

Strukturbiologische und zelluläre
Charakterisierung Isoform-selektiver
kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

Fakultät Chemie und Chemische Biologie der

Technischen Universität Dortmund

Vorgelegt von

Laura Depta

Geb. 24.06.1995 in Marl

Januar 2022

DISSERTATION

Strukturbiologische und zelluläre Charakterisierung Isoform-selektiver kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren

Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

Technische Universität Dortmund

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

Dortmund, 2022

“I am among those who think that science has great beauty.

A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale.”

- MARIE CURIE -

Madame Curie: A Biography (1937)

by Eve Curie Labouisse

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Daniel Rauh im Zeitraum von November 2018 bis Dezember 2021 im Fachbereich der Chemischen Biologie und Medizinischen Chemie der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Im Rahmen dieser Dissertation entstanden die Bachelorarbeiten von Fabian Schnecke (2019), Sandra Koska (2020) und Cora Neugebauer (2021) sowie die Masterarbeit von Melissa Lubeck (2020) und Fabian Schnecke (2022). Die Arbeiten sind an den entsprechenden Stellen gekennzeichnet.

PUBLIKATIONEN

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden die folgenden Publikationen.

* Diese Autoren trugen gleichermaßen zur Publikation bei.

[1] Wiedemann, B.*; Kamps, D.*; **Depta, L.**; Weisner, J.; Cvetreznik, J.; Tomassi, S.; Gentz, S.; Hoffmann, J.-E.; Müller, M. P.; Koch, O.; Dehmelt, L.; Rauh, D., Design and Synthesis of Nrf2-Derived Hydrocarbon Stapled Peptides for the Disruption of Protein-DNA-Interactions, *submitted 2022*.

[2] Quambusch, L.*; **Depta, L.***; Landel, I.; Lubeck, M.; Kirschner, T.; Nabert, J.; Uhlenbrock, N.; Weisner, J.; Kostka, M.; Levy, L. M.; Schultz-Fademrecht, C.; Glanemann, F.; Althoff, K.; Müller, M. P.; Siveke, J. T.; Rauh, D., Cellular model system to dissect the isoform-selectivity of Akt inhibitors, *Nature Communications* **2021**, 12, 5297.

[3] Landel, I.*; Quambusch, L.*; **Depta, L.***; Rauh, D., Spotlight on AKT: Current Therapeutic Challenges, *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, 11 (3), 225-227.

[4] Quambusch, L.; Landel, I.; **Depta, L.**; Weisner, J.; Uhlenbrock, N.; Müller, M. P.; Glanemann, F.; Althoff, K.; Siveke, J. T.; Rauh, D., Covalent-Allosteric Inhibitors to Achieve Akt Isoform-Selectivity, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2019**, 58 (52), 18823-18829.

[5] Uhlenbrock, N.*; Smith, S.*; Weisner, J.; Landel, I.; Lindemann, M.; Le, T. A.; Hardick, J.; Gontla, R.; Scheinpflug, R.; Czodrowski, P.; Janning, P.; **Depta, L.**; Quambusch, L.; Müller, M. P.; Engels, B.; Rauh, D., Structural and chemical insights into the covalentallosteric inhibition of the protein kinase Akt, *Chem. Sci.* **2019**, 10 (12), 3573-3585.

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

DANKSAGUNG

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Daniel Rauh für das interessante Promotionsprojekt, die fortwährende Unterstützung und anregende Diskussionen während meiner Promotion. Herrn Dr. Leif Dehmelt danke ich herzlich sowohl für die Übernahme des Koreferats als auch für die Hilfestellung und Beratung hinsichtlich zellbiologischer Fragestellungen.

Einen weiteren großen Dank möchte ich an Dr. Matthias Müller für die ständige Hilfsbereitschaft in jeglichen wissenschaftlichen Fragestellungen richten. Darüber hinaus danke ich dem Sekretariat mit Martina Reibner, Petra Alhorn, Maria Sergani und Ulrich Schoppe für die Unterstützung und reibungslose Zusammenarbeit. Ohne euch wäre vieles nicht möglich. Andreas Arndt danke ich vor allem für die Reinigung des Erk2-Konstruktes sowie für die Unterstützung bei technischen und administrativen Fragestellungen im Labor.

Darüber hinaus war die wissenschaftliche Arbeit während meiner Promotion geprägt von zahlreichen Kollaborationen. Dazu zählen Prof. Dr. Jens Siveke, Christina Althoff und Franziska Glanemann (Universitätsklinikum Essen); Im Rahmen des DDHD-Projektes danke ich Dr. Matthias Baumann, Dr. Julian Engel und Dr. Carsten Schultz-Fademrecht (LDC Dortmund); Dr.in Laura Levy und Dr. Thorsten Genski (Taros Chemicals) sowie Prof. Dr. Jan Hengstler und seiner Arbeitsgruppe (IfaDo Dortmund). Der *Protein Chemistry Facility* des MPI Dortmund danke ich für die Virusproduktion für die Insektenzellexpression sowie Sascha Gentz für die Peptidsynthese. Dr.in Ingrid Vetter und Dr. Raphael Gasper-Schönenbrücher, danke ich für die ständige Hilfsbereitschaft und die Ermöglichung der Mitnutzung verschiedener Gerätschaften für die Proteinkristallographie. Weiterhin danke ich der AG Lorenz (ISAS) für die gute Zusammenarbeit innerhalb des Erk-CASTing-Projektes, sowie Julia Fender für die Analyse der Akt-Inhibitoren im Zusammenhang mit Cardiotoxizität. Zudem danke ich Dr.in Tania Romacho und ihren Kolleg:innen vom KomIT-Konsortium am DDZ in Düsseldorf, für die Analyse unserer Inhibitoren in Diabetes Modellen.

Ebenso bedanke ich mich bei den aktuellen und ehemaligen Mitgliedern der AG Rauh für die stets freundliche Atmosphäre: Lisa, Janina, Julia, Ina, Lena, Kiru, Jörn, Alina, Niklas, Marius, Tonia, Jan, Tom, Mike, Jonas W., Rajesh, Shiva, Sven, Tobi, Steven, Marina, Patrik, Bianca, Helena, Paul, Jonas L., Christiane und Silke. Ich hatte das Glück während meiner Promotion sehr motivierte Studenten betreuen zu dürfen. Ich bedanke mich besonders bei Melissa Lubeck für die freundschaftliche Zusammenarbeit sowie bei Sandra Koska, Cora Neugebauer und Fabian Schnecke für die Unterstützung bei verschiedenen Projekten während meiner Promotion.

Dank gilt auch dem Akt-Projektteam, darunter: Lena, Ina, Jörn, Marius und Sven. Besonders hervorheben möchte ich hier zunächst Jörn Weisner für die Hilfsbereitschaft und zahlreiche Ratschläge sowie die Zusammenarbeit in diversen Nebenprojekten. Weiterhin danke ich Ina Landel für die stets freundschaftliche Teamarbeit im Bereich der Kristallographie und Zellbiologie. Zuletzt möchte ich Lena Quambusch für die großartige Zusammenarbeit an unserer Publikation, die inspirierenden Diskussionen sowie die chemischen und biochemischen Arbeiten zu den Akt-Isoformen danken. Für das Korrekturlesen meiner Dissertation bedanke ich mich bei Lena, Ina und Melissa.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für die Ablenkung vom stressigen Laboralltag bedanken. Den größten Dank richte ich dabei an meine Eltern, meinen Zwillingbruder Maximilian und meinen Freund Max. Ohne eure Unterstützung und Loyalität hätte ich diesen Weg nicht gehen können.

INHALTSVERZEICHNIS

PUBLIKATIONEN	VII
DANKSAGUNG	VIII
INHALTSVERZEICHNIS	X
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	XII
ZUSAMMENFASSUNG	XVI
ABSTRACT	XVIII
1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Proteinkinase Akt	1
1.1.1 Akt-Isoform-spezifische Signalübertragung und Funktionen	5
1.2 Chemische Biologie	9
1.2.1 Biologische <i>versus</i> chemische Perturbationsuntersuchungen	9
1.2.2 Chemische Werkzeuge zur Adressierung der Akt-Isoformen	11
1.3 Strukturbasiertes Ligandendesign	15
2. MOTIVATION UND ZIELSETZUNG	18
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	21
3.1 Sequenz- und Strukturanalyse der Akt-Isoformen	21
3.2 Strukturbasiertes Design Isoform-selektiver CAAs	26
3.3 Darstellung und Reinigung der Akt-Isoformen	28
3.3.1 Konstruktdesign und -generierung	28
3.3.2 Expression in Insektenzellen	31
3.3.3 Etablierung und Optimierung der Proteinreinigungsstrategie	34
3.4 Kristallisationsstudien der Akt-Isoformen	50
3.4.1 Kristallisation von Akt2	50
3.4.2 Kristallisation und Strukturaufklärung von Akt2-Mimikry	57
3.4.3 Kristallisation von Akt3	61
3.5 Biochemische Charakterisierung Isoform-selektiver CAAs	65
3.6 Strukturbiochemische Analyse Isoform-selektiver CAAs	70
3.7 Zelluläre Evaluierung Isoform-selektiver CAAs	77
3.7.1 Etablierung eines Ba/F3-Modellsystems	77
3.7.2 Analyse von Isoform-selektiven CAAs im Ba/F3-Modellsystem	87
3.7.3 Studien in der humanen Krebszelllinie PANC1	93
3.7.4 Etablierung von Akt-Isoform <i>knock-outs</i> in HEK293T	98
3.8 Kristallisation von Erk2	108
3.8.1 Reinigung des Erk2-Konstruktes	109
3.8.2 Kristallisation und Strukturaufklärung von Erk2	112
3.8.3 Strukturanalyse von Erk2	114

4.	<u>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</u>	118
5.	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	121
5.1	Allgemeine Anmerkungen	121
5.1.1	Verbrauchsmaterialien	121
5.1.2	Verwendete Geräte	123
5.1.3	Verwendete Proteine, Reagenzien und Medien	125
5.1.4	Bakterienstämme und Zelllinien	126
5.1.5	Antikörper	127
5.2	Computerbasierte Methoden	129
5.2.1	Sequenzvergleich	129
5.2.2	Homologiemodelle	129
5.3	Molekular- und Mikrobiologische Methoden	129
5.3.1	Klonierung mittels Restriktion und Ligation	129
5.3.2	<i>QuickChange</i> -Mutagenese	131
5.3.3	Reinigung von PCR-Produkten	131
5.3.4	Transformation chemisch kompetenter <i>E. Coli</i>	132
5.3.5	Kolonie-PCR	132
5.3.6	Isolierung von Plasmid-DNA	133
5.3.7	DNA-Sequenzierung	133
5.3.8	Agarosegelelektrophorese	133
5.4	Heterologe Proteinexpression in <i>E. Coli</i>	133
5.5	Insektenzellkultivierung	134
5.5.1	Virusamplifikation	134
5.5.2	Heterologe Proteinexpression in Insektenzellen	135
5.6	Proteinreinigung und biochemische Methoden	135
5.6.1	Reinigung der Akt-Konstrukte	135
5.6.2	Reinigung der Erk-Konstrukte	138
5.6.3	Proteinstabilitätsassay	140
5.6.4	Bestimmung der Kinaseaktivität	140
5.7	Strukturbiologische Methoden	141
5.7.1	Kristallisations- <i>Screenings</i>	141
5.7.2	<i>Microseeding</i>	142
5.7.3	Kristallisation in <i>Fine Screens</i>	142
5.7.4	Datensammlung und Prozessierung	143
5.8	Zellbiologische Methoden	143
5.8.1	Zellkultivierung	144
5.8.2	Inkulturnahme von Säugerzellen	144
5.8.3	Kryokonservierung von Säugerzellen	145
5.8.4	Viabilitätsassay	145
5.8.5	Proteinstabilitätsassay in Zellen (CETSA)	146
5.8.6	Generierung von Zelllysaten	147
5.8.7	Western Blots	147
5.8.8	Retrovirale Transduktion muriner Ba/F3-Zellen	149
5.8.9	Anwendung von CRISPR/Cas9	150
5.9	Massenspektrometrie von Proteinen	153
6.	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	155
7.	<u>ANHANG</u>	168

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abl	engl. <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
AEX	Anionenaustauschchromatographie (engl. <i>anion exchange chromatography</i>)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
Bcr	engl. <i>breakpoint cluster region</i>
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i>)
CAAI	kovalent-allosterischer Akt-Inhibitor (engl. <i>covalent allosteric Akt inhibitors</i>)
CBB	Coomassie Brilliant Blau
CC _{1/2}	Korrelationskoeffizient
CETSA	engl. <i>Cellular thermal shift assay</i>
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonat
CRISPR/Cas9	engl. <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9</i>
CTG	CellTiter-Glo Assay
DHDD	Drug Discovery Hub Dortmund
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration

Erk	engl. <i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ESI	engl. <i>electrospray ionization-tandem mass spectrometry</i>
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FBS	Fötales Kälberserum (engl. <i>fetal bovine serum</i>)
FOXO	Forkhead-Box-Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor (engl. <i>G protein-coupled receptor</i>)
GSK3 α/β	Glykogensynthase-Kinase 3 α/β
HDR	engl. <i>homology directed repair</i>
His ₆ -Tag	Hexahistidin-Aufreinigungsanker
HM	hydrophobes Motiv
HNE	4-Hydroxy-2-nonenal
HTRF	engl. <i>Homogeneous Time-Resolved Fluorescence</i>
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IL-3	Interleukin-3
MD	Molekulardynamik
MEK	engl. <i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MSA	engl. <i>Multiple Sequence Alignment</i>
MS/MS	engl. <i>tandem mass spectrometry</i>
mTORC2	engl. <i>mechanistic target of rapamycin complex 2</i>
NHEJ	engl. <i>non-homologous end-joining</i>
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie
PAE	engl. <i>predicted aligned error</i>
PAM	engl. <i>protospacer adjacent motif</i>

PARP	Poly-ADP-Polymerase-Ribose-Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCF	engl. <i>Protein Chemistry Facility</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	engl. <i>Protein Data Bank</i>
PKD1	Phosphoinositide-abhängige Kinase-1, (engl. <i>phosphoinositide dependent kinase-1</i>)
PEG 2000 MME	Polyethylenglycol 2000 Monomethylether
PH	Pleckstrin-Homologie
PHLPP	engl. <i>PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIF	PKD1-interagierendes Fragment
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-(3,4,5)-bisphosphat
pLDDT	engl. <i>predicted local distance difference test</i>
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PRAS40	Prolin-reiches Akt-Substrat mit 40 kDa (engl. <i>proline-rich Akt substrate of 40 kDa</i>)
PROTAC	engl. <i>proteolysis targeting chimera</i>
PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog
PTM	Posttranslationale Modifikation
RIPA	engl. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
R _{merge}	Übereinstimmung symmetrieverwandter Reflexe

R _{meas}	Redundanz-unabhängiger R-Wert
RTK	Rezeptortyrosinkinase
S6	Ribosomales Protein S6
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung (engl. <i>structure activity relationship</i>)
SBLD	strukturbasiertes Ligandendesign (engl. <i>structure-based ligand design</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl. <i>size exclusion chromatography</i>)
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
sgRNA	engl. <i>single guided RNA</i>
SHIP2	Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i>
SLS	<i>Swiss Light Source</i>
SV40	Simian-Virus 40
TEV	engl. <i>tobacco etch virus</i>
T _m	Schmelztemperatur
TSA	engl. <i>thermal shift assay</i>
Wt	Wildtyp

ZUSAMMENFASSUNG

Die Proteinkinase Akt, die aus drei Isoformen (Akt1/Akt2/Akt3) besteht, ist ein zentraler Knotenpunkt innerhalb des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs und an einer Vielzahl von lebenswichtigen Prozessen in der menschlichen Zelle beteiligt. Genomische Veränderungen wie aktivierende Mutationen in PI3K und Amplifikationen von AKT-Genen können eine Überaktivierung der Akt-Isoformen und damit einhergehend verschiedene Krankheiten auslösen. Dies macht die Akt-Isoformen zu attraktiven Zielproteinen für die Arzneimittelforschung. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten sind mehrere klinische Studien mit potenziellen Arzneimittelkandidaten gescheitert. Verantwortlich dafür sind u. a. der Mangel an Informationen über Isoform-spezifische Funktionen im Zusammenhang mit menschlichen Krankheiten sowie die nicht selektive Adressierung der Isoformen und die damit verbundenen Nebenwirkungen. Frühere Studien haben gezeigt, dass ein vielversprechender Ansatz darin besteht, die allosterische Interdomänen-Bindungstasche von Akt zu adressieren.

In dieser Arbeit war das Hauptziel, strukturelle und zelluläre Systeme zu etablieren, die die Grundlage für ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign von Isoform-selektiven CAAs bilden. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein detaillierter Sequenz- und Strukturvergleich der Akt-Isoformen und ein strukturbasiertes Design einer fokussierten Wirkstoffbibliothek, bestehend aus 23 CAAs, unter Verwendung von Homologiemodellen und *AlphaFold* durchgeführt. Die Strukturanalyse und ein fundiertes Konstruktdesign ermöglichten die Entwicklung effizienter Expressions- und Reinigungsstrategien für Akt2 und Akt3. Das Fehlen von Akt2- und Akt3-Kristallstrukturen in Volllänge in der Literatur machte umfangreiche Kristallisationsstudien erforderlich, die zu vielversprechenden Kristallisationsbedingungen für Akt2 und Akt3 führten. Darüber hinaus konnte ein einzigartiger Einblick in die Akt2-Bindungstasche gewonnen werden, indem die Akt2-Interdomänen-Bindungstasche in Akt1 nachgebildet wurde. Dieser Einblick, kombiniert mit biochemischen und massenspektrometrischen Daten, ermöglichte eine Evaluierung der fokussierten Substanzbibliothek und eine Verifizierung des von einem Homologiemodell abgeleiteten CAAI-Designansatzes.

Es konnten interessante Struktur-Wirkungs-Beziehungen (SAR) abgeleitet werden, die schließlich zur Identifizierung von CAAs mit guten Selektivitätsprofilen führten. Um weiterführende zelluläre Studien zu ermöglichen, wurde ein Ba/F3-Akt-Isoform-abhängiges Modellsystem etabliert, welches das Verhalten einer onkogenen Zelllinie mimikriert und so als optimales System für die Bewertung unterschiedlicher Selektivitäten fungiert. Mit Hilfe dieses Modellsystems konnten die identifizierten biochemischen Selektivitätsprofile der fokussierten Substanzbibliothek erstmalig in den zellulären Kontext übertragen werden. Diese Selektivitätsprofile dienten als Grundlage für weitere Studien an der menschlichen Krebszelllinie PANC1. Darüber hinaus wurde ein robustes Protokoll zur Einführung von CRISPR/Cas9-vermittelten Akt-*knock-outs* in menschliche Zellen etabliert. Die zellulären Studien zeigten die Vorteile der entwickelten Isoform-selektiven CAAs gegenüber invasiven genetischen *knock-outs* für die Entschlüsselung der Isoform-spezifischen Funktionen von Akt.

Darüber hinaus ist es gelungen, ein robustes Kristallisationssystem für die Kinase Erk2 zu etablieren. Es wurden erfolgreich Erk2-Konstrukte hergestellt, exprimiert und gereinigt, die anschließend als Grundlage für die Reproduktion der aus der Literatur bekannten Kristallisationsbedingungen dienten. Nach Röntgenbeugungsexperimenten konnten strukturelle Erkenntnisse gewonnen werden, die in Zukunft das strukturbasierte Design von Erk2-Inhibitoren ermöglichen werden.

ABSTRACT

The protein kinase Akt, comprising three isoforms (Akt1/Akt2/Akt3), is a central node within the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, and involved in a wide variety of vital processes in the human cell. Genomic alterations such as activating mutations in PI3K and amplifications of AKT genes can trigger hyperactivation of Akt isoforms and concomitant diverse diseases. This makes Akt isoforms attractive target proteins for drug discovery. Despite intensive research in the last decades, several clinical trials of potential drug candidates failed. Responsible for this are, among others, the lack of information on isoform-specific functions in the context of human disease and the non-selective targeting of the isoforms and associated side effects. Previous studies revealed that addressing Akt's allosteric interdomain binding pocket is a promising approach.

In this work, the main goal was to establish structural biology and cellular systems that lay the foundation for structure-based drug design of isoform-selective CAIs. For this purpose, a detailed sequence and structure comparison of Akt isoforms and a structure-based design of a focused compound library consisting of 23 CAIs was first realized using homology models and *AlphaFold*. The structural analysis and a founded construct design enabled the development of efficient expression and purification strategies for Akt2 and Akt3. The absence of full-length Akt2 and Akt3 crystal structures in the literature necessitated extensive crystallization studies leading to promising Akt2 and Akt 3 crystallization conditions. Additionally, a unique insight into the Akt2^{Wt} binding pocket was realized using an Akt2^{Wt} interdomain binding pocket mimic in Akt1^{Wt}. This insight, combined with biochemical and mass spectrometric data, allowed an evaluation of the focused compound library and a verification of the homology model derived CAI design approach. Interesting structure-activity relationships could be deduced, which finally led to identifying CAIs with good selectivity profiles.

The establishment of a Ba/F3 Akt isoform-dependent model system facilitated the cellular characterization. The model mimics the behavior of an oncogenic cell line and thus acts as an optimal system for the evaluation of different selectivity profiles.

Using this model system, the identified biochemical selectivity profiles of the focused compound library could be transferred to the cellular context. The selectivity profiles identified in the Ba/F3 model system served as the basis for further studies in the human cancer cell line PANC1. In addition, a robust protocol for introducing CRISPR/Cas9-mediated Akt knock outs into human cells was established. The cellular studies demonstrated the advantages of the developed isoform-specific CAAs over invasive genetic knock outs for deciphering Akt isoform-specific functions.

Furthermore, establishing a robust crystallization system for the kinase Erk2 was successful. Erk2 constructs were successfully prepared, expressed, and purified, which subsequently served as the basis for reproducing literature-known crystallization conditions. After X-ray diffraction experiments, structural insights could be obtained, which will enable the structure-based design of Erk2 inhibitors in the future.



1. EINLEITUNG

Trotz bahnbrechender Fortschritte und neuer Technologien sind die Herausforderungen der Gesundheit und der medizinischen Forschung im 21. Jahrhundert gewaltig: eine alternde Bevölkerung, eine ungesunde Lebensweise, die schnelle Übertragung von Infektionserregern und das Potenzial für globale Pandemien, Antibiotikaresistenzen sowie die gesundheitlichen Auswirkungen des Klimawandels und der Umweltverschmutzung.¹ Daraus resultiert eine außerordentliche Notwendigkeit das biologische Verständnis hinsichtlich humaner Erkrankungen voranzutreiben und so die Entwicklung neuartiger Medikamente und Therapien zu ermöglichen.² Die Funktionsfähigkeit der humanen Zelle ist maßgeblich abhängig von der spezifischen Antwort intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden auf externe Stimuli. Als zentrale Steuerelemente einer Zelle stellen Proteine, wie die Proteinkinase Akt, wichtige Angriffspunkte verschiedenster Therapeutika dar, sodass ein tiefgehendes Verständnis der jeweiligen Proteinfunktionen für die Arzneistoffentwicklung unabdingbar ist.^{3,4}

1.1 Die Proteinkinase Akt

Eine zentrale Rolle innerhalb von Signaltransduktionskaskaden nehmen die Proteinkinasen ein. Kinasen gehören zu den Transferasen, welche die Übertragung des γ -Phosphats von Adenosintriphosphat (ATP) auf die Hydroxylgruppe einer Aminosäure (AS)-Seitenkette ihrer Substrate katalysieren. Dabei wird generell zwischen Tyrosin-Kinasen und Serin-/Threonin-Kinasen unterschieden. Die posttranslationale Modifikation (PTM) der Substratproteine durch die transferierte Phosphatgruppe führt durch die Einführung einer hohen Ladungsdichte zu Konformationsänderungen. Diese gehen zumeist mit einer Aktivierung oder Inaktivierung der entsprechenden Substrate einher.⁵ Das humane Kinom stellt mit insgesamt 518 bekannten Mitgliedern eine der wichtigsten Enzymfamilien dar, welche in nahezu jedem Signalweg innerhalb der humanen Zelle an essenziellen Prozessen beteiligt ist. Eine fehlregulierte Kinase-Funktion wird mit der Entstehung einer Vielzahl von Krankheiten, insbesondere Krebserkrankungen, in Verbindung gebracht.⁶

Die Proteinkinase Akt, auch Proteinkinase B genannt, ist eine der AGC-Familie zugehörige Ser/Thr-Kinase.⁷ Es existieren drei Akt-Isoformen (Akt1/PKB α ⁸, Akt2/PKB β ⁹ und Akt3/PKB γ ^{10,11}), welche eine hohe Sequenz- und Strukturhomologie aufweisen¹². Die Akt-Isoformen bestehen aus einer N-terminalen PH-(engl. *pleckstrin homology*)-Domäne (AS 5-117), die über einen flexiblen Linker mit einer Kinase-Domäne (AS 146-408) verbunden ist. Diese wird wiederum vom C-terminalen regulatorischen, hydrophoben Motiv (HM) flankiert (AS 409-480).¹³ Die stark konservierte Kinasedomäne ist aus einer N-terminalen β -Faltblatt-reichen Domäne und einer C-terminalen α -Helix-reichen Domäne aufgebaut, welche über die Scharnierregion verbunden sind. Hier ist das katalytische Zentrum von Akt lokalisiert (Abbildung 1).¹²

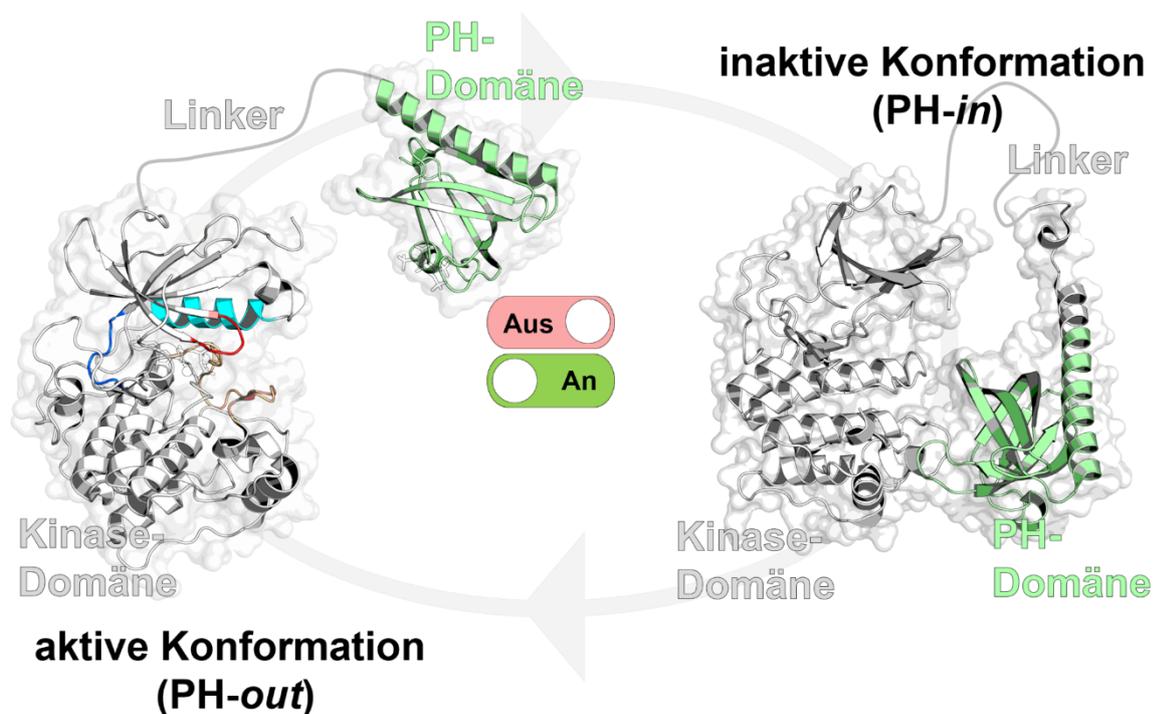


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Proteinkinase Akt. Darstellung der Kinase-Domäne (grau, PDB: 4EKK)¹⁴ und der PH-Domäne (grün; PDB: 1UNQ)¹⁵ in der aktiven PH-out-Konformation (links) und der autoinhibitorischen Konformation (rechts, PDB: 7APJ)¹⁶. Die Linkerregion ist als graue Linie dargestellt, die α C-Helix ist in cyan eingefärbt, die Scharnierregion in blau, die Glycin-reiche Schleife in rot und die Aktivierungsschleife in beige.

Die PH-Domäne ist maßgeblich am Regulations- und Aktivierungsmechanismus von Akt beteiligt. Diese β -Faltblatt-reiche Domäne besitzt eine Phosphoinositol-Bindetasche und ist demnach für die Rekrutierung des Proteins zur Zellmembran sowie zu endogenen Membranen verantwortlich.¹⁵ Weiterhin ermöglicht der flexible Linker (AS 118-145) unterschiedliche Positionierungen der PH-Domäne zur Kinase-Domäne. Zum einen kann eine autoinhibitorische PH-*in*-Konformation gebildet werden, bei der die PH-Domäne über ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken, ionischen Interaktionen und hydrophoben Wechselwirkungen mit der Kinase-Domäne interagiert.¹⁶ Zum anderen ermöglicht dies die Formation einer aktiven PH-*out*-Konformation, welche das katalytische Zentrum freilegt und die Bindung von ATP ermöglicht (Abbildung 1).¹⁴ Das regulatorische hydrophobe Motiv wechselwirkt intramolekular mit der N-terminalen Subdomäne der Kinasedomäne zwischen α B- und α C-Helix und enthält das PDK1-interagierende-Fragment (PIF). Dabei ist eine Phosphorylierung am Thr450 für eine Faltung des C-terminalen HM auf die N-terminale Subdomäne verantwortlich. Dies gewährleistet einen Schutz vor proteosomalem Abbau und ist essenziell für die Stabilität des Proteins.¹⁷

Die Aktivierung von Akt erfolgt hauptsächlich durch externe Stimuli wie Wachstumsfaktoren oder Insulin, welche Membran-ständige Rezeptoren wie RTKs (engl. *receptor tyrosine kinase*) und GPCRs (engl. *G protein coupled receptors*) aktivieren. Dies resultiert in der Aktivierung unterschiedlichster Signaltransduktionskaskaden.¹⁸ Der bekannteste Signalweg, in dem Akt eine Rolle spielt, ist der PI3K/Akt-Signalweg. Dieser führt zur Umsetzung von Membran-gebundenem Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), was wiederum die Rekrutierung von PH-Domänen-assoziierten Proteinen wie Akt und PDK1 (engl. *3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1*) an die Membran induziert.¹⁹ Weiterhin kann die Bindung der Akt2-PH-Domäne auch an endogene Membranen sowie an PI(3,4)P₂ erfolgen.²⁰ Die Bindung der PH-Domäne an PIP₃ führt zu einem Konformationswechsel von der autoinhibitorischen Konformation (PH-*in*) in die aktive Konformation (PH-*out*) von Akt.²¹ Durch diesen Vorgang wird die Aktivierungsschleife freigelegt und es kann durch PDK1 eine Phosphorylierung am Thr308 erfolgen.²²

Zur vollständigen Aktivierung von Akt wird zusätzlich die Phosphorylierung des Ser473 durch mTORC2 (engl. *mammalian target of rapamycin complex 2*) benötigt.²³ Dies ermöglicht die Phosphorylierung von nachgeschalteten Akt-Substraten, wie zum Beispiel FOXO1/3a (engl. *forkhead box protein 1/3a*) und GSK3a/β (Glykogensynthase-Kinase 3).¹⁸ (Abbildung 2)

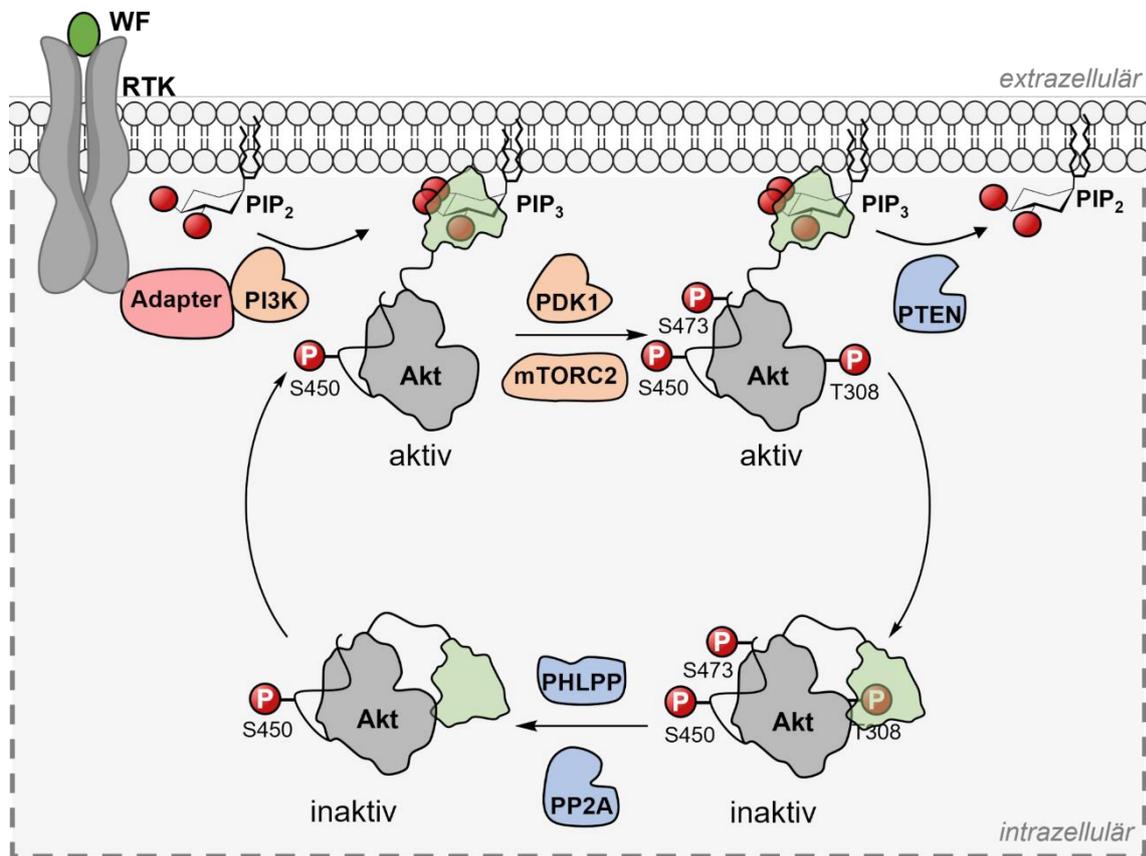


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aktivierungsmechanismus von Akt. Zunächst erfolgt eine Aktivierung von Membranrezeptoren durch externe Stimuli.¹⁸ Die Produktion von PIP₃ durch PI3K oder von PIP(2,3)P₂ durch SHIP induziert die Rekrutierung von PH-Domänen-assoziierten Proteinen wie Akt und PDK1 an die Membran.^{15,20} Das in der aktiven Konformation (PH-out) vorliegende Akt kann nun am Thr308 durch PDK1 und am Ser473 durch mTORC2 vollständig aktiviert werden.^{22,23} In diesem Zustand kann Akt zahlreiche in räumlicher Nähe lokalisierte Substrate phosphorylieren und aktivieren. Sobald Akt sich von PIP₃/PIP(2,3)P₂ löst, wird erneut die autoinhibitorische Konformation ausgebildet und die Dephosphorylierung von Thr308 und Ser473 durch PHLPP und PP2A induziert. Dies gewährleistet eine präzise Signalweiterleitung als Antwort auf externe Stimuli. WF: Wachstumsfaktor, RTK: Rezeptor-Tyrosinkinase, PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, PIP₂: Phosphatidyl-inositol-(4,5)-bisphosphat, PIP₃: Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat, PTEN: *phosphatase and tensin homolog*, PDK1: *phosphoinositide-dependent kinase-1*, PP2A: *protein phosphatase 2*, mTORC2: *mechanistic target of rapamycin complex 2*, PHLPP: *PH domain and leucine rich repeat phosphatases*, Adaptiert von Truebestein *et al.*¹⁶

Die Phosphorylierung der Akt-Substrate erfolgt an einem konservierten Sequenzmotiv (R-X-R-X-X-S/T; R: Arg, X: beliebige AS).²⁴ Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von Akt von der direkten Bindung der PH-Domäne an PIP₃/PIP(2,3)P₂ abhängt. Sobald Akt sich von PIP₃/PIP(2,3)P₂ löst, wird erneut die autoinhibitorische Konformation ausgebildet und die Dephosphorylierung von Thr308 und Ser473 durch PHLPP (engl. *PH domain leucin-rich repeat phosphatase*) und PP2A (Protein Phosphatase 2A) induziert.^{16,25,26} Durch diesen streng regulierten Aktivierungsmechanismus wird eine spezifische Signalweiterleitung als Antwort auf externe Stimuli gewährleistet (Abbildung 2). Die Notwendigkeit dieser strengen Regulierung wird bei der Betrachtung der Anzahl bisher identifizierter Akt-Substrate deutlich, welche die Zahl 100 deutlich übersteigen.²⁷

1.1.1 Akt-Isoform-spezifische Signalübertragung und Funktionen

Die Komplexität der Akt-vermittelten Signalübertragung wird durch die Anwesenheit der drei Akt-Isoformen (Akt1/Akt2/Akt3) zusätzlich deutlich erhöht. In zahlreichen Studien konnten neben unterschiedlichen Substrat- und Interaktionspartner-Selektivitäten weitere Regulationsmechanismen festgestellt werden, die eine Akt-Isoform-spezifische Signalübertragung ermöglichen.²⁸

Einer dieser Regulationsmechanismen ist die Isoform-spezifische subzelluläre Kompartimentierung, die durch unterschiedliche Lokalisationen die räumliche Nähe zu Substraten und Interaktionspartnern bestimmt.²⁸ Umfassende Immunohistochemie-Studien in humanen Zelllinien sowie in humanen Krebszelllinien mit Hilfe von Isoform-spezifischen Antikörpern zeigten unterschiedliche Lokalisationen der Isoformen. Während Akt1 ubiquitär im Zytoplasma sowie an der Plasmamembran lokalisiert ist, ist Akt2 vermehrt an endogenen Membranen, vor allem an den Mitochondrien und am Golgi-Apparat, vorhanden.²⁹ Hier scheinen vor allem die unterschiedlichen Affinitäten der Isoformen zu PIP₃ und PI(3,4)P₂ eine Rolle zu spielen. Liu *et al.* zeigten, dass Akt2 neben der Bindung an PIP₃ ebenfalls durch PI(3,4)P₂ an endogene Membranen rekrutiert werden kann.²⁰

PI(3,4)P₂ wird durch SHIP2 (engl. *SH2-containing phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase*) aus PIP₃ gebildet und in Form eines Endosoms durch Endozytose aus der Plasmamembran freigesetzt.³⁰ Akt3-spezifische Signale wurden hauptsächlich an der nuklearen Membran und im Zellkern nachgewiesen. Akt3 zeigt wie Akt1 ausschließlich Bindung an PIP₃.^{20,29} Darüber hinaus lässt sich eine gewebsspezifische Expression feststellen. Akt1 zeigt eine ubiquitäre Expression, was auf eine Beteiligung an zahlreichen zellulären Prozessen hindeutet. Akt2 kann vor allem in Insulin-abhängigen Zellen wie skeletalen Muskel- und Fettzellen und Hepatozyten nachgewiesen werden. Akt3 zeigt eine sehr spezifische Gewebsverteilung und ist hauptsächlich in Gehirn- und Hodengewebe vorhanden.³¹

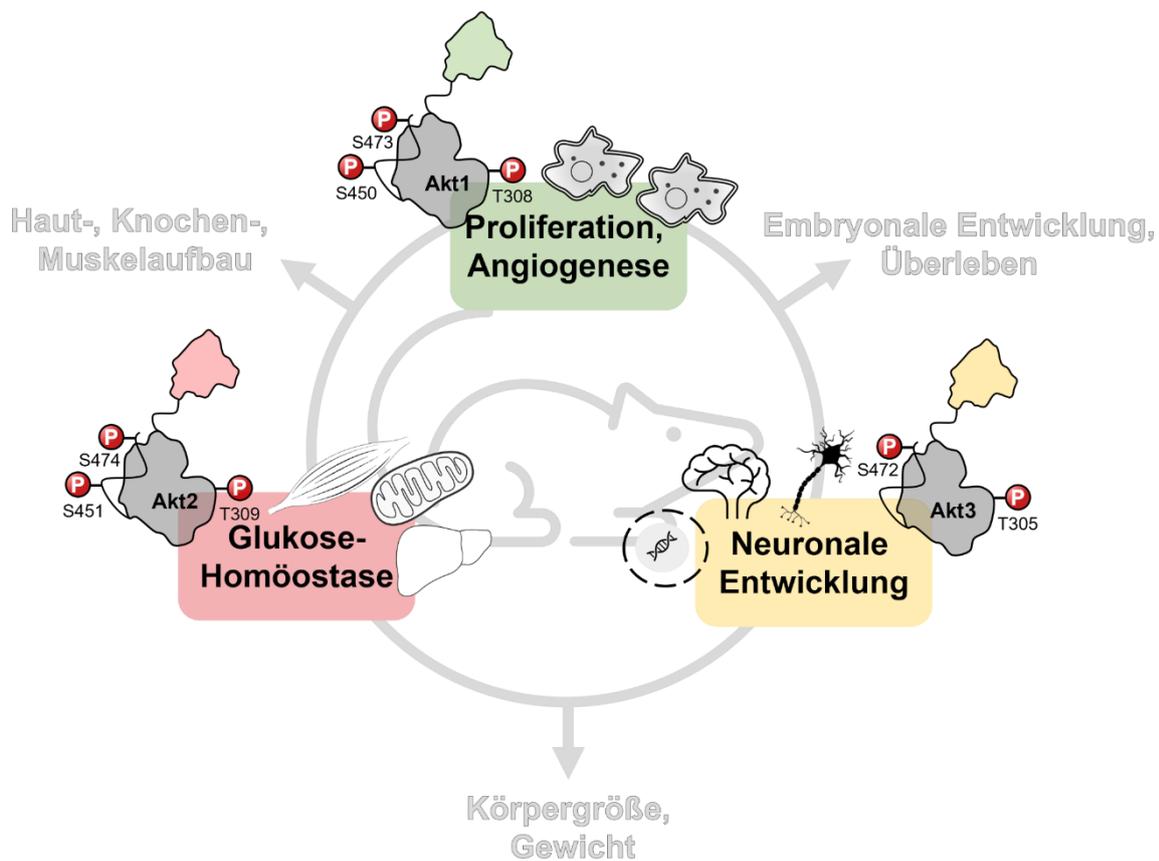


Abbildung 3: Darstellung der redundanten und nicht-redundanten Isoform-spezifischen Funktionen. Umfassende Akt-Isoform *knock-out*-Studien zeigten, dass Akt1 eine zentrale Rolle für die Proliferation, das Zellüberleben und die Angiogenese einnimmt, Akt2 vor allem für die Aufrechterhaltung der Glukose-Homöostase und Akt3 für die neuronale Entwicklung. Weiterhin zeigten *knock-out*-Kombinationen überlappenden Funktionen, die in dieser Abbildung mit Pfeilen zwischen den entsprechenden Isoformen gekennzeichnet sind.^{28,32-35} Adaptiert von Gonzalez *et al.*²⁸

Zusätzlich könnten alternative Aktivierungsmechanismen und Stimulus-spezifische Antworten zu einer Isoform-spezifischen Signalübertragung beitragen. In zahlreichen Studien wurden positive und negative Rückkopplungsschleifen innerhalb des PI3K/Akt-Netzwerks beschrieben.³⁶⁻³⁸ Darüber hinaus zeigen die PI3K-Isoformen unterschiedliche Präferenzen für PIP-Varianten und führen so zu einer spezifischen, zeitlich-versetzten Antwort auf unterschiedliche extrazelluläre Faktoren.³⁹ Des Weiteren sind unterschiedliche PTMs der Akt-Isoformen beschrieben. Als Ankerpunkte dienen hier vor allem die Linkerregionen, welche im Vergleich zu den anderen Strukturelementen eine geringe Homologie zwischen den Isoformen aufweisen. So wurde im Falle von Akt2 eine durch ROS (reaktive Sauerstoff-Spezies) erzeugte reversible Oxidation am Cys124 beschrieben, welche zur Inaktivierung der Kinase führt.⁴⁰ Im Gegensatz dazu zeigt das Cys119 in Akt3 Sensitivität gegenüber dem *second-messenger* HNE (4-Hydroxy-2-nonenal), was ebenfalls eine Inaktivierung der Kinase induziert.⁴¹

Aus diesen Regulationsmechanismen resultieren unterschiedliche Funktionen der Akt-Isoformen, die in der Vergangenheit hauptsächlich mit Hilfe von phänotypischen *knock-out*-Experimenten nachgewiesen wurden (Abbildung 3). Die genetische Entfernung von Akt1 in Mausmodellen führte zu einer deutlichen Reduktion des Körpergewichts und es konnte vermehrt Apoptose in den Zellen nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen weisen auf eine hohe Relevanz von Akt1 im Hinblick auf Proliferation und Zellüberleben hin.^{28,32} Akt2 Maus-*knock-out*-Studien zeigten, dass in Abwesenheit von Akt2 ein Diabetes-Typ 2-artiger Phänotyp sowie eine veränderte Glukose-Verwertung auftreten. Demnach wird Akt2 vor allem eine zentrale Rolle in der Instandhaltung der Glukose-Homöostase zugeschrieben.^{34,35} Der Einfluss von Akt2 auf den zellulären Energiemetabolismus wird zusätzlich durch die Interaktion mit Glukosetransportern und mitochondrialen Hexokinasen untermauert.^{42,43} Darüber hinaus wurde bei der Untersuchung von Akt3 *knock-out*-Mausmodellen eine fehlerhafte Entwicklung des Gehirns beobachtet, was auf eine zentrale Rolle innerhalb der neuronalen Entwicklung hindeutet. Eine Kombination der Akt-Isoform-*knock-outs* zeigte ebenfalls überlappende Funktionen.³¹⁻³³

Die simultane Deletion von Akt1 und Akt2 führt zur Letalität kurz nach der Geburt, Akt1- und Akt3-*knock-out*-Mäuse sind embryonal letal, während Mäuse mit einem einzigen funktionalen Allel von Akt1 (Akt1^{+/}-Akt2⁻-Akt3⁻) trotz reduziertem Körpergewicht und Insulin- und Glukoseintoleranz lebensfähig sind.^{28,33}

Der PI3K/Akt-Signalweg spielt eine Schlüsselrolle bei verschiedenen zellulären Prozessen wie Zellproliferation, Stoffwechsel und Zellüberleben und ist in vielen humanen Erkrankungen, wie zum Beispiel in Krebs, fehlreguliert. Genomische Veränderungen können zu einer Überaktivierung der Akt-Isoformen führen, welche als wichtige Signalknotenpunkte innerhalb des PI3K/Akt-Signalweges fungieren.¹⁸ Am häufigsten treten Deletionen von PTEN (30 %) auf, gefolgt von Mutationen in PI3KCA (13 %), PTEN (6 %) und AKT (1 %).^{44,45} Amplifikationen von Akt1 wurden primär in Magenkrebs⁴⁶, von Akt2 in Eierstock- und Pankreaskrebs^{9,47} und von Akt3 in Melanomen nachgewiesen.⁴⁸ Eine Überexpression von Akt1 lässt sich vor allem in Brustkrebs⁴⁹, von Akt2 in Leberzellkarzinomen⁵⁰ und von Akt3 in Estrogen-Rezeptor-negativem (ER-neg.) Brustkrebs sowie Melanomen beobachten.⁴⁸ Mutationen treten in humanen Karzinomen vorrangig in Akt1 auf. Konstitutive Überaktivierungen von Akt2 und Akt3 resultieren hingegen hauptsächlich aus Amplifikationen, Überexpression oder Veränderungen der im Signalweg vorgeschalteten Proteinregulation.²⁸ Die Mutation Akt1^{E17K} zeigte sich in Eierstock-, Brust- und Darmkrebs. Dabei liegt die mutierte Kinase in der permanent aktiven PH-*out*-Konformation vor, da die negativ geladene AS Glutamat zu einem positiv geladenen Lysin mutiert, was zu einer Destabilisierung der autoinhibitorischen PH-*in*-Konformation führt.⁵¹ Innerhalb der gleichen Krebszelllinie weisen die Isoformen häufig unterschiedliche und sogar gegensätzliche Funktionen auf. Es konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Akt1 in Brustkrebs einen anti-metastatischen Effekt zeigt, während Akt2 die Metastasierung vorantreibt.⁵² Innerhalb von Lungenkrebs wurde beobachtet, dass eine Akt1-Inhibierung einen negativen Effekt auf das Wachstum der Tumore hat, während eine Akt2-Inhibierung die Proliferation beschleunigt.⁵³ Diese in malignen Erkrankungen auftretenden Ambivalenzen, verdeutlichen erneut die Komplexität der Akt-Isoform-spezifischen Signalübertragung, welche durch viele Faktoren beeinflusst wird und trotz zahlreicher Studien noch nicht gänzlich verstanden ist.

Bis heute wurden zur Aufklärung der zellulären Funktionen der Isoformen vor allem genetisch-invasive *knock-out*-Studien verwendet. Hier könnte die zielgerichtete Adressierung der Akt-Isoformen mit selektiven, niedermolekularen Inhibitoren dabei helfen das Verständnis über die Isoform-spezifischen Funktionen zu erweitern. Weiterhin könnte dieser Ansatz die durch eine pan-Akt-Adressierung auftretenden Nebenwirkungen und Limitationen bei der Behandlung von humanen Erkrankungen umgehen.

1.2 Chemische Biologie

In den letzten zwei Jahrzehnten hat sich das Feld der Chemischen Biologie zu einer der führenden Disziplinen für die Entschlüsselung biologischer und zellulärer Fragestellungen entwickelt. Die Chemische Biologie beinhaltet die Entwicklung und die Verwendung von niedermolekularen Verbindungen als chemische Werkzeuge zur Untersuchung biologischer Systeme, von der Proteinstruktur und -funktion über zelluläre Signalwege bis hin zu komplexen Organismen.^{54,55} Die Chemische Biologie interagiert an der Schnittstelle vieler Disziplinen, und während sie ursprünglich auf akademische Einrichtungen beschränkt war, hat sie sich zu einem integralen Bestandteil der Arzneimittelforschung entwickelt.⁵⁶

1.2.1 Biologische *versus* chemische Perturbationsuntersuchungen

Der Begriff der Perturbation beschreibt die gezielte Störung eines biologischen Systems, Signalwegs oder Proteins mit Hilfe von biologischen oder chemischen Methoden wie zum Beispiel mit niedermolekularen Verbindungen. So können Informationen über die Funktionen der entsprechenden Komponenten erlangt werden.⁵⁷ Es gibt zwei fundamentale Ansätze, die im Rahmen der Studie von zellulären Prozessen verwendet werden: Vorwärts- und rückwärts-gerichtete Genetik (Abbildung 4). In der vorwärts-gerichteten Genetik werden unspezifische Perturbationen verwendet, um einen bestimmten Phänotyp zu induzieren, welcher anschließend analysiert wird und so Rückschlüsse auf die für den Phänotyp verantwortlichen Gene oder Proteine zulässt.

Im Rahmen der rückwärts-gerichteten Genetik werden spezifische Perturbationen eines bestimmten Proteins oder Gens verwendet, um tiefgreifende Informationen über die Funktionen der untersuchten Komponenten zu bekommen. Generell kann dafür sowohl die „klassische“ biologische Genetik verwendet werden als auch die chemische Genetik.^{58,59}

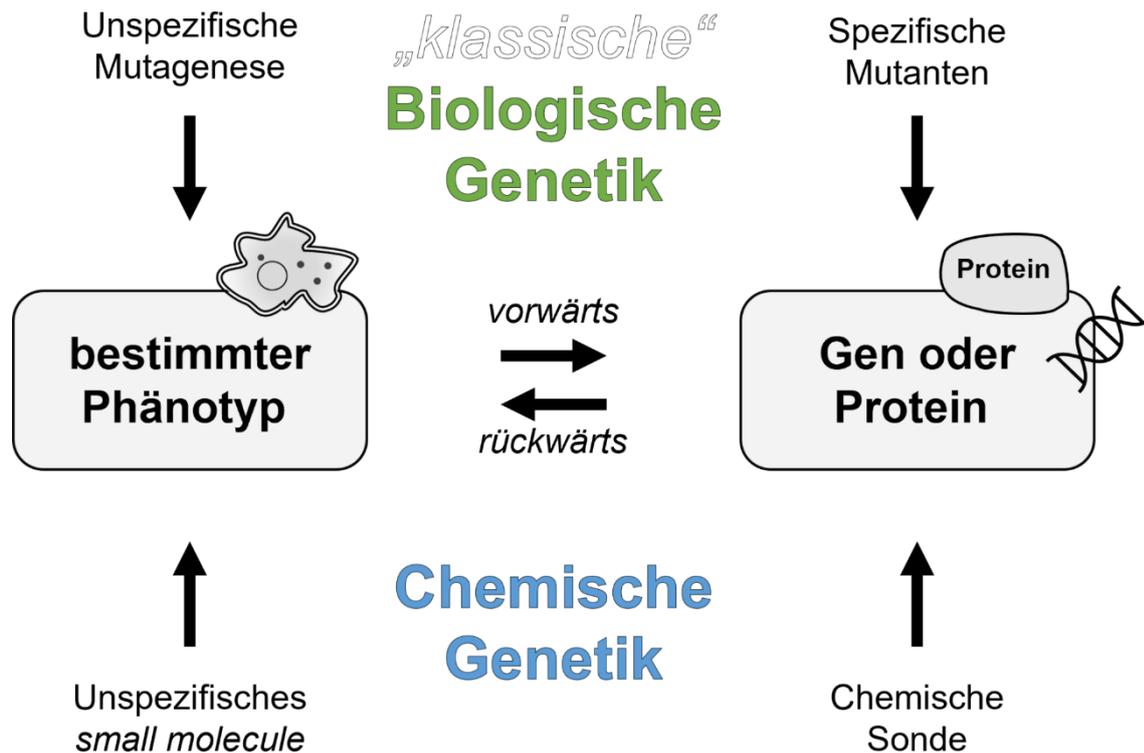


Abbildung 4: Prinzip der klassischen biologischen Genetik und der chemischen Genetik zur Untersuchung biologischer Fragestellungen. In der vorwärts-gerichteten Genetik werden unspezifische Perturbationen verwendet, um einen bestimmten Phänotyp zu induzieren, welcher anschließend analysiert wird und so Rückschlüsse auf die für den Phänotyp verantwortlichen Gene oder Proteine zulässt. Im Rahmen der rückwärts-gerichteten Genetik werden Perturbationen eines bestimmten Proteins oder Gens verwendet, um tiefgreifende Informationen über die spezifischen Funktionen der untersuchten Komponenten zu bekommen.⁵⁸⁻⁶⁰ Adaptiert von Lehár *et al.*⁶⁰

Die klassischen genetischen Methoden umfassen unter anderem das gezielte Einführen oder Entfernen von Genabschnitten (*knock-in/-out*) zum Beispiel mit Hilfe der „molekularen Genschere“ CRISPR/Cas⁹⁶¹ oder die Verwendung von sogenannter *small interfering RNA* (siRNA), welche zu einem gezielten Abbau der adressierten mRNA nach der Transkription führt (*knock-down*)⁶².

Diese Methoden haben den Vorteil, dass sie eine außerordentliche Selektivität gewährleisten. Zusätzlich ermöglichen Mutantenbibliotheken für mehrere Modellorganismen die phänotypische Untersuchung ganzer Genome in einem hohen Durchsatz.^{63,64} In den letzten Jahrzehnten haben diese Methoden zu fundamentalen Erkenntnissen, z. B. über die Zellteilung und die Apoptose beigetragen. Die Nachteile dabei sind, dass vor allem *knock-out*-Experimente sehr zeitintensiv sind und durch die invasive Entfernung des entsprechenden Gens oder Genprodukts ein massiver Eingriff in das biologische System vorgenommen wird. Dies kann die Aktivierung von Kompensationsmechanismen induzieren, welche schließlich dazu führen, dass keine verlässlichen Aussagen über den beobachteten Phänotyp getroffen werden können. Die chemisch-genetischen Perturbationsansätze basieren auf der gezielten Adressierung der Zielproteine mit niedermolekularen Verbindungen. Dies ermöglicht eine reversible Inaktivierung des Zielproteins sowie eine feine Regulierung der verwendeten Inhibitorkonzentrationen. Eine grundlegende Voraussetzung für die Durchführung solcher Experimente ist die Zugänglichkeit hoch-potenter und selektiver Inhibitoren.⁵⁸⁻⁶⁰ Für stark konservierte Proteine, wie zum Beispiel die Akt-Isoformen, stellt es eine große Herausforderung dar Inhibitoren mit einem geeigneten Selektivitätsprofil zu entwickeln.

1.2.2 Chemische Werkzeuge zur Adressierung der Akt-Isoformen

Aufgrund der hohen klinischen Relevanz Akt-vermittelter Signalwege in zahlreichen malignen Erkrankungen, wurden bereits verschiedenste Inhibitorclassen zur Adressierung von Akt entwickelt (Abbildung 5).⁶⁵⁻⁶⁷

Ein klassischer Ansatz sind die ATP-kompetitiven Inhibitoren, welche durch Interaktionen mit der Scharnierregion die katalytische Bindetasche von Akt blockieren und so die Bindung von ATP verhindern.^{65,68} In der Vergangenheit gelang es einigen Firmen hoch-potente orthosterische Akt-Inhibitoren zu entwickeln, welche bereits in zahlreichen klinischen Studien getestet wurden. Die Wirksamkeit dieser Inhibitorclassen bei molekular unselektierten Patientenpopulationen kann im Allgemeinen als enttäuschend betitelt werden: Ipatasertib und Capivasertib zeigten in mehreren Monotherapiestudien eine begrenzte Aktivität.⁶⁷

Weiterhin hat Ipatasertib in einer Phase-I-Studie eine bescheidene Antitumoraktivität bei der Behandlung verschiedener Tumorarten gezeigt.⁶⁹ Im Gegensatz dazu zeigte Capiwasertib, ein selektiver ATP-kompetitiver pan-Akt-Inhibitor, kürzlich in klinischen Studien eine hohe Wirksamkeit bei Patienten mit verschiedenen Tumorhistologien mit Akt1^{E17K}-Mutationen oder PTEN-Mutationen.^{70,71}

Dies deutet daraufhin, dass das Scheitern der klinischen Studien unter anderem auf eine fehlerhafte Patienten-Auswahl zurückzuführen ist.⁷² Die hohe Komplexität der Akt-vermittelten Signalübertragung erschwert die Identifizierung geeigneter Biomarker. Aus diesem Grund wäre ein präzises Verständnis über die gewebsspezifischen und genotypischen Eigenschaften der Akt-Isoformen von großem Nutzen für den Erfolg einer therapeutischen Behandlung mit Akt-Inhibitoren.^{67,72}

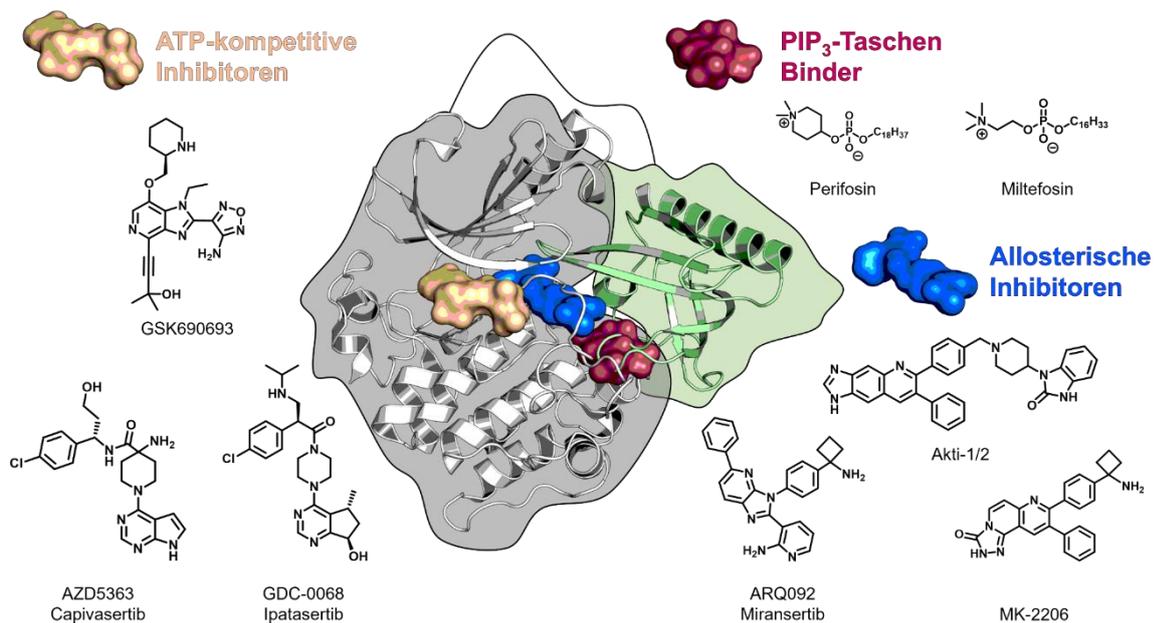


Abbildung 5: Unterschiedliche Inhibitorklassen zur Adressierung der Proteinkinase Akt. Darstellung der adressierbaren Bindetaschen mit ATP-kompetitiven (beige, PDB: 4GV1)⁷³, PIP₃-Taschen-Bindern (weinrot, PDB: 1UNQ)¹⁵ und allosterischen (blau, PDB: 6HHF) Akt-Inhibitoren sowie der chemischen Struktur literaturbekannter Inhibitoren (PDB: 6HHF)⁷⁴.

Weiterhin konnten häufig unerwünschte Nebenwirkungen beobachtet werden, die unter anderem auf die mangelhafte Selektivität von ATP-kompetitiven Inhibitoren gegenüber den Akt-Isoformen zurückzuführen sind.⁷⁵ Aufgrund der hoch konservierten Ko-Substrat-Bindetasche ist es bisher nicht gelungen Isoform-selektive ATP-kompetitive Akt-Inhibitoren zu entwickeln, welche sich für Untersuchungen der Isoform-spezifischen Funktionen eignen würden.

Einen weiteren Adressierungsansatz stellen die PIP₃-Taschen-Binder dar, welche die Rekrutierung von Akt an die Plasmamembran und so dessen Aktivierung unterbinden.^{76,77} Hier sind vor allem die Inhibitoren Perifosin und Miltefosin zu nennen, welche vielversprechende präklinische Ergebnisse lieferten, diese allerdings in klinischen Studien nicht bestätigen konnten.^{78,79} Dies lässt sich zum einen auf schlechte pharmakokinetische Eigenschaften durch den amphiphilen Charakter zurückführen und zum anderen erneut auf den Mangel an Selektivität.⁸⁰ Die PH-Domäne mit ihrer stark polaren Phosphoinositol-Bindetasche ist eine stark konservierte Struktur in der humanen Zelle, sodass durch die Behandlung mit PIP₃-Taschen-Bindern verheerende *off*-Target-Effekte, wie zum Beispiel eine schwere gastrointestinale Toxizität, beobachtet werden konnten.⁸¹

Um diese Selektivitätsprobleme zu umgehen, eignen sich vor allem allosterische Inhibitoren, welche für Akt erstmals von *Merck Sharp & Dohme* beschrieben wurden.^{82,83} Die Inhibitoren binden in einer einzigartigen Interdomänentasche und führen zur Formation einer Inhibitor-vermittelten PH-*in* Konformation.⁸⁴ Kürzlich konnten Truebestein *et al.* mit Hilfe einer Kristallstruktur der autoinhibitorischen Konformation von Akt1 zeigen (PDB: 7APJ), dass die Inhibitor-vermittelte Konformation nicht der nativen autoinhibitorischen PH-*in*-Konformation entspricht.¹⁶ Trotzdem ist die Kinase durch die Blockade der ATP-Bindetasche und der PIP₃-Bindetasche in einer inaktiven Konformation stabilisiert. Die daraufhin entwickelten Wirkstoffkandidaten MK-2206 und Miransertib zeigten vielversprechende Eigenschaften, wie zum Beispiel eine potente Inhibition der Akt-Isoformen und eine hohe Selektivität gegenüber anderen Kinasen.⁸⁵⁻⁸⁹ Allerdings blieb auch hier der erhoffte Erfolg in klinischen Studien bisher aus.

Dies lässt sich erneut auf einen Mangel an bekannten prädiktiven Biomarkern zurückführen und hebt die Notwendigkeit hervor die Signalnetzwerke der Akt-Isoformen in der humanen Zelle besser zu verstehen.^{72,90,91} Weisner und Gontla *et al.* beschrieben 2015 erstmals das Konzept der kovalent-allosterischen Akt-Inhibitoren (CAAI, engl. *covalent allosteric Akt inhibitor*) (Abbildung 6).⁹² Die kovalente Adressierung nicht-katalytischer AS-Seitenketten in Kombination mit einem allosterischen Ansatz hat besondere Vorteile: Zum einen eine optimierte Selektivität und zum anderen eine gesteigerte Effektivität durch die maximale Verweildauer des Inhibitors am Protein.^{84,93,94} Allerdings muss eine sorgfältige Auswahl der reaktiven Gruppe erfolgen, welche schließlich die kovalente Bindung ausbildet, da diese auch toxische Effekte haben kann. Hier eignen sich vor allem die moderat reaktiven Acrylamid-Gruppen. Zusätzlich sind kovalente Inhibitoren vielversprechende Startpunkte für die Entwicklung von Sondenmolekülen für die chemisch-biologische Untersuchung zellulärer Mechanismen.⁵⁵ Die Analyse publizierter Ko-Kristallstrukturen von Akt1 mit verschiedenen allosterischen Inhibitoren führte zur Identifizierung zweier redoxsensitiver Cysteine (Cys296 und Cys310) in der Aktivierungsschleife.⁹⁵

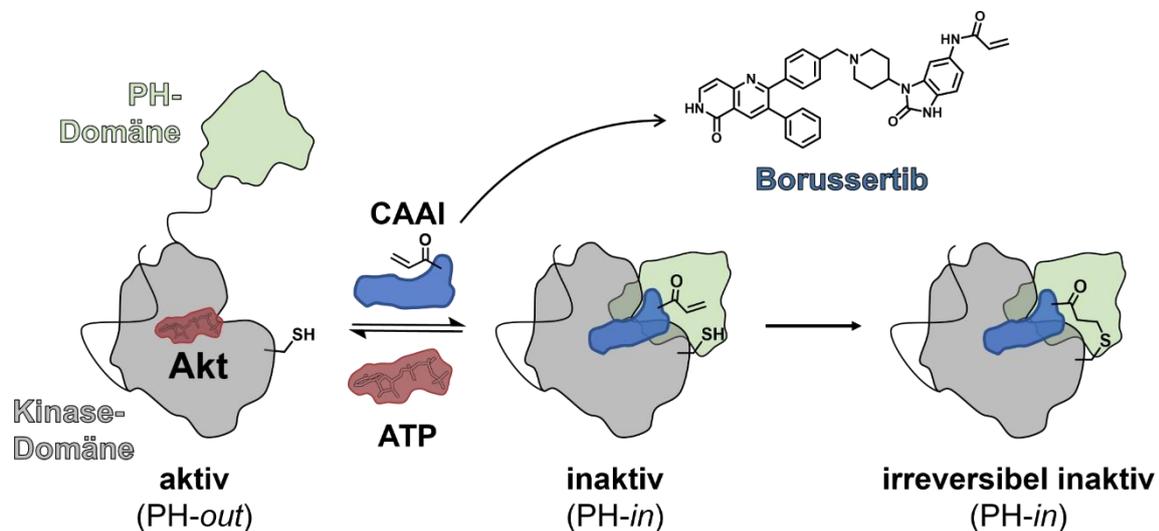


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Adressierung von Akt1 durch kovalent-allosterische Akt-Inhibitoren (CAAI). Durch die zunächst reversible Bindung des Inhibitors in die allosterische Tasche, erfolgt die Konformationsänderung zur inaktiven PH-*in*-Konformation. Durch die räumliche Nähe der Acrylamid-Gruppe zu den nicht-katalytischen Cysteinen Cys296 und Cys310 erfolgt schließlich die kovalente Bindungsbildung.^{92,95,96} Adaptiert aus der Dissertation von Lena Quambusch (AG Rauh, TU Dortmund).

Mit Hilfe eines strukturbasierten Ligandendesigns konnten schließlich CAAs entwickelt werden, welche Cys296 und Cys310 über eine Acrylamidgruppe kovalent modifizieren können.^{92,96} Hier zeigte sich vor allem die 1,6-Naphthyridinon-basierte Verbindung Borussertib mit einer gesteigerten biochemischen Potenz im Vergleich zu MK-2206 als besonders erfolgversprechend. Erste präklinische Studien in Mausmodellen in Kombination mit einem MEK-Inhibitor lieferten zusätzlich gute Ergebnisse.⁷⁴

Mit dem Blick auf die Entwicklung Akt-Isoform selektiver chemischer Sonden für die Aufklärung der Isoform-spezifischen Funktionen, erwiesen sich die beobachteten unterschiedlichen Potenzen von Borussertib auf den Isoformen als sehr interessant. Biochemische Untersuchungen zeigten, dass bei einer vollständigen Inhibierung von Akt1 und Akt2, Akt3 nur zu 60 % inhibiert wird. Die Kombination dieser Eigenschaften ermutigte Quambusch *et al.* zu einer Übertragung des Konzepts der CAAs auf literaturbekannte Akt-Inhibitoren mit moderaten Selektivitätsprofilen. Diese Moleküle stellen vielversprechende Startpunkte für die Entwicklung Akt-Isoform-selektiver Sondenmoleküle dar.⁹⁷

1.3 Strukturbasiertes Ligandendesign

Eine effektive Herangehensweise für die Entwicklung selektiver Liganden ist das strukturbasierte Ligandendesign (SBLD).⁹⁸ Im Gegensatz zum kombinatorischen Ansatz des Ligandendesigns, der auf dem *Screening* einer großen Zahl von Verbindungen beruht, die nach dem Zufallsprinzip synthetisiert wurden, basiert das SBLD auf der detaillierten Analyse der zu adressierenden Bindetasche sowie der Bindemodi bereits bekannter Liganden.⁹⁹ Diese Methode setzt demnach die Kenntnis der Struktur des Zielproteins voraus. Die stetig wachsende Anzahl an verfügbaren Proteinstrukturen sowie die Entwicklung effizienter computerbasierter Methoden haben das SBLD in den letzten Jahrzehnten zur vorherrschenden Methode für die Entwicklung von Wirkstoffen gemacht.⁹⁸

Der iterative Prozess des SBLD startet mit der Klonierung, Reinigung und Strukturbestimmung des Zielproteins (Abbildung 7).¹⁰⁰ Neben der Strukturbestimmung durch NMR-Spektroskopie und Cryo-Elektronenmikroskopie ist die Proteinkristallographie bis heute die bedeutendste Methode für die Analyse von Inhibitoren im Komplex mit dem Zielprotein.¹⁰¹ Nach der erfolgreichen Strukturbestimmung und der Etablierung eines verlässlichen Kristallisationssystems folgt ein *in silico*-Design einer fokussierten Substanzbibliothek.

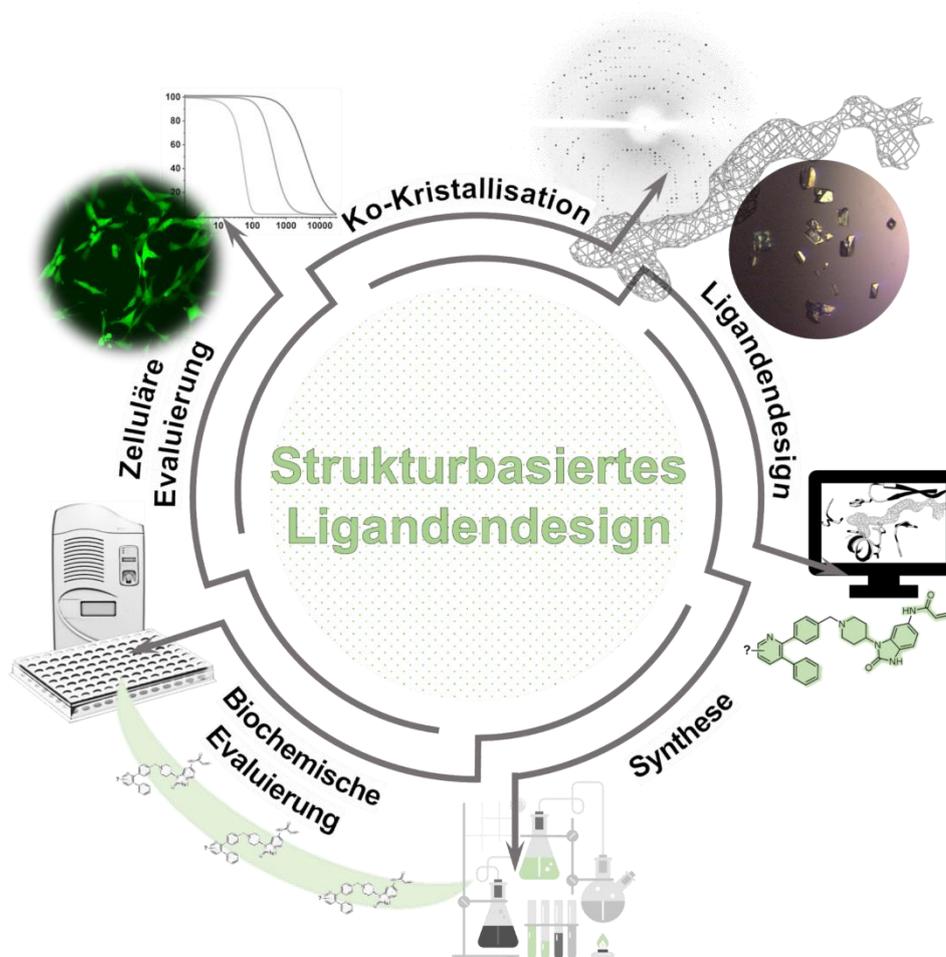


Abbildung 7: Darstellung des iterativen Prozesses des SBLD. Zunächst erfolgen Klonierung, Reinigung und Strukturbestimmung des Zielproteins. Nach der Etablierung eines verlässlichen Kristallisationssystems folgt ein *in silico*-Design einer fokussierten Substanzbibliothek. Anschließend folgt die Synthese sowie die biochemische und zelluläre Evaluierung der Substanzbibliothek. Dies ermöglicht eine detaillierte Bewertung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) und legt die Grundlage für weitere iterative Optimierungszyklen.¹⁰⁰

Heutzutage stehen den Wissenschaftler:innen dafür zahlreiche unterstützende computerbasierte Methoden zu Verfügung, welche eine frühzeitige Evaluierung der designten Liganden ermöglicht.¹⁰² Dazu zählen zum Beispiel molekulares Docking und Molekular-Dynamik-Simulationen.¹⁰² Anschließend folgt die Synthese sowie die biochemische und zelluläre Evaluierung der Substanzbibliothek. Dabei ist es wichtig effiziente und Ressourcen-sparende Syntheserouten zu entwickeln, um eine leichte synthetische Zugänglichkeit der Verbindungen zu gewährleisten.

Weiterhin müssen biochemische und zelluläre Assay-Systeme für das Zielprotein entwickelt werden, welche eine Evaluierung großer Substanzbibliotheken in einem hohen Durchsatz ermöglichen. Je nach Beschaffenheit und den Eigenschaften des Zielproteins kann dies eine große Herausforderung darstellen und erfordert ein gewisses Maß an Erfindungsreichtum der Wissenschaftler:innen. Anhand der gewonnenen Daten werden schließlich Liganden selektiert, die in einem nächsten Schritt im Komplex mit dem Zielprotein ko-kristallisiert werden. Dies ermöglicht in Kombination mit den biochemischen und zellulären Daten eine präzise Bewertung der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) und legt die Grundlage für weitere iterative Optimierungszyklen.^{98,100} So können mit Hilfe des SBLD effizient effektive und selektive Inhibitoren für das entsprechende Zielprotein entwickelt werden, welche sich sowohl für die Verwendung in chemisch-biologischen Experimenten als auch für die Anwendung in der Präzisionstherapie eignen können.

2. MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

Als zentraler Knotenpunkt innerhalb des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs ist die Proteinkinase Akt, welche drei Isoformen (Akt1/Akt2/Akt3) umfasst, in der humanen Zelle an unterschiedlichsten überlebenswichtigen Prozessen beteiligt. Genomische Veränderungen wie zum Beispiel aktivierende Mutationen in PI3K und Amplifikationen der AKT-Gene können eine Hyperaktivierung der Akt-Isoformen und damit einhergehend diverse Krankheiten auslösen. Dies macht die Akt-Isoformen zu attraktiven Zielproteinen für die Wirkstoffforschung, allen voran für die Therapie maligner Erkrankungen. Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten sind die klinischen Studien potenzieller Wirkstoffkandidaten geprägt von wiederholtem Scheitern. Dafür sind unter anderem die fehlenden Informationen über die Isoform-spezifischen Funktionen, das komplexe Zusammenspiel der Akt-Isoformen im Kontext von humanen Erkrankungen sowie die nicht differenzierte Adressierung dieser und die damit einhergehenden Nebenwirkungen verantwortlich.

Die Adressierung der allosterischen Interdomänen-Bindetasche von Akt hat sich in vorangegangenen Studien als vielversprechender Ansatz für eine selektive Adressierung der Akt-Isoformen herausgestellt. Allosterische Sondenmoleküle könnten zur Aufklärung der Isoform-spezifischen Funktionen beitragen und gleichzeitig als Startpunkt für die Entwicklung innovativer Therapeutika dienen. Quambusch *et al.* gelang bereits durch Kombination von bekannten Motiven mit einem kovalenten Ansatz eine Identifizierung von vielversprechenden Selektivitätsprofilen, welche in Akt1 Ko-Kristallstrukturen erste strukturelle Bindepräferenzen ableiten ließen.⁹⁷

Das übergeordnete Ziel dieser Dissertation ist die Grundlage für eine strukturbasierte Optimierung von Isoform-selektiven CAAs mit einem Fokus auf die Etablierung von strukturbiochemischen und zellulären Systemen. Diese sollen eine effiziente Evaluierung von CAAs ermöglichen, sowie die Identifizierung von potenziellen Sondenmolekülen vorantreiben, die sich hinsichtlich ihrer Eigenschaften für weiterführende Studien zur Aufklärung der Isoform-spezifischen Funktionen eignen.

Für die Etablierung strukturbioologischer Systeme soll zunächst mit Hilfe von Computer-gestützten Methoden ein detaillierter Sequenz- und Strukturvergleich der Akt-Isoformen erfolgen. Nachfolgend soll ein SBLD einer fokussierten Substanzbibliothek durchgeführt werden, welche später zur Evaluierung der entwickelten Systeme genutzt werden soll. Basierend darauf, sollen effiziente Expressions- und Reinigungsstrategien etabliert werden, um die massenspektrometrische und strukturbioologische Evaluierung der CAAI-Bibliothek zu ermöglichen. Da bisher noch keine Vollängenkristallstrukturen von Akt2 und Akt3 gelöst werden konnten, sollen neue Kristallisationsbedingungen für die Kristallisation eben dieser Isoformen identifiziert werden. Diese sollen anschließend zusammen mit dem bereits etablierten Kristallisationssystem für Akt1^{Wt} dazu genutzt werden, um strukturelle Einblicke in die Bindemodi unterschiedlicher Liganden zu erhalten.

Weiterhin sollen die identifizierten biochemischen Selektivitätsprofile der fokussierten Substanzbibliothek im zellulären Kontext evaluiert werden. Allerdings erschweren die gewebsspezifische Expression und die unterschiedliche Lokalisierung der Isoformen in zellulären Kompartimenten die Bewertung und den direkten Vergleich Isoform-selektiver Liganden in klassischen zellulären Modellsystemen erheblich. Deshalb soll mit Hilfe der murinen Ba/F3-Zellen ein Akt-Isoform abhängiges Modellsystem entwickelt werden, welches das Verhalten einer onkogenen Zelllinie mimikriert und so als optimales System für die erleichterte Bewertung unterschiedlicher Selektivitätsprofile fungiert. Liganden, die ein geeignetes Selektivitätsprofil im Ba/F3-System vorweisen können, sollen schließlich in humanen Krebszelllinien evaluiert werden und für Untersuchungen der Isoform-spezifischen Signalübertragung genutzt werden. Um die Auswirkungen genetischer Perturbationen auf die Isoform-spezifische Signalübertragung in humanen Zellen mit Inhibitor-vermittelten Perturbationen vergleichen zu können, soll zusätzlich ein robustes Protokoll für die Einführung CRISPR/Cas9-vermittelter *knock-outs* in humane Zellen etabliert werden.

Ein weiterer zentraler Signalweg in der humanen Zelle ist der Ras/Erk-Signalweg, welcher über zahlreiche positive und negative Rückkopplungsschleifen mit dem PI3K/Akt-Signalweg interagiert.

Daraus resultieren als Folge einer gezielten Adressierung eines der beiden Signalwege Kompensationsmechanismen, welche die Untersuchung dieser und die Interpretation der auftretenden Phänotypen erheblich erschweren. Die Kombination selektiver Liganden, die jeweils den PI3K/Akt- und den MAPK/Erk-Stoffwechselweg adressieren, könnten die Aufklärung des komplexen PI3K/Akt-Ras/Erk-Netzwerks maßgeblich unterstützen. Um die Entwicklung selektiver Inhibitoren für die Adressierung der Proteinkinase Erk2 (engl. *extracellular-signal regulated kinase 2*) zu ermöglichen, soll ein robustes Kristallisationssystem entwickelt werden. Dazu sollen zunächst Erk2-Konstrukte hergestellt, exprimiert und gereinigt werden. Anschließend sollen literaturbekannte Kristallisationsbedingungen reproduziert werden, um ein SBLD von Erk2-Inhibitoren zu ermöglichen.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Sequenz- und Strukturanalyse der Akt-Isoformen

Die Strukturanalyse von Proteinen ist ein initialer und essenzieller Bestandteil im Feld der chemischen Biologie, um die Funktionen und Regulationsmechanismen von Zielproteinen zu verstehen. Weiterhin ermöglicht die Analyse von Proteinen im Komplex mit Liganden in Kombination mit biochemischen und zellulären Daten eine detaillierte Bewertung der SAR.¹⁰¹ Dies legt die Grundlage für iterative Optimierungszyklen der entsprechenden Liganden und ist unerlässlich für die Entwicklung von effektiven und selektiven chemischen Werkzeugen für die Entschlüsselung zellulärer Mechanismen.⁹⁸ Um Informationen über die Beschaffenheit der Isoformen zu bekommen, sollte zunächst ein Sequenz- und Strukturvergleich mit Hilfe von Computer-gestützten Methoden erfolgen (Abbildung 8).

Bei einer genauen Betrachtung der Aminosäuresequenzen konnte eine Gesamtübereinstimmung von 73 % zwischen den drei Akt-Isoformen festgestellt werden. Allerdings weisen bestimmte Strukturelemente signifikante Unterschiede auf. Während die Kinasedomäne mit 87 – 90 % und die PH-Domäne mit 76 – 84 % eine relativ hohe Übereinstimmung zeigen, ist besonders die Linkerregion (AS 111-145) mit 17 – 41 % Homologie wenig konserviert. Das hydrophobe Motiv am Ende der C-terminalen Domäne besitzt eine Übereinstimmung von 66 – 76 % (Anhang, Abbildung 59). Da bisher keine Vollängenkristallstrukturen von Akt2 und Akt3 vorhanden sind, wurden zur weiteren Analyse Apo-Strukturen der Akt-Isoformen aus der *AlphaFold Protein Structure Database* herangezogen. Diese sollten helfen Unterschiede zwischen den Isoformen, eventuell problematische Strukturelemente für die Kristallisation, sowie essenzielle Bereiche zu identifizieren. Das Programm *AlphaFold* ist ein neuronales Netz entwickelt von der Firma DeepMind, welches die 3D-Koordinaten aller schweren Atome für ein bestimmtes Protein voraussagt, indem es ausschließlich die primäre Aminosäuresequenz und Sequenzen von homologen Proteinen als Grundlage verwendet. Das Grundprinzip besteht darin, die Vorhersage von Proteinstrukturen als ein Graphenproblem im 3D-Raum zu betrachten, bei dem die Kanten des Graphen durch nahe beieinander liegende Reste definiert sind.

Es bildet sich schon früh eine konkrete Strukturhypothese heraus, die kontinuierlich verfeinert wird. Zu den wichtigsten Schritten dabei gehören das Aufbrechen der Kettenstruktur, um eine gleichzeitige lokale Verfeinerung aller Teile der Struktur zu ermöglichen, ein neuartiger äquivarianter Transformator, der es dem Netzwerk ermöglicht, implizit auf die nicht repräsentierten Seitenkettenatome zu schließen, sowie ein Verlustterm, der der Orientierungskorrektheit der Reste erhebliches Gewicht verleiht.¹⁰³⁻¹⁰⁵

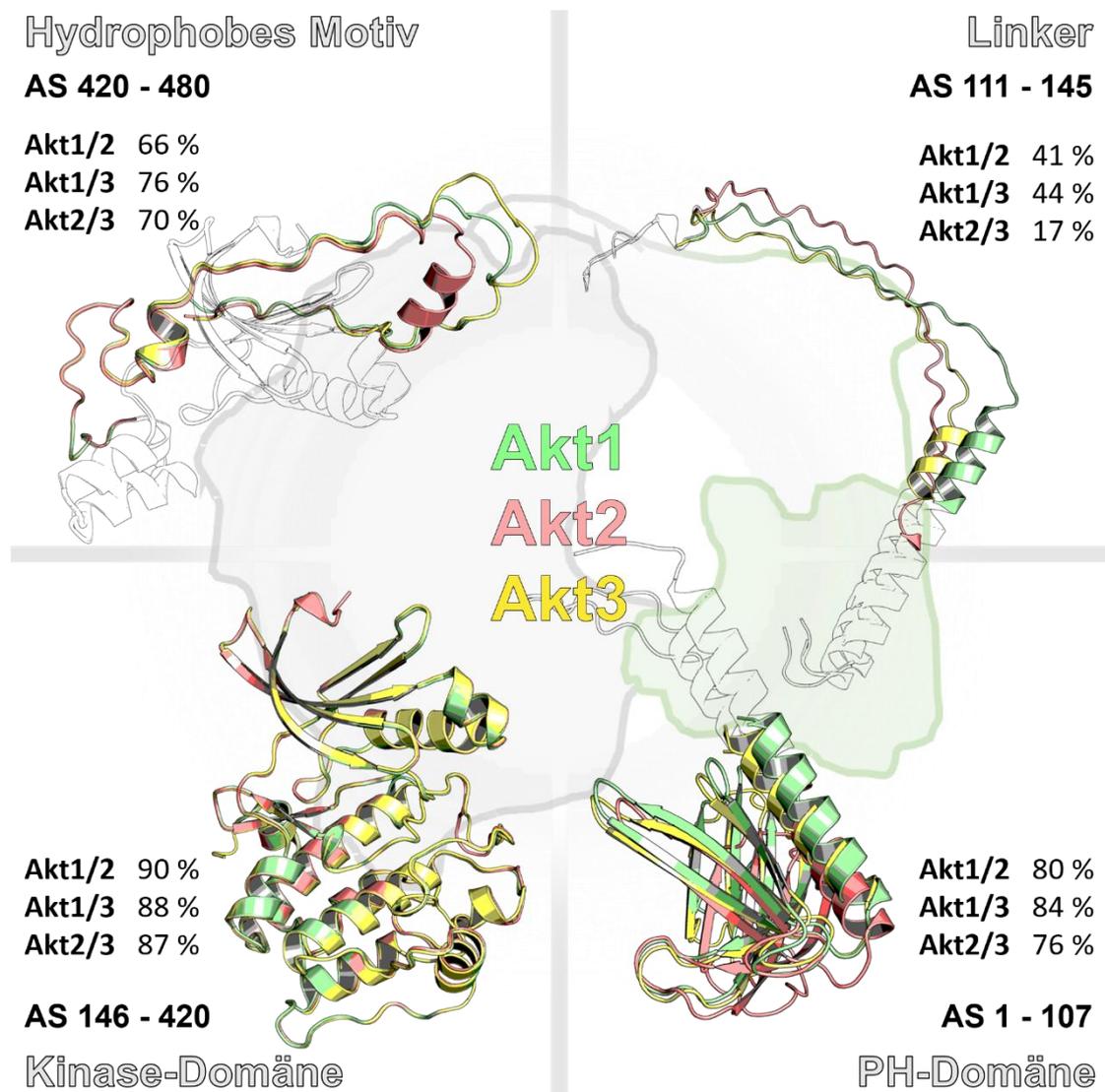


Abbildung 8: Übersicht über die vergleichende Sequenz- und Strukturanalyse der Akt-Isoformen mit Hilfe der von *AlphaFold* berechneten Apo-Strukturen (*AlphaFold Structure Database* AKT1_human, AKT2_human, AKT3_human)¹⁰³⁻¹⁰⁵. Die Proteinstrukturen wurden in die charakteristischen Strukturelemente aufgeteilt und hinsichtlich ihrer strukturellen und sequenziellen Identität untersucht.

Die Frage, die sich für Strukturbiolog:innen nun stellt, ist, welche Genauigkeit *AlphaFold* erreichen kann und welche Anwendungsmöglichkeiten sich daraus für den weiteren Verlauf dieser Arbeit ergeben. Der durchschnittliche *r.m.s.d₉₅* (engl. *root-mean-square deviation*) zwischen vorhergesagter Struktur und experimentell bestimmten Strukturen aus der *Protein Data Bank* (PDB) beträgt 1,46 Å. Demnach kann *AlphaFold* vor allem das Rückgrat eines Proteins mit hoher Genauigkeit reproduzieren und ist für das Design von Kristallisationskonstrukten besonders hilfreich. Innerhalb des SBLD sind allerdings genaue Seitenkettenkonformationen von großer Wichtigkeit, sodass die Verwendung von *AlphaFold*-Strukturen für die Entwicklung selektiver Inhibitoren für hoch-homologe Proteine zumindest bisher noch nicht ausreichend ist.^{106,107}

Im Vergleich der berechneten Akt-Isoform-3D-Strukturen lassen sich vor allem Unterschiede in der Linkerregion feststellen. In Akt1 bilden die AS 111-121 eine Helix aus, welche sich an die endständige Helix der PH-Domäne anschließt. Diese Helix wird von einem Glycin und einem Prolin aufgebrochen (Gly123 und Pro125), welche als sogenannte Helixbrecher bekannt sind. Hingegen wird in Akt2 diese Helix bereits ab dem Ala114 nicht mehr ausgebildet, was in einem längeren und flexibleren Linker resultiert. Weiterhin fällt auf, dass Akt2 an Position 124 ein Cystein aufweist. In Akt3 reicht diese Helix bis zum Cys119, was vermutlich in einem ähnlich stabilen Linker wie in Akt1 resultiert (Abbildung 9).



Abbildung 9: Vergleich der Linkerregion der Akt-Isoformen. Darstellung der homologen AS in grau und der sich unterscheidenden AS in unterschiedlichen Farben (Akt1: grün; Akt2: rot; Akt3: gelb).

Die Linkerregion ist vor allem im Zusammenhang mit Isoform-spezifischen PTMs und der damit verbundenen Steuerung unterschiedlicher Signale beschrieben. Weiterhin sind ungleiche Reaktivitäten der Linker-Cysteine von Akt2 und Akt3 in der Literatur bekannt, was hier mit deren Lokalisationen und der damit einhergehenden abweichenden chemischen Umgebung erklärt werden könnte.^{40,41} Cysteine die am Ende einer α -Helix positioniert sind, wie das Cys119, weisen ein verändertes Dipolmoment und demnach auch eine erhöhte Nukleophilie auf als Cysteine in unstrukturierten Bereichen.¹⁰⁸

Während zahlreiche Ko-Kristallstrukturen von Akt1 im Komplex mit allosterischen Inhibitoren den Beweis für eine geschlossene, inaktive Konformation zwischen der Kinase-Domäne und der PH-Domäne liefern^{95,96}, war es bisher nicht klar, ob dies die physiologische, inaktive Konformation von Akt widerspiegelt. Die von *AlphaFold* berechneten Strukturen zeigen eine autoinhibitorische Konformation für alle drei Isoformen, welche sich durch eine Wechselwirkung zwischen dem APE- α F-Loop der Kinasedomäne und der PIP₃-Bindetasche in der PH-Domäne auszeichnet. Dies wird zusätzlich durch die kürzlich publizierte Kristallstruktur 7APJ verifiziert, welche ebenfalls eine autoinhibitorische Konformation von Akt1, vermittelt durch eben diese Wechselwirkungen, zeigt.¹⁶ Die PH-Domäne rotiert im Vergleich zur autoinhibitorischen Konformation durch die Bindung eines allosterischen Inhibitors um etwa 25° in Richtung der Kinase-Domäne und wird dort durch π - π -Wechselwirkungen zwischen Trp80 und Inhibitor-Grundgerüst stabilisiert. (Anhang, Abbildung 60). Für die Analyse der Inhibitor-vermittelten inaktiven Konformationen der Akt-Isoformen wurden alternativ zu den von *AlphaFold* berechneten Akt-Isoform-3D-Strukturen Homologiemodelle von Akt2 und Akt3 auf der Grundlage einer Akt1-Ko-Kristallstruktur herangezogen (PDB: 6S9X).^{97,109-112} Ein Vergleich der bekannten Bindetaschen zeigt, dass die ATP-Bindetasche mit 97 % und die PIP₃-Bindetasche mit 94 % eine sehr hohe Übereinstimmung zeigen, was unter anderem auf ihre hohe Sequenzidentität zurückzuführen ist. Auch die allosterische Bindetasche zeigt stark konservierte Sequenzbereiche, wohingegen die wenigen unterschiedlichen AS ähnliche Eigenschaften aufweisen, wie zum Beispiel Ser205 in Akt1 und Thr205 in Akt2 und Akt3.

In den weniger konservierten Abschnitten fallen vor allem die Deletionen in der Schleife der AS 259-273 in Akt2 und Akt3 auf, welche zu einer Verkürzung der dort lokalisierten α E-Helix führen. Weiterhin fällt auf, dass das Lys269 im Vergleich zu den analogen AS in Akt2 (Arg268) und Akt1 (Lys267) eine andere Ausrichtung in Akt3 besitzt. Daraus lässt sich für Akt3 eine größere Öffnung der allosterischen Bindetasche zur Lösungsmittel-exponierten Seite ableiten. Zusätzlich ist das Val270 durch ein sterisch anspruchsvolleres Isoleucin in Akt3 ausgetauscht, weshalb die Bindetasche dort entsprechend verengt sein könnte (Abbildung 10).

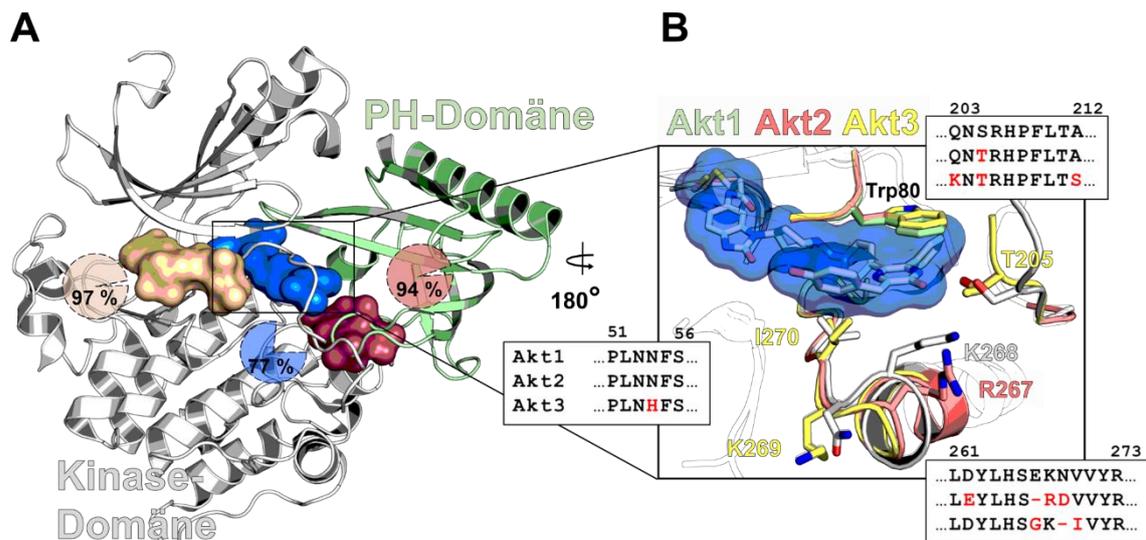


Abbildung 10: Übersicht der Strukturanalyse der Akt-Isoformen mit Hilfe von Homologiemodellen von Akt2 und Akt3 basierend auf einer Ko-Kristallstruktur von Akt1 (PDB: 6S9X)^{97,112}. **A:** Darstellung der PH-*in*-Konformation von Akt sowie der vorhandenen Bindetaschen mit gebundenen Inhibitoren: ATP-kompetitiv Capivasertib (beige, PDB: 4GV1)⁷³, PIP₃-Binder (dunkelrot, PDB: 1UNQ)¹⁵, kovalent-allosterisch (blau, PDB: 6S9X)⁹⁷. Die Übereinstimmung der AS-Sequenz der entsprechenden Bindetaschen ist in Prozent angegeben (Ko-Substrat-Bindetasche, beige, 97 %; PIP-Bindetasche, rot, 94 %; allosterische Bindetasche, blau, 77 %). **B:** Darstellung der allosterischen Interdomänen-Bindetasche von Akt1^{wt} in Komplex mit RL2461 (blau) sowie der Sequenzvergleiche der Akt-Isoformen.⁹⁷

Im Allgemeinen sollte beachtet werden, dass es sich sowohl bei den Akt-Isoform-Apo-Strukturen als auch bei den Akt-Isoform-Homologiemodellen nicht um experimentell bestimmte sondern um berechnete Strukturinformationen handelt. Um diese zu verifizieren, ist die Generierung von Ko-Kristallstrukturen der Akt-Isoformen im Komplex mit allosterischen Inhibitoren von großem Interesse und würde einen elementaren Beitrag zur Validierung dieser Modelle leisten.¹⁰¹

3.2 Strukturbasiertes Design Isoform-selektiver CAAs

Aufgrund der zu diesem Zeitpunkt fehlenden Kristallisationssysteme zur experimentellen Untersuchung der Isoform-spezifischen Interdomänen-Bindetaschen wurden alternativ die aus den Homologiemodellen erhaltenen Erkenntnisse für das SBLD einer Substanzbibliothek Isoform-selektiver CAAs verwendet. Diese sollten anschließend im weiteren Verlauf dieser Arbeit für die Evaluierung der entwickelten strukturellen und zellulären Systeme verwendet werden.

Als erster Ansatzpunkt diente die veränderte Helixstruktur, welche in der Interdomänen-Tasche als Hauptunterschied zwischen den Isoformen identifiziert wurde. Im Vergleich zur Akt1-Struktur ist ein größerer, zugänglicher Raum am Ende dieser Interdomänen-Tasche vorhanden, was den Einbau sterisch anspruchsvollerer Reste in Liganden für Akt2 und insbesondere Akt3 ermöglichen könnte. Dies steht im Einklang mit den Selektivitätsprofilen der ersten Generation von Isoform-selektiven Inhibitoren, bei denen die Einführung größerer Einheiten an der 5'-Position in den Pyrazinon-basierten CAAs von Akt2 und Akt3 toleriert wurde, aber nicht von Akt1.⁹⁷ Darüber hinaus hat jedes Enzym eine andere Aminosäure mit unterschiedlichen chemischen Eigenschaften an Position 269 in Akt1 oder der entsprechenden Position in Akt2 und Akt3 (Vgl. Kapitel 3.1). Daraus könnte sich ein verändertes elektrostatisches Potential an dieser Position in der Bindetasche der verschiedenen Isoformen ableiten.

Basierend auf der ersten Generation Isoform-selektiver CAAs, welche im Rahmen der Masterarbeit von Lena Quambusch entwickelt wurden, sowie den Trends aus den Homologiemodellen, gelang es eine Reihe weiterer Moleküle durch strukturbasiertes Design zu entwickeln. Hier lag der Schwerpunkt auf Molekülen mit einer 5'-Positionssubstitution und somit einer Modifikation, die zuvor nachweislich von Akt2 und Akt3 bevorzugt wurde. Variationen in den chemischen Eigenschaften und des räumlichen Anspruchs eingeführter Substituenten waren das Hauptziel für die eingeführten Komponenten. Diese diversen Reste sollten über verschiedene Linker an ein Pyridin-Grundgerüst geknüpft werden.

Weiterhin wurde das wichtigste Bindungselement in den neuen Liganden bewahrt: zwei π - π -gesteuerte Stapelwechselwirkungen mit Trp80 und Tyr272.¹¹²

Basierend darauf wurde eine fokussierte Substanzbibliothek synthetisiert und zur weiteren Bewertung der SAR der allosterischen Bindungsstellen in den Akt-Isoformen verwendet (Vgl. Tabelle 2, Kapitel 3.5).*

* Design und Synthese der Isoform-selektiven CAAI-Substanzbibliothek durch Dr.in Lena Quambusch (AG Rauh, TU Dortmund).

3.3 Darstellung und Reinigung der Akt-Isoformen

Für die Charakterisierung von Inhibitoren ist die Durchführung von massenspektrometrischen, biochemischen und strukturellen Untersuchungen der entsprechenden Protein-Ligand-Komplexe unerlässlich. Dafür müssen die Zielproteine zunächst in großen Mengen und mit einer hohen Reinheit produziert werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte demnach eine robuste Expressions- und Reinigungsstrategie für die Akt-Isoformen Akt2 und Akt3 etabliert und mit den Protokollen für Akt1 verglichen werden.[†]

3.3.1 Konstruktdesign und -generierung

Als Basis für die Akt-Konstrukte, welche vor allem für die Kristallisation bestimmte Eigenschaften haben müssen, diente eine bereits publizierte Akt1^{Wt}-Struktur (PDB: 3O96)¹¹³ im Komplex mit einem reversiblen allosterischen Inhibitor sowie die zuvor durchgeführte Strukturanalyse der von *AlphaFold* berechneten Akt-Isoform-3D-Strukturen. Die Expression der Akt-Isoform-Konstrukte sollte in Insektenzellen erfolgen. Demnach wurden die entsprechenden DNA-Sequenzen für die Verwendung in Insektenzellen Codon-optimiert. Das Akt1^{Wt}-Gen wurde bereits im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. Jörn Weisner sowie die Akt2^{Wt} und Akt3^{Wt}-Gene im Rahmen der Doktorarbeit von Dr.in Ina Landel mit Hilfe des Ligations-/Restriktionsprotokolls in pLEX/Bac3-Transfervektoren überführt und mit einem N-terminalen His₆-Tag versehen, welcher später zur Affinitäts-basierten Aufreinigung der Proteine dienen sollte. Um diesen im weiteren Verlauf effizient abspalten zu können, wurde die Erkennungssequenz der TEV-Protease (engl. *tobacco etch virus*) eingebracht. Für das Akt1^{Wt}-Konstrukt konnte bereits gezeigt werden, dass der C-terminale Bereich (Akt1^{Wt}: AS 447-480; Akt2^{Wt}: AS (440)448-481; Akt3^{Wt}: AS 444-579) bei der Kristallisation einen Störfaktor darstellt.

[†] Etablierung der Akt1^{Wt}-Reinigung durch M. Sc. Rebekka Scheinpflug und Dr.in Ina Landel (AG Rauh, TU Dortmund).

Zusätzlich ließ sich in der vorangegangenen Strukturanalyse erkennen (Kapitel 3.1), dass dieser Bereich in allen drei Isoformen eine hohe Flexibilität aufweist und wurde demnach aus den Konstrukten entfernt.

Die so erhaltenen Kristallisationskonstrukte Akt1^{Wt} (2-446), Akt2^{Wt} (2-447), Akt2^{Wt} (2-439) und Akt3^{Wt} (2-443) dienen als Grundlage für alle im Rahmen dieser Arbeit generierten Akt-Isoform-Varianten. Innerhalb des Akt1^{Wt} (2-446)-Konstruktes und des Akt3^{Wt} (2-443)-Konstruktes wurden zusätzlich die sich im Linker befindenden AS Glu114/Glu115/Glu116, zu Alaninen mutiert, um die Oberflächenentropie in diesem Bereich durch den unpolaren Charakter der Alanine herabzusenken.[‡] Diese könnte sich andernfalls negativ auf die Kristallisation auswirken.^{114,115}

Im Rahmen der 3D-Strukturanalyse der Akt-Isoformen in Kapitel 3.1 konnte für Akt2 eine längere und deutlich flexiblere Linkerregion festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden vier weitere Konstrukte hergestellt, die eine Modifikation des Linkers aufweisen. Zum einen wurde der Bereich der AS 115-118 in Akt2 dem entsprechenden Bereich in Akt1 angepasst, indem eine Deletion von Pro115 und Gly116 durchgeführt wurde, sowie eine Mutation der AS Glu117 und Asp118 in Alanine. Durch die Entfernung der „strukturbrechenden“ AS Prolin und Glycin könnte hier eine Verringerung der Flexibilität in diesem Bereich erfolgen. Die Mutationen Glu117Ala und Asp118Ala dienen ebenfalls der Absenkung der Oberflächenentropie in diesem Bereich (Akt2^{P115del/G116del/E117A/E118A}). Zusätzlich wurden sowohl ein Austausch der Akt2-Linkersequenz durch die Akt1-Linkersequenz (Akt2(2-111)-Akt1(112-145)-Akt2(146-446)) als auch durch einen kürzeren (GGGGS)₂-Linker (Akt2(GGGGS)₂) vorgenommen.[§] In beiden Ansätzen sollte die Kristallisation von Akt2 durch eine weniger flexible Linkerregion begünstigt werden. Ein weiterer Ansatz sollte eine vollständige Entfernung der Linkerregion sein. Hier könnte durch eine Inkubation mit einem allosterischen Inhibitor ein stabiler Kinasedomänen-Inhibitor-PH-Domänen-Komplex entstehen, welcher durch das Fehlen des flexiblen Linkers einfacher kristallisieren könnte.

[‡] Darstellung des Akt3-(2-443; Glu114Ala/Glu115Ala/Glu116Ala)-Konstruktes im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. Fabian Schnecke (AG Rauh, TU Dortmund) und Darstellung des Akt1-(2-446; Glu114Ala/Glu115Ala/Glu116Ala)-Konstruktes durch Dr. Jörn Weisner (AG Rauh, TU Dortmund).

[§] Darstellung der Akt2(2-111)-Akt1(112-145)-Akt2(146-446)- und Akt2(GGGGS)₂-Konstrukte im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. Cora Neugebauer (AG Rauh, TU Dortmund).

Darüber hinaus wurde basierend auf dem Vergleich der Akt-Isoform-Homologiemodelle eine Änderung der allosterischen Bindetasche in Akt1^{Wt} zur entsprechenden Akt2-Bindetasche vorgenommen. Daraus resultiert das Konstrukt Akt1^{S205T/D262E/E267del/K268R/N269D}, welches im weiteren Verlauf dieser Arbeit zur Vereinfachung Akt2-Mimikry genannt wird. Hier wäre mit den etablierten Kristallisationsbedingungen für Akt1^{Wt} bereits ein potenzieller Startpunkt für Kristallisationsstudien vorhanden. Nach der erfolgreichen Herstellung und Verifizierung der Kristallisationskonstrukte (Abbildung 11) mittels Sanger-Sequenzierung sollte die Expression der Zielproteine in einem geeigneten Expressionssystem erfolgen.

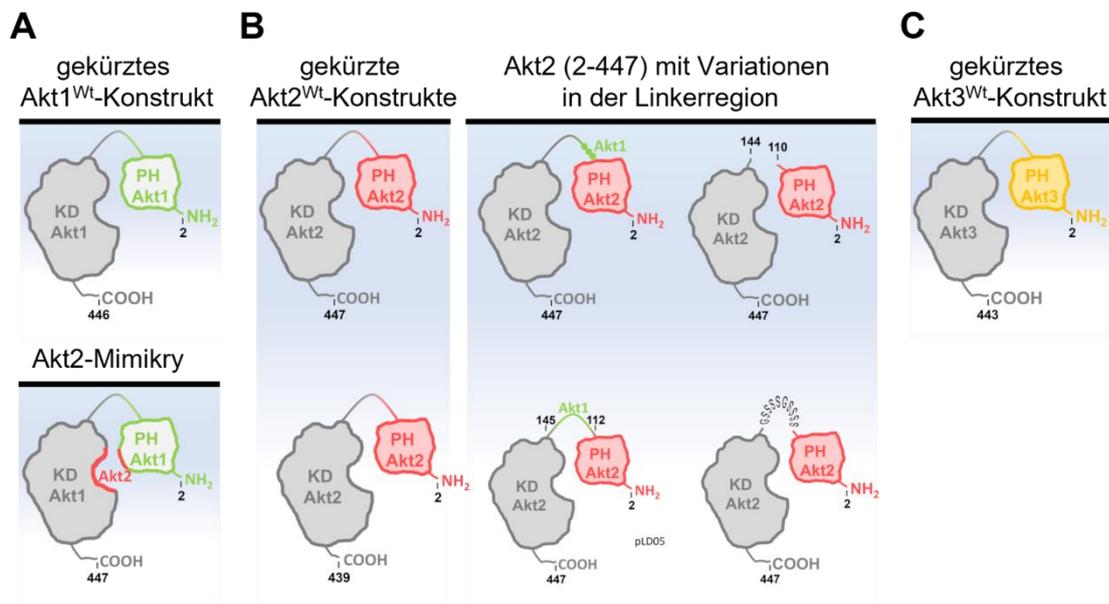


Abbildung 11: Schematische Darstellung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Akt-Isoform-Kristallisationskonstrukte. **A:** Darstellung der auf Akt1^{Wt} basierenden Kristallisationskonstrukte. **B:** Darstellung der auf Akt2^{Wt} basierenden Kristallisationskonstrukte. **C:** Darstellung der auf Akt3^{Wt} basierenden Kristallisationskonstrukte.

3.3.2 Expression in Insektenzellen

Für die Proteinkristallisation sowie die Durchführung weiterer biochemischer und biophysikalischer Studien werden große Mengen des Zielproteins benötigt. Daher ist eine effiziente Expression in einem geeigneten Expressionssystem ein zentraler Bestandteil bei der Etablierung einer Proteinreinigungsstrategie. Neben der Expression der Proteine in *Escherichia Coli* (*E. coli*)¹¹⁶, sind besonders Insektenzellen ein attraktives System für die Herstellung von Kinasen, da sie posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierungen und Glykosilierungen ermöglichen, welche für die Aktivität und Stabilität der eukaryotischen Proteine essenziell sein können.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Um eine Expression des Zielproteins in Insektenzellen zu ermöglichen, werden diese mit rekombinanten Baculoviren infiziert. Dabei wird auf dem verwendeten Transfervektor, welcher die für die Virusreplikation nötigen Geninformationen trägt, zusätzlich die DNA-Sequenz des Zielproteins eingeführt. Eine Überexpression wird dadurch erreicht, dass das Gen für das Zielprotein gegen das Gen des Proteins Polyhedrin ausgetauscht wird. Dieses ist für die Virusreplikation nicht zwingend notwendig.¹²⁰ Für die Expression der Akt-Isoform-Kristallisationskonstrukte in Insektenzellen wurde das BacMagic-Protokoll von Merck Millipore verwendet (Material und Methoden, Kapitel 5.5). Dafür wird die Sequenz des Zielproteins in einen pIEX/Bac3-Transfervektor eingebracht, welcher flankierend zum Gen des Zielproteins Rekombinationssequenzen aufweist.¹²¹ Nach Ko-Transfektion des Transfervektors und einer synthetischen Bacmid-DNA wird durch homologe Rekombination ein Baculovirus erzeugt, welcher die Überexpression des Zielproteins während der Virusreplikation ermöglicht. Mit Hilfe der zuvor generierten pIEX/Bac3-Transfervektoren, welche das entsprechende Zielgen enthalten, wurden Baculoviren der ersten und zweiten Generation von der *Protein Chemistry Facility* (ZE-PCF, MPI Dortmund) hergestellt. Der Virus der zweiten Generation (P2-Virus) konnte anschließend für die Expression im großen Maßstab verwendet werden. Dafür erfolgt zunächst eine Erhöhung des Virustiters, indem ein Virus der dritten Generation hergestellt wird (P3-Virus). Der P3-Virus wird schlussendlich für die finale Proteinexpression verwendet.

Um sowohl die erfolgreiche Expression als auch den optimalen Zeitpunkt der Zellernte bestimmen zu können, wurde eine Testexpression in Sf9- und Tnao38-Zellen durchgeführt.** Dafür wurde von der Expressionskultur der entsprechenden Zelllinie und von einer Kontrollkultur, welche nicht mit P2-Baculovirus versetzt wurde, nach jeweils 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden eine Probe entnommen und mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese auf die entsprechenden Expressionslevel untersucht (Abbildung 12).

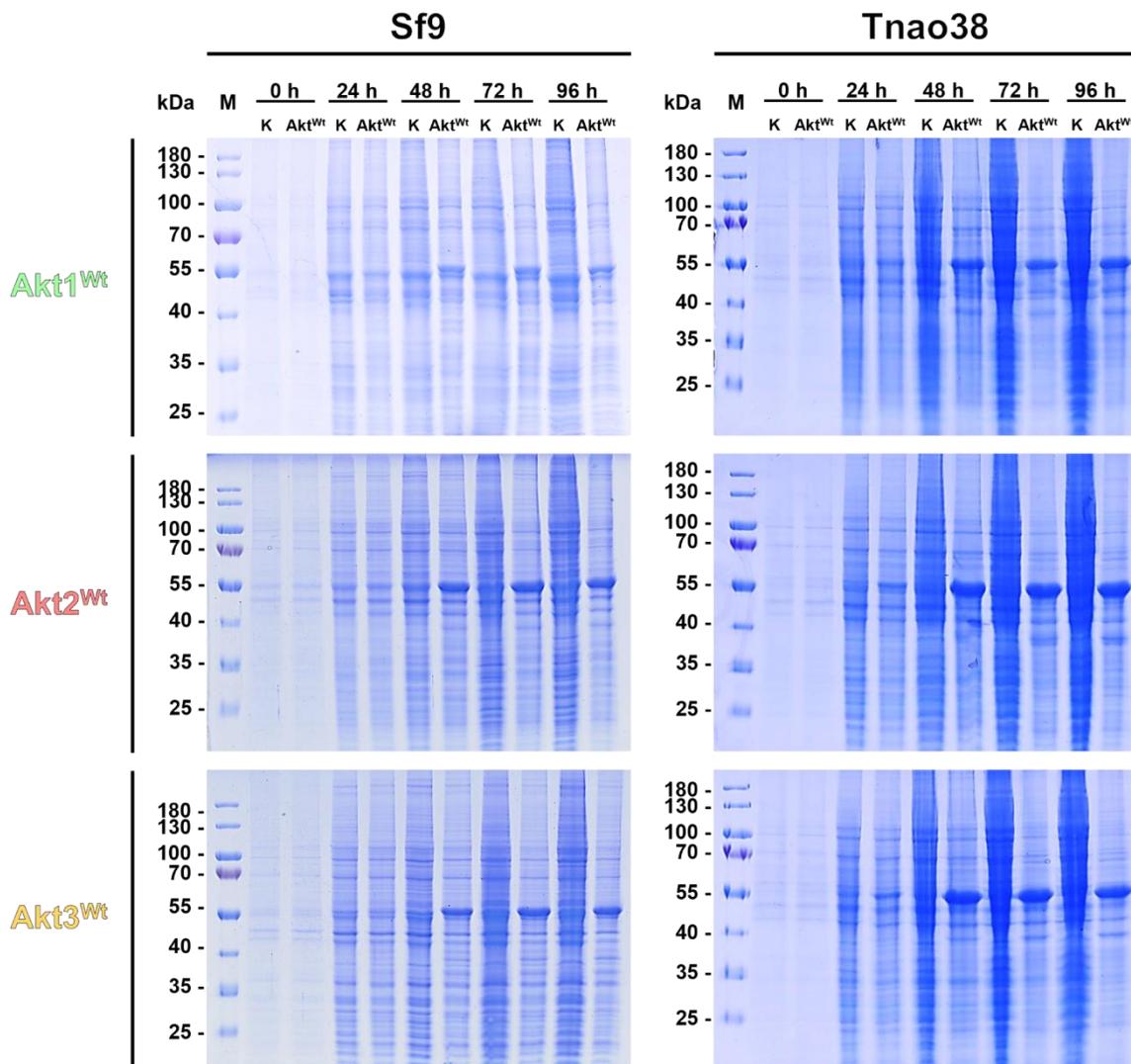


Abbildung 12: Testexpressionen von Akt1^{Wt}, Akt2^{Wt} und Akt3^{Wt} in Sf9- und Tnao38-Insektenzellen. Von den Expressionskulturen und der entsprechenden Kontrollkultur (K) wurden nach 0-96 h Proben entnommen und mit einer SDS-Gelelektrophorese analysiert. Marker (M).

** Durchführung der Testexpressionen in Sf9- und Tnao38-Zellen im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. Cora Neugebauer (AG Rauh, TU Dortmund).

Sowohl in den Sf9-Zellen als auch in den Tnao38-Zellen konnte für alle drei Isoformen bereits nach 48 h eine Überexpression festgestellt werden, was durch eine intensive Bande auf der Höhe von 55 kDa deutlich wurde. Die höchste Proteinkonzentration konnte nach 72 h erreicht werden, welche sich nach 96 h nicht mehr veränderte. Es ließ sich feststellen, dass Akt1^{Wt} geringere Expressionslevel als Akt2^{Wt} und Akt3^{Wt} in beiden Insektenzelllinien aufweist. Dies könnte unterschiedliche Ursachen haben. Zunächst sollte eine unterschiedliche Konzentration und Beladung der Proben auf das SDS-Gel in Betracht gezogen werden. Weiterhin stammen die P2-Viren aus unterschiedlichen Transfektions-Chargen, was sich auf den initialen Virustiter und demnach auf die Infektionseffizienz des P2-Virus auswirken könnte. In den Tnao38-Zellen scheint insgesamt eine höhere Proteinmenge der entsprechenden Proteine vorzuliegen, da jedoch in vorangegangenen Studien eine Veränderung des für die Akt1^{Wt}-Kristallisation essenziellen Phosphorylierungsmusters von Akt1^{Wt} in den Tnao38-Zellen nachgewiesen werden konnte¹²², wurden die Sf9-Zellen als geeignetes Expressionssystem für alle zuvor beschriebenen Akt-Isoform-Kristallisationskonstrukte ausgewählt.

3.3.3 Etablierung und Optimierung der Proteinreinigungsstrategie

Für die Kristallisation und die biochemische sowie biophysikalische Evaluierung von Proteinen ist auch deren Reinheit ein zentraler Faktor. Aus diesem Grund sollten im Rahmen dieser Arbeit robuste Reinigungsstrategien für Akt2 und Akt3^{††} etabliert werden, welche nachfolgend mit dem Protokoll von Akt1 verglichen wurden (Abbildung 13).

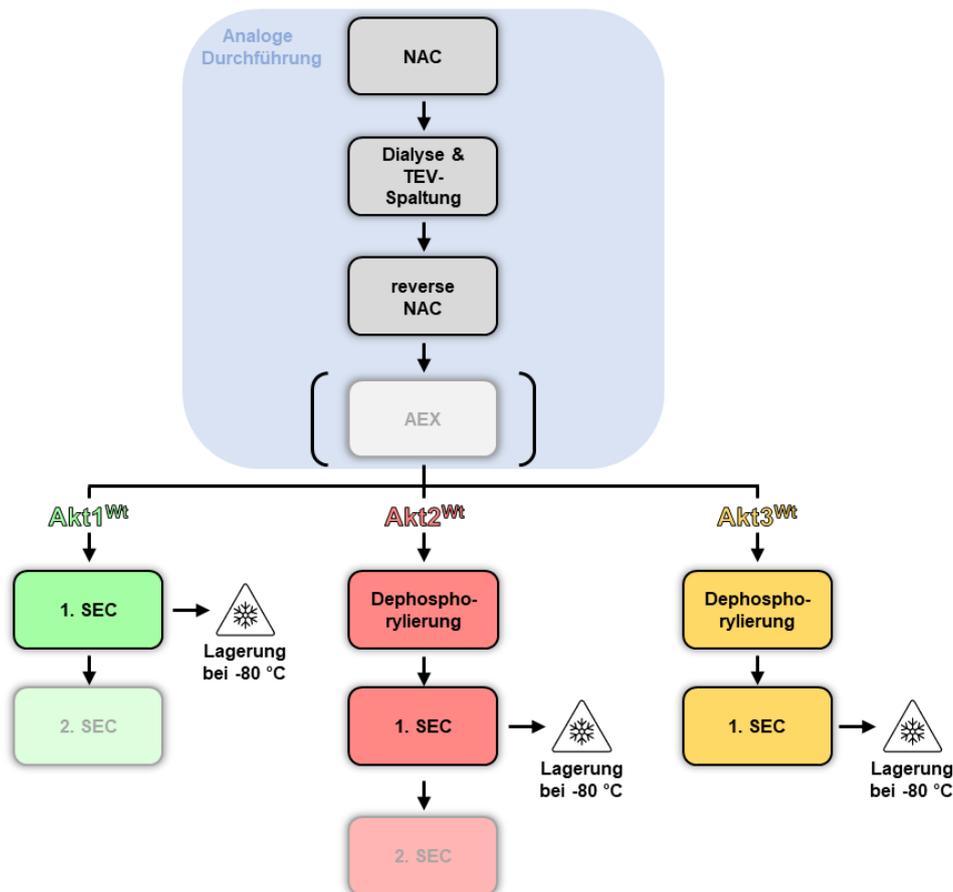


Abbildung 13: Darstellung der Reinigungsstrategien für alle Akt1-, Akt2- und Akt3-Konstrukte. Zunächst erfolgt eine erste NAC vor einer Dialyse und Abspaltung des His₆-Tags mit Hilfe der TEV-Protease. Anschließend erfolgt eine reverse NAC und alternativ eine AEX je nach vorliegendem Reinheitsgrad des Proteins. Während für Akt1 direkt eine SEC durchgeführt wird, erfolgt für Akt2 und Akt3 vor der SEC zunächst eine Dephosphorylierung mit der α -Phosphatase. Anschließend wird das Protein entweder langfristig bei -80 °C gelagert, direkt für die Kristallisation verwendet (Akt3) oder vor der Kristallisation über eine zweite SEC in den Kristallisationspuffer überführt (Akt1 und Akt2).

^{††} Initiale Arbeiten zur Akt3^{Wt}-Reinigung im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. Cora Neugebauer (AG Rauh, TU Dortmund).

Dabei ließ sich feststellen, dass die ersten Reinigungsschritte eine analoge Durchführung erlauben. Nach der Zellernte wurden die Insektenzellen mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators aufgeschlossen und anschließend zentrifugiert. So sollten die löslichen Bestandteile von den unlöslichen Bestandteilen abgetrennt werden. Das so erhaltene klare Zellysate wurde auf eine Nickel-Affinitätschromatographiesäule (NAC) aufgetragen. Da die entsprechenden Akt-Isoform-Konstrukte einen N-terminalen His₆-Tag enthalten, konnten diese mit Hilfe der NAC aus dem Zellysate isoliert werden. Um den Reinigungserfolg zu verfolgen, wurden SDS-Gele angefertigt, welche für die ersten Reinigungsschritte aufgrund der nahezu identischen Resultate für die Akt-Isoformen exemplarisch für Akt2 gezeigt sind (Abbildung 14).

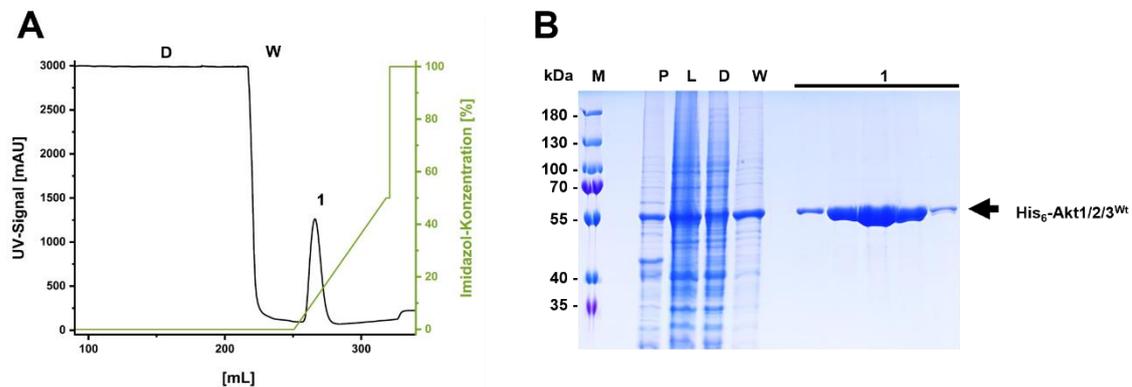


Abbildung 14: 1. NAC zur Reinigung von Akt2^{Wt} exemplarisch gezeigt für alle Akt1-, Akt2- und Akt3-Konstrukte. **A:** UV-Chromatogramm. UV-Signal (schwarz); Gradient der Imidazol-Konzentration in % (grün). **B:** SDS-Gel. Marker (M); Pellet (P); Lysat (L); Durchfluss (D); Waschfraktion (W); Elutionspeak 1 (1).

Auf dem SDS-Gel ist auf einer Höhe von etwa 55 kDa zu erkennen, dass das Zielprotein nach dem Zellaufschluss sowohl in unlöslicher Form als auch in löslicher Form vorliegt. Durch den Einsatz des Detergenzes CHAPS (3-[[3-cholamidopropyl]dimethylammonio]-1-propanesulfonat) könnte der Anteil des Proteins in der löslichen Form vermutlich erhöht werden, allerdings konnte bereits eine ausreichende Menge des löslichen Protein erhalten werden, sodass auf diesen Schritt verzichtet wurde.^{123,124} Weiterhin lässt sich erkennen, dass im Durchfluss und in der Waschfraktion ebenfalls Protein vorhanden ist, was darauf hindeutet, dass die Säule mit einer zu großen Menge Protein beladen wurde und ihre Bindekapazität überschritten wurde.

Trotzdem konnte nach einer Elution mit einem linearen Imidazolgradienten ausreichend Protein von der Säule eluiert werden. Dabei konnte bereits sehr reines Protein mit nur wenigen Verunreinigungen erhalten werden, welche im weiteren Verlauf der Reinigung abgetrennt werden sollten. Die Abspaltung des His₆-Tags erfolgte im Anschluss mit Hilfe der TEV-Protease. Dazu wurde diese über Nacht in einer Dialyse mit dem Zielprotein inkubiert und anschließend im Rahmen einer reversen NAC aus der Proteinlösung entfernt (Abbildung 15).

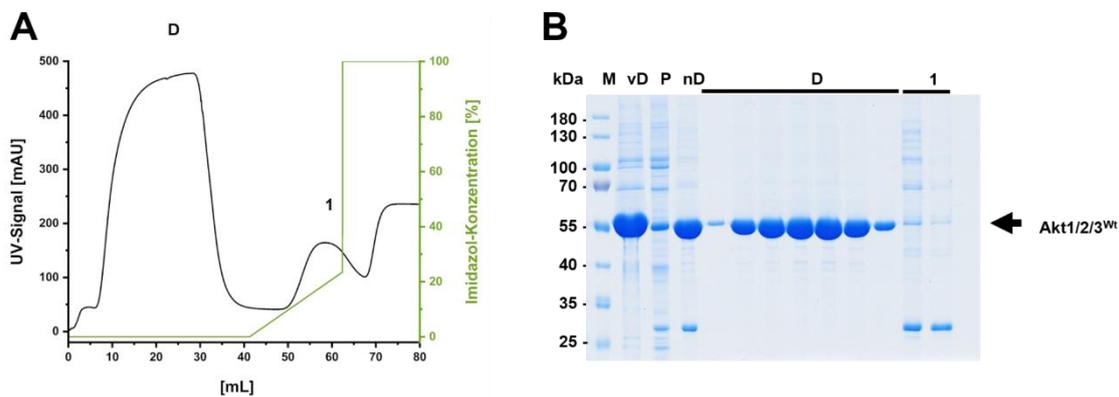


Abbildung 15: Reverse NAC zur Reinigung von Akt2^{wt} exemplarisch gezeigt für alle Akt1-, Akt2- und Akt3-Konstrukte. **A:** UV-Chromatogramm. UV-Signal (schwarz); Gradient der Imidazolkonzentration in % (grün). **B:** SDS-Gel. Marker (M); vD (vor Dialyse); Pellet (P); nach Dialyse (nD); Durchfluss (D); Elutionspeak 1 (1).

Da nach der Dialyse weißes Präzipitat in der Proteinlösung beobachtet werden konnte, wurde dieses zunächst durch Zentrifugation abgetrennt. Auf dem SDS-Gel lässt sich erkennen, dass neben einer geringen Menge des Zielproteins, hauptsächlich Verunreinigungen ausgefallen sind. Weiterhin zeigt der Vergleich vor und nach der Dialyse eine Verschiebung der Proteinbande zu einem niedrigeren Molekulargewicht, was auf eine erfolgreiche Abtrennung des His₆-Tags hindeutet. Dies wurde dadurch bestätigt, dass sich das Protein bei der Durchführung der reversen NAC im Durchfluss befindet, da es ohne den His₆-Tag nicht mehr an die Säule binden kann.

Nach einer Elution mit Imidazol wurde die TEV-Protease und weitere Verunreinigungen von der Säule eluiert, welche demnach erfolgreich abgetrennt werden konnten.

Im nächsten Schritt wurde eine Anionenaustauschchromatografie (AEX) durchgeführt, zum einen um weitere Verunreinigungen abzutrennen und zum anderen um die unterschiedlichen Phosphorylierungszustände der Akt-Isoformen zu evaluieren (Abbildung 16).

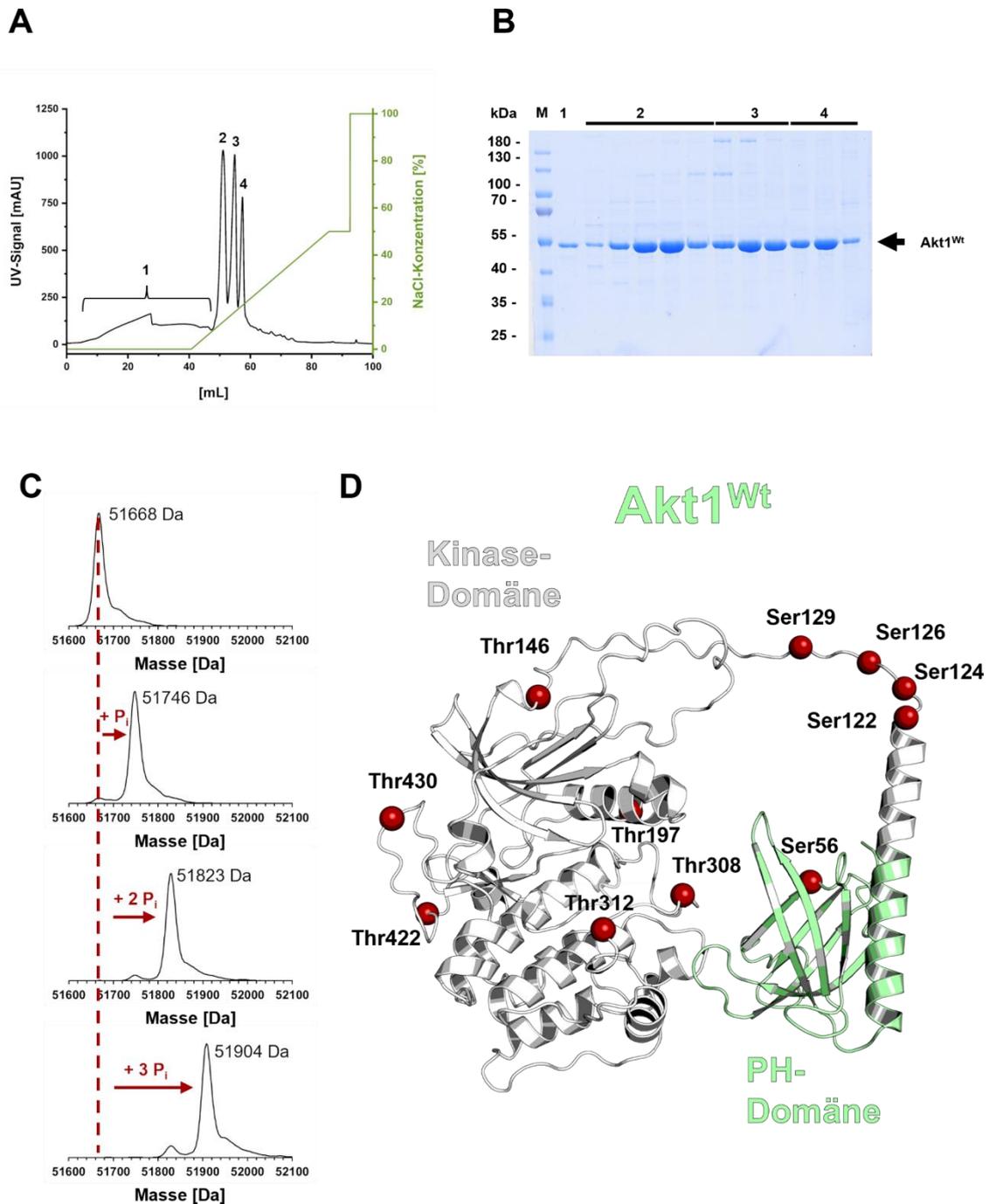


Abbildung 16: AEX zur Reinigung von Akt1^{Wt}. **A:** UV-Chromatogramm. UV-Signal (schwarz); Gradient der NaCl-Konzentration in % (grün). **B:** SDS-Gel. Marker (M); Durchfluss (1); Elutionspeaks 2-4 (2-4). **C:** Massenspektren des Durchflusses und der Elutionspeaks. **D:** Modellierung der Positionen der mittels ESI-MS/MS identifizierten Phosphorylierungsstellen.

Hier konnten signifikante Unterschiede zwischen Akt1, Akt2 und Akt3 identifiziert werden, welche sich im weiteren Verlauf auf das gewählte Reinigungsprotokoll auswirken. Vorangegangene Studien zeigten bereits, dass bei der Expression in Insektenzellen unterschiedliche Phosphorylierungszustände von Akt1^{Wt} entstehen, welche essenziell für die anschließende Kristallisation sind.^{125,126} Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Beobachtungen reproduziert werden. Während das unphosphorylierte Protein nicht an die AEX bindet und mit dem Durchfluss eluiert wird, werden sowohl der einfach-, zweifach als auch dreifach-phosphorylierte Zustand mit steigender NaCl-Konzentration in drei Elutionspeaks von der Säule eluiert (Abbildung 16A und B). Massenspektrometrische Analysen zeigten eine effiziente Trennung der Phosphorylierungszustände. Zusätzlich konnte durch ESI-MS/MS-Analysen nachgewiesen werden, dass sich diese aus multiplen Phosphorylierungspositionen zusammensetzen (Abbildung 16C und E). Bei dieser Methode erfolgt nach der Inkubation des Proteins mit dem Inhibitor ein proteolytischer Verdau. Die dabei entstandenen Peptidfragmente werden anschließend mit hintereinander geschalteten Massenspektrometern analysiert.^{127,128} Für die Akt1^{Wt}-Reinigungen wurde die AEX ausgespart, da sich dieser Schritt nicht vorteilig auf die Reinheit von Akt1^{Wt} auswirkte und das gesamte Proteingemisch mit allen Phosphorylierungszuständen für folgende Kristallisationsstudien eingesetzt werden sollte.

Hingegen zeigte sich für Akt2^{Wt} mit zwei Elutionspeaks im Durchfluss und fünf Elutionspeaks mit steigender NaCl-Konzentration ein deutlich heterogeneres Proteingemisch (Abbildung 17A). Ein SDS-Gel konnte bestätigen, dass es sich bei Peak 1-6 um Akt2 handelt, während mit Peak sieben weitere Verunreinigungen abgetrennt werden konnten (Abbildung 17B). In massenspektrometrischen Analysen zeigte sich, dass es sich bei Peak 1-3, um unphosphorylierte Spezies von Akt2^{Wt} handelt (Abbildung 17C).

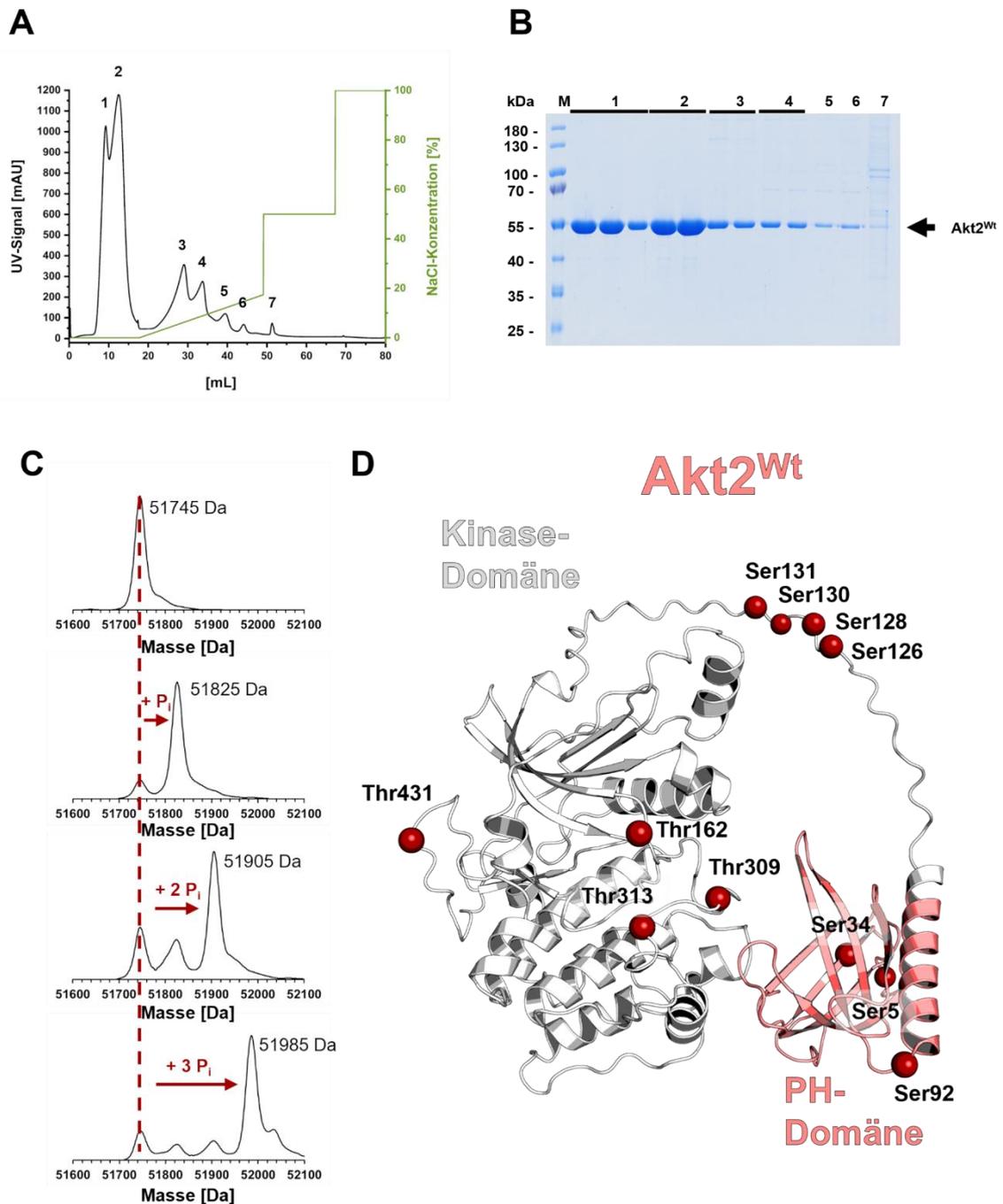


Abbildung 17: AEX zur Reinigung von Akt2^{Wt}. **A:** UV-Chromatogramm. UV-Signal (schwarz); Gradient der NaCl-Konzentration in % (grün). **B:** SDS-Gel. Marker (M); Durchfluss (1-2); Elutionspeaks 3-7 (3-7). **C:** Massenspektren des Durchflusses und der Elutionspeaks. **D:** Modellierung der Positionen der mittels ESI-MS/MS identifizierten Phosphorylierungsstellen.

Die ungleiche Bindungsfähigkeit der Akt2-Fractionen an das Säulenmaterial könnte unterschiedliche Ursachen haben. Zunächst wurde von einer Sättigung der Säule durch eine zu hohe Menge an Protein ausgegangen, allerdings konnte ein analoges Elutionsprofil bei einer Auftragung von geringeren Mengen Protein reproduziert werden. Weiterhin könnten unterschiedliche Proteinkonformationen und -faltungen sowie posttranslationale Modifikationen (PTMs) einen Einfluss auf die Bindefähigkeit haben. Eine fehlerhafte Faltung von Akt2 konnte durch die Untersuchung der Proteinstabilität ausgeschlossen werden, was zu einem späteren Zeitpunkt näher diskutiert wird. Weiterhin zeigte es sich, dass es sich bei den Peaks 4-6 um die einfach-, zweifach- und dreifach-phosphorylierte Spezies von Akt2^{Wt} handelt, welche jedoch in deutlich geringeren Mengen im Vergleich zum unphosphorylierten Protein vorliegen und mit Hilfe der verwendeten Säule und Pufferbedingungen nicht vollständig voneinander separiert werden konnten. Trotzdem konnten mit Hilfe einer ESI-MS/MS-Analyse multiple Phosphorylierungspositionen identifiziert werden (Abbildung 17D). Hier fallen vor allem die zu Akt1 analogen Linkerphosphorylierungen auf. Bei einer Untersuchung des Akt2(2-111)-Akt1(112-145)-Akt2(146-446)-Konstruktes konnte ein analoges Elutionsprofil und Massenspektrum zu Akt1^{Wt} festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass vor allem die Linkerphosphorylierungen den beobachteten positiven Einfluss auf die Kristallisation haben könnten (Anhang, Abbildung 62B). Da mit Hilfe der AEX weitere Verunreinigungen von Akt2^{Wt} abgetrennt werden konnten, wurde diese dauerhaft in das Reinigungsprotokoll aufgenommen. Zusätzlich wurde diese verwendet, um verschiedene Kombinationen der Phosphorylierungszustände von Akt2 zu isolieren, welche im Anschluss in Kristallisationsstudien verwendet werden sollten.

Im Gegensatz zu Akt1^{Wt} und Akt2^{Wt} zeigt Akt3^{Wt} nur zwei Elutionsfraktionen, wobei es sich hier um das unphosphorylierte Protein im Durchfluss und das einfach-phosphorylierte Protein, eluiert durch geringe NaCl-Konzentrationen, handelt (Abbildung 18A, B und D). Die ESI-MS/MS-Analyse zeigte ebenfalls mehrere Phosphorylierungspositionen, wobei lediglich zwei in der Linkerregion identifiziert werden konnten (Ser120 und Ser122).

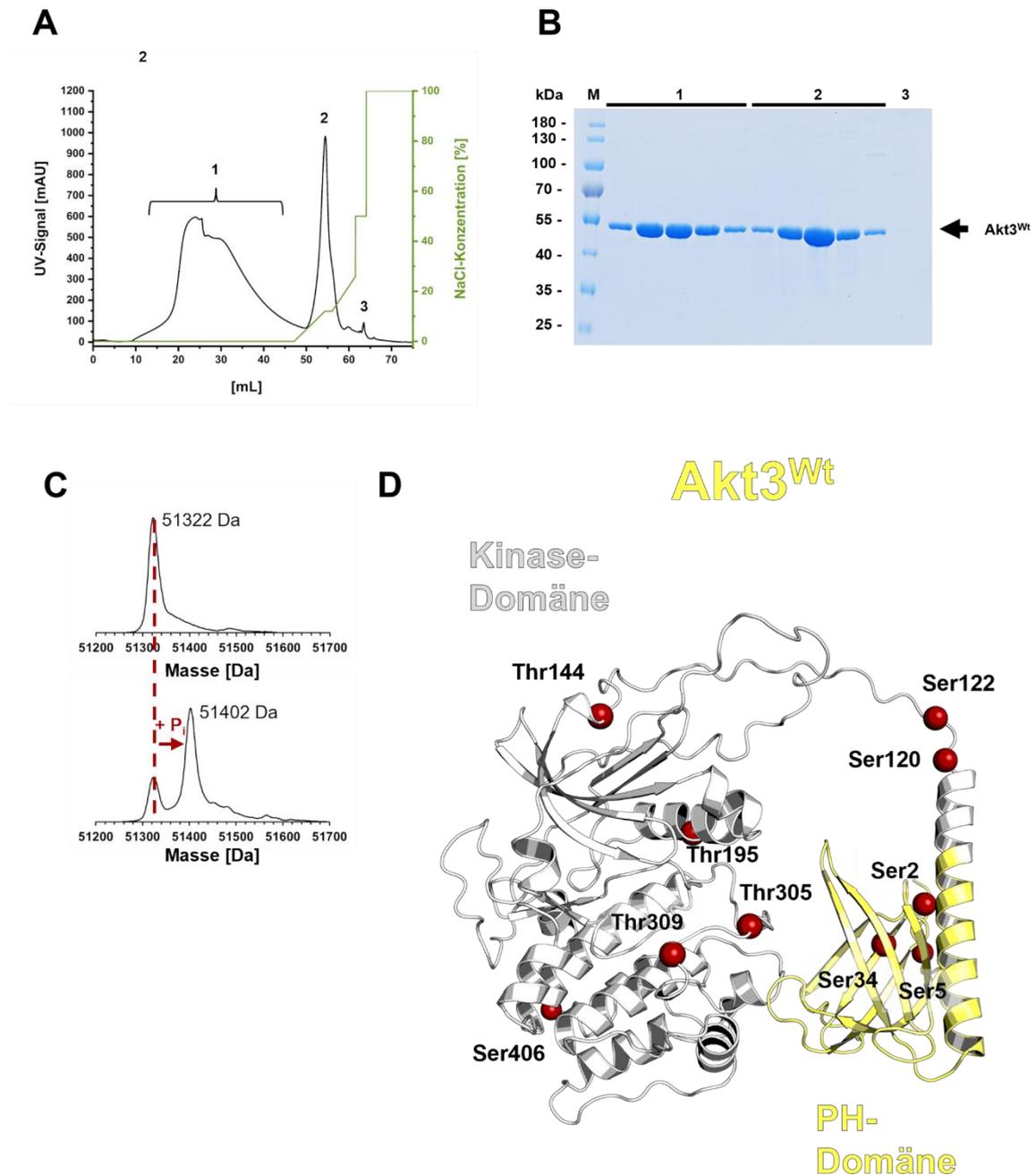


Abbildung 18: AEX zur Reinigung von Akt3^{Wt}. **A:** UV-Chromatogramm. UV-Signal (schwarz); Gradient der NaCl-Konzentration in % (grün). **B:** SDS-Gel. Marker (M); Durchfluss (1); Elutionspeak (2). **C:** Massenspektren des Durchflusses und der Elutionspeaks. **D:** Modellierung der Positionen der mittels ESI-MS/MS identifizierte Phosphorylierungsstellen.

Da sich durch die AEX keine Vorteile hinsichtlich der Reinheit des Proteins ergaben, wurde diese bei weiteren Reinigungen von Akt3^{Wt} nicht verwendet. Weiterhin fällt auf, dass alle drei Isoformen partielle Phosphorylierungen an der Aktivierungsposition Thr308/309/305 aufweisen.

Um eine daraus resultierende mögliche Aktivierung der Zielproteine zu untersuchen, wurde eine Kinasetitration durchgeführt, welche zu einem späteren Zeitpunkt in diesem Kapitel diskutiert wird.

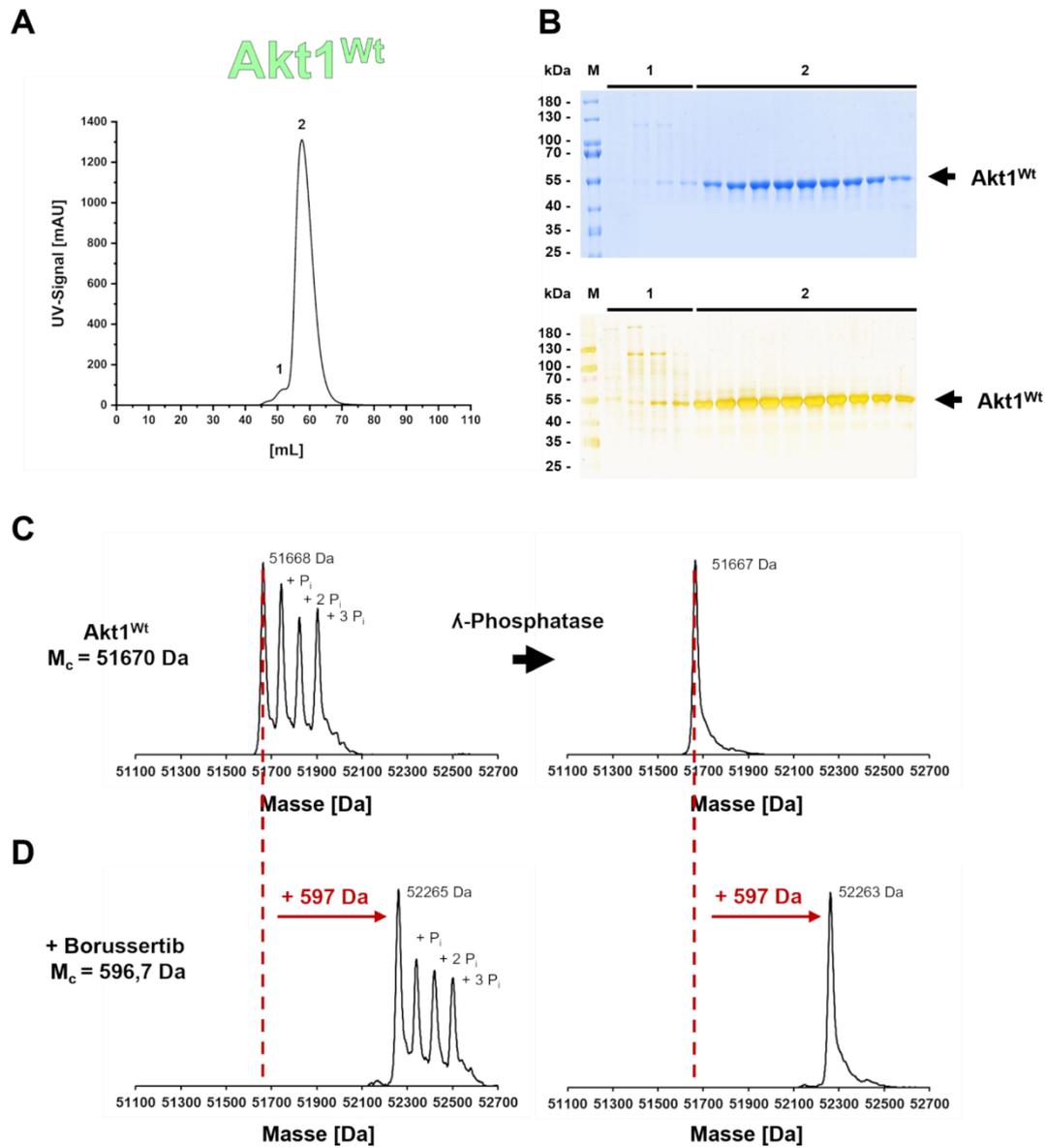


Abbildung 19: SEC zur Reinigung von Akt1^{Wt} und massenspektrometrische Untersuchungen. **A:** UV-Chromatogramm. UV-Signal (schwarz). **B:** SDS-Gel nach CBB-Färbung und Silberfärbung. Marker (M); Elutionspeak (1); Elutionspeak (2). **C:** Massenspektrum von Akt1^{Wt}. **D:** Vollständige kovalente Modifikation von Akt1^{Wt} durch Borussertib nach 1 h Inkubation mit einem dreifachen Überschuss des Inhibitors auf Eis.

Im weiteren Verlauf der Reinigung erfolgte eine Größenausschlusschromatografie (SEC), um verbleibende Verunreinigungen und Oligomere vor der Verwendung des Zielproteins für weiterführende Experimente abzutrennen. Im Falle der Akt1^{Wt}-Reinigung konnten mit Hilfe der SEC verbleibende Verunreinigungen und Oligomere in Elutionspeak 1 entfernt werden (Abbildung 19A und B). Akt1^{Wt} wurde im Elutionspeak 2 mit einer sehr hohen Reinheit eluiert, was neben dem SDS-Gel mit einer CBB-Färbung auch in einer sensitiveren Silberfärbung bestätigt werden konnte.^{##} Eine massenspektrometrische Analyse zeigte die erwartete Masse des Proteins und das Vorhandensein der unterschiedlichen Phosphorylierungszustände. Die vollständige kovalente Modifikation mit dem Inhibitor Borussertib bestätigte zudem die korrekte Faltung des Proteins. Dies konnte ebenfalls mit dem durch die α -Phosphatase dephosphorylierten Protein nachgewiesen werden. Da jedoch vorherige Kristallisationsstudien von Akt1^{Wt} die Unerlässlichkeit der Phosphorylierungszustände zeigten, wurde das heterogene Proteingemisch für weitere vergleichende Untersuchungen zwischen den Akt-Isoformen sowie für die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Kristallisationsstudien verwendet.¹²⁵

Da für Akt2^{Wt} mit den zwei phosphorylierten Spezies kein Kristallwachstum beobachtet werden konnte, wurde nach der AEX eine Dephosphorylierung mit der α -Phosphatase durchgeführt, um die Heterogenität der Proteinlösung herabzusetzen.^{129,§§} Mit einer SEC konnten in einem ersten Peak Oligomere abgetrennt werden, während im Peak 2 das Zielprotein eluiert wurde (Abbildung 20A). Die Silberfärbung zeigt wenige verbleibende Verunreinigungen (Abbildung 20B). Diese konnten weder durch die Erhöhung der Salzkonzentration im Puffer noch durch die Durchführung weiterer Reinigungsäulen entfernt werden. Trotzdem konnte das Zielprotein in einer guten Reinheit für weitere Experimente isoliert werden. In Peak 3 konnte schließlich die α -Phosphatase erfolgreich abgetrennt werden. Massenstudien bestätigten die Identität von Akt2^{Wt} sowie die erfolgreiche vollständige Dephosphorylierung des Zielproteins (Abbildung 20C und D).

^{##} Durchführung der Silberfärbung des SDS-Gels der finalen SEC von Akt1^{Wt}, Akt2^{Wt} und Akt3^{Wt} durch B. Sc. Cora Neugebauer (AG Rauh).

^{§§} Charakterisierung des dephosphorylierten Akt2^{Wt} in Zusammenarbeit mit B. Sc. Fabian Schnecke (AG Rauh, TU Dortmund).

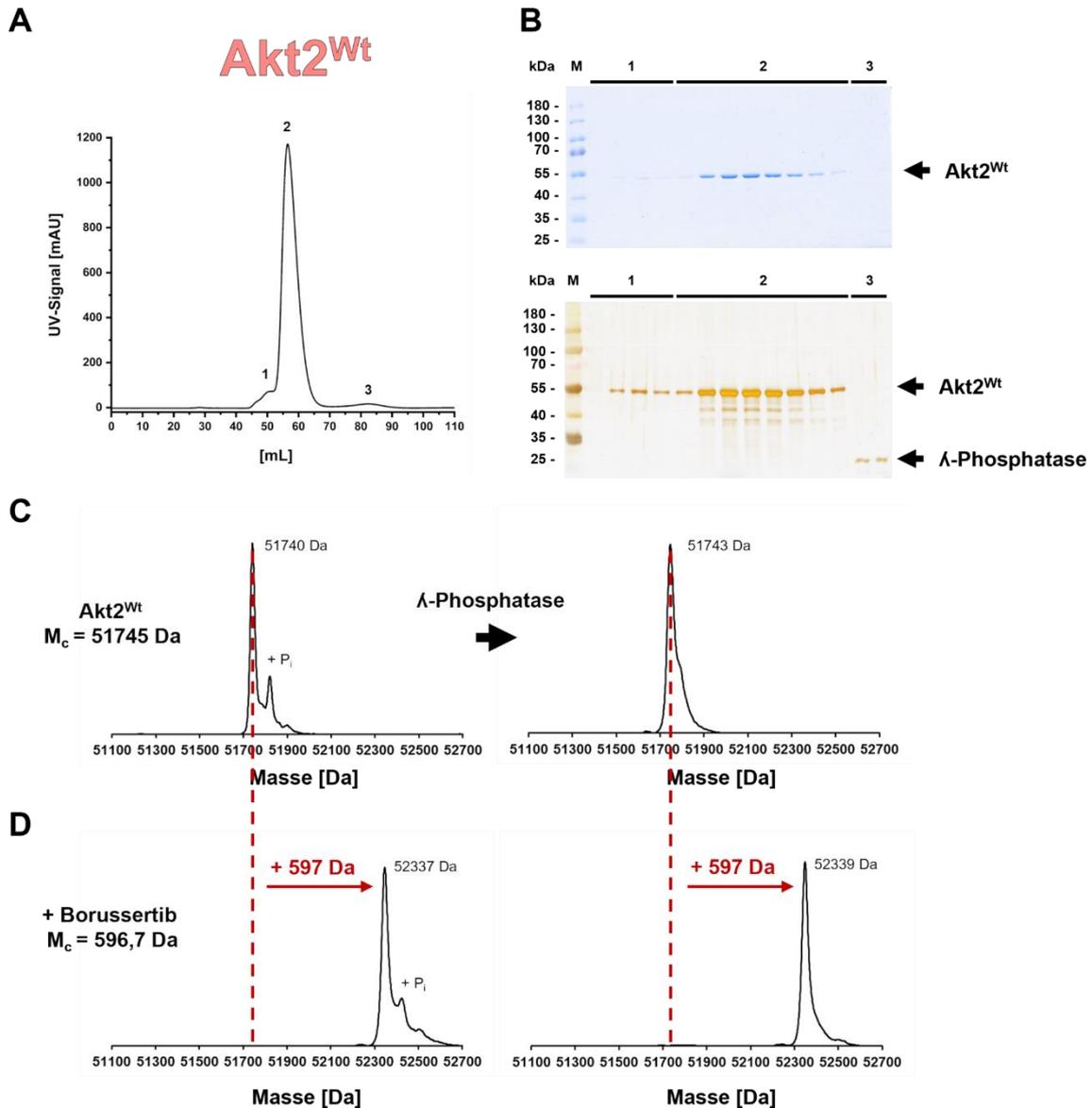


Abbildung 20: SEC zur Reinigung von Akt2^{Wt} und massenspektrometrische Untersuchungen. **A:** UV-Chromatogramm. UV-Signal (schwarz). **B:** SDS-Gel nach CBB-Färbung und Silberfärbung. Marker (M); Elutionspeak (1); Elutionspeak (2); Elutionspeak (3). **C:** Massenspektrum von Akt2^{Wt}. **D:** Vollständige kovalente Modifikation von Akt2^{Wt} durch Borussertib nach 1 h Inkubation mit einem dreifachen Überschuss des Inhibitors auf Eis.

Außerdem konnte erstmalig eine vollständige kovalente Bindung von CAAs sowohl an das Proteingemisch mit zwei unterschiedlichen Phosphorylierungspezies als auch an das dephosphorylierte Akt2^{Wt} nach 1 h nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass diese Art von Inhibitoren auch in Akt2 den postulierten Bindungsmodus aufweisen könnte.

ESI-MS/MS-Studien zeigten zudem die spezifische Adressierung von Cys297 und Cys311 in Akt2^{Wt} durch Borussertib. Interessanterweise konnte für andere CAAIs ebenfalls eine Alkylierung des Cys124 in der Linkerregion nachgewiesen werden (Vgl. Anhang, Abbildung 66 und 67). Weitere Massenstudien mit und ohne dem reduzierenden Detergenz Dithiothreitol (DTT) zeigten, dass Akt2^{Wt} nur in Gegenwart von DTT alkyliert wird, während zum Beispiel Akt1^{Wt} auch ohne den Zusatz von DTT kovalent modifiziert werden kann. Dies deutet auf eine erhöhte Reaktivität der Cysteine von Akt2^{Wt} in Gegenwart von reduzierenden Reagenzien und demnach eine Redoxsensitivität des Proteins hin. Daher könnte es sich bei der Alkylierung von Cys124 um eine unspezifische Bindung handeln, welche zusätzlich durch die Verwendung des hohen Überschusses an Inhibitor begünstigt wird. Sowohl in biochemischen als auch in zellulären Studien konnte in einer reduzierenden Umgebung eine Aktivitätssteigerung für Akt2^{Wt} nachgewiesen werden, während eine oxidierende Umgebung mit einer Inaktivierung von Akt2^{Wt} einhergeht.^{40,130-133} Dies deutet auf potenzielle Konformationsänderungen des Proteins in Gegenwart von DTT hin, welche zum Beispiel durch Auflösung von Disulfidbrücken zwischen einzelnen Strukturelementen induziert werden könnten. Um diese Hypothese zu validieren, müssten noch weitere Untersuchungen zum Beispiel mit Hilfe von Massenspektrometrie und Cystein-selektiven Sonden durchgeführt werden. Um Einflüsse auf die Proteinstabilität des gereinigten Akt2^{Wt} zu evaluieren, wurde ein Proteinstabilitätsassay mit und ohne DTT durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass Akt2^{Wt} in Anwesenheit von DTT deutlich schneller aggregiert als ohne die Zugabe von DTT (Anhang, Abbildung 61).

Für Akt3^{Wt} wurde ebenfalls ein Dephosphorylierung gewählt, um die Heterogenität des Proteingemisches herabzusetzen. Die darauffolgende SEC zeigte ein ähnliches Bild wie für Akt2^{Wt}, da in einem ersten Peak Oligomere abgetrennt werden konnten, in Peak 2 Akt3^{Wt} eluiert wurde und in Peak 3 die für die Dephosphorylierung verwendete α -Phosphatase. Sowohl das SDS-Gel mit CBB-Färbung als auch das SDS-Gel mit Silberfärbung zeigen, dass Akt3^{Wt} in einer sehr hohen Reinheit isoliert werden konnte. Darüber hinaus konnte mit Hilfe von Massenspektrometrie die Identität von Akt3^{Wt} sowie die kovalente Modifizierung mit Borussertib erfolgreich nachgewiesen werden (Abbildung 21).

In ESI-MS/MS-Experimenten zeigte sich, dass in Akt3^{Wt} ausschließlich das Cys293 alkyliert wird und weder Cys305 noch Cys119 in der Linkerregion alkyliert werden. Dies könnte durch die bereits diskutierten strukturellen Unterschiede von Akt3^{Wt} in der allosterischen Interdomänen-Bindetasche sowie durch die Positionierung des Cys119 in der Linkerregion erklärt werden.

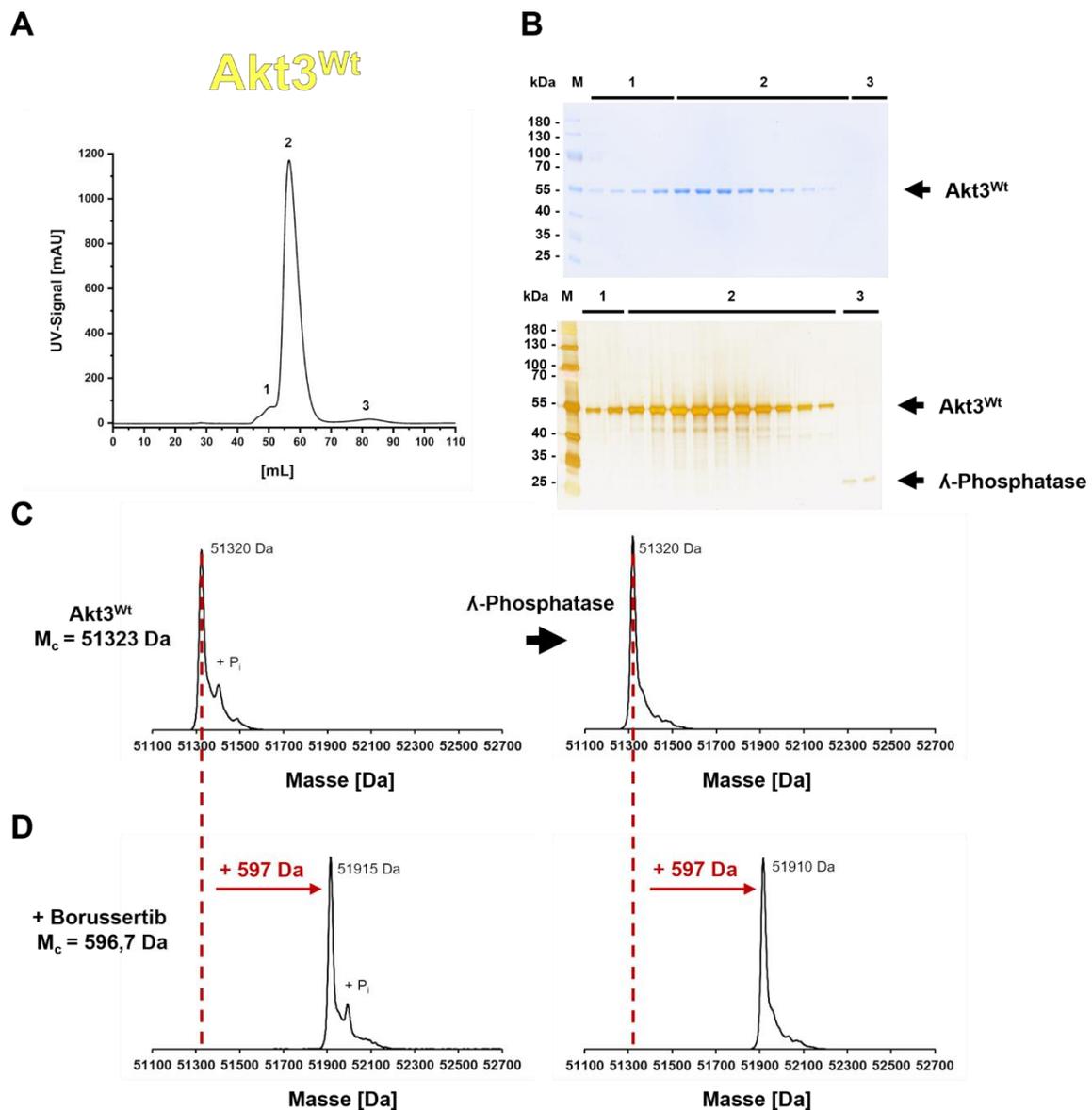


Abbildung 21: SEC zur Reinigung von Akt3^{Wt} und massenspektrometrische Untersuchungen. **A:** UV-Chromatogramm. UV-Signal (schwarz). **B:** SDS-Gel nach CBB-Färbung und Silberfärbung. Marker (M); Elutionspeak (1); Elutionspeak (2); Elutionspeak (3). **C:** Massenspektrum von Akt3^{Wt}. **D:** Vollständige kovalente Modifikation von Akt3^{Wt} durch Borussertib nach 1 h Inkubation mit einem dreifachen Überschuss des Inhibitors auf Eis.

Für die Durchführung von weiterführenden Studien und vor allem für die Proteinkristallisation ist die Stabilität des Proteins im finalen Puffer von großer Wichtigkeit. Dies wurde mit Hilfe eines *Thermal Shift Assays* (TSA) überprüft. Dieser beruht auf einer thermisch induzierten Proteindenaturierung, welche mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs *SYPRO Orange* detektiert werden kann. Der Farbstoff bindet an hydrophobe Bereiche des Proteins, welche bei der Proteindenaturierung freigelegt werden. Demnach korreliert eine höhere Schmelztemperatur mit einer erhöhten Proteinestabilität (Abbildung 22A).¹³⁴ Es wurden sowohl unterschiedliche pH-Werte (pH 4-10) als auch unterschiedliche Salzkonzentrationen (0-1 M NaCl) untersucht (Abbildung 22B-D).

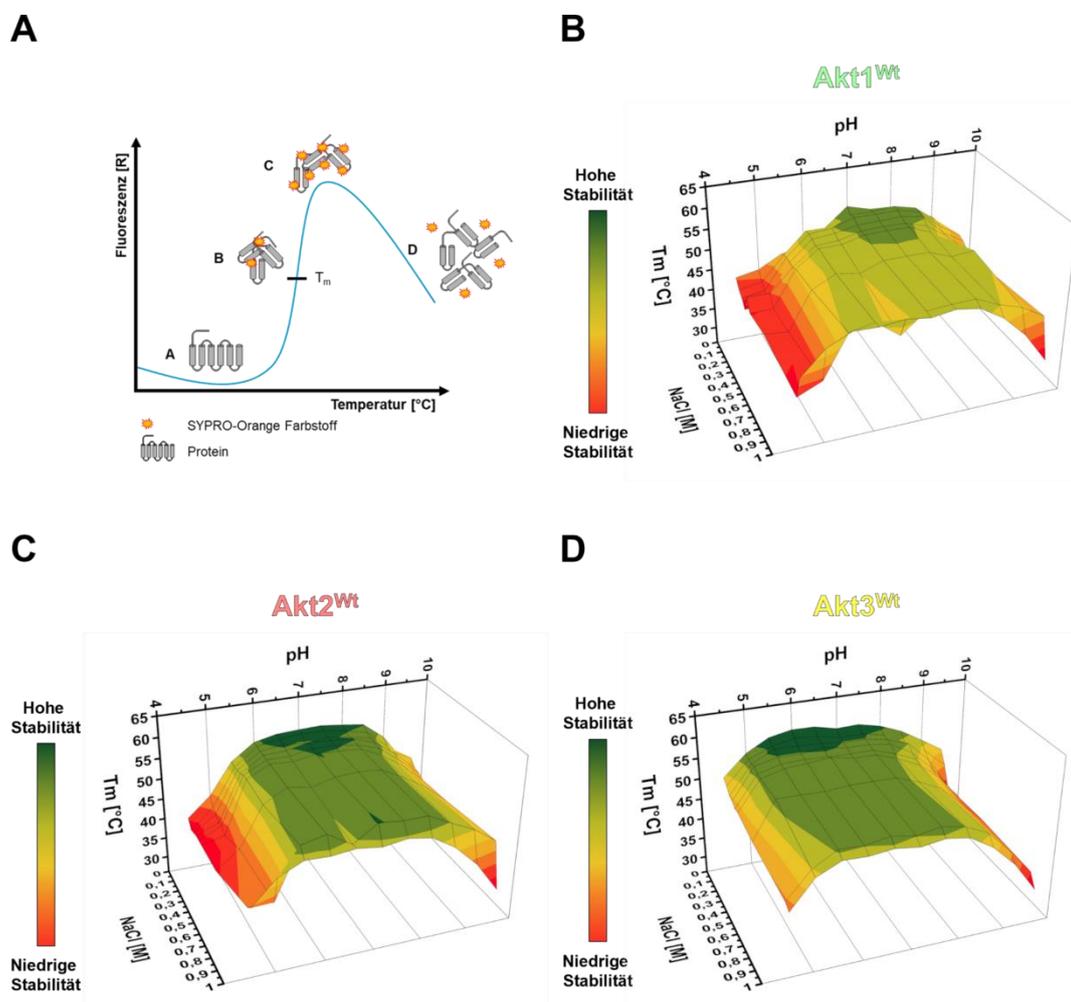


Abbildung 22: A: Prinzip des TSA. B-D: Ergebnisse des Pufferstabilitätsassays für Akt1^{Wt}, Akt2^{Wt} und Akt3^{Wt}. Akt1^{Wt} bevorzugt einen pH-Wert von 7,5, Akt2^{Wt} hat den höchsten Schmelzpunkt bei pH 7 und Akt3^{Wt} bei pH 6,5.

Alle drei Isoformen bevorzugen niedrige Salzkonzentrationen, präferieren jedoch unterschiedliche pH-Werte. Während Akt1^{Wt} einen pH-Wert von 7,5 bevorzugt, weist Akt2^{Wt} den höchsten Schmelzpunkt bei pH 7 und Akt3^{Wt} bei pH 6,5 auf. Im Falle von Akt1^{Wt} hat der literaturbekannte Kristallisationspuffer bereits die optimale Zusammensetzung, für Akt2^{Wt} und Akt3^{Wt} wurden Anpassungen hinsichtlich der verwendeten Salze, Salzkonzentrationen und pH-Werte vorgenommen (Material und Methoden, Kapitel 5.6.1).

Mit Hilfe einer auf dem *homogeneous time-resolved fluorescence energy-transfer* (HTRF) Assay basierenden Aktivitätsbestimmung wurde schließlich die katalytische Aktivität der exprimierten Akt-Isoformen untersucht (Abbildung 23). Dafür wird ein biotinyliertes Substratpeptid verwendet, welches nach der Zugabe von ATP von der jeweiligen Kinase phosphoryliert werden kann. Anschließend wird ein Fluorophor-gekoppelter Antikörper, welcher an das phosphorylierte Substrat bindet, und ein Fluorophor-gekoppeltes Streptavidin, welches den Biotin-Tag bindet, hinzugegeben. Der durch die räumliche Nähe der Fluorophore stattfindende Resonanzenergie-transfer kann durch die Messung des entstehenden Fluoreszenzsignals verfolgt werden.¹³⁵

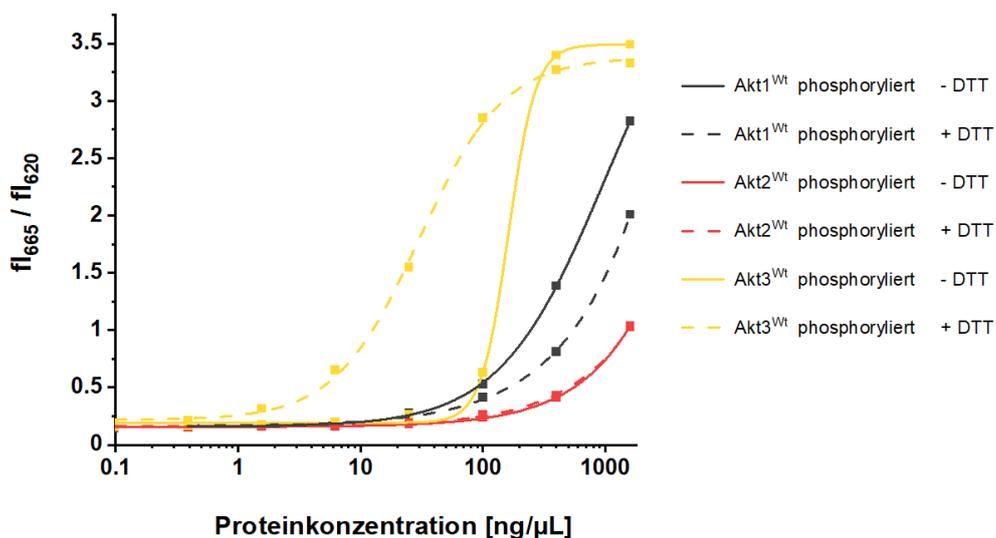


Abbildung 23: Darstellung der Ergebnisse der auf dem HTRF-Assay basierenden Aktivitätsbestimmung der Akt-Isoform-Kristallisationskonstrukte in unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen und unter unterschiedlichen Bedingungen. Auftragung der gemessenen Fluoreszenz gegen die verwendeten Proteinkonzentrationen in ng/μL.

Sowohl für Akt1^{Wt} als auch Akt2^{Wt} konnte nur eine geringe katalytische Aktivität gemessen werden. Im Falle von Akt2^{Wt} konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in Anwesenheit und in Abwesenheit des Reduktionsmittels DTT festgestellt werden. Demnach lässt sich der in der Literatur beschriebene aktivierende Effekt von Reduktionsmitteln nicht auf eine gesteigerte katalytische Aktivität zurückführen, sondern ist vermutlich struktureller Natur. Aus diesem Grund wurden die folgenden Kristallisationsexperimente sowohl mit als auch ohne DTT durchgeführt. Für Akt1^{Wt} wurde eine geringe Aktivität in Anwesenheit von DTT detektiert. Für Akt3^{Wt} konnte für das phosphorylierte Protein ohne DTT bereits eine deutlich höhere Aktivität als für die anderen Isoformen beobachtet werden. Interessanterweise zeigte Akt3^{Wt} eine gesteigerte Aktivität in Gegenwart von DTT. Da dies, aufgrund der daraus resultierenden höheren Flexibilität des Proteins, hinderlich für die Kristallisation sein könnte, wurde dem finalen Akt3^{Wt}-Kristallisationspuffer kein DTT hinzugefügt.

Insgesamt konnten im Rahmen dieser Arbeit für Akt2 und Akt3 robuste Reinigungsstrategien entwickelt werden, welche den Erhalt der Proteine in hoher Reinheit und guter Ausbeute von 2,5-3 mg pro Liter Expressionskultur ermöglichten. So konnte erstmalig eine weiterführende Charakterisierung von Akt2 und Akt3 hinsichtlich der Isoform-spezifischen Eigenschaften im Vergleich mit dem bereits im Arbeitskreis Rauh etablierten und gut charakterisierten Akt1^{Wt} durchgeführt werden. Zusätzlich konnte mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen erstmalig eine kovalente Modifizierung von Akt2^{Wt} und Akt3^{Wt} an den Thiol-Seitenketten von Cys293/297 und Cys308/311 mit CAAs nachgewiesen werden. Demnach eignen sich die dargestellten Akt-Isoform-Konstrukte für die Analyse der Bindungseigenschaften der Isoform-selektiven CAAs im weiteren Verlauf der Arbeit.

3.4 Kristallisationsstudien der Akt-Isoformen

Die strukturelle Analyse von Liganden im Komplex mit dem Zielprotein ist ein essenzieller Schritt für die Entwicklung und die rationale Optimierung bioaktiver Moleküle. Vor allem in der Entwicklung von selektiven Inhibitoren für Proteine mit einer hohen Sequenzhomologie, wie im Falle der Akt-Isoformen, ist eine detaillierte Analyse der adressierten Bindetasche und der dort lokalisierten AS nötig. Bis heute ist die Proteinkristallographie das leistungsstärkste Mittel für die Untersuchung von Protein-Ligand-Komplexen. Die größte Herausforderung dabei ist die Identifizierung von geeigneten Kristallisationsbedingungen.¹⁰¹

3.4.1 Kristallisation von Akt2

Bisher konnten keine Vollängenkristallstrukturen der Akt-Isoformen Akt2 und Akt3 gelöst werden und für die Optimierung von Isoform-selektiven CAAs musste grundsätzlich auf Homologiemodelle zurückgegriffen werden. Deshalb war ein elementarer Bestandteil dieser Arbeit Kristallisationsstudien mit Akt2 und Akt3 durchzuführen. Da hierzu im Gegensatz zu Akt1^{Wt} keine Literaturbedingung als Startpunkt zur Verfügung steht, stellt es eine besondere Herausforderung dar, geeignete Kristallisationsbedingungen zu identifizieren. Für die Kristallisationsexperimente mit Akt2^{Wt} erfolgte zunächst die Überführung in den entsprechenden Kristallisationspuffer. Da wie bereits diskutiert durch die Zugabe von DTT in den Puffer eventuell strukturelle Änderungen des Proteins induziert werden, wurden Kristallisationsexperimente sowohl mit DTT im finalen Puffer als auch ohne DTT durchgeführt. Beim Vergleich der Chromatogramme der SEC konnte eine signifikante Verschiebung des Peaks ohne DTT (schwarz) in Richtung einer späteren Elution verzeichnet werden, während der Peak mit DTT (grau) früher von der Säule eluiert wurde (Abbildung 24A). Dies bestätigt die Annahme eines strukturellen Einflusses von Reduktionsmitteln auf Akt2 und deutet darauf hin, dass diese Isoform in einer oxidierenden Umgebung in einer globuläreren Konformation vorliegt. Um optimale Liganden für die Kristallisation zu identifizieren, wurde der stabilisierende Einfluss verschiedener Inhibitorklassen auf Akt2^{Wt} mit Hilfe eines Proteinstabilitätsassays ermittelt.

Hier stellte sich heraus, dass Akt2^{Wt} durch allosterische und kovalent-allosterische Inhibitoren die größte Stabilisierung erfährt (Abbildung 24C). Allerdings konnte in Abwesenheit von DTT keine kovalente Bindung ausgebildet werden. Aus diesem Grund wurde in ersten Experimenten der allosterische Inhibitor Miransertib für weitere Experimente ausgewählt.

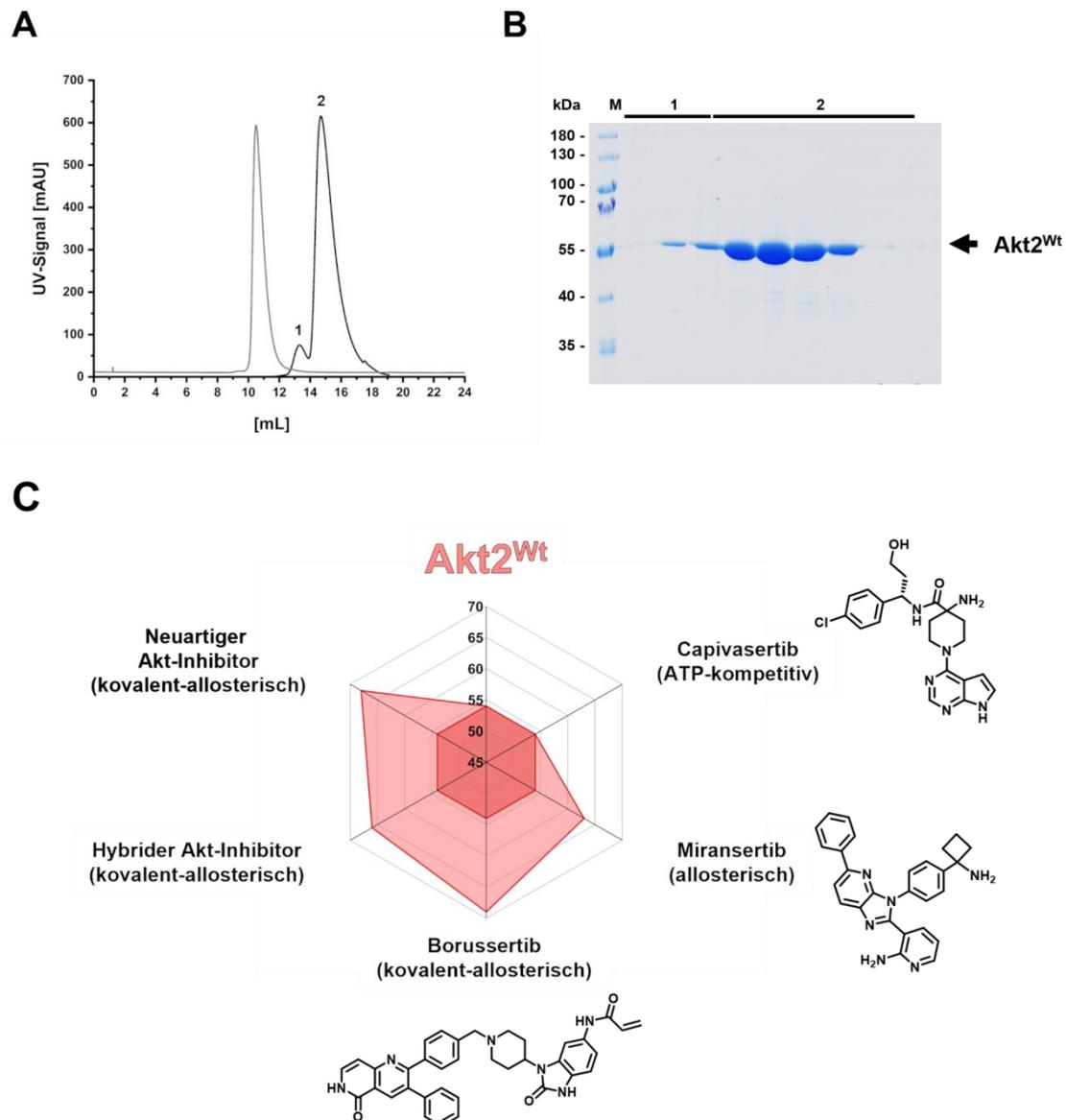


Abbildung 24: Zweite SEC zur Überführung von Akt2^{Wt} in den Kristallisationspuffer und Proteinstabilitätsuntersuchungen. **A:** UV-Chromatogramm. UV-Signal mit DTT im Kristallisationspuffer (grau); UV-Signal ohne DTT im Kristallisationspuffer (schwarz). **B:** SDS-Gel nach CBB-Färbung: Marker (M); Elutionspeak (1); Elutionspeak (2). **C:** Vergleich der Ergebnisse des TSA-Assay von Akt2^{Wt} inkubiert mit unterschiedlichen Inhibitorclassen. Die DMSO-Kontrolle ist in der Mitte in dunklerem rot dargestellt, während T_m von Akt2^{Wt} inkubiert mit den Inhibitoren in hellerem rot gezeigt ist.

Da die Akt-Isoformen eine hohe Sequenzhomologie haben, wurde zunächst getestet, ob sich die publizierten (PDB: 4EJN⁸⁶; 3O96¹¹³) sowie die im Arbeitskreis etablierten Akt1^{Wt}-Kristallisationsbedingungen¹²⁵ auf Akt2^{Wt} anwenden lassen. Es konnte allerdings in zahlreichen Kristallisationsexperimenten unter der Variation von Proteinkonzentration, Temperatur, Salzkonzentration, pH-Wert, Zusammensetzung der Phosphorylierungs-Spezies und Fällungsmittel kein Kristallwachstum beobachtet werden. Im nächsten Schritt wurden unter Variation der Parameter die publizierten Kristallisationsbedingungen für die Akt2-Kinasedomäne getestet (PDB: 1MVR)¹³⁶ und es konnte ebenfalls kein Kristallwachstum erreicht werden.

Wenn bisher noch keine Kristallisationsbedingungen bekannt sind, bieten kommerziell erhältliche *Screens* (JCSG Core I-IV Suites, PACT Suite, PEG I-II Suites, MemGold I-II Suites, AmSO4 Suite, Classics Suite, Classics II Suite, Qiagen) die Möglichkeit eine Vielzahl von unterschiedlichen Bedingungen in einem hohen Durchsatz zu testen und potenziell geeignete neuartige Bedingungen zu identifizieren. Zunächst wurde der Phospho-Mix des Proteins in Anwesenheit von DTT im Kristallisationspuffer getestet und es wurden Parameter wie die Proteinkonzentration (3-15 mg/mL) und Inkubationstemperatur (4 °C und 20 °C) variiert und unterschiedliche Akt-Inhibitoren getestet (ATP-kompetitiv, allosterisch und kovalent-allosterisch). Im Rahmen dieser Experimente konnten zwei Bedingungen gefunden werden, die zum Wachstum von Kristall-ähnlichen Strukturen führten. Während in einer Bedingung rundliche Kristall-Morphologien, bestehend aus feinen Nadelkristallen, zu beobachten waren, wuchsen in der anderen Bedingung sehr kleine kubische Kristalle (Abbildung 25A und B). Eine Betrachtung der Tryptophan-Fluoreszenz unter dem UV-Mikroskop zeigte eine Anregung der Kristalle, sodass es sich dabei vermutlich um Protein und nicht um Salz handelt. Allerdings konnte bei einer Reproduktion der Bedingungen in einem *Fine Screen* kein Kristallwachstum beobachtet werden.

Wie bereits in Kapitel 3.3.3 diskutiert, entsteht durch die Expression von Akt2^{Wt} in Insektenzellen ein sehr heterogen phosphoryliertes Proteingemisch.

Da diese Heterogenität eventuell hinderlich für die Kristallisation des Proteins sein könnte, wurden sowohl Kristallisationsexperimente mit dem dephosphorylierten Protein als auch ohne DTT im finalen Puffer durchgeführt. Letztendlich führte die Kombination aus dephosphoryliertem Akt2^{Wt} inkubiert mit dem allosterischen Inhibitor Miransertib und einem Kristallisationspuffer ohne DTT zum Wachstum von Kristall-ähnlichen Morphologien in Bedingungen mit verschiedenen Ammoniumsulfat-Konzentrationen (Abbildung 25C).

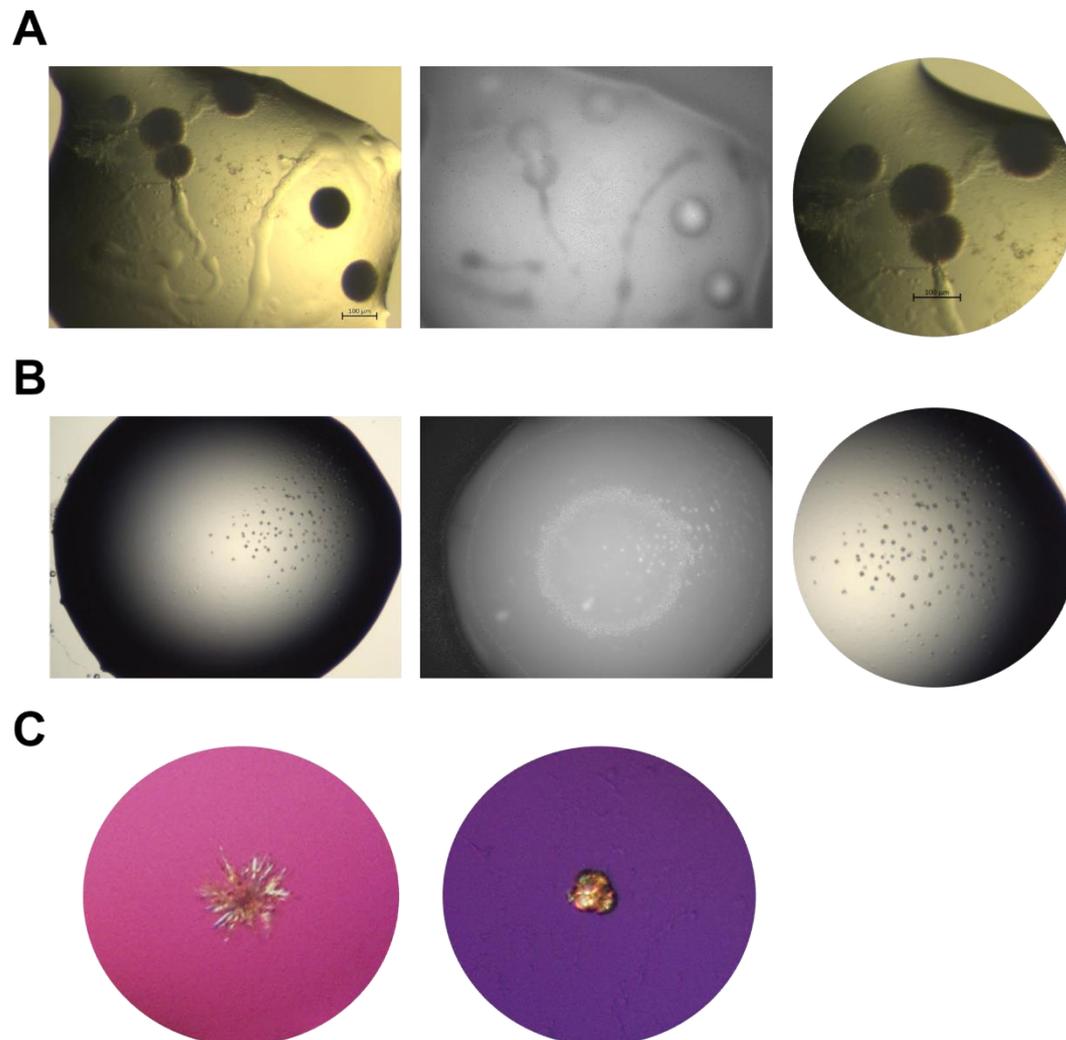


Abbildung 25: Ergebnisse aus den *Screening*-Experimenten mit Akt2^{Wt}. **A:** Sphärolite mit den Bedingungen: 200 mM MgAc, 100 mM Na-Kakodylat, pH 6,5, 20 % (w/v) PEG 8000 (20 °C, 10 mg/mL, Classic I *Screen*, Qiagen) **B:** Kubische Kristalle mit den Bedingungen: 200 mM NaF, 100 mM Bis-Tris Propan pH 6, 20 % (w/v) PEG 3350 MME (20 °C, 8 mg/mL, PACT *Screen*, Qiagen) **C:** Kristalle mit unterschiedlichen Morphologien mit (NH₄)₂SO₄ enthaltenen Bedingungen: 100 mM Tris, pH 9, 1-1,5 M (NH₄)₂SO₄ (20 °C, 14 mg/mL, JCSG Core Suite IV, Qiagen).

Diese Bedingungen wurden in einem *Fine Screen* unter Variation der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration und des pH-Wertes des Bicin-Puffers wiederholt. Nach zwei Tagen Inkubation bei 4 °C, 12 °C und 20 °C wuchsen unterschiedliche Kristall-Morphologien, welche jedoch alle in die Klasse der Sphärolite einzuordnen sind (Abbildung 26). Auffällig war dabei, dass diese nur bei der Verwendung von Miransertib als Liganden wuchsen und nicht bei der Verwendung des Apo-Proteins oder ATP-kompetitiven Inhibitoren. Eine Vermessung der Sphärolite am *Swiss Light Source* (SLS) zeigte keine Diffraktion, sodass im nächsten Schritt ein *Additiv-Screen* durchgeführt wurde. Mit Hilfe dieses Experiments wird der Einfluss unterschiedlichster Additive (Salze, Lösemittel, Puffer) auf die Kristallisation des Zielproteins untersucht, indem diese zu den initialen Bedingungen hinzugegeben werden. Hier gelang lediglich eine Reproduktion der Sphärolite, jedoch keine Optimierung hinsichtlich Morphologie und Diffraktionseigenschaften. Zusätzlich wurden *Seeding*-Experimente mit unterschiedlichen Konzentrationen der *Microseed*-Lösungen durchgeführt. Bei dieser Methode werden die erhaltenen Kristalle zum Beispiel mit einem kleinen Glasstab in kleine Fragmente zerstoßen und anschließend mit Hilfe von iterativem Vortexen in kleinste Mikrokristalle verarbeitet. Diese Mikrokristalle können anschließend in unterschiedlichen Verdünnungen als Kristallisationskeime für die Kristallisation beziehungsweise zur Optimierung der erhaltenen Kristalle dienen.¹³⁷⁻¹³⁹ Es gelang eine Optimierung der Sphärolite hin zu Nadel-Bündeln, welche mit absteigender *Microseed*-Konzentration feinere Strukturen ausbildeten (Abbildung 26E-G). Diese Nadel-Bündel wurden erneut zerkleinert und für weitere *Seeding*-Experimente mit unterschiedlichen Zusammensetzungen der Reservoir- und Proteinlösung eingesetzt, allerdings ließ sich keine Optimierung erzielen.

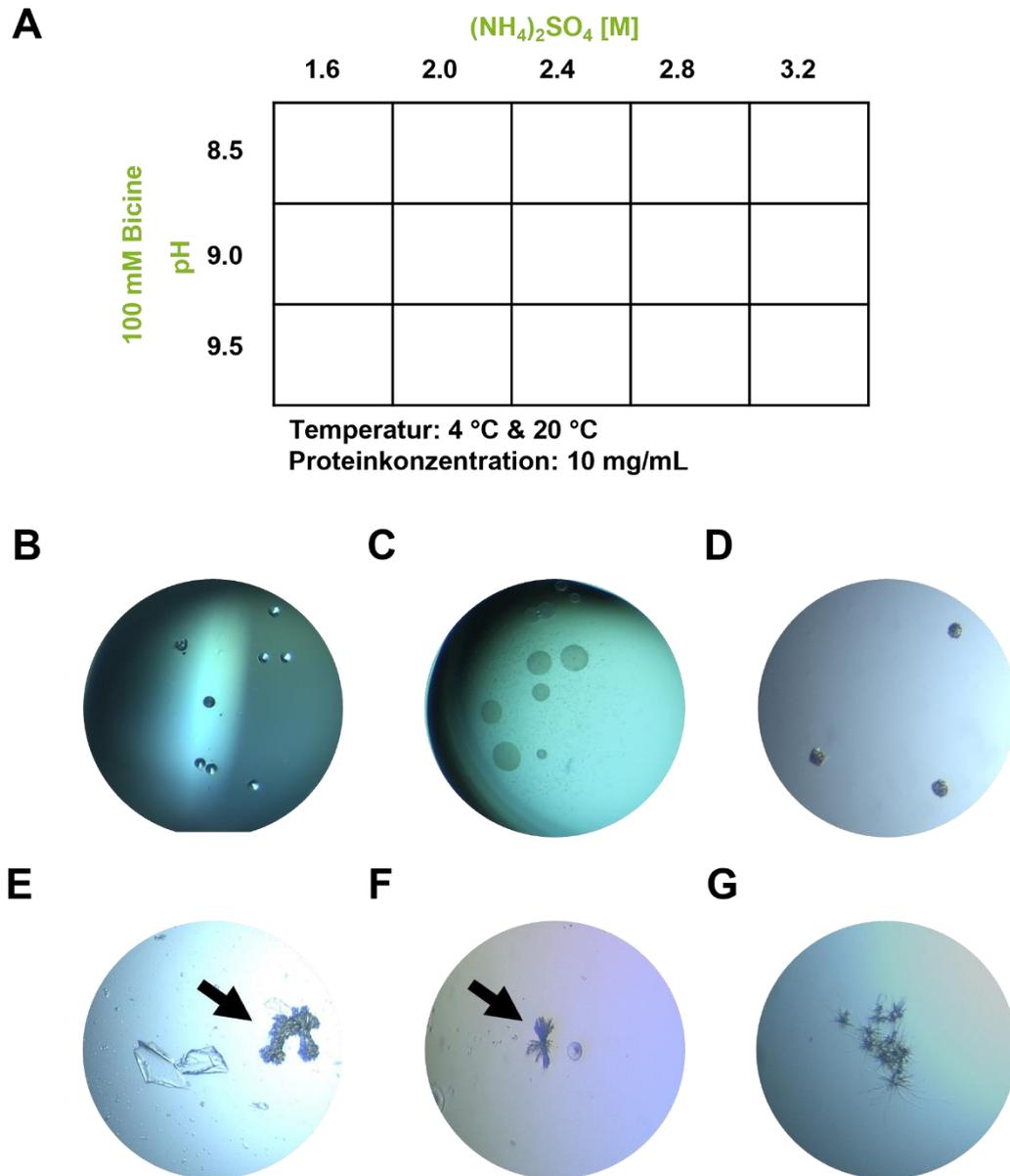


Abbildung 26: **A:** Verwendete Kristallisationsbedingungen für Akt2^{Wt}: 100 mM Bicine mit pH-Werten von 8,5 – 9,5 sowie einer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentration von 1,6-3,2 M. Inkubation von 10 mg/mL Protein bei 4 °C und 20 °C. **B-G:** Beispiele für die beobachteten Kristallmorphologien mit unterschiedlichen Bedingungen. **B:** Akt2^{Wt} + Miransertib, 4 °C. **C:** Akt2^{Wt} + Miransertib, 20 °C. **D:** Akt2^{Wt} + Miransertib, 12 °C **E:** Akt2^{Wt} + Miransertib, 20 °C, Seeding-Verdünnung 1:50. **F:** Akt2^{Wt} + Miransertib, 20 °C, Seeding-Verdünnung 1:1000. **G:** Akt2^{Wt} + Miransertib, 20 °C, Seeding-Verdünnung 1:20000.

Insgesamt konnten mit Hilfe der zahlreichen durchgeführten Experimente und Optimierungsansätze keine Bedingungen identifiziert werden, die zum Wachstum von für Diffraktionsexperimente geeigneten Akt2^{wt}-Proteinkristallen führen. Dies könnte daran liegen, dass Akt2^{wt} aufgrund des langen unstrukturierten Linkers eine hohe Flexibilität aufweist und mit den verwendeten Inhibitoren und Methoden nicht ausreichend für die Kristallisation stabilisiert werden konnte. Diese Erkenntnis stellt einen interessanten Angriffspunkt für weitere Studien dar. Nichtsdestotrotz stellen die erhaltenen Nadelcluster einen vielversprechenden Startpunkt für die Kristallisation von Akt2^{wt} dar und die gewonnenen Erkenntnisse über die charakteristischen Eigenschaften des Zielproteins können als Grundlage für weitere Studien fungieren.

3.4.2 Kristallisation und Strukturaufklärung von Akt2-Mimikry

Zusätzlich wurden vier weitere Akt2-Varianten mit dem Ziel hergestellt durch eine geringere Flexibilität eine dichtere Proteinpäckung zu ermöglichen. Dazu wurden verschiedene Modifikationen des Linkers eingeführt. Der Aufbau der entsprechenden Konstrukte wurde in Kapitel 3.3.1 ausführlich erläutert. Innerhalb dieser Arbeit konnten die Linker-Varianten mit Hilfe, der bereits für die Wildtyp-Akt-Isoformen etablierten Protokolle, erfolgreich exprimiert und gereinigt werden. Initiale Experimente mit den verschiedenen Konstrukten lieferten die vielversprechendsten Ansätze mit Akt2-Mimikry. Da Experimente mit allen Konstrukten parallel zu zeitintensiv und aufwendig sind, wurde dementsprechend der Fokus auf dieses Konstrukt gelegt. Die Übertragung von Bindetaschen bisher nicht-kristallisierbarer Proteine in Konstrukte mit bereits bekannten Strukturen und Kristallisationssystemen war bereits in früheren Anwendungen erfolgreich, wie zum Beispiel für die Proteasen Trypsin und Faktor XA.¹⁴⁰⁻¹⁴² Basierend auf dem in Kapitel 3.1 diskutierten Homologiemodell von Akt2 wurde die allosterische Bindetasche von Akt1 mit Hilfe von Punktmutationen der Akt2-Bindetasche angepasst (S205T/D262E/E267del/K268R/N269D). Da es sich bei diesem Konstrukt demnach um eine Akt1-Variante handelt, wurde die Expression und Reinigung analog zu der beschriebenen Akt1^{Wt}-Reinigung durchgeführt. Weiterhin konnten die bereits bekannten und etablierten Akt1^{Wt}-Kristallisationsbedingungen als Startpunkt für weitere Experimente genutzt werden.^{***} Im Rahmen dieses Protokolls erfolgte zunächst mit Hilfe einer SEC ein Pufferaustausch in den finalen Kristallisationspuffer. Anschließend wurde der vollständige Phospho-Mix des Proteins einer einstündigen Inkubation mit dem dreifachen Überschuss eines Liganden unterzogen (Anhang, Abbildung 63). Für die Ko-Kristallisation von Akt1^{Wt} mit allosterischen und kovalent-allosterischen Inhibitoren konnte bei der Verwendung von 1,25 mM Natrium-Acetat und 3,75 mM Natrium-Citrat mit pH-Werten von 6,5-7,5 sowie einer PEG 2000 MME-Konzentration von 12-24 % Kristallwachstum nach durchschnittlich 1-3 Tagen festgestellt werden (Anhang, Abbildung 64).

^{***} Etablierung des Kristallisationssystems für die Ko-Kristallisation von Akt1^{Wt} mit CAAls durch M. Sc. Rebekka Scheinpflug und Dr.in Ina Landel (AG Rauh, TU Dortmund).

Die Inkubation erfolgte mit 3 mg/mL Protein bei 18 °C.¹²⁵ Bei der Verwendung dieser Bedingungen kristallisiert Akt1^{Wt} in der Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$ mit den Zellkonstanten $a = 70 \text{ \AA}$, $b = 70 \text{ \AA}$, $c = 90/100 \text{ \AA}$ und $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$ sowie einem einzelnen Molekül in der asymmetrischen Einheit. Für die Kristallisation von Akt2-Mimikry wurden sowohl der allosterische Akt-Inhibitor Miransertib als auch unterschiedliche CAAs für die Kristallisation getestet. Bei der Inkubation des Proteins mit einem dreifachen Überschuss CAAI fiel auf, dass nach einer Stunde keine vollständige Bindung erreicht werden konnte. Dies könnte durch die veränderte Beschaffenheit der allosterischen Bindetasche zu erklären sein, was vermutlich zu einer Affinitätsverringering der verwendeten Inhibitoren führt. Aus diesem Grund wurde die Inkubationszeit auf 4 h erhöht (Anhang, Abbildung 62A).

Es konnte nach zwei Wochen das Wachstum von sehr feinen Nadeln beobachtet werden (Abbildung 27A). Da diese zu klein für eine Entnahme aus dem Tropfen waren, wurden weitere Kristallisationsexperimente mit dieser Bedingung unter der Variation von Proteinkonzentration, Reservoir-Zusammensetzung und Inkubationstemperatur durchgeführt. Dies führte jedoch nicht zum gewünschten Erfolg. Deshalb wurde im nächsten Schritt ein *Seeding*-Experiment durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode konnten größere Nadel-Bündel für Akt2-Mimikry inkubiert mit Miransertib erhalten werden, mit denen bereits bei der Vermessung am SLS Proteindiffraktion gemessen wurde. Diese dienten erneut für ein *Seeding*-Experiment und es konnte abermals eine Optimierung der Kristallmorphologie erreicht werden (Abbildung 27B).

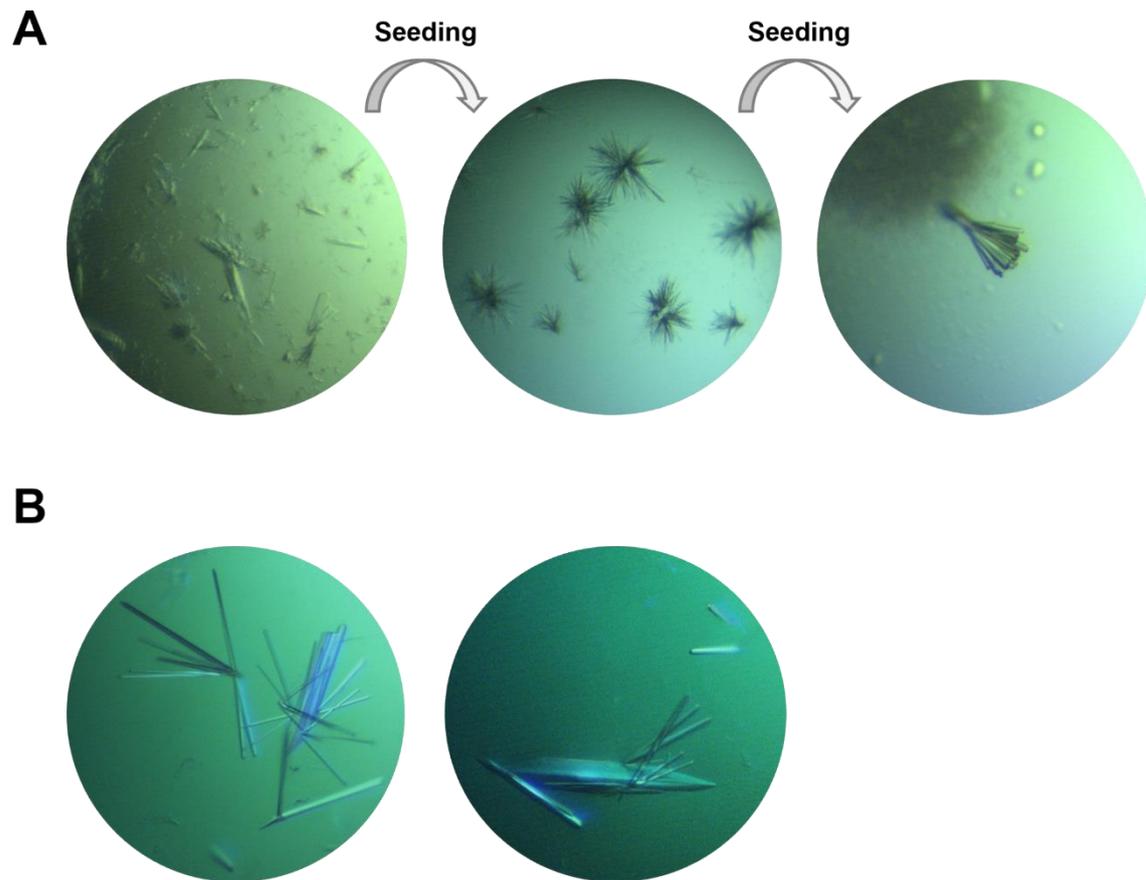


Abbildung 27: Ergebnisse der Kristallisationsexperimente mit Akt2-Mimikry. **A:** Optimierung der initial erhaltenen Nadelkristalle mit Hilfe von Seeding-Experimenten zu breiteren Nadeln. Gezeigte Bedingung: Miransertib, 18 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 7,5. **B:** Optimierte Nadelkristalle mit Miransertib, 18 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 6,5.

Die optimierten Proteinkristalle ermöglichten schließlich die Aufnahme eines vollständigen Datensatzes mit einer guten Auflösung und qualitativ hochwertigen Diffraktionsbildern (Abbildung 28). Für die manuelle Datenprozessierung mit dem Programm XDS konnten alle 3600 aufgenommenen Bilder (360° in $\Delta\varphi$ -Schritten von $0,1^\circ$) verwendet werden. Die Datenprozessierung des Akt2-Mimikry-Datensatzes lieferte die orthorombische Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$, mit den Zellkonstanten $a = 45 \text{ \AA}$, $b = 165 \text{ \AA}$, $c = 190 \text{ \AA}$ sowie $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$ und einer Auflösung von $2,5 \text{ \AA}$. Dabei fiel auf, dass die Zellachsen von denen von Akt1^{Wt} abweichen, welches mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit kristallisiert. Im Gegensatz dazu konnten für Akt2-Mimikry drei Moleküle in der asymmetrischen Einheit bestimmt werden (Tabelle 1).

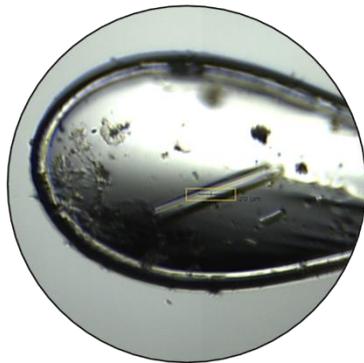
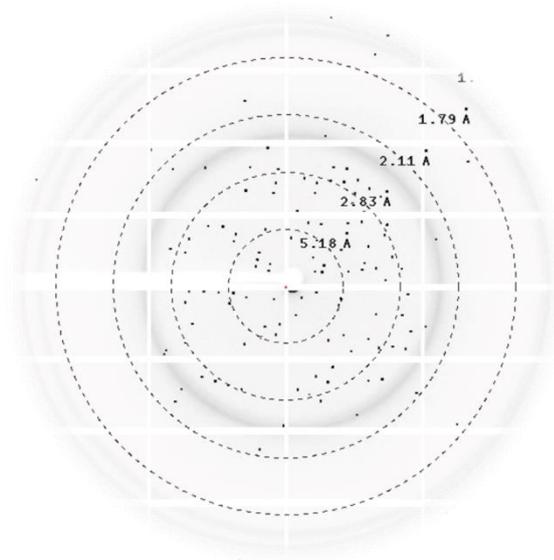
A**B**

Abbildung 28: Ergebnisse der Röntgendiffraktionsexperimente am SLS. **A:** Aufnahme des Akt2-Mimikry-Proteinkristalls während der Vermessung am SLS. Der Proteinkristall wurde aus den Bedingungen mit 18 % (w/v) PEG 2000 MME, pH 6,5 entnommen. **B:** Beispielhaftes Diffraktionsbild von der Vermessung des Akt2-Mimikry-Proteinkristalls im Komplex mit dem allosterischen Inhibitor Miransertib am SLS.

Tabelle 1: Vergleich der Datenprozessierung von Akt1^{Wt} und von Akt2-Mimikry im Komplex mit Miransertib.

	Akt1^{Wt}†††	Akt2-Mimikry
Datenbereich	1 - 1440	1 - 3600
Reflexbereich	1 - 1440	1 - 3600
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten		
a, b, c, (Å)	69.83, 70.36, 92.82	44.80, 164.30, 188.96
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
N (mol)	1	3
Auflösung (Å)	50 - 2.1 (2.2 - 2.1)	50 - 2.5 (2.6 - 2.5)

††† Strukturlösung und -verfeinerung von Akt1^{Wt} im Komplex mit Miransertib durch Dr.in Ina Landel (AG Rauh, TU Dortmund).

3.4.3 Kristallisation von Akt3

Für die Kristallisation von Akt3 musste keine weitere SEC erfolgen, da das Protein bereits während der ersten SEC in den finalen Kristallisationspuffer überführt wurde. Der Proteinstabilitätsassay zeigte, dass das Apo-Protein bereits eine höhere Stabilität im Vergleich zu den anderen Akt-Isoformen aufweist, allerdings weniger stark durch die Inkubation mit allosterischen und kovalent-allosterischen Inhibitoren stabilisiert wird. Dies ist dadurch zu erklären, dass diese Inhibitoren auch eine geringere Bindungsaffinität zu Akt3 haben. Insgesamt zeigten der CAAI Borussertib sowie ein Hybridmolekül die größte Stabilisierung des Proteins, sodass diese Inhibitoren bevorzugt für die Kristallisation eingesetzt wurden (Abbildung 29).^{###}

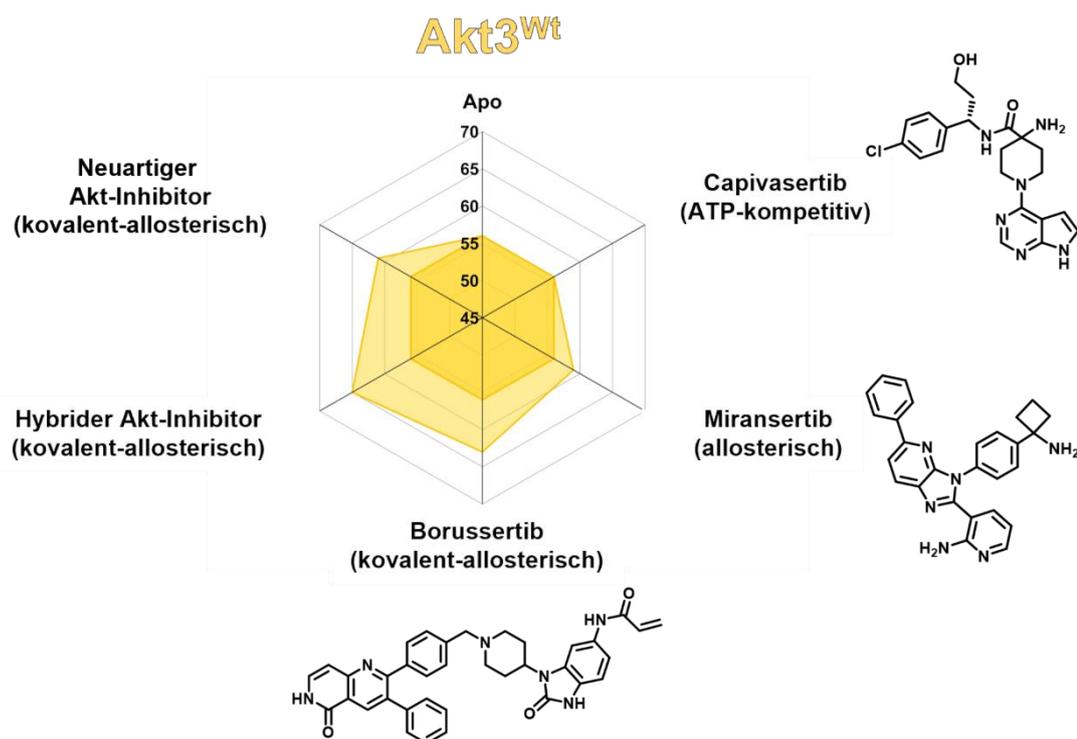


Abbildung 29: Vergleich der Ergebnisse des TSA-Assays von Akt3^{Wt} inkubiert mit unterschiedlichen Inhibitorclassen. Die DMSO-Kontrolle ist in der Mitte in dunklerem gelb dargestellt, während T_m von Akt3^{Wt} inkubiert mit den Inhibitoren in hellerem gelb gezeigt ist.

^{###} Durchführung des TSA für Akt3^{Wt} mit unterschiedlichen Inhibitoren im Rahmen der Bachelorarbeit von B. Sc. Cora Neugebauer (AG Rauh, TU Dortmund).

Da mit Hilfe der Akt1^{Wt}-Kristallisationsbedingungen ebenfalls kein Kristallwachstum erreicht werden konnte, wurden kommerzielle *Screens* (JCSG Core I-IV Suites, PACT Suite, PEG I-II Suites, MemGold I-II Suites, AmSO₄ Suite, Classics Suite, Classics II Suite, Qiagen) getestet, um neuartige Bedingungen identifizieren zu können. Aufgrund der zuvor diskutierten Ergebnisse wurde ausschließlich das dephosphorylierte Protein sowie kein DTT im finalen Kristallisationspuffer verwendet. Nach etwa drei Tagen konnte bei der Verwendung von 10 mg/mL Protein bei 4 °C in mehreren Bedingungen Wachstum von Nadelkristallen beobachtet werden (Abbildung 30). Dabei traten diese ausschließlich bei einer Inkubation mit einem hybriden CAAI auf. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die hybriden CAAIs im Vergleich zu anderen allosterischen und kovalent-allosterischen Inhibitoren eine hohe Aktivität auf Akt3^{Wt} haben, was vermutlich in einer guten Stabilisierung der inaktiven PH-*in*-Konformation resultiert. Weiterhin fiel auf, dass die identifizierten Bedingungen Ethanol oder Isopropanol als Präzipitant enthalten.

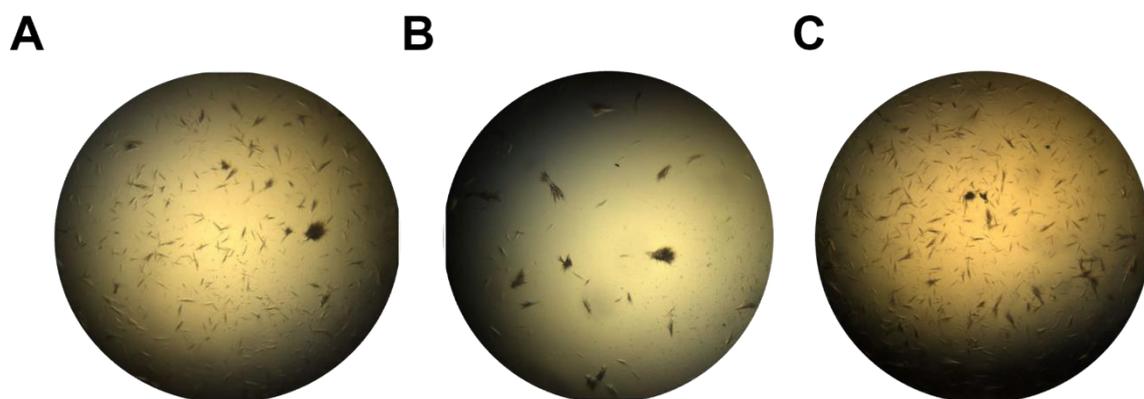


Abbildung 30: Ergebnisse aus den *Screening*-Experimenten mit Akt3^{Wt} inkubiert mit einem hybriden CAAI. **A:** Nadelkristalle mit den Bedingungen: 100 mM TRIS, pH 7, 15 % (v/v) EtOH (4 °C, 10 mg/mL). **B:** Nadelkristalle mit den Bedingungen: 100 mM Imidazol, pH 8, 200 mM MgCl₂, 15 % (v/v) EtOH (4 °C, 10 mg/mL). **C:** Nadelkristalle mit den Bedingungen: 100 mM CHES, pH 9,5, 15 % (v/v) EtOH (4 °C, 10 mg/mL).

Unter der Verwendung der Bedingungen 100 mM Imidazol pH 7,5-8,5, 200 mM MgCl₂, 10-20 % (v/v) EtOH bei 4 °C und mit 10 mg/mL Protein (Abbildung 30B und 31A) konnten die Nadelkristalle in einem *Fine Screen* reproduziert werden (Abbildung 31B) und anschließend mit *Seeding*-Experimenten zu größeren Nadeln optimiert werden (Abbildung 31C).

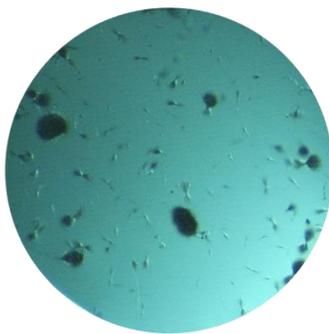
Die Nadeln wurden gefischt und am SLS vermessen, allerdings zeigten diese keine Proteindiffraktion. Um dies zu erreichen, müssten vermutlich weitere Optimierungen vorgenommen werden, die zu einer Vergrößerung der Nadeln oder zu einer generellen Optimierung der Kristallmorphologie führen. Es könnten weitere *Seeding*-Experimente oder *Additiv-Screens* durchgeführt werden. Darüber hinaus könnte es von Vorteil sein das Cys119 in der Linkerregion von Akt3 gegen eine weniger reaktive Aminosäure auszutauschen, da dieses ein Störfaktor bei der Kristallisation sein könnte.

A

		EtOH					200 mM MgCl ₂ 100 mM Imidazol
		10 %	12 %	15 %	17 %	20 %	
pH	7,5						
	8,0						
	8,5						

Temperatur: 4 °C
Proteinkonzentration: 10 mg/mL

B



C



Abbildung 31: **A:** *Fine Screen* neuartiger Kristallisationsbedingungen für Akt3^{Wt}: 100 mM Imidazol, pH 7,5-8,5, 200 mM MgCl₂, 10-20 % (v/v) EtOH. Inkubation von 10 mg/mL Protein bei 4 °C. **B:** Akt3^{Wt} + Hybrid-CAAI, 4 °C. **C:** Beobachtete Nadelkristalle bei der Verwendung einer 1:10000 Seeding-Verdünnung, Akt3^{Wt} + Hybrid-CAAI, 4 °C.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden umfassende Kristallisationsstudien an den Akt-Isoformen durchgeführt, mit dem übergeordneten Ziel eine strukturbio­logische Untersuchung der Isoformen im Komplex mit unterschiedlichen Liganden zu ermöglichen. Insgesamt konnten Kristallstrukturen mit diversen CAAs im Komplex mit Akt1^{Wt} gelöst werden. Aufgrund einer noch andauernden Optimierung und Evaluierung dieser Inhibitoren (1. Generation Hybridmoleküle, 2. Generation Hybridmoleküle und neuartige Inhibitor­klasse) wird von der Diskussion dieser Ergebnisse abgesehen.^{§§§} Die gelösten Strukturen werden zukünftig eine effiziente Optimierung der entsprechenden Inhibitoren ermöglichen. Weiterhin wurden essenzielle Kristallisationsstudien an Akt2^{Wt} und Akt3^{Wt} durchgeführt. In beiden Fällen konnten vielversprechende Ansatzpunkte gefunden werden, welche womöglich durch systematische Optimierungen zur erstmaligen Aufklärung der Wildtyp-Proteinstrukturen der beiden Isoformen beitragen werden. Zusätzlich könnten zukünftig HDX-MS-Experimente durchgeführt werden. Diese Methode erlaubt die Untersuchung konformationeller Änderungen von Proteinen, die zum Beispiel durch Protein-Ligand-Interaktionen oder posttranslationale Modifikationen verursacht werden.^{143,144} Alternativ könnten Methoden wie die Cryo-Elektronenmikroskopie in der Zukunft durch stetige Optimierungen zur Aufklärung vieler bisher nicht gelöster Proteinstrukturen führen.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Darüber hinaus gelang die Strukturaufklärung einer Ko-Kristallstruktur von Akt2-Mimikry mit einer guten Auflösung von 2.5 Å, welche in Kapitel 3.6 ausführlich analysiert wird. Zukünftig sollte nun im Fokus stehen weitere Ko-Kristallstrukturen mit verschiedenen CAAs zu generieren, um umfassende Bindungsstudien durchführen zu können. So könnte Akt2-Mimikry als effizientes Modellsystem für die Optimierung Isoform-selektiver CAAs dienen. Darüber hinaus sollten weitere Kristallisationsexperimente unter der Variation verschiedenster Parameter mit den Akt2-Linkervarianten erfolgen, welche bisher nur in initialen *Screening*-Experimenten getestet wurden. Des Weiteren könnte zum Beispiel die zusätzliche Stabilisierung der flexiblen Linkerregion mit einem interagierenden Protein zum gewünschten Erfolg führen. Dieser Ansatz war bereits für die publizierte Akt1^{Wt}-Apostruktur (PDB: 7APJ) erfolgreich.¹⁶

^{§§§} Design und Synthese der Hybridmoleküle und der neuartigen Inhibitor­klasse durch M. Sc. Sven Brandherm (AG Rauh, TU Dortmund).

3.5 Biochemische Charakterisierung Isoform-selektiver CAAls

Um Einblicke in die Potenzen und Selektivitäten der fokussierten Substanzbibliothek zu gewinnen und eine nachfolgende Korrelation dieser mit zellulärer Aktivität zu ermöglichen, wurde die inhibitorische Wirkung (IC_{50}) auf die drei Akt-Isoformen in einem biochemischen, aktivitätsbasierten Assay unter Verwendung kommerziell erhältlicher Akt-Isoform-Konstrukte untersucht (Tabelle 2).^{112,148} Im Allgemeinen wurde das unmodifizierte Pyridingrundgerüst (RL2661) toleriert und zeigte eine gute Affinität für Akt1 und einen 10- bzw. 100-fachen Aktivitätsverlust für Akt2 und Akt3. Insgesamt wurde die Einführung größerer Einheiten von Akt1 weniger gut toleriert. Im Gegensatz dazu erhöhten kleinere Gruppen wie die freie Carbonsäure (RL3274) oder der entsprechende Ester (RL3067) sowie eine Methylgruppe (RL3047) am Pyridin-Kern die Potenz für Akt1. Reste, die protoniert werden können und unter physiologischen Bedingungen eine positive Ladung besitzen, wie z. B. das Pyrrolidin (RL2905), wurden nicht toleriert. Die Verknüpfung einiger Reste über eine Amidbindung schien im direkten Vergleich zur methylenverbrückten Version vorteilhaft zu sein (RL2930 vs. RL3085, RL3271 vs. RL3312, RL3272 vs. RL3279), während das einfache Methylamid (RL3084) im Vergleich zum Ester eine 4-fache Aktivität verlor. Im Falle der Akt2 Interdomänen-Bindungsstelle wurden größere Reste stärker bevorzugt als kleinere Reste. Basische sekundäre Amine wurden mit mäßiger Aktivität toleriert, während die Amid-verknüpfte Version dieser Liganden einen 5-fachen Rückgang der Affinität zeigte (RL2905 vs. RL3170). Kleine aromatische Ringsysteme wie Methylpyrazol (RL3081/RL3096) und Imidazol (RL2928) zeigten gute Aktivitäten. Der Stickstoff in diesen aromatischen Ringen war im Vergleich zum sauerstoffhaltigen System besonders begünstigt (RL3341 vs. RL3200). Ein ähnlicher Effekt wurde bei den sechsgliedrigen, elektronenreichen Systemen beobachtet, insbesondere das 3-Pyridin (RL3272) und das Aminopyridin (RL3094) zeigten eine gute Affinität zur Akt2-Bindungstasche. Darüber hinaus war die einfache Anilin-Gruppe (RL3271) wirksamer als das Phenol (RL3082), während Modifikationen an der 4-Position dieser Ringe weniger gut vertragen wurden (RL3225).

Tabelle 2: IC₅₀-Werte bestimmt mit dem HTRF-Assay (n = 3, Fehler als (±) Standardabweichung).¹⁴⁸

#	R	IC ₅₀ [nM]		
		Akt1	Akt2	Akt3
RL2661		53 ± 13	599 ± 63	6627 ± 1128
RL3047		22 ± 2	150 ± 5	7509 ± 1821
RL2884		186 ± 79	961 ± 174	> 20000
RL3274		44 ± 18	248 ± 49	6446 ± 742
RL3067		35 ± 4	116 ± 2	3396 ± 406
RL3084		112 ± 21	108 ± 31	5752 ± 1547
RL2905		7087 ± 3437	479 ± 91	> 20000
RL3170		4566 ± 197	2068 ± 147	> 20000
RL2930		5930 ± 793	4214 ± 412	8374 ± 1784
RL3085		1716 ± 166	94 ± 4	1564 ± 75
RL2928		643 ± 95	76 ± 11	1890 ± 621
RL3081		1281 ± 18	251 ± 18	607 ± 95
RL3096		98 ± 15	53 ± 5	3543 ± 617
RL3341		527 ± 14	23 ± 4	356 ± 88
RL3200		604 ± 31	1400 ± 112	4356 ± 1077
RL3082		9484 ± 665	682 ± 83	5339 ± 2006
RL3271		2853 ± 758	133 ± 9	2108 ± 441
RL3312		91 ± 13	39 ± 6	5266 ± 1030
RL3225		1797 ± 105	511 ± 62	1509 ± 389
RL3094		1631 ± 148	175 ± 2	187 ± 40
RL3272		2111 ± 268	99 ± 6	272 ± 84
RL3279		209 ± 40	55 ± 5	3049 ± 646
RL3310		130 ± 11	151 ± 25	6303 ± 1923

Für die Isoform Akt3 war das dargestellte Set von CAAs insgesamt weniger aktiv, und nur einige Verbindungen zeigten mäßige Potenz. Kleinere Substituenten wurden nicht bevorzugt und es waren größere Einheiten erforderlich, um das Protein zu inaktivieren. Das Aminopyridin (RL3094) und Pyridin (RL3272) sowie das Methylpyrazol (RL3081) zeigten eine gute submikromolare Aktivität. Die Bedeutung des Stickstoffs innerhalb des aromatischen Ringsystems wurde wiederum durch das Anilin (RL3225) unterstrichen, welches einen 10-fachen Wirkungsverlust aufwies. Somit konnten die Homologiemodell-abgeleiteten Trends des SBLD (Vgl. Kapitel 3.1 und 3.2) durch die erhaltene Substanzbibliothek validiert werden. Sowohl die Größe der entsprechenden Tasche als auch die Bedeutung der unterschiedlichen Oberflächenpolarisation im Zielgebiet der einzelnen Bindungstaschen stimmen also mit den hier vorgestellten Ergebnissen überein. Insbesondere Akt2 toleriert positiv geladene Reste in Pyrrolidin (RL2905) und Pyrrol (RL3341). Interessanterweise scheint Akt2 beide Bindungen, Amid oder Methylen, zu tolerieren, während Akt1 die Amid-verknüpfte Version und Akt3 die methylgebundene bevorzugt, z. B. die Pyridine RL3272 und RL3279. In Übereinstimmung mit den oben erwähnten beobachteten Veränderungen am Ende der α E-Helix zeigt Akt2 einen hybridähnlichen Charakter zwischen Akt1 und Akt3 in Bezug auf die SAR dieser Inhibitorserie.****

Nachfolgend wurde mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen die kovalente Bindung der CAAs RL2661 an Akt1^{Wt}, RL3341 an Akt2^{Wt} und RL3094 an Akt3^{Wt} und somit laut biochemischen Analysen an die jeweils präferierte Akt-Isoformen nachgewiesen (Anhang, Abbildung 65).¹⁴⁸ Die drei Akt-Isoformen wurden mit einem dreifachen Überschuss des entsprechenden Inhibitors bei 4 °C inkubiert und es konnte eine vollständige mono-Alkylierung nach 2 h beobachtet werden. Um dies weiter zu untersuchen, wurden LC-MS/MS-Studien durchgeführt, welche die Identifizierung der exakten Alkylierungsposition ermöglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass Akt1^{Wt} und Akt2^{Wt} durch die entsprechenden Inhibitoren an beiden postulierten Cysteinen modifiziert werden, während Akt3 nur an Cys293 modifiziert wird (Abbildung 32).

**** Durchführung der biochemischen Evaluierung der Isoform-selektiven CAAs durch Dr.in Lena Quambusch (AG Rauh, TU Dortmund).

Dies könnte auf die geringe Menge an Peptiden in der Akt3-Probe zurückgeführt werden. Demnach müsste das Experiment nochmal wiederholt werden, um diese Beobachtung zu bestätigen oder zu revidieren.

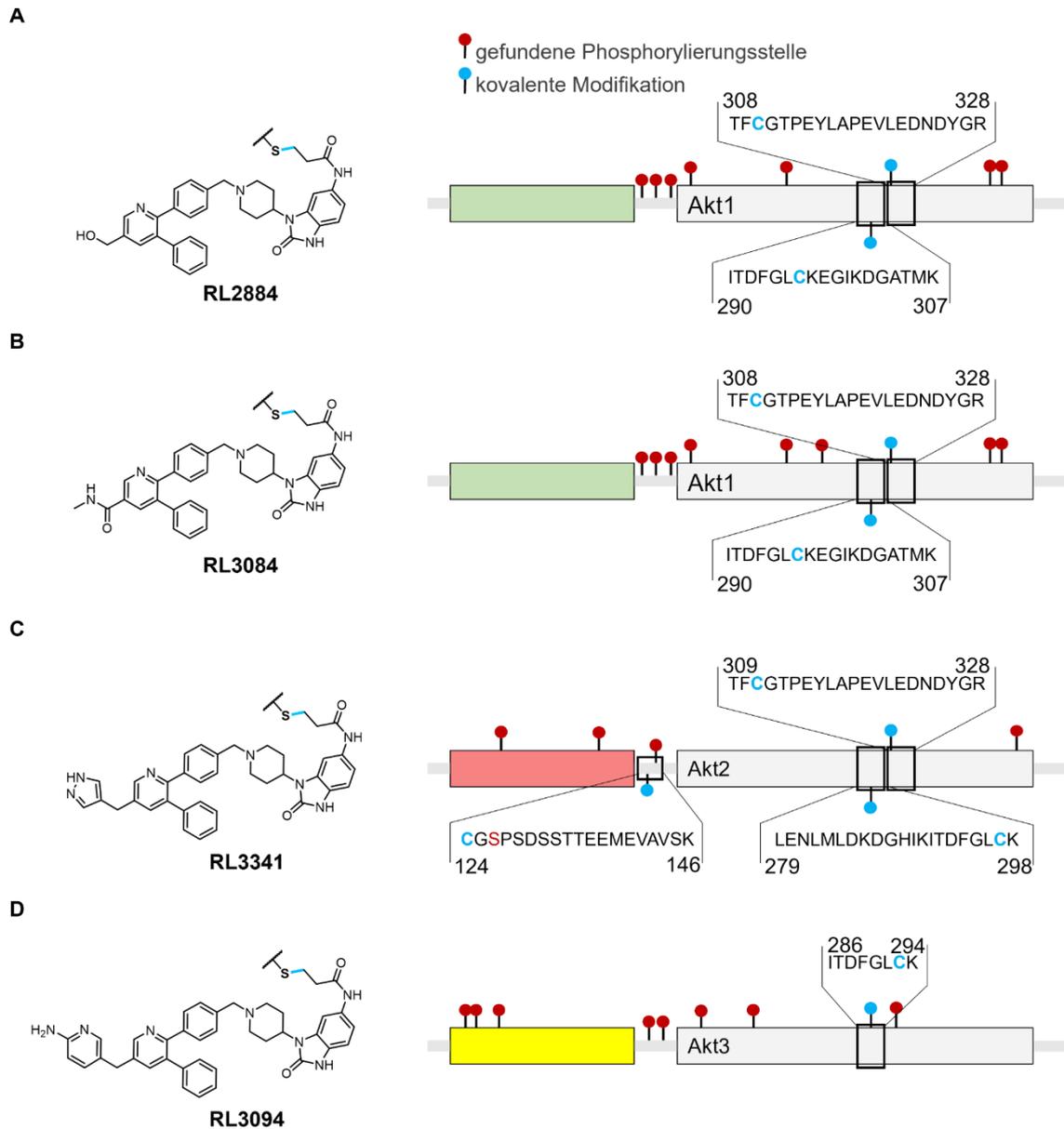


Abbildung 32: A-D: Schematische Darstellung der LC-MS/MS-Analyse der Akt-Isoformen mit unterschiedlichen CAAs. Darstellung der gefundenen Phosphorylierungspositionen (rot) und der identifizierten kovalenten Modifikationen (blau).

Darüber hinaus wird erneut das Cys124 in Akt2^{Wt} in der Linkerregion modifiziert. Wie bereits in Kapitel 3.3.3 diskutiert, zeigt dieses Cystein eine erhöhte Reaktivität in Gegenwart von reduzierenden Detergenzien, welche im Rahmen der massenspektrometrischen Analyse verwendet wurden. Demnach könnte es sich hierbei um eine unspezifische Bindung handeln, welche zusätzlich durch die Verwendung des hohen Überschusses an Inhibitor begünstigt wird.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit Hilfe des biochemischen Aktivitätsbasierten HTRF-Assays die Homologiemodell-abgeleiteten Trends und die durch frühere Studien postulierten Präferenzen der Akt-Isoformen hinsichtlich einer 5'-Substitution am Pyridin-Grundgerüst bestätigt werden konnten. Die Herleitung einer validen SAR ist jedoch maßgeblich abhängig vom komplexen Zusammenspiel biochemischer Daten und experimentell bestimmter Strukturinformationen, sodass eine Erklärung dieser Trends ausschließlich mit Hilfe von Ko-Kristallstrukturen von Zielprotein und Inhibitor möglich ist.

3.6 Strukturbiologische Analyse Isoform-selektiver CAAs

Mit der erfolgreichen Strukturaufklärung von Akt2-Mimikry wurde eine attraktive Alternative zur strukturbiologischen Evaluierung Isoform-selektiver CAAs entwickelt, welche bisher nur mit computerbasierten Methoden garantiert werden konnte. Die Aussagekraft von computerbasiert vorhergesagten Proteinstrukturen ist jedoch meist nicht ausreichend für die Entwicklung von bioaktiven Molekülen, da in diesem Falle die genaue Ausrichtung einzelner Aminosäureseitenketten von großer Wichtigkeit sein kann. Darüber hinaus findet die Vorhersage der Proteinstrukturen unter Ausschluss von Lösemittelmolekülen statt, sodass potenziell wichtige Interaktionen, wie zum Beispiel Wasser-vermittelte Wasserstoffbrückenbindungen, nicht dargestellt und analysiert werden können.^{107,109} Diese gelöste Kristallstruktur ermöglicht einen einzigartigen Einblick in die adaptierte Akt2-Bindetasche und wird nachfolgend mit dem Fokus auf Unterschiede zu Akt1^{Wt} ausführlich diskutiert.

Die genaue Betrachtung der gelösten Struktur zeigt, wie erwartet, die Stabilisierung von Akt2-Mimikry in einer inaktiven Inhibitor-vermittelten PH-*in*-Konformation im Komplex mit dem allosterischen Inhibitor Miransertib. Weiterhin wurde in allen zuvor gelösten Strukturen im Arbeitskreis Rauh, sofern diese aufgelöst war, durch die Bildung der PH-*in*-Konformation eine Rotation der regulatorischen α C-Helix aus der Bindetasche induziert, welche durch die hohe Flexibilität nicht aufgelöst ist. Miransertib zeigt eine gute biochemische Aktivität sowohl auf Akt1^{Wt} als auch auf Akt2^{Wt} und bindet zwischen der PH-Domäne und der Kinasedomäne in der allosterischen Interdomänentasche (Abbildung 33A). Weiterhin bildet der Ligand die literaturbekannten Interaktionen (PDB: 5KCV)⁸⁹ sowohl über π - π -Wechselwirkungen mit Trp80 als auch mit dem Proteinrückgrat von Tyr272 und Thr211 aus. Zusätzlich konnte auch die Wasserstoffbrückenbindung mit Asp274 beobachtet werden.

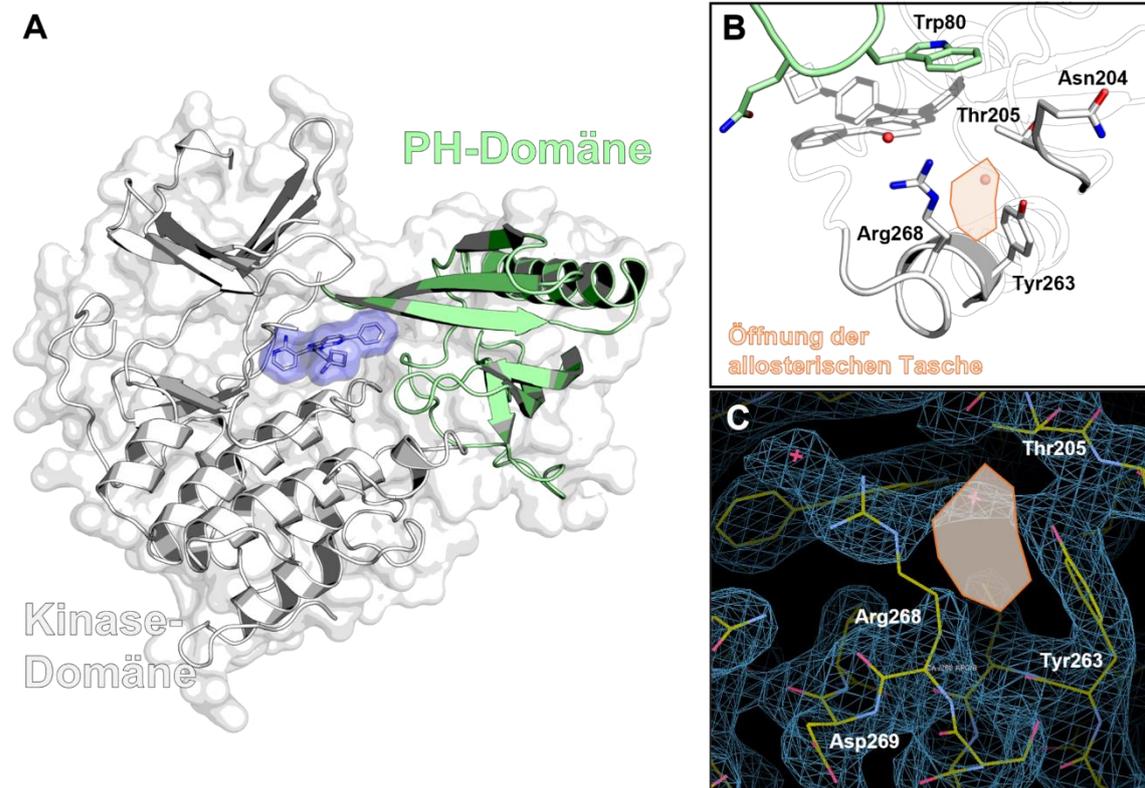


Abbildung 33: Kristallstruktur von Akt2-Mimikry im Komplex mit dem allosterischen Inhibitor Miransertib. **A:** Überblick über die gesamte Struktur von Akt2-Mimikry mit Darstellung der Proteinoberfläche und des gebundenen Inhibitors. **B:** Darstellung der allosterischen Bindetasche mit einer Drehung um 180° zur Visualisierung der mutierten AS (S205T; D262E; E267del; K268R; N269D). Die Öffnung der allosterischen Tasche zur Lösemittel-exponierten Seite ist in orange gekennzeichnet. **C:** Darstellung der Elektronendichte des relevanten Bereichs. Arg268 ist nicht zur Gänze aufgelöst, was auf eine hohe Flexibilität hindeutet. Die $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte ist auf $\sigma = 1,0$ konturiert.

Mit dem Blick auf die berechnete Elektronendichte lässt sich erkennen, dass es sich bei dem veränderten Bereich um einen sehr flexiblen Bereich handelt, da die AS nicht zur Gänze aufgelöst sind (Abbildung 33C). Hier lässt sich der erste Unterschied zu Akt1^{Wt} feststellen. Während Lys268 unabhängig von der Auflösung in nahezu allen im Arbeitskreis Rauh gelösten Strukturen eine vollständig definierte Elektronendichte zeigt, lässt sich dies für Arg268 nicht beobachten. Zusätzlich lassen sich hinsichtlich der Positionierung von Arg268 in diesem Bereich ebenfalls Unterschiede in den verschiedenen Ketten des Proteins in der Einheitszelle feststellen.

Die hier zu Tage tretende Flexibilität dieses Bereiches könnte auf eine höhere Anpassungsfähigkeit der allosterischen Bindetasche hindeuten, welche größere Substituenten in diesem Bereich erlauben würde. Es lässt sich erkennen, dass Ser205Thr, Asp262Glu und Asn269Asp keinen Einfluss auf die entsprechenden Proteinkonformationen haben. Im Gegensatz dazu führt die Deletion von Glu267 zu einer Verkürzung der dort lokalisierten α -Helix, was in einer Senkung des Rückgrats resultiert und so zu einer Öffnung der allosterischen Bindetasche zur Lösemittel-exponierten Seite führt (Abbildung 33B; Abbildung 34A und B). Dies wurde innerhalb der Homologiemodell-Analyse vor allem für Akt3 beobachtet und könnte eine Erklärung für die ähnlichen Inhibitorpräferenzen der beiden Isoformen sein.

Ein Vergleich mit der Kristallstruktur der Kinasedomäne von Akt2^{Wt} (PDB: 1MRV)¹³⁶ zeigt, dass die Aminosäuredeletion von Glu267 die Beschaffenheit der Helix in Akt2^{Wt} an dieser Position sehr gut imitiert, was unter anderem durch die ähnlichen Positionierungen der AS Asp269 und Glu262 deutlich wird. Interessant sind die Unterschiede, die für das Arg268 beobachtet werden können. Während Arg268 in der Struktur 1MRV mit dem Thr205 und Tyr263 wechselwirkt, ist dieses in der gelösten Struktur in die entgegengesetzte Richtung orientiert (Abbildung 34C). Diese Unterschiede könnten aus der Verdrängung der α C-Helix aus der Interdomänenbindetasche durch die Formation der Inhibitor-vermittelten nicht-nativen PH-*in*-Konformation resultieren. Die bereits erwähnte erhöhte Flexibilität in diesem Bereich könnte schließlich die Öffnung der allosterischen Bindetasche induzieren. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der Strukturaufklärung von Vollängerkristallstrukturen im Komplex mit den entsprechenden Inhibitor-Klassen für die Entwicklung und Optimierung von bioaktiven Molekülen. Besonders da die beobachtete PH-*in*-Konformation laut neuesten Studien nicht der nativen inaktiven PH-*in*-Konformation (PDB: 7APJ)¹⁶ entspricht, ist ein Vergleich mit einzelnen Domänen wie der Struktur 1MRV besonders für die Ausrichtung spezifischer AS nur bedingt möglich. Diese können jedoch im Rahmen des SBLD eine entscheidende Rolle spielen. Darüber hinaus sind computerbasierte Proteinstrukturen wie Homologiemodelle oder die kürzlich veröffentlichten *AlphaFold*-Modelle ebenfalls nur bedingt aussagekräftig.

Während diese für das Kristallisationskonstruktdesign einen wertvollen Beitrag leisten können, hat besonders die fehlende Berücksichtigung von Lösemitteln häufig einen entscheidenden Einfluss auf die berechnete Position von einzelnen Aminosäureresten (Abbildung 34D). Weiterhin kann die Flexibilität einzelner Bereiche in Homologiemodellen nicht abgebildet werden und die Ausrichtung dieser orientiert sich zumeist an der entsprechenden Orientierung in der verwendeten Templat-Struktur.^{109,110}

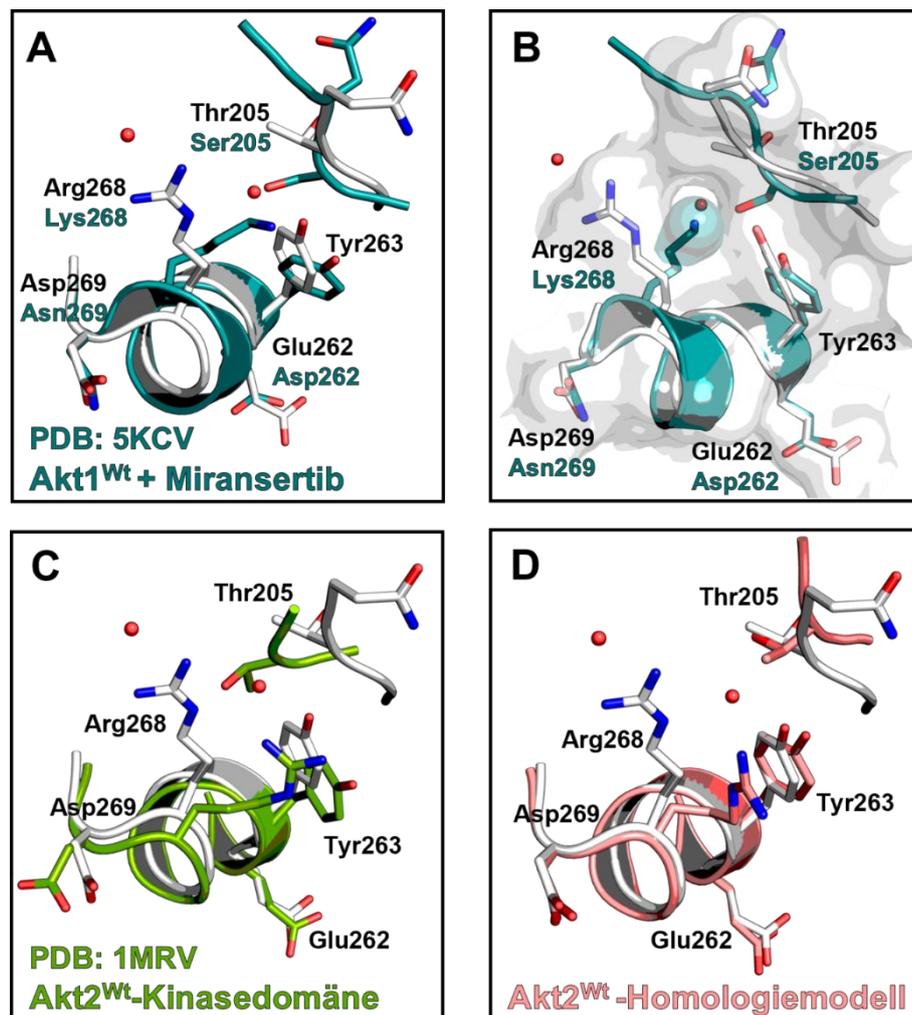


Abbildung 34: A und B: Vergleich von Akt2-Mimikry (weiß) mit einer publizierten Ko-Kristallstruktur von Akt1^{Wt} im Komplex mit Miransertib (dunkelgrün). B: Darstellung der Proteinoberfläche zur Visualisierung der Lösemittel-exponierten Öffnung der Interdomänenbindetasche. C: Vergleich von Akt2-Mimikry (grau) mit einer publizierten Kristallstruktur der Kinasedomäne von Akt2^{Wt} (grün). D: Vergleich von Akt2-Mimikry mit dem Homologiemodell von Akt2^{Wt} basierend auf einer Ko-Kristallstruktur von Akt1^{Wt} mit einem CAAI (rosa).

Zukünftig ist es nun wichtig die erhaltenen Kristalle und die Kristallstrukturen zu reproduzieren, bestenfalls im Komplex mit Isoform-selektiven CAAs, um die hier beobachteten Charakteristika zu bestätigen. Bei einer Kristallstruktur handelt es sich immer nur um eine Momentaufnahme des Zielproteins, deshalb sind die erhaltenen Ergebnisse besonders durch die vermutlich hohe Flexibilität des entsprechenden Bereiches mit entsprechender Vorsicht zu betrachten.

Nichtsdestotrotz wurde ein Vergleich der gelösten Kristallstruktur mit zwei Kristallstrukturen von Akt1^{WT} im Komplex mit den Inhibitoren RL2884 (PDB: 7NH4) und RL3084 (PDB: 7NH5) aus der in dieser Arbeit charakterisierten Substanzbibliothek vorgenommen (Abbildung 35).

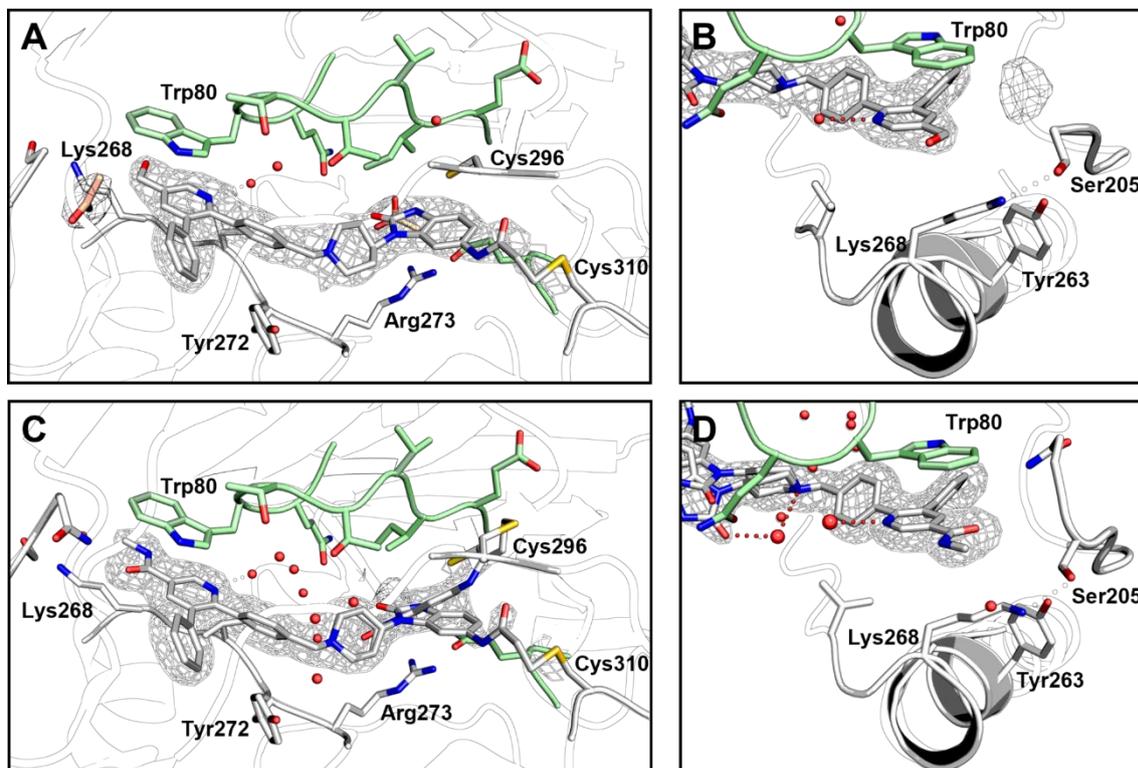


Abbildung 35: Kristallstrukturen von Akt1^{WT} mit Liganden aus der charakterisierten Substanzbibliothek. **A:** Kristallstruktur mit RL2884 (PDB: 7NH4, 2.3 Å). **C:** Kristallstruktur mit RL3084 (PDB: 7NH5, 1.9 Å). Die 2Fo-Fc-Elektronendichte ist auf $\sigma = 0.8$ konturiert. Die Abbildungen **B** und **D** zeigen eine 180°-Drehung der Kristallstrukturen zur Visualisierung der 5'-Substituenten in der allosterischen Bindetasche. Die 2Fo-Fc-Elektronendichtekarten in **A**, **B**, **C** und **D** sind auf $\sigma = 0,8$ konturiert.

Der Blick in die allosterische Tasche zeigt wie erwartet die Besetzung dieser sowie die kovalente Bindung der Inhibitoren entweder an Cys310 (RL2884) oder an Cys296 und Cys310 (RL3084). Außerdem können für CAAs charakteristische Interaktionen identifiziert werden, wie die Kation- π -Wechselwirkung von Arg273 zum Benzimidazol-Linker und die Wasserstoffbrückenbindung zum Proteinerückgrat von Lys297. Diese Interaktionen ermöglichen eine vorteilhafte Positionierung des Michael-Akzeptors zu den Cysteinen. Darüber hinaus werden die bekannten π - π -Wechselwirkungen zu Tyr272 und Trp80 mit den Phenylringen am Pyridin sowie dem Pyridin ausgebildet. Der Phenylring an 3'-Position des Pyridin-Grundgerüsts bindet in eine hydrophobe Tasche und stabilisiert die π - π -Wechselwirkungen der Aryl-Systeme. Zusätzlich wechselwirkt das tertiäre Amin über elektrostatische Wechselwirkung mit dem Glu274 der katalytischen Schleife. Diese Salzbrücke konnte bereits für den Inhibitor Arq092 nachgewiesen werden und ist eine häufig beschriebene Interaktion dieser Ligandenklasse. Zudem interagiert der Stickstoff des aromatischen Pyridin-Ringsystems über eine Wasser-vermittelte Wasserstoffbrückenbindung mit den polaren Seitenketten Asn54 und Gln79 (Abbildung 35A und C).¹⁴⁸

Ein Blick in den hinteren Bereich der allosterischen Tasche zeigt, dass die 5'-Substituenten der Liganden in Richtung der Lösemittel-exponierten Öffnung der Bindetasche orientiert sind (Abbildung 35B und D). Während RL2884 eine Präferenz für Akt1 zeigt (IC_{50} [Akt1] = 200 nM, IC_{50} [Akt2] = 900 nM) ist RL3084 equipotent auf den Isoformen Akt1 und Akt2 (IC_{50} [Akt1] = 100 nM, IC_{50} [Akt2] = 100 nM). Hier wären mögliche Wechselwirkungen des Substituenten von RL3084 mit Thr205 oder Asn204 denkbar, die zu einem Potenzgewinn auf Akt2 führen. In Kapitel 3.5 konnte gezeigt werden, dass Akt2 kleine aromatische positiv polarisierte Reste wie in Pyrrolidin (RL2905) und Pyrrol (RL3341) bevorzugt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass diese Liganden in die geöffnete Tasche hineinragen und dort günstige elektrostatische Wechselwirkungen mit Arg268 und Tyr263 ausbilden. Diese Beobachtungen könnten mit den erwähnten beobachteten Veränderungen am Ende der α E-Helix eine Erklärung für den hybridähnlichen Charakter von Akt2 zwischen Akt1 und Akt3 in Bezug auf die SAR der Substanzbibliothek sein.

Zusammenfassend konnte mit der Strukturaufklärung von Akt2-Mimikry ein einzigartiger Einblick in die adaptierte allosterische Interdomänentasche von Akt2 gewährleistet werden. Dies ermöglichte die Validierung Homologiemodell-abgeleiteter Hypothesen und es konnten mögliche Erklärungen, für die in Kapitel 3.5 diskutierten, biochemischen Präferenzen der einzelnen Inhibitoren gegenüber Akt2 gefunden werden. Das entwickelte Modell kann zukünftig eine bisher nicht schließbare Lücke im Kreislauf des SBLD füllen und stellt ein wichtiges Puzzleteil für das Gesamtkonzept der Etablierung strukturbiologischer und zellulärer Systeme für die Evaluierung Isoform-selektiver CAAs innerhalb dieser Arbeit dar.

3.7 Zelluläre Evaluierung Isoform-selektiver CAAs

Die mit Hilfe von biochemischen Experimenten ermittelten vielversprechenden Selektivitätsprofile der CAAs sollten im nächsten Schritt in zellulären Modellsystemen evaluiert werden. Die Übertragung von Selektivitätsprofilen in komplexe zelluläre Systeme ist eine große Herausforderung. Die gewebespezifische Expression und unterschiedliche Lokalisationen der Isoformen in zellulären Kompartimenten erschweren die Entwicklung, Bewertung und den direkten Vergleich Isoform-selektiver-Inhibitoren. Derzeit fehlen effiziente Modellsysteme zur Bewertung der Akt-Isoform-Selektivität auf zellulärer Ebene. Eine erste Evaluierung erfolgte mit etablierten PI3K/Akt-abhängigen humanen Zelllinien wie zum Beispiel ZR-75-1 und AN3-CA. Aufgrund von unterschiedlichen oder fehlenden Sensitivitäten dieser Zelllinien gegenüber einer Inhibition der drei Isoformen konnten allerdings keine aussagekräftigen Ergebnisse erhalten werden. Aus diesem Grunde sollte das Ba/F3-Zellsystem entsprechend modifiziert und zur Evaluierung einer selektiven Inhibition der Akt-Isoformen auf die Zellviabilität genutzt werden.^{†††}

3.7.1 Etablierung eines Ba/F3-Modellsystems

Ba/F3-Zellen sind murine, Interleukin-3 abhängige, pro B-Zellen, die aufgrund ihrer charakteristischen Eigenschaften zu einem prominenten Werkzeug in der modernen Kinase-Wirkstoffforschung geworden sind.^{149,150} Ba/F3-Zellen weisen eine hohe Proliferationsrate auf und entsprechende Transgene können sehr effizient mit Hilfe von Transfektion oder retroviraler Infektion eingebracht werden. Weiterhin beschrieben Daley und Baltimore 1988 erstmals, dass eine retroviral-induzierte Expression der Tyrosinkinase Bcr-Abl ein IL-3 unabhängiges Wachstum der Ba/F3-Zellen ermöglicht.¹⁵¹

^{†††} Teile dieses Kapitels sind im Rahmen der Masterarbeit von M. Sc. Melissa Lubeck (AG Rauh, TU Dortmund) entstanden. Die entsprechenden Abschnitte sind gekennzeichnet.

Durch die retrovirale Transfektion eines dominanten Onkogens, kann die Abhängigkeit der Ba/F3-Zellen von der IL-3-induzierten Signalweiterleitung auf das konstitutive Proliferationssignal der Treibermutation übertragen werden. Diese Abhängigkeit ermöglicht die Evaluierung potenzieller Kinaseinhibitoren hinsichtlich ihrer Aktivität gegenüber dem entsprechenden Transgen.¹⁵⁰ Zur Einbringung der genetischen Information muss zunächst eine Ko-Transfektion eines Transfervektors sowie eines Verpackungsplasmids in HEK293T-Zellen erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dafür der pBabe-Transfervektor sowie der pCL-Eco-Vektor als Verpackungsplasmid verwendet werden. Der pBabe-Vektor enthält dabei die Information für das Zielgen, verschiedene regulatorische Elemente für die Expression in der Zelle sowie eine Puromycin-Resistenz, die eine Selektion der erfolgreich infizierten Ba/F3-Zellen ermöglicht.¹⁵² Das Verpackungsplasmid enthält die viralen Genabschnitte *gag*, *env* und *pol*. Diese codieren für die essenziellen viralen Strukturproteine der Matrix und des Kapsids (*gag*), für die viralen Hüllproteine (*env*) sowie für die Proteasen, die reverse Transkriptase und die Integrase (*pol*), welche für die Integration in das Wirtsgenom notwendig sind.^{153,154} Die Herstellung der retroviralen Partikel erfolgte in den leicht zu transfizierenden HEK293T-Zellen, welche durch die zusätzliche Expression des SV40 *large* T-Antigens, Plasmide mit dem SV40-Promotor replizieren.¹⁵⁵ Der SV40-Promoter ist sowohl auf den verwendeten pBabe-Plasmiden als auch auf dem Verpackungsplasmid pCL-Eco lokalisiert.¹⁵⁴ Die durch die Ko-Transfektion entstehenden retroviralen Vektoren basieren auf dem Genom des murinen Leukämie-Virus und ermöglichen durch eine Infektion der Ba/F3-Zellen eine stabile Integration des Transgens in das Genom der gewünschten Zelllinie.¹⁵⁶ Dabei wird die virale RNA zunächst durch die reverse Transkriptase in DNA transkribiert. Eine Integration des Gens an eine zufällige Stelle in das Ba/F3-Genom während der Zellteilung, ermöglicht eine stabile Expression.¹⁵⁷ Im nächsten Schritt erfolgt nun ein sukzessiver Entzug von IL-3. Durch die Ausbildung einer Abhängigkeit erfolgt die Signalweiterleitung nun über das integrierte Protein. Dies ermöglicht die Generierung eines artifiziellen Zellmodells, welches das Verhalten einer onkogenen Zelllinie mimikriert und so als optimales System für die Entwicklung und Charakterisierung von Inhibitoren in Bezug auf die entsprechende Zielkinase fungiert (Abbildung 36A).¹⁵⁰

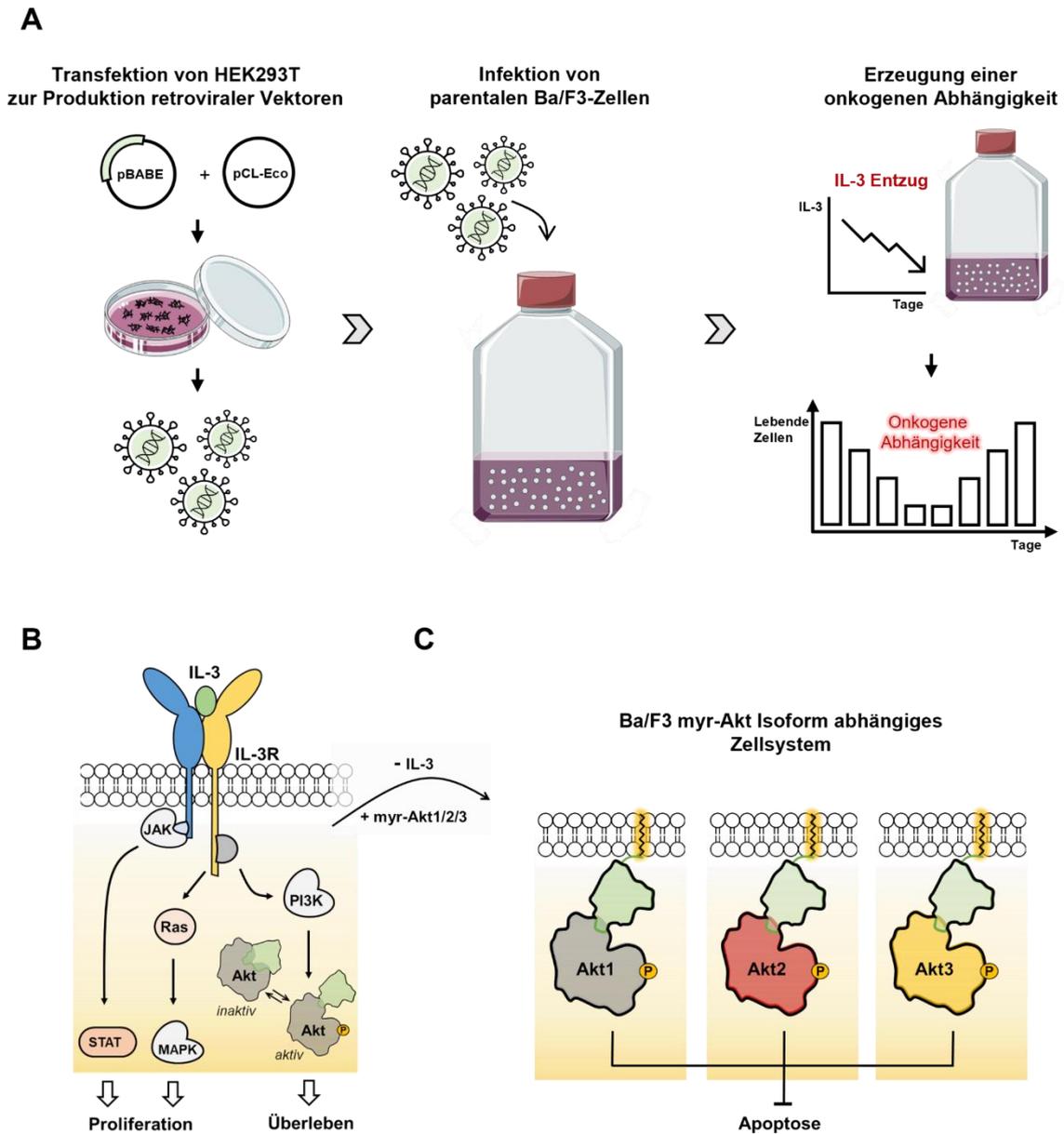


Abbildung 36: Etablierung eines myr-Akt-Isoform abhängigen Ba/F3-Zellsystems.

A: Schematische Darstellung der retroviralen Transduktion von murinen Ba/F3-Zellen zur Generierung einer onkogenen Abhängigkeit. Durch Ko-Transfektion von HEK293T-Zellen mit einem Transfer- (pBabe) und Verpackungsplasmid (pCL-Eco) werden retrovirale Vektoren generiert, welche das Transgen durch Infektion von Ba/F3-Zellen in das Wirtsgenom integrieren. Durch den Entzug von IL-3 wird eine onkogene Abhängigkeit der Ba/F3-Zellen vom Transgen erzeugt. **B:** Darstellung des IL-3-Signalwegs in der murinen Ba/F3-Zelle nach Bindung von IL-3. **C:** Allgemeiner Überblick über die Zelllinien Ba/F3^{myr-Akt1} (grau), Ba/F3^{myr-Akt2} (rot) und Ba/F3^{myr-Akt3} (gelb).

Um konstitutiv aktive Formen der Akt-Isoformen (Akt1/Akt2/Akt3) in murine Ba/F3-Zellen einzuführen, sollten retrovirale Konstrukte verwendet werden, die jeweils eine myristoylierte Akt-Isoform tragen. Diese Lipidierung von Akt bewirkt eine bevorzugte Assoziation mit exogenen und endogenen Membranen, was zu einer konstitutiven Phosphorylierung und einem erhöhten Anteil aktivierter Kinase in der Zelle führt (Abbildung 37B). Darüber hinaus wiesen vorangegangene Studien auf eine wichtige Funktion des Akt-Signalwegs beim IL-3-vermittelten Überleben hin, indem dieser die intrinsische, apoptotische Maschinerie von Ba/F3-Zellen hemmt (Abbildung 36C).¹⁵⁸⁻¹⁶⁰

Für die Produktion der retrovirealen Vektoren in HEK293T-Zellen und anschließender Infektion der murinen Ba/F3-Zellen wurden kommerziell erhältliche pBABE-Vektoren verwendet, welche bereits die genetischen Informationen für myr-Akt2^{Wt} (pBABE-myr-HA-Akt2^{Wt}, Addgene) und myr-Akt3^{Wt} (pBABE-myr-HA-Akt3^{Wt}, Addgene) enthielten.^{###} Weiterhin wurde das Akt1^{Wt}-Gen aus einem kommerziell erhältlichen pBABE-Vektor (pBABE-HA-Akt1^{Wt}, Addgene) mit Hilfe des Restriktions-/Ligationsprotokolls in den entsprechenden pBABE-myr-HA-Vektor kloniert.^{####} Die konstitutiv inaktiven Konstrukte pBABE-myr-Akt1^{T308A/S473A}, pBabe-myr-Akt2^{T309A/S474A} und pBabe-myr-Akt3^{T305A/S472A} sollten als Negativkontrollen dienen, bei denen die für die Aktivierung essenziellen Phosphorylierungsstellen mit Hilfe einer ortsgerichteten Mutagenese zur AS Alanin mutiert wurden.¹⁶¹

Die Optimierung aller Schritte der Ba/F3-Zellinfektion wurde an verschiedenen Zelllinien getestet und wird im Folgenden beispielhaft an der Generierung der Zelllinie Ba/F3^{myr-Akt2} beschrieben.¹⁶¹ Zur Bestimmung der optimalen Zellzahl für die Virusproduktion wurde ein *Screen* durchgeführt, bei dem unterschiedliche Zellzahlen ausgesät und nach 24 h qualitativ durch Mikroskopie hinsichtlich ihrer Konfluenz und Viabilität bewertet wurden (Abbildung 37A).

^{###} 1051 pBABEpuroL-Akt1, 1271 pBABEpuroL-Myr-HA-Akt2, und 1272 pBABEpuroL-Myr-HA-Akt3 wurden über Addgene von William Sellers zur Verfügung gestellt (Addgene Plasmid #9011/ 9018/ 9019; <http://n2t.net/addgene:90011/9018/9019>; RRID: Addgene_9011/9018/9019).

^{####} Klonierung von pBABE myr-HA-Akt1^{Wt} durch Dr.in Ina Landel (AG Rauh, TU Dortmund).

Hier zeigte sich eine Zellzahl von $5,0 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$ mit einer Konfluenz von 40 - 70 % als optimal, um genügend Zellen für die Virusproduktion bereitzustellen und gleichzeitig ein frühzeitiges Überwachsen und Absterben der Zellen zu verhindern. Für die Produktion des Virus erfolgte 24 h nach Aussaat die Transfektion der HEK293T-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden. Dabei wurde das Transfektionsreagenz TransIT-LT verwendet, um eine optimale Aufnahme der Plasmide in die Zellen zu gewährleisten. Die Verwendung des im Reagenz enthaltenen Lipopolyplexes führt zu einer Kondensation der Plasmid-DNA, welche dann von einer ungeordneten Protein-Lipidschicht umhüllt wird und so durch Rezeptor-vermittelte Endozytose in die Zellen gelangt.¹⁶² Als visuelle und qualitative Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde das Plasmid pBabe-HA-mKate verwendet, welches das rot-fluoreszierende Protein mKate codiert (Abbildung 37B). Nach einer Inkubation von 48 h nach der Transfektion zeigte sich die Expression von mKate, was ebenfalls mit der erfolgreichen Expression der für die Virusproduktion relevanten Proteine einhergeht. Damit lässt sich bestätigen, dass die Transfektion der HEK293T-Zellen erfolgreich verlief. Weiterhin zeigte sich, dass eine Inkubation von 72 h das mKate-Expressionslevel nochmal deutlich erhöhen konnte (Abbildung 37B). Um die Effizienz des Virus qualitativ bewerten zu können, wurde die Zahl der lebenden Ba/F3^{myr-Akt2} Zellen nach der Infektion mit einem Virus nach 48 h Ernte und einem Virus nach 72 h Ernte verglichen. Im Vergleich zwischen den betrachteten Ansätzen war eindeutig, dass der Virus nach 72 h im Durchschnitt einen höheren Anteil der parentalen Ba/F3-Zellen infiziert hatte. Dies korreliert ebenfalls mit den Beobachtungen der Transfektionskontrolle mit pBabe-HA-mKate, bei der die höchste Expression von mKate ebenfalls nach 72 h zu verzeichnen war. Zur genaueren Bestimmung der produzierten Virusmenge könnte die Bestimmung eines Virustiters erfolgen.

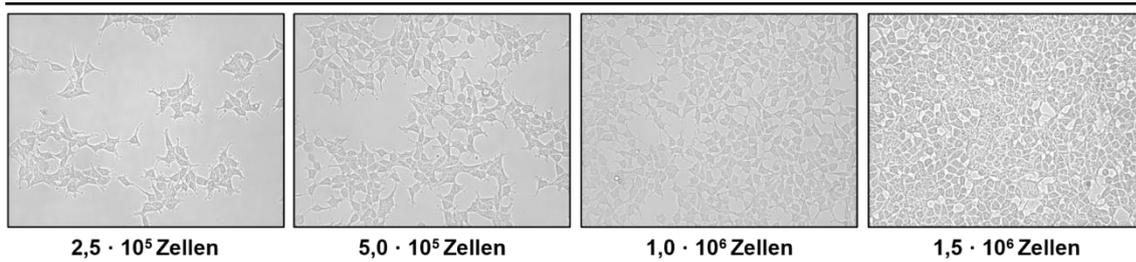
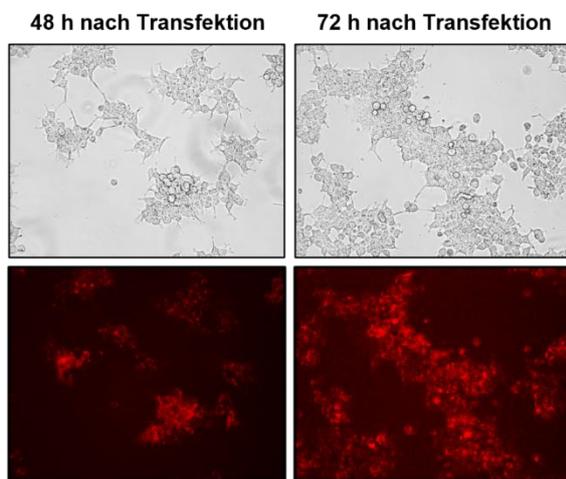
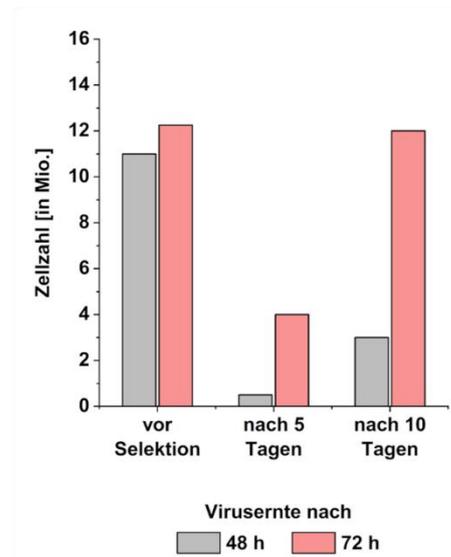
A**Screening zur Zellzahloptimierung – HEK293T****B****Transfektionskontrolle pBABE-mKate****C**

Abbildung 37: Etablierung der Herstellung viraler Partikel in HEK293T. **A:** *Screening* zur Zellzahloptimierung für die Retrovirusproduktion der HEK293T-Zellen 24 h nach der Aussaat von $2,5 \cdot 10^5$ Zellen, $5,0 \cdot 10^5$ Zellen, $1,0 \cdot 10^6$ Zellen und $1,5 \cdot 10^6$ Zellen. **B:** Kontrolle der Transfektion von HEK293T-Zellen mit dem rot fluoreszierenden Protein mKate nach 48 h und 72 h. **C:** Lebende Ba/F3-Zellen (in Mio.) infiziert mit myr-Akt2-Virus vor der Selektion, 5 Tage nach Zugabe von Puromycin und 10 Tage nach Zugabe von Puromycin. Zur Evaluierung des optimalen Zeitpunktes für die Virusernte wurden die verwendeten Viren 48 h (grau) und 72 h (rot) nach Transfektion geerntet und die Infektionseffizienz verglichen.

Der produzierte myr-Akt2- und der mKate-Virus wurden isoliert und anschließend direkt für die Infektion der parentalen Ba/F3-Zellen verwendet. Hier ließ sich zunächst beobachten, dass die infizierten Zellen eine verringerte Wachstumsrate als die parentalen aufwiesen.

Weiterhin konnte in den mit mKate transfizierten Zellen nach fünf Tagen eine rote Fluoreszenz beobachtet werden, sodass von einer erfolgreichen Infektion der Ba/F3-Zellen ausgegangen werden konnte (Abbildung 38B). Nach der Selektion der erfolgreich infizierten Zellen mit Puromycin erfolgte im nächsten Schritt die sukzessive Reduktion des Wachstumsfaktors IL-3. Um im weiteren Verlauf einen Vergleich der parentalen Zelllinie mit den infizierten Zellen zu ermöglichen, wurde die parentale Zellpopulation in zwei Teile aufgeteilt. Die eine Hälfte wurde mit Puromycin behandelt, was aufgrund der fehlenden Puromycin-Resistenz zu einem Absterben der Zellen führte. Die andere Hälfte wurde ohne Puromycin kultiviert und parallel zu den infizierten Zellen ebenfalls einem IL-3-Entzug unterzogen. Während die parentalen Zellen zunächst durch das Passagieren Schwankungen in der Zellzahl zeigten, ließ sich erst bei der Reduktion auf 0,1 ng/μL eine deutliche Reduktion der Zellzahl feststellen. Bei vollständigem IL-3-Entzug tritt schnell ein vollständiges Zellsterben auf, sodass bereits nach 2 Tagen keine lebenden Zellen mehr vorliegen (Abbildung 38A). Anhand dieser Kontrolle lässt sich wie erwartet nachweisen, dass die parentalen Ba/F3-Zellen eine Abhängigkeit vom Wachstumsfaktor aufweisen und bei vollständigem IL-3 Entzug nicht mehr überlebensfähig sind.^{163,164}

Die Ba/F3^{myr-Akt2}-Zellen wiesen ein kontinuierliches Wachstum sowie Proliferation bei IL-3-Reduktion bis zu einer Konzentration von einschließlich 1 ng/μL IL-3 auf. Nach vollständigem IL-3-Entzug konnte ein starker Verlust lebender Zellen beobachtet werden und die Proliferation setzte erst nach 8 Tagen wieder ein (Abbildung 38C).¹⁶⁵ Analoges Verhalten wurde bei der Generierung anderer Ba/F3-Akt-Zelllinien beobachtet. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass bei der IL-3-Entzugsphase durch einen geringen Selektionsdruck Zellen mit parentalen Charakteristika entstanden sein könnten, welche entweder das entsprechende Transgen nicht ausreichend oder gar nicht exprimieren oder keine Abhängigkeit von dem eingebrachten Transgen ausgebildet haben. Dies korreliert ebenfalls mit der Beobachtung, dass die parentalen Ba/F3-Zellen bis zu einer Kultivierungskonzentration von 1 ng/μL IL-3 keine Beeinträchtigung des Proliferations- und Wachstumsverhaltens zeigten.

Nach einem vollständigen IL-3-Entzug besaß diese Subpopulation vermutlich nicht die nötigen Eigenschaften, um die überlebenswichtige Signalweiterleitung aufrecht zu erhalten. Um dies zu verhindern, könnte daher eine dauerhafte Selektion der infizierten Ba/F3-Zellen mit Puromycin durchgeführt werden oder die Zeitspanne des IL-3-Entzugs könnte verkürzt werden.¹⁶⁶

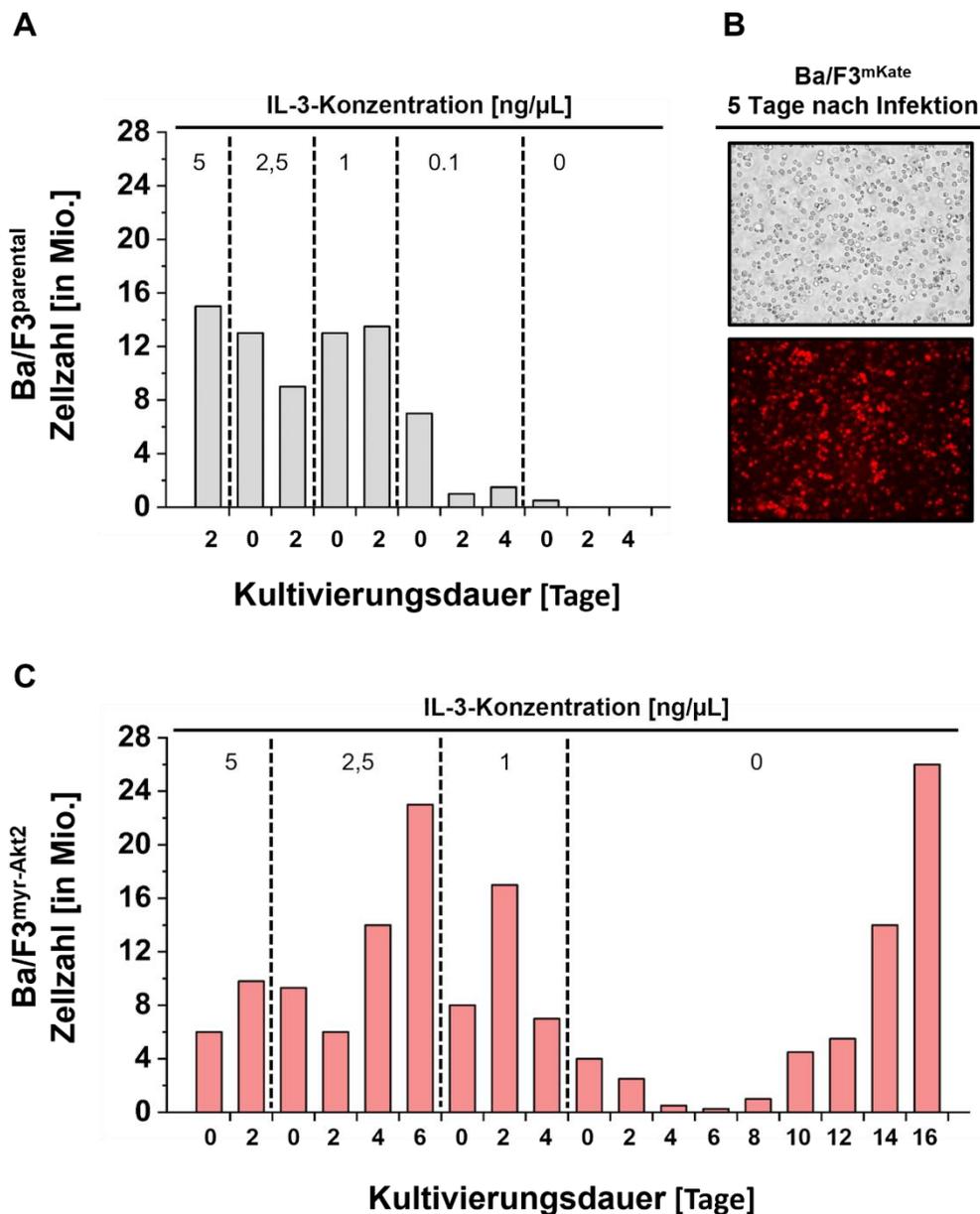


Abbildung 38: Etablierung der Herstellung von IL3-unabhängigen Ba/F3-Zellen. **A:** Darstellung der lebenden Zellen (in Mio.) der parentalen Ba/F3-Zellen bei schrittweisem IL-3 Entzug. **B:** Kontrolle der Infektion von parentalen Ba/F3-Zellen mit dem rot fluoreszierendem Protein mKate nach 5 Tagen. **C:** Darstellung der lebenden mit myr-Akt2-Virus infizierten Ba/F3-Zellen bei schrittweisem IL3-Entzug.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten unter Anwendung des etablierten Ba/F3-Infektionsprotokolls Wachstumsfaktor-unabhängige Ba/F3-Zellen für die Konstrukte Myr-Akt1, Myr-Akt2 und Myr-Akt3 generiert werden. Eine Infektion der Ba/F3 Zellen mit den inaktiven Akt-Varianten myr-Akt1^{T308A/S473A} myr-Akt2^{T309A/S474A} und myr-Akt3^{T305A/S472A} zeigte, dass ohne die für die Akt-Aktivierung signifikanten Phosphorylierungsstellen keine IL-3 unabhängigen Ba/F3-Zellen generiert werden können. Im Umkehrschluss bestätigt dies, dass für die wachsenden Zellen eine Abhängigkeit von der Aktivität also der Phosphorylierung der myr-Akt^{Wt}-Konstrukte notwendig ist und diese zur Aktivierung essenzieller zellulärer Signalkaskaden führen (Abbildung 39A).¹⁶¹

Die Expression der Akt-Isoformen und ihr Einfluss auf die nachgeschaltete Signalübertragung wurden durch Western-Blot-Analysen überprüft (Abbildung 39C). Durch die Verwendung von Akt-Isoform-spezifischen Antikörpern wurde eine starke Überexpression der einzelnen Akt-Isoformen im Vergleich zur parentalen Ba/F3-Zelllinie festgestellt. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse einen signifikanten Anstieg der Menge an pAkt^{S473}, was auf eine hohe Konzentration der aktiven Akt-Isoform in der entsprechenden Zelllinie hinweist. Weiterhin bewirken die myr-Akt-Isoformen eine erhöhte Phosphorylierung der nachgeschalteten Proteine FOXO und GSK3 β , während das Phosphorylierungsniveau von PRAS40 (Prolinreiches Akt-Substrat mit 40 kDa) beibehalten wird. Im Gegensatz dazu zeigen pErk1/2 und das ribosomale Protein S6, die an der Regulierung der Zellproliferation beteiligt sind, eine schwächere Phosphorylierung als die parentale Zelllinie.^{167,168} Um das Wachstumsverhalten der Zelllinien zu untersuchen, wurde der *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) verwendet (Abbildung 39B).¹⁶¹ Die Ergebnisse zeigen eine langsamere Wachstumsrate für Ba/F3^{myr-Akt1/2/3} im Vergleich zur parentalen Ba/F3-Zelllinie, was auf die verminderte Phosphorylierung von Erk1/2 und S6 zurückzuführen sein könnte. Es lässt sich jedoch festhalten, dass alle drei Zelllinien ein stabiles Wachstum zeigen.

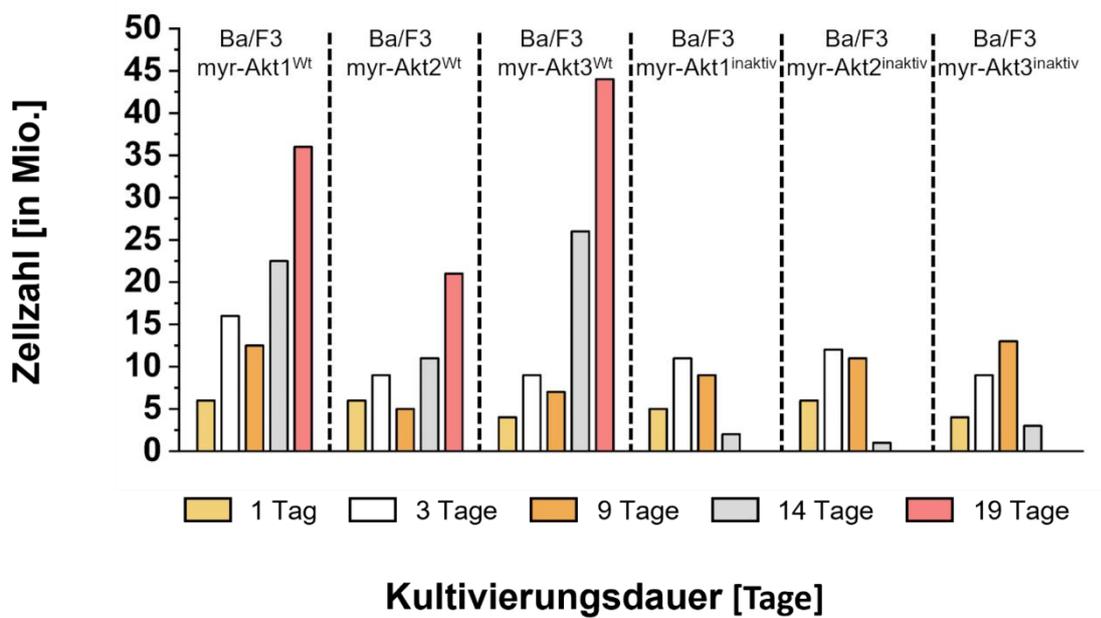
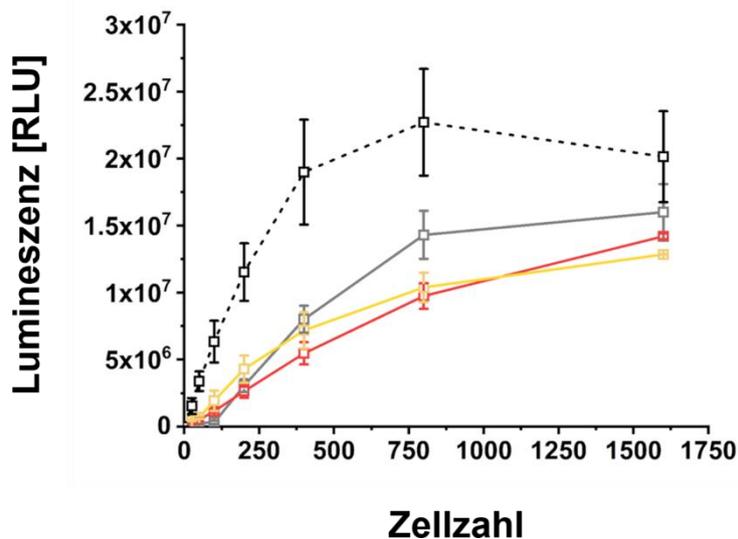
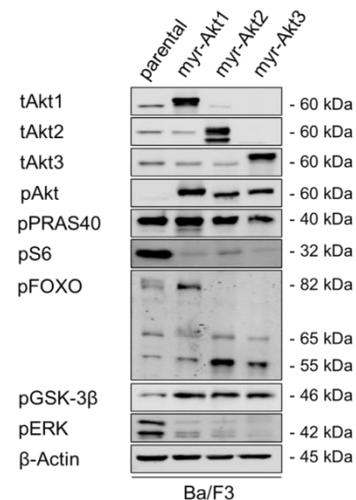
A**B****C**

Abbildung 39: A: Darstellung der lebenden Zellen (in Mio.) der mit den Wt-Konstrukten Myr-Akt1^{Wt}, Myr-Akt2^{Wt} und Myr-Akt3^{Wt}, und den Inaktivitätsmutanten Myr-Akt1^{T308A/S473A}, Myr-Akt2^{T309A/S474A} und Myr-Akt3^{T305A/S472A} transfizierten Ba/F3-Zellen an unterschiedlichen Tagen nach der Infektion. B: Darstellung der Anzahl der ausgesäten Zellen der Ba/F3-Konstrukte (myr-Akt1 (grau), myr-Akt2 (rot), myr-Akt3 (gelb)) und die daraus resultierenden Lumineszenzsignale nach Behandlung mit CTG-Lösung im Vergleich zum parentalen System (gestrichelte Linie, weiß) nach einer 96-stündigen Inkubationszeit. Die Experimente wurden in dreifacher, biologisch unabhängiger Ausführung (n = 3) durchgeführt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. C: Immunoblot von Ba/F3^{myr-Akt}-Zellen, die die molekularen Expressionsniveaus, Aktivitäten und Veränderungen von nachgeschalteten Proteinen von Akt zeigen (n = 1).

3.7.2 Analyse von Isoform-selektiven CAAs im Ba/F3-Modellsystem

Im nächsten Schritt wurde die Sensitivität der transformierten Zelllinien auf die Hemmung von Akt mit dem CAAI Borussertib (Abbildung 40) und Capivasertib, einem orthosterischen Inhibitor, getestet (Anhang Abbildung 70). Borussertib zeigte eine dosisabhängige Verringerung von pAkt sowie der nachgeschalteten Ziele pPRAS40, pFOXO und pGSK3 β , während der ATP-kompetitive Inhibitor weniger wirksam ist. Außerdem führte eine höhere Inhibitor-Konzentration zu einem Anstieg des cPARP-Signals (Poly-ADP-Polymerase-Ribose-Polymerase). Dies bestätigt die Induktion von Apoptose durch Akt-Inhibition und zeigt die Abhängigkeit der Ba/F3-Zellen von der entsprechenden myr-Akt-Isoform (Abbildung 40C).¹⁶⁹ Zellviabilitätsuntersuchungen zeigten eine signifikant reduzierte Anzahl lebensfähiger Zellen für Ba/F3^{myr-Akt1} und Ba/F3^{myr-Akt2} in Gegenwart steigender Borussertib-Konzentrationen (Abbildung 40B). Darüber hinaus gab die geringe Reaktion der Ba/F3^{myr-Akt3}-Zelllinie den ersten Hinweis auf die Anwendbarkeit der generierten Zelllinien zur gezielten Hemmung der einzelnen Akt-Isoformen, da der Inhibitor eine moderate Aktivität für Akt3 (IC₅₀ = 500 nM) in biochemischen Assays verglichen mit 1 nM für Akt1 und 14 nM für Akt2 aufweist. Im Allgemeinen ist zu beachten, dass die Myristoylierung das Gleichgewicht von Akt beeinflussen könnte, indem sie es in seiner aktiven und offenen PH-*out*-Konformation stabilisiert. Aufgrund des Bindungsmechanismus der CAAs könnten die Konformationsänderungen die Bindungsaffinitäten für die myr-Akt-Konstrukte im Vergleich zur Wildtyp-Form herabsetzen. In weiteren Experimenten wurden die Pyrazinon-basierten Isoform-selektiven CAAs RL2405 und RL2406 verwendet, um das zelluläre Modellsystem zu bewerten und die Isoform-Selektivität zu untersuchen (Abbildung 41). Western-Blot-Studien mit Konzentrationen von 250 nM bis 10 μ M zeigten unterschiedliche Sensitivitäten in den myr-Akt-Isoform-abhängigen Zelllinien (Abbildung 41B)¹⁶¹. Insbesondere der 6'-modifizierte Ligand RL2406 war gegen myr-Akt1 wirksamer als gegen myr-Akt2 und myr-Akt3, was durch eine dosisabhängige Abnahme von pAkt^{S473} sowie eine geringere Anzahl lebensfähiger Zellen in der Ba/F3^{myr-Akt1}-Zelllinie nach der Behandlung sichtbar wird. Für Ba/F3^{myr-Akt2} und Ba/F3^{myr-Akt3} präsentierten die Daten eine bevorzugte Bindung des 5'-substituierten Moleküls RL2405.¹⁴⁸

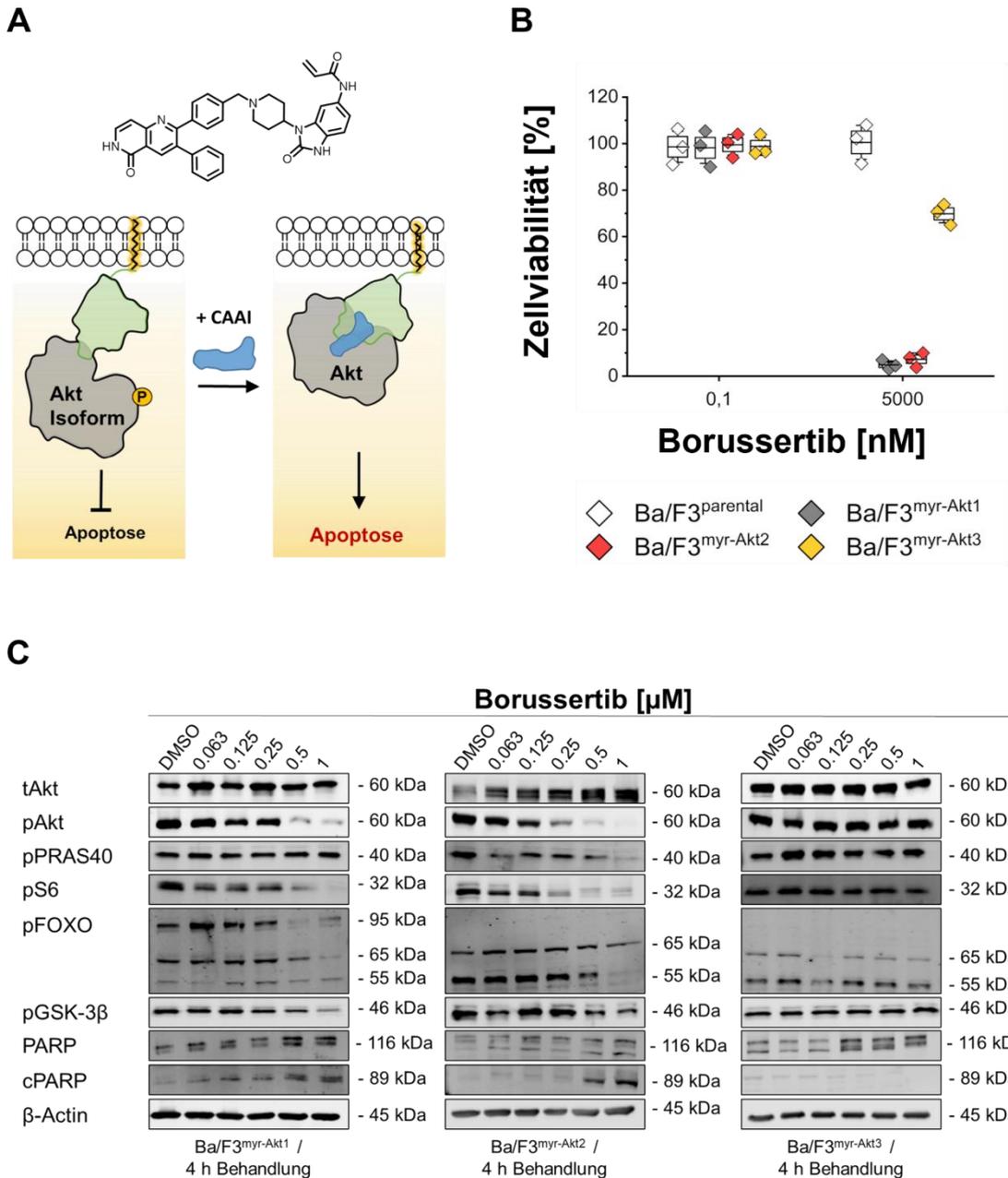


Abbildung 40: Adressierung der Ba/F3^{myr-Akt}-Zellen mit CAAI Borussertib, um die Empfindlichkeit des etablierten Systems hinsichtlich einer Adressierung von Akt zu untersuchen. **A:** Struktur des verwendeten Inhibitors und schematische Darstellung des Bindungsmodus. **B:** Diagramm, das die verbleibenden lebensfähigen Zellen als Prozentsatz in Bezug auf die verwendete Konzentration von Borussertib zeigt. Die Versuchspunkte wurden in Duplikaten für jede Platte gemessen und in biologisch unabhängigen Experimenten repliziert (n = 3). **C:** Immunoblots zeigen das Vorhandensein und die Aktivität einzelner Akt-Isoformen sowie der nachgeschalteten Proteine in den drei Modellsystemen nach 4 Stunden Behandlung (n = 1).

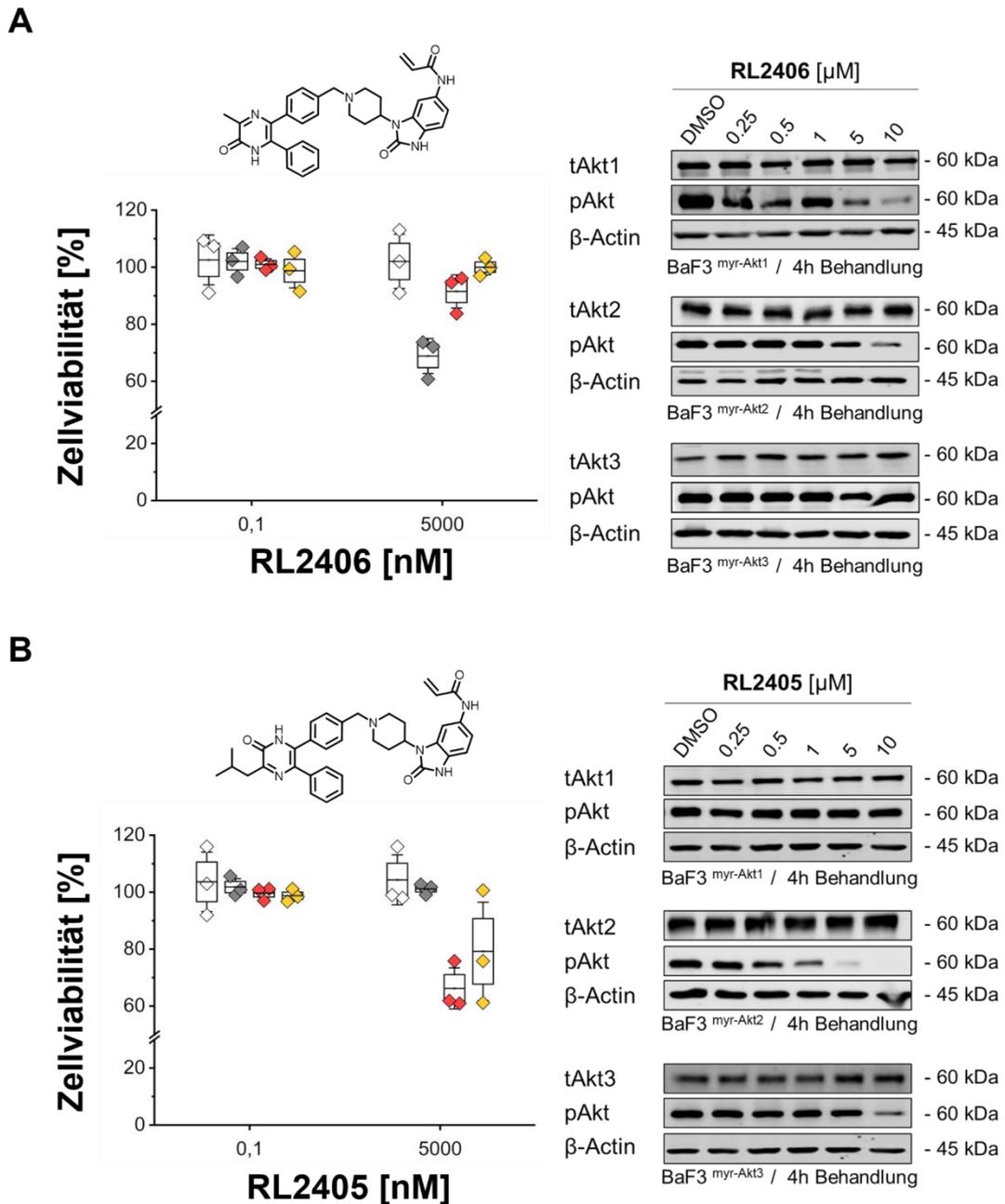


Abbildung 41: Behandlung der Ba/F3^{myr-Akt}-Zellen mit Isoform-selektiven CAAs RL2406 und RL2405 zur Untersuchung der Selektivitätsübertragung auf das etablierte System. **A:** Das Diagramm zeigt die verbleibenden lebensfähigen Zellen als Prozentsatz in Bezug auf die verwendete Konzentration von RL2406 und RL2405. Die Versuchspunkte wurden in Duplikaten für jede Platte gemessen und in biologisch unabhängigen Experimenten repliziert (n = 3). Struktur der verwendeten Inhibitoren. **B:** Immunoblots zeigen die Isoform-selektive Aktivität innerhalb der drei Modellsysteme nach 4-stündiger Behandlung (n = 1).

Insgesamt zeigten die Ergebnisse eine sehr gute Korrelation zu den zuvor beobachteten biochemischen Daten und Isoform-Selektivitäten. Um die Anwendbarkeit des Ba/F3 myr-Akt-Isoform-abhängigen Systems zur Prüfung der unterschiedlichen Isoform-Selektivität zu bestätigen, wurde das in Kapitel 3.5 beschriebene fokussierte Inhibitor-Set verwendet. Um die Übersetzung der Selektivitätsprofile zu bewerten, wurden die Verhältnisse der zellulären CTG EC₅₀-Werte Akt1/Akt2 und Akt2/Akt3 mit den entsprechenden Verhältnissen der biochemischen HTRF IC₅₀-Werte verglichen (Abbildung 42 und Anhang, Tabelle 17). Liganden, die mit polaren Gruppen ausgestattet sind, z. B. mit einer freien Säure- oder Hydroxylgruppe (RL2884, RL3274, RL3082, siehe Tabelle 2), zeigten im Allgemeinen keine Aktivität gegenüber den Ba/F3^{myr-Akt}-Zelllinien, was vermutlich auf die geringe zelluläre Permeabilität der Inhibitoren zurückzuführen ist. Es konnte jedoch eine klare Korrelation zwischen den zellulären Daten im Vergleich zu den *in vitro* Daten bezüglich der Selektivitätsverhältnisse der analysierten Isoform-selektiven CAAs beobachtet werden (Abbildung 42), was die Anwendbarkeit des entwickelten zellulären Systems zur Bestimmung der Isoform-Selektivität unterstreicht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Moleküle RL2928, RL3341 und RL3271 ihre Selektivität für Akt2 in einem zellulären Kontext beibehielten, was bestätigt, dass größere Substituenten von der Akt2-Bindungstasche stärker bevorzugt werden als kleinere Substituenten. In Übereinstimmung mit den biochemischen Daten zeigten das Aminopyridin (RL3094) und das Pyridin (RL3272) sowie das Methylpyrazol (RL3081) leicht verschobene Aktivitäten gegenüber der Isoform myr-Akt3, was die Bedeutung des Stickstoffs innerhalb des aromatischen Ringsystems für die Adressierung von Akt3 hervorhebt. Das einfache Pyridin-Grundgerüst RL2661 zeigt eine erwartete mäßige Selektivität für myr-Akt1 sowie einen Aktivitätsverlust mit zunehmender Größe der eingeführten Gruppe. Die vielversprechenden Selektivitätsprofile der CAAs RL2661, RL3341 und RL3094 in den Ba/F3-Zellen konnten zusätzlich in Immunoblot-Studien validiert werden (Abbildung 43). Im Allgemeinen konnte eine erfolgreiche Übertragung der SAR in das etablierte Ba/F3^{myr-Akt}-Modellsystem gezeigt werden.¹⁴⁸

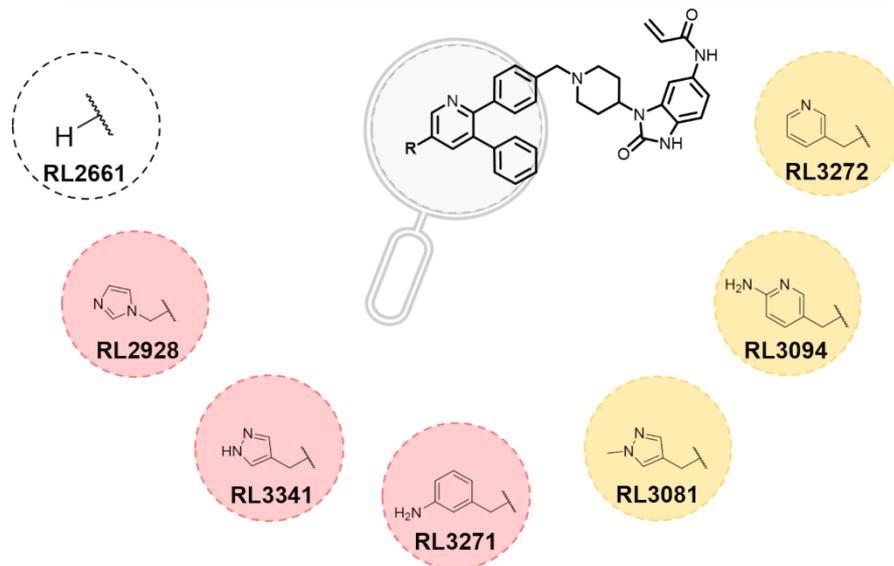
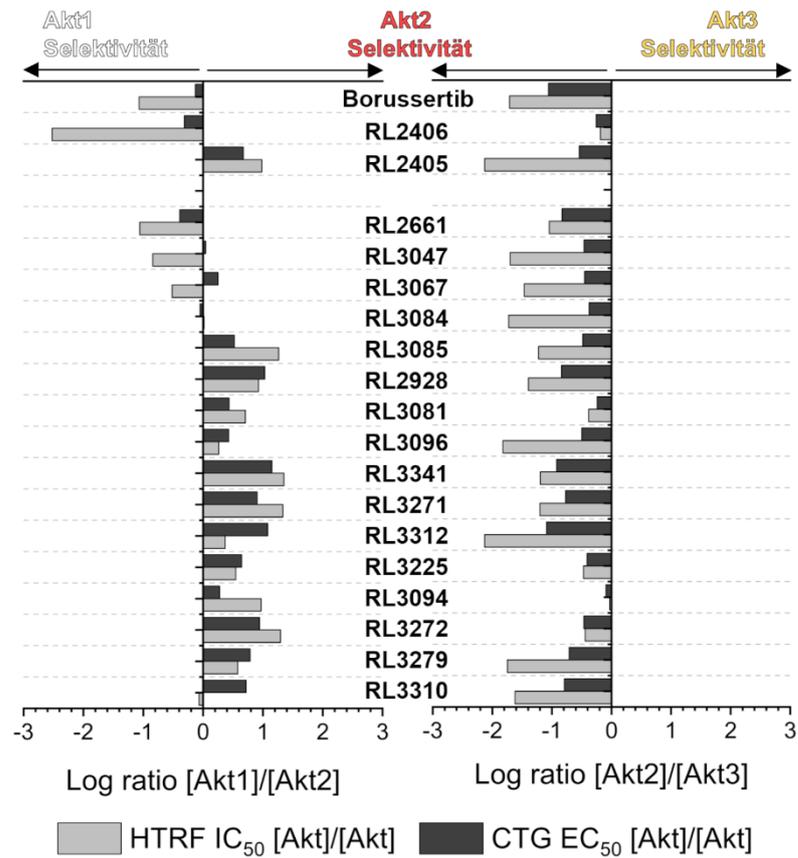


Abbildung 42: Untersuchung des Ba/F3 myr-Akt-Isoform-Systems mit einer fokussierten Bibliothek CAAs. Identifizierte biochemische Selektivitätsprofile (dunkelgrau) im Vergleich mit den aus dem Zellviabilitätstest mit Ba/F3 myr-Akt-Isoform-abhängigen Zellen erhaltenen Verhältnissen (hellgrau). Die Selektivitätsverhältnisse in log-Einheiten sind konsistent und unterstreichen die erfolgreiche Übertragung der Ergebnisse aus biochemischen Assays auf das zelluläre System. Darstellung von Strukturen und Resten, die vielversprechende Selektivitätsprofile zeigen und sich als potenzielle Sondenmoleküle für weitere Untersuchungen eignen.

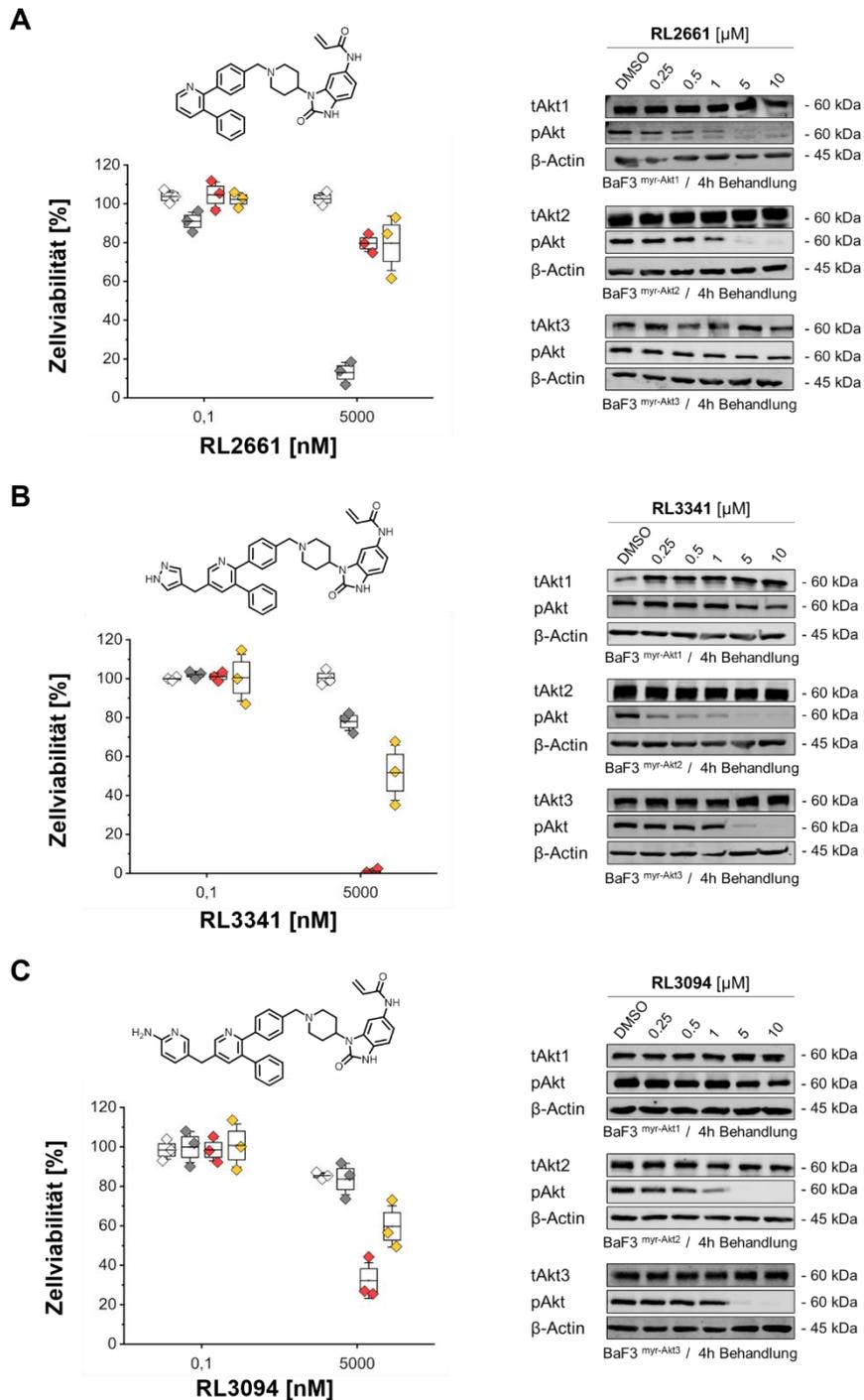


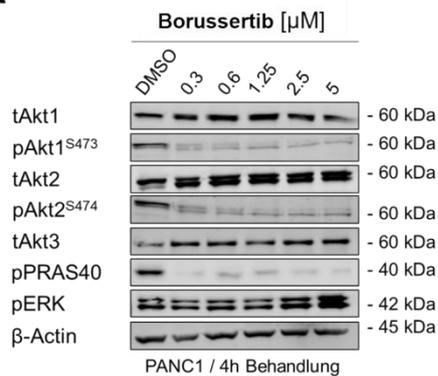
Abbildung 43: Behandlung der Ba/F3^{myr-Akt}-Zellen mit Isoform-selektiven CAAs RL2661, RL3341 und RL3094 zur Untersuchung der Selektivitätsübertragung auf das etablierte System. **A:** Das Diagramm zeigt die verbleibenden lebensfähigen Zellen als Prozentsatz in Bezug auf die verwendete Konzentration von RL2661, RL3341 und RL3094. Die Versuchspunkte wurden in Duplikaten für jede Platte gemessen und in n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten repliziert. Darstellung der Struktur der verwendeten Inhibitoren. **B:** Immunoblots zeigen die Isoform-selektive Aktivität innerhalb der drei Modellsysteme nach 4-stündiger Behandlung (n = 1).

3.7.3 Studien in der humanen Krebszelllinie PANC1

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die identifizierten Selektivitätsprofile in humane Krebszelllinien übertragbar sind. Dafür wurde die humane Pankreas-Krebszelllinie PANC1 ausgewählt, welche eine KRas-Abhängigkeit aufweist und demnach wahrscheinlich keine verminderte Viabilität durch die Adressierung einer oder mehrerer Akt-Isoformen auftritt.^{170,171} Weiterhin ließ sich durch frühere Immunoblot-Studien die Expression aller drei Isoformen in relevanten Mengen in PANC1 nachweisen. Dies ermöglicht einen ungehinderten Nachweis der Effekte einer Akt-Inhibition mit Hilfe von Immunoblot-Studien sowie einen direkten Vergleich der selektiven Adressierung der Akt-Isoformen mit Hilfe des *Cellular thermal shift assay* (CETSA). Aufgrund ihrer vielversprechenden Selektivitätsprofile im HTRF- und im CTG-Assay wurden die Moleküle RL2661, RL3341 und RL3094 für die Untersuchungen in den PANC1-Zellen ausgewählt und mit dem durch Borussertib erzielten Effekt verglichen. Immunoblot-Studien zeigten, dass eine Behandlung mit RL2661 zu einer dosis-abhängigen Verringerung sowohl des pAkt1 als auch des pAkt2-Signals führte. Dies lässt die Vermutung zu, dass RL2661 die in den Ba/F3-Zellen identifizierte Selektivität für Akt1 nicht in einer humanen Zelle aufrechterhalten kann. Hierbei muss jedoch beachtet werden, dass in PANC1 eine Überexpression von Akt2 vorliegt. Dies könnte einen visuellen, qualitativen Vergleich via Western Blots erschweren. Darüber hinaus zeigt sich ein drastischer Abfall des pAkt2-Signals durch die Behandlung mit 0,3 μM RL2661 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Dies könnte unter anderem durch das Auftreten unterschiedlicher Phosphorylierungs-Spezies von Akt2 oder durch verschiedene Splicing-Varianten erklärt werden, deren Bildung durch eine Inhibitor-vermittelte Inhibition induziert wurde.¹⁷² Des Weiteren kann eine dosisabhängige Inaktivierung der nachgeschalteten Proteine S6 und PRAS40 beobachtet werden, wobei jedoch keine vollständige Inaktivierung erreicht werden kann. Dies resultiert aus der Aktivität alternativer Signalwege, wie zum Beispiel dem Ras/ERK-Signalweg, welcher durch die Akt-Inhibition nicht beeinflusst wird.¹⁷³ Für RL3341 konnte bereits bei 0,3 μM eine effiziente Inaktivierung von Akt2 beobachtet werden, während das pAkt1-Signal bis zu einer Konzentration von 5 μM stabil blieb. Für RL3094 zeigte sich ein Effekt auf pAkt2 ab einer Inhibitorkonzentration von 1,25 μM .

Dies bestätigt die bereits in biochemischen und den Zellviabilitäts-Studien nachgewiesene Aktivität dieses Inhibitors auf Akt2. Weiterhin konnte in den PANC1 nur sehr geringe pAkt3-Level nachgewiesen werden, sodass keine Aussage über den Effekt der Inhibitoren auf Akt3 getroffen werden konnte (Abbildung 44).

A



B

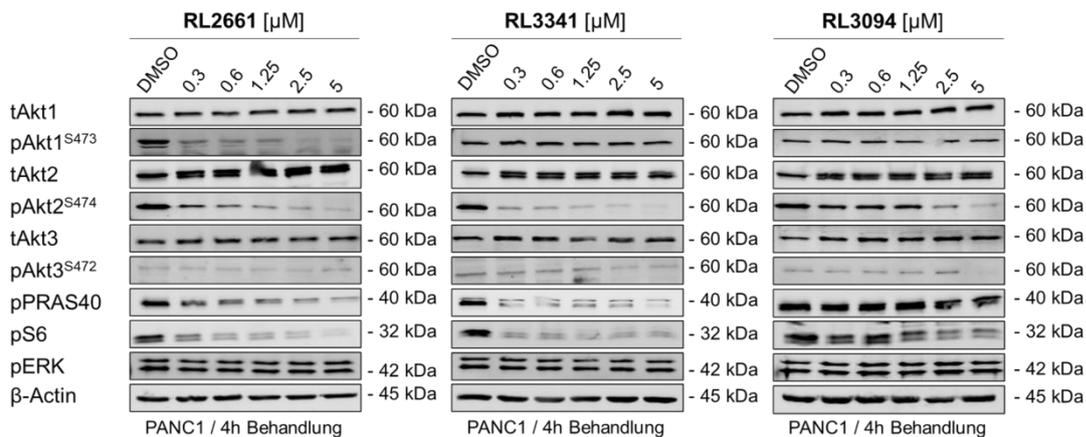


Abbildung 44: Immunoblots von PANC1 behandelt mit unterschiedlichen CAAs. **A:** Der Immunoblot zeigt den Einfluss von Borussertib nach 4-stündiger Behandlung auf die individuellen pAkt-Level der Isoformen sowie auf nachgeschaltete Proteine (n = 1). **B:** Der Immunoblot zeigt den Einfluss der Isoform-selektiven CAAs RL2661, RL3341 und RL3094 nach 4-stündiger Behandlung auf die individuellen pAkt-Level der Isoformen sowie auf nachgeschaltete Proteine (n = 1).

Um dies zu umgehen, eignen sich CETSA-Experimente als Alternative. Diese Methode hat zellbasierte Studien zur Bindung von Zielmolekülen revolutioniert, da die Detektion einer direkten Adressierung an das Protein ermöglicht wird. Der Assay basiert auf der Annahme, dass sich ein Protein beim Erhitzen entfaltet und bei einer bestimmten Temperatur aggregiert, die als T_m bezeichnet wird. Die hitzeinduzierte Aggregation kann durch die Bindung eines kleinen Moleküls an das Protein verändert werden, was zu einer Verschiebung von T_m hin zu höheren Temperaturen führt. Ligand-induzierte thermische Verschiebungen wurden ausgiebig an gereinigten Proteinen untersucht. T_m -Änderungen wurden meist durch Differential-Scanning-Fluorimetrie unter Verwendung hydrophober Farbstoffe oder durch intrinsische Fluoreszenz von Trp-Resten nachgewiesen. Die biophysikalischen Grundsätze der thermischen Entfaltung werden bei CETSA trotz der komplexen Umgebung intakter Zellen beibehalten. Nach dem Erhitzen der Zellen in Gegenwart eines kleinen Moleküls werden die Zellen aufgeschossen und die entfalteten und aggregierten Proteine durch Zentrifugation entfernt. Die Präsenz einzelner Proteine, die in Lösung verbleiben, kann durch eine Proteindetektionsmethode wie den Western Blot überwacht werden. Eine anschließende Quantifizierung der detektierten Banden ermöglicht die Bestimmung der thermischen Stabilität des Zielproteins.¹⁷⁴ Dafür wurden die PANC1-Zellen mit einer festgelegten Konzentration des entsprechenden Inhibitors behandelt und anschließend verschiedenen Temperaturen von 40 °C bis 80 °C ausgesetzt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit DMSO behandelt wurden.

Die Ergebnisse der CETSA-Experimente zeigen eine eindeutige Stabilisierung aller drei Isoformen durch die Behandlung mit 1 μM Borussertib im Bezug zur DMSO Kontrolle (Abbildung 45A). Im Vergleich dazu konnte eine bevorzugte Stabilisierung von Akt1 durch 0,3 μM RL2661 beobachtet werden. Diese Selektivität geht verloren so bald eine höhere Konzentration RL2661 von 1 μM eingesetzt wird (Anhang, Abbildung 73A). Trotz der höheren Inhibitorkonzentration von 1 μM konnte für RL3341 eine signifikante thermische Verschiebung für Akt2 beobachtet werden, während für Akt1 keine thermische Stabilisierung durch RL3341 ersichtlich ist. Für Akt3 konnte eine leichte Verschiebung von etwa 5 °C beobachtet werden.

Für das Aminopyridin RL3094 zeigte sich bei der Verwendung von 1 μM (Abbildung 45D) und 2,5 μM (Anhang, Abbildung 73B) eine leicht stärkere Stabilisierung von Akt3 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle als von Akt2. Wobei dieser Unterschied nicht als signifikant einzustufen ist und demnach von einer Equipotenz von RL3094 auf Akt2 und Akt3 in PANC1 ausgegangen werden kann. Diese Beobachtung wird sowohl durch die biochemische Aktivität von RL3094 auf den Isoformen als auch durch die zellbasierten Studien in den Ba/F3^{myr-Akt}-Zellen bestätigt.

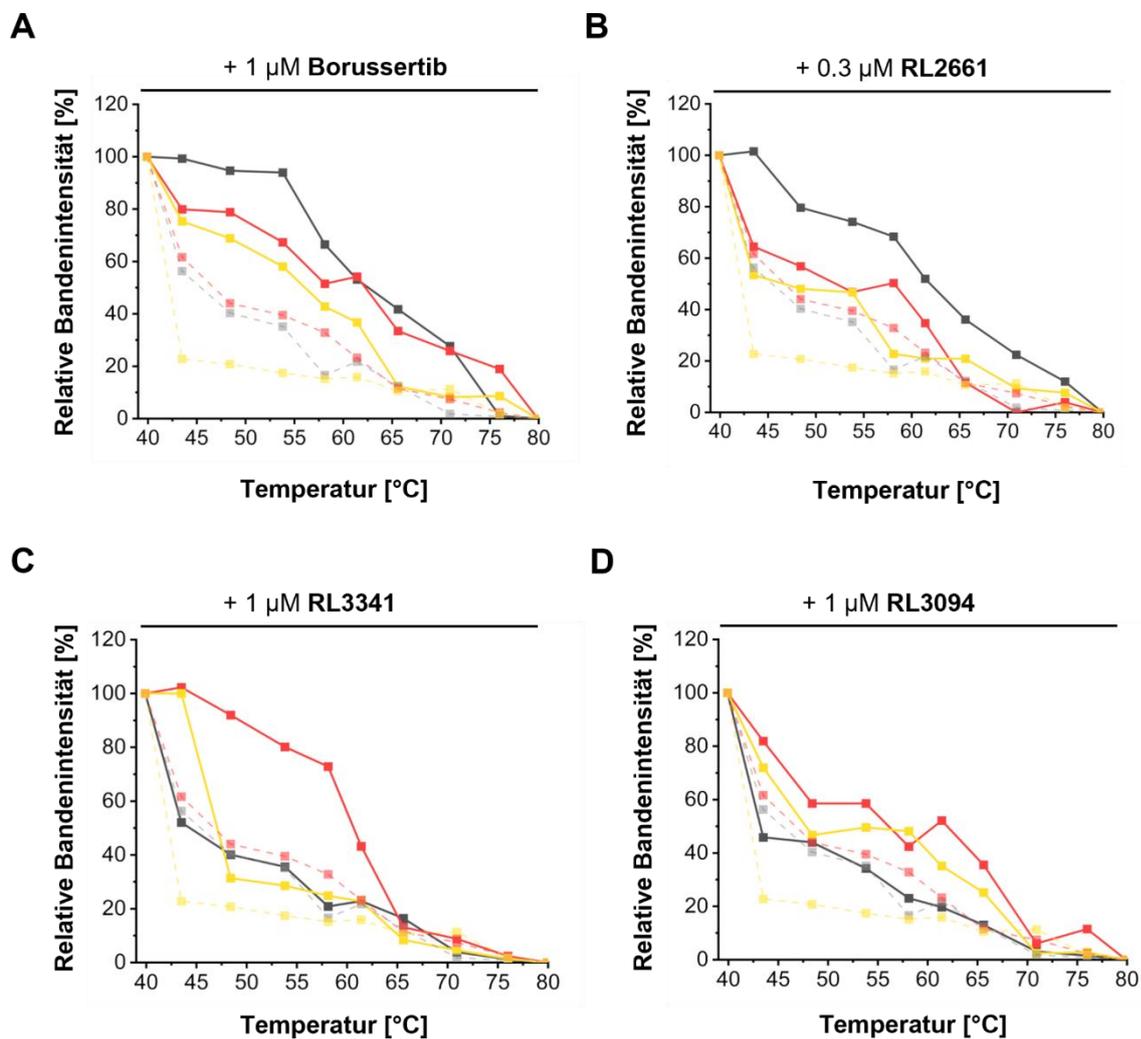


Abbildung 45: Quantifizierung der Immunoblot-basierten *CETSA*-Experimente von PANC1 behandelt mit **A:** 1 μM Borussertib, **B:** 0.3 μM RL2661, **C:** 1 μM RL3341 und **D:** 1 μM RL3094. Die Signale der tAkt-Antikörper wurden auf Actin normalisiert. Darstellung der mit DMSO behandelten Zellen mit gestrichelten Linien; mit Inhibitor behandelte Zellen mit durchgezogenen Linien; Akt1 (grau); Akt2 (rot); Akt3 (gelb).

Im Allgemeinen gelang es durch den Einsatz von Immunoblots sowie CETSA-Experimenten die Translation der in einem myr-Akt-Isoform-abhängigen Modellsystem identifizierten Selektivitätsprofile in humane Krebszellen zu bestätigen. Das artifizielle Ba/F3-Modell, kombiniert mit einem Hochdurchsatz-*Readout*, dient als zuverlässiger Analyseschritt zur Identifizierung vielversprechender selektiver Inhibitoren für die anschließende Übertragung auf nativere Krebsmodellsysteme. Die Nutzung des Konzepts der CAAs lieferte einzigartige Einblicke in die SAR der drei Akt-Isoformen. Weiterhin ergab die aktivitätsbasierte Charakterisierung eine konsistente SAR der CAAs gegenüber den einzelnen Interdomänen-Taschen der Akt-Isoformen.¹⁴⁸

3.7.4 Etablierung von Akt-Isoform *knock-outs* in HEK293T

Die Studien von lebenden Organismen und Zellen sind ein komplexes Unterfangen. Um ein umfassendes Bild der durch die Akt-Isoformen vermittelten Signalübertragung zu erhalten, könnte sich eine Kombination aus chemischen und biologischen Perturbationsstudien als besonders wirkungsvoll erweisen.⁶⁰ Aus diesem Grund sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll für die Einführung von CRISPR/Cas9-vermittelten Akt-Isoform *knock-outs* in humane Zellen etabliert werden. Der Ursprung des CRISPR/Cas9-Systems liegt im adaptiven Immunsystem von Prokaryoten gegen Phagen und konjugative Plasmid-Infektionen.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Im Jahr 2019 erhielten Doudna und Charpentier den Nobelpreis für die fundamentalen Studien und Charakterisierungen dieses Systems, welche den Weg für die Entwicklung einer „molekularen Genschere“ ebneten.⁶¹

Das native CRISPR/Cas9-System kann durch entsprechende Anpassungen für eine gezielte Genomeditierung genutzt werden.¹⁷⁸⁻¹⁸⁰ Es besteht aus zwei Komponenten: der sogenannten *single guide* RNA (gRNA oder sgRNA) und einer CRISPR-assoziierten Endonuklease (Cas-Protein). Die sgRNA ist eine kurze synthetische RNA bestehend aus einer Gerüstsequenz, welche für die Bindung von *Cas* nötig ist, und einer etwa 20 Nukleotide langen Sequenz (*Spacer*), welche für die Rekrutierung des *Cas9*-Systems an das genomische Ziel verantwortlich ist. Dementsprechend kann das genomische Ziel durch eine simple Anpassung der *Spacer*-Sequenz verändert werden.^{181,182} Es ist wichtig, dass das Ziel-Gen eine zwei bis drei Basenpaare lange PAM-Sequenz (engl. *protospacer adjacent motif*) besitzt, um erkannt werden zu können. Diese Sequenz ist ein Nukleotid unterhalb der zur sgRNA komplementären Region lokalisiert und wird von der PAM-*interacting* Domäne des Cas-Proteins erkannt. Die erkannte Sequenz unterscheidet sich je nach verwendetem Cas-Protein (*Cas9* aus *Streptococcus pyogenes*: 5'-NGG).^{183,184} Anschließend wird durch die Nukleasedomänen RuvC und HNH ein Doppelstrangbruch (DSB) induziert. Die darauffolgende Veränderung des Genoms kann durch zwei verschiedene Reparaturmechanismen erfolgen.

Über eine nicht-homologe Endverknüpfung (engl. *non-homologous end joining*, NHEJ) wird der DSB zufällig repariert und es entstehen dabei sogenannte *indel*-Mutationen (Insertionen und Deletionen zufälliger Basenpaare).^{178,185} Dies kann für die Einbringung von Gen-*knock-outs* genutzt werden, da es dabei zu *frame shifts* oder frühzeitig eingebauten Stopp-Codons kommen kann. Die andere Möglichkeit ist die Verwendung einer Homologie-gerichteten Reparatur (engl. *homology-directed repair*, HDR). Bei dieser Methode wird ein Reparaturstrang dazu genutzt präzise Genveränderungen, wie zum Beispiel Punktmutationen, einzuführen. Dafür wird der Reparaturstrang so konzipiert, dass er die Informationen für den gewünschten Basenaustausch trägt (Abbildung 46A).^{178,185}

Es gibt unterschiedliche Methoden, um die sgRNA und das Cas9-Protein in die gewünschte Zelle einzubringen. Innerhalb dieser Arbeit wurde ein Plasmid-basierter Ansatz gewählt. Dafür müssen zu Beginn zunächst geeignete sgRNAs basierend auf dem Zielgen entwickelt werden, welche anschließend mittels Klonierung in den CRISPR/Cas9-Expressionsvektor eingebracht werden.¹⁸⁶ Es wurden der pSpCas9(BB)-2A-GFP-Vektor und der pSpCas9(BB)-2A-Puro-Vektor gewählt.^{181,****} Diese enthalten die genetischen Informationen für sgRNA und Cas9 sowie verschiedene regulatorische Elemente für die Expression. Zusätzlich sind die Selektionsmarker EGFP oder eine Puromycin-Resistenz vorhanden, welche nach der Transfektion die Selektion erfolgreich transfizierter Zellen ermöglichen. Dabei ist es wichtig, dass die Zellpopulation in einzelne Zellen separiert wird, was entweder durch eine serielle Verdünnung oder durch Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (engl. *fluorescence activated cell sorting*, FACS) erzielt werden kann, damit bei einer anschließenden klonalen Expansion eine homogene Zellpopulation entwickelt werden kann. Die abschließende Validierung erfolgt über eine Genomisolierung und anschließende Sequenzierung des Zielgens sowie über Immunoblot-Studien (Abbildung 46B).¹⁸⁷

**** pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 und pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) wurden von Feng Zhang über Addgene zur Verfügung gestellt (Addgene plasmid #62988; RRID:Addgene_62988 und #48138; RRID:Addgene_48138)

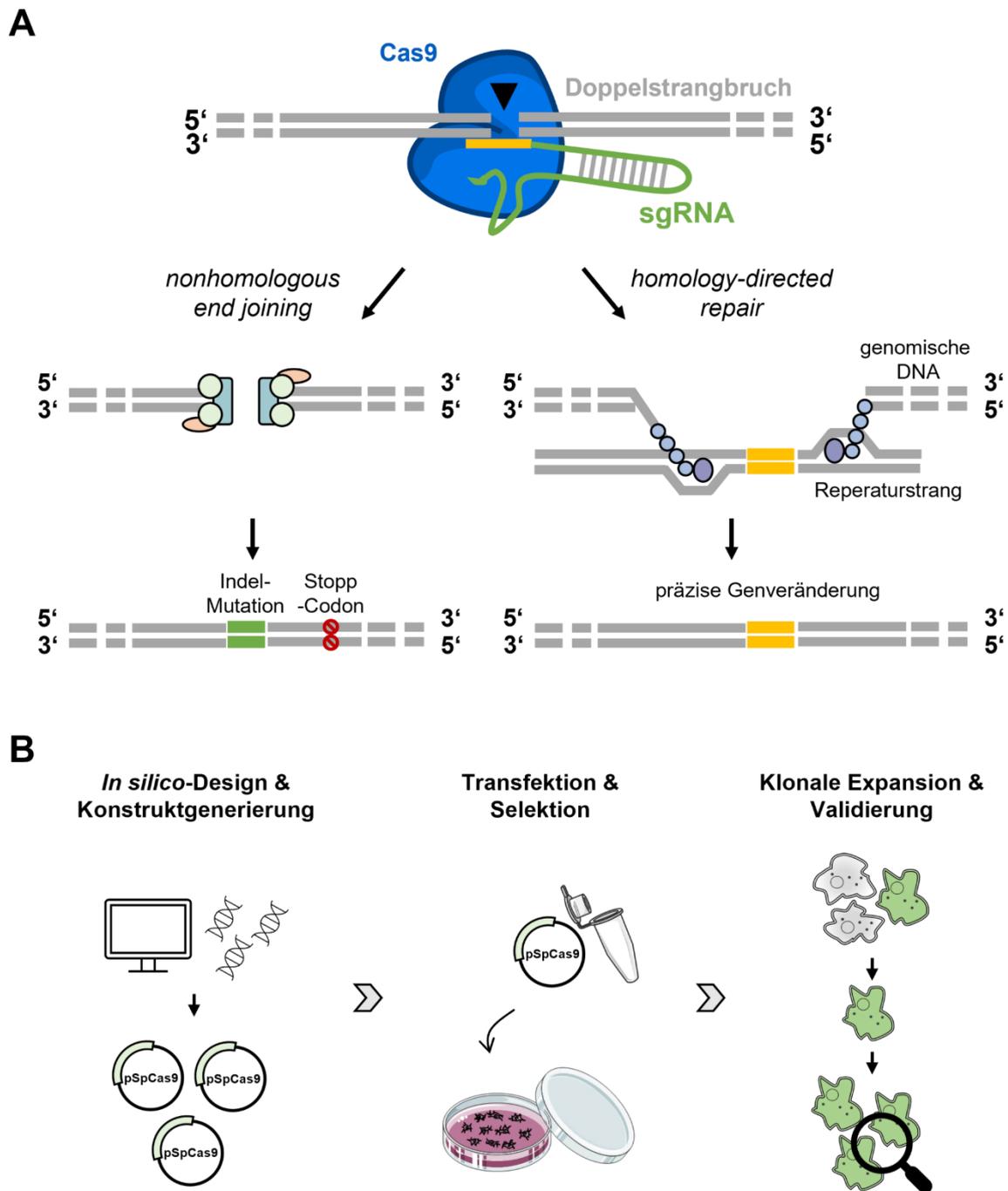


Abbildung 46: **A:** Schematische Darstellung des für die Genomeditierung angepassten CRISPR/Cas9-Systems sowie der möglichen Reparaturmechanismen, *nonhomologous end joining* (NHEJ) und *homology-directed repair* (HDR). **B:** Schematische Darstellung der Plasmid-basierten Transfektion des CRISPR/Cas9-Systems in HEK293T zur Einbringung von Gen-*knock-outs*. Adaptiert aus Ran *et al.*¹⁸¹

Das Protokoll sollte zunächst für HEK293T-Zellen etabliert und getestet werden, da diese leicht zu transfizieren sind und alle drei Isoformen in detektierbaren Mengen exprimieren.^{††††} Für das Design der sgRNA wurden die Online Tools ChopChop¹⁸⁸⁻¹⁹⁰, CrisPick¹⁹¹ und TrueDesign Genom Editor (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Diese entwickeln sgRNAs basierend auf einem Referenzgenom, welche anschließend mit Hilfe eines Scoring-Algorithmus bewertet werden. Die gewählten sgRNA-Sequenzen für die Akt-Isoformen sind im Detail im Anhang aufgeführt (Tabelle-13-15). Die Etablierung des Protokolls wird nachfolgend am Beispiel der sgRNA *AGGAGCCGTCGCTCTTCAGC* beschrieben, welche für die Einführung eines *Akt2-knock-outs* verwendet werden sollte.

Um optimale Bedingungen für die Transfektion der CRISPR/Cas9-Konstrukte in die HEK293T-Zellen zu identifizieren, wurden unterschiedliche Zellzahlen der für die Transfektion ausgesäten HEK293T-Zellen ($0,5 \cdot 10^5$ - $2,0 \cdot 10^5$ Zellen) in Kombination mit verschiedenen Zusammensetzungen des Transfektions-Mix getestet (Abbildung 47A). Die Transfektion der HEK293T-Zellen mit den entsprechenden Plasmiden erfolgte 24 h nach Aussaat. Dafür wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin 3000 verwendet, welches nach dem gleichen Prinzip funktioniert wie das in Kapitel 3.7.1 beschriebene TransIT-LT. Nach einer Inkubation von 24 h nach der Transfektion zeigte sich die Expression von EGFP-markiertem Cas9, was eine erfolgreiche Transfektion der HEK293T-Zellen bestätigt (Abbildung 47B). Weiterhin zeigte sich, dass eine Verwendung von 50.000 Zellen zu einer deutlich gesteigerten Transfektionseffizienz führt als höhere Zellzahlen. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Zellen bei einer niedrigeren Konfluenz eine höhere Vitalität haben. Zusätzlich zeigte sich eine Verwendung von 1,5 μ L Transfektionsreagenz in Kombination mit 1 μ g Plasmid-DNA als vorteilhaft. So konnte eine sehr gute mittels qualitativer visueller Analyse bestimmte Transfektionseffizienz von etwa 40 % in HEK293T erzielt werden.

^{††††} Etablierung des Protokolls für die Generierung von Akt-Isoform-*knockouts* in HEK293T im Rahmen der Masterarbeit von B. Sc. Fabian Schnecke (AG Rauh, TU Dortmund).

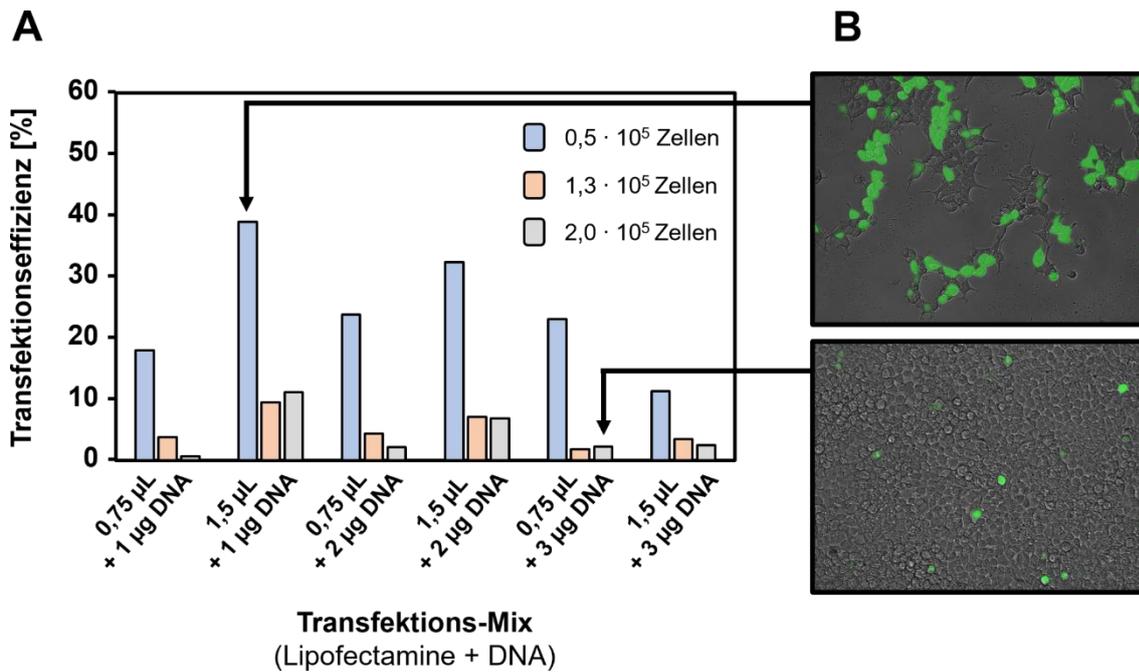


Abbildung 47: Etablierung eines Transfektionsprotokolls für die Generierung CRISPR/Cas9-vermittelter Gen-*knock-out* in HEK293T. **A:** Vergleich der Transfektionseffizienz durch die Variation der verwendeten Zellzahl, Menge des Transfektionsreagenzes Lipofectamin 3000 und der Menge des Plasmids. **B:** Qualitative Analyse der erfolgreich transfizierten Zellen mit Hilfe des pSpCas9(BB)-2A-GFP-Vektors beispielhaft dargestellt für zwei verschiedene Bedingungen. Die Anzahl der fluoreszierenden Zellen wurde mit den nicht-fluoreszierenden Zellen verglichen und auf die Gesamtanzahl der ausgesäten Zellen bezogen.

Drei Tage nach der Transfektion erfolgte die Selektion der erfolgreich transfizierten Zellen mittels FACS. Diese Methode hat den Vorteil, dass bei der Sortierung weitere Verunreinigungen ausgeleitet werden. So ließ sich bei der Betrachtung aller detektierter Partikel eine Gesamt-Zellmenge von 83 % nachweisen. Diese werden schließlich anhand eines manuell festgelegtem Fluoreszenzwertes in GFP-negative und GFP-positive Zellen klassifiziert und dementsprechend einzelne Zellen in eine 96-Kammer-Platte sortiert. Zur Kontrolle wurden ebenfalls Kammern nur mit Medium oder mit GFP-negativen Zellen befüllt. Es konnten insgesamt 36 % GFP-positive Zellen nachgewiesen werden, was mit der zuvor bestimmten Transfektionseffizienz korreliert (Abbildung 48).

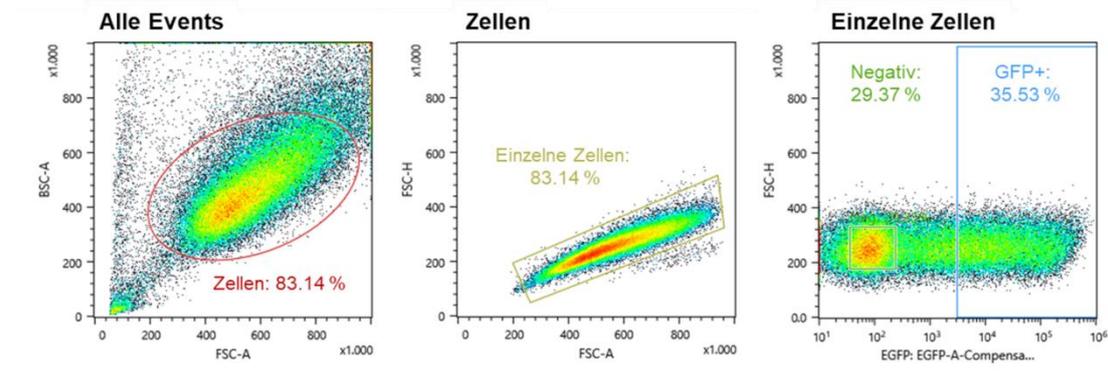


Abbildung 48: Ergebnisse der Selektion erfolgreich transfizierter Zellen mit Hilfe einer FACS-Analyse.

Die Zellklone wurden anschließend etwa zwei Wochen kultiviert. Dabei ließ sich feststellen, dass ein Großteil dieser aufgrund der äußeren Stressfaktoren nicht überlebten. Weiterhin konnte nach etwa 5 Tagen ein Verlust der fluoreszierenden Eigenschaften beobachtet werden, was auf die nicht stabile Expression des Cas9-Proteins zurückgeführt werden kann. Stabil wachsende und proliferierende Zellpopulationen wurden schließlich mit Hilfe von Akt-spezifischen Antikörpern auf die Präsenz von Akt2 untersucht (Abbildung 49A). Insgesamt ließen sich geringere Akt2-Expressionslevel in allen Klonen im Vergleich zur parentalen Zelllinie nachweisen. Vier von zehn Klonen zeigten einen vollständigen *knock-out* von Akt2 (B8, C11, E9 und G4), was über die Abwesenheit eines tAkt2- und pAkt2-Signals nachgewiesen werden konnte. Die entsprechenden Klone wurden zusätzlich mit einer Genomsequenzierung validiert (Abbildung 49B). Diese zeigte, dass in den Akt2-negativen Klonen im Vergleich zu den Akt2-positiven Klonen und den parentalen HEK293T willkürliche *indel*-Mutationen nachgewiesen werden können, welche den *knock-out* verursachen.

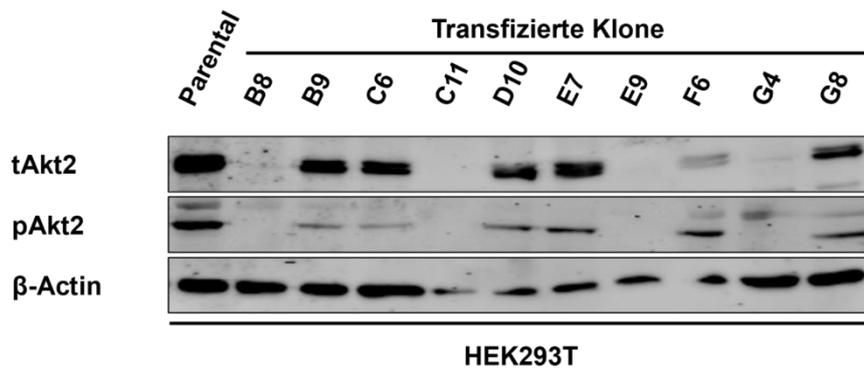
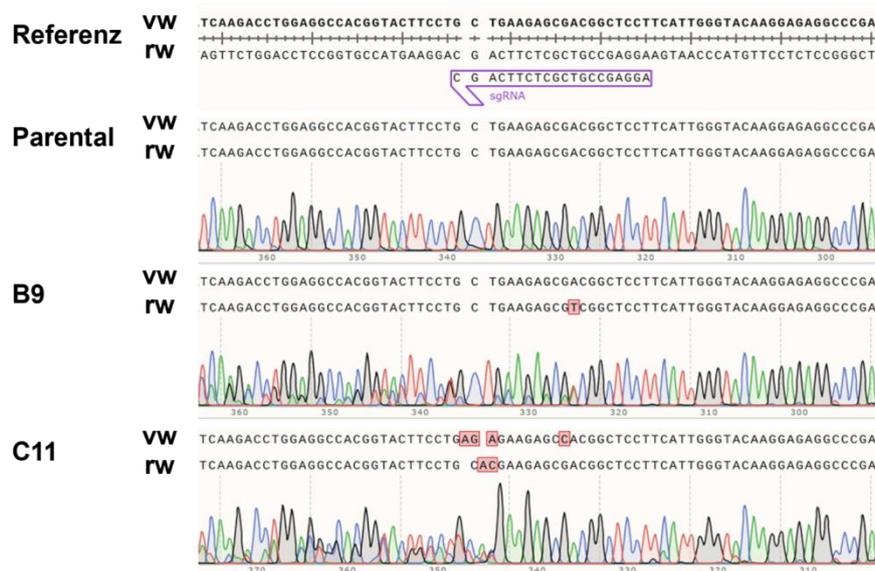
A**B**

Abbildung 49: Validierung der aus einzelnen Zellen expandierten Zellpopulationen. **A:** Untersuchung der Anwesenheit von Akt2 und phosphoryliertem Akt2 in den generierten HEK293T-Zelllinien im Vergleich zur parentalen Zelllinie. Es konnten vier Akt2-negative Klone nachgewiesen werden (B8, C11, E9 und G4). **B:** Beispielhafte Darstellung der Genomsequenzierung eines Akt2-positiven (B9) und eines Akt2-negativen (C11) Klons im Vergleich zu parentalen HEK293T.

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der generierten Zelllinie und der parentalen HEK293T-Zellen mit dem CTG-Assay zeigt eine stabile Proliferation (Abbildung 50). Interessanterweise scheint der *knock-out* von Akt2 das Wachstum der Zellen geringfügig zu beschleunigen. Dies könnte durch die Aktivierung alternativer Signalwege anhand von Signal-Rückkopplungsschleifen verursacht werden.^{173,192}

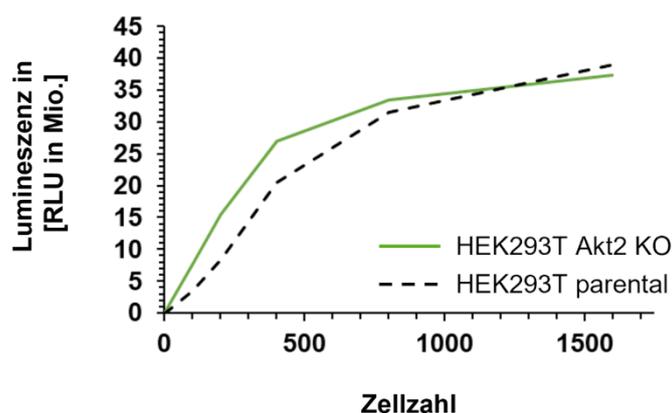


Abbildung 50: Darstellung der Anzahl der ausgesäten Zellen von HEK293T Akt2^{ko} (grün) und die daraus resultierenden Lumineszenzsignale nach Behandlung mit CTG-Lösung im Vergleich zum parentalen System (gestrichelte Linie, schwarz) nach einer 96-stündigen Inkubationszeit. Die Experimente wurden in einmaliger Ausführung (n = 1) durchgeführt.

Zusammenfassend konnten unter Anwendung des etablierten Protokolls *knock-outs* für alle drei Akt-Isoformen generiert werden. Im weiteren Verlauf sollten diese Zelllinien nun hinsichtlich der Akt-Isoform-spezifischen Signalübertragung sowie der Einflüsse auf die Phosphorylierung bekannter nachgeschalteter Proteine untersucht werden. Weiterhin sollte ein Vergleich mit Inhibitor-induzierten Einflüssen der Inhibitoren Borussertib und RL3341 erfolgen (Abbildung 51).

Die Immunoblots zeigen, dass sowohl Akt1 als auch Akt2 erfolgreich aus den Zellen entfernt werden konnten. Im Falle von tAkt3 zeigt sich ein schwaches verbliebenes Signal, wobei hier nicht ausgeschlossen werden kann, dass der tAkt3-Antikörper womöglich unspezifische Bindung an die zwei anderen Isoformen zeigt. Darüber hinaus konnten für die HEK293T-Zellen trotz mehrfacher Anpassung des Lyse- und Western Blot-Protokolls keine validen Ergebnisse mit Hilfe des pAkt3-Antikörpers erhalten werden. Aus diesem Grund wird die Akt3-*ko*-Zelllinie im weiteren Verlauf nicht näher diskutiert. Die Validierung dieser ist unter anderem Bestandteil der Masterarbeit von Fabian Schnecke. Die Behandlung mit den Inhibitoren Borussertib und RL3341 zeigt eine dosisabhängige Reduzierung der pAkt-Isoform-Signale, wobei sich für den Inhibitor RL3341 im Einklang mit der vorherigen biochemischen und zellulären Evaluierung im Ba/F3-Modellsystem eine deutliche Akt2-Selektivität erkennen lässt.

Diese Selektivität geht schließlich bei höheren Inhibitorkonzentrationen verloren und es werden sowohl Akt1 als auch Akt2 ausgeschaltet. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Immunoblot-Studien in den PANC1-Zellen lässt sich erkennen, dass die Selektivitätsprofile der Inhibitoren stark zwischen verschiedenen Zelllinien variieren. Während in den PANC1-Zellen bis zu einer Konzentration von 5 μ M RL3341 kein Effekt auf Akt1 zu beobachten ist, geht die Selektivität in den HEK293T-Zellen bereits bei einer Konzentration von 200 nM verloren. Dies könnte unter anderem auf die unterschiedlichen Expressionslevel, den spezifischen Aktivitätsstatus und die Funktionalisierung der Akt-Isoformen in verschiedenen Zelllinien zurückzuführen sein.^{170,193}

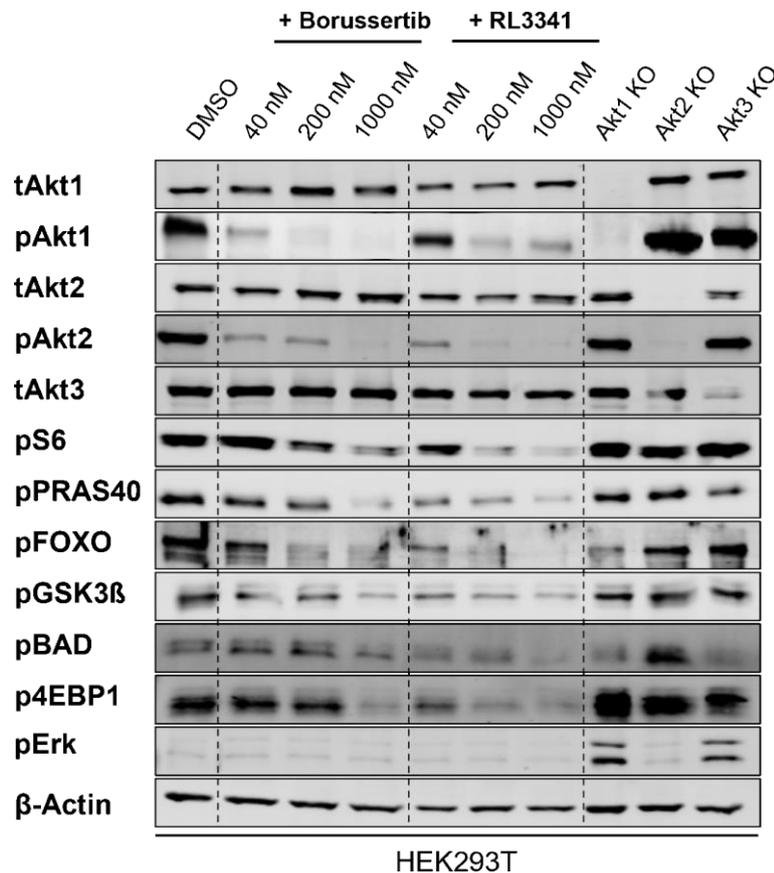


Abbildung 51: Immunoblot von Inhibitor-behandelten parentalen HEK293T im Vergleich zu HEK293T Akt-Isoform-knock-out-Zellen, die die molekularen Expressionsniveaus, Aktivitäten und Veränderungen von nachgeschalteten Proteinen von Akt zeigen (n = 1).

Bei der genauen Betrachtung verschiedener nachgeschalteter Proteine im Akt-Signalweg fällt auf, dass zumeist erst ein Effekt durch die Behandlung mit Borussertib und RL3341 beobachtet werden kann, sobald sowohl Akt1 als auch Akt2 ausgeschaltet sind (pS6, pPRAS40, p4EBP1). In der Literatur sind unterschiedlichste Kompensationsmechanismen für den Akt-Signalweg beschrieben. Dazu zählt unter anderem, dass die Akt-Isoformen Akt1 und Akt2 bei einer Koexpression im selben Zelltyp die Funktionen der jeweils ausgeschalteten Isoform übernehmen können.^{194,195} Dies würde den beobachteten Effekt erklären, müsste jedoch unter Kombination verschiedener Inhibitoren und *knock-outs* weiter evaluiert werden. Des Weiteren zeigen pGSK3 β und pBAD (engl. *Bcl-2-antagonist-of-cell-death*) eine gewisse Selektivität hinsichtlich einer Adressierung von Akt2. Mit Blick auf die *knock-out*-Zelllinien fällt besonders auf, dass keines der nachgeschalteten Proteine durch einen Akt1- oder Akt2-*knock-out* ein signifikant verringertes Phosphorylierungslevel aufweist. Im Gegensatz dazu zeigen pErk in Abwesenheit von Akt1 und pBAD in Abwesenheit von Akt2 ein stärkeres Signal. Dies deutet auf die Aktivierung von Rückkopplungsschleifen hin, welche zur Aktivierung alternativer Signalwege führen. Die invasive Entfernung des entsprechenden Gens ist ein massiver Eingriff in das biologische System. Dies kann die Aktivierung von Kompensationsmechanismen induzieren, welche schließlich dazu führen, dass keine vergleichenden Aussagen über den beobachteten Phänotyp getroffen werden können. Vor allem die parallel agierenden Ras-Erk- und PI3K-Akt-Signalwege können die Aktivität des jeweils anderen beeinflussen. Durch die genetische Blockierung werden vermutlich Kreuzhemmungen aufgehoben und der andere Signalweg wirksam aktiviert.^{173,192,196-199} Dies verdeutlicht die Vorteile einer zeitlich kontrollierbaren chemischen Perturbation gegenüber einer dauerhaften, invasiven genetischen Perturbation.

Zusammenfassend gelang die Etablierung eines robusten Protokolls für die Generierung von Akt-Isoform-*knock-outs* in HEK293T, welches zukünftig für vergleichende Studien zwischen Inhibitor- und *knock-out*-vermittelten Effekten in relevante Modelle, wie zum Beispiel Brustkrebs-abgeleitete Zelllinien²⁰⁰, übertragen werden sollte.

3.8 Kristallisation von Erk2

Der PI3K/Akt- und der Ras/Erk-Signalweg sind die zentralen Mechanismen in der humanen Zelle für die Kontrolle von Zellüberleben, Differenzierung, Proliferation und Metabolismus.

Die MAPK/Erk-Signalkaskade wird durch eine Vielzahl von Rezeptoren aktiviert, die an Wachstum und Differenzierung beteiligt sind, darunter Rezeptortyrosinkinasen (RTKs), Integrine und Ionenkanäle. Die spezifischen Komponenten der Kaskade variieren stark zwischen den verschiedenen Stimuli. Die Architektur des Signalwegs umfasst in der Regel eine Reihe von Adaptoren, die den Rezeptor mit einem Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (SOS, C3G) verbinden, der das Signal an kleine GTP-bindende Proteine (Ras, Rap1) weiterleitet. Diese aktivieren wiederum die Kerneinheit der Kaskade, die aus einer MAPKKK (Raf), einer MAPKK (MEK1/2) und MAPK (Erk1/2) besteht. Dabei zeigt Erk2 deutlich höhere Expressionslevel in Säugetieren als Erk1. Ein aktiviertes Erk-Dimer kann Ziele im Zytosol regulieren und auch in den Zellkern wandern, wo es eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren phosphoryliert, die die Genexpression regulieren.²⁰¹

In den letzten Jahrzehnten wurden extensive Studien zur Entwicklung gezielter niedermolekularer Inhibitoren des PI3K/Akt- oder MAPK/Erk-Signalweges durchgeführt.^{202,203} Der daraus resultierende klinische Nutzen ist jedoch begrenzt. Dies ist unter anderem auf die Kompensationsmechanismen zwischen diesen beiden Signalwegen und den daraus resultierenden Arzneimittelresistenzen zurückzuführen.²⁰⁴⁻²⁰⁶ Die simultane Adressierung der beiden Signalwege zeigte bereits vielversprechende Ergebnisse⁷⁴, stellt jedoch immer noch eine große Herausforderung dar. Weiterhin könnte die Kombination selektiver Liganden, die den PI3K/Akt- und den MAPK/Erk-Stoffwechselweg adressieren, die Aufklärung des komplexen PI3K/Akt-Ras/Erk-Netzwerks unterstützen.^{202,207}

Demnach sollte innerhalb dieser Arbeit zusätzlich ein valides Kristallisationssystem für die Proteinkinase Erk2 etabliert werden, welches anschließend als Grundlage für ein SBLD dienen sollte.

3.8.1 Reinigung des Erk2-Konstruktes

Von der Proteinkinase Erk2 existieren zahlreiche Kristallstrukturen in der PDB, welche als Ansatzpunkt für das Konstruktdesign herangezogen werden konnten. Basierend auf einem Sequenzvergleich einiger bereits publizierter Kristallisationskonstrukte (PDB: 4G6N, 4G6O, 6Q7K²⁰⁸, 4FV4, 6QAG²⁰⁸, 3W55²⁰⁹, 5WP1) wurde das Volllängenkonstrukt für die Kristallisation gewählt (hsErk2(1-360)), welches aus einer klassischen Kinasedomäne besteht. Das für die Expression in *E. coli* Codon-optimierte Gen wurde von *GeneArt* bezogen und in einen pET15b-Vektor kloniert, um dieses mit einem N-terminalen His₆-Tag und einer Thrombin-Schnittstelle auszustatten.²¹⁰****

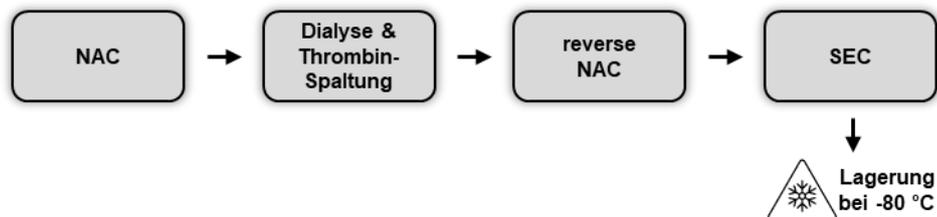


Abbildung 52: Darstellung der etablierten Reinigungsstrategien für Erk2. Zunächst erfolgt eine erste NAC gefolgt von einer Dialyse und Abspaltung des His₆-Tags mit Hilfe der Thrombin-Protease. Anschließend erfolgt eine reverse NAC und anschließend direkt eine SEC.²¹⁰ Anschließend wird das Protein entweder langfristig bei -80 °C gelagert oder mit Hilfe einer weiteren SEC in den Kristallisationspuffer überführt.

Nach der Expression in *E. coli*-Zellen und der Zellernte wurden diese mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators aufgeschlossen. Das Zellysate wurde auf eine NAC aufgetragen. Da das Erk2-Konstrukt einen N-terminalen His₆-Tag enthält, konnte dieses mit Hilfe einer NAC aus dem Zellysate isoliert werden.^{§§§§§} Auf dem SDS-Gel ist auf einer Höhe von etwa 40 kDa zu erkennen, dass das Zielprotein nach dem Zellaufschluss sowohl in unlöslicher als auch in löslicher Form vorliegt (Abbildung 53B).

**** Design des Erk2-Kristallisationskonstrukts durch Dr. Matthias Müller und Dr. Jörn Weisner (AG Rauh, TU Dortmund).

§§§§§ Expression und Reinigung von Erk2 durch Andreas Arndt und Paul Siebers (AG Rauh, TU Dortmund).

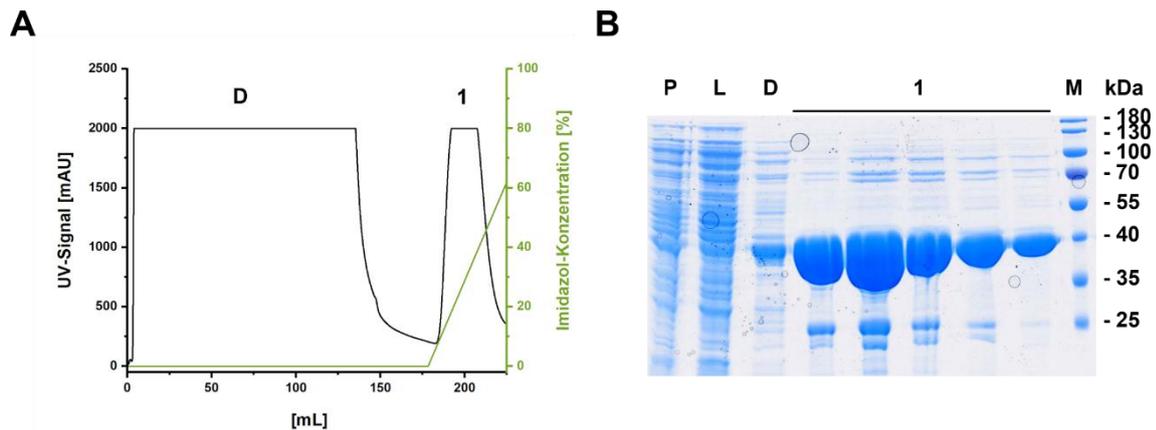


Abbildung 53: Erste NAC zur Reinigung von Erk. **A:** UV-Chromatogramm. UV-Signal (schwarz); Gradient der Imidazolkonzentration in % (grün). **B:** SDS-Gel. Pellet (P); Lysat (L); Durchfluss (D); Elutionspeak 1 (1); Marker (M).

Weiterhin lässt sich erkennen, dass im Durchfluss ebenfalls Protein vorhanden ist, was auf die große Menge an Protein zurückzuführen ist und auf eine Überschreitung der Säulen-Bindekapazität hindeutet. Nach der Elution mit einem linearen Imidazolgradienten konnte eine große Proteinmenge von der Säule eluiert werden. Dabei zeigten sich noch einige verbleibende höher- und niedermolekulare Verunreinigungen.

Diese sollten anschließend im Rahmen einer reversen NAC aus der Proteinlösung entfernt werden. Dafür wurde zunächst der N-terminale His₆-Tag mit der Thrombin-Protease abgespalten. Ein Vergleich vor und nach der Dialyse zeigt eine Verschiebung der Proteinbande zu einem niedrigeren Molekulargewicht, was auf eine erfolgreiche Abtrennung des His₆-Tags hindeutet. Dies wurde dadurch bestätigt, dass sich das Protein bei der Durchführung der reversen NAC im Durchfluss befindet. Nach einer Elution mit Imidazol wurde die Thrombin-Protease mit weiteren Verunreinigungen von der Säule eluiert, welche demnach erfolgreich abgetrennt werden konnten (Abbildung 54).

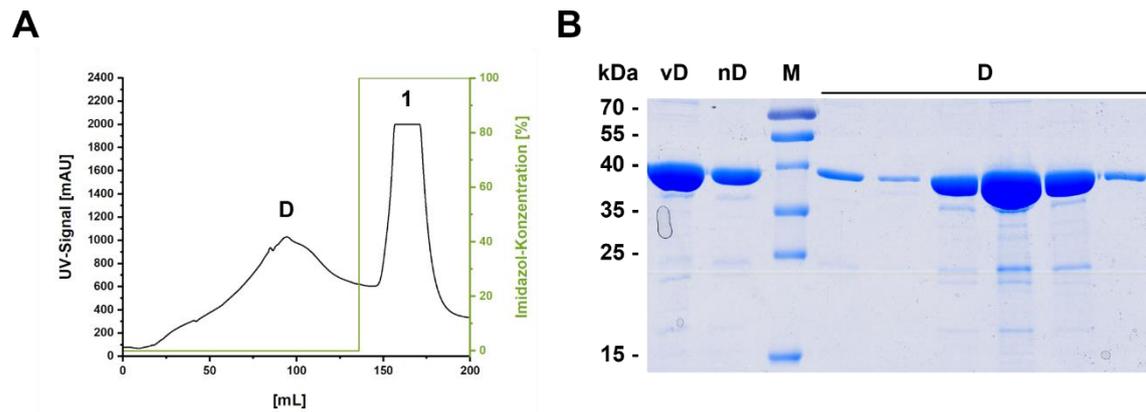


Abbildung 54: Zweite Nickel-Affinitätschromatografie zur Reinigung von Erk. **A:** UV-Chromatogramm. UV-Signal (schwarz); Gradient der NAC in % (grün). **B:** SDS-Gel. vD (vor Dialyse); nach Dialyse (nD); Marker (m); Durchfluss (D).

Mit einer SEC konnten schließlich verbleibende Verunreinigungen und Oligomere entfernt werden (Abbildung 55A und B). Erk2 wurde im Elutionspeak 2 mit einer sehr hohen Reinheit eluiert. Weiterhin bestätigte eine massenspektrometrische Analyse die korrekte Masse des Proteins. Im Allgemeinen konnte Erk2 in ausreichenden Mengen exprimiert und gereinigt werden, was eine optimale Voraussetzung für Kristallisationsstudien bietet.

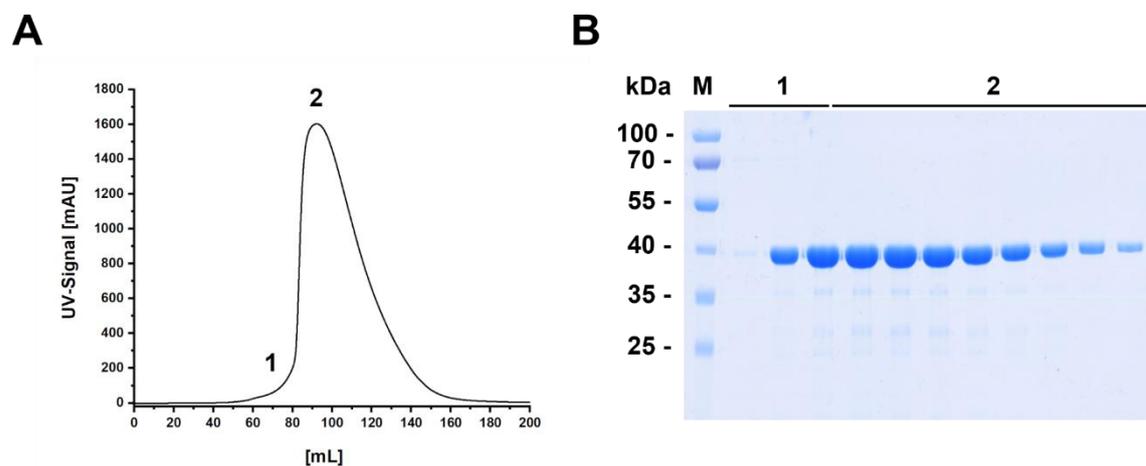


Abbildung 55: SEC zur Reinigung von Erk2. **A:** UV-Chromatogramm. UV-Signal (schwarz). **B:** SDS-Gel. Marker (M); Elutionspeak (1); Elutionspeak (2).

3.8.2 Kristallisation und Strukturaufklärung von Erk2

Zu Beginn wurden unterschiedlichste literaturbekannte Kristallisationsbedingungen getestet. Dafür wurde das Protein zunächst mit einer SEC in den Kristallisationspuffer überführt. Für die Ko-Kristallisation des Proteins mit verschiedenen Liganden wurde das Protein eine Stunde mit einem zweifachen Überschuss des entsprechenden Liganden inkubiert und nach einer anschließenden Zentrifugation direkt für die Kristallisation verwendet. Die Verwendung der Literaturbedingungen (PDB: 1PME)²¹¹ mit 100 mM HEPES pH 6,5 - 7,5, 200 mM Ammoniumsulfat, 20 mM β -Mercaptoethanol und 24 %-32 % PEG 2000 MME induzierte nach einer langen Zeit von etwa drei Monaten das Wachstum von großen Nadelkristallen mit dem Apo-Protein. Insgesamt zeigten die erhaltenen Kristalle sowohl bei 4 °C als auch bei 20 °C ein hohes Maß an Verwachsungen, sodass weiterführende Optimierungen nötig waren, um die Kristallqualität und die Nukleationszeit zu verkürzen. Durch die Variation unterschiedlicher Parameter wie Proteinkonzentration und Temperatur konnte keine Optimierung erreicht werden. Erst ein Wechsel der PEG-Variante von PEG 2000 MME auf PEG 4000 führt zum Wachstum von großen kubischen Einkristallen oder großen Kristallen mit moderaten Verwachsungen innerhalb von 5 Tagen, welche eine Separation einzelner Fragmente mit einer Nadel ermöglichten. Die Kristalle wurden nach etwa zwei Wochen mit einem Nylon-Loop aus dem Tropfen entnommen und bis zur Messung in flüssigem Stickstoff gelagert. Es wurde keine Cryolösung verwendet, was zukünftig einen weiteren Optimierungsansatz darstellen könnte, um die Qualität der vermessenen Daten zu erhöhen. Erk2 kristallisiert in der orthorhombischen Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$ mit den Zellkonstanten $a = 45 \text{ \AA}$, $b = 70 \text{ \AA}$, $c = 120 \text{ \AA}$ sowie $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$, $\gamma = 90^\circ$ und einem Molekül in der asymmetrischen Einheit.

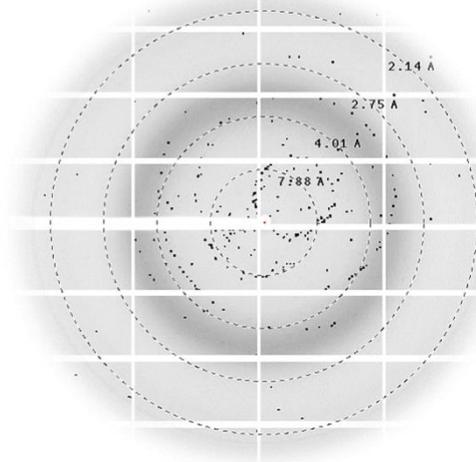
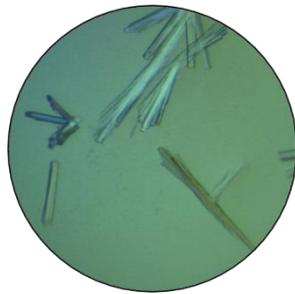
A

		PEG 4000 MME [%]				
		24 %	26 %	28 %	30 %	32 %
100 mM HEPES pH	6.5					
	7.0					
	7.5					

200 mM (NH₄)₂SO₄
20 mM β-ME

Temperatur: 20 °C
Proteinkonzentration: 14 mg/mL

B



C

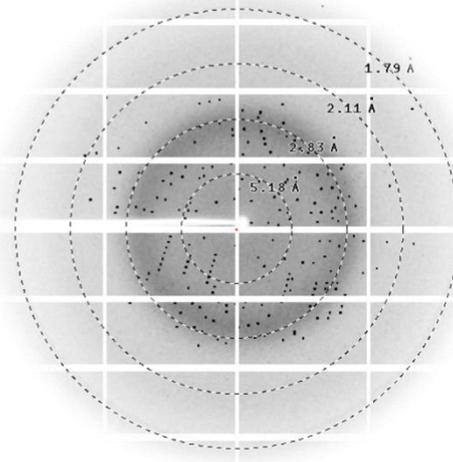
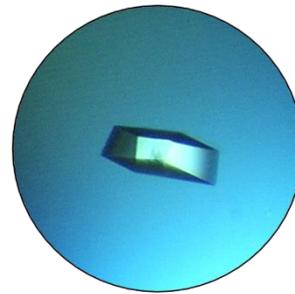


Abbildung 56: A: Verwendete Kristallisationsbedingungen für Erk2: 100 mM HEPES mit pH-Werten von 6,5 – 7,5, 200 mM (NH₄)₂SO₄ und 20 mM β-Mercaptoethanol sowie einer PEG 4000-Konzentration von 24-32 %. Inkubation von 14 mg/mL Protein bei 20 °C. B: Diffraktionsbild eines verwachsenen Erk2-Kristalls (100 mM HEPES, pH 6,5, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM β-Mercaptoethanol, 32 % PEG 2000 MME). C: Diffraktionsbild eines Erk2-Einkristalls (100 mM HEPES pH 6,5, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM β-Mercaptoethanol, 30 % PEG 4000).

Ein Vergleich der Diffraktionsbilder zeigte eine deutliche Verbesserung der Streuung zwischen den verwachsenen Erk2-Kristallen und den optimierten Erk2-Einkristallen (Abbildung 56A und B).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten so erfolgreich Erk2-Apo-Kristalle sowie Ko-Kristalle mit verschiedenen Inhibitoren erhalten werden. Die Kristalle zeigten am SLS eine sehr gute Auflösung von 1.7 Å - 2.0 Å und ermöglichten in der AG Rauh erstmalig die Lösung der Erk2-Apo-Struktur sowie im Komplex mit dem literaturbekannten Inhibitor Ulixertinib. Dies schafft optimale Bedingungen für weiterführende Experimente wie *Soaking* und für die Ko-Kristallisation diverser Erk2-Liganden und unterstreicht die Qualität der etablierten Reinigungsstrategie.

3.8.3 Strukturanalyse von Erk2

Die Regulation von Proteinkinasen im Allgemeinen wird durch unterschiedlichste Strukturelemente kontrolliert. Proteinkinasen weisen eine β -Faltblatt-reiche N-terminale und eine C-terminale Domäne auf, welche über die Scharnierregion verbunden sind. An der Scharnierregion ist die ATP-Bindetasche lokalisiert, welche aus konservierten für die Bindung und Katalyse von ATP essenziellen Strukturelementen zusammengesetzt ist. Die Scharnierregion ist für die korrekte Positionierung der Adenineinheit von ATP verantwortlich. Zu Beginn dieser befindet sich die sogenannte Türsteher-Aminosäure, welche durch ihren räumlichen Platzanspruch und die Ausrichtung die Zugänglichkeit der ATP-Bindungstasche und einer benachbarten hydrophoben Tasche reguliert. Die Glycin-reiche-Schleife (GxGxxG) befindet sich in der N-terminalen Domäne und ist für die Positionierung des β - und γ -Phosphats von ATP verantwortlich. Die regulatorische α C-Helix kann in einer sogenannten aktiven α C-in-Konformation vorliegen und in einer inaktiven α C-out-Konformation. In der α C-in-Konformation wechselwirkt ein Lys (Lys53 in Erk2) über eine Salzbrücke mit einem Asp (Asp71 in Erk2). Ein Aspartat agiert als katalytische Base und erleichtert die Deprotonierung des Substratproteins und somit den nukleophilen Angriff auf das γ -Phosphat von ATP. Die Aktivierungsschleife flankiert die katalytische Bindungstasche und reguliert dessen Zugänglichkeit.

Erfolgt die Phosphorylierung eines oder mehrerer Reste (Thr183 und Tyr185 in Erk2) wird eine konformationelle Änderung induziert. In der phosphorylierten aktiven Konformation befindet sich das am Anfang der Aktivierungsschleife lokalisierte DFG-Motiv (Asp-Phe-Gly) in der sogenannten DFG-*in*-Konformation. Das Phe wechselwirkt über hydrophobe Interaktionen mit der α C-Helix und das Asp ragt in die ATP-Bindetasche hinein und koordiniert zwei Mg^{2+} -Ionen, welche wiederum die β - und γ -ständigen Phosphatgruppen von ATP positionieren. Im inaktiven Zustand (DFG-*out*) hingegen ragt die Phe-Seitenkette in die ATP-Bindungstasche hinein und die Aspartat-vermittelte Positionierung der terminalen Phosphatgruppen ist nicht mehr gewährleistet.²¹²⁻²¹⁶ Erk2 weist dieselben konservierten soeben beschriebenen strukturellen Kinase-Eigenschaften auf (Abbildung 57A).²¹⁷ Die Positionen der katalytischen Reste unterscheiden sich allerdings zwischen dem phosphorylierten Protein und dem nicht-phosphorylierten Protein sowie der gelösten Struktur kaum und gleichen der aktiven Konformation der meisten Proteinkinasen (Abbildung 57B, DFG-*out* und α C-Helix-*in*).^{218,219}

Deshalb ist besonders der Phosphorylierungszustand ein wichtiger Indikator dafür, ob aktives oder inaktives Erk2 vorliegt. Die Umwandlung des inaktiven Erk2 in die aktive Form erfordert die Phosphorylierung von zwei Resten innerhalb der Aktivierungsschleife, die von MEK1/2 katalysiert wird. Diese beiden Reste liegen in der Sequenz Thr-Glu-Tyr. MEK1/2 vermittelt zunächst die Phosphorylierung des Tyrosinrestes in der Erk2 Aktivierungsschleife. Tyrosin-phosphoryliertes Erk2 dissoziiert von MEK1/2 und reassoziert dann mit der gleichen oder einer anderen aktiven MEK1/2, die dann die Phosphorylierung des Threonins der Aktivierungsschleife katalysiert.^{201,220} Die publizierten Kristallstrukturen von Erk2 zeigen eine wesentliche Konformationsänderung der Aktivierungsschleife nach Phosphorylierung an den regulatorischen Stellen Thr183 und Tyr185 (Abbildung 57C). Das pThr183 bildet nun ionische Kontakte mit der N-terminalen Domäne aus, wodurch die N-terminale und C-terminale Domäne näher zueinander positioniert werden und die Ausrichtung von pTyr185 erlaubt die Beteiligung an der Substraterkennung.^{217,220}

In der in dieser Arbeit erhaltenen Erk2-Struktur ist die Aktivierungsschleife nicht aufgelöst, demnach lässt sich vor allem über die fehlenden, mittels Massenspektrometrie untersuchten, Phosphorylierungen am Thr183 und Tyr185 auf eine inaktive Konformation dieser schließen (Anhang, Abbildung 75).

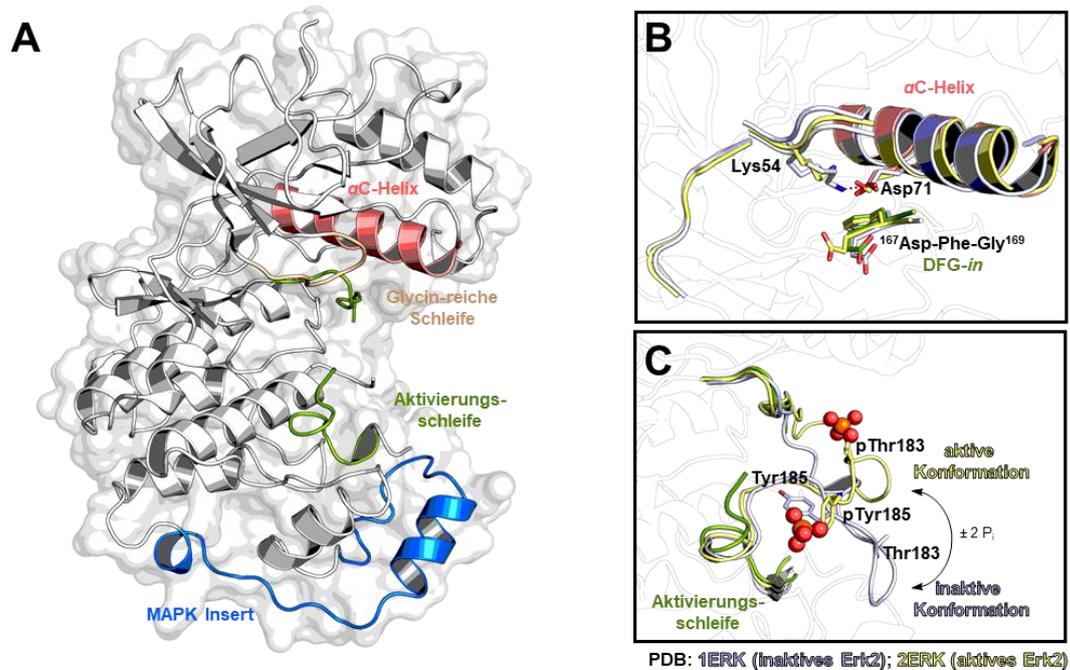


Abbildung 57: Vergleich der erhaltenen Erk2-Apo-Struktur (1.95 Å) mit publizierten Erk-Apo-Strukturen. **A:** Darstellung der sich in der inaktiven Konformation befindenden Erk2-Apo-Kristallstruktur. Die wichtigen regulatorischen Elemente sind farblich gekennzeichnet. **B:** Vergleich der Beschaffenheit der katalytischen Tasche mit Erk2 in der inaktiven (PDB: 1ERK)²¹⁷ und in der aktiven (PDB: 2ERK)²²⁰ Konformation **C:** Vergleich der Konformation der Aktivierungsschleife mit Erk2 in der inaktiven und in der aktiven Konformation.

Die Komplexstruktur mit dem ATP-kompetitiven Inhibitor Ulixertinib (PDB: 6GDQ) zeigt die in der Literatur bereits beschriebene Bindung des Inhibitors in der ATP-Bindetasche und bestätigt den Bindungsmodus.²¹⁰ Das DFG-Motiv befindet sich in der DFG-*in*-Konformation und Asp167 wechselwirkt mit der Hydroxylgruppe des Inhibitors. Die Isopropylaminopyridin-Gruppe wechselwirkt mit dem Rückgrat von Met108, während die Carbonylgruppe eine Wasserstoffbrücke zum Lys54 ausbildet. Weiterhin lässt sich eine Anion- π - π -Interaktion zwischen einem Chloratom des Inhibitors und Tyr36 und Tyr64 feststellen (Abbildung 58).

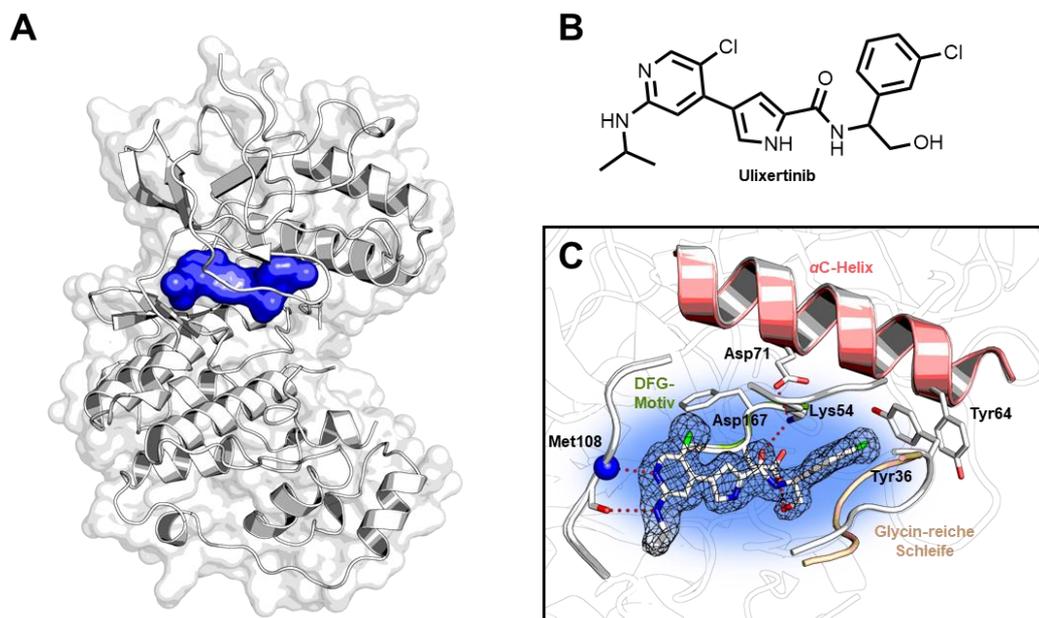


Abbildung 58: **A:** Übersicht über Erk2 ko-kristallisiert mit dem ATP-kompetitiven Inhibitor Ulixertinib (1.7 Å). **B:** Chemische Struktur des ATP-kompetitiven Inhibitors Ulixertinib. **C:** Vergleich der gelösten inaktiven Apostruktur (α C-Helix in rosa, Glycin-reiche Schleife in beige, DFG-Motiv in grün) mit der an Ulixertinib gebundenen aktiven Erk2-Struktur (hellgrau). Die 2Fo-Fc-Elektronendichtekarte ist auf $\sigma = 1,0$ konturiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein robustes System für das strukturbasierte Design von Erk2-Inhibitoren etabliert werden. Bereits mit Hilfe initialer Experimente konnten verwachsene Kristalle erhalten werden, welche sich zur Lösung der ersten Erk2-Kristallstruktur innerhalb der AG Rauh eigneten. Weiterhin konnten die Kristallisationsbedingungen hinsichtlich der resultierenden Kristallmorphologie und -dauer optimiert werden und es konnten Proteinstrukturen mit einer Auflösung von 1.7 Å – 2.0 Å erhalten werden. Dies legt eine optimale Grundlage für die strukturbasierte Entwicklung effizienter Liganden und ermöglicht zum Beispiel ein Fragment-basiertes *Screening* unter Verwendung der *Soaking*-Methode. Trotzdem wäre es zukünftig von Interesse alternative Bedingungen zu identifizieren, welche die Kristallisation der aktiven, phosphorylierten Form von Erk2 und somit einen Vergleich der beiden Zustände im Hinblick auf die Liganden-Bindung erlauben. Insgesamt leistet die Etablierung des Kristallisationssystems für Erk2 einen wichtigen Beitrag für ein SBLD und somit ebenfalls für die Entwicklung von effizienten Strategien einer simultanen Adressierung der Signalwege PI3K/Akt und MEK/Erk.

4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Genomische Veränderungen innerhalb des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs, wie zum Beispiel aktivierende Mutationen in PI3K und Amplifikationen der AKT-Gene, können eine Hyperaktivierung der Akt-Isoformen (Akt1/Akt2/Akt3) und damit einhergehend diverse Krankheiten auslösen.⁴⁴ Allerdings ist ein Großteil der klinischen Studien potenzieller Wirkstoff-Kandidaten, trotz intensiver Forschung in den letzten Jahrzehnten, gescheitert. Dies ist vor allem auf die fehlenden Informationen über die Isoform-spezifischen Funktionen im Kontext von humanen Erkrankungen zurückzuführen.⁷² Um diese Hürden zu überwinden und tiefgreifende Einblicke in das komplexe Signalnetzwerk der Akt-Isoformen zu erhalten, eignen sich vor allem gezielte Perturbationsstudien mit selektiven chemischen Werkzeugen.^{58,59} Allerdings stellt es eine große Herausforderung dar Liganden mit geeigneter Selektivität für homologe Proteine zu entwickeln. Hier hat sich vor allem das SBLD in zahlreichen Beispielen als geeignete Methode qualifiziert.^{98,99}

Für die Evaluierung Akt-Isoform-selektiver Liganden standen zu Beginn dieser Arbeit weder strukturelle noch zelluläre Systeme zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit gelang es durch die Etablierung ebendieser Systeme das Fundament für ein SBLD Isoform-selektiver kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren (CAAI) zu legen.

Zunächst konnte mit Hilfe von Homologiemodellen und *AlphaFold* ein detaillierter Sequenz- und Strukturvergleich der Akt-Isoformen verwirklicht werden. Die Verfügbarkeit der Zielproteine in ausreichenden Mengen und hoher Reinheit ist unerlässlich für die Durchführung biochemischer und -physikalischer, sowie struktureller Experimente. Basierend auf der vorgenommenen Strukturanalyse und einem fundierten Konstruktdesign konnten effiziente Expressions- und Reinigungsstrategien für Akt2 und Akt3 entwickelt werden. Diese legten die Grundlage für weiterführende Untersuchungen.

Im Gegensatz zu Akt1 konnten bisher noch keine Vollängerkristallstrukturen von Akt2 und Akt3 gelöst werden, was daraufhin deutet, dass es sich dabei um eine besonders große Herausforderung handelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden umfangreiche Kristallisationsstudien an Akt2 und Akt3 durchgeführt, welche schließlich zur Identifizierung vielversprechender Kristallisationsbedingungen führten. Weiterhin konnten tiefgreifende Erkenntnisse über die Isoform-spezifischen strukturellen Eigenschaften erlangt werden, welche für den Prozess der Kristallisation hinderlich sind und überwunden werden müssen. Hier stellen vor allem die generierten Akt2-Linker-Varianten einen attraktiven Startpunkt für weitere Studien dar.

Die zu diesem Zeitpunkt fehlenden, über die Genauigkeit von computerbasierten Modellen hinausgehenden, Strukturinformationen hinsichtlich der allosterischen Bindetaschen der Akt-Isoformen, erforderte die Entwicklung von effizienten Alternativen. Mit Hilfe einer Imitation der Akt2-Interdomänen-Bindetasche in Akt1 konnte ein einzigartiger Einblick in die Akt2-Bindetasche erhalten werden. In Kombination mit biochemischen und massenspektrometrischen Daten sowie einer fokussierten Substanzbibliothek aus vorherigen Arbeiten¹¹² konnte so der Homologiemodell-abgeleitete CAAI-Designansatz untermauert werden. Für die Adressierung von Akt1 ist vor allem die amidische Verknüpfung der 5'-Substituenten elementar. Akt3 bevorzugt vor allem sterisch anspruchsvolle und aromatische Reste. Akt2 scheint einen Hybrid-ähnlichen Charakter zu besitzen und toleriert sowohl größere Reste als auch Amid-Linker. Dies ist vermutlich durch eine erhöhte Flexibilität der durch die 5'-Substitution adressierten Region in Akt2 zu erklären. Dabei ist zu beachten, dass die erhaltenen Ergebnisse durch die Generierung weiterer Kristallstrukturen bestätigt werden sollten, welche die aufgestellten Hypothesen stützen oder widerlegen. Zukünftig wäre die Übertragung dieses Konzeptes der Bindetaschen-Imitation auf Akt3 ebenfalls interessant.

Die Ableitung dieser interessanten SAR mündete schließlich in der Identifizierung von CAAs mit guten Selektivitätsprofilen, die in weiterführenden zellulären Studien evaluiert werden sollten. Um dies zu ermöglichen, wurde ein Ba/F3-Akt-Isoform-abhängiges Modellsystem etabliert, welches das Verhalten einer onkogenen Zelllinie mimikriert und so als optimales System für die Bewertung unterschiedlicher Selektivitäten fungiert.

Mit Hilfe dieses Modellsystems konnten die identifizierten biochemischen Selektivitätsprofile der fokussierten Substanzbibliothek erstmalig in den zellulären Kontext übertragen werden. Diese Ergebnisse dienten als Grundlage für weiterführende Studien dreier vielversprechender Inhibitoren in der humanen Krebszelllinie PANC1. Mit Hilfe von CETSA-Experimenten gelang die Validierung einer selektiven Stabilisierung der Akt-Isoformen. Zusätzlich konnte ein robustes Protokoll für die Einführung CRISPR/Cas9-vermittelter *knock-outs* in humane Zellen etabliert werden. Diese Methode stellt eine Erweiterung des zur Verfügung stehenden Werkzeugkastens für die vergleichende Evaluierung von Isoform-selektiven CAAs dar. Abschließend konnten zelluläre Studien schließlich die Vorteile dieser gegenüber invasiven genetischen *knock-outs* zur Entschlüsselung Akt-Isoform-spezifischer Funktionen zeigen.

Darüber hinaus gelang die Etablierung eines Kristallisationssystems für die Kinase Erk2. Es konnten erfolgreich Erk2-Konstrukte hergestellt, exprimiert und gereinigt werden, welche anschließend als Grundlage für die Reproduktion literaturbekannter Kristallisationsbedingungen dienten. Nach erfolgreichen Röntgenbeugungsexperimenten konnten erstmals Erk2-Kristallstrukturen in der AG Rauh gelöst werden, die zukünftig das strukturbasierte Design von effizienten Inhibitoren ermöglichen werden.

Aus den hier präsentierten Ergebnissen ergeben sich nun verschiedene Ansatzpunkte. Auf der einen Seite eignen sich die evaluierten selektiven CAAs für funktionelle Studien vor allem für Akt1 und Akt2 und könnten in Kombination mit biologisch-genetischen Ansätzen tiefgreifende Erkenntnisse vorantreiben. Auf der anderen Seite eignen sich die etablierten Systeme im Rahmen eines SBLD für die iterative und effiziente Optimierung der hier gezeigten Moleküle. Dies legt die Grundlage für die Entwicklung selektiver Wirkstoffkandidaten, welche dabei helfen könnten durch eine pan-Akt-Adressierung auftretende Nebenwirkungen bei therapeutischen Behandlungen zu umgehen.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1 Allgemeine Anmerkungen

Die verwendeten Chemikalien wurden alle mit analytischem Reinheitsgrad von den Firmen Alfa Aesar, Acros Organics, Carl Roth, Fluka, Life Technologies, Merck Millipore, Sigma-Aldrich oder VWR bezogen.

5.1.1 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Produktname / Hersteller
Dialyseschlauch	Spectra/Por MWCO 12-14 kDa, Carl Roth
FPLC-Säulen	Ni-NTA Superflow Catridge, Qiagen HiTrap Q HP, Cytiva MonoQ 5/50 GL, Cytiva HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, Cytiva Superdex 75 Increase 10/300 GL, Cytiva
Kristallisationsplatten	EasyXtal 15-well Tool X-Seal, NeXtal Biotechnologies 96-well sitting drop iQ plates, TTP Labtech
Kristallisations-Screens	JCSG Core I-IV Suites, Qiagen PACT Suite, Qiagen PEGI-II Suites, Qiagen MemGold I-II Suites, Qiagen AmSO ₄ Suite, Qiagen Opti-Salts Suite, Qiagen Additive HT, Hampton Research Silver Bullets, Hampton Research
Mikrotiterplatten	MicroWell 96 well PS, F-Boden, transparent, Nunc

	Zellkultur Microplatte, <i>384 well</i> , PS, F-Boden, weiß, TC, Greiner Bio-One
Objektträger	<i>Countess™</i> Zellzählungs-Kammerobjektträger, Invitrogen
PVDF-Membran	Immobilon-FL PVDF Membran, 0,45 µM, Merck Millipore
Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S, 0,45 µM, Sarstedt Filtropur S, 0,2 µM, Sarstedt
Zentrifugalkonzentratoren	Vivaspin 6/20 MWCO 30 kDa, Sartorius
Zellkulturflaschen	TC25/TC75/TC175-Flaschen Standard, Sarstedt
Zellkulturplatten	TC-Platte <i>6 well</i> , Standard, F, Sarstedt TC-Platte <i>24 well</i> , Standard, F, Sarstedt

5.1.2 Verwendete Geräte

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Produktname / Hersteller
CO ₂ -Inkubatoren	CB 150, WTB Binder
Fluoreszenz- <i>Imager</i>	Odyssey CLx Imaging System, LI-COR Biosciences
FPLC	ÄKTA <i>pure</i> , Cytiva
Gelelektrophorese-Systeme	Mini-PROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad, Hercules Mini-PROTEAN® Tetra Cell, Bio-Rad, Hercules
Hochdruckhomogenisator	M-110L Microfluidizer, Microfluidics
Inkubatoren	MaxQ™ 8000, Thermo Fisher Scientific
Kristallisationsplatten- <i>Imager</i>	Rock Imager 1000, Formulatrix
LC-MS-System	Velos Pro Dual-Pressure Lineare-Ionenfallen- Massenspektrometer, Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplatten-Pipettiergerät	Multidrop Combi Reagenzien-Dispenser, ThermoFisher Scientific
Mikrotiterplatten-Lesegerät	EnVision 2104 Multilabel Plattenleser, PerkinElmer Infinite M1000, Tecan
Mikroskope	EVOS FLoid, Thermo Fisher Scientific EVOS XL Core, Thermo Fisher Scientific
Pipetten	Research plus, Eppendorf Xplorer, Eppendorf
Pipettierroboter	LCP-Mosquito, TTP Labtech
Echtzeit PCR-Zyklus	Lightcycler 480 Instrument II, Roche
Rotoren	Sorvall SA 600, FiberLite F20-6x100, FiberLite F8-6x1000y, Thermo Fisher Scientific
Röntgengenerator	D8 Venture Diffraktometer, Röntgenquelle: I μ S 3.0, Detektor: Photon II, Bruker
Spektralphotometer	NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific
Sterilbank	Herasafe KS12/K“18, Thermo Fisher Scientific

Thermozykler	Mastercycler PRO, Eppendorf
Thermoschüttler	ThermoMixer C, Eppendorf
Transfer-Powersystem	Pierce Power Station, Thermo Fisher Scientific
Tröpfchendispensierer	Echo 520 Liquid Handler, LabCyte
Zellzähler	Countess II, Invitrogen
Zentrifugen	Zentrifuge 5804R/5424/5424R, Eppendorf
	Sorvall Evolution RC, Thermo Fisher Scientific

5.1.3 Verwendete Proteine, Reagenzien und Medien

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Proteine, Reagenzien und Medien.

Bezeichnung	Produktname / Hersteller
BCA Protein Assay Kit, Pierce	Thermo Fisher Scientific
CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Chameleon Duo Pre-Stained Protein Ladder	LI-COR Biosciences
cOmplete ULTRA Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
DPBS-Puffer	Gibco, Invitrogen
FBS Good/Good Forte	PAN-Biotech
FBS, EU <i>approved</i>	Gibco, Invitrogen
Intercept (TBS) <i>Protein-Free Blocking Buffer</i>	LI-COR Biosciences
Interleukin 3, murin	PeproTech
Lipofectamin 3000	Thermo Fisher Scientific
Medien	DMEM, <i>high glucose</i> , GlutaMax, Gibco, Invitrogen RPMI-1640 GlutaMax, Gibco, Invitrogen Sf-900 III SFM, Gibco, Invitrogen
Odyssey Blocking Buffer, TBS	LI-COR Biosciences
One Taq Hot Start DNA Polymerase	New England Biolabs
Phusion <i>High-Fidelity</i> DNA-Polymerase	New England Biolabs
<i>PageRuler Plus Prestained Protein Ladder</i> , 10-250 kDA	Thermo Fisher Scientific
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Invitrogen
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
Polybren Infektionsreagenz	Merck Millipore
Puromycin-Dihydrochlorid	Gibco, Invitrogen

<i>QIAamp DNA Mini Kit</i>	Qiagen
<i>QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	Qiagen
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Qiagen
Restriktionsenzyme <i>BamHI-HF, DpnI, EcoRI, HindIII-HF, NcoI, NdeI, XhoI</i>	New England Biolabs
RIPA-Puffer	Cell Signaling Technologies
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
TransIT-LT1 Transfektionsreagenz	Mirus Bio LLC
Trypan Blue Stain (0,4 %)	Invitrogen
Trypsin-Protease, Pierce, MS Grade	Thermo Fisher Scientific
Trypsin-EDTA, Phenolrot (0,25 %)	Gibco, Invitrogen

5.1.4 Bakterienstämme und Zelllinien

Tabelle 6: Auflistung der verwendeten Bakterienstämme und Zelllinien.

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

5.1.5 Antikörper

Tabelle 7: Auflistung der verwendeten Antikörper.

Epitop	Spezies	Verdünnung	Produktnummer / Hersteller
primäre Antikörper			
β -Actin	Hase	1:5000	#4970 Cell Signaling Technologies
β -Actin	Maus	1:5000	A5441 / Sigma-Aldrich
tAkt	Hase	1:1000	#2920 / Cell Signaling Technologies
tAkt1	Hase	1:1000	#2938 Cell Signaling Technologies
tAkt2	Hase	1:1000	#3063 Cell Signaling Technologies
tAkt3	Hase	1:1000	#14982 Cell Signaling Technologies
pAkt1 ^{Ser473}	Hase	1:1000	#9018 Cell Signaling Technologies
pAkt2 ^{Ser474}	Hase	1:1000	#8599 Cell Signaling Technologies
pAkt3 ^{Ser471}	Hase	1:1000	PA5-12898 / Sigma-Aldrich
pBAD ^{Ser136}	Hase	1:1000	#4366 Cell Signaling Technologies
pErk1/2 ^{Thr202/Tyr204}	Hase	1:2000	#4370 Cell Signaling Technologies
pFoxO1/FoxO3 ^{Thr24/Thr32}	Hase	1:500	#9464 Cell Signaling Technologies

pGSK3 β ^{Ser9}	Hase	1:1000	#5558 Cell Signaling Technologies
PARP/cPARP	Hase	1:1000	#9542 Cell Signaling Technologies
pPRAS40 ^{Thr246}	Hase	1:1000	#2997 Cell Signaling Technologies
pS6 ^{Ser235/236}	Hase	1:2000	#4858 Cell Signaling Technologies
p4E-BP1 ^{Ser65}	Hase	1:1000	#13443 Cell Signaling Technologies

sekundäre Antikörper

Anti-Maus IgG, DyLight 680 Conjugate	Ziege	1:15000	#5470 Cell Signaling Technologies
Anti-Hase IgG, DyLight 800 4X PEG Conjugate	Ziege	1:15000	#5151 Cell Signaling Technologies

5.2 Computerbasierte Methoden

5.2.1 Sequenzvergleich

Der Sequenzvergleich der drei Akt-Isoformen (Akt1_HUMAN P31749, Akt2_HUMAN, P31751, Akt3_Human Q9Y243) wurde mit dem Clustal Omega Webserver (EMBL-EBI) durchgeführt.

5.2.2 Homologiemodelle

Die Akt2- und Akt3-Homologiemodelle wurden mit dem online verfügbaren Server SWISS-MODEL auf der Grundlage der Akt1-Vollängen Ko-Kristallstruktur (PDB: 6S9X) sowie den Akt2_HUMAN, P31751 und Akt3_Human Q9Y243 Sequenzen durchgeführt.

5.3 Molekular- und Mikrobiologische Methoden

5.3.1 Klonierung mittels Restriktion und Ligation

5.3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation des Geninserts nach dem Restriktions-/Ligationsprotokoll wurde das folgende Protokoll für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet.

Tabelle 8: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes bei der Amplifikation des Geninserts für das Restriktions-/Ligationsprotokoll.

Reaktionsansatz	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
100 ng Templat-DNA	1x Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
1 µL <i>forward</i> -Primer (5 µM)	Denaturierung	98 °C	10 s
1 µL <i>reverse</i> -Primer (5 µM)	30x Annealing	65 °C	30 s
4 µL Phusion Puffer HF	Elongation	72 °C	105 s
0,4 µL dNTP-Mix	1x Finale Elongation	72 °C	10 min
0,2 µL Phusion DNA-Polymerase	1x Halten	4 °C	∞
auf 20 µL mit ddH ₂ O auffüllen			

Nach der PCR wurde dem Reaktionsansatz 1 μL *DpnI* zugegeben, um die methylierte Templat-DNA abzubauen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.3.1.2 Restriktionsverdau

Um die für die Subklonierung benötigten spezifischen DNA-Überhänge zu generieren, wurde im Anschluss an die PCR sowohl der Zielvektor als auch das zuvor amplifizierte Geninsert mit den entsprechenden Restriktionsenzymen für 3 h bei 37 °C inkubiert. Die Reinigung der Restriktionsansätze erfolgte mit dem *QIAquick PCR-Purification Kit*.

Tabelle 9: Zusammensetzung der Reaktionsansätze für den Restriktionsverdau.

	PCR-Produkt	Vektor
Templat-DNA	45 μL	2 μL
Restriktionsenzym I	1 μL	1 μL
Restriktionsenzym II	1 μL	1 μL
CIP	-	1 μL
CutSmart Puffer (10x)	6 μL	4 μL
mit ddH ₂ O auffüllen	auf 40 μL	auf 60 μL

5.3.1.3 Ligation

Zur Insertion des Geninserts in den Zielvektor wurde der in Tabelle 10 aufgeführte Ligationsansatz bei 37 °C für 3 h oder bei 16 °C über Nacht bei 300 rpm inkubiert.

Tabelle 10: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Ligation.

	PCR-Produkt
Zielvektor	10 ng
Insert	50 ng
T4 DNA Ligase	1 μL
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	2 μL
mit ddH ₂ O auffüllen	auf 20 μL

Anschließend erfolgte gemäß den Angaben in Abschnitt 5.3.4 eine Transformation des gesamten Ligationsansatzes in chemisch kompetente *E. Coli XL10 Gold* Zellen.

5.3.2 QuickChange-Mutagenese

5.3.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur zielgerichteten Einbringung verschiedener Mutationen mit Hilfe der *QuickChange*-Mutagenese wurde das folgende Protokoll für die Polymerase-Kettenreaktion verwendet.

Tabelle 11: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes für das *QuickChange* Mutagenese-Protokoll.

Reaktionsansatz	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
100 ng Templat-DNA	1x Initiale Denaturierung	98 °C	30 s
1 µL <i>forward</i> -Primer (1 µM)	Denaturierung	98 °C	10 s
1 µL <i>reverse</i> -Primer (1 µM)	30x Annealing	55 - 70 °C	30 s
4 µL Phusion Puffer GC	Elongation	72 °C	105 s
0,4 µL dNTP-Mix	1x Finale Elongation	72 °C	10 min
0,2 µL Phusion DNA-Polymerase	1x Halten	4 °C	∞
auf 20 µL mit ddH ₂ O auffüllen			

Anschließend erfolgte gemäß den Angaben in Abschnitt 5.3.4 eine direkte Transformation des gesamten PCR-Ansatzes in chemisch kompetente *E. Coli XL10 Gold* Zellen.

5.3.3 Reinigung von PCR-Produkten

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

5.3.4 Transformation chemisch kompetenter *E. Coli*

Das erhaltene Ligationsprodukt oder *QuickChange* Mutagenese-PCR-Produkt wurde mittels Hitzeschock in chemisch kompetente *E. coli XL10 Gold* Zellen eingebracht. Dazu wurden zunächst 100 µL der *E. coli* Zellen mit dem entsprechenden Produkt versetzt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Die Transformation der Zellen erfolgte anschließend durch den Hitzeschock bei 42 °C für 1 min. Nach 5-minütiger Regeneration der Zellen auf Eis wurden zur Initiierung des Zellwachstums 100 µL LB-Medium zum Transformationsansatz hinzugegeben und bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die transformierten Zellen wurden nach Inkubation zentrifugiert (1 min, 5000 rpm), in 100 µL LB-Medium resuspendiert und auf einer LB-Ampicillin-Agar Platte über Nacht bei 37 °C selektiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden zur Plasmidvervielfältigung jeweils eine Übernachtskultur angefertigt. Die aufgenommene Kolonie wurde in 5 mL LB-Medium, versetzt mit 5 µL Ampicillin (Verhältnis 1:1000), über Nacht bei 37 °C kultiviert.

5.3.5 Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurden von der LB-Agarplatte Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in ein PCR-Gefäß überführt. Für die PCR wurde die in Tabelle 12 dargestellte Zusammensetzung und Reaktionsbedingung verwendet.

Tabelle 12: Zusammensetzung des PCR-Reaktionsansatzes für die Kolonie-PCR.

Reaktionsansatz	Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer
Material von einzelner Kolonie	1x Initiale Denaturierung	94 °C	30 s
0,125 µL <i>forward</i> -Primer (5 µM)	Denaturierung	94 °C	10 s
0,125 µL <i>reverse</i> -Primer (5 µM)	30x Annealing	65 °C	30 s
5 µL One-Tag Puffer (5x)	Elongation	68 °C	105 s
0,5 µL dNTP-Mix	1x Finale Elongation	68 °C	10 min
0,125 µL One-Tag DNA-Polymerase	1x Halten	4 °C	∞
auf 25 µL mit ddH ₂ O auffüllen			

5.3.6 Isolierung von Plasmid-DNA

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

5.3.7 DNA-Sequenzierung

Zur Verifizierung der hergestellten Plasmidkonstrukte wurde eine DNA-Sequenzierung durch *Eurofins Genomics* durchgeführt.

5.3.8 Agarosegelelektrophorese

Zur Größenseparation von DNA-Proben wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde 1 % (w/v) Agarose in 1 x TBE-Puffer durch Erhitzen gelöst und SYBR Safe (Verhältnis 1:10000) zur Anfärbung von Nukleinsäuren zugefügt. Anschließend wurden die mit 1 x OrangeG versetzten DNA-Proben sowie der Marker DNA Ladder 1kb aufgetragen und in einem elektrischen Spannungsfeld von 110 V für 1 h separiert. Die Visualisierung der DNA erfolgte mit dem Gel-Dokumentationssystem Gel Doc™ XR+ (BioRad).

5.4 Heterologe Proteinexpression in *E. Coli*

Für die heterologe Expression der Erk-Konstrukte in *E. coli* wurden zunächst chemisch kompetente BL21 (DE3) *E. coli*-Zellen mit dem Plasmid pET-15b (His6-Thrombin-Erk2(1-360)) und dem Plasmid pET-41a (GST-3C-MEK1DD-His8) mit Hilfe der Hitzeschock-Methode ko-transformiert (Abschnitt 4.3.4) und anschließend auf LB-Agarplatten mit 100 µg/mL Ampicillin und 34 µg/mL Kanamycin selektiert. Zur Herstellung einer Vorkultur wurden 50 mL TB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin und 34 µg/mL Kanamycin versetzt mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Nach 18 h wurden aus den Vorkulturen die Hauptkulturen bestehend aus TB-Medium mit 100 µg/mL Ampicillin und 34 µg/mL Kanamycin angesetzt und bei 37 °C und 160 rpm inkubiert. Nachdem eine OD₆₀₀ von 0,5 – 0,6 erreicht war, wurden die Kulturen zunächst auf 20 °C abgekühlt und anschließend mit 0,5 mM IPTG induziert. Nachfolgend wurden die Kulturen für weitere 18 h bei 20 °C und 160 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation bei 4000 g für 20 min und 4 °C. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

5.5 Insektenzellkultivierung

Für die Proteinexpression in Insektenzellen wurde zunächst eine Transfektion der Insektenzellen nach dem BacMagic-Protokoll (Merck Millipore) mit den entsprechenden pLEX/Bac3-Transfervektoren sowie die Generierung des Baculovirus der zweiten Generation durch die *Protein Chemistry Facility* (PCF, MPI Dortmund) durchgeführt. Der P2-Virus wurde lichtgeschützt bei 4 °C für mehrere Monate gelagert. Die Insektenzellkultivierung wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt und die Zelldichte und -viabilität alle zwei bis drei Tage mittels Trypanblau-Färbung überprüft. Für die Subkultivierung wurde die Zelldichte auf $1-2 \cdot 10^6$ Zellen/mL eingestellt. Als Nährmedium für die Sf9- und Tnao38-Zellen wurde das Sf-900 III SFM Medium (Gibco) verwendet und die Zellen bei 27 °C in sterilen Erlenmeyerkolben bei 110 rpm inkubiert.

5.5.1 Virusamplifikation

Für die heterologe Expression der Zielproteine in Insektenzellen muss zunächst der Virustiter des P2-Virus durch Amplifikation erhöht werden. Dazu wurden 100 mL Zellsuspension mit einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL mit 40 µL des P2-Virus versetzt und für 4 Tage bei 27 °C und 120 rpm inkubiert. Bei Erreichen einer Zellviabilität von 60-80 % wurde der P3-Virus durch Zentrifugation der Zellsuspension bei 4 °C, 3000 g für 10 min und anschließender Filtration des Virusenthaltenden Überstandes (0,45 µM Spritzenvorsatzfilter, Sarstedt) geerntet.

Der P3-Virus wurde bis zum Ansetzen der Expressionskultur für mehrere Wochen lichtgeschützt bei 4 °C gelagert.

5.5.2 Heterologe Proteinexpression in Insektenzellen

Die heterologe Proteinexpression in Insektenzellen wurde in 1,5 L Volumen in 5 L Erlenmeyerkolben durchgeführt. Dafür wurde die Zellsuspension zunächst auf $3 \cdot 10^6$ Zellen/mL verdünnt, mit 50 mL P3-Virus versetzt und anschließend für 3 Tage bei 27 °C und 120 rpm inkubiert. Die Zellernte erfolgte mittels Zentrifugation bei 3000 g und 4 °C für 20 min. Nach dem Waschen des Zellpellets mit kaltem PBS (1x), wurde dieses mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

5.6 Proteinreinigung und biochemische Methoden

5.6.1 Reinigung der Akt-Konstrukte

5.6.1.1 Zellyse

Für die Zellyse der Protein-enthaltenden Sf9-Zellen wurden diese zunächst in 5 mL Lysepuffer pro Gramm Pellet resuspendiert. Nach Zugabe einer Protease-Inhibitor Cocktail-Tablette (Roche) wurde die Zellsuspension für 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde der Zellaufschluss mit Hilfe eines Hochdruckhomogenisators (3 Durchgänge) durchgeführt. Um die unlöslichen Zellbestandteile abzutrennen, wurde das Lysat für eine Stunde bei 4 °C und 17000 rpm zentrifugiert und anschließend mit einem 0,45 µm Spritzenfilter filtriert.

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

5.6.1.2 Nickel-Affinitätschromatographie

Nach dem Zellaufschluss wurde eine Nickel-Affinitätschromatographie (ni-NTA Superflow Cartridge, Qiagen) durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit 1,5 Säulenvolumen 0,5 M Natronlauge und Wasser gewaschen. Im Anschluss an die Äquilibration mit 1,5 SV Waschpuffer, wurde das Zellysat mit 2 mL/min auf die Säule aufgetragen.

Im nächsten Schritt wurde die Säule mit Waschpuffer gewaschen, bis sich konstante UV- und Leitfähigkeitssignale eingestellt haben. Mit Hilfe des Elutionspuffers und einer Schlagelution auf zunächst 250 mM Imidazol bei 2 mL/min wurden die gebundenen Proteine von der Säule eluiert. Um verbleibende Proteine von der Säule zu lösen, wurde erneut eine Schlagelution mit 500 mM Imidazol durchgeführt. Nach Analyse der SDS-Gelelektrophorese wurden die Zielprotein-enthaltenen Fraktionen für die nächsten Reinigungsschritte vereint.

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

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

5.6.1.3 TEV-Proteaseverdau und Dialyse

Die Abspaltung des His₆-Tags wurde mit Hilfe der TEV-Protease realisiert. Dazu wurde die Proteinlösung mit 1 mg TEV-Protease pro 15 mg Protein versetzt und für 18 h bei 4 °C gegen den Dialysepuffer dialysiert.

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

5.6.1.4 Reverse Nickel-Affinitätschromatographie

Um die His₆-Tag-enthaltende TEV-Protease aus der Proteinlösung zu entfernen, wurde im nächsten Schritt eine reverse Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt. Dazu wurde die Säule entsprechend Abschnitt 5.6.1.2 vorbereitet. Um während der Dialyse entstandene Schwebstoffe aus der Proteinlösung zu entfernen, wurde diese zunächst für 10 min bei 21000 g und 4 °C zentrifugiert und anschließend mit 2 mL/min auf die Säule aufgetragen. Mit Hilfe einer Schlagelution mit 500 mM Imidazol wurden die gebundenen Proteine eluiert und es folgte eine Analyse der Fraktionen mit einer SDS-Gelelektrophorese. Zielprotein-enthaltende Fraktionen wurden für die weiteren Schritte vereint.

5.6.1.5 Anionenaustauschchromatographie

Die Anionenaustauschchromatographie-Säule (HiTrap Q HP bzw. Mono Q 5/50 GL, Cytiva) wurde nach der Äquilibrierung nach Herstellerangaben mit einem Fluss von 1 mL/min mit der Proteinlösung beladen. Der Dialysepuffer wurde als Äquilibrierungspuffer verwendet und die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 0-500 mM über einen Zeitraum von 45 min und anschließender Schlagelution mit 1 M NaCl. Die Fraktionen wurden per SDS-Gelelektrophorese analysiert und Zielprotein-enhaltende Fraktionen wurden mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentrators (Vivaspin 20, MWCO 30 kDa, Sartorius) auf ein Volumen von 1 mL eingengt. Die Akt2- und Akt3-Konstrukte wurden zusätzlich dephosphoryliert. Dies wurde durch Ko-Inkubation mit der λ -Phosphatase bei 4 °C über Nacht erreicht (λ -Phosphatase 1:20 Zielprotein).

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

5.6.1.6 Erste Größenausschlusschromatographie

Für die Durchführung der ersten Größenausschlusschromatographie wurde die Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, Cytiva) zunächst nach Herstellerangaben äquilibriert und die Proteinlösung wurde zentrifugiert (21000 g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand auf die Säule geladen und mit einem Fluss von 1 mL/min aufgetrennt. Die Zielprotein-enhaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert und vereinigt. Es erfolgte eine Aufkonzentration des Proteins mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentrators auf 4-6 mg/mL. Das Protein wurde nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff langfristig bei -80 °C gelagert.

Gelfiltrationspuffer:

Akt1 und Akt2: 50 mM HEPES, 200 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, pH 7.3

Akt3: 25 mM HEPES, 50 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, pH 6.8

5.6.1.7 Zweite Größenausschlusschromatographie

Die zweite Größenausschlusschromatographie dient zur Umpufferung in den Kristallisationspuffer sowie der Entfernung von Oligomeren. Die Proteinlösung wurde erneut zentrifugiert (21000 g, 10 min, 4 °C) und auf die nach Herstellerangaben äquilibrierte Gelfiltrationssäule (Superdex 75 10/300 GL Increase, Cytiva) geladen. Die Auftrennung erfolgte mit einem Fluss von 0,4 mL/min.

Lagerungspuffer:

Akt1: 25 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, 5 mM DTT, pH 7.5

Akt2: 25 mM Tris, 100 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerol, pH 7.0

5.6.2 Reinigung der Erk-Konstrukte

5.6.2.1 Zelllyse

Für die Zelllyse der Protein-enthaltenden *E. coli*-Zellen wurden diese zunächst in 5 mL Lysepuffer pro Gramm Pellet resuspendiert. Nach Zugabe einer Protease-Inhibitor Cocktail-Tablette (Roche) wurden die Zellen mit Hilfe eines Hochdruck-homogenisators (3-5 Durchgänge) lysiert. Um die unlöslichen Zellbestandteile abzutrennen, wurde das Lysat für eine Stunde bei 4 °C und 17000 rpm zentrifugiert und anschließend mit einem 0,45 µm Spritzenfilter filtriert.

Lysepuffer: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 2 mM DTT, pH 8.0

5.6.2.2 Nickel-Affinitätschromatographie

Nach dem Zellaufschluss wurde eine Nickel-Affinitätschromatographie (Ni-NTA Superflow Cartridge, Qiagen) durchgeführt. Zunächst wurde die Säule mit 1,5 Säulenvolumen 0,5 M Natronlauge und Wasser gewaschen. Im Anschluss an die Äquilibrierung mit 1,5 SV Waschpuffer, wurde das Zellysat mit 2 mL/min auf die Säule aufgetragen. Im nächsten Schritt wurde die Säule mit Waschpuffer gewaschen, bis sich konstante UV- und Leitfähigkeitssignale eingestellt haben. Mit Hilfe des Elutionspuffers und einem kurzen Gradienten zu 100 % Elutionspuffer in 20 min wurden die gebundenen Proteine von der Säule eluiert.

Nach Analyse der SDS-Gelelektrophorese wurden die Zielprotein-enthaltenen Fraktionen für die nächsten Reinigungsschritte vereint.

Waschpuffer: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, 2 mM DTT, pH 8.0

Elutionspuffer: 50 mM Tris, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 5 % (v/v) Glycerol, 2 mM DTT, pH 8.0

5.6.2.3 Thrombin-Proteaseverdau

Die Abspaltung des His₆-Tags wurde mit Hilfe der Thrombin-Protease durchgeführt. Dazu wurde die Proteinlösung mit katalytischen Mengen Thrombin versetzt und für 18 h bei 4 °C gegen den Dialysepuffer dialysiert.

Dialysepuffer: 50 mM Tris, 20 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 2 mM DTT, pH 8.0

5.6.2.4 Reverse Nickel-Affinitätschromatographie

Um das His₆-Tag-enthaltende Thrombin aus der Proteinlösung zu entfernen, wurde im nächsten Schritt eine reverse Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt. Dazu wurde die Säule entsprechend Abschnitt 5.6.2.2 vorbereitet. Anschließend wurde das Lysat mit 2 mL/min auf die Säule geladen. Mit Hilfe einer Schlagelution mit 500 mM Imidazol wurden die gebundenen Proteine eluiert und es folgte eine Analyse der Fraktionen mit einer SDS-Gelelektrophorese. Zielprotein-enthaltende Fraktionen wurden für die weiteren Schritte vereint.

5.6.2.5 Größenausschlusschromatographie

Für die Durchführung der ersten Größenausschlusschromatographie wurde die Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, Cytiva) zunächst nach Herstellerangaben äquilibriert und die Proteinlösung wurde zentrifugiert (21000 g, 10 min, 4 °C). Anschließend wurde der Überstand auf die Säule geladen und mit einem Fluss von 1 mL/min aufgetrennt. Die Zielprotein-enthaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese analysiert und vereinigt.

Es erfolgte eine Aufkonzentration des Proteins mit Hilfe eines Zentrifugalkonzentrators auf 10-15 mg/mL. Das Protein wurde nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff langfristig bei -80 °C gelagert.

Gelfiltrationspuffer:

20 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 % (v/v) Glycerol, 5 mM DTT, pH 7.5

Kristallisationspuffer:

20 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7.5

5.6.3 Proteinstabilitätsassay

Die Stabilität der Proteine in verschiedenen Puffersystemen wurde mit Hilfe des *Thermal Shift Assays* (TSA) untersucht. Dazu wurden 2 µL des Proteins mit einer Konzentration von 1 mg/mL zusammen mit 16 µL des entsprechenden Puffers (bei Verwendung des *Solubility and Stability-Screens* von Hampton Research 11 µL ddH₂O und 5 µL Puffer) und 2 µL eines SYPRO Orange Farbstoffes in eine 96-well-Lightcycler-Platte (Sarstedt) pipettiert. Diese wurde anschließend mit einer Folie luftdicht verschlossen und zentrifugiert. Der TSA wurde mit Hilfe des Lightcycler 480 Instrument II (Roche) durchgeführt. Die thermische Stabilität wurde mit Hilfe einer schrittweisen Erhöhung der Temperatur von Raumtemperatur bis auf 85 °C innerhalb von 40 min beobachtet. Anschließend wurde das erhaltene Fluoreszenzsignal gegen die Temperatur aufgetragen und es wurde der Schmelzpunkt T_m mit dem Programm Origin bestimmt. Um den Einfluss einer Bindung eines Liganden zu untersuchen, wurde das Protein vor der Durchführung des TSA 1h mit einem dreifachen molaren Überschuss des entsprechenden Liganden auf Eis inkubiert.

5.6.4 Bestimmung der Kinaseaktivität

Die Bestimmung der Kinaseaktivität wurde mit Hilfe des *homogeneous time-resolved fluorescence energy-transfer* (HTRF) -Assays durchgeführt. Dafür wird ein für die jeweilige Kinase geeignetes an Biotin gekoppeltes Substratpeptid verwendet.

Anschließend wird ATP, ein Fluorophor-gekoppelter Antikörper, welcher das phosphorylierte Substrat bindet und ein Fluorophor-gekoppeltes Streptavidin hinzugegeben. Sobald Streptavidin an das Biotin bindet wird durch die räumliche Nähe der Fluorophore ein strahlungsfreier Resonanzenergie transfer induziert. Dieser Vorgang wird durch die Messung des Fluoreszenzsignals verfolgt und quantifiziert. Es wurden auf einer 384-*well*-Platte 0,098 ng – 1600 ng Protein vorgelegt. Es erfolgte die Zugabe von 5 µL Startlösung auf die Platte, welche anschließend geschüttelt und zentrifugiert wurde. Nach 30-minütiger Inkubation in einer Feuchtekammer unter Lichtausschluss wurden jeweils 10 µL Stopplösung hinzugegeben. Die Platte wurde erneut geschüttelt, zentrifugiert und dann 60 min inkubiert. Das Fluoreszenzsignal wurde mit Hilfe des EnVision (PerkinElmer) ausgelesen und mit dem Programm Origin ausgewertet.

Startlösung (400 µL): 390,4 µL Puffer, 2 µM TKP (1,6 µL), 200 µM ATP (8 µL).

Stopplösung (800 µL): 394 µL Detektionspuffer, 400 µL Antikörper, 125 nM SA-XL665 (6 µL).

5.7 Strukturbiologische Methoden

Die Zielproteine wurden direkt nach der finalen Größenausschlusschromatografie der Proteinreinigung für die Kristallisation verwendet oder nach der Lagerung bei -80 °C zügig aufgetaut und erneut mit einer Größenausschlusschromatografie (Superdex 75 Increase 10/300 GL, Cytiva) von denaturiertem Protein und Oligomeren abgetrennt.

5.7.1 Kristallisations-Screenings

Um potenzielle Kristallisationsbedingungen für die Zielproteine zu finden, wurden kommerzielle *Screens* (JCSG Core I-IV Suites, PACT Suite, PEG I-II Suites, MemGold I-II Suites, AmSO4 Suite, Classics Suite, Classics II Suite, Qiagen) durchgeführt. Dafür wurden 96-*well* TTP Labtech IQ Platten verwendet, welche die Dampfdiffusionsmethode des sitzenden Tropfens ermöglichen. Es wurden jeweils 70 µL der entsprechenden Reservoirlösung auf der Platte vorgelegt und anschließend jeweils 0,1 µL Reservoirlösung mit 0,1 µL Proteinlösung mit Hilfe des Pipettierroboters Mosquito Crystal (TTP Labtech) in einem Tropfen vereint.

Dieser Vorgang erfolgte stets in einem feuchten Milieu, um das schnelle Austrocknen der Tropfen zu verhindern und die Platte wurde nachfolgend mit einer durchsichtigen Folie luftdicht verschlossen. Die Platten wurden anschließend in den Rock *Imager* 1000 (Formulatrix) geladen und dort mit Hilfe eines Kamerasystems regelmäßig überprüft.

5.7.2 Microseeding

Für das *Microseeding* wurden die zu optimierenden Kristalle mit einem Kristallzerkleinerer (Hampton Research) zerstoßen. Die dabei entstandenen Proteinkristallfragmente wurden mit der Pipette aufgenommen und in ein Behältnis des *Seed Bead Kits* (Hampton Research) überführt. Dieses enthält eine Kugel welche beim vortexen, das weitere zerkleinern der Kristallfragmente unterstützt. Die *Seeding*-Lösung wurde dreimal für eine Minute gevortext und anschließend direkt auf Eis gestellt. Es wurden mit Hilfe der Reservoirlösung unterschiedliche Verdünnungen hergestellt, welche beim Ansetzen von Kristallisationstropfen mit der Proteinlösung (1 μ L) und der Reservoirlösung (0,8 μ L) vermischt wurden.

5.7.3 Kristallisation in *Fine Screens*

Für die Optimierung gefundener Kristallisationsbedingungen wurden *Fine Screens* verwendet. Dafür wurde die entsprechende Reservoir-Lösung in 15-*well*-Kristallisationsplatten (EasyXtal 15-*well* Tools XSeal, Qiagen) pipettiert und auf einem Schüttler vermischt. Nach der Dampfdiffusionsmethode des hängenden Tropfens wurden je 1 μ L der Reservoir-Lösung mit 1 μ L der Proteinlösung auf einem Deckel vermischt und anschließend luftdicht auf die, die entsprechende Reservoirlösung enthaltende, Vertiefung geschraubt. Die Inkubation der Kristallisationsplatten erfolgte bei unterschiedlichen Temperaturen und das Kristallwachstum wurde in regelmäßigen Abständen untersucht. Die entstandenen Ko-Kristalle des Akt1^{Wt} im Komplex mit verschiedenen Inhibitoren wurden mit Hilfe eines Nylon-Loops aus dem Tropfen entnommen, in einen Tropfen einer 40 %-igen Ethylenglykol-Lösung eingetaucht und in flüssigem N₂ eingefroren und gelagert.

Kristallisationsbedingungen Akt1^{wt} und pLD13: 12-24 % PEG 2000 MME, 1,25 mM Na-Acetat, 3,75 mM Na-Citrat, pH 6.5-7.5, 3 mg/mL Akt1^{wt}, 18 °C

Kristallisationsbedingungen Erk2: PEG 2000 MME, 200 mM (NH₄)₂SO₄, 100 mM HEPES, pH 6,5-7,5, 10 mg/mL Erk2, 18 °C

5.7.4 Datensammlung und Prozessierung

Die aus den Tropfen entnommenen Kristalle wurden zunächst mit Hilfe des verfügbaren Röntgendiffraktometers (D8 Venture Diffraktometer, I μ S 3.0 Röntgenquelle, Photon II Detektor, Bruker) getestet und entsprechend der gemessenen Diffraktion für die Vermessung am *Swiss Light Synchrotron* (PSI, Villigen, Schweiz) ausgesucht. Die Datensätze wurden an der PXII X10SA Röntgenquelle mit dem Eiger X 9M Detektor bei 100 K und einer Wellenlänge von 1 Å aufgenommen. Die Integration und Indexierung der Datensätze wurde mit dem Programm XDS durchgeführt und die anschließende Skalierung mit dem Programm XSCALE.^{221,222} Für den molekularen Ersatz zur Erhaltung eines Proteinmodells wurde das Programm PHASER eingesetzt. Dabei dienten eigens gelöste Kristallstrukturen als Templat.²²³ Mit Hilfe des Programms WINCOOT wurde das erhaltene Modell modifiziert und mit dem Programm PHENIX verfeinert.²²⁴⁻²²⁶ Die Liganden wurde mit Hilfe einer Koordinaten- und einer Topologie-Datei mit dem Programm ELBOW eingebaut.²²⁶ Der PDB_REDO Server wurde zur Validierung der Kristallstrukturen eingesetzt.²²⁷ Die Visualisierung der Proteinstrukturen im Komplex mit verschiedenen Inhibitoren und die Strukturanalyse im Rahmen dieser Arbeit erfolgte abschließend mit Hilfe von PyMol.²²⁸

5.8 Zellbiologische Methoden

Alle zellbiologischen Arbeiten mit humanen Zellen wurden unter sterilen Bedingungen auf einer Sterilbank durchgeführt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Es wurden alle 2-4 Tage Subkulturen der Zelllinie angefertigt. Alle verwendeten Medien, Puffer und Reagenzien wurden vor Gebrauch autoklaviert oder steril erworben.

5.8.1 Zellkultivierung

Für das Anlegen von Subkulturen adhärenter Zellen aus einer 70-90 % konfluenten Zellpopulation wurde zunächst Kulturmedium, DPBS und 0,25 %-iges Trypsin-EDTA (Gibco), auf 37 °C im Wasserbad vorgewärmt. Das alte Kulturmedium wurde verworfen und die Zellen mit 10 mL warmem DPBS gewaschen. Anschließend wurden 2,5 mL Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben. Die T75-Zellkulturflasche (Sarstedt) wurde für 5 min im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Durchlichtmikroskop wurde überprüft, ob die Zellen durch die Behandlung mit der Trypsin-EDTA-Lösung erfolgreich vom Boden der Zellkulturschale abgelöst wurden. War dies nicht der Fall wurde die Inkubationszeit um zwei Minuten verlängert. Das Trypsin wurde durch die Zugabe von 8 mL warmem Kulturmedium inaktiviert. Die Zellzahl pro Milliliter in der Suspension wurde anschließend mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung bestimmt. Für die neue Subkultur wurden je nach Wachstumsgeschwindigkeit $4 \cdot 10^5$ bis $6 \cdot 10^5$ Zellen in eine neue Zellkulturflasche unterschiedlicher Größen pipettiert, in die vorab 9,5 mL warmes Kulturmedium vorgelegt wurden. Die Inkubation erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ für 3-4 Tage. Suspensionskulturen wurden zunächst per Zentrifugation (1000 rpm, 5 min) pelletiert und das alte Kulturmedium wurde entfernt. Nach einer Aufnahme in warmem, frischem Kulturmedium wurde die Zellzahl wie oben beschrieben bestimmt. Für die neue Subkultur wurden 1×10^6 bis $4 \cdot 10^6$ Zellen in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die Inkubation erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ für 2-3 Tage.

5.8.2 Inkulturnahme von Säugerzellen

Die Inkulturnahme von in Kryogefäßen (2 mL, Sarstedt) konservierten Säugerzellen erfolgte durch das rasche Auftauen der Zellsuspension in einem Wasserbad bei 37 °C. Daraufhin wurde die Zellsuspension in 10 mL warmes Kulturmedium überführt, bei 1000 rpm 5 min zentrifugiert und erneut in 10 mL warmem Kulturmedium aufgenommen und in eine T75-Zellkulturflasche überführt. Nach einer Inkubation von 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Die weitere Kultivierung erfolgte wie in Kapitel 5.8.1 beschrieben.

5.8.3 Kryokonservierung von Säugerzellen

Ein essenzieller Schritt für die Kryokonservierung von Säugerzellen ist die Verwendung von Säugerzellen aus frühen Passagen. Diese wurden, wie in Kapitel 5.8.1 beschrieben, zunächst entweder von der Zellkulturflaschenoberfläche abgelöst oder per Zentrifugation geerntet. Im Anschluss wurden die Zellen in Kulturmedium versetzt mit 10 % DMSO aufgenommen und in sterile Kryogefäße überführt ($1-2 \cdot 10^6$ Zellen/mL). Das Einfrieren erfolgte mit einem Gefrierbehälter gefüllt mit Isopropanol (Mr. Frosty Thermo Fisher Scientific) bei -80 °C mit einer Kühlrate von -1 °C/min . Am folgenden Tag wurden die Kryogefäße bei -150 °C für eine langfristige Lagerung eingefroren.

5.8.4 Viabilitätsassay

Um den Effekt von Inhibitoren auf die Zellproliferation unterschiedlicher Zellen evaluieren zu können wurde der CellTiter-Glo Assay von Promega verwendet. Die Bestimmung der Zellviabilität beruht dabei auf der Quantifizierung des in den Zellen vorhandenen ATPs als Indikator für metabolisch aktive Zellen. Die Zugabe des CTG-Reagenzes führt zur Lyse der Zellen und einer ATP-proportionalen Lumineszenz-Reaktion. Das Lumineszenzsignal wird durch die enzymatische Umwandlung von Luciferin zu lumineszierendem Oxyluciferin durch das Enzym Luciferase erzeugt, welches Mg^{2+} , O_2 sowie ATP als Cofaktoren zur Aktivität benötigt. Folglich wurde das CTG-Reagenz auf Grund der hohen Lichtsensitivität möglichst wenig Lichteinstrahlung ausgesetzt.

Zunächst muss eine Bestimmung der optimalen Zellzahl erfolgen, um eine Vergleichbarkeit zwischen unterschiedlich schnell wachsenden Zelllinien gewährleisten zu können. Dafür wurden die Zellen wie in Kapitel 4.8.1 beschrieben, passagiert und anschließend wurden Suspensionslösungen mit den gewünschten Zell-Konzentrationen hergestellt. Mit dem Multidrop Combi Reagent Dispenser wurden die Konzentrationsreihen auf eine 384 *well* Platte ausgesät und für 5 Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Die Zugabe des CTG-Reagenzes (Verhältnis 1:1) erfolgte nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur und das Auslesen mit Hilfe des EnVision Managers.

Aus dem linearen Wachstumsbereich jeder Zelllinie wurde die optimale Zellzahl für den Zellviabilitätsassay ermittelt (Ba/F3^{myr-Akt1}: 600 Zellen/*well*, Ba/F3^{myr-Akt2}: 800 Zellen/*well*, Ba/F3^{myr-Akt3}: 800 Zellen/*well*).

Die Zellsuspension mit der ermittelten optimalen Zellzahl wurde auf eine 384-*well* Platte mit dem Multidrop Combi Reagent Dispenser ausgesät. Nach 24 h Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) erfolgte die Zugabe der Inhibitoren in Duplikaten in serieller Verdünnung (30 µM bis 0,1 nM) mit dem Echo 520 Liquid Handler (Labcyte). Nach weiteren 96 h Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) erfolgte das Auslesen der Zellviabilität wie zuvor durch Zugabe des CTG-Reagenzes (Verhältnis 1:1) mit dem Multidrop Combi Reagent Dispenser und 20 min Inkubation bei Raumtemperatur mit Hilfe des EnVision Managers. Die Quantifizierung der Daten sowie die Analyse der EC₅₀-Werte erfolgte mit der Software Quattro.

5.8.5 Proteinstabilitätsassay in Zellen (CETSA)

Um die direkte Bindung der Inhibitoren an das Zielprotein in der Zelle untersuchen zu können, wurde ein *Cellular Thermal Shift Assay* (CETSA) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen (PANC1) zunächst gemäß Kapitel 5.8.1 passagiert und es wurden 10⁶ Zellen in 100 mm Zellkulturschalen ausgesät. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen sowie DMSO als Kontrolle behandelt. Nach 4,5 h wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers geerntet. Die erhaltene Zellsuspension wurde in 100 µL Aliquots aufgeteilt, welche anschließend mit Temperaturen von 40 – 80 °C im Thermocycler behandelt wurden. Dies erfolgte für 3 min, gefolgt von einer 3-minütigen Inkubation bei Rt. Die thermisch behandelten Zellen wurden nun zweimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und in einem Heizblock bei Rt wieder aufgetaut. Nach einer Zentrifugation von 20 min bei 15000 rpm wurde das Zellysate in ein neues Gefäß überführt und im weiteren Verlauf mittels Western Blots analysiert.

5.8.6 Generierung von Zelllysaten

Zur Generierung von Zelllysaten wurden die Zellen zunächst gemäß Kapitel 5.8.1 passagiert und in 2 mL Kultivierungsmedium in einer 6-well Platte ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24-48 h inkubiert. Die Zellen wurden mit DMSO (Verhältnis 1:1000) oder verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen behandelt und inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen in Suspensionskultur in ein 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, und 5 min bei 4 °C und 1000 rpm zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen. Die Extraktion der Proteine wurde durch die Resuspension des Zellpellets in 100 µL RIPA-Puffers als Lyse-Detergens-Lösung inklusive Protease-Inhibitor zur Vorbeugung der Proteolyse und Instandhaltung der Phosphorylierung sowie 20 min Inkubation auf Eis durchgeführt. Adhärente Zellen wurden zunächst zweimal mit 10 mL kaltem PBS gewaschen und dann 20 min mit 100 µL RIPA inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte mit einem Zellschaber und anschließender Überführung in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß. Zur Abtrennung der löslichen Proteine von den übrigen Zellrückständen wurde die Lösung für 10 min bei 4 °C und 15000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und direkt zur Konzentrationsbestimmung innerhalb des BCA-Assays verwendet oder in Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

5.8.7 Western Blots

Zur Proteinkonzentrationsbestimmung der Zelllysate wurde die Methode des Bicinchoninsäure-Assays (BCA-Assay) unter Verwendung des Pierce BCA Protein-Assay Kit durchgeführt. Dazu wurden jeweils 200 µL Puffer A und Puffer B (Verhältnis 50:1) in eine 96-well-MicroPlatte vorgelegt und mit je 1 µL der Lysatproben in Triplikaten versetzt. Als Hintergrundsubstrat wurde der RIPA-Puffer und als Referenzprotein BSA (Triplikate mit 1µL, 2µL und 3µL) verwendet.

Nach 1-2 h Inkubation bei 37 °C tritt abhängig von der Proteinkonzentration ein Farbumschlag der Pufferlösung von grün nach lila auf, der über Absorption bei 280 nm mit Hilfe des TECAN gemessen wird.

Anschließend konnte durch lineare Regression des Referenzproteins eine Standardkurve ermittelt und anhand der erhaltenen Absorptionswerte der Lysatproben die Proteinkonzentration berechnet werden.

Zur Größenauftrennung der Proteine der Zelllysate wurde eine SDS-Page angefertigt. Dazu folgte auf Basis der ermittelten Proteinkonzentrationen der Zelllysate eine einheitliche Verdünnung der Proben auf 1 mg/mL mit 4x SDS-Proben-Puffer und Wasser sowie deren Denaturierung bei 95 °C für 10 min. Anschließend wurden je 10-20 µg Protein sowie 4 µL des Chameleon Du Prestained Protein Ladders in einem 12 %-igen SDS-Gel bei einer konstanten elektrischen Spannung von 30 mA für 1 h größenspezifisch separiert.

Für den Western-Blot wurden die größenseparierten Proteine von dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran transferiert. Zunächst wurde die PVDF-Membran für 2 min in Methanol aktiviert, in Wasser gewaschen und anschließend zusammen mit dem Filterpapier in Transferpuffer für mindestens 5 min äquilibriert. Die Membran und das SDS-Gel wurden zwischen zwei Filterpapieren in die Elektroden der Pierce Power Blot Cassette eingespannt und die Proteine mittels des Mixed Range MW (25-150 kDa) Programms elektrophoretisch auf die PVDF-Membran transferiert.

Zur Sättigung der unspezifischen Bindestellen erfolgte eine Inkubation der PVDF-Membran in LI-COR® Odyssey Blocking Buffer für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran in TBS-T Puffer (3 x 5 min) gewaschen. Die Bindung des primären Antikörpers, welcher zuvor in LI-COR® Odyssey Blocking Buffer entsprechend den Herstellerangaben verdünnt wurde, erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach erneutem Waschen in TBS-T Puffer (3 x 5 min) wurde die Membran für 1 h in einem Fluoreszenz-markierten sekundären Antikörpermix unter verminderter Lichteinstrahlung bei Rt inkubiert.

Die Detektion der Fluoreszenzsignale der gebundenen sekundären Antikörper erfolgte nach erneutem Waschen mit TBS-T Puffer (3 x 5 min) mit dem LI-COR® Odyssey CLx Imager. Die Auswertung und Quantifizierung der erhaltenen Daten wurden mit dem Programm Image Studio Light durchgeführt.

5.8.8 Retrovirale Transduktion muriner Ba/F3-Zellen

5.8.8.1 Virusgenerierung

Zur Generierung des Retrovirus für die retrovirale Transduktion muriner Ba/F3-Zellen wurde zunächst eine liposomale Transfektion der humanen Zelllinie HEK293T vorgenommen. Dazu wurden $7,5 \cdot 10^4$ HEK293T-Zellen in einer TC60-Zellkulturschale (Sarstedt) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 40-60 % kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem nach Herstellerangaben hergestellten Transfektionsansatz. Dafür wurden 2,5 µg des Verpackungsplasmids, 2,5 µg des entsprechenden retroviralen pBABE-Transfervektors und 7,5 µL des Transfektionsreagenz TransIT-LT1 (Mirus Bio LLC) mit 250 µL OptiMEM-Medium (Gibco) in einem sterilen Eppendorfgefäß vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der tropfenweisen Zugabe des Transfektionsansatzes auf den HEK293T-Zellrasen in 5 mL Kultivierungsmedium erfolgte eine 72-stündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂. Zur Virusernte wurde das Medium abgenommen, bei 40 g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Der Virus-enhaltende Überstand wurde abgenommen und mit Hilfe eines 0.45 µm Spritzenvorsatzfilters (Sarstedt) filtriert. Der Virus wurde entweder für maximal 3 Tage lichtgeschützt bei 4 °C gelagert oder in flüssigem N₂ eingefroren und langfristig bei -80 °C gelagert.

5.8.8.2 Retrovirale Infektion von Ba/F3-Zellen

Mit dem generierten Retrovirus wurden im nächsten Schritt die Ba/F3-Zellen infiziert, was in einer Insertion des Zielgens in das Genom der Ba/F3-Zellen resultiert. Dafür wurden die Ba/F3-Zellen mit einer Zelldichte von $6 \cdot 10^6$ Zellen/mL in 3 mL Infektionsmedium (60 % RPMI 1640 + GlutaMAX™ (Gibco), 20 % FBS *Good Forte* (PAN Biotech), 8 µg/mL Polybren (Merck Millipore) in einer TC25-Zellkulturflasche (Sarstedt) vorgelegt und mit 2 mL des Retrovirus versetzt. Nach 24-stündiger Inkubation im CO₂-Inkubator bei 37 °C wurde dem Infektionsansatz 5 mL frisches Kultivierungsmedium mit 10 ng/mL Interleukin-3 (IL-3) zugegeben.

Zur Selektion der transfizierten Zellen wurde anschließend nach weiteren 24 Stunden das Kultivierungsmedium durch das Selektionsmedium ausgetauscht, wobei dieses zusätzlich 1 µg/mL des Antibiotikums Puromycin enthielt. Die Selektion mit Puromycin erfolgte über sieben Tage, wobei alle 48 bis 72 Stunden ein Mediumwechsel durchgeführt wurde. Um anschließend eine Abhängigkeit des Zellwachstums anstelle des IL-3-induzierten Signalweges durch das eingebrachte Gen zu erreichen, wurde ein radikaler IL-3-Entzug durchgeführt und die Zellen wurden fortlaufend in Ba/F3-Kultivierungsmedium ohne IL-3 kultiviert. Nach Wiedereintreten des Zellwachstums wurden die transduzierten Zellen alle zwei bis drei Tage auf eine Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/mL in TC75-Zellkulturflaschen (Sarstedt) passagiert.

5.8.8.3 Genomisolierung Und Sequenzierung

Zur Verifizierung der erfolgreichen Insertion des Zielgens in das Genom der Ba/F3-Zellen wurde eine Genomsequenzierung und eine anschließende Sequenzierung mit Fokus auf das Zielgen durchgeführt. Zunächst wurde mit Hilfe des *DNA Mini Kit* (Qiagen) die genomische DNA der Ba/F3-Zellen isoliert und folgend das gesuchte Zielgen durch Verwendung von spezifischen Primern mittels PCR amplifiziert. Daraufhin erfolgte eine Reinigung des PCR-Produktes mit dem *QIAquick PCR-Purification Kit* (Qiagen) und eine Sequenzierung durch *Eurofins Genomics*.

5.8.9 Anwendung von CRISPR/Cas9

5.8.9.1 Design von sgRNAs

Für das Design der sgRNAs zur Adressierung der Akt-Isoform-Gene wurden die Online-Tools ChopChop, CrisPick und TrueDesign Genom Editor verwendet. Diese Programme verwenden definierte Bewertungs-Algorithmen, welche mögliche sgRNA Sequenzen basierend auf dem gewählten Gen und einem Referenzgenom auswählen.

Tabelle 13: Auflistung der für die Akt1-*knock-out*-Experimente verwendeten sgRNAs.

sgRNA	Akt1	Quelle
1	fw CACCGGAAGGTGCGTTTCGATGACAG rv AAACCTGTCATCGAACGCACCTTCC	CrisPick ¹⁹¹
2	fw CACCGTCACGTTGGTCCACATCCTG rv AAACCAGGATGTGGACCAACGTGAC	ChopChop ¹⁸⁸⁻¹⁹⁰
3	fw CACCGTCACGTTGGTCCACATCCTG rv AAACCAGGATGTGGACCAACGTGAC	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 14: Auflistung der für die Akt2-*knock-out*-Experimente verwendeten sgRNAs.

sgRNA	Akt2	Quelle
1	fw CACCGCTGCAGGCAGCGTATGACAA rv AAACGTTGTCATACGCTGCCTGCAGC	CrisPick ¹⁹¹
2	fw CACCGTCACGTCCGAGGTCGACACA rv AAAGTGTGTCGACCTCGGACGTGAC	ChopChop ¹⁸⁸⁻¹⁹⁰
3	fw CACCGAGGAGCCGTCGCTCTTCAGC rv AAACGCTGAAGAGCGACGGCTCCTC	Thermo Fisher Scientific

Tabelle 15: Auflistung der für die Akt3-*knock-out*-Experimente verwendeten sgRNAs.

sgRNA	Akt3	Quelle
1	fw CACCGCTGCACCATAGAAACGTGTG rv AAACCACACGTTTCTATGGTGCAGC	CrisPick ¹⁹¹
2	fw CACCGGAGGACCGCACACGTTTCTA rv AAAGTAGAAACGTGTGCGGTCCTCC	ChopChop ¹⁸⁸⁻¹⁹⁰
3	fw CACCGTCTCTATAACAGTAGTCCAC rv AAACGTGGACTACTGTTATAGAGAC	Thermo Fisher Scientific

5.8.9.2 Transfektion

Um die CRISPR/Cas9-Konstrukte in die HEK293T-Zellen einzubringen, wurde zunächst eine liposomale Transfektion vorgenommen. Dazu wurden $0,5 \cdot 10^5$ HEK293T-Zellen in eine 24-Kammer-Zellkulturplatte (Sarstedt) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 % ohne Antibiotikum kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem nach Herstellerangaben hergestellten Transfektionsansatz. Dafür wurden 1 µg des Plasmids mit 0,75 µL des Transfektionsreagenz Lipofectamin 3000 (Thermo Fisher Scientific) mit 25 µL OptiMEM-Medium (Gibco) in einem sterilen Gefäß vermischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der tropfenweisen Zugabe des Transfektionsansatzes auf den HEK293T-Zellrasen in 500 µL Kultivierungsmedium erfolgte eine 72-stündige Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂.

5.8.9.3 Selektion der infizierten Zellen

Die Selektion der transfizierten Zellen wurde abhängig vom verwendeten Plasmid über zwei verschiedene Methoden durchgeführt.

5.8.9.3.1 Selektion der Zellen mit Puromycin und serieller Verdünnung

Die mit dem pSpCas9(BB)-2A-Puro-Vektor transfizierten Zellen ermöglichten eine Selektion mit Hilfe von Puromycin und anschließender serieller Verdünnung. Dazu wurden 24 h nach der Transfektion 1 µg/mL Puromycin zum Medium hinzugegeben. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen gemäß Abschnitt 5.8.1 passagiert und anschließend mit frischem Medium in 100-fachen Schritten bis zu einer Konzentration von 5 Zellen/mL verdünnt. Nachfolgend wurden 0,5 Zellen/Kammer auf 24-Kammer-Zellkulturplatten ausgesät und bis zum Erreichen einer stabil wachsenden Zellpopulation über mehrere Wochen kultiviert. Die Evaluierung des eingefügten *knock-outs* erfolgte über Western Blots und eine Genomsequenzierung.

5.8.9.3.2 *Fluorescence activated cell sorting (FACS)*

Die mit dem pSpCas9(BB)-2A-GFP-Vektor transfizierten Zellen konnten nach der Transfektion direkt mittels FACS vereinzelt werden. Die Zellen wurden zunächst gemäß Abschnitt 5.8.1 passagiert und in steril filtriertes Medium in ein 15 mL Gefäß überführt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 200 g wurden die Zellen in 200 µL Medium aufgenommen, durch einen Zellsieb in ein FACS-Röhrchen überführt und bis zur Sortierung auf Eis gelagert. Zusätzlich wurde eine 96-Kammer-Zellkulturplatte (Sarstedt) mit 100 µL/Kammer befüllt, welche anschließend zur Sammlung der Zellen verwendet wurde. Die vereinzelt Zellen wurden anschließend bis zum Erreichen einer stabil wachsenden Zellpopulation über mehrere Wochen kultiviert. Die Evaluierung des eingefügten *knock-outs* erfolgte über Western Blots und eine Genomsequenzierung.

5.9 Massenspektrometrie von Proteinen

Die Proteine wurden vor der massenspektrometrischen Analyse mit einem dreifachen Überschuss Protein auf Eis für 1-4 h inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben bei 5000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand in ein Massenspektrometer-kompatibles Gefäß überführt. Es wurde eine Thermo Fisher Scientific Ultimate 300 HPLC gefolgt von einer Thermo Fisher Scientific Velos Pro (2D Ionenfalle) verwendet. Es wurden maximal 2 µL der Probe zunächst über eine AdvanceBio Desalting RP-Cartridge (Agilent Technologies) getrennt, unter Verwendung eines zunächst polaren Gradienten beginnend von 95 % Lösemittel A (H₂O + 0,1 FA) und 5 % Lösungsmittel B (0,1 % FA in MeCN) für 30 Sekunden, gefolgt von einem linearen Gradienten für 2,5 min mit bis zu 80 % Lösemittel B. Die Rohdaten wurden mit MagTran dekonvolviert.

5.9.1 Vorbereitung von Proteinproben für die Tandem-Massenspektrometrie

Für die Analyse der kovalenten Bindungsbildung durch kovalente Inhibitoren wurden Tandem-Massenspektrometrie Experimente durchgeführt. Diese ermöglichen die eindeutige Zuordnung proteolytisch verdauter Peptide zur entsprechenden Sequenz. Hierfür wurde ein tryptischer Verdau in Lösung gewählt und anschließend mittels StageTip Reinigung entsalzt sowie konzentriert. Zunächst erfolgte eine 1-4 h Inkubation auf Eis mit einem dreifachen Überschuss des kovalenten Inhibitors. Anschließend wurden 75 µL der Probe in ein loBinding Reaktionsgefäß (Sarstedt) überführt und mit 75 µL Triethylammoniumbromid (100 mM, TEAB) versetzt. Anschließend erfolgte eine Reduktionreaktion durch Zugabe von 7.5 µL TCEP (200 mM) in TEAB (100 mM). Das Reaktionsgemisch wurde für 1 h bei 55 °C inkubiert. Nachfolgend wurden 7,5 µL Iodacetamid (375 mM in 200 mM TEAB) hinzugegeben und es wurde für 30 min bei Rt unter Lichtausschluss inkubiert. Die Fällung des Proteins erfolgt über Nacht unter Verwendung von gekühltem Aceton (900 µL) bei -20 °C. Nach Zentrifugation für 10 min bei 8000 g und 4 °C wurde der Überstand vorsichtig entfernt und die Proben für 45 min mit offenem Deckel getrocknet. Zur Vorbereitung der Trypsin-Lösung wurden aus einer 0,4 µg/µL Stammlösung 165 µL zu 2200 µL TEAB (100 mM) gegeben. Aus dieser Trypsin-Lösung werden 107,5 µL zu den getrockneten Proben gegeben, welche anschließend für 20 Sekunden mit Hilfe eines Vortexers vermischt wurden. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Reaktionsgefäße bei 37 °C und 300 rpm für 3 Stunden. Der Verdau wurde durch Zugabe von 20 µL 0,1 % TFA in Wasser beendet und die Proben weiter bei 37 °C über Nacht geschüttelt. Bevor die Peptid Proben zur Massenspektrometrischen Analyse aufgesetzt wurden, erfolgte eine Reinigung mit C18-Material an umgekehrter Phase. Zuletzt erfolgte die Entfernung des Lösungsmittels mit einer SpeedVac (Eppendorf) bei 30 °C für 1 h.

Die Durchführung und Auswertung der Tandem-Massenspektrometrie erfolgte durch Dr.in Petra Janning, Malte Metz und Andreas Brockmeyer (MPI Dortmund).

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. World Health Organization. *Global Health Estimates 2020: Disease burden by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019*. (2020).
2. Cohen, P. The role of protein phosphorylation in human health and disease. *European Journal of Biochemistry* **268**, 5001–5010 (2001).
3. Stenberg, K. A., Riikonen, P. T. & Vihinen, M. KinMutBase, a database of human disease-causing protein kinase mutations. *Nucleic acids research* **28**, 369–371 (2000).
4. Lahiry, P., Torkamani, A., Schork, N. J. & Hegele, R. A. Kinase mutations in human disease: interpreting genotype–phenotype relationships. *Nature Reviews Genetics* **11**, 60–74 (2010).
5. Rabiller, M. *et al.* Proteus in the World of Proteins: Conformational Changes in Protein Kinases. *Archiv der Pharmazie* **343**, 193–206 (2010).
6. Zhang, H. *et al.* A subcellular map of the human kinome. *eLife* **10**, e64943 (2021).
7. Jones, P. F., Jakubowicz, T., Pitossi, F. J., Maurer, F. & Hemmings, B. A. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 4171–4175 (1991).
8. Staal, S. P., Huebner, K., Croce, C. M., Parsa, N. Z. & Testa, J. R. The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32. *Genomics* **2**, 96–98 (1988).
9. Cheng, J. Q. *et al.* AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 9267–9271 (1992).
10. Konishi, H. *et al.* Molecular Cloning and Characterization of a New Member of the RAC Protein Kinase Family: Association of the Pleckstrin Homology Domain of 3 Types of RAC Protein Kinase with Protein Kinase C Subspecies and $\beta\gamma$ Subunits of G Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **216**, 526–534 (1995).
11. Nakatani, K. *et al.* Up-regulation of Akt3 in Estrogen Receptor-deficient Breast Cancers and Androgen-independent Prostate Cancer Lines*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 21528–21532 (1999).
12. Kumar, C. C. & Madison, V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors. *Oncogene* **24**, 7493–7501 (2005).
13. Hanada, M., Feng, J. & Hemmings, B. A. Structure, regulation and function of PKB/AKT—a major therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1697**, 3–16 (2004).
14. Kui, L. *et al.* An ATP-Site On-Off Switch That Restricts Phosphatase Accessibility of Akt. *Science Signaling* **5**, ra37–ra37 (2012).
15. Milburn, C. C. *et al.* Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. *The Biochemical journal* **375**, 531–538 (2003).
16. Truebestein, L. *et al.* Structure of autoinhibited Akt1 reveals mechanism of PIP(3)-mediated activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **118**, e2101496118 (2021).

-
17. Yang, J. *et al.* Molecular Mechanism for the Regulation of Protein Kinase B/Akt by Hydrophobic Motif Phosphorylation. *Molecular Cell* **9**, 1227–1240 (2002).
 18. Manning, B. D. & Toker, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. *Cell* **169**, 381–405 (2017).
 19. Vivanco, I. & Sawyers, C. L. The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer* **2**, 489–501 (2002).
 20. Liu, S.-L. *et al.* Quantitative Lipid Imaging Reveals a New Signaling Function of Phosphatidylinositol-3,4-Bisphosphate: Isoform- and Site-Specific Activation of Akt. *Molecular cell* **71**, 1092-1104.e5 (2018).
 21. Calleja, V., Laguerre, M., Parker, P. J. & Larijani, B. Role of a Novel PH-Kinase Domain Interface in PKB/Akt Regulation: Structural Mechanism for Allosteric Inhibition. *PLOS Biology* **7**, e1000017- (2009).
 22. Alessi, D. R. *et al.* Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Current Biology* **7**, 261–269 (1997).
 23. D, S. dos, A, G. D., M, A. S. & M, S. D. Phosphorylation and Regulation of Akt/PKB by the Rictor-mTOR Complex. *Science* **307**, 1098–1101 (2005).
 24. Obata, T. *et al.* Peptide and protein library screening defines optimal substrate motifs for AKT/PKB. *The Journal of biological chemistry* **275**, 36108–36115 (2000).
 25. Brognard, J., Sierrecki, E., Gao, T. & Newton, A. C. PHLPP and a Second Isoform, PHLPP2, Differentially Attenuate the Amplitude of Akt Signaling by Regulating Distinct Akt Isoforms. *Molecular Cell* **25**, 917–931 (2007).
 26. Ugi, S. *et al.* Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and cellular biology* **24**, 8778–8789 (2004).
 27. Manning, B. D. & Cantley, L. C. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**, 1261–1274 (2007).
 28. Gonzalez, E. & McGraw, T. E. The Akt kinases: isoform specificity in metabolism and cancer. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **8**, 2502–2508 (2009).
 29. Santi, S. A. & Lee, H. The Akt isoforms are present at distinct subcellular locations. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* **298**, C580–C591 (2009).
 30. Huber, M. *et al.* The role of SHIP in growth factor induced signalling. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **71**, 423–434 (1999).
 31. Tschopp, O. *et al.* Essential role of protein kinase B γ (PKB γ /Akt3) in postnatal brain development but not in glucose homeostasis. *Development* **132**, 2943–2954 (2005).
 32. Yang, Z.-Z. *et al.* Dosage-dependent effects of Akt1/protein kinase B α (PKB α) and Akt3/PKB γ on thymus, skin, and cardiovascular and nervous system development in mice. *Molecular and cellular biology* **25**, 10407–10418 (2005).
 33. Dummler, B. *et al.* Life with a single isoform of Akt: mice lacking Akt2 and Akt3 are viable but display impaired glucose homeostasis and growth deficiencies. *Molecular and cellular biology* **26**, 8042–8051 (2006).
 34. Cho, H. *et al.* Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKB β). *Science* **292**, 1728–1731 (2001).

35. Garofalo, R. S. *et al.* Severe diabetes, age-dependent loss of adipose tissue, and mild growth deficiency in mice lacking Akt2/PKB beta. *The Journal of clinical investigation* **112**, 197–208 (2003).
36. Faes, S. & Dormond, O. PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer. *International journal of molecular sciences* **16**, 21138–21152 (2015).
37. Rozengurt, E., Soares, H. P. & Sinnet-Smith, J. Suppression of feedback loops mediated by PI3K/mTOR induces multiple overactivation of compensatory pathways: an unintended consequence leading to drug resistance. *Molecular cancer therapeutics* **13**, 2477–2488 (2014).
38. Sathe, A. *et al.* Parallel PI3K, AKT and mTOR inhibition is required to control feedback loops that limit tumor therapy. *PLOS ONE* **13**, e0190854 (2018).
39. Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M. & Bilanges, B. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 329–341 (2010).
40. Wani, R. *et al.* Isoform-specific regulation of Akt by PDGF-induced reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 10550–10555 (2011).
41. Long, M. J. C. *et al.* Akt3 is a privileged first responder in isozyme-specific electrophile response. *Nature chemical biology* **13**, 333–338 (2017).
42. Li, H. *et al.* AKT2 phosphorylation of hexokinase 2 at T473 promotes tumorigenesis and metastasis in colon cancer cells via NF- κ B, HIF1 α , MMP2, and MMP9 upregulation. *Cellular Signalling* **58**, 99–110 (2019).
43. Kupriyanova, T. A. & Kandror, K. v. Akt-2 Binds to Glut4-containing Vesicles and Phosphorylates Their Component Proteins in Response to Insulin*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 1458–1464 (1999).
44. Fruman, D. A. *et al.* The PI3K Pathway in Human Disease. *Cell* **170**, 605–635 (2017).
45. Millis, S. Z., Ikeda, S., Reddy, S., Gatalica, Z. & Kurzrock, R. Landscape of Phosphatidylinositol-3-Kinase Pathway Alterations Across 19 784 Diverse Solid Tumors. *JAMA Oncology* **2**, 1565–1573 (2016).
46. Staal, S. P. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**, 5034–5037 (1987).
47. Cheng, J. Q. *et al.* Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 3636 (1996).
48. Stahl, J. M. *et al.* Deregulated Akt3 Activity Promotes Development of Malignant Melanoma. *Cancer Research* **64**, 7002 (2004).
49. Stål, O. *et al.* Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy. *Breast Cancer Research* **5**, R37 (2003).
50. Roy, H. K. *et al.* AKT proto-oncogene overexpression is an early event during sporadic colon carcinogenesis. *Carcinogenesis* **23**, 201–205 (2002).
51. Carpten, J. D. *et al.* A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* **448**, 439–444 (2007).
52. Hinz, N. & Jücker, M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Communication and Signaling* **17**, 154 (2019).

-
53. Linnerth-Petrik, N. M., Santry, L. A., Petrik, J. J. & Wootton, S. K. Opposing Functions of Akt Isoforms in Lung Tumor Initiation and Progression. *PLOS ONE* **9**, e94595- (2014).
 54. Rauh, D. & Rabiller, M. Chemische Biologie. in *Bioanalytik* (eds. Lottspeich, F., Engels, J. W., Solodkoff, Z.L.) (eds. Lottspeich, F., Engels, J. W. & Solodkoff, Z. L.) 1121–1137 (Spektrum Akademischer Verlag, 2012, 2012).
 55. Bucci, M., Goodman, C. & Sheppard, T. L. A decade of chemical biology. *Nature Chemical Biology* **6**, 847–854 (2010).
 56. Plowright, A. T. *et al.* Joining Forces: The Chemical Biology–Medicinal Chemistry Continuum. *Cell Chemical Biology* **24**, 1058–1065 (2017).
 57. Vidal, M., Cusick, M. E. & Barabási, A.-L. Interactome Networks and Human Disease. *Cell* **144**, 986–998 (2011).
 58. Kawasumi, M. & Nghiem, P. Chemical Genetics: Elucidating Biological Systems with Small-Molecule Compounds. *Journal of Investigative Dermatology* **127**, 1577–1584 (2007).
 59. Stockwell, B. R. Exploring biology with small organic molecules. *Nature* **432**, 846–854 (2004).
 60. Lehár, J., Stockwell, B. R., Giaever, G. & Nislow, C. Combination chemical genetics. *Nature chemical biology* **4**, 674–681 (2008).
 61. Martin, J. *et al.* A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).
 62. J, H. A. & C, B. D. A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* **286**, 950–952 (1999).
 63. Moffat, J. *et al.* A Lentiviral RNAi Library for Human and Mouse Genes Applied to an Arrayed Viral High-Content Screen. *Cell* **124**, 1283–1298 (2006).
 64. Silva, J. M. *et al.* Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nature Genetics* **37**, 1281–1288 (2005).
 65. Nitulescu, G. M. *et al.* Akt inhibitors in cancer treatment: The long journey from drug discovery to clinical use (Review). *International journal of oncology* **48**, 869–885 (2016).
 66. Mundi, P. S., Sachdev, J., McCourt, C. & Kalinsky, K. AKT in cancer: new molecular insights and advances in drug development. *British Journal of Clinical Pharmacology* **82**, 943–956 (2016).
 67. Coleman N, Moyers JT, Harbery A, Vivanco I & Yap TA. Clinical Development of AKT Inhibitors and Associated Predictive Biomarkers to Guide Patient Treatment in Cancer Medicine. *Pharmgenomics Pers Med* **14**, 1517–1535 (2021).
 68. Bhullar, K. S. *et al.* Kinase-targeted cancer therapies: progress, challenges and future directions. *Molecular Cancer* **17**, 48 (2018).
 69. Saura, C. *et al.* A First-in-Human Phase I Study of the ATP-Competitive AKT Inhibitor Ipatasertib Demonstrates Robust and Safe Targeting of AKT in Patients with Solid Tumors. *Cancer Discovery* **7**, 102 (2017).
 70. Smyth, L. M. *et al.* Selective AKT kinase inhibitor capivasertib in combination with fulvestrant in PTEN-mutant ER-positive metastatic breast cancer. *npj Breast Cancer* **7**, 44 (2021).
 71. Kalinsky, K. *et al.* Effect of Capivasertib in Patients With an AKT1 E17K-Mutated Tumor: NCI-MATCH Subprotocol EAY131-Y Nonrandomized Trial. *JAMA Oncology* **7**, 271–278 (2021).

72. Landel, I., Quambusch, L., Depta, L. & Rauh, D. Spotlight on AKT: Current Therapeutic Challenges. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **11**, 225–227 (2020).
73. Addie, M. *et al.* Discovery of 4-Amino-N-[(1S)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl]-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamide (AZD5363), an Orally Bioavailable, Potent Inhibitor of Akt Kinases. *Journal of Medicinal Chemistry* **56**, 2059–2073 (2013).
74. Weisner, J. *et al.* Preclinical Efficacy of Covalent-Allosteric AKT Inhibitor Borussertib in Combination with Trametinib in KRAS-Mutant Pancreatic and Colorectal Cancer. *Cancer Research* **79**, 2367 (2019).
75. Geuna, E. *et al.* Complications of hyperglycaemia with PI3K-AKT-mTOR inhibitors in patients with advanced solid tumours on Phase I clinical trials. *British journal of cancer* **113**, 1541–1547 (2015).
76. Almeida Pachioni, J. de *et al.* Alkylphospholipids – A Promising Class of Chemotherapeutic Agents with a Broad Pharmacological Spectrum. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* **16**, 742–759 (2013).
77. Reis-Sobreiro, M. *et al.* Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood Cancer Journal* **3**, e118–e118 (2013).
78. Gills, J. J. & Dennis, P. A. Perifosine: update on a novel Akt inhibitor. *Current oncology reports* **11**, 102–110 (2009).
79. Becher, R. *et al.* Phase II Trial of Orally Administered Miltefosine in Advanced Colorectal Cancer. *Oncology Research and Treatment* **16**, 11–15 (1993).
80. Hers, I., Vincent, E. E. & Tavaré, J. M. Akt signalling in health and disease. *Cellular Signalling* **23**, 1515–1527 (2011).
81. van der Luit, A. H. *et al.* A new class of anticancer alkylphospholipids uses lipid rafts as membrane gateways to induce apoptosis in lymphoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **6**, 2337 (2007).
82. Lindsley, C. W. *et al.* Allosteric Akt (PKB) inhibitors: discovery and SAR of isozyme selective inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **15**, 761–764 (2005).
83. BARNETT, S. F. *et al.* Identification and characterization of pleckstrin-homology-domain-dependent and isoenzyme-specific Akt inhibitors. *Biochemical Journal* **385**, 399–408 (2005).
84. Fang, Z., Grütter, C. & Rauh, D. Strategies for the Selective Regulation of Kinases with Allosteric Modulators: Exploiting Exclusive Structural Features. *ACS Chemical Biology* **8**, 58–70 (2013).
85. Yu, Y. *et al.* Abstract 374: In vitro and in vivo anti-tumor activity of ARQ 751, a potent and selective AKT inhibitor. *Cancer Research* **76**, 374 (2016).
86. Ashwell, M. A. *et al.* Discovery and Optimization of a Series of 3-(3-Phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amines: Orally Bioavailable, Selective, and Potent ATP-Independent Akt Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **55**, 5291–5310 (2012).
87. Yu, Y. *et al.* Targeting AKT1-E17K and the PI3K/AKT Pathway with an Allosteric AKT Inhibitor, ARQ 092. *PLOS ONE* **10**, e0140479- (2015).
88. Hirai, H. *et al.* MK-2206, an Allosteric Akt Inhibitor, Enhances Antitumor Efficacy by Standard Chemotherapeutic Agents or Molecular Targeted Drugs In vitro and In vivo. *Molecular Cancer Therapeutics* **9**, 1956 (2010).

-
89. Lapierre, J.-M. *et al.* Discovery of 3-(3-(4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl)-5-phenyl-3H-imidazo[4,5-b]pyridin-2-yl)pyridin-2-amine (ARQ 092): An Orally Bioavailable, Selective, and Potent Allosteric AKT Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* **59**, 6455–6469 (2016).
 90. Al-Saffar, N. M. S. *et al.* Metabolic biomarkers of response to the AKT inhibitor MK-2206 in pre-clinical models of human colorectal and prostate carcinoma. *British Journal of Cancer* **119**, 1118–1128 (2018).
 91. Martorana, F. *et al.* AKT Inhibitors: New Weapons in the Fight Against Breast Cancer? *Frontiers in Pharmacology* **12**, 662232 (2021).
 92. Weisner, J. *et al.* Covalent-Allosteric Kinase Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **54**, 10313–10316 (2015).
 93. de Vita, E. 10 years into the resurgence of covalent drugs. *Future Medicinal Chemistry* **13**, 193–210 (2020).
 94. Singh, J., Petter, R. C., Baillie, T. A. & Whitty, A. The resurgence of covalent drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **10**, 307–317 (2011).
 95. Wu, W.-I. *et al.* Crystal Structure of Human AKT1 with an Allosteric Inhibitor Reveals a New Mode of Kinase Inhibition. *PLOS ONE* **5**, e12913- (2010).
 96. Uhlenbrock, N. *et al.* Structural and chemical insights into the covalent-allosteric inhibition of the protein kinase Akt. *Chemical Science* **10**, 3573–3585 (2019).
 97. Quambusch, L. *et al.* Covalent-Allosteric Inhibitors to Achieve Akt Isoform-Selectivity. *Angewandte Chemie International Edition* **58**, 18823–18829 (2019).
 98. Klebe, G. *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen.* (Springer-Verlag, 2009).
 99. Blundell, T. L. Structure-based drug design. *Nature* **384**, 23–26 (1996).
 100. Anderson, A. C. The Process of Structure-Based Drug Design. *Chemistry & Biology* **10**, 787–797 (2003).
 101. Deschamps, J. R. The role of crystallography in drug design. *Drug Addiction* 343–355 (2008).
 102. Śledź, P. & Caflisch, A. Protein structure-based drug design: from docking to molecular dynamics. *Current Opinion in Structural Biology* **48**, 93–102 (2018).
 103. Tunyasuvunakool, K. *et al.* Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature* **596**, 590–596 (2021).
 104. Varadi, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research* **50**, D439–D444 (2022).
 105. Jumper, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).
 106. Thornton, J. M., Laskowski, R. A. & Borkakoti, N. AlphaFold heralds a data-driven revolution in biology and medicine. *Nature Medicine* **27**, 1666–1669 (2021).
 107. Tong, A. B. *et al.* Could AlphaFold revolutionize chemical therapeutics? *Nature Structural & Molecular Biology* **28**, 771–772 (2021).
 108. Miranda, J. J. L. Position-dependent interactions between cysteine residues and the helix dipole. *Protein Science* **12**, 73–81 (2003).
 109. Muhammed, M. T. & Aki-Yalcin, E. Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chemical Biology & Drug Design* **93**, 12–20 (2019).

110. Cavasotto, C. N. & Phatak, S. S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discovery Today* **14**, 676–683 (2009).
111. Waterhouse, A. *et al.* SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic acids research* **46**, W296–W303 (2018).
112. Quambusch, L. Strukturbasierte Entwicklung und Evaluierung von Sondenmolekülen zur allosterischen Regulation von Isoformen der Proteinkinase Akt. (2021).
113. Wu, W.-I. *et al.* Crystal Structure of Human AKT1 with an Allosteric Inhibitor Reveals a New Mode of Kinase Inhibition. *PLOS ONE* **5**, e12913- (2010).
114. Cooper, D. R. *et al.* Protein crystallization by surface entropy reduction: optimization of the SER strategy. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **63**, 636–645 (2007).
115. Derewenda, Z. S. & Vekilov, P. G. Entropy and surface engineering in protein crystallization. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **62**, 116–124 (2006).
116. Rosano, G. L. & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Frontiers in microbiology* **5**, 172 (2014).
117. Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J. & McCawley, P. The establishment of two cell lines from the insectspodoptera frugiperda (lepidoptera; noctuidae). *In vitro* **13**, 213–217 (1977).
118. Klenk, H.-D. Post-translational modifications in insect cells. in *Insect Cell Culture: Fundamental and Applied Aspects* 139–144 (Springer, 1996).
119. Berger, I. & Mayr, L. M. Protein production for structural biology: new solutions to new challenges. *Current opinion in structural biology* **23**, 317–318 (2013).
120. Jarvis, D. L. Baculovirus–insect cell expression systems. *Methods in enzymology* **463**, 191–222 (2009).
121. Possee, R. D. *et al.* Generation of baculovirus vectors for the high-throughput production of proteins in insect cells. *Biotechnology and bioengineering* **101**, 1115–1122 (2008).
122. Landel, I. Strukturbiologische Untersuchung und zelluläre Charakterisierung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren. (2020).
123. Arnold, T. & Linke, D. The Use of Detergents to Purify Membrane Proteins. *Current Protocols in Protein Science* **53**, 4.8.1-4.8.30 (2008).
124. Massiah, M. A., Wright, K. M. & Du, H. Obtaining Soluble Folded Proteins from Inclusion Bodies Using Sarkosyl, Triton X-100, and CHAPS: Application to LB and M9 Minimal Media. *Current Protocols in Protein Science* **84**, 6.13.1-6.13.24 (2016).
125. Landel, I. Strukturbiologische Untersuchung und zelluläre Charakterisierung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren. (2020).
126. Weisner, J. Biochemische, kinetische und zelluläre Charakterisierung kovalent-allosterischer Akt-Inhibitoren. (2020).
127. Saraswathy, N. & Ramalingam, P. 13 - Protein Identification by Peptide Mass Fingerprinting (PMF). in *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics* (eds. Saraswathy, N. & Ramalingam, P.) 185–192 (Woodhead Publishing, 2011). doi:<https://doi.org/10.1533/9781908818058.185>.
128. Cottrell, J. S. Protein identification using MS/MS data. *Journal of Proteomics* **74**, 1842–1851 (2011).

-
129. Dessau, M. A. & Modis, Y. Protein crystallization for X-ray crystallography. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2285 (2011) doi:10.3791/2285.
 130. Su, Z. *et al.* Global redox proteome and phosphoproteome analysis reveals redox switch in Akt. *Nature Communications* **10**, 5486 (2019).
 131. Wani, R., Bharathi, N. S., Field, J., Tsang, A. W. & Furdui, C. M. Oxidation of Akt2 kinase promotes cell migration and regulates G1-S transition in the cell cycle. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* **10**, 3263–3268 (2011).
 132. Corcoran, A. & Cotter, T. G. Redox regulation of protein kinases. *The FEBS Journal* **280**, 1944–1965 (2013).
 133. Lennicke, C. & Cochemé, H. M. Redox regulation of the insulin signalling pathway. *Redox Biology* **42**, 101964 (2021).
 134. Huynh, K. & Partch, C. L. Analysis of Protein Stability and Ligand Interactions by Thermal Shift Assay. *Current Protocols in Protein Science* **79**, 28.9.1-28.9.14 (2015).
 135. Bazin, H., Préaudat, M., Trinquet, E. & Mathis, G. Homogeneous time resolved fluorescence resonance energy transfer using rare earth cryptates as a tool for probing molecular interactions in biology. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **57**, 2197–2211 (2001).
 136. Huang, X. *et al.* Crystal Structure of an Inactive Akt2 Kinase Domain. *Structure* **11**, 21–30 (2003).
 137. Stura, E. A. & Wilson, I. A. Applications of the streak seeding technique in protein crystallization. *Journal of Crystal Growth* **110**, 270–282 (1991).
 138. Shaw Stewart, P. D., Kolek, S. A., Briggs, R. A., Chayen, N. E. & Baldock, P. F. M. Random Microseeding: A Theoretical and Practical Exploration of Seed Stability and Seeding Techniques for Successful Protein Crystallization. *Crystal Growth & Design* **11**, 3432–3441 (2011).
 139. D’Arcy, A., mac Sweeney, A. & Haber, A. Using natural seeding material to generate nucleation in protein crystallization experiments. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **59**, 1343–1346 (2003).
 140. Rauh, D., Reyda, S., Klebe, G. & Stubbs, M. T. Trypsin Mutants for Structure-Based Drug Design: Expression, Refolding and Crystallisation. **383**, 1309–1314 (2002).
 141. Hopfner, K. P. *et al.* New enzyme lineages by subdomain shuffling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 9813–9818 (1998).
 142. Hopfner, K. P. *et al.* Converting blood coagulation factor IXa into factor Xa: dramatic increase in amidolytic activity identifies important active site determinants. *The EMBO journal* **16**, 6626–6635 (1997).
 143. Abzalimov, R. R., Kaplan, D. A., Easterling, M. L. & Kaltashov, I. A. Protein conformations can be probed in top-down HDX MS experiments utilizing electron transfer dissociation of protein ions without hydrogen scrambling. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **20**, 1514–1517 (2009).
 144. Masson, G. R., Jenkins, M. L. & Burke, J. E. An overview of hydrogen deuterium exchange mass spectrometry (HDX-MS) in drug discovery. *Expert opinion on drug discovery* **12**, 981–994 (2017).
 145. Renaud, J.-P. *et al.* Cryo-EM in drug discovery: achievements, limitations and prospects. *Nature reviews Drug discovery* **17**, 471–492 (2018).

146. Shoemaker, S. C. & Ando, N. X-rays in the cryo-electron microscopy era: Structural biology's dynamic future. *Biochemistry* **57**, 277–285 (2018).
147. Danev, R., Yanagisawa, H. & Kikkawa, M. Cryo-electron microscopy methodology: current aspects and future directions. *Trends in biochemical sciences* **44**, 837–848 (2019).
148. Quambusch, L. *et al.* Cellular model system to dissect the isoform-selectivity of Akt inhibitors. *Nature Communications* **12**, 5297 (2021).
149. Palacios, R. & Steinmetz, M. IL3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* **41**, 727–734 (1985).
150. Warmuth, M., Kim, S., Gu, X., Xia, G. & Adrián, F. Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. *Current Opinion in Oncology* **19**, (2007).
151. Daley, G. Q. & Baltimore, D. Transformation of an interleukin 3-dependent hematopoietic cell line by the chronic myelogenous leukemia-specific P210bcr/abl protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 9312–9316 (1988).
152. DiRenzo, J. *et al.* Growth Factor Requirements and Basal Phenotype of an Immortalized Mammary Epithelial Cell Line. *Cancer Research* **62**, 89 (2002).
153. Varmus, H. Retroviruses. *Science* **240**, 1427–1435 (1988).
154. Naviaux, R. K., Costanzi, E., Haas, M. & Verma, I. M. The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *Journal of Virology* **70**, 5701–5705 (1996).
155. C, R. D., G, C. S. & Robert, T. A Mammalian Host-Vector System That Regulates Expression and Amplification of Transfected Genes by Temperature Induction. *Science* **227**, 23–28 (1985).
156. Roe, T., Reynolds, T. C., Yu, G. & Brown, P. O. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. *The EMBO Journal* **12**, 2099–2108 (1993).
157. Mitani, K. & Caskey, C. T. Delivering therapeutic genes — matching approach and application. *Trends in Biotechnology* **11**, 162–166 (1993).
158. Songyang, Z., Baltimore, D., Cantley, L., Kaplan, D. & Franke, T. Interleukin 3-dependent survival by Akt protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 11345–11350 (1997).
159. Socolovsky, M., Fallon, A. E. J., Wang, S., Brugnara, C. & Lodish, H. F. Fetal Anemia and Apoptosis of Red Cell Progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} Mice: A Direct Role for Stat5 in Bcl-XL Induction. *Cell* **98**, 181–191 (1999).
160. Leverrier, Y. *et al.* Role of PI3-kinase in Bcl-X induction and apoptosis inhibition mediated by IL-3 or IGF-1 in Baf-3 cells. *Cell Death & Differentiation* **6**, 290–296 (1999).
161. Lubeck, M. Masterarbeit - Etablierung des Ba/F3-Zellsystems zur zellulären Charakterisierung von Akt-Isoform spezifischen Inhibitoren. (2020).
162. Bofinger, R. *et al.* Development of lipopolyplexes for gene delivery: A comparison of the effects of differing modes of targeting peptide display on the structure and transfection activities of lipopolyplexes. *Journal of Peptide Science* **24**, e3131 (2018).
163. Ormerod, M. G., Collins, M. K. L., Rodriguez-Tarduchy, G. & Robertson, D. Apoptosis in interleukin-3-dependent haemopoietic cells: Quantification by two flow cytometric methods. *Journal of immunological methods* **153**, 57–65 (1992).

-
164. Collins, M. K., Marvel, J., Malde, P. & Lopez-Rivas, A. Interleukin 3 protects murine bone marrow cells from apoptosis induced by DNA damaging agents. *The Journal of experimental medicine* **176**, 1043–1051 (1992).
 165. Parikh, C. *et al.* Disruption of PH-kinase domain interactions leads to oncogenic activation of AKT in human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 19368–19373 (2012).
 166. Kong, K., Ng, P. K. shing & Scott, K. Ba/F3 transformation assays. *Oncotarget* **8**, (2017).
 167. Mebratu, Y. & Tesfaiqi, Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell cycle* **8**, 1168–1175 (2009).
 168. Ruvinsky, I. *et al.* Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & development* **19**, 2199–2211 (2005).
 169. Herceg, Z. & Wang, Z.-Q. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **477**, 97–110 (2001).
 170. Yao, Z. *et al.* Role of Akt in Growth and Survival of PANC-1 Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas* **24**, (2002).
 171. Deer, E. L. *et al.* Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* **39**, 425–435 (2010).
 172. Plotz, G., Lopez-Garcia, L. A., Brieger, A., Zeuzem, S. & Biondi, R. M. Alternative AKT2 splicing produces protein lacking the hydrophobic motif regulatory region. *PLOS ONE* **15**, e0242819- (2020).
 173. Mendoza, M. C., Er, E. E. & Blenis, J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends in biochemical sciences* **36**, 320–328 (2011).
 174. Martinez, N. J. *et al.* A widely-applicable high-throughput cellular thermal shift assay (CETSA) using split Nano Luciferase. *Scientific Reports* **8**, 9472 (2018).
 175. Terns, M. P. & Terns, R. M. CRISPR-based adaptive immune systems. *Current Opinion in Microbiology* **14**, 321–327 (2011).
 176. Bhaya, D., Davison, M. & Barrangou, R. CRISPR-Cas Systems in Bacteria and Archaea: Versatile Small RNAs for Adaptive Defense and Regulation. *Annual Review of Genetics* **45**, 273–297 (2011).
 177. Wiedenheft, B., Sternberg, S. H. & Doudna, J. A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* **482**, 331–338 (2012).
 178. Wang, H., la Russa, M. & Qi, L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review of Biochemistry* **85**, 227–264 (2016).
 179. Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science (New York, N.Y.)* **339**, 823–826 (2013).
 180. Wang, H. *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* **153**, 910–918 (2013).
 181. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* **8**, 2281–2308 (2013).
 182. Nishimasu, H. *et al.* Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell* **156**, 935–949 (2014).

183. Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A. & Jinek, M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature* **513**, 569–573 (2014).
184. Hsu, P. D. *et al.* DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology* **31**, 827–832 (2013).
185. Jiang, F. & Doudna, J. A. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms. *Annual Review of Biophysics* **46**, 505–529 (2017).
186. Doench, J. G. *et al.* Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nature Biotechnology* **32**, 1262–1267 (2014).
187. Luther, D. C., Lee, Y. W., Nagaraj, H., Scaletti, F. & Rotello, V. M. Delivery approaches for CRISPR/Cas9 therapeutics in vivo: advances and challenges. *Expert Opinion on Drug Delivery* **15**, 905–913 (2018).
188. Labun, K. *et al.* CHOPCHOP v3: expanding the CRISPR web toolbox beyond genome editing. *Nucleic Acids Research* **47**, W171–W174 (2019).
189. Labun, K., Montague, T. G., Gagnon, J. A., Thyme, S. B. & Valen, E. CHOPCHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Research* **44**, W272–W276 (2016).
190. Montague, T. G., Cruz, J. M., Gagnon, J. A., Church, G. M. & Valen, E. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Research* **42**, W401–W407 (2014).
191. Doench, J. G. *et al.* Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nature Biotechnology* **34**, 184–191 (2016).
192. Christian, R. *et al.* Differentiation Stage-Specific Inhibition of the Raf-MEK-ERK Pathway by Akt. *Science* **286**, 1738–1741 (1999).
193. Alonso, N. *et al.* PI3K pathway is involved in ERK signaling cascade activation by histamine H2R agonist in HEK293T cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1860**, 1998–2007 (2016).
194. Franke, T. F. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* **27**, 6473–6488 (2008).
195. Degan, S. E. & Gelman, I. H. Emerging Roles for AKT Isoform Preference in Cancer Progression Pathways. *Molecular Cancer Research* **19**, 1251 (2021).
196. Harada, H. *et al.* Phosphorylation and Inactivation of BAD by Mitochondria-Anchored Protein Kinase A. *Molecular Cell* **3**, 413–422 (1999).
197. Guan, K.-L. *et al.* Negative Regulation of the Serine/Threonine Kinase B-Raf by Akt*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 27354–27359 (2000).
198. Moelling, K., Schad, K., Bosse, M., Zimmermann, S. & Schweneker, M. Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 31099–31106 (2002).
199. Sven, Z. & Karin, M. Phosphorylation and Regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B). *Science* **286**, 1741–1744 (1999).
200. Hinz, N. & Jücker, M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. *Cell Communication and Signaling* **17**, 154 (2019).
201. Lavoie, H., Gagnon, J. & Therrien, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **21**, 607–632 (2020).
202. Chin, H. M., Lai, D. K. & Falchook, G. S. Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Inhibitors in Oncology Clinical Trials. *Journal of Immunotherapy and Precision Oncology* **2**, 10–16 (2020).

-
203. Nissan, M. H., Rosen, N. & Solit, D. B. ERK Pathway Inhibitors: How Low Should We Go? *Cancer Discovery* **3**, 719 (2013).
 204. Goetz, E. M., Ghandi, M., Treacy, D. J., Wagle, N. & Garraway, L. A. ERK mutations confer resistance to mitogen-activated protein kinase pathway inhibitors. *Cancer research* **74**, 7079–7089 (2014).
 205. Jaiswal, B. S. *et al.* ERK mutations and amplification confer resistance to ERK-inhibitor therapy. *Clinical Cancer Research* **24**, 4044–4055 (2018).
 206. Carlino, M. S. *et al.* Differential activity of MEK and ERK inhibitors in BRAF inhibitor resistant melanoma. *Molecular oncology* **8**, 544–554 (2014).
 207. Merchant, M. *et al.* Combined MEK and ERK inhibition overcomes therapy-mediated pathway reactivation in RAS mutant tumors. *PloS one* **12**, e0185862 (2017).
 208. O'Reilly, M. *et al.* Crystallographic screening using ultra-low-molecular-weight ligands to guide drug design. *Drug Discovery Today* **24**, 1081–1086 (2019).
 209. Ohori, M. *et al.* Role of a cysteine residue in the active site of ERK and the MAPKK family. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **353**, 633–637 (2007).
 210. Heightman, T. D. *et al.* Fragment-based discovery of a potent, orally bioavailable inhibitor that modulates the phosphorylation and catalytic activity of ERK1/2. *Journal of medicinal chemistry* **61**, 4978–4992 (2018).
 211. Fox, T. *et al.* A single amino acid substitution makes ERK2 susceptible to pyridinyl imidazole inhibitors of p38 MAP kinase. *Protein Science* **7**, 2249–2255 (1998).
 212. Endicott, J. A., Noble, M. E. M. & Johnson, L. N. The structural basis for control of eukaryotic protein kinases. *Annual review of biochemistry* **81**, 587–613 (2012).
 213. Huse, M. & Kuriyan, J. The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* **109**, 275–282 (2002).
 214. Zhou, J. & Adams, J. A. Participation of ADP dissociation in the rate-determining step in cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* **36**, 15733–15738 (1997).
 215. Meharena, H. S. *et al.* Deciphering the structural basis of eukaryotic protein kinase regulation. *PLoS biology* **11**, e1001680 (2013).
 216. Rabiller, M. *et al.* Proteus in the world of proteins: conformational changes in protein kinases. *Archiv der Pharmazie: An International Journal Pharmaceutical and Medicinal Chemistry* **343**, 193–206 (2010).
 217. Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* **367**, 704–711 (1994).
 218. Jafari, S., Farsani, F. M., Ganji, M. & Ganjalikhany, M. R. The functional regulatory details of ERK2 in complex with RSK1: an in silico insight. *RSC Advances* **11**, 11048–11056 (2021).
 219. Lee, T., Hoofnagle, A. N., Resing, K. A. & Ahn, N. G. Hydrogen exchange solvent protection by an ATP analogue reveals conformational changes in ERK2 upon activation. *Journal of molecular biology* **353**, 600–612 (2005).
 220. Canagarajah, B. J., Khokhlatchev, A., Cobb, M. H. & Goldsmith, E. J. Activation Mechanism of the MAP Kinase ERK2 by Dual Phosphorylation. *Cell* **90**, 859–869 (1997).

-
221. Kabsch, W. Automatic processing of rotation diffraction data from crystals of initially unknown symmetry and cell constants. *Journal of applied crystallography* **26**, 795–800 (1993).
 222. Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**, 125–132 (2010).
 223. Read, R. J. Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **57**, 1373–1382 (2001).
 224. Emsley, P. & Cowtan, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica section D: biological crystallography* **60**, 2126–2132 (2004).
 225. Afonine, P. v *et al.* Towards automated crystallographic structure refinement with phenix.refine. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **68**, 352–367 (2012).
 226. Adams, P. D. *et al.* PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* **66**, 213–221 (2010).
 227. Joosten, R. P., Long, F., Murshudov, G. N. & Perrakis, A. The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCrj* **1**, 213–220 (2014).
 228. The PyMOL Molecular Graphics System.

7.2 Vergleich der beschriebenen Akt-PH-*in*-Konformationen

A

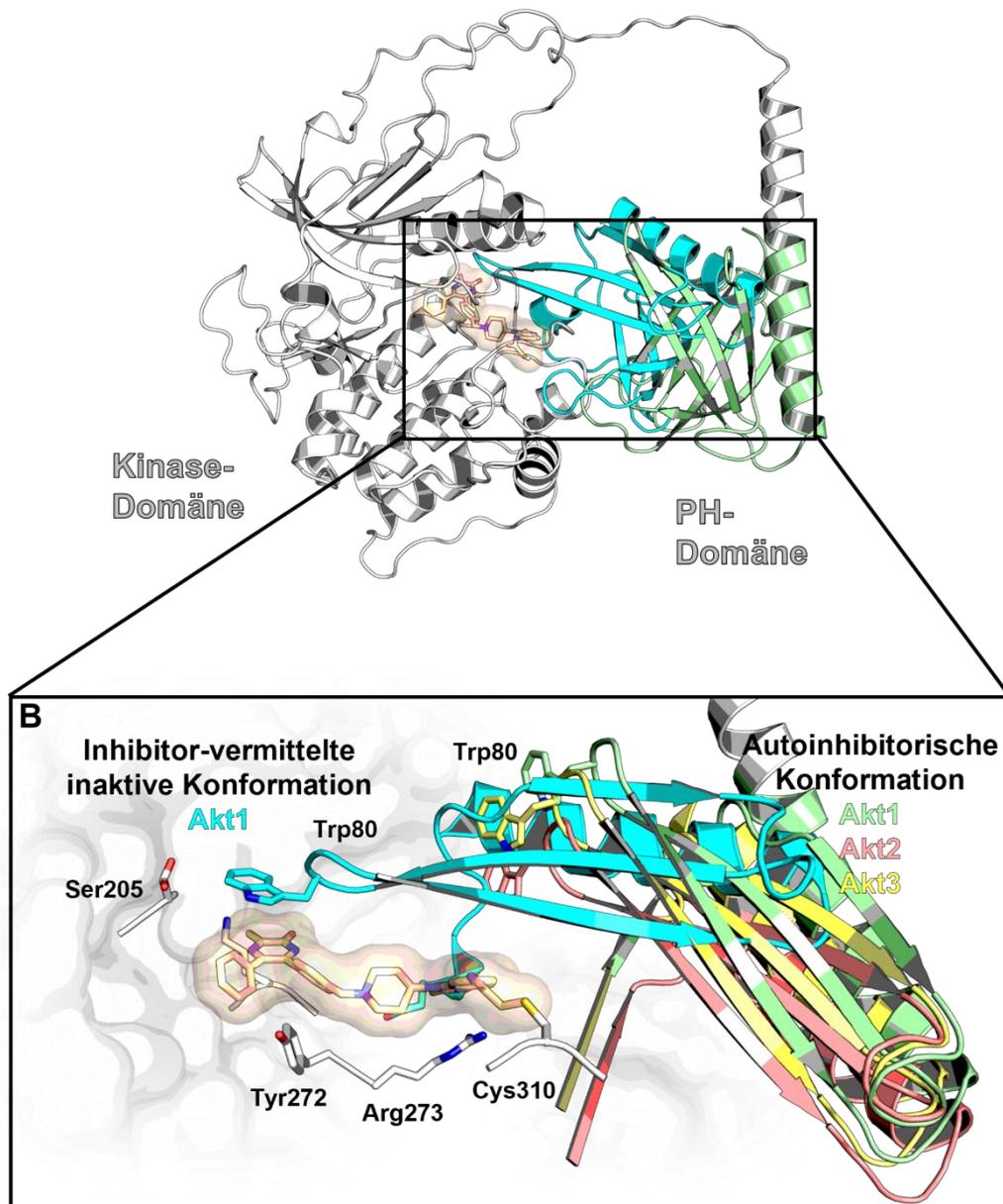


Abbildung 60: **A:** Vergleich der nativen autoinhibitorischen Konformation von Akt1^{wt} (*AlphaFold Database*; AKT1_Human) mit der Inhibitor-vermittelten inaktiven PH-*in*-Konformation. **B:** Darstellung der Interdomänen-Bindetasche einer Ko-Kristallstruktur von Akt1^{wt} im Komplex mit RL2407 (PDB: 6S9W). Eine Überlagerung mit den vorhergesagten autoinhibitorischen Konformationen der Akt-Isoformen (*AlphaFold Database*; AKT1_Human, AKT2_Human, AKT3_Human) zeigt eine Inhibitor-induzierte Rotation der PH-Domäne.

7.3 Zuordnung der verwendeten Proteine

Tabelle 16: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Proteine.

Konstrukt	Protein	Beschreibung
pJW16	Akt1 (2-446) (E114A; E115A; E116A)	Akt1 ^{Wt} gekürzt
pIL04	Akt2 (2-447)	Akt2 ^{Wt} gekürzt
pLD03	Akt2 (2-447) (T48R; D270N; A382S; V433T)	
pLD04	Akt2 (2-447) (P115del; G116del; E117A; E118A)	
pLD05	Akt2 (2-447) (2-111)-Akt1 (112-145)-Akt2 (146-446)	
pLD06	Akt2 (2-439)	
pLD07	Akt2-PH (2-111)	
pLD08	Akt2-Kinasedomäne (146-447)	
pLD12	Akt2 (2-447) (GGGGS) ₂	
pLD13	Akt1 (2-446) (S205T; D262E; E267del; K268R; N269D)	Akt2-Bindetaschen-Mimikry
pLD02	Akt3 (2-443) (E113A; E114A; E115A)	Akt3 ^{Wt} gekürzt

7.4 Proteinsequenzen

7.4.1 Akt1^{Wt} (2-446) - pJW16

Molekulargewicht (ungeschnitten/geschnitten): 55113 Da / 51670 Da

Extinktionskoeffizient (ungeschnitten/geschnitten): 66810 M⁻¹cm⁻¹ / 63830 M⁻¹cm⁻¹

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSTSHHHHH	HDHITSLYKK	AGFENLYFQG	SDVAIVKEGW	LHKRGEYIKT	WRPRYFLLKN
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
DGTFIGYKER	PQDVDQREAP	LNNFSVAQCQ	LMKTERPRPN	TFIIRCLQWT	TVIERTFHVE
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
TPEEREWT	AIQTVADGLK	KQAAAEMDFR	SGSPSDNSGA	EEMEVSLAKP	KHRVTMNEFE
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
YLKLLGKGT	GKVILVKEKA	TGRYYAMKIL	KKEVIVAKDE	VAHTLTENRV	LQNSRHPFLT
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
ALKYSFQTHD	RLCFVMEYAN	GGELFFHLSR	ERVFSEDRAR	FYGAEIVSAL	DYLHSEKNVV
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
YRDLKLENLM	LDKDGHIKIT	DFGLCKEGIK	DGATMKTFCG	TPEYLAPEVL	EDNDYGRAVD
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
WWGLGVVME	MMCGRLPFYN	QDHEKLFELI	LMEEIRFPRT	LGPEAKSLLS	GLLKKDPKQR
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	
LGGGSEDAKE	IMQHRFFAGI	VWQHVEKKL	SPPFKPQVTS	ETDTRYFDEE	FTAQM

7.4.2 Akt2^{Wt} (2-447) - pIL04

Molekulargewicht (ungeschnitten/geschnitten): 55188 Da / 51745 Da

Extinktionskoeffizient (ungeschnitten/geschnitten): 67185 M⁻¹cm⁻¹ / 64205 M⁻¹cm⁻¹

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSTSHHHHH	HDHITSLYKK	AGFENLYFQG	NEVSVIKEGW	LHKRGEYIKT	WRPRYFLLKS
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
DGSFIGYKER	PEAPDQTLPP	LNNFSVAECQ	LMKTERPRPN	TFVIRCLQWT	TVIERTFHVD
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
SPDEREEMMR	AIQMVANSLK	QRAPGEDPMD	YKCGSPSDSS	TTEEMEVAVS	KARAKVTMND
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
FDYLKLLGKG	TFGKVLVRE	KATGRYYAMK	ILRKEVIAK	DEVAHTVTEŠ	RVLQNTRHPF
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
LTALKYAFQT	HDRLCFVMEY	ANGGELFFHL	SRERVFTEER	ARFYGAEIVS	ALEYLHSRDV
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
VYRDIKLENL	MLDKDGHIKI	TDFGLCKEGI	SDGATMKTFC	GTPEYLAPEV	LEDNDYGRAV
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
DWWGLGVVME	EMMCGRLPFY	NQDHERLFEL	ILMEEIRFPR	TLSPKAKSLL	AGLLKKDPKQ
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	
RLGGGSPDAK	EVMEHRFFLS	INWQDVVQKK	LLPPFKPQVT	SEVDTRYFDD	EFTAQS

7.4.3 Akt2 (2-447) (T48R; D270N; A382S; V434T) – pLD03

Molekulargewicht (ungeschnitten/geschnitten): 55260 Da / 51817 Da

Extinktionskoeffizient (ungeschnitten/geschnitten): 66810 M⁻¹cm⁻¹ / 63830 M⁻¹cm⁻¹

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSTSHHHHH	HDHITSLYKK	AGFENLYFQG	NEVSVIKEGW	LHKRGEYIKT	WRPRYFLLKS
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
DGSFIGYKER	PEAPDQRLPP	LNNFSVAECQ	LMKTERPRPN	TFVIRCLQWT	TVIERTFHVD
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
SPDEREEWMR	AIQMVANSLK	QRAPGEDPMD	YKCGSPSDSS	TTEEMEVAVS	KARAKVTMND
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
FDYLKLLGKG	TFGKVVILVRE	KATGRYAMK	ILRKEVIAK	DEVAHTVTES	RVLQNTRHPF
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
LTALKYAFQT	HDRLCFVMEY	ANGGELFFHL	SRERVFTEER	ARFYGAEIVS	ALEYLHSRNV
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
VYRDIKLENL	MLDKDGHKI	TDFGLCKEGI	SDGATMKTFC	GTPEYLAPEV	LEDNDYGRAV
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
DWGWLGVMY	EMMCGRLPFY	NQDHERLFEL	ILMEEIRFPR	TLSPEAKSLL	SGLLKKDPKQ
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	
RLGGGPSDAK	EVMEHRFFLS	INWQDVVQKK	LLPPFKPQVT	SETDTRYFDD	EFTAQS

7.4.4 Akt2 (2-447) (P115del; G116del; E117A; E118A) – pLD04

Molekulargewicht (ungeschnitten/geschnitten): 54932 Da / 51489 Da

Extinktionskoeffizient (ungeschnitten/geschnitten): 66810 M⁻¹cm⁻¹ / 63830 M⁻¹cm⁻¹

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSTSHHHHH	HDHITSLYKK	AGFENLYFQG	NEVSVIKEGW	LHKRGEYIKT	WRPRYFLLKS
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
DGSFIGYKER	PEAPDQTLPP	LNNFSVAECQ	LMKTERPRPN	TFVIRCLQWT	TVIERTFHVD
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
SPDEREEWMR	AIQMVANSLK	QRAAAPMDYK	CGSPSDSSTT	EEMEVAVSKA	RAKVTMNDFD
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
YLKLLGKGT	GKVVILVREKA	TGRYAMKIL	RKEVIAKDE	VAHTVTESRV	LQNTRHPFLT
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
ALKYAFQTHD	RLCFVMEYAN	GGELFFHLSR	ERVFTEERAR	FYGAEIVSAL	EYLHSRDVVY
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
RDIKLENLML	DKDGHKID	FGLCKEGISD	GATMKTFCGT	PEYLAPEVLE	DNDYGRAVDW
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
WGLGVMYEM	MCGRLPFYNQ	DHERLFELIL	MEEIRFPRTL	SPEAKSLLAG	LLKKDPKQRL
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	
GGGPSDAKEV	MEHRFFLSIN	WQDVVQKLL	PPFKPQVTSE	VDTRYDDEF	TAQS

7.4.5 Akt2 (2-447) (2-111)-Akt1 (112-145)-Akt2 (146-446) – pLD05

Molekulargewicht (ungeschnitten/geschnitten): 55991 Da / 51548 Da

Extinktionskoeffizient (ungeschnitten/geschnitten): 65320 M⁻¹cm⁻¹ / 62340 M⁻¹cm⁻¹

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSTSHHHHH	HDHITSLYKK	AGFENLYFQG	NEVSVIKEGW	LHKRGEYIKT	WRPRYFLLKS
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
DGSFIGYKER	PEAPDQTLPP	LNNFSVAECQ	LMKTERPRPN	TFVIRCLQWT	TVIERTFHVD
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
SPDEREEMMR	AIQMVANSLK	KQAAAEMDFR	SGSPSDNSGA	EEMEVSLAKP	KHRVTMNFDF
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
YLKLLGKGT	GKVVILVREKA	TGRYYAMKIL	RKEVIAKDE	VAHTVTESRV	LQNTRHPFLT
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
ALKYAFQTHD	RLCFVMEYAN	GGELFFHLSR	ERVFTEERAR	FYGAEIVSAL	EYLHSRDVVY
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
RDIKLENLML	DKDGHKIDT	FGLCKEGISD	GATMKTFCGT	PEYLAPEVLE	DNDYGRAVDW
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
WGLGVVYEM	MGRLPFYNQ	DHERLFELIL	MEEIRFPRTL	SPEAKSLLAG	LLKKDPKQRL
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	
GGGSDAKEV	MEHRFFLSIN	WQDVVQKLL	PPFKPQVTSE	VDTRYFDDEF	TAQS

7.4.6 Akt2 (2-439) – pLD06

Molekulargewicht (ungeschnitten/geschnitten): 55294 Da / 50851 Da

Extinktionskoeffizient (ungeschnitten/geschnitten): 66810 M⁻¹cm⁻¹ / 63830 M⁻¹cm⁻¹

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSTSHHHHH	HDHITSLYKK	AGFENLYFQG	NEVSVIKEGW	LHKRGEYIKT	WRPRYFLLKS
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
DGSFIGYKER	PEAPDQTLPP	LNNFSVAECQ	LMKTERPRPN	TFVIRCLQWT	TVIERTFHVD
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
SPDEREEMMR	AIQMVANSLK	QRAPGEDPMD	YKCGSPSDSS	TTEEMEVAVS	KARAKVTMND
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
FDYLKLLGKG	TFGKVVILVRE	KATGRYYAMK	ILRKEVIAK	DEVAHTVTE	RVLQNTRHPF
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
LTALKYAFQT	HDRLCFVMEY	ANGGELFFHL	SRERVFTEER	ARFYGAEIVS	ALEYLHSRDV
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
VYRDIKLENL	MLDKDGHIKI	TDFGLCKEGI	SDGATMKTFC	GTPEYLAPEV	LEDNDYGRAV
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
DWWGLGVVY	EMMGRLPFY	NQDHERLFEL	ILMEEIRFPR	TLSPEAKSLL	AGLLKKDPKQ
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>		
RLGGGSDAK	EVMEHRFFLS	INWQDVVQKK	LLPPFKPQVT	SEVDTRYF	

7.4.7 Akt2-Kinasedomäne (146-447) - pLD07

Molekulargewicht (ungeschnitten/geschnitten): 38283 Da / 34840 Da

Extinktionskoeffizient (ungeschnitten/geschnitten): 38850 M⁻¹cm⁻¹ / 35870 M⁻¹cm⁻¹

10 20 30 40 50 60
MGSTSHHHHH HDHITSLYKK AGFENLYFQG TMNDFDYLKL LGKGTFGKVI LVREKATGRY

70 80 90 100 110 120
YAMKILRKEV IIAKDEVAHT VTESRVLQNT RHPFLTALKY AFQTHDRLCF VMEYANGGEL

130 140 150 160 170 180
FFHLSRERVF TEERARFYGA EIVSALEYLH SRDVVYRDIK LENLMLDKDG HIKITDFGLC

190 200 210 220 230 240
KEGISDGATM KTFCGTPEYL APEVLEDNDY GRAVDWWGLG VVMYEMMCGR LPFYNQDHER

250 260 270 280 290 300
LFELILMEEI RFPRTLSP EA KLLAGLLKK DPKQRLGGGP SDAKEVMEHR FFLSINWQDV

310 320 330
VQKLLPPFK PQVTSEVDTR YFDDEFTAQS

7.4.8 Akt2-PH (2-111) - pLD08

Molekulargewicht (ungeschnitten/geschnitten): 16583 Da / 13140 Da

Extinktionskoeffizient (ungeschnitten/geschnitten): 29450 M⁻¹cm⁻¹ / 26470 M⁻¹cm⁻¹

10 20 30 40 50 60
MGSTSHHHHH HDHITSLYKK AGFENLYFQG NEVSVIKEGW LHKRGEYIKT WRPRYFLLKS

70 80 90 100 110 120
DGSFIGYKER PEAPDQTLPP LNNFSVAECQ LMKTERPRPN TFEVIRCLQWT TVIERTFHVD

130 140
SPDEREEWMMR AIQMVANSLK

7.4.9 Akt2 (2-447) (GGGS)₂ – pLD12

Molekulargewicht (ungeschnitten/geschnitten): 51979 Da / 48536 Da

Extinktionskoeffizient (ungeschnitten/geschnitten): 65320 M⁻¹cm⁻¹ / 62340 M⁻¹cm⁻¹

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSTSHHHHH	HDHITSLYKK	AGFENLYFQG	NEVSVIKEGW	LHKRGEYIKT	WRPRYFLKLS
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
DGSFIGYKER	PEAPDQTLPP	LNNFSVAECQ	LMKTERPRPN	TFVIRCLQWT	TVIERTFHVD
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
SPDEREEMWR	AIQMVANSLK	GGGSGGGGS	TMNDFDYKLK	LGKGTFGKVI	LVREKATGRY
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
YAMKILRKEV	IIAKDEVAHT	VTESRVLQNT	RHPFLTALKY	AFQTHDRLCF	VMEYANGGEL
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
FFHLSRERVF	TEERARFYGA	EIVSALEYLH	SRDVVYRDIK	LENLMLDKDG	HIKITDFGLC
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
KEGISDGATM	KTFCGTPEYL	APEVLEDNDY	GRAVDWWGLG	VVMYEMMCGR	LPFYNQDHER
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
LFELIIMEEI	RFPRTLPEA	KSLLAGLLKK	DPKQRLGGGP	SDAKEVMEHR	FFLSINWQDV
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>			
VQKLLPPFK	PQVTSEVDTR	YFDEFETAQS			

7.4.10 Akt1 (2-446) (S205T; D262E; E267del; K268R; N269D)- pLD13 (Akt2-Mimikry)

Molekulargewicht (ungeschnitten/geschnitten): 55040 Da / 51598 Da

Extinktionskoeffizient (ungeschnitten/geschnitten): 66810 M⁻¹cm⁻¹ / 63830 M⁻¹cm⁻¹

<u>10</u>	<u>20</u>	<u>30</u>	<u>40</u>	<u>50</u>	<u>60</u>
MGSTSHHHHH	HDHITSLYKK	AGFENLYFQG	SDVAIVKEGW	LHKRGEYIKT	WRPRYFLKLN
<u>70</u>	<u>80</u>	<u>90</u>	<u>100</u>	<u>110</u>	<u>120</u>
DGTFIGYKER	PQDVDQREAP	LNNFSVAQCQ	LMKTERPRPN	TFIIRCLQWT	TVIERTFHVE
<u>130</u>	<u>140</u>	<u>150</u>	<u>160</u>	<u>170</u>	<u>180</u>
TPEEREWT	AIQTVADGLK	KQAAAEMDFR	SGSPSDNSGA	EEMVSLAKP	KHRVTMNEFE
<u>190</u>	<u>200</u>	<u>210</u>	<u>220</u>	<u>230</u>	<u>240</u>
YLKLLGKGT	GKVILVKEKA	TGRYAMKIL	KKEVIVAKDE	VAHTLTENRV	LQNTRHPFLT
<u>250</u>	<u>260</u>	<u>270</u>	<u>280</u>	<u>290</u>	<u>300</u>
ALKYSFQTHD	RLCFVMEYAN	GGELFFHLSR	ERVFSEDRAR	FYGAEIVSAL	EYLHSRDVVY
<u>310</u>	<u>320</u>	<u>330</u>	<u>340</u>	<u>350</u>	<u>360</u>
RDLKLENLML	DKDGHIKITD	FGLCKEGIKD	GATMKTFCGT	PEYLAPEVLE	DNDYGRAVDW
<u>370</u>	<u>380</u>	<u>390</u>	<u>400</u>	<u>410</u>	<u>420</u>
WGLGVVMEY	MCGRLPFYNQ	DHEKLFELIL	MEEIRFPRTL	GPEAKSLLSG	LLKKDPKQRL
<u>430</u>	<u>440</u>	<u>450</u>	<u>460</u>	<u>470</u>	
GGGSEDAKEI	MQHRFFAGIV	WQHVYEKKLS	PPFKPQVTSE	TDTRYFDEEF	TAQM

7.4.11 Akt3^{Wt} (2-443) - pLD02

Molekulargewicht (ungeschnitten/geschnitten): 54766 Da / 51324 Da

Extinktionskoeffizient (ungeschnitten/geschnitten): 68300 M⁻¹cm⁻¹ / 65320 M⁻¹cm⁻¹

10 20 30 40 50 60
MGSTSHHHHH HDHITSLYKK AGFENLYFQG SDVTIVKEGW VQKRGEYIKN WRPRYFLLKT

70 80 90 100 110 120
DGSFIGYKEK PQDVLDPLPYL NNFSVAKCQL MKTERPKPNT FIIRCLQWTT VIERTFHVDT

130 140 150 160 170 180
PEEREEWTEA IQAVADRLQR QAAARMNCSP TSQIDNIGEE EMDASTTHHK RKTMNDFDYL

190 200 210 220 230 240
KLLGKGTFGK VILVREKASG KYYAMKILKK EVIIAKDEVA HTLTESRVLK NTRHPFLTSL

250 260 270 280 290 300
KYSFQTKDRL CFVMEYVNGG ELFFHLSRER VFSEDRTRFY GAEIVSALDY LHSGKIVYRD

310 320 330 340 350 360
LKLENLMLDK DGHIKITDFG LCKEGITDAA TMKTFCGTPE YLAPEVLEDN DYGRAVDWWG

370 380 390 400 410 420
LGVVMYEMMC GRLPFYNQDH EKLFEILIME DIKFPRTLSS DAKSLLSGLL IKDPNKRLGG

430 440 450 460 470
GPDDAKEIMR HSFFSGVNWQ DVYDKKLVPP FKPQVTSETD TRYFDEEFTA QT

7.4.12 Erk2

Molekulargewicht (ungeschnitten/geschnitten): 43553 Da / 41671 Da

Extinktionskoeffizient (ungeschnitten/geschnitten): 44810 M⁻¹cm⁻¹ / 44810 M⁻¹cm⁻¹

10 20 30 40 50 60
MGSSHHHHHHH SSSLVPRGSH MAAAAAAGAG PEMVRGQVFD VGPRYTNLST IGEGAYGMVC

70 80 90 100 110 120
SAYDNVNKVR VAIKKISPF EHQTYCQRTL R EIKILLRFRH ENIIGINDII RAPTIEQMKD

130 140 150 160 170 180
VYIVQDLMET DLYKLLKTQH LSNDHICYFL YQILRGLKYI HSANVLHRDL KPSNLLLNTT

190 200 210 220 230 240
CDLKICDFGL ARVADPDHDH TGFLTEYVAT RWYRAPEIML NSKGYTKSID IWSVGCILAE

250 260 270 280 290 300
MLSNRPIFFG KHYLDQLNHI LGILGSPSQE DLNCIINLKA RNYLLSLPHK NKVPWNRLFP

310 320 330 340 350 360
NADSKALDLL DKMLTFNPHK RIEVEQALAH PYLEQYYDPS DEPIAEAPFK FDMELDDLPK

370 380
EKLKELIFEE TARFQPGYRS

7.5 Untersuchung der Akt2^{Wt}-Stabilität

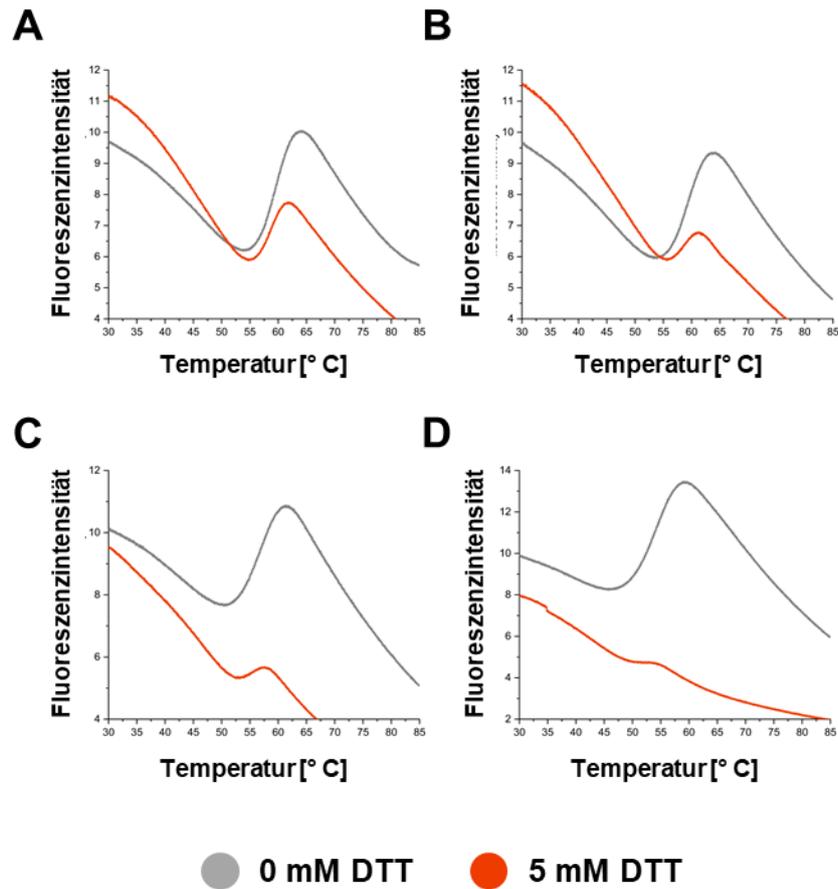


Abbildung 61: Untersuchung der Akt2-Stabilität mit dem TSA. **A:** Ergebnisse des TSA bei pH 7,5. **B:** Ergebnisse des TSA bei pH 8. **C:** Ergebnisse des TSA bei pH 8,5. **D:** Ergebnisse des TSA bei pH 9. Die Fluoreszenzspektren zeigen, dass Akt2 in Anwesenheit von DTT zu einer schnelleren Aggregation sowie zu geringeren T_m-Werten tendiert und weisen demnach auf eine geringere Stabilität des Proteins unter diesen Bedingungen hin.

7.6 Massenspektrometrische Analyse von pLD13 und pLD05

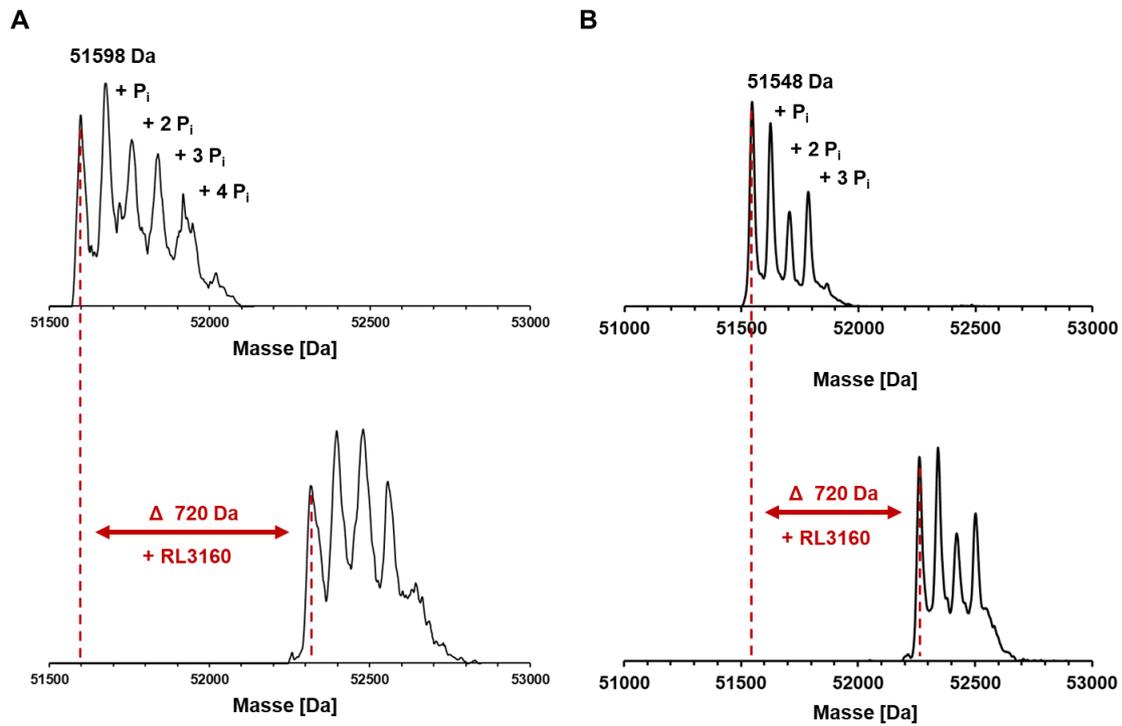


Abbildung 62: **A:** Massenspektrometrische Untersuchung von Akt2-Mimikry (pLD13) in der Apo-Form und nach einer 4-stündigen Inkubation mit dem hybriden CAAI RL3160. **B:** Massenspektrometrische Untersuchung von Akt2 (2-447) (2-111)-Akt1 (112-145)-Akt2 (146-446) (pLD05) in der Apo-Form und nach einer 60-minütigen Inkubation mit dem hybriden CAAI RL3160.

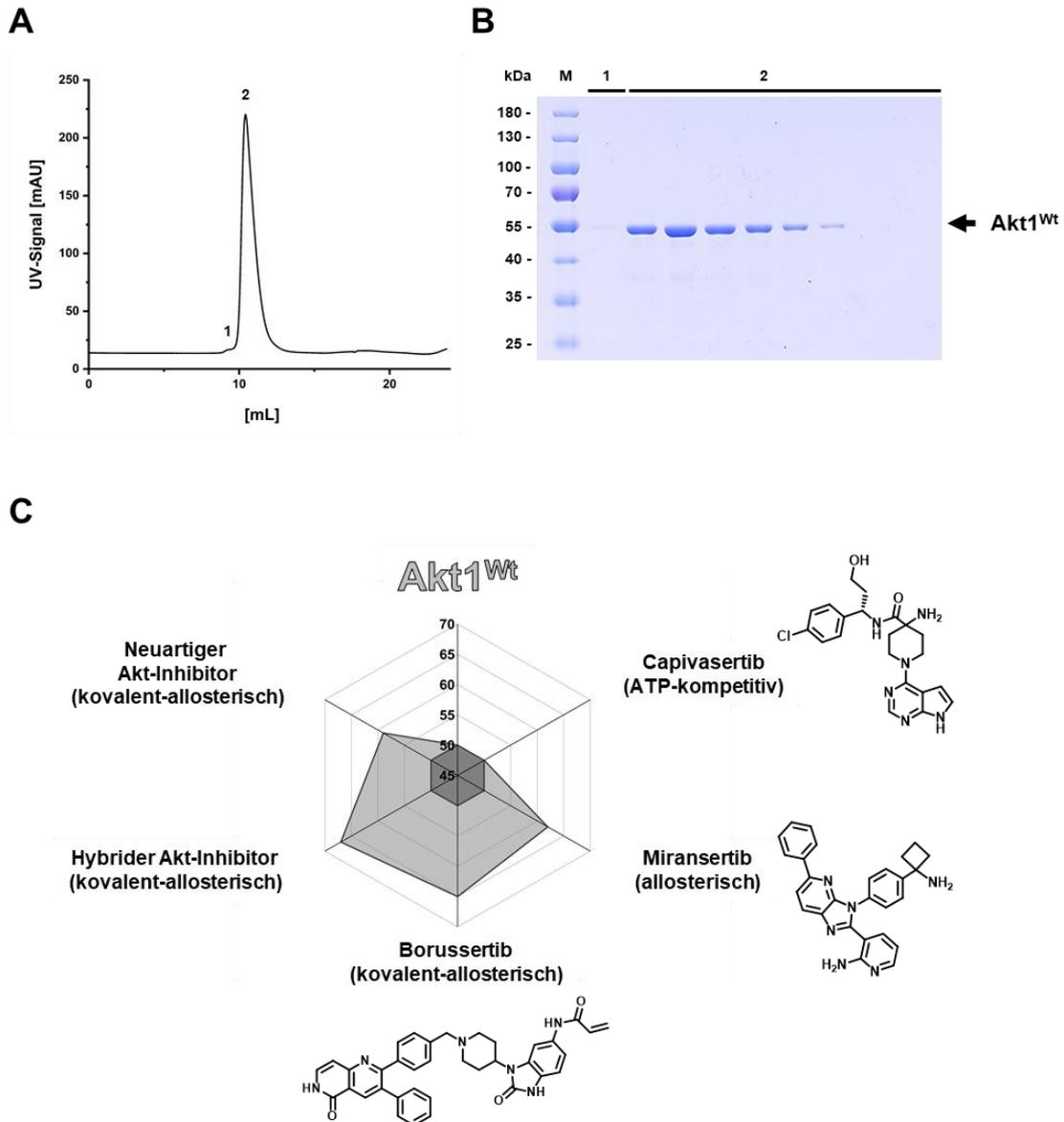
7.7 SEC und TSA von Akt1^{Wt}

Abbildung 63: Zweite SEC zur Überführung von Akt1^{Wt} in den Kristallisationspuffer und Proteinstabilitätsuntersuchungen. **A** und **B**: Ergebnisse der SEC von Akt1^{Wt}. **A**: UV-Chromatogramm. UV-Signal (schwarz). **B**: SDS-Gel nach CBB-Färbung: Marker (M); Elutionspeak (1); Elutionspeak (2). **C**: Vergleich der Ergebnisse des TSA-Assays von Akt1^{Wt} inkubiert mit unterschiedlichen Inhibitorklassen.*****

***** Durchführung des TSA-Experiments in Zusammenarbeit mit Dr.in Ina Landel (AG Rauh, TU Dortmund).

7.8 Kristallisation von Akt1^{Wt}

A

		PEG 2000 MME				
		12 %	15 %	18 %	21 %	24 %
pH	6.5					
	7.0					
	7.5					

1,25 mM Na-Acetat
3,75 mM Na-Citrat

Temperatur: 18 °C
Proteinkonzentration: 3 mg/mL

B

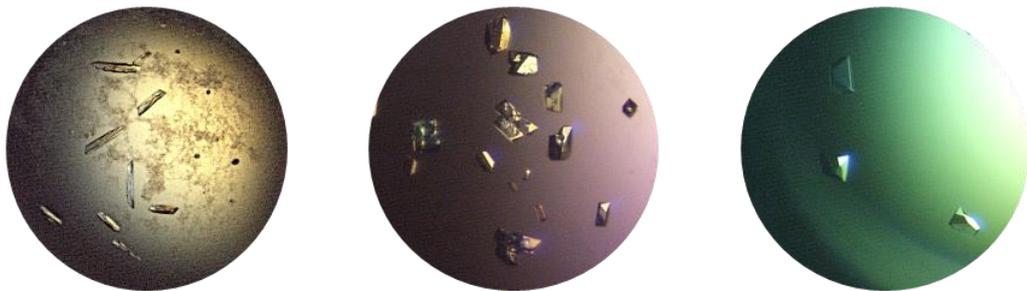


Abbildung 64: A: Verwendete Kristallisationsbedingungen für Akt1^{Wt}: 1,25 mM Natrium-Acetat und 3,75 mM Natrium-Citrat mit pH-Werten von 6,5 – 7,5 sowie einer PEG 2000 MME-Konzentration von 12-24 %. Inkubation von 3 mg/mL Protein bei 18 °C. B-D: Beispiele für die beobachteten Kristallmorphologien mit unterschiedlichen Inhibitorklassen.

7.9 Datenstatistiken

Tabelle 17: Datenstatistiken der Akt-Komplexstrukturen. Die Werte in den Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

	Akt2-Mimikry (pLD13)	Akt1^{Wt}	Akt1^{Wt}
	Miransertib	RL2884	RL3084
Datenprozessierung		PDB: 7NH4 ⁺⁺⁺⁺⁺	PDB: 7NH5 ^{#####}
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten			
a, b, c (Å)	44.80, 164.25, 188.96	70.76, 70.95, 91.13	70.65, 71.41, 91.02
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	47.37 – 2.50 (2.60 – 2.50)	45.56 – 2.30 (2.40 – 2.30)	43.97 – 1.90 (1.90 – 2.00)
R _{meas} (%)	12.2 (154.0)	6.4 (161.4)	5.0 (188.5)
R _{merge} (%)	11.7 (148.0)	6.0 (150.2)	4.8 (181.7)
I/ σ I	13.99 (1.58)	15.03 (1.05)	25.85 (1.47)
CC _{1/2}	99.9 (74.1)	99.9 (60.8)	100.0 (67.9)
Vollständigkeit (%)	100.0 (100.0)	99.9 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundanz	13.6 (13.0)	7.4 (7.5)	13.5 (14.1)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	47.37 – 2.50	45.56 – 2.30	43.97 – 1.90
Anzahl der Reflexe	49467	20958	36964
R _{work} /R _{free} (%)	23.89/28.80 (36.83/39.05)	22.28/24.57 (33.86/36.77)	19.98/22.84 (34.80/37.23)
Anzahl der Atome			
	Kette A: 2882		
Protein	Kette B: 2898	3045	3149
	Kette C: 2815		
	Kette A: 33/10		
Ligand/Ion	Kette B: 33/14	42	65
	Kette C: 33		
Wasser	142	15	83
B-Faktoren			
	Kette A: 75.49		
Protein	Kette B: 70.76	82.18	58.00
	Kette C: 83.78		
	Kette A: 54.24/86.84		
Ligand/Ion	Kette B: 58.73/84.48	73.12	42.04
	Kette C: 61.63		
Wasser	65.48	68.24	56.10

+++++ Strukturaufklärung und Verfeinerung durch Dr.in Ina Landel (AG Rauh, TU Dortmund).

Strukturaufklärung und Verfeinerung durch Dr.in Ina Landel (AG Rauh, TU Dortmund).

	Akt2-Mimikry (pLD13)	Akt1^{Wt}	Akt1^{Wt}
	Miransertib	RL2884	RL3084
Verfeinerung			
Standardabweichung			
Bindungslängen (Å)	0.002	0.002	0.010
Bindungswinkel (°)	0.683	0.494	1.084
Wellenlänge (Å)	0.99999	0.99999	0.99998
Temperatur	100	100	100
Röntgenquelle	PX II at SLS, Villigen, CH	PX II at SLS, Villigen, CH	PX II at SLS, Villigen, CH
Detektor	Eiger2 X 16M	Eiger2 X 16M	Eiger2 X 16M

Tabelle 18: Datenstatistiken der Erk-Komplexstrukturen. Die Werte in den Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungsschale.

	Erk2	Erk2
	Apo	Ulixertinib
Datenprozessierung		
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellkonstanten		
a, b, c (Å)	44.09, 70.74, 120.16	43.75, 69.55, 119.31
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90
Auflösung (Å)	45.79 – 1.95 (2.05-1.95)	50.00 – 1.70 (1.80-1.70)
R _{meas} (%)	9.6 (176.1)	7.2 (191.9)
R _{merge} (%)	9.2 (169.6)	6.9 (184.5)
I/ σ I	17.74 (1.88)	20.01 (1.45)
CC _{1/2}	99.9 (76.2)	100.0 (62.2)
Vollständigkeit (%)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundanz	13.4 (13.8)	13.2 (13.3)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	45.79 – 1.95	50.00 – 1.70
Anzahl der Reflexe	28182	40895
R _{work} /R _{free} (%)	20.74/24.89 (27.85/33.04)	18.64/22.17 (41.54/46.76)
Anzahl der Atome		
Protein	2697	2758
Ligand/Ion	15	29/20
Wasser	136	198
B-Faktoren		
Protein	46.70	38.60
Ligand/Ion	132.45	28.13/73.87
Wasser	48.55	44.17

	Erk2 Apo	Erk2 Ulixertinib
Verfeinerung		
Standardabweichung		
Bindungslängen (Å)	0.017	0.007
Bindungswinkel (°)	1.731	0.927
Wellenlänge (Å)	0.99999	0.99999
Temperatur	100	100
Röntgenquelle	PX II at SLS, Villigen, CH	PX II at SLS, Villigen, CH
Detektor	Eiger2 X 16M	Eiger2 X 16M

7.10 Massenexperimente~~§§§§§§~~

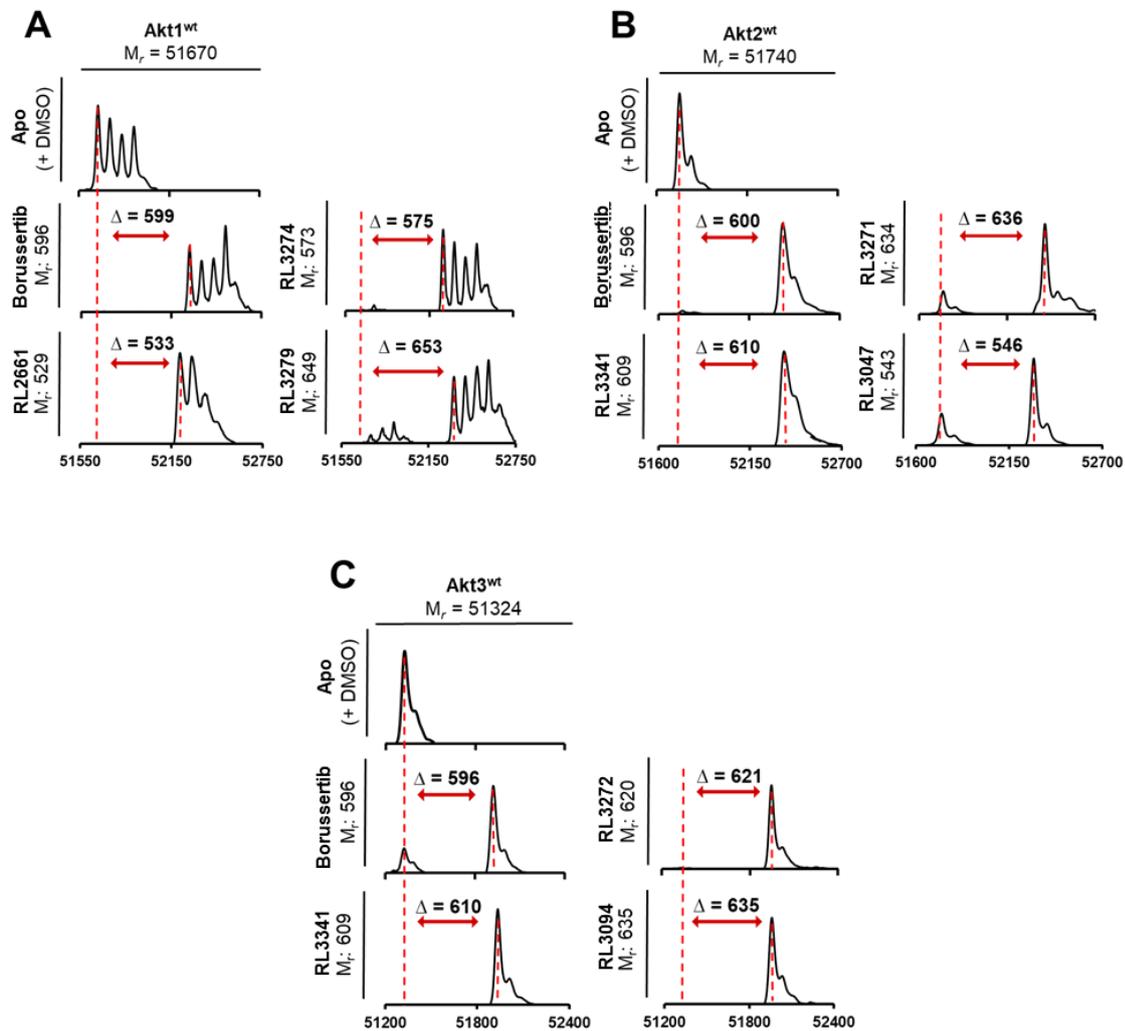


Abbildung 65: Protein-Massenspektrometrie ausgewählter CAAs mit den Akt-Isoformen. Dekonvolutierte Massenspektren von Akt1^{Wt} (**A**), Akt2^{Wt} (**B**) und Akt3^{Wt} (**C**) nach Inkubation mit DMSO (Apo) und ausgewählten CAAs. Alle getesteten Moleküle zeigen Massenunterschiede entsprechend einer Monomarkierung des Proteins, und die Vollständigkeit entspricht der Potenz der Liganden für die spezifische Isoform. Die Massenspektren wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgenommen.

~~§§§§§§~~ Durchführung der Massenexperimente in Zusammenarbeit mit Dr.in Lena Quambusch (AG Rauh, TU Dortmund).

7.11 Tandem-Massenspektrometrie

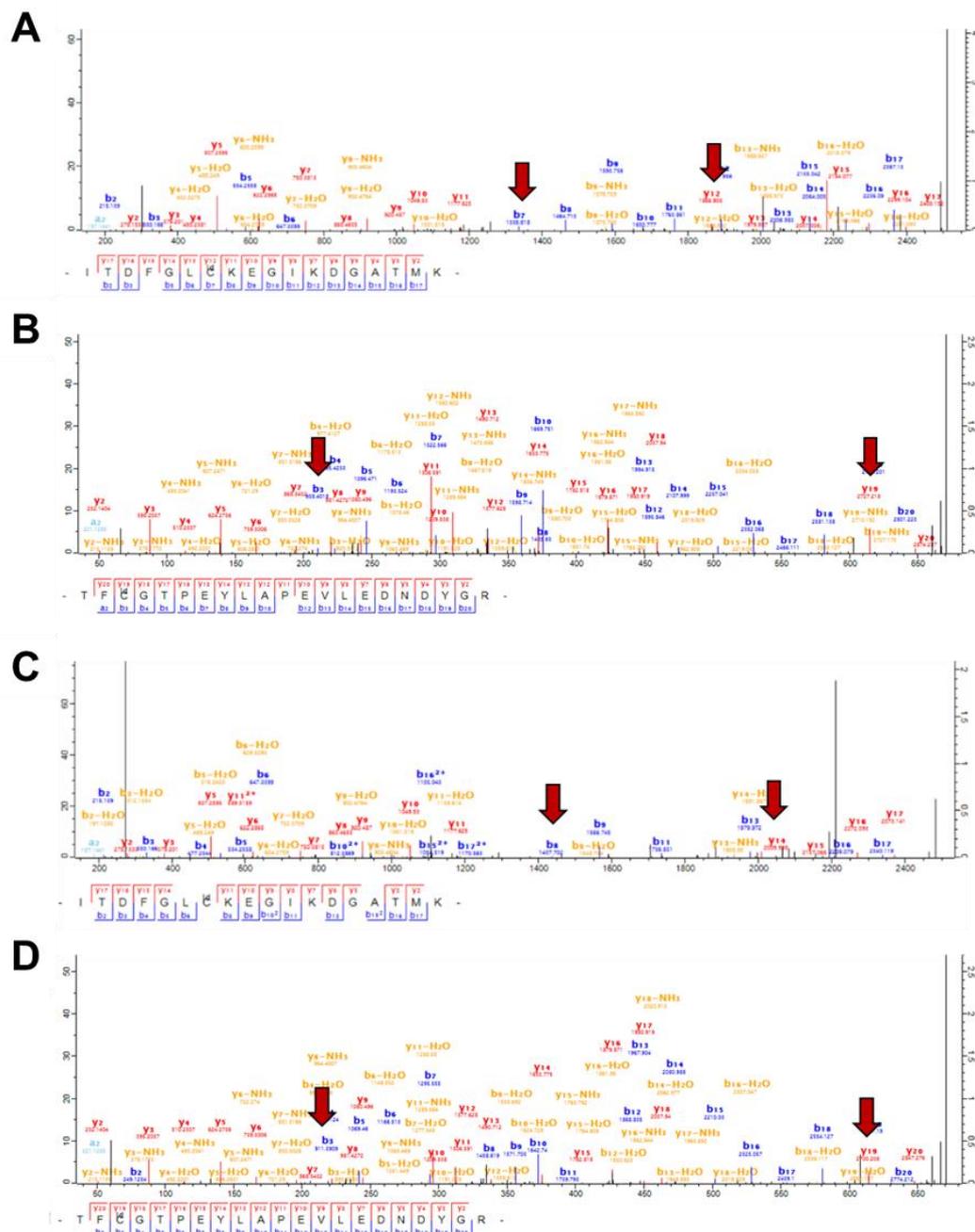


Abbildung 66: MS/MS-Spektren von Akt1^{Wt}, modifiziert mit den CAIs RL2884 und RL3084. Akt-Isoformen in voller Länge wurden mit einem 5-fachen molaren Überschuss der Inhibitoren RL2884 und RL3084 mit Akt1^{Wt} inkubiert. Tandem-MS/MS-Spektren zeigen die segmentale Markierung von Cys296 (**A**) und Cys310 (**B**) mit CAI RL2884 sowie von Cys296 (**C**) und Cys30 (**D**) mit CAI RL3084. Die genaue Peptidsequenz ist unter den Spektren dargestellt, und rote Pfeile markieren das identifizierte Fragment mit den alkylierten Resten.

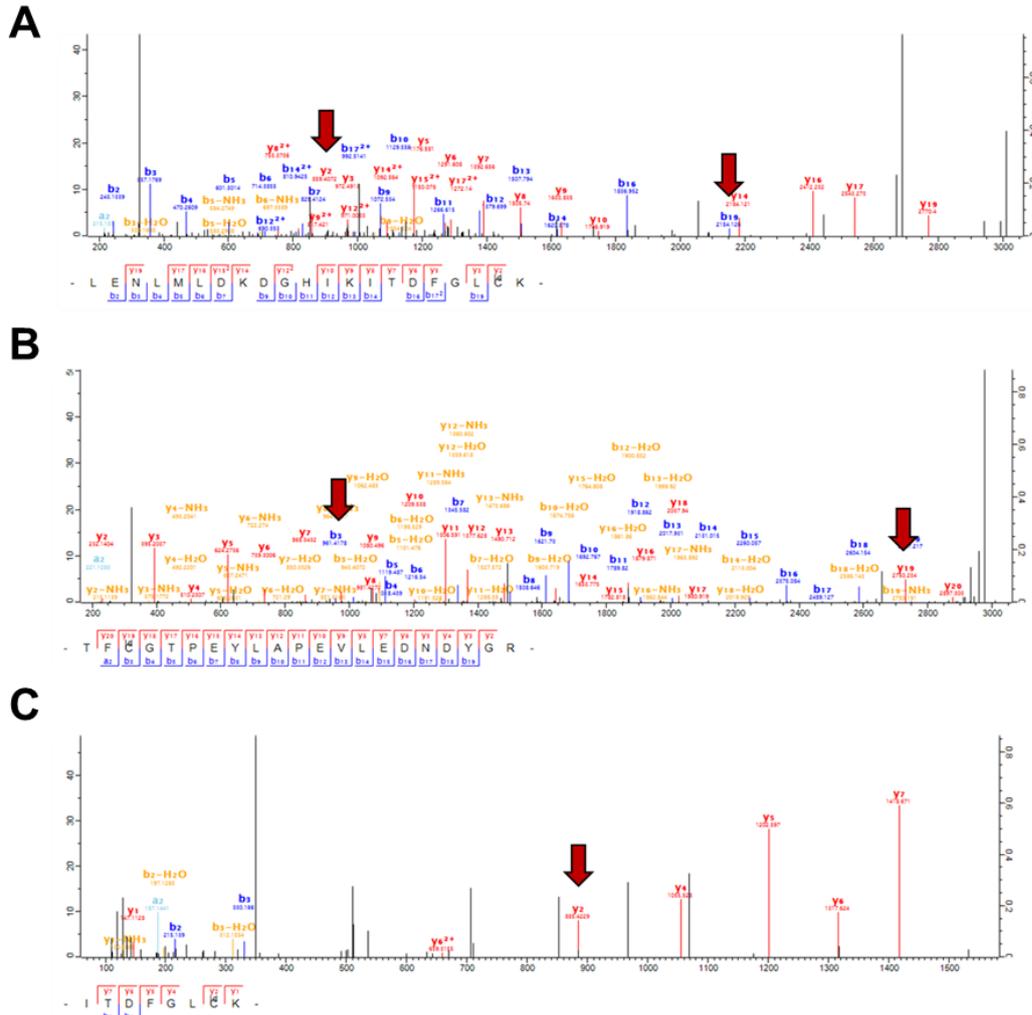


Abbildung 67: MS/MS-Spektren von Akt2^{Wt} und Akt3^{Wt}, modifiziert mit den CAAs RL3341 und RL3094. Akt-Isoformen in voller Länge wurden mit einem 5-fachen molaren Überschuss des Inhibitors RL3341 mit Akt2^{Wt} und RL3094 mit Akt3^{Wt} inkubiert. Die Tandem-MS/MS-Spektren zeigen eine segmentale Markierung von Cys297 **(A)** und Cys311 **(B)** mit CAAI RL3341. Sowie Cys293 **(C)** mit CAAI RL3094. Die genaue Peptidsequenz ist unter den Spektren abgebildet, und rote Pfeile markieren das identifizierte Fragment, das die alkylierten Reste enthält.

7.12 Charakterisierung der Ba/F3-myr-Akt-Isoform-Zellen

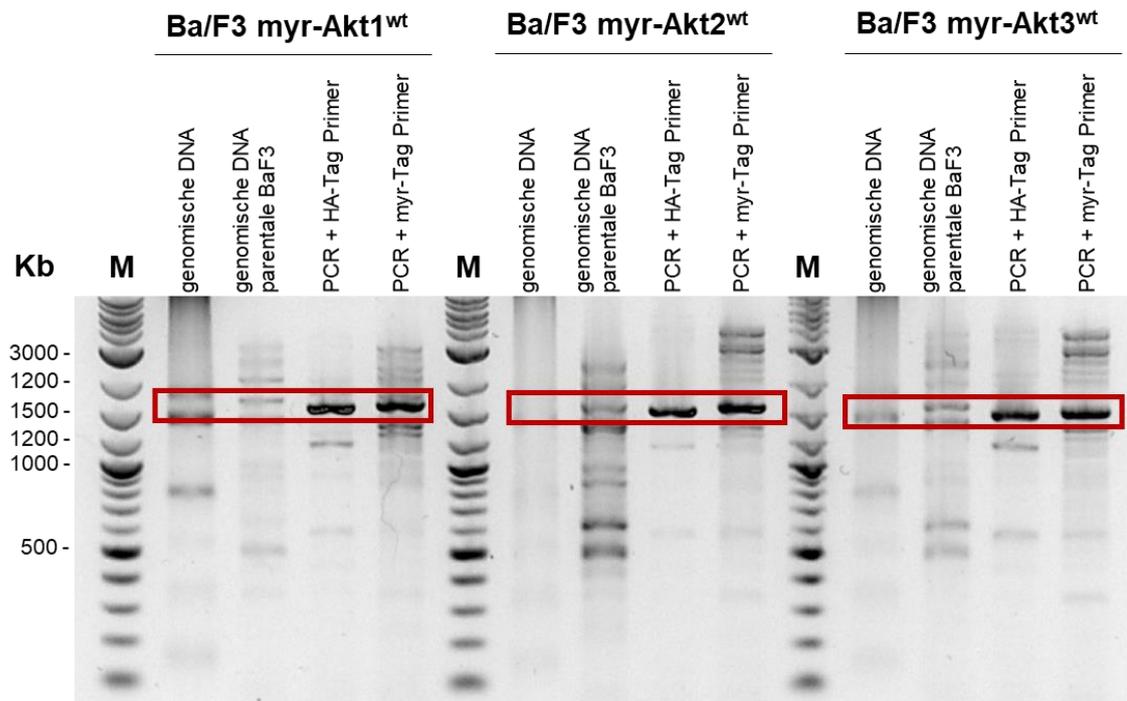


Abbildung 68: Agarosegel der aus den Ba/F3-Zellen isolierten Genome und mit Hilfe von spezifischen Primern amplifizierten myr-Akt-Isoform-Gene.

7.13 Evaluierung Isoform-selektiver CAAs im Ba/F3-Modellsystem

Tabelle 17: Zelluläre Bewertung der synthetisierten CAAs in myr-Akt-Isoform-abhängigen Ba/F3-Zelllinien und der parentalen Ba/F3-Zelllinie. Die mittleren EC₅₀-Werte ± s.d. wurden in n = 3 biologisch unabhängigen Experimenten repliziert wurden.¹⁴⁸

#	EC ₅₀ /nM							
	BaF3 ^{myr-Akt1}		BaF3 ^{myr-Akt2}		BaF3 ^{myr-Akt3}		BaF3	
RL2661	1787 ±	637	4473 ±	2127	> 30000		6894 ±	692
RL3047	3095 ±	307	2785 ±	1205	> 30000		11455 ±	1236
RL2884	28324 ±	1676	21194 ±	8807	> 30000		> 30000	
RL3274	> 30000		> 30000		> 30000		> 30000	
RL3067	4919 ±	689	2714 ±	1039	7650 ±	202	16331 ±	2626
RL3084	9614 ±	1622	10803 ±	2563	25686 ±	3148	> 30000	
RL2905	4711 ±	863	1781 ±	719	2509 ±	522	8462 ±	1441
RL3170	> 30000		12785 ±	948	26478 ±	1737	25613 ±	5480
RL2930	> 30000		13602 ±	2591	14110 ±	3455	29492 ±	718
RL3085	26661 ±	3929	7987 ±	1821	24273 ±	1724	24525 ±	6003
RL2928	28817 ±	1242	2690 ±	355	18561 ±	3885	> 30000	
RL3081	8290 ±	1252	3046 ±	672	5288 ±	2956	24711 ±	5297
RL3096	19283 ±	1743	7179 ±	679	22620 ±	4994	25580 ±	8253
RL3341	7557 ±	482	529 ±	51	4468 ±	148	8643 ±	1221
RL3200	26685 ±	2087	14308 ±	5914	17160 ±	1422	28578 ±	2011
RL3082	> 30000		25496 ±	6370	> 30000		> 30000	
RL3271	> 30000		3750 ±	426	22036 ±	2694	> 30000	
RL3312	17806 ±	499	1479 ±	710	18153 ±	7820	> 30000	
RL3225	12736 ±	4925	2893 ±	688	7442 ±	642	12490 ±	5265
RL3094	9483 ±	366	4093 ±	806	5054 ±	595	12145 ±	3732
RL3272	19686 ±	4737	2234 ±	194	6515 ±	654	14739 ±	2368
RL3279	22535 ±	6092	3683 ±	1254	18840 ±	1056	> 30000	
RL3310	14641 ±	1219	2760 ±	504	17064 ±	7359	> 30000	
RL2406	7211 ±	600	14866 ±	4051	26950 ±	5283	> 30000	
RL2405	29835 ±	130	6343 ±	597	21959 ±	7802	20125 ±	3002
Borussertib	440 ±	99	599 ±	214	6837 ±	670	20068 ±	3660
MK-2206	1124 ±	100	1339 ±	449	5734 ±	169	7386 ±	1553
Capivasertib	1074 ±	223	938 ±	240	848 ±	103	15997 ±	5100

7.14 Immunblot-Studien mit Ba/F3-myr-Akt-Isoform-Zellen

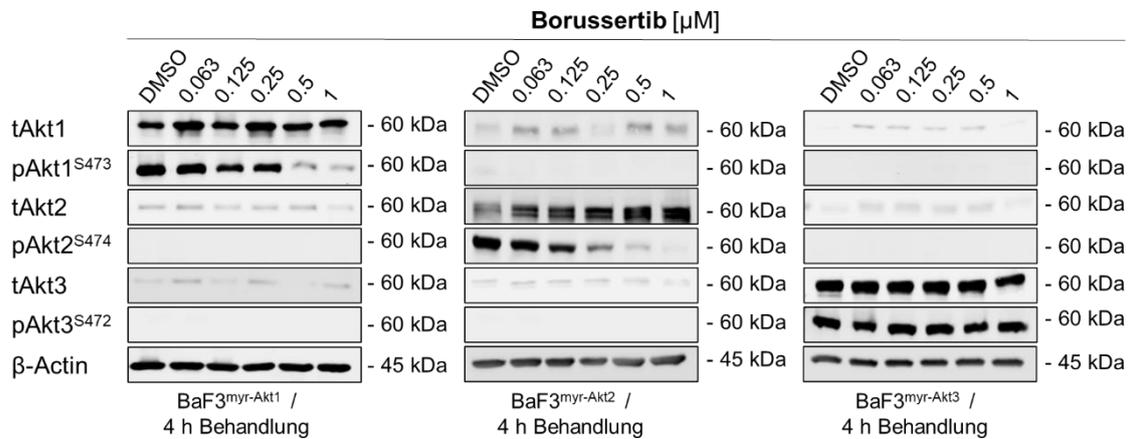


Abbildung 69: Immunoblots der Ba/F3-myr-Akt-Isoform-Zellen behandelt mit Borussertib (0,063-1 μ M) zeigen das Vorhandensein und die Aktivität einzelner Akt-Isoformen sowie die dosisabhängige Verringerung des pAkt-Signals mit steigenden Inhibitorkonzentrationen (n = 1).*****

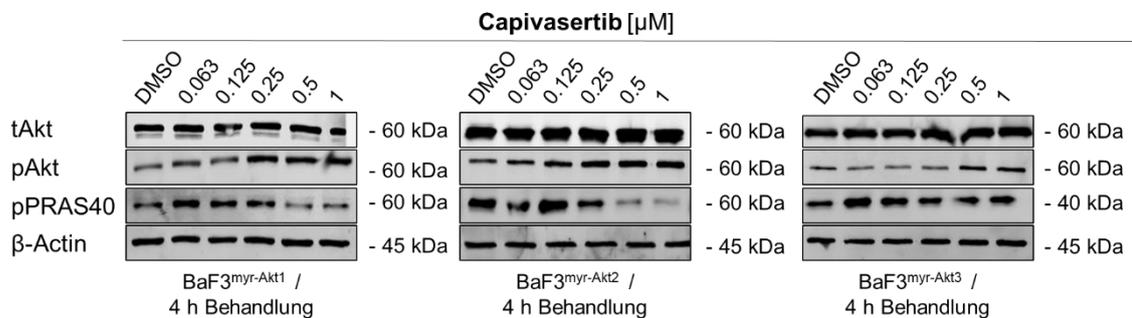


Abbildung 70: Immunoblots der Ba/F3-myr-Akt-Isoform-Zellen behandelt mit Capivasertib (0,063-1 μ M) (n = 1).

***** Durchführung der Immunoblots im Rahmen der Masterarbeit von M. Sc. Melissa Lubeck (AG Rauh, TU Dortmund).

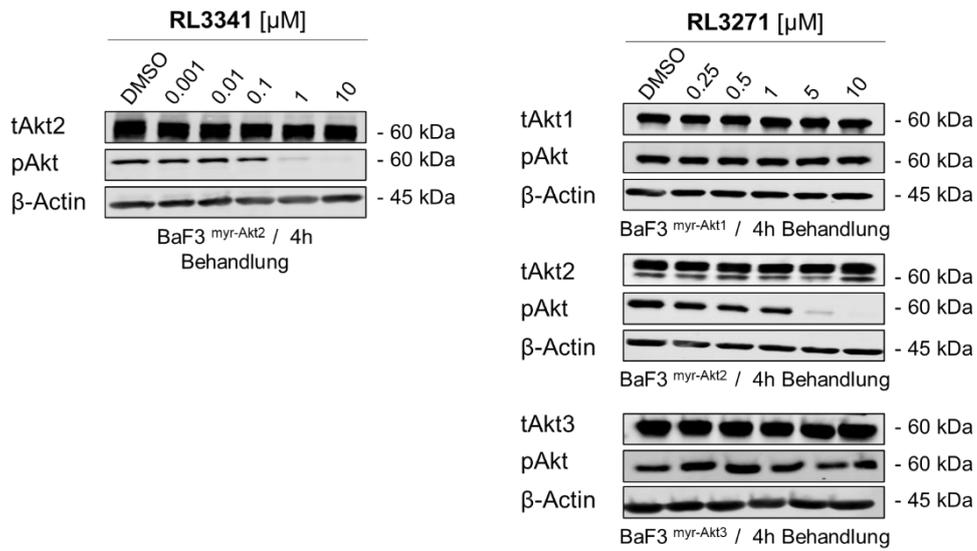


Abbildung 71: Immunoblots der Ba/F3-myr-Akt-Isoform-Zellen behandelt mit RL3341 (0,001-10 μM) und RL3271 (0,25-10 μM) zeigen das Vorhandensein und die Aktivität einzelner Akt-Isoformen sowie die dosisabhängige Verringerung des pAkt-Signals mit steigenden Inhibitorkonzentrationen (n = 1).

7.15 Zelluläre Evaluierung von Akt-Isoform-selektiven CAAs in PANC1

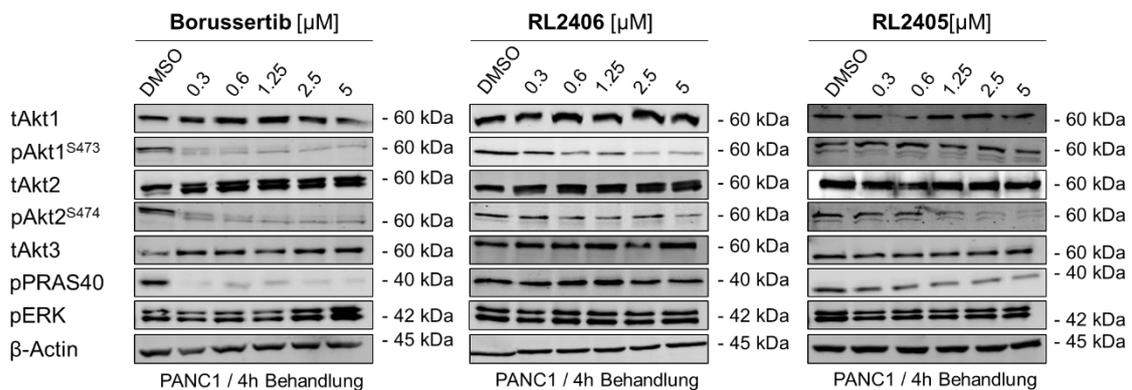


Abbildung 72: Immunoblots von PANC1 behandelt mit Borussertib, RL2406 und RL2405. Die Immunoblots zeigen den Einfluss der CAAs nach 4-stündiger Behandlung auf die individuellen pAkt-Level der Isoformen sowie auf nachgeschaltete Proteine (n = 1).

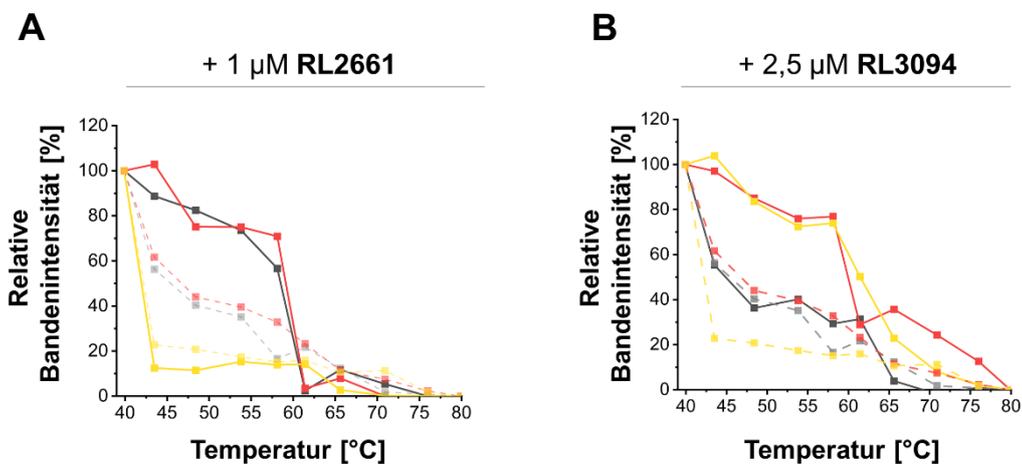


Abbildung 73: Quantifizierung der Immunoblot-basierten CETSA-Experimente von PANC1 behandelt mit **A:** 1 μM RL2661, **B:** 2,5 μM RL3094. Die Signale der tAkt-Antikörper wurden auf Actin normalisiert. Darstellung der mit DMSO behandelten Zellen mit gestrichelten Linien; mit Inhibitor behandelte Zellen mit durchgezogenen Linien; Akt1 (grau); Akt2 (rot); Akt3 (gelb).

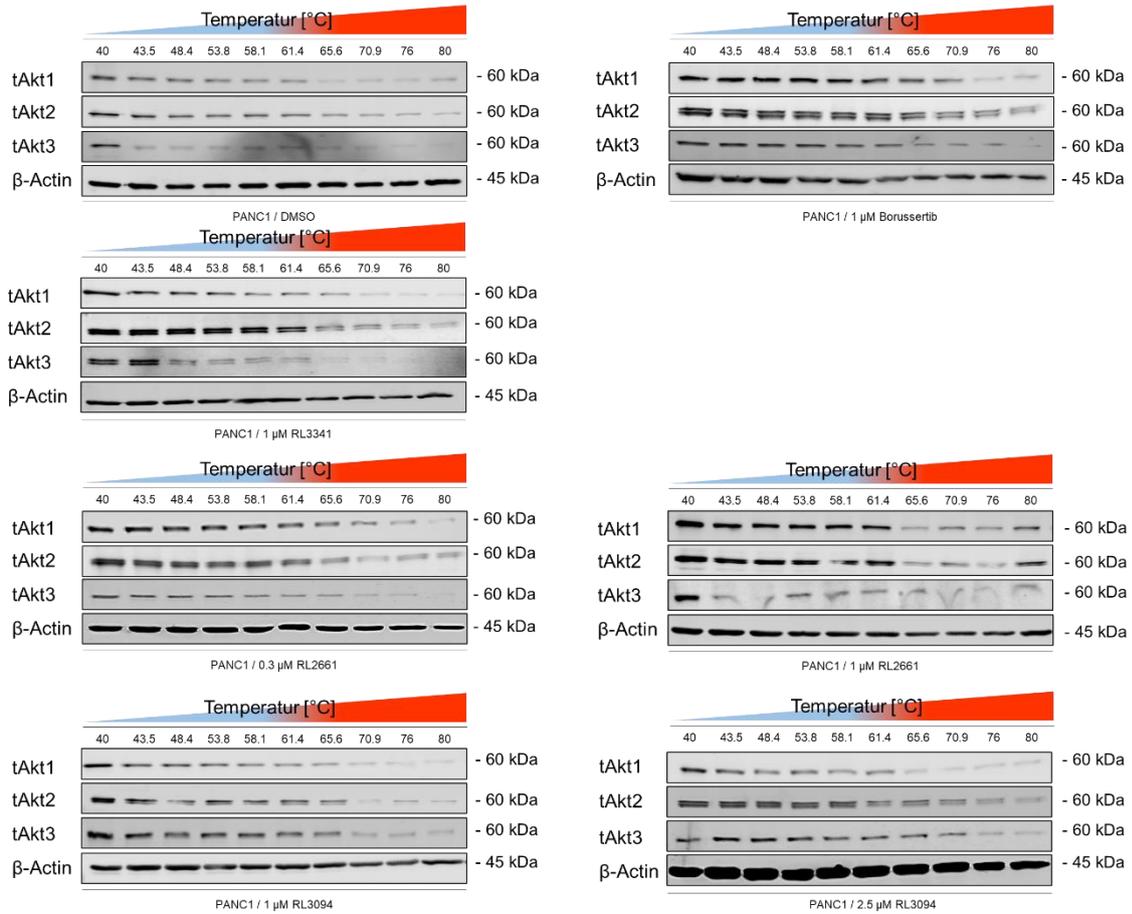


Abbildung 74: Immunoblots der CETSA-Experimente von PANC1 behandelt mit unterschiedlichen CAAs und Inhibitor-Konzentrationen.

7.16 Massenspektrometrische Untersuchung von Erk2

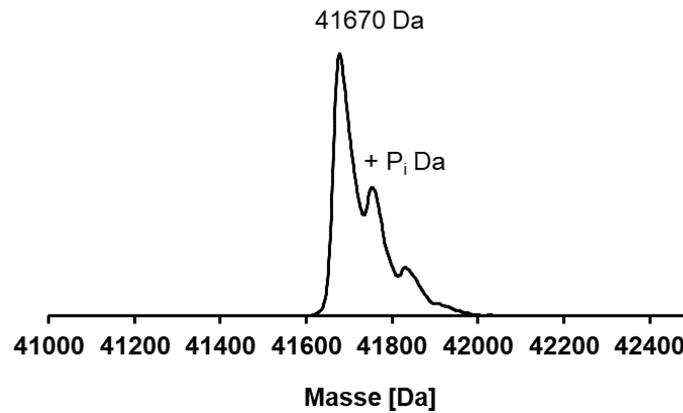


Abbildung 75: Massenspektrometrische Untersuchung von Erk2. Die Ergebnisse zeigen ein größtenteils unphosphoryliertes Protein mit geringen Mengen einfach-phosphoryliertem Protein. Dies deutet daraufhin, dass Erk2 in der inaktiven Konformation vorliegt.