, ist weiterhin die effiziente allosterische Modulation der E17K-

Mutante von größtem Interesse. Mit den Inhibitoren Miransertib und Arq751 konnten dabei bereits vielversprechende *in vitro* und *in vivo* anti-tumorale Aktivitäten durch die allosterische Modulation der Akt E17K-Mutante erzielt werden, welche derzeit Bestandteil klinischer Studien sind.⁶⁵

Die Überlegenheit der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren gegenüber den allosterischen Referenzverbindungen in Zelllinien mit einer Akt-Überaktivierung, die aus genetischen Läsionen Akt-vorgeschalteter Proteine resultiert, konnte bereits in Kapitel 3.1 demonstriert werden. Um dies möglicherweise auch im Kontext der Akt1^{E17K}-Adressierung darstellen zu können, war die Charakterisierung dieser Mutante ein zentrales Ziel dieser Arbeit. Ein besonderes Interesse lag dabei in der Kristallisation der Akt1^{E17K}-Mutante, um das strukturbasierte Design und die Optimierung der CAAs zur Adressierung des Proteins zu ermöglichen. Neben der biochemischen Untersuchung der Stabilisierung der inaktiven Kinase-Konformation mit verschiedenen Inhibitoren wird in diesem Kapitel außerdem die Etablierung eines Ba/F3-Zellmodellsystems zur Darstellung einer onkogenen Abhängigkeit von der Akt1^{E17K}-Mutation beschrieben, welche die zelluläre Charakterisierung der verschiedenen Akt-Inhibitoren ermöglicht.

3.4.1 Kristallisation von Akt1^{E17K}

Strukturbiologische Untersuchungen der E17K-Mutation in Akt konnten bislang lediglich mit Hilfe der Kristallstrukturen der PH-Domänen des Wildtyps und der E17K-Mutante erfolgen.⁶⁰ Mit der Auflösung der Vollängenstruktur des Akt1-Wildtyps wurde jedoch deutlich, dass für ein tiefergehendes Verständnis des Einflusses der Mutation auf die Regulation des Proteins eine Betrachtung der Interaktion von Kinase- und PH-Domäne von zentraler Bedeutung ist.⁷⁴ Daher sind strukturelle Informationen über die Volllänge von Akt1^{E17K} von größtem Interesse, welche bis zum derzeitigen Stand der Forschung durch beispielsweise Röntgenstrukturanalyse jedoch nicht erhalten werden konnten. Enorme Relevanz hat der Einblick in die Struktur der Volllänge außerdem im Hinblick auf das strukturbasierte Wirkstoffdesign zur Adressierung dieser Aktivierungsmutante. Daher war im Rahmen dieser Arbeit ein zentrales Ziel die Identifizierung von Bedingungen, welche zur Kristallisation der Akt1^{E17K}-Volllänge führen, sodass die Proteinstruktur mittels Röntgenstrukturanalyse aufgelöst werden kann. Unter Ausnutzung der ProXID-Infrastruktur (Kapitel 3.2.1) sollten dafür zunächst valide Expressions- und Reinigungsbedingungen bestimmt werden, um optimale Voraussetzungen für die anstehenden *Screening*-Experimente gewährleisten zu können.

3.4.1.1 Expression und Reinigung des Akt1^{E17K}-Kristallisationskonstrukts

Das für die Kristallisation von Akt1^{E17K} verwendete DNA-Konstrukt ist analog zur Sequenz des Akt1^{WT}, wobei durch ortsspezifische Mutagenese die E17K-Mutation eingebracht wurde (Kapitel 3.2.2). Somit befindet sich das Gen auf dem Transfervektor pIEx-Bac-3 (Merck Millipore), welcher analog zum Wildtyp für die Proteinexpression in Insektenzellen nach dem BacMagic-System (Merck Millipore) geeignet ist.

Für die initiale Bestimmung des optimalen Zeitpunkts der Zellernte, wurde zunächst eine Testexpression in der Insektenzelllinie Sf9 durchgeführt und die jeweiligen Proben im Vergleich mit einer Kontrollkultur ohne Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus per SDS-Gelelektrophorese analysiert (Abbildung 39).

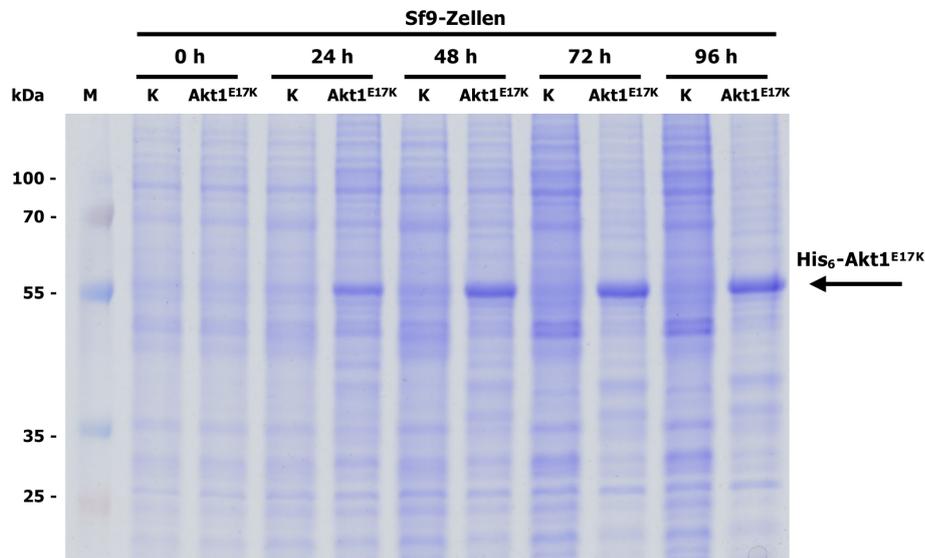


Abbildung 39: Testexpression von Akt1^{E17K} in Sf9-Zellen zur Bestimmung der optimalen Expressionsdauer. Bereits nach 72 Stunden kann das höchste Proteinlevel erreicht werden. M: Marker, K: Kontrollkultur ohne Infektion mit Baculovirus, Akt1^{E17K}: Sf9-Kultur nach Infektion mit dem rekombinanten Baculovirus.

Bereits nach 72 Stunden Inkubation wird das Protein mit einer Größe von 55,1 kDa in einem hohen Level exprimiert, sodass diese Inkubationszeit als optimale Expressionsdauer gewählt wurde. Im Vergleich mit dem Wildtyp-Protein konnte insgesamt mit der E17K-Mutante eine ähnlich gute Ausbeute durch die Expression in Sf9-Zellen erzielt werden, was auch auf die Expression in einem größeren Maßstab übertragbar war. Aufgrund des Erfolgs für den Wildtyp wurde für die Mutante anschließend die identische Reinigungsstrategie gewählt (Kapitel 3.2.3).

Analog zum Wildtyp-Protein wurde die N-terminal mit einem His₆-Tag versehene Akt1^{E17K}-Mutante nach dem Zellaufschluss durch eine Nickel-Affinitätschromatographie isoliert (Abbildung 40). Auffällig ist jedoch eine prominente Bande des Proteins mit einer Größe von 55,1 kDa in der unlöslichen Fraktion (UF) nach dem Zellaufschluss, was auch in nachfolgenden Reinigungen nach Inkubation mit dem nicht-denaturierenden Detergenz CHAPS nur geringfügig reduziert werden konnte.²¹⁸ Im Vergleich zum äußerst hohen Anteil an löslichem Protein (LF) konnte die unlösliche Fraktion allerdings vernachlässigt werden. Mit Hilfe der Nickel-Affinitätschromatographie konnte die Akt1^{E17K}-Mutante insgesamt mit einer bereits ordentlichen Reinheit in einem symmetrischen Peak gewonnen werden. Lediglich geringe höher- und niedermolekulare Verunreinigungen sind in der eluierten Proteinlösung vorhanden, welche ebenfalls in der Reinigung des Wildtyps auftreten.

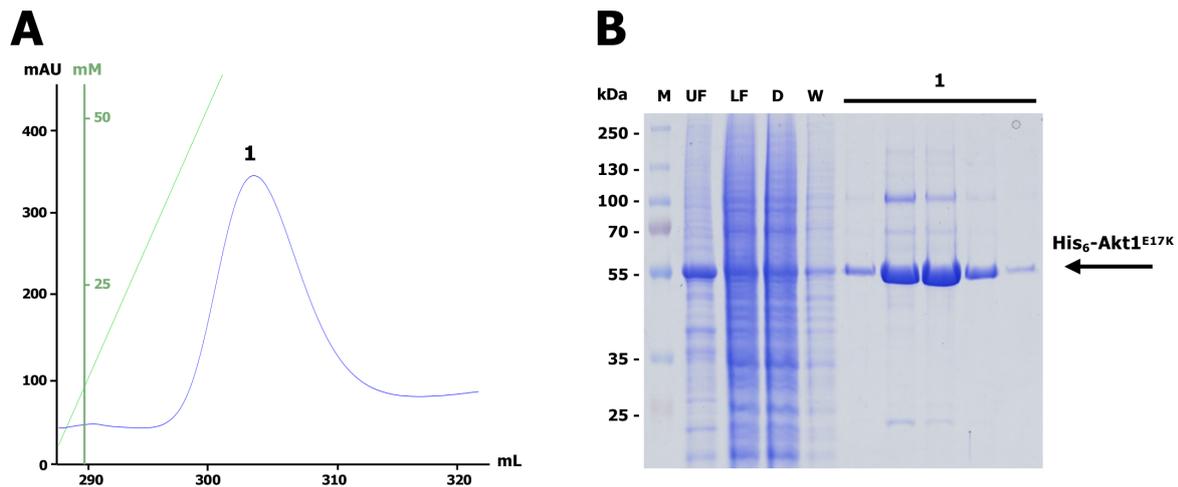


Abbildung 40: Erste Nickel-Affinitätschromatographie zur Reinigung von Akt1^{E17K}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal, grün: Gradient der Imidazol-Konzentration. B: SDS-Gel der ersten Nickel-IMAC. M: Marker, UF: unlösliche Fraktion, LF: lösliche Fraktion, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, 1: Fraktionen des Elutionspeak 1. Das Zielprotein konnte im Elutionspeak neben leichten Verunreinigungen isoliert werden.

Die Fraktionen des Elutionspeaks wurden vereint und im Zuge einer Dialyse der His₆-Tag von Akt1^{E17K} mit Hilfe der TEV-Protease proteolytisch abgespalten. Zur Abtrennung der His₆-Tag-tragenden TEV-Protease folgte anschließend eine reverse Nickel-Affinitätschromatographie (Abbildung 41).

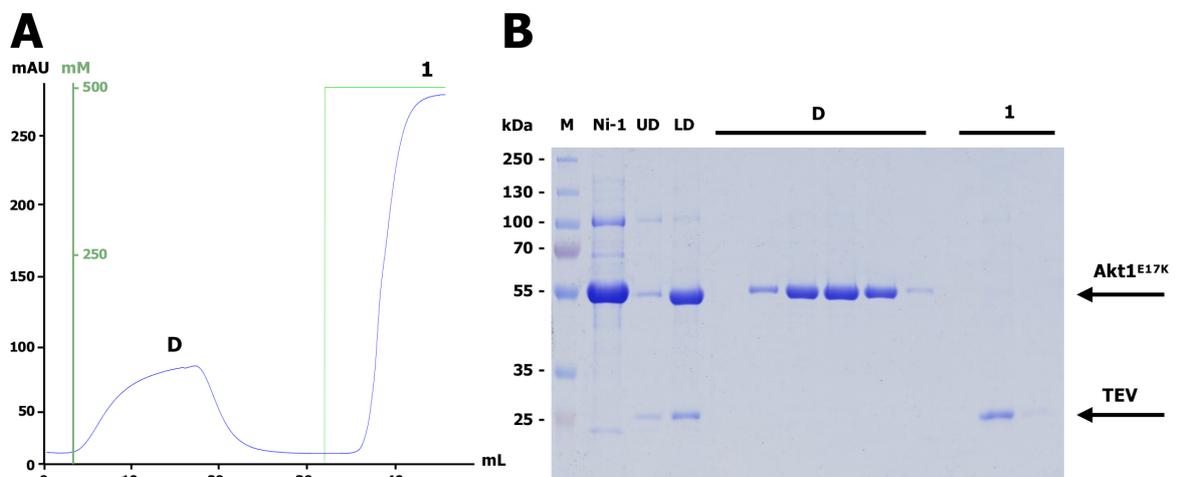


Abbildung 41: Reverse Nickel-Affinitätschromatographie zur Reinigung von Akt1^{E17K}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal, grün: Imidazol-Konzentration. B: SDS-Gel der reversen Nickel-IMAC. M: Marker, Ni-1: Elutionsfraktion der ersten Nickel-Affinitätschromatographie, UD: unlösliche Fraktion der Dialyse, LD: lösliche Fraktion der Dialyse, D: Durchfluss, 1: Fraktionen des Elutionspeak. Das vollständig geschnittene Zielprotein konnte im Durchfluss isoliert werden.

Analog zur Reinigung des Wildtyps konnte ein Präzipitat während der Dialyse (UD) beobachtet werden, welches ebenfalls hauptsächlich nieder- und höhermolekulare Verunreinigungen enthielt. Die erfolgreiche und vollständige Abspaltung des His₆-Tags konnte zudem durch die ausschließliche Isolierung des Proteins mit einer Größe von 51,7 kDa im Durchfluss (D) der Säule bestätigt werden.

Anhand des SDS-Gels wird außerdem die Abtrennung der TEV-Protease im Eluat (1) deutlich. Als nächster Schritt wurde trotz der bereits hohen Reinheit des Proteins mit der Hälfte der Proteinlösung eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt (Abbildung 42).

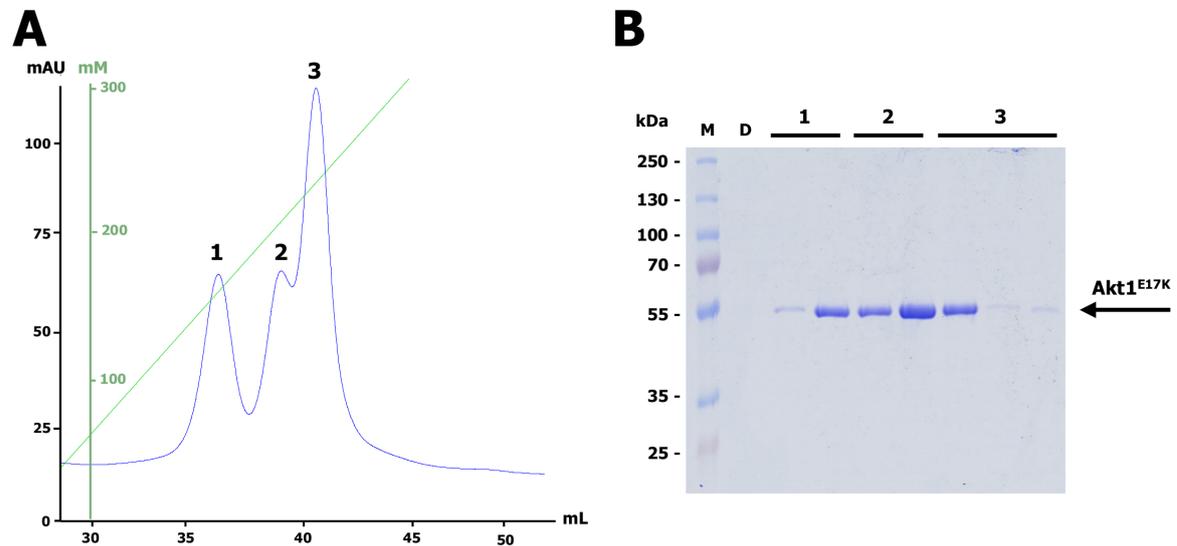


Abbildung 42: Anionenaustauschchromatographie zur Reinigung von Akt1^{E17K}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal, grün: Gradient der Natriumchlorid-Konzentration. B: SDS-Gel der AEX, M: Marker, D: Durchfluss, 1-3: Fraktionen der Elutionspeaks 1-3. Das Zielprotein konnte in allen Elutionspeaks erhalten werden.

Mit der identischen Anionenaustauscher-Säule (HiTrap Q HP, Cytiva) wurde für die Akt1^{E17K}-Mutante ein leicht verändertes UV-Chromatogramm im Vergleich zum Wildtyp erhalten. Eine massenspektrometrische Analyse der einzelnen Peaks wies eine äußerst minderwertige Qualität auf, sodass keine Aussagen über die teilweise separierten Spezies getroffen werden kann. Interessanterweise zeigte jedoch die massenspektrometrische Analyse der Proteinlösung vor der Anionenaustauschchromatographie ein im Vergleich zum Wildtyp verändertes Phosphorylierungsmuster, wobei insgesamt die gleichen Spezies mit dem unphosphorylierten, einfach-, zweifach- und dreifach-phosphorylierten Protein identifiziert werden konnten. Im Gegensatz zum Wildtyp dominiert allerdings für die Akt1^{E17K}-Mutante vor allem das unphosphorylierte Protein gegenüber den phosphorylierten Spezies (Abbildung 43), eine valide Quantifizierung ist jedoch nicht erfolgt. Die in der Anionenaustauschchromatographie isolierten Fraktionen der einzelnen Elutionspeaks wurden aufgrund der geringen Proteinmenge der jeweiligen Spezies wieder vereint. Da die Durchführung der Anionenaustauschchromatographie im Vergleich mit der anderen Hälfte der Proteinlösung, welche ohne diesen Reinigungsschritt behandelt wurde, bezüglich der Proteinreinheit keinen Vorteil brachte, wurde für die nachfolgenden Reinigungen keine Anionenaustauscher-Säule verwendet. Dies führte zudem zu einer deutlichen Steigerung der Proteinausbeute und konnte bereits für den Wildtyp als nicht nachteilig für die Kristallisation befunden werden (Kapitel 3.2.3).

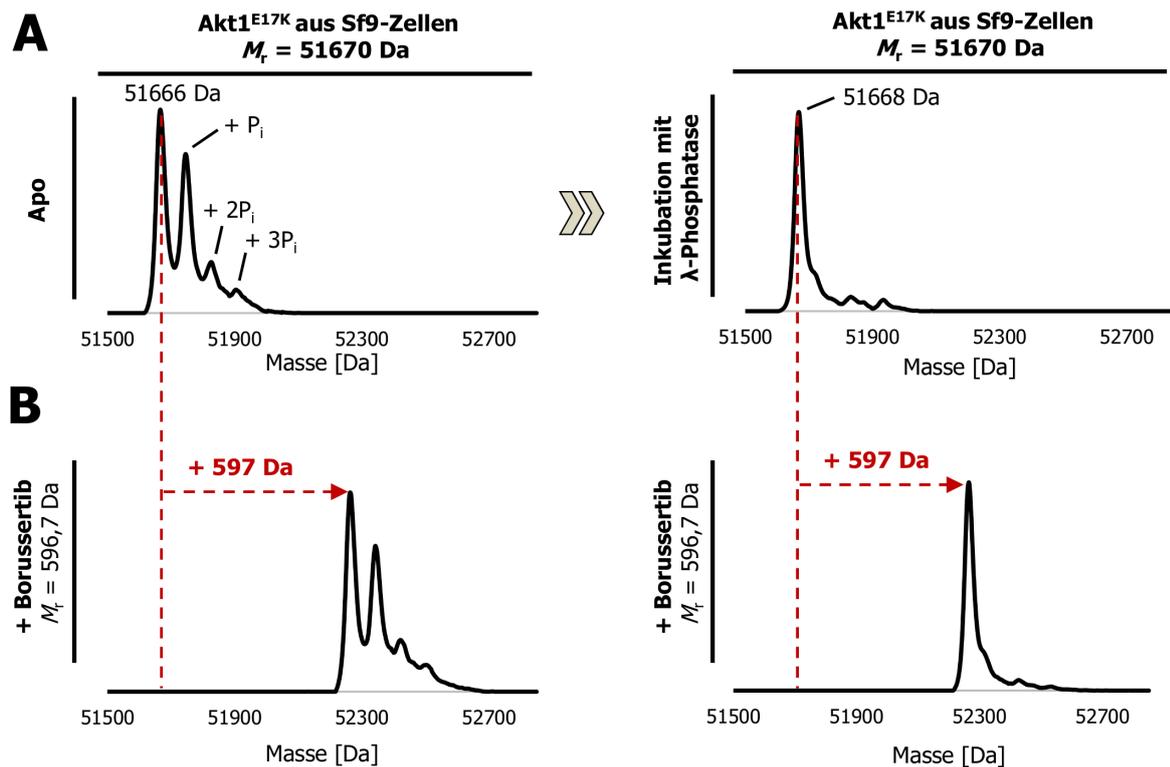


Abbildung 43: Massenspektrometrische Analyse des Phosphorylierungsmusters von Akt1^{E17K} nach Expression in Sf9-Zellen. A: Dephosphorylierung von Akt1^{E17K} mit der λ-Phosphatase. Nach Inkubation über Nacht konnte eine vollständige Dephosphorylierung erreicht werden. B: Kovalente Modifikation des heterogenen Phosphorylierungsgemisches (links) und des dephosphorylierten Proteins (rechts) durch Borussertib. Auch nach Co-Inkubation der λ-Phosphatase kann weiterhin eine kovalente Adressierung des Proteins erfolgen.

Neben Kristallisationsexperimenten mit dem Phosphorylierungsgemisch der Akt1^{E17K}-Mutante, sollten außerdem *Screening*-Ansätze mit einer möglichst homogenen Proteinlösung erfolgen, da dies für die Kristallisation eines Proteins essentiell sein kann.²⁰⁷ Daher sollte die heterogene Proteinlösung aus der Expression in Sf9-Zellen mit der unspezifischen λ-Phosphatase dephosphoryliert werden. Eine massenspektrometrische Verfolgung der Co-Inkubation über Nacht bei 4 °C zeigte eine vollständige Dephosphorylierung der Akt1^{E17K}-Mutante (Abbildung 43A). Da zudem eine vollständige kovalente Modifikation des dephosphorylierten Proteins mit Borussertib möglich war, konnte von einer weiterhin nativen Proteinstruktur nach der Inkubation mit der λ-Phosphatase ausgegangen werden (Abbildung 43B). Zur Abtrennung der λ-Phosphatase sowie zur weiteren Reinigung des Proteins erfolgte anschließend eine Größenausschlusschromatographie (Abbildung 44).

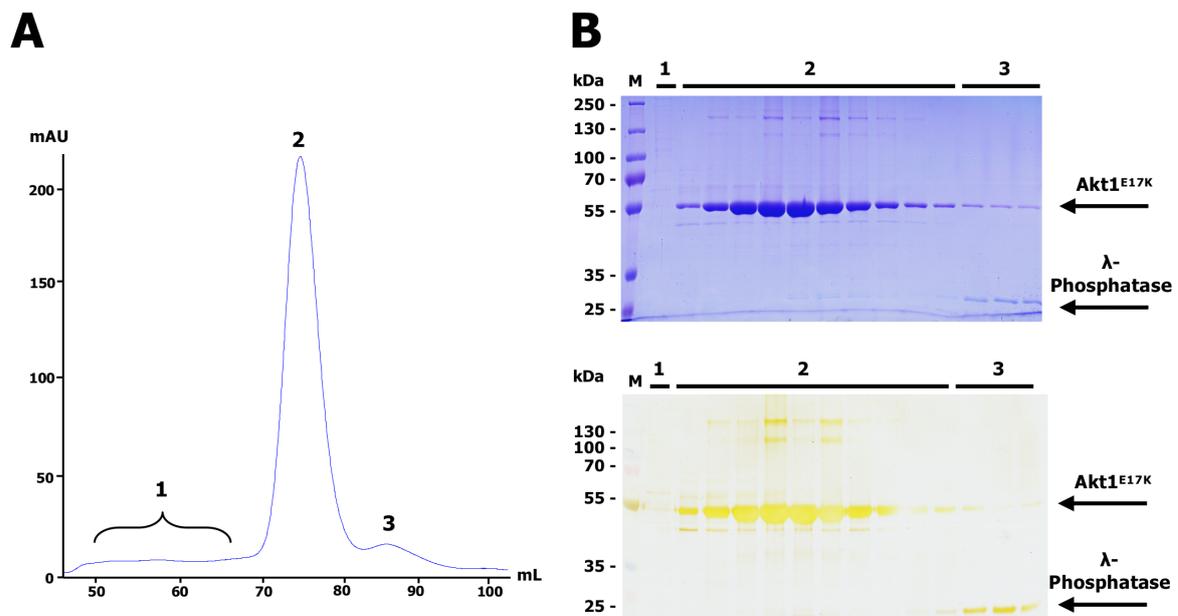


Abbildung 44: Größenausschlusschromatographie zur Reinigung von Akt1^{E17K}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal. B: SDS-Gel der ersten Gelfiltration nach CBB-Färbung (oben) und Silberfärbung (unten). M: Marker, 1-3: Fraktionen der Peaks 1-3. Das Zielprotein konnte im zweiten Elutionspeak isoliert werden.

Durch die Größenausschlusschromatographie konnte die dephosphorylierte Akt1^{E17K}-Mutante im zweiten Peak von der λ-Phosphatase, welche eine Größe von 26,0 kDa aufweist und daher mit höherer Retentionszeit eluiert wird, abgetrennt werden. Die wenigen Fraktionen des zweiten Peaks, welche weiterhin höher- und niedermolekulare Verunreinigungen im Silbergel zeigen, wurden für die weitere Verwendung der Proteinlösung vernachlässigt, sodass insgesamt eine ordentliche Reinheit von Akt1^{E17K} erzielt werden konnte. Um möglichst einen Erfolg der Kristallisationsexperimente mit der Akt1^{E17K}-Mutante erzielen zu können, sollten neben der generellen Reinigungsstrategie die für den Wildtyp bewährten Pufferzusammensetzungen verwendet werden. Daher wurde auch für die Mutante ein Pufferaustausch des HEPES-basierten Gelfiltrationspuffers gegen einen Tris-gepufferten Lagerungspuffer mit Hilfe einer weiteren Größenausschlusschromatographie durchgeführt (Abbildung 45). Dies diente zusätzlich der Entfernung möglicher Oligomere vor dem Ansetzen der Kristallisationsexperimente.

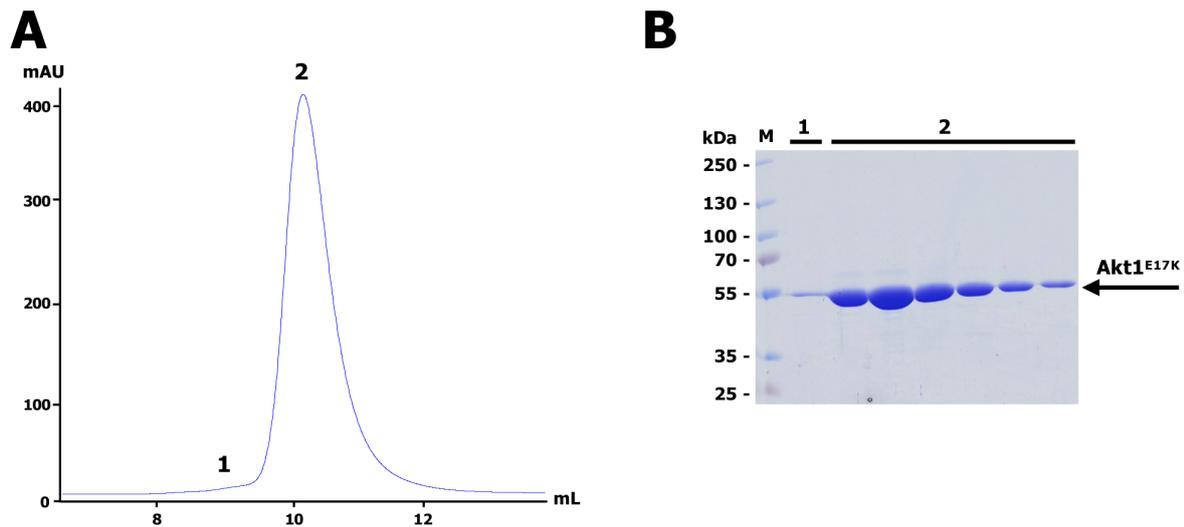


Abbildung 45: Zweite Größenausschlusschromatographie zum Pufferaustausch von Akt1^{E17K}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal. B: SDS-Gel der finalen Gelfiltration. M: Marker, 1-2: Fraktionen der Peaks 1-2. Das Protein konnte von Oligomeren abgetrennt und in den Kristallisationspuffer überführt werden.

Das für die Kristallisationsexperimente verwendete Protein wurde im zweiten Peak der Größenausschlusschromatographie erfolgreich von Oligomeren, welche in einer kleinen Schulter (1) des Hauptpeaks eluiert wurden, abgetrennt und in den Lagerungspuffer überführt. Um zu überprüfen, ob die Akt1^{E17K}-Mutante ebenso wie der Wildtyp eine gute Stabilität in diesem Puffer aufweist, wurden die Schmelztemperaturen des Proteins durch einen TSA-Assay in einem *Screen*, in welchem der pH-Wert und die Salzkonzentration des Tris-basierten Puffers variiert wurden, bestimmt (Abbildung 46).

		NaCl-Konzentration [mM]											
		0	90	180	270	360	440	530	620	710	800	1200	1600
pH-Wert	6.5	51.4	51.4	51.3	51.4	50.7	50.3	50.3	50.2	50.0	49.9	49.0	49.2
	6.8	51.5	51.2	50.9	50.4	50.6	49.9	49.7	49.8	49.2	49.2	48.0	47.9
	7.1	55.0	54.2	54.1	53.9	53.8	53.1	52.9	52.8	52.4	52.4	51.7	51.3
	7.4	55.2	54.5	54.6	54.2	53.8	53.4	53.0	52.9	52.5	52.5	51.7	51.5
	7.6	54.7	54.3	54.0	53.7	53.6	52.9	52.6	52.4	52.1	52.2	51.1	50.5
	7.9	54.2	54.0	53.6	53.0	52.8	52.3	51.9	51.7	51.4	51.2	50.1	49.4
	8.2	53.9	53.3	52.9	52.5	52.3	51.9	51.0	50.8	50.5	50.3	49.2	48.5
	8.5	52.2	52.2	52.1	51.4	51.2	50.1	50.1	49.8	49.5	49.2	48.1	47.4

Abbildung 46: Pufferstabilitätstest für Akt1^{E17K} im Lagerungspuffer für die Kristallisation. Die gewählte Pufferzusammensetzung führt zu einer ordentlichen Stabilität des Proteins.

Da im Bereich des verwendeten Lagerungspuffers mit einem pH-Wert von 7,5 und einer Natriumchlorid-Konzentration von 100 mM eine hohe Proteinstabilität erreicht wird, stellt die gewählte Pufferzusammensetzung eine gute Grundlage für die nachfolgenden Kristallisationsansätze mit der isolierten Akt1^{E17K}-Mutante dar.

Die Akt1^{E17K}-Mutante konnte insgesamt mit der zum Wildtyp analogen Reinigungsstrategie in einer ordentlichen Reinheit und mit einer hohen Proteinausbeute von ca. 2,5 mg pro Liter Expressionskultur erhalten werden. Ebenso liegt ein heterogenes Proteingemisch bezüglich der Phosphorylierung nach der Expression in Sf9-Zellen vor. Durch die Verwendung identischer Pufferzusammensetzungen wie für den Wildtyp, in welchen die Mutante eine ebenso hohe Stabilität zeigt, konnten somit gute Voraussetzungen für die nachfolgenden *Screening*-Experimente zur Identifizierung der Kristallisationsbedingungen von Akt1^{E17K} geschaffen werden.

3.4.1.2 Ansätze zur Kristallisation von Akt1^{E17K}

Für die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen eines Proteins, dessen Kristallstruktur bisher nicht gelöst wurde, ist oftmals eine kaum überblickbare Auswahl an möglichen Experimenten vorhanden. Dabei ist jedoch eine erfolgreiche Kristallisation auch durch systematische Herangehensweise nicht immer gewährleistet. Für die Darstellung klinisch relevanter Mutanten kann es allerdings von Vorteil sein, wenn bereits Kristallstrukturen des entsprechenden Wildtyp-Proteins existieren. Da für die Akt1-Volllänge im Rahmen dieser Arbeit bereits ein robustes Kristallisationssystem etabliert wurde, ist die Reproduktion der Wildtyp-Kristallisationsbedingungen mit der analog aufbereiteten E17K-Mutante daher naheliegend. Unter Variation unterschiedlicher Parameter in zahlreichen *Fine Screens*, wie der Fällungsmittel- und Salz-Konzentrationen, dem pH-Wert, der Temperatur, der Proteinkonzentration sowie der Verwendung der phosphorylierten oder dephosphorylierten Proteinlösung, konnten dabei allerdings keine Kristalle erhalten werden. Sowohl in der Apo-Form als auch durch Co-Inkubation mit verschiedenen kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren und dem ATP-kompetitiven Inhibitor Capivasertib konnte ebenfalls kein Kristallwachstum induziert werden. Dies lässt vermuten, dass durch den Einfluss der E17K-Mutation auf die Proteinkonformation die Mutante möglicherweise nur unter neuartigen Bedingungen und mit veränderter Kristallpackung kristallisieren kann.

Um diese Bedingungen identifizieren zu können, liefern komplexe *Screening*-Experimente mit kommerziellen Kristallisationsbedingungen (JCSG Core I-IV Suites, PACT Suite, PEG I-II Suites, MemGold I-II Suites, AmSO₄ Suite, Classics Suite, Classics II Suite, Qiagen) bei unterschiedlichen Temperaturen eine gute Grundlage. Aufgrund der Relevanz der Phosphorylierung für die Kristallisation des Akt1^{WT} wurden die *Screenings* zunächst ebenfalls mit dem heterogenen Gemisch der Phosphorylierungsspezies für die Akt1^{E17K}-Mutante durchgeführt. Diese führten jedoch in keiner der über 1000 Bedingungen unter Variation der Proteinkonzentrationen von 3-10 mg/mL und zusätzlicher Co-Inkubation mit verschiedenen Akt-Inhibitoren zu jeglichem Kristallwachstum. Unter der Annahme, dass die Kristallisation möglicherweise durch die Heterogenität der Proteinlösung in Bezug auf die verschiedenen Phosphorylierungsspezies gehindert ist, wurden diese *Screening*-Experimente mit dem dephosphorylierten Protein wiederholt. Dabei konnte tatsächlich bei jeweils 4 °C Inkubationstemperatur in einigen Bedingungen die Bildung kristallähnlicher

Morphologien für das mit Borussertib co-inkubierte Protein verzeichnet werden (Abbildung 47A-C).

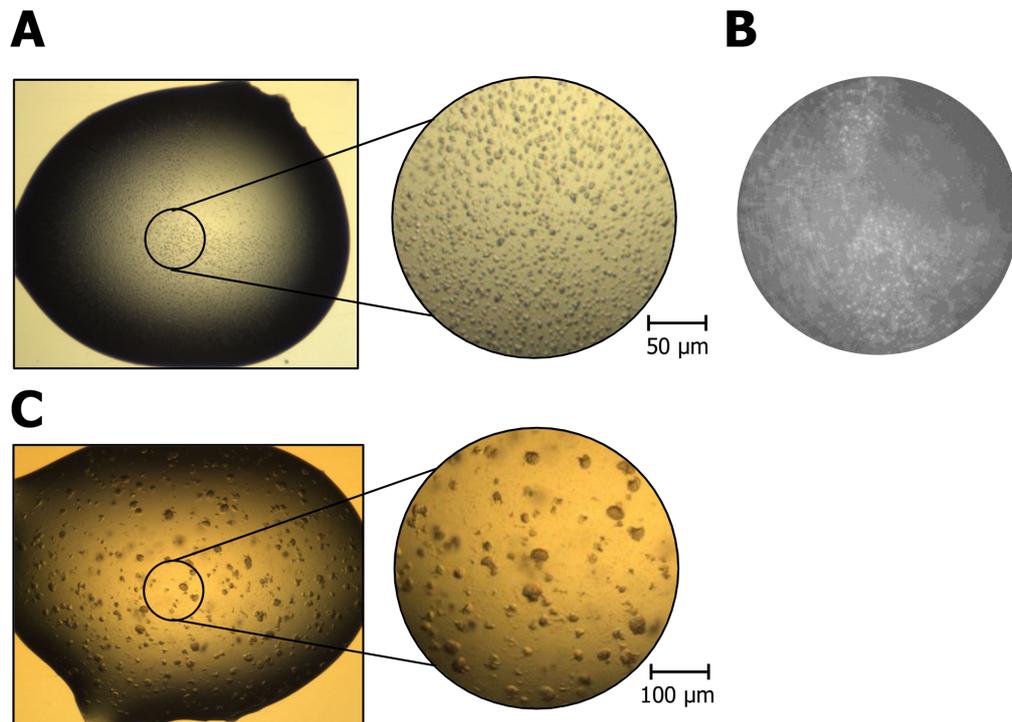


Abbildung 47: Ergebnisse der *Screening*-Experimente mit dephosphoryliertem Akt1^{E17K} co-inkubiert mit Borussertib. B: Sehr kleine, kubische Kristalle mit einer Bedingung aus JCSG Core Suite I, Qiagen (100 mM Na-Acetat, pH 5,5, 20 % (w/v) PEG 3000, 4 °C). C: Anregung unter dem UV-Mikroskop. D: Sphärolite mit Bedingung aus JCSG Core Suite IV, Qiagen (100 mM MES, pH 6,0, 5 % (w/v) PEG 3000, 30 % (v/v) PEG 200, 4 °C).

Es handelte sich dabei zum einen um sehr kleine kubische Kristalle (Abbildung 47A), sowie kugelförmig angeordnete Nadel-Kristallaggregate, sogenannte Sphärolite (Abbildung 47C), welche über einen Zeitraum von wenigen Tagen sukzessiv gewachsen sind. Eine Untersuchung der intrinsischen Tryptophan-Fluoreszenz durch Inspektion der kubischen Kristalle unter dem UV-Mikroskop zeigte zudem eine Anregung und somit das Aufleuchten der Kristalle, was im Allgemeinen einen Hinweis auf das Vorliegen von Protein- anstatt von Salzkristallen liefert (Abbildung 47B).

Im nächsten Schritt wurden die Experimente mit diesen *Screening*-Bedingungen in einem *Fine Screen* unter Verwendung größerer Volumina der Reservoir-Lösung und des Kristallisationstropfens wiederholt. Mit der Bedingung der kubischen Kristallformen konnte allerdings keine Reproduktion erzielt werden. Für die Sphärolit-Bedingung dagegen konnte auch in einem *Fine Screen* unter Variation der PEG 3000- und PEG 200-Konzentrationen sowie des pH-Werts des 100 mM MES-Puffers die Reproduktion kleiner, zahlreicher Sphärolite erfolgen (Abbildung 48A). Diese wuchsen analog zum *Screening*-Experiment lediglich bei einer Temperatur von 4 °C.

Auffällig war zudem, dass die Sphärolite nur durch Co-Inkubation mit potenten kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren, wie Borussertib, und nicht mit der Apo-Form des Proteins oder nach Co-Inkubation mit dem ATP-kompetitiven Inhibitor Capivasertib gebildet wurden. Eine signifikante Stabilisierung der inaktiven Konformation, welche die Flexibilität der PH-Domäne einschränkt, scheint daher ähnlich wie für den Wildtyp vorteilhaft für die Kristallisation der Akt1^{E17K}-Volllänge zu sein. Des Weiteren führten Kristallisationsexperimente mit diesen Bedingungen unter Verwendung der Proteinlösung mit dem heterogenen Phosphorylungsgemisch nicht zur Bildung der Sphärolite. Diese Erkenntnis unterstützte die weitere Verwendung des dephosphorylierten Proteins in den nachfolgenden *Fine Screens*. Da die reproduzierten Sphärolite allerdings sehr klein waren, wurden weitere *Fine Screens* mit dieser Bedingung unter Variation der Reservoir-Zusammensetzung, der Proteinkonzentration sowie der Tropfenverhältnisse von Reservoir- und Proteinlösung angesetzt. Durch systematische Variationen dieser Parameter konnten die Sphärolite auf Größen von ca. 50-100 μm optimiert werden (Abbildung 48B-C). Nichtsdestotrotz konnte mit diesen Sphäroliten keine Diffraktion der Röntgenstrahlung am SLS erzielt werden, sodass weitere Optimierungsschritte notwendig waren.

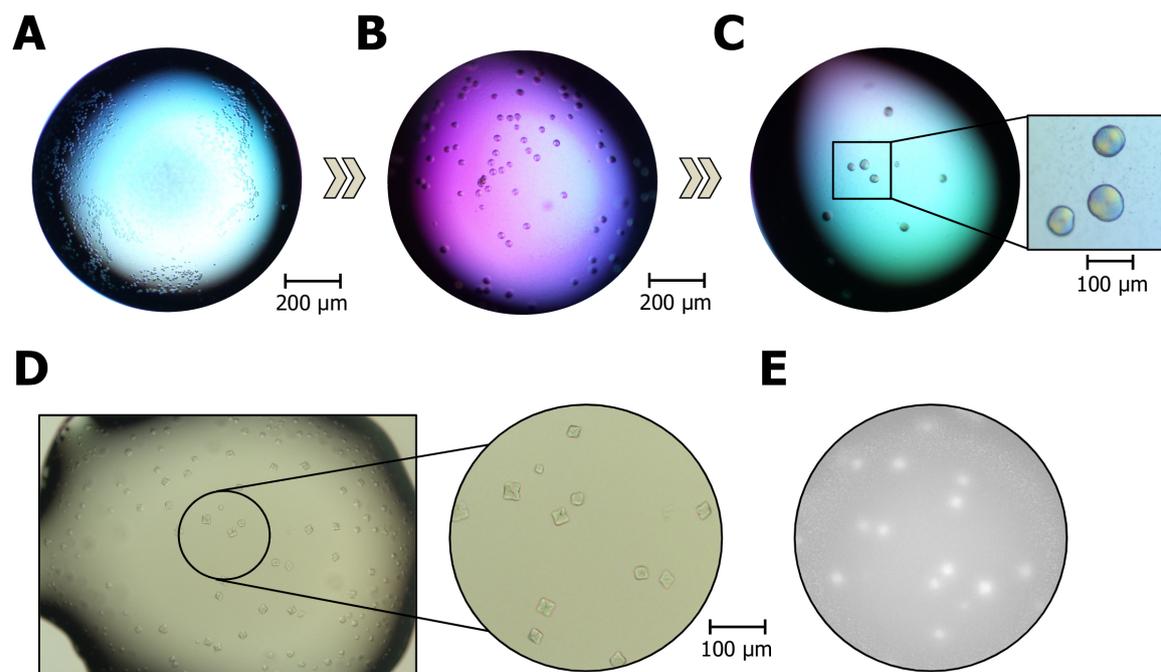


Abbildung 48: Optimierung der Sphärolit-Bedingung im Komplex mit Borussertib aus dem *Screening*. A-C: Reproduktion im *Fine Screen* bei 4 $^{\circ}\text{C}$ und systematische Optimierung. A: 4,5 mg/mL, 100 mM MES, pH 6,0, 35 % (v/v) PEG 200, 7 % (w/v) PEG 3000. B: 4,5 mg/mL, 100 mM MES, pH 6,0, 30 % (v/v) PEG 200. C: 6,0 mg/mL, 100 mM MES, pH 6,0, 32 % (v/v) PEG 200. D: Kubische Kristalle im Additiv-*Screening* unter Zugabe von 100 mM Na-Acetat, pH 4,6 und 300 mM NaF. E: Anregung unter dem UV-Mikroskop.

Für die Optimierung der Sphärolite hin zu Kristallmorphologien, welche für Röntgenbeugungsexperimente geeignet sind, wurden verschiedene Ansätze gewählt. Ein Ansatz war dabei das sogenannte *Microseeding* in Lösung, welches durch die Zugabe einer verdünnten Lösung bereits erhaltener Kristallfragmente in Reservoir zum Kristallisationstropfen das Kristallwachstum induzieren bzw. positiv beeinflussen soll und

für zahlreiche Proteine in der Literatur erfolgsbringend war.²¹⁹ Daher wurde ein möglicherweise positiver Einfluss durch Zugabe von Akt1^{WT}- sowie Akt1^{E17K}-Sphärolit-Kristallfragmenten, welche in unterschiedlichen Konzentrationen in der jeweiligen Reservoir-Lösung verdünnt wurden, beim Ansetzen der Sphärolit-Bedingungen untersucht. Diese *Microseeding*-Experimente konnten jedoch keine Veränderung der beobachteten Morphologie erzielen. Eine weitere Möglichkeit zur vorteilhaften Beeinflussung der Kristallisation eines Proteins stellen kommerzielle Additiv-*Screenings* dar (Opti-Salts Suite, Qiagen und Additive Screen HT, Silver Bullets, Hampton Research), welche den Einfluss der Zugabe beispielsweise weiterer Salze oder Puffer zu den initialen Kristallisationsbedingungen untersuchen. In lediglich einer Bedingung, unter Zugabe von 100 mM Natrium-Acetat mit pH 4,6 und 300 mM Natriumfluorid, konnten kubische Kristalle erhalten werden, welche unter dem UV-Mikroskop angeregt werden konnten (Abbildung 48D-E). Diese Kristalle zeigten allerdings während der Vermessung am SLS keine Diffraktion. Zudem konnten sie in einem *Fine Screen* nicht reproduziert werden, sodass insgesamt auch diese *Screening*-Experimente trotz einer Vielzahl getesteter Additive nicht zielführend waren. Des Weiteren wurden Kristallisationsversuche nach einer reduktiven Methylierung der ϵ -Aminogruppe von Lysin-Seitenketten des dephosphorylierten Akt1^{E17K} untersucht. Die Lysin-Methylierung hat dabei einen erheblichen Einfluss auf die Hydrophobizität und damit auf die Löslichkeit des Proteins, sodass eine Kristallisation möglicherweise durch begünstigte Interaktionen in der Kristallpackung ermöglicht wird.²²⁰ Mit Hilfe massenspektrometrischer Analyse konnte die vollständige Methylierung des Proteins nachgewiesen werden, jedoch ebenso eine unvollständige Modifikation des methylierten Proteins durch Borussertib (Kapitel 6.6, Abbildung 66). Dies deutet zusammen mit dem Ausbleiben jeglicher Sphärolite im *Fine Screen* auf einen negativen Einfluss der Methylierung auf die native Proteinstruktur hin, sodass dieser Ansatz ebenfalls nicht erfolgreich war.

Insgesamt konnten mit den bis hier beschriebenen *Screening*- und Optimierungsexperimenten keine Bedingungen identifiziert werden, die zum Wachstum von Kristallen führten, welche für Röntgenbeugungsexperimente geeignet sind. Eine mögliche Erklärung für die geringe Bereitschaft zur Kristallisation könnte die hohe Flexibilität der Proteinstruktur in der durch die Mutation erzeugten aktiven PH-*out*-Konformation sein, welche die Ausbildung stabiler Interaktionen in der Kristallpackung erschwert. Nach Co-Inkubation mit kovalent-allosterischen Inhibitoren konnten allerdings mit Sphäroliten erste Erfolge in Richtung einer Kristallisation des Proteins erzielt werden, jedoch konnten keine geeigneten Kristalle für Diffraktionsexperimente erhalten werden. Möglicherweise weisen die bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten Inhibitoren, wie Borussertib mit einer biochemischen Potenz (IC₅₀-Wert) von 117 ± 46 nM gegenüber der Akt1^{E17K}-Mutante, eine eher schwache Bindung an das Protein auf, wodurch eine gewisse Flexibilität der PH-Domäne trotz der kovalent-allosterischen Ligandenbindung erhalten bleibt und eine ausreichend stabile Kristallpackung nicht erzeugt werden kann.^{135*}

* Bestimmung des HTRF IC₅₀-Werts von Borussertib auf der Akt1^{E17K}-Mutante durch Dr. Jörn Weisner (AG D. Rauh, TU Dortmund).

Durch die Bindung von Inhibitoren mit einer höheren Affinität könnte jedoch möglicherweise eine verstärkte Einschränkung der Flexibilität und somit die Co-Kristallisation gelingen. Derartige Verbindungen konnten im Rahmen der Entwicklung einer weiteren innovativen Inhibitor-Klasse an kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren synthetisiert werden, welche sich durch eine deutliche Steigerung der biochemischen Potenz gegenüber der Akt1^{E17K}-Mutante auszeichnen. Somit ergaben sich zum Ende dieser Arbeit neue Aussichten zur möglichen Kristallisation des Proteins.

Nach Inkubation mit dem neuartigen Inhibitor RL3160, welcher mit einer biochemischen Aktivität (IC₅₀-Wert) von $2,8 \pm 1,2$ nM auf der Akt1^{E17K}-Mutante bis dato die potenteste Verbindung darstellt, wurden erneut *Screening*-Experimente mit dem dephosphorylierten Protein durchgeführt.*† Tatsächlich führte dies in einem Tropfen neben erneuter Sphärolit-Bildung in diversen Bedingungen zum sukzessiven Wachstum feiner Nadelcluster über mehrere Tage bei ausschließlich 20 °C (Abbildung 49B). Die Untersuchung der Anregung unter dem UV-Mikroskop konnte zwar keine eindeutige Tryptophan-Fluoreszenz nachweisen, dies kann jedoch möglicherweise auf die äußerst dünne Morphologie der Nadeln zurückgeführt werden. Auch eine Reproduktion der Bedingungen in initialen *Fine Screens* war nicht erfolgreich, welche jedoch durch Wiederholung unter Variation der verschiedenen Parameter und durch beispielsweise *Seeding* mit den im *Screening* erhaltenen Nadelclustern oder Akt1^{WT}-Kristallen erreicht werden könnte.

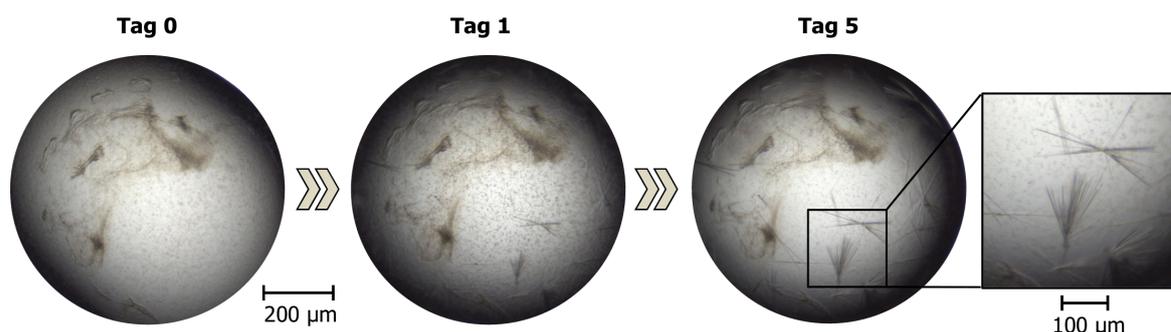


Abbildung 49: *Screening* von Kristallisationsbedingungen mit Akt1^{E17K} im Komplex mit RL3160. Wachstum von Nadelclustern bei 20 °C über mehrere Tage (6,0 mg/mL, 100 mM HEPES, pH 7,0, 20 % (w/v) PEG 6000, 10 mM ZnCl₂).

Zusammenfassend stellen die erhaltenen Nadelcluster von Akt1^{E17K} im Komplex mit RL3160 einen vielversprechenden Ansatz zur Kristallisation der Mutante dar und unterstützen die Hypothese, dass eine signifikante Stabilisierung der inaktiven PH-*in*-Konformation durch die Ligandenbindung vorteilhaft für die Kristallisation der Aktivierungsmutante ist. Nach zahlreichen *Screening*-Experimenten konnten somit aussichtsreiche Kristallisationsbedingungen im Rahmen dieser Arbeit identifiziert werden, welche möglicherweise durch systematische Optimierung zum Wachstum geeigneter Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse der Akt1^{E17K}-Mutante führen.

* Bestimmung des HTRF IC₅₀-Werts von RL3160 auf der Akt1^{E17K}-Mutante durch M. Sc. Lena Quambusch (AG D. Rauh, TU Dortmund).

† Synthese von RL3160 durch M. Sc. Sven Brandherm (AG D. Rauh, TU Dortmund).

3.4.2 Biochemische Evaluierung der Adressierung von Akt1^{E17K}

Neben der Kristallisation der Akt1^{E17K}-Mutante war außerdem die Untersuchung der Adressierung des Proteins mit verschiedenen Akt-Inhibitoren von Interesse. Daher erfolgte sowohl eine biochemische Charakterisierung der inhibitorischen Potenz mittels eines aktivitätsbasierten HTRF-Assays während der Promotion von Dr. Jörn Weisner als auch die Analyse des Einflusses der Ligandenbindung auf die Stabilität des Proteins im Rahmen dieser Arbeit. Dies wurde im Vergleich zum Wildtyp mit Referenzverbindungen und kovalent-allosterischen Inhibitoren analysiert. Um die Proteinstabilität quantifizieren zu können, wurde das vor-inkubierte Protein mit Hilfe eines TSA-Assays vermessen und die Schmelztemperaturen bestimmt (Abbildung 50).

Die Betrachtung der IC₅₀-Werte der Akt1^{E17K}-Inhibition ergibt keinen Potenzverlust für das ATP-kompetitive Capivasertib, sodass diese Verbindung trotz der Mutation in der PH-Domäne weiterhin ein starker Inhibitor der Kinase-Aktivität darstellt.* Dies ist auf den PH-Domänen-unabhängigen Bindungsmodus dieser Inhibitoriklasse zurückzuführen, wobei die katalytische ATP-Bindungstasche adressiert und die aktive Konformation stabilisiert wird, welche ebenso durch die Mutation induziert wird. Zusätzlich wird dies dadurch bestärkt, dass die Ligandenbindung durch Capivasertib keinen Einfluss auf die Stabilität der Mutante (T_m = 54 °C) als auch des Wildtyp-Proteins (T_m = 54 °C) im Vergleich zum Apo-Zustand (jeweils T_m = 54 °C) hat. Im Gegensatz dazu führt die Bindung des allosterischen Inhibitors Miransertib an das Wildtyp-Protein zu einer drastischen Steigerung der Proteinstabilität mit einer Erhöhung der Schmelztemperatur um 13 °C. Die Stabilisierung der inaktiven PH-*in*-Konformation und der damit verbundenen Einschränkung der Flexibilität der PH-Domäne führt somit zu einer insgesamt stabileren Proteinkonformation im Vergleich zur flexiblen PH-*out*-Konformation. Bei der Betrachtung der E17K-Mutante allerdings wird diese Stabilitätssteigerung durch die allosterische Bindung von Miransertib (T_m = 54 °C) aufgehoben, was ebenfalls durch den drastischen Verlust der inhibitorischen Potenz unterstützt wird. Der Verlust der biochemischen Aktivität auf der Mutante wird prinzipiell auch in den IC₅₀-Werten der kovalent-allosterischen Inhibitoren beobachtet. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse des TSA-Assays auch für die E17K-Mutante eine weiterhin bestehende deutliche Stabilisierung der inaktiven PH-*in*-Konformation (T_m = 65 °C) durch die irreversible Bindung von Borussertib. Mit der neuartigen Inhibitoriklasse von kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren, welche im Arbeitskreis entwickelt wurden, konnte dieser Effekt mit der Verbindung RL2788 weiter gesteigert werden, was sich auch in einer erhöhten biochemischen Aktivität äußert.†

Insgesamt verdeutlichen diese Daten die effizientere allosterische Modulation der E17K-Mutante durch die zusätzliche kovalente Adressierung, welche aus einer erhöhten Stabilisierung der inaktiven Konformation resultiert. Insbesondere die innovativen neuartigen CAAs könnten somit vielversprechende Inhibitoren zur effizienten

* Bestimmung der HTRF IC₅₀-Werte auf der Akt1^{E17K}-Mutante durch Dr. Jörn Weisner (AG D. Rauh, TU Dortmund).

† Synthese von RL2788 durch M. Sc. Sven Brandherm (AG D. Rauh, TU Dortmund).

Adressierung der Akt1^{E17K}-Mutante darstellen, wobei der Selektivitätsvorteil der allosterischen Modulation im Vergleich zu ATP-kompetitiven Inhibitoren ausgenutzt wird.

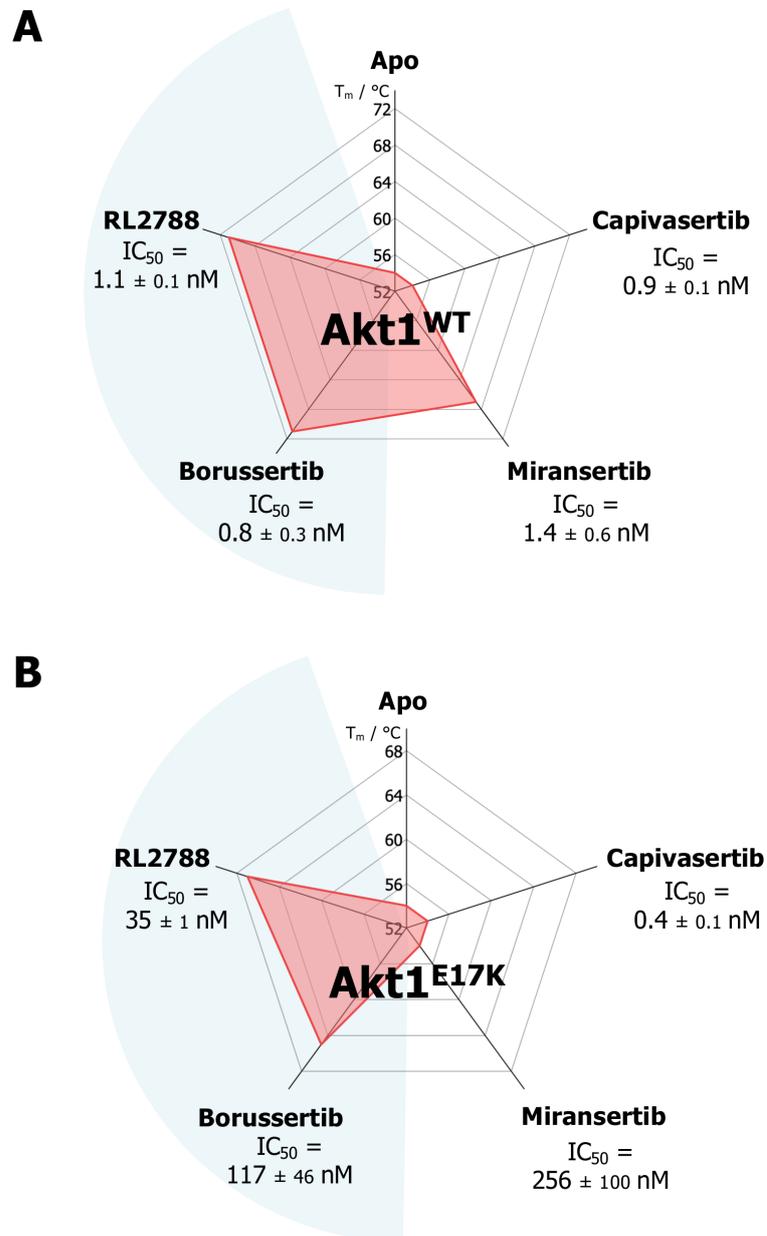


Abbildung 50: TSA-Assay zur Untersuchung der Proteinstabilität nach Ligandenbindung durch verschiedene Akt-Inhibitoren. A: Einfluss auf die Stabilität von Akt1^{WT} mit den jeweiligen Akt1^{WT}-HTRF IC₅₀-Werten. B: Einfluss auf die Stabilität von Akt1^{E17K} mit den jeweiligen Akt1^{E17K}-HTRF IC₅₀-Werten. Die Bindung der CAAs zeigt eine stärkere Stabilisierung der inaktiven PH-*in*-Konformation in der Akt1^{E17K}-Mutante im Vergleich zum allosterischen Inhibitor Miransertib, was sich in einer erhöhten biochemischen Potenz äußert. Die HTRF IC₅₀-Werte wurden durch Dr. Jörn Weisner bestimmt.

3.4.3 Zelluläre Charakterisierung von Akt-Inhibitoren zur Adressierung von Akt1^{E17K}

Die biochemische Steigerung der Effizienz der Akt1^{E17K}-Adressierung durch kovalent-allosterische Inhibitoren im Vergleich zu allosterischen Modulatoren sollte im Rahmen dieser Arbeit weitergehend in komplexeren zellulären Modellsystem validiert werden. Mit der KU-19-19 Zelllinie stand zwar eine Zelllinie, welche die Akt1^{E17K}-Mutation aufweist, zur Verfügung, diese zeigt jedoch aufgrund einer zusätzliche NRAS^{Q61R}-Mutation keine onkogene Abhängigkeit vom PI3K/Akt-Signalweg. Daher ist eine Analyse des Einflusses einer Akt-Inhibition auf die Zellproliferation mit dieser Zelllinie nicht aussagekräftig. Da alternative kommerzielle Krebszelllinien, welche eine onkogene Abhängigkeit von der E17K-Mutante aufweisen, nicht zur Verfügung standen, sollte mit den murinen Ba/F3-Zellen ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses der Akt1^{E17K}-Inhibition auf die Zellproliferation generiert werden.

3.4.3.1 Exkurs: Retrovirale Transduktion zur Generierung von Ba/F3-Modellsystemen

Die rasche experimentelle Untersuchung neuartig identifizierter Mutationen eines Proteins zur Evaluierung der Relevanz und einer möglichen Adressierung ist im Zeitalter der personalisierten Medizin von größter Bedeutung für die Identifizierung eines potentiellen Therapieansatzes. Ein dafür prominentes zelluläres Modellsystem basiert auf der murinen pro-B-Zelllinie Ba/F3, deren Überlebens- und Proliferationssignale von der exogenen Zufuhr des Wachstumsfaktors Interleukin-3 (IL-3) abhängig sind.²²¹ Insbesondere die hohe Proliferationsrate und die einfache Einbringung von Transgenen (GoI, engl. *gene of interest*) durch beispielsweise retrovirale Transduktion macht diese Zelllinie besonders attraktiv für die Erforschung diverser klinisch relevanter Mutanten. Dabei wird die IL-3-abhängige Proliferation der Ba/F3-Zellen ausgenutzt, welche den Entzug des Wachstumsfaktors nicht überleben. Durch die Integration dominanter Onkogene über retrovirale Transduktion kann jedoch die Abhängigkeit des Zellüberlebens vom IL-3-induzierten Signalweg auf das konstitutive Proliferationssignal der Treibermutation transferiert werden, sodass eine onkogene Abhängigkeit der Ba/F3-Zellen vom Transgen erreicht werden kann (Abbildung 51). Im Feld der Kinase-Forschung konnte dieses System bereits für eine Vielzahl von Onkogenen, wie beispielsweise der Bcr-Abl-Kinase, c-Kit oder EGFR, etabliert werden.²²²

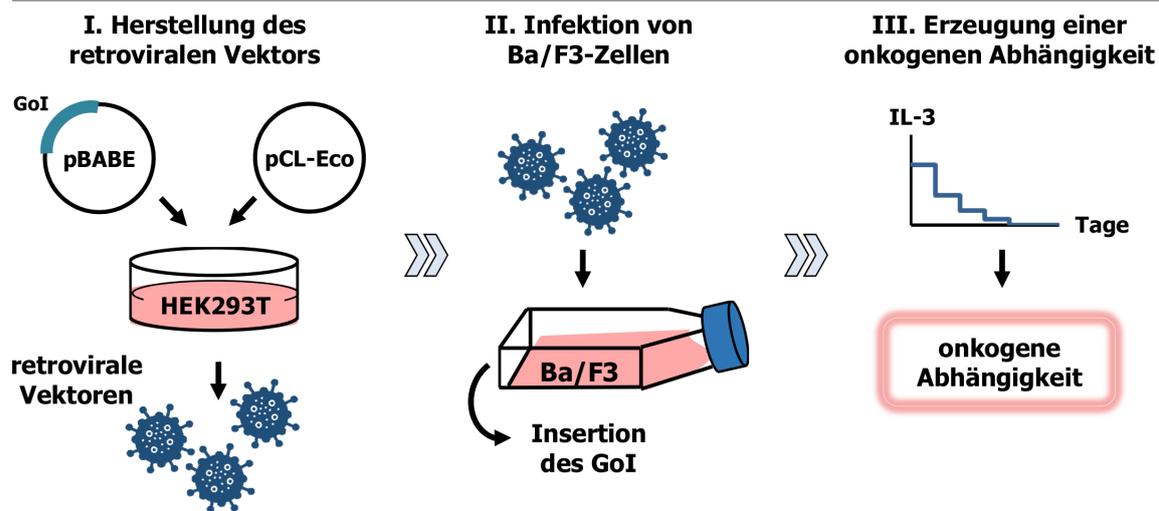


Abbildung 51: Schematische Darstellung der retroviralen Transduktion von murinen Ba/F3-Zellen zur Darstellung einer onkogenen Abhängigkeit. Durch Co-Transfektion eines Transfer- (pBABE) und Verpackungsplasmids (pCL-Eco) in HEK293T-Zellen werden retrovirale Vektoren generiert, welche das Transgen (GoI, engl. *gene of interest*) durch Infektion von Ba/F3-Zellen in das Wirtsgenom integrieren. Durch sukzessiven Entzug des Wachstumsfaktors IL-3 wird eine onkogene Abhängigkeit der Ba/F3-Zellen vom Transgen erzeugt.

Durch die Transduktion der Ba/F3-Zellen über retrovirale Vektoren, welche auf dem Genom des murinen Leukämie-Virus (MLV) basieren, kann eine stabile Integration eines Transgens in das Wirtsgenom während der Zellteilung erreicht werden.²²³ Die Herstellung des viralen Vektors kann dabei unter anderem durch die Co-Transfektion eines Transferplasmids, wie beispielsweise dem pBABE-Vektor, und eines Verpackungsplasmids in HEK293T-Zellen erfolgen.²²⁴ Das Transferplasmid enthält sowohl die Sequenz des einzubringenden Transgens, als auch verschiedene regulatorische Elemente für die Integration und Expression in der Wirtszelle. Außerdem vermittelt der pBABE-Vektor eine Puromycin-Resistenz, die eine Selektion der infizierten Ba/F3-Zellen ermöglicht.²²⁴ Das Verpackungsplasmid enthält die viralen Genombereiche *gag*, *pol* und *env*, welche die genetischen Informationen für die essentiellen viralen Strukturproteine der Matrix und des Kapsids (*gag*), der für die Integration notwendigen Protease, Reversen Transkriptase und der Integrase (*pol*) sowie der viralen Hüllproteine (*env*) codieren.²²⁵ Die Co-Transfektion dieser Plasmide in der einfach zu transfizierenden humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293T führt somit zur Generierung virusähnlicher Partikel, den sogenannten retroviralen Vektoren.²²⁶ Diese retroviralen Vektoren können anschließend zur Infektion der Ba/F3-Zellen verwendet werden, wobei die virale RNA durch die reverse Transkriptase zunächst in doppelsträngige DNA transkribiert wird. Während der Zellteilung kann diese an einen zufälligen Integrationsort im Wirtsgenom eingebracht werden, sodass theoretisch eine stabile Expression des Transgens über die vollständige Lebensdauer der Ba/F3-Zellen erfolgen kann.²²⁷ Die IL-3-unabhängige Proliferation der Ba/F3-Zellen, deren Wachstum stattdessen vom Überlebenssignal des eingebrachten Onkogens abhängig ist, kann ein leistungsfähiges Werkzeug zur Untersuchung der Sensitivität der Zellen gegenüber verschiedenen Wirkstoffen darstellen.

Dies ermöglicht die Entwicklung neuartiger Therapieansätze, sodass das Ba/F3-System daher ein beliebtes Modellsystem in der Medizinischen Chemie darstellt.

3.4.3.2 Etablierung des murinen Ba/F3-Systems zur Darstellung der onkogenen Abhängigkeit von Akt1^{E17K}

Für die Produktion des endogenen Retrovirus in HEK293T-Zellen und anschließender Infektion der murinen Ba/F3-Zellen wurde ein kommerziell erhältlicher pBABE-Vektor (Addgene) verwendet, welcher bereits das Akt1 Wildtyp-Gen und eine Puromycin-Resistenz als Selektionsmarker enthielt.²²⁴ Durch ortsgerichtete Mutagenese wurde in diesen Vektor die E17K-Mutation eingebracht. Weiterhin sollte eine Ba/F3-Zelllinie generiert werden, welche eine Abhängigkeit vom Signal des Akt1-Wildtyps zeigt, wofür die Kinase mit einem N-terminalen Myristoyl-Tag versehen wurde. Dies führt zu einer dauerhaften Lokalisation an der Plasmamembran und einer damit verbundenen konstitutiven Aktivität des Proteins. Das Akt1-Gen aus dem kommerziell erhaltenen pBABE-Vektor wurde daher in einen anderen pBABE-Vektor subkloniert, welcher den Myristoyl-Tag bereits enthielt. Die generierten pBABE-Vektoren dienten als Transferplasmide zur Einbringung des Akt1-Gens in das virale Genom, wobei die weiteren genetischen Informationen über das Verpackungsplasmid pCL-Eco vermittelt wurden.²²⁵ Diese beiden Plasmide wurden über das TransIT-LT1 Transfektionsreagenz (Mirus Bio LLC) in HEK293T-Zellen eingebracht und die Zellen für 72 Stunden kultiviert. Der so produzierte ecotrope Retrovirus wurde isoliert und die Ba/F3-Zellen direkt infiziert, wobei jedoch keine Bestimmung des Virustiters erfolgte. Die Infektion der Ba/F3-Zellen wird im Folgenden am Beispiel der Integration der Akt1^{E17K}-Mutante beschrieben.

Eine Verfolgung der Zellzahlen nach 48-stündiger Infektion zeigte eine Stagnation der Proliferation, während für die nicht-infizierten, parental Zellen in diesem Zeitraum ein starkes Wachstum beobachtet werden konnte (Abbildung 52A). Die anschließende Selektion der infizierten Zellen mit Puromycin, welche nach erfolgreicher Infektion eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum aufweisen, führt zu einer leichten Reduktion der Zellzahl nach 48 Stunden, während parentale Zellen die Kultivierung mit Puromycin nicht überleben. Dies lässt auf eine hohe Infektionsrate und somit erfolgreiche Transduktion eines signifikanten Anteils an Ba/F3-Zellen schließen. Nach 5-tägiger Selektion konnte zudem eine Verdopplung der Zellzahl und gesteigerte Viabilität beobachtet werden, wodurch eine Erholung der Zellen von der Infektion deutlich wird.

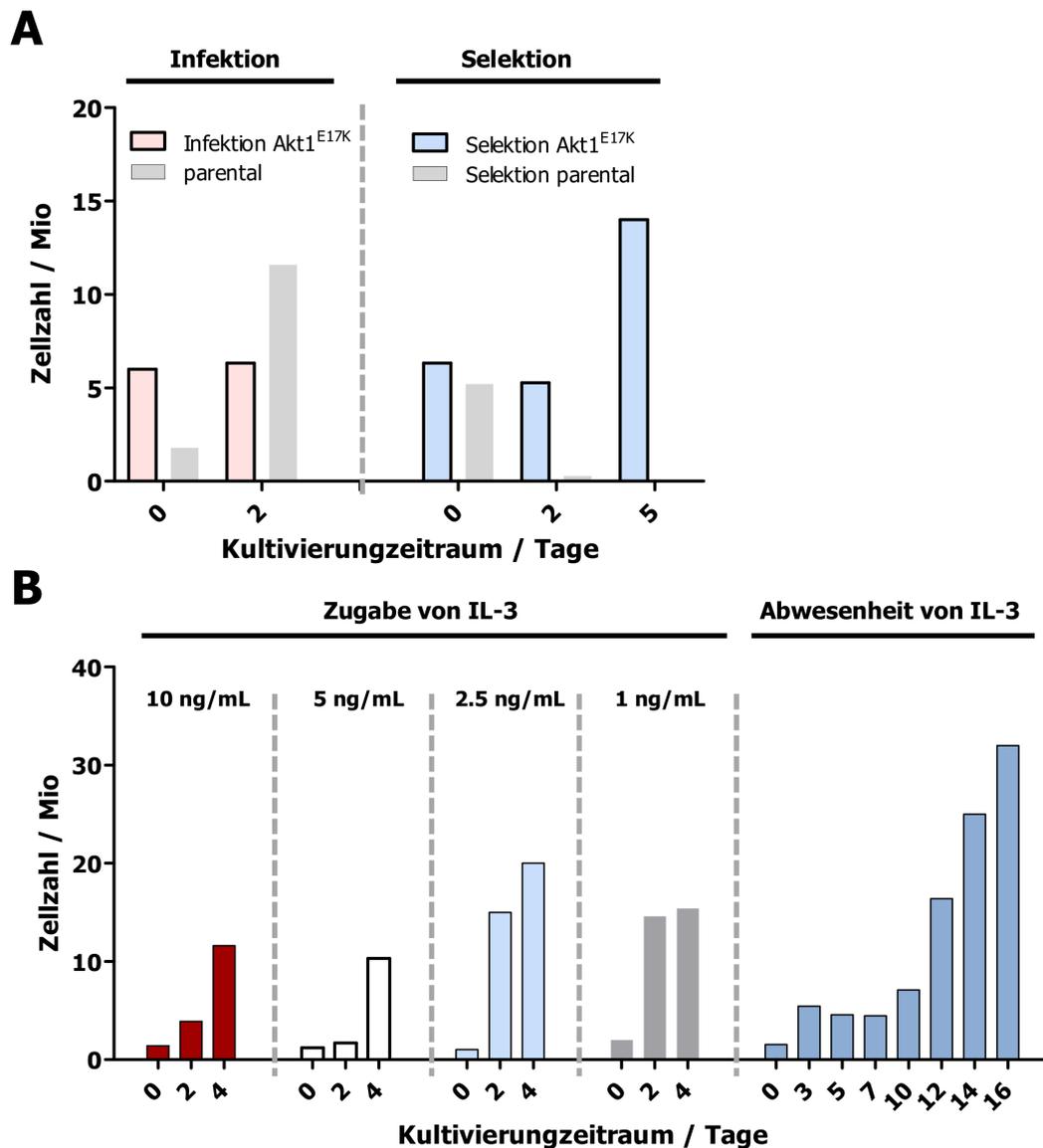


Abbildung 52: Wachstumsverhalten transduzierter Ba/F3-Zellen mit dem Transgen Akt1^{E17K}. A: Zellzahlen viabler Zellen nach Infektion mit dem Retrovirus und Selektion mit Puromycin. Die Zellzahlen der infizierten Ba/F3-Zellen bleiben relativ stabil. B: Zellzahlen der infizierten Ba/F3 Akt1^{E17K}-Zellen während des sukzessiven IL-3-Entzugs. Nach jeweils 2 Tagen (Tag 2) wurde die Zellzahl bestimmt und anschließend eine Subkultivierung in einem Verhältnis von 1:10 durchgeführt. Nach weiteren 2 Tagen (Tag 4) wurde erneut die Zellzahl bestimmt. Das Zellwachstum erholt sich innerhalb weniger Tage nach Reduktion von IL-3.

Um die initiale IL-3-bedingte Abhängigkeit der Proliferation auf eine Abhängigkeit von dem durch die Akt1^{E17K}-Mutante resultierenden Proliferationsignal zu transferieren, wurde die Methode der sukzessiven Reduktion der IL-3-Konzentration während der Kultivierung gewählt. Eine Kultivierung der parentalen Zelllinie führt unter vollständiger Abwesenheit von IL-3 zu einem radikalen Verlust der Überlebensfähigkeit, sodass bei fortwährender Proliferation der infizierten Zellen von einer Abhängigkeit von dem eingebrachten Onkogen ausgegangen werden kann. Nach anfänglicher Kultivierung mit 10 ng/mL, wurde die IL-3-Konzentration nach jeweils viertägiger Kultivierung auf 5, 2,5 und 1 ng/mL reduziert sowie anschließend vollständig entfernt. Insgesamt zeigte das Wachstumsverhalten während der Kultivierung mit der jeweiligen IL-3-Konzentration einen raschen Anstieg der Zellzahl

(Abbildung 52B). Unter vollständiger Abwesenheit von IL-3 konnte jedoch zunächst eine Stagnation der Proliferation über mehrere Tage verzeichnet werden. Dies kann möglicherweise auf einen nicht ausreichend hohen Selektionsdruck während der langwierigen Entzugsphase mit IL-3 zurückgeführt werden. Durch die ständige Anwesenheit des Wachstumsfaktors könnte eine Subpopulation entstanden sein, welche keine signifikante Abhängigkeit der Proliferation von dem eingebrachten Onkogen aufweist. Die Aufrechterhaltung dieser eher parentalen Eigenschaften kann sich jedoch unter Abwesenheit von IL-3 nicht durchsetzen, sodass ausschließlich die vom onkogenen Signal abhängigen Ba/F3-Zellen proliferieren können. Dies äußert sich ebenfalls in der deutlichen Steigerung des Wachstums nach ca. 10-tägiger Kultivierung ohne den initialen Wachstumsfaktor IL-3. Eine Möglichkeit, um die anfängliche Stagnation durch die unzureichende Abhängigkeit der Proliferation vom onkogenen Signal zu verhindern, könnte eine Verkürzung der IL-3-Entzugsphase liefern.²²⁸

Insgesamt deutet das langfristig stabile Wachstum der infizierten Ba/F3-Zellen eine erfolgreiche Transduktion mit dem Akt1^{E17K}-Gen und dem Erreichen einer durch das onkogene Signal-bedingten Proliferation hin. Um die Einbringung des Zielproteins und dessen Auswirkung auf die Signalweiterleitung zu untersuchen, wurden intrazelluläre Veränderungen im Vergleich zur parentalen Zelllinie mit Hilfe von Western Blots analysiert (Abbildung 53A). Die Verwendung eines Akt^{E17K}-spezifischen Antikörpers konnte die Präsenz der Akt-Mutante in lediglich der transduzierten Ba/F3 Akt1^{E17K}-Zelllinie nachweisen, sodass die Einbringung des Zielgens erfolgreich war. Die weitere Betrachtung der Akt-Aktivität zeigt zudem eine Phosphorylierung von Akt an der Aktivierungsstelle Ser473, welche in der parentalen Zelllinie ausbleibt und somit dem Einfluss der eingebrachten E17K-Aktivierungsmutante zugeordnet werden kann. Zusätzlich deutet eine verstärkte Phosphorylierung des Proteins PRAS40 auf die Aktivierung nachgeschalteter Signalwege hin. Das Ribosomale Protein S6 dagegen, welches an der Regulation der Zellproliferation beteiligt ist, zeigt im Vergleich zur parentalen Zelllinie eine schwächere Phosphorylierung in den IL-3-unabhängigen Ba/F3 Akt1^{E17K}-Zellen.²²⁹ Möglicherweise kann dies auf eine IL-3-induzierte erhöhte Erk1/2-Aktivität in den parentalen Ba/F3-Zellen zurückgeführt werden, welches ebenso die Aktivierung des Proteins S6 kontrolliert.¹⁶⁴ Die Ba/F3-Zellen, welche mit dem myristoylierten Wildtyp-Protein transduziert wurden, zeigen insgesamt die gleichen Effekte wie die Ba/F3 Akt1^{E17K}-Zellen, wobei jedoch prinzipiell eine stärkere Aktivierung von Akt und den nachgeschalteten Proteinen beobachtet werden kann.

Um einen Hinweis auf eine onkogene Abhängigkeit von der Akt1^{E17K}-Mutation zu erlangen, wurde zudem eine Inhibition des Akt-Signals durch 4-stündige Inkubation der transduzierten Zellen mit dem kovalent-allosterischen Akt-Inhibitor Borussertib untersucht (Abbildung 53B). Die Behandlung der Zellen mit Borussertib führt zu einer erwarteten vollständigen Reduktion der Akt-Aktivität und Inhibition der nachgeschalteten Signalwege. Besonders interessant ist zudem das erhöhte Level des gespaltenen PARP-Proteins (cPARP), was eine Induktion der Apoptose nach Borussertib-Behandlung und dessen anti-proliferative Aktivität verdeutlicht.

Neben der beobachteten IL-3-Wachstumsfaktor-unabhängigen Proliferation führte dies zu der initialen Annahme einer onkogenen Abhängigkeit der Zelllinie vom Akt1^{E17K}-Signal, was im Rahmen des CellTiter-Glo Assays (Promega) weiter validiert werden sollte.

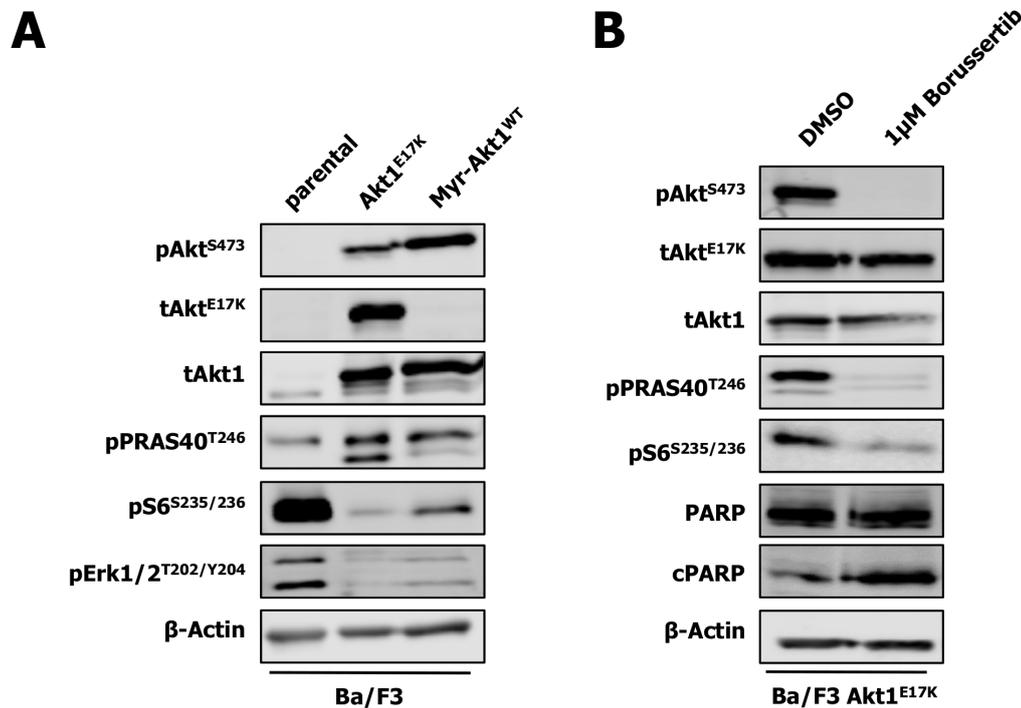


Abbildung 53: Western Blot Analysen der transduzierten Zelllinie Ba/F3 Akt1^{E17K}. A: Vergleich der intrazellulären Einflüsse durch Einbringung von Akt1^{E17K} und myristoyliertem Akt1^{WT} im Vergleich zur parentalen Zelllinie. Sowohl die erfolgreiche Insertion des Zielgens als auch die Aktivierung des Proteins und nachgeschalteter Signalwege konnte nachgewiesen werden. B: Untersuchung der onkogenen Abhängigkeit durch Inhibition mit 1 µM Borussertib für 4 Stunden führt zur Inhibition des Akt-Signals und Induktion der Apoptose.

Mit dem verwendeten Protokoll konnte insgesamt ein murines Ba/F3-Modellsystem zur Darstellung der onkogenen Abhängigkeit von der Akt1^{E17K}-Mutante generiert werden. Dies ermöglicht eine Charakterisierung von verschiedenen Verbindungen hinsichtlich ihrer anti-proliferativen Aktivität im Rahmen des CTG-Assays. Somit kann eine Untersuchung einer möglichen effizienten Adressierung der onkogenen Aktivierungsmutation Akt1^{E17K} durch kovalent-allosterische Inhibitoren erfolgen.

3.4.3.3 Zelluläre Charakterisierung von Akt-Inhibitoren im Ba/F3 Akt1^{E17K}-Modellsystem

Für die Vermessung verschiedener Verbindungen im Rahmen des CTG-Assays (Promega) wurde zunächst eine Zellzahl festgelegt, welche im linearen Bereich der Lumineszenz-Intensität liegt, um eine Proportionalität zur Viabilität zu erreichen (Kapitel 6.7, Abbildung 67). Anschließend wurden Dosis-Wirkungskurven mit den Ba/F3 Akt1^{E17K} zur zellulären Charakterisierung verschiedener Referenzverbindungen und kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren aufgenommen und die jeweiligen EC₅₀-Werte bestimmt (Tabelle 3-5).

Adressierung der Akt1^{E17K}-Mutante durch kovalent-allosterische Akt-Inhibitoren

Tabelle 3-5: Bestimmung der EC₅₀-Werte verschiedener Referenzverbindungen und kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren in der Ba/F3 Akt1^{E17K}-Zelllinie.

		Akt1^{E17K} HTRF IC₅₀ / nM*	Ba/F3 Akt1^{E17K} CTG EC₅₀ / nM
Inhibitor			
ATP-kompetitive Akt-Inhibitoren	Capivasertib	0,9 ± 0,1	290 ± 103
	Ipatasertib	1,5 ± 0,7	191 ± 57
Allosterische Akt-Inhibitoren	MK-2206	4800 ± 1800	254 ± 81
	Miransertib	256 ± 100	103 ± 23
	Borussertib	117 ± 46	46 ± 9
CAAIs	RL1782	840 ± 226	274 ± 13 ^a
	RL2788	35 ± 1,0	22 ± 6
	RL3159	3,5 ± 1,1	19 ± 7
	RL3160	2,8 ± 1,2	14 ± 5
	PI3K-Inhibitor	Pictilisib	n.b.
MEK-Inhibitor	Trametinib	n.b.	> 30000 ± 0

^a Zweifach-Messung; n.b. nicht bestimmt.

Insgesamt zeigt die Ba/F3 Akt1^{E17K}-Zelllinie eine ausgesprochene Sensitivität gegenüber einer Akt-Inhibition mit den verschiedenen Verbindungen. Im Gegensatz dazu weist die Zelllinie gegenüber Inhibitoren, welche nicht den PI3K/Akt-Signalweg adressieren, wie beispielsweise dem MEK-Inhibitor Trametinib, einen deutlichen Sensitivitätsverlust auf. Dies bestärkt die Annahme der onkogenen Abhängigkeit der Zelllinie vom überaktivierten Akt-Signal. Weiterhin führt eine Inhibition der Akt-vorgeschalteten Kinase PI3K durch den Inhibitor Pictilisib²³⁰ nur zu einer moderaten Inhibition der Zellproliferation, was die konstitutive Signalweiterleitung durch die E17K-Mutation in Akt zusätzlich unterstreicht. Durch Kontrollexperimente mit der parentalen Ba/F3-Zelllinie, in welcher keine signifikanten anti-proliferativen Effekte der Akt-Inhibitoren beobachtet werden konnten, konnte außerdem die spezifische Inhibition des Zielproteins und somit vermutlich keine generellen zytotoxischen Effekte der Inhibitoren in den Ba/F3-Zellen verdeutlicht werden.

* Bestimmung der HTRF IC₅₀-Werte durch Dr. Jörn Weisner und M. Sc. Lena Quambusch (AG D. Rauh, TU Dortmund).

(Kapitel 6.7.2, Tabelle 6-10). Die Resultate unterstreichen demnach die Anwendbarkeit dieses artifizialen Zellmodells für die Charakterisierung der Akt-Inhibitoren hinsichtlich der Adressierung von Akt1^{E17K}.

Interessanterweise führt die ATP-kompetitive Inhibition mit Capivasertib und Ipatasertib in den Ba/F3 Akt1^{E17K}-Zellen zu eher moderaten anti-proliferativen Aktivitäten, welche jedoch im biochemischen Kontext durch äußerst potente Inhibition der isolierten Mutante herausstechen. Eine mögliche Erklärung dieses Potenzverlusts im zellulären Modellsystem könnte die von VIVANCO *et al.* beschriebene fehlende Inhibition der nicht-katalytischen Funktionen von Akt liefern.¹⁶⁰ Durch die Aufrechterhaltung der aktiven PH-*out*-Konformation durch Ligandenbindung ATP-kompetitiver Inhibitoren, wird zwar die durch Phosphorylierungen-bedingte Signalweiterleitung unterdrückt, jedoch bleiben die bisher nicht vollständig aufgeklärten konformations-abhängigen Funktionen von Akt bestehen, sodass weiterhin ein Überlebenssignal übermittelt wird. Da die in Zellen bestehenden komplexen Interaktome im biochemischen Assay nicht präsent sind, ist der verwendete HTRF-Assay nicht prädiktiv für die tatsächliche inhibitorische Aktivität ATP-kompetitiver Akt-Inhibitoren im zellulären Kontext. Dies unterstützt zudem die Relevanz eines zellulären Modellsystems zur validen Untersuchung einer Akt-Adressierung, welches im Rahmen dieser Arbeit durch die Generierung der Ba/F3 Akt1^{E17K}-Mutante etabliert werden konnte.

Die zellulären Potenzen der allosterischen Referenzinhibitoren MK-2206 und Miransertib weisen im Vergleich zu den ATP-kompetitiven Inhibitoren keine signifikante Steigerung auf. Die kovalent-allosterischen Inhibitoren dagegen erreichen mit EC₅₀-Werten im unteren nanomolaren Bereich signifikante anti-proliferative Aktivitäten in der Ba/F3 Akt1^{E17K}-Zelllinie. Insgesamt kann eine gute Korrelation der gemessenen EC₅₀-Werte mit den biochemischen Potenzen für die allosterischen und kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren beobachtet werden. Aufgrund der stabilisierten inaktiven PH-*in*-Konformation werden zellulär sowohl aktivitäts- als auch konformations-abhängige Signale gehemmt, sodass der biochemische Assay als prädiktiv für die Zellantworten allosterischer Akt-Inhibitoren betrachtet werden kann. Insbesondere die neuartigen kovalent-allosterischen Inhibitoren RL2788, RL3159 und RL3160 können eine starke Inhibition der Proliferation erreichen. Dies steht ebenso im Einklang mit der biochemischen Aktivität und den im TSA-Assay bereits gezeigten gesteigerten Stabilisierung der inaktiven PH-*in*-Konformation durch Bindung der kovalenten CAAs im Vergleich zum allosterischen Inhibitor Miransertib. Um die Überlegenheit der kovalent-allosterischen Inhibitoren zudem intrazellulär zu validieren, wurden weiterhin die *in vitro* pharmakodynamischen Einflüsse in der Ba/F3 Akt1^{E17K}-Zelllinie untersucht (Abbildung 54).

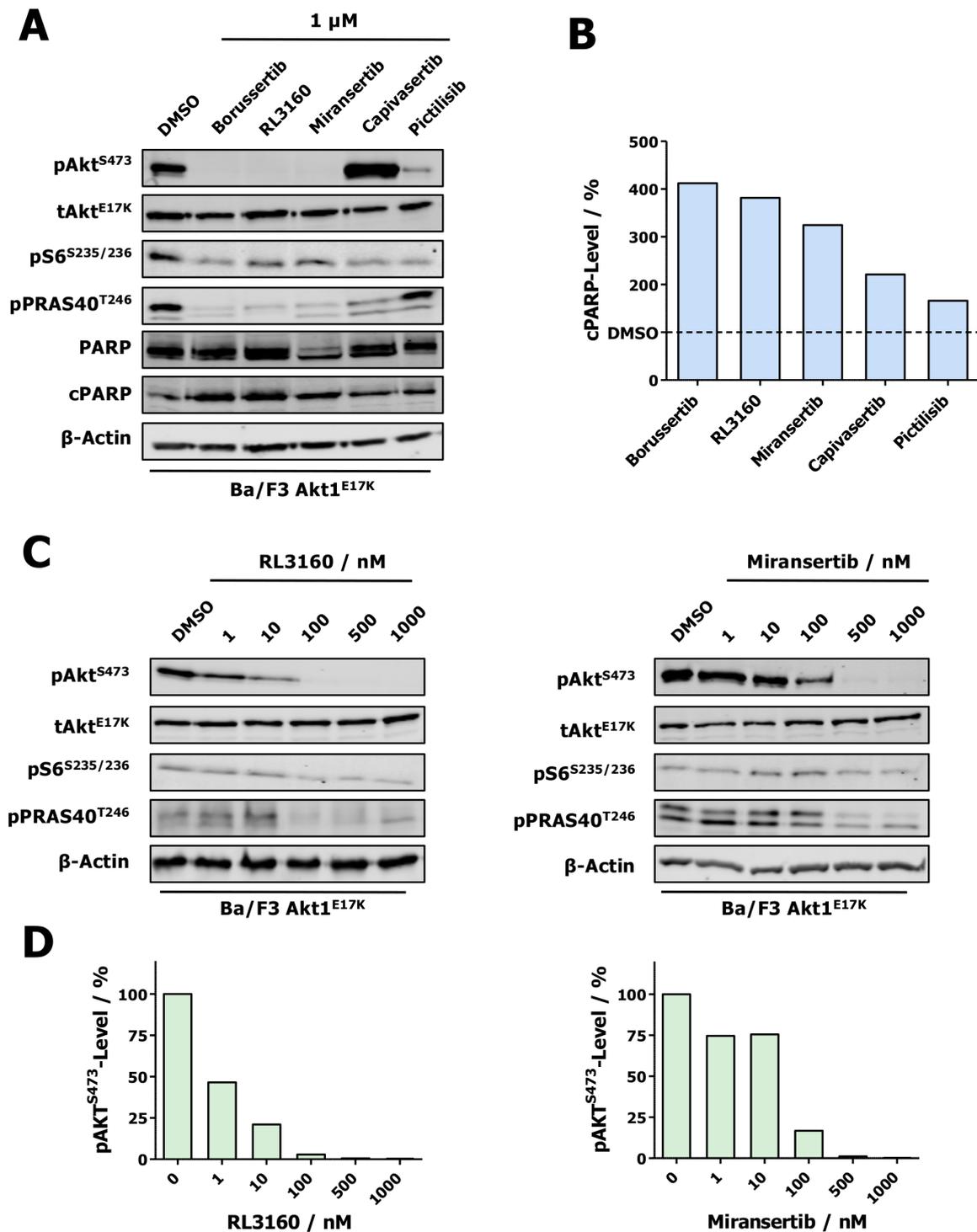


Abbildung 54: *In vitro* pharmakodynamische Einflüsse der verschiedenen Akt-Inhibitoren in Ba/F3 Akt1^{E17K}-Zellen nach 4-stündiger Behandlung. A: Vergleich von jeweils 1 μ M der Inhibitoren. B: Quantifizierung des Levels an gespaltenem PARP-Protein (cPARP). C: Dosis-abhängige Inhibition mit dem CAAI RL3160 und dem allosterischen Inhibitor Miransertib. D: Quantifizierung der pAKT^{S473}-Level nach Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren. Durch die CAAIs wird eine effektivere intrazelluläre Akt-Inhibition und Apoptose-Induktion im Vergleich mit den gezeigten Inhibitoren erreicht. Für die Quantifizierung der Western Blots wurde die Software Image Studio Lite (LI-COR Biosciences) verwendet. Die Intensitäten der jeweiligen Banden wurden dabei zunächst auf das *housekeeping*-Protein β -Actin derselben Bahn und anschließend auf die DMSO-Kontrolle normalisiert. Aufgrund lediglich einmaliger Durchführung der Western Blot-Analysen konnten keine Standardabweichungen angegeben werden.

Eine allosterische und kovalent-allosterische Inhibition zeigt eine deutliche Hemmung des pAKT^{S473}-Signals und der Phosphorylierung der Akt-Substrate S6 und PRAS40, während die ATP-kompetitive Verbindung Capivasertib eine durch dessen Wirkungsmechanismus bekannte Hyperphosphorylierung von Akt hervorruft (Abbildung 54A). Durch die konstitutive Lokalisation von Akt an der Plasmamembran in der aktiven PH-*out*-Konformation, welche durch die ATP-kompetitiven Inhibitoren stabilisiert wird, kann die Dephosphorylierung der Aktivierungsstellen durch PP2A und PHLPP1 aufgrund eingeschränkter Zugänglichkeit nicht erfolgen.²³¹ Zudem wird ein verminderter Effekt von Capivasertib auf die Akt-nachgeschalteten Proteine, wie PRAS40, deutlich. Erwartungsgemäß weist auch der PI3K-Inhibitor Pictilisib lediglich eine moderate Inhibition des Akt-Signals auf, was im Einklang mit der geringen zellulären Potenz im Viabilitätsassay steht. Insbesondere die Betrachtung der Apoptose-Induktion verdeutlicht jedoch die Effizienz der (kovalent-)allosterischen Inhibition, da im Vergleich mit Capivasertib und Pictilisib deutlich erhöhte Level an gespaltenem PARP-Protein für Borussertib, RL3160 und Miransertib vorliegen (Abbildung 54B). Die kovalente Adressierung verstärkt den proapoptischen Effekt zudem, was sich ebenfalls in der erhöhten anti-proliferativen Aktivität der CAAs im Viabilitätsassay widerspiegelt. Um die Überlegenheit der CAAs gegenüber den allosterischen Akt-Inhibitoren weiter aufzulösen, wurden außerdem dosis-abhängige Einflüsse von RL3160 und Miransertib auf die *in vitro*-Pharmakodynamik in den Ba/F3 Akt1^{E17K}-Zellen untersucht (Abbildung 54C). Die Betrachtung des Akt-Phosphorylierungslevels zeigt dabei eine verminderte Inhibition der Akt-Aktivität durch den allosterischen Akt-Inhibitor Miransertib im Vergleich zu RL3160 (Abbildung 54D). Zudem werden gesteigerte Effekte auf die Reduktion der PRAS40-Phosphorylierung durch RL3160 deutlich. Insgesamt bestärken die Western Blot-Analysen somit die bereits im Viabilitätsassay erwiesene zelluläre Effizienz der CAAs, wobei insbesondere die neuartige Inhibitorklasse von kovalent-allosterischen Inhibitoren, vor allem mit der Verbindung RL3160, einen vielversprechenden Ansatz zur Adressierung der onkogenen Akt1^{E17K}-Mutante darstellen könnten.

3.4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die strukturbasierte Entwicklung von Inhibitoren, welche die onkogene Akt1^{E17K}-Mutante adressieren, erfordert detaillierte Einblicke in den Einfluss dieser Mutation auf die Proteinkonformation sowie das veränderte Interaktionsprofil mit den verschiedenen Akt-Inhibitoren. Die Erhaltung einer Kristallstruktur dieser Mutante ist daher von größter Relevanz. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Expressions- und Reinigungsprotokoll etabliert werden, welches zur Isolierung des Proteins in hohen Ausbeuten und ordentlicher Reinheit führt. Im Vergleich zum Wildtyp-Protein erwies sich dabei ein verändertes Muster an Phosphorylierungen, welche aus der Expression in Sf9-Zellen resultieren. Die zahlreichen anschließenden Kristallisationsansätze, sowohl unter Verwendung der phosphorylierten als auch dephosphorylierten Proteinlösung, führten zunächst lediglich zum Wachstum von Sphäroliten. Nach Variation verschiedenster Parameter und durch die Durchführung mehrerer Optimierungsexperimente konnten allerdings keine Kristallformen erzeugt werden, welche für Röntgenbeugungsexperimente geeignet sind. Die Co-Inkubation mit dem Inhibitor RL3160, ein neuartiger kovalent-allosterischen Inhibitor mit hoher biochemischer Aktivität auf der Akt1^{E17K}-Mutante, führte jedoch durch erneute *Screening*-Experimente zum Wachstum von Nadelclustern. Somit konnten letztlich vielversprechende Kristallisationsbedingungen identifiziert werden, deren Optimierung möglicherweise zu Kristallen führen könnte, die die erstmalige Strukturbestimmung der Akt1^{E17K}-Mutante ermöglichen. Dabei könnten beispielsweise *Seeding*-Experimente oder *Additiv-Screenings* zielführend sein.

Die biochemische Charakterisierung der Akt1^{E17K}-Adressierung durch verschiedene Akt-Inhibitoren im Rahmen eines TSA-Assays verdeutlichte außerdem eine effizientere allosterische Inhibition durch die zusätzliche kovalente Adressierung, welche sich in einer erhöhten Stabilisierung der inaktiven PH-*in*-Konformation durch die CAAs im Vergleich zu Miransertib äußerte. Weitere Möglichkeiten zur Untersuchung einer veränderten Proteindynamik der Akt1^{E17K}-Mutante im Vergleich zum Wildtyp könnten beispielsweise die Wasserstoff-Deuterium-Austausch-Massenspektrometrie (HDX-MS, engl. *hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry*) oder die Elektronenspinresonanz (EPR)-Spektroskopie liefern, wobei letztere bereits im Arbeitskreis im Rahmen eines Kooperationsprojekts realisiert wird.* Diese Experimente ermöglichen zudem die Validierung der unterschiedlichen Stabilisierung der inaktiven Proteinkonformation durch die Bindung der verschiedenen Akt-Inhibitoren.

Um diese Beobachtung auch im zellulären Kontext zu validieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Ba/F3-Modellsystem etabliert, in welches die Akt1^{E17K}-Mutante durch retrovirale Transduktion eingebracht und eine onkogene Abhängigkeit vom Akt-Signal induziert wurde. Die Charakterisierung dieser Zelllinie erwies die Anwendbarkeit zur Evaluierung der anti-proliferativen Aktivitäten verschiedener Inhibitoren. Dabei konnte insbesondere das Defizit ATP-kompetitiver Akt-Inhibitoren bezüglich einer effizienten zellulären Aktivität

* EPR-Messungen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Drescher (Universität Konstanz).

nachgewiesen werden, welche auf die fehlende Inhibition nicht-katalytischer Funktionen zurückgeführt werden kann. Auch allosterische Referenzinhibitoren wiesen eine eher moderate zelluläre Potenz auf, während die kovalent-allosterischen Inhibitoren deutliche anti-proliferative Aktivitäten mit EC_{50} -Werten im unteren nanomolaren Bereich erzielen. Diese Ergebnisse konnten zusätzlich durch die Betrachtung der *in vitro* pharmakodynamischen Einflüsse bestätigt und die spezifische *on-target*-Inhibition gezeigt werden.

Insgesamt stellen die kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren aufgrund der gesteigerten inhibitorischen Aktivität im Vergleich zur allosterischen Verbindung Miransertib einen äußerst vielversprechenden Ansatz zur effizienten Adressierung der aktivierenden Akt1^{E17K}-Mutante dar. Darüber hinaus unterstreicht die zusätzliche Inhibition der nicht-katalytischen Funktionen im Gegensatz zu den ATP-kompetitiven Inhibitoren, welche lediglich die katalytische Aktivität inhibieren, das Potential der CAAs. Insbesondere die neuartige Inhibitorklasse der CAAs könnte dabei effiziente Modulatoren im Rahmen weiterführender *in vivo*-Experimente, wie beispielweise in Xenograft-Modellen mit der hier etablierten Ba/F3 Akt1^{E17K}-Zelllinie, liefern.

3.5 Kristallisation von c-Kit und PDGFR α

Gastrointestinale Stromatumoren (GIST) stellen die häufigsten Sarkom-Erkrankungen des gastrointestinalen Trakts dar und sind häufig mit Metastasen-Bildung verbunden. In 85 % der Fälle ist die Entstehung dieser Tumore auf genetische Läsionen in der Rezeptortyrosinkinase c-Kit sowie mit 8 %-iger Häufigkeit auf Mutationen in PDGFR α zurückzuführen, sodass diese Kinasen attraktive Zielproteine für einen personalisierten Therapieansatz darstellen.^{35,232} Dies wird insbesondere dadurch unterstützt, dass klassische Behandlungsmethoden, wie die Strahlen- und Chemotherapie, für metastasierende GIST-Tumore ineffektiv sind.²³³ Im Gegensatz dazu führte die zielgerichtete Krebstherapie mit spezifischen c-Kit- und PDGFR α -Inhibitoren, wie beispielsweise den Typ II-Kinaseinhibitoren Imatinib und Sunitinib, zu einem Durchbruch des klinischen Erfolges der GIST-Behandlung und deutlicher Steigerung der Überlebensrate.^{32,234} Dennoch konnte bei 80 % der Patienten ein erneutes Tumorwachstum und somit eine Resistenzentwicklung beobachtet werden, welche durch weitere Sekundärmutationen der adressierten Tyrosinkinasen hervorgerufen werden.²³⁵ Die Entwicklung der meisten zur Therapie von GIST verwendeten Kinase-Inhibitoren erfolgte außerdem ursprünglich nicht für die Behandlung dieser Tumorerkrankungen. Der Inhibitor Imatinib ist beispielsweise zur Adressierung der Bcr-Abl-Kinase im Kontext von chronischer myeloischer Leukämie (CML) entstanden und GIST-Tumore stellen die ersten soliden Tumore dar, welche mit diesem Wirkstoff behandelt werden konnten.²⁹ Ein starker Fokus auf das Erreichen einer hohen Selektivität und Potenz gegenüber den für GIST relevanten Tyrosinkinasen c-Kit und PDGFR α im Rahmen der präklinischen Entwicklung neuartiger Inhibitoren, könnte für die Überwindung der Resistenzentwicklung jedoch zielführend sein. Somit ist die Darstellung und intensive Charakterisierung derartiger Inhibitoren von größtem Interesse, wofür erneut das strukturbasierte Wirkstoffdesign ein wichtiges Werkzeug darstellt.²³⁶

Um die strukturbasierte Entwicklung neuartiger c-Kit- und PDGFR α -Inhibitoren zu ermöglichen, ist analog zur Akt1-Kinase die Etablierung eines validen Kristallisationssystems unerlässlich. Daher sollten die bereits etablierten Methoden auch für die Rezeptortyrosinkinasen c-Kit und PDGFR α im Rahmen dieser Arbeit angewandt werden und die Kristallisation dieser Proteine erfolgen, was im folgenden Kapitel näher erläutert wird.

3.5.1 Design der c-Kit- und PDGFR α -Kristallisationskonstrukte

Für die Kristallisation von c-Kit beschränkt sich das Konstrukt auf die Juxtamembran- (JMD) und Kinase-Domänen, wobei das C-terminale Ende (935-976) nicht enthalten ist. Somit umfasst es die Aminosäuren 551-934 (Uniprot-ID: P10721). Angelehnt an eine bereits publizierte Kristallstruktur der c-Kit-Kinase-Domäne (PDB: 6GQK) enthält die Aminosäuresequenz eine Deletion des *kinase insert loop* in der C-terminalen Subdomäne (688-765), welche durch eine alternative Sequenz ersetzt wurde (Kapitel 4.4.2).²³⁷ Zudem sind zahlreiche Punktmutationen enthalten. Das durch GeneArt AG synthetisierte Gen im pET-15b-Vektor wurde außerdem N-terminal mit einem His₆-Tag sowie einer nachfolgenden Erkennungssequenz für die Thrombin-Protease versehen. Die Expression in *E. coli* sollte unter Co-Expression der Tyrosin-Phosphatase YopH erfolgen, um eine möglicherweise für die Zellen toxische Phosphorylierung anderer Proteine durch das exprimierte c-Kit zu verhindern. Dafür wurde eine Subklonierung des c-KIT-Gens in einen pCDFDuet-1 Dualvektor (Merck Millipore) vorgenommen, welcher das Gen der katalytischen Domäne der YopH-Phosphatase bereits enthielt. Das PDGFR α -Kristallisationskonstrukt der Kinase-Domäne basiert ebenfalls auf der Sequenz einer bereits publizierten Struktur (PDB: 5GRN), wobei es die Aminosäuren 550-973 (Uniprot-ID: P16234) unter Deletion des Bereiches von 697-768 in der C-terminalen Subdomäne umfasst. Das durch GeneArt AG synthetisierte Gen liegt einem pIEX/Bac-3-Vektor vor und ist somit kompatibel für die Expression in Insektenzellen nach dem BacMagic-Protokoll (Merck Millipore). Außerdem ist es ebenfalls N-terminal mit einem His₁₀-Tag sowie einer sich anschließenden Erkennungssequenz der PreScission-Protease versehen.

In beide dargestellten DNA-Konstrukte von c-Kit und PDGFR α wurden durch ortsgerichtete Mutagenese einige bis dato klinisch relevante Mutationen eingebracht, sodass insgesamt elf Konstrukte für die Kristallisation der Proteine zur Verfügung standen (Tabelle 3-6).^{*238} Die initiale Etablierung der Kristallisation sollte zunächst mit den jeweiligen Wildtyp-Proteinen erfolgen.²³⁹ Da die Reproduktion der Literaturbedingungen sowie die zahlreichen *Screening*-Experimente für den PDGFR α -Wildtyp zwar zu vielversprechenden Ansätzen, jedoch nicht zur Generierung von diffraktionsfähigen Kristallmorphologien führten, wird im Folgenden lediglich die Reinigung und Kristallisation des c-Kit Wildtyp beschrieben.[†] Weitere Kristallisationsansätze für PDGFR α und c-Kit, insbesondere der jeweiligen klinisch relevanten Mutanten, werden im Rahmen der Dissertation von Alina Teuber behandelt.

* Darstellung der Kristallisationskonstrukte von c-Kit und PDGFR α im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. Luca Kröll (AG D. Rauh, TU Dortmund).

† Reinigung und Kristallisation von c-Kit und PDGFR α im Rahmen der Masterarbeit von M. Sc. Alina Teuber (AG D. Rauh, TU Dortmund).

Tabelle 3-6: Übersicht über die generierten Kristallisationskonstrukte von c-Kit und PDGFR α .

Kinase	Mutation	Expressionssystem
c-Kit	Wildtyp	<i>E. coli</i>
	V559D/V654A	
	V559D/T670I	
	D816H	
PDGFR α	Wildtyp	Sf9-Zellen
	D842V	
	D842V/V658A	
	D842V/V658A/G652E	
	D842V/G680R	
	D842V/T674I	
	T674I	

3.5.2 Reinigung des c-Kit Kristallisationskonstrukts

Für eine erfolgreiche Reproduktion der literaturbekannten Kristallisationsbedingungen kann bereits die Vorbereitung der Proteinlösung durch die Verwendung der analogen Reinigungs- und Pufferbedingungen entscheidend sein. Daher wurden die beschriebenen Pufferzusammensetzungen und Expressions- bzw. Reinigungsprotokolle aus der Publikation der PDB-Struktur 6GQK übernommen.²³⁷ Dies beinhaltet für den c-Kit Wildtyp (c-Kit^{WT}) zunächst die Co-Expression in *E. coli* mit einer Tyrosin-Phosphatase. Im Gegensatz zu der in der Publikation beschriebenen Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B) wurde im Rahmen dieser Arbeit die Tyrosin-Phosphatase YopH verwendet, da ein Dualvektor mit dem entsprechenden Gen der Phosphatase im Arbeitskreis zur Verfügung stand. Nach erfolgreicher Expression wurde das Protein mit dem beschriebenen Reinigungsprotokoll gereinigt (Abbildung 55).

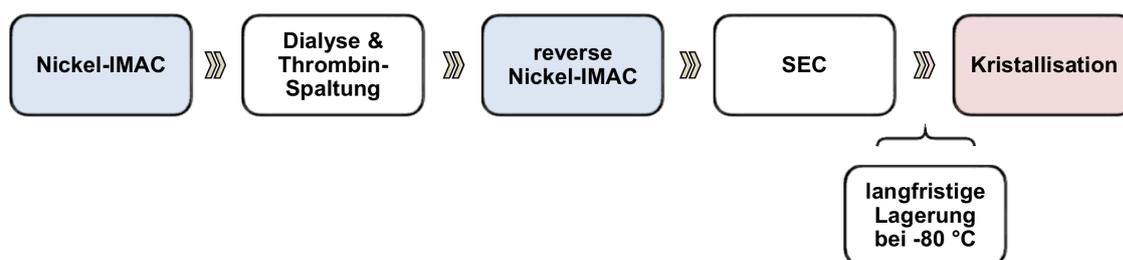


Abbildung 55: Reinigungsstrategie für c-Kit^{WT}. Nach Isolierung über eine Nickel-IMAC erfolgt eine Dialyse und Entfernung des His₆-Tags durch die Thrombin-Protease, welche über eine reverse Nickel-IMAC abgetrennt wird. Abschließend wird eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt.

Die Isolierung von c-Kit^{WT} nach dem Zellaufschluss erfolgte zunächst mit einer Nickel-Affinitätschromatographie durch Elution mit einem Imidazol-Gradienten (Abbildung 56).

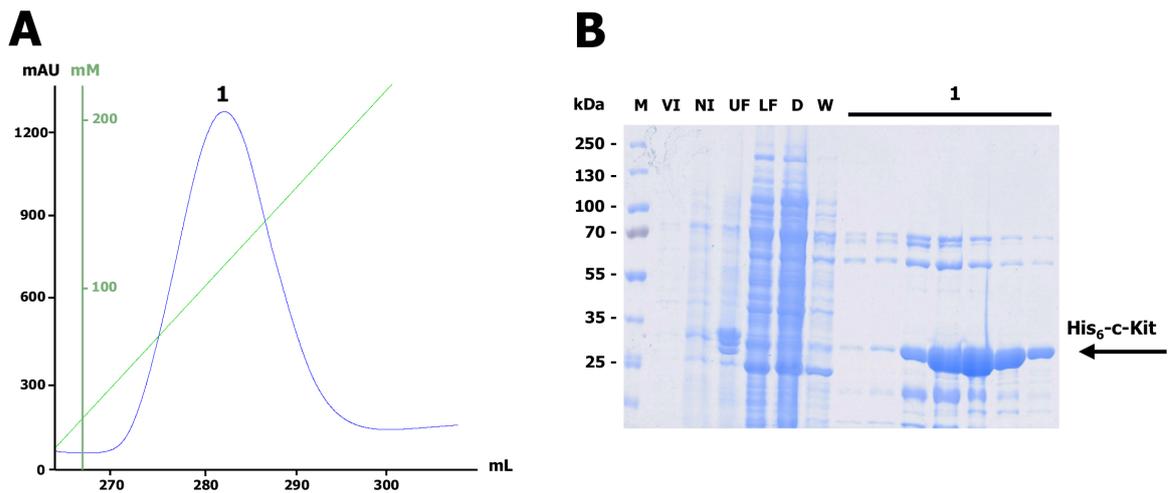


Abbildung 56: Erste Nickel-Affinitätschromatographie zur Reinigung von c-Kit^{WT}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal, grün: Gradient der Imidazol-Konzentration. B: SDS-Gel der ersten Nickel-IMAC. M: Marker, VI: vor Induktion, NI: nach Induktion, UF: unlösliche Fraktion, LF: lösliche Fraktion, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, 1: Fraktionen des Elutionspeak 1. Das Zielprotein konnte im Elutionspeak neben leichten Verunreinigungen isoliert werden.

Nach der Induktion der Expression mit IPTG (NI) konnte eine erfolgreiche Überexpression von c-Kit mit einer Größe von 39,2 kDa und der Phosphatase YopH mit einer Größe von 35,5 kDa verzeichnet werden. Das Zielprotein c-Kit^{WT} konnte weiterhin in einem symmetrischen Elutionspeak isoliert werden, wobei höher- und niedermolekulare Verunreinigungen vorliegen. Die Fraktionen des Elutionspeaks wurden im Rahmen einer Dialyse mit der Thrombin-Protease proteolytisch verdaut, um eine Abspaltung des His₆-Tags zu erzielen. Durch eine reverse Nickel-Affinitätschromatographie sollte die His-getaggte Protease anschließend wieder abgetrennt werden (Abbildung 57).

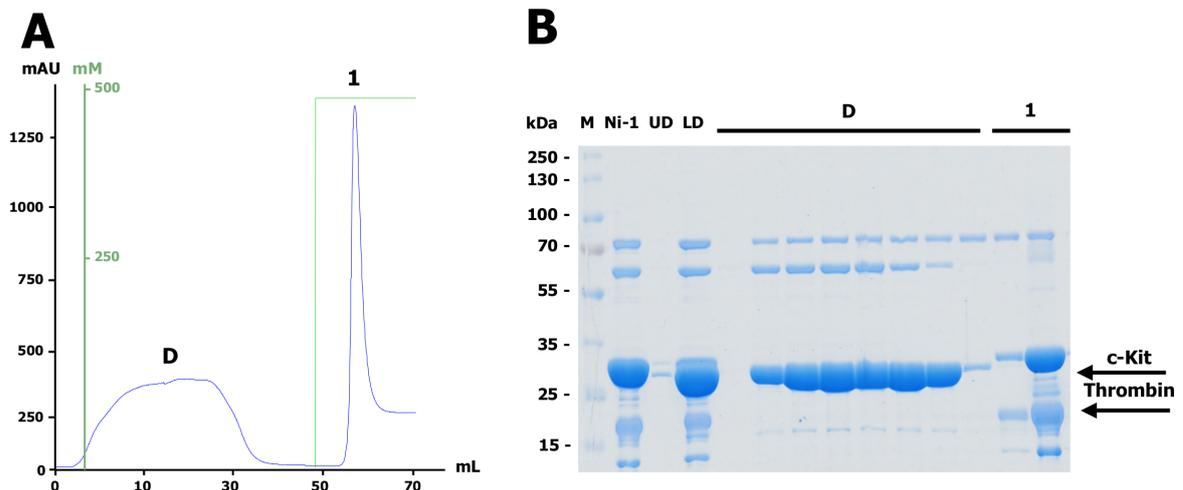


Abbildung 57: Reverse Nickel-Affinitätschromatographie zur Reinigung von c-Kit^{WT}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal, grün: Imidazol-Konzentration. B: SDS-Gel der reversen Nickel-IMAC. M: Marker, Ni-1: Elutionsfraktion der ersten Nickel-Affinitätschromatographie, UD: unlösliche Fraktion der Dialyse, LD: lösliche Fraktion der Dialyse, D: Durchfluss, 1: Fraktionen des Elutionspeak. Das geschnittene Zielprotein konnte im Durchfluss isoliert werden.

Das geschnittene Zielprotein mit einer Größe von 37,2 kDa konnte im Durchfluss isoliert werden und erfolgreich von der Thrombin-Protease abgetrennt werden. Eine vollständige Proteolyse war jedoch nicht erfolgreich, welche möglicherweise durch eine höher eingesetzte Konzentration der Protease erreicht werden kann. Der Anteil des geschnittenen Proteins war jedoch für die weiterführenden Experimente ausreichend, sodass die Reinigung mit den entsprechenden Fraktionen fortgeführt wurde. Um die verbleibenden Verunreinigungen zu entfernen, wurde im Anschluss eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (Abbildung 58).

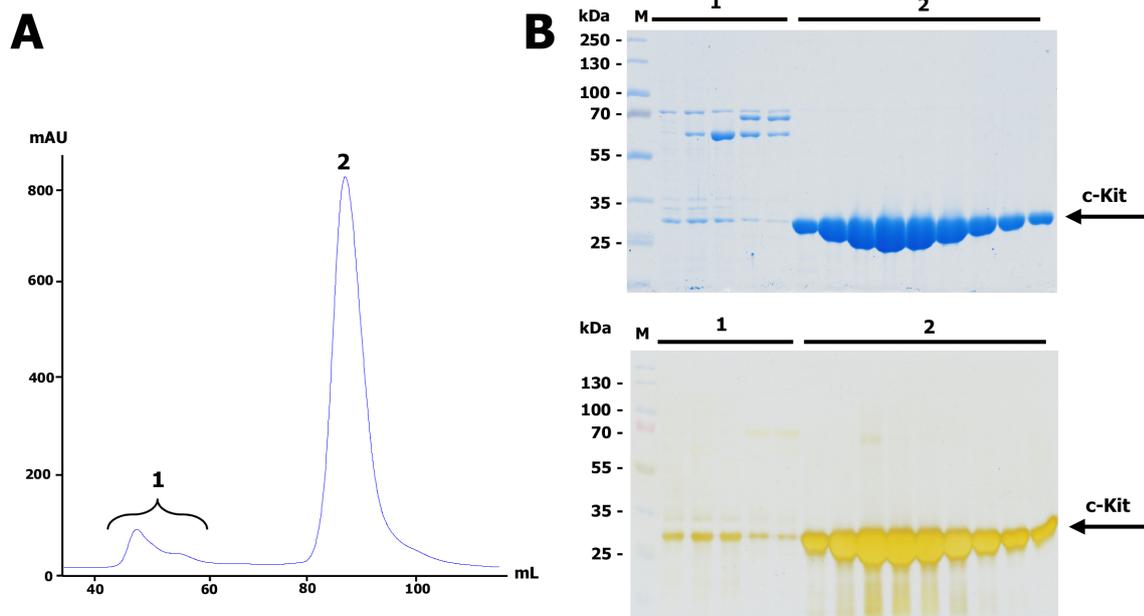


Abbildung 58: Größenausschlusschromatographie zur Reinigung von c-Kit^{WT}. A: UV-Chromatogramm. Blau: UV-Signal. B: SDS-Gel der Gelfiltration nach CBB-Färbung (oben) und Silberfärbung (unten). M: Marker, 1-2: Fraktionen der Peaks 1-2. Das Zielprotein konnte im zweiten Elutionspeak isoliert werden.

Während die höhermolekularen Verunreinigungen im ersten Elutionspeak isoliert wurden, wurde das Zielprotein in hoher Reinheit im zweiten Peak erhalten, was auch durch eine Silberfärbung bestätigt werden konnte. Mit einer Proteinausbeute von 3,2 mg pro Liter Expressionskultur konnte c-Kit in guter Ausbeute und Reinheit isoliert werden. Insgesamt konnte somit das in der Publikation beschriebene Expressions- und Reinigungsprotokoll erfolgreich adaptiert werden, sodass optimale Voraussetzungen für die nachfolgenden Kristallisationsexperimente vorlagen.

3.5.3 Kristallisation von c-Kit^{WT}

Die Reproduktion der beschriebenen Kristallisationsbedingungen (PDB: 6GQK, 3G0E) führte bereits in den initialen Ansätzen zum Wachstum diverser Kristallmorphologien, welche durch Variation verschiedener Parameter in weiteren *Fine Screens*, sowie durch *Additiv-Screenings*, zu Kristallen geeigneter Größe und Form optimiert werden konnten (Abbildung 59).^{237,240} Die Kristallisation erfolgte dabei innerhalb weniger Tage bei verschiedenen Temperaturen von 4, 12 und 20 °C.

Außerdem war sowohl die Kristallisation der Apo-Form als auch die Co-Kristallisation mit dem Typ II-Kinaseinhibitor Sunitinib erfolgreich (Abbildung 59 B-D). Mit dem Sunitinib-Co-Kristall konnte somit die im Arbeitskreis erstmalig gelöste Kristallstruktur des c-Kit^{WT} mit einer sehr guten Auflösung von 1,6 Å erhalten werden. Auch die Diffraktion der Apo-Kristalle an der Beamline des SLS liegt mit Auflösungen um ca. 2,0 Å in einem guten Bereich, was eine optimale Grundlage für *Soaking*-Experimente darstellt. Daher wurde mit diesen Apo-Kristallen die Diffusion des Typ II-Inhibitors RL2319, welcher im Arbeitskreis zur kovalenten Adressierung der c-Kit Kinase entwickelt wurde, in die Bindungstasche unter Variation der Inkubationszeit untersucht.²⁴¹ Des Weiteren konnten mit kommerziellen *Screenings* weitere Bedingungen zur Kristallisation des c-Kit^{WT} identifiziert werden. Die hohe Bereitschaft zur Kristallisation unterstreicht dabei die Validität des etablierten Reinigungs- und Kristallisationssystems für c-Kit^{WT} (Abbildung 59E-F).

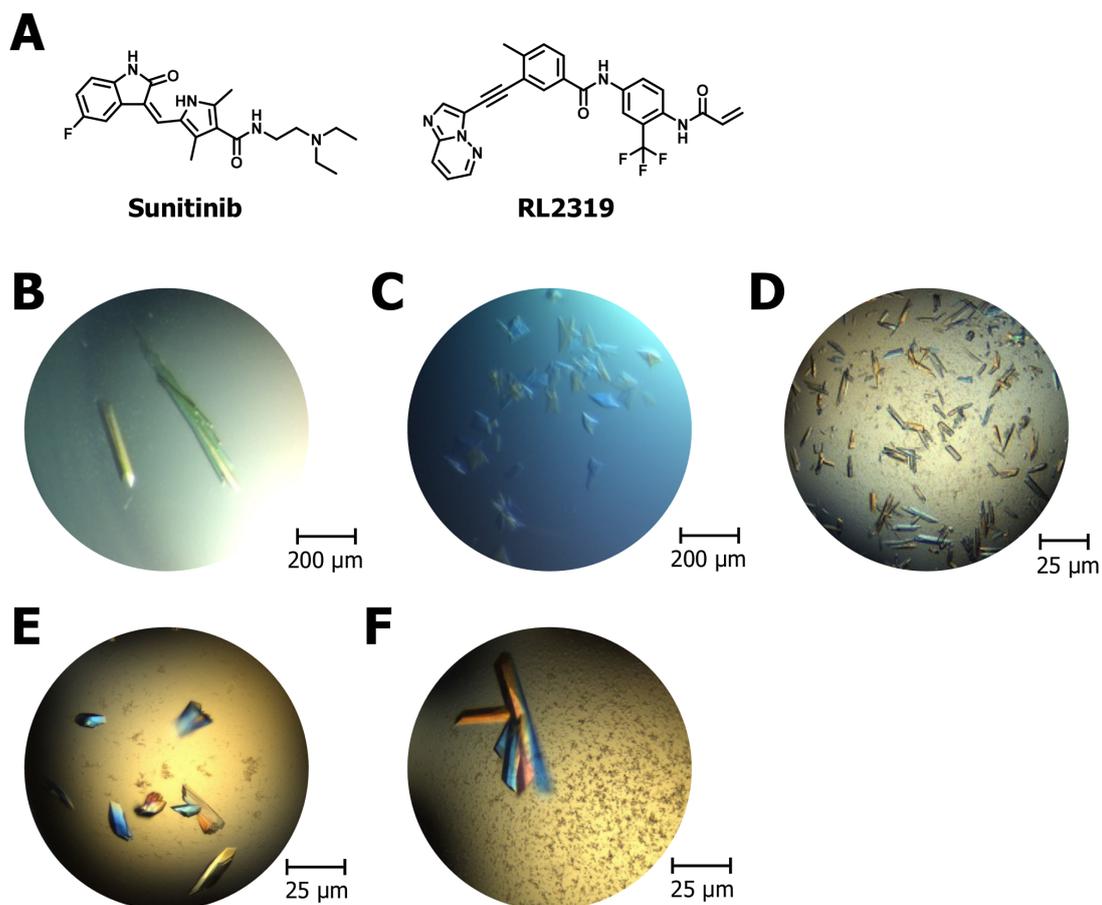


Abbildung 59: Kristallisation des c-Kit^{WT}. A: Molekülstrukturen der Inhibitoren Sunitinib und RL2319. B: Co-Kristall mit Sunitinib (6.6 mg/mL, 14 % (w/v) PEG 8000, 20 % (w/v) Ethylenglycol, 100 mM Bicin, 30 mM NaI/NaBr/NaF, pH 9,5, 12 °C). C: Apo-Kristalle von c-Kit^{WT} aus dem *Fine Screen* (6.6 mg/mL, 16 % (w/v) PEG 8000, 20 % (w/v) Ethylenglycol, 100 mM Bicin, 30 mM NaI/NaBr/NaF, pH 8,5, 4 °C). D: Apo-Kristalle von c-Kit^{WT} aus dem *Additive Screen* (6.6 mg/mL, 16 % (w/v) PEG 8000, 20 % (w/v) Ethylenglycol, 100 mM Bicin, pH 9,0, 30 mM NaI/NaBr/NaF, 0,25 % Hexamincobalt(III)chlorid, 0,25 % Salicylamid, 0,25 % Sulfanilamid, 0,25 % Vanillinsäure, 0,02 M Hepes, pH 6,8, 4 °C). E-F: Beispielhafte Apo-Kristalle aus den *Screenings*. E: 6,6 mg/mL, 30 % (v/v) PEG 400, 0,1 M CHES, pH 9,5, 4 °C. F: 8 mg/mL, 0,1 M Natriumacetat, 0,1 M MES, 30 % (v/v) PEG 400, pH 6,5, 4 °C.

Interessanterweise zeigten die Datensätze der Komplexstruktur mit Sunitinib sowie der gesoakten und ungesoakten Apo-Kristalle die Kristallisation in einer neuartigen Raumgruppe und mit anderen Zellkonstanten im Vergleich zu den bisher für c-Kit^{WT} beschriebenen Parametern. Während für die meisten publizierten Kristallstrukturen die orthorhombischen Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$ erhalten wird, weisen die hier gelösten Strukturen die monokline Raumgruppe $C 2$ mit den Zellkonstanten $a = 98 \text{ \AA}$, $b = 69 \text{ \AA}$, $c = 56 \text{ \AA}$ sowie $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 117^\circ$, $\gamma = 90^\circ$ auf.

3.5.4 Strukturanalyse der c-Kit^{WT}-Kristallstrukturen

Die Komplexstruktur mit dem Typ II-Inhibitor Sunitinib zeigte die Bindung des Inhibitors in der ATP-Bindungstasche mit dem aus der Literatur bereits bekannten Bindungsmodus unter Stabilisation der inaktiven Kinase-Konformation mit dem DFG-*out*-Zustand (Abbildung 60A).²⁴⁰ Die N-terminale Juxtamembrandomäne (JMD) ragt außerdem in die allosterische Bindungstasche hinein, wobei die Bindung von Sunitinib nicht beeinflusst wird. Durch die hohe Flexibilität des aliphatischen Diethylaminoethyl-Substituenten ist dieser Teil des Moleküls wie in der publizierten Struktur nicht vollständig aufgelöst. In den Apo- bzw. *Soaking*-Strukturen wird ebenfalls die DFG-*out*-Konformation der inaktiven Kinase sowie eine analoge Faltung der JMD beobachtet. Weiterhin zeigen die Kristallstrukturen der *Soaking*-Ansätze mit dem Ponatinib-basierten kovalenten Inhibitor RL2319 keine Besetzung der allosterischen Bindungstasche durch die Verbindung. Die Konformation der Kinase ist außerdem deckungsgleich mit den Strukturen der Sunitinib-Komplexstruktur sowie der Apo-Form. Ein Vergleich der regulatorischen Kinase-Elemente der erhaltenen Apo-Struktur mit publizierten Strukturen der inaktiven (PDB: 1T45) und aktiven (PDB: 1PKG) Konformation von c-Kit^{WT} verdeutlicht das Vorliegen der inaktiven Struktur (Abbildung 60B-C).^{242,243} Für den Erfolg der *Soaking*-Experimente stellt dies mit dem Ponatinib-basierten Inhibitor RL2319 jedoch ein Hindernis dar, da die Faltung der JMD in die allosterische Bindungstasche die Besetzung dieser zu adressierenden Tasche durch den Typ-II-Inhibitor verhindert. Dabei ist unklar, ob diese inaktive Konformation bereits in Lösung vorliegt, sodass auch eine Co-Kristallisation nicht möglich ist, oder ob dies durch die Kristallpackung induziert wird.

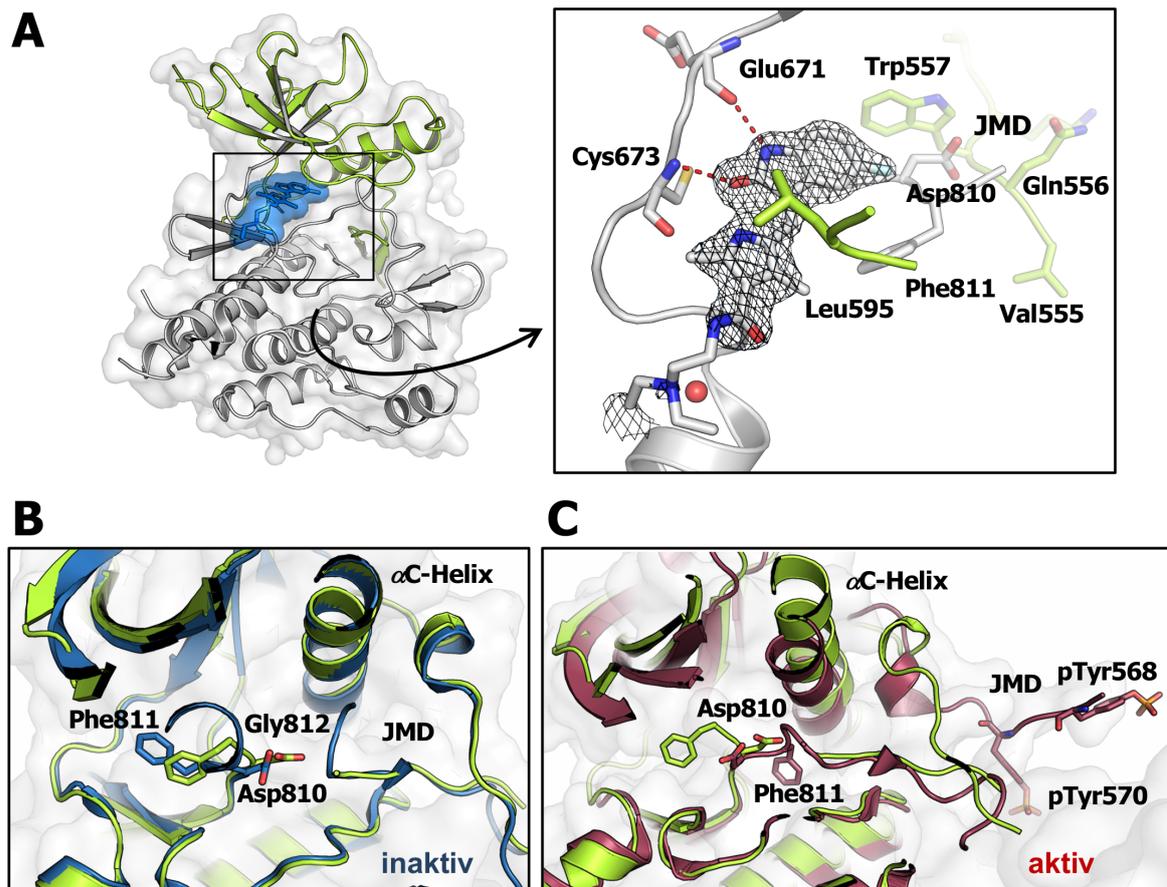


Abbildung 60: Strukturanalyse der erhaltenen c-Kit^{WT} Kristallstrukturen. A: Komplexstruktur mit Sunitinib. Der Bindungsmodus ist analog zur publizierten Kristallstruktur. B-C: Vergleich der erhaltenen Apo-Struktur (grün) mit den Strukturen der inaktiven (B, blau) und aktiven (C, rot) Konformation von c-Kit. Die erhaltenen Strukturen liegen in der inaktiven Konformation vor. Die 2F_o-F_c-Elektronendichte wurde auf $\sigma = 1$ konturiert.

Da massenspektrometrische Analysen der kovalenten Bindungsknüpfung von RL2319 an c-Kit^{WT} bisher ebenfalls keine spezifische Bindung an das zu adressierende Cys788 nachweisen konnten, ist eine bereits inaktive Konformation des Proteins in Lösung jedoch wahrscheinlich. Eine Verkürzung des Konstrukts durch Deletion der N-terminalen JMD könnte jedoch möglicherweise zielführend für den Erhalt von Komplexstrukturen mit den im Arbeitskreis synthetisierten allosterischen Typ II-Inhibitoren sein.

3.5.5 Zusammenfassung und Ausblick

Für das strukturbasierte Design von c-Kit- und PDGFR α -Inhibitoren zur effektiven Adressierung dieser Kinasen konnten sowohl die DNA-Konstrukte der klinisch relevanten Mutanten dargestellt als auch die publizierten Expressions- und Reinigungsprotokolle erfolgreich reproduziert werden. Während für PDGFR α die Kristallisationsansätze bisher mit Nadelclustern zu vielversprechenden Ansätzen führten, konnten für c-Kit sowohl mit den publizierten Bedingungen als auch in *Screening*-Experimenten zahlreiche Kristalle erhalten werden, die sich bereits für die Röntgenstrukturanalyse eignen. Somit konnte im Komplex mit dem Typ II-Inhibitor Sunitinib die erste Kristallstruktur von c-Kit^{WT} im

Arbeitskreis gelöst werden. Die Strukturanalyse der *Soaking*-Ansätze mit dem kovalenten Inhibitor RL2319 zeigte jedoch keine Bindung des Moleküls an das Protein, was auf das Vorliegen der inaktiven Konformation zurückzuführen ist. Nichtsdestotrotz konnten durch die gelösten Strukturen Ansätze zur Optimierung des Kristallisationskonstrukts geliefert werden, welche möglicherweise zur erfolgreichen Co-Kristallisation mit den im Arbeitskreis synthetisierten allosterischen Typ II-Inhibitoren führen können und das strukturbasierte Design weiterer Inhibitoren ermöglichen. Dabei könnten möglicherweise eine Verkürzung des Konstrukts durch Deletion der N-terminalen JMD oder *Soaking*-Ansätze mit den Kristallen der neuartig identifizierten Bedingungen, welche eventuell eine veränderte Kristallpackung und Orientierung der JMD aufweisen, zielführend sein. Zur Optimierung der Nadelcluster von PDGFR α könnten sowohl *Seeding*-Experimente als auch das *Screening* nach neuartigen Kristallisationsbedingungen zur Erhaltung geeigneter Kristallmorphologien führen.

Insgesamt konnten somit die für Akt bewährten Methoden der Expression, Reinigung, Kristallisation und Datenprozessierung mit dem c-Kit-Wildtyp auf ein weiteres klinisch relevantes Zielprotein im Rahmen dieser Arbeit übertragen werden.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

4.1 Allgemeine Anmerkungen

Alle für die Herstellung der Pufferlösungen verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden von folgenden Anbietern im analytischen Reinheitsgrad bezogen: Alfa Aesar, Acros Organics, Carl Roth, Fluka, Life Technologies, Merck Millipore, Sigma-Aldrich und VWR.

4.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4-1: Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Produktbezeichnung und Hersteller
6- <i>well</i> -Zellkulturplatten	TC-Platte 6 <i>well</i> , Standard, F, Sarstedt
15- <i>well</i> -Kristallisationsplatten	EasyXtal 15- <i>well</i> Tool X-Seal, NeXtal Biotechnologies
96- <i>well</i> -Kristallisationsplatten	96- <i>well</i> sitting drop iQ plates, TTP Labtech
Dialyseschlauch	Spectra/Por MWCO 12-14 kDa, Carl Roth
FPLC-Säulen	Ni-NTA Superflow Catridge, Qiagen HiTrap Q HP, Cytiva MonoQ 5/50 GL, Cytiva HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, Cytiva Superdex 75 Increase 10/300 GL, Cytiva
Kristallisations- <i>Screens</i>	JCSG Core I-IV Suites, Qiagen PACT Suite, Qiagen PEGI-II Suites, Qiagen MemGold I-II Suites, Qiagen AmSO ₄ Suite, Qiagen Opti-Salts Suite, Qiagen Additive Screen HT, Hampton Research Silver Bullets, Hampton Research
Mikrotiterplatten	MicroWell 96 <i>well</i> PS, F-Boden, transparent, Nunc Zellkultur Microplatte, 384 <i>well</i> , PS, F-Boden, weiß, TC, Greiner Bio-One
PVDF-Membran	Immobilon-FL PVDF Membran, 0,45 µM, Merck Millipore
Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S, 0,2 µM/0,45 µM, Sarstedt
Zentrifugalkonzentratoren	Vivaspin 6/20 MWCO 30 kDa, Sartorius
Zellkulturflaschen	TC25/TC75/TC175-Flaschen Standard, Sarstedt
Zellzählungs-Objektträger	Countess™ Zellzählungs-Kammerobjektträger, Invitrogen

4.1.2 Verwendete Geräte

Tabelle 4-2: Übersicht über verwendete Geräte.

Bezeichnung	Artikelbezeichnung und Hersteller
Fluoreszenz-Imager	Odyssey CLx Imaging System, LI-COR Biosciences
FPLC-System	ÄKTA pure, Cytiva
Gelelektrophoresen-System	Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, Hercules
Hochdruckhomogenisator	M-110L Microfluidizer, Microfluidics
Inkubatoren	MaxQ 8000, Thermo Fisher Scientific CB150 CO ₂ -Inkubator, WTB Binder
Kristallisationsplatten-Imager	Rock Imager 1000, Formulatrix
LC-MS System	Velos Pro Dual-Pressure Lineare-Ionenfallen-Massenspektrometer, Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplatten-Dispensiergerät	Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser, Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplatten-Lesegeräte	EnVision 2104 Multilabel Plattenleser, PerkinElmer Infinite M1000, Tecan
Mikroskop	EVOS XL Core Cell Imaging System, Invitrogen
Pipettierroboter	LCP-Mosquito, TTP Labtech
Real-Time PCR-Cycler	Lightcycler 480 Instrument II, Roche
Rotoren	Sorvall SA 600, FiberLite F20-6x100, FiberLite F8-6x1000y, Thermo Fisher Scientific
Röntgengenerator	D8 Venture Diffraktometer, Röntgenquelle: I μ S 3.0, Detektor: Photon II, Bruker
Spektralphotometer	NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific
Sterilbank	Herasafe KS12/KS18, Thermo Fisher Scientific
Thermocycler	Mastercycler PRO, Eppendorf
Thermoschüttler	ThermoMixer C, Eppendorf
Transfer-Powersystem	Pierce Power Station, Thermo Fisher Scientific
Tröpfchendispensierer	Echo 520 Liquid Handler, LabCyte
Zellzähler	Countess II, Invitrogen
Zentrifugen	Zentrifuge 5804R/5424/5424R, Eppendorf Sorvall Evolution RC, Thermo Fisher Scientific

4.1.3 Verwendete Proteine, Reagenzien und Medien

Tabelle 4-3: Übersicht über verwendete Proteine, Reagenzien und Medien.

Bezeichnung	Hersteller
1-Thioglycerol	Sigma-Aldrich
Amphotericin B	Gibco, Invitrogen
BCA Protein Assay Kit, Pierce	Thermo Fisher Scientific
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Chameleon Duo Pre-Stained Protein Ladder	LI-COR Biosciences
Choleratoxin	Sigma-Aldrich
Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich
cOmplete ULTRA Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
DPBS-Puffer	Gibco, Invitrogen
EGF	PeptoTech
FBS Good/Good Forte, EU approved	PAN-Biotech
FBS, qualified, Brazil	Gibco, Invitrogen
FBS, EU approved	Gibco, Invitrogen
Geneticin/G418 Sulfat	Gibco, Invitrogen
Insulin, human	Sigma-Aldrich
Intercept (TBS) Protein-Free Blocking Buffer	LI-COR Biosciences
Interleukin 3, murin	PeptoTech
Medien	MEM GlutaMax, Gibco, Invitrogen DMEM, high glucose, GlutaMax, Gibco, Invitrogen DMEM/F-12 GlutaMax, Gibco, Invitrogen RPMI-1640 GlutaMax, Gibco, Invitrogen Sf-900 III SFM, Gibco, Invitrogen
Natriumpyruvat	Gibco, Invitrogen
Odyssey Blocking Buffer, TBS	LI-COR Biosciences
One <i>Taq</i> Hot Start DNA Polymerase	New England Biolabs
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa	Thermo Fisher Scientific
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Invitrogen
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Polybren Infektions-/Transfektionsreagenz	Merck Millipore
Puromycin-Dihydrochlorid	Gibco, Invitrogen
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Restriktionsenzyme <i>Bam</i> HI-HF, <i>Dpn</i> I, <i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III-HF, <i>Nco</i> I, <i>Nde</i> I, <i>Xho</i> I	New England Biolabs
RIPA-Puffer	Cell Signaling Technologies
SF-900 III SFM	Gibco, Invitrogen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
Thrombin	SERVA
TransIT-LT1 Transfektionsreagenz	Mirus Bio LLC
Trypan Blue Stain (0,4 %)	Invitrogen
Trypsin-Protease, Pierce, MS Grade	Thermo Fisher Scientific
Trypsin-EDTA, Phenolrot (0,25 %)	Gibco, Invitrogen

4.1.4 Bakterienstämme und Insektenzelllinien

Tabelle 4-4: Übersicht über verwendete Bakterienstämme und Insektenzelllinien.

Bezeichnung	Anbieter
<i>E. coli</i> XL10 Gold	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Merck Millipore Novagen
Sf9, <i>Spodoptera frugiperda</i>	Thermo Fisher Scientific
Tnao38, <i>Trichoplusia ni</i>	Zur Verfügung gestellt von Prof. Gary W. Blissard, Boyce Thompson Institute

4.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.1 Verwendete Plasmide

Für die Kristallisation von Akt1 im Rahmen dieser Arbeit wurden für das BacMagic-Expressionssystem (Merck Millipore) kompatible pIEX/Bac-3 Plasmide verwendet, wobei das Akt1-Gen (Uniprot-ID: P31749) für die Expression in Sf9-Zellen codon-optimiert ist. Das Gen beinhaltet die Aminosäuren 2-446 sowie die Oberflächenentropie-reduzierenden Mutationen E114A/E115A/E116A, angelehnt an die zuvor publizierten Akt1^{WT}-Kristallstrukturen (PDB: 3O96, 4EJN).^{74,134} Zusätzlich wurde selbiges Plasmid mit den mittels zielgerichteter Mutagenese eingebrachten Mutationen E17K, C296S und C310S in dieser Arbeit verwendet. Alle Konstrukte tragen einen N-terminalen His₆-Tag, welcher der Reinigung des Proteins dient, sowie eine anschließende Erkennungssequenz der TEV-Protease.

Die Gene der Rezeptortyrosinkinasen c-Kit (Uniprot-ID: P10721) und PDGFR α (Uniprot-Eintrag P16234) wurden von GeneArt (Thermo Fisher Scientific) synthetisiert. Das c-Kit-Gen, codon-optimiert für die Expression in *E. coli* BL21 (DE3), in einem pET-15b Vektor umfasst die Aminosäuren 551-934 und enthält diverse Mutationen (I563S, V569S, Y609Q, L631S, M651E, I662H, D768H, R804N, V825D, C844S, L890S, H894Y, L912D, L923D) und eine Deletion des *kinase insert loop* (688-765), welcher durch die Sequenz EFVPYKVAPEDLYKDFLT ersetzt wurde. Dabei wurden diese Veränderungen angelehnt an eine zuvor veröffentlichte c-Kit-Kristallstruktur (PDB: 6GQK) vorgenommen.²³⁷ Für die Co-Expression mit der Tyrosinphosphatase YopH wurde das Gen in den Dualvektor pCDF-Duet-1, welcher außerdem das Gen der katalytischen Domäne von YopH enthält, subkloniert. Das Gen für PDGFR α , codon-optimiert für die Expression in Sf9-Zellen, ist in dem Transfervektor pIEX/Bac-3 vorhanden und umfasst die Aminosäuren, wobei es die Aminosäuren 550-973 unter Deletion des Bereiches von 697-768 umfasst. Diese Sequenz ist angelehnt an eine publizierte PDGFR α -Kristallstruktur (PDB: 5GRN). Als Affinitätstag für die Proteinreinigung tragen beide Kinasen einen N-terminalen Hexahistidin-Tag. In die DNA-Konstrukte der Proteine wurden außerdem die in Abschnitt 3.5.1 dargestellten klinisch relevanten Mutationen mittels Mutagenese eingebracht. Die Aminosäuresequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Kristallisationskonstrukte sind im Anhang zusammengefasst (Kapitel 6.2).

Die pBABE-Transferplasmide für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-Zellen mit den unterschiedlichen Akt1-Konstrukten wurden von Addgene bezogen.²²⁴ Diese umfassen das humane Akt1-Gen (Uniprot-ID: P31749) mit den Aminosäuren 1-480 und einem N-terminalen HA-Tag. In dieses Konstrukt wurde die onkogene E17K-Mutation mittels Mutagenese eingebracht. Zur zusätzlichen Fusion eines N-terminalen Myristoyl-Tags, welcher eine dauerhafte Aktivierung des Proteins erzielen sollte, wurde außerdem das Akt1^{WT}-Gen in einen pBABE-Vektor, welchen diesen Myristoyl-Tag enthielt, subkloniert. Das Verpackungsplasmid pCL-Eco (Novus Biologicals) wurde von Prof. Dr. Martin Sos (Uniklinik Köln) zur Verfügung gestellt.

4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation des Geninserts nach dem Restriktions-/Ligationsprotokoll, der zielgerichteten Einbringung verschiedener Mutationen mittels *Quickchange*-Mutagenese sowie der Validierung der Einbringung des Gens in der Ligation wurden die folgenden Protokolle für die Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) verwendet.

Tabelle 4-5: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes und Verlauf der PCR-Reaktion für die Amplifikation des Geninserts und die zielgerichtete Mutagenese.

Reaktionsansatz	PCR-Verlauf	Temperatur	Dauer	
4 µL Phusion HF Puffer (5x)	Denaturierung	98 °C	30 s	35 Zyklen
0,4 µL dNTP-Mix (10 mM)	Denaturierung	98 °C	10 s	
1 µL <i>reverse</i> Primer (10 µM)	Annealing	55-65 °C	30 s	
1 µL <i>forward</i> Primer (10 µM)	Elongation	72 °C	90 s	
50-100 ng Templat-DNA	finale Elongation	72 °C	5 min	
0,2 µL Phusion <i>High-Fidelity</i> DNA-Polymerase	Halten	4 °C		
auf 20 µL mit ddH ₂ O auffüllen				

Zur Entfernung der methylierten Templat-DNA wurde im Anschluss an die PCR 1 U *DpnI* zum Reaktionsansatz gegeben und mindestens 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Für die Mutagenese-Ansätze erfolgte anschließend die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* XL10 Gold Zellen mit 1 µL PCR-Produkt mittels Hitzeschock. Die transformierte Bakterienkultur wurde auf LB-Agarplatten, versetzt mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 4-6: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes und Verlauf der PCR-Reaktion zur Überprüfung der Einbringung des Gens in der Ligation.

Reaktionsansatz	PCR-Verlauf	Temperatur	Dauer	
1 Bakterienkolonie	Denaturierung	94 °C	30 s	35 Zyklen
5 µL OneTaq <i>Standard</i> Puffer (5x)	Denaturierung	94 °C	30 s	
0,5 µL dNTP-Mix (10 mM)	Annealing	55 °C	30 s	
0,5 µL <i>reverse</i> Primer (10 µM)	Elongation	68 °C	90 s	
0,5 µL <i>forward</i> Primer (10 µM)	finale Elongation	68 °C	5 min	
0,125 µL OneTaq DNA-Polymerase	Halten	4 °C		
auf 25 µL mit ddH ₂ O auffüllen				

Im Anschluss an die Kolonie-PCR wurde die erfolgreiche Ligation mit Hilfe einer Agarose-Gelelektrophorese auf 1%-iger Agarose überprüft.

4.2.3 Restriktionsverdau

Zur Subklonierung des amplifizierten Geninserts wurden sowohl das Zielplasmid als auch das PCR-Produkt zunächst mit entsprechenden *High-Fidelity* Restriktionsenzymen spezifisch für 3 h bei 37 °C verdaut und die Enzyme anschließend für 5 min bei 80 °C hitzeinaktiviert. Die Zusammensetzung der Ansätze für den Restriktionsverdau ist in Tabelle 4-7 zusammengefasst.

Tabelle 4-7: Zusammensetzung der Ansätze für den Restriktionsverdau.

	Zielplasmid	PCR-Produkt
DNA	1-3 µg	45 µL
Restriktionsenzym I	1 µL	1 µL
Restriktionsenzym II	1 µL	1 µL
CIP	1 µL	-
<i>CutSmart</i> Puffer (10x)	4 µL	6 µL
mit ddH ₂ O auffüllen	auf 40 µL	auf 60 µL

Die DNA-Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR Purifikation Kit (Qiagen).

4.2.4 Ligation

Zur Ligation der DNA-Fragmente wurde ein dreifacher Überschuss des amplifizierten Geninserts zu 50 ng Zielplasmid gegeben und der 10 µL-Ansatz mit 0,5 µL T4-DNA-Ligase (NEB) sowie 1 x *Rapid Ligation* Puffer für 16 h bei 16 °C inkubiert. Anschließend wurden *E. coli* XL10 Gold Zellen mit 1 µL Plasmid mittels Hitzeschock transformiert und die Bakterienkultur auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum für die Selektion transformierter Zellen ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die selektierten Klone wurden in 5 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert.

4.2.5 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Isolierung der Plasmide aus *E. coli* XL10 Gold Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben. Zur Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA wurden Absorptionmessungen bei 260 nm mit dem NanoDrop 2000 Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt.

4.2.6 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung der korrekten Einbringung der gewünschten Mutationen und erfolgreichen Ligation des Geninserts in das Zielplasmid wurde eine DNA-Sequenzierung durch Eurofins Genomics durchgeführt.

4.3 Proteinexpression

4.3.1 Proteinexpression in Insektenzellen

Die Transfektion von Insektenzellen nach dem BacMagic-Protokoll (Merck Millipore) mit den für die Expression von Akt vorliegenden pIEX/Bac3-Transfervektoren sowie die Generierung des Baculovirus zweiter Generation (P2) erfolgte durch die Dortmund Protein Facility (DPF, MPI Dortmund). Der P2-Virus diente anschließend als Grundlage für alle weiteren Expressionsschritte und wurde bei 4 °C lichtgeschützt für mehrere Monate gelagert. Die Arbeiten mit Sf9- und Tnao38-Insektenzellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt und die Zelldichte und -viabilität in regelmäßigen Abständen von zwei bis drei Tagen mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Für die Subkultivierung wurde die Zelldichte auf $1-2 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingestellt. Als Nährmedium für die Sf9- und Tnao38-Zellen wurde das Sf-900 III SFM Medium (Gibco) verwendet und die Zellen bei 27 °C in sterilen Erlenmeyerkolben bei 110 rpm inkubiert.

4.3.1.1 Virusamplifikation

Um einen für die Expression ausreichend hohen Virustiter zu erreichen, wurde zunächst eine Amplifikation des P2-Virus zum Baculovirus dritter Generation (P3) durchgeführt. Dafür wurden 100 mL einer Sf9-Zellsuspension mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL mit 40 µL des P2-Virus versetzt und für 72-96 h bei 27 °C und 110 rpm inkubiert. Bei einer verbliebenen Zellviabilität von 70-80 % erfolgte die Ernte des P3-Virus durch Zentrifugation der Zellsuspension bei 4 °C, 3000 g für 10 min und anschließender Filtration des P3-Virus-enthaltenden Überstandes (0,45 µm Spritzenvorsatzfilter, Sarstedt). Der P3-Virus wurde bis zum Ansetzen der Expressionskultur für mehrere Wochen lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

4.3.1.2 Proteinexpression im präparativen Maßstab

Die Proteinexpression in Sf9-Zellen im 1,5 L-Maßstab erfolgte in sterilen 5 L-Erlenmeyerkolben mit einer Zelldichte von $3 \cdot 10^6$ Zellen/mL durch Infektion mit 50 mL des Baculovirus dritter Generation. Die Expressionskultur wurde für 72 h bei 27 °C und 110 rpm inkubiert und die Zellen durch Zentrifugation (3000 g, 20 min, 4 °C) geerntet. Anschließend wurde das Zellpellet zur Entfernung des Mediums mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bis zur Proteinreinigung bei -80 °C gelagert.

4.3.2 Proteinexpression in *E. coli*

Für die Expression der c-Kit-Konstrukte wurde der chemische kompetente Bakterienstamm *E. coli* BL21 (DE3) mit dem entsprechenden Plasmid per Hitzeschock transformiert und auf einer LB-Agarplatte mit 100 µg/mL Streptomycin selektiert. Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 50 mL TB-Medium, mit 100 µg/mL Streptomycin versetzt, in einem sterilen 250 mL Erlenmeyer-Schikanekolben mit einer von der Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickten Kolonie versetzt und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Diese 50 mL-Vorkultur diente der Inokulation von 2 L TB-Medium, wobei das Wachstum der Bakterienkultur durch Messungen der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) beobachtet wurde. Nach Erreichen einer OD_{600} von 0,6 wurde die Expression durch Zugabe von 0,4 mM IPTG induziert und die Expressionskultur für 18 bei 18 °C und 150 rpm inkubiert. Durch Zentrifugation bei 3000 rpm und 4 °C für 20 min wurde das Zellpellet geerntet und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.4 Proteinreinigung und biochemische Methoden

4.4.1 Reinigung der Akt1-Konstrukte

4.4.1.1 Zellyse

Zur Lyse der Sf9-Zellen wurde das aufgetaute Zellpellet in 4 mL Lysepuffer pro Gramm des Pellet resuspendiert und mit einer Protease-Inhibitor Cocktail-Tablette (Roche) für 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach dem Zellaufschluss durch einen Hochdruckhomogenisator (3-4 Zyklen) wurde das Zellysate mit 1 % CHAPS bei 4 °C für eine Stunde inkubiert, um eine höhere Proteinlöslichkeit zu erreichen. Zur Abtrennung der unlöslichen Bestandteile wurde das Lysat für eine Stunde bei 4 °C und 20000 rpm zentrifugiert und abschließend der Überstand mit 0,45 µm Spritzenfilter filtriert.

Lysepuffer: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, 0,1 % Triton X-100, pH 8.0

4.4.1.2 Nickel-Affinitätschromatographie, Proteaseverdau und Dialyse

In einem ersten Reinigungsschritt wurde das Zellysate über eine Nickel-Affinitätschromatographie (Ni-NTA Superflow Catridge, Qiagen) aufgetrennt. Dafür wurde die Säule zunächst nach Herstellerangaben mit Wasser und 0,5 M Natronlauge gewaschen und anschließend mit dem Waschpuffer äquilibriert. Das Zellysate wurde mit einem Fluss von 2 mL/min auf die Säule aufgetragen und die Säule anschließend bis zum Erreichen konstanter UV- und Leitfähigkeitssignale mit Waschpuffer gewaschen. Mit Hilfe des Elutionspuffers und einem Gradienten von 0-250 mM Imidazol über einen Zeitraum von 30 min sowie einer anschließenden Schlagelution mit 500 mM Imidazol wurden die gebundenen Proteine mit einem Fluss von 1,5 mL/min von der Säule eluiert. Nach Analyse per SDS-Gelelektrophorese wurden die Zielprotein-enthaltenen Fraktionen vereint und mit

1 mg TEV-Protease pro 10 mg Protein zur Abspaltung des Hexahistidin-Tags im Zuge einer ca. 18-stündigen Dialyse bei 4 °C gegen den Dialysepuffer versetzt.

Waschpuffer: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0

Elutionspuffer: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0

Dialysepuffer: 25 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0

4.4.1.3 Reverse Nickel-Affinitätschromatographie

Zur Entfernung der His-getaggen TEV-Protease vom geschnittenen Zielprotein wurde die Nickel-Affinitätschromatographie-Säule zunächst nach Herstellerangaben vorbereitet und äquilibriert. Die Proteinlösung, welche nach der Dialyse zunächst zur Entfernung präzipitierter Proteine zentrifugiert wurde (21000 g, 10 min, 4 °C), wurde mit einem Fluss von 1 mL/min auf die Säule aufgetragen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte anschließend mit Hilfe einer Schlagelution mit 500 mM Imidazol, wobei die Zielprotein-enthaltenden Fraktionen vereint wurden.

4.4.1.4 Anionenaustauschchromatographie

Für die Anionenaustauschchromatographie (HiTrap Q HP bzw. Mono Q 5/50 GL, Cytiva) wurde die Proteinlösung nach Äquilibrierung der Säulen nach Herstellerangaben mit einem Fluss von 1 mL/min beladen. Als Äquilibrierungspuffer diente der Dialysepuffer. Die Elution erfolgte über einen Natriumchlorid-Gradienten von 0-500 mM über einen Zeitraum von 40 min und anschließender Schlagelution mit 1 M Natriumchlorid. Die Fraktionen der Elution wurden per SDS-Gelelektrophorese analysiert und jene, welche das Zielprotein enthalten, wurden auf ein Volumen von 1 mL mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentrators (Vivaspin 20, MWCO 30 kDa, Sartorius) eingengt. Im Falle des Akt1^{E17K}-Konstrukts wurde das Protein zusätzlich dephosphoryliert. Dies wurde durch Co-Inkubation mit der λ -Phosphatase bei 4 °C über Nacht, wobei das Akt-Protein in einem 20-fachen Überschuss vorlag, erreicht.

Elutionspuffer: 20 mM Tris, 1 M NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8.0

4.4.1.5 Erste Größenausschlusschromatographie

Die Proteinlösung wurde zunächst zentrifugiert (21000 g, 10 min, 4 °C) und der Überstand über eine nach Herstellerangaben äquilibrierte Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, Cytiva) mit einem Fluss von 1 mL/min aufgetrennt. Die Fraktionen, welche das Zielprotein enthalten, wurden vereint und mit einem Zentrifugalkonzentrator auf eine Proteinkonzentration von 3-5 mg/mL aufkonzentriert. Zur langfristigen Lagerung wurde die Proteinlösung aliquotiert und nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

Gelfiltrationspuffer: 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, pH 7.3

4.4.1.6 Zweite Größenausschlusschromatographie

In einem letzten Reinigungsschritt und zur Umpufferung des Proteins in den finalen Lagerungspuffer, wurde die Proteinlösung über eine abschließende Gelfiltrationssäule (Superdex 75 10/300 GL Increase, Cytiva mit einem Fluss von 0,5 mL/min eluiert. Das weitere Vorgehen zur Vorbereitung des Proteins für die Kristallisation von Akt1 ist in Kapitel 4.5.1 beschrieben.

Lagerungspuffer: 25 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, 5 mM DTT, pH 7.5

4.4.2 Reinigung der c-Kit-Konstrukte

4.4.2.1 Zellyse

Das aufgetaute Zellpellet der *E. coli* BL21 (DE3) Zellen wurde in 4 mL Lysepuffer pro Gramm des Pellet resuspendiert und unter Zugabe einer Protease-Inhibitor Cocktail-Tablette (Roche) für 20 min bei 4 °C inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte über einen Hochdruckhomogenisator (3-4 Zyklen) und für die Abtrennung unlöslicher Bestandteile wurde das Zellysat für eine Stunde bei 20000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Lysepuffer: 40 mM HEPES, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 8.0

4.4.2.2 Nickel-Affinitätschromatographie, Proteaseverdau und Dialyse

Mit Hilfe einer nach Herstellerangaben mit dem Waschpuffer äquilibrierten Nickel-Affinitätschromatographie (HisTrap Q FF crude, Cytiva) wurde eine erste Isolierung des Zielproteins erreicht, in dem das Protein mit einem Fluss von 2 mL/min auf die Säule aufgetragen wurde und mit einem linearen Gradienten des Elutionspuffers von 0-250 mM Imidazol über 30 min und anschließender Schlagelution mit 500 mM Imidazol bei einer Flussrate vom 1 mL/min eluiert wurde. Durch eine SDS-Gelelektrophorese wurden die Zielprotein-enthaltenden Fraktionen ermittelt und vereint. Um eine Abspaltung des Hexahistidin-Tags zu erreichen, wurde die Proteinlösung mit 1 U Thrombin pro 100 µg Protein versetzt und über Nacht gegen den Dialysepuffer bei 4 °C dialysiert.

Waschpuffer: 40 mM HEPES, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 8.0

Elutionspuffer: 40 mM HEPES, 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 8.0

Dialysepuffer: 40 mM HEPES, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 0,5 mM TCEP, pH 8.0

4.4.2.3 Reverse Nickel-Affinitätschromatographie

Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung zunächst zur Entfernung des entstandenen Präzipitats zentrifugiert (21000 g, 10 min, 4 °C). Zur Isolierung des geschnittenen Zielproteins wurde das Protein erneut über eine mit Waschpuffer äquilibrierte Nickel-Affinitätschromatographie mit einem Fluss von 1 mL/min aufgetrennt und die an die Säule gebundenen Proteine mit einer Schlagelution durch 500 mM Imidazol eluiert.

Die Zielprotein-enthaltenden Fraktionen wurden vereint und mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentrators (Vivaspin 20, MWCO 10 kDa, Sartorius) auf ein Volumen von 1 mL eingeeengt.

4.4.2.4 Größenausschlusschromatographie

Zur abschließenden Entfernung verbliebener Verunreinigungen wurde die Proteinlösung nach Zentrifugation (21000 g, 10 min, 4 °C) auf einer mit dem Gelfiltrationspuffer äquilibrierten Größenausschlusschromatographie-Säule (HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, Cytiva) mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetrennt. Nach Analyse per SDS-Gelelektrophorese wurden die Protein-enthaltenden Fraktionen vereint und auf eine Proteinkonzentration von 5-10 mg/mL aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Gelfiltrationspuffer: 20 mM Tris, 200 mM NaCl, 1 mM TCEP, pH 8.0

4.4.3 Proteinstabilitätsassay

Die Bestimmung der Proteinstabilität wurde mit Hilfe eines *Thermal Shift Assays* (TSA) durchgeführt. Dafür wurden jeweils 2 µL des Proteins mit einer Konzentration von 1 mg/mL in die Kavitäten einer 96-well-Lightcycler-Platte (Sarstedt) vorlegt und dazu 11 µL bidestilliertem Wasser, 5 µL des entsprechenden Puffers und zuletzt 2 µL eines SYPRO Orange Farbstoffs zugegeben. Für die Untersuchung des Einflusses einer Ligandenbindung wurde das Protein zuvor mit einem dreifachen molaren Überschuss des Liganden versetzt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Ansätze in den qPCR-Platten wurden anschließend mit einer thermostabilen Folie abgedeckt und die Platte kurz runterzentrifugiert. Der TSA-Assay wurde mit Hilfe eines Real-Time PCR-Cyclers (Lightcycler 480 Instrument II, Roche) durchgeführt, wobei die Temperatur über einen Zeitraum von ca. 40 min von 20-85 °C schrittweise erhöht wurde.

4.5 Strukturbiologische Methoden

4.5.1 Kristallisation von Akt1

Die Kristallisationsstudien mit den Akt1-Konstrukten wurde vorzugsweise im direkten Anschluss an die in Kapitel 3.2.3 erläuterte, abschließende Größenausschlusschromatographie der Proteinreinigung durchgeführt. Sofern jedoch zuvor eine Lagerung der Proteinlösung bei -80 °C erfolgte, wurde das Protein vor der Verwendung für Kristallisationsexperimente zunächst über eine Gelfiltrationssäule (Superdex 75 Increase 10/300 GL, Cytiva) von möglichen Oligomeren getrennt, um eine homogenere Proteinlösung zu erhalten (Kapitel 4.4.1.6). Anschließend wurde die Proteinlösung mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentrators (Vivaspin 20, MWCO 30 kDa, Sartorius) auf eine Proteinkonzentration von 3-6 mg/mL aufkonzentriert.

Für Co-Kristallisationsstudien wurde das Protein mit einem dreifachen molaren Überschuss des jeweiligen Inhibitors versetzt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Die Proteinlösung wurde vor der Kristallisation zentrifugiert (21000 g, 4 °C, 10 min) und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

4.5.1.1 Kristallisations-*Screening*

Für das *Screening* mit diversen kommerziellen Kristallisationsbedingungen (JCSG Core I-IV Suites, PACT Suite, PEGI-II Suites, MemGold I-II Suites, AmSO₄ Suite, Qiagen) wurden 70 µL der jeweiligen Reservoir-Lösung in einer 96-*well*-Kristallisationsplatte (IQ Plates, TTP Labtech) vorgelegt. Gemäß der *sitting drop*-Methode wurden anschließend 100 nL der Proteinlösung mit 100 nL Reservoir-Lösung mit Hilfe eines Pipettierroboters (Mosquito Crystal, TTP Labtech) unter feuchtem Milieu versetzt und die Kristallisationsplatten mit einer Klarsichtfolie luftdicht verschlossen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 4 °C und 20 °C in einem Kristallisationsplatten-Dokumentationssystem (Rock Imager 1000, Formulatrix) über einen Zeitraum von 21 Tagen. Mit dem gleichen experimentellen Aufbau wurden auch *Additiv-Screenings* (Opti-Salts Suite, Qiagen und Additive Screen HT, Silver Bullets, Hampton Research) angesetzt, wobei 63 µL der als Grundlage gewählten Reservoir-Lösung in einer 1,1-fachen Konzentration mit 7 µL der jeweiligen Additiv-Komposition versetzt wurden.

4.5.1.2 Kristallisation in *Fine Screens*

Zur weiteren Optimierung der Kristallisationsbedingungen in *Fine Screens* wurde die jeweilige Reservoir-Lösung in 15-*well*-Kristallisationsplatten (EasyXtal 15-Well Tools X-Seal, Qiagen) pipettiert und auf einem Kreisschüttler vermischt. Nach der Dampfdiffusionsmethode per *hanging drop*-Prinzip wurde je 1 µL der Reservoir-Lösung mit 1 µL der Proteinlösung auf einem fusselreifen Deckel versetzt und dieser luftdicht auf die dafür vorgesehene Kavität mit der entsprechenden Reservoir-Lösung geschraubt. Die Inkubation der Kristallisationsplatten erfolgte für mehrere Wochen sowohl bei 4 °C als auch, insbesondere im Falle von Akt1^{WT}, bei 18 °C und das Kristallwachstum wurde über diesen Zeitraum in regelmäßigen Abständen beobachtet. Die nach wenigen Tagen entstandenen Co-Kristalle des Akt1^{WT} im Komplex mit verschiedenen Inhibitoren wurden mit Hilfe eines Nylon-Loops aus dem Tropfen entnommen, kurz in einen Tropfen einer 40 %-iger Ethylenglykol-Lösung als cryoschützende Substanz eingetaucht und in flüssigem Stickstoff eingefroren und gelagert.

Kristallisationsbedingungen Akt1^{WT}: 12-24 % PEG 2000 MME, 1,25 mM Na-Acetat, 3,75 mM Na-Citrat, pH 6.5-7.5, 3 mg/mL Akt1^{WT}, 18 °C

4.5.1.3 Microseeding

Für *Microseeding*-Experimente wurden Akt1^{WT}-Kristalle oder Sphärolite von Akt1^{E17K} mithilfe des Crystal Crusher (Hampton Research) zerkleinert und anschließend wurde

mithilfe des Seed Bead Kits (Hampton Research) eine *Seeding*-Lösung mit der jeweiligen Reservoir-Lösung in verschiedenen Verdünnungen (1:1000-100.000) hergestellt. Beim Ansetzen der *Fine Screens* wurde je 1 μ L Reservoir mit 1 μ L Proteinlösung und 0,2 μ L der jeweiligen *Seeding*-Lösung vermischt.

4.5.2 Datensammlung und -prozessierung

Kristalle mit einer geeignet guten Diffraktion wurden durch Testmessungen am im Arbeitskreis verfügbaren Röntgendiffraktometer (D8 Venture Diffraktometer, I μ S 3.0 Röntgenquelle, Photon II Detektor, Bruker) für die Vermessung am Swiss Light Synchrotron (PSI, Villigen, Schweiz) ausgewählt. Die Datensätze wurden dort an der PXII X10SA Röntgenquelle sowohl mit dem 6MF Detektor (Pilatus) als auch dem Eiger X 9M Detektor bei 100 K und einer Wellenlänge um 1 Å aufgenommen. Für die Integration und Indexierung der Datensätze wurde zunächst das Programm XDS verwendet und im Anschluss eine Skalierung mit dem Programm XSCALE durchgeführt.²⁰⁸ Für den molekularen Ersatz zur Erhaltung eines Proteinmodells wurde das Programm PHASER eingesetzt.²⁴⁴ Dabei diente zunächst eine publizierte Akt1^{WT}-Kristallstruktur (PDB: 3O96) als Modellvorlage und im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde die eigens gelöste Akt1^{WT}-Kristallstruktur mit RL1780 (PDB: 6HHG) als Templat verwendet.^{74,138} Mit Hilfe des Programms WINCOOT wurde in iterativen Zyklen das Modell modifiziert und mit dem Programm PHENIX verfeinert.²⁴⁵⁻²⁴⁷ Für den Einbau des gebundenen Liganden wurde eine Koordinaten- und Topologie-Datei mit Hilfe des Servers PRODRG erstellt.²⁴⁸ Zur Validierung der finalen Kristallstruktur wurde eine Qualitätsüberprüfung mit Hilfe des PDB_REDO Servers durchgeführt. Die Visualisierung der Proteinstrukturen im Komplex mit verschiedenen Inhibitoren und die Strukturanalyse im Rahmen dieser Arbeit erfolgte abschließend mit Hilfe von PyMol.^{249,250}

4.5.3 Kristallisation von c-Kit

Die Vorgehensweise der Kristallisationsstudien von c-Kit entsprechen den in Kapitel 4.5.1 erläuterten Methoden. Für die Ansätze wurden Proteinkonzentrationen von 6.6-8 mg/mL verwendet und die Inkubation der Kristallisationsplatten erfolgte sowohl bei 4 °C als auch bei 12 °C und 20 °C. Das Kristallwachstum konnte nach mehreren Tagen und Wochen beobachtet werden und die Kristalle wurden ohne Verwendung eines Cryoschutzes in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Durchführung der Beugungsexperimente gelagert. Die Datensammlung und -prozessierung wurde ebenfalls wie in Kapitel 4.6.3 durchgeführt, wobei für den molekularen Ersatz die publizierte c-Kit^{WT} Struktur (PDB: 6GQK) verwendet wurde.

Kristallisationsbedingungen c-Kit^{WT}: 10-18 % PEG 8000, 100 mM Tris-Bicine, 100 mM Bicine, pH 8.5-9.5, 6.6-8 mg/mL c-Kit^{WT}, 4 °C, 12 °C und 20 °C.

4.5.3.1 *Soaking*-Experimente

Um eine Diffusion des Liganden in die Bindungstasche des Proteins im Kristall zu erreichen, wurden *Soaking*-Experimente durchgeführt. Dazu wurden die erhaltenen Apo-Kristalle mit Hilfe eines Nylon-Loops aus dem Muttertropfen in einen Tropfen überführt, welcher aus einer 1 mM Inhibitor-Lösung in der jeweiligen Reservoir-Lösung bestand. Die Inkubation erfolgte über verschiedene Zeiträume von 5-60 min bei der jeweiligen Kristallisationstemperatur und der Kristall wurde anschließend wie in Kapitel 4.5.1.2 beschrieben ohne Verwendung einer cryoschützenden Substanz gefischt.

4.6 Zellbiologische Methoden

Die verschiedenen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten humanen und murinen Zelllinien wurden bei 37 °C und bei einer 5 %-igen CO₂-Atmosphäre und einer feuchten Luftumgebung in TC75-Zellkulturflaschen (Sarstedt) kultiviert. Alle Arbeiten und die Verwendung von autoklavierten bzw. sterilen Medien, Puffern und Reagenzien erfolgten unter sterilen Bedingungen. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gegen frisches Medium ausgetauscht und bei Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % eine Subkultivierung der adhären Zellen vorgenommen. Dafür wurde zunächst das Medium entfernt und der Zellrasen mit 10 mL DPBS-Puffer gewaschen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese anschließend mit 2,5 mL einer 0,25 %-igen Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco) für 5 min bei 37 °C behandelt und die Zellen mit 9,5 mL Medium von der Oberfläche der Zellkulturflasche abgewaschen. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen. Die Zellzahlbestimmung und Überprüfung der Viabilität erfolgte über eine Trypanblau-Färbung und entsprechend der Wachstumsgeschwindigkeit wurde ein jeweiliges Split-Verhältnis für die Weiterkultivierung der nächsten Zellpassage gewählt. Für Suspensionszellen, wie die Ba/F3-Zellen, wurde ebenfalls alle 2-3 Tage eine Subkultivierung durch Zentrifugation (1000 rpm, 5 min, Raumtemperatur) und anschließender Verdünnung auf eine Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL vorgenommen. Für die langfristige Lagerung der Zellen bei -150 °C wurden die Zellen ebenfalls mit der 0,25 %-igen Trypsin/EDTA-Lösung behandelt, nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet jedoch in DMSO-enthaltenem Medium (10 % DMSO) aufgenommen und mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ c/mL je 1 mL in Cryoröhrchen überführt. Um eine möglichst langsame und schonende Gefrierung der Zellen zu erreichen, wurden die Cryoröhrchen zunächst in einem *Freezing* Container bei -80 °C über Nacht eingefroren und anschließend bei -150 °C gelagert.

4.6.1 Verwendete Zelllinien

Die im Rahmen dieser Arbeit für die Charakterisierung der verschiedenen Inhibitoren verwendeten Zelllinien, die Zusammensetzung der verwendeten Kultivierungsmedien sowie die Quelle, von welcher die Zelllinien bezogen wurden, sind in Tabelle 4-8 zusammengefasst.

Tabelle 4-8: Übersicht über verwendete humane und murine Zelllinien.

Zelllinie	Medium	Quelle
AN3-CA	MEM GlutaMax, 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech), 1 mM Natriumpyruvat 1X Penicillin-Streptomycin	ATCC, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Jan G. Hengstler
Ba/F3	RPMI-1640 GlutaMax, 10 % FBS Good, EU approved (PAN-Biotech), 10 µg/mL Interleukin-3, 1X Penicillin-Streptomycin	DSMZ, Leibniz-Institut, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Martin Sos
Bo103	DMEM high glucose, GlutaMAX/DMEM/F-12 GlutaMAX (1:1), 1,6 µg/mL Amphotericin B, 10 µM Y-2763, 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	Isolierung der primären Zelllinie im Rahmen des RUCCC, <i>in vitro</i> -Kultivierung und zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Stephan A. Hahn
BT-474	RPMI-1640 GlutaMax, 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech), 10 µg/mL Insulin, 1X Penicillin-Streptomycin	CLS Cell Lines Service, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Jan G. Hengstler
DanG	DMEM high glucose, GlutaMax, 10 % FBS, qualified, Brazil (Gibco), 1X Penicillin-Streptomycin	CLS Cell Lines Service, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Jens T. Siveke
HEK293T	DMEM high glucose, GlutaMax, 10 % FBS Good, EU approved (PAN-Biotech), 1X Penicillin-Streptomycin	ATCC, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Daniel Summerer
HPAF-II	DMEM high glucose, GlutaMax, 10 % FBS, qualified, Brazil (Gibco), 1X Penicillin-Streptomycin	CLS Cell Lines Service, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Jens T. Siveke
KU-19-19	RPMI-1640 GlutaMax, 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech), 1X Penicillin-Streptomycin	DSMZ, Leibniz-Institut
MCF-7	MEM GlutaMax, 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech), 1 mM Natriumpyruvat 1X Penicillin-Streptomycin	CLS Cell Lines Service, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Jan G. Hengstler
T47-D	RPMI-1640 GlutaMax, 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech), 10 µg/mL Insulin, 1X Penicillin-Streptomycin	ECACC, Sigma-Aldrich
ZR-75-1	RPMI-1640 GlutaMax, 10 % FBS Good Forte, EU approved (PAN-Biotech), 1X Penicillin-Streptomycin	ECACC, Sigma-Aldrich

4.6.2 Viabilitätsassay

Um den Einfluss der verschiedenen Inhibitoren auf die Proliferation der verschiedenen Zelllinien und entsprechende EC_{50} -Werte zu bestimmen wurde der CellTiter-Glo Assay (Promega) verwendet. Für die initiale Bestimmung der für die Durchführung des Assays geeigneten Zellzahl wurden die Zellen wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben passagiert und Zellsuspensionen entsprechender Konzentrationen angesetzt, sodass in weißen 384-*well*-Zellkulturplatten (μ Clear, Greiner Bio-One) neben einer Kontrolle durch das Medium Zellzahlen von 50-3200 Zellen/*well* abgedeckt wurden. Je 25 μ L dieser Zellsuspensionen wurden in drei Spalten der 384-*well*-Platten mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Dispensiergeräts (MultiDrop, Thermo Fisher Scientific) pipettiert und diese in einer Feuchtekkammer bei 37 °C und 5 %-iger CO_2 -Atmosphäre für 96-120 Stunden kultiviert. Entsprechend den Herstellerangaben wurde das CTG-Reagenz angesetzt und je 25 μ L des Reagenzes mit einem Mikrotiterplatten-Dispensiergerät zu den Zellen in der 384-*well*-Platte pipettiert. Anschließend wurden die Platten für 2 min bei 1000 rpm geschüttelt und 20 min in einer dunklen Kammer inkubiert. Mit Hilfe eines Mikrotiterplattenlesers (EnVision, Perkin Elmer) wurde das Lumineszenzsignal in den einzelnen Kavitäten vermessen. Die Zellzahl, bei welcher 50 % des maximalen Lumineszenzsignals im linearen Bereich erreicht wurde, wurde als die für den CTG-Assay geeignete Zellzahl gewählt und für die anschließende Testung der verschiedenen Inhibitoren verwendet. Dafür wurde die Zellsuspension mit der entsprechenden Konzentration wie beschrieben in 384-*well*-Platten pipettiert und über Nacht bei 37 °C und 5 %-iger CO_2 -Atmosphäre kultiviert. Mit Hilfe eines akustischen Tröpfchendispenziergeräts (Echo 520 Liquid Handler, Labcyte) wurde eine Konzentrationsreihe der jeweiligen Inhibitor-Lösung bestehend aus acht Datenpunkten von 0,1 nM-30 μ M in Duplikaten zu den Zellen in der 384-*well*-Platte pipettiert. Zusätzlich wurden als negative und positive Kontrolle je 16 *wells* mit DMSO und 30 μ M Staurosporin versetzt. Nach 96-stündiger Inkubation bei 37 °C und 5 %-iger CO_2 -Atmosphäre wurde das Lumineszenzsignal nach Herstellerangaben wie beschrieben ausgelesen. Für die Analyse der Daten wurde die Quattro Software Suite verwendet, wobei das Lumineszenzsignal auf die Kontrollen normalisiert wurde und mit Hilfe einer 4-Parameter logistischen Funktion (Gleichung 1) der jeweilige EC_{50} -Wert bestimmt.

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

A_1 : Mittelwert der DMSO-Kontrolle, A_2 : Mittelwert der Staurosporin-Kontrolle, x : Konzentration des Liganden, x_0 : Wendepunkt (EC_{50} -Wert), p : Hill-Koeffizient.

4.6.3 *In vitro* pharmakodynamische Untersuchungen

4.6.3.1 Verwendete Antikörper

Die für die *in vitro*-Pharmakodynamik-Studien verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 4-9 zusammengefasst.

Tabelle 4-9: Übersicht über verwendete primäre und sekundäre Antikörper.

Epitop	Produkt-Nr.	Spezies	Hersteller
Primäre Antikörper:			
p4E-BP1 ^{S65}	#13443	Hase	Cell Signaling Technology
β-Actin	A5441	Maus	Sigma-Aldrich
pAkt ^{T308}	#9275	Hase	Cell Signaling Technology
pAkt ^{S473}	#4060	Hase	Cell Signaling Technology
total-Akt	#2920	Maus	Cell Signaling Technology
total-Akt1	#2938	Hase	Cell Signaling Technology
total-Akt ^{E17K}	#14702	Hase	Cell Signaling Technology
pErk1/2 ^{T202/Y204}	#4370	Hase	Cell Signaling Technology
PARP	#9542	Hase	Cell Signaling Technology
pPRAS40 ^{T246}	#2997	Hase	Cell Signaling Technology
pS6 ^{S235/236}	#4858	Hase	Cell Signaling Technology
Sekundäre Antikörper:			
Anti-Maus IgG, DyLight 680 Conjugate	#5470	Ziege	Cell Signaling Technology
Anti-Hase IgG, DyLight 800 4X PEG Conjugate	#5151	Ziege	Cell Signaling Technology

4.6.3.2 Generierung der Zelllysate

Die Validierung der Inhibition von Akt1 wurde in *in vitro* pharmakodynamischen Studien mittels Western Blot-Analyse erhalten. Für die Generierung der Zelllysate wurde nach dem Trypsinieren die Zellzahl bestimmt und die Zellen je nach Zelllinie mit einer Zellzahl von $5-8 \cdot 10^5$ Zellen/*well* in 6-*well*-TC-Platten (Sarstedt) in einem Volumen von 2,5 mL ausplattiert und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % kultiviert. Für die Behandlung der Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor wurden Inhibitor-Lösungen in DMSO

angesetzt, welche 10-fach höher konzentriert als die zu testende Konzentration waren. Zu den 2,5 mL Medium wurden je 2,5 µL der Inhibitor-Lösung entsprechender Konzentration zugegeben und die Zellen für 2-24 Stunden bei 37 °C im CO₂-Inkubator inkubiert. Um insbesondere die Aktivität von Proteasen und Phosphatasen während der anschließenden Zelllyse zu mindern, wurden alle weiteren Arbeitsschritte stets auf Eis und nicht mehr unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Nach dem Absaugen des Medium wurde der Zellrasen zunächst zweimal mit eiskaltem DPBS-Puffer (2 mL) gewaschen, 100 µL RIPA-Puffer (Cell Signaling Technologies) versetzt mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor Cocktail Tabletten (Roche) auf den Zellrasen pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der *well*-Oberfläche abgekratzt und in ein vorgekühltes 1,5 mL-Eppendorfgefäß überführt. Nach Zentrifugation bei 14000 g für 10 min bei 4 °C wurde der Überstand erneut in ein neues, vorgekühltes Eppendorfgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.6.3.3 Isolierung der Tumor-Zelllysate

Für die Isolierung von Zelllysaten aus Tumorgewebe wurden mit einem sterilen Skalpell Tumorstücke eines Gewichts von 30-50 mg von den bei -80 °C gelagerten Tumoren in einer gekühlten Mörserschale auf Trockeneis abgetrennt und in gekühlte Lysematrix D-Gefäße (MP Biomedicals) überführt. Alle Arbeiten wurden unter Kühlung auf Trockeneis durchgeführt. Zu jeweils 1 mg Tumorgewebe wurden 10 µL RIPA-Puffer (versetzt mit Protease- und Phosphatase-Inhibitor, Roche) gegeben und die Zellen mit einer Kugelmühle (6 m/s, 1 min) lysiert. Nach Zentrifugation des Lysats in den Lysematrix-Gefäßen bei 4 °C, 14000 g für 10 min wurde der Überstand in ein neues und gekühltes Eppendorf-Gefäß überführt. Dieses Lysat wurde erneut für 10 min bei 4 °C und 14000 g zentrifugiert und der Überstand ebenfalls in ein gekühltes Eppendorf-Gefäß pipettiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.6.3.4 Western Blots

Nach dem raschen Auftauen der Proteinlösungen wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe des *BCA Protein Assay Kits* (Pierce, Thermo Fisher Scientific) bestimmt und die Proteinkonzentration durch Zugabe von SDS-Probenpuffer und autoklaviertem Wasser auf 1 mg/mL eingestellt. Die Proteine wurden bei 95 °C denaturiert und vor dem Beladen des 12 %-igen SDS-Gels bei 21000 g für 5 min runterzentrifugiert. Die Taschen des SDS-Gels wurde mit 10-15 µg der Proteinlösung des Überstands beladen und die Proteine über eine SDS-Gelelektrophorese bei einer Stromstärke von 40 mA pro Gel getrennt. Mit Hilfe einer Powerstation (Pierce, Thermo Fisher Scientific) wurde ein *semi dry*-Transfer der Proteine bei einer Spannung von 25 V auf eine PVDF-Membran (Immobilon-FL, Merck Millipore) erreicht, wobei sowohl das Filterpapier als auch die PVDF-Membran zuvor im Transferpuffer für mindestens 5 min äquilibriert wurden. Zuvor wurde die PVDF-Membran außerdem kurz in Methanol und anschließend ddH₂O getaucht. Nach dem Transfer wurde die Membran für 5 min in ddH₂O gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur unter

leichtem Schütteln mit Blockierungspuffer (*Intercept Blocking Buffer*, LI-COR Biosciences) inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit 5 mL TBS-T-Puffer gewaschen und mit einer primären Antikörper-Lösung (s. Tabelle 4-9) in der entsprechenden Verdünnung im Blockierungspuffer über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T-Puffer gewaschen und für 1 h bei Raumtemperatur mit der sekundären Antikörper-Lösung (s. Tabelle 4-9) inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift mit TBS-T-Puffer wurden die Fluoreszenz-markierten Proteine auf der Membran mit Hilfe eines Fluoreszenzlesers (Odyssey CLx Imaging System, LI-COR Biosciences) detektiert. Die Durchführung des PathScan Akt Signaling-Assays (Cell Signaling Technology) erfolgte nach den Herstellerangaben.* Für die Quantifizierung der Western Blots wurde die Software Image Studio Lite (LI-COR Biosciences) verwendet. Die Intensitäten der jeweiligen Banden wurden dabei auf das *housekeeping*-Protein β -Actin derselben Bahn und anschließend auf die DMSO-Kontrolle normalisiert.

Transferpuffer: 336 mM Tris, 260 mM Glycin, 140 mM Tricin, 2,5 mM EDTA

TBS-T-Puffer: 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20, pH 7.4

4.6.3.5 *Wash-out*-Experimente[†]

Zur Bestimmung der Halbwertszeit der Desphosphorylierung von Akt in *wash-out*-Experimenten wurden die Zellen in TC100-Zellkulturplatten (Sarstedt) und nach Erreichen einer 60-70 %-igen Konfluenz mit dem entsprechenden Inhibitor für 24 Stunden behandelt. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit DPBS-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von frischem Kultivierungsmedium ohne Inhibitor wurden die Zellen bis zu 48 Stunden weiterkultiviert, wobei innerhalb dieses Zeitraumes Zelllysate zu unterschiedlichen Zeitpunkten wie in Kapitel 4.6.3.2 beschrieben generiert wurden. Jeweils 15 min vor der Zelllyse wurden die Zellen dabei mit 100 ng/mL EGF (PeproTech) stimuliert. Die generierten Zelllysate wurden wie in Kapitel 4.6.3.4 beschrieben per Western Blot analysiert.

4.6.4 Retrovirale Transduktion muriner Ba/F3-Zellen

4.6.4.1 Virusgenerierung

Zur Generierung des Retrovirus für die retrovirale Transduktion muriner Ba/F3-Zellen wurde zunächst eine transiente Transfektion der humanen embryonalen Nierenzelllinie HEK293T durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in TC60-Zellkulturplatten (Sarstedt) kultiviert und bei Erreichen einer ca. 70 %-igen Konfluenz mit dem Transfektionsansatz entsprechend der Herstellerangaben behandelt, wobei zunächst 2,5 μ g des

* Durchführung der PathScan-Experimente durch Dr. Marija Trajkovic-Arsic (AG J. Siveke, Westdeutsches Tumorzentrum, Universitätsklinikum Essen).

† Durchführung der *Wash-out*-Experimente durch Dr. Christoph Reintjes (AG S. Hahn, Ruhr-Universität Bochum).

entsprechenden retroviralen pBABE-Transfervektors und 2,5 µg des Verpackungsplasmids pCL-Eco (Novus Biologicals) mit 250 µL OptiMEM-Medium (Gibco) in einem sterilen Eppendorfgefäß vermischt wurden. Nach Zugabe von 7,5 µL des TransIT-LT1 Transfektionsreagenz (Mirus Bio LLC) erfolgte eine 20-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Der Transfektionsansatz wurde anschließend tropfenweise zum Medium (5 mL) auf den HEK293T-Zellrasen pipettiert und die Zellen für 72 Stunden im CO₂-Inkubator bei 37 °C inkubiert. Zur Virusernte wurde das Virus-enhaltene Medium abgenommen und bei 40 g und Raumtemperatur für 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde filtriert (0,45 µm Spritzenvorsatzfilter, Sarstedt) und bis zur weiteren Verwendung für wenige Tage lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

4.6.4.2 Retrovirale Infektion von Ba/F3-Zellen

Mit dem generierten Retrovirus wurden im nächsten Schritt die Ba/F3-Zellen infiziert und somit eine Integration des Gens in das Genom der Zellen erreicht. Dafür wurden die Ba/F3-Zellen auf eine Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/mL in 1 mL Infektionsmedium, welches zusätzlich 40 % FBS und 8 µg/mL des polykationischen Infektionsreagenz Polybren (Merck Millipore) zur Erhöhung der retroviralen Gentransfer-Effizienz enthielt, in einer TC25-Zellkulturflasche (Sarstedt) verdünnt und mit 2,5 mL des Retrovirus versetzt. Nach 18-stündiger Inkubation im CO₂-Inkubator bei 37 °C wurde der Infektionsansatz durch Zugabe von 5 mL des Kultivierungsmediums mit 10 ng/mL Interleukin 3 (IL-3) weiter verdünnt. Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde anschließend nach weiteren 24 Stunden das Medium ausgetauscht, wobei das Selektionsmedium 1 µg/mL das Antibiotikum Puromycin enthielt. Die Selektion mit Puromycin erfolgte dabei über einen Zeitraum von fünf Tagen. Um anschließend eine Abhängigkeit des Zellwachstums anstelle des von IL-3-induzierten Signalweges durch des vom eingebrachten Gen zu erreichen, wurde über einen Zeitraum von zwei Wochen die IL-3-Zugabe im Kultivierungsmedium schrittweise von 10 ng/mL auf 5, 2,5 und 1 ng/mL bis zur vollständigen Abwesenheit reduziert. Bei erfolgreich erreichter Abhängigkeit der Zellen vom Onkogen erfolgte die Weiterkultivierung ohne Zugabe von IL-3 wobei die transduzierten Zellen alle zwei bis drei Tage auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL in TC75-Zellkulturflaschen (Sarstedt) passagiert wurden.

4.6.4.3 Genomisolierung und -sequenzierung

Um die erfolgreiche Einbringung des gewünschten Gens in das Genom der Ba/F3-Zellen überprüfen zu können, wurde zunächst die genomische DNA mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (Qiagen) isoliert. Zur Amplifikation des Gensinserts wurde anschließend eine PCR mit der in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Experimentvorschrift durchgeführt. Nach Aufreinigung der DNA mit Hilfe des QIAquick DNA Purification Kit (Qiagen) wurde die Einbringung des Zielgens mit einer DNA-Sequenzierung durch Eurofins Genomics verifiziert.

4.7 *In vivo*-Studien mit PDX-Modellen

Die Arbeiten der *in vivo*-Studien mit Hilfe der PDX-Modelle erfolgte durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan A. Hahn unter Genehmigung des Ethik-Komitees der Ruhr-Universität Bochum (Registrierungsnummer: 3534-09, 3841-10, 16-5792). Das entsprechende Pankreas- und Kolonkarzinomgewebe wurde im Rahmen des Ruhr-Universität Comprehensive Cancer Centers (RUCCC) operativ nach dem Einverständnis der Patienten entnommen und Tumorstücke einer Größe von 1-2 mm in Matrigel (Becton Dickinson) gelagert. Nach 15-30 min Einweichzeit wurden die Tumore subkutan in 5-10 Wochen alte NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}-Mäuse implantiert. Zur Erhaltung der Mauskohorten zur Behandlung mit Borussertib und Trametinib wurden die Tumorstücke früher Passagen (\leq F5-Generation) ebenfalls in NMRI-Foxn1^{nu}/Foxn1^{nu}-Mäuse implantiert und die Behandlung nach Erreichen eines Tumolvolumens von 100-200 mm³ begonnen. Dabei wurden die Mäuse in Gruppen von jeweils 3-4 Mäusen der Kontroll- und Behandlungskohorte eingeteilt. Die Behandlung mit 0,5 mg/kg p.o. Trametinib erfolgte an 5 Tagen die Woche jeweils einmal täglich, während 20 mg/kg i.p. Borussertib einmal täglich über 7 Tage die Woche verabreicht wurde. Das Volumen der Tumore wurde an drei Tagen der Woche durch eine Messung der Länge und Breite bestimmt und durch die Formel $V = (Länge \times Breite^2)/2$ dokumentiert. Entsprechend der RECIST 1.1 Kriterien wurde die Reduktion bzw. das Wachstum des Tumolvolumens eingeordnet.

5 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 WHO Statistiken Cancer Today, gco.iarc.fr/today/home. **Stand: 20.10.2020.**
- 2 Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A. ; Jemal, A., 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.
- 3 Nguyen, D. ; Gocke, C. D., Managing the genomic revolution in cancer diagnostics. *Virchows Arch* **2017**, *471*, 175-194.
- 4 Seyhan, A. A. ; Carini, C., Are innovation and new technologies in precision medicine paving a new era in patients centric care? *J Transl Med* **2019**, *17*, 114.
- 5 Padma, V. V., An overview of targeted cancer therapy. *Biomedicine (Taipei)* **2015**, *5*, 19.
- 6 Schilsky, R. L., Personalized medicine in oncology: the future is now. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9*, 363-366.
- 7 Lander, E. S.; Linton, L. M.; Birren, B.; Nusbaum, C.; Zody, M. C.; Baldwin, J.; Devon, K.; Dewar, K.; Doyle, M.; FitzHugh, W.; Funke, R.; Gage, D.; Harris, K.; Heaford, A.; Howland, J.; Kann, L.; Lehoczky, J.; LeVine, R.; McEwan, P.; McKernan, K.; Meldrim, J.; Mesirov, J. P.; Miranda, C.; Morris, W.; Naylor, J.; Raymond, C.; Rosetti, M.; Santos, R.; Sheridan, A.; Sougnez, C.; Stange-Thomann, Y.; Stojanovic, N.; Subramanian, A.; Wyman, D.; Rogers, J.; Sulston, J.; Ainscough, R.; Beck, S.; Bentley, D.; Burton, J.; Clee, C.; Carter, N.; Coulson, A.; Deadman, R.; Deloukas, P.; Dunham, A.; Dunham, I.; Durbin, R.; French, L.; Grafham, D. *et al.*, Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **2001**, *409*, 860-921.
- 8 Gregory, S. G.; Barlow, K. F.; McLay, K. E.; Kaul, R.; Swarbreck, D.; Dunham, A.; Scott, C. E.; Howe, K. L.; Woodfine, K.; Spencer, C. C.; Jones, M. C.; Gillson, C.; Searle, S.; Zhou, Y.; Kokocinski, F.; McDonald, L.; Evans, R.; Phillips, K.; Atkinson, A.; Cooper, R.; Jones, C.; Hall, R. E.; Andrews, T. D.; Lloyd, C.; Ainscough, R.; Almeida, J. P.; Ambrose, K. D.; Anderson, F.; Andrew, R. W.; Ashwell, R. I.; Aubin, K.; Babbage, A. K.; Bagguley, C. L.; Bailey, J.; Beasley, H.; Bethel, G.; Bird, C. P.; Bray-Allen, S.; Brown, J. Y.; Brown, A. J.; Buckley, D.; Burton, J.; Bye, J.; Carder, C.; Chapman, J. C.; Clark, S. Y.; Clarke, G.; Clee, C.; Cobley, V.; Collier, R. E. *et al.*, The DNA sequence and biological annotation of human chromosome 1. *Nature* **2006**, *441*, 315-321.
- 9 Vogelstein, B. ; Kinzler, K. W., Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* **2004**, *10*, 789-799.
- 10 Ginsburg, G. S. ; Phillips, K. A., Precision Medicine: From Science To Value. *Health Aff (Millwood)* **2018**, *37*, 694-701.
- 11 Weinstein, I. B., Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* **2002**, *297*, 63-64.
- 12 Li, Y.; Zhang, Y.; Li, X.; Yi, S. ; Xu, J., Gain-of-Function Mutations: An Emerging Advantage for Cancer Biology. *Trends Biochem Sci* **2019**, *44*, 659-674.
- 13 Tabin, C. J.; Bradley, S. M.; Bargmann, C. I.; Weinberg, R. A.; Papageorge, A. G.; Scolnick, E. M.; Dhar, R.; Lowy, D. R. ; Chang, E. H., Mechanism of activation of a human oncogene. *Nature* **1982**, *300*, 143-149.

-
- 14 Weinberg, R. A., Tumor suppressor genes. *Science* **1991**, *254*, 1138-1146.
 - 15 Sharma, S. V.; Fischbach, M. A.; Haber, D. A. ; Settleman, J., "Oncogenic shock": explaining oncogene addiction through differential signal attenuation. *Clin Cancer Res* **2006**, *12*, 4392s-4395s.
 - 16 Sharma, S. V. ; Settleman, J., Oncogenic shock: turning an activated kinase against the tumor cell. *Cell Cycle* **2006**, *5*, 2878-2880.
 - 17 Hoelder, S.; Clarke, P. A. ; Workman, P., Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities. *Mol Oncol* **2012**, *6*, 155-176.
 - 18 Hanahan, D. ; Weinberg, R. A., Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
 - 19 Hanahan, D. ; Weinberg, R. A., The hallmarks of cancer. *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
 - 20 Eifert, C. ; Powers, R. S., From cancer genomes to oncogenic drivers, tumour dependencies and therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 572-578.
 - 21 Ransohoff, D. F., Cancer. Developing molecular biomarkers for cancer. *Science* **2003**, *299*, 1679-1680.
 - 22 Nalejska, E.; Maczynska, E. ; Lewandowska, M. A., Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology. *Mol Diagn Ther* **2014**, *18*, 273-284.
 - 23 Conte, B. ; Kopetz, S., Challenges and strategies for identifying biomarkers for colorectal cancer. *Colorectal Cancer* **2013**, *2*, 487-489.
 - 24 Seoane, J. ; De Mattos-Arruda, L., The challenge of intratumour heterogeneity in precision medicine. *J Intern Med* **2014**, *276*, 41-51.
 - 25 Hu, Z. Z.; Huang, H.; Wu, C. H.; Jung, M.; Dritschilo, A.; Riegel, A. T. ; Wellstein, A., Omics-based molecular target and biomarker identification. *Methods Mol Biol* **2011**, *719*, 547-571.
 - 26 Smyth, L. M.; Zhou, Q.; Nguyen, B.; Yu, C.; Lepisto, E. M.; Arnedos, M.; Hasset, M. J.; Lenoue-Newton, M. L.; Blauvelt, N.; Dogan, S.; Micheel, C. M.; Wathoo, C.; Horlings, H.; Hudecek, J.; Gross, B. E.; Kundra, R.; Sweeney, S. M.; Gao, J.; Schultz, N.; Zarski, A.; Gardos, S. M.; Lee, J.; Sheffler-Collins, S.; Park, B. H.; Sawyers, C. L.; Andre, F.; Levy, M.; Meric-Bernstam, F.; Bedard, P. L.; Iasonos, A.; Schrag, D.; Hyman, D. M. ; Consortium, A. P. G., Characteristics and Outcome of AKT1 (E17K)-Mutant Breast Cancer Defined through AACR Project GENIE, a Clinicogenomic Registry. *Cancer Discov* **2020**, *10*, 526-535.
 - 27 Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T. ; Sudarsanam, S., The protein kinase complement of the human genome. *Science* **2002**, *298*, 1912-1934.
 - 28 Cohen, P., Protein kinases--the major drug targets of the twenty-first century? *Nat Rev Drug Discov* **2002**, *1*, 309-315.
 - 29 Iqbal, N. ; Iqbal, N., Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemother Res Pract* **2014**, *2014*, 357027.
 - 30 Kantarjian, H.; O'Brien, S.; Jabbour, E.; Garcia-Manero, G.; Quintas-Cardama, A.; Shan, J.; Rios, M. B.; Ravandi, F.; Faderl, S.; Kadia, T.; Borthakur, G.; Huang, X.; Champlin, R.; Talpaz, M. ; Cortes, J., Improved survival in chronic myeloid leukemia since the introduction of imatinib therapy: a single-institution historical experience. *Blood* **2012**, *119*, 1981-1987.

- 31 Druker, B. J.; Tamura, S.; Buchdunger, E.; Ohno, S.; Segal, G. M.; Fanning, S.; Zimmermann, J.; Lydon, N. B., Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* **1996**, *2*, 561-566.
- 32 Demetri, G. D.; von Mehren, M.; Blanke, C. D.; Van den Abbeele, A. D.; Eisenberg, B.; Roberts, P. J.; Heinrich, M. C.; Tuveson, D. A.; Singer, S.; Janicek, M.; Fletcher, J. A.; Silverman, S. G.; Silberman, S. L.; Capdeville, R.; Kiese, B.; Peng, B.; Dimitrijevic, S.; Druker, B. J.; Corless, C.; Fletcher, C. D.; Joensuu, H., Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* **2002**, *347*, 472-480.
- 33 Blanke, C. D.; Demetri, G. D.; von Mehren, M.; Heinrich, M. C.; Eisenberg, B.; Fletcher, J. A.; Corless, C. L.; Fletcher, C. D.; Roberts, P. J.; Heinz, D.; Wehre, E.; Nikolova, Z.; Joensuu, H., Long-term results from a randomized phase II trial of standard- versus higher-dose imatinib mesylate for patients with unresectable or metastatic gastrointestinal stromal tumors expressing KIT. *J Clin Oncol* **2008**, *26*, 620-625.
- 34 Verweij, J.; Casali, P. G.; Zalcberg, J.; LeCesne, A.; Reichardt, P.; Blay, J. Y.; Issels, R.; van Oosterom, A.; Hogendoorn, P. C.; Van Glabbeke, M.; Bertulli, R.; Judson, I., Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumours with high-dose imatinib: randomised trial. *Lancet* **2004**, *364*, 1127-1134.
- 35 Heinrich, M. C.; Corless, C. L.; Demetri, G. D.; Blanke, C. D.; von Mehren, M.; Joensuu, H.; McGreevey, L. S.; Chen, C. J.; Van den Abbeele, A. D.; Druker, B. J.; Kiese, B.; Eisenberg, B.; Roberts, P. J.; Singer, S.; Fletcher, C. D.; Silberman, S.; Dimitrijevic, S.; Fletcher, J. A., Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol* **2003**, *21*, 4342-4349.
- 36 Emile, J. F.; Brahimi, S.; Coindre, J. M.; Binguier, P. P.; Monges, G.; Samb, P.; Doucet, L.; Hostein, I.; Landi, B.; Buisine, M. P.; Neuville, A.; Bouche, O.; Cervera, P.; Pretet, J. L.; Tisserand, J.; Gauthier, A.; Le Cesne, A.; Sabourin, J. C.; Scoazec, J. Y.; Bonvalot, S.; Corless, C. L.; Heinrich, M. C.; Blay, J. Y.; Aegerter, P., Frequencies of KIT and PDGFRA mutations in the MolecGIST prospective population-based study differ from those of advanced GISTs. *Med Oncol* **2012**, *29*, 1765-1772.
- 37 Sawyers, C. L.; Hochhaus, A.; Feldman, E.; Goldman, J. M.; Miller, C. B.; Ottmann, O. G.; Schiffer, C. A.; Talpaz, M.; Guilhot, F.; Deininger, M. W.; Fischer, T.; O'Brien, S. G.; Stone, R. M.; Gambacorti-Passerini, C. B.; Russell, N. H.; Reiffers, J. J.; Shea, T. C.; Chapuis, B.; Coutre, S.; Tura, S.; Morra, E.; Larson, R. A.; Saven, A.; Peschel, C.; Gratwohl, A.; Mandelli, F.; Ben-Am, M.; Gathmann, I.; Capdeville, R.; Paquette, R. L.; Druker, B. J., Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* **2002**, *99*, 3530-3539.
- 38 Heinrich, M. C.; Corless, C. L.; Blanke, C. D.; Demetri, G. D.; Joensuu, H.; Roberts, P. J.; Eisenberg, B. L.; von Mehren, M.; Fletcher, C. D.; Sandau, K.; McDougall, K.; Ou, W. B.; Chen, C. J.; Fletcher, J. A., Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol* **2006**, *24*, 4764-4774.
- 39 Demetri, G. D.; van Oosterom, A. T.; Garrett, C. R.; Blackstein, M. E.; Shah, M. H.; Verweij, J.; McArthur, G.; Judson, I. R.; Heinrich, M. C.; Morgan, J. A.; Desai, J.; Fletcher, C. D.; George, S.; Bello, C. L.; Huang, X.; Baum, C. M.; Casali, P. G., Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal

- tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial. *Lancet* **2006**, *368*, 1329-1338.
- 40 Rabiller, M.; Getlik, M.; Kluter, S.; Richters, A.; Tuckmantel, S.; Simard, J. R. ; Rauh, D., Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases. *Arch Pharm (Weinheim)* **2010**, *343*, 193-206.
- 41 Ferguson, F. M. ; Gray, N. S., Kinase inhibitors: the road ahead. *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17*, 353-377.
- 42 Vivanco, I. ; Sawyers, C. L., The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2002**, *2*, 489-501.
- 43 Nitulescu, G. M.; Margina, D.; Juzenas, P.; Peng, Q.; Olaru, O. T.; Saloustros, E.; Fenga, C.; Spandidos, D.; Libra, M. ; Tsatsakis, A. M., Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *Int J Oncol* **2016**, *48*, 869-885.
- 44 Manning, B. D. ; Toker, A., AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **2017**, *169*, 381-405.
- 45 Gonzalez, E. ; McGraw, T. E., The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell Cycle* **2009**, *8*, 2502-2508.
- 46 Quambusch, L.; Landel, I.; Depta, L.; Weisner, J.; Uhlenbrock, N.; Muller, M. P.; Glanemann, F.; Althoff, K.; Siveke, J. T. ; Rauh, D., Covalent-Allosteric Inhibitors to Achieve Akt Isoform-Selectivity. *Angew Chem Int Ed Engl* **2019**, *58*, 18823-18829.
- 47 Manning, B. D. ; Cantley, L. C., AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **2007**, *129*, 1261-1274.
- 48 Vanhaesebroeck, B. ; Alessi, D. R., The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem J* **2000**, *346 Pt 3*, 561-576.
- 49 Milburn, C. C.; Deak, M.; Kelly, S. M.; Price, N. C.; Alessi, D. R. ; Van Aalten, D. M., Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *Biochem J* **2003**, *375*, 531-538.
- 50 Alessi, D. R.; Andjelkovic, M.; Caudwell, B.; Cron, P.; Morrice, N.; Cohen, P. ; Hemmings, B. A., Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* **1996**, *15*, 6541-6551.
- 51 Sarbassov, D. D.; Guertin, D. A.; Ali, S. M. ; Sabatini, D. M., Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* **2005**, *307*, 1098-1101.
- 52 Arcaro, A. ; Guerreiro, A. S., The phosphoinositide 3-kinase pathway in human cancer: genetic alterations and therapeutic implications. *Curr Genomics* **2007**, *8*, 271-306.
- 53 Chalhoub, N. ; Baker, S. J., PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annu Rev Pathol* **2009**, *4*, 127-150.
- 54 Andjelkovic, M.; Jakubowicz, T.; Cron, P.; Ming, X. F.; Han, J. W. ; Hemmings, B. A., Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1996**, *93*, 5699-5704.

- 55 Gao, T.; Furnari, F. ; Newton, A. C., PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* **2005**, *18*, 13-24.
- 56 Jiang, N.; Dai, Q.; Su, X.; Fu, J.; Feng, X. ; Peng, J., Role of PI3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Mol Biol Rep* **2020**, *47*, 4587-4629.
- 57 Mundi, P. S.; Sachdev, J.; McCourt, C. ; Kalinsky, K., AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *Br J Clin Pharmacol* **2016**, *82*, 943-956.
- 58 Polivka, J., Jr. ; Janku, F., Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol Ther* **2014**, *142*, 164-175.
- 59 Lazaro, G.; Kostaras, E. ; Vivanco, I., Inhibitors in AKTion: ATP-competitive vs allosteric. *Biochem Soc Trans* **2020**, *48*, 933-943.
- 60 Carpten, J. D.; Faber, A. L.; Horn, C.; Donoho, G. P.; Briggs, S. L.; Robbins, C. M.; Hostetter, G.; Boguslawski, S.; Moses, T. Y.; Savage, S.; Uhlik, M.; Lin, A.; Du, J.; Qian, Y. W.; Zeckner, D. J.; Tucker-Kellogg, G.; Touchman, J.; Patel, K.; Mousses, S.; Bittner, M.; Schevitz, R.; Lai, M. H.; Blanchard, K. L. ; Thomas, J. E., A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **2007**, *448*, 439-444.
- 61 Kim, M. S.; Jeong, E. G.; Yoo, N. J. ; Lee, S. H., Mutational analysis of oncogenic AKT E17K mutation in common solid cancers and acute leukaemias. *Br J Cancer* **2008**, *98*, 1533-1535.
- 62 Yi, K. H. ; Lauring, J., Recurrent AKT mutations in human cancers: functional consequences and effects on drug sensitivity. *Oncotarget* **2016**, *7*, 4241-4251.
- 63 Hyman, D. M.; Smyth, L. M.; Donoghue, M. T. A.; Westin, S. N.; Bedard, P. L.; Dean, E. J.; Bando, H.; El-Khoueiry, A. B.; Perez-Fidalgo, J. A.; Mita, A.; Schellens, J. H. M.; Chang, M. T.; Reichel, J. B.; Bouvier, N.; Selcuklu, S. D.; Soumerai, T. E.; Torrisi, J.; Erinjeri, J. P.; Ambrose, H.; Barrett, J. C.; Dougherty, B.; Foxley, A.; Lindemann, J. P. O.; McEwen, R.; Pass, M.; Schiavon, G.; Berger, M. F.; Chandralapaty, S.; Solit, D. B.; Banerji, U.; Baselga, J. ; Taylor, B. S., AKT Inhibition in Solid Tumors With AKT1 Mutations. *J Clin Oncol* **2017**, *35*, 2251-2259.
- 64 Lindhurst, M. J.; Sapp, J. C.; Teer, J. K.; Johnston, J. J.; Finn, E. M.; Peters, K.; Turner, J.; Cannons, J. L.; Bick, D.; Blakemore, L.; Blumhorst, C.; Brockmann, K.; Calder, P.; Cherman, N.; Deardorff, M. A.; Everman, D. B.; Golas, G.; Greenstein, R. M.; Kato, B. M.; Keppler-Noreuil, K. M.; Kuznetsov, S. A.; Miyamoto, R. T.; Newman, K.; Ng, D.; O'Brien, K.; Rothenberg, S.; Schwartzenruber, D. J.; Singhal, V.; Tirabosco, R.; Upton, J.; Wientroub, S.; Zackai, E. H.; Hoag, K.; Whitewood-Neal, T.; Robey, P. G.; Schwartzberg, P. L.; Darling, T. N.; Tosi, L. L.; Mullikin, J. C. ; Biesecker, L. G., A mosaic activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome. *N Engl J Med* **2011**, *365*, 611-619.
- 65 Yu, Y.; Savage, R. E.; Eathiraj, S.; Meade, J.; Wick, M. J.; Hall, T.; Abbadessa, G. ; Schwartz, B., Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT Pathway with an Allosteric AKT Inhibitor, ARQ 092. *PLoS One* **2015**, *10*, e0140479.
- 66 Bellacosa, A.; de Feo, D.; Godwin, A. K.; Bell, D. W.; Cheng, J. Q.; Altomare, D. A.; Wan, M.; Dubeau, L.; Scambia, G.; Masciullo, V.; Ferrandina, G.; Benedetti Panici, P.; Mancuso, S.; Neri, G. ; Testa, J. R., Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer* **1995**, *64*, 280-285.

- 67 Ruggeri, B. A.; Huang, L.; Wood, M.; Cheng, J. Q. ; Testa, J. R., Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol Carcinog* **1998**, *21*, 81-86.
- 68 West, K. A.; Castillo, S. S. ; Dennis, P. A., Activation of the PI3K/Akt pathway and chemotherapeutic resistance. *Drug Resist Updat* **2002**, *5*, 234-248.
- 69 Wang, Z.; Huang, Y. ; Zhang, J., Molecularly targeting the PI3K-Akt-mTOR pathway can sensitize cancer cells to radiotherapy and chemotherapy. *Cell Mol Biol Lett* **2014**, *19*, 233-242.
- 70 Tolcher, A. W.; Khan, K.; Ong, M.; Banerji, U.; Papadimitrakopoulou, V.; Gandara, D. R.; Patnaik, A.; Baird, R. D.; Olmos, D.; Garrett, C. R.; Skolnik, J. M.; Rubin, E. H.; Smith, P. D.; Huang, P.; Learoyd, M.; Shannon, K. A.; Morosky, A.; Tetteh, E.; Jou, Y. M.; Papadopoulos, K. P.; Moreno, V.; Kaiser, B.; Yap, T. A.; Yan, L. ; de Bono, J. S., Antitumor activity in RAS-driven tumors by blocking AKT and MEK. *Clin Cancer Res* **2015**, *21*, 739-748.
- 71 Arencibia, J. M.; Pastor-Flores, D.; Bauer, A. F.; Schulze, J. O. ; Biondi, R. M., AGC protein kinases: from structural mechanism of regulation to allosteric drug development for the treatment of human diseases. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1834*, 1302-1321.
- 72 Hanada, M.; Feng, J. ; Hemmings, B. A., Structure, regulation and function of PKB/AKT--a major therapeutic target. *Biochim Biophys Acta* **2004**, *1697*, 3-16.
- 73 Song, G.; Ouyang, G. ; Bao, S., The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* **2005**, *9*, 59-71.
- 74 Wu, W. I.; Voegtli, W. C.; Sturgis, H. L.; Dizon, F. P.; Vigers, G. P. ; Brandhuber, B. J., Crystal structure of human AKT1 with an allosteric inhibitor reveals a new mode of kinase inhibition. *PLoS One* **2010**, *5*, e12913.
- 75 Taylor, S. S. ; Kornev, A. P., Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem Sci* **2011**, *36*, 65-77.
- 76 Bhullar, K. S.; Lagaron, N. O.; McGowan, E. M.; Parmar, I.; Jha, A.; Hubbard, B. P. ; Rupasinghe, H. P. V., Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Mol Cancer* **2018**, *17*, 48.
- 77 Heerding, D. A.; Rhodes, N.; Leber, J. D.; Clark, T. J.; Keenan, R. M.; Lafrance, L. V.; Li, M.; Safonov, I. G.; Takata, D. T.; Venslavsky, J. W.; Yamashita, D. S.; Choudhry, A. E.; Copeland, R. A.; Lai, Z.; Schaber, M. D.; Tummino, P. J.; Strum, S. L.; Wood, E. R.; Duckett, D. R.; Eberwein, D.; Knick, V. B.; Lansing, T. J.; McConnell, R. T.; Zhang, S.; Minthorn, E. A.; Concha, N. O.; Warren, G. L. ; Kumar, R., 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.
- 78 Crouthamel, M. C.; Kahana, J. A.; Korenchuk, S.; Zhang, S. Y.; Sundaresan, G.; Eberwein, D. J.; Brown, K. K. ; Kumar, R., Mechanism and management of AKT inhibitor-induced hyperglycemia. *Clin Cancer Res* **2009**, *15*, 217-225.
- 79 Addie, M.; Ballard, P.; Buttar, D.; Crafter, C.; Currie, G.; Davies, B. R.; Debreczeni, J.; Dry, H.; Dudley, P.; Greenwood, R.; Johnson, P. D.; Kettle, J. G.; Lane, C.; Lamont, G.; Leach, A.; Luke, R. W.; Morris, J.; Ogilvie, D.; Page, K.; Pass, M.; Pearson, S. ; Ruston, L., 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.
- 80 Crafter, C.; Vincent, J. P.; Tang, E.; Dudley, P.; James, N. H.; Klinowska, T. ; Davies, B. R., Combining AZD8931, a novel EGFR/HER2/HER3 signalling inhibitor, with AZD5363 limits AKT inhibitor induced feedback and enhances antitumour efficacy in HER2-amplified breast cancer models. *Int J Oncol* **2015**, *47*, 446-454.
- 81 Banerji, U.; Dean, E. J.; Perez-Fidalgo, J. A.; Batist, G.; Bedard, P. L.; You, B.; Westin, S. N.; Kabos, P.; Garrett, M. D.; Tall, M.; Ambrose, H.; Barrett, J. C.; Carr, T. H.; Cheung, S. Y. A.; Corcoran, C.; Cullberg, M.; Davies, B. R.; de Bruin, E. C.; Elvin, P.; Foxley, A.; Lawrence, P.; Lindemann, J. P. O.; Maudsley, R.; Pass, M.; Rowlands, V.; Rugman, P.; Schiavon, G.; Yates, J. ; Schellens, J. H. M., A Phase I Open-Label Study to Identify a Dosing Regimen of the Pan-AKT Inhibitor AZD5363 for Evaluation in Solid Tumors and in PIK3CA-Mutated Breast and Gynecologic Cancers. *Clin Cancer Res* **2018**, *24*, 2050-2059.
- 82 clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=AZD5363&cntry=&state=&city=&dist=.
Stand: 21.10.2020.
- 83 Schmid, P.; Abraham, J.; Chan, S.; Wheatley, D.; Brunt, A. M.; Nemsadze, G.; Baird, R. D.; Park, Y. H.; Hall, P. S.; Perren, T.; Stein, R. C.; Mangel, L.; Ferrero, J. M.; Phillips, M.; Conibear, J.; Cortes, J.; Foxley, A.; de Bruin, E. C.; McEwen, R.; Stetson, D.; Dougherty, B.; Sarker, S. J.; Prendergast, A.; McLaughlin-Callan, M.; Burgess, M.; Lawrence, C.; Cartwright, H.; Mousa, K. ; Turner, N. C., Capivasertib Plus Paclitaxel Versus Placebo Plus Paclitaxel As First-Line Therapy for Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: The PAKT Trial. *J Clin Oncol* **2020**, *38*, 423-433.
- 84 Blake, J. F.; Xu, R.; Bencsik, J. R.; Xiao, D.; Kallan, N. C.; Schlachter, S.; Mitchell, I. S.; Spencer, K. L.; Banka, A. L.; Wallace, E. M.; Gloor, S. L.; Martinson, M.; Woessner, R. D.; Vigers, G. P.; Brandhuber, B. J.; Liang, J.; Safina, B. S.; Li, J.; Zhang, B.; Chabot, C.; Do, S.; Lee, L.; Oeh, J.; Sampath, D.; Lee, B. B.; Lin, K.; Liederer, B. M. ; Skelton, N. J., 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.
- 85 Lin, J.; Sampath, D.; Nannini, M. A.; Lee, B. B.; Degtyarev, M.; Oeh, J.; Savage, H.; Guan, Z.; Hong, R.; Kassees, R.; Lee, L. B.; Risom, T.; Gross, S.; Liederer, B. M.; Koeppen, H.; Skelton, N. J.; Wallin, J. J.; Belvin, M.; Punnoose, E.; Friedman, L. S. ; Lin, K., 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.
- 86 Saura, C.; Roda, D.; Rosello, S.; Oliveira, M.; Macarulla, T.; Perez-Fidalgo, J. A.; Morales-Barrera, R.; Sanchis-Garcia, J. M.; Musib, L.; Budha, N.; Zhu, J.; Nannini, M.; Chan, W. Y.; Sanabria Bohorquez, S. M.; Meng, R. D.; Lin, K.; Yan, Y.; Patel, P.; Baselga, J.; Tabernero, J. ; Cervantes, A., 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.
- 87 Kim, S. B.; Dent, R.; Im, S. A.; Espie, M.; Blau, S.; Tan, A. R.; Isakoff, S. J.; Oliveira, M.; Saura, C.; Wongchenko, M. J.; Kapp, A. V.; Chan, W. Y.; Singel, S. M.; Maslyar, D. J.; Baselga, J. ; investigators, L., Ipatasertib plus paclitaxel versus placebo plus paclitaxel as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (LOTUS): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **2017**, *18*, 1360-1372.

- 88 de Bono, J. S.; De Giorgi, U.; Rodrigues, D. N.; Massard, C.; Bracarda, S.; Font, A.; Arranz Ariba, J. A.; Shih, K. C.; Radavoi, G. D.; Xu, N.; Chan, W. Y.; Ma, H.; Gendreau, S.; Riisnaes, R.; Patel, P. H.; Maslyar, D. J. ; Jinga, V., Randomized Phase II Study Evaluating Akt Blockade with Ipatasertib, in Combination with Abiraterone, in Patients with Metastatic Prostate Cancer with and without PTEN Loss. *Clin Cancer Res* **2019**, *25*, 928-936.
- 89 clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=gdc-0068&cntry=&state=&city=&dist=. **Stand: 21.10.2020**.
- 90 Jansen, V. M.; Mayer, I. A. ; Arteaga, C. L., Is There a Future for AKT Inhibitors in the Treatment of Cancer? *Clin Cancer Res* **2016**, *22*, 2599-2601.
- 91 Costa, C. ; Bosch, A., The Strategy of PIKing a Target: What Is AKTually Most Effective? *Clin Cancer Res* **2018**, *24*, 2029-2031.
- 92 Landel, I.; Quambusch, L.; Depta, L. ; Rauh, D., Spotlight on AKT: Current Therapeutic Challenges. *ACS Med Chem Lett* **2020**, *11*, 225-227.
- 93 Davies, B. R.; Greenwood, H.; Dudley, P.; Crafter, C.; Yu, D. H.; Zhang, J.; Li, J.; Gao, B.; Ji, Q.; Maynard, J.; Ricketts, S. A.; Cross, D.; Cosulich, S.; Chresta, C. C.; Page, K.; Yates, J.; Lane, C.; Watson, R.; Luke, R.; Ogilvie, D. ; Pass, M., 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.
- 94 Verweij, J.; Krzemieniecki, K.; Kok, T.; Poveda, A.; van Pottelsberghe, C.; van Glabbeke, M. ; Mouridsen, H., Phase II study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in advanced soft tissue sarcomas of the adult--an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. *Eur J Cancer* **1993**, *29A*, 208-209.
- 95 Gills, J. J. ; Dennis, P. A., Perifosine: update on a novel Akt inhibitor. *Curr Oncol Rep* **2009**, *11*, 102-110.
- 96 Meuillet, E. J., Novel inhibitors of AKT: assessment of a different approach targeting the pleckstrin homology domain. *Curr Med Chem* **2011**, *18*, 2727-2742.
- 97 van Blitterswijk, W. J. ; Verheij, M., Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Biochim Biophys Acta* **2013**, *1831*, 663-674.
- 98 Giantonio, B. J.; Derry, C.; McAleer, C.; McPhillips, J. J. ; O'Dwyer, P. J., Phase I and pharmacokinetic study of the cytotoxic ether lipid ilmofosine administered by weekly two-hour infusion in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **2004**, *10*, 1282-1288.
- 99 Hers, I.; Vincent, E. E. ; Tavaré, J. M., Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* **2011**, *23*, 1515-1527.
- 100 Rios-Marco, P.; Marco, C.; Galvez, X.; Jimenez-Lopez, J. M. ; Carrasco, M. P., Alkylphospholipids: An update on molecular mechanisms and clinical relevance. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **2017**, *1859*, 1657-1667.
- 101 Lindsley, C. W.; Zhao, Z.; Leister, W. H.; Robinson, R. G.; Barnett, S. F.; Defeo-Jones, D.; Jones, R. E.; Hartman, G. D.; Huff, J. R.; Huber, H. E. ; Duggan, M. E., Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 761-764.

- 102 Bilodeau, M. T.; Balitza, A. E.; Hoffman, J. M.; Manley, P. J.; Barnett, S. F.; Defeo-Jones, D.; Haskell, K.; Jones, R. E.; Leander, K.; Robinson, R. G.; Smith, A. M.; Huber, H. E.; Hartman, G. D., Allosteric inhibitors of Akt1 and Akt2: a naphthyridinone with efficacy in an A2780 tumor xenograft model. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 3178-3182.
- 103 Zhao, Z.; Robinson, R. G.; Barnett, S. F.; Defeo-Jones, D.; Jones, R. E.; Hartman, G. D.; Huber, H. E.; Duggan, M. E.; Lindsley, C. W., Development of potent, allosteric dual Akt1 and Akt2 inhibitors with improved physical properties and cell activity. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18*, 49-53.
- 104 Li, Y.; Liang, J.; Siu, T.; Hu, E.; Rossi, M. A.; Barnett, S. F.; Defeo-Jones, D.; Jones, R. E.; Robinson, R. G.; Leander, K.; Huber, H. E.; Mittal, S.; Cosford, N.; Prasit, P., Allosteric inhibitors of Akt1 and Akt2: discovery of [1,2,4]triazolo[3,4-f][1,6]naphthyridines with potent and balanced activity. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 834-836.
- 105 Barnett, S. F.; Defeo-Jones, D.; Fu, S.; Hancock, P. J.; Haskell, K. M.; Jones, R. E.; Kahana, J. A.; Kral, A. M.; Leander, K.; Lee, L. L.; Malinowski, J.; McAvoy, E. M.; Nahas, D. D.; Robinson, R. G.; Huber, H. E., Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors. *Biochem J* **2005**, *385*, 399-408.
- 106 Fang, Z.; Grutter, C.; Rauh, D., Strategies for the selective regulation of kinases with allosteric modulators: exploiting exclusive structural features. *ACS Chem Biol* **2013**, *8*, 58-70.
- 107 Yap, T. A.; Yan, L.; Patnaik, A.; Fearen, I.; Olmos, D.; Papadopoulos, K.; Baird, R. D.; Delgado, L.; Taylor, A.; Lupinacci, L.; Riisnaes, R.; Pope, L. L.; Heaton, S. P.; Thomas, G.; Garrett, M. D.; Sullivan, D. M.; de Bono, J. S.; Tolcher, A. W., First-in-man clinical trial of the oral pan-AKT inhibitor MK-2206 in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* **2011**, *29*, 4688-4695.
- 108 Molife, L. R.; Yan, L.; Vitfell-Rasmussen, J.; Zernhelt, A. M.; Sullivan, D. M.; Cassier, P. A.; Chen, E.; Biondo, A.; Tetteh, E.; Siu, L. L.; Patnaik, A.; Papadopoulos, K. P.; de Bono, J. S.; Tolcher, A. W.; Minton, S., Phase 1 trial of the oral AKT inhibitor MK-2206 plus carboplatin/paclitaxel, docetaxel, or erlotinib in patients with advanced solid tumors. *J Hematol Oncol* **2014**, *7*, 1.
- 109 Zhang, Y.; Yan, H.; Xu, Z.; Yang, B.; Luo, P.; He, Q., Molecular basis for class side effects associated with PI3K/AKT/mTOR pathway inhibitors. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2019**, *15*, 767-774.
- 110 clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=MK-2206&cntry=&state=&city=&dist=. **Stand: 21.10.2020.**
- 111 Lapierre, J. M.; Eathiraj, S.; Vensel, D.; Liu, Y.; Bull, C. O.; Cornell-Kennon, S.; Iimura, S.; Kelleher, E. W.; Kizer, D. E.; Koerner, S.; Makhija, S.; Matsuda, A.; Moussa, M.; Namdev, N.; Savage, R. E.; Szwaya, J.; Volckova, E.; Westlund, N.; Wu, H.; Schwartz, B., 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.
- 112 Politz, O.; Siegel, F.; Barfacker, L.; Bomer, U.; Hagebarth, A.; Scott, W. J.; Michels, M.; Ince, S.; Neuhaus, R.; Meyer, K.; Fernandez-Montalvan, A. E.; Liu, N.; von Nussbaum, F.; Mumberg, D.; Ziegelbauer, K., 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.
- 113 ArQule Corporate Presentation, Pursuing Treatments for Biomarker-driven Cancers and Rare Diseases. **November, 2018.**
- 114 clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=BAY+1125976&cntry=&state=&city=&dist=. **Stand: 21.10.2020.**
- 115 clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=arq+751&cntry=&state=&city=&dist=. **Stand: 21.10.2020.**
- 116 clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=Arq+092&cntry=&state=&city=&dist=. **Stand: 21.10.2020.**
- 117 Leoni, C.; Gullo, G.; Resta, N.; Fagotti, A.; Onesimo, R.; Schwartz, B.; Kazakin, J.; Abbadessa, G.; Crown, J.; Collins, C. D.; Ranieri, C.; Scambia, G.; Zampino, G., First evidence of a therapeutic effect of miransertib in a teenager with Proteus syndrome and ovarian carcinoma. *Am J Med Genet A* **2019**, *179*, 1319-1324.
- 118 ArQule Corporate Presentation, Pursuing Treatments for Biomarker-driven Cancers and Rare Diseases. **August, 2019.**
- 119 Saleh, M., Papadpoulo, K., Arabnia, A., Patnaik, A., Stein, R.M., Chai, F., Lamar, M., Savage, R., Abbadessa, G., Tolcher, A., First-in-human study with ARQ 092, a novel pan AKT-inhibitor, in subjects with advanced solid tumors or recurrent malignant lymphoma. *Poster, 26th EORTC – NCI – AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics* **November, 2014.**
- 120 Biesecker, L. G.; Edwards, M.; O'Donnell, S.; Doherty, P.; MacDougall, T.; Tith, K.; Kazakin, J.; Schwartz, B., Clinical report: one year of treatment of Proteus syndrome with miransertib (ARQ 092). *Cold Spring Harb Mol Case Stud* **2020**, *6*.
- 121 ArQule Corporate Presentation, Pursuing Treatments for Biomarker-driven Cancers and Rare Diseases - ArQule's Approach to Rare Overgrowth Diseases: Miransertib, a Portfolio in a Product. **März, 2019.**
- 122 Schneeweiss, A.; Hess, D.; Joerger, M.; Varga, A.; Moulder, S.; Tsimberidou, A. M.; Ma, C.; Hurvitz, S. A.; Rentzsch, C.; Rudolph, M.; Thiele, S.; Boix, O.; Wilkinson, G.; Lagkadinou, E.; Ocker, M., Phase 1 Dose Escalation Study of the Allosteric AKT Inhibitor BAY 1125976 in Advanced Solid Cancer-Lack of Association between Activating AKT Mutation and AKT Inhibition-Derived Efficacy. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*.
- 123 Weisner, J.; Gontla, R.; van der Westhuizen, L.; Oeck, S.; Ketzer, J.; Janning, P.; Richters, A.; Muhlenberg, T.; Fang, Z.; Taher, A.; Jendrossek, V.; Pelly, S. C.; Bauer, S.; van Otterlo, W. A.; Rauh, D., Covalent-Allosteric Kinase Inhibitors. *Angew Chem Int Ed Engl* **2015**, *54*, 10313-10316.
- 124 Abdeldayem, A.; Raouf, Y. S.; Constantinescu, S. N.; Moriggl, R.; Gunning, P. T., Advances in covalent kinase inhibitors. *Chem Soc Rev* **2020**, *49*, 2617-2687.
- 125 Ghosh, A. K.; Samanta, I.; Mondal, A.; Liu, W. R., Covalent Inhibition in Drug Discovery. *ChemMedChem* **2019**, *14*, 889-906.
- 126 Mok, T. S.; Wu, Y. L.; Ahn, M. J.; Garassino, M. C.; Kim, H. R.; Ramalingam, S. S.; Shepherd, F. A.; He, Y.; Akamatsu, H.; Theelen, W. S.; Lee, C. K.; Sebastian, M.; Templeton, A.; Mann, H.; Marotti, M.; Ghorghiu, S.; Papadimitrakopoulou, V. A. ;

- Investigators, A., Osimertinib or Platinum-Pemetrexed in EGFR T790M-Positive Lung Cancer. *N Engl J Med* **2017**, *376*, 629-640.
- 127 Mullard, A., 2017 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17*, 150.
- 128 Singh, J.; Petter, R. C.; Baillie, T. A. ; Whitty, A., The resurgence of covalent drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 307-317.
- 129 Smith, A. J.; Zhang, X.; Leach, A. G. ; Houk, K. N., Beyond picomolar affinities: quantitative aspects of noncovalent and covalent binding of drugs to proteins. *J Med Chem* **2009**, *52*, 225-233.
- 130 Lagoutte, R.; Patouret, R. ; Winssinger, N., Covalent inhibitors: an opportunity for rational target selectivity. *Curr Opin Chem Biol* **2017**, *39*, 54-63.
- 131 Barf, T. ; Kaptein, A., Irreversible protein kinase inhibitors: balancing the benefits and risks. *J Med Chem* **2012**, *55*, 6243-6262.
- 132 Lonsdale, R. ; Ward, R. A., Structure-based design of targeted covalent inhibitors. *Chem Soc Rev* **2018**, *47*, 3816-3830.
- 133 Zhang, T.; Kwiatkowski, N.; Olson, C. M.; Dixon-Clarke, S. E.; Abraham, B. J.; Greifenberg, A. K.; Ficarro, S. B.; Elkins, J. M.; Liang, Y.; Hannett, N. M.; Manz, T.; Hao, M.; Bartkowiak, B.; Greenleaf, A. L.; Marto, J. A.; Geyer, M.; Bullock, A. N.; Young, R. A. ; Gray, N. S., Covalent targeting of remote cysteine residues to develop CDK12 and CDK13 inhibitors. *Nat Chem Biol* **2016**, *12*, 876-884.
- 134 Ashwell, M. A.; Lapiere, J. M.; Brassard, C.; Bresciano, K.; Bull, C.; Cornell-Kennon, S.; Eathiraj, S.; France, D. S.; Hall, T.; Hill, J.; Kelleher, E.; Khanapurkar, S.; Kizer, D.; Koerner, S.; Link, J.; Liu, Y.; Makhija, S.; Moussa, M.; Namdev, N.; Nguyen, K.; Nicewonger, R.; Palma, R.; Szwaya, J.; Tandon, M.; Uppalapati, U.; Vensel, D.; Volak, L. P.; Volckova, E.; Westlund, N.; Wu, H.; Yang, R. Y. ; Chan, T. C., 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.
- 135 Weisner, J., Biochemische, kinetische und zelluläre Charakterisierung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren. *Dissertation, TU Dortmund* **2020**.
- 136 Smith, S., Design, Synthese und massenspektrometrische Analyse kovalenter und kovalent-reversibler Kinaseinhibitoren. *Dissertation, TU Dortmund* **2017**.
- 137 Uhlenbrock, N., Struktur-basiertes Design, Synthese und Evaluation von Sondenmolekülen und Wirkstoffkandidaten zur Adressierung der Proteinkinase Akt. *Dissertation, TU Dortmund* **2019**.
- 138 Uhlenbrock, N.; Smith, S.; Weisner, J.; Landel, I.; Lindemann, M.; Le, T. A.; Hardick, J.; Gontla, R.; Scheinpflug, R.; Czodrowski, P.; Janning, P.; Depta, L.; Quambusch, L.; Muller, M. P.; Engels, B. ; Rauh, D., Structural and chemical insights into the covalent-allosteric inhibition of the protein kinase Akt. *Chem Sci* **2019**, *10*, 3573-3585.
- 139 Weisner, J.; Landel, I.; Reintjes, C.; Uhlenbrock, N.; Trajkovic-Arsic, M.; Dienstbier, N.; Hardick, J.; Ladigan, S.; Lindemann, M.; Smith, S.; Quambusch, L.; Scheinpflug, R.; Depta, L.; Gontla, R.; Unger, A.; Muller, H.; Baumann, M.; Schultz-Fademrecht, C.; Gunther, G.; Maghnoij, A.; Muller, M. P.; Pohl, M.; Teschendorf, C.; Wolters, H.; Viebahn, R.; Tannapfel, A.; Uhl, W.; Hengstler, J. G.; Hahn, S. A.; Siveke, J. T. ; Rauh, D., 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.
- 140 Batool, M.; Ahmad, B. ; Choi, S., A Structure-Based Drug Discovery Paradigm. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*.
- 141 Swinney, D. C. ; Anthony, J., How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov* **2011**, *10*, 507-519.
- 142 Mandal, S.; Moudgil, M. ; Mandal, S. K., Rational drug design. *Eur J Pharmacol* **2009**, *625*, 90-100.
- 143 Anderson, A. C., The process of structure-based drug design. *Chem Biol* **2003**, *10*, 787-797.
- 144 Brown, D. G. ; Shotton, E. J., Diamond: shedding light on structure-based drug discovery. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* **2015**, *373*.
- 145 www.rcsb.org/stats/summary. **Stand: 22.10.2020**.
- 146 McPherson, A. ; Gavira, J. A., Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **2014**, *70*, 2-20.
- 147 Kalyanamoorthy, S. ; Chen, Y. P., Structure-based drug design to augment hit discovery. *Drug Discov Today* **2011**, *16*, 831-839.
- 148 Kirsch, P.; Hartman, A. M.; Hirsch, A. K. H. ; Empting, M., Concepts and Core Principles of Fragment-Based Drug Design. *Molecules* **2019**, *24*.
- 149 Lasfargues, E. Y.; Coutinho, W. G. ; Redfield, E. S., Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* **1978**, *61*, 967-978.
- 150 Soule, H. D.; Vazquez, J.; Long, A.; Albert, S. ; Brennan, M., A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **1973**, *51*, 1409-1416.
- 151 Keydar, I.; Chen, L.; Karby, S.; Weiss, F. R.; Delarea, J.; Radu, M.; Chaitcik, S. ; Brenner, H. J., Establishment and characterization of a cell line of human breast carcinoma origin. *Eur J Cancer* **1979**, *15*, 659-670.
- 152 Engel, L. W.; Young, N. A.; Tralka, T. S.; Lippman, M. E.; O'Brien, S. J. ; Joyce, M. J., Establishment and characterization of three new continuous cell lines derived from human breast carcinomas. *Cancer Res* **1978**, *38*, 3352-3364.
- 153 Dawe, C. J.; Banfield, W. G.; Morgan, W. D.; Slatick, M. S. ; Curth, H. O., Growth in Continuous Culture, and in Hamsters, of Cells from a Neoplasm Associated with Acanthosis Nigricans. *J Natl Cancer Inst* **1964**, *33*, 441-456.
- 154 Tachibana, M.; Miyakawa, A.; Tazaki, H.; Nakamura, K.; Kubo, A.; Hata, J.; Nishi, T. ; Amano, Y., Autocrine growth of transitional cell carcinoma of the bladder induced by granulocyte-colony stimulating factor. *Cancer Res* **1995**, *55*, 3438-3443.
- 155 Chu, M. Y.; Naguib, F. N.; Iltzsch, M. H.; el Kouni, M. H.; Chu, S. H.; Cha, S. ; Calabresi, P., Potentiation of 5-fluoro-2'-deoxyuridine antineoplastic activity by the uridine phosphorylase inhibitors benzylacyclouridine and benzyloxybenzylacyclouridine. *Cancer Res* **1984**, *44*, 1852-1856.

- 156 Metzgar, R. S.; Gaillard, M. T.; Levine, S. J.; Tuck, F. L.; Bossen, E. H. ; Borowitz, M. J., Antigenes of human pancreatic adenocarcinoma cells defined by murine monoclonal antibodies. *Cancer Res* **1982**, *42*, 601-608.
- 157 Tate, J. G.; Bamford, S.; Jubb, H. C.; Sondka, Z.; Beare, D. M.; Bindal, N.; Boutselakis, H.; Cole, C. G.; Creatore, C.; Dawson, E.; Fish, P.; Harsha, B.; Hathaway, C.; Jupe, S. C.; Kok, C. Y.; Noble, K.; Ponting, L.; Ramshaw, C. C.; Rye, C. E.; Speedy, H. E.; Stefancsik, R.; Thompson, S. L.; Wang, S.; Ward, S.; Campbell, P. J. ; Forbes, S. A., COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47*, D941-D947.
- 158 Omura, S.; Iwai, Y.; Hirano, A.; Nakagawa, A.; Awaya, J.; Tsuchiya, H.; Takahashi, Y. ; Masuma, R., A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **1977**, *30*, 275-282.
- 159 Karaman, M. W.; Herrgard, S.; Treiber, D. K.; Gallant, P.; Atteridge, C. E. ; Campbell, B. T.; Chan, K. W.; Ciceri, P.; Davis, M. I.; Edeen, P. T.; Faraoni, R.; Floyd, M.; Hunt, J. P.; Lockhart, D. J.; Milanov, Z. V.; Morrison, M. J.; Pallares, G.; Patel, H. K.; Pritchard, S.; Wodicka, L. M. ; Zarrinkar, P. P., A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 127-132.
- 160 Vivanco, I.; Chen, Z. C.; Tanos, B.; Oldrini, B.; Hsieh, W. Y.; Yannuzzi, N.; Campos, C. ; Mellingerhoff, I. K., A kinase-independent function of AKT promotes cancer cell survival. *Elife* **2014**, *3*.
- 161 Hirai, H.; Sootome, H.; Nakatsuru, Y.; Miyama, K.; Taguchi, S.; Tsujioka, K.; Ueno, Y.; Hatch, H.; Majumder, P. K.; Pan, B. S. ; Kotani, H., 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.
- 162 Abe, H.; Kikuchi, S.; Hayakawa, K.; Iida, T.; Nagahashi, N.; Maeda, K.; Sakamoto, J.; Matsumoto, N.; Miura, T.; Matsumura, K.; Seki, N.; Inaba, T.; Kawasaki, H.; Yamaguchi, T.; Kakefuda, R.; Nanayama, T.; Kurachi, H.; Hori, Y.; Yoshida, T.; Kakegawa, J.; Watanabe, Y.; Gilmartin, A. G.; Richter, M. C.; Moss, K. G. ; Laquerre, S. G., Discovery of a Highly Potent and Selective MEK Inhibitor: GSK1120212 (JTP-74057 DMSO Solvate). *ACS Med Chem Lett* **2011**, *2*, 320-324.
- 163 Alessi, D. R.; Caudwell, F. B.; Andjelkovic, M.; Hemmings, B. A. ; Cohen, P., Molecular basis for the substrate specificity of protein kinase B; comparison with MAPKAP kinase-1 and p70 S6 kinase. *FEBS Lett* **1996**, *399*, 333-338.
- 164 Roux, P. P.; Shahbazian, D.; Vu, H.; Holz, M. K.; Cohen, M. S.; Taunton, J.; Sonenberg, N. ; Blenis, J., RAS/ERK signaling promotes site-specific ribosomal protein S6 phosphorylation via RSK and stimulates cap-dependent translation. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 14056-14064.
- 165 Cross, D. A.; Alessi, D. R.; Cohen, P.; Andjelkovich, M. ; Hemmings, B. A., Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **1995**, *378*, 785-789.
- 166 Herceg, Z. ; Wang, Z. Q., Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat Res* **2001**, *477*, 97-110.
- 167 Copeland, R. A.; Pompliano, D. L. ; Meek, T. D., Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5*, 730-739.

-
- 168 Hobbs, G. A.; Der, C. J. ; Rossman, K. L., RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *J Cell Sci* **2016**, *129*, 1287-1292.
- 169 Goebel, L.; Müller, M. P.; Goody, R. S. ; Rauh, D., KRasG12C inhibitors in clinical trials: a short historical perspective. *RSC Med. Chem.* **2020**, *11*, 760-770.
- 170 McGuigan, A.; Kelly, P.; Turkington, R. C.; Jones, C.; Coleman, H. G. ; McCain, R. S., Pancreatic cancer: A review of clinical diagnosis, epidemiology, treatment and outcomes. *World J Gastroenterol* **2018**, *24*, 4846-4861.
- 171 Ostrem, J. M. ; Shokat, K. M., Direct small-molecule inhibitors of KRAS: from structural insights to mechanism-based design. *Nat Rev Drug Discov* **2016**, *15*, 771-785.
- 172 Lee, S.; Rauch, J. ; Kolch, W., Targeting MAPK Signaling in Cancer: Mechanisms of Drug Resistance and Sensitivity. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*.
- 173 Holt, S. V.; Logie, A.; Davies, B. R.; Alferrez, D.; Runswick, S.; Fenton, S.; Chresta, C. M.; Gu, Y.; Zhang, J.; Wu, Y. L.; Wilkinson, R. W.; Guichard, S. M. ; Smith, P. D., Enhanced apoptosis and tumor growth suppression elicited by combination of MEK (selumetinib) and mTOR kinase inhibitors (AZD8055). *Cancer Res* **2012**, *72*, 1804-1813.
- 174 Janku, F.; Tsimberidou, A. M.; Garrido-Laguna, I.; Wang, X.; Luthra, R.; Hong, D. S.; Naing, A.; Falchook, G. S.; Moroney, J. W.; Piha-Paul, S. A.; Wheler, J. J.; Moulder, S. L.; Fu, S. ; Kurzrock, R., PIK3CA mutations in patients with advanced cancers treated with PI3K/AKT/mTOR axis inhibitors. *Mol Cancer Ther* **2011**, *10*, 558-565.
- 175 Jaiswal, B. S.; Janakiraman, V.; Kljavin, N. M.; Eastham-Anderson, J.; Cupp, J. E.; Liang, Y.; Davis, D. P.; Hoeflich, K. P. ; Seshagiri, S., Combined targeting of BRAF and CRAF or BRAF and PI3K effector pathways is required for efficacy in NRAS mutant tumors. *PLoS One* **2009**, *4*, e5717.
- 176 Greco, W. R.; Bravo, G. ; Parsons, J. C., The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol Rev* **1995**, *47*, 331-385.
- 177 Pastor, D. M.; Poritz, L. S.; Olson, T. L.; Kline, C. L.; Harris, L. R.; Koltun, W. A.; Chinchilli, V. M. ; Irby, R. B., Primary cell lines: false representation or model system? a comparison of four human colorectal tumors and their coordinately established cell lines. *Int J Clin Exp Med* **2010**, *3*, 69-83.
- 178 Walker, D. K., The use of pharmacokinetic and pharmacodynamic data in the assessment of drug safety in early drug development. *Br J Clin Pharmacol* **2004**, *58*, 601-608.
- 179 Bermejo, M.; Avdeef, A.; Ruiz, A.; Nalda, R.; Ruell, J. A.; Tsinman, O.; Gonzalez, I.; Fernandez, C.; Sanchez, G.; Garrigues, T. M. ; Merino, V., PAMPA--a drug absorption in vitro model 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *Eur J Pharm Sci* **2004**, *21*, 429-441.
- 180 van Breemen, R. B. ; Li, Y., Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2005**, *1*, 175-185.
- 181 Di, L.; Kerns, E. H.; Ma, X. J.; Huang, Y. ; Carter, G. T., Applications of high throughput microsomal stability assay in drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen* **2008**, *11*, 469-476.

- 182 Bose, P.; Gandhi, V. V. ; Keating, M. J., Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of ibrutinib for the treatment of chronic lymphocytic leukemia: rationale for lower doses. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2016**, *12*, 1381-1392.
- 183 O'Brien, Z. ; Moghaddam, M. F., 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.
- 184 Siolas, D. ; Hannon, G. J., Patient-derived tumor xenografts: transforming clinical samples into mouse models. *Cancer Res* **2013**, *73*, 5315-5319.
- 185 Lai, Y.; Wei, X.; Lin, S.; Qin, L.; Cheng, L. ; Li, P., Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research. *J Hematol Oncol* **2017**, *10*, 106.
- 186 Eisenhauer, E. A.; Therasse, P.; Bogaerts, J.; Schwartz, L. H.; Sargent, D.; Ford, R.; Dancey, J.; Arbuck, S.; Gwyther, S.; Mooney, M.; Rubinstein, L.; Shankar, L.; Dodd, L.; Kaplan, R.; Lacombe, D. ; Verweij, J., New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer* **2009**, *45*, 228-247.
- 187 Dale, G. E.; Oefner, C. ; D'Arcy, A., The protein as a variable in protein crystallization. *J Struct Biol* **2003**, *142*, 88-97.
- 188 Derewenda, Z. S. ; Vekilov, P. G., Entropy and surface engineering in protein crystallization. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2006**, *62*, 116-124.
- 189 Derewenda, Z. S., Rational protein crystallization by mutational surface engineering. *Structure* **2004**, *12*, 529-535.
- 190 Rosano, G. L. ; Ceccarelli, E. A., Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges. *Front Microbiol* **2014**, *5*, 172.
- 191 Berger, I. ; Mayr, L. M., Protein production for structural biology: new solutions to new challenges. *Curr Opin Struct Biol* **2013**, *23*, 317-318.
- 192 Klenk, H. D., Post-translational modifications in insect cells. *Cytotechnology* **1996**, *20*, 139-144.
- 193 Vaughn, J. L.; Goodwin, R. H.; Tompkins, G. J. ; McCawley, P., The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* **1977**, *13*, 213-217.
- 194 Jarvis, D. L., Baculovirus-insect cell expression systems. *Methods Enzymol* **2009**, *463*, 191-222.
- 195 Possee, R. D.; Hitchman, R. B.; Richards, K. S.; Mann, S. G.; Siaterli, E.; Nixon, C. P.; Irving, H.; Assenberg, R.; Alderton, D.; Owens, R. J. ; King, L. A., Generation of baculovirus vectors for the high-throughput production of proteins in insect cells. *Biotechnol Bioeng* **2008**, *101*, 1115-1122.
- 196 Goldschmidt, L.; Cooper, D. R.; Derewenda, Z. S. ; Eisenberg, D., Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants. *Protein Sci* **2007**, *16*, 1569-1576.
- 197 Scheinplflug, R., Expression, Aufreinigung und Kristallisation von Akt in Komplex mit kovalent-allosterischen Inhibitoren. *Masterarbeit, TU Dortmund* **2016**.
- 198 Datta, S. R.; Brunet, A. ; Greenberg, M. E., Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* **1999**, *13*, 2905-2927.

- 199 Dephoure, N.; Zhou, C.; Villen, J.; Beausoleil, S. A.; Bakalarski, C. E.; Elledge, S. J. ; Gygi, S. P., A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 10762-10767.
- 200 Olsen, J. V.; Blagoev, B.; Gnäd, F.; Macek, B.; Kumar, C.; Mortensen, P. ; Mann, M., Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* **2006**, *127*, 635-648.
- 201 Lucic, I.; Rathinaswamy, M. K.; Truebestein, L.; Hamelin, D. J.; Burke, J. E. ; Leonard, T. A., Conformational sampling of membranes by Akt controls its activation and inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115*, E3940-E3949.
- 202 Huynh, K. ; Partch, C. L., Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. *Curr Protoc Protein Sci* **2015**, *79*, 28 29 21-28 29 14.
- 203 Lavinder, J. J.; Hari, S. B.; Sullivan, B. J. ; Magliery, T. J., High-throughput thermal scanning: a general, rapid dye-binding thermal shift screen for protein engineering. *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 3794-3795.
- 204 Lin, K.; Lin, J.; Wu, W. I.; Ballard, J.; Lee, B. B.; Gloor, S. L.; Vigers, G. P.; Morales, T. H.; Friedman, L. S.; Skelton, N. ; Brandhuber, B. J., An ATP-site on-off switch that restricts phosphatase accessibility of Akt. *Sci Signal* **2012**, *5*, ra37.
- 205 Hassell, A. M.; An, G.; Bledsoe, R. K.; Bynum, J. M.; Carter, H. L., 3rd; Deng, S. J.; Gampe, R. T.; Grisard, T. E.; Madauss, K. P.; Nolte, R. T.; Rocque, W. J.; Wang, L.; Weaver, K. L.; Williams, S. P.; Wisely, G. B.; Xu, R. ; Shewchuk, L. M., Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2007**, *63*, 72-79.
- 206 Skarzynski, T. ; Thorpe, J., Industrial perspective on X-ray data collection and analysis. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2006**, *62*, 102-107.
- 207 Muller, I., Guidelines for the successful generation of protein-ligand complex crystals. *Acta Crystallogr D Struct Biol* **2017**, *73*, 79-92.
- 208 Kabsch, W., Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *J Appl Crystallogr* **1993**, *26*, 795-800.
- 209 Kabsch, W., Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66*, 125-132.
- 210 Gildea, R. J.; Waterman, D. G.; Parkhurst, J. M.; Axford, D.; Sutton, G.; Stuart, D. I.; Sauter, N. K.; Evans, G. ; Winter, G., New methods for indexing multi-lattice diffraction data. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2014**, *70*, 2652-2666.
- 211 Chang, J. W.; Bhuiyan, M.; Tsai, H. M.; Zhang, H. J.; Li, G.; Fathi, S.; McCutcheon, D. C.; Leoni, L.; Freifelder, R.; Chen, C. T. ; Moellering, R. E., In Vivo Imaging of the Tumor-Associated Enzyme NCEH1 with a Covalent PET Probe. *Angew Chem Int Ed Engl* **2020**.
- 212 Pantel, A. R. ; Mankoff, D. A., Molecular imaging to guide systemic cancer therapy: Illustrative examples of PET imaging cancer biomarkers. *Cancer Lett* **2017**, *387*, 25-31.
- 213 Yang, Z. Z.; Tschopp, O.; Baudry, A.; Dummler, B.; Hynx, D. ; Hemmings, B. A., Physiological functions of protein kinase B/Akt. *Biochem Soc Trans* **2004**, *32*, 350-354.
- 214 Santi, S. A. ; Lee, H., The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *Am J Physiol Cell Physiol* **2010**, *298*, C580-591.

- 215 Linnerth-Petrik, N. M.; Santry, L. A.; Petrik, J. J. ; Wootton, S. K., Opposing functions of Akt isoforms in lung tumor initiation and progression. *PLoS One* **2014**, *9*, e94595.
- 216 Landgraf, K. E.; Pilling, C. ; Falke, J. J., 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.
- 217 Davies, B. R.; Guan, N.; Logie, A.; Crafter, C.; Hanson, L.; Jacobs, V.; James, N.; Dudley, P.; Jacques, K.; Ladd, B.; D'Cruz, C. M.; Zinda, M.; Lindemann, J.; Kodaira, M.; Tamura, K. ; Jenkins, E. L., Tumors with AKT1E17K Mutations Are Rational Targets for Single Agent or Combination Therapy with AKT Inhibitors. *Mol Cancer Ther* **2015**, *14*, 2441-2451.
- 218 Hjelmeland, L. M., A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: design and synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1980**, *77*, 6368-6370.
- 219 Bergfors, T., Seeds to crystals. *J Struct Biol* **2003**, *142*, 66-76.
- 220 Walter, T. S.; Meier, C.; Assenberg, R.; Au, K. F.; Ren, J.; Verma, A.; Nettleship, J. E.; Owens, R. J.; Stuart, D. I. ; Grimes, J. M., Lysine methylation as a routine rescue strategy for protein crystallization. *Structure* **2006**, *14*, 1617-1622.
- 221 Palacios, R. ; Steinmetz, M., Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* **1985**, *41*, 727-734.
- 222 Warmuth, M.; Kim, S.; Gu, X. J.; Xia, G. ; Adrian, F., Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. *Curr Opin Oncol* **2007**, *19*, 55-60.
- 223 Roe, T.; Reynolds, T. C.; Yu, G. ; Brown, P. O., Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *EMBO J* **1993**, *12*, 2099-2108.
- 224 DiRenzo, J.; Signoretti, S.; Nakamura, N.; Rivera-Gonzalez, R.; Sellers, W.; Loda, M. ; Brown, M., Growth factor requirements and basal phenotype of an immortalized mammary epithelial cell line. *Cancer Res* **2002**, *62*, 89-98.
- 225 Naviaux, R. K.; Costanzi, E.; Haas, M. ; Verma, I. M., The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J Virol* **1996**, *70*, 5701-5705.
- 226 Shein, H. M.; Enders, J. F. ; Levinthal, J. D., Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. II. Cell-virus relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1962**, *48*, 1350-1357.
- 227 Mitani, K. ; Caskey, C. T., Delivering therapeutic genes--matching approach and application. *Trends Biotechnol* **1993**, *11*, 162-166.
- 228 Kong, K.; Ng, P. K. ; Scott, K. L., Ba/F3 transformation assays. *Oncotarget* **2017**, *8*, 35488-35489.
- 229 Ruvinsky, I.; Sharon, N.; Lerer, T.; Cohen, H.; Stolovich-Rain, M.; Nir, T.; Dor, Y.; Zisman, P. ; Meyuhas, O., Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes Dev* **2005**, *19*, 2199-2211.
- 230 Folkes, A. J.; Ahmadi, K.; Alderton, W. K.; Alix, S.; Baker, S. J.; Box, G.; Chuckowree, I. S.; Clarke, P. A.; Depledge, P.; Eccles, S. A.; Friedman, L. S.; Hayes, A.; Hancox, T. C.; Kugendradas, A.; Lensun, L.; Moore, P.; Olivero, A. G.; Pang, J.; Patel, S.; Pergl-Wilson, G. H.; Raynaud, F. I.; Robson, A.; Saghir, N.;

- Salphati, L.; Sohal, S.; Ultsch, M. H.; Valenti, M.; Wallweber, H. J.; Wan, N. C.; Wiesmann, C.; Workman, P.; Zhyvoloup, A.; Zvelebil, M. J. ; Shuttleworth, S. J., The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-t hieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer. *J Med Chem* **2008**, *51*, 5522-5532.
- 231 Chan, T. O.; Zhang, J.; Rodeck, U.; Pascal, J. M.; Armen, R. S.; Spring, M.; Dumitru, C. D.; Myers, V.; Li, X.; Cheung, J. Y. ; Feldman, A. M., Resistance of Akt kinases to dephosphorylation through ATP-dependent conformational plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108*, E1120-1127.
- 232 Corless, C. L.; Barnett, C. M. ; Heinrich, M. C., Gastrointestinal stromal tumours: origin and molecular oncology. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11*, 865-878.
- 233 Edmonson, J. H.; Marks, R. S.; Buckner, J. C. ; Mahoney, M. R., Contrast of response to dacarbazine, mitomycin, doxorubicin, and cisplatin (DMAP) plus GM-CSF between patients with advanced malignant gastrointestinal stromal tumors and patients with other advanced leiomyosarcomas. *Cancer Invest* **2002**, *20*, 605-612.
- 234 Reichardt, P., Novel approaches to imatinib- and sunitinib-resistant GIST. *Curr Oncol Rep* **2008**, *10*, 344-349.
- 235 Antonescu, C. R.; Besmer, P.; Guo, T.; Arkun, K.; Hom, G.; Koryotowski, B.; Leversha, M. A.; Jeffrey, P. D.; Desantis, D.; Singer, S.; Brennan, M. F.; Maki, R. G. ; DeMatteo, R. P., Acquired resistance to imatinib in gastrointestinal stromal tumor occurs through secondary gene mutation. *Clin Cancer Res* **2005**, *11*, 4182-4190.
- 236 Kaitiotou, H.; Keul, M.; Hardick, J.; Muhlenberg, T.; Ketzer, J.; Ehrt, C.; Krull, J.; Medda, F.; Koch, O.; Giordanetto, F.; Bauer, S. ; Rauh, D., Inhibitors to Overcome Secondary Mutations in the Stem Cell Factor Receptor KIT. *J Med Chem* **2017**, *60*, 8801-8815.
- 237 Kettle, J. G.; Anjum, R.; Barry, E.; Bhavsar, D.; Brown, C.; Boyd, S.; Campbell, A.; Goldberg, K.; Grondine, M.; Guichard, S.; Hardy, C. J.; Hunt, T.; Jones, R. D. O.; Li, X.; Moleva, O.; Ogg, D.; Overman, R. C.; Packer, M. J.; Pearson, S.; Schimpl, M.; Shao, W.; Smith, A.; Smith, J. M.; Stead, D.; Stokes, S.; Tucker, M. ; Ye, Y., Discovery of N-(4-{[5-Fluoro-7-(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-yl]amino}phenyl)-2-[4-(propan-2-yl)-1 H-1,2,3-triazol-1-yl]acetamide (AZD3229), a Potent Pan-KIT Mutant Inhibitor for the Treatment of Gastrointestinal Stromal Tumors. *J Med Chem* **2018**, *61*, 8797-8810.
- 238 Kröll, L., Klonierung, Expression, Aufreinigung und Kristallisation der Rezeptortyrosinkinasen c-KIT und PDGFR α . *Bachelorarbeit, TU Dortmund* **2019**.
- 239 Teuber, A., Expression, Aufreinigung und Kristallisation der katalytischen Domänen der Rezeptortyrosinkinasen c-Kit und PDGFR α . *Masterarbeit, TU Dortmund* **2020**.
- 240 Gajiwala, K. S.; Wu, J. C.; Christensen, J.; Deshmukh, G. D.; Diehl, W.; DiNitto, J. P.; English, J. M.; Greig, M. J.; He, Y. A.; Jacques, S. L.; Lunney, E. A.; McTigue, M.; Molina, D.; Quenzer, T.; Wells, P. A.; Yu, X.; Zhang, Y.; Zou, A.; Emmett, M. R.; Marshall, A. G.; Zhang, H. M. ; Demetri, G. D., KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 1542-1547.

- 241 Kaitsiotou, H., Design, Synthese, biochemische und zelluläre Evaluierung von Inhibitoren zur Umgehung von Wirkstoffresistenzen in KIT-abhängigen gastrointestinalen Stroma-Tumoren (GIST). *Dissertation, TU Dortmund* **2018**.
- 242 Mol, C. D.; Lim, K. B.; Sridhar, V.; Zou, H.; Chien, E. Y.; Sang, B. C.; Nowakowski, J.; Kassel, D. B.; Cronin, C. N. ; McRee, D. E., Structure of a c-kit product complex reveals the basis for kinase transactivation. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 31461-31464.
- 243 Mol, C. D.; Dougan, D. R.; Schneider, T. R.; Skene, R. J.; Kraus, M. L.; Scheibe, D. N.; Snell, G. P.; Zou, H.; Sang, B. C. ; Wilson, K. P., Structural basis for the autoinhibition and STI-571 inhibition of c-Kit tyrosine kinase. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 31655-31663.
- 244 Read, R. J., Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2001**, *57*, 1373-1382.
- 245 Emsley, P. ; Cowtan, K., Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2126-2132.
- 246 Afonine, P. V.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Mustyakimov, M.; Terwilliger, T. C.; Urzhumtsev, A.; Zwart, P. H. ; Adams, P. D., Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2012**, *68*, 352-367.
- 247 Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkoczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C. ; Zwart, P. H., PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66*, 213-221.
- 248 Schuttelkopf, A. W. ; van Aalten, D. M., PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 1355-1363.
- 249 Joosten, R. P.; Long, F.; Murshudov, G. N. ; Perrakis, A., The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCrJ* **2014**, *1*, 213-220.
- 250 Schrödinger, L., The PyMOL Molecular Graphics System. **2019**.

6 ANHANG

6.1 Zelluläre Evaluierung der Kontrollverbindungen

Tabelle 6-1: Anti-proliferative Aktivitäten der Kontrollverbindungen Pictilisib, Trametinib und Doxorubicin in den unterschiedlichen Zelllinien durch Bestimmung der EC₅₀-Werte.

Zelllinie	CTG EC ₅₀ / nM		
	PI3K-Inhibitor	MEK-Inhibitor	Zytostatikum
	Pictilisib	Trametinib	Doxorubicin
AN3-CA			
PIK3R1 ^{R557_K561>Q} PTEN ^{R130fs} TP53 ^{R213Q}	201 ± 33	> 30000*	31 ± 8
BT-474	n.b.	n.b.	580 ± 138
PIK3CA ^{K111N} TP53 ^{E285K}			
MCF-7	358** ± 50	> 30000	161 ± 15
PIK3CA ^{E545K}			
T-47D	507* ± 0	> 30000*	127 ± 40
PIK3CA ^{H1047R} TP53 ^{L194F}			
ZR-75-1	270 ± 103	> 30000	100 ± 26
PTEN ^{L108R}			
KU-19-19	n.b.	n.b.	58 ± 7
PIK3CA ^{R1023Q} AKT1 ^{E17K/E49K} NRAS ^{Q61R}			
Dan-G	715 ± 350	198** ± 152	132 ± 16
KRAS ^{G12V} ERBB3 ^{I950T}			
HPAF-II	2238 ± 834	98 ± 46	212 ± 59
KRAS ^{G12D} TP53 ^{P151S}			

*: Einfachmessung, **: Zweifachmessung, n.b.: nicht bestimmt.

6.2 Proteinsequenzen

6.2.1 Akt1

1 MGSTSHHHHH HDHITSLYKK AGFENLYFQG SDVAIVKEGW LHKRGEYIKT WRPRYFLLKN
61 DGTFIGYKER PQDVDQREAP LNNFSVAQCQ LMKTERPRPN TFIIRCLQWT TVIERTFHVE
121 TPEEREETT AIQTVADGLK KQAAAEMDFR SGSPSDNSGA EEMEVSLAKP KHRVTMNEFE
181 YLKLLGKGTG GKVILVKEKA TGRYYAMKIL KKEVIVAKDE VAHTLTENRV LQNSRHPFLT
241 ALKYSFQTHD RLCFVMEYAN GGELFFHLSR ERVSEDRAR FYGAEIVSAL DYHSEKNVV
301 YRDLKLENLM LDKDGHKIKIT DFGLCKEGIK DGATMKTFCG TPEYLAPEVL EDNDYGRAVD
361 WWGLGVVMEYE MMCGRLPFYN QDHEKLFELI LMEEIRFPRT LGPEAKSLLS GLLKKDPKQR
421 LGGSEDAKE IMQHRFFAGI VWQHVVYEKLL SPPFKPQVTS ETDTRYFDEE FTAQM

Abbildung 61: Sequenz des Kristallisationskonstrukts von Akt1^{WT} vor Entfernung des His₆-Tags.

Tabelle 6-2: Überblick über Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten der Kristallisationskonstrukte von Akt1.

Konstrukt	Molekulargewicht / Da	Extinktionskoeffizient / M ⁻¹ cm ⁻¹
	geschnitten/ungeschnitten	geschnitten/ungeschnitten
Akt1 ^{WT}	55113 / 51670	66810 / 63830
Akt1 ^{E17K}	55112 / 51669	66810 / 63830
Akt1 ^{C296S}	55097 / 51654	66810 / 63830
Akt1 ^{C310S}	55097 / 51654	66810 / 63830

6.2.2 c-Kit

1 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSM PMYEVQWKVV EESNGNNYSY IDPTQLPYDH KWEFPRNRLS
 61 FGKTLGAGAF GKVVEATAQG LIKSDAAMTV AVKMLKPSAH STEREALMSE LKVL SYLGNH
 121 ENIVNLLGAC THGGPTLVIT EYCCYGDLLN FLRRKRDEFV PYKVAPEDLY KDFLTLEHLL
 181 SFSYQVAKGM AFLASKNCIH RDLAARNILL THGNITKICD FGLARDIKND SNYVDKGNAR
 241 LPVKWMAPES IFNSVYTFES DVWSYGIFLW ELFSLGSSPY PGMPVDSKFY KMIKEGFRMS
 301 SPEYAPAEMY DIMKTCWDAD PDKRPTFKQI VQDIEKQISE STNH

Abbildung 62: Sequenz des Kristallisationskonstrukts von c-Kit^{WT} vor Entfernung des His₆-Tags.

Tabelle 6-3: Überblick über Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten des Kristallisationskonstrukts von c-Kit^{WT}.

Konstrukt	Molekulargewicht / Da	Extinktionskoeffizient / M ⁻¹ cm ⁻¹
	geschnitten/ungeschnitten	geschnitten/ungeschnitten
c-Kit ^{WT}	39169 / 37150	58330 / 58330

6.2.3 PDGFR α

1 MAHHHHHHHH HHGALEVL FQ GPGKQKPRYE IRWRVIESIS PDGHEYIYVD PMQLPYDSRW
 61 EFPRDGLVLG RVLGSGAF GK VVEGTAYGLS RSQPVMKVAV KMLKPTARSS EKQALMSELK
 121 IMTHLGPHLN IVNLLGACTK SGPIYIITEY CFYGDVLVNYL HKNRDSFLSH KKKSMMLDSEV
 181 KNLLSDDNSE GLTLLDLSF TYQVARGMEF LASKNCVHRD LAARNVLLAQ GKIVKICDFG
 241 LARDIMHDSN YVSKGSTFLP VKWMAPESIF DNLYTTLSDV WSYGILLWEI FSLGGTPYPG
 301 MMVDSTFYNK IKSGYRMAKP DHATSEVYEI MVKCNWSEPE KRPSFYHLSE IVENLLPGQY
 361 KKS YEKIHL D FLKSD

Abbildung 63: Sequenz des Kristallisationskonstrukts von PDGFR α ^{WT} vor Entfernung des His₁₀-Tags.

Tabelle 6-4: Überblick über Molekulargewichte und Extinktionskoeffizienten des Kristallisationskonstrukts von PDGFR α ^{WT}.

Konstrukt	Molekulargewicht / Da	Extinktionskoeffizient / M ⁻¹ cm ⁻¹
	geschnitten/ungeschnitten	geschnitten/ungeschnitten
PDGFR α ^{WT}	42804 / 40373	62800 / 62800

6.3 Kinasetitration von Akt1^{WT}

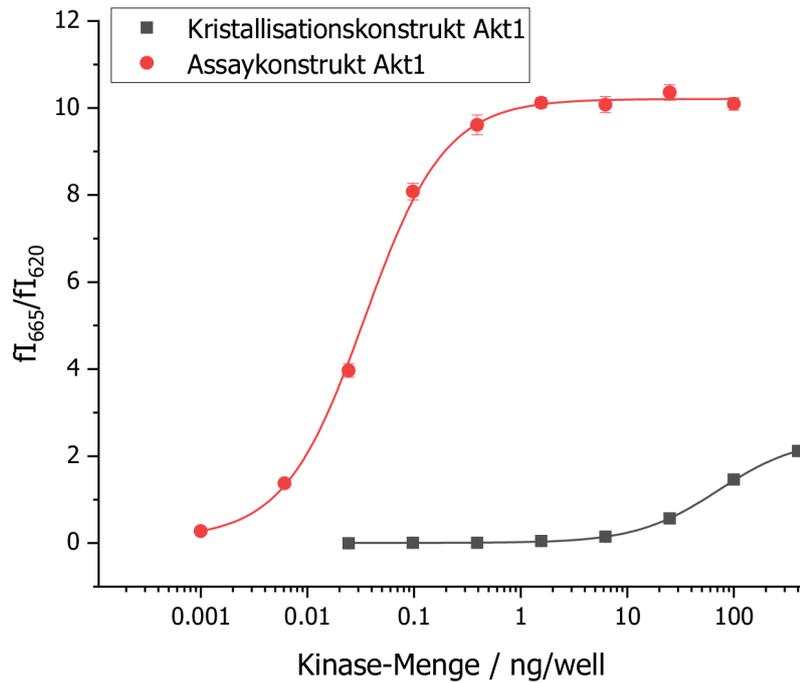


Abbildung 64: Kinasetitration des Kristallisationskonstrukts von Akt1^{WT} (grau) im Vergleich zum aktivierten Assaykonstrukt des Akt1-Wildtyps (rot) im Rahmen des HTRF-Assays.* Das Kristallisationskonstrukt weist eine sehr geringe Kinase-Aktivität mit einem EC₈₀-Wert von 245,1 ng/well im Vergleich zum Assaykonstrukt mit einem EC₈₀-Wert von 0,1 ng/well auf.

* Durchführung der Kinasetitration für das aktivierte Assaykonstrukt des Akt1^{WT} durch Dr. Jörn Weisner (AG D. Rauh, TU Dortmund).

6.4 Datenstatistiken der Komplexstrukturen

6.4.1 Datenstatistiken der Akt1-Kristallstrukturen

Tabelle 6-5: Datenstatistiken der Akt1^{WT} Komplexstrukturen mit Borussertib und ¹⁹F-Borussertib sowie der Akt1^{C296S}-Kristallstruktur. Die Werte in den Klammern beziehen sich auf die jeweils höchste Auflösungsschale.

	Akt1^{WT} Borussertib	Akt1^{WT} ¹⁹F-Borussertib	Akt1^{C296S} RL1780
Datensammlung	PDB: 6HHF		
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten			
a, b, c (Å)	64.37, 68.44, 102.51	67.77, 70.56, 101.97	70.29, 70.84, 91.48
α , β , γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	46.89 – 2.90 (3.00 – 2.90)	48.88 – 2.90 (3.00 – 2.90)	43.80 – 2.10 (2.20 – 2.10)
R _{meas} (%)	8.4 (175.7)	5.0 (170.4)	5.2 (55.6)
R _{merge} (%)	8.1 (169.1)	4.8 (163.7)	5.0 (51.5)
I/ σ I	18.38 (1.57)	26.62 (1.58)	25.06 (3.00)
CC _{1/2}	99.9 (77.0)	100.0 (62.9)	100.0 (91.5)
Vollständigkeit (%)	100.0 (100.0)	99.7 (99.2)	99.7 (99.6)
Redundanz	12.7 (13.7)	13.0 (13.0)	12.1 (7.1)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	46.89 – 2.90	48.88 – 2.90	43.80 – 2.10
Anzahl der Reflexe	10508	11298	27210
R _{work} /R _{free} (%)	23.05/27.36 (33.10/37.21)	27.15/32.97 (39.27/42.41)	21.21/24.54 (26.92/33.06)
Anzahl der Atome			
Protein	3034	2945	3095
Ligand/Ion	45	46	46
Wasser	3	0	64
B-Faktoren			
Protein	123.66	133.37	56.08
Ligand/Ion	100.62	98.99	47.60
Wasser	82.04	-	54.29
Standardabweichung			
Bindungslängen (Å)	0.002	0.002	0.002
Bindungswinkel (°)	0.691	0.511	0.566
Wellenlänge (Å)	0.97862	0.99999	0.99991
Temperatur	100	100	100
Röntgenquelle	PX II am SLS Villigen, CH	PX II am SLS Villigen, CH	PX II am SLS Villigen, CH
Detektor	Pilatus 6MF	Eiger2 X 16M	Eiger2 X 16M
Ramachandran Plot			
Reste in			
bevorzugten Bereich	93.63 %	95.91 %	97.07 %
erlaubten Bereichen	3.09 %	4.09 %	2.93 %
Ausreißer	0.28 %	0.00 %	0.00 %

Tabelle 6-6: Datenstatistiken der Akt1^{WT} Komplexstrukturen mit RL1780, RL1781 und RL1782. Die Werte in den Klammern beziehen sich auf die jeweils höchste Auflösungsschale.

	Akt1^{WT} RL1780	Akt1^{WT} RL1781	Akt1^{WT} RL1782
Datensammlung	PDB: 6HHG	PDB: 6HHH	PDB: 6HHI
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten			
a, b, c (Å)	70.82, 71.23, 91.24	70.32, 70.89, 91.08	70.17, 70.96, 91.11
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	45.62 – 2.30 (2.40 – 2.30)	45.54 – 2.70 (2.80 – 2.70)	45.56 – 2.70 (2.80 – 2.70)
R _{meas} (%)	12.8 (145.8)	7.5 (99.7)	8.5 (67.6)
R _{merge} (%)	12.6 (137.7)	7.4 (99.7)	8.1 (69.0)
I/σI	12.86 (1.37)	24.48 (2.77)	21.39 (3.71)
CC _{1/2}	99.8 (59.9)	100.0 (92.1)	99.9 (95.0)
Vollständigkeit (%)	99.9 (99.5)	100.0 (99.8)	100.0 (100.0)
Redundanz	12.0 (7.7)	13.0 (13.8)	13.1 (13.7)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	45.62 – 2.30	45.54 – 2.70	45.55 – 2.70
Anzahl der Reflexe	21088	13003	12991
R _{work} /R _{free} (%)	21.04/24.61 (30.08/36.32)	21.44/26.57 (26.92/33.80)	22.76/25.80 (30.38/32.42)
Anzahl der Atome			
Protein	3190	3132	3218
Ligand/Ion	46	41	44
Wasser	78	21	18
B-Faktoren			
Protein	65.27	92.08	84.17
Ligand/Ion	56.48	53.46	77.14
Wasser	57.84	69.98	64.94
Standardabweichung			
Bindungslängen(Å)	0.002	0.005	0.003
Bindungswinkel (°)	0.548	0.787	0.630
Wellenlänge (Å)	0.99991	0.99992	0.97769
Temperatur	100	100	100
Röntgenquelle	PX II am SLS Villigen, CH	PX II am SLS Villigen, CH	PX II am SLS Villigen, CH
Detektor	Pilatus 6MF	Pilatus 6MF	Pilatus 6MF
Ramachandran Plot			
Reste in			
bevorzugtem Bereich	97.34 %	96.75 %	97.10 %
erlaubten Bereichen	2.66 %	3.25 %	2.90 %
Ausreißer	0.00 %	0.00 %	0.00 %

Tabelle 6-7: Datenstatistiken der Akt1^{WT} Komplexstrukturen mit RL2132, RL2232 und RL2323. Die Werte in den Klammern beziehen sich auf die jeweils höchste Auflösungsschale.

	Akt1^{WT} RL2132	Akt1^{WT} RL2232	Akt1^{WT} RL2323
Datensammlung	PDB: 6HHJ		
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten			
a, b, c (Å)	70.05, 71.37, 90.96	66.30, 69.02, 103.18	68.56, 70.64, 102.64
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	43.81 – 2.30 (2.40 – 2.30)	47.81 – 2.80 (2.90 – 2.80)	41.52 – 2.70 (2.80 – 2.70)
R _{meas} (%)	20.1 (110.3)	14.3 (134.1)	4.2 (138.3)
R _{merge} (%)	18.5 (107.5)	13.8 (129.0)	4.0 (132.8)
I/σI	7.81 (1.37)	12.98 (1.60)	35.34 (2.26)
CC _{1/2}	99.4 (70.8)	99.9 (77.2)	100.0 (80.3)
Vollständigkeit (%)	99.9 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundanz	7.2 (7.1)	13.1 (13.4)	13.0 (12.8)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	43.81 – 2.30	41.32 – 2.80	41.52 – 2.70
Anzahl der Reflexe	20854	12156	13502
R _{work} /R _{free} (%)	22.20/24.35 (30.57/31.17)	22.16/25.11 (31.50/36.01)	23.81/25.25 (30.82/34.32)
Anzahl der Atome			
Protein	3378	3127	3049
Ligand/Ion	46	44	43
Wasser	120	23	7
B-Faktoren			
Protein	50.85	80.21	97.26
Ligand/Ion	39.43	54.75	67.00
Wasser	41.40	62.61	70.22
Standardabweichung			
Bindungslängen(Å)	0.002	0.002	0.003
Bindungswinkel (°)	0.592	0.581	0.742
Wellenlänge (Å)	1.00000	0.91504	0.91504
Temperatur	100	100	100
Röntgenquelle	PX II am SLS Villigen, CH	PX II am SLS Villigen, CH	PX II am SLS Villigen, CH
Detektor	Pilatus 6MF	Pilatus 6MF	Pilatus 6MF
Ramachandran Plot			
Reste in			
bevorzugtem Bereich	97.77 %	95.91 %	96.37 %
erlaubten Bereichen	2.23 %	3.81 %	3.63 %
Ausreißer	0.00 %	0.27 %	0.00 %

Tabelle 6-8: Datenstatistiken der Akt1^{WT} Komplexstrukturen mit RL2237, RL2407 und RL2461. Die Werte in den Klammern beziehen sich auf die jeweils höchste Auflösungsschale.

	Akt1^{WT} RL2237	Akt1^{WT} RL2407	Akt1^{WT} RL2461
Datensammlung		PDB: 6S9W	PDB: 69SX
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten			
a, b, c (Å)	70.24, 71.20, 90.91	70.07, 71.03, 91.34	71.46, 71.33, 91.56
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	45.46 – 2.40 (2.50 – 2.40)	45.67 – 2.30 (2.40 – 2.30)	45.78 – 2.60 (2.70 – 2.60)
R _{meas} (%)	11.0 (144.6)	10.2 (170.5)	5.1 (156.6)
R _{merge} (%)	10.6 (139.0)	9.8 (163.7)	4.9 (150.8)
I/σI	15.60 (2.16)	15.06 (1.62)	30.05 (1.8)
CC _{1/2}	99.9 (76.7)	99.9 (62.9)	100 (76.4)
Vollständigkeit (%)	100.0 (100.0)	91.8 (100)	100.0 (100.0)
Redundanz	12.9 (13.2)	12.6 (12.9)	13.0 (13.8)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	45.46 – 2.40	45.67 – 2.30	38.53 – 2.60
Anzahl der Reflexe	18411	19149	14732
R _{work} /R _{free} (%)	19.37/23.51 (25.83/29.99)	20.47/26.06 (28.65/36.85)	21.15/23.63 (35.99/38.18)
Anzahl der Atome			
Protein	3226	3394	3162
Ligand/Ion	46	42	49
Wasser	28	12	12
B-Faktoren			
Protein	67.85	70.94	98.84
Ligand/Ion	52.30	58.65	82.24
Wasser	59.95	54.54	87.74
Standardabweichung			
Bindungslängen(Å)	0.003	0.003	0.003
Bindungswinkel (°)	0.690	0.633	0.611
Wellenlänge (Å)	0.91886	0.91886	0.91955
Temperatur	100	100	100
Röntgenquelle	PX II am SLS Villigen, CH	PX II am SLS Villigen, CH	PX II am SLS Villigen, CH
Detektor	Pilatus 6MF	Pilatus 6MF	Pilatus 6MF
Ramachandran Plot			
Reste in			
bevorzugtem Bereich	97.12 %	98.02 %	97.58 %
erlaubten Bereichen	2.62 %	1.98 %	2.42 %
Ausreißer	0.26 %	0.00 %	0.00 %

6.4.2 Datenstatistiken der c-Kit^{WT}-Kristallstrukturen

Tabelle 6-9: Datenstatistiken der c-Kit^{WT} Komplexstruktur mit Sunitinib und der *Soaking*-Struktur mit RL2319. Die Werte in den Klammern beziehen sich auf die jeweils höchste Auflösungsschale.

	c-Kit ^{WT} Sunitinib	c-Kit ^{WT} Soaking mit RL2319
Datensammlung		
Raumgruppe	C 2	C 2
Zellkonstanten		
a, b, c (Å)	97.77, 69.82, 55.93	98.88, 69.44, 56.35
α , β , γ (°)	90, 117, 90	90, 117, 90
Auflösung (Å)	43.42 – 1.60 (1.70 – 1.60)	44.76 – 2.10 (2.20 – 2.10)
R _{meas} (%)	4.9 (86.2)	9.3 (92.0)
R _{merge} (%)	4.5 (79.6)	7.9 (76.6)
I/ σ I	19.20 (2.62)	10.35 (1.65)
CC _{1/2}	99.9 (89.0)	99.9 (62.9)
Vollständigkeit (%)	98.8 (97.2)	99.0 (99.4)
Redundanz	6.8 (6.9)	3.5 (3.3)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	43.42 – 1.60	43.87 – 2.10
Anzahl der Reflexe	51202	19701
R _{work} /R _{free} (%)	22.00/23.87 (31.78/36.09)	19.44/21.63 (30.53/34.61)
Anzahl der Atome		
Protein	2333	2344
Ligand/Ion	29	17
Wasser	124	62
B-Faktoren		
Protein	40.19	48.28
Ligand/Ion	60.34	59.87
Wasser	48.48	46.86
Standardabweichung		
Bindungslängen (Å)	0.006	0.002
Bindungswinkel (°)	0.840	0.526
Wellenlänge (Å)	0.99999	0.99999
Temperatur	100	100
Röntgenquelle	PX II am SLS Villigen, CH	PX II am SLS Villigen, CH
Detektor	Eiger2 X 16M	Eiger2 X 16M
Ramachandran Plot		
Reste in		
bevorzugten Bereichen	97.59 %	98.96 %
erlaubten Bereichen	1.72 %	1.04 %
Ausreißer	0.69 %	0.00 %

6.5 *Simulated Annealing OMIT Map* der Komplexstruktur von Akt1^{WT} mit Borussertib

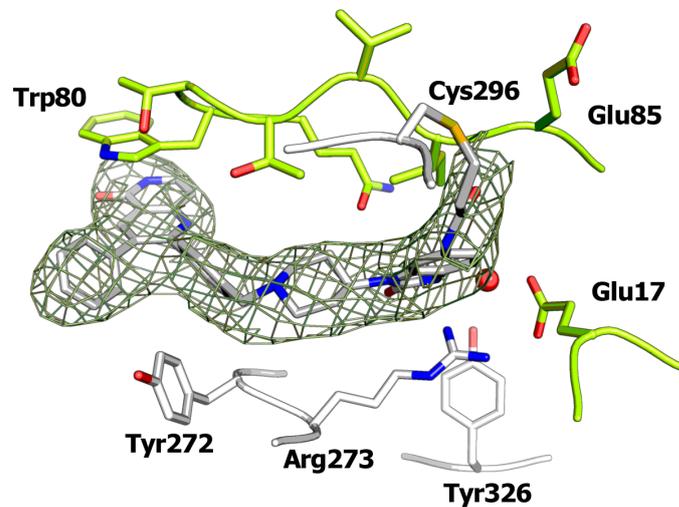


Abbildung 65: F_0F_C *simulated annealing omit map* der Komplexstruktur von Akt1^{WT} mit Borussertib. Die F_0F_C -Elektronendichte wurde auf $\sigma = 2$ konturiert. Die Differenz-Elektronendichte weist auf eine unvollständige Besetzung durch die Adressierung beider Cystein-Seitenketten Cys296 und Cys310. Eine bevorzugte Modifikation von Cys296 kann für Borussertib beobachtet werden.

6.6 Methylierung von Akt1^{E17K} zur Kristallisation

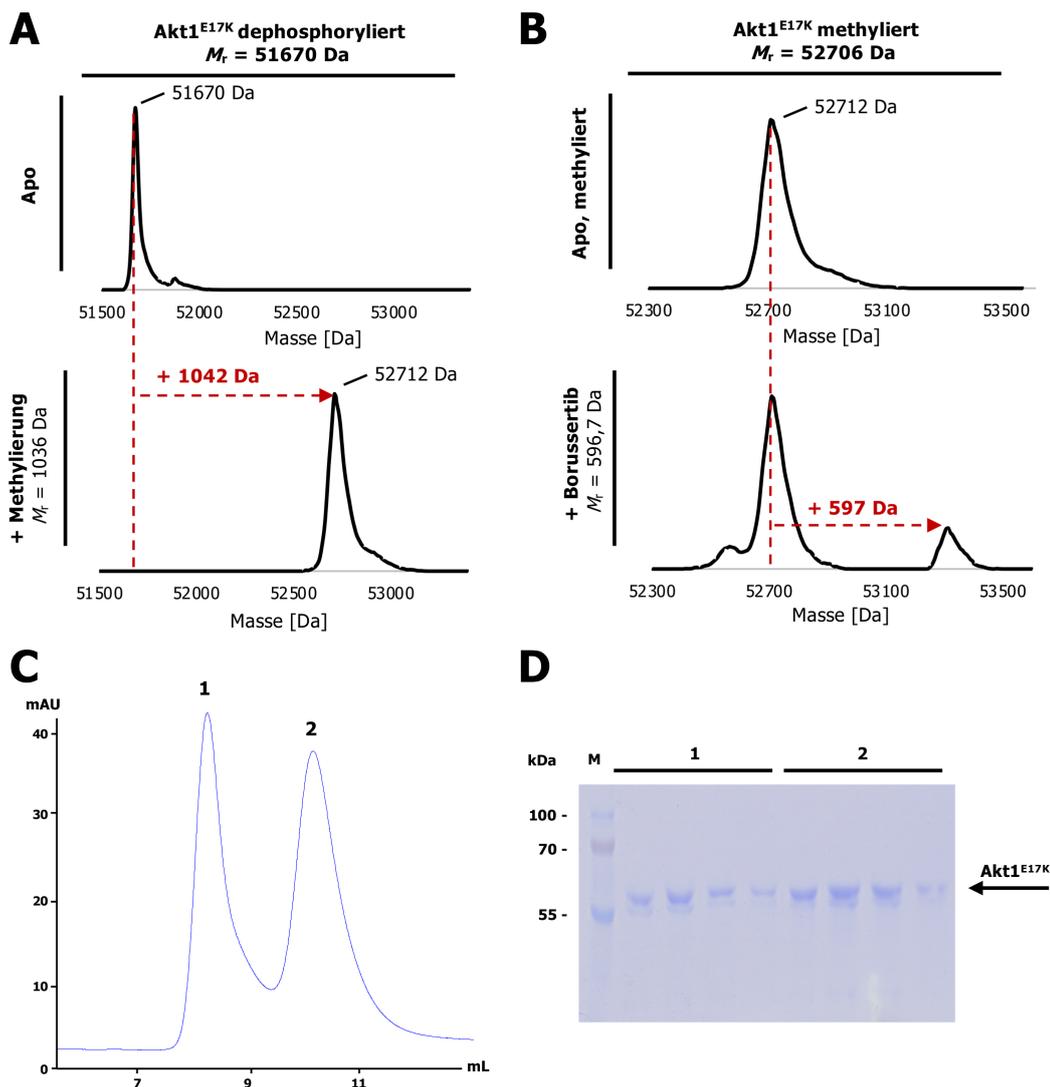


Abbildung 66: Reduktive Methylierung von Akt1^{E17K}. A: Massenspektrometrische Analyse weist die Methylierung aller 36 vorhandenen Lysine sowie des N-Terminus nach. Die theoretische Masse einer angefügten Methylgruppe beträgt 28 Da, sodass eine vollständige Methylierung einer Massenverschiebung um 1036 Da entspricht. Mit einer Verschiebung um 1042 Da liegt die identifizierte Masse im Toleranzbereich. B: Nach einstündiger Inkubation mit einem dreifachen molaren Überschuss an Borussertib keine eine unvollständige kovalente Modifikation beobachtet werden. C-D: Gelfiltration der methylierten Proteinlösung. C: Chromtogramm. Blau: UV-Signal. D: SDS-Gel der Gelfiltration. M: Marker, 1-2: Elutionspeaks 1-2. Die Proteinfractionen des ersten Peaks wurden mit dem Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule eluiert und können vermutlich aggregiertem Protein zugeordnet werden. Daher wurden lediglich die Fractionen des zweiten Peaks für die *Fine Screens* mit den Sphärolit-Bedingungen verwendet, wobei nur klare Tropfen zu beobachten waren.

6.7 Viabilitätsassay mit murinen Ba/F3-Zellen

6.7.1 Zellzahlbestimmung der Ba/F3-Zellen

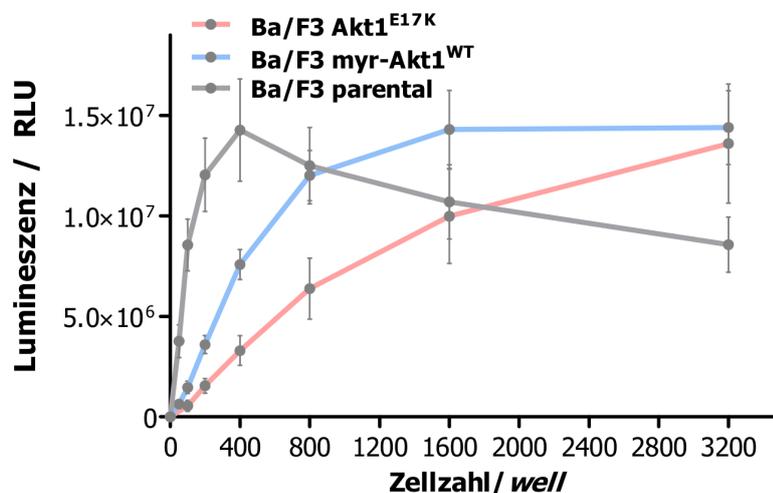


Abbildung 67: Zellzahlbestimmung im Rahmen des CellTiter-Glo Assays für die transduzierten Ba/F3 Akt1^{E17K}- und Ba/F3 myr-Akt1^{WT}-Zelllinien sowie die parentalen Ba/F3-Zellen. Ba/F3 Akt1^{E17K}: 800 Zellen/well, Ba/F3 myr-Akt1^{WT}: 400 Zellen/well, parentale Ba/F3: 100 Zellen/well.

6.7.2 Bestimmung des anti-proliferativen Effekts von Akt-Inhibitoren in parentalen Ba/F3

Tabelle 6-10: Bestimmung der EC₅₀-Werte verschiedener Referenzverbindungen und kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren in der parentalen Ba/F3-Zelllinie.

	Ba/F3 parental CTG EC ₅₀ / nM	
	Inhibitor	
ATP-kompetitive Akt-Inhibitoren	Capivasertib	27894 ± 2978
	Ipatasertib	> 30000
Allosterische Akt-Inhibitoren	MK-2206	8525 ± 833
	Miransertib	3637 ± 964
	Borussertib	24355 ± 7218
	RL1782	11565 ± 3859
CAAIs	RL2788	15108 ± 265
	RL3159	> 30000
	RL3160	> 30000
PI3K-Inhibitor	Pictilisib	9880 ± 2712
MEK-Inhibitor	Trametinib	3345 ± 732

7 EIDESTAATLICHE VERSICHERUNG (AFFIDATIV)

Landel, Ina

Name, Vorname
(Surname, first name)

148803

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,

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Strukturbiologische Untersuchung 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,

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)