

# **Biochemische und Strukturbiologische Evaluierung von MKK7-Ligand Wechselwirkungen**

## **Dissertation**

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

vorgelegt von  
*Patrik Wolle*  
geboren in Hamm

23. April 2021

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel RAUH
2. Gutachter: Prof. Dr. Susanne BRAKMANN



# Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Name, Vorname  
(Surname, first name)

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.

Ort, Datum  
(Place, date)

Unterschrift  
(Signature)

Titel der Dissertation:  
(Title of the thesis):

---

---

---

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.**

Ort, Datum  
(Place, date)

Unterschrift  
(Signature)



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2014 bis Dezember 2018 unter der Leitung von Prof. Dr. Daniel Rauh im Fachbereich Chemische Biologie und Medizinische Chemie der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.



## Zusammenfassung

Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Signalwege sind in eukaryotischen Zellen von besonderer Bedeutung, da sie einen zentralen Bestandteil der Weiterleitung von extrazellulären Signalen zum Zellkern darstellen. Beim Menschen sind insgesamt vier MAPK-Signalwege bekannt.

In dieser Arbeit wurde im Speziellen der JNK-Signalweg genauer untersucht, der vor allem in Folge von physischen Stimuli wie Hitze, Strahlung und osmotischen Schock sowie Cytokine aktiviert wird. Ebenso ist der JNK-Signalweg in die Entwicklung von Organen während der Embryogenese und in der Entwicklung des Gehirns und des Nervensystems beteiligt. Dies macht den Signalweg zu einem relevanten Ziel für die Wirkstoffforschung. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine direkte Einwirkung auf JNK, zum Beispiel durch selektive JNK-Inhibitoren, viele Nebenwirkungen auslösen kann. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit die Regulierung einer der beiden Aktivatoren von JNK, die Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 7 (MKK7), genauer analysiert werden. Hierfür sollte nach Liganden gesucht werden, welche die Aktivität der Kinase innerhalb eines Organismus spezifisch modulieren können, mit dem Ziel, mit Hilfe dieser Substanz Veränderungen in der Funktionsweise des Signalweges, zum Beispiel in den Phosphorylierungsmustern der JNK Substrate, oder in der Morphologie der Zelle, zu detektieren.

Dazu wurde zunächst eine Auswahl von verschiedenen biochemischen Assays hinsichtlich ihrer Eignung auf die Charakterisierung von MKK7-Liganden untersucht und mit einem, auf diese Weise identifizierten, geeignetem System eine Bibliothek niedermolekularer Substanzen durchmustert. Die gefundenen Hits wurden sowohl biochemisch als auch mit Hilfe von massenspektrometrischen Messungen validiert. Der potenteste Inhibitor (Verbindung **22**) wurde anschließend in Mäusen auf seine pharmakokinetischen Eigenschaften hin untersucht, und in einem Ansatz mit *Dorsal Root Ganglion* (DRG)-Zellen auf seine spezifische Wirksamkeit hin untersucht und zeigte auch hier eine hohe Aktivität wie auch Selektivität.

Zusätzlich wurde Verbindung **22** wie auch eine Reihe weiterer Inhibitoren im Komplex mit MKK7 kokristallisiert, wodurch der Bindungsmodus dieser Inhibitoren aufgeklärt werden konnte.



## Summary

Mitogen-activated protein kinase signaling pathways are of particular importance in eukaryotic cells, since they represent a key part in the forwarding of extracellular signals to the nucleus. For humans, there are known a total of four MAPK-signaling pathways. In this work, the JNK signaling pathway was examined in more detail, mainly due to its activation by physical stimuli such as heat, radiation and osmotic shock, as well as cytokines. Likewise, the JNK signaling pathway is also involved in the development of organs during embryogenesis and the development of the brain and nervous system. This makes the signal path to a relevant drug discovery target. It has already been shown, that direct impact on JNK, for example, through selective JNK inhibitors can cause many side effects. For this reason, this work had to analyze the regulation of one of the two activators of JNK, the Mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MKK7), in more detail. That for, one should search for ligands which can specifically modulate the activity of the kinase within an organism, with the goal of detecting changes in the functioning of the signaling pathway with the help of this substance, for example like phosphorylation patterns of the JNK substrates or morphology of the cell. This was initially done by a selection of different biochemical assays, which were examined for their suitability for the characterization of MKK7 ligands. A library of small molecules was scrutinized with a suitable system, that was identified by this. The found hits were validated, both biochemically and by mass spectrometry measurements. The most potent inhibitor (Compound 22) was subsequently investigated for its pharmacokinetic properties in mice, and in an approach with Dorsal Root Ganglion (DRG)-cells, to its specific effectiveness and also showed high activity here as well as selectivity. In addition, compound 22, as well as a number of other inhibitors in the complex with MKK7, was cocrystallized, which could clarify the binding mode of these inhibitors.



## Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Daniel Rauh für die interessante Aufgabenstellung sowie die engagierte Betreuung während meiner Promotion bedanken. Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Brakmann meinen Dank für die Übernahme des Koreferats aussprechen.

Bei meinen Büro- und Laborkollegen die immer für ein hilfreiches Gespräch sowie die gute Zusammenarbeit im Labor zur Verfügung standen.

Besonderer Dank geht an Simone Eppmann und Andreas Arndt für die tatkräftige Unterstützung und große Hilfsbereitschaft bei der Laborarbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei dem gesamten Arbeitskreis Rauh für die angenehme Arbeitsatmosphäre, den freundschaftlichen Kontakt, die anregenden Diskussionen und die Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein Dank gilt außerdem sämtlichen Korrekturlesern, sowie Ina Landel die durch ihre Masterarbeit zu dieser Arbeit beigetragen hat, auch wenn manche Ergebnisse nur indirekt einfließen konnten.

Mein Dank geht auch an Dr. Ingrid Vetter und Georg Holtermann, die mir bei theoretischen und praktischen Fragen zur Röntgenkristallographie immer weiterhelfen konnten, sowie den gesamten Mitarbeitern die regelmäßig zum SLS gefahren sind um dort Proteinkristalle zu messen. Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Zentralen Einrichtung Biotechnologie am Max-Planck-Institut Dortmund für die Bereitstellung der Nährmedien und die Analyse der DNA-Sequenzierungen.

Besonders bedanken möchte ich mich auch beim meinen Eltern, meinen Geschwistern, meinen Schwiegereltern und meinen Freunden für die Hilfe und Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Vor allem möchte ich mich bei meiner Frau Ann-Kathrin, für die jahrelange Unterstützung und dafür, dass sie immer für mich da war bedanken.



## Abkürzungsverzeichnis

<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>CD</b>	<i>common docking</i>
<b>cryo-EM</b>	<i>cryogenic-electron microscopy</i>
<b>DPF</b>	<i>Dortmund Protein Facility</i>
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DFG</b>	Aspartat(D)-Phenylalanin(F)-Glycin(G)
<b>DRG</b>	<i>Dorsal Root Ganglion</i>
<b>DVD</b>	<i>domain for versatile docking</i>
<b>EGF</b>	<i>epidermal growth factor</i>
<b>EGFR</b>	<i>epidermal growth factor receptor</i>
<b>ERK</b>	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
<b>FPLC</b>	<i>Fast Protein Liquid Chromatographie</i>
<b>GADD45</b>	<i>Growth Arrest and DNA Damage</i>
<b>GST</b>	Glutathion-S-Transferase
<b>IMBA</b>	<i>Institute of Molecular Biotechnnology of the Austrian Academy of Science</i>
<b>IPTG</b>	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
<b>JIP</b>	<i>JNK interacting protein</i>
<b>JNK</b>	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
<b>Kan</b>	Kanamycin
<b>LLE</b>	<i>ligand lipophilicity efficiency</i>
<b>MAD</b>	<i>multi-wavelength anomalous dispersion</i>
<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
<b>MAP2K</b>	MAP Kinase Kinase
<b>MAP3K</b>	MAP Kinase Kinase Kinase
<b>MBP</b>	Maltosebindendes Protein
<b>MD</b>	Molekül Dynamik

**MEKK** MAPK/ERK Kinase Kinase  
**MEKK1** Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 1  
**MKK4** Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4  
**MKK7** Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 7  
**MLK** textitmixed lineage kinase  
**NMR** *nuclear magnetic resonance*  
**OD<sub>600</sub>** Optischen Dichte  
**PAMPA** *Parallel artificial membrane permeability assay*  
**PCR** *Polymerase chain reaction*  
**PDB** *protein data bank*  
**PMSF** Phenylmethylsulfonylfluorid  
**PPi** Protein-Protein Interaktion  
**RLU** *relative light unit*  
**SAD** *single-wavelength anomalous dispersion*  
**SAPK** *stress activated protein kinase*  
**SDS-Page** *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*  
**SLS** *Swiss Light Source*  
**TEV** *Tobacco Etch Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase*  
**XDS** *X-ray Detector Software*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Proteinkinasen . . . . .	1
1.2	Mitogen-aktivierte Signalkaskaden . . . . .	3
1.2.1	Die c-Jun-N-terminale Kinase und ihr Signalweg . . . . .	5
1.3	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 7 . . . . .	6
1.4	Zielgerichtete Wirkstoffforschung . . . . .	8
1.5	Strukturbestimmung . . . . .	9
1.5.1	Strukturbestimmung mittels Röntgenkristallographie . . . . .	9
1.5.2	Kristallisation von Proteinen . . . . .	13
1.6	Kovalente Click-Chemie . . . . .	14
1.6.1	Click-Chemie . . . . .	14
<b>2</b>	<b>Ziel dieser Arbeit</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>19</b>
3.1	Expression und Reinigung von Proteinen . . . . .	19
3.1.1	Expression und Reinigung von MKK7 Konstrukten . . . . .	19
3.1.2	Expression und Reinigung von MEKK1 Konstrukten . . . . .	39
3.1.3	Expression und Reinigung von JNK1 Konstrukten . . . . .	45
3.2	Biochemische Charakterisierung von MKK7 Modulatoren . . . . .	48
3.2.1	Radiometrischer Filter-Bindungsassay . . . . .	49
3.2.2	Transcreener <sup>®</sup> ADP <sup>2</sup> FP Assay . . . . .	52
3.2.3	ADP-Glo <sup>™</sup> Kinase Assay . . . . .	58
3.2.4	Screening nach neuen Modulatoren . . . . .	65
3.2.5	Validierung der Screening-Hits . . . . .	70
3.2.6	Erzeugung neuer Modulatoren mittels Click-Chemie . . . . .	73
3.2.7	Validierung von Clickprodukten von Verbindung <b>4</b> . . . . .	75
3.3	Bestimmung von Kinetikdaten . . . . .	76

## Inhaltsverzeichnis

3.4	Massenspektrometrische Untersuchungen . . . . .	78
3.4.1	Bestimmung des Einflusses von ATP auf die Ausbildung der kovalenten Bindung . . . . .	81
3.5	Kristallisation . . . . .	83
3.5.1	Kristallisation von MKK7 . . . . .	83
3.5.2	Feindurchmusterung . . . . .	84
3.6	Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen . . . . .	87
3.6.1	MKK7 Apo Strukturen . . . . .	87
3.6.2	Beschreibung der MKK7-Komplexstrukturen . . . . .	94
3.6.3	Vergleich der MKK7-Komplexstrukturen . . . . .	111
3.7	Selektivitätsprofilung von Verbindung 22 . . . . .	112
3.8	Pharmakokinetische Analyse von Verbindung 22 . . . . .	114
3.9	Biologische Evaluierung von Verbindung 22 . . . . .	117
3.9.1	Inhibition der Ausbildung von Dendriten . . . . .	117
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>121</b>
<b>5</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>125</b>
5.1	Verwendete Chemikalien . . . . .	125
5.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	125
5.3	Verwendete Reagenzien, Nährmedien, Zellen und Kits . . . . .	125
5.4	Verwendete Geräte . . . . .	125
5.5	Mutagenese . . . . .	126
5.6	Proteinexpression . . . . .	127
5.6.1	Heterolge Expression in <i>E. coli</i> . . . . .	127
5.6.2	Heterolge Expression in Insektenzellen . . . . .	128
5.7	Proteinreinigung . . . . .	128
5.7.1	Zellyse . . . . .	128
5.7.2	Reinigung mittels Ni-Affinitätschromatografie . . . . .	129
5.7.3	Reinigung mittels GST-Affinitätschromatografie . . . . .	129
5.7.4	Reinigung mittels MBP-Affinitätschromatografie . . . . .	130
5.7.5	Reinigung mittels Ionenaustauscherchromatografie . . . . .	130
5.7.6	Reinigung mittels Größenausschlusschromatografie . . . . .	131
5.8	Biochemische Charakterisierung . . . . .	132
5.8.1	Radiometrischer Filter Bindungs-Assay . . . . .	132
5.8.2	Transcreener <sup>®</sup> ADP <sup>2</sup> FP Assay . . . . .	133

5.8.3 ADP-Glo Assay . . . . .	135
5.9 Massenspektrometrische Untersuchungen . . . . .	138
5.10 Cov-Click . . . . .	138
5.11 Proteinkristallisation . . . . .	139
5.11.1 Screen nach neuen Kristallisationsbedingungen . . . . .	139
5.11.2 Ansetzten von Kristallisationen . . . . .	139
5.12 Lösen der dreidimensionalen Struktur . . . . .	139
5.12.1 Aufnahme der Diffraktionsbilder . . . . .	139
5.12.2 Datenverarbeitung . . . . .	140
5.12.3 Refinement . . . . .	141
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>141</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>151</b>
6.1 Materialien . . . . .	151
6.1.1 Verwendete Verbrauchsmaterialien . . . . .	151
6.1.2 Verwendete Reagenzien, Nährmedien, Zellen und Kits . . . . .	151
6.2 Geräte . . . . .	152
6.3 Primer . . . . .	152
6.4 Protein-Konstrukte . . . . .	152
6.4.1 MKK7 Kristallisationskonstrukte . . . . .	152
6.4.2 MKK7 Assaykonstrukte . . . . .	154
6.4.3 MEKK1 Konstrukte . . . . .	155
6.4.4 JNK Konstrukte . . . . .	156
6.5 Im Screen eingesetzte Moleküle . . . . .	158
6.6 Eingesetzte Azide . . . . .	171
6.7 Kristallografische Statistiken . . . . .	174
6.7.1 Kristallografiestatistik MKK7 Apo DFG- <i>in</i> und DFG- <i>out</i> . . . . .	174
6.7.2 Kristallografiestatistik Verbindung <b>1</b> und <b>2</b> . . . . .	175
6.7.3 Kristallografiestatistik Verbindung <b>4</b> und <b>9</b> . . . . .	176
6.7.4 Kristallografiestatistik Verbindung <b>12</b> und <b>14</b> . . . . .	177
6.7.5 Kristallografiestatistik Verbindung <b>20</b> und <b>22</b> . . . . .	178
6.8 Selektivitätsprofilung . . . . .	178



# 1 Einleitung

Das Wissen über die Eigenschaften von Enzymen und deren Funktionen in der Zelle ist für die aktuelle akademische sowie industrielle Forschung von großer Wichtigkeit. Durch diese werden immer mehr Zusammenhänge über die Vorgänge in der Zelle an sich und in Verbindung mit dem Körper aufgedeckt, was zu einem deutlich besseren Verständnis von Funktion und Aufbau der beteiligten Signaltransduktionsnetzwerke führt. So ist zum Beispiel bekannt, dass durch die Fehlregulation von Enzymen in solchen Signalwegen viele Krankheiten, wie zum Beispiel Krebs oder neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer entstehen können.<sup>1,2</sup> Aus diesem Grund ist das genaue Verständnis über die Interaktion solcher Enzyme untereinander und in dem gesamten Signalnetz von immenser Bedeutung, um beispielsweise neue Ansätze zur Behandlung dieser Krankheiten zu finden. In diesem Zusammenhang spielen die Vertreter der Enzymklasse der Proteinkinasen eine wichtige Rolle, da diese eine maßgebliche Schlüsselposition in der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle einnehmen und aus diesem Grund häufig an pathogenen Prozessen beteiligt sind.

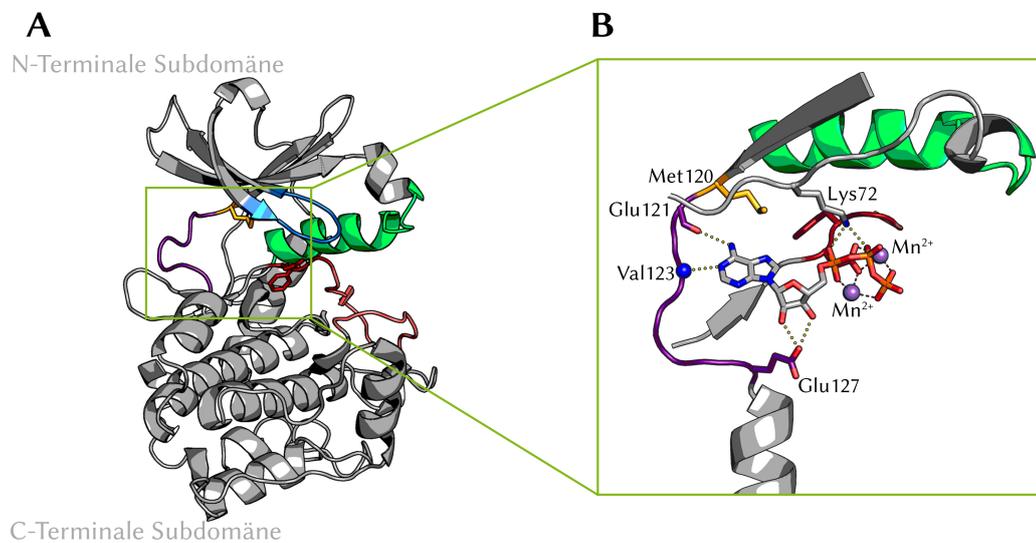
## 1.1 Proteinkinasen

Kinasen sind Enzyme, deren Funktion darin besteht, das  $\gamma$ -Phosphat eines Adenosintriphosphat (ATP)-Moleküls auf Substrate wie Zucker, Nukleotide oder andere Proteine zu übertragen. Wird dabei ein anderes Protein an der Seitenkette einer Aminosäure phosphoryliert, so spricht man von einer Proteinkinase.<sup>3</sup> Im menschlichen Genom sind etwa 518 Proteinkinasen codiert (etwa 2% des menschlichen Genoms), die in der Lage sind insgesamt 30% des menschlichen Proteoms zu phosphorylieren.<sup>4</sup> Diese Phosphorylierung führt häufig zu einer Konformationsänderung des Zielproteins, die durch das Einbringen des Phosphats mit hoher negativer Punktladungsdichte induziert wird. Diese Änderung der Konformation kann unter anderem zu einer Aktivierung oder Inaktivierung des Proteins führen.

## Proteinkinasen

Bei Proteinkinasen wird je nach Substratspezifität zwischen Serin-/Threonin-Kinasen, Tyrosin-Kinasen, dual-spezifischen Kinasen und anderen Spezialfällen unterschieden.<sup>5-7</sup> Dabei werden Tyrosin-Kinasen in Bezug auf ihre Lokalisierung in der Zelle nochmals in Rezeptor- und nicht-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen unterteilt.<sup>8,9</sup>

Kinasen, aber insbesondere auch Proteinkinasen, haben einen typischen, konservierten strukturellen Aufbau, der sich aus einer Reihe spezifischer Motive zusammensetzt (Abbildung 1.1-A).<sup>10-12</sup>



**Abbildung 1.1:** **A:** Übersicht über den Aufbau einer typischen Proteinkinase (PDB-Code: 1atp). Grün:  $\alpha$ C-Helix, lila: Scharnierregion blau: glycinreiche Schleife, orange: Türsteher, rot: DFG-Motiv, rosa: Aktivierungsschleife. **B:** Detailansicht der ATP-Bindetasche mit einem gebundenen ATP-Molekül und in gelb gepunktet den Wasserstoffbrückenbindungen.

Zwischen der N- und der C-terminalen Subdomäne befindet sich die ATP-Bindetasche und das katalytische Zentrum der Kinase (Abbildung 1.1-B). Sie wird auf der einen Seite von der Scharnierregion begrenzt, welche die beiden Subdomänen flexibel miteinander verbindet. Am Anfang der Scharnierregion befindet sich die sogenannte Türsteher-Aminosäure, der ein direkter Einfluss auf die Selektivität der Kinase zugesprochen wird.<sup>13</sup> Am oberen Ende wird die ATP-Bindetasche von der Glycinreichen-Schleife begrenzt, einem sehr flexiblen Bereich der Kinase, der an der Stabilisierung eines gebundenen ATP-Moleküls

beteiligt ist. An der unteren Seite wird sie von dem sogenannten Aspartat(D)-Phenylalanin(F)-Glycin(G) (DFG)-Motiv und der Aktivierungsschleife abgegrenzt. Das DFG-Motiv setzt sich aus der Abfolge der drei Aminosäuren Aspartat(D), Phenylalanin(F) und Glycin(G) zusammen, und stabilisiert eines der Magnesium-Ionen, die als Cofaktoren für die katalytische Aktivität des Enzyms benötigt werden.<sup>14,15</sup> Außerdem lassen sich anhand des DFG-Motivs in vielen Kinasen zwei unterschiedliche Konformationen ausmachen. Die aktive DFG-*in*-Konformation der Kinase, wobei das Aspartat die erwähnte Stabilisierung des Magnesium-Ions ausführt und das Phenylalanin in Richtung der  $\alpha$ C-Helix orientiert ist, sowie die inaktive DFG-*out*-Konformation der Kinase, in der das Motiv in einer gedrehten Konformation vorliegt, so dass das Aspartat nicht mehr für die Stabilisierung des Magnesium-Ions zur Verfügung steht und eine Bindung von ATP nicht mehr möglich ist.<sup>16</sup> Durch das Herausdrehen des Phenylalanins wird in vielen Kinasen allerdings eine zusätzliche Bindetasche, oft *backpocket* genannt, frei.<sup>17,18</sup>

Phosphorylierungen zählen zu den wichtigsten posttranslationalen Modifikationen.<sup>19-21</sup> Durch die Einführung der negativen Ladung in ein Protein kann es zu einer konformationellen Änderung in dessen Struktur kommen, welche neben einer veränderten Aktivität eines Enzyms auch viele weitere Einflüsse haben kann, wie etwa die Ausbildung von Protein-Protein Interaktion (PPI) begünstigen oder stören.<sup>22</sup> Des Weiteren können durch die konformationelle Änderung auch neue Bindetaschen geöffnet oder vorhandene Bindetaschen geschlossen werden, was unter anderem für die Signalweiterleitung innerhalb der Zelle relevant sein kann.<sup>23</sup> Hier spielen Proteinkinasen eine besonders wichtige Rolle. Proteinkinasen sind wichtige Bestandteile von Signalkaskaden, die extrazelluläre Signale empfangen, verarbeiten und in den Zellkern weiterleiten. Eine Besondere Art der Signalkaskaden stellen dabei die Signalwege von Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) dar.

## 1.2 Mitogen-aktivierte Signalkaskaden

MAPK-Signalwege sind wichtige Bestandteile jeder eukaryontischen Zelle. Sie leiten einen extrazellulären Stimulus ins Zellinnere und zum Zellkern, wo über Translations- und Transkriptionsereignisse eine Zellantwort eingeleitet wird.<sup>24</sup> Das initiale Signal geht dabei häufig von einem Liganden (bspw. *epidermal growth factor* (EGF)), der an einen Rezeptor (bspw. *epidermal growth factor recep-*

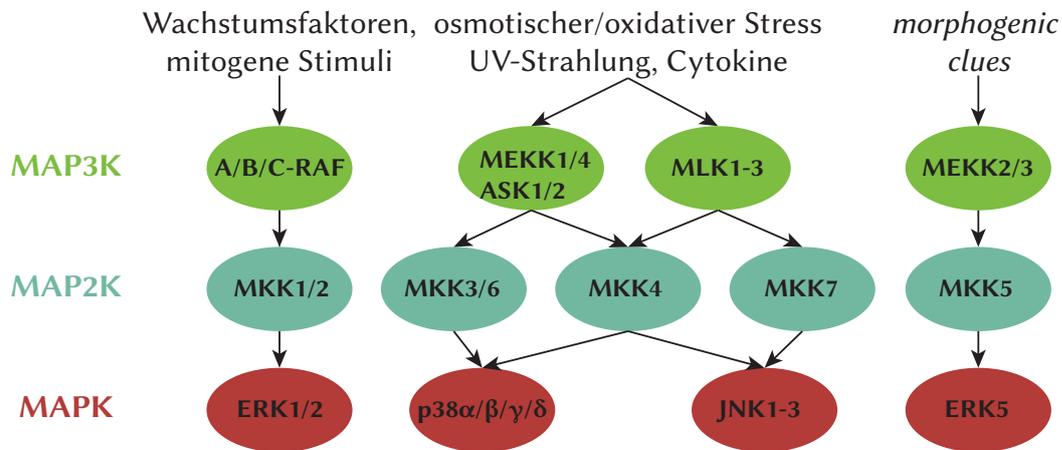
### Mitogen-aktivierte Signalkaskaden

tor (EGFR)), bindet aus.<sup>25,26</sup> Der Rezeptor gibt das Signal über die Membran an Proteine im Cytoplasma weiter. Neben extrazellulären Liganden als Stimuli gibt es noch weitere Signale, zum Beispiel physische Stimuli, wie osmotischer oder oxidativer Stress und UV-Strahlung, die eine nachfolgende Transduktion auslösen können.<sup>27</sup> Diese verschiedenen Reize werden ebenfalls über spezielle Proteine wahrgenommen und entsprechend weitergeleitet.

Dabei kommen neben verschiedenen Arten von Kinasen häufig auch kleine GTPasen zum Einsatz. Diese bilden Komplexe aus, die mit Hilfe von Adapterproteine, die in der Lage sind spezielle Epitope (bspw. phosphorylierte Seitenketten) zu erkennen, ausgebildet werden. So werden die benötigten Proteine in räumliche Nähe zueinander gebracht und sind in der Lage das Signal weiterzugeben.

Ein wichtiger Teil vieler Signalwege sind die MAPK, welche eine Reihe von verschiedenen Proteinkinasen darstellen. Diese sind in einer Kaskade angeordnet, welche eine Amplifikation des eingehenden Signals ermöglicht. Neben der Amplifikation ist aber auch die Regulation über diese Anordnung möglich, da viele dieser Kinasen stark reglementierenden Rückkopplungsmechanismen unterliegen.<sup>28</sup>

Der charakteristische Aufbau von MAPK-Kaskaden ist dabei stets gleich. Durch das extrazelluläre Signal wird eine MAP Kinase Kinase Kinase (MAP3K) aktiviert. Diese hat wiederum eine MAP Kinase Kinase (MAP2K) als Substrat, wobei viele MAP3Ks keine besondere Spezifität aufweisen und eine selektive Aktivierung stattdessen oft durch entsprechende Adapterproteine vermittelt wird.<sup>29</sup> Dahingegen haben MAP2Ks generell eine sehr hohe Substratspezifität.<sup>30</sup> Es sind insgesamt vier humane MAPK-Signalwege bekannt, die wie folgt aufgeteilt werden, *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-Signalweg, p38-Signalweg, *c-Jun N-terminal kinase* (JNK)-Signalweg und der ERK5-Signalweg (Abbildung 1.2).<sup>24</sup>



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung der vier bekannten eukaryontischen MAPK-Signalkaskaden, aufgeteilt nach den jeweiligen extrazellulären Stimuli.<sup>31</sup>

Die verschiedenen Signalwege haben dabei durchaus überschneidende Funktionen, werden aber häufig durch unterschiedliche Stimuli angeregt. So ist der ERK1/2-Signalweg hauptsächlich an der Differenzierung und dem Zellwachstum so wie der Zellteilung beteiligt und wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren aktiviert.

Der p38-Signalweg spielt wiederum eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen, wohingegen ERK5 wiederum von sogenannten *morphogenic clues* aktiviert wird und vor allem an der Transkriptionskontrolle beteiligt ist. Der JNK-Signalweg wird vor allem durch Umwelteinflüsse und Cytokine aktiviert und ist stark an der Regulation der Apoptose, aber auch an der Entwicklung während der Embryogenese beteiligt.<sup>32,33</sup>

### 1.2.1 Die c-Jun-N-terminale Kinase und ihr Signalweg

JNK oder auch *stress activated protein kinase* (SAPK) ist eine MAPK und existiert in zehn Isoformen, die in drei Kategorien (JNK1-3) eingeteilt werden können, wobei die Isoformen von JNK1 und JNK2 hauptsächlich in Zellen und Gewebe gefunden werden und die Isoformen von JNK3 hingegen im Gehirn.<sup>34</sup> JNK verfügt neben der Kinasedomäne noch über eine *common docking* (CD)-Domäne, die für die selektive Bindung mit ihren beiden Aktivatoren verantwortlich ist. Die Aktivierung des JNK- bzw. SAPK-Signalwegs erfolgt durch Umwelteinflüsse wie

## Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 7

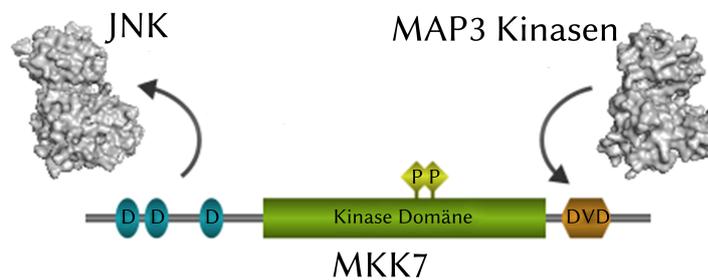
UV/Radioaktive-Strahlung, Hitze, osmotischen Schock oder extrazelluläre Signale wie Cytokine.<sup>35</sup> Dabei kommt es im weiteren Verlauf zu der Aktivierung verschiedener MAP3Ks, unter anderem MAPK/ERK Kinase Kinase (MEKK)1-4 und textitmixed lineage kinase (MLK)1-3. Die Aktivierung dieser MAP3Ks führt dazu, dass ihrerseits Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 4 (MKK4) und Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 7 (MKK7) aktiviert werden.<sup>36</sup> Diese beiden MAP2Ks sind in der Lage die verschiedenen Isoformen von JNK am spezifischen TXY-Motiv zu phosphorylieren.<sup>37</sup> Dabei wird davon ausgegangen, dass diese Interaktion von großen Adapterproteinen, den *JNK interacting protein* (JIP) unterstützt wird.<sup>38,39</sup>

JNK spielt eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Apoptose. Eine Aktivierung des JNK-Signalwegs, vor allem durch physischen und chemischen Stress, soll durch die Einleitung der Apoptose die Entartung der Zelle verhindern. Jedoch ist der Signalweg, durch Mutation und dadurch entsprechende Veränderung der Signalweiterleitung, ebenfalls an der Resistenzentwicklung gegenüber Chemotherapeutika beteiligt.<sup>40</sup> Aus diesem Grund ist eine fein regulierte Steuerung dieses Signalwegs notwendig, da gezeigt werden konnte, dass die reine Inhibition von JNK viele unbeabsichtigte Nebenwirkungen mit sich führt.<sup>41,42</sup> So sind zum Beispiel JNK1 und JNK2 an der korrekten Funktion der Immunzellen beteiligt.<sup>43</sup> Es wurde ebenso gezeigt, dass in viele Fällen eine genauere Steuerung des Signalwegs über den JNK-Aktivator MKK7 möglich ist.<sup>43,44</sup>

### 1.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase 7

MKK7 oder auch Stress-aktivierte Protein-Kinase-Kinase 2 ist ein selektiver JNK Aktivator. MKK7 wie MKK7 ist wie alle MAP2 Kinase eine dual spezifische Proteinkinase. Das bedeutet, dass diese Proteinkinasen sowohl Serin-/Theronin-Seitenketten als auch Tyrosin-Seitenketten phosphorylieren können.<sup>5</sup> Alle bekannten Isoformen von MKK7 werden in einen JNK-bindenden Bereich, eine *domain for versatile docking* (DVD) und eine Kinase-Domäne unterteilt (Abbildung 1.3).

Dabei unterscheiden sich die verschiedenen Isoformen von MKK7, in ihrer Länge, vor allem in der N-terminalen JNK-bindenden Domäne. Die Interaktion mit JNK wird dabei über sogenannte D-Domänen vermittelt. Bei diesen D-Domänen handelt es sich um einen Bereich, in dem vermehrt positiv geladene

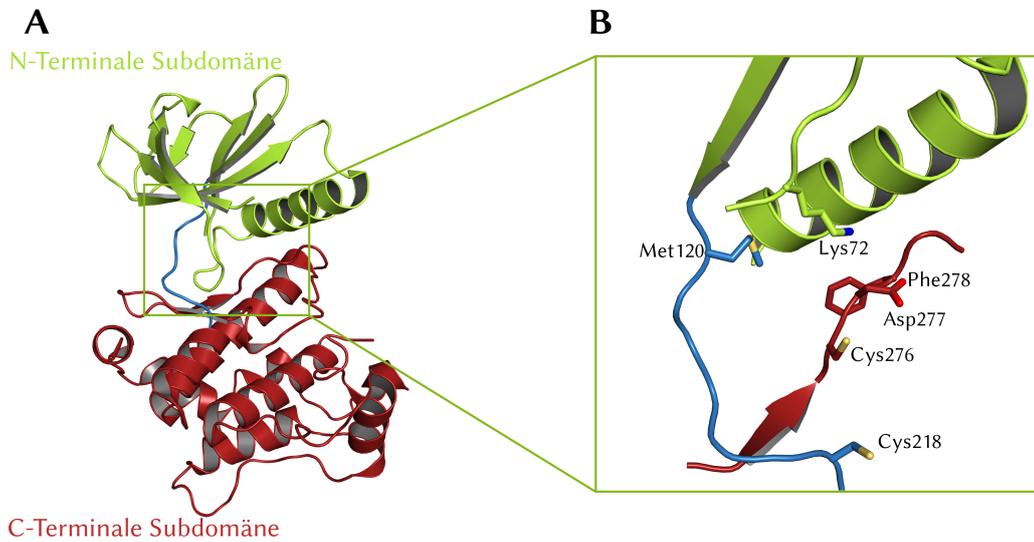


**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen von MKK7.

Aminosäuren auftreten.

Dieser Bereich kann mit der CD-Domäne von JNK, die vor allem negativ geladene Aminosäuren aufweist, interagieren. Die Anzahl der Domänen reguliert dabei in welchem Maße MKK7 mit JNK interagieren kann. So gibt es beispielsweise in murinen Zellen die Unterteilung in  $MKK7\alpha$ ,  $-\beta$  und  $-\gamma$ , wobei die  $\alpha$ -Isoformen von MKK7 über lediglich eine D-Domäne verfügen, während die anderen Isoformen drei D-Domänen aufweisen, wodurch die Bindung zu JNK und daraus folgend, dessen Aktivierung durch MKK7 deutlich gesteigert wird.<sup>42,45</sup> Am C-Terminus befindet sich die sogenannte DVD, ein Motiv, welches die Bindung zu den MAP3Ks vermittelt.<sup>46</sup> Der Aufbau der Kinasedomäne ist bei allen Isoformen grundlegend gleich. Für die Regulation der Kinaseaktivität von besonderem Interesse ist dabei das katalytische Zentrum der Kinase (Abbildung 1.4).

MKK7 spielt in vielen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Unter anderem ist es während der embryonalen Entwicklung bei der Organisation verschiedener Organe beteiligt. Ebenso kann es an der Entwicklung von Krebs<sup>47,48</sup> und neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sein.<sup>49,50</sup> So konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von MKK7 durch das Adapterprotein *Growth Arrest and DNA Damage* ( $GADD45$ ) $\beta$ , dazu führt, dass die Krebszellen im multiplen Myelom weiter leben können, wohingegen eine Inhibition dieser Interaktion und die damit verbundene Reaktivierung von MKK7 zu einem vollständigen Rückgang der Tumorzellen führen kann.<sup>51,52</sup> Als einer von zwei Regulatoren des JNK-Signalwegs ist MKK7 ein hervorragendes Ziel für die Wirkstoffentwicklung, da auf diese Weise eine Perturbation des Signalwegs ermöglicht werden kann, ohne dessen Funktion vollständig zu Inhibieren, was wie bereits in Abschnitt 1.2.1 gezeigt, mit verschiedenen Nebenwirkungen verbunden ist.



**Abbildung 1.4:** **A:** Struktur der Kinase-Domäne von MKK7 (PDB: 2dyl) mit der charakteristischen Aufteilung in N- und C-Terminus. **B:** Detaillierte Sicht auf die ATP-Bindetasche von MKK7 (PDB:2DYL). Von besonderem Interesse für die Wirkstoffentwicklung ist dabei die sterisch anspruchsvolle Türsteheraminosäure Met212, sowie die beiden oberflächenexponierten Cysteine Cys218 und Cys276.

## 1.4 Zielgerichtete Wirkstoffforschung

Durch das steigende Alter der Bevölkerung steigt auch die Anzahl der Erkrankungen wie Krebs, Herzkreislauf- und neurodegenerativen Erkrankungen.<sup>53-55</sup> Aus diesem Grund war der Bedarf an neuen Wirkstoffen und Therapien zuvor noch nie so hoch wie heute. Dabei gibt es viele Eigenschaften, die ein neuer Wirkstoff haben muss, wobei insbesondere Faktoren wie Wirksamkeit und Selektivität hervorzuheben sind. Die klassische Wirkstoffforschung basierte dabei oft auf dem Prinzip der Zufallsentdeckung oder auf der Isolation pharmazeutisch aktiver Substanzen aus Pflanzen oder Tieren. Dem gegenüber steht heute die rationale oder auch zielgerichtete Wirkstoffforschung. Bei der zielgerichteten Wirkstoffforschung wird, im Gegensatz zu der traditionellen Wirkstoffforschung, ein Wirkstoff basierend auf dem Verständnis über die molekularen Hintergründe eines Krankheitsbildes entwickelt, und spezifisch auf ein bestimmtes Zielmolekül hin optimiert.

Dabei wird auf Basis der molekularen Ursache der Krankheit, ein Wirkstoff spezifisch für diese Ursache entwickelt, was in den meisten Fällen in einer hohen Selektivität wie auch Wirksamkeit resultiert. Basierend auf dem Wissen über die molekulare Ursache, bspw. eine bestimmte Mutation, welche zu einem Aminosäureaustausch in einem Protein führt, welche dann zu einer veränderten Aktivität des Proteins führt, kann eine Reihe strukturell angepasster kleiner Moleküle erzeugt werden. Diese können dann durch biochemische, biologische und strukturbiochemische Methoden auf ihre Wirksamkeit sowie Bindungseigenschaften hin untersucht werden. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen können Informationen für Verbesserungen dieser Moleküle generiert werden, welche dann wieder in auf ihre Eigenschaften hin untersucht werden. Durch diesen iterativen Prozess ist es möglich ein hohes Maß an Selektivität und Wirksamkeit zu erzeugen. Eine Voraussetzung für diesen Ansatz ist die Kenntnis über die jeweilige Zielstruktur (bspw. ein Protein), auf welches ein Krankheitsbild zurückgeführt werden kann. Ebenso sind Strukturinformationen über das Zielprotein hilfreich. Solche Informationen werden zum Beispiel durch den Einsatz der Röntgenstrukturanalyse gewonnen.

## 1.5 Strukturbestimmung

Die Grundlage der modernen Wirkstoffforschung ist das Wissen über die Interaktionen zwischen Proteinen und ihren Liganden, Substraten oder Reaktionspartnern. Dies wurde erst durch die Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen ermöglicht, die das erste mal im Jahr 1958 am Beispiel des Myoglobins von KENDREW erfolgreich durchgeführt wurde.<sup>56</sup> Durch die Verbesserung der Computer und der Röntgenquellen, die Entwicklung der Synchrotronquellen sowie die heterologe Expression von Proteinen wurden bis heute bereits 177009 Proteinstrukturen in der *protein data bank* (PDB) hinterlegt.<sup>a</sup>

### 1.5.1 Strukturbestimmung mittels Röntgenkristallographie

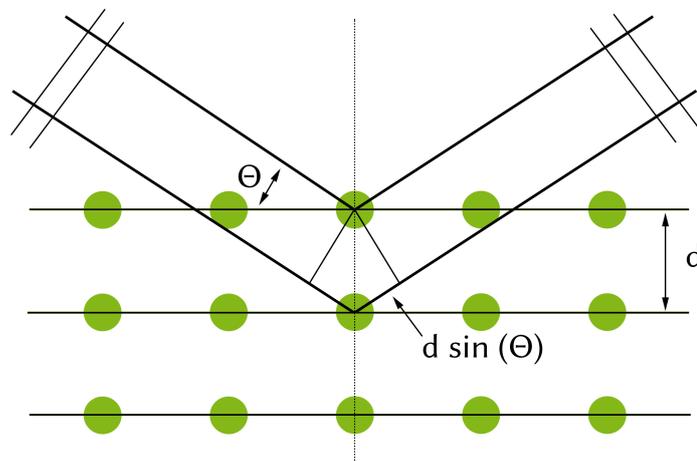
Um die dreidimensionale Struktur eines Proteins zu bestimmen, gibt es mehrere Möglichkeiten: Die *nuclear magnetic resonance* (NMR)-Technologie, die *cryogenic electron microscopy* (*cryo-EM*) und die Röntgenkristallographie.

---

<sup>a</sup>Stand 23.04.2021

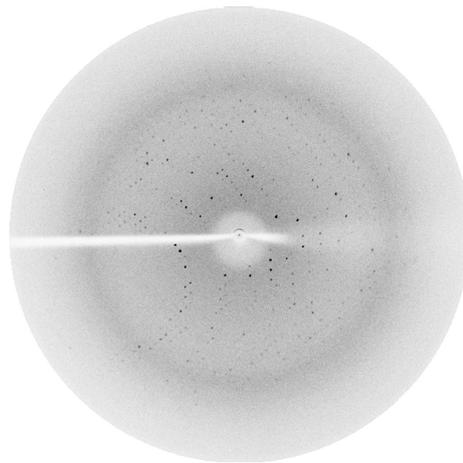
## Strukturbestimmung

Bei der weit verbreiteten Strukturaufklärung mittels Röntgenkristallographie werden Kristalle der zu untersuchenden Substanz, bspw. kleine chemische Moleküle oder Biomakromoleküle, wie Proteine und Nukleinsäuren, durch den Einsatz von Röntgenstrahlung auf ihre Struktur untersucht. Röntgenstrahlung hat eine Wellenlänge im Bereich von 10 nm bis 1 pm und entspricht dabei dem ungefähren Abstand von zwei Atomen in einem Molekül.<sup>57</sup> Zum Beispiels weist eine Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung eine Länge von 154 pm bzw. 1,54 Å auf. Trifft nun ein Röntgenstrahl auf ein Molekül, so kommt es zur Interaktion der Röntgenstrahlen mit der Elektronenhülle der einzelnen Atome, wodurch die Röntgenstrahlen gebeugt, also deren Flugbahn verändert wird. Dieser Effekt ist bei einem einzelnen Molekül jedoch sehr schwach, da lediglich ein kleiner Teil der Strahlung gebeugt wird. Da die Beugung eines einzelnen Moleküls jedoch nicht ausreicht, werden viele Moleküle eingesetzt um das Beugungssignal zu verstärken. Damit die Signale jedoch einheitlich vervielfacht werden und die Beugungssignale verstärkt werden, setzt man Kristalle ein. Kristalle bestehen aus vielen Einheitszellen, die immer wieder über den gleichen Aufbau verfügen. Wenn der Röntgenstrahl nun auf den Kristall trifft, kommt es zu Interferenzen zwischen den am Kristall gebeugten Wellen. Wenn diese Interaktionen unter bestimmten Voraussetzungen zueinander stehen, kommt es zu einer positiven Interferenz und somit zu einem detektierbaren Reflex (Abbildung 1.5).<sup>58</sup>



**Abbildung 1.5:** Schematische Darstellung der Röntgenbeugung nach Bragg.<sup>58</sup>

Nach BRAGG kommt es dabei bei gleichen Einfallswinkeln ( $\Theta$ ) und einem Vielfachen des Gitterabstandes ( $d$ ) zu einer positiven Interferenz der gebeugten Welle, während es bei allen anderen Bedingungen zu einer destruktiven Interferenz kommt. Diese Positive Interferenz resultiert dann in Reflexen auf einem dafür geeigneten Detektor, wodurch ein Diffraktionsbild erhalten wird, auf dem diese Reflexe abgebildet werden (Abbildung 1.6).



**Abbildung 1.6:** Beispiel eines Röntgenbeugungsbildes, aufgenommen mit einem *Image-Plate*-Detektor. Die schwarzen Punkte stellen dabei die Intensität der Reflexe dar. Durch die Anordnung der Reflexe können Rückschlüsse auf die Raumgruppe, sowie die Gitterkonstanten des Kristalls getroffen werden. Der weiße Bereich in der Mitte und zum linken Rand hin entsteht durch den *Beamstop*, der den Detektor vor dem Primärstrahl der Röntgenquelle schützt.

Anhand dieser Reflexe ist es möglich die Abstände der Gitterebenen zu bestimmen. Ist die Raumgruppe des Kristalls bekannt, können die Gitterkonstanten der Einheitszelle bestimmt werden (Gleichung 1.1).

$$\frac{1}{d_{hkl}^2} = \frac{h^2}{a^2} + \frac{k^2}{b^2} + \frac{l^2}{c^2} \quad (1.1)$$

Die Position der Reflexe auf dem Diffraktionsbild ist spezifisch für die Größe, Form und Symmetrie der Einheitszelle. Die Intensität jedes Reflexes ist direkt proportional zu dem Quadrat der Strukturfaktoramplitude.

## Strukturbestimmung

Bei dem Strukturfaktor handelt es sich um eine komplexe Zahl, die sich aus der Strukturfaktoramplitude und der Phase der elektromagnetischen Welle zusammen setzt (Gleichung 1.2).

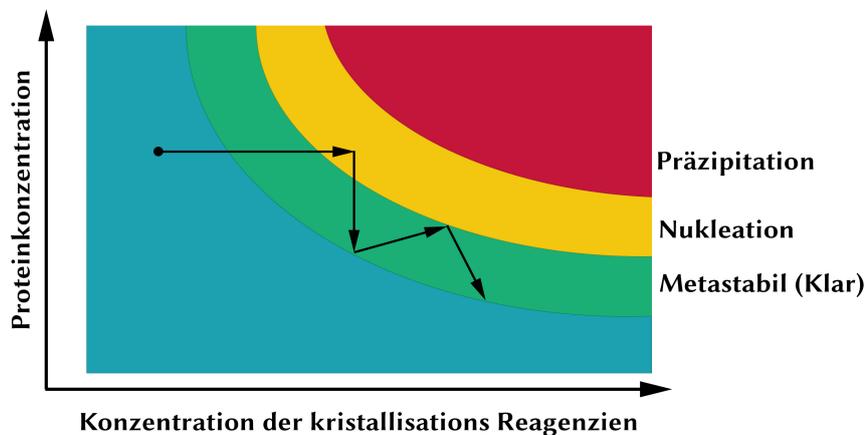
$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{(2\pi i(hx+ky+lz)+i\Theta(hkl))} \quad (1.2)$$

Zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur werden sowohl die Intensität, also die Strukturfaktoramplitude, als auch die Phase benötigt. Aus dem Diffraktionsexperiment ist jedoch nur die Bestimmung der Intensität möglich, nicht jedoch die Bestimmung der Phasen. Dies wird als Phasenproblem bezeichnet. Es wurden mehrere Methoden entwickelt um dieses Problem zu lösen. So können für kleine Moleküle und Proteine, die Diffraktionsdaten mit einer Auflösung von 1.4 Å und besser aufweisen, die Phasen über *ab initio* Rechnungen direkt bestimmt werden.<sup>59,60</sup> Eine andere Möglichkeit stellt die Methode der anomalen Röntgenbeugung dar, wobei zwischen *multi-wavelength anomalous dispersion* (MAD) und *single-wavelength anomalous dispersion* (SAD) unterschieden wird. Dabei wird die Wellenlänge des Röntgenstrahls so eingestellt, dass eine Absorptionskante eines gewählten Atoms abgetastet werden kann, wodurch sich die Streuung des Strahls auf eine bekannte Weise ändert. Durch Aufnahme eines vollen Datensatzes, bei der Absorptionskante (SAD) eines schweren Atoms oder bei der Messung von drei verschiedenen Wellenlängen (MAD)(bei der Absorptionskante, deutlich darunter und darüber), können die Positionen der anomal beugenden Atome bestimmt werden. Basierend darauf können anschließend die Phasen berechnet werden.<sup>61</sup> Die gängigste Methode stellt hierbei aber der molekulare Ersatz dar. Dabei wird eine strukturell ähnliche Proteinstruktur genutzt. Dafür wird das Modell so angepasst, dass die Reflexe, die aus dem Modell berechnet wurden, mit den Positionen der Reflexe aus den gemessenen Daten übereinstimmen. Anschließend können aus den bekannten Daten die Phasen für die neuen Daten berechnet werden.<sup>62</sup>

Dabei ist die Grundlage für die Strukturbestimmung mittels Röntgenkristallographie die Erzeugung eines Kristalls des zu bestimmenden Moleküls. Eine besondere Herausforderung stellt dabei die Kristallisation von Biomakromolekülen wie beispielsweise Proteinen dar.

## 1.5.2 Kristallisation von Proteinen

Für den Einsatz in Röntgenbeugungsexperimenten ist es nötig, dass Proteine, aber auch andere Biomakromoleküle zuvor kristallisiert werden. Dabei stellt die Kristallisation von Proteinen einen langwierigen und komplexen Vorgang dar. Für die Kristallisation von Proteinen sind große Mengen des reinen Proteins notwendig, das sehr langsam aufkonzentriert werden muss, um so über die Löslichkeitsgrenze hinaus zu kommen und dann Kristallisationskeime zu bilden (Abbildung 1.7).



**Abbildung 1.7:** Phasendiagramm der Proteinkristallisation mit den verschiedenen Kristallisationsphasen. Aufgetragen wird dabei die Proteinkonzentration gegen die Konzentration der Kristallisations-Reagenzien.

Nach der Bildung von Kristallisationskeimen, sinkt die Konzentration der Proteine in Lösung und es kommt zur Anlagerung weiterer Proteinmoleküle an die Kristallisationskeime. Die Konzentration der Proteine befindet sich nun immer im Bereich der Metastabilität. Durch das Wachstum der Kristalle werden Proteinmoleküle aus der Lösung entfernt, wodurch die Konzentration in der Lösung sinkt. Durch das diffundieren der Wassermoleküle aus der Proteinlösung steigt die Konzentration der in Lösung befindlichen Proteine wieder.

Bei der Proteinlösung handelt es sich jedoch nicht um reines Protein in Wasser, sondern um eine gepufferte Lösung mit einem spezifischen pH-Wert und einer

## Kovalente Click-Chemie

spezifischen Ionenkonzentration. Diese Werte bestimmen im hohen Maße den Erfolg einer Kristallisation und sind für jedes Protein unterschiedlich. Bis heute ist es nicht möglich diese geeigneten Bedingungen vorherzusagen, weswegen zu deren Identifizierung hunderte bis tausende einzelne Kristallisationsbedingungen in sogenannten *Screenings* durchmustert werden.<sup>63</sup>

Zur Bildung von Proteinkristallen gibt es mehrere Techniken. Die beiden grundlegenden Techniken sind die *hanging-drop* und die *sitting-drop* Methode. Bei beiden handelt es sich um Methoden auf Grundlage der Dampfdiffusion, wobei ein kleiner Tropfen Proteinlösung (normalerweise 1  $\mu$ L) mit der jeweiligen Reservoirlösung vermischt und luftdicht versiegelt wird. Wie die Namen schon verraten, wird bei der *hanging-drop*-Methode der Tropfen über eine Reservoirlösung gehangen, während bei der *sitting-drop*-Methode der Tropfen auf einer über die Luft mit der Reservoirlösung verbundenen Kavität platziert wird. Nun kommt es aufgrund des Dampfdrucks und des Konzentrationsunterschieds zu einer Diffusion der Lösemittelmoleküle vom Tropfen in das Reservoir. Dadurch kommt es zu einer langsamen Aufkonzentration der Proteinlösung und im optimalen Fall zur Kristallisation. Die auf diese Weise gewonnenen Kristalle können daraufhin zur Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eingesetzt werden (vgl. 1.5.1).

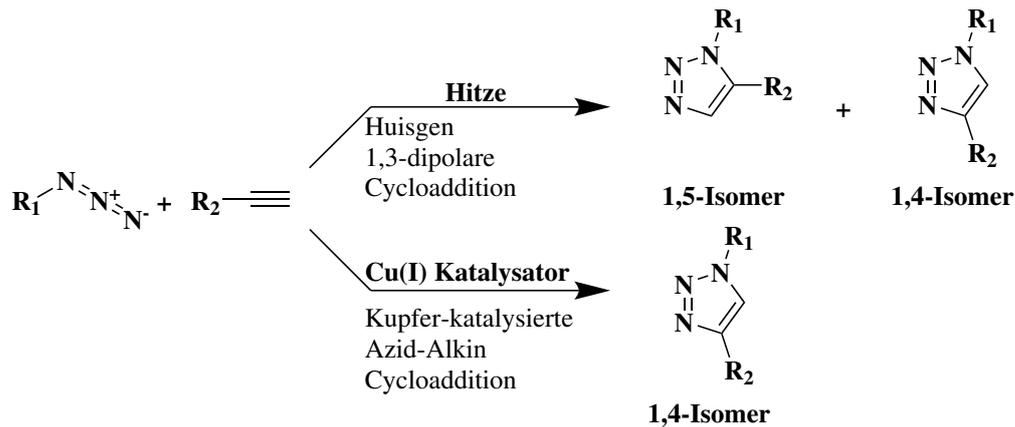
## 1.6 Kovalente Click-Chemie

Durch die gewonnenen Informationen aus der Strukturbestimmung eines Proteins kann, basierend auf der Struktur, mit der Entwicklung neuer Modulatoren begonnen werden. Der klassische Ansatz zum Auffinden von Modulatoren besteht in der Synthese und biochemischen Analyse von diesen Molekülen. Aus den Ergebnissen kann eine Struktur-Wirkungsbeziehung abgeleitet werden, wodurch potentiell optimierte Modulatoren entwickelt werden können. Ein neuer Ansatz ist das Erzeugen von bioaktiven Liganden in Gegenwart der vorliegenden Zielstruktur, unter Einsatz der sogenannten „Click-Chemie“. Einer Möglichkeit, zwei Bausteine über die Ausbildung eines Triazols auch unter biokompatiblen Bedingungen zu Verbinden.

### 1.6.1 Click-Chemie

Bei der „Click-Chemie“ handelt es sich um eine Reihe von biokompatiblen Reaktionen zur Verknüpfung zweier chemischer Bausteine.<sup>64,65</sup>

Der Vorteil dieser Reaktion liegt in der Durchführbarkeit als „Eintopf“-Reaktion in wässriger Umgebung und der gleichzeitigen Entstehung nur weniger Nebenprodukte. Die klassischen Click-Reaktionen stellen die 1,3-dipolare Cycloaddition nach HUISGEN und die Kupfer-(I)-katalysierte Azid-Alkin Cycloaddition dar (Abbildung 1.8).<sup>66-68</sup>



**Abbildung 1.8:** Reaktionsschemata der Click-Reaktion nach HUISGEN und der Kupfer-katalysierten Azid-Alkin Cycloaddition.

Aufgrund ihrer guten Bioverträglichkeit ist eine Reaktion in Anwesenheit von Biomolekülen oder sogar in einem biologischen System möglich.



## 2 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation kleiner Moleküle zur Modulation der Aktivität der Proteinkinase MKK7. MKK7 wurde besonders in den letzten Jahren zu einem bedeutenden Forschungsobjekt. Als Teil des JNK-Signalwegs bildet MKK7 zusammen mit MKK4 einen sogenannten Flaschenhals, also einen Punkt in dem Signalweg wo dieser von wenigen beteiligten Molekülen abhängig ist. Daher eignen sich diese beiden Kinasen hervorragend zur Steuerung des Signalweges. Viele Forschungsarbeiten haben bereits gezeigt, dass die direkte Inhibition von JNK eine große Anzahl von negativen Effekten zeigt, da JNK an vielen verschiedenen Prozessen beteiligt ist. Da die Aktivität von JNK jedoch von den beiden MAP2K reguliert wird, ist durch deren Modulation ein viel genaueres Steuern der Aktivität des gesamten Signalwegs möglich, was in einer geringeren Anzahl an Nebenwirkungen resultieren sollte.

Zu diesem Zweck sollte ein biochemischer Assay aufgesetzt werden, mit dem es möglich ist neue Modulatoren für die Aktivität von MKK7 zu identifizieren. Dazu sollten zunächst Protein-Konstrukte erzeugt werden, mit denen der biochemische Assay durchgeführt werden kann. Aus diesem Grund sollte sowohl ein Aktivator von MKK7 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase 1 (MEKK1)), sowie das Substrat von MKK7 (JNK) exprimiert werden. Dabei sollte MKK7 in einem ersten Schritt durch seinen Aktivator (MEKK1) phosphoryliert werden, um anschließend mit dem so aktivierten MKK7 den eigentlichen Aktivitätstest durchführen zu können. Als Substrat für den Assay wurde die Inaktivitäts-Mutante JNK K55M gewählt, die im Assay von MKK7 phosphoryliert wird. Mit dem biochemischen Assay sollte im Anschluss ein Screening, mit einer Auswahl an bereits bekannten Modulatoren die einen MICHAEL-Akzeptor tragen, sowie eine anschließende Hitvalidierung durchgeführt werden. Aus den Ergebnissen und den daraus gewonnenen Daten, sollte eine Struktur-Wirkungs-Beziehung abgeleitet werden.

Neben der Bestimmung der Aktivität sollten auch Untersuchungen zum Bindungsverhalten durchgeführt werden. Da MKK7 an der Position 218 ein Cystein

## 2 Ziel dieser Arbeit

in der ATP-Bindetasche trägt, sollte der Fokus vor allem auf kovalente Modulatoren gerichtet werden.

Hierzu sollten massenspektrometrische Analysen, sowie die Bestimmung von  $k_i$  und  $k_{\text{inact}}$  Werten durchgeführt werden. Zusätzlich sollte eine Untersuchung des Einfluss der Modulatoren auf die Stabilität der Kinase mittels thermischer Verfahren untersucht werden.

Zusätzlich zu der biochemischen Charakterisierung der Verbindungen sollte ebenfalls eine strukturbiochemische Charakterisierung erfolgen. Dazu sollten die Verbindungen, mit den zuvor in der Masterarbeit von PATRIK WOLLE gefundenen Kristallisationsbedingungen, co-kristallisiert, oder durch andere Verfahren in einen Komplex gebracht werden. Im Anschluss sollte die Struktur im Komplex gelöst werden um weitere Aufschlüsse über die Art der Interaktionen der Verbindungen mit der Kinase zu bekommen. Ebenso sollte neben der Durchmusterung der bereits bekannten Substanzbibliotheken versucht werden, mittels Click-Chemie neue Verbindungen direkt in der ATP-Bindetasche aufzubauen und diese dann über die bereits genannten Verfahren zu validieren und zu evaluieren.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Expression und Reinigung von Proteinen

Für die zum Ziel gesetzten Versuche wurden verschiedene Konstrukte von MKK7 als auch von anderen Proteinen wie MEKK1 und JNK benötigt. Diese wurden entweder in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen oder in Sf9-Insektenzellen exprimiert.

#### 3.1.1 Expression und Reinigung von MKK7 Konstrukten

Die für biochemische und die strukturelle Untersuchungen erforderlichen Konstrukte von MKK7 unterscheiden sich vor allem in der jeweiligen Länge. Das Vollängen-Enzym für die biochemische Aktivitätsbestimmung weist hierbei, die im N-terminalen Bereich liegende Substrat-Bindungsstellen auf. Dieser Bereich liegt jedoch in einem ungeordneten Zustand vor, der in Hinblick auf die Kristallisations-Experimente in einer gekürzten Variante des Enzyms entfernt wurde. Der genaue Aufbau der Konstrukte findet sich im Anhang im Abschnitt 6.4.

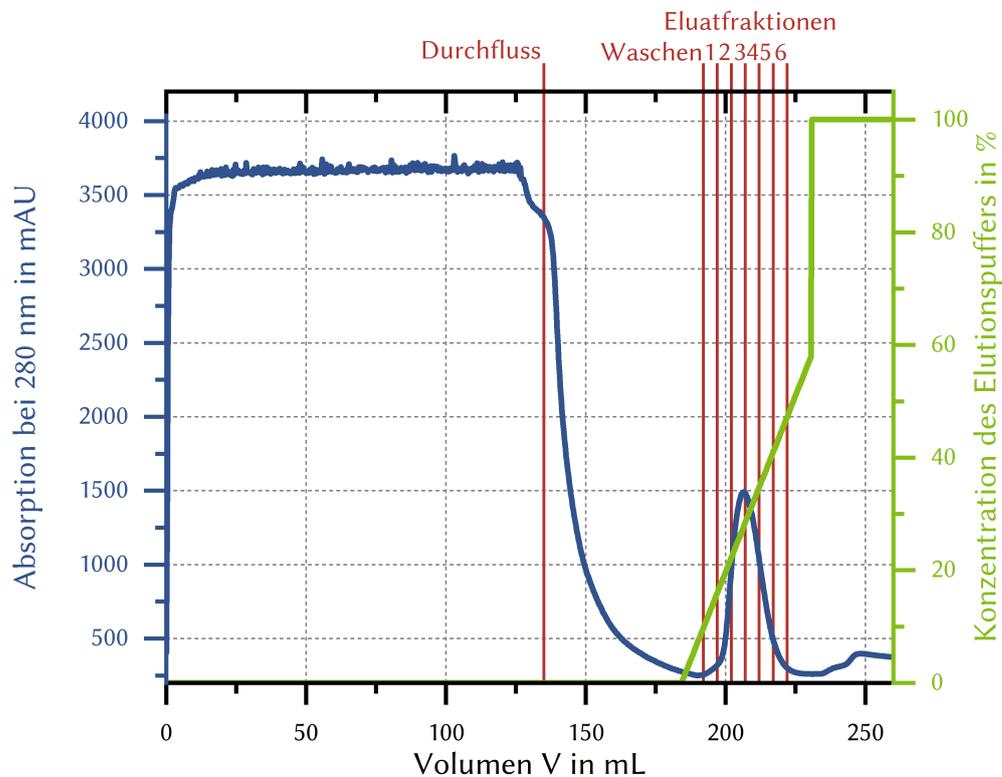
##### 3.1.1.1 Expression und Reinigung von MKK7 Kristallisationskonstrukten

Als Basis für die MKK7-Kristallisationskonstrukte wurde die zu diesem Zeitpunkt einzige Struktur von MKK7 (PDB: 2dy1) verwendet. Bei diesem Konstrukt wurde der N-Terminus um die JNK-Binde-Domäne gekürzt und zwei Aktivierungsmutationen (S271D, T275D) eingeführt. Vor diesem Hintergrund wurden in Vorarbeiten vier verschiedene MKK7-Konstrukte von SVENJA MAYER WRANGOWSKI erzeugt (Tabelle 3.1). Diese Konstrukte wurden weiterführend genutzt, um ein geeignetes Kristallisationssystem zu finden.<sup>69</sup>

**Tabelle 3.1:** Auflistung der vier Kristallisationskonstrukte von MKK7 mit den Unterschieden zum Wildtyp-Protein.

Konstrukt	Unterschiede zum humanen Wildtyp-Protein
MKK7 Krist-1	AS 101-451, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag
MKK7 Krist-2	AS 101-451, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, TEV-Schnittstelle
MKK7 Krist-3	AS 101-451, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, S271D, T275D
MKK7 Krist-4	AS 101-451, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, TEV-Schnittstelle, S271D, T275D

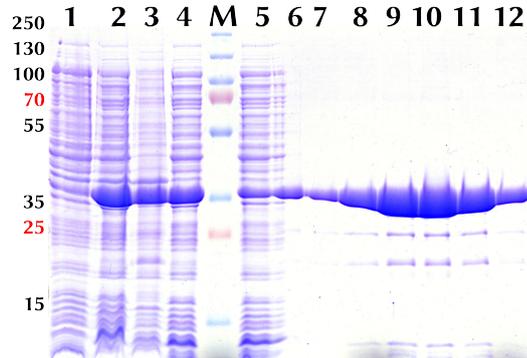
Alle vier Konstrukte wurden in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen durch Einbringen eines pet41-b-Vektors mit der entsprechenden genetischen Information exprimiert. Die anschließende Reinigung wird im Folgenden anhand des Konstruktes MKK7 Krist-1 beispielhaft beschrieben, da sich die Reinigungen der einzelnen Konstrukte unwesentlich von einander unterscheiden. Die für die Expression benötigten Expressionstämme wurden bereits in Vorarbeiten erzeugt.<sup>69</sup> Nach der Expression (Abschnitt 5.6), dem Zellaufschluss sowie dem Abtrennen der unlöslichen Bestandteile wurde zunächst eine Ni-Affinitätschromatografie durchgeführt, um das His<sub>6</sub>-markierte Ziel-Protein von den restlichen löslichen Zellbestandteilen zu trennen (Abschnitt 5.7.2).



**Abbildung 3.1:** Chromatogramm der Ni-Affinitätschromatografie während der Reinigung von MKK7 Krist-1. blau: UV-Absorption bei 280 nm, grün: Konzentration des Puffers B und in rot: die Fraktionen, die gesammelt wurden. Aufgetragen wurde jeweils gegen das Volumen, dass über die Säule geflossen ist.

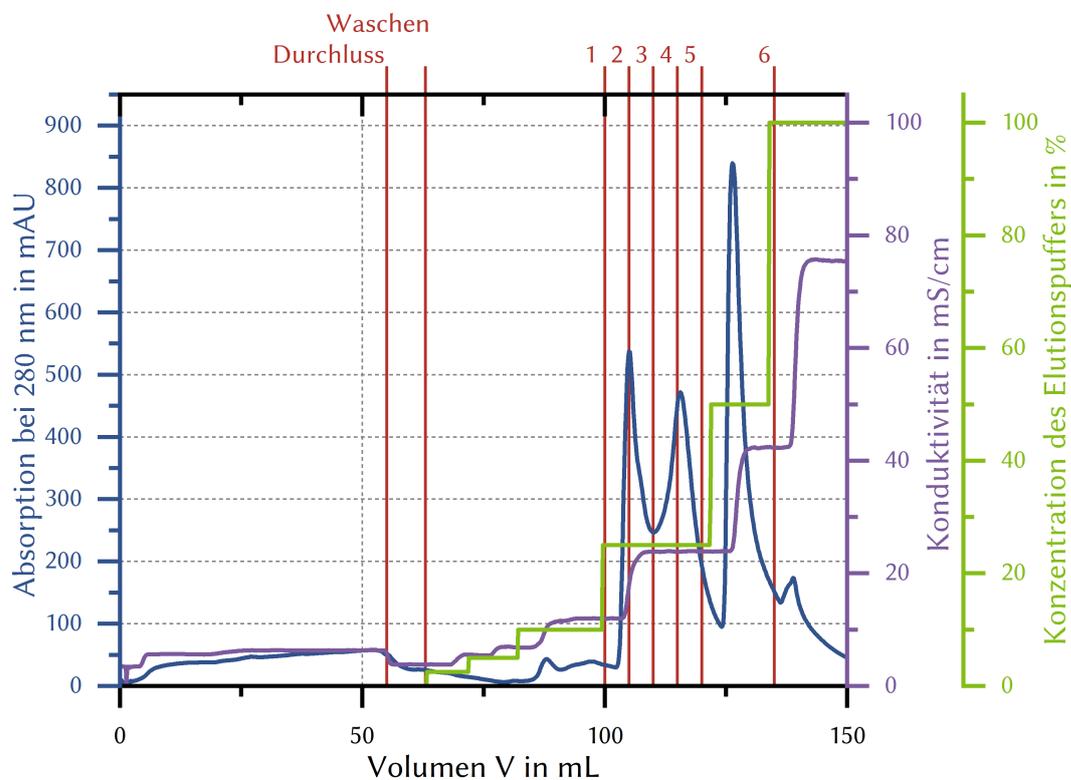
Während die lösliche Fraktion die Säule passierte, erreichte das Absorptionssignal ein Plateau. Nach Beginn des Waschvorgangs sank das Signal auf einen stabilen Bereich von 1000 mAU. Mit steigender Konzentration an Imidazol durch Erhöhung der Konzentration von Puffer B wurden Proteine bei einem Volumen von etwa 200 mL eluiert. Die erhaltenen Eluatfraktionen, sowie der Durchfluss und die Waschfraktion, wurden zusammen mit Proben der Expression und des Zellaufschlusses mittels *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-Page) analysiert (Abbildung 3.2).

## Expression und Reinigung von Proteinen



**Abbildung 3.2:** SDS-Page nach Durchführung der Ni-Affinitätschromatografie zur Reinigung von MKK7 Krist-1. Angefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau. 1: Vor Induktion mit IPTG, 2: Nach Induktion, 3: Unlösliche Fraktion nach Zellaufschluss, 4: Lösliche Fraktion, M: Marker (Größenangaben in kDa), 5: Durchfluss, 6: Waschfraktion, 7-12: Eluatfraktionen 1-6.

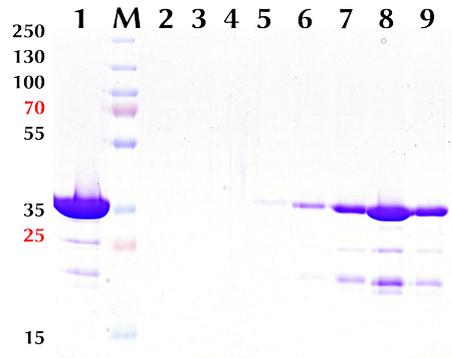
Das Gel zeigt, dass die Induktion der Expression erfolgreich war und es zu einer Überexpression des Zielproteins bei etwa 36 kDa gekommen ist. Durch den Zellaufschluss und das anschließende Zentrifugieren konnte ein Teil der Proteine erfolgreich von unlöslichen Bestandteilen abgetrennt werden, wobei eine große Menge des Zielproteins in der unlöslichen Fraktion verblieben ist. Bei einer Überexpression in diesem Maße kann das überexprimierte Protein zum Beispiel in *inclusion bodies* eingeschlossen sein und verbleibt folglich in der unlöslichen Fraktion. Ebenso ist zu erkennen, dass eine große Menge des Proteins in der löslichen Fraktion zu finden ist. Bei der Reinigung mittels Ni-Affinitätschromatografie zeigte sich, dass ein Teil des Proteins ohne Bindung an die Säule diese passieren konnte, sowie beim Waschen von der Säule gewaschen wurde. Dies kann entweder an einer zu geringen Bindungsaffinität oder an einer Überladung der Säule durch große Mengen an gebundenem Protein liegen. Wie auf dem Gel zu erkennen ist, liegt das Protein bereits sehr rein vor. Lediglich einige Banden bei einem geringeren Molekulargewicht von etwa 25 und 20 kDa sind noch vorhanden, sodass dieser erste Reinigungsschritt als erfolgreich angesehen werden konnte. Nach der Ni-Affinitätschromatografie folgte zunächst eine Dialyse zum Pufferaustausch sowie dem Entfernen von Imidazol, bevor die Reinigung mit einer Kationenaustauscher-Chromatografie fortgesetzt wurde.



**Abbildung 3.3:** Chromatogramm während der Reinigung von MKK7 Krist-1 mittels Kationenaustauscherchromatografie. Blau: UV-Absorption bei 280 nm, grün: Konzentration des Puffers B, violett: Konduktivität in  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  und in rot: die gesammelten Fraktionen. Aufgetragen wurde jeweils gegen das Volumen, dass über die Säule geflossen ist.

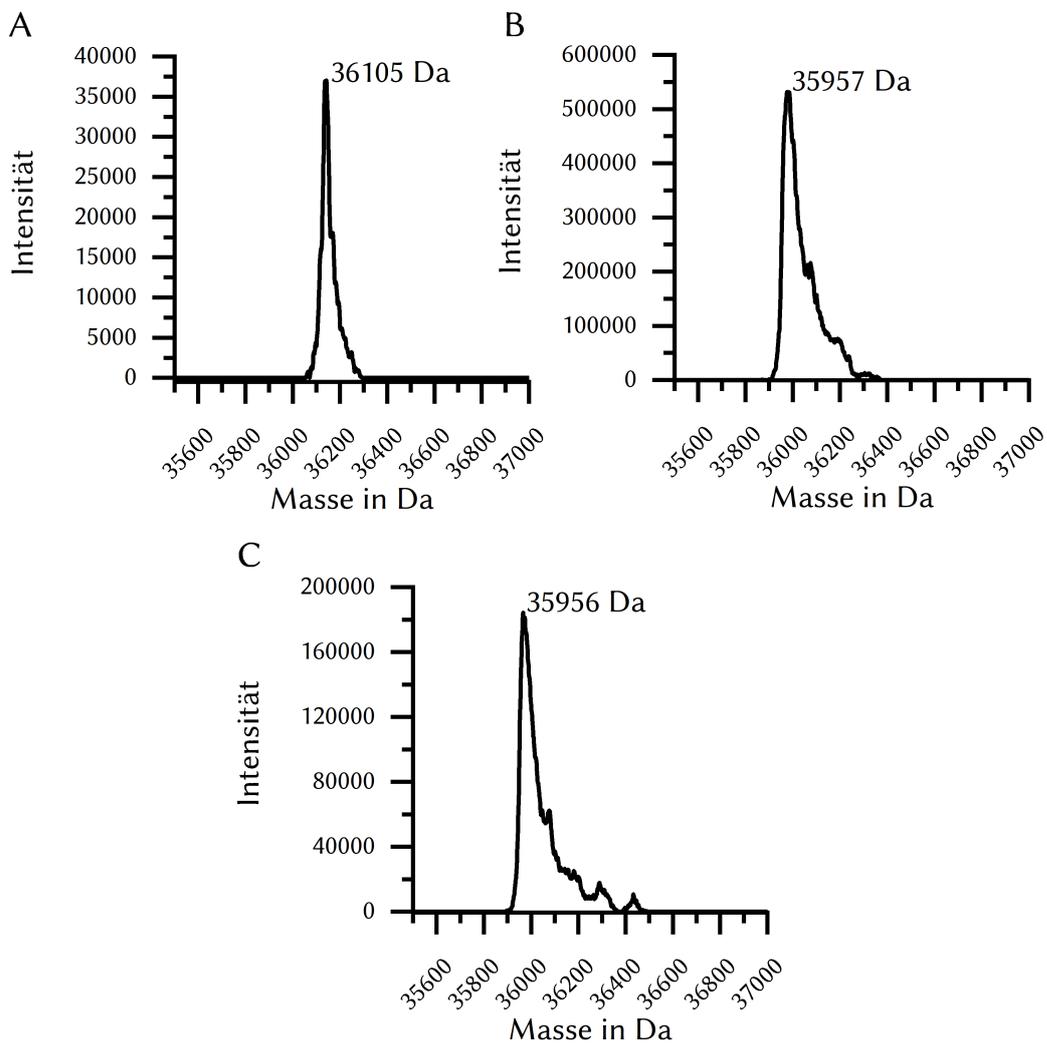
Während der Kationenaustauscher-Chromatografie zeigte sich, dass ein sehr kleiner Teil der verbliebenen Proteine direkt eluiert wurde (0-50 mL), was anhand des geringen Anstiegs der UV-Absorption zu erkennen war. Durch die schrittweise Erhöhung der Ionenkonzentration wurden separate UV-Signale beobachtet und das entsprechende Eluat in den Fraktionen E1-E6 gesammelt. Diese wurden zusammen mit einer Probe aus der Dialyse mittels SDS-Page analysiert (Abbildung 3.4).

## Expression und Reinigung von Proteinen



**Abbildung 3.4:** SDS-Page nach Durchführung der Kationenaustauscherchromatografie zur Reinigung von MKK7 Krist-1. Angefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau. 1: Vereinigte Fraktionen der Ni-Affinitätschromatografie nach der Dialyse, M: Marker (Größenangaben in kDa), 2: Durchfluss, 3: Waschfraktion, 4-9: Eluatfraktionen 1-6.

Erwartungsgemäß rief die Dialyse keinen Unterschied in der Reinheit des Proteins hervor und im Durchfluss, als auch in der Waschfraktion, war keinerlei Protein nachzuweisen. In den Proben der Eluatfraktionen E1-E6 konnten generell dieselben Proteine in unterschiedlicher Konzentration detektiert werden. Da der Ionenaustauscher dafür genutzt wurde, um Proteine nach ihrer Ladung (Beispielsweise aufgrund unterschiedlicher Phosphorylierungsspezies) zu trennen, wurde im Anschluss für jeden Elutions-Peak eine massenspektrometrische Untersuchung durchgeführt, um die Massen der enthaltenen Proteine zu bestimmen (Abbildung 3.5).

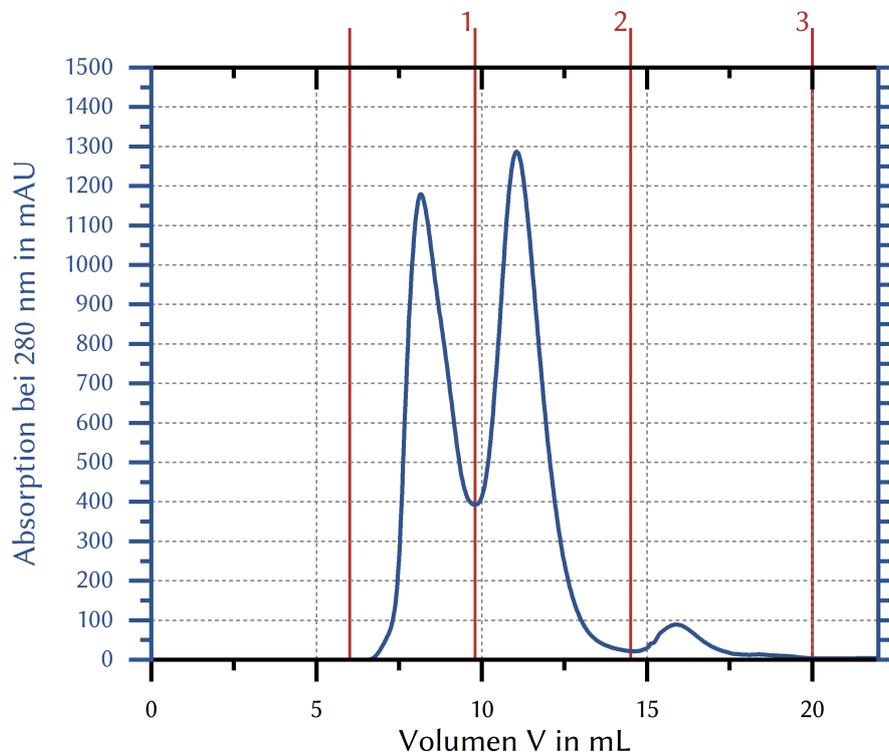


**Abbildung 3.5:** Massenspektrometrische Untersuchung der drei Elutions-Peaks von der Kationenaustauscherchromatografie. Von A nach C, in der Reihenfolge in der die Peaks von der Säule eluiert wurden. Aufgetragen wurde jeweils die gemessene Intensität im Massenspektrometer gegen die molekulare Masse in Da. Die Masse des Zielproteins betrug: 35.954 Da

Es zeigte sich, dass die auf die Kationenaustauschersäule aufgetragene Probe teilweise erfolgreich aufgetrennt wurde. Im Massenspektrum konnte dem Protein aus dem ersten Elutions-Peak eine Masse von 36.105 Da zugeordnet werden, dies entspricht jedoch nicht dem MKK7 Konstrukt da dies mit Start-Methionin

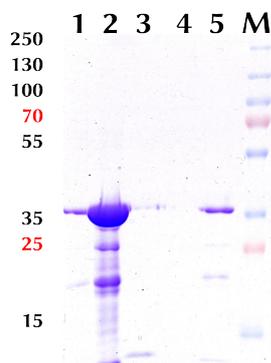
## Expression und Reinigung von Proteinen

eine Masse von 36.085 Da hat. Die Differenz zu der eigentlich erwarteten Masse beträgt hierbei etwa 148 Da. Dies entspricht der Masse einer Modifikation mit einem Desoxyzucker wie Fucose oder Galactose. Da die Bestimmung der Modifikation jedoch nicht das Ziel dieser Arbeit war, wurden die Eluate des ersten Peaks verworfen. In den Proben des zweiten und dritten Elutions-Peaks wurden wiederum Massen von 35.957 Da bzw. 35.956 Da beobachtet, die dem Protein mit abgespaltenem Start-Methionin entsprachen. Die gesammelten Fraktionen des zweiten und dritten Elutions-Peaks (E4-E6) wurden vereinigt und im Anschluss eine Größenausschlusschromatografie durchgeführt (Abbildung 3.6).



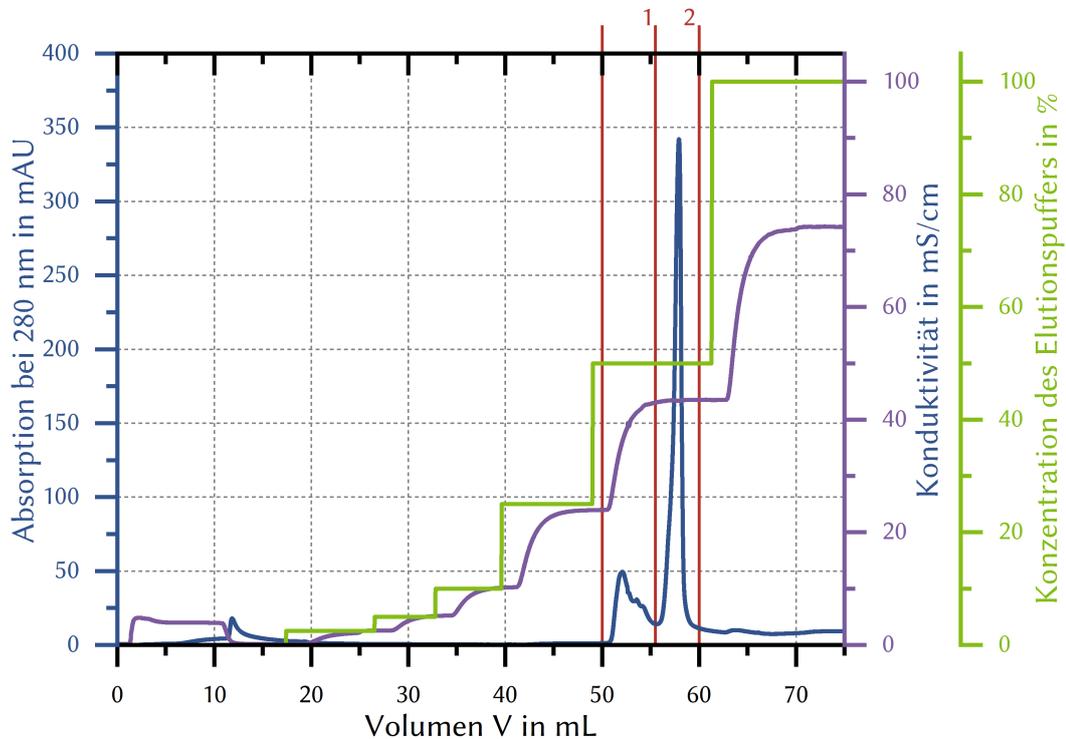
**Abbildung 3.6:** Chromatogramm während der Reinigung von MKK7 Krist-1 mittels Größenausschlusschromatografie. Blau: UV-Absorption bei 280 nm und in rot: die gesammelten Fraktionen. Aufgetragen wurde jeweils gegen das Volumen, dass über die Säule geflossen ist.

Bei der Größenausschlusschromatografie wurde das Protein nach der Größe aufgetrennt, wobei größere Proteine oder Komplexe zuerst von der Säule eluiert werden und kleinere Proteine später. Es zeigte sich für die Probe von MKK7-Krist1, dass insgesamt drei Elutions-Peaks entstanden sind, wobei der erste Peak mit etwa 1200 mAU geringfügig niedriger liegt als der zweite Peak mit etwa 1300 mAU. Der letzte Peak wies dabei lediglich eine Intensität von etwa 100 mAU auf, wobei es sich hierbei um Verunreinigungen handeln könnte. Zur Identifikation der Bestandteile wurden von den drei Fraktionen eine SDS-Page angefertigt (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7:** SDS-Page nach Durchführung der Größenausschlusschromatografie und der zweiten Kationenaustauscherchromatografie, zur Reinigung von MKK7 Krist-1. Angefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau. 1-3: Eluatfraktionen E1-E3, 4-5: Eluatfraktionen der Kationenaustauscherchromatografie E1 und E2, M: Marker.

In allen drei Eluatfraktionen konnte das Zielprotein auf einer Höhe von ca 36 kDa nachgewiesen werden. Das deutet darauf hin, dass es sich bei dem ersten Peak im Chromatogramm um Dimere oder Multimere des Proteins handeln könnte, da diese größer sind als das eigentliche Protein und deswegen früher eluiert werden. Bei dem zweiten Peak handelte es sich mutmaßlich um das gewünschte monomere Protein. In der dritten Fraktion ließ sich neben dem potentiellen Zielprotein in geringerer Menge ebenfalls eine Verunreinigung auf einer Bandenhöhe unterhalb von 15 kDa beobachten. Es zeigte sich jedoch, dass bei Peak 2 noch eine größere Menge Verunreinigung vorhanden war, weswegen in einem nächsten Reinigungsschritt eine stärkere Kationenaustauscherchromatografie eingesetzt wurde, welche eine feinere Auftrennung ermöglichen sollte (Abbildung 3.8).

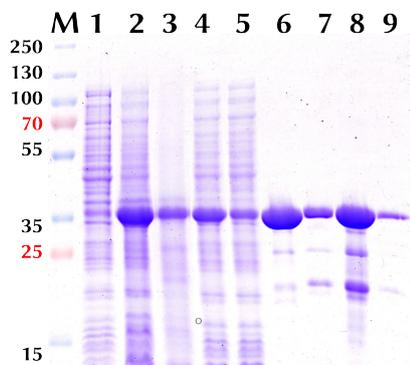


**Abbildung 3.8:** Chromatogramm während der Reinigung von MKK7 Krist-1 mittels einer stärkeren Kationenaustauscherchromatografie. Blau: UV-Absorption bei 280 nm, grün: Konzentration des Puffers B, violett: Konduktivität in  $\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  und in rot: die gesammelten Fraktionen. Aufgetragen wurde jeweils gegen das Volumen, dass über die Säule geflossen ist.

Wie bereits bei der ersten Kationenaustauscherchromatografie, war auch hier anhand des Chromatogramms zu erkennen, dass ein Teil der Proteine nicht an die Säule gebunden hatten, zu erkennen an dem steigenden UV Signal beim Beladen der Säule (0-15 mL). Im Anschluss wurden zwei Signale im Chromatogramm erhalten, und deren Fraktionen gesammelt. Dabei handelt es sich um ein kleines Signal mit einer Intensität von etwa 50 mAU und ein Hauptsignal mit einer Intensität von etwa 350 mAU. Das erste Signal wurde bei einer geringeren Konduktivität (ca.  $20\text{-}30\text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ ) eluiert, während das Hauptsignal bei ca.  $40\text{-}50\text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$  eluiert wurde.

Dies würde dafür sprechen, dass es sich entweder um unterschiedlich geladene Varianten desselben Proteins handelt, oder aber um unterschiedliche Proteine. Um dies aufzuklären wurde von beiden Fraktionen ebenfalls eine SDS-Page angefertigt (Abbildung 3.7).

Für die erste Fraktion zeigt sich dabei kein Protein, was wahrscheinlich an der zu geringen Konzentration liegen könnte. Das zweite Signal zeigte ein ähnliches Bandenmuster wie bereits das zweite Signal der Größenausschlusschromatografie, jedoch mit weniger Verunreinigungen, was allerdings auch an der geringeren Konzentration liegen könnte. Zur Verdeutlichung des Reinigungserfolgs wurde im Anschluss eine SDS-Page mit Proben aus allen Aufreinigungsschritten als Übersicht angefertigt (Abbildung 3.9).

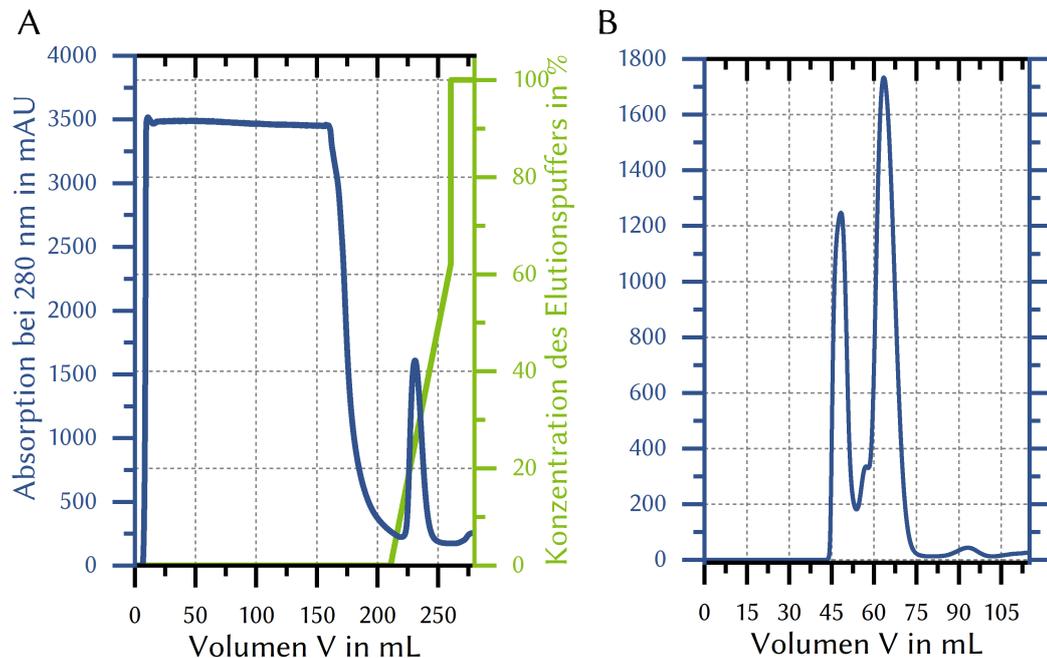


**Abbildung 3.9:** SDS-Page aller Aufreinigungsschritte als Übersicht über die Reinigung von MKK7 Krist-1. Anfärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau. M: Marker, 1: Zellysat, 2: Unlösliche Bestandteile des Zellysats, 3: Lösliche Bestandteile des Zellysats, 4: Durchfluss über die Ni-Affinitätschromatografie, 5: Waschfraktion der Ni-Affinitätschromatografie, 6: Vereinigte Eluate der Ni-Affinitätschromatografie<sup>a</sup>, 7: Vereinigte Eluate der Kationenaustauscherchromatografie<sup>a</sup>, 8: Eluat der Größenausschlusschromatografie, 9: Eluat der zweiten Kationenaustauscherchromatografie.

Es zeigt sich, dass mit jedem Reinigungsschritt ein zunehmender Reinigungserfolg verzeichnet werden konnte, allerdings ließ sich die Verunreinigung bei etwa 20 kDa bis zum Ende nicht entfernen. Ferner riefen die Durchführung mehrerer Kationenaustauscherchromatografien jeweils Verluste von etwa 80% in der Protein-Ausbeute hervor.

<sup>a</sup>Die Fraktionen, die für die Aufreinigung weiter verwendet wurden.

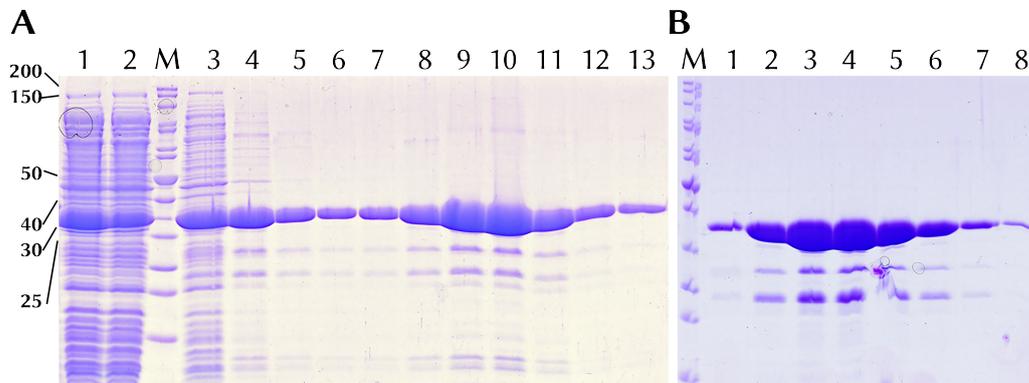
Aufgrund dessen und der Einsparung von Zeit wurde eine verkürzte Reinigung getestet, bei der die beiden Kationenaustauscherchromatografie-Schritte entfallen und lediglich eine Ni-Affinitätschromatografie und eine Größenausschlusschromatografie durchgeführt wurden (Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10:** Chromatogramme der verkürzten Reinigung des Kristallisationskonstruktes von MKK7 Krist-1. **A:** Ni-Affinitätschromatografie, **B:** Größenausschlusschromatografie. In blau: UV-Absorption bei 280 nm und in grün: Konzentration des Puffers B. Aufgetragen jeweils gegen das Elutionsvolumen das über die Säule geflossen ist.

Wie an den Chromatogrammen zu erkennen war, gleichen sie den bereits gezeigten Chromatogrammen der Ni-Affinitätschromatografie (3.1) und der Größenausschlusschromatografie (Abbildung 3.6). Bei der Ni-Affinitätschromatografie gibt es ein deutliches Elutionssignal, während es bei der Größenausschlusschromatografie eine Aufteilung in zwei Signale gab, wobei es sich wahrscheinlich wieder um die Auftrennung von Monomeren und Multimeren handelte. Zum Vergleich wurde ebenfalls eine SDS-Page von den beiden Aufreinigungsschritten

durchgeführt (Abbildung 3.11).



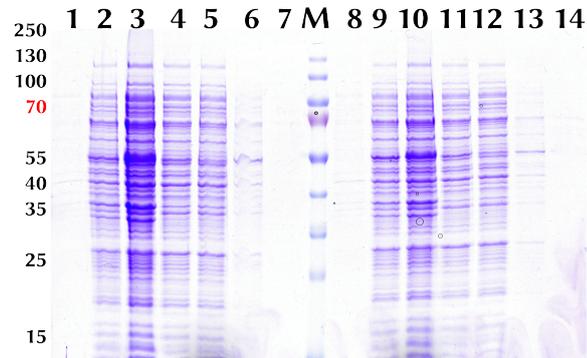
**Abbildung 3.11:** SDS-Page der Reinigung von MKK7 Krist-1 über **A:** Ni-Affinitätschromatografie, 1: Unlösliche Fraktion des Zellysats, 2: Lösliche Fraktion des Zellysats M: Marker, 3: Durchfluss, 4: Waschfraktion, 5-13: Eluatfraktion, **B:** M: Marker, 1-8: Eluatfraktionen. Angefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau.

Die Ergebnisse zeigen keinen Unterschied zu den Ergebnissen in denen zusätzlich eine Kationenaustauscherchromatografie eingesetzt wurde. Es zeigte sich das selbe Bandenmuster, wie bereits bei der Aufreinigung mit den Kationenaustauschern. So kann auch bei dieser Aufreinigung der Hauptanteil des Proteins bei etwa 36 kDa gefunden werden, was in etwa der Masse des Zielproteins entspricht. Neben diesen Banden, ließen sich noch schwächere Banden bei etwa 25 kDa und 15 kDa feststellen. Im Gegensatz zu der Reinigung mit der Kationenaustauscherchromatografie, wurde jedoch die Ausbeute um etwa das zehnfache erhöht, von  $8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Expressionskultur, auf  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  Expressionskultur.

### 3.1.1.2 Expression und Reinigung von MKK7 Assay-Konstrukten

Für die Durchführung der biochemischen Assays wurde das Volllängen-Konstrukt von MKK7 verwendet. Dabei handelt es sich um die humane Isoform MKK7- $\beta$ 1. Für den Assay wurde zum einen der Wildtyp mit einem N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag (MKK7 Assay-1) exprimiert und die Mutante MKK7 S271D, T275D, welche eine vollständig aktivierte Kinase imitieren soll (MKK7 Assay-2). Zunächst wurde eine Testexpression für das Konstrukt MKK7 Assay-1 in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen durchgeführt (Abbildung 3.12).

## Expression und Reinigung von Proteinen



**Abbildung 3.12:** Testexpression von MKK7- $\beta$ 1. 1: Probe vor der Induktion, 2: Probe nach der Induktion, 3: Unlösliche Fraktion, 4: Lösliche Fraktion, 5: Durchfluss durch die Ni-Affinitätssäule, 6: Waschfraktion, 7: Eluatfraktion, M: Marker, 8: Probe vor der Induktion, 9: Probe nach der Induktion, 10: Unlösliche Fraktion, 11: Lösliche Fraktion, 12: Durchfluss durch die Ni-Affinitätssäule, 13: Waschfraktion, 14: Eluatfraktion

Basierend auf den Ergebnissen der SDS-Page kam es zu keiner sichtbaren Überexpression, wobei zwar eine intensivere Bande bei etwa 50 kDa beobachtet werden konnte, was dem Molekulargewicht des Zielproteins entspricht. Jedoch konnte keine Reinigung über Ni-Affinitätschromatografie erreicht werden. Weitere Testexpressionen unter verschiedenen Bedingungen, sowie ein Wechsel der genutzten Bakterienstämme, führten zu einer Reproduktion dieser Ergebnisse (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2:** Verschiedene Bedingungen für die Testexpression von MKK7- $\beta$ 1. Angegeben sind alle getesteten Variationen, jeweils gegeneinander.

Bedingung	Variation
Bakterienstämme	BL21(DE3), BL21(DE3) PlysE
Temperatur	4, 12, 18, 21, 27, 30, 37 °C
IPTG-Konzentration	0,05, 0,10, 0,20 ,0,50, 1,00 ,2,50, 5,00 mM

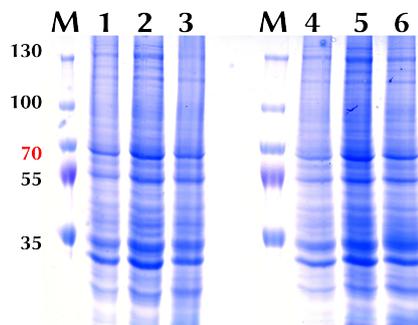
Da die Variation der verschiedenen Bedingungen zu keiner Expression führte, wurde für beide Varianten ein Baculovirus von der *Dortmund Protein Facility* (DPF) generiert, welcher für die Expression in SF9-Insektenzellen eingesetzt werden sollte.

Für die Erzeugung wurden die Konstrukte MKK7 Assay-1 und -2 in den Vektor pIEX/Bac™-3<sup>b</sup> inseriert. Daraus entstanden die Konstrukte MKK7 Assay-3 und -4 (Tabelle 3.3).

**Tabelle 3.3:** Auflistung der vier Assay-Konstrukte für MKK7, mit den Unterschieden zu dem Wildtyp-Protein.

Konstrukt	Unterschiede zu dem humanen Wildtyp-Protein	Vektor
MKK7 Assay-1	AS 1-451, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, TEV-Schnittstelle	pet15b
MKK7 Assay-2	AS 1-451, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, TEV-Schnittstelle, S271D, T275D	pet15b
MKK7 Assay-3	AS 1-451, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, TEV-Schnittstelle	pIEX/Bac™-3
MKK7 Assay-4	AS 1-451, N-Terminaler His <sub>6</sub> -Tag, TEV-Schnittstelle, S271D, T275D	pIEX/Bac™-3

Zur Bestimmung der idealen Expressionszeit wurde zunächst eine zeitabhängige Expression durchgeführt (Abbildung 3.13).



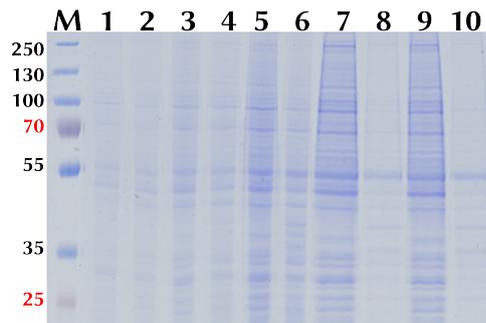
**Abbildung 3.13:** SDS-Page der Zeitabhängige Expression der zwei Konstrukte MKK7 Assay-3 und -4. Gezeigt ist jeweils das Zelllysate. M: Marker, 1: MKK7 Assay-3 24 h, 2: 48 h 3: 72 h, M: Marker, 4: MKK7 Assay-4 24 h, 5: 48 h 6: 72 h. Angefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau.

Die Ergebnisse der SDS-Page zeigen eine deutliche Bande bei der erwarteten Masse von etwa 50 kDa für das Zielprotein (52 kDa). Für beide Varianten konnte gezeigt werden, dass nach drei Tagen ein optimales Expressionslevel für die

<sup>b</sup>Novagen

## Expression und Reinigung von Proteinen

Ernte der Zellen erreicht wurde, zu Erkennen daran das die Bande im Vergleich zu den anderen Banden intensiver gefärbt war. Um dies zu verifizieren, wurde für das Konstrukt MKK7 Assay-4 erneut eine zeitabhängige Expression mit einer Laufzeit von vier Tagen durchgeführt und jeweils zwischen löslicher und unlöslicher Fraktion unterschieden (Abbildung 3.14).

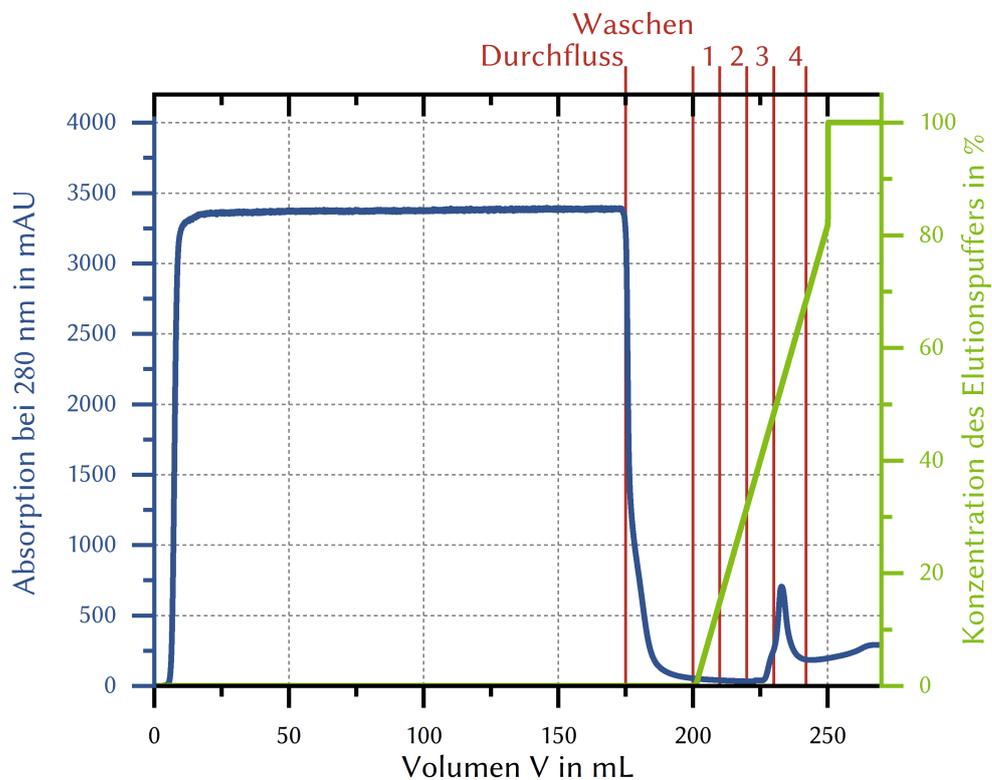


**Abbildung 3.14:** SDS-Page der zeitabhängigen Expression von MKK7 Assay-4 in sf9 Insektenzellen. Anfärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau. M: Marker, 1: Zeitpunkt 0 h Pellet, 2: Zeitpunkt 0 h Überstand, 3 Zeitpunkt 24 h Pellet, 4: Zeitpunkt 24 h Überstand, 5: Zeitpunkt 48 h Pellet, 6: Zeitpunkt 48 h Überstand, 7: Zeitpunkt 72 h Pellet, 8: Zeitpunkt 72 h Überstand, 9: Zeitpunkt 96 h Pellet, 10: Zeitpunkt 96 h Überstand.

Hier zeigte sich ebenfalls, dass die optimale Expressionsrate bereits nach drei Tagen erreicht wurde, und dies als Zeitpunkt für die Zellernte für alle folgenden Expressionen festgelegt wurde.

Daraufhin wurde jeweils eine Expression mit jeweils 3 L Medium angesetzt und im Anschluss gereinigt. Am Beispiel der Mutante MKK7- $\beta$ 1 S271D T275D (MKK7 Assay-4) wurde hierbei zunächst eine Ni-Affinitätschromatografie durchgeführt, um das Zielprotein von den restlichen löslichen Bestandteilen der Zelle zu trennen (Abbildung 3.15).

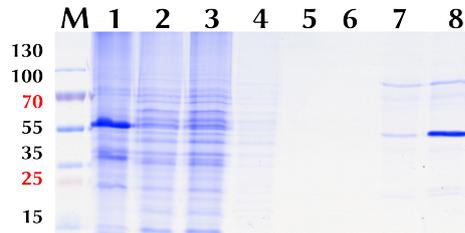
Während die lösliche Fraktion die Säule passierte, erreichte das Absorptionssignal ein Plateau bei etwa 4000 mAU. Zu Beginn des Waschvorgangs fiel das Signal, bis ein stabiler Wert von etwa 100 mAU erreicht wurde. Anschließend wurde mittels eines Puffer-Gradienten mit einer steigenden Konzentration bis auf 100%, die Elution eingeleitet. Bei einer Konzentration von etwa 30% wurde, begann das UV-Signal bis auf einen Wert von etwa 750 mAU zu steigen, was auf die eluierung von Proteinen mit einem His-Tag hinwies. Diese Elutionsfraktion hatte ein Volumen von etwa 20 mL.



**Abbildung 3.15:** Chromatogramm der Ni-Affinitätschromatografie während der Reinigung von MKK7 Assay-4. Blau: UV-Absorption bei 280 nm, grün: Konzentration des Puffers B und in rot: die Fraktionen, die gesammelt wurden. Aufgetragen wurde jeweils gegen das Volumen, dass über die Säule geflossen ist.

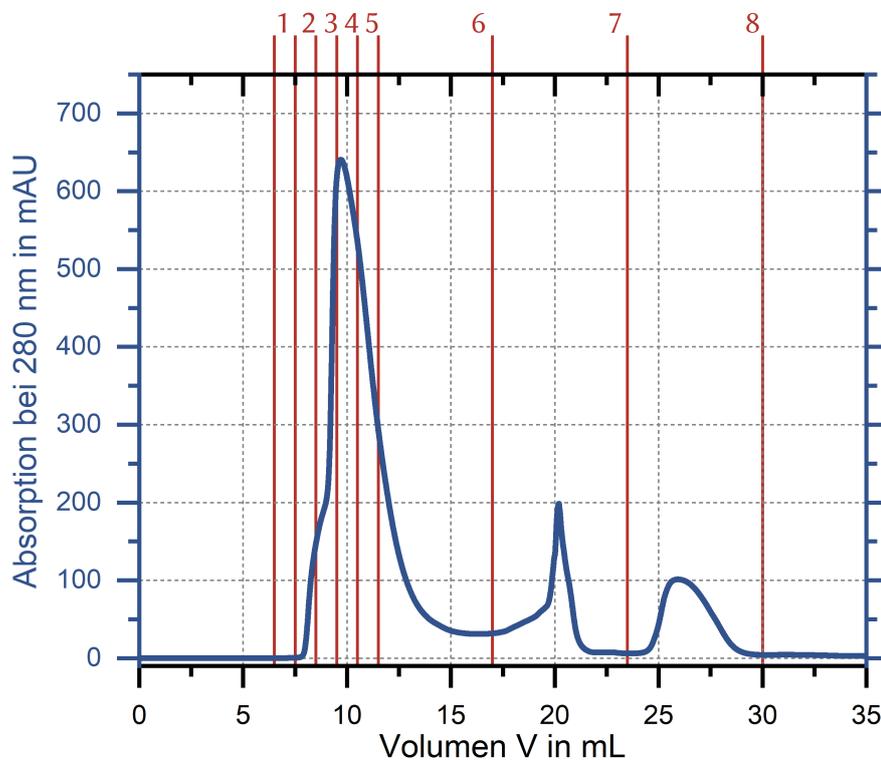
Die gesammelten Fraktionen wurden im Anschluss mittels SDS-Page analysiert (Abbildung 3.16). Anhand der Probe vom Pellete war eine deutliche Überexpression bei einer Masse von etwa 50 kDa zu erkennen, jedoch nicht in der löslichen Fraktion. Dies könnte auf einen Versuch der Wirtszellen hindeuten das Protein unschädlich zu machen, aber auch auf eine nicht funktionierende Expression. Ebenso war bei der Fraktion des Durchflusses und der Waschfraktion kein Zielprotein zu erkennen. In den Eluatfraktionen E3-E4 hingegen, konnte im Gel (Bahn 7 und 8) eine ausgeprägte Bande auf einer Höhe von etwa 50 kDa beobachtet werden, die der Masse des Zielproteins von 52 kDa entspricht.

### Expression und Reinigung von Proteinen



**Abbildung 3.16:** SDS-Page der Reinigung von MKK7 Assay-4 über eine Ni-Affinitätschromatografie. Angefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau. M: Marker, 1: Unlösliche Fraktion, 2: Lösliche Fraktion, 3: Durchfluss, 4: Waschfraktion, 5-8: E1-E4.

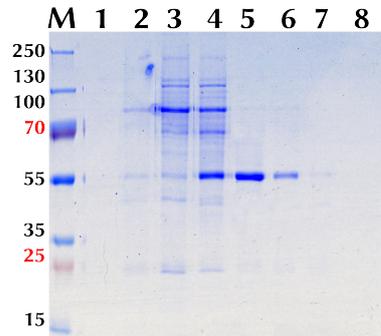
Da nach der ersten chromatografischen Reinigung eine Entfernung des His<sub>6</sub>-Tags für die Durchführung der biochemischen Analysen nicht nötig war, wurde keine Dialyse angewendet und direkt im Anschluss eine Größenausschlusschromatografie durchgeführt. So wurden Verluste in der Ausbeute verringert sowie Zeit eingespart, da der His<sub>6</sub>-Tag mit allen geplanten Versuchen kompatibel ist. Deswegen wurden die vereinten Fraktionen (E3-E4) der Ni-Affinitätschromatografie aufkonzentriert und über eine Größenausschlusschromatografie gereinigt (Abbildung 3.17).



**Abbildung 3.17:** Chromatogramm während der Reinigung von MKK7 Assay-4 mittels Größenausschlusschromatografie. Blau: UV-Absorption bei 280 nm und in rot: die gesammelten Fraktionen. Aufgetragen wurde jeweils gegen das Volumen, dass über die Säule geflossen ist.

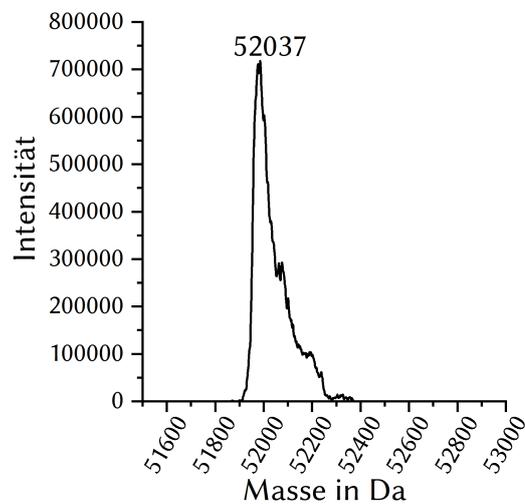
Es wurden während der Elution des Proteins insgesamt drei Signale erhalten, wobei das erste Signal mit einer Intensität von etwa 650 mAU und einem Volumen von etwa 7,5 mL das Hauptsignal darstellte. Dieses Signal wurde in mehreren Fraktionen gesammelt, während die anderen Signale jeweils in einer Fraktion gesammelt wurden. Alle gesammelten Fraktionen wurden im Anschluss mittels SDS-Page analysiert (Abbildung 3.18).

### Expression und Reinigung von Proteinen



**Abbildung 3.18:** SDS-Page der Reinigung von MKK7 Assay-4 über eine Größenausschlusschromatografie. Anfärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau. 1-8: E1-E8.

Die Ergebnisse der SDS-Page zeigten, dass mit dem Hauptsignal mehrere verschiedene Proteine von der Säule eluiert wurden. In den ersten Fraktionen finden sich Proteine höherer Molekulargewichte. In Fraktion E4 war schließlich eine Mischung aus dem vermeintlichen Zielprotein bei etwa 52 kDa und den Proteinen mit höheren Molekulargewichten zu finden. Ab Fraktion E5 konnte sehr sauberes Zielprotein isoliert werden. Es zeigte sich ebenso, dass in der Fraktion des zweiten Signals (E6-E7) ebenfalls eine Bande bei etwa 52 kDa zu erkennen war, was darauf schließen ließ, dass es sich ebenfalls um das Zielprotein handeln könnte. Die Fraktionen E5-E7 wurden folglich vereint und massenspektrometrisch untersucht (Abbildung 3.19).



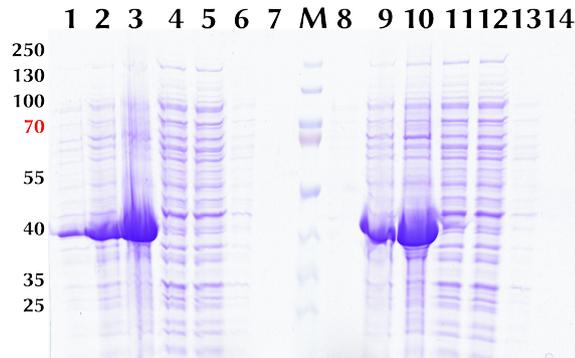
**Abbildung 3.19:** Dekonvolutiertes Spektrum des gereinigten Assaykonstrukt von MKK7 Assay-4 mit einer erwarteten Masse von 52.038 Da. Aufgetragen ist die gemessene Signalintensität gegen die Masse in Da.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrischen Untersuchung des gereinigten Proteins MKK7 Assay-4 zeigten eine Masse von 52.037 Da. Dies entspricht fast exakt der erwarteten Masse von 52.038,9 Da. Die Abweichung von 1,9 Da zwischen gemessenem Wert und erwartetem Wert entsprechen der Fehlertoleranz. Dieses Ergebnis verifiziert damit, dass die Reinigung des Zielproteins, MKK7 Assay-4 erfolgreich war und für den Einsatz in den folgenden biochemischen Untersuchungen eingesetzt werden konnte.

### 3.1.2 Expression und Reinigung von MEKK1 Konstrukten

Für die Durchführung der biochemischen Assays mit dem Konstrukt MKK7 Assay-3, wurde MEKK1, eine MAP3 Kinase benötigt um das MKK7 Konstrukt zu aktivieren. MEKK1 ist in der Lage MKK7 an den beiden Positionen Ser271 und Thr275 zu phosphorylieren und somit zu aktivieren. Dazu wurde das Gen von MEKK1 mit dem Sequenzabschnitt 1193-1512 kommerziell erzeugt und in einen *E. coli* Expressionsvektor kloniert (pet15b). Zunächst wurde damit eine Testexpression in *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt, und davon eine SDS-Page angefertigt (Abbildung 3.20).

## Expression und Reinigung von Proteinen



**Abbildung 3.20:** SDS-Page der Testexpression und Testreinigung über eine Ni-Affinitätschromatografie von MEKK1 in *E. coli* BL21(DE3) Zellen. Angefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau. 1: Vor der Induktion der Expression, 2: Nach der Induktion, 3: Unlösliche Zellbestandteile, 4: Lösliche Zellbestandteile, 5: Durchfluss durch die Ni-Affinitätssäule, 6: Waschfraktion, 7: Eluatfraktion, M: Marker, 8: Vor der Induktion der Expression, 9: Nach der Induktion, 10: Unlösliche Zellbestandteile, 11: Lösliche Zellbestandteile, 12: Durchfluss durch die Ni-Affinitätssäule, 13: Waschfraktion, 14: Eluatfraktion

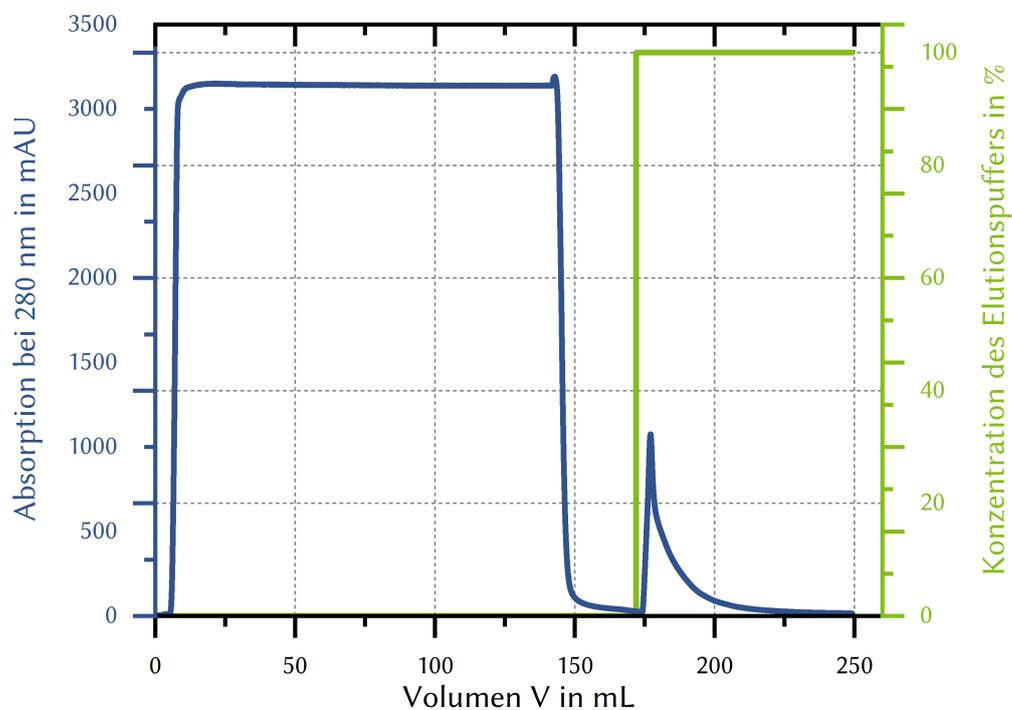
Es zeigte sich, dass die *E. coli*-Zellen zwar in der Lage waren das Protein im hohen Maße zu exprimieren, jedoch war dieses Protein unlöslich, was wiederum dazu führte, dass in der anschließenden Ni-Affinitätschromatografie kein Protein, weder das Zielprotein noch ein anderes, eluiert wurde. Aus diesem Grund wurden weitere alternative Bedingungen für die Expression durchmustert, um eine Anreicherung des Proteins in der löslichen Fraktion zu erreichen (Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.4:** Verschiedene Bedingungen, die bei der Testexpression von MEKK1 variiert wurden.

Bedingung	Variation
Expressions-Vektor	pet41b, pet15b, pMAL
Affinitätstags	His <sub>6</sub> -Tag, GST-Tag, MBP-Tag
Bakterienstämme	BL21(DE3), BL21(DE3) PlysE
Temperatur	4-37 °C
IPTG-Konzentration	0,05-5 mM

Hierbei führte die Einführung der Löslichkeitsvermittelnden Protein-Tags Maltosebindendes Protein (MBP) und Glutathion-S-Transferase (GST) jeweils zu einem Übergang des Proteins in die lösliche Fraktion, wobei jedoch zeitgleich die Expressionsraten sanken. Eine beispielhafte Aufreinigung mittels MBP-Tag wird im Nachfolgenden exemplarisch gezeigt.

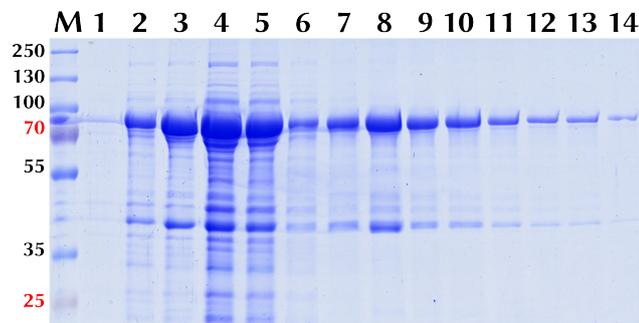
Nach dem Zellaufschluss und der Trennung von den unlöslichen Zellbestandteilen wurde das Lysat durch eine MBP-Affinitätschromatografie aufgereinigt (Abbildung 3.21).



**Abbildung 3.21:** Chromatogramm der Reinigung von MEKK1 mittels einer MBP-Affinitätschromatografie. In blau: UV-Absorption bei 280 nm, in grün: die Konzentration des Elutionspuffers in % und in rot: die Fraktionen, die gesammelt wurden. Aufgetragen jeweils gegen das Volumen, das über die Säule geflossen ist.

### Expression und Reinigung von Proteinen

Das Chromatogramm zeigte, dass (ähnlich zu den Ni-Affinitätschromatografien) zuerst eine hohe Absorption detektiert wurde, während die gesamte lösliche Fraktion über die Säule fließt. Der nachfolgende Waschschrift führte zu einem stabilen Signal bei etwa 50 mAU, woraufhin die Elution direkt mit 100 % des Elutionspuffers durchgeführt wurde. Dies führte zu einem Signal mit einer maximalen Absorption von etwa 1000 mAU. Das Signal zeigte dabei eine dementsprechende charakteristische Form mit einem steilen Anstieg und einem anschließendem Auslaufen des Signals. Um den Reinigungserfolg zu überprüfen, wurden die gesammelten Fraktionen im Anschluss mit einer SDS-Page analysiert (Abbildung 3.22).

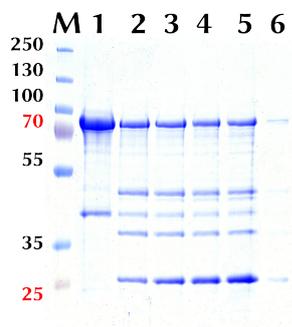


**Abbildung 3.22:** SDS-Page der Reinigung von MEKK1-MPB über eine MPB-Affinitätschromatografie. Angefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau. M: Marker, 1: Vor Induktion, 2: Nach Induktion, 3: Unlösliche Fraktion, 4: Lösliche Fraktion, 5: Durchfluss, 6: Waschfraktion, 7-14: Eluatfraktionen.

Es zeigte sich eine Überexpression des Fusionsproteins MEKK1-MBP (82,1 kDa). Deutliche Unterschiede im Expressionsmuster waren zwischen Proben 1 und 2 zu beobachten, was den Proben vor und nach der Induktion der Expression entsprach. Neben dem möglichen Zielprotein in der löslichen Fraktion, befand sich auch eine große Menge des vermeintlichen Zielproteins in der unlöslichen Fraktion, was auf eine signifikante Überexpression zurückzuführen sein könnte. Da in der Durchflussfraktion ebenfalls eine große Menge des Proteins nachgewiesen werden konnte, wurde die MBP-Säule wahrscheinlich überladen oder die Flussgeschwindigkeit mit  $0,25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  zu hoch eingestellt, um ein sicheres binden an die Säule zu gewährleisten. Während des Waschvorgangs, wurde ebenfalls Protein mit der Zielmasse von der Säule eluiert, was ebenfalls für eine Überladung der Säule spricht.

In den Eluatfraktionen wurden neben Banden bei einer Masse von etwa 82 kDa ebenfalls deutliche Banden bei etwa 40 kDa beobachtet. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um freies MBP, das vermutlich auf natürlich vorkommende Expression zurückzuführen ist.

Im nächsten Schritt wurde nun zunächst der MBP-Tag vom Protein gespalten, um danach das freie MEKK1 zu isolieren. Dazu sollte die *Tobacco Etch Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase* (TEV)-Schnittstelle genutzt werden, welche sich zwischen MEKK1 und dem MBP-Tag befand. Zunächst wurde die für die komplette Spaltung erforderliche Menge TEV bestimmt (Abbildung 3.23).



**Abbildung 3.23:** SDS-Page der Reinigung von MEKK1-MPB. Test von verschiedenen Konzentrationen der Protease TEV. Angefärbt mit Coomassie-Brilliant-Blau. **M:** Marker, **1:** Vor der Dialyse, **2:** 2 mg TEV, **3:** 4 mg TEV, **4:** 6 mg TEV, **5:** 8 mg TEV, **6:** 8 mg TEV nach 24 h.

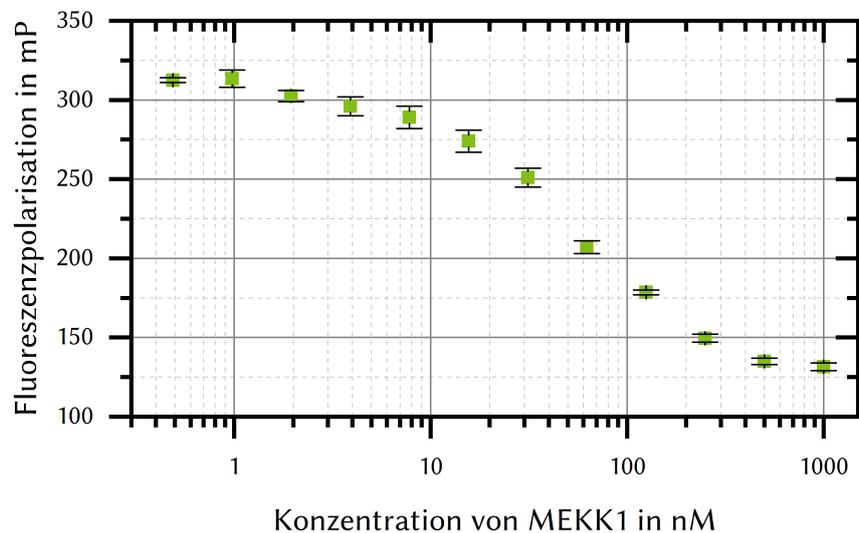
Die Ergebnisse der SDS-Page zeigten, dass es nach der Zugabe von TEV zu der Probe zu einem deutliche Unterschied im Bandenmuster kam, Vergleich der Bahn 1 gegen die folgenden. Dabei spaltete sich das Bandenmuster von zwei Banden bei etwa 80 und 40 kDa in fünf Banden auf, wobei die Bande bei etwa 25 kDa der TEV Protease zugeordnet werden kann, da es sich hierbei um das entsprechende Molekulargewicht handelte. Diese Bande zeigt auch eine steigende Intensität von 2-5, was an der entsprechend höheren Konzentration durch erhöhte Zugabe lag. Es zeigte sich jedoch trotz erhöhter Konzentration von TEV keine Veränderung im Verteilungsmuster der anderen Banden. Bei den Banden handelt es sich wahrscheinlich um die folgenden Spaltungsprodukte: bei etwa 35 kDa MEKK1, was der Masse des geschnittenen MEKK1 (35,4 kDa) entspricht und bei etwa 46 kDa MBP, was der Masse des MBP-Tags (46,7 kDa) entspricht. Da die Spaltung nicht vollständig war, wurde die vereinten Fraktionen mit TEV-

## Expression und Reinigung von Proteinen

Protease versetzt. Die Proteinkonzentration der gesamten Probe lag nach diesem Versuch bei  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Mit dieser Probe wurde nach der Inaktivierung von TEV mit Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) überprüft, ob MEKK1 in der Lage ist MKK7 zu phosphorylieren.

### 3.1.2.1 Aktivierung von MKK7 mit MEKK1

Es sollte untersucht werden, inwiefern MEKK1 in der Lage ist MKK7 zu phosphorylieren. Dazu wurde der Transcreener<sup>®</sup> ADP<sup>2</sup> FP Assay eingesetzt (Abschnitt 5.8.3).

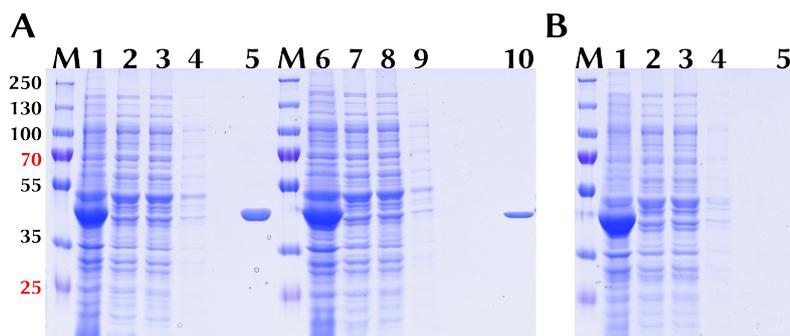


**Abbildung 3.24:** Grafische Darstellung der Fluoreszenzpolarisation in mP gegen die Konzentration von MEKK1 in nM.

Mit Hilfe des Assays konnte gezeigt werden, dass MEKK1 eine enzymatische Aktivität aufwies, und ein EC80 von etwa 100 nM detektiert werden konnte. Aufgrund der geringen Ausbeute während der Reinigung (ca. 1 mg), und der hohen benötigten Konzentration im Assay (100 nM) wurden keine weiteren Versuche mit MEKK1 und dem dadurch aktivierten MKK7 durchgeführt. Stattdessen wurde die bereits durch die Mutationen S271D und T275D aktivierte MKK7-Variante (MKK7 Assay-4) für die biochemischen Untersuchungen eingesetzt.

### 3.1.3 Expression und Reinigung von JNK1 Konstrukten

Für die biochemische Charakterisierung der MKK7-Modulatoren wurde ein Substrat für den Assay benötigt. Aus anderen Publikationen und früheren Versuchen war bereits bekannt, dass die Nutzung eines Peptidfragmentes oder einzelner Domänen von JNK nicht ausreichen würden, um eine biochemische Aktivität nachweisen zu können. Aus diesem Grund wurde das Protein in Volllänge benötigt. Da dies im Assay in relativ großer Menge benötigt werden würde, sollte es ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit exprimiert werden. Um falsche Ergebnisse in den biochemischen Assays zu vermeiden, wurde eine inaktive Mutante von JNK gewählt. Es handelte sich dabei um JNK K55M, wobei das katalytische Lysin gegen ein Methionin ausgetauscht wurde. Das entsprechende Gen wurde hierbei kommerziell synthetisiert und bereits in den entsprechenden Expressionsvektor, Champion™pET151/D-TOPO™<sup>c</sup> kloniert. Mit diesem wurde dann zunächst eine Testexpression in *E. coli* BL21(DE3) Zellen durchgeführt (Abbildung 3.25).



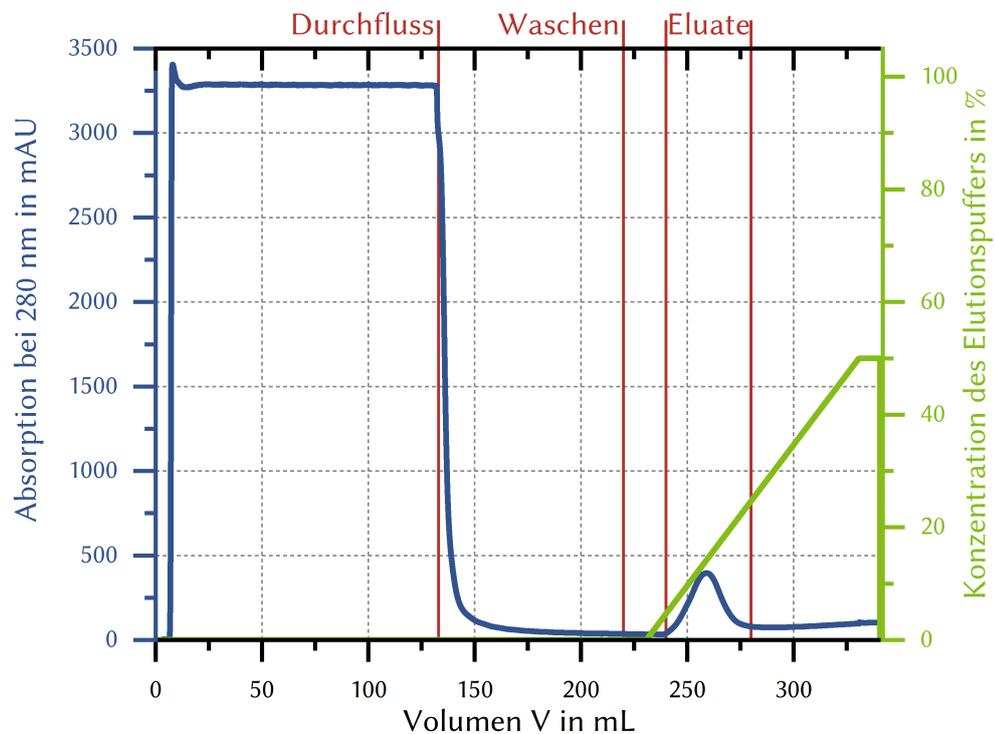
**Abbildung 3.25:** SDS-Page der Testexpression und -reinigungen von JNK1A1 K55M. **A** Erster und zweiter getesteter Klon: M: Marker; 1: Pellet; 2: Überstand; 3: Durchfluss; 4: Waschfraktion; 5: Eluat; M: Marker; 6: Pellet; 7: Überstand; 8: Durchfluss; 9: Waschfraktion; 10: Eluat. **B** Dritter getesteter Klon M: Marker; 1: Pellet; 2: Überstand; 3: Durchfluss; 4: Waschfraktion; 5: Eluat. Angefärbt mit Coomassie-Brillinat Blau.

Es zeigte sich, dass der Klon der für die erste Testexpression genutzt wurde, die dickste Bande in der Eluatfraktion zeigte, wohingegen der zweite Klon eine schwache und der dritte keine Bande zeigte. Bis auf die Eluatfraktionen zeigten sich gleiche Bandenmuster bei allen drei Klonen. Vor allem eine deutliche Bande bei etwa 50 kDa in der unlöslichen Fraktion.

<sup>c</sup>ThermoFischer Scientific

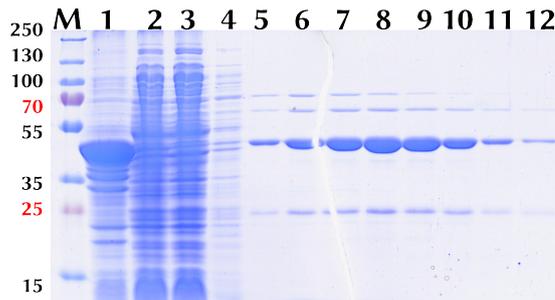
## Expression und Reinigung von Proteinen

Demnach wurde das Protein wahrscheinlich in allen drei Klonen exprimiert. Die schwächere Eluat-Bande bei dem zweiten Klon und das Fehlen dieser bei dem dritten Klon, lässt sich auf einen eventuell misslungenen Aufschluss der Zellen oder auf ein Problem der Ni-Affinitätssäulen zurückführen. Aufgrund der anscheinend guten Ausbeute und Reinheit der Reinigung des ersten Klons, wurde mit diesem eine große Expression angesetzt. Nach dem Aufschluss und der Trennung in lösliche und unlösliche Fraktion, wurde eine Reinigung über eine Ni-Affinitätschromatografie durchgeführt (Abbildung 3.26).



**Abbildung 3.26:** Chromatogramm der Ni-Affinitätschromatografie während der Reinigung von JNK K55M. In blau: UV-Absorption bei 280 nm, in grün: die Konzentration des Elutionspuffers in % und in rot: die Fraktionen die gesammelt wurden, wobei die Eluatfraktionen aufgrund der besseren Lesbarkeit hier als Eluate zusammengefasst wurden. Aufgetragen jeweils gegen das Volumen, dass über die Säule geflossen ist.

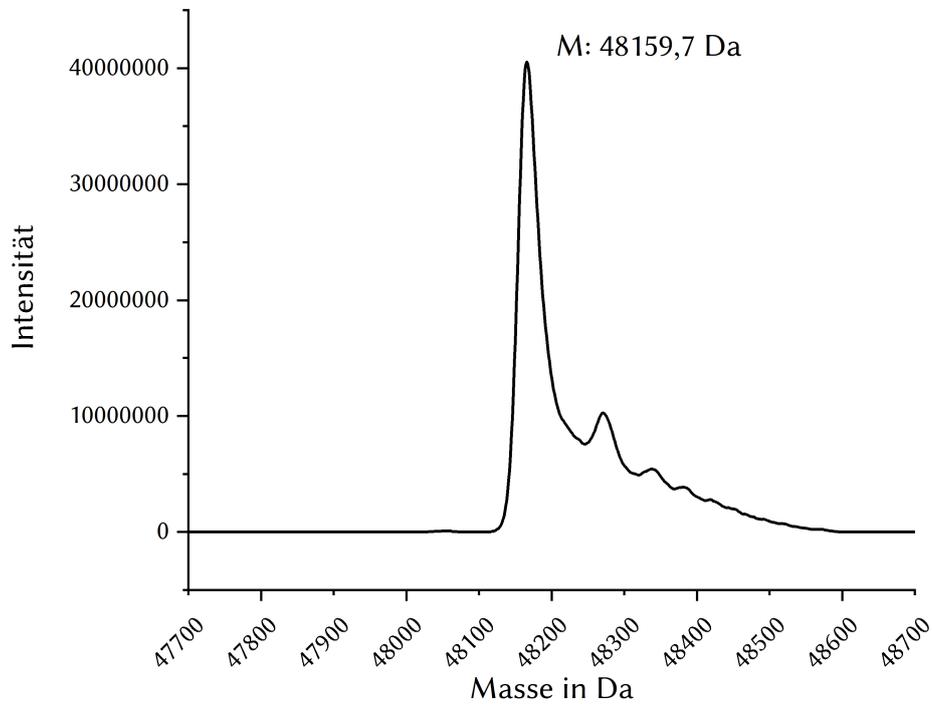
Nach dem Plateau, das während des Durchflusses des Zelllysats, nach dem Waschen auf etwa 50 mAU abgefallen ist, wurde durch graduelle Erhöhung der Konzentration des Elutionspuffers die an die Säule gebundene Protein bei einer Konzentration von etwa 7% Elutionspuffer eluiert und mittels SDS-Page analysiert (Abbildung 3.27).



**Abbildung 3.27:** SDS-Page der Reinigung über eine Ni-Affinitätschromatografie von JNK1A1 K55M. M: Marker; 1: Unlösliche Fraktion; 2: Lösliche Fraktion; 3: Durchfluss; 4: Waschfraktion; 5-12: Eluatfraktionen.

Es zeigte sich eine große Menge Protein bei einer Masse von etwa 50 kDa in der unlöslichen Fraktion, was jedoch in der hohen Überexpression begründet liegen könnte. In der löslichen Fraktion, sowie in der Durchfluss- und der Waschfraktion zeigte sich keine deutliche Überexpressionsbande. Jedoch zeigte sich in den Eluatfraktionen eine große Menge eines Proteins auf Höhe der gewünschten Masse von etwa 48 kDa. Neben diesen Banden zeigen sich auch schwächer ausgeprägte Banden, sowohl in einem Bereich von etwa 70-90 kDa und eine Banden bei etwa 25 kDa.

Die erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt. Mit dem so erhaltenen Protein wurde zur Überprüfung der Identität zunächst ein Massenspektrum aufgenommen (Abbildung 3.28).



**Abbildung 3.28:** Dekonvolviertes Massenspektrum der vereinigten Eluatproben aus der Ni-Affinitätschromatografie von JNK1 K55M.

Die Massenspektrometrische Untersuchung ergab eine Masse von 48.159,7 Da. Dies entspricht der Masse des JNK k55M Konstruktes von 48.159,63 Da. Damit konnte die Expression und die Reinigung von JNK1 K55M als erfolgreich angesehen werden. In den biochemischen Analysen sollte nun noch getestet werden ob die Verunreinigungen oberhalb und unterhalb der Masse von JNK einen Einfluss haben.

### 3.2 Biochemische Charakterisierung von MKK7 Modulatoren

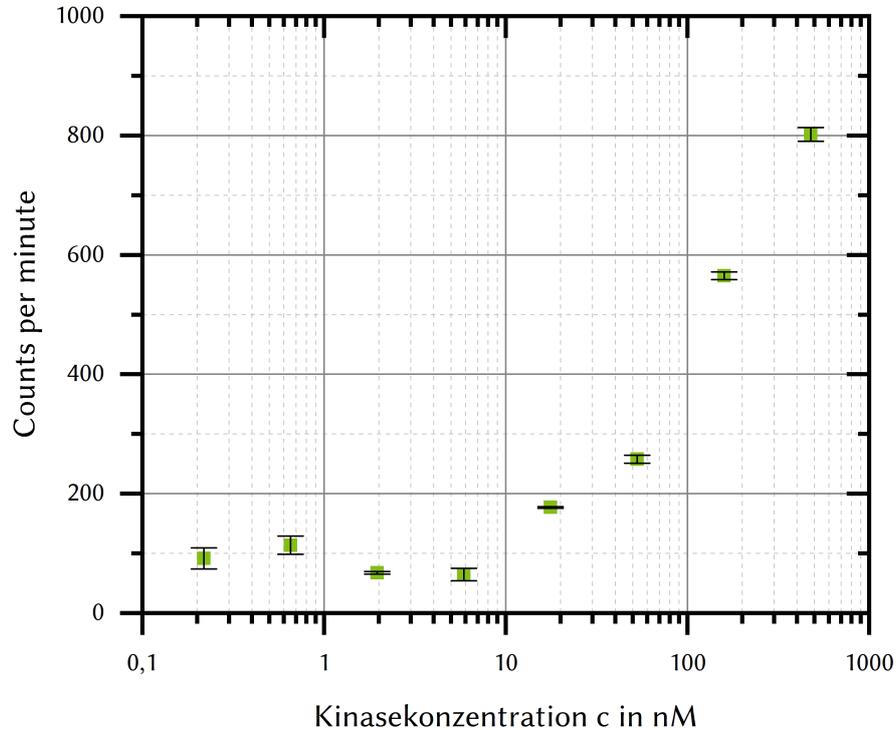
Zum Identifizieren von Inhibitoren beziehungsweise Modulatoren von MKK7, sollte zunächst ein entsprechendes System gefunden werden, mit dem bioche-

mische Aktivität von MKK7, in Form von Phosphorylierung von JNK detektiert werden kann. Basierend auf den vielzählig genutzten radioaktiven Assays kommerzieller Anbieter, sollte zunächst ebenfalls ein solches System für die Charakterisierung herangezogen werden.

### **3.2.1 Radiometrischer Filter-Bindungsassay**

#### **3.2.1.1 Bestimmung der Reaktionsbedingungen**

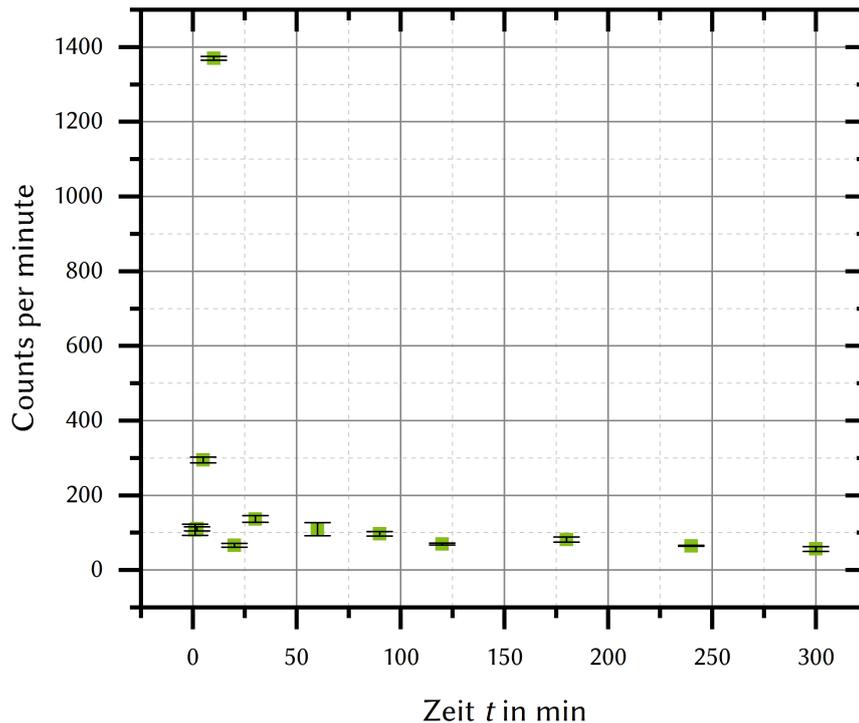
Ein kommerziell häufig genutztes Verfahren für die Bestimmung der Aktivität von MKK7 stellen radiometrische Filter-Bindungsassays dar, die aus diesem Grund ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit genutzt werden sollten. Zur Bestimmung der idealen Kinasekonzentration, wurde die Menge eingesetzter Kinase variiert (0,2-477,0 nM) (Abbildung 3.29).



**Abbildung 3.29:** Gemessene Radioaktivität in *counts per minute* gegen die Konzentration von MKK7 Assay-4 in nM.

Die Ergebnisse zeigen einen exponentiellen Verlauf für die Reaktion der Kinase. Bis zu einer Konzentration von etwa 10 nM bleibt das Signal bei etwa 100 cpm, danach steigt es bis auf 800 cpm bei 477 nM MKK7. Es wurde kein Sigmoidaler Kurvenverlauf erhalten, der für eine biochemische Reaktion wie die Phosphorylierung durch eine Proteinkinase zu erwarten war. Wahrscheinlich wurde die dafür benötigte Konzentration an Kinase nicht erreicht. Ausgehend von dieser Messung wurde für die folgenden Messungen eine Konzentration von 50 nM Kinase eingesetzt. Bei diesem Wert war die gemessene Radioaktivität zwar nicht besonders hoch (257 CPM), jedoch war aufgrund der Menge an Kinase die für den Assay eingesetzt werden musste, eine höhere Konzentration nicht realisierbar.

Als nächstes sollte die Bestimmung der Reaktionszeit festlegen, wie lange die Kinasereaktion in zukünftigen Assays andauern darf. Dazu wurde die Reaktion nach verschiedenen Zeitpunkten durch Zugabe von Phosphorsäure gestoppt (Abbildung 3.30).



**Abbildung 3.30:** Gemessenen Radioaktivität in *counts per minute* gegen die Zeit  $t$  in Minuten.

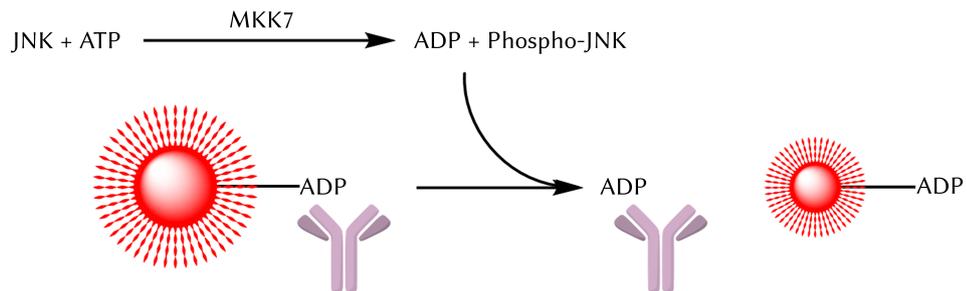
Es konnte (auch nach mehrfacher Wiederholung des Experiments) keine signifikante Aktivität bestimmt werden. Es zeigte sich vielmehr, dass das Signal bei 5 min nicht reproduzierbar und somit ein Ausreißer war. Anscheinend war eine Steigerung der Reaktionszeit in diesem Rahmen nicht ausreichend, um das Signal zu erhöhen.

Aufgrund der großen Menge an Kinase, die für den Assay eingesetzt wurde, und dem gefährlichen Umgang mit dem radioaktiven Isotop  $^{32}\text{P}$  Phosphor, wurden keine weiteren Versuche unternommen einen radiometrischen Assay durch-

zuführen. Im weiteren Verlauf wurde daher auf einen Assay auf Fluoreszenzbasis zurückgegriffen.

### 3.2.2 Transcreener<sup>®</sup> ADP<sup>2</sup> FP Assay

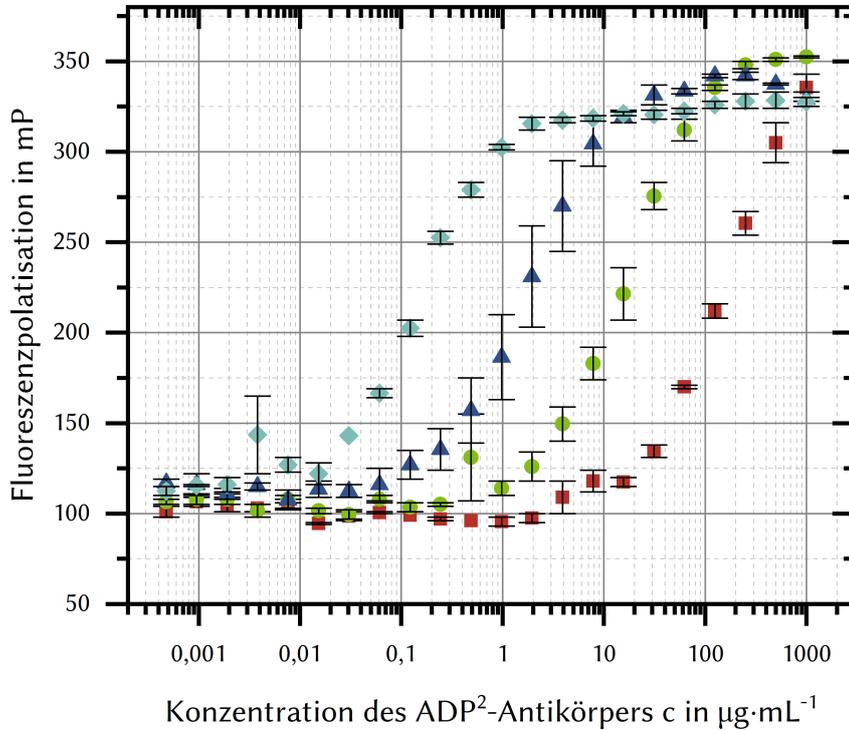
Der hierfür ausgewählte Transcreener<sup>®</sup> ADP<sup>2</sup> FP funktioniert auf Basis der Fluoreszenzpolarisation. Dabei wird nach der Kinasereaktion ein fluorophormarkiertes Adenosindiphosphat (ADP), sowie ein anti-ADP-Antikörper zu der Lösung gegeben. Kommt es nun durch die Kinasereaktion zu einer hohen Konzentration an freigesetztem ADP in der Lösung, so konkurriert dieses mit dem fluorophormarkiertem ADP um die Bindung an den Antikörper. Durch die Bindung an den Antikörper erhöht sich die Fluoreszenzpolarisation des Fluorophors. Je mehr freies ADP in der Lösung, desto weniger von dem fluoreszenzmarkiertem ADP kann an den Antikörper binden, wodurch das Fluoreszenzpolarisationssignal sinkt (Abbildung 3.31).



**Abbildung 3.31:** Schematische Darstellung der Funktionsweise des Transcreener<sup>®</sup> ADP<sup>2</sup> FP Assays.<sup>70</sup>

#### 3.2.2.1 Bestimmung der Reaktionsbedingungen des Transcreener<sup>®</sup> ADP<sup>2</sup> FP Assays

Zur Etablierung des Assays sollte zunächst die Bestimmung der idealen Reaktionsbedingungen erfolgen. Den ersten Schritt stellte hierbei die Bestimmung der optimalen Antikörpermenge dar, um das maximale Signal während des Assays zu erhalten. Dafür wurde der Antikörper bei verschiedenen Konzentrationen an ATP titriert (Abbildung 3.32).



**Abbildung 3.32:** Titration des ADP<sup>2</sup>-Antikörpers bei verschiedenen Konzentrationen von ATP. Aufgetragen ist die Fluoreszenzpolarisierung gegen die Antikörper Konzentration bei: ■ 1000 µM ATP, ● 100 µM ATP, ▲ 10 µM ATP und ◆ 1 µM ATP.

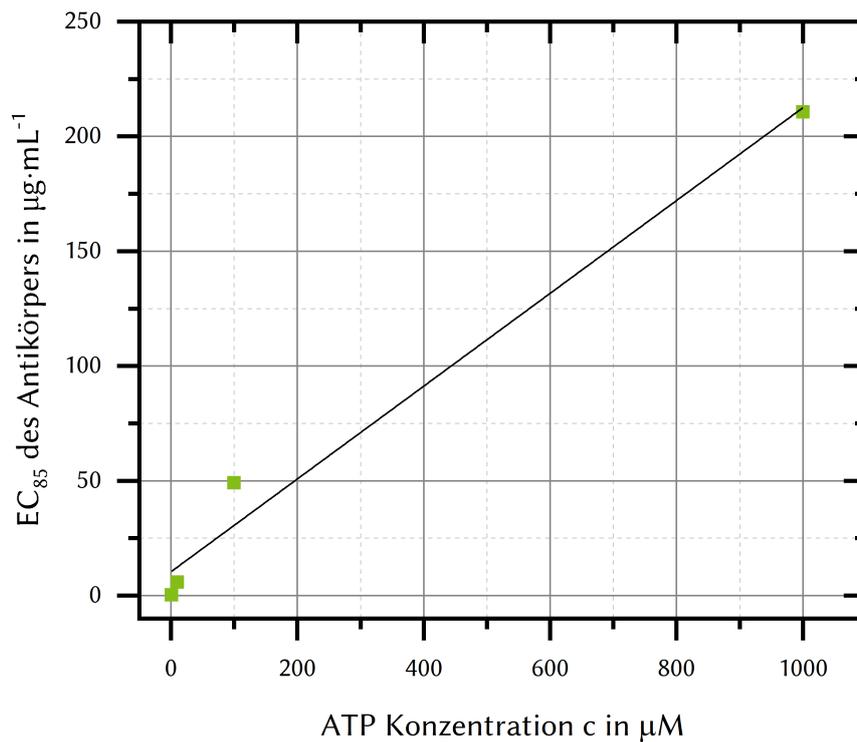
Aus dieser Messung wurde nun für die verschiedenen Konzentrationen jeweils die optimale Antikörperkonzentration bestimmt, indem für jede Kurve der EC<sub>85</sub> bestimmt wurde, wobei n<sub>H</sub> der HILL-Koeffizient ist, welcher der Steigung der Kurve entspricht (Gleichung 3.1; Tabelle 3.5).

$$EC_{85} = \left( \frac{85}{100 - 85} \right)^{\frac{1}{n_H}} \cdot EC_{50} \quad (3.1)$$

**Tabelle 3.5:** Ergebnisse aus der Bestimmung der idealen Antikörper-Konzentration bei verschiedenen ATP-Konzentrationen.

Konzentration von ATP in $\mu\text{M}$	$\text{EC}_{85}$ der Antikörpertitration in $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	0,26
10	5,90
100	49,15
1000	210,70

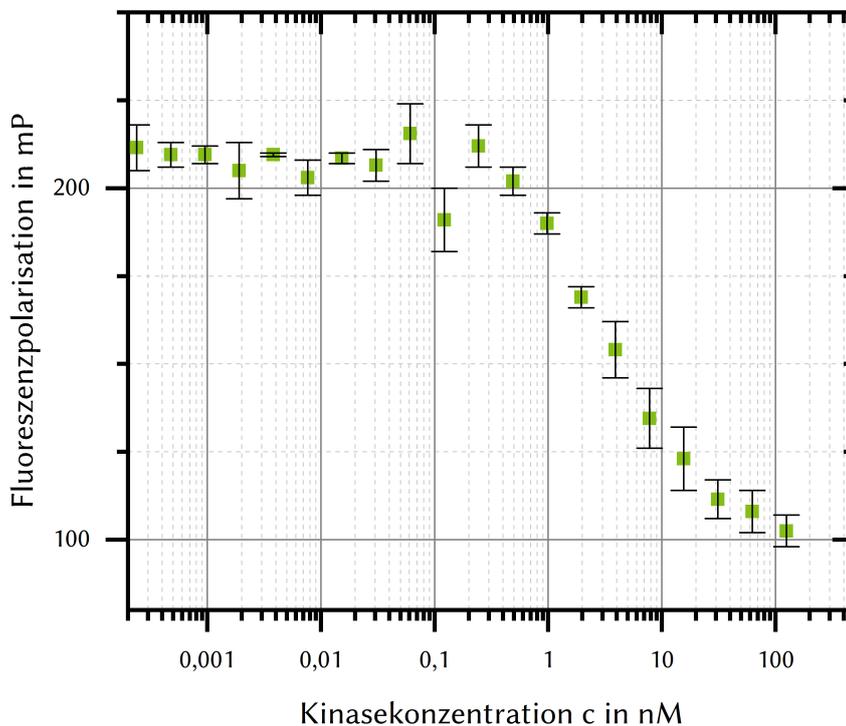
Aus diesen Werten kann nun eine Geradengleichung bestimmt werden, mit deren Hilfe die optimale Antikörperkonzentration für die jeweils eingesetzte Menge an ATP bestimmt wurde (Abbildung 3.33).



**Abbildung 3.33:** Bestimmung der Geradengleichung für die jeweiligen  $\text{EC}_{85}$ -Werte der Antikörpertitration:  $y = 0,2c + 10,4$ ,  $R^2 = 0,99$ .

Mit Hilfe der erhaltenen Geradengleichung ( $y = 0,2c + 10,4$ ) wurde die entsprechende Antikörperkonzentration ( $y$ ) bei einer entsprechenden ATP-Konzentration ( $c$ ) für den Assay bestimmt.

Als nächstes wurde zur Bestimmung der Reaktionsbedingungen die Konzentration an Kinase variiert, wobei die restlichen Faktoren bei Standardwerten nach dem Handbuch für den Assay gehalten wurden (Reaktionszeit: 60 min, Substratkonzentration: 5 mM, Raumtemperatur) (Abschnitt 5.8.2).



**Abbildung 3.34:** Transcreener<sup>®</sup> ADP<sup>2</sup> FP Assay der Bestimmung der idealen Konzentration von MKK7 im Assay. Aufgetragen ist die Fluoreszenzpolarisierung in mP gegen die Konzentration von MKK7 in nM.

Es zeigte sich ein nahezu sigmoidaler Verlauf von hohen Polarisations-Werten (210 mP) bei niedrigen Kinasekonzentrationen, hin zu niedrigeren Polarisations-Werten (100 mP) bei höheren Kinasekonzentrationen. Eine steigende Aktivität war erst ab einer Konzentration von etwa 0,5 nM Kinase festzustellen.

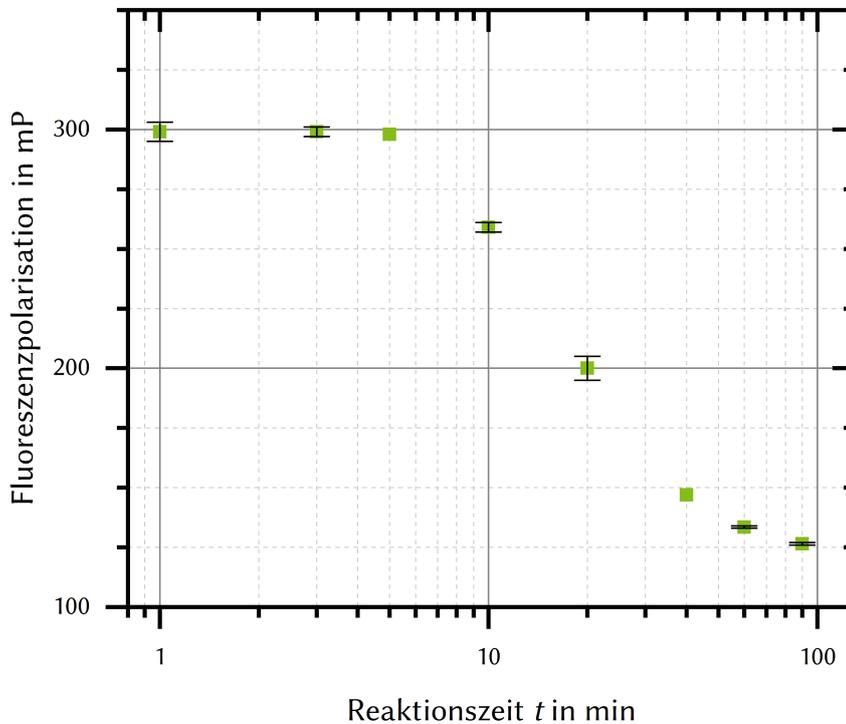
### *Biochemische Charakterisierung von MKK7 Modulatoren*

Der Wert bei 125 nM Kinase von etwa 100 mP entspricht dabei dem Wert für die Positivkontrolle und zeigte, dass die Reaktion dabei nahezu vollständig ablief. Die ideale Kinasekonzentration wurde durch den EC<sub>80</sub>-Wert bestimmt (Gleichung 3.2).

$$EC_{80} = \left( \frac{80}{(100 - 80)} \right)^{\frac{1}{n_H}} \cdot EC_{50} \quad (3.2)$$

Mit Hilfe der entsprechenden Gleichung und den Ergebnissen ergab sich ein EC<sub>80</sub> von etwa 10 nM. Diese Konzentration wurde folglich für die zukünftigen Experimente als Standard festgelegt.

Zur Bestimmung der idealen Reaktionszeit, bei der ein ausreichend starkes Signal erzeugt wird, um ein gutes Signal zu Rauschen Verhältnis zu erhalten, wurde die Reaktion zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit der Detektionslösung gestoppt (Abbildung 3.35).



**Abbildung 3.35:** Ergebnisse der Bestimmung der Reaktionszeit für den Transcreener<sup>®</sup> ADP<sup>2</sup> FP Assay, Fluoreszenzpolarisation gegen die Reaktionszeit  $t$  in min.

Die Ergebnisse zeigten einen sigmoidalen Kurvenverlauf von hohen Polarisationswerten bei geringer Reaktionszeit hin zu kleinen Polarisationswerten bei hohen Reaktionszeiten. Daraus folgt, je länger die Reaktionszeit war, desto größer war auch der Umsatz. Zur Bestimmung der Reaktionszeit wurde erneut der  $EC_{80}$  bestimmt (Gleichung 3.2), welcher eine Reaktionszeit von 30 min ergab. Neben der Reaktion, sowie der Positiv- und Negativkontrolle, wurde auch eine Kontrolle für das Substrat alleine durchgeführt, um zu überprüfen ob die Mutation K55M in JNK tatsächlich die gewünschte Inaktivierung zeigt. Dazu wurde der Reaktion kein MKK7 zugegeben. Theoretische dürfte das JNK K55M aufgrund seiner Mutation keine Aktivität haben.<sup>71</sup> Es stellte sich jedoch heraus, dass es sehr wohl zu einem konzentrationsabhängigen Signal kam (Tabelle 3.6).

**Tabelle 3.6:** Vergleich der Kontrollen bei der Durchführung des Transcreeper<sup>®</sup> ADP<sup>2</sup> FP Assays.

Kontrolle	Fluoreszenzpolarisation in mP
Negativ Kontrolle	101,7 ± 2,9
Positiv Kontrolle	286,3 ± 8,9
nur MKK7 (Mit ATP)	295,5 ± 2,5
nur JNK (Mit ATP)	147,0 ± 1,0
komplett (MKK7, JNK und ATP)	133,5 ± 0,5

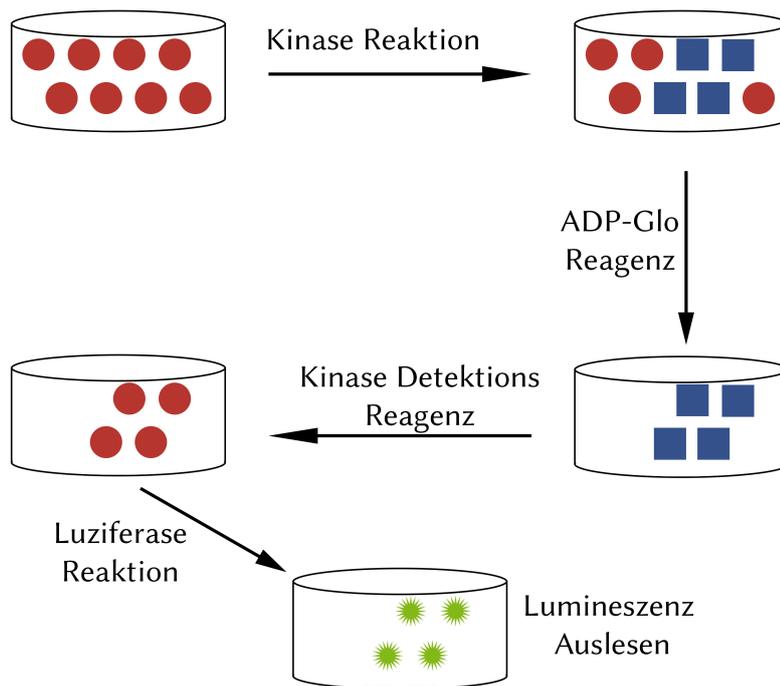
Daraus resultierte, dass die Aktivität von MKK7 mit JNK nur minimal höher war, als die Reaktion von JNK alleine. Dies deutete darauf hin, dass JNK entweder eine eigene Aktivität hatte, was jedoch durch die Mutation ausgeschlossen werden sollte, oder dass es in einer anderen Weise mit dem Assay interagiert. So kann davon ausgegangen werden, dass das JNK zwar durch die Inaktivierungsmutation nicht in der Lage ist, das ATP umzusetzen, es aber sehr wohl in der Lage war einen Komplex mit dem fluoreszenzmarkierten ADP zu formen und dadurch die Polarisation des Fluorophors ebenfalls zu verändern, wodurch es zu einem falsch positiven Signal kam. Um dies zu vermeiden, sollte auf ein System gewechselt werden, bei dem der Verbrauch des ATP's nicht durch Fluoreszenzpolarisation des gebundenen ADPs gemessen wird, sondern durch Lumineszenz, dafür sollte der ADP-Glo<sup>™</sup> Kinase Assay eingesetzt werden.

### 3.2.3 ADP-Glo<sup>™</sup> Kinase Assay

Mit Hilfe des ADP-Glo<sup>™</sup> Kinase-Assays<sup>d</sup>, bei dem die verbrauchte Menge ATP über eine Luciferase Reaktion in Form von Lumineszenz gemessen werden kann, sollte eine eventuelle Bindung des Substrates JNK K55M keine Rolle spielen, beziehungsweise nur zu einer geringfügigen Reduktion des Signals, jedoch nicht zu falsch positiven Ergebnissen führen. Der Assay teilt sich dabei je nach Anwendung in drei bzw. vier Phasen auf. In der ersten Phase findet die Kinasereaktion statt, in der Kinase, Substrat, ATP und eventuell Modulator zusammen inkubiert werden. Eventuell wird zuvor noch eine Inkubation der Kinase mit dem Modulator durchgeführt. Anschließend wird durch Zugabe des ADP-Glo<sup>™</sup>-Reagenzes die Kinasereaktion gestoppt und das nicht verbrauchte ATP aus der Reakti-

<sup>d</sup>Promega

onslösung entfernt.<sup>72</sup> Im nächsten Schritt wird das Kinase-Detektions-Reagenz hinzugegeben, wodurch das zuvor durch die Kinase erzeugte ADP wieder zu ATP umgesetzt wird und dieses dann in einer Reaktion mit der ebenfalls enthaltenen Luciferase zu einer Emission von Licht bei der Wellenlänge von 560 nm führt (Abbildung 3.36).<sup>73</sup>



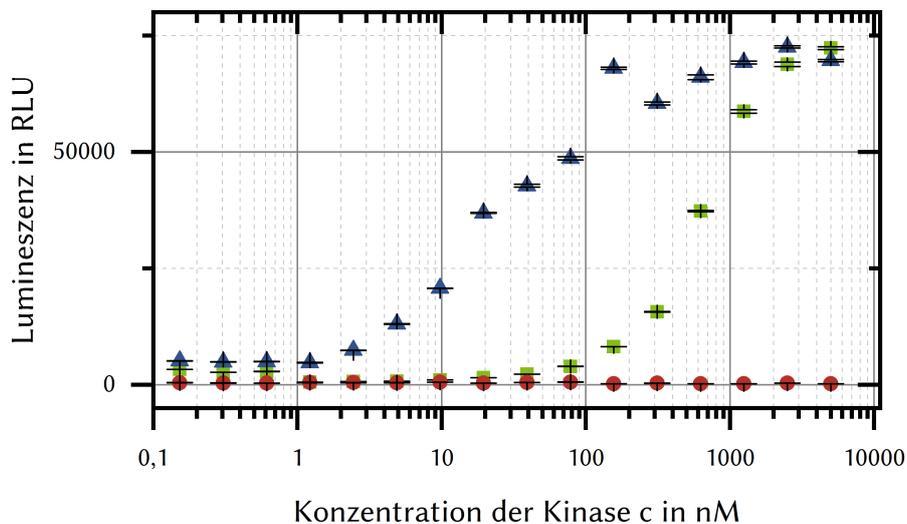
**Abbildung 3.36:** Schematische Abbildung der Durchführung des ADP-Glo™ Kinase-Assay.<sup>74</sup>

(●): ATP, (■): ADP.

Durch das entstehende Lichtsignal ist es möglich den Verbrauch von ATP zu bestimmen und dieses dann zum Beispiel gegen die Konzentration der Kinase oder der Konzentration der Modulatoren aufzutragen, wodurch die Bestimmung der optimalen Kinasekonzentration oder von  $IC_{50}$ -Werten ermöglicht wird. Damit dieser Assay für die Bestimmung von biochemischen Parametern genutzt werden konnte, musste zunächst die ideale Konzentration von MKK7, JNK und ATP bestimmt werden, sowie die Reaktionszeit.

### 3.2.3.1 Bestimmen der Reaktionsbedingungen des ADP-Glo™ Kinase-Assays

Zuerst wurde die optimale Konzentration von MKK7 bestimmt. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen von MKK7 bei Standard-Bedingungen (Abschnitt 5.8.3) getestet, um die ideale Konzentration zu finden, bei der das Signal ein gutes Signal zu Rauschen Verhältnis hat, aber auch noch Sensitiv genug ist (Abbildung 3.37).



**Abbildung 3.37:** ADP-Glo™ Kinase-Assay: Kinasetitration, Relative Lumineszenz gegen die Kinasekonzentration. (■): MKK7, (●): 1 μM Substrat (JNK1 K55M), (▲): MKK7 + 1 μM Substrat.

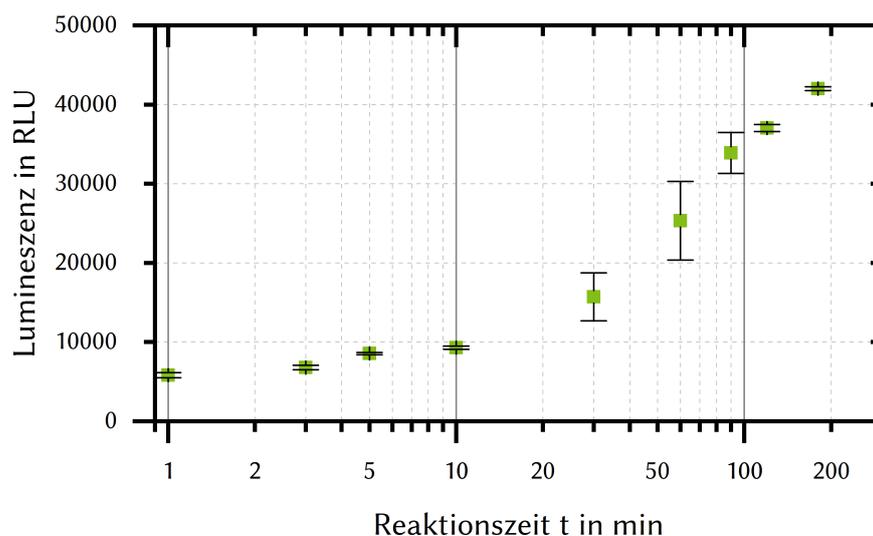
Die Ergebnisse zeigen drei Kurven, wobei es sich um eine Kurve für die Reaktion von MKK7 mit ATP (■), JNK K55M mit ATP (●) und MKK7 mit JNK und ATP handelte (▲). Die Kurven der Reaktion mit MKK7 zeigen einen ähnlichen Kurvenverlauf, wobei die Reaktion mit JNK bei einer Konzentration von etwa 1 nM beginnt, während die Reaktion ohne JNK erst bei 10 nM ein messbares Signal erzeugt. Die Kurve der Reaktion von JNK mit ATP zeigt lediglich eine Gerade bei einem Wert um 0.

Aus diesen Ergebnissen ging hervor, dass das MKK7 zum Einen eine Autophosphorylierung katalysiert, was an der Kurve zu erkennen ist, bei der lediglich MKK7 zur Reaktion beigefügt wurde (■). Das Substrat alleine (●) wies hinge-

gen keine Aktivität in dem Assay auf. Bei der vollständigen Reaktion ( $\blacktriangle$ ), bei der neben MKK7 und ATP auch JNK vorlag, fand die Reaktion bereits bei einer deutlich geringeren Kinasekonzentration statt. Diese Ergebnisse sprachen dafür, dass MKK7 JNK K55M unter den gewählten Bedingungen erfolgreich phosphorylieren konnte.

Aus der Kurve der vollständigen Reaktion ( $\blacktriangle$ ) ging hervor, dass die ideale Kinasekonzentration für den Assay bei etwa 20 nM lag, was 80 % des linearen Anstiegs der Kurve entsprach. Bei dieser Konzentration wies die Reaktion ein Lumineszenzsignal von etwa 40.000 *relative light unit* (RLU) auf, während die Autophosphorylierung nur ein Signal von etwa 200 RLU aufwies. Mit dieser Konzentration sollte im nächsten Schritt die Reaktionszeit bestimmt werden.

Für die Bestimmung der Reaktionszeit wurde die Reaktion nach unterschiedlichen Zeitpunkten in einem Bereich von 1-180 min gestoppt. Die entsprechende Lumineszenz wurde gegen die Reaktionszeit aufgetragen (Abbildung 3.38).

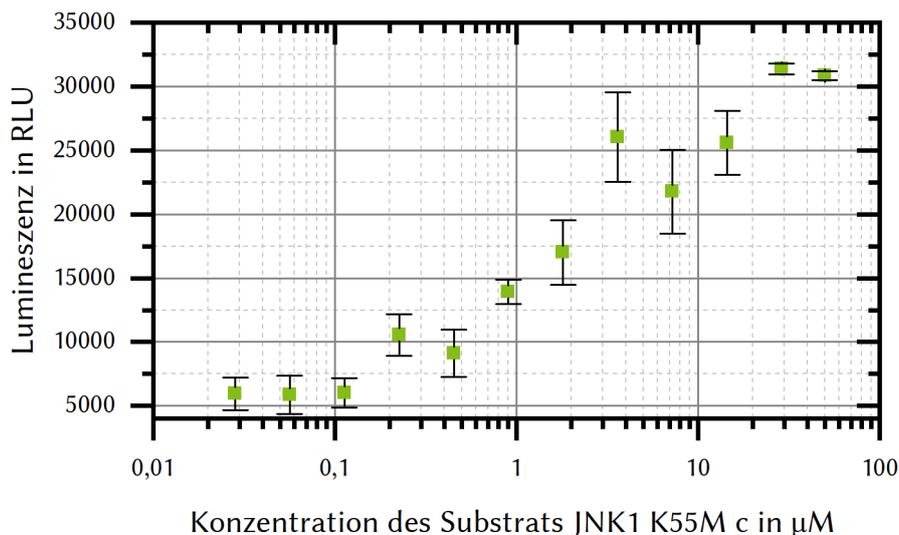


**Abbildung 3.38:** Bestimmung der optimalen Reaktionszeit für den ADP-Glo<sup>TM</sup> Kinase-Assay durch Auftragung der relativen Lumineszenz gegen die Reaktionszeit in min.

Das Ergebnis der Messung ergab einen sigmoidalen Kurvenverlauf, wobei das Signal, also der Umsatz von ATP, mit steigender Zeit zunahm.

### Biochemische Charakterisierung von MKK7 Modulatoren

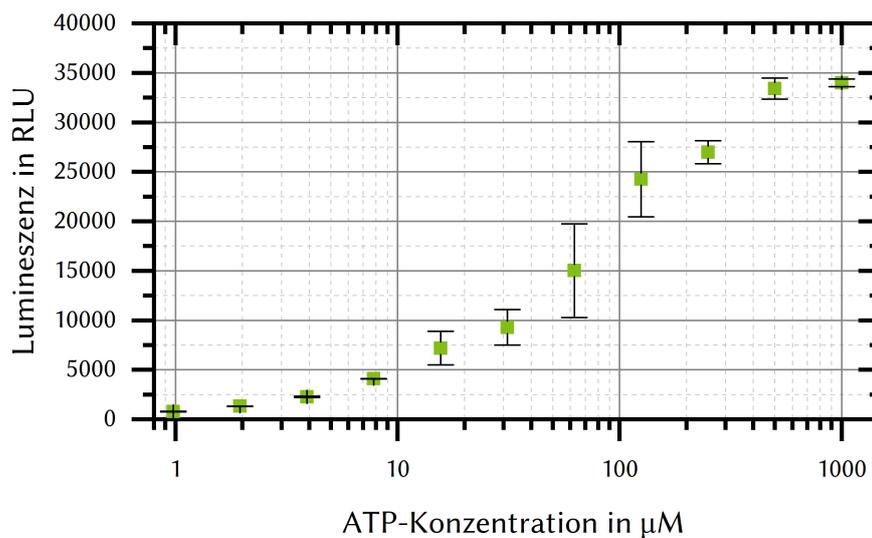
Bei kurzen Reaktionszeiten im Bereich von 1-10 min lag das Signal zwischen 5.000 und 10.000 RLU. Danach stieg das Signal bis auf etwa 42.000 RLU bei einer Reaktionszeit von 3 h an. Aus der Auftragung ging eine Reaktionszeit zwischen 60-90 min als idealer Wert hervor, da es sich dabei um etwa 80 % des linearen Bereiches der Kurve handelte. Da bereits aus vorherigen Untersuchungen bekannt war, dass die Kinase bei längerer Inkubationszeit instabil wird, wurde 60 min als Reaktionszeit gewählt. Nach der Bestimmung der Reaktionszeit und der Kinasekonzentration folgte die Ermittlung der ATP- und Substratkonzentration, um die letztendlich im Assay eingesetzten Konzentrationen dieser beiden Komponenten zu bestimmen. Zuerst sollte dabei die Konzentration des Substrats bestimmt werden. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen des Substrats JNK1 K55M eingesetzt und die resultierende Lumineszenz gegen diese Konzentration aufgetragen (Abbildung 3.39).



**Abbildung 3.39:** Bestimmung der Substratkonzentration für den ADP-Glo™ Kinase-Assay, durch Auftragung der relativen Lumineszenz gegen die Substratkonzentration.

Die Auftragung der Messungen ergab auch für dieses Experiment den erwarteten Sigmoidalen Kurvenverlauf. Mit steigender Konzentration des Substrates stieg auch der Umsatz an ATP, beziehungsweise das Lumineszenz-Signal.

Bei Konzentrationen von unter  $0,2 \mu\text{M}$  war lediglich ein Signal von etwa 5.000 RLU detektierbar. Dieses Signal stieg dann bis auf etwa 33.000 RLU bei  $30 \mu\text{M}$  an und blieb dort stabil. Wie bereits zuvor wurde hier der Wert bei etwa 80 % des linearen Bereiches als Wert für die optimale Konzentration gewählt. Hierfür ergab sich ein Wert von etwa  $5 \mu\text{M}$ , weswegen für den Assay in den nachfolgenden Versuchen immer  $5 \mu\text{M}$  JNK1 K55M als Substrat eingesetzt wurden. Der letzte Schritt des Aufsetzens des Assays bestand in der Ermittlung der ATP-Konzentration. Dieser wurde äquivalent zur Bestimmung der Substratkonzentration ermittelt, indem die Konzentration an ATP variiert wurde. Dazu musste darauf geachtet werden, dass die entsprechende Laufzeit für die Stoppreaktion angepasst wurde, da der Hersteller für eine Konzentration zwischen 10 und  $100 \mu\text{M}$  ATP eine Detektionszeit von 30 Minuten, bei  $100\text{-}500 \mu\text{M}$  40 Minuten und bei Konzentrationen zwischen 500 und  $1.000 \mu\text{M}$  60 Minuten angibt (Abbildung 3.40).



**Abbildung 3.40:** Bestimmung der ATP-Konzentration für den ADP-Glo™ Kinase-Assay, durch Auftragung der relativen Lumineszenz gegen die Substratkonzentration.

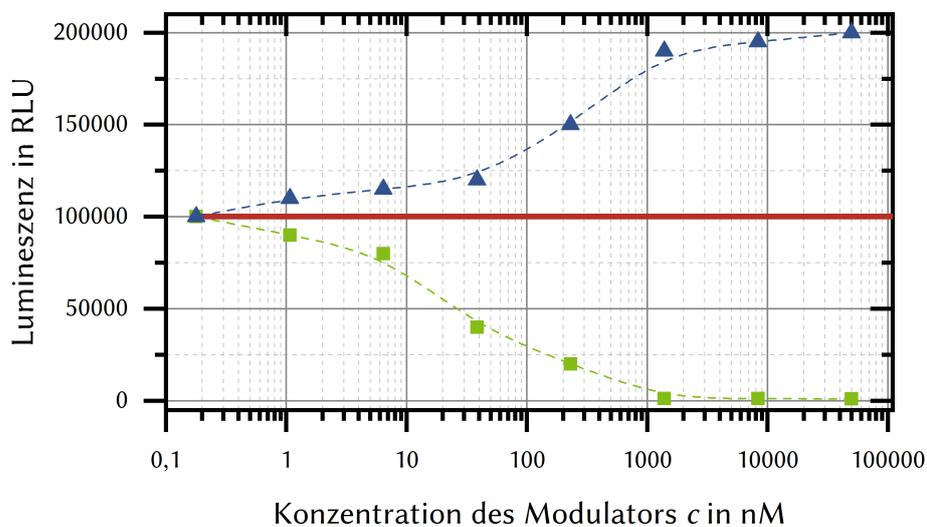
### *Biochemische Charakterisierung von MKK7 Modulatoren*

Auch für die Bestimmung der ATP-Konzentration ergab sich ein sigmoidaler Kurvenverlauf. Dabei fällt auf, dass die Signale unter 10  $\mu\text{M}$  ATP unter den zuvor immer als Minimum bestimmten 5.000 RLU liegen. Das lag daran, dass die Konzentration in den vorherigen Bestimmungen bei 10  $\mu\text{M}$  ATP lag. Das Signal steigt bis zu einem Maximum von etwa 34.000 RLU. Hier wurde erneut der Wert bei 80 % des linearen Bereiches ermittelt und ergab etwa 170  $\mu\text{M}$  ATP. Als ATP-Konzentration für den Assay, wurde unter Berücksichtigung der Herstellerangaben, 250  $\mu\text{M}$  gewählt.<sup>74</sup>

Der Assay konnte somit nach erfolgreicher Bestimmung der optimalen Kinase-, Substrat- und ATP-Konzentration für eine folgende Charakterisierung von niedermolekularen Substanzen zur Identifikation potenzieller MKK7-Liganden bzw. Modulatoren genutzt werden.

### 3.2.4 Screening nach neuen Modulatoren

Aufgrund der Funktionsweise des ADP-Glo™ Kinase-Assays ist es möglich sowohl Aktivatoren, als auch Inhibitoren zu identifizieren, indem die Ergebnisse mit denen einer ohne Zugabe einer niedermolekularen Verbindung verglichen werden. Dies soll anhand der folgenden Abbildung 3.41 exemplarisch gezeigt werden.

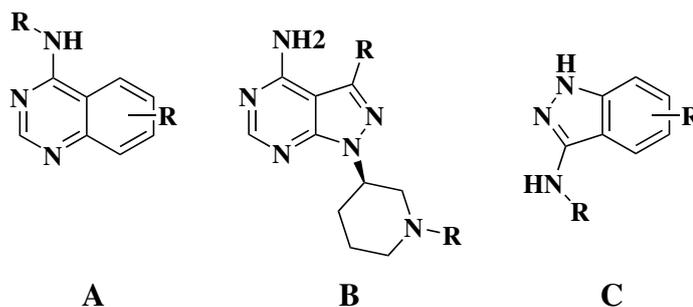


**Abbildung 3.41:** Beispielhafter Vergleich zwischen dem theoretischen Verlauf einer Kurve für einen Inhibitor (▲), einen Aktivator (■) und der reinen Kinase ohne Zugabe eines Modulators, beziehungsweise der Verlauf mit einem Modulator der keine Wirkung auf die Kinase zeigt.

In der Abbildung zeigt die rote Linie den Verlauf einer Messung bei der kein Modulator, oder ein Modulator ohne Wirkung eingesetzt wird. Durch Zugabe einer Verbindung, die mit der Kinase interagieren und sie modulieren kann, kommt es Konzentrationsabhängig zu einer Veränderung des Signals. Während das Signal bei Gabe eines Inhibitors, bei steigender InhibitorKonzentration sinken sollte, müsste bei einem Aktivator ein Konzentrationsabhängiger Anstieg festzustellen sein.

## Biochemische Charakterisierung von MKK7 Modulatoren

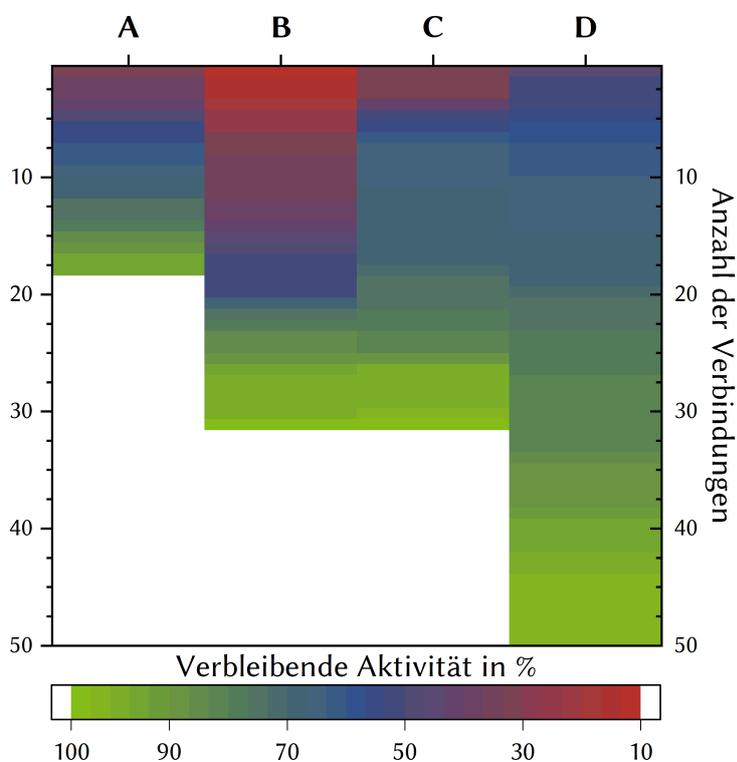
Auf diese Weise wurde eine interne Substanzbibliothek<sup>e</sup> mit etwa 200 Molekülen nach Modulatoren durchsucht (Abschnitt 5.8.3). Die Moleküle wurden dabei in vier Kategorien, **A**: Quinazoline, **B**: Pyrazolopyrimidine, **C**: Indazole und **D**: Andere Verbindungen, eingeteilt (Abbildung 3.42). Eine Übersicht der Verbindungen befindet sich im Anhang (Abschnitt 6.5).



**Abbildung 3.42:** Einteilung der getesteten Verbindungen in 4 Substanzklassen. **A**: Quinazolin-4-amin, **B**: 1-(Piperidin-3-yl)-1H-Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amin, **C**: 1H-indazol-3-amin.

Die erhaltenen Ergebnisse aus dem Screen, wurden auf einen Bereich zwischen Reaktion der Kinase ohne Modulator (100 %) und die Reaktion ohne Kinase (0 %) normiert und im Anschluss in einer Heatmap aufgetragen ( 3.43).

<sup>e</sup>Die Substanzbibliothek bestand aus Molekülen, die in der Arbeitsgruppe von Prof. RAUH, sowie Kooperationspartnern synthetisiert wurden und einigen kommerziell erhältlichen Kinaseinhibitoren

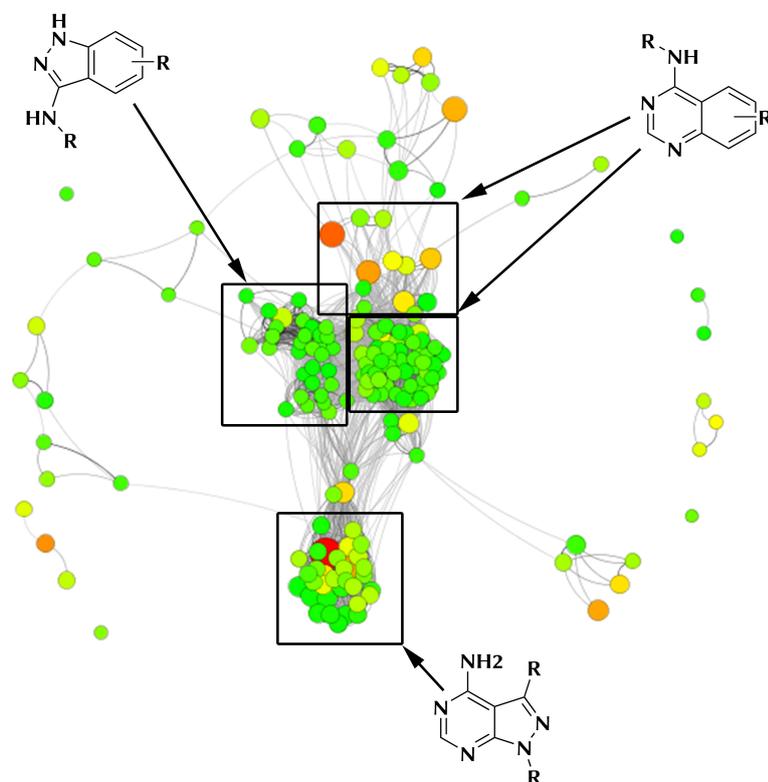


**Abbildung 3.43:** Darstellung der Screening-Ergebnisse in einer Heatmap, eingeteilt in die verschiedenen Klassen der Verbindungen: A: Quinazolin-4-amine (18 Verbindungen), B: 1(Piperidin-3-yl)-1H-Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine (32 Verbindungen), C: Indazole (32 Verbindungen), D: Modulatoren die auf anderen Grundgerüsten beruhen (50 Verbindungen)  $\text{Q}$ . Aufgetragen ist die Prozentuale Restaktivität der Kinase in den verschiedenen Modulator-kategorien.

Die Resultate zeigten, dass die meisten Verbindungen einen eher geringen Einfluss auf die Aktivität der Kinase bei der getesteten Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  hatten. In fast allen Kategorien zeigte sich, dass es nur wenige Verbindungen gab, die bei einer so hohen Testkonzentration überhaupt eine signifikante Inhibition der Kinase hervorbrachten. Hier stach lediglich die Kategorie B (1(Piperidin-3-yl)-1H-Pyrazolo[3,4-d]pyrimidin-4-amine) hervor. Bei dieser Substanzklasse waren fast 50% der Verbindungen in der Lage, eine Restaktivität der Kinase von etwa 35% zu erreichen. Die Häufung von Verbindungen aus dieser Kategorie lässt sich damit erklären, dass das Grundgerüst stark dem des Adenosins im ATP

### *Biochemische Charakterisierung von MKK7 Modulatoren*

ähnelten und diese Klasse zusätzlich über verschiedene MICHAEL-Akzeptoren verfügten, die bereits zuvor gezeigt haben, dass sie in anderen Proteinkinasen an das Strukturäquivalente Cystein (Cys218) binden können. Die geringe Affinität der anderen Gruppen lässt sich daher auch dadurch erklären, dass die Gruppe A einen ähnlichen Bindungsmodus ausbilden würde wie die Gruppe B. Jedoch befindet sich in MKK7 an der Stelle der Türsteheraminosäure ein sterisch anspruchsvolles Methionin. Aus diesem Grund würden Verbindungen die an der Aminogruppe des Quinazolin-4-amin substituiert sind sterisch gehindert, und könnten schlecht oder gar nicht Binden, obwohl sie ebenfalls über MICHAEL-Akzeptoren verfügten. Bei der Klasse C würde sich ein ähnliches Bild zeigen, vorausgesetzt, es würden sich die gleichen Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden. Dann würde das Amin ebenfalls in Richtung der Türsteheraminosäure zeigen. In der Klasse D sind sehr verschiedene Klassen von Verbindungen zusammengefasst. Diese Klassen zeigen jedoch auch die geringste Aktivität gegen die Kinase, was vor allem daran liegt, dass es sich um eher spezielle Liganden für einige Kinase handelte, deren Aufbau zwar ähnlich zu MKK7, aber nicht vollständig gleich war, und viele dieser Verbindungen keinen MICHAEL-Akzeptor trugen. Zur besseren Visualisierung der strukturellen Ähnlichkeiten der Verbindungen wurden diese ebenfalls hinsichtlich ihrer chemischen Struktur gruppiert (Abbildung 3.44).



**Abbildung 3.44:** Darstellung der Verbindungen und ihres Einflusses auf die Aktivität der Kinase, gruppiert nach ihrer strukturellen Ähnlichkeit. Jeder Punkt steht dabei für eine Verbindung, in grün und klein: keine Veränderung der Kinaseaktivität bis rot und groß vollständige Inhibition. Die Linien zeigen an, dass es strukturelle Ähnlichkeiten gibt.

Hier zeigt sich die Einteilung in die Kategorien erneut. Es gibt 3 große Cluster, die den Kategorien A-C entsprechen, und viele anderen Moleküle, die auch teilweise dazwischen liegen, die der Kategorie D zugeordnet sind. Aufgrund der logarithmischen Färbung der Ergebnisse durch die verwendete Software fallen hier lediglich stärkere Inhibitoren auf. Dabei kann man vor allem in der Gruppe der Pyrazolopyrimidine (Unterste Gruppe) sehen, dass sich neben dem potentesten Inhibitor auch mehrere Weitere in dieser Gruppe befinden. Die Ergebnisse ergaben insgesamt, dass die Gruppe der Pyrazolopyrimidine (Gruppe B) die vielversprechendsten Kandidaten aufwies, um diese genauer zu untersuchen.

Es wurde eine Auswahl basierend auf den Ergebnissen im Screen getroffen, bei denen das Grundgerüst aus dem bereits erwähnten Pyrazolopyrimidinen besteht, das Amin dabei nicht substituiert ist, sich an der 1-Position des Pyrazolopyrimidins ein 1-(piperidin-1-yl)prop-2-en-1-on als MICHAEL-Akzeptor befinden sollte, und die 3-Position mit verschiedenen Gruppen substituiert sein sollte. Es wurden dafür 20 Verbindungen ausgewählt, bei denen die genannten Kriterien galten, wobei der MICHAEL-Akzeptor variiert wurde, jedoch immer ein Piperidinring als Spacer verwendet wurde. Dieser sollte den Abstand zu dem Cys218 überbrücken und gleichzeitig den MICHAEL-Akzeptor in die richtige Position für eine Bindung bringen. Diese Verbindungen trugen an der 3-Position unterschiedliche Substitutionen von einem einfachen Wasserstoff, bis zu großen sterisch anspruchsvollen Gruppen. Für diese Verbindungen wurden dann die IC<sub>50</sub>-Werte bestimmt.

### **3.2.5 Validierung der Screening-Hits**

Um die durch das Screening und die folgende Auswertung ausgewählten Verbindungen genauer zu charakterisieren, wurden die IC<sub>50</sub>-Werte für diese gemessen. Da es sich bei dem Screen lediglich um eine Messung bei einer fixen Konzentration handelte, sollte hiermit die genaue biochemische Aktivität der einzelnen Verbindungen gezeigt werden. Dazu wurde der ADP-Glo Kinase-Assay wie in Abschnitt 5.8.3 durchgeführt (Tabelle 3.7).

**Tabelle 3.7:** Bestimmung von IC<sub>50</sub>-Werten in jeweils drei unabhängigen Messungen mit MKK7 Assay-4 für die zuvor ausgewählten Pyrazolopyrimidine.

ID	Struktur	IC <sub>50</sub> in nM	ID	Struktur	IC <sub>50</sub> in nM
1		631 ± 87	11		302 ± 104
2		35 ± 3	12		149 ± 30
3		307 ± 9	13		113 ± 25
4		40 ± 8	14		19 ± 9
5		413 ± 127	15		2611 ± 1503
6		154 ± 23	16		> 10000
7		666 ± 195	17		> 10000
8		159 ± 117	18		> 10000
9		9 ± 3	19		> 10000
10		1572 ± 105	20		> 10000

## *Biochemische Charakterisierung von MKK7 Modulatoren*

Die Resultate zeigen, dass es durchaus Unterschiede in der Aktivität der einzelnen Verbindungen gibt. So zeigen die Verbindungen **2**, **4**, **9** und **14** einen  $IC_{50}$ -Wert von unter 40 nM wohingegen Verbindung **10** und **15** beide einen  $IC_{50}$ -Wert von über 1.000 nM aufwiesen. Die Verbindungen **16-20** zeigten bis zu einer Konzentration von 10.000 nM keine Aktivität. Das Vorhandensein eines MICHAEL-Akzeptors scheint ein notwendiges Strukturelement der Verbindungen zu sein, um eine erfolgreiche biochemische Aktivität ausbilden zu können. Dies war an dem Vergleich zwischen den Verbindungen **1-15** und **16-18** gut zu erkennen. Bei den Verbindungen **16-18** handelt es sich jeweils um reversible Analoga der Verbindungen **5**, **6** und **8**, wobei das Acrylamid jeweils durch ein Propionamid ersetzt wurde. Sobald die Verbindungen nicht mehr in der Lage waren eine dauerhafte kovalente Bindung mit dem Protein einzugehen, verloren sie ihre biochemische Aktivität, was in der Tabelle mit einem Wert von  $\geq 10000$  gekennzeichnet wurde.

Zusätzlich wurde Verbindung (**15**) mit einem 4-(Dimethylamino)but-2-enamid anstelle des Acrylamids getestet, hierbei handelte es sich um einen schwächeren MICHAEL-Akzeptor, da dieser ein besser stabilisiertes Enolat anion bilden kann. Dies sollte zeigen, ob die Stärke des MICHAEL-Akzeptors einen Einfluss auf die Biochemische Aktivität hatte.

Die Aktivität von Verbindung **15**, ist im Vergleich zum Acrylamid 16-fach geringer (Verbindung **8**: 159 nM; Verbindung **15**: 2.611 nM), was durch die unterschiedliche Bindungsrate der kovalenten Bindung, aufgrund der unterschiedlichen Stärke des MICHAEL-Akzeptors erklärt werden könnte. Im Vergleich dazu wies das Propionamid (Verbindung **18**) gar keine Aktivität in dem gemessenen Bereich auf.

Zusätzlich zu den kovalenten und den reversiblen Verbindungen, wurden die zwei kovalent-reversible Inhibitoren **19** und **20** getestet. Hierbei konnte jedoch keine Aktivität in dem gemessenen Bereich festgestellt werden, was entweder an der zu geringen Reaktivität der 2-Cyano-3-cyclopropylacrylamid-Gruppe oder an ihrer sterischen Hinderung im Bereich des Cys218 gelegen haben könnte.

Bei den kovalenten Verbindungen ließ sich feststellen, dass die Substitution in 3-Position eine deutliche Verbesserung der inhibitorischen Aktivität bewirkte. Bevorzugt wurden ebenfalls elektronenreiche Gruppen (aromatische Reste, Iod) wie sie **2** und **4** aufwiesen. Diese beiden Verbindungen haben im Vergleich zu **3**, welche an der 3-Position eine Cyclopropylgruppe trägt, eine etwa 10-fach höhere

Aktivität. Dies könnte auf die hydrophobe Interaktion mit dem Met212 zusammenhängen. Dies wurde bereits für ähnliche Inhibitoren bei EGFR gezeigt, welches durch die Mutation T790M ebenfalls ein Methionin an der homologen Position trägt.<sup>75</sup> Für die phenylierten Inhibitoren **69** konnte im Vergleich zu **5** eine gesteigerte Aktivität durch *para*-Position des Phenylrings mit Wasserstoffbrücken-Donoren oder -Akzeptoren erreicht werden. Dies war ebenso bei Verbindung **14** der Fall, wo der Wasserstoffbrücken-Donor im Fünfring der Azaindol-Gruppe lag. Das ließ sich darauf zurückführen, dass MKK7 in der  $\alpha$ C-Helix ein Aspartat trägt, welches homolog zu dem Glu762 in EGFR ist.<sup>76</sup> Dieses Glutamat ist bei EGFR in der Lage eine Wasserstoffbrücke mit Liganden in der ATP-Bindetasche auszubilden. Daher würde sich ein ähnliches Bindungsverhalten in MKK7 anbieten. Ebenfalls führte das Einbringen von Naphtyl-Gruppen (**12**, **13**) zu einer etwa vierfach höheren Aktivität als bei einer Phenylsubstitution. Verschlechterungen der Aktivitäten traten auf, wenn der Phenylring in *para*-Position mit einer hydrophoben sterisch anspruchsvollen Gruppe substituiert war oder, wie bei Verbindung **10**, eine andere sterisch anspruchsvolle hydrophobe Gruppe eingeführt wurde. Dies sprach ebenfalls dafür, dass die Einbringung eine polaren Gruppe in Form eines Wasserstoffbrücken-Donors/-Akzeptors in die Nähe der  $\alpha$ C-Helix, Interaktionen mit dieser begünstigt, während reine hydrophobe Gruppen hierzu nicht in der Lage waren und darüber hinaus die hydrophilen Interaktionen innerhalb der Bindetasche wahrscheinlich stören könnten. Verbindung **4** wies im Gegensatz zu den anderen Verbindungen noch eine Besonderheit auf. In der 3-Position trug das Molekül eine Alkylgruppe, mit dieser war es möglich, durch „Click-Chemie“ weitere Substitutionsmuster aufzubauen.

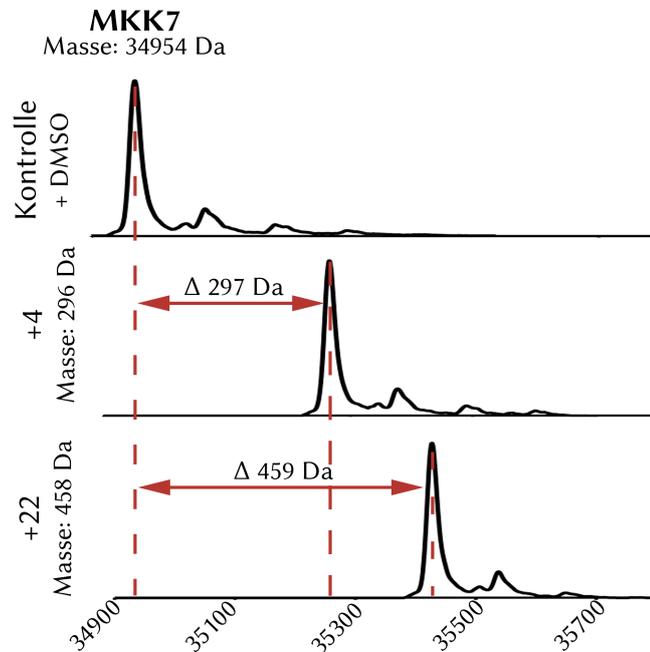
### 3.2.6 Erzeugung neuer Modulatoren mittels Click-Chemie

Durch die Nutzung der „Click-Chemie“ sollte versucht werden den bereits potenten Inhibitor **4** in seiner Aktivität zu steigern.

Um neue Modulatoren zu entwickeln, sollte dabei versucht werden, passende Fragmente zu finden, um die Aktivität von Verbindung **4** zu steigern. Hierfür wurde das Protein zunächst mit Verbindung **4** vorinkubiert. Im Anschluss sollten durch Zugabe von Aziden neue Moleküle erzeugt werden, indem diese in den freien Bereich in der Bindetasche von MKK7 binden und durch die räumliche Nähe eine „Click-Reaktion“ stattfinden sollte. Die Übersicht über diese Bibliothek befindet sich im Anhang (Abschnitt 6.6).

### Biochemische Charakterisierung von MKK7 Modulatoren

Es sollten dabei unterschiedliche Reaktionsbedingungen getestet und der Erfolg der jeweiligen Methode mittels Massenspektrometrie validiert werden (Abbildung 3.45).



**Abbildung 3.45:** Beispielhafte Darstellung der Spektren vor und nach der Inkubation von MKK7 mit der Verbindung **4** und einem Azidfragment. Oben: MKK7 in Gegenwart von DMSO (Negativkontrolle), Mitte: MKK7 in Gegenwart des kovalent-bindenden Alkins **4**; Unten: MKK7 in Gegenwart des Click-Produktes **22**.

Für diese Versuche wurde nicht MKK7 Assay-4 genutzt, da dies keine gute Langzeitstabilität aufwies und die Expression nicht die nötigen Ausbeuten für diese Art der Experimente erbrachte. Stattdessen wurde MKK7 Krist-1 genutzt, welches im Gramm-Maßstab in *E. coli* exprimiert und gereinigt werden konnte.

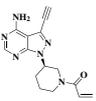
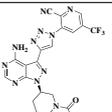
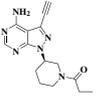
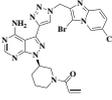
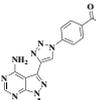
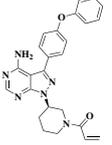
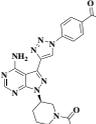
Die Versuche ergaben keine erfolgreich Ausgebildeten Click-Produkte. Wahrscheinlich war es den Verbindungen nicht möglich, nachdem das Alkin bereits gebunden hatte, in die Bindetasche zu gelangen, oder aber die dafür nötige Affinität der kleinen Fragmente hatte nicht ausgereicht, um eine lange Verweildauer in der Bindetasche zu ermöglichen. Auch der Versuch einer Vorinkubation mit den Aziden um so eine Blockade durch das Alkin zu verhindern erbrachte keine

Ergebnisse. Einige der Verbindungen die daraus hätten entstehen können wurden in vorhergegangenen Experimenten bereits erzeugt und sollten im Anschluss auch auf MKK7 getestet werden.

### 3.2.7 Validierung von Clickprodukten von Verbindung 4

Zusätzlich zu den Bereits gemessenen Verbindungen sollten nun noch bereits hergestellte Click-Produkte getestet werden. Zusätzlich dazu wurde das reversible Gegenstück zu Verbindung **4** erzeugt, indem das Acrylamid gegen ein Propionamid ausgetauscht wurde. Da aus den vorhergegangenen Messungen eine hohe Aktivität von Verbindungen mit einem Wasserstoffbrücken-Donor bekannt war, sollte nun der strukturell ähnliche kommerzielle Inhibitor Ibrutinib<sup>f</sup> ebenfalls getestet werden (Tabelle 3.8).

**Tabelle 3.8:** Bestimmung von IC<sub>50</sub>-Werten in jeweils drei unabhängigen Messungen mit MKK7 Assay-4 für die mittels Click-Chemie hergestellten Modulatoren (**22-25**) und der Referenzinhibitor Ibrutinib (**26**).

ID	Struktur	IC <sub>50</sub> in nM	ID	Struktur	IC <sub>50</sub> in nM
4		40 ± 8	24		788 ± 172
21		> 10000	25		669 ± 161
22		10 ± 3	26		78 ± 21
23		> 10000			

Im Vergleich zu der Ausgangsverbindung **4** konnte für das Triazol **22** eine Verbesserung der Aktivität um den Faktor 4 von 40 nM auf 10 nM festgestellt wer-

<sup>f</sup>AbbVie

### *Bestimmung von Kinetikdaten*

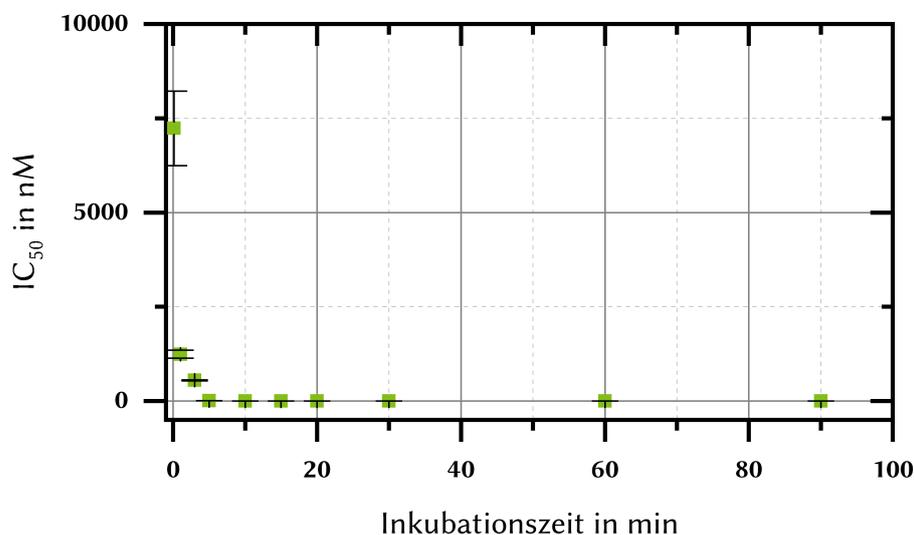
den. Aber auch hier zeigt sich, dass die Aktivität maßgeblich von der Ausbildung der kovalenten Bindung abhing, da die Verbindung **23** bei der das Acrylamid erneut gegen ein Propionamid ausgetauscht wurde, keine inhibitorische Aktivität mehr aufwies. Die Verbindungen **24** und **25** zeigten eine moderate Aktivität, was wahrscheinlich auf die Größe der Azide zurückgeführt werden konnte. Für die Bindung von großen Gruppen wäre eine deutliche Umorientierung der Bindetasche der Kinase nötig, was in einer geringeren Aktivität enden würde.

Da es für MKK7 keine Referenzinhibitoren gab, sollte der kommerzielle Inhibitor Ibrutinib (Verbindung **26**), der eine große strukturelle Ähnlichkeit zu den getesteten Verbindungen aufwies ebenfalls untersucht werden. Dieser weist das gleiche Grundgerüst sowie eine ähnliche Größe auf, und verfügt an der 3-Position über einen Wasserstoffbrücken-Donor in Form eines Ethers und über ein Acrylamid als MICHAEL-Akzeptor. Die Messungen ergaben eine Aktivität von 78 nM was bereits für eine gute Aktivität spricht, jedoch noch um den Faktor 8 schlechter ist, als der Wert von Verbindung **22** mit 10 nM.

Da die Bestimmung des  $IC_{50}$ -Wertes bei der Ausbildung einer kovalenten Bindung keine absolute Aussage über die Potenz des Inhibitors zulässt, sollten die Parameter  $K_i$  und  $K_{inakt}$  mit Hilfe von Kinetikmessungen bestimmt werden.

### **3.3 Bestimmung von Kinetikdaten**

Um eine genaue Aussage über die Potenz von kovalenten Inhibitoren zu erhalten, sollten zusätzlich die beiden kinetischen Parameter  $K_i$  und  $K_{inakt}$  bestimmt werden.<sup>77</sup> Dabei gibt  $K_i$  die reversible Affinität des Inhibitors zu dem Protein an, während  $K_{inakt}$  eine Auskunft über die Knüpfung der kovalenten Bindung gibt. Es war jedoch nicht möglich aus den Messungen Daten für die verschiedenen Liganden zu berechnen. In Abbildung 3.46 ist beispielhaft die Auftragung der  $IC_{50}$ -Werte gegen die Inkubationszeit für Verbindung **22** gezeigt.



**Abbildung 3.46:** Bestimmung der Kinetikparameter  $K_i$  und  $K_{\text{inakt}}$  für Verbindung **22**. Aufgetragen sind die  $IC_{50}$ -Werte in nM gegen die Inkubationszeit in Minuten.

Die Ergebnisse zeigten, dass es zu einer sehr schnellen Bindung kam, was anhand des schnell sinkenden  $IC_{50}$ -Wertes zu erkennen war. Bereits bei 5 Minuten wurde das Minimum des  $IC_{50}$ -Wertes erreicht. Aus diesen Werten sollten mittels der Methode nach STRELOW die entsprechenden Kinetikparameter bestimmt werden.<sup>78</sup> Jedoch war es aufgrund der schnellen Messung nicht möglich verlässliche Parameter für die Kinetikparameter zu erhalten.

Qualitativ konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich um eine sehr schnelle kovalente Bindungsknüpfung handelt und bereits nach etwa 5 min das Minimum der biochemische Aktivität erreicht wurde. Dies spricht entweder für eine sehr hohe Affinität des Liganden zu der Bindetasche, oder aber für eine sehr schnelle kovalente Bindungsknüpfung und der damit verbundenen permanenten Blockade der Bindetasche. Ausgehend von den Ergebnissen des reversiblen Inhibitors kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um die schnelle Knüpfung der kovalenten Bindung handelt. Würde es sich um die hohe Affinität des Liganden zu der Bindetasche handeln, so müsste auch der reversible Inhibitor zumindest über eine erhöhte Aktivität verfügen.

### *Massenspektrometrische Untersuchungen*

Um im weiteren die Hypothese der kovalenten Bindungsknüpfung zu bestätigen, sollten mit Hilfe von Massenspektrometrischen Untersuchungen gezeigt werden, ob diese Bindung tatsächlich ausgebildet wurde.

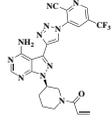
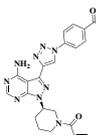
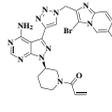
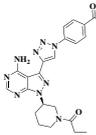
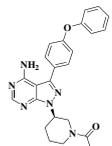
### **3.4 Massenspektrometrische Untersuchungen**

Die Ergebnisse der biochemischen Analysen ließen die Vermutung zu, dass es zu der Knüpfung einer kovalenten Bindung zwischen den Inhibitoren mit einem MICHAEL-Akzeptor und dem Cys218 kam. Gestützt wurde diese Hypothese dadurch, dass die Verbindungen ohne MICHAEL-Akzeptor im gemessenen Bereich keine biochemische Aktivität aufwiesen. Deswegen wurde neben der biochemischen Analyse die Ausbildung der kovalenten Bindung der Liganden ebenfalls durch Massenspektrometrische Untersuchungen validiert (Tabellen 3.9 und 3.10).

**Tabelle 3.9:** Bestimmung der kovalenten Bindungsweise für die zuvor im Screening gefundenen Pyrazolopyrimidine.

ID	Struktur	Kovalent	ID	Struktur	Kovalent
1		Ja	11		Ja
2		Ja	12		Ja
3		Ja	13		Ja
4		Ja	14		Ja
5		Ja	15		Teilweise
6		Ja	16		Nein
7		Ja	17		Nein
8		Ja	18		Nein
9		Ja	19		Teilweise
10		Teilweise	20		Nein

**Tabelle 3.10:** Bestimmung der kovalenten Bindung der Click-Verbindungen.

ID	Struktur	Kovalent	ID	Struktur	Kovalent
21		Nein	24		Ja
22		Ja	25		Ja
23		Nein	26		Ja

Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass für alle Verbindungen, die über ein Acrylamid verfügen, eine kovalente Bindung ausgebildet wurde. Dabei wurde von einer vollständigen Bindungsknüpfung ausgegangen wenn keine Masse des nicht modifizierten Proteins messbar war. Einzige Ausnahme stellte hierbei die Verbindung **10** dar, hier war zwar eine kovalente Modifikation beobachtet worden, jedoch konnte in etwa der gleichen Intensität auch die Masse des nicht modifizierten Proteins gemessen werden. Da es sich um den gleichen MICHAEL-Akzeptor wie bei den anderen Verbindungen handelte, lag dies wahrscheinlich an der sterischen Hinderung des Liganden, welcher dadurch möglicherweise nicht in der Lage war, eine für die kovalente Bindungsknüpfung günstige Orientierung in der Kinase einzunehmen.

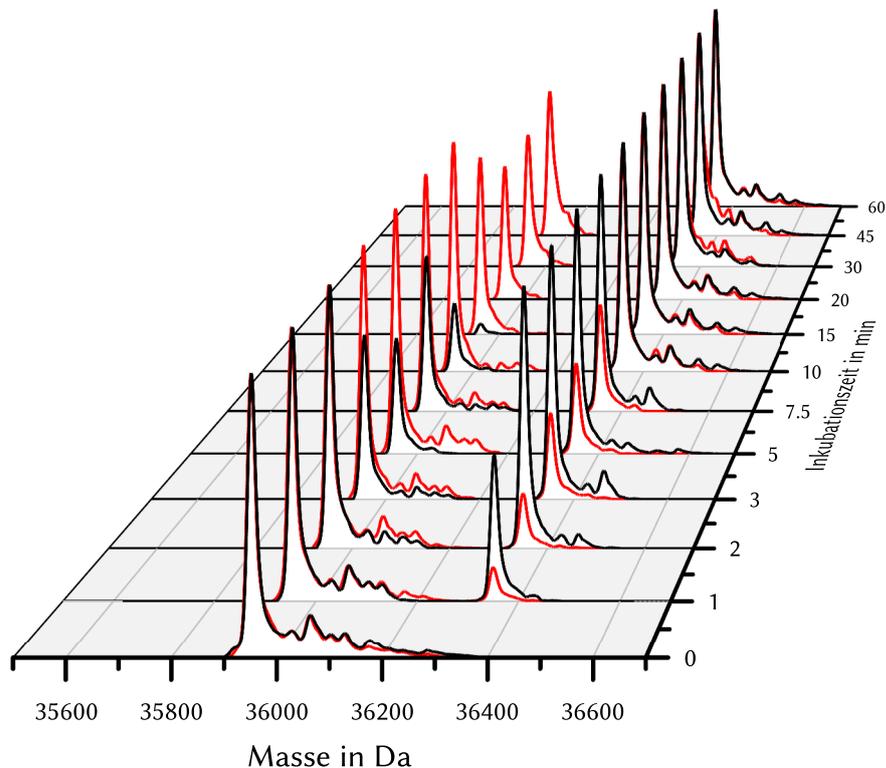
Ebenfalls zu einer teilweisen Modifikation des Proteins kam es bei den Verbindungen **15** und **19**. Bei **15** handelte es sich um das Äquivalent zu **8** wobei das Acrylamid gegen ein 4-(Dimethylamino)but-2-Enamid ausgetauscht wurde und bei **19** gegen ein 2-Cyano-3-Cyclopropylacrylamid. Beide Moleküle zeigten bereits in den biochemischen Analysen eine geringere Aktivität, wofür das nicht vollständige Binden an das Protein eine mögliche Erklärung darstellen könnte, da wie bereits zuvor vermutet die Knüpfung der kovalenten Bindung eine wichtige Voraussetzung für biochemische Aktivität darstellt. Die geringere Bindungsknüpfung könnte hierbei an den modifizierten MICHAEL-Akzeptoren gelegen haben, da diese deutlich weniger reaktiv als das Acrylamid sind.

Für die reversiblen Varianten der Inhibitoren, bei denen das Acrylamid gegen ein Propionamid ausgetauscht wurde, zeigte sich erwartungsgemäß keine Modifikation.

Aufgrund der Bedeutung der kovalenten Bindungsknüpfung für die Aktivität sollte ebenfalls untersucht werden, wie stark der Einfluss der Anwesenheit von ATP auf die Ausbildung der kovalenten Bindungsknüpfung ist.

#### **3.4.1 Bestimmung des Einflusses von ATP auf die Ausbildung der kovalenten Bindung**

Da bereits bei der Messung der Kinetikdaten aufgefallen war, dass einige Zeit für die Bindung des Liganden an das Protein benötigt wird, sollte der Einfluss des ATPs auf diese Bindung untersucht werden. Dazu wurden mehrere Massenspektren von MKK7 nach Inkubation mit Verbindung **2** in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von 250 mM ATP aufgenommen (Abbildung 3.47).



**Abbildung 3.47:** Massenspektren von MKK7 mit Verbindung **2** zu unterschiedlichen Zeitpunkten, normiert auf das Maximum der Messung des Apo-Proteins. Schwarz: in Abwesenheit von ATP, rot: in Anwesenheit von ATP.

Zum Zeitpunkt  $t = 0$  min wurde bei beiden Ansätzen (mit und ohne ATP) keinerlei kovalente Bindung beobachtet. Mit zunehmender Zeit von 0 min bis 60 min stieg bei beiden Ansätzen der Anteil der kovalenten Bindungsknüpfung von 0% auf 100%. Während bei der Kombination aus Kinase und Inhibitor bereits nach 15 min etwa eine vollständige Umsetzung zu erkennen war, dauerte dies bei der Zugabe von ATP etwa viermal so lange. Hierbei war ebenso ein deutlich langsamerer Anstieg zu erkennen. Während ohne Zugabe von ATP bereits nach 2 min eine Bindungsknüpfung von etwa 50% erreicht wurde, war dies bei Zugabe von ATP erst nach etwa 10 min der Fall.

Die lässt darauf schließen, dass es wie erwartet eine Konkurrenz zwischen dem ATP und dem Liganden gab, da beide um die gleiche Bindetasche konkurrieren.

Jedoch ließ sich dadurch auch eine deutlich höhere Affinität des Liganden zu der Kinase vermuten, da trotz der fast 2.800 fach höheren Konzentration des ATPs im Gegensatz zu dem Liganden, es trotzdem nach 60 min zu einer vollständigen Modifikation des Proteins kam. Aus den Experimenten konnten auch die Inkubationszeiten für die Kristallisation des Proteins mit den getesteten Verbindungen übernommen werden.

### 3.5 Kristallisation

Neben der biochemischen Charakterisierung war vor allem die strukturelle Evaluierung der Verbindungen ein Ziel dieser Arbeit. Dazu sollte MKK7 kristallisiert werden, um die Bindungsmodi der zuvor mit biochemischen Methoden gefundenen Modulatoren aufzuklären.

#### 3.5.1 Kristallisation von MKK7

##### 3.5.1.1 Screen nach neuen Kristallisationsbedingungen

Da Versuche mit bereits bekannten Kristallisationsbedingungen in vorhergegangenen Arbeiten nicht erfolgreich waren, sollte zunächst nach neuen Kristallisationsbedingungen gesucht werden. Dazu wurden insgesamt 9216 verschiedene Kristallisationsbedingungen für jedes der vier Kristallisationskonstrukte getestet. Es zeigte sich, dass neben der Kristallisationsbedingung mit Dinatriumhydrogenphosphat (0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 % PEG3350), vor allem Kristallisationsbedingungen, die Citratsalze enthielten, erfolgreich zum Kristallwachstum führten (Tabelle 3.11).

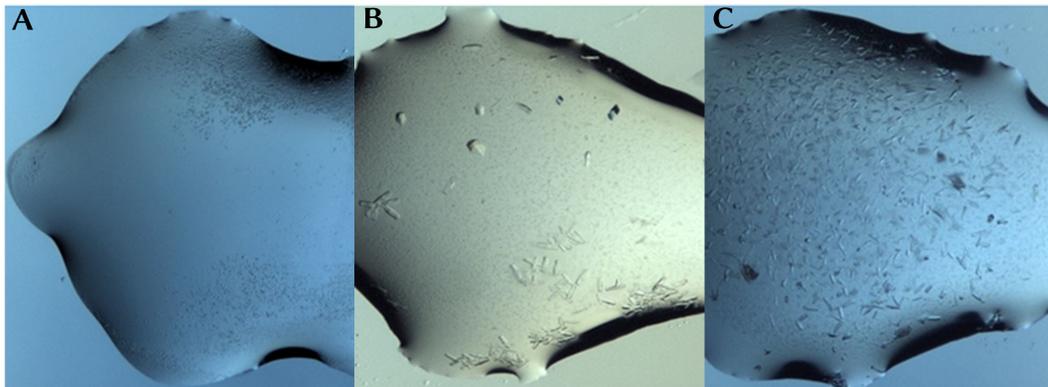
**Tabelle 3.11:** Erfolgreiche Kristallisationsbedingungen für MKK7 basierend auf Citratsalzen.

Salz	Fällungsmittel	Temperatur in °C
0,2 M Lithiumcitrat	20 % PEG3350	4
0,2 M Natriumcitrat	20 % PEG3350	4
0,2 M Natriumcitrat	20 % PEG3350	20
0,2 M Kaliumcitrat	20 % PEG3350	4

Dabei fällt auf, dass eine Kristallisation vor allem bei 4 °C stattfand.

## Kristallisation

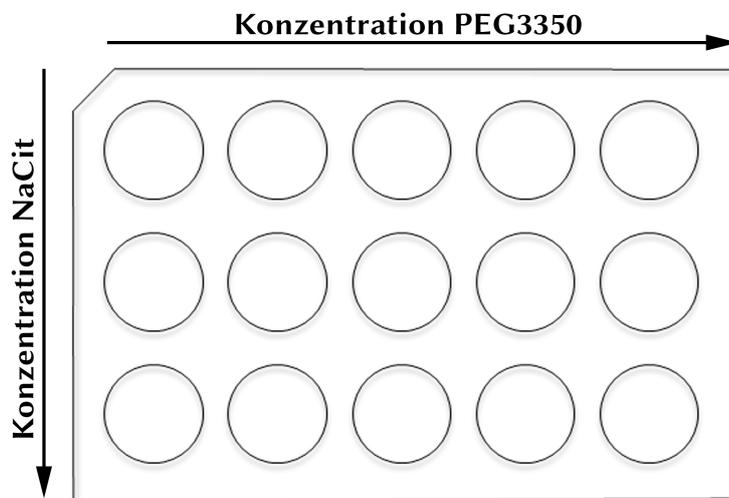
Lediglich die Bedingung mit Natriumcitrat führte auch zu einer Kristallisation bei 20 °C. Bezogen auf die Proteinkonzentration, konnte gezeigt werden, dass  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  als die Konzentration hervorging, die für ein Beugungsexperiment morphologisch am besten geeigneten Kristalle generierte. Diese Kristalle waren vergleichsweise größer als unter anderen Bedingungen. Während bei  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  wenige kleine Kristalle gebildet wurden, wurden bei  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  zu viele kleine einzelne Kristalle gebildet, bei denen es nur schwer möglich ist, einen einzelnen Kristall für ein Beugungsexperiment zu entnehmen (Abbildung 3.48).



**Abbildung 3.48:** Beispiele für Kristalle, die während der Durchführung des Screenings entstanden sind. Bei den verschiedenen Bedingungen handelt es sich jeweils um 0,2 M eines Citrat-Salzes mit 20% PEG3350 bei 4 °C. **A:** Lithiumcitrat, **B:** Natriumcitrat und **C:** Kaliumcitrat.

### 3.5.2 Feindurchmusterung

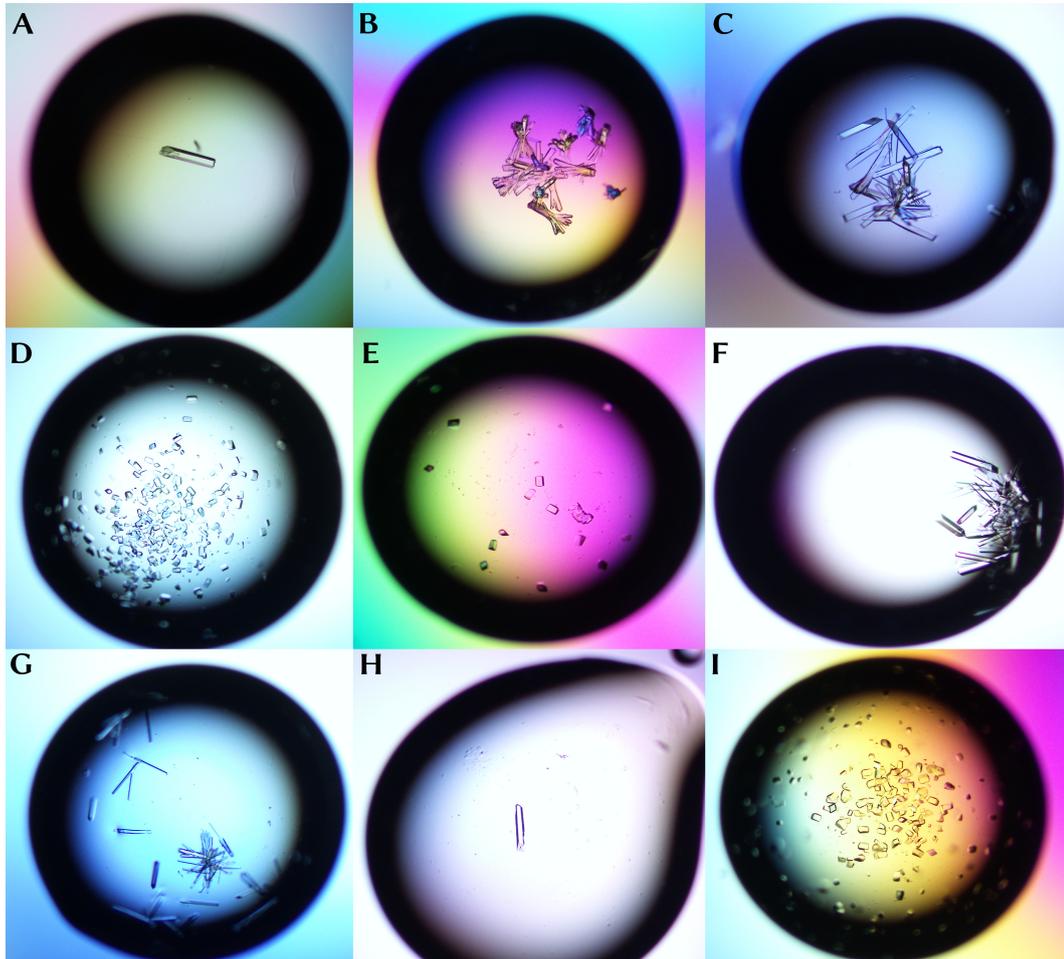
Nach dem erfolgreichen Auffinden von Kristallisationsbedingungen sollte die am besten geeignete Bedingung (0,2 M Natriumcitrat, 20% PEG3350, 4 °C) in einer Feindurchmusterung eingesetzt werden. Dazu werden die Kristallisationslösungen in einer 15-Well-Platte in ihrer Zusammensetzung variiert (Abbildung 3.49).



**Abbildung 3.49:** Schematische Darstellung der Variationsmatrix für die Durchführung einer Feindurchmusterung basierend auf den besten gefundenen Bedingungen aus dem Kristallisationsscreen.

Neben dem Apo-Protein sollte hierbei vor allem MKK7 im Komplex mit den verschiedenen zuvor identifizierten Inhibitoren zu ko-kristallisiert werden, um so die Struktur des Komplexes und den Bindungsmodus der Inhibitoren aufzuklären. Als besonders erfolgreich stellte sich bei den Kristallisationsversuchen dabei der Konzentrationsbereich bei niedrigen Citrat- und hohen PEG-Konzentrationen heraus. Dieser Trend zeigte sich sowohl für das Apo-Protein als auch für die Ko-Kristallisationsversuche. Die Versuche führten zu einer Reihe von Kristallen aus Ansätzen mit verschiedenen Inhibitoren (Abbildung 3.50).

## Kristallisation



**Abbildung 3.50:** Beispielhafte Ergebnisse der durchgeführten Feindurchmusterung mit MKK7-Kristl. Alle Erhaltenen Kristalle wurden bei 4°C angesetzt. A: MKK7 Apo (0,18 M NaCit, 22% PEG3350), B: MKK7 mit Verbindung **1** (0,22 M NaCit, 24% PEG3350), C: MKK7 mit Verbindung **29** (0,18 M NaCit, 22% PEG3350), D: MKK7 mit Verbindung **2** (0,20 M NaCit, 22% PEG3350), E: MKK7 mit Verbindung **4** (0,18 M NaCit, 24% PEG3350), F: MKK7 mit Verbindung **9** (0,20 M NaCit, 20% PEG3350), G: MKK7 mit Verbindung **12** (0,18 M NaCit, 22% PEG3350), H: MKK7 mit Verbindung **14** (0,18 M NaCit, 24% PEG3350), I: MKK7 mit Verbindung **22** (0,18 M NaCit, 22% PEG3350)

Gut zu erkennen war die deutliche Verbesserung der Kristallqualität im Vergleich zu den Kristallen aus dem initialen Screen. Während im Screen vor allem viele kleine Kristalle wuchsen, zeigten sich hier bei vielen der Bedingungen längliche, zylindrische (Abbildung 3.50-A) oder kleinere aber ebenso zylindrische Kristalle (Abbildung 3.50-D). Besonders bei höheren Salzkonzentrationen kam es auch zu verwachsenen Kristallen (Abbildung 3.50-B). Für die Verbindung **29** konnten jedoch keine nicht verwachsenen Kristalle erhalten werden. Insgesamt zeigten sich aber vor allem große und nicht verwachsene Kristalle, welche eine gute Voraussetzung für das Fischen und Vermessen der Kristalle war, da aufgrund ihrer Größe und der zylindrischen Form eine günstige Ausrichtung im Röntgenstrahl gewährleistet werden konnte

## **3.6 Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen**

Um die Interaktionen zwischen MKK7 und potentiellen Liganden neben Struktur-Wirkungs-Beziehungen und im Rahmen von Massenexperimenten zu beschreiben, sollte die Wechselwirkung ebenfalls auf molekularer Ebene mittels Proteinkristallographie untersucht werden. Dafür sollte die Struktur von MKK7 sowohl in der Apo-Form als auch im Komplex mit den niedermolekularen Substanzen gelöst werden. In den nachfolgenden Abschnitten sind immer die Strukturen mit den besten Strukturparametern der jeweiligen Kombination aus MKK7 mit und ohne Verbindung gezeigt, obwohl mehrere Datensätze für einzelne Verbindungen aufgenommen wurden.

### **3.6.1 MKK7 Apo Strukturen**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Apo-Struktur der Kinase in ihrer aktiven Konformation gelöst werden, welche zu diesem Zeitpunkt lediglich mit den Aktivierungsmutationen S271D und T275D oder mit anderen Mutationen kristallisiert wurden.<sup>79-82</sup> Neben der aktiven Konformation gelang es zudem die erste Struktur von Apo-MKK7 in der inaktiven Konformation zu lösen.

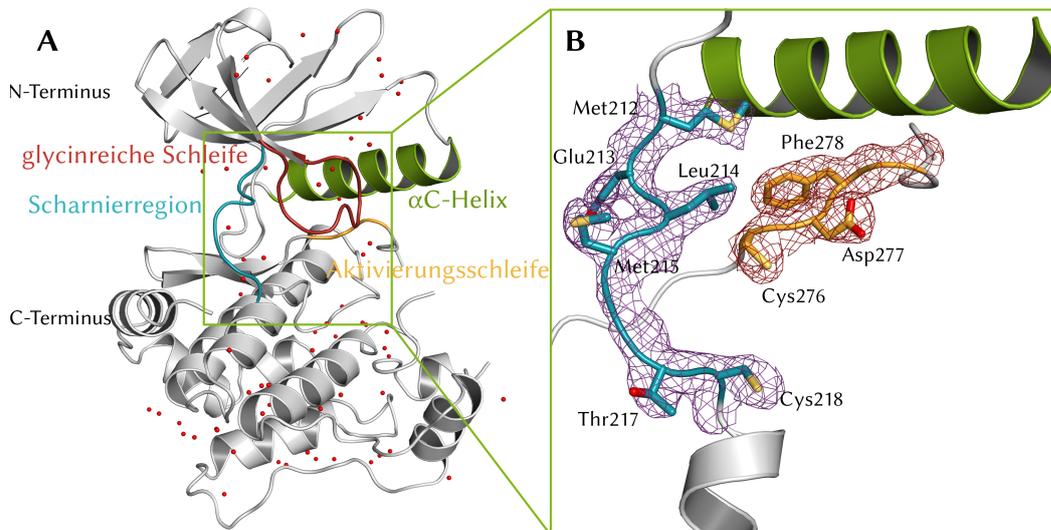
### 3.6.1.1 Aktive MKK7-Apo-Struktur

Zuerst wurde die Struktur von Apo-MKK7 gelöst. Die sich aus der Kristallisation ergebenden Kristalle wiesen eine Größe von etwa 50-100  $\mu\text{m}$  (Abschnitt 3.5.1), sowie eine charakteristische Streuung der Reflexe im Diffraktionsexperiment auf (Tabelle 3.12).

**Tabelle 3.12:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von Apo-MKK7; Die vollständigen kristallografischen Statistiken befinden sich im Anhang in Abschnitt 6.7.

Parameter	Resultat
<b>Datensatz</b>	
Auflösung in Å	46,1-2,2 (2,3-2,2)
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter	
a, b, c in Å	62,0, 68,8, 85,3
$\alpha, \beta, \gamma$ in °	90,0, 90,0, 90,0
R <sub>mean</sub> in %	6,7 (40,2)
I/ $\sigma$ I	17,1 (3,5)
Vollständigkeit in%	92,8 (81,8)
Redundanz	5,9 (5,9)
<b>Verfeinerung</b>	
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> in %	22,0 / 25,0
r.m.s Bindungslängen in Å	0,001
r.m.s Bindungswinkel in °	0,403
Ramachandran-Plot Ausreißer in %	0,0

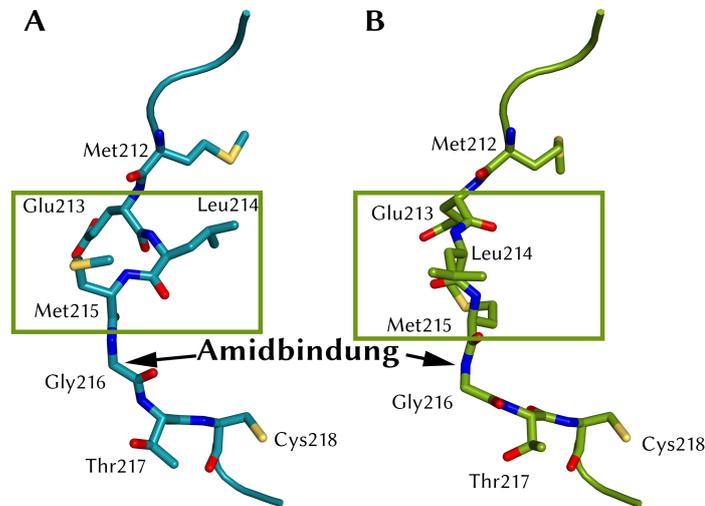
Die Kinase befindet sich in der resultierenden Struktur in der aktiven Konformation, was anhand des DFG-Motivs festgestellt werden konnte, wobei die Seitenkette des Phenylalanins in den hinteren Teil der ATP-Bindetasche ragt. Im Gegensatz zu vorher bekannten Strukturen, wurde bei dieser auch die glycinreiche Schleife vollständig aufgelöst (Abbildung 3.51).



**Abbildung 3.51:** Darstellung der dreidimensionalen Struktur der aktiven Konformation von Apo-MKK7. A: Übersicht über die Proteinkinase-Domäne von MKK7. B: Detaillierte Ansicht der ATP-Bindetasche der aktiven Konformation von Apo-MKK7 mit dargestellter Elektronendichte der Scharnierregion ( $2F_{\text{O}}F_{\text{C}}$ -Karte bei  $1\sigma$ ) und des DFG-Motivs ( $2F_{\text{O}}F_{\text{C}}$ -Karte bei  $1\sigma$ ).

Die Struktur zeigt den charakteristischen Aufbau einer Kinase-Domäne mit der Einteilung in  $\beta$ -Faltblatt reichen N-Terminus und  $\alpha$ -Helix reichen C-Terminus. Am Ende der Scharnierregion sowie vor dem DFG-Motiv fanden sich die zwei Lösemittel-exponierten Cystein 218 und 276, welche beide keine sterische Hinderung erfuhren und aus diesem Grund frei für eine mögliche Bindung gewesen wären.

Im Vergleich zu den bisherigen Strukturen fiel bei dieser Struktur und auch allen anderen gelösten Strukturen von Apo-MKK7 in der aktiven Konformation auf, dass das Leu214 eine abweichende Orientierung in der Bindetasche einnahm. Vergleicht man diese Konformation mit der von bereits publizierten Strukturen (Abbildung 3.52), so fällt auf, dass es sich hierbei um eine Rotation, nicht nur des Leu214 sondern auch des Met215 handelte und somit wahrscheinlich um eine Art semi-aktive Konformation. Durch diese Konformation wäre es theoretisch nicht möglich, dass die Kinase ATP binden könnte, da das Leu214 eine sterische Hinderung hervorrufen würde.

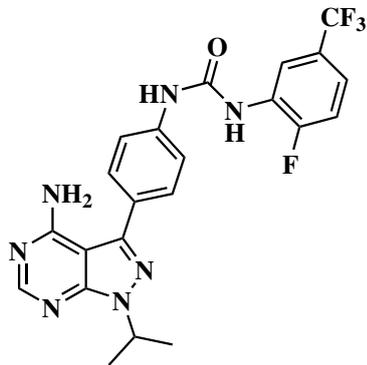


**Abbildung 3.52:** Scharnierregion von MKK7 mit Seitenketten. A: gelöste Struktur von Apo-MKK7. B: Struktur aus der PDB (2dyl).

Deutlich war der Flip der Amid-Bindung zwischen Met215 und Gly216 zu erkennen. Dabei war die gesamte Bindung um  $180^\circ$  gedreht, wodurch die Konformationsänderung in Bezug auf die bisherigen Strukturen hervorgerufen wurde. Aus der Struktur ließ sich keine Begründung für einen Wechsel der Konformation zu dem in die ATP-Bindetasche gedrehten Leu214 finden. Die Vergleichsstruktur 2dyl trägt, im Gegensatz zu dem hier verwendeten Kristallisationskonstrukt, jedoch Aktivierungsmutationen (S271D und T275D). Möglicherweise wurde die Konformationelle Änderung, hin zu dem Leu214 in der Bindetasche, durch die Einführung der beiden Mutationen verhindert.

### 3.6.1.2 MKK7 Apo Struktur dfg-out

Aufgrund von Versuchen im Arbeitskreis, die Verbindung AD80 (Abbildung 3.53) im Komplex mit einer Proteinkinase zu kristallisieren, wurde versucht dieses Molekül, welches für die Rezeptor-Tyrosinkinase RET entwickelt wurde in MKK7 als Modellsystem zu kristallisieren. MKK7 bot sich dafür an, da durch die gefundenen Kristallisationsbedingungen ein robustes Kristallisationssystem geschaffen werden konnte, das verlässliche und reproduzierbare Daten generieren konnte.



**29**

**Abbildung 3.53:** Chemische Struktur des c-RET Inhibitors AD80 (Verbindung **29**).

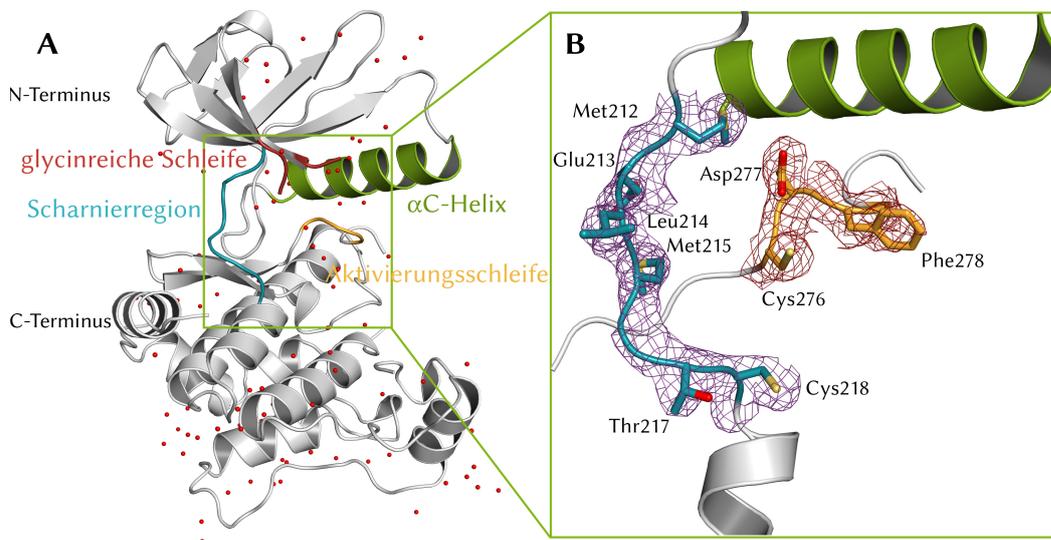
AD80 basiert ebenfalls auf einem Pyrazolopyrimidin Grundgerüst, und wies an einem in 3-Position substituierten Phenylring in para-Position ein sekundäres Amin auf, mit dem eine Interaktion mit dem Asp182 in MKK7 möglich gewesen wäre. Die Kristallisationsversuche ergaben, gut messbare aber an ihrer Basis verwachsene, Kristalle und es konnte die Struktur jedoch ohne gebundenen Liganden gelöst werden 3.13.

*Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen*

**Tabelle 3.13:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von Apo-MKK7 DFG-out; Die vollständigen kristallographischen Statistiken befinden sich im Anhang in Abschnitt 6.7.

Parameter	Resultat
<b>Datensatz</b>	
Auflösung in Å	45,8-2,3 (2,4-2,3)
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter	
a, b, c in Å	61,3, 68,8, 84,7
$\alpha, \beta, \gamma$ in °	90,0, 90,0, 90,0
R <sub>mean</sub> in %	5,7 (74,9)
I/ $\sigma$ I	29,7 (5,0)
Vollständigkeit in%	99,8 (99,1)
Redundanz	12,2 (11,2)
<b>Verfeinerung</b>	
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> in %	22,0 / 26,0
r.m.s Bindungslängen in Å	0,001
r.m.s Bindungswinkel in °	0,339
Ramachandran-Plot Ausreißer in %	0,0

Die Daten der Struktur lagen in einem guten Bereich und mit einer Auflösung von 2,3Å war eine genaue Untersuchung der Struktur der Kinase möglich (Abbildung 3.54)



**Abbildung 3.54:** Darstellung der dreidimensionalen Struktur der inaktiven Konformation von MKK7-Apo. A: Übersicht über die Proteinkinase-Domäne von MKK7. B: Detaillierte Ansicht der ATP-Bindetasche der inaktiven Konformation von MKK7-Apo mit dargestellter Elektronendichte der Scharnierregion ( $2F_{\text{O}}/F_{\text{C}}$ -Karte bei  $1 \sigma$ ) und des DFG-Motivs ( $2F_{\text{O}}/F_{\text{C}}$ -Karte bei  $1 \sigma$ ).

Die Struktur zeigt keinen gebundenen Liganden in der Bindetasche, was wahrscheinlich daran lag, dass dieser Ligand keine kovalente Bindung aufbauen konnte, da er nicht über den nötigen MICHAEL-Akzeptor verfügte. Im Gegensatz zu der Struktur die ohne Zugabe von Liganden kristallisiert wurde, ließen sich aber vor allem zwei Unterschiede feststellen. Zum einen war das Leu214 nicht in die ATP-Bindetasche gedreht, sondern hat die gleiche Konformation eingenommen, wie bereits in den zuvor publizierten Strukturen. Des Weiteren gab es eine Veränderung des DFG-Motivs. Hier kam es zu einer Drehung des Asp277 und des Phe278, wobei das Phe278 aus der ATP-Bindetasche heraus- und das Asp277 herein gedreht wurde. Dies zeigte das erste mal eine DFG-out-Konformation bei MKK7.

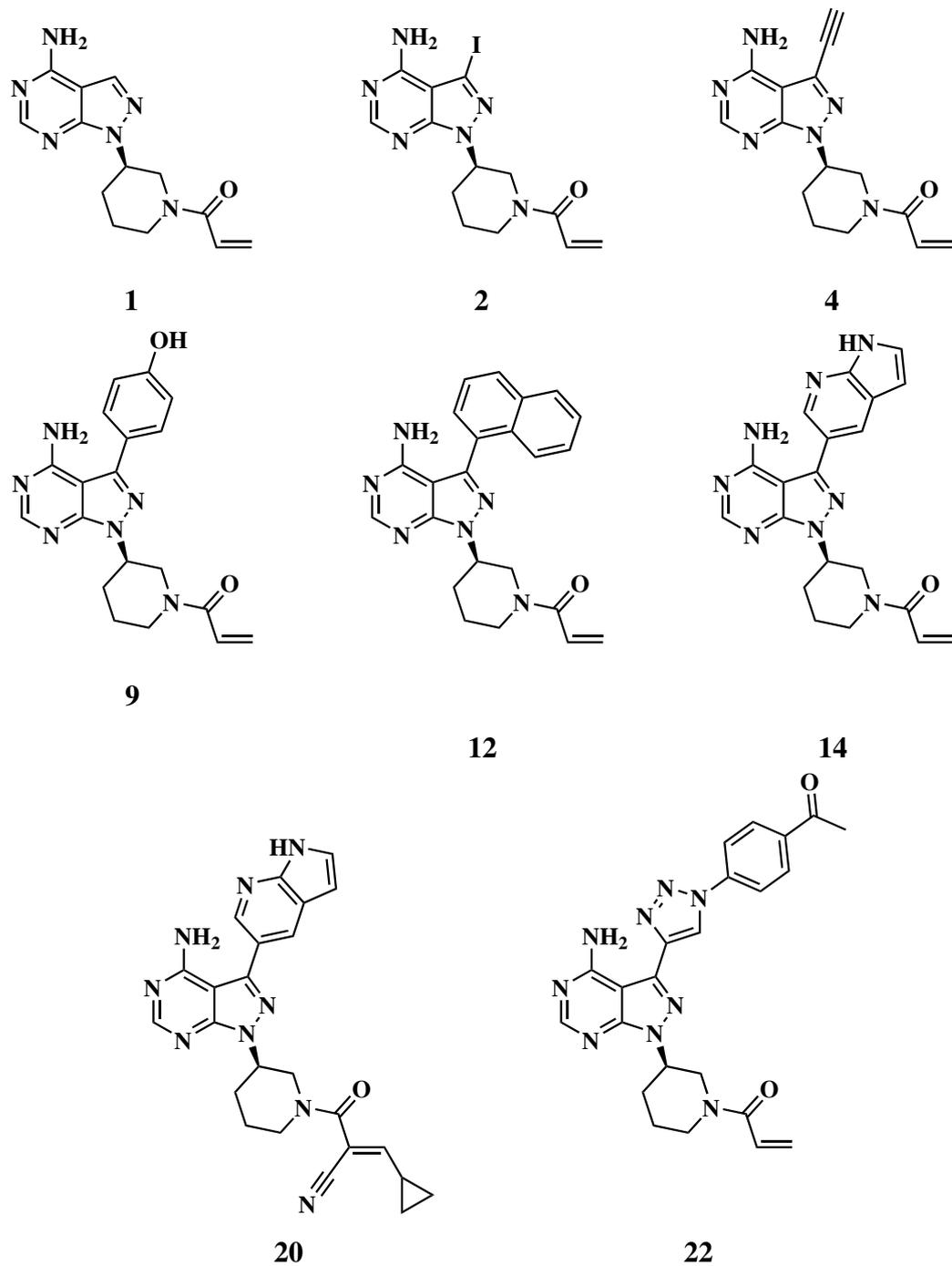
Eine mögliche Ursache dieser Konformationsänderung war die Interaktion mit dem Liganden AD80. Eine nachträgliche biochemische Aktivitätsbestimmung ergab jedoch keine messbare Inhibitorische Funktion des Liganden, was wahrscheinlich an der fehlenden Möglichkeit zur Ausbildung einer kovalenten Bindung lag.

### *Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen*

Jedoch war eine Interaktion mit der Kinase durchaus denkbar, da während der Kristallisation und der Inkubation mit dem Liganden kein ATP vorhanden war, das mit dem Liganden konkurrieren konnte, woraus sich die Möglichkeit einer schwachen Interaktion ergab. Anhand der Struktur von AD80 ist ersichtlich, dass bei einer Bindung in die ATP-Bindetasche eine Umorientierung des DFG-Motivs nötig wäre um genügend Platz für eine Bindung aufzubauen. Molekül Dynamik (MD)-Simulationen von RET mit AD80 hatten gezeigt, dass die Einnahme der DFG-out Konformation für die Bindung ein nötiges Kriterium darstellt.<sup>83</sup> Aus diesem Grund konnte die Hypothese aufgestellt werden, dass die Interaktion von AD80 mit MKK7 zu der DFG-out Konformation geführt hatte. Neben AD80 sollten aber vor allem Komplexe von MKK7 mit den zuvor biochemisch und in den massenspektrometrischen Untersuchungen gefundenen Liganden kristallisiert und gelöst werden.

#### **3.6.2 Beschreibung der MKK7-Komplexstrukturen**

Das Ziel dieser Arbeit war vorrangig das auffinden neuer Modulatoren für MKK7, sowie deren biochemische und strukturbiologische Evaluierung. Im folgenden wurden die im biochemischen Assay gefundenen Modulatoren (Abbildung 3.55) auf ihren Bindungsmodus und ihre Interaktionen mit der Kinase hin untersucht.



**Abbildung 3.55:** Übersicht über die erfolgreich ko-kristallisierten Modulatoren aus den biochemischen Analysen von MKK7.

## 3.6.2.1 MKK7 im Komplex mit Verbindung 1

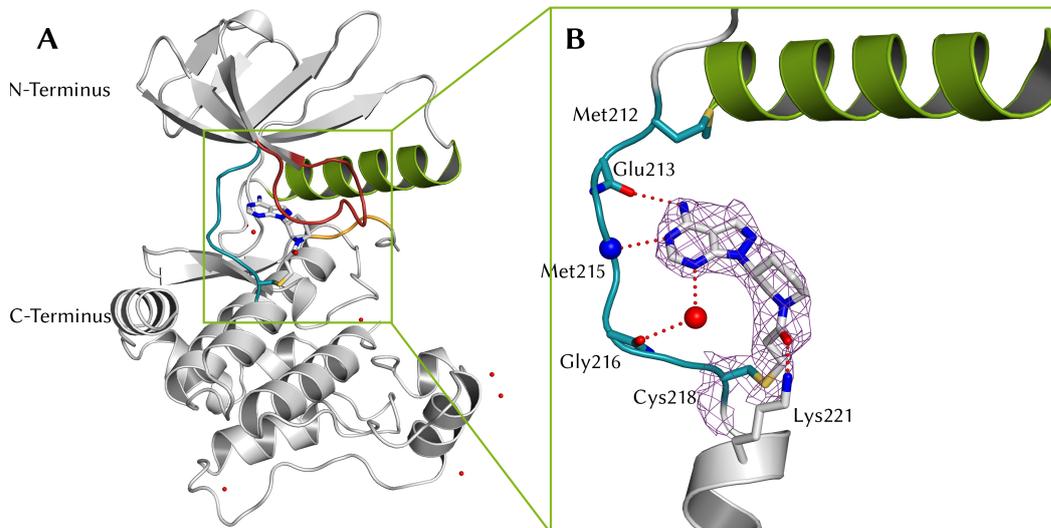
Die Verbindung **1** trug an Position 3 keine Substitution, jedoch trug diese Verbindung, wie alle weiteren Verbindungen die Kristallisiert wurden, einen MICHAEL-Akzeptor. Das Acrylamid war hier in Form eines 1-(Piperidin-1-yl)Prop-2-en-1-on an der 1 Position des Pyrazolopyrimidin-Grundgerüsts substituiert.

**Tabelle 3.14:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **1**; Die vollständigen kristallographischen Statistiken befinden sich im Anhang in Abschnitt 6.7.

Parameter	Resultat
<b>Datensatz</b>	
Auflösung in Å	49,4-2,7 (2.8-2.7)
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter	
a, b, c in Å	60,5, 67,9, 85,5
$\alpha, \beta, \gamma$ in°	90,0, 90,0, 90,0
R <sub>mean</sub> in %	7,9 (91,2)
I/ $\sigma$ I	21,8 (2,5)
Vollständigkeit in%	99,4 (99,9)
Redundanz	12,1 (10,2)
<b>Verfeinerung</b>	
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> in %	0,22 / 0,28
r.m.s Bindungslängen in Å	0,004
r.m.s Bindungswinkel in °	0,748
Ramachandran-Plot Ausreißer in %	0

Aus den gewonnenen Daten konnte im folgenden die Komplex-Struktur von MKK7 mit Verbindung **1** gelöst werden (Abbildung 3.56).

Die Struktur der Kinase war bis auf einen Teil der Aktivierungsschleife vollständig aufgelöst und befand sich in der aktiven DFG-in Konformation. Ähnlich wie ein ATP-Molekül, hat auch die Verbindung **1** in die Bindetasche der Kinase gebunden. Das freie Amin an Position 4 bildete eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Carbonylsauerstoff des Glu213 und das tertiäre Amin an Position 5 eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Amidstickstoff des Met215. Ebenso konnte die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zu einem Wassermolekül über das tertiäre Amin an Position 7 beobachtet werden, wodurch eine verbrückte Verbindung zu dem Carbonylsauerstoff von Gly216 entstanden ist. Durch den Car-



**Abbildung 3.56:** Darstellung der dreidimensionalen Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **1**, und den wichtigsten Strukturmotiven. A: Übersicht über die Proteinkinase-Domäne von MKK7. B: Detaillierte Ansicht der ATP-Bindetasche von MKK7 im Komplex mit Verbindung **1** mit dargestellter Elektronendichte des Liganden ( $2F_{\text{O}}F_{\text{C}}$ -Karte bei  $1\sigma$ ), und den Wasserstoffbrückenbindungen und einem Wassermolekül.

bonylsauerstoff des Acrylamids wurde eine weitere Wasserstoffbrückenbindung zu dem primären Amin in der Seitenkette des Lys221 ausgebildet. Neben den Wasserstoffbrückenbindungen ist durch die eindeutig definierte Elektronendichte die kovalente Bindung zu der Seitenkette von Cys218 zu erkennen, welche den Liganden in der Bindetasche verankert.

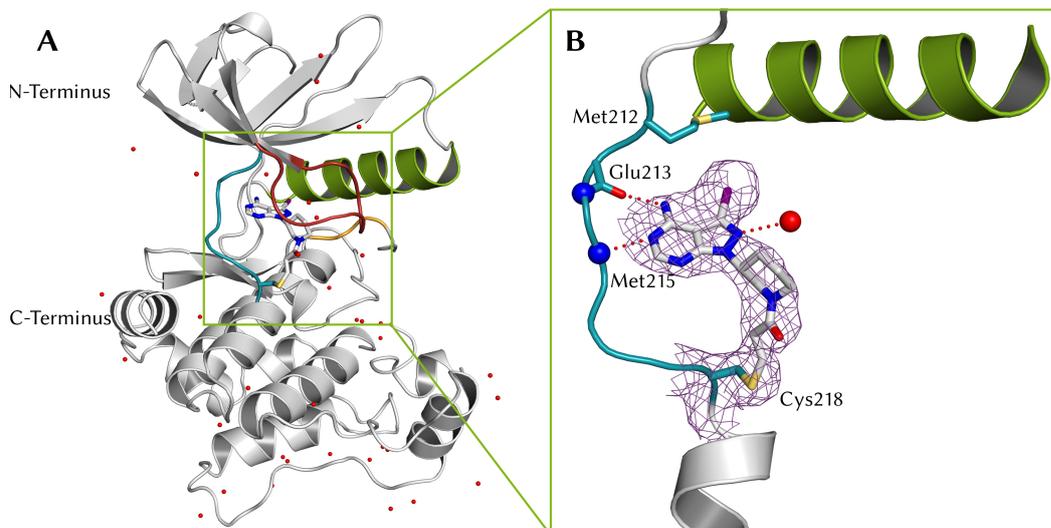
### 3.6.2.2 MKK7 im Komplex mit Verbindung 2

Bei der Verbindung **2** war das Pyrazolopyrimidin-Grundgerüst an der 3-Position mit einem Iod substituiert, wodurch der Ligand eine große, leicht zu polarisierende elektronenreiche Gruppe erhielt.

**Tabelle 3.15:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **2**; Die vollständigen kristallografischen Statistiken befinden sich im Anhang in Abschnitt 6.7.

Parameter	Resultat
Datensatz	
Auflösung in Å	49,2-2,7 (2,8-2,7)
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter	
a, b, c in Å	60,4, 67,1, 85,0
$\alpha, \beta, \gamma$ in°	90,0, 90,0, 90,0
R <sub>mean</sub> in %	8,8 (87,7)
I/ $\sigma$ I	13,4 (1,3)
Vollständigkeit in%	100,0 (99,9)
Redundanz	6,4 (6,3)
Verfeinerung	
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> in %	0,24 / 0,28
r.m.s Bindungslängen in Å	0,002
r.m.s Bindungswinkel in °	0,669
Ramachandran-Plot Ausreißer in %	0

Aus den gewonnenen Daten konnte im folgenden die Komplex-Struktur von MKK7 mit Verbindung **2** gelöst werden (Abbildung 3.57).



**Abbildung 3.57:** Darstellung der dreidimensionalen Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **2**, und den wichtigsten Strukturmotiven. A: Übersicht über die Proteinkinase-Domäne von MKK7. B: Detaillierte Ansicht der ATP-Bindetasche von MKK7 im Komplex mit Verbindung **2** mit dargestellter Elektronendichte des Liganden ( $2F_{\text{O}}F_{\text{C}}$ -Karte bei  $1\sigma$ ), und den Wasserstoffbrückenbindungen.

Auch bei dieser Struktur wurden die gleichen Wasserstoffbrückenbindungen zu der Scharnierregion ausgebildet, wie bereits bei der Verbindung **1**. Jedoch konnte keine Interaktion mit dem Gly216 oder dem Lys221 beobachtet werden. Es wurde aber eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem tertiären Amin an Position 2 und einem Wassermolekül gefunden, wobei keine weiteren Interaktionen dieses Wassermoleküls beobachtet wurden, woraus sich keine Verbesserung der Bindungsaffinitäten aufgrund dieser Bindung feststellen ließ.

Ebenfalls ist die eindeutige kovalente Bindungsknüpfung zwischen dem Acrylamid und der Seitenkette des Cys218 zu erkennen, wodurch der Ligand fest in der Bindetasche verankert wurde.

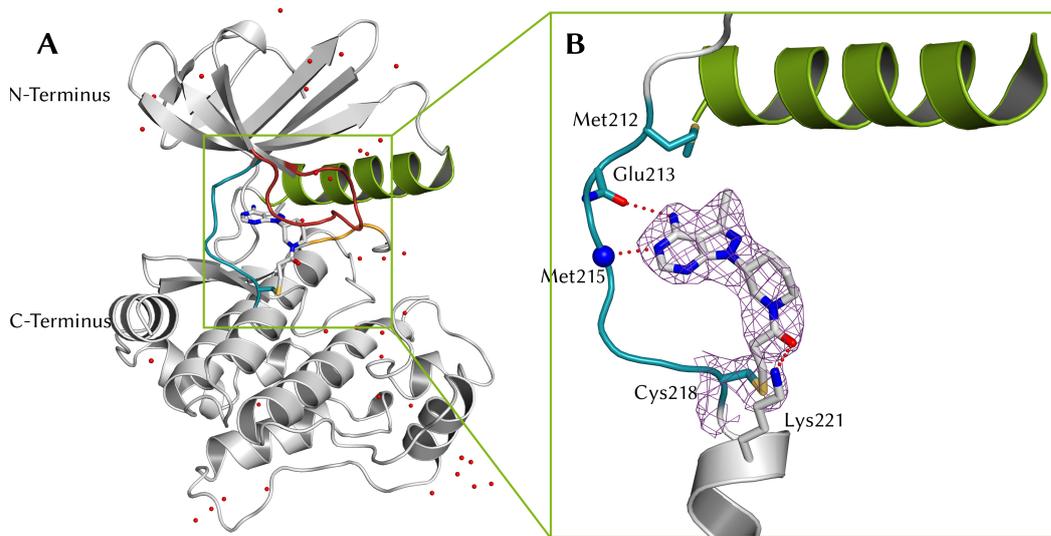
### 3.6.2.3 MKK7 im Komplex mit Verbindung 4

Bei Verbindung **4** war das Grundgerüst an der 3-Position mit einem Alkin substituiert, und sollte als Ausgangspunkt für Versuche mit „Click-Chemie“ eingesetzt werden (Tabelle 3.16).

**Tabelle 3.16:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **4**; Die vollständigen kristallographischen Statistiken befinden sich im Anhang in Abschnitt 6.7.

Kristallografischer Parameter	Wert
<b>Datensatz</b>	
Auflösung in Å	30,0-2,6 (2,7-2,6)
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Zellparameter</b>	
a, b, c in Å	59,4, 66,0, 86,4
$\alpha, \beta, \gamma$ in °	90,0, 90,0, 90,0
R <sub>mean</sub> in %	32,1 (128,2)
I/ $\sigma$ I	5,4 (1,2)
Vollständigkeit in%	99,9 (99,9)
Redundanz	12,6 (13,5)
<b>Verfeinerung</b>	
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> in %	0,24 / 0,28
r.m.s Bindungslängen in Å	0,013
r.m.s Bindungswinkel in °	1,802
Ramachandran-Plot Ausreißer in %	0

Aus den gewonnenen Daten konnte im folgenden die Komplex-Struktur von MKK7 mit Verbindung **4** gelöst werden (Abbildung 3.58).



**Abbildung 3.58:** Darstellung der dreidimensionalen Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **4**, und den wichtigsten Strukturmotiven. A: Übersicht über die Proteinkinase-Domäne von MKK7. B: Detaillierte Ansicht der ATP-Bindetasche von MKK7 im Komplex mit Verbindung **4** mit dargestellter Elektronendichte des Liganden ( $2F_{\text{O}}F_{\text{C}}$ -Karte bei  $1\sigma$ ), und den Wasserstoffbrückenbindungen.

Es zeigten sich auch hier wieder die Standardinteraktionen zwischen dem Pyrazolopyrimidin-Grundgerüst und der Scharnierregion der Kinase. Ebenso ist die kovalente Bindung zwischen dem Acrylamid und der Seitenkette des Cys218 eindeutig zu erkennen und durch die Elektronendichte deutlich definiert. Wie bereits bei Verbindung **1** konnte hier eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zwischen der Seitenkette des Lys221 und dem Carbonylsauerstoff des Acrylamids beobachtet werden. Die Alkin-Funktion der Verbindung war in Richtung der  $\alpha$ C-Helix und damit tiefer in die ATP-Bindetasche orientiert.

#### 3.6.2.4 MKK7 im Komplex mit Verbindung **9**

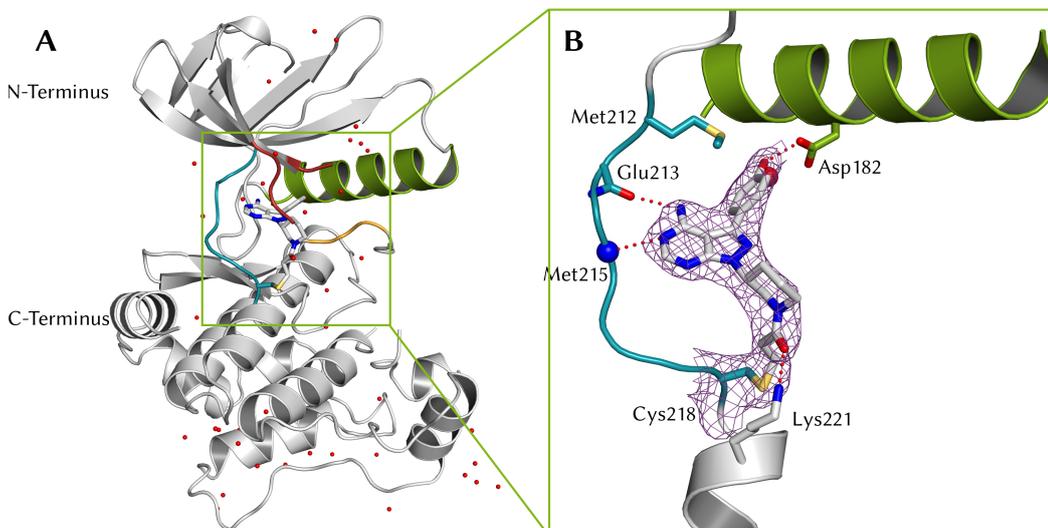
Verbindung **9** war an der 3-Position durch eine *para*-Phenol-Gruppe substituiert. Damit wurde der Ligand um einen potentiellen Wasserstoffbrücken-Wechselwirkungs-Partner in Richtung der  $\alpha$ C-Helix erweitert (Tabelle 3.17).

Aus den gewonnenen Daten konnte im folgenden die Komplex-Struktur von MKK7 mit Verbindung **9** gelöst werden (Abbildung 3.59).

## Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen

**Tabelle 3.17:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **9**; Die vollständigen kristallographischen Statistiken befinden sich im Anhang in Abschnitt 6.7.

Kristallografischer Parameter	Wert
<b>Datensatz</b>	
Auflösung in Å	43,1-2,3 (2,4-2,3)
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
<b>Zellparameter</b>	
a, b, c in Å	60,2, 67,0, 86,1
$\alpha, \beta, \gamma$ in°	90,0, 90,0, 90,0
R <sub>mean</sub> in %	6,9 (120,8)
I/ $\sigma$ I	21,7 (2,3)
Vollständigkeit in%	100,0 (100,0)
Redundanz	12,8 (13,1)
<b>Verfeinerung</b>	
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub>	0,23 / 0,27
r.m.s Bindungslängen in Å	0,002
r.m.s Bindungswinkel in °	0,491
Ramachandran-Plot Ausreißer in %	0



**Abbildung 3.59:** Darstellung der dreidimensionalen Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **9**, und den wichtigsten Strukturmotiven. A: Übersicht über die Proteinkinase-Domäne von MKK7. B: Detaillierte Ansicht der ATP-Bindetasche von MKK7 im Komplex mit Verbindung **9** mit dargestellter Elektronendichte des Liganden ( $2F_{O}F_{C}$ -Karte bei  $1\sigma$ ), und den Wasserstoffbrückenbindungen.

Wie bereits zuvor zeigten sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem primären Amin in 4-Position und dem Carbonylsauerstoff des Glu213, sowie zwischen dem tertiären Amin in 5-Position und dem Amidstickstoff des Met215. Ebenso war die Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Lys221 und dem Carbonylsauerstoff des Acrylamids erneut zu erkennen.

Bei dieser Verbindung wurde zusätzlich eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Asp182 über die *para*-Phenolgruppe in 3-Position ausgebildet. Dadurch stellte der Ligand eine zusätzliche Interaktion mit der  $\alpha$ C-Helix her.

Auch die Ausbildung der kovalenten Bindung zwischen Acrylamid und der Seitenkette des Cys218 war eindeutig zu erkennen.

### 3.6.2.5 MKK7 im Komplex mit Verbindung 12

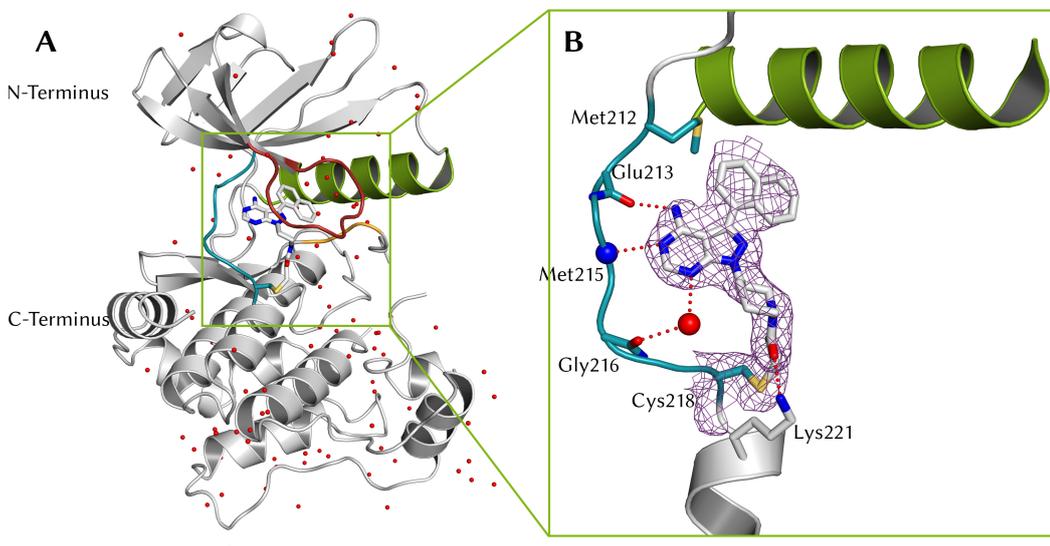
Bei Verbindung **12** handelte es sich um einen potenten Inhibitor von EGFR. Substituiert war die Verbindung an der 3-Position mit einem *ortho*-Naphthyl (Tabelle 3.18).

**Tabelle 3.18:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **12**; Die vollständigen kristallographischen Statistiken befinden sich im Anhang in Abschnitt 6.7.

Kristallografischer Parameter	Wert
Datensatz	
Auflösung in Å	48,8-2,0 (2,1-2,0)
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter	
a, b, c in Å	59,4, 65,8, 86,0
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ in °	90,0, 90,0, 90,0
R <sub>mean</sub> in %	12,3 (86,3)
I/ $\sigma$ I	13,2 (2,0)
Vollständigkeit in%	99,7 (99,6)
Redundanz	11,6 (6,9)
Verfeinerung	
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub>	0,24 / 0,28
r.m.s Bindungslängen in Å	0,002
r.m.s Bindungswinkel in °	0,644
Ramachandran-Plot Ausreißer in %	0

## Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen

Aus den gewonnenen Daten konnte im folgenden die Komplex-Struktur von MKK7 mit Verbindung **12** gelöst werden (Abbildung 3.60).



**Abbildung 3.60:** Darstellung der dreidimensionalen Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **12**, und den wichtigsten Strukturmotiven:  $\alpha$ C-Helix, Scharnierregion, Glycinreiche Schleife, DFG-Motiv. **A:** Übersicht über die gesamte Proteinkinase-Domäne von MKK7. **B:** Detaillierte Ansicht der ATP-Bindetasche von MKK7 im Komplex mit Verbindung **12** mit dargestellter Elektronendichte des Liganden ( $2F_oF_C$ -Karte bei  $1\sigma$ ), und den Wasserstoffbrückenbindungen.

Bei dieser Verbindung zeigte sich das gleiche Bindungsmuster, wie bei den bereits zuvor vorgestellten Verbindungen. Es werden Wasserstoffbrückenbindungen zu den Seitenketten Glu213, Met215 und Lys221 ausgebildet. Hinzu kommt die gut erkennbare kovalente Bindung zu dem Cys218. Neu war hier die Interaktion über den Stickstoff in 7-Position. Dieser bildet verbrückt über ein Wassermolekül eine Wasserstoffbrücke zu dem Carbonylsauerstoff von Gly216 aus. Ob dies wirklich einen Einfluss hat, ist jedoch fragwürdig, da es sich dabei durchaus um ein Artefakt der Kristallstruktur handeln kann. Der Grund für die höhere Aktivität im Vergleich mit der nicht substituierten Verbindung **1** liegt wahrscheinlich in der hydrophoben Interaktion zwischen der Türsteheramino­säure Met212 und dem Naphthyl. Ähnlich wird auch die Aktivität dieser Verbindung bei der Inhibition der EGFR T790M Mutante beschrieben, bei der die Türsteher-Aminosäure

ebenfalls zu einem Methionin mutiert ist.

### 3.6.2.6 MKK7 im Komplex mit Verbindung 14

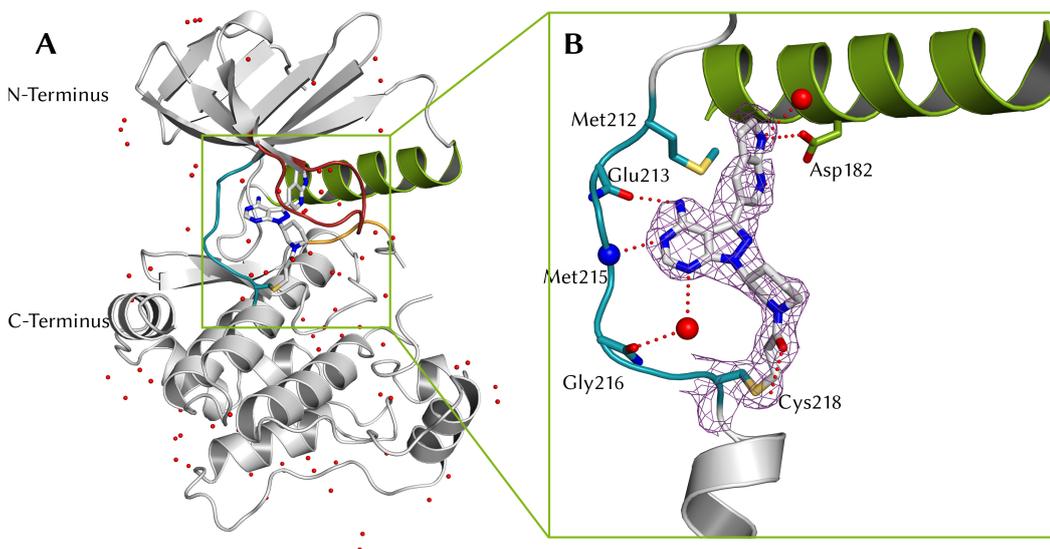
Verbindung **14** war an 3-Position mit einem 1-H-Pyrrolo[2,3]pyridin substituiert. Hier sollte ähnlich wie bei Verbindung **9** eine Interaktion mit der Seitenkette des Asp182 möglich sein.

**Tabelle 3.19:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **14**; Die vollständigen kristallographischen Statistiken befinden sich im Anhang in Abschnitt 6.7.

Kristallografischer Parameter	Wert
Datensatz	
Auflösung in Å	46,2-2,4 (2,5-2,4)
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter	
a, b, c in Å	62,1, 69,0, 84,9
$\alpha, \beta, \gamma$ in °	90,0, 90,0, 90,0
R <sub>mean</sub> in %	4,8 (92,2)
I/ $\sigma$ I	4,8 (2,4)
Vollständigkeit in%	94,8 (98,3)
Redundanz	12,5 (12,5)
Verfeinerung	
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub>	0,24 / 0,29
r.m.s Bindungslängen in Å	0,002
r.m.s Bindungswinkel in °	0,687
Ramachandran-Plot Ausreißer in %	0

Aus den gewonnenen Daten konnte im folgenden die Komplex-Struktur von MKK7 mit Verbindung **14** gelöst werden (Abbildung 3.61).

## Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen



**Abbildung 3.61:** Darstellung der dreidimensionalen Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **14**, und den wichtigsten Strukturmotiven. A: Übersicht über die gesamte Proteinkinase-Domäne von MKK7. B: Detaillierte Ansicht der ATP-Bindetasche von MKK7 im Komplex mit Verbindung **14** mit dargestellter Elektronendichte des Liganden (2F<sub>o</sub>F<sub>C</sub>-Karte bei 1σ), und den Wasserstoffbrückenbindungen.

Es wurden erneut Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Carbonylsauerstoff des Glu213 und dem primären Amin in 4-Position, dem Amidstickstoff des Met215 und dem tertiären Amin an Position 5 und der Seitenkette des Lys221 und dem Carbonylsauerstoff des Acrylamids ausgebildet. Des weiteren konnte eine Wasserstoffbrückenbindung über ein Wassermolekül zwischen dem Carbonylsauerstoff des Gly216 und dem tertiären Amin in Position 7 beobachtet werden. Die Ausbildung der kovalenten Bindung zu der Seitenkette des Cys218 war ebenfalls eindeutig zu erkennen.

Wie bereits zuvor bei Verbindung **9** wurde hier erneut eine Interaktion mit der  $\alpha$ C-Helix beobachtet. Hierbei wurde die Wasserstoffbrückenbindung zu der Seitenkette des Asp182 über das sekundäre Amin der Pyrrolopyridin-Substitution gebildet. Wodurch der Ligand über eine weitere Verbindung zu der Bindetasche verfügte.

### 3.6.2.7 MKK7 im Komplex mit Verbindung 20

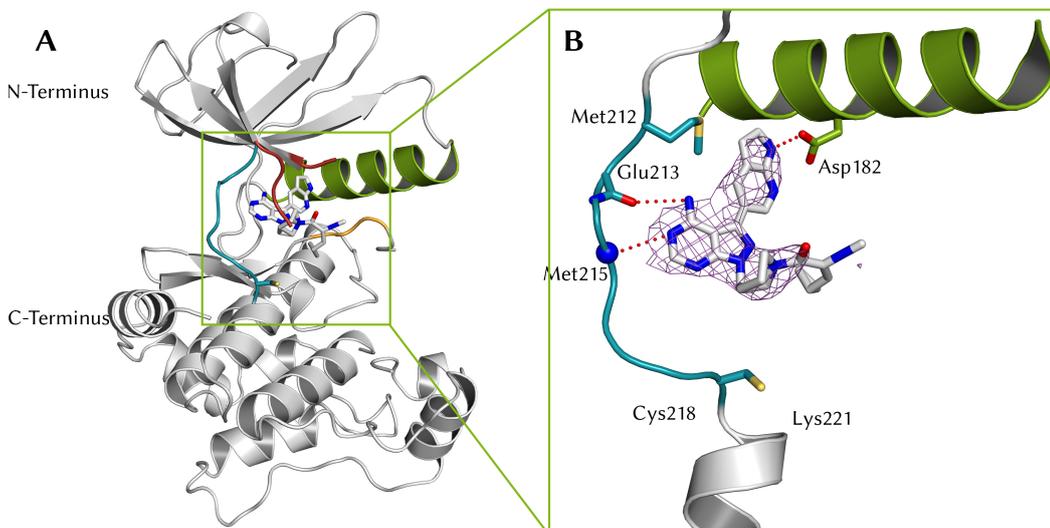
Bei Verbindung **20** handelte es sich um das kovalent reversible Gegenstück zu Verbindung **14**. Im Gegensatz zu dem Acrylamid, trug diese Verbindung ein 2-cyano-3-cyclopropylacrylamid (Tabelle 3.20).

**Tabelle 3.20:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **20**; Die vollständigen kristallographischen Statistiken befinden sich im Anhang in Abschnitt 6.7.

Kristallografischer Parameter	Wert
Datensatz	
Auflösung in Å	46,1-2,7 (2,8-2,7)
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter	
a, b, c in Å	60,7, 67,8, 84,9
$\alpha, \beta, \gamma$ in °	90,0, 90,0, 90,0
R <sub>mean</sub> in %	10,9 (96,8)
I/ $\sigma$ I	12,4 (2,8)
Vollständigkeit in%	100,0 (100,0)
Redundanz	12,5 (12,2)
Verfeinerung	
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> in %	0,23 / 0,28
r.m.s Bindungslängen in Å	0,003
r.m.s Bindungswinkel in °	0,457
Ramachandran-Plot Ausreißer in %	0

Aus den gewonnenen Daten konnte im folgenden die Komplex-Struktur von MKK7 mit Verbindung **20** gelöst werden (Abbildung 3.62).

## Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen



**Abbildung 3.62:** Darstellung der dreidimensionalen Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **20**, und den wichtigsten Strukturmotiven. A: Übersicht über die gesamte Proteinkinase-Domäne von MKK7. B: Detaillierte Ansicht der ATP-Bindetasche von MKK7 im Komplex mit Verbindung **20** mit dargestellter Elektronendichte des Liganden ( $2F_oF_C$ -Karte bei  $1\sigma$ ), und den Wasserstoffbrückenbindungen.

Das Grundgerüst verfügte über die gleichen Interaktionen zu der Scharnierregion wie die vorher gezeigten Verbindungen, das primäre Amin in 4-Position bildete dabei eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Carbonylsauerstoff des Glu213 aus und das tertiäre Amin in 5-Position mit dem Amidstickstoff des Met215. Äquivalent zu der Verbindung **14** wurde eine Wasserstoffbrückenbindung zu der Seitenkette des Asp182 in der  $\alpha$ C-Helix über das an 3-Position eingeführte Pyrrolopyridin.

Im Gegensatz zu den anderen gezeigten Strukturen, konnte hier keine kovalente Bindung beobachtet werden. Die Elektronendichte des Liganden kann lediglich bis zum Carbonylsauerstoff der 2-Cyano-3-cyclopropylacrylamid-Gruppe. Der Rest konnte nicht aufgelöst werden.

### 3.6.2.8 MKK7 im Komplex mit Verbindung 22

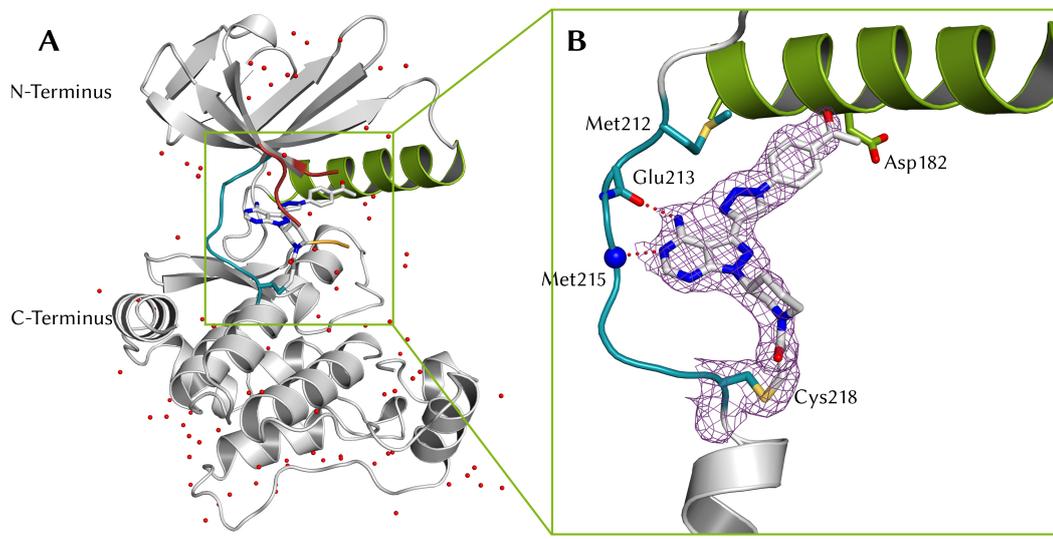
Bei Verbindung **22** handelt es sich um eine durch Click-Chemie hergestellte Verbindung, deutlich an dem Triazol zu erkennen. Das Grundgerüst ist dabei die Verbindung **4** (Tabelle 3.21).

**Tabelle 3.21:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **22**; Die vollständigen kristallographischen Statistiken befinden sich im Anhang in Abschnitt 6.7.

Kristallografischer Parameter	Wert
<b>Datensatz</b>	
Auflösung in Å	45,4-2,1 (2,2-2,1)
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter	
a, b, c in Å	60,7, 68,4, 84,0
$\alpha, \beta, \gamma$ in °	90,0, 90,0, 90,0
R <sub>mean</sub> in %	9,7 (82,5)
I/ $\sigma$ I	17,3 (3,4)
Vollständigkeit in%	100,0 (100,0)
Redundanz	12,7 (13,2)
<b>Verfeinerung</b>	
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub> in %	0,21 / 0,25
r.m.s Bindungslängen in Å	0,016
r.m.s Bindungswinkel in °	2,121
Ramachandran-Plot Ausreißer in %	0

Aus den gewonnenen Daten konnte im folgenden die Komplex-Struktur von MKK7 mit Verbindung **20** gelöst werden (Abbildung 3.63).

## Bestimmung der dreidimensionalen Struktur von Proteinen



**Abbildung 3.63:** Darstellung der dreidimensionalen Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **22**, und den wichtigsten Strukturmotiven. A: Übersicht über die gesamte Proteinkinase-Domäne von MKK7. B: Detaillierte Ansicht der ATP-Bindetasche von MKK7 im Komplex mit Verbindung **20** mit dargestellter Elektronendichte des Liganden ( $2F_{\text{O}}F_{\text{C}}$ -Karte bei  $1\sigma$ ), und den Wasserstoffbrückenbindungen.

In Abbildung 3.63 ist zu sehen, dass das Pyrazolopyrimidin-Grundgerüst die bereits bekannten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem primären Amin in 4-Position und dem Carbonylsauerstoff des Glu213 sowie zwischen dem tertiären Amin in 5-Position und dem Amidstickstoff des Met215 ausbildet. Daneben ist die kovalente Bindung durch eine deutliche Elektronendichte gut zu erkennen. Durch den Triazolring und die dadurch verknüpfte Acetophenyl-Gruppe ragt diese Verbindung deutlich weiter in die Bindetasche als die anderen. Es kommt dadurch zu einer strukturellen Änderung in der  $\alpha$ C-Helix. Das Asp182 muss zur Seite klappen, damit es nicht zu einem sterischen Konflikt kommt. Ebenso muss sich die Konformation des DFG-Motivs ändern. Diese wird ein wenig nach unten weggedrückt, um genug Platz für den Liganden zu haben.

### 3.6.3 Vergleich der MKK7-Komplexstrukturen

Die verschiedenen Liganden zeigten alle ein sehr ähnliches Bindungsmuster, wobei stets die gleichen Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Grundgerüst der Liganden und dem Rückgrat der Scharnierregion der Kinase ausgebildet wurden. Es zeigte sich, dass der Aktivitäts-Trend der Inhibitoren sich gut anhand der Strukturen ableiten ließ. Während die Verbindung **1** quasi den Start darstellt, da diese in 3-Position nicht substituiert worden war und mit einer Aktivität von  $631 \pm 87$  nM eine eher geringe Biochemische Aktivität aufwies. Durch Einführung Elektronenreicher Gruppen wie ein Iod (**2**:  $35 \pm 3$  nM) und eines Alkyls (**4**:  $40 \pm 8$  nM) konnte die Aktivität deutlich erhöht werden. Dies liegt wahrscheinlich an der Interaktion der jeweiligen Gruppen mit dem Schwefelatom im Met212. Der gleiche Effekt erklärt auch die Aktivität von Verbindung **12**, wobei sich das elektronenreiche System hierbei um eine Naphthylgruppe handelte. Diese Interagiert wahrscheinlich mit dem Ring des Phenylalanins im DFG-Motiv über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen. Die Aktivität konnte durch weitere Wasserstoffbrückenbindungen zu der  $\alpha$ C-Helix noch gesteigert werden (**9**:  $9 \pm 3$  nM und **14**:  $19 \pm 9$  nM). Bei diesen beiden Verbindungen wurde jeweils eine Wasserstoffbrückenbindung zu dem Asp182 ausgebildet, wodurch es zu einer weiteren Stabilisierung des Liganden kam, wodurch die höhere Aktivität erklärt werden konnte.

Das Fehlen der kovalenten Bindung bei Verbindung **20** erklärte bereits zuvor das Fehlen einer biochemischen Aktivität im gemessenen Bereich. Da bei der Kristallisation im Gegensatz zu den biochemischen Untersuchungen kein ATP eingesetzt wurde, das den Liganden verdrängen konnte, war eine ko-Kristallisation, trotz geringer Affinität möglich.

Verbindung **22** war der vielversprechendste Kandidat aus den biochemischen Analysen. Die Struktur zeigte einige Besonderheiten, die jedoch die Aktivität nicht erklären konnten. So zeigten sich die gleichen Interaktionen wie beispielsweise bei Verbindung **1**. Jedoch wurde die Struktur der Kinase durch den Liganden verändert, so wurde die Konformation des DFG-Motivs gestört, wodurch die Auflösung des DFG-Motivs nicht möglich war. Möglicherweise wurde die Kinase durch den Liganden in eine energetisch vorteilhaftere Konformation gebracht, wodurch eine Bindung bevorzugt wurde. Eine genaue Aufklärung der Aktivität von Verbindung **22** war jedoch nicht möglich.

Neben der Struktur und der biochemischen Analyse mit MKK7 sollte getestet

### Selektivitätsprofilung von Verbindung 22

werden, in wie weit die Verbindung **22** eine Aktivität gegen anderen Proteinkinasen aufweist. Dazu sollte ein Selektivitätsprofilung durchgeführt werden.

### 3.7 Selektivitätsprofilung von Verbindung 22

Nachdem für die Verbindung **22** in den biochemischen Tests eine sehr gute Aktivität nachgewiesen werden konnte, sollte überprüft werden, ob auch andere Kinasen von dieser Verbindung Inhibiert werden. Hierfür wurde ein Selektivitätsprofilung mit insgesamt 320 Proteinkinasen<sup>§</sup> durchgeführt (Tabelle 3.22).

**Tabelle 3.22:** Auflistung der Ergebnisse des Selektivitätsprofilung für Verbindung **22**. Aufgelistet sind die Kinasen, deren Restaktivität bei der Konzentration von 1  $\mu$ M unter 50% lag.

Kinase	Restaktivität in % (1 $\mu$ M)	Restaktivität in % (10 nM)
BMX	18	47
BTK	36	81
BLK	37	79
mTOR	39	105
JAK3	40	91
S6K	40	99
ITK	41	90

Obwohl MKK7 als Referenz ebenfalls Teil dieses Profilings war, konnte hierfür keine Aktivität bestimmt werden. Wie bereits bei den biochemischen Untersuchungen zuvor registriert, scheint MKK7 in einer Art semiinaktivem Zustand vorzuliegen, zumindest in den biochemischen Analysen, was darauf schließen lässt, dass ein Vorinkubationsschritt für eine erfolgreiche Bindung nötig sein könnte. In Abschnitt 3.4.1 konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von ATP erst nach 60 min eine vollständige Bindung des Liganden an die Kinase erfolgt war. Da der in Auftrag gegebene Assay bei Proqinase jedoch keine Vorinkubationszeit aufwies und lediglich eine Reaktionszeit von einer Stunde hatte, konnte der Ligand nicht an MKK7 binden, was in einer Restaktivität von 77 % (81 %) resultierte.

Die Resultate zeigten eine sehr geringe Anzahl an potentiellen Zielen des Liganden. Es konnten lediglich bei sieben Proteinkinasen eine inhibitorische Wirkung

<sup>§</sup>Proqinase<sup>®</sup>

mit einer Restaktivität von unter 50 % bei einer Ligandenkonzentration von 1  $\mu$ M nachgewiesen werden. Lediglich bei der Proteinkinase BMX wurde auch bei einer Ligandenkonzentration von 10 nM eine Reduktion der Restaktivität auf unter 50 % erreicht.

Das besondere an all diesen Kinasen war, dass sie alle über ein strukturäquivalentes Cystein zu dem Cys218 in MKK7 verfügten. Was bereits einen großen Selektivitätsvorteil bedeuten könnte. Zusätzlich ist der Ligand relativ groß, wodurch er bei anderen Kinasen, die ein strukturäquivalentes Cystein tragen, keine Aktivität aufweist (z.B EGFR).

Das Profiling konnte zeigen, dass nur ein geringer Teil der vorkommenden Proteinkinasen von Verbindung **22** inhibiert werden konnten, was einen guten Ausgangspunkt für einen selektiven Inhibitor darstellt. Neben der biochemischen Aktivität und Selektivität, sind vor allem die pharmakokinetischen Eigenschaften einer Verbindung wichtig für den Einsatz als Sonde oder Medikament in biologischen Systemen.

### 3.8 Pharmakokinetische Analyse von Verbindung 22

Neben der biochemische Aktivität und Selektivität sowie dem Bindungsmodus sind vor allem die pharmakokinetischen Eigenschaften einer Verbindung wichtig für den Einsatz in biologischen Systemen. Darunter zählen viele Parameter wie zum Beispiel die Löslichkeit einer Verbindung oder ihre Zellpermeabilität. Für den geplanten Einsatz in einem biologischen Testsystem sollten die pharmakokinetischen Parameter von Verbindung **22** bestimmt werden. Als Referenz für die pharmakokinetischen Parameter wurde der bereits zugelassene Wirkstoff Ibrutinib ebenfalls getestet. Dieser wurde gewählt, da er zum einen die Werte für einen zugelassenen kovalenten Inhibitor widerspiegelte, aber auch, da er über inhibitorische Aktivität gegen MKK7 ( $78 \pm 21$  nM) verfügte (Tabelle 3.23)<sup>h</sup>.

**Tabelle 3.23:** Zusammenfassung der pharmakokinetischen Parameter die für die Verbindung **22** und **26** bestimmt wurden.

Pharmakokinetischer Parameter	Verbindung 22	Verbindung 26
CLogP <sup>i</sup>	1,6	4,1
LLE <sup>j</sup>	6,4	3,0
SolRank / $\mu$ M	23	57
PAMPA / % Flux	n.B.	38
Plasma Stabilität Mensch/Maus / % Verbleibend	>99 / 71	80 / 96
Plasma Protein Bindung Mensch/Maus / % Gebunden	96 / 93	98 / 99
MDCKII-MDR1 (Papp A-B) / $10^{-6}$ $\text{cm}^{-1}$	9	22
MDCKII-MDR1 (Verhältnis B-A/A-B)	0,40	0,13
Mircosomale Stabilität Phase I Mensch/Maus / $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$	154 / 124	234 / >1000
Caco-2 (Papp A-B) / $10^{-6}$ $\text{cm}^{-1}$	20,00	40,00
Caco-2 (Papp B-A) / $10^{-6}$ $\text{cm}^{-1}$	13,00	0,90
Caco-2 (Verhältnis Papp B-A/A-B)	0,60	0,02

<sup>h</sup>In Kooperation mit der *Lead Discovery Center* GmbH, Dortmund und Leibniz-Institut für Arbeitsforschung an der TU Dortmund (IfADo)

<sup>i</sup>Der CLogP wurde mit ChemDraw von PelkinElmer berechnet.

<sup>j</sup>ligand lipophilicity efficiency (LLE) wurde berechnet durch:  $\text{pIC}_{50}(\text{MKK7}) - \text{CLogP}$ .

Der CLogP gibt dabei die Hydrophobizität einer Verbindung an. Dieser Wert beschreibt die Fähigkeit einer Verbindung, die Lipiddoppelschicht einer Zelle durchwandern zu können. Sie muss dabei hydrophob genug sein, um die Lipiddoppelschicht durchdringen zu können, aber nicht so hydrophob, dass diese nicht wieder verlassen werden kann. Ein Richtwert besagt dabei, dass der ClogP einen Wert von 5 nicht überschreiten darf. Dazu wird die *Lipinski Rule of 5* herangezogen,<sup>84</sup> die über eine statistische Auswertung einen Bereich von Eigenschaften eines Moleküls beschreibt, in der die meisten Arzneistoffe liegen. Neben der Berechnung der Hydrophobizität wurde auch eine Löslichkeitsanalyse durchgeführt, wobei die Löslichkeit der Verbindung bei drei verschiedenen pH-Werten (2,1, 4,0, 7,4) bestimmt und gemittelt wird. Die Löslichkeit lag für beide Liganden in einem Bereich mit dem weitere Analysen durchgeführt werden konnten. Die LLE beschreibt die Wirkstoffartigkeit, indem es den CLogP mit dem pIC50 in Verhältnis setzt<sup>i</sup>. Dadurch ergibt sich ein hoher Wert je kleiner der IC50 ist, woraus ein hoher pIC50 resultiert. Hierbei gilt im Allgemeinen, dass ein potenter Wirkstoff einen Wert von >6,0 haben sollte.<sup>85,86</sup> Für die Verbindung **22** trifft dies auch zu, jedoch ist der Wert für die Verbindung **26** mit 3 nur halb so hoch, wie er mindestens sein sollte. Da es sich hierbei jedoch um einen Inhibitor handelt, der für ein anderes Ziel entwickelt wurde, ist es nicht verwunderlich, dass der Wert hier schlechter ist, da sowohl der IC50 als auch der CLogP eingerechnet werden. Dadurch, dass die Aktivität gegen MKK7 geringer ist, ist der Wert für den LLE ebenfalls schlechter.

Bei dem *Parallel artificial membrane permeability assay* (PAMPA) handelt es sich um ein Testsystem, bei dem der passive Membrantransport durch ein Modellsystem evaluiert werden soll. Hierbei gilt ein höherer Fluss durch die Membran als guter Referenzwert, da es bedeutet, dass die Verbindung generell membranfähig ist.<sup>87</sup> Für die Verbindung **22** konnte auch nach mehreren Versuchen kein Wert gemessen werden. Für Verbindung **26** ergab sich ein Wert von 38 % Fluss durch die Membran, was bedeutet, dass die Verbindung in die Zelle gelangen kann. Da für die eigentliche Zielverbindung kein Wert bestimmt werden konnte, wurde zusätzlich zu dem PAMPA-Assay, der Caco-2 Assay durchgeführt. Dieser Assay funktioniert prinzipiell genauso wie der PAMPA-Assay, jedoch wird hier anstelle einer artifiziellen Membran eine Zell-Monoschicht aus Caco2-Zellen verwendet. Diese sind in der Lage Verbindungen neben dem passiven Transport

---

<sup>i</sup>LLE = pIC50 - CLogP

auch über aktiven Transport durch die Zellmembran zu befördern. Dieses System ist somit eine bessere Darstellung des tatsächlichen Membrantransportes. Dabei wird bestimmt, wie der Transport in Gewebe (Papp A-B) und der Transport aus dem Gewebe (Papp B-A) sowie das Verhältnis dieser beiden zueinander ist. Somit ist ein höherer Transport in das Gewebe bevorzugt, das bedeutet, je kleiner das Verhältnis aus  $B-A / A-B$  desto besser ist der Transport in das Gewebe. Hier zeigte sich, dass die Verbindung **22** ein Verhältnis von 0,6 aufwies. Die Verbindung hat daher einen höheren Transport, in als aus der Zelle. Bei Verbindung **26** ist dieser Unterschied deutlich größer, wobei es sich hierbei jedoch um einen veröffentlichten Wirkstoff handelt, der weitaus mehr Optimierung erfahren hat. Ebenso wurde die Mikrosomale Stabilität der Phase I für Mensch und Maus Mikrosomen getestet. Dabei wird die Verbindung mit Mikrosomen des jeweiligen Organismus zusammen gegeben und die Stabilität über die Zeit bestimmt. Hierbei zeigen beide Verbindungen eine gute Halbwertszeit im Menschen sowie in der Maus, wobei die Stabilität für Verbindung **26** höher liegt, was an der bereits zuvor erwähnten Optimierung liegen könnte. Neben der Stabilität der Liganden in Mikrosomen wurde ebenfalls die Stabilität im Plasma sowie die Bindung der Liganden an Plasma-Proteine bestimmt. Hierbei zeigen sich für beide Liganden hohe Stabilitätswerte im Plasma, sowie eine sehr hohe Bindung an Plasma-Proteine. Dies lässt sich auf das Acrylamid zurückführen, welches beide Liganden aufweisen, in früheren Untersuchungen wurden ähnliche Werte für Verbindungen erhalten, die ein Acrylamid oder eine vergleichbare chemische Gruppe aufwiesen. Die hohe Stabilität kommt durch die hohe Plasma-Protein-Bindung zustande, da die Liganden in diesem Fall vor dem Abbau geschützt werden. Durch diese Bindung kommt es zu einer langsameren Freisetzung des Wirkstoffes im Körper, da sich immer nur ein Teil der Verbindung von den Plasmaproteinen löst.

Diese Werte waren alle in einem Bereich, der die weitere biologische Evaluierung ermöglicht hatte. Neben den folgenden Zellanalysen sollten aufgrund der Grundlage dieser Werte ebenfalls Tierstudien durchgeführt werden, die jedoch nicht Teil dieser Arbeit sind.

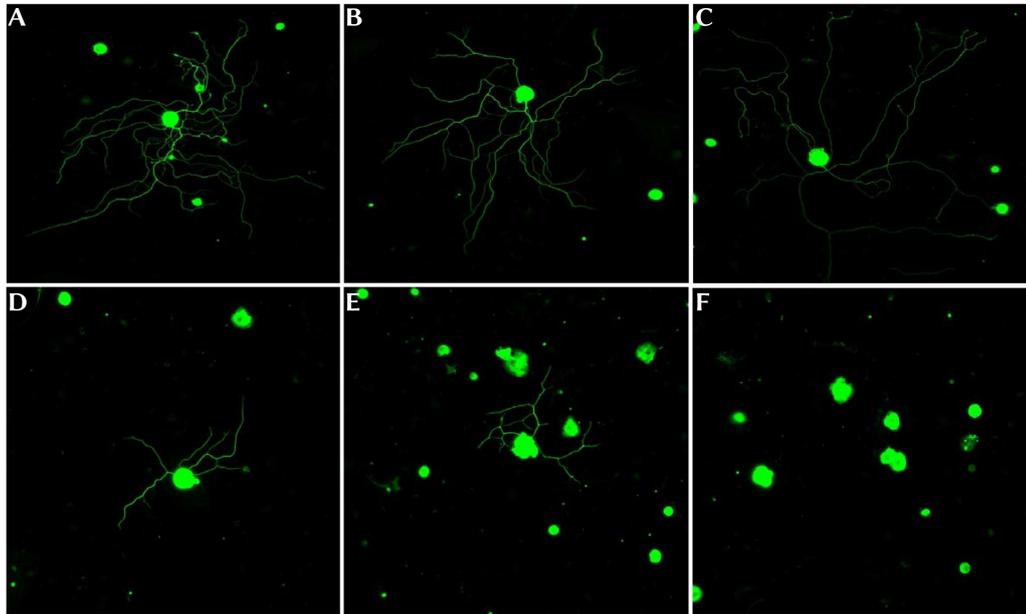
## 3.9 Biologische Evaluierung von Verbindung 22

Nachdem die biochemische und strukturebiologische Charakterisierung einen vielversprechenden Inhibitor für MKK7 hervorgebracht hatte, sollte im weiteren überprüft werden, ob diese Wirkung auch in einem biologischen System zu einer phänotypischen Veränderung führen kann. Dazu sollte der Einfluss von Verbindung **22** sowie zur Kontrolle von Verbindung **25** und **26** getestet werden. Ebenso sollten Westernblot Analysen der Zellsubstrate Aufschluss über die Effektivität der einzelnen Verbindungen geben.

Die biologische Evaluierung dieser Verbindung wurde von unserem Kooperationspartner Professor Josef PENNINGER am *Institute of Molecular Biotechnology of the Austrian Academy of Science* (IMBA) durchgeführt.

### 3.9.1 Inhibition der Ausbildung von Dendriten

Aufgrund von Experimenten der Arbeitsgruppe von Professor Josef PENNINGER ist bekannt, dass die Inaktivierung von MKK7 durch Gen *knock out* zu einer Verminderung des Wachstums von Dendriten in Neuronen führte.<sup>50</sup> Um die biologische Wirksamkeit zu überprüfen und um den möglichen Einsatz von Verbindung **22** als Sonde für MKK7-Abhängige Prozesse nutzen zu können, sollte die Inhibition des Dendritenwachstums durch Gabe von verschiedenen Konzentrationen von Verbindung **22** überprüft werden. Dazu sollten DRG mit verschiedenen Konzentrationen der Verbindung **22** sowie zur Kontrolle mit Dimethylsulfoxid (DMSO) versetzt werden um zu zeigen, ob es zu einer phänotypischen Veränderung kommt (3.64).

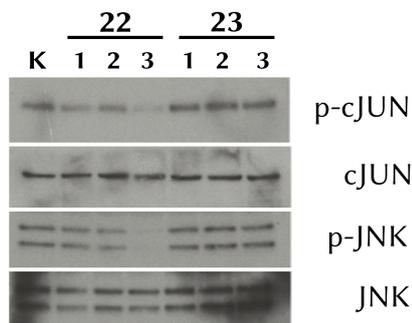


**Abbildung 3.64:** Fluoreszenzspektroskopische Aufnahmen von DRG. **A-C:** In Gegenwart von DMSO (Negativkontrolle). **D-F:** In Gegenwart von 1 µM, 2,5 µM und 10 µM Verbindung **22**.

Die Ergebnisse zeigten eine Konzentrationsabhängige Inhibition des Dendritenwachstums. Während die Neuronen in Gegenwart von DMSO eine deutliche Ausbildung von Dendriten zeigten, war bei einer Konzentration von 1 µM Verbindung **22** eine verminderte Ausbildung von Dendriten zu erkennen. Bei 2,5 µM waren die Dendriten weiter reduziert. Bei einer Konzentration von 10 µM und oberhalb war keine Ausbildung von Dendriten zu erkennen.

Es zeigte sich, dass die Verbindung **22** das Dendritenwachstum inhibieren konnte, was dafür sprach, dass die Verbindung zum einen in die Zellen gelangen konnte, und zum anderen, dass sie einen Einfluss auf die Ausbildung der Dendriten hatte und somit vermutlich erfolgreich die Aktivität von MKK7 in lebenden Zellen beeinflussen konnte.

Um den Einfluss von Verbindung **22** genauer zu untersuchen, sollten die Auswirkungen auf den JNK-Signalweg analysiert werden. Hierfür sollte ein Westernblot der aus dem Zellysat der Neuronen zeigen, welchen Einfluss **22** auf die Phosphorylierung innerhalb des JNK-Signalwegs hatte (Abbildung 3.65).



**Abbildung 3.65:** Westernblot der Ergebnisse der Behandlung von DRG Neuronen mit Verbindung **22** und **23**. Getestet wurde gegen Phospho-cJun (p-cJUN), cJun, Phospho-JNK (p-JNK) und JNK. In den Konzentrationen **1**: 0,1  $\mu$ M, **2**: 0,4  $\mu$ M und **3**: 1,0  $\mu$ M.

Zur Kontrolle wurde Verbindung **22** hier mit dem reversiblen Pendant (Verbindung **23**) verglichen, welches in biochemischen Untersuchungen keine Aktivität gegen MKK7 aufweisen konnte. Dabei wurde sowohl das JNK/Phospho-JNK Level wie auch das cJUN/Phospho-cJUN Level analysiert. Bei cJun handelt es sich um das Substrat von JNK, und somit um ein weiteres wichtiges Ziel des Signalwegs. Bei Verbindung **23** konnte bei keiner Konzentration eine Veränderung im Phosphorylierungsmuster in den Expressionsmustern festgestellt werden. Bei Verbindung **22** war bei einer Konzentration von 1,0  $\mu$ M eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung von JNK zu erkennen, was sich durch die resultierende geringere Aktivität von JNK auch auf das Phosphorylierungslevel von cJUN auswirkte. Hier konnte ebenfalls kein Unterschied im Expressionslevel festgestellt werden.

Das Ergebnis des Westernblot bestätigt auch das Ergebnis der Neuronen-Tests (Abbildung 3.64), bei denen bei der höchsten Konzentration das Wachstum der Dendriten vollkommen zum Erliegen kam.

Die Wirkung auf Zellen von Verbindung **22** ist wahrscheinlich schon aufgrund der besseren pharmakokinetischen Eigenschaften besser, wo noch die höhere Aktivität gegen MKK7 hinzu kommt. Dies macht die Verbindung **22** zu einem idealen Ausgangspunkt für die weitere Entwicklung von noch potenteren und selektiveren MKK7 Inhibitoren.



## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Proteinkinase MKK7 ist ein zentraler Bestandteil des JNK-Signalwegs und somit ein idealer Ansatzpunkt für die Kontrolle von diesem Signalweg. Das Ziel dieser Arbeit war es, mit verschiedenen biochemischen sowie biologischen und strukturellen Methoden neue Modulatoren für die Proteinkinase MKK7 zu bestimmen. Für die Expressionen der benötigten Proteine wurden verschiedene Expressionssysteme gewählt. Für die Kristallisationskonstrukte (MKK7 Krist-1-4) konnten im Schnitt eine Ausbeute von  $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  aus *E. coli* BL21 (DE3) Kulturen erhalten werden. Für die Assaykonstrukte (MKK7 Assay-1-2) wurde zunächst auch eine Expression in *E. coli* durchgeführt, wobei jedoch keine Ausbeute erhalten werden konnte. Daher wurde das Expressionssystem gewechselt und es konnte mit den Konstrukten MKK7 Assay-3/4 in *Sf9*-Zellen eine durchschnittliche Ausbeute von etwa  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  erreicht werden. Die verschiedenen Konstrukte wurden alle mittels *Fast Protein Liquid Chromatographie* (FPLC) über verschiedene Methoden, wie zum Beispiel Ni-Affinitätschromatografie oder Größenausschlusschromatografie aufgereinigt. Wodurch Proteine in hoher Reinheit für weitere Versuche geliefert wurden.

Mit den Konstrukten MKK7 Assay-3/4 wurde im Anschluss versucht, eine biochemische Charakterisierung von kleinen Molekülen durchzuführen. Hierzu wurden verschiedene biochemische Assay Systeme eingesetzt und auf die Durchführbarkeit hin analysiert. Dazu wurden ein radiometrischer Assay sowie ein Fluoreszenz-Polarisations- und ein Lumineszenz-Assay getestet. Es stellte sich heraus, dass aufgrund von Selektivitätsproblemen ein Einsatz des Polarisationsassays nicht möglich war, und dass aufgrund weitreichender Probleme ebenfalls der Einsatz des radiometrischen Assays nicht praktikabel war. Es zeigte sich das im Rahmen dieser Arbeit nur mit dem Lumineszenz Assay akkurate biochemische Aktivitäten bestimmt werden konnten.

Mit diesem Assay wurde ein Aktivitäts-Screen mit 180 Verbindungen durchgeführt. Diese 180 Verbindungen setzten sich aus verschiedenen chemischen Grundgerüsten zusammen, von denen einige bereits dafür bekannt waren an Cy-

#### 4 Zusammenfassung und Ausblick

steine zu binden, die sich an einer dem Cys218 strukträquivalenten Position befanden, wie auch verschiedene Arten von publizierten Proteinkinase-Inhibitoren. Die Ergebnisse zeigten, dass vor allem Verbindungen mit einem Acrylamid als MICHAEL-Akzeptor und einem Pyrazolopyrimidin als Grundgerüst eine vielversprechende Gruppe von Inhibitoren darstellte.

Eine größere Auswahl von Verbindungen aus dieser Substanzklasse wurde auf ihre biochemische Aktivität getestet, wobei sowohl Verbindungen ohne MICHAEL-Akzeptor als auch mit verschiedenen MICHAEL-Akzeptoren getestet wurden. Dabei konnte gezeigt werden, dass lediglich Verbindungen, die eine kovalente Bindung über das Cys218 aufbauen konnten, überhaupt eine inhibitorische Aktivität im verwendeten Assaysystem gezeigt haben. Als besonders potente Inhibitoren zeigten sich die Verbindungen **9** (9 nM) und **14** (19 nM). Beide Verbindungen trugen große Gruppen in 3-Position mit einem exponierten Wasserstoffbrücken Akzeptor/Donor. Ebenso fiel die Verbindung **4** mit einer Aktivität von 40 nM auf. Die Besonderheit war hier ein Alkin in 3-Position, was durch Click-Chemie einfach erweitert werden konnte. Die daraus resultierenden Verbindungen wurden ebenfalls biochemisch analysiert, woraus sich ein sehr potenter Inhibitor, Verbindung **22** (10±3 nM) ergab. Die Aktivität ist zwar Vergleichbar mit der Aktivität von Verbindung **9**, jedoch konnte eine deutliche Selektivität für die Verbindung nachgewiesen werden. Im Vergleich der Aktivität der Inhibitoren bei MKK7 und EGFR, ergab sich, dass die meisten Verbindungen eine deutlich höhere Aktivität gegen EGFR aufwiesen als gegen MKK7. Eine Ausnahme stellte die Verbindung **22** dar. Hier zeigte sich eine hohe Potenz gegen MKK7, gegen EGFR, war diese Verbindung jedoch inaktiv. Aus diesem Grund wurde ein Fokus auf die Analyse der Verbindung **22** gesetzt. Es zeigte sich, dass die pharmakokinetischen Eigenschaften dieser Verbindung durchaus als gut bewertet werden können. Im Vergleich mit dem bereits zugelassenen Wirkstoff Ibrutinib zeigte sich sogar, dass die pharmakokinetischen Eigenschaften besser sind.

Aus diesem Grund sollte die Verbindung **22** auch in einem biologischen System getestet werden. Dies wurde durch das Labor von Prof. PENNINGER durchgeführt. Dabei zeigte sich auch hier, dass die Verbindung eine gute Wirksamkeit aufweist. Als Referenz diente hier erneut Ibrutinib, welches auch eine biochemische Aktivität gegen MKK7 aufweist (78±21 nM) wie auch die reversible Variante von Verbindung **22**. Es zeigte sich auch hier, dass MKK7 selektiv einen Einfluss auf das biologische System nimmt, was ein zusätzlicher Hinweis ist, dass hier ein

selektiver und sehr potenter Inhibitor gefunden werden konnte. Zusätzlich zu den biochemischen Untersuchungen, konnten mehrere Strukturen von MMK7 gelöst werden. So konnte neben der Apo-Struktur die erste Struktur von MKK7 im inaktiven Zustand gelöst werden. Ebenso wurden 8 Komplexstrukturen mit Inhibitoren aus dieser Arbeit gelöst. Es zeigte sich stets der gleiche Bindungsmodus, wobei vor allem die kovalente Bindung über das Cys218 gezeigt werden konnte. Anhand der Strukturen konnten auch die unterschiedlichen Aktivitäten der Inhibitoren gut erklärt werden. Verbindung **22** kann nun in weiteren biologischen Systemen getestet werden und als Sonde für die Erforschung der Funktion von MKK7 eingesetzt werden. Ebenso kann das aufgesetzte Assaysystem genutzt werden, um weitere Screens, mit mehr Molekülen durchzuführen, um weitere Inhibitoren oder vielleicht Aktivatoren für MKK7 auffinden zu können. Diese können dann mit dem hier gefundenen Kristallisationssystem zur Aufklärung des Bindungsmodus kokristallisiert werden.



## **5 Material und Methoden**

### **5.1 Verwendete Chemikalien**

Sofern nicht anders angegeben, wurden die während dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien und Reagenzien von den folgenden Anbietern bezogen: Acros Organics, Alfa Aesar, Carl-Roth, Serva, Sigma-Aldrich und VWR.

### **5.2 Verbrauchsmaterialien**

In dieser Arbeit wurden, sofern nicht anders erwähnt, die Verbrauchsmaterialien von den folgenden Anbietern bezogen: Carl-Roth, GE Healthcare, Sigma-Aldrich und VWR. Eine Auflistung befindet sich im Anhang (6.1.1).

### **5.3 Verwendete Reagenzien, Nährmedien, Zellen und Kits**

Biologische Materialien wie Reagenzien, Nährmedien, Zellen und Biologische Kits wurden von den Firmen GE und VWR bezogen. Eine Liste aller Materialien befindet sich im Anhang (6.1.2).

### **5.4 Verwendete Geräte**

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in der Tabelle 6.1 im Anhang zu sehen (Abschnitt 6.2).

## 5.5 Mutagenese

Zum Austausch von einzelnen Aminosäuren oder zum Einführen neuer Restriktionsschnittstellen, wurden Basenpaare durch ortsgerichtete Mutagenese mittels der *Quickchange*-Methode ausgetauscht. Die genaue Zusammensetzung der Reaktion sowie das *Polymerase chain reaction* (PCR)-Programm sind in den Tabellen 5.1 und 5.2 gezeigt.

**Tabelle 5.1:** Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die ortsgerichtete Mutagenese.

Bestandteil	Menge
DNA	150-300 ng
Primer fwd. <sup>a</sup> (10 µM)	0,5 µL
Primer rev. <sup>b</sup> (10 µM)	0,5 µL
dNTP-Mix (25 µM)	0,5 µL
10x Pfu Ultra II Puffer	2,5 µL
Pfu Ultra II Fusion HS DNA Polymerase	0,5 µL
Wasser	auffüllen auf 25 µL

**Tabelle 5.2:** Reaktionszeit und Reaktionstemperatur der einzelnen Reaktionsschritte während der PCR.

	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturieren	95 °C	5 min
2	Denaturieren	95 °C	30 s
3	Annealing	57 °C <sup>c</sup>	30 s
4	Elongation	72 °C	30 s
5	Elongation	72 °C	30 s
6	Pause	95 °C	30 s

Nach der PCR wurden die Reaktionsansätze mit 1 µL des Restriktionsenzym *DpnI* versetzt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden chemisch kompetente *E. coli* XL10 Gold Zellen mit den entstandenen Plasmiden transformiert.

<sup>a</sup>fwd.: Forward-Primer.

<sup>b</sup>rev.: reverse-Primer.

<sup>c</sup>Die Annealingtemperatur ist Primerabhängig. Die genaue Annealingtemperatur für jeden Primer befindet sich im Anhang.

Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Plasmide dann mit Hilfe des QIAspin Miniprep Kits nach Herstellerangaben isoliert. Die Konzentrationsbestimmung der Plasmide erfolgte über die Messung der Absorption bei 260 nm mit einem NanoDrop (ThermoFischer). Alle entstandenen Plasmide wurden mittels DNA-Sequenzierung (SeqLab, ZE-Biotechnologie<sup>d</sup>) analysiert.

## 5.6 Proteinexpression

Es folgt die Beschreibung der verschiedenen Methoden zur Expression von Proteinen für die Kristallografie und die biochemischen Analysen.

### 5.6.1 Heterolge Expression in *E. coli*

Für die Expression wurden chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) Zellen mit den Plasmiden transformiert und auf LB Agarplatten (50 µg mL<sup>-1</sup> Kanamycin (Kan)) selektiert. Es wurden je drei Kolonien von den Agarplatten in eine 5 mL Vorkultur (TB-Medium, 50 µg mL<sup>-1</sup> Kan) für eine Testexpression überführt und für 18 h bei 37 °C inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde 1 mL in 24 mL Expressionskultur (TB-Medium, 50 µg mL<sup>-1</sup> Kan) überführt und aus 500 µL ein Glycerolstock (50 % Glycerol) angesetzt. Die Expressionskultur wurde für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach 3 h wurde die Kultur auf 18 °C herunter gekühlt und 0,2 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) zur Induktion der Expression hinzugegeben.

Bei einer erfolgreichen Testexpression wurde aus dem entsprechenden Glycerolstock eine 50 mL Vorkultur (TB-Medium, 50 µg mL<sup>-1</sup> Kan) angesetzt und für 18 h bei 37 °C inkubiert. Die Vorkultur wurde nach dieser Inkubationszeit vollkommen in eine 2 L Expressionskultur (TB-Medium, 50 µg mL<sup>-1</sup> Kan) überführt. Die Optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) der Expressionskultur wurde nun zum Zeitpunkt 0 sowie alle 30 min bestimmt. Bei einer optischen Dichte zwischen 0,6 und 0,7 wurde die Kultur auf 18 °C heruntergekühlt und es wurden 0,2 mM IPTG hinzugegeben. Die Kultur wurde danach noch weitere 18 h bei 18 °C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur durch Zentrifugation bei 6000 rpm geerntet und bis zur Reinigung bei -20 °C gelagert.

---

<sup>d</sup>MPI für molekulare Physiologie (Dortmund)

## *Proteinreinigung*

### **5.6.2 Heterologe Expression in Insektenzellen**

Es folgt die Beschreibung für die Expression in Sf9-Insektenzellen mittels Baculovirus transfection.

#### **5.6.2.1 Generierung von P3-Vieren**

Zur Generierung von P3-Vieren wurden 50 mL einer Kultur mit einer OD<sub>600</sub> von 1 mit 50 µL P2-Virus versetzt und solange bei 27 °C inkubiert, bis die Mortalitätsrate der Zellen über 30% lag. Im Anschluss wurde die Kultur über einen 0,22 µm Filter geklärt. Der Durchfluss wurde im Anschluss für die Expressionen bei 4 °C unter Ausschluss von Licht gelagert.

#### **5.6.2.2 Test-Expression in Insektenzellen**

Für die Testexpression wurden 50 mL einer Sf9 Kultur mit einer optischen Dichte von 3 mit 1 mL P3-Virus versetzt. Anschließend wurde die Kultur bei 27 °C weiter inkubiert. Vor der Zugabe des Virus, sowie alle 24 h danach, wurden jeweils Proben für die SDS-PAGE genommen.

#### **5.6.2.3 Expression in Insektenzellen**

Für die Testexpression wurden 1,6 L einer Sf9 Kultur mit einer optischen Dichte von 3 mit 50 mL P3-Virus versetzt. Anschließend wurde die Kultur bei 27 °C für die zuvor ermittelte Dauer weiter inkubiert. Im Anschluss wurde die Kultur durch Zentrifugation bei 3000 rpm geerntet und bis zur Reinigung bei -78 °C gelagert.

## **5.7 Proteinreinigung**

Beschreibung der einzelnen Reinigungsschritte zur Reinigung von Proteinkonstrukten. Die angegebenen Puffer stellen die Standardpuffer dar. Abweichungen sind im Abschnitt 3 erwähnt.

### **5.7.1 Zellyse**

Das gefrorene Zellpellet wurde mit dem 3- bis 4-fachen Volumen des Puffers A des ersten Reinigungsschrittes resuspendiert.

Zusätzlich erfolgte die Zugabe von Benzonase (die entsprechend der Herstellerangaben dosiert wurde) und bei der Zellyse von Insektenzellen erfolgte die Zugabe eines Protease-Inhibitors. Im Anschluss wurde die Suspension mittels Hochdruckhomogenisators in 10 Zyklen lysiert. Das Lysat wurde im folgenden mittels Zentrifugation bei 45000 g bei 4 °C für 60 min von den unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennt. Der lösliche Überstand wurde abgenommen und mittels 0,45 µm Filter weiter geklärt. Mit dem so geklärten Lysat wurde dann die Aufreinigung durchgeführt.

### 5.7.2 Reinigung mittels Ni-Affinitätschromatografie

Für die Reinigung mittels Ni-Affinitätschromatografie wurde das FPLC-System Äkta-Purifier der Firma GE benutzt. Die Ni-Affinitätssäule wurde dazu mit zwei Säulenvolumen Puffer A äquilibriert und anschließend wurde die Säule mit Hilfe der Samplepump bei einem Fluss von 2 mL/min beladen. Die Probe wurde mit einem Gradienten von 50 % Puffer B in 30 min eluiert und in mehreren Fraktionen aufgefangen.

**Puffer A:** 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 25 mM Imidazol, 5 % Glycerol, 1 mM DTT, pH 8

**Puffer B:** 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 5 % Glycerol, 1 mM DTT, pH 8

### 5.7.3 Reinigung mittels GST-Affinitätschromatografie

Für die Reinigung mittels GST-Affinitätschromatografie wurde das FPLC-System Äkta-Purifier der Firma GE benutzt. Die GST-Affinitätssäule wurde dazu mit zwei Säulenvolumen Puffer A äquilibriert und anschließend wurde die Säule mit Hilfe der Samplepump bei einem Fluss von 0.5 mL/min beladen. Die Probe wurde Puffer B bei einem Fluss von 5 ml/min eluiert und in mehreren Fraktionen aufgefangen.

**Puffer A:** 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 % Glycerol, 1 mM DTT, pH 8

## Proteinreinigung

**Puffer B:** 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM Glutathion, 5 % Glycerol, 1 mM DTT, pH 8

### 5.7.4 Reinigung mittels MBP-Affinitätschromatografie

Für die Reinigung mittels MBP-Affinitätschromatografie wurde das FPLC-System Äkta-Purifier der Firma GE benutzt. Die MBP-Affinitätssäule wurde dazu mit zwei Säulenvolumen Puffer A äquilibriert und anschließend wurde die Säule mit Hilfe der Samplepump bei einem Fluss von 1 mL/min beladen. Die Probe wurde Puffer B bei einem Fluss von 5 ml/min eluiert und in mehreren Fraktionen aufgefangen.

**Puffer A:** 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 % Glycerol, 1 mM DTT, pH 8

**Puffer B:** 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 10 mM Glutathion, 5 % Glycerol, 1 mM DTT, pH 8

### 5.7.5 Reinigung mittels Ionenaustauscherchromatografie

Für die Reinigung mittels Ionenaustauscherchromatografie wurde das FPLC-System Äkta-Purifier der Firma GE benutzt. Abhängig vom pI des jeweiligen Proteins wurde entweder eine Anionen- ( $pI \leq 8$ ) oder Kationenaustauscherchromatografie ( $pI \geq 8$ ) genutzt. Die Ionenaustauschersäule wurde dazu zuerst mit 5 Säulenvolumen Puffer A äquilibriert und anschließend wurde die Säule mit Hilfe des Samplepump mit einem Fluss von  $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  beladen. Die Probe wurde im Anschluss mit einem Gradienten von 0-100 % Puffer B innerhalb von 60 min eluiert und in mehreren Fraktionen aufgefangen.

**Puffer A (Anionenaustauscher):** 50 mM Tris, 5 % Glycerol, 1 mM DTT, pH 9

**Puffer A (Kationenaustauscher):** 50 mM Tris, 5 % Glycerol, 1 mM DTT, pH 7

**Puffer B (Anionenaustauscher):** 50 mM Tris, 1000 mM NaCl, 5 % Glycerol, 1 mM DTT, pH 9  
**Puffer B (Kationenaustauscher):** 50 mM Tris, 1000 mM NaCl, 5 % Glycerol, 1 mM DTT, pH 7

### **5.7.6 Reinigung mittels Größenausschlusschromatografie**

Für die Reinigung mittels Größenausschlusschromatografie wurde das FPLC-System Äkta-Purifier der Firma GE benutzt. Die Gefisäule wurde dazu mit zwei Säulenvolumen Puffer A äquilibriert und anschließend wurde die Säule mit Hilfe einer Spritze beladen.

## Biochemische Charakterisierung

Dabei wurde abhängig von der Säule entweder 2 mL oder 500  $\mu\text{L}$  auf die Säule gegeben. Die Probe wurde dann mit einem Fluss von  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  eluiert und in mehreren Fraktionen aufgefangen.

**Puffer A:** 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 % Glycerol, 1 mM DTT, pH 8

## 5.8 Biochemische Charakterisierung

Es folgt die Durchführung der verschiedenen biochemischen Charakterisierungen.

### 5.8.1 Radiometrischer Filter Bindungs-Assay

Die Experimente fanden in dem Isotopenlabor der Arbeitsgruppe von Prof. SUMMERER an der TU-Dortmund, und in dem Isotopenlabor des Max-Planck Institutes für molekulare Physiologie in Dortmund, statt.

Die Reaktionen wurden in einem Volumen von  $V = 50 \mu\text{L}$  durchgeführt. Dazu wurde das Substrat und die Kinase zusammen in den entsprechenden Konzentrationen in Reaktionspuffer (60 mM HEPES-NaOH, bei pH 7,5; 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 3 mM  $\text{MnCl}_2$ ; 3  $\mu\text{M}$  Natriumorthovanadat; 1,2 mM DTT;  $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) gelöst. Anschließend wurde eine Mischung aus ATP und  $^{32}\text{P}$ -ATP ( $10 \text{ mCi} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) im Verhältnis 100:3 angesetzt. Nun wurden 40  $\mu\text{L}$  der Kinase-Substrat Mischung in eine Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben, dazu wurden 5  $\mu\text{L}$  10 %iges DMSO gegeben und im Anschluss 5  $\mu\text{L}$  der ATP Mischung. Die Reaktionslösung wurde kurz geschüttelt und anschließend für eine Stunde bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Durch Zugabe von 10  $\mu\text{L}$  10 %iger Phosphorsäure wurde die Reaktion gestoppt. Es wurden 10  $\mu\text{L}$  der Reaktionslösung auf eine P81 Phosphocellulose Membran gegeben. Diese wurde dann drei mal mit 10 %iger Phosphorsäure gewaschen und anschließend mit Aceton getrocknet. Diese wurden im Anschluss direkt in ein Auslesegefäß überführt. Durch Zugabe von destilliertem Wasser konnte die Probe dann in einem Scintillationszähler am MPI, bei einer Auslesezeit von einer Minute, ausgelesen werden.

### 5.8.1.1 Aufsetzten eines Radiometrischen Filter Bindungs-Assays

Zur Bestimmung der idealen Zusammensetzung sowie Dauer der Kinasereaktion wurde eine Optimierung durchgeführt.

**Kinasetitration** Bei der Kinasetitration wurde eine maximale Konzentration der Kinase eingesetzt (477 nM) und diese in 7 weiteren Schritten jeweils um den Faktor 3 mit der Reaktionslösung verdünnt. Anschließend wurde wie zuvor beschrieben fortgefahren.

**Bestimmung der Reaktionszeit** Zur Bestimmung der Reaktionszeit wurde die zuvor Beschriebene Reaktion bei verschiedenen Zeitpunkten (0, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 und 300 min) durch die Zugabe von Phosphorsäure gestoppt. Bis zum vollständigen beenden der Reaktion bei dem letzten Zeitpunkt  $t = 300$  min, wurden die getrockneten Membranen jeweils in ihren Auslesegefäßen aufbewahrt.

### 5.8.2 Transcreener® ADP<sup>2</sup> FP Assay

Die Durchführung erfolgte anhand der Technischen Anleitung zu dem Transcreener® ADP<sup>2</sup> FP Assay.

Die Reaktionen wurden in einer schwarzen 384 Well Platte mit einem Reaktionsvolumen von 10  $\mu$ L durchgeführt. Dazu wurden die Kinase (Kinase-Lösung), sowie ATP und Substrat (Start-Lösung) jeweils in Reaktionspuffer (35 mM HEPES, bei pH 7,5; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01 %Brij-25) verdünnt 5  $\mu$ L Kinaselösung mit 4  $\mu$ L Start-Lösung und 1  $\mu$ L DMSO vermischt und für eine Stunde bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 10  $\mu$ L der Detektionslösung (20 mM HEPES, bei pH 7,5; 40 mM EDTA; 0,01 %Brij-25; Antikörper und *Tracer*) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei Raumtemperatur wurde die Fluoreszenzpolarisation mit einem Tecan Infinite® M1000 Plattenlesegerät bestimmt.

#### 5.8.2.1 Aufsetzten des Transcreener® ADP<sup>2</sup> FP Assays

Zur Bestimmung der idealen Zusammensetzung sowie Dauer der Kinasereaktion wurde eine Optimierung durchgeführt.

**Bestimmung der Konzentration des ADP<sup>2</sup>-Antikörpers** Die Bestimmung der idealen Konzentration des ADP<sup>2</sup>-Antikörpers erfolgte anhand der Anleitung.

**Kinasetitration** Bei der Kinasetitration wurde eine maximale Konzentration der Kinase von 110 nM, eingesetzt) und diese in 11 weiteren Schritten jeweils um den Faktor 2 mit der Reaktionslösung verdünnt (siehe Tabelle 5.3). Anschließend wurde wie zuvor beschrieben fortgefahren.

**Tabelle 5.3:** Verdünnungsschritte für die Kinasetitration beim Aufsetzen des Transcreener<sup>®</sup> ADP<sup>2</sup> FP Assays.

Verdünnung	Konzentration <i>c</i> in nM
0	110,00
1	55,00
2	27,50
3	13,75
4	6,88
5	3,44
6	1,72
7	0,86
8	0,43
9	0,21
10	0,11
11	0,05

**Bestimmung der Reaktionszeit** Zur Bestimmung der Reaktionszeit wurde die zuvor Beschriebene Reaktion bei verschiedenen Zeitpunkten durch die Zugabe Detektionslösung gestoppt (siehe Tabelle 5.4). Hierbei wurde der *Tracer* in einem separaten Schritt hinzugegeben um den Fluorophor vor dem Ausbleichen zu schützen.

**Tabelle 5.4:** Zeitschritte für die Bestimmung der Reaktionszeit beim Aufsetzen des Transcreener<sup>®</sup> ADP<sup>2</sup> FP Assays.

Reaktionszeitschritt	Reaktionszeit $t$ in min
0	0
1	2
2	5
3	10
4	20
5	40
6	60
7	90

### 5.8.3 ADP-Glo Assay

Die Durchführung des ADP-Glo Assays erfolgte anhand der Anleitung für den Assay. Zur Bestimmung der optimalen Bedingungen bei der Durchführung des ADP-Glo Assays wurden verschiedene Optimierungsschritte durchgeführt. Dazu zählen die Bestimmung der idealen Kinasekonzentration sowie die Bestimmung der optimalen Reaktionszeit und -Temperatur und der Konzentrationen an ATP und Substrat. Als Substrat für diesen Assay wurde eine Inaktivitätsmutante von JNK1 verwendet.

**Bestimmung der Kinasekonzentration** Für die Bestimmung der optimalen Konzentration der Kinase wurde eine Verdünnung von 1:2 der Kinase von 5000 nM bis zu 0,15 nM durchgeführt. Es wurden die Daten einmal ohne Anwesenheit des Substrats, mit 1  $\mu$ M Substrat und eine Reihe nur mit Substrat der gleichen Verdünnungsreihe aufgenommen.

Verdünnung	Konzentration $c$ in nM
0	5000,00
1	2500,00
2	1250,00
3	625,00
4	312,50
5	156,25
6	78,13
7	39,06
8	19,53
9	9,77
10	4,88
11	2,44
12	1,22
13	0,61
14	0,31
15	0,15

**Tabelle 5.5:** Eingesetzte Konzentrationen bei der Bestimmung der idealen Kinase-Konzentration für den ADP-Glo Assay.

**Bestimmung der Reaktionszeit** Für die Bestimmung der Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Zugabe des ADP-Glo Reagenz zu den verschiedenen Zeitpunkten (Tabelle 5.6) gestoppt. Die Zugabe des Kinase Detektions Reagenz erfolgte jeweils nach 40 min.

Zeitpunkt	Zeit in min
0	0
1	1
2	3
3	5
4	10
5	30
6	60
7	90
8	120
9	180

**Tabelle 5.6:** Reaktionszeiten für die Bestimmung der idealen Reaktionszeit für den ADP-Glo Kinaseassay

**Bestimmung von ATP und Substrat  $K_M$**  Für die Bestimmung der idealen Konzentrationen für das Substrat und das ATP wurden Konzentrationsreihen der jeweiligen Bestandteile durchgeführt (Tabelle ).

Verdünnung	Substrat Konzentration $c$ in $\mu\text{M}$	ATP Konzentration $c$ in $\mu\text{M}$
0	50,00	1000,00
1	28,95	500,00
2	14,48	250,00
3	7,24	125,00
4	3,62	62,50
5	1,81	31,25
6	0,90	15,63
7	0,45	7,81
8	0,23	3,91
9	0,11	1,95
10	0,06	0,98
11	0,03	0,00

**Tabelle 5.7:** Reaktionszeiten für die Bestimmung der idealen Reaktionszeit für den ADP-Glo Kinaseassay

**Bestimmung von  $IC_{50}$ -Werten** Für die Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte wurden die zuvor ermittelten Konzentrationen und Bedingungen des ADP-Glo Assays eingesetzt und die Kinase zuvor mit verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Bedingung inkubiert. Die Inkubationszeit betrug dabei 30 Minuten. Um die verschiedenen Konzentrationen der Verbindung zu erhalten, wurden entweder manuell Verdünnungsreihen in DMSO angesetzt oder der Pipettierroboter ECHO510 eingesetzt.

Der Assay wurde in weißen 384 Well Platten der Firma Greiner durchgeführt. Zuerst wurde dabei 2.5  $\mu\text{L}$  der Kinase-Lösung vorgelegt, zu der entweder 1  $\mu\text{L}$  der manuell angesetzten Verdünnungsreihe hinzugegeben wurde, oder 100 nL der Verdünnungsreihe mit dem ECHO510. Dann wurde die Platte in einer gesättigten Umgebung für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1.5  $\mu\text{L}$  (2.4  $\mu\text{L}$ ) Start-Lösung hinzugegeben und für weitere 60 Minuten inkubiert. Darauf folgte die Zugabe von 5  $\mu\text{L}$  des ADP-Glo Reagenz und weitere Inkubation für 60 Minuten. Im letzten Schritt wurden 10  $\mu\text{L}$  des *Detection-Reagent* hinzugegeben und noch einmal für 60 Minuten inkubiert. Danach wurde die Platte mit dem Tecan M1000 mit einem Lumineszenz Programm ausgelesen.

## Cov-Click

Die erhaltenen Werte wurden mit Quattro-Workflow oder XLfit5 ausgewertet.

## 5.9 Massenspektrometrische Untersuchungen

Zur Identifikation des kovalenten Bindungsmodus wurden Massenspektrometrische Untersuchungen durchgeführt. Dazu wurde das Protein mit einer Konzentration von 1 mg/mL (30  $\mu$ M) mit dem dreifachen molaren Überschuss an Compound versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde zentrifugiert und der Überstand wurde für die Messungen verwendet.

Das Spektrum wurde auf einem VelosPro IonTrap<sup>e</sup> mit einer EC50/3 Nucleodur C18 1.8  $\mu$ m Säule<sup>f</sup> und einem Gradienten der mobilen Phase von A(0,1 % Ameisensäure in Wasser) zu B(0,1 % Ameisensäure in Acetonitril) aufgenommen. Die Visualisierung der Ergebnisse wurde XCalibur und MagTran verwendet

## 5.10 Cov-Click

Für die Cov-Click Versuche wurde Protein mit einer Konzentration von 1 mg mL<sup>-1</sup> in einem Reaktionsgefäß auf Eis vorgelegt. Es folgte die Zugabe des kovalenten Bausteins (Verbindung **4**) in einem molaren Verhältnis von 1:3. Die Mischung wurde durch mehrfache Inversion durchmischt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde der Azidbaustein hinzugegeben und die Mischung erneut durch mehrfache Inversion durchmischt. Dabei wurden die Reaktionsbedingungen wie in Tabelle 5.8 variiert.

Reaktionsbedingung	Variation
Verhältnis Protein: Azidbaustein	1:3, 1:10, 1:25 und 1:50
Reaktionstemperatur	0, 20, 25 ,37 °C
Reaktionszeit	1, 2, 3, 5, 16, 24, 48 h

**Tabelle 5.8:** Verschiedene getestete Reaktionsbedingungen für die Durchführung des zweiten Schrittes der Cov-Click-Ansätze.

<sup>e</sup>Thermo Scientific

<sup>f</sup>Machery and Nagel

## **5.11 Proteinkristallisation**

### **5.11.1 Screen nach neuen Kristallisationsbedingungen**

Zum bestimmen neuer Kristallisationsbedingungen wurde ein Screening mit bereits bekannten und häufig erfolgreichen Kristallisationsbedingungen durchgeführt. Dazu wurde die Kristallisation in einer 96 Well Platte (TTP-Labtech) angesetzt. Zuerst wurden pro Well 70  $\mu\text{L}$  einer Reservoirlösung vorgelegt. Anschließend wurde die Protein-Lösung in einer 96 Well Platte vorgelegt und 100 nL der Protein-Lösung mit 100 nL der Reservoirlösung vermischt. Anschließend wurde die Platte luftdicht versiegelt und zur Beobachtung der Kristallisation in einem Plattenhotel gelagert.

### **5.11.2 Ansetzten von Kristallisationen**

Die Kristallisation wurde in EasyXtal 15-Well Tool Platten angesetzt. Dazu wurde jede Kavität mit 500  $\mu\text{L}$  Reservoirlösung gefüllt. Die Platte wurde verschlossen und für 15 Minuten bei 500 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Platte auf die gewünschte Temperatur inkubiert.

Das Ansetzen der Kristallisationsansätze erfolgte auf dem Deckel der Platten. Dazu wurde 1  $\mu\text{L}$  der Reservoirlösung vorgelegt und zu diesem 1  $\mu\text{L}$  der Protein-Lösung gegeben. Dies wurde für alle Ansätze einer Kavität durchgeführt. Anschließend wurde die Kavität mit dem Deckel luftdicht verschlossen.

Nachdem dies für die gesamte Platte durchgeführt wurde, folgte eine erste Sichtung der Ansätze sowie eine Fotodokumentation im Falle von positiven Ergebnissen. Zur Lagerung wurde die Platte dann bei der gewünschten Temperatur gelagert und in regelmäßigen Zeitabständen einer Sichtung sowie Fotodokumentation unterzogen.

## **5.12 Lösen der dreidimensionalen Struktur**

### **5.12.1 Aufnahme der Diffraktionsbilder**

#### **5.12.1.1 Testaufnahme der Diffraktionsbilder**

Die in Abschnitt 5.11.2 erzeugten Kristalle wurden Zunächst an der Drehanode der Firma Bruker am MPI für molekulare Physiologie auf ihr Streuverhalten ge-

## Lösen der dreidimensionalen Struktur

testet. Dazu wurden jeweils 2 Bilder im Abstand von  $90^\circ$  aufgenommen, mit einer Belichtungszeit von 5 min. Im Anschluss wurden, sofern Diffraction beobachtet werden konnte, unter zu Hilfenahme des Programms *iMosflm* die Zellparameter des Kristalls bestimmt. Diese wurden dann genutzt, um für die Datenaufnahme an der *Swiss Light Source* (SLS) eine Strategie vorzuschlagen, und um die Kristalle nach ihrer Qualität zu ordnen

### 5.12.1.2 Aufnahme von Diffraktionsbildern an der Swiss Light Source

Die Eigentliche Aufnahme von Diffraktionsbildern für die Datensätze wurde an der SLS durchgeführt. Dort wurden die Kristalle erneut getestet und im Anschluss wurde eine Strategie zur Datenaufnahme, anhand der Kristallparameter erzeugt.

### 5.12.2 Datenverarbeitung

Jeder Datensatz wurde zunächst mit Hilfe des Programms *X-ray Detector Software* (XDS)<sup>88,89</sup> bearbeitet. Dazu wurde die Input Datei an die Messbedingungen angepasst, wobei die Wellenlänge, der Detektorabstand, sowie Bilderzahl eingestellt wurden. Zunächst wurden dafür nur etwa 100 Bilder gewählt um die Zellparameter zu bestimmen. Anschließend wurden diese ebenfalls in die Input Datei geschrieben und das Programm wurde über die gesamte Bilderzahl gerechnet. Mit den so reduzierten Informationen wurde der Datensatz mit dem Programm *XScale* skaliert und die Auflösungsgrenzen wurden bestimmt. Dazu wurde das Programm zunächst mit Standardauflösungsgrenzen von 50-1.5 Å durchlaufen. Im Nachhinein wurde die Logdatei überprüft und die Auflösungsgrenzen so angepasst, dass die Entsprechenden Kristallografischen Werte innerhalb der erlaubten Grenzen liegen.

**Tabelle 5.9:** Allgemeine Grenzen für die Bestimmung der Auflösungsgrenzen für einen Röntgenkristallografischen Datensatz.<sup>90</sup>

Kristallografischer Parameter	Grenzen
Signalstärke / $I \cdot \sigma^{-1}$	$\geq 2$
$R_{\text{meas}}$	$\leq 80\%$
$CC_{\frac{1}{2}}$	$\geq 0.5$

Nachdem die Auflösungsgrenzen geändert wurden, wurde das Programm XScale erneut gestartet, und die Werte erneut überprüft. Wenn diese die entsprechenden Kriterien erfüllt hatten, wurde eine Konvertierung der Reflexdatei in ein passendes Format für die Weiterverarbeitung mit Hilfe von XDSCConv durchgeführt. Mit der so erzeugten .MTZ Datei wurde anschließend der Molekulare Ersatz durchgeführt. Bei dem Molekularen Ersatz werden die für die Bestimmung der Elektronendichtekarten benötigten Phasen mit Hilfe einer bereits gelösten Kristallstruktur bestimmt. Wie genau dies funktioniert wurde bereits im Abschnitt 1.5.1 beschrieben. Durch den molekularen Ersatz mit der Struktur 2DYL, konnte dann eine Elektronendichtekarte erzeugt werden.

### 5.12.3 Refinement

Die zuvor erzeugte Elektronendichtekarte wurde zusammen mit dem Model, also in diesem Fall 2DYL mit Hilfe des Programms *Phenix.refine*, das erste mal verfeinert (siehe Abschnitt 1.5.1). Daraufhin wurden die Aminosäure Seitenketten der entsprechenden Sequenz des Tatsächlich verwendeten Proteins angepasst und ihre Konformation entsprechend der Elektronendichtekarte ausgerichtet. Im Anschluss wurde erneut ein Refinement durchgeführt, woraus sich eine angepasste Elektronendichtekarte mit verbesserten Fehlerwerten ergab. Dieser Prozess wurde iterativ durchgeführt, bis keine weitere Verbesserung der Fehlerwerte möglich war. Danach folgte der Einbau von Liganden, Wassermolekülen sowie anderen Atomen. Hier wurde ebenfalls iterativ so lange angepasst, bis eine Verbesserung der Fehlerwerte nicht mehr möglich war. Danach wurden die Bindungswinkel, der Seitenketten sowie die Diederwinkel des Proteinrückgrats mit Hilfe von Ramachandran- und Rotameranalysen überprüft und entsprechend den erlaubten Winkelbereichen angepasst. Am Ende des Refinements sollte eine Struktur mit minimalen Fehlerwerten für das Refinement sowie ohne Fehler bei den Bindungs- und Diederwinkeln entstanden sein.



## Literaturverzeichnis

- [1] R. Baskaran, B. K. Velmurugan, *Life sciences* **2018**.
- [2] A. G. Knudson, *Cancer research* **1985**, 45(4), 1437–1443.
- [3] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, S. Sudarsanam, *Science (New York, N.Y.)* **2002**, 298(5600), 1912–1934.
- [4] G. Manning, *WormBook : the online review of C. elegans biology* **2005**, 1–19.
- [5] N. Dhanasekaran, E. Premkumar Reddy, *Oncogene* **1998**, 17(11 Reviews), 1447–1455.
- [6] V. Reiterer, P. A. Eyers, H. Farhan, *Trends in cell biology* **2014**, 24(9), 489–505.
- [7] M. van Meter, M. Simon, G. Tomblin, A. May, T. D. Morello, B. P. Hubbard, K. Bredbenner, R. Park, D. A. Sinclair, V. A. Bohr, V. Gorbunova, A. Seluanov, *Cell Rep* **2016**, 16(10), 2641–2650.
- [8] S. K. Hanks, A. M. Quinn, T. Hunter, *Science (New York, N.Y.)* **1988**, 241(4861), 42–52.
- [9] A. Weiss, D. R. Littman, *Cell* **1994**, 76(2), 263–274.
- [10] E. D. Scheeff, P. E. Bourne, *PLoS computational biology* **2005**, 1(5), e49.
- [11] S. K. Hanks, T. Hunter, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **1995**, 9(8), 576–596.
- [12] S. K. Hanks, A. M. Quinn, *Methods in enzymology* **1991**, 200, 38–62.
- [13] K. R. Keyloun, M. C. Reid, R. Choi, Y. Song, A. M. W. Fox, H. K. Hillesland, Z. Zhang, R. Vidadala, E. A. Merritt, A. O. T. Lau, D. J. Maly, E. Fan, L. K. Barrett, W. C. van Voorhis, K. K. Ojo, *Parasitology* **2014**, 141(11), 1499–1509.

## Literaturverzeichnis

- [14] D. R. Knighton, J. H. Zheng, L. F. ten Eyck, V. A. Ashford, N. H. Xuong, S. S. Taylor, J. M. Sowadski, *Science (New York, N.Y.)* **1991**, 253(5018), 407–414.
- [15] L. M. Toledo, N. B. Lydon, D. Elbaum, *Current medicinal chemistry* **1999**, 6(9), 775–805.
- [16] D. K. Treiber, N. P. Shah, *Chemistry & biology* **2013**, 20(6), 745–746.
- [17] S. B. Hari, E. A. Merritt, D. J. Maly, *Chemistry & biology* **2013**, 20(6), 806–815.
- [18] Y. Liu, N. S. Gray, *Nature chemical biology* **2006**, 2(7), 358–364.
- [19] B. Alberts, *Molecular biology of the cell*, 5. Aufl., Garland Science, New York, **2008**.
- [20] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, B. Häcker, *Biochemie*, korr. nachdr. der 6. Aufl., Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, **2011**.
- [21] A. J. Cozzone, *Annual review of microbiology* **1988**, 42, 97–125.
- [22] M. Uhart, G. Flores, D. M. Bustos, *Scientific reports* **2016**, 6, 26234.
- [23] F. Ardito, M. Giuliani, D. Perrone, G. Troiano, L. Lo Muzio, *International journal of molecular medicine* **2017**, 40(2), 271–280.
- [24] G. Pearson, F. Robinson, T. Beers Gibson, B. E. Xu, M. Karandikar, K. Berman, M. H. Cobb, *Endocrine reviews* **2001**, 22(2), 153–183.
- [25] L.-R. Yu, H. J. Issaq, T. D. Veenstra, *Proteomics. Clinical applications* **2007**, 1(9), 1042–1057.
- [26] J. M. Heuckmann, D. Rauh, R. K. Thomas, *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2012**, 30(27), 3417–3420.
- [27] C. Rosette, M. Karin, *Science (New York, N.Y.)* **1996**, 274(5290), 1194–1197.
- [28] D. Lake, S. A. L. Corrêa, J. Müller, *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **2016**, 73(23), 4397–4413.
- [29] L. Rusnak, H. Fu, *Advances in biological regulation* **2017**, 66, 23–30.

- [30] A. Reményi, M. C. Good, R. P. Bhattacharyya, W. A. Lim, *Molecular cell* **2005**, 20(6), 951–962.
- [31] R. J. Davis, *Molecular reproduction and development* **1995**, 42(4), 459–467.
- [32] Y. T. Ip, R. J. Davis, *Current opinion in cell biology* **1998**, 10(2), 205–219.
- [33] M. C. Wang, D. Bohmann, H. Jasper, *Developmental Cell* **2003**, 5(5), 811–816.
- [34] A. M. Bode, Z. Dong, *Molecular carcinogenesis* **2007**, 46(8), 591–598.
- [35] S. Vlahopoulos, V. C. Zoumpourlis, *Biochemistry. Biokhimiia* **2004**, 69(8), 844–854.
- [36] Y. T. Ip, R. J. Davis, *Current opinion in cell biology* **1998**, 10(2), 205–219.
- [37] X. Wang, A. Destrumont, C. Tournier, *Biochimica et biophysica acta* **2007**, 1773(8), 1349–1357.
- [38] J. Yasuda, A. J. Whitmarsh, J. Cavanagh, M. Sharma, R. J. Davis, *Molecular and Cellular Biology* **1999**, 19(10), 7245–7254.
- [39] D. Nihalani, H. N. Wong, L. B. Holzman, *J Biol Chem* **2003**, 278(31), 28694–28702.
- [40] D. Yan, G. An, M. T. Kuo, *Journal of cellular and molecular medicine* **2016**, 20(11), 2013–2019.
- [41] J. Tian, J. Locker, *Advances in experimental medicine and biology* **2013**, 793, 69–80.
- [42] W. Haeusgen, T. Herdegen, V. Waetzig, *European journal of cell biology* **2011**, 90(6-7), 536–544.
- [43] R. Yarza, S. Vela, M. Solas, M. J. Ramirez, *Frontiers in pharmacology* **2015**, 6, 321.
- [44] C. Davies, C. Tournier, *Biochemical Society transactions* **2012**, 40(1), 85–89.
- [45] D. T. Ho, A. J. Bardwell, M. Abdollahi, L. Bardwell, *J Biol Chem* **2003**, 278(35), 32662–32672.

Literaturverzeichnis

- [46] M. Raman, W. Chen, M. H. Cobb, *Oncogene* **2007**, 26(22), 3100–3112.
- [47] E. de Smaele, F. Zazzeroni, S. Papa, D. U. Nguyen, R. Jin, J. Jones, R. Cong, G. Franzoso, *Nature* **2001**, 414(6861), 308–313.
- [48] D. A. Liebermann, B. Hoffman, *Journal of molecular signaling* **2008**, 3, 15.
- [49] R. L. Openshaw, D. M. Thomson, J. M. Penninger, J. A. Pratt, B. J. Morris, *Psychopharmacology* **2017**, 234(2), 293–305.
- [50] T. Yamasaki, N. Deki-Arima, A. Kaneko, N. Miyamura, M. Iwatsuki, M. Matsuoka, N. Fujimori-Tonou, Y. Okamoto-Uchida, J. Hirayama, J. D. Marth, Y. Yamanashi, H. Kawasaki, K. Yamanaka, J. M. Penninger, S. Shibata, H. Nishina, *Scientific reports* **2017**, 7(1), 7348.
- [51] T. Ueda, Y. Kohama, A. Kuge, E. Kido, H. Sakurai, *Archives of biochemistry and biophysics* **2017**, 635, 1–7.
- [52] L. Tornatore, D. Marasco, N. Dathan, R. M. Vitale, E. Benedetti, S. Papa, G. Franzoso, M. Ruvo, S. M. Monti, *Journal of molecular biology* **2008**, 378(1), 97–111.
- [53] J. D. Finger, M. A. Busch, Y. Du, C. Heidemann, H. Knopf, R. Kuhnert, T. Lampert, G. B. M. Mensink, H. K. Neuhauser, A. S. Rosario, C. Scheidt-Nave, A. Schienkiewitz, J. Truthmann, B.-M. Kurth, *Deutsches Arzteblatt international* **2016**, 113(42), 712–719.
- [54] J. Haberland, J. Bertz, U. Wolf, T. Ziese, B.-M. Kurth, *BMC cancer* **2010**, 10, 52.
- [55] Robert Koch-Institut, „Inanspruchnahme psychiatrischer und psychotherapeutischer Leistungen – Individuelle Determinanten und regionale Unterschiede“.
- [56] J. C. KENDREW, G. BODO, H. M. DINTZIS, R. G. PARRISH, H. WYCKOFF, D. C. PHILLIPS, *Nature* **1958**, 181(4610), 662–666.
- [57] K. H. Lieser, *Einführung in die Kernchemie*, 3. Aufl., VCH, Weinheim, **1991**.
- [58] W. H. Bragg, W. L. Bragg, *Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **1913**, 88(605), 428–438.

- [59] H. Hauptman, *Current opinion in structural biology* **1997**, 7(5), 672–680.
- [60] I. Usón, G. M. Sheldrick, *Current opinion in structural biology* **1999**, 9(5), 643–648.
- [61] S. E. Ealick, *Current opinion in chemical biology* **2000**, 4(5), 495–499.
- [62] G. Taylor, *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* **2003**, 59(11), 1881–1890.
- [63] Y. Lin, *Expert opinion on drug discovery* **2018**, 13(8), 691–695.
- [64] R. A. Evans, *Australian Journal of Chemistry* **2007**, 60(6), 384.
- [65] H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2001**, 40(11), 2004–2021.
- [66] H. C. Kolb, K. B. Sharpless, *Drug discovery today* **2003**, 8(24), 1128–1137.
- [67] V. V. Rostovtsev, L. G. Green, V. V. Fokin, K. B. Sharpless, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2002**, 41(14), 2596–2599.
- [68] C. Spiteri, J. E. Moses, *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2010**, 49(1), 31–33.
- [69] Patrik Wolle, Masterarbeit, TU-Dortmund, **2014**.
- [70] <https://www.bellbrooklabs.com/products/transcreener-hts-assays/kinase-assays/adp2-assays-fp/>, *BellBrook Labs*, (2018).
- [71] P. Gerwins, J. L. Blank, G. L. Johnson, *J Biol Chem* **1997**, 272(13), 8288–8295.
- [72] H. Li, R. D. Totoritis, L. A. Lor, B. Schwartz, P. Caprioli, A. J. Jurewicz, G. Zhang, *Assay and drug development technologies* **2009**, 7(6), 598–605.
- [73] J. Sanghera, R. Li, J. Yan, *Assay and drug development technologies* **2009**, 7(6), 615–622.
- [74] „ADP-Glo™ Kinase Assay“.

## Literaturverzeichnis

- [75] J. Engel, A. Richters, M. Getlik, S. Tomassi, M. Keul, M. Termathe, J. Lategahn, C. Becker, S. Mayer-Wrangowski, C. Grütter, N. Uhlenbrock, J. Krüll, N. Schaumann, S. Eppmann, P. Kibies, F. Hoffgaard, J. Heil, S. Menninger, S. Ortiz-Cuaran, J. M. Heuckmann, V. Tinnefeld, R. P. Zahedi, M. L. Sos, C. Schultz-Fademrecht, R. K. Thomas, S. M. Kast, D. Rauh, *Journal of medicinal chemistry* **2015**, 58(17), 6844–6863.
- [76] M. L. d. C. Barbosa, L. M. Lima, R. Tesch, C. M. R. Sant'Anna, F. Totzke, M. H. G. Kubbutat, C. Schächtele, S. A. Laufer, E. J. Barreiro, *European journal of medicinal chemistry* **2014**, 71, 1–14.
- [77] S. Singh, D. P. Ballou, R. Banerjee, *Biochemistry* **2011**, 50(3), 419–425.
- [78] J. M. Strelow, *SLAS discovery : advancing life sciences R & D* **2017**, 22(1), 3–20.
- [79] M. Kukimoto-Niino, T. Takagi, T. Kaminishi, T. Uchikubo-Kamo, T. Tera-da, O. Matsuzaki, M. Shirouzu, S. Yokoyama, *Crystal structure of human mitogen-activated protein kinase kinase 7 activated mutant (S287D, T291D)*, **2007**.
- [80] Y. Sogabe, T. Hashimoto, T. Matsumoto, Y. Kirii, M. Sawa, T. Kinoshita, *A crucial role of Cys218 in the stabilization of an unprecedented auto-inhibition form of MAP2K7*, **2016**.
- [81] T. Kinoshita, *Crystal structure of the C276S mutant of MAP2K7*, **2017**.
- [82] Y. Sogabe, Y. Hashimoto, T. Matsumoto, T. Kinoshita, *THE STRUCTURE OF MAP2K7 IN COMPLEX WITH 5Z-7-oxozeaenol*, **2015**.
- [83] D. Plenker, M. Riedel, J. Brägelmann, M. A. Dammert, R. Chauhan, P. P. Knowles, C. Lorenz, M. Keul, M. Bührmann, O. Pagel, V. Tischler, A. H. Scheel, D. Schütte, Y. Song, J. Stark, F. Mrugalla, Y. Alber, A. Richters, J. Engel, F. Leenders, J. M. Heuckmann, J. Wolf, J. Diebold, G. Pall, M. Peifer, M. Aerts, K. Gevaert, R. P. Zahedi, R. Buettner, K. M. Shokat, N. Q. McDonald, S. M. Kast, O. Gautschi, R. K. Thomas, M. L. Sos, *Science translational medicine* **2017**, 9(394).
- [84] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, P. J. Feeney, *Advanced Drug Delivery Reviews* **2001**, 46(1-3), 3–26.

- [85] T. Ryckmans, M. P. Edwards, V. A. Horne, A. M. Correia, D. R. Owen, L. R. Thompson, I. Tran, M. F. Tutt, T. Young, *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2009**, 19(15), 4406–4409.
- [86] J. E. Macor (Hrsg.: ), *Annual reports in medicinal chemistry: Volume 45*, Annual Reports in Medicinal Chemistry, 1. Aufl., Elsevier/Academic Press, Amsterdam, **2010**.
- [87] G. Ottaviani, S. Martel, P.-A. Carrupt, *Journal of medicinal chemistry* **2006**, 49(13), 3948–3954.
- [88] W. Kabsch, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2010**, 66(Pt 2), 133–144.
- [89] W. Kabsch, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2010**, 66(Pt 2), 125–132.
- [90] [http://www.ccp4.ac.uk/schools/DLS-2014/course material/day05/Kay Diederichs Data quality indicators.pdf](http://www.ccp4.ac.uk/schools/DLS-2014/course_material/day05/Kay_Diederichs_Data_quality_indicators.pdf), *Diederichs, K.* **2014**.



## 6 Anhang

### 6.1 Materialien

#### 6.1.1 Verwendete Verbrauchsmaterialien

#### 6.1.2 Verwendete Reagenzien, Nährmedien, Zellen und Kits

[H]	
Verwendet	Hersteller
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen
Spodoptera frugiperda, Sf9 cells in Sf-900 III SFM	ThermoFischer
Escherichia coli XL10 Gold	Stratagene
ADP-Glo Assay	Promega
Transcreener ADP <sup>2</sup> FP Assay	BellBrooks Labs
Pierce Protease Inhibitor Tablets, EDTA-free	ThermoFischer
Benzonase Nuclease	Sigma-Aldrich
PfuUltra II Fusion HS	Agilent Technologies
PageRuler Unstained Protein Ladder	ThermoFischer
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	ThermoFischer
Restriktionsenzyme	New England BioLabs

## 6.2 Geräte

**Tabelle 6.1:** Liste aller verwendeter Geräte.

Gerät	Hersteller (Ort)
Äcta Pure	GE Healthcare Life Sciences (Chicago)
Echo 525	Labcyte(Indianapolis)
EnVison2103	PerkinElmer (Waltham)
TECAN M1000	TECAN (Zürich)
Thermocycler	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge R308	Eppendorf (Hamburg)

## 6.3 Primer

**Tabelle 6.2:** Sequenzierungsprimer.

Bezeichnung	Primer-Sequenz	T <sub>M</sub> °C
T7	5'-TAATACGACTACTATAGG-3'	53,2
T7 term	5'-CTATTATTGCTCAGCGG-3'	54,5

**Tabelle 6.3:** Mutageneseprimer.

Bezeichnung	Primer-Sequenz	T <sub>M</sub> °C
MKK7 S271D, T275D	5'-CACAACTGCGCTACGGTCTT TTGCTTTGTCATCAACCAGACGAC-3'	53,2
MKK7 S271D, T275D rev	5'-GTCGTCTGGTTGATGACAAAG CAAAAGACCGTAGCGCAGGTTGTG-3'	54,5

## 6.4 Protein-Konstrukte

### 6.4.1 MKK7 Kristallisationskonstrukte

#### MKK7 Krist-1

MGHHHHHSAKQTGYLTIGGQRYQAEINDLENLGEMSGTCCGVWKMFRKTGHVIA  
VKQMRRSGNKEENKRILMDLDVVLKSHDCPYIVQCFGTFITNTDVFIAEMLMGTCAE

KLKKRMQGP I P E R I L G K M T V A I V K A L Y Y L K E K H G V I H R D V K P S N I L L D E R G Q I K L C D  
F G I S G R L V D S K A K T R S A G C A A Y M A P E R I D P P D P T K P D Y D I R A D V W S L G I S L V E L A T G  
Q F P Y K N C K T D F E V L T K V L Q E E P P L L P G H M G F S G D F Q S F V K D C L T K D H R K R P K Y N K L L  
E H S F I K R Y E T L E V D V A S W F K D V M A K T E S P R T S G

M: Startmethionin, His<sub>6</sub>-Tag

#### MKK7 Krist-2

MGHHHHHHLESTSLYKKAGSAAAVLEENLYFQ/GKQTGYLTIGGQRYQAEINDLENL  
GEMGSGTCGQVWKMFRKTGHVIAVKQMRSGNKEENKRILMDLDVVLKSHDCPYIV  
QCFGTFTNTDVFIAELMGTCAEKLKKRMQGP I P E R I L G K M T V A I V K A L Y Y L K E K H  
G V I H R D V K P S N I L L D E R G Q I K L C D F G I S G R L V D D K A K D R S A G C A A Y M A P E R I D P P D P  
T K P D Y D I R A D V W S L G I S L V E L A T G Q F P Y K N C K T D F E V L T K V L Q E E P P L L P G H M G F S G  
D F Q S F V K D C L T K D H R K R P K Y N K L L E H S F I K R Y E T L E V D V A S W F K D V M A K T E S P R T S G

M: Startmethionin, His<sub>6</sub>-Tag, TEV-Schnittstelle

#### MKK7 Krist-3

MGHHHHHHS AKQTGYLTIGGQRYQAEINDLENL GEMGSGTCGQVWKMFRKTGHVIA  
VKQMRSGNKEENKRILMDLDVVLKSHDCPYIVQCFGTFTNTDVFIAELMGTCAE  
KLKKRMQGP I P E R I L G K M T V A I V K A L Y Y L K E K H G V I H R D V K P S N I L L D E R G Q I K L C D  
F G I S G R L V D D K A K D R S A G C A A Y M A P E R I D P P D P T K P D Y D I R A D V W S L G I S L V E L A T G  
Q F P Y K N C K T D F E V L T K V L Q E E P P L L P G H M G F S G D F Q S F V K D C L T K D H R K R P K Y N K L L  
E H S F I K R Y E T L E V D V A S W F K D V M A K T E S P R T S G

M: Startmethionin, His<sub>6</sub>-Tag, S271D,T275D

#### MKK7 Krist-4

MGHHHHHHLESTSLYKKAGSAAAVLEENLYFQ/GKQTGYLTIGGQRYQAEINDLENL  
GEMGSGTCGQVWKMFRKTGHVIAVKQMRSGNKEENKRILMDLDVVLKSHDCPYIV  
QCFGTFTNTDVFIAELMGTCAEKLKKRMQGP I P E R I L G K M T V A I V K A L Y Y L K E K H  
G V I H R D V K P S N I L L D E R G Q I K L C D F G I S G R L V D D K A K D R S A G C A A Y M A P E R I D P P D P  
T K P D Y D I R A D V W S L G I S L V E L A T G Q F P Y K N C K T D F E V L T K V L Q E E P P L L P G H M G F S G  
D F Q S F V K D C L T K D H R K R P K Y N K L L E H S F I K R Y E T L E V D V A S W F K D V M A K T E S P R T S G

## Protein-Konstrukte

M: Startmethionin, His<sub>6</sub>-Tag, TEV-Schnittstelle, S271D,T275D

### 6.4.2 MKK7 Assaykonstrukte

#### MKK7 $\beta$ 1

MGSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGIPGLDGIYARTENLYFQ/GAMAASSLEQKLSR  
LEAKLKQENREARRRIDLNLDISPQRPRPTLQLPLANDGGSRSPPSESSPQHPTPPA  
RPRHMLGLPSTLFTPRSMESIEIDQKLQEIMKTGYLTIGGQRYQAEINDLENLGEMG  
SGTCGQVWKMFRKTGHVIAVKQMRRSGNKEENKRILMDLDVVLKSHDCPYIVQCFG  
TFITNTDVFIAEELMGTCAEKLLKRMQGP IPERILGKMTVAIVKALYYLKEKHGV IH  
RDVKPSNILLDERGQIKLCDFGISGRLVDSKAKTRSAGCAAYMAPERIDPPDPTKPD  
YDIRADVWSLGISLVELATGQFPYKNCKTDFEVLTKVLQEEPPLLPGHMGFSGDFQS  
FVKDCLTKDHRKRPKYNKLEHSFIKRYETLEVDVASWFKDVMAKTESPRTSGVLSQ  
PHLPFFR

M: Startmethionin, His<sub>6</sub>-Tag, TEV-Schnittstelle

#### MKK7 $\beta$ 1 Aktivierung

MGSPIDPMGHHHHHGRRRASVAAGIPGLDGIYARTENLYFQ/GAMAASSLEQKLSR  
LEAKLKQENREARRRIDLNLDISPQRPRPTLQLPLANDGGSRSPPSESSPQHPTPPA  
RPRHMLGLPSTLFTPRSMESIEIDQKLQEIMKTGYLTIGGQRYQAEINDLENLGEMG  
SGTCGQVWKMFRKTGHVIAVKQMRRSGNKEENKRILMDLDVVLKSHDCPYIVQCFG  
TFITNTDVFIAEELMGTCAEKLLKRMQGP IPERILGKMTVAIVKALYYLKEKHGV IH  
RDVKPSNILLDERGQIKLCDFGISGRLVDKAKDRSAGCAAYMAPERIDPPDPTKPD  
YDIRADVWSLGISLVELATGQFPYKNCKTDFEVLTKVLQEEPPLLPGHMGFSGDFQS  
FVKDCLTKDHRKRPKYNKLEHSFIKRYETLEVDVASWFKDVMAKTESPRTSGVLSQ  
PHLPFFR

M: Startmethionin, His<sub>6</sub>-Tag, TEV-Schnittstelle, S271D,T275D

### 6.4.3 MEKK1 Konstrukte

#### MEKK1

MGH~~HHHHH~~LESTSLYKKAGSAAAVLE~~ENLYFQ~~/GMAMSASQDALPIVPQLQVENGED  
I I I IQQDTPETLPGHTKAKQPYREDTEWLKQQIGLGAFSSCYQAQDVGTGTLMAVK  
QVTYVRNTSSEQEEVVEALREEIRMMSHLNHPNIIRMLGATCEKSNYNLFIEWMAGG  
SVAHLLSKYGAFKESVVINYTEQLLRGLSYLHENQI IHRDVKGANLLIDSTGQRLRI  
ADFGAAARLASKGTGAGEFQGQLLGTIAFMAPEVLRGQQYGRSCDVWSVGCAI IEMA  
CAKPPWNAEKHSNHLALIFKIASATTAPSI PSHLSPGLRDVALRCLELQPQDRPPSR  
ELLKHPVFRTTW

M: Startmethionin, His<sub>6</sub>-Tag, TEV-Schnittstelle

#### MEKK1 GST

MGSPIIDPM~~HHHHHH~~GRRRASVAAGIPGLDGIYART~~ENLYFQ~~/GAMAASSLEQKLSRL  
EAKLKQENREARRRIDLNLDISPQRPRPTLQLPLANDGGSRSPSESSPQHPTPPAR  
PRHMLGLPSTLFTPRSMESIEIDQKLQEIMKTGYLTIGGQRYQAEINDLENLGEMGS  
GTCGQVWKMFRFRKTGHVIAVKQMRRSGNKEENKRILMDLDVVLKSHDCPYIVQCFT  
FITNTDVFIAELMGTCAEKLLKRMQGP IPERILGKMTVAIVKALYYLKEKHGVIHR  
DVKPSNILLDERGQIKLCDFGISGRLVD~~KAKDRSAGCAAYMAPERIDPPDPTKPDY~~  
DIRADVWSLGISLVELATGQFPYKNCKTDFEVLTKVLQEEPPLLPGHMGFSGDFQSF  
VKDCLTKDHRKRPKYNKLEHSFIKRYETLEVDVASWFKDVMAKTESPRTSGVLSQP  
HLPFFR

M: Startmethionin, His<sub>6</sub>-Tag, TEV-Schnittstelle, S271D, T275D

## Protein-Konstrukte

### MEKK1 MBP

MGHHHHHHLESTSLYKKAGSAAVLEENLYFQ/GMAMSASQDALPIVPQLQVENGED  
IIIIQQDTPETLPGHTKAKQPYREDTEWLKGGQIGLGAFSSCYQAQDVGTGTLMAVK  
QVTYVRNTSSEQEEVVEALREEIRMMSHLNHPNIIRMLGATCEKSNYNLFIEWMAGG  
SVAHLLSKYGAFKESVVINYTEQLLRGLSYLHENQIIHRDVKGANLLIDSTGQRLRI  
ADFGAAARLASKGTGAGEFQGQLLGTIAFMAPEVLRGQQYGRSCDVWSVGCAIIEMA  
CAKPPWNAEKHSNHLALIF KIASATTAPSIPSHLSPGLRDVALRCLELQPQDRPPS  
RELLKHPVFRTTW

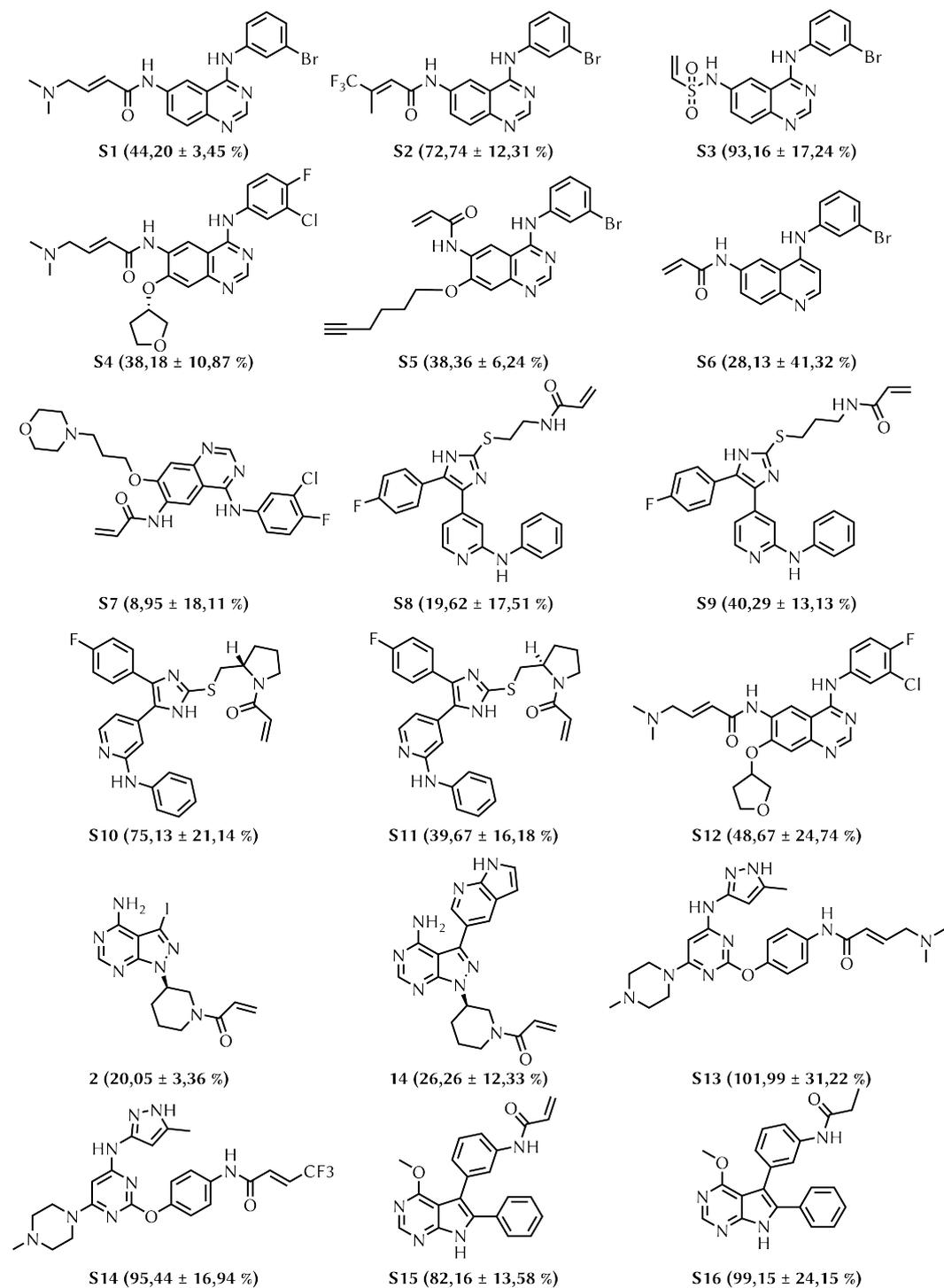
M: Startmethionin, His<sub>6</sub>-Tag, TEV-Schnittstelle, S271D,T275D

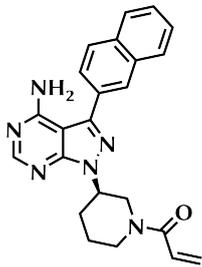
### 6.4.4 JNK Konstrukte

**JNK1A1** MHHHHHHGKPIPNPLLGLDSTENLYFQ/GIDPFTGSMRSKRDNFYSVEI  
GDSTFTVLKRYQNLKPIGSGAQGIVCAAYDAILERNVAIMKLSRPFQNQTHAKRAYR  
ELVLMKCVNHKNIIGLLNVFTPQKSLEEFQDVYIVMELMDANLCQVIQMELDHERMS  
YLLYQMLCGIKHLHSAGIIHRDLKPSNIVVKS DCTLKILDFGLARTAGTSFMMPYV  
VTRYRAPEVILGMGYKENVDLWSVGCIMGEMVCHKILFPGRDYIDQWNKVIEQLGT  
PCPEFMKKLQPTVRTYVENRPKYAGYSFEKLPDVLFPADSEHNKLLKASQARDLLSK  
MLVIDASKRISVDEALQHPYINVWYDPSEAEAPPKIPDKQLDEREHTIEEWKELIY  
KEVMDLEERTKNGVIRGQPSPLAQVQQ

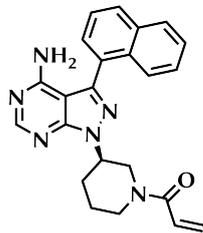


## 6.5 Im Screen eingesetzte Moleküle

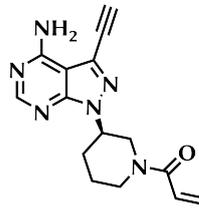




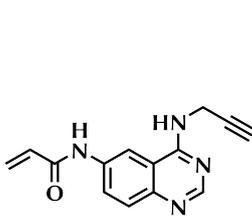
13 (13,59 ± 15,21 %)



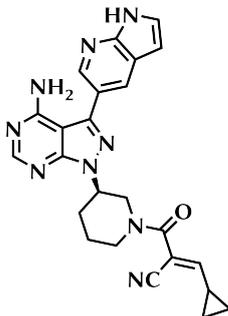
12 (44,37 ± 21,11 %)



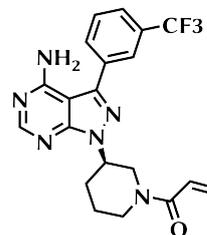
4 (54,07 ± 18,24 %)



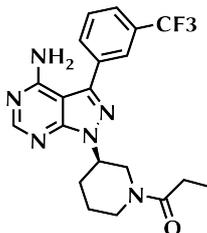
S17 (30,05 ± 13,81 %)



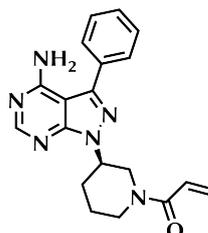
20 104,28 ± 31,31 %



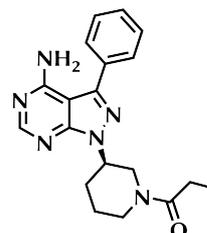
8 (39,44 ± 11,29 %)



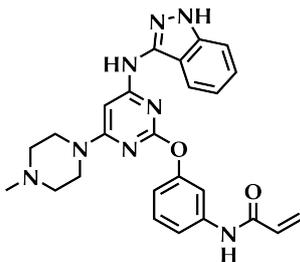
18 (84,04 ± 14,88 %)



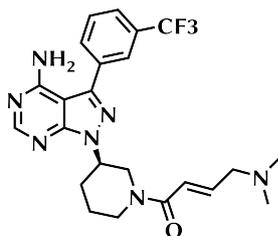
5 (33,82 ± 9,55 %)



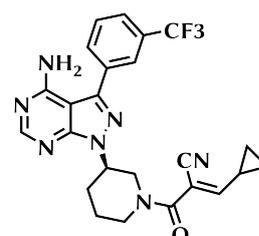
16 (88,89 ± 24,87 %)



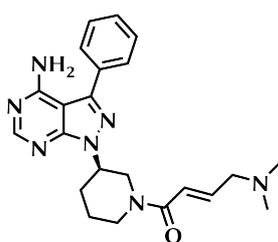
S18 (69,03 ± 24,12 %)



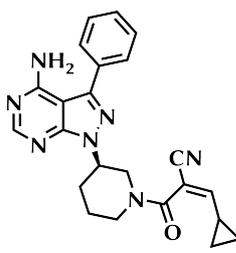
15 (83,48 ± 13,68 %)



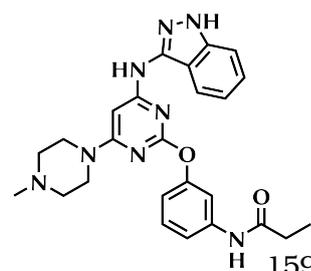
19 (100,43 ± 28,96 %)



S19 (94,88 ± 25,23 %)

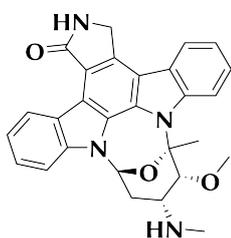


S20 (101,28 ± 31,28 %)

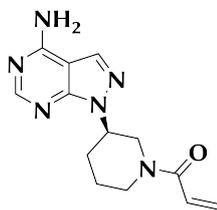


S21 (100,00 ± 41,22 %)

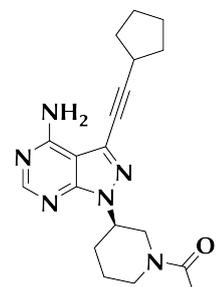
Im Screen eingesetzte Moleküle



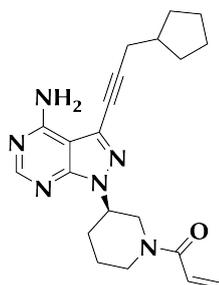
S32 (47,86 ± 17,54 %)



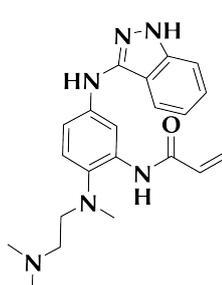
1 (38,04 ± 7,84 %)



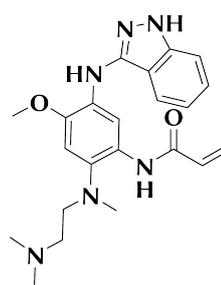
10 (67,95 ± 19,11 %)



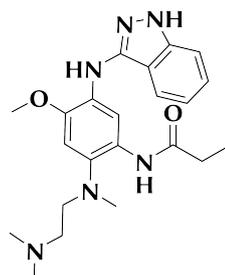
S33 (51,92 ± 21,63 %)



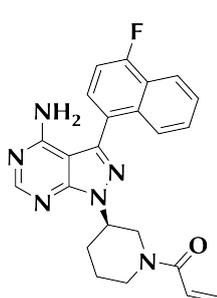
S34 (53,12 ± 19,55 %)



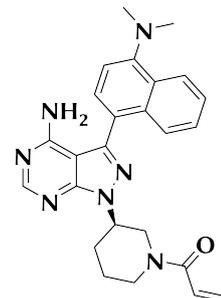
S35 (68,63 ± 18,36 %)



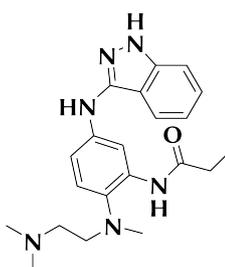
S36 (97,72 ± 37,54 %)



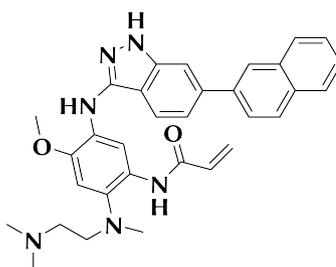
S37 (38,75 ± 18,21 %)



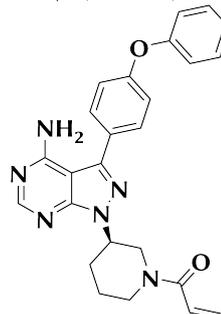
S38 (37,54 ± 11,03 %)



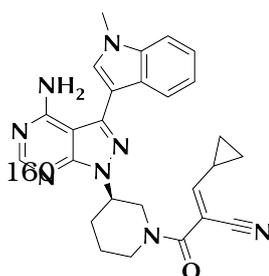
S39 (95,73 ± 36,89 %)



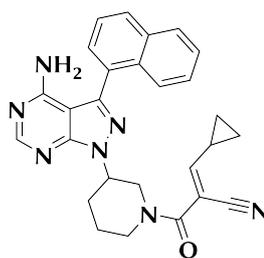
S40 (94,02 ± 14,67 %)



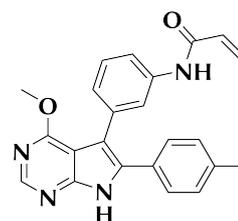
26 (18,90 ± 6,23 %)



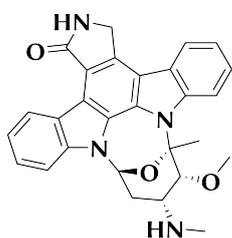
S41 (78,63 ± 31,57 %)



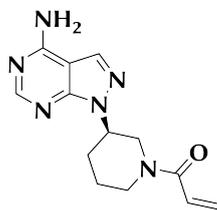
S42 (96,29 ± 35,24 %)



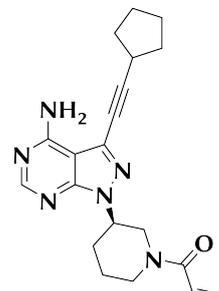
S43 (81,28 ± 19,33 %)



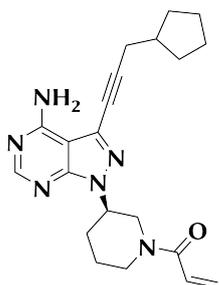
S32 (47,86 ± 17,54 %)



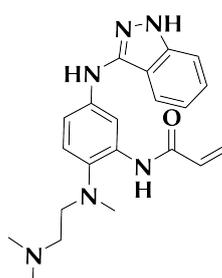
1 (38,04 ± 7,84 %)



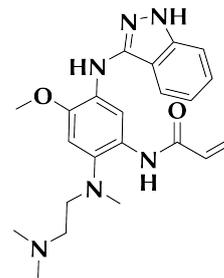
10 (67,95 ± 19,11 %)



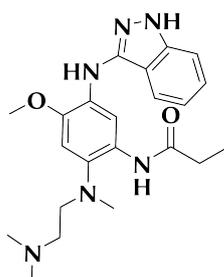
S33 (51,92 ± 21,63 %)



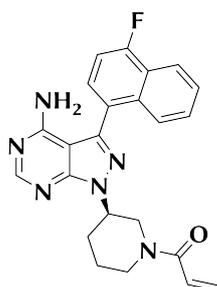
S34 (53,12 ± 19,55 %)



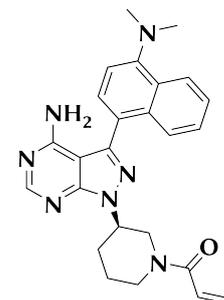
S35 (68,63 ± 18,36 %)



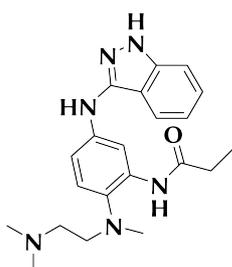
S36 (97,72 ± 37,54 %)



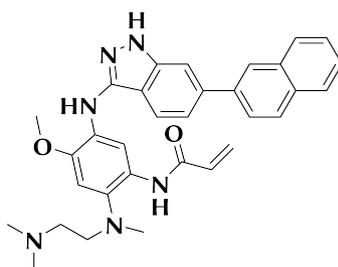
S37 (38,75 ± 18,21 %)



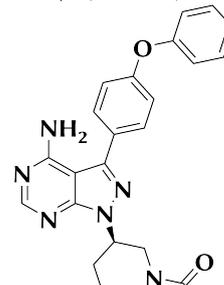
S38 (37,54 ± 11,03 %)



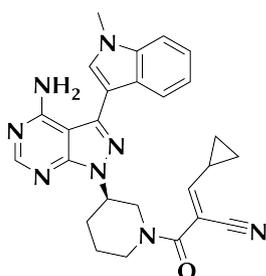
S39 (95,73 ± 36,89 %)



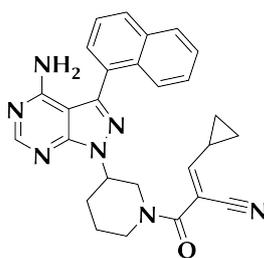
S40 (94,02 ± 14,67 %)



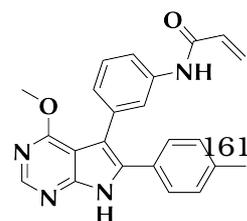
26 (18,90 ± 6,23 %)



S41 (78,63 ± 31,57 %)

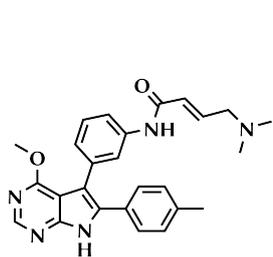


S42 (96,29 ± 35,24 %)

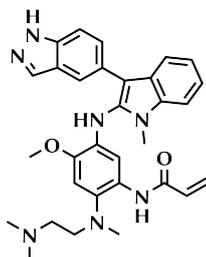


S43 (81,28 ± 19,33 %)

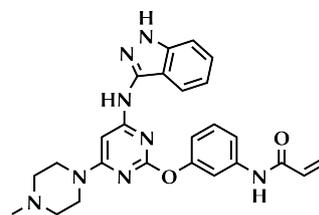
Im Screen eingesetzte Moleküle



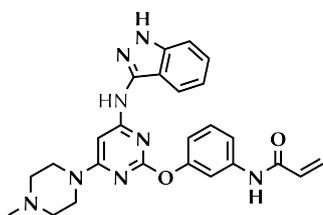
S43 (81,38 ± 12,55 %)



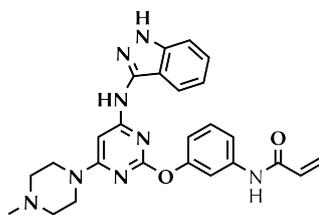
S44 (93,45 ± 20,14 %)



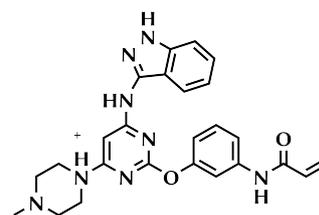
S45 (80,38 ± 9,45 %)



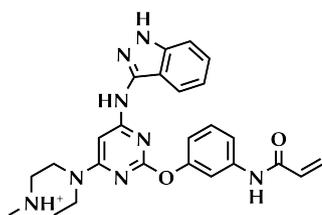
S46 (69,71 ± 8,76 %)



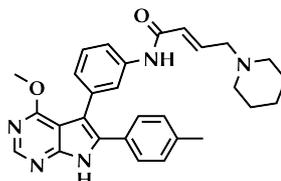
S47 (69,75 ± 11,26 %)



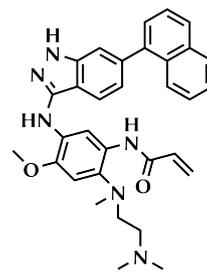
S48 (77,19 ± 11,95 %)



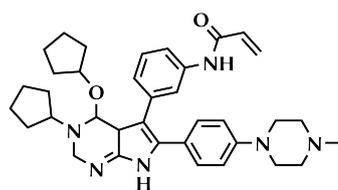
S49 (64,72 ± 13,85 %)



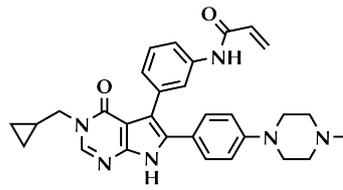
S50 (66,29 ± 19,76 %)



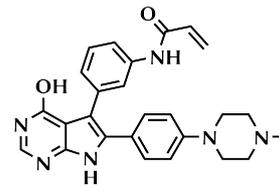
S51 (100,57 ± 28,33 %)



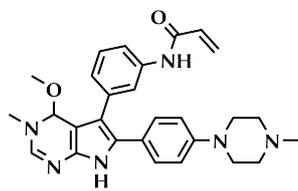
S52 (103,99 ± 26,33 %)



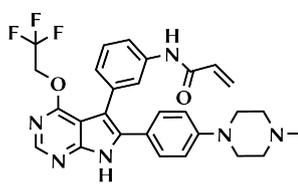
S53 (77,56 ± 17,21 %)



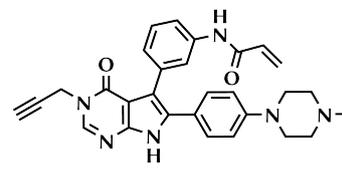
S54 (65,49 ± 17,84 %)



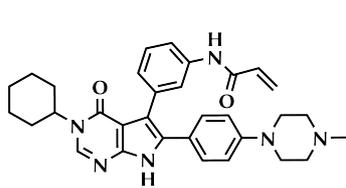
S55 (64,61 ± 15,55 %)



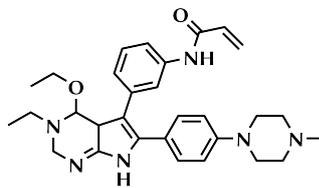
S56 (63,78 ± 12,69 %)



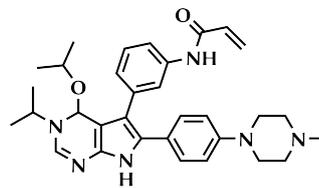
S57 (74,59 ± 14,87 %)



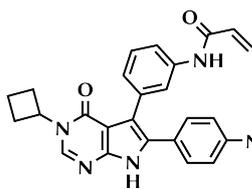
S58 (65,71 ± 11,35 %)



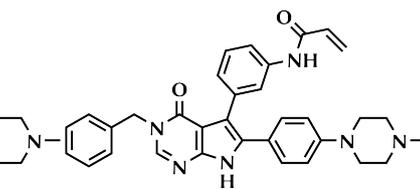
S59 (97,44 ± 21,47 %)



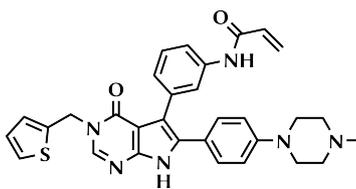
S60 (99,99 ± 23,31 %)



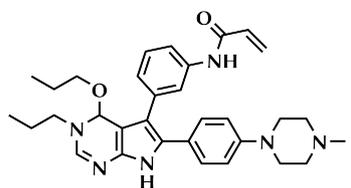
S61 (87,65 ± 18,34 %)



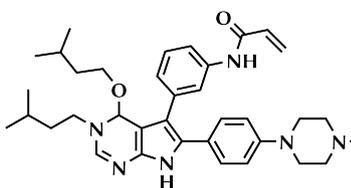
S62 (93,33 ± 19,77 %)



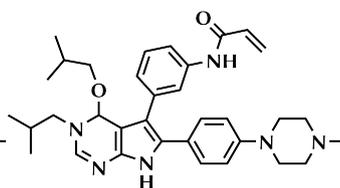
S63 (81,53 ± 20,11 %)



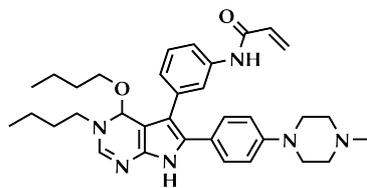
S64 (87,63 ± 16,68 %)



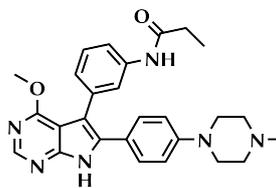
S65 (59,78 ± 9,31 %)



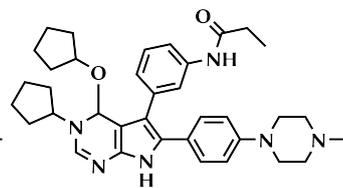
S66 (79,90 ± 12,15 %)



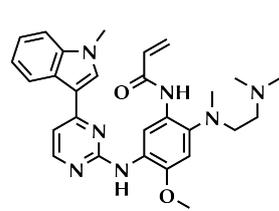
S67 (68,78 ± 18,94 %)



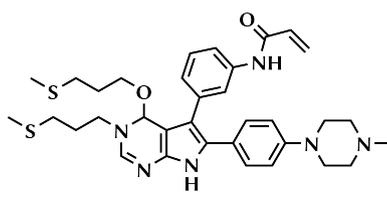
S68 (79,08 ± 22,58 %)



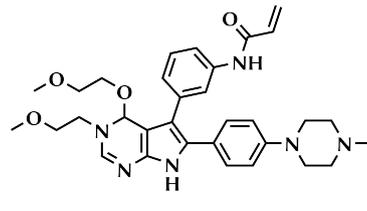
S69 (93,73 ± 19,98 %)



S67 (68,78 ± 18,94 %)

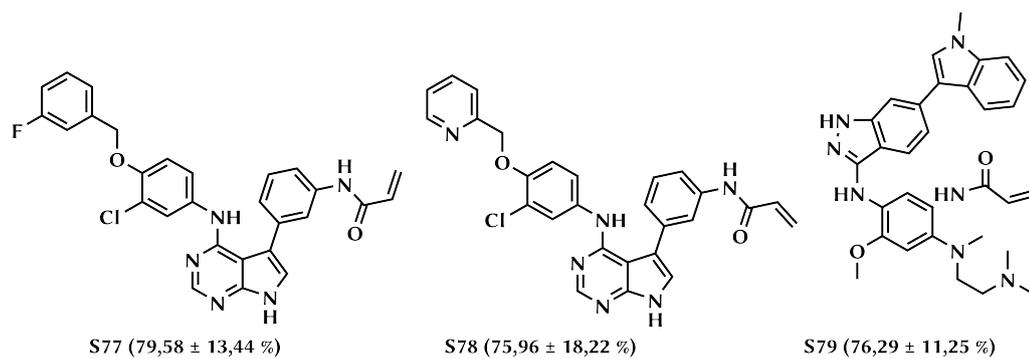
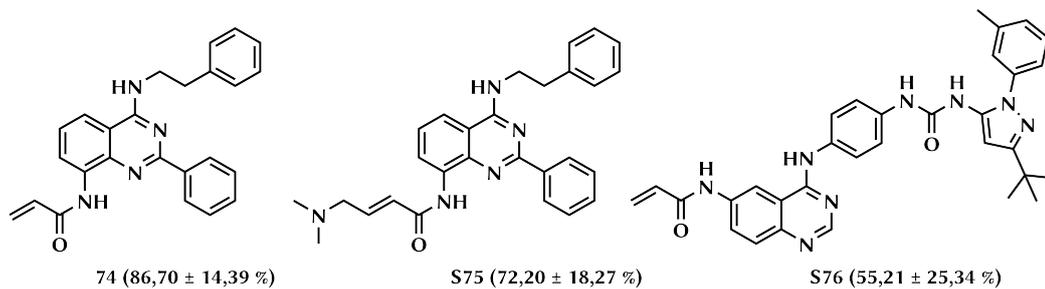
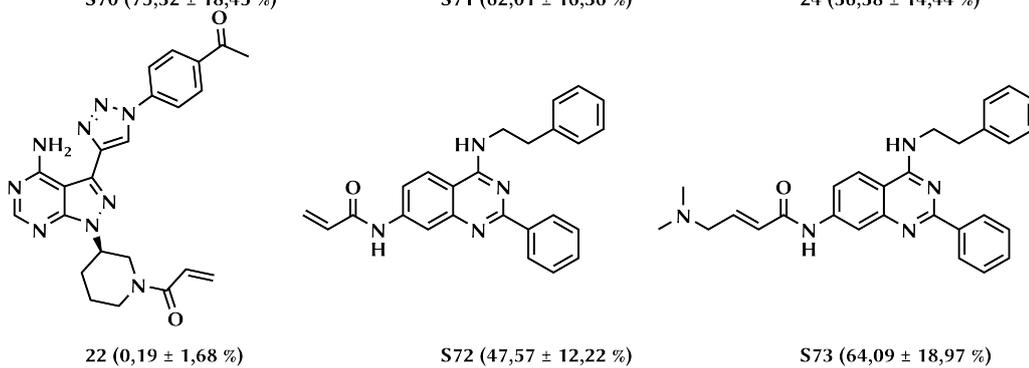
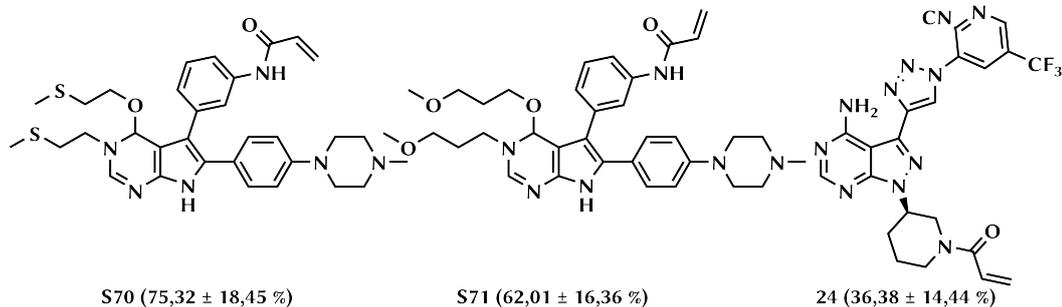


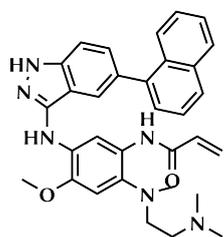
S68 (79,08 ± 22,58 %)



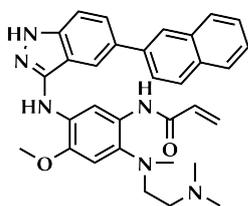
S69 (93,73 ± 19,98 %)

Im Screen eingesetzte Moleküle

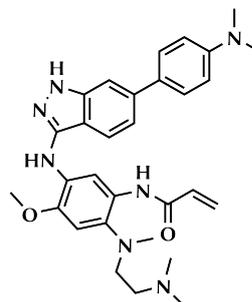




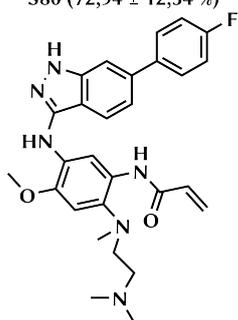
S80 (72,94 ± 12,54 %)



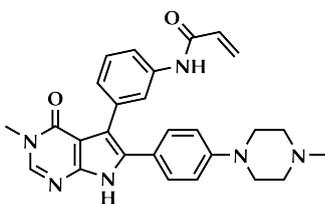
S81 (75,05 ± 18,33 %)



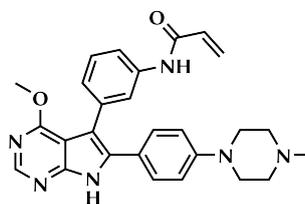
S82 (79,61 ± 10,57 %)



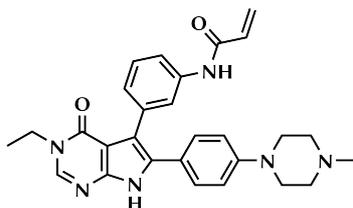
S83 (32,47 ± 24,37 %)



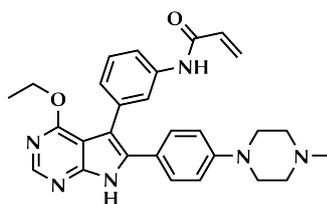
S84 (57,26 ± 13,33%)



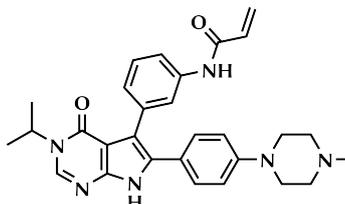
S85 (55,93 ± 27,36 %)



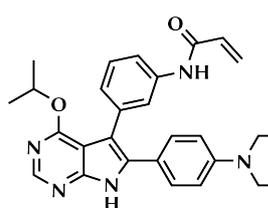
S86 (53,63 ± 23,85 %)



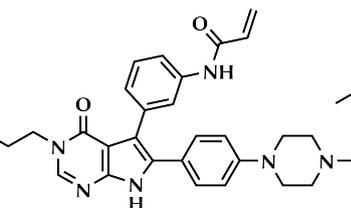
S87 (58,89 ± 18,98%)



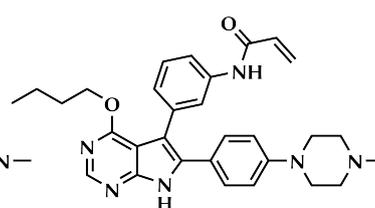
S88 (69,55 ± 17,74 %)



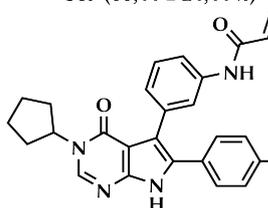
S89 (66,44 ± 24,44 %)



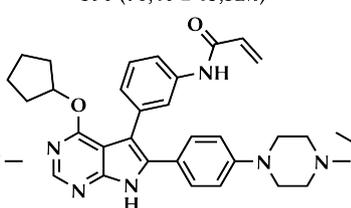
S90 (76,40 ± 15,32%)



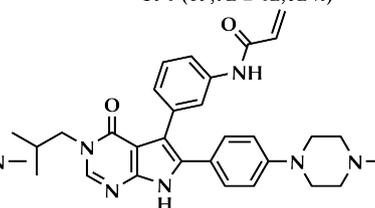
S91 (69,72 ± 12,02 %)



S92 (76,94 ± 17,94 %)

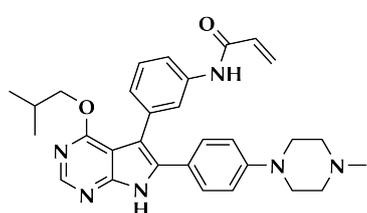


S93 (79,44 ± 17,39%)

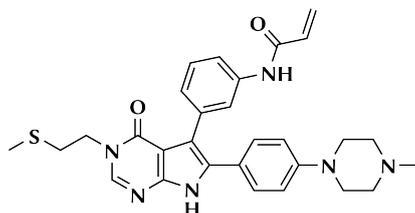


S94 (78,64 ± 19,88 %)

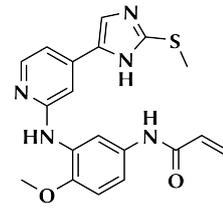
Im Screen eingesetzte Moleküle



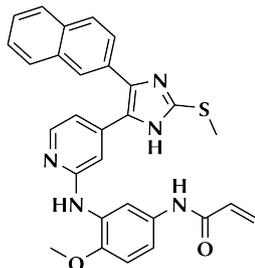
S95 (105,13 ± 12,65 %)



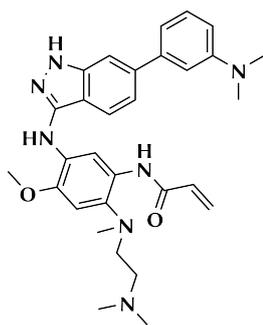
S96 (85,85 ± 19,99 %)



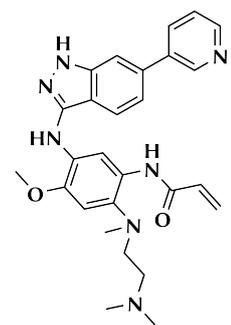
S97 (35,87 ± 21,19 %)



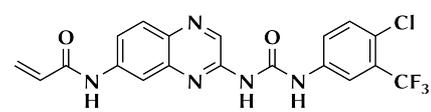
S98 (44,61 ± 24,77 %)



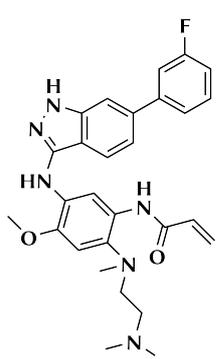
S99 (66,44 ± 23,20 %)



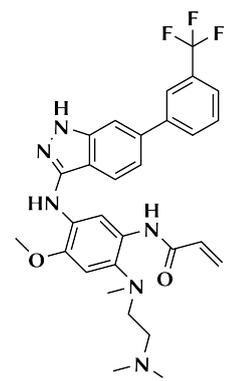
S100 (73,11 ± 20,55 %)



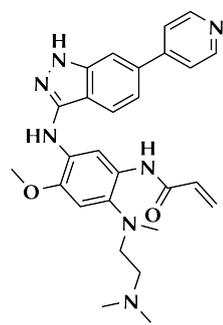
S101 (33,72 ± 11,33 %)



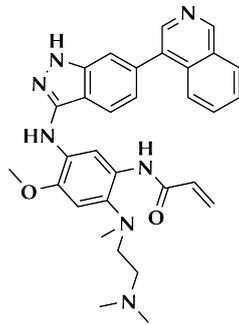
S102 (71,15 ± 20,10 %)



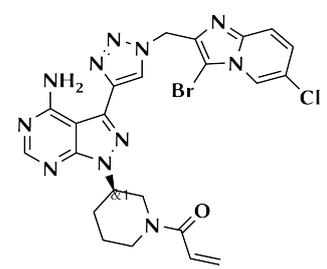
S103 (61,85 ± 24,27 %)



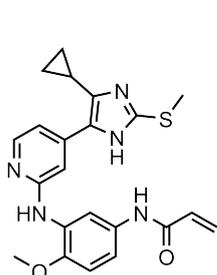
S104 (89,74 ± 19,76 %)



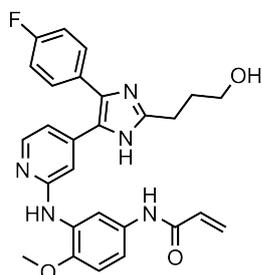
S105 (63,82 ± 16,59 %)



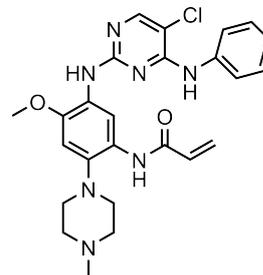
25 (35,21 ± 22,33 %)



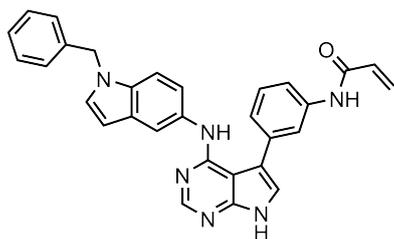
S106 (98,29 ± 15,71 %)



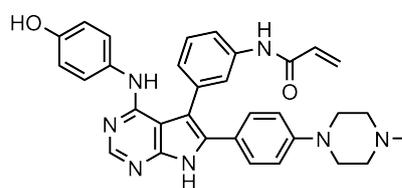
S107 (99,43 ± 11,01 %)



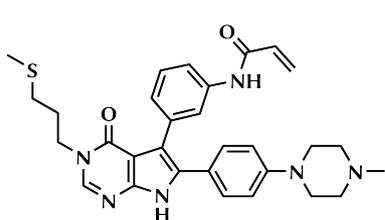
S108 (99,14 ± 14,53 %)



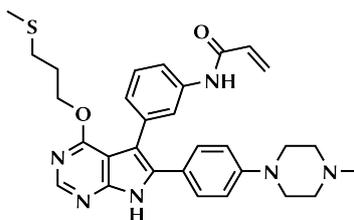
S109 (63,55 ± 15,03 %)



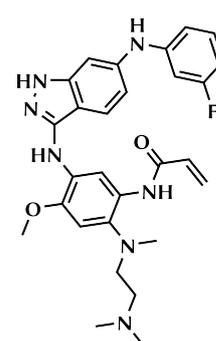
S110 (26,73 ± 24,66 %)



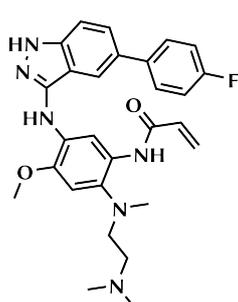
S111 (18,18 ± 18,21 %)



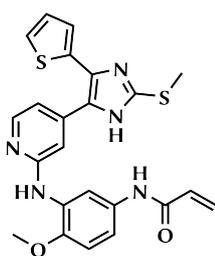
S112 (38,75 ± 19,78 %)



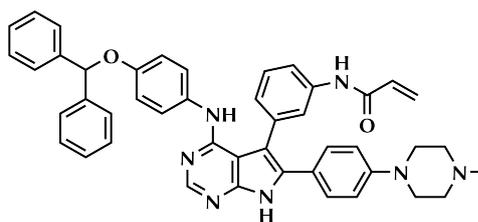
S113 (65,43 ± 10,47 %)



S114 (61,41 ± 22,56 %)

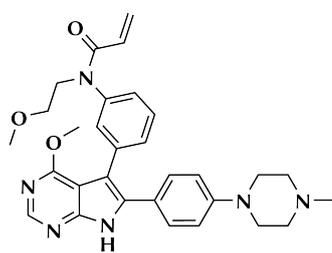


S115 (73,02 ± 12,23 %)

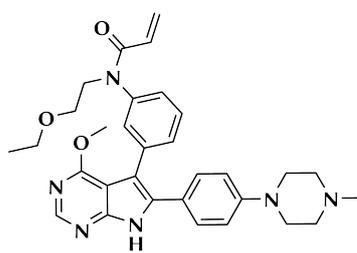


S116 (50,14 ± 11,58 %)

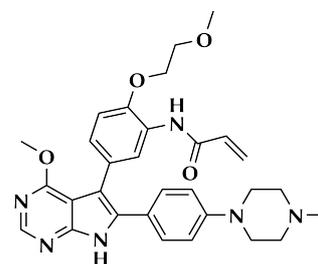
Im Screen eingesetzte Moleküle



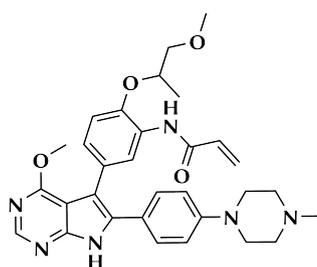
S117 (46,49 ± 15,02 %)



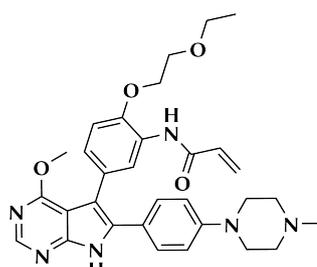
S118 (31,54 ± 11,70 %)



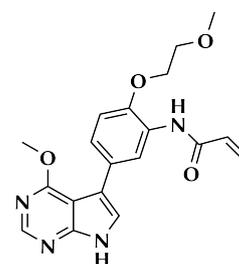
S119 (51,29 ± 19,39 %)



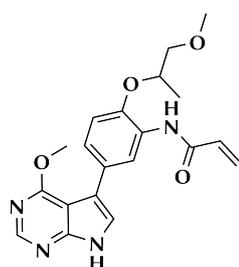
S120 (66,15 ± 19,08 %)



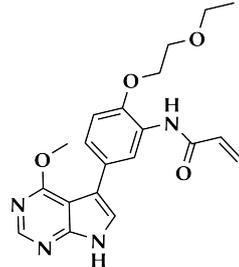
S121 (84,37 ± 24,11 %)



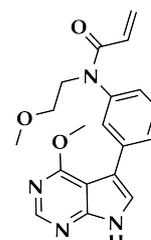
S122 (24,03 ± 14,49 %)



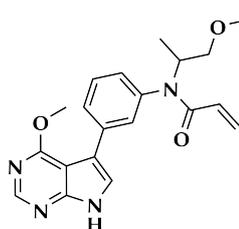
S123 (28,04 ± 11,00 %)



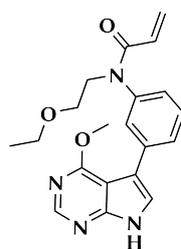
S124 (16,99 ± 15,60 %)



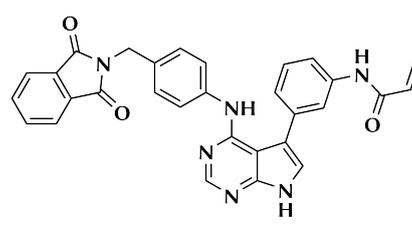
S125 (20,84 ± 12,11 %)



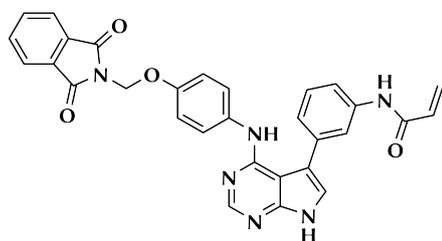
S126 (50,75 ± 20,32 %)



S127 (108,43 ± 22,44 %)



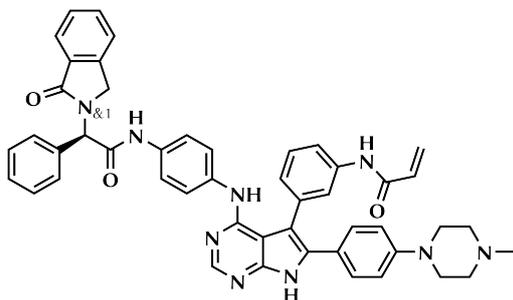
S128 (63,62 ± 16,46 %)



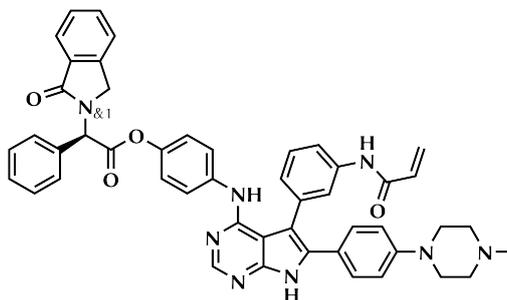
S129 (55,66 ± 22,54 %)



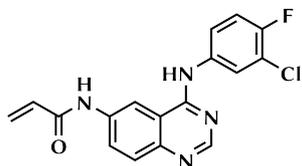
S130 (14,65 ± 21,04 %)



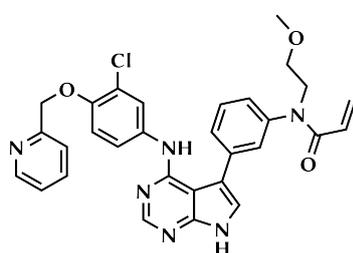
S131 (84,13 ± 22,19 %)



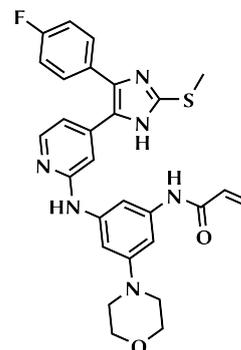
S132 (45,61 ± 20,45 %)



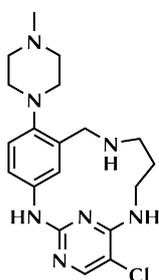
S133 (12,02 ± 14,07 %)



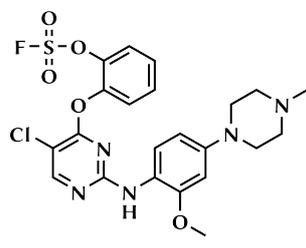
S134 (12,98 ± 21,65 %)



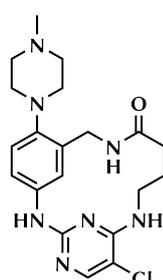
S135 (13,69 ± 17,32 %)



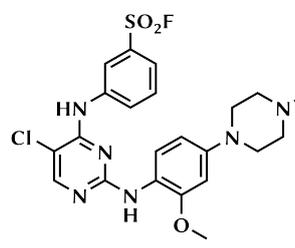
S136 (46,77 ± 14,75 %)



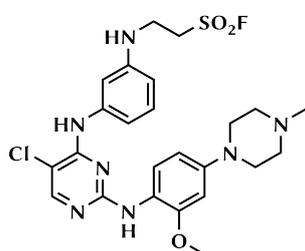
S137 (68,57 ± 12,15 %)



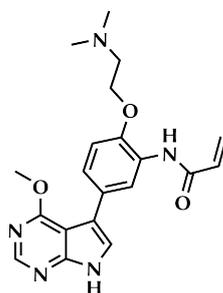
S138 (40,11 ± 17,73 %)



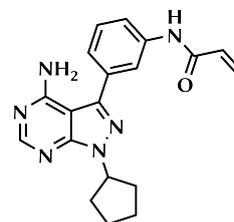
S139 (34,13 ± 13,21 %)



S140 (27,15 ± 21,40 %)



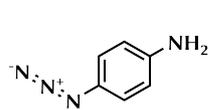
S141 (23,55 ± 19,42 %)



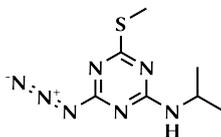
S142 (39,25 ± 17,37 %)

*Im Screen eingesetzte Moleküle*

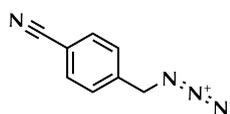
## 6.6 Eingesetzte Azide



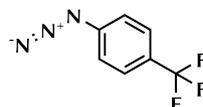
AZ 01



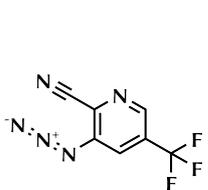
AZ 02



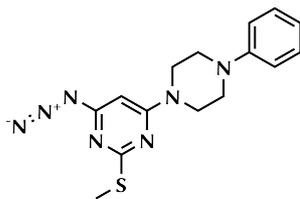
AZ 03



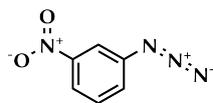
AZ 04



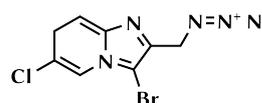
AZ 05



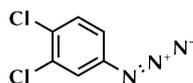
AZ 06



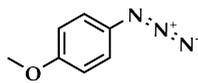
AZ 07



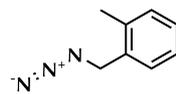
AZ 08



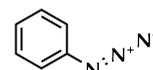
AZ 09



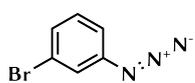
AZ 10



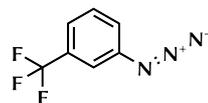
AZ 11



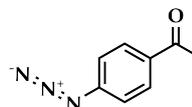
AZ 12



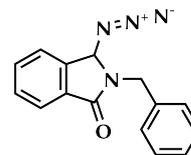
AZ 13



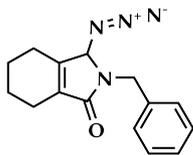
AZ 14



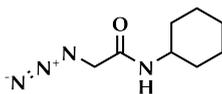
AZ 15



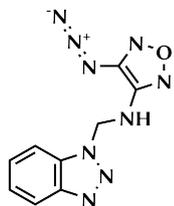
AZ 16



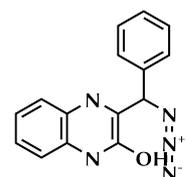
AZ 17



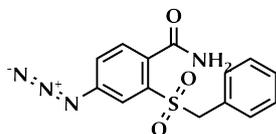
AZ 18



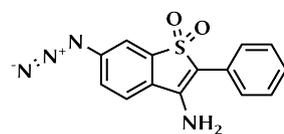
AZ 19



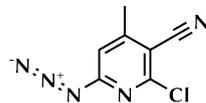
AZ 20



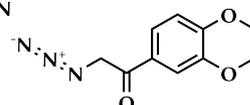
AZ 21



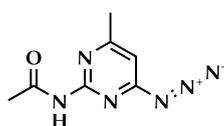
AZ 22



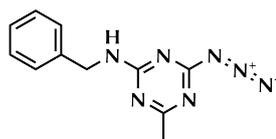
AZ 23



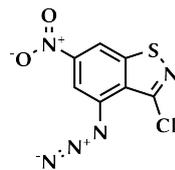
AZ 24



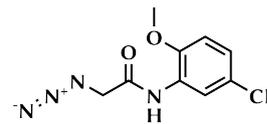
AZ 25



AZ 26

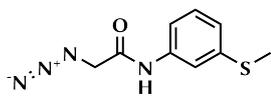


AZ 27

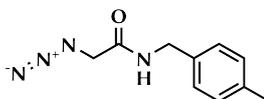


AZ 28

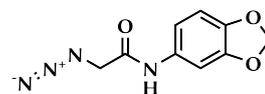
Eingesetzte Azide



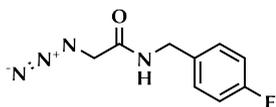
AZ 29



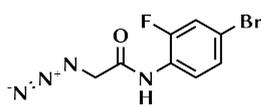
AZ 30



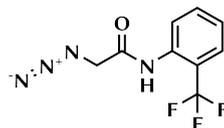
AZ 31



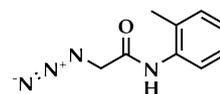
AZ 32



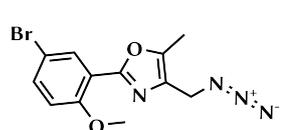
AZ 33



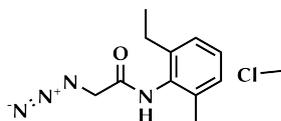
AZ 34



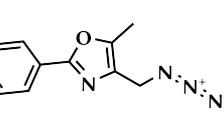
AZ 35



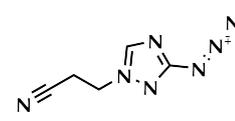
AZ 36



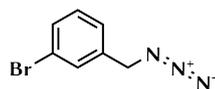
AZ 37



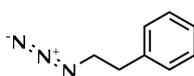
AZ 38



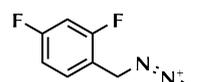
AZ 39



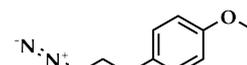
AZ 40



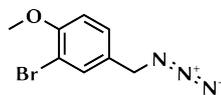
AZ 41



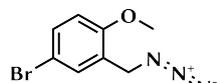
AZ 42



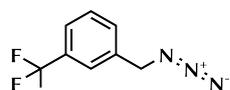
AZ 43



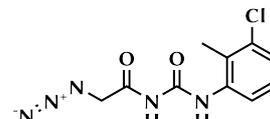
AZ 44



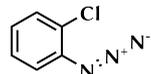
AZ 45



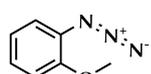
AZ 46



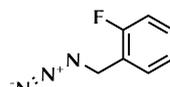
AZ 47



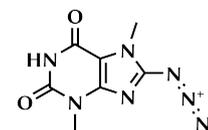
AZ 48



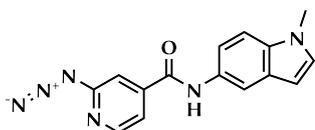
AZ 49



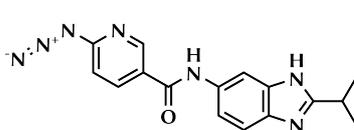
AZ 50



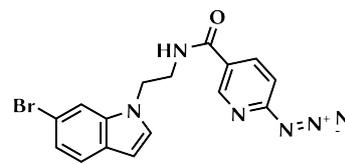
AZ 51



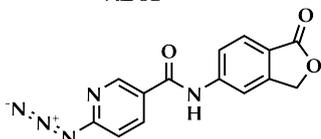
AZ 52



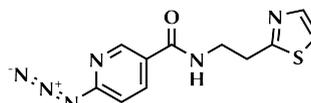
AZ 53



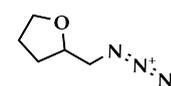
AZ 54



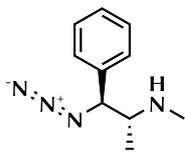
AZ 55



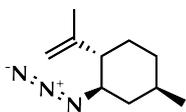
AZ 56



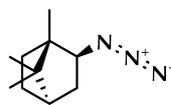
AZ 57



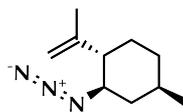
AZ 58



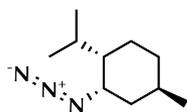
AZ 59



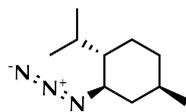
AZ 60



AZ 61



AZ 62



AZ 63

## 6.7 Kristallografische Statistiken

### 6.7.1 Kristallografiestatistik MKK7 Apo DFG-*in* und DFG-*out*

**Tabelle 6.4:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von MKK7 Apo DFG-*in* und DFG-*out* .

	MKK7 Apo DFG- <i>in</i>	MKK7 Apo DFG- <i>out</i>
<b>Datensatz</b>		
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter		
a, b, c (Å)	62,0, 68,8, 85,3	61,3, 68,8, 84,7
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0
Auflösung (Å)	46,1-2,2 (2,3-2,2)	48,8-2,3 (2,4-2,3)
R <sub>mean</sub> (%)	6,7 (40,2)	5,7 (74,9)
I/ $\sigma$ I	17,1 (3,5)	29,6 (5,1)
Vollständigkeit (%)	92,8 (81,8)	99,8 (99,1)
Redundanz	5,9 (5,9)	12,2 (11,2)
<b>Verfeinerung</b>		
Auflösung (Å)	46,1-2,2 (2,3-2,2)	48,8-2,3 (2,4-2,3)
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub>	0,22 / 0,25	0,22 / 0,26
Anzahl der Atome		
Protein	2203	2030
Ligand	0	0
Wasser/Ionen	72	88
B-Faktoren	55,0	49,0
r.m.s.-Abweichung		
Bindungslängen (Å)	0,001	0,001
Bindungswinkel (°)	0,403	0,339
Ramachandran-Ausreißer (%)	0,00	0,00

## 6.7.2 Kristallografie-statistik Verbindung 1 und 2

**Tabelle 6.5:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **1** und **2**.

	Verbindung <b>1</b>	Verbindung <b>2</b>
<b>Datensatz</b>		
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter		
a, b, c (Å)	60,5, 67,9, 85,5	60,4, 67,1, 85,0
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0
Auflösung (Å)	49,4-2,7 (2,8-2,7)	49,2-2,7 (2,8-2,7)
R <sub>mean</sub> (%)	7,9 (91,2)	8,9 (87,7)
I/ $\sigma$ I	21,8 (2,5)	16,5 (2,2)
Vollständigkeit (%)	99,4 (99,9)	100,0 (100,0)
Redundanz	12,1 (10,2)	6,5 (6,4)
<b>Verfeinerung</b>		
Auflösung (Å)	49,4-2,7 (2,8-2,7)	49,2-2,7 (2,8-2,7)
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub>	0,22 / 0,28	0,23 / 0,29
Anzahl der Atome		
Protein	2067	2110
Ligand	20	21
Wasser/Ionen	7	34
B-Faktoren	66,0	63,0
r.m.s.-Abweichung		
Bindungslängen (Å)	0,004	0,002
Bindungswinkel (°)	0,748	0,002
Ramachandran-Ausreißer (%)	0,00	0,00

### 6.7.3 Kristallografiestatistik Verbindung 4 und 9

**Tabelle 6.6:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **4** und **9**.

	Verbindung <b>4</b>	Verbindung <b>9</b>
<b>Datensatz</b>		
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter		
a, b, c (Å)	59,4, 66,0, 86,4	60,2, 67,0, 86,1
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0
Auflösung (Å)	45,4-2,6 (2,7-2,6)	43,1-2,3 (2,4-2,3)
R <sub>mean</sub> (%)	32,1 (128,2)	9,6 (120,8)
I/ $\sigma$ I	5,4 (1,2)	21,7 (2,3)
Vollständigkeit (%)	99,9 (99,9)	100,0 (100,0)
Redundanz	12,64 (13,49)	13,1 (12,8)
<b>Verfeinerung</b>		
Auflösung (Å)	45,4-2,6 (2,7-2,6)	43,1-2,3 (2,4-2,3)
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub>	0,22 / 0,28	0,23 / 0,27
Anzahl der Atome		
Protein	2300	2047
Ligand	22	27
Wasser/Ionen	0	40
B-Faktoren	52,5	66,0
r.m.s.-Abweichung		
Bindungslängen (Å)	0,013	0,002
Bindungswinkel (°)	1,802	0,491
Ramachandran-Ausreißer (%)	0,00	0,00

## 6.7.4 Kristallografie-statistik Verbindung 12 und 14

**Tabelle 6.7:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **12** und **14**.

	Verbindung <b>12</b>	Verbindung <b>14</b>
<b>Datensatz</b>		
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter		
a, b, c (Å)	59,4, 65,8, 86,0	62,1, 69,0, 84,9
$\alpha, \beta, \gamma$ (°)	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0
Auflösung (Å)	48,8-2,0 (2,1-2,0)	46,2-2,4 (2,5-2,4)
R <sub>mean</sub> (%)	12,3 (86,3)	40,8 (92,2)
I/ $\sigma$ I	13,2 (2,0)	4,8 (2,4)
Vollständigkeit (%)	99,7 (97,6)	94,8(98,3)
Redundanz	11,6 (6,9)	12,5 (12,5)
<b>Verfeinerung</b>		
Auflösung (Å)	48,8-2,0 (2,1-2,0)	46,2-2,4 (2,5-2,4)
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub>	0,24 / 0,28	0,24 / 0,29
Anzahl der Atome		
Protein	2166	2178
Ligand	30	29
Wasser/Ionen	95	92
B-Faktoren	40,0	35,0
r.m.s.-Abweichung		
Bindungslängen (Å)	0,002	0,002
Bindungswinkel (°)	0,644	0,687
Ramachandran-Ausreißer (%)	0,00	0,00

## Selektivitätsprofilung

### 6.7.5 Kristallografiestatistik Verbindung 20 und 22

**Tabelle 6.8:** Zusammenfassung der kristallografischen Daten für die Struktur von MKK7 im Komplex mit Verbindung **20** und **22**.

	Verbindung <b>20</b>	Verbindung <b>22</b>
<b>Datensatz</b>		
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Zellparameter		
a, b, c (Å)	60,7, 67,8, 84,9	60,7, 68,4, 84,0
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90,0, 90,0, 90,0	90,0, 90,0, 90,0
Auflösung (Å)	46,1-2,7 (2,8-2,7)	45,4-2,1 (2,2-2,1)
R <sub>mean</sub> (%)	10,9 (96,8)	9,7 (82,5)
I/ $\sigma$ I	12,4 (2,8)	17,3 (3,4)
Vollständigkeit (%)	100,0 (100,0)	100,0 (100,0)
Redundanz	12,5 (12,2)	12,7 (13,2)
<b>Verfeinerung</b>		
Auflösung (Å)	46,1-2,7 (2,8-2,7)	45,4-2,1 (2,2-2,1)
R <sub>work</sub> /R <sub>free</sub>	0,23 / 0,28	0,22 / 0,25
Anzahl der Atome		
Protein	2169	2224
Ligand	34	33
Wasser/Ionen	0	24
B-Faktoren	78,2	39,0
r.m.s.-Abweichung		
Bindungslängen (Å)	0,003	0,016
Bindungswinkel (°)	0,457	2,121
Ramachandran-Ausreißer (%)	0,00	0,00

## 6.8 Selektivitätsprofilung

#	Kinase Name	Kinase Family*	Cpd ID	RL1862-2	RL1862-1
			Assay Conc. (M)	1,0E-08	1,0E-06
1	ABL1	TK		95	96
2	ABL2	TK		69	59
3	ACK1	TK		83	74
4	ACV-R1	TKL		112	99
5	ACV-R1B	TKL		100	117
6	ACV-R2A	TKL		101	79
7	ACV-R2B	TKL		76	92
8	ACV-RL1	TKL		95	102
9	KT1 aa106-48	AGC		111	113
10	KT2 aa107-48	AGC		104	101
11	KT3 aa106-47	AGC		90	91
12	K (GST-HIS-t	TK		118	100
13	PK-alpha1 aa1	CAMK		97	103
14	ARK5	CAMK		108	108
15	ASK1	STE		107	108
16	Aurora-A	OTHER		110	71
17	Aurora-B	OTHER		85	76
18	Aurora-C	OTHER		96	83
19	AXL	TK		95	95
20	BLK	TK		79	37
21	BMPR1A	TKL		96	93
22	BMX	TK		47	18
23	B-RAF	TKL		93	67
24	BRK	TK		96	83
25	BRSK1	CAMK		99	109
26	BRSK2	CAMK		92	81
27	BTK	TK		81	36
28	BUB1B	OTHER		91	98
29	CAMK1D	CAMK		102	112
30	CAMK2A	CAMK		85	84
31	CAMK2B	CAMK		110	75
32	CAMK2D	CAMK		95	104
33	CAMK2G	CAMK		75	81
34	CAMK4	CAMK		106	110
35	CAMKK1	OTHER		116	101
36	CAMKK2	OTHER		104	73
37	CDC42BPA	AGC		71	60
38	CDC42BPB	AGC		90	76
39	CDC7/DBF4	OTHER		100	98
40	CDK1/CycA2	CMGC		102	93
41	CDK1/CycB1	CMGC		91	81
42	CDK1/CycE1	CMGC		105	89
43	CDK16/CycY	CMGC		105	100
44	CDK19/CycC	CMGC		99	94
45	CDK2/CycA2	CMGC		124	102
46	CDK2/CycE1	CMGC		110	95
47	CDK3/CycC	CMGC		92	98
48	CDK3/CycE1	CMGC		100	101
49	CDK4/CycD1	CMGC		106	99

50	CDK4/CycD3	CMGC	101	102
51	CDK5/p25NCK	CMGC	98	96
52	CDK5/p35NCK	CMGC	100	102
53	CDK6/CycD1	CMGC	110	103
54	CDK6/CycD3	CMGC	108	96
55	CDK7/CycH/MAK	CMGC	109	98
56	CDK8/CycC	CMGC	108	90
57	CDK9/CycK	CMGC	115	109
58	CDK9/CycT1	CMGC	107	94
59	CHK1	CAMK	104	97
60	CHK2	CAMK	97	102
61	CK1-alpha1	CK1	99	105
62	CK1-delta	CK1	81	84
63	CK1-epsilon	CK1	76	68
64	CK1-gamma1	CK1	80	80
65	CK1-gamma2	CK1	86	78
66	CK1-gamma3	CK1	80	77
67	CK2-alpha1	OTHER	98	97
68	CK2-alpha2	OTHER	97	95
69	CLK1	CMGC	93	65
70	CLK2	CMGC	94	76
71	CLK3	CMGC	99	82
72	CLK4	CMGC	85	72
73	COT	STE	115	115
74	CSF1-R	TK	81	74
75	CSK	TK	93	80
76	DAPK1	CAMK	88	83
77	DAPK2	CAMK	104	99
78	DAPK3	CAMK	90	79
79	DCAMKL2	CAMK	114	93
80	DDR2	TK	95	99
81	DMPK	AGC	90	92
82	DNA-PK	ATYPICAL	86	90
83	DYRK1A	CMGC	107	97
84	DYRK1B	CMGC	108	100
85	DYRK2	CMGC	110	124
86	DYRK3	CMGC	107	89
87	DYRK4	CMGC	106	94
88	EEF2K	ATYPICAL	93	94
89	EGF-R	TK	77	73
90	EIF2AK2	OTHER	130	114
91	EIF2AK3	OTHER	97	107
92	EPHA1	TK	96	94
93	EPHA2	TK	88	74
94	EPHA3	TK	92	90
95	EPHA4	TK	86	91
96	EPHA5	TK	99	95
97	EPHA6	TK	91	72
98	EPHA7	TK	93	82
99	EPHA8	TK	70	84
100	EPHB1	TK	86	83
101	EPHB2	TK	111	95
102	EPHB3	TK	95	92

103	EPHB4	TK	93	73
104	ERBB2	TK	98	75
105	ERBB4	TK	90	61
106	ERK1	CMGC	107	112
107	ERK2	CMGC	105	95
108	ERK5	CMGC	111	107
109	ERK7	CMGC	100	104
110	FAK aa2-1052	TK	79	72
111	FER	TK	85	87
112	FES	TK	95	88
113	FGF-R1	TK	106	107
114	FGF-R2	TK	98	106
115	FGF-R3	TK	92	105
116	FGF-R4	TK	104	91
117	FGR	TK	70	74
118	FLT3	TK	74	80
119	FRK	TK	88	89
120	FYN	TK	68	58
121	GRK2	AGC	99	92
122	GRK3	AGC	98	90
123	GRK4	AGC	71	66
124	GRK5	AGC	81	77
125	GRK6	AGC	76	73
126	GRK7	AGC	86	79
127	GSG2	OTHER	100	104
128	GSK3-alpha	CMGC	98	88
129	GSK3-beta	CMGC	105	99
130	HCK	TK	68	52
131	HIPK1	CMGC	100	90
132	HIPK2	CMGC	123	121
133	HIPK3	CMGC	95	103
134	HIPK4	CMGC	104	105
135	HRI	OTHER	107	104
136	IGF1-R	TK	108	95
137	IKK-alpha	OTHER	97	103
138	IKK-beta	OTHER	104	101
139	IKK-epsilon	OTHER	86	77
140	INS-R	TK	112	113
141	INSR-R	TK	109	99
142	IRAK1	TKL	111	92
143	AK4 (untagged)	TKL	110	106
144	ITK	TK	90	41
145	K1 aa583-1154	TK	116	105
146	JAK2	TK	94	96
147	JAK3	TK	91	40
148	JNK1	CMGC	113	109
149	JNK2	CMGC	111	117
150	JNK3	CMGC	101	107
151	KIT	TK	77	70
152	LCK	TK	56	77
153	LIMK1	TKL	110	94
154	LIMK2	TKL	93	99
155	LRRK2	TKL	102	93

156	LTK	TK	99	103
157	LYN	TK	88	81
158	MAP3K1	STE	100	94
159	MAP3K10	STE	91	66
160	MAP3K11	STE	96	62
161	MAP3K7/MAP3K1	STE	110	99
162	MAP3K9	STE	98	82
163	MAP4K2	STE	100	100
164	MAP4K4	STE	99	92
165	MAP4K5	STE	86	76
166	MAPKAPK2	CAMK	74	60
167	MAPKAPK3	CAMK	102	97
168	MAPKAPK5	CAMK	83	81
169	MARK1	CAMK	95	90
170	MARK2	CAMK	117	115
171	MARK3	CAMK	86	91
172	MARK4	CAMK	92	97
173	MATK	TK	95	88
174	MEK1	STE	79	58
175	MEK2	STE	96	82
176	MEK5	STE	93	91
177	MEKK2	STE	86	88
178	MEKK3	STE	85	91
179	MELK	CAMK	89	76
180	MERTK	TK	91	93
181	MET	TK	109	99
182	MINK1	STE	105	97
183	MKK4	STE	98	107
184	MKK6 S207D/T21	STE	107	106
185	MKK7	STE	81	77
186	MKNK1	CAMK	106	122
187	MKNK2	CAMK	79	75
188	MLK4	TKL	148	95
189	MST1	STE	111	109
190	MST2	STE	97	91
191	MST3	STE	97	86
192	MST4	STE	109	121
193	mTOR	ATYPICAL	105	39
194	MUSK	TK	92	87
195	MYLK	CAMK	96	89
196	MYLK2	CAMK	115	105
197	MYLK3	CAMK	98	95
198	NEK1	OTHER	105	109
199	NEK11	OTHER	102	85
200	NEK2	OTHER	103	103
201	NEK3	OTHER	108	102
202	NEK4	OTHER	93	93
203	NEK6	OTHER	113	120
204	NEK7	OTHER	89	82
205	NEK9	OTHER	88	78
206	NIK	STE	93	92
207	NLK	CMGC	107	103
208	p38-alpha	CMGC	108	105

209	p38-beta	CMGC	108	104
210	p38-delta	CMGC	97	102
211	p38-gamma	CMGC	112	112
212	PAK1	STE	106	106
213	PAK2	STE	89	87
214	PAK3	STE	94	98
215	PAK4	STE	100	87
216	PAK6	STE	101	99
217	PAK7	STE	85	95
218	PASK	CAMK	96	89
219	PBK	OTHER	88	101
220	PDGFR-alpha	TK	87	96
221	PDGFR-beta	TK	97	92
222	PDK1	AGC	111	94
223	PHKG1	CAMK	95	77
224	PHKG2	CAMK	97	88
225	PIM1	CAMK	82	83
226	PIM2	CAMK	89	94
227	PIM3	CAMK	93	95
228	PKA	AGC	123	122
229	PKC-alpha	AGC	88	91
230	PKC-beta1	AGC	93	95
231	PKC-beta2	AGC	103	102
232	PKC-delta	AGC	92	91
233	PKC-epsilon	AGC	85	102
234	PKC-eta	AGC	102	94
235	PKC-gamma	AGC	92	96
236	PKC-iota	AGC	103	97
237	PKC-mu	AGC	88	122
238	PKC-nu	AGC	96	98
239	PKC-theta	AGC	95	94
240	PKC-zeta	AGC	93	79
241	PKMYT1	OTHER	102	81
242	PLK1	OTHER	114	113
243	PLK3	OTHER	99	95
244	PRK1	AGC	97	91
245	PRK2	AGC	102	116
246	PRKD2	CAMK	101	112
247	PRKG1	AGC	109	120
248	PRKG2	AGC	90	102
249	PRKX	AGC	82	83
250	PYK2	TK	101	93
251	ROD/Y341D (ur	TKL	104	93
252	RET	TK	104	71
253	RIPK2	TKL	100	90
254	RIPK5	TKL	91	77
255	ROCK1	AGC	115	108
256	ROCK2	AGC	101	92
257	RON	TK	100	81
258	ROS	TK	101	102
259	RPS6KA1	AGC	103	86
260	RPS6KA2	AGC	97	81
261	RPS6KA3	AGC	90	79

262	RPS6KA4	AGC	105	93
263	RPS6KA5	AGC	101	96
264	RPS6KA6	AGC	103	106
265	S6K	AGC	99	40
266	S6K-beta	AGC	104	89
267	SAK	OTHER	85	86
268	SGK1	AGC	102	86
269	SGK2	AGC	99	97
270	SGK3	AGC	100	123
271	SIK1	CAMK	82	90
272	SIK2	CAMK	82	89
273	SIK3	CAMK	114	98
274	SLK	STE	100	67
275	SNARK	CAMK	106	91
276	SNK	OTHER	88	91
277	C (GST-HIS-t	TK	91	82
278	SRMS	TK	96	85
279	SRPK1	CMGC	98	101
280	SRPK2	CMGC	94	89
281	STK17A	CAMK	88	90
282	STK23	CAMK	114	106
283	STK25	STE	98	86
284	STK33	CAMK	98	103
285	STK39	STE	102	82
286	SYK aa1-635	TK	98	96
287	TAOK2	STE	103	86
288	TAOK3	STE	109	109
289	TBK1	OTHER	96	91
290	TEC	TK	93	63
291	TGFB-R1	TKL	106	110
292	TGFB-R2	TKL	84	69
293	TIE2	TK	113	97
294	TLK1	AGC	78	75
295	TLK2	AGC	78	81
296	TNK1	TK	83	78
297	TRK-A	TK	83	69
298	TRK-B	TK	94	75
299	TRK-C	TK	77	77
300	TSF1	OTHER	103	97
301	TSK2	CAMK	90	99
302	TSSK1	CAMK	88	88
303	TTBK1	CK1	84	83
304	TTBK2	CK1	100	98
305	TTK	OTHER	94	101
306	TXK	TK	77	61
307	TYK2	TK	99	95
308	TYRO3	TK	93	90
309	VEGF-R1	TK	104	90
310	VEGF-R2	TK	80	97
311	VEGF-R3	TK	92	80
312	VRK1	CK1	103	95
313	VRK2	CK1	72	63
314	WEE1	OTHER	108	87

<b>315</b>	<b>WNK1</b>	<b>OTHER</b>		<b>127</b>	<b>117</b>
<b>316</b>	<b>WNK2</b>	<b>OTHER</b>		<b>105</b>	<b>94</b>
<b>317</b>	<b>WNK3</b>	<b>OTHER</b>		<b>133</b>	<b>119</b>
<b>318</b>	<b>YES</b>	<b>TK</b>		<b>105</b>	<b>83</b>
<b>319</b>	<b>ZAK</b>	<b>TKL</b>		<b>100</b>	<b>92</b>
<b>320</b>	<b>ZAP70</b>	<b>TK</b>		<b>95</b>	<b>86</b>