

Design, Synthese und Evaluation
Mutanten-selektiver Inhibitoren zur Adressierung
onkogener KRas-Varianten

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät Chemie und Chemische Biologie

der Technischen Universität Dortmund

vorgelegt von

Lisa Goebel

Dortmund 2022

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Mai 2017 bis Dezember 2021 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Daniel Rauh im Fachbereich für Chemische Biologie und Medizinische Chemie der Fakultät Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh
2. Gutachter: Prof. Dr. Roger S. Goody

Teile dieser Arbeit wurden bereits in Form von Publikationen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften oder im Rahmen der Bachelor- und Masterarbeiten von Sandra Koska und Christian Böhm veröffentlicht und wurden in dieser Dissertation an entsprechender Stelle gekennzeichnet.

PUBLIKATIONEN

Im Rahmen dieser Dissertation sind folgende Publikationen entstanden:

- [1] Goebel, L.; Kirschner, T.; Koska, S.; Rai, A.; Janning, P.; Maffini, S.; Vatheuer, H.; Czodrowski, P.; Goody, R. S.; Müller, M. P.; Rauh, D.; Targeting oncogenic KRasG13C by nucleotide-based covalent inhibitors, **2021**, *revised*.
- [2] Goebel, L.; Müller, M. P.; Goody, R. S.; Rauh, D.; KRasG12C inhibitors in clinical trials: a short historical perspective, *RSC Med. Chem.* **2020**, 11 (7), 760–770.

Im Zeitraum dieser Arbeit wurden zudem zwei finale Kristallstrukturen generiert, die in der Protein Data Bank (PDB) publiziert wurden:

PDB-ID	Titel
7ok3	Crystal Structure of KRasG13C in Complex with Nucleotide-based Covalent Inhibitor edaGDP (<i>submitted</i>)
7ok4	Crystal Structure of KRasG13C in Complex with Nucleotide-based covalent Inhibitor bdaGDP (<i>submitted</i>)

DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Daniel Rauh für das interdisziplinäre Projekt, das mir einen Einblick in viele verschiedene Bereiche der medizinischen Chemie ermöglicht und meine Begeisterung dafür noch verstärkt hat, sowie für die individuelle Förderung während der Promotionszeit bedanken. Prof. Dr. Roger S. Goody möchte ich für die freundliche Übernahme des Koreferats danken.

Ein besonderer Dank gilt zudem Dr. Matthias P. Müller, der durch die projektbegleitende fachliche Unterstützung eine entscheidende Rolle bei dem Erfolg meiner Promotion gespielt hat. Darüber hinaus möchte ich auch dem gesamten Ras-Team der AG Rauh sowie unseren engen Kooperationspartnern des Max-Planck-Instituts Dortmund für die zahlreichen Diskussionen und die produktive Zusammenarbeit danken. Dazu gehören Prof. Dr. Roger S. Goody, Dr. Amrita Rai und Nathalie Bleimling der AG Goody, Dr. Stefano Maffini der AG Musacchio, Dr. Petra Janning der AG Waldmann sowie Tonia Kirschner und Rajesh Gontla der AG Rauh. An dieser Stelle möchte ich mich ebenfalls bei meinen engagierten Studenten Sandra Koska und Christian Böhm bedanken, die mich tatkräftig bei meiner Promotion unterstützt haben und deren Experimente maßgeblich zu dieser Arbeit beigetragen haben.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Rauh, die mich im Studium und meiner Promotion begleitet haben möchte ich für die entspannte Arbeitsatmosphäre und Unternehmungen abseits des Laboralltags danken. Besonders hervorheben möchte ich dabei den Zusammenhalt der selbsternannten Power Labgirls Ina Landel, Janina Niggenaber, Julia Hardick und Laura Depta sowie Marius Lindemann, mit dem ich während der gemeinsamen Promotionszeit nicht nur den Laboralltag, sondern auch den WG-Alltag geteilt habe.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei Andreas Arndt und Paul Siebers für die Unterstützung bei der Proteinexpression und -reinigung sowie beim gesamten Sekretariat mit Martina Reibner, Petra Alhorn, Maria Sergani und Ulrich Schoppe für die Unterstützung in administrativen Bereichen bedanken.

Zuletzt gilt mein Dank meiner Familie, die mir das Studium und die Promotion ermöglicht und mich in all meinen Entscheidungen unterstützt haben, und meinen Freunden, die mich während der gesamten Dauer meines Studiums begleitet und unterstützt haben. Vielen Dank!

INHALTSVERZEICHNIS

Publikationen	V
Danksagung	VII
Inhaltsverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
Kurzfassung	1
Abstract.....	3
1 Einleitung.....	5
1.1 Struktur und Funktion der GTPase Ras	6
1.2 Zielgerichtete Adressierung der GTPase Ras	9
1.2.1 KRasG12C – eine zukunftsweisende Erfolgsgeschichte	12
1.2.2 KRasG13C – eine noch unerforschte onkogene Ras Mutante.....	20
2 Motivation und Zielsetzung	23
3 Ergebnisse und Diskussion	25
3.1 Rationales Design kovalenter Nukleotid-basierter KRas-Inhibitoren	25
3.2 Synthese und Charakterisierung von kovalenten Guaninnukleotid-basierten Verbindungen.....	30
3.2.1 Synthese der Nukleotidanaloga	31
3.2.2 Isokratische Trennung der Nukleotidanaloga	34
3.2.3 NMR-Untersuchungen.....	37
3.3 Biochemische Charakterisierung	40
3.3.1 Proteinexpression und -reinigung der verkürzten KRas-Konstrukte.....	40
3.3.2 Massenspektrometrische Evaluierung	44
3.3.3 Kinetische Charakterisierung.....	46
3.3.3.1 Bestimmung der Nukleotidassoziation	47
3.3.3.2 Bestimmung der relativen Proteinaffinitäten	49
3.3.4 GEF-katalysierter Nukleotidaustausch	52

3.3.5 GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse	54
3.4 Strukturbiologische Untersuchungen	57
3.4.1 Probenvorbereitung für die Kristallisation	57
3.4.2 Proteinkristallographie	58
3.4.3 Analyse der Komplexstruktur von KRasG13C mit edaGDP und bdaGDP ...	61
3.4.4 Bestimmung der Mg ²⁺ -Affinität	63
3.4.5 Berechnung der pK _a -Werte	64
3.5 Zellbiologische Charakterisierung	67
3.5.1 Etablierung von artifiziellen KRas-abhängigen Zelllinien.....	67
3.5.1.1 Ba/F3-Zellen.....	67
3.5.1.2 NIH-3T3-Zellen	75
3.5.2 Charakterisierung der Nukleotidanaloga in KRasG13C-mutierten Krebszelllinien	77
3.5.2.1 NTP-Transporter	77
3.5.2.2 Elektroporation.....	80
3.5.3 Elektroporation rekombinanter Proteine in HeLa-Zellen.....	84
3.5.3.1 Proteinexpression und -reinigung sowie Labelling der Vollängenkonstrukte	84
3.5.3.2 <i>in vitro</i> Farnesylierung	87
3.5.3.3 MS/MS-Experimente	88
3.5.3.4 Western Blots	90
4 Zusammenfassung und Ausblick	93
5 Material und Methoden	99
5.1 Material	99
5.1.1 Geräte	99
5.1.2 Verbrauchsmaterialien	100
5.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits	101
5.1.4 Bakterien, Enzyme und Plasmide.....	103

5.1.5 Zelllinien, Zellkulturreagenzien und Antikörper	103
5.1.6 Programme	105
5.2 Computergestützte Methoden	106
5.2.1 Multiples Sequenzalignment.....	106
5.2.2 pK _a -Berechnungen	106
5.3 Organische Synthese von Nukleotid-basierten Inhibitoren	107
5.3.1 Synthetische Verfahren und Charakterisierung der Verbindungen	107
5.3.2 Isokratische Trennung der Nukleotidanaloga	111
5.3.3. Konzentrationsbestimmung der Nukleotide	111
5.3.4. Massenspektrometrie	111
5.3.5. NMR-Spektroskopie	112
5.4 Molekularbiologische Methoden	112
5.4.1. Mutagenese	112
5.4.2. Klonierung nach dem Restriktions-/Ligationsprotokoll	113
5.4.3. Transformation und Selektion	115
5.4.4. Kolonie-PCR.....	115
5.4.5. Agarose-Gelelektrophorese	116
5.4.6. Plasmidamplifizierung, -isolierung und -sequenzierung	116
5.4.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	116
5.5 Proteinexpression und-reinigung	117
5.5.1. Verkürzte KRas-Konstrukte	117
5.5.2. KRas-Vollängenkonstrukte.....	118
5.6 Biochemische und biophysikalische Methoden.....	120
5.6.1. Protein-Massenspektrometrie	120
5.6.2. Proteinassoziation mittels <i>stopped-flow</i>	122
5.6.3. Bestimmung der relativen Affinitäten mittels HPLC-basiertem Assay.....	122
5.6.4. SOS-katalysierter Nukleotidaustausch	123
5.6.5. GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse	123

5.6.6. Mg ²⁺ -Affinitäts-Assay	124
5.6.7. <i>in vitro</i> Farnesylierung	124
5.7 Proteinkristallisation.....	124
5.7.1. Probenvorbereitung für die Kristallisation	124
5.7.2. <i>Screening</i> -Experimente	125
5.7.3. Röntgenstrukturanalyse	125
5.8 Zellbiologische Methoden.....	126
5.8.1. Zellkultivierung.....	126
5.8.2. Genomsequenzierung	127
5.8.3. Transfektion	128
5.8.4. NTP-Transporter-Assay	129
5.8.5. Elektroporation.....	130
5.8.6. Western Blot-Analyse	130
5.8.7. CellTiter-Glo [®] -Viabilitätsassay	132
6 Literaturverzeichnis.....	133
7 Anhang	147
Eidesstattliche Erklärung.....	179

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACN	Acetonitril
ADME	engl. <i>adsorption, distribution, metabolism, excretion</i>
AEX	Anionenaustauschchromatographie (engl. <i>anion exchange chromatography</i>)
aGDP	Acryl-GDP
Akt	Proteinkinase B
APT	Acyl-Proteinthioesterase
AS	Aminosäure(n)
BCA	Bicinchoninsäure
bda	Butylendiamin
bp	Basenpaare
BTD	engl. <i>Breakthrough Therapy Designation</i>
CDI	Carbonyldiimidazol
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CHES	N-Cyclohexyl-2-aminoethansulfonsäure
CIP	Calf-Intestinal-Phosphatase
COSMIC	engl. <i>Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer</i>
COSY	engl. <i>correlated spectroscopy</i>
CRC	Kolorektales Karzinom (engl. <i>colorectal cancer</i>)
CTG	CellTiter-Glo Assay
d	Tag(e)
DCI	Deuteriumchlorid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	Halbmaximale effektive Konzentration
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eda	Ethylendiamin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

Erk	Extrazelluläre, Signal-regulierte Kinase (engl. <i>extracellular signal-regulated kinase</i>)
ESI-MS	engl. <i>electrospray ionization mass spectrometry</i>
ESI-MSMS	engl. <i>electrospray ionization-tandem mass spectrometry</i>
FPLC	Schnelle-Protein-Flüssigkeits-Chromatographie (engl. <i>fast protein liquid chromatography</i>)
FPP	Farnesylpyrophosphat
FTase	Farnesyltransferase
FTI	Farnesyltransferase-Inhibitor
GAP	GTPase-aktivierendes Protein (engl. <i>GTPase activating protein</i>)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	GTP-Austauschfaktor (engl. <i>guanosine triphosphate exchange factor</i>)
GMP	Guanosinmonophosphat
GppNHp	Guanosine-5'-[(β,γ)-imido]triphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
h	Stunde(n)
HCD	engl. <i>high energy collision dissociation</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
His ₆ -Tag	Hexahistidin-Reinigungsanker
HNSCC	Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (engl. <i>head and neck squamous cell carcinoma cancer</i>)
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HRas	Harvey-Ras
HRMS	engl. <i>high-resolution mass spectrometry</i>
HVR	Hypervariable Region
IEX	Ionenaustauschchromatographie (engl. <i>ion exchange chromatography</i>)
IL-3	Interleukin-3
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid

K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
k _{off}	Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante
k _{on}	Assoziationsgeschwindigkeitskonstante
KRas	Kirsten-Ras
LAC	Lungenkrebs (engl. <i>lung adenocarcinoma</i>)
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LCMS	engl. <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>
mantdGDP	3'- <i>O</i> -(<i>N</i> -Methyl-anthraniloyl)-2'-deoxyguanosin-5'-diphosphat
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
MW	Molekulargewicht (engl. <i>molecular weight</i>)
MWCO	engl. <i>molecular weight cut-off</i>
NaOD	Natriumdeuteroxid
NaOH	Natriumhydroxid
Ni-AC	Nickel-Affinitätschromatographie
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NOESY	engl. <i>nuclear overhauser enhancement spectroscopy</i>
NRas	Neuroblastoma-Ras
NSCLC	Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom (engl. <i>non-small-cell lung carcinoma</i>)
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PD-1	engl. <i>programmed cell death protein 1</i>
pda	Propylendiamin
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

PPI	Protein-Protein-Interaktionen
ProTide	PROdrug + nucleoTIDE
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Raf	G-Protein Raf (engl. <i>rat fibrosarcoma</i>)
Ras	G-Protein Ras (engl. <i>rat sarcoma</i>)
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay Puffer (engl. <i>radioimmunoprecipitation assay buffer</i>)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
S6	Ribosomales Protein S6
S-IIP	<i>Switch-II</i> -Tasche (engl. <i>Switch-II pocket</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEC	Größenausschlusschromatographie (engl. <i>size exclusion chromatography</i>)
SHP2	engl. <i>SH2 containing protein tyrosine phosphatase-2</i>
SLS	Swiss Light Source
SOS	<i>Son of sevenless</i>
TBA	Tributylamin
TBAB	Tetrabutylammoniumbromid
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (engl. <i>Tris buffered saline</i>)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEA	Triethylamin
TEAB	Tetraethylammoniumbromid
TFA	Trifluoressigsäure
UniProt	Universal Protein Resource
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation (engl. <i>world health organization</i>)
WT	Wildtyp

KURZFASSUNG

Ras-Proteine fungieren als molekulare Schalter in der Signaltransduktion essentieller zellulärer Prozesse, indem sie zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand wechseln.¹ Onkogene Ras-Mutationen, die in etwa 25 % aller humanen Krebsarten vorkommen und zu einer Fehlregulation des *switch* Mechanismus führen sind daher attraktive Zielstrukturen in der Präzisionsmedizin. Trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung nach Entdeckung der Ras-Onkogene im Jahre 1981 waren Versuche, Ras gezielt zu adressieren, weitestgehend erfolglos und Ras-Proteine galten lange Zeit als nicht adressierbar (engl.: *undruggable*).²⁻³ Neue Hoffnung ergab sich jedoch im Jahr 2013 durch die erfolgreiche gezielte Adressierung der G12C-Mutation von Ras durch Kevan Shokat.⁴ Neben kovalenten Inhibitoren, die innerhalb der *switch-II*-Tasche irreversibel an die G12C-Mutation binden und deren Optimierung schließlich im Mai 2021 zur Zulassung des ersten KRasG12C-Inhibitors Sotorasib (Amgen) für die Behandlung von nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) führte,⁵⁻¹² wurden zudem Nukleotid-kompetitive Inhibitoren entwickelt, die ebenfalls kovalent an KRasG12C binden können.¹³⁻¹⁴ Strategien, die eine direkte Konkurrenz zur Nukleotidbindung beinhalten, wurden ursprünglich aufgrund der hohen Affinität von GDP/GTP für Ras und der hohen zellulären Nukleotid-Konzentrationen verworfen, erlangten jedoch durch die Kombination mit einem kovalenten Wirkmechanismus der Inhibitoren erneut Aufmerksamkeit im akademischen Umfeld. Die dabei am β -Phosphat der GDP-Derivate eingeführten elektrophilen Gruppen führten jedoch zu einer dramatischen Reduzierung der reversiblen Bindungsaffinität der Nukleotidderivate, da wichtige Wechselwirkungen mit dem Protein und dem Mg^{2+} -Ion verloren gehen.^{13, 15}

Um diese Limitierung zu überwinden und diesen Ansatz der kovalenten Nukleotid-kompetitiven Inhibitoren an onkogene KRas-Varianten mit Cysteinen im P-loop (KRasG12C und KRasG13C) anzupassen, wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels strukturbasiertem Wirkstoffdesign Nukleotidanaloga synthetisiert, die einen Thiol-reaktiven Linker an den 2',3'-OH-Gruppen der Ribose für eine kovalente Proteinmodifikation tragen.

Anhand von massenspektrometrischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die dargestellten Nukleotidderivate selektiv an KRasG13C binden, ohne dabei KRasG12C sowie KRasWT zu adressieren.

Mittels einer detaillierten kinetischen Charakterisierung wurden anschließend die Affinitäten der Nukleotidanaloga gegenüber KRas im Vergleich zu den unmodifizierten Nukleotiden bestimmt. Neben der Bestimmung der Kinetik der Nukleotidassoziation (k_{on}) mit einer bereits etablierten *stopped-flow* Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit zudem ein HPLC-basierter Assay zur Evaluierung der relativen Affinitäten der Nukleotidanaloga entwickelt. Die Affinitäten der dargestellten Nukleotidderivate sind dabei mit denen der unmodifizierten Nukleotide vergleichbar, sodass der eingeführte Linker keinen Einfluss auf die reversible Wechselwirkung und die Affinität hat, was bei einem Nukleotid-kompetitivem Ansatz von maßgeblicher Bedeutung ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass bei KRasG13C, welches eine drastisch erhöhte intrinsische Nukleotidaustauschrate im Vergleich zum WT besitzt, infolge einer kovalenten Proteinmodifikation der SOS-katalysierter Nukleotidaustausch verhindert und kovalent modifiziertes KRasG13C im inaktiven Zustand stabilisiert wird. Eine gesteigerte GTP-Hydrolyse in Gegenwart von GAPs konnte für kovalent modifizierte KRasG13C im Vergleich zu KRasWT nicht beobachtet werden, die intrinsische GTP-Hydrolyse ist hingegen vergleichbar mit der von KRasWT.

Die in dieser Arbeit generierten Komplexkristallstrukturen von KRasG13C-edaGDP (PDB: 7ok3) und KRasG13C-bdaGDP (PDB: 7ok4) ermöglichten darüber hinaus einen detaillierten Einblick in den Bindemodus der Nukleotidderivate und bestätigten den erwarteten Bindemodus sowie die kovalente Bindungsknüpfung an Cys13.

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von KRasG13C-abhängigen Krebszelllinien wurden zunächst erfolgreich artifizielle KRas-abhängige Zelllinien, darunter NIH-3T3 sowie Ba/F3-Zellen generiert, die in Zukunft für die Charakterisierung mutantenselektiver KRas-Inhibitoren genutzt werden können. Für die zelluläre Charakterisierung der in dieser Arbeit dargestellten Nukleotidanaloga, die aufgrund ihres anionischen Charakters nicht die Zellmembran überwinden können, wurden verschiedene Strategien für den Transfer in Zellen getestet, unter anderem ein NTP-Transporter vermittelter Transfer sowie die Elektroporation. Durch Elektroporation rekombinanter KRas-Proteine in Zellen konnte schließlich gezeigt werden, dass bei der Verwendung von kovalent modifiziertem KRasG13C eine onkogene Signalweiterleitung *in vivo* inhibiert wird, was die Möglichkeit des Einsatzes von kovalenten Nukleotid-basierten Inhibitoren bei KRasG13C-getriebenem Krebs verdeutlicht.

ABSTRACT

Ras proteins act as molecular switches in the signal transduction of essential cellular processes by switching between an inactive GDP-bound and an active GTP-bound state.¹ Oncogenic Ras mutations, which occur in approximately 25 % of all human cancers and lead to dysregulation of the switch mechanism, are therefore attractive targets in precision medicine. However, despite decades of intensive research after the initial discovery of Ras oncogenes in 1981, attempts to target Ras were largely unsuccessful and consequently Ras has long been classified as undruggable.²⁻³ Only recently, selective targeting of the G12C mutant of Ras by the Shokat laboratory raised new interest in this strategy.⁴ In addition to covalent switch-II pocket inhibitors that bind irreversibly to the G12C mutation within the switch-II pocket and the optimization of which finally led to the approval of the first KRasG12C inhibitor sotorasib (Amgen) for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC) in May 2021,⁵⁻¹² nucleotide-competitive inhibitors that covalently bind to KRasG12C have been developed.¹³⁻¹⁴ Strategies involving direct competition with nucleotide binding were originally set aside because of the high affinity of GDP/GTP for Ras and high cellular nucleotide concentrations, but gained renewed attention in academia by combining nucleotide competition with covalent binding of the inhibitors. However, the electrophilic groups introduced at the β -phosphate of the generated GDP derivatives resulted in a dramatic loss of affinity due to the loss of important interactions with the protein and the Mg^{2+} ion.^{13, 15}

To overcome this limitation and adapt this approach of covalent nucleotide-competitive inhibitors to target oncogenic KRas variants harbouring cysteines in the P-loop (KRasG12C and KRasG13C), a structure-based drug design was used in the present work to synthesize nucleotide analogues bearing a thiol-reactive linker at the 2',3'-OH groups of the ribose for covalent protein modification.

Mass spectrometry experiments indicated that the synthesized nucleotide derivatives could selectively react with KRasG13C without addressing KRasG12C or KRasWT.

In order to exclude effects of the linker and the reactive warhead regarding reversible binding to KRas, the affinities of the nucleotide analogues towards KRas were determined and compared to unmodified nucleotides. In addition to the determination of the kinetics of nucleotide association (k_{on}) using an already established stopped-flow method, an HPLC-based assay was developed to evaluate the relative affinities of the nucleotide

analogues showing that the affinities of the nucleotide derivatives were comparable to those of the unmodified nucleotides. Thus, the attached linker has no impact on the reversible interaction and the overall affinity, an important fact that must be considered in a nucleotide-competitive approach.

In the present work, it was also shown that KRasG13C has a drastically increased intrinsic nucleotide exchange rate compared to WT, however covalently modified KRasG13C can no longer undergo spontaneous nor SOS-catalysed nucleotide exchange. Thus, covalently modified KRasG13C is trapped in the corresponding nucleotide-bound state. Whereas an increased GTP hydrolysis in the presence of GAPs could not be observed for covalently modified KRasG13C, the intrinsic GTP hydrolysis is comparable to that of KRasWT.

The complex crystal structures of KRasG13C-edaGDP (PDB: 7ok3) and KRasG13C-bdaGDP (PDB: 7ok4) presented in this thesis provided detailed insight into the binding mode of the nucleotide derivatives and confirmed the expected binding mode and covalent linkage to Cys13.

Due to the limited availability of KRasG13C-dependent cancer cell lines, artificial KRas-dependent cell lines, including NIH-3T3 as well as Ba/F3 cells, were generated and are available for the prospective characterization of mutant-selective KRas inhibitors. For cellular characterization of the synthesized nucleotide analogues that cannot cross the cell membrane due to their anionic nature, various strategies for transfer into cells including NTP transporter-mediated transfer and electroporation were tested. Finally, by electroporation of recombinant KRas proteins into cells, it was shown that in contrast to KRasG13C, the covalently locked protein is unable to induce oncogenic signalling in cells, further highlighting the possibility of using nucleotide-based inhibitors with covalent warheads in KRasG13C-driven cancer.

1 EINLEITUNG

Eine der größten Herausforderungen der heutigen Gesellschaft ist die zunehmende Anzahl an diagnostizierten Krebserkrankungen. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation WHO traten im Jahr 2020 weltweit schätzungsweise 19.3 Millionen neue Krebserkrankungen auf und mit fast 10 Millionen Todesfällen im gleichen Zeitraum ist Krebs die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen.¹⁶⁻¹⁷ Die bei der klassischen Behandlung von Krebs neben der chirurgischen Entfernung des Tumorgewebes zum Einsatz kommenden Chemo- oder Strahlentherapien sind dabei häufig aufgrund der fehlenden Selektivität mit starken Nebenwirkungen oder teils geringen Heilungserfolgen verbunden. Ein Paradigmenwechsel in der Krebstherapie stellt hingegen die personalisierte Präzisionsmedizin dar, bei der die von Weinstein als *oncogene addiction* postulierte Abhängigkeit der Krebszellen von fehlregulierten Proteinen (Onkogenen) und den entsprechenden Signalwegen genutzt wird.¹⁸ Durch die zielgerichtete Adressierung dieser Onkogene, die verantwortlich für die Proliferation und das Überleben von Krebszellen sind, wird die Apoptose dieser Krebszellen eingeleitet, wohingegen gesunde Zellen auf alternative Signalwege ausweichen können (*oncogenic shock*).¹⁹ Im Gegensatz zu den klassischen *one-size-fits-all* Therapieansätzen führt diese maßgeschneiderte Krebsbehandlung bei den betroffenen Patienten zu einer deutlichen Verbesserung der Überlebensrate sowie der Lebensqualität. Die prominentesten Beispiele für den erfolgreichen Einsatz der Präzisionsmedizin sind unter anderem die bei der Behandlung von chronisch-myeloischer Leukämie (CML) oder nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) zugelassenen Tyrosinkinase-Inhibitoren.

Die von Hopkins und Groom im Jahr 2002 bezeichnete *druggability* der potentiellen Zielstrukturen ist hierbei für den Erfolg der Präzisionsmedizin maßgeblich. Rund 85 % des humanen Genoms entziehen sich der direkten Adressierung mit niedermolekularen Verbindungen und werden als *undruggable* bezeichnet.²⁰ Die in dieser Arbeit behandelten Ras-Proteine sind in diesem Zusammenhang häufig zu finden, stellen jedoch aufgrund der hohen Relevanz von überaktivierenden genetischen Läsionen ein besonders attraktives Angriffsziel für die Entwicklung zielgerichteter Therapeutika dar und werden im Folgenden näher betrachtet.^{1, 21}

1.1 Struktur und Funktion der GTPase Ras

Die Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen umfasst mehr als 150 Mitglieder, welche anhand unterschiedlicher Funktionen in der Zelle in fünf Subfamilien (Ras-, Rho-, Rab-, Sar1/Arf- und Ran-Familie) eingeteilt werden.²² Benannt wurde die Ras-Superfamilie nach den Ras-Genen, die erstmals in retroviralen Sarkomen in Ratten gefunden wurden.²³⁻²⁵ Die prominentesten Vertreter der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen sind die Ras-Proteine KRas²⁶ (Kirsten Ras), HRas²⁷ (Harvey Ras) und NRas²⁸⁻²⁹ (Neuroblastoma Ras). Die drei im humanen Genom vorkommenden Ras-Gene codieren für insgesamt vier Ras-Proteine (HRas, NRas, KRas4a und KRas4b), die eine große Ähnlichkeit in der Primärsequenz, Struktur und in den biochemischen Eigenschaften aufweisen.³⁰ Die niedermolekularen GTPasen (21 kDa) bestehen aus einer Guaninnukleotid-bindenden Domäne (G-Domäne), innerhalb welcher die Ras-Isoformen eine hohe Sequenzidentität aufweisen und einer hypervariablen Region mit einer Sequenzidentität von lediglich etwa 8 % (Abb. 1). Die G-Domäne der Ras-Proteine besteht aus einem sechs-strängigen β -Faltblatt, welches von insgesamt fünf α -Helices umgeben ist. Innerhalb der G-Domäne weisen die GTPasen hochkonservierte Sequenzmotive (G1 bis G5) auf, die an der Mg^{2+} -abhängigen Bindung sowie Hydrolyse des Nukleotids beteiligt sind.³¹⁻³² Das G1-Motiv, welches auch als P-loop bezeichnet wird, ist die am höchsten konservierte Sequenz (GxxxxGK(S/T)) und ist an der Bindung des α - und β -Phosphats des Nukleotids sowie an der Koordination des Magnesiumions beteiligt.³³ Neben dem G2-Motiv, welches sich aus einem Threonin innerhalb der *switch-I*-Region zusammensetzt, ist auch das G3-Motiv (DxxG), welches Teil der *switch-II*-Region ist, für die Bindung des γ -Phosphats von GTP und Koordination des Magnesiumions notwendig. Die durch die G2- und G3-Motive vermittelten Wechselwirkungen bewirken innerhalb der *switch-I*- und *switch-II*-Regionen in Abhängigkeit des gebundenen Nukleotids eine Konformationsänderung von Ras.³⁴ Die durch GTP-Bindung induzierte Konformationsänderung ermöglicht dabei über die als Effektorschleife bezeichnete *switch-I*-Region sowie die *switch-II*-Region eine Interaktion mit Effektorproteinen.³⁵ Die G4- und G5-Motive (NKxD und SAK) sind an der spezifischen Interaktion mit der Guaninbase beteiligt und Mutationen innerhalb dieser Motive können die Nukleotidspezifität verschieben.³⁶⁻³⁸ Neben den für die Nukleotidbindung essentiellen G-Motiven innerhalb der G-Domäne weisen die Ras-Isoformen eine weitere konservierte Sequenz auf, die sich innerhalb der hypervariablen Region (HVR) am C-Terminus befindet, und als CAAX-Box (C = Cystein, A =

aliphatische AS, X = Serin, Methionin, Alanin, Glutamat) bezeichnet wird. Das durch posttranslationale Modifikationen carboxymethylierte und farnesylierte Cystein der CAAX-Box spielt eine entscheidende Rolle bei der für die Aktivität von Ras wichtigen Lokalisation an der Plasmamembran. Um eine stabile Membranassoziation zu gewährleisten, weisen KRas4a, N-Ras und H-Ras eine zusätzliche Palmitoylierung auf, wohingegen bei KRas4b eine Anhäufung von positiv geladenen Lysinseitenketten nahe des farnesylierten Cysteins eine verstärkte Membranverankerung ermöglicht.³⁹⁻⁴⁰

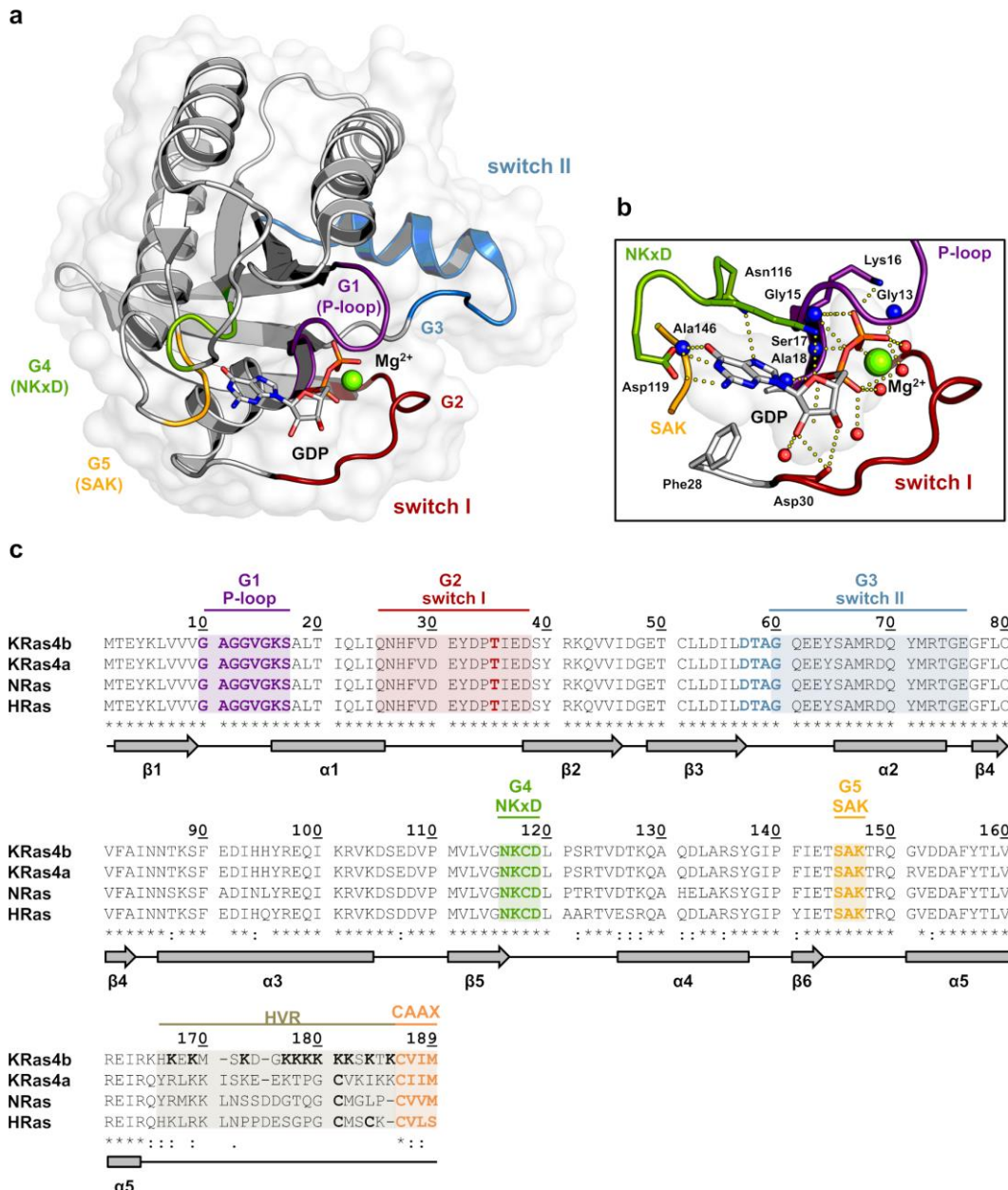


Abbildung 1 | Struktureller Aufbau der GTPase Ras. (a) Kristallstruktur von KRasWT im GDP-gebundenen Zustand (PDB: 4obe); (b) Detaillierter Einblick in die Protein-Ligand-Interaktionen; (c) Sequenzüberlagerung der vier Ras-Isoformen. Die für Ras charakteristischen Elemente sind entsprechend farblich markiert (G1 (P-loop): violett, G2 (switch-I): rot, G3 (switch-II): blau, G4 (NKxD): grün, G5 (SAK): gelb, HVR: braun, CAAX: orange).⁴¹ [Abbildung modifiziert nach Goody et al.⁴¹]

Innerhalb der Zelle fungieren Ras-Proteine aufgrund der alternierenden Bindung der Nukleotide GDP und GTP als molekulare Schalter in der Signaltransduktion und beeinflussen dadurch zahlreiche essentielle Prozesse. Ras-Proteine wechseln dabei zwischen einem inaktiven GDP-gebundenen und einem aktiven GTP-gebundenen Zustand.⁴²⁻⁴³ Mit Hilfe von Guaninnukleotidaustauschfaktoren (GEFs), die die Dissoziation des gebundenen Nukleotids katalysieren, erfolgt der Austausch von GDP zu dem intrazellulär höher konzentrierten GTP und die Ras-Proteine werden aktiviert.⁴⁴ Im aktiven Zustand interagieren Ras-Proteine mit Effektorproteinen, darunter Raf und PI3K, die die Proliferation und das Zellüberleben regulieren. Die Inaktivierung von Ras erfolgt durch die Hydrolyse von GTP zu GDP aufgrund der intrinsischen GTPase-Aktivität, die unter Einwirkung von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAPs) um mehrere Größenordnungen verstärkt wird (Abb. 2).⁴⁵⁻⁴⁶

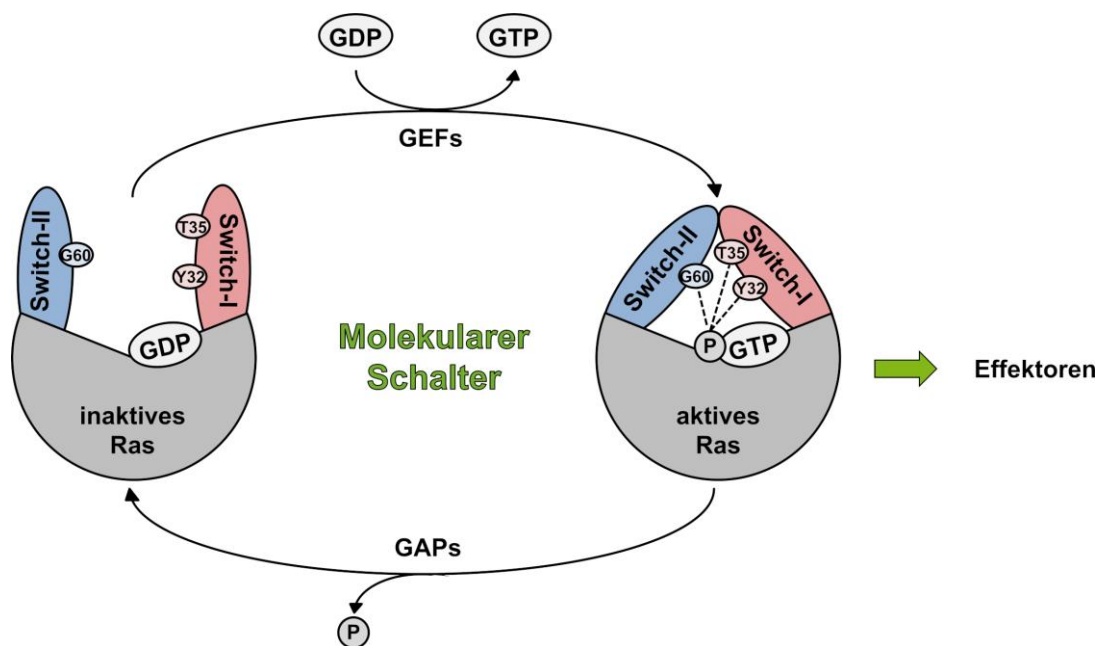


Abbildung 2 | Zyklus der Aktivierung und Inaktivierung kleiner GTPasen. Die Aktivierung der Ras-Proteine erfolgte durch einen von GEFs katalysierten Austausch von GDP zu GTP. Im aktiven GTP-gebundenen Zustand binden Ras-Proteine an Effektoren und induzieren die Signalweiterleitung. Die Inaktivierung erfolgt durch eine von GAPs katalysierte Hydrolyse von GTP zu GDP. [Abbildung modifiziert nach Ostrem *et al.*⁴⁷].

Aufgrund der Schlüsselrolle von Ras in der Signaltransduktion essentieller zellulärer Prozesse wird dieses Signalmolekül insbesondere infolge einer Fehlregulation mit der Entstehung von Krebs assoziiert und stellt daher ein attraktives Angriffsziel in der Präzisionsmedizin dar.⁴⁸

1.2 Zielgerichtete Adressierung der GTPase Ras

Mutationen innerhalb der Ras-Proteine, die zu Defekten im Schaltmechanismus führen, stellen wichtige Treiber bei der Entstehung von Krebs dar. Onkogene Ras-Mutationen wurden bei etwa 25 % aller humanen Krebsarten gefunden, darunter drei der tödlichsten Formen (Lungen-, Darm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs). Unter den Ras-Proteinen ist KRas die vorherrschende mutierte Isoform (85 %), gefolgt von NRas (11 %) und HRas (4 %).³⁰ Im Vergleich zu NRas und HRas spielen Mutationen in KRas eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Pankreaskarzinomen (PDAC; engl.: *pancreatic ductal adenocarcinoma*) sowie Darm- (CRC; engl.: *colorectal cancer*) und Lungenkrebs (LAC; engl.: *lung adenocarcinoma*). Mutationen im NRas-Gen kommen hingegen überwiegend bei Melanomen vor und Mutationen im HRas-Gen bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC; engl.: *head and neck squamous cell carcinoma cancer*) (Abb. 3a).³⁰ Die häufigsten Mutationen treten an den Aminosäurepositionen G12, G13 und Q61 der Ras-Isoformen auf (Abb. 3b), die durch eine verminderte GTP-Hydrolyse und/oder einen erhöhten Nukleotidaustausch zur Akkumulation von aktivem GTP-gebundenen Ras-Protein in der Zelle führen (Abb. 3c). Die onkogenen Eigenschaften der Mutationen an den Positionen 12 und 13 beruhen dabei auf einem sterischen Konflikt mit dem katalytischen Argininfinger der GAPs, während Mutationen an Position 61 eine korrekte Positionierung des für die GTP-Hydrolyse notwendigen katalytischen Wassers verhindern.⁴⁹⁻⁵⁰ Eine systematische Charakterisierung der biochemischen und biophysikalischen Eigenschaften von häufigen Krebs-assoziierten KRas-Mutationen wurde kürzlich von Westover und Kollegen bereitgestellt. Innerhalb dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Mutationen an den Aminosäurepositionen G12, G13 und Q61 zu einer verminderten intrinsischen sowie GAP-vermittelten GTP-Hydrolyse führen. Für die G13D-Mutante konnte ebenfalls ein erhöhter GEF-unabhängiger Nukleotidaustausch im Vergleich zum Wildtyp-Protein beobachtet werden, welches ebenfalls die onkogenen Eigenschaften dieser Mutante erklärt (Abb. 3d).⁵¹

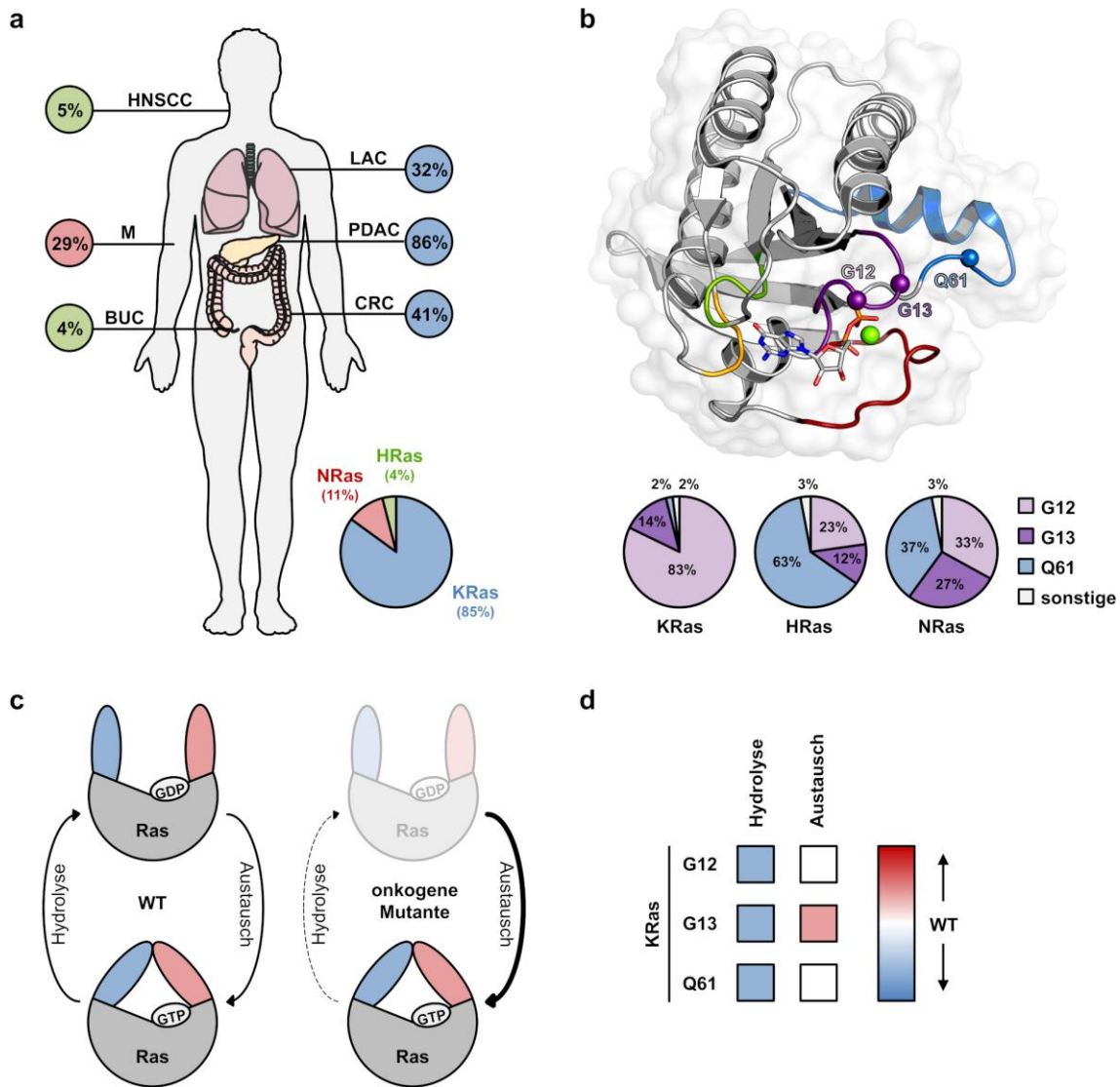


Abbildung 3 | Zielgerichtete Adressierung von Ras. (a) Verteilung von Mutationen der Ras-Isoformen (KRas, NRas und HRas) auf die verschiedenen Tumortypen;² (b) Kristallstruktur von KRas:GDP, innerhalb der die Hotspot-Mutationen an den Positionen G12, G13 und Q61 als Sphären hervorgehoben sind (PDB: 4obe). Der prozentuale Anteil der Hotspot-Mutationen in G12 (rosa), G13 (lila) und Q61 (blau) für die jeweiligen Ras-Isoformen sind als Kreisdiagramme dargestellt;³⁰ (c) Graphische Darstellung der generellen biochemischen Störung, die bei onkogenen Ras-Mutationen auftritt. Durch eine verminderte GTP-Hydrolyse und/oder einen erhöhten Nukleotidaustausch kommt es zu einer Anhäufung von aktiven GTP-gebundenen Ras-Proteinen in der Zelle;² (d) Biochemische Eigenschaften der Hotspot-Mutationen an den Positionen G12, G13 und Q61 im Vergleich zum Wildtyp (WT).⁵¹ [Abbildung modifiziert nach Moore *et al.*²]

Aufgrund der zentralen Rolle bei der Krebsentstehung wurden die kleinen GTPasen als attraktive Zielstrukturen in der Medizinalchemie identifiziert, jedoch waren Versuche, Ras gezielt zu adressieren, trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung weitestgehend erfolglos und Ras-Proteine galten lange Zeit als nicht adressierbar.

In der Vergangenheit zielten erste Studien auf die Entwicklung Nukleotid-kompetitiver Inhibitoren ab, um die durch die Akkumulation konstitutiv aktiver Ras-Proteine hervorgerufene onkogene Signalweiterleitung zu unterdrücken. Die bei der Adressierung von Kinasen, welche Affinitäten gegenüber ATP im mikromolaren Bereich aufweisen, äußerst erfolgreiche Strategie der ATP-kompetitiven Inhibitoren, führte zur Entwicklung zahlreicher Kinase-Inhibitoren.⁵² Aufgrund der hohen Affinitäten von GDP und GTP ($K_D \sim 20$ pM) und der hohen zellulären Konzentration dieser Nukleotide (GDP ~ 40 μ M und GTP ~ 400 μ M) wurde dieser Ansatz für die kleinen GTPasen jedoch relativ schnell wieder verworfen.^{15, 53-55} Dieser allgemeine Ansatz hat jedoch kürzlich wieder Aufmerksamkeit auf sich gezogen, als GDP-Derivate entwickelt wurden, die über eine elektrophile Gruppe am β -Phosphat kovalent an die onkogene KRasG12C-Mutante binden.¹³⁻¹⁴

Alternative Strategien, die zelluläre Lokalisation der Ras-Proteine durch Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTIs) oder Acyltransferase-Inhibitoren (APTs) zu stören, führte zur Entwicklung potenter Inhibitoren für NRas und HRas.⁵⁶⁻⁵⁹ Um die zelluläre Lokalisation von KRas zu stören wurden desweiteren am Max-Planck-Institut für molekulare Physiologie in Dortmund vielversprechende Phosphodiesterase δ -Untereinheit (PDE δ)-Inhibitoren entwickelt, welche jedoch bisher noch nicht in die klinische Erprobung gelangt sind.⁶⁰⁻⁶²

Die im Zusammenhang mit Ras-mutierten Krebs am häufigsten adressierten Effektor-Signalwege sind die Raf-Mek-Erk MAPK-Kaskade sowie der PI3K-Akt-mTOR-Weg. Für die innerhalb dieser Signalwege oberhalb und unterhalb von Ras agierenden Proteine sind bereits zahlreiche Inhibitoren zugelassen oder befinden sich in klinischen Studien,^{2, 63} jedoch ist der Einsatz dieser Inhibitoren gegenüber Ras-abhängigen Krebs durch komplexe Feedback-Mechanismen häufig weniger erfolgreich als antizipiert. So führen Raf-Inhibitoren bei Ras-mutierten Krebszellen zu einer paradoxen Aktivierung des Signalwegs⁶⁴⁻⁶⁶ und bei Mek-Inhibitoren konnte nur eine begrenzte Wirksamkeit beobachtet werden.⁶⁷ Intensive Bemühungen, die Ras-SOS (*son of sevenless*, GEF) Interaktion zu hemmen, führten schließlich zum ersten pan-Ras Inhibitor BI-1701963, dessen Wirksamkeit derzeit in klinischen Studien evaluiert wird.⁶⁸ Dieser Ansatz scheint generell vielversprechend zu sein, da der positive Feedback-Mechanismus von SOS, der durch Ras:GTP hervorgerufen wird, zu einer Verstärkung der Ras-Aktivierung und einer Kreuzaktivierung von Wildtyp-Ras und anderen Ras-Isoformen durch onkogene Ras-

Proteine führt.⁶⁹⁻⁷⁰ Neben SOS-Inhibitoren wurden zudem vielversprechende SHP2-Inhibitoren entwickelt, die sich derzeit ebenfalls in klinischen Studien befinden.⁷¹⁻⁷⁸

Erst die Entwicklung von kovalenten Inhibitoren, die die onkogene KRasG12C-Mutante selektiv adressieren, führte schließlich zur Zulassung des ersten KRasG12C-Inhibitors Sotorasib (LUMAKRAS™) im Mai 2021 durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) und stellt damit einen Meilenstein bei der personalisierten Krebstherapie von KRasG12C-mutierten NSCLC dar. Neben Sotorasib befinden sich derzeit noch zwei weitere vielversprechende KRasG12C-Inhibitoren in klinischen Studien, darunter Adagrasib (MRTX849), welches erst kürzlich die *Breakthrough Therapy Designation* (BTD) durch die FDA erhalten hat, sowie JNJ-74699157 (ARS-3248).

Das folgende Kapitel gibt einen kurzen historischen Überblick über die Entwicklung dieser vielversprechenden Inhibitoren, die innerhalb der bis dato unbekanntenen *switch-II*-Tasche (S-IIP; engl.: *switch-II pocket*) kovalent an den mutierten Cysteinrest binden. Eine tabellarische Übersicht über die in diesem historischen Überblick dargestellten Verbindungen ist im Anhang (Tab. A1) abgebildet.

1.2.1 KRasG12C – eine zukunftsweisende Erfolgsgeschichte*

Lungenkrebs ist die weltweit häufigste Ursache für krebsbedingte Todesfälle und bei etwa 13 % der NSCLC-Patienten liegt eine KRasG12C-Mutation vor.⁷⁹

Entscheidend für die Entwicklung der KRasG12C-Inhibitoren war die Entdeckung der sogenannten *switch-II*-Tasche im Jahr 2013 durch Kevan Shokat.⁴⁷ Mit Hilfe eines Fragment-basierten Screening-Ansatzes⁸⁰ wurde eine Bibliothek von 480 Disulfid-Verbindungen untersucht und eine Reihe von kovalent-bindenden Inhibitoren identifiziert, welche selektiv die G12C-Mutante adressieren. Die Fragmente 2E07 und 6H05 zeigten im Vergleich eine besonders effiziente kovalente Modifikation in massenspektrometrischen Untersuchungen und über nachfolgende SAR-Studien wurde Verbindung 6^{Ostrem} generiert (Abb. 4a). Die Ko-Kristallstruktur von KRasG12C:GDP in Komplex mit Verbindung 6^{Ostrem} bestätigte den kovalenten Charakter dieser Moleküle und zeigte darüber hinaus, dass die Verbindungen nicht die Nukleotid-Bindetasche adressieren, sondern in eine bisher unbekannte Tasche unterhalb der *switch-II*-Region

* Teile dieses Kapitels sind bereits in Form eines Reviews publiziert worden.⁴

binden (Abb. 4b). Die Bindung der Liganden verursacht dabei eine Neuorientierung der *switch-II*-Region, wodurch es zur Ausbildung der sogenannten *switch-II*-Tasche (S-IIP) kommt. Die Konformation von *switch-I* gegenüber dem GDP-gebundenen Zustand bleibt hingegen unverändert. Basierend auf den initial detektierten *hits* wurden weitere Derivate mit Acrylamid- und Vinylsulfonamid-Funktionalitäten zur Erzeugung potenterer Inhibitoren synthetisiert (Abb. 4c). Sowohl Verbindung 9^{Ostrem} als auch Verbindung 12^{Ostrem} wiesen eine deutlich verbesserte kovalente Proteinmodifikation auf und eine Ko-Kristallstruktur von KRasG12C:GDP in Komplex mit der Verbindung 9^{Ostrem} bestätigte den zuvor beobachteten Bindemodus (Abb. 4c). Durch die Bindung der sogenannten S-IIP-Liganden in die adressierbare, aber bisher unbekannte Bindetasche werden die inaktive GDP-gebundene Konformation stabilisiert und Interaktionen mit Regulator- und Effektorproteinen wie SOS und Raf inhibiert.^{41, 81} Folglich wird die onkogene Ras-Signalweiterleitung blockiert, welches einen wichtigen Schritt in Richtung der zielgerichteten Adressierung von RasG12C in Ras-getriebenen Krebsarten darstellt.

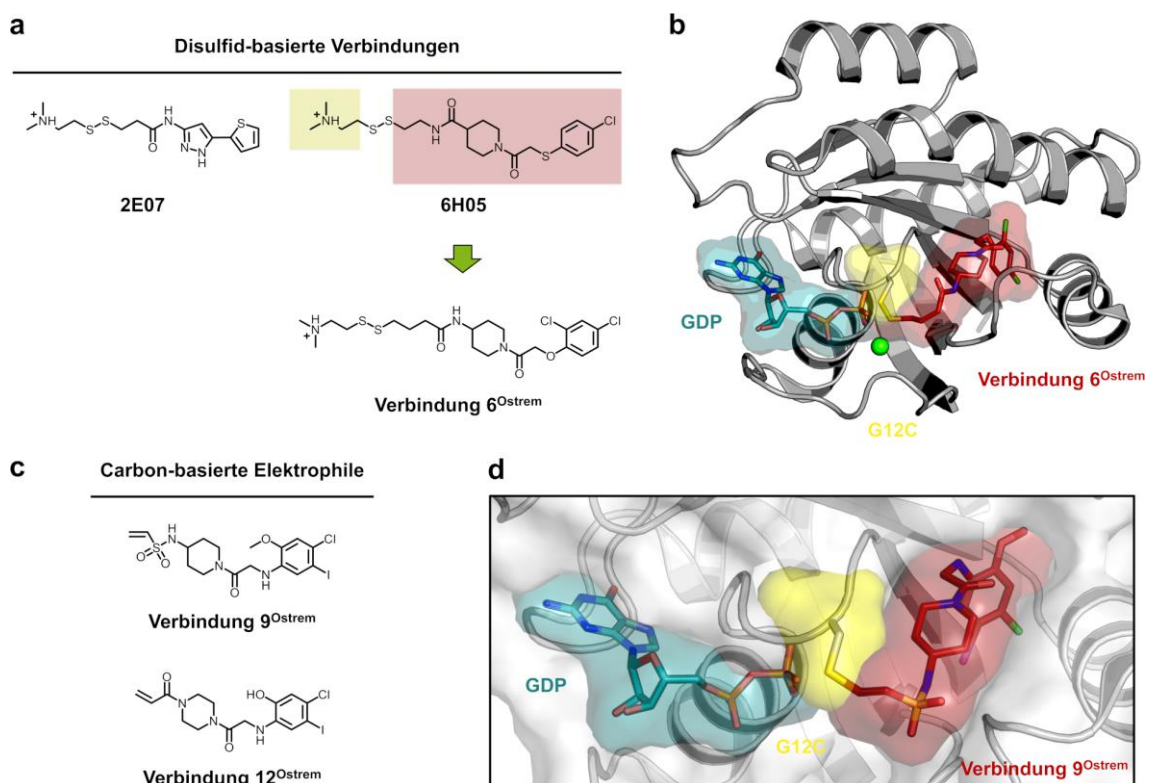


Abbildung 4 | Entdeckung der KRasG12C S-IIP-Inhibitoren. (a) Chemische Strukturen der Screening-*hits* 2E07 und 6H05; (b) Ko-Kristallstruktur von KRasG12C:GDP in Komplex mit Verbindung 6^{Ostrem} (PDB: 4luc); (c) Chemische Strukturen der Verbindung 9^{Ostrem} und Verbindung 12^{Ostrem}; (d) Ko-Kristallstruktur von KRasG12C:GDP in Komplex mit Verbindung 12^{Ostrem} (PDB: 4lyh). [Abbildung modifiziert nach Goebel *et al.*⁴¹]

Basierend auf der bahnbrechenden Entdeckung von Ostrem *et al.* entwickelten Wellspring Bioscience, welches unter anderem von Kevan Shokat im Jahr 2012 gegründet worden ist, nach der initial identifizierten Verbindung ARS-107 in einem LC/MS-MS-basierten Assay ARS-853, welches eine deutlich verbesserte zelluläre Aktivität gegenüber KRasG12C im niedrigen mikromolaren Bereich ($IC_{50} = 1.6 \mu\text{M}$) aufweist (Abb. 5a/b).⁸¹ ARS-853, war zu dieser Zeit somit der erste KRasG12C-Inhibitor, der eine zelluläre Affinität im Bereich eines klinischen Kandidaten aufweist. Ein großer Nachteil der ARS-Reihe war jedoch die kurze metabolische Plasmastabilität und die limitierte Bioverfügbarkeit. Janes *et al.* synthetisierten daraufhin eine Reihe von Quinazolin-basierten Verbindungen, die schließlich zur Identifizierung von ARS-1620 (S-Atropisomer) führten.⁷⁹ Die Ko-Kristallstruktur von ARS-1620, gebunden an KRasG12C, zeigte dabei einen modifizierten Bindungsmodus im Vergleich zu dem bisher bekannten KRasG12C-S-IIP-Inhibitoren. ARS-1620 bildet eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung mit der Seitenkette von His95, wodurch eine rigide Konformation induziert und die Bildung der kovalenten Bindung begünstigt wird (Abb. 5c/d). Im Vergleich zu ARS-853 zeigt ARS-1620 eine zehnfach verbesserte Aktivität im biochemischen und zellulären Assay mit einer hohen oralen Bioverfügbarkeit und einer ausreichenden Plasmastabilität sowohl in Mäusen als auch in Menschen. Im Gegensatz dazu ist das R-Atropisomer fast 1000-mal weniger wirksam als ARS-1620 und diente daher als nützliche Kontrollverbindung. Zudem konnte in Xenograft-Modellen, nach Verabreichung von ARS-1620 eine Hemmung des Tumorwachstums festgestellt werden. ARS-1620 stellte somit zum damaligen Zeitpunkt eine neue Generation der KRasG12C-S-IIP-Inhibitoren mit vielversprechenden Eigenschaften dar.

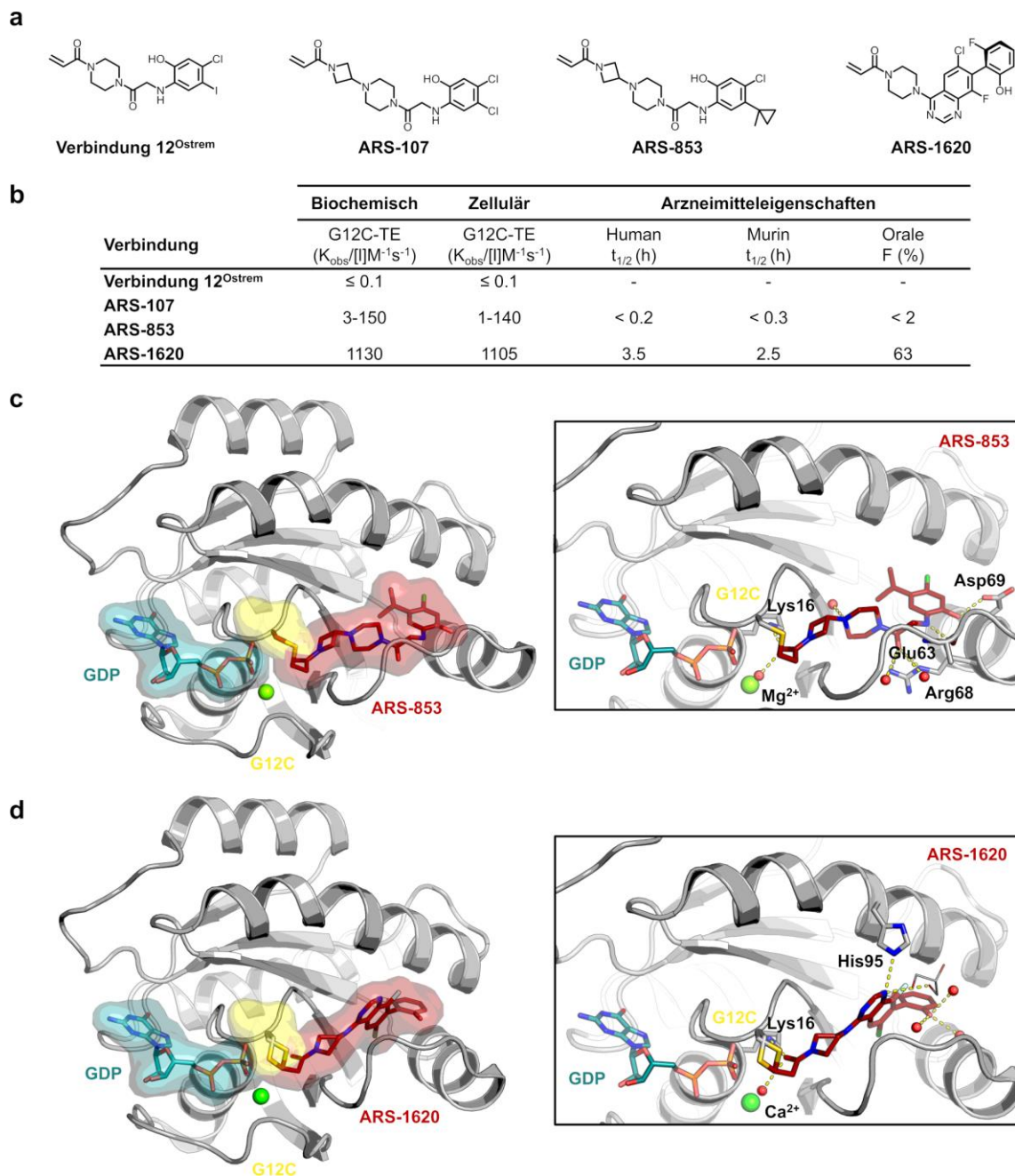


Abbildung 5 | Optimierung der KRasG12C-Inhibitoren. (a) Chemische Strukturen der Verbindung 12^{Ostrem}, ARS-107, ARS-853 und ARS-1620; (b) Biochemische und zelluläre Daten sowie arzneimittelähnliche Eigenschaften der gezeigten Verbindungen; (c) Ko-Kristallstruktur von KRasG12C:GDP in Komplex mit ARS-853 (PDB: 5f2e); (d) Ko-Kristallstruktur von KRasG12C:GDP in Komplex mit ARS-1620 (PDB: 5v9u). [Abbildung modifiziert nach Goebel *et al.*⁴]

Neben Wellspring Bioscience war nun auch das Interesse zahlreicher anderer Forschungseinrichtungen im akademischen und industriellen Umfeld geweckt. Nur etwa sechs Jahre nach Entdeckung einer adressierbaren Bindetasche in Ras wurden die drei Kandidaten AMG 510, MRTX849 und JNJ-74699157 (ARS-3248) von drei unabhängigen Unternehmen für klinische Studien zugelassen.

AMG 510, der von Amgen entwickelt wurde, war der erste KRasG12C-Inhibitor, der im August 2018 für klinische Studien (NCT03600883) und somit für die Verabreichung an Menschen zugelassen wurde (Abb. 6).⁹ In Zusammenarbeit mit Carmot Therapeutics identifizierte Amgen die Indol-Leitstruktur 1^{Amgen} mit einer zellulären Aktivität im submikromolaren Bereich.⁸² In der Ko-Kristallstruktur von 1^{Amgen} konnte ein neuartiger Bindungsmodus mit einer bisher unbekanntem kryptischen Tasche durch eine alternative Orientierung von His95 auf der Oberfläche von KRasG12C beobachtet werden (Abb. 6c). Trotz der deutlich verbesserten zellulären Potenz gegenüber ARS-1620 war die Indol-Leitstruktur aufgrund einer hohen *Clearance* und einer geringen oralen Bioverfügbarkeit für *in vivo* Experimente ungeeignet (Abb. 6a). Lanman *et al.* entwickelten daraufhin durch Vergleich der Bindungsmodi von 1^{Amgen} und ARS-1620 eine Reihe neuartiger Hybridverbindungen, die die Adressierung der kryptischen Tasche durch Substitution der N1-Position von ARS-1620 erlaubten, darunter AMG 510 mit einem Isopropyl-Methylpyridin-Substituenten.⁸³ Im Vergleich zu ARS-1620 zeigte AMG 510 neben einer 10-fachen verbesserten Aktivität im biochemischen Assay eine 20-fache Verbesserung der Potenz im zellulären Assay mit für *in vivo* Testungen notwendigen ADME-Parametern. Zudem konnte in präklinischen Studien eine Hemmung des Tumorwachstums in Xenograft-Modellen und darüber hinaus eine Tumorregression bei höheren Dosen beobachtet werden.⁵ AMG 510 (Sotorasib) wurde in einer klinischen Studie (Phase I/II) an Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren, die eine KRasG12C-Mutation aufweisen, getestet (NCT03600883).⁹ Insgesamt 129 Patienten, darunter 59 mit NSCLC, 42 mit CRC und 28 mit anderen Tumoren wurde AMG 510 einmal am Tag in eskalierenden Dosierungskohorten mit Dosen von 180, 360, 720 und 960 mg oral verabreicht.⁶ Während der Behandlung sind keine dosislimitierenden toxischen Effekte oder behandlungsbedingte Todesfälle aufgetreten und 32 % der NSCLC-Patienten und 7 % der Darmkrebspatienten haben auf die Therapie angesprochen. Eine Krankheitskontrolle konnte bei 88 % der NSCLC-Patienten und 74 % der CRC-Patienten beobachtet werden und das mediane progressionsfreie Überleben betrug 6.3 Monate (NSCLC) beziehungsweise vier Monate (CRC). Sotorasib zeigte eine herausragende krebshemmende Aktivität und wurde schließlich im Mai 2021 von der FDA für die Behandlung von KRasG12C-mutierten NSCLC zugelassen. LUMAKRASTM (Sotorasib) ist der erste zugelassene Wirkstoff (*First-in-Class*) zur gezielten Adressierung von Ras und markiert damit einen Meilenstein in der Präzisionsmedizin.

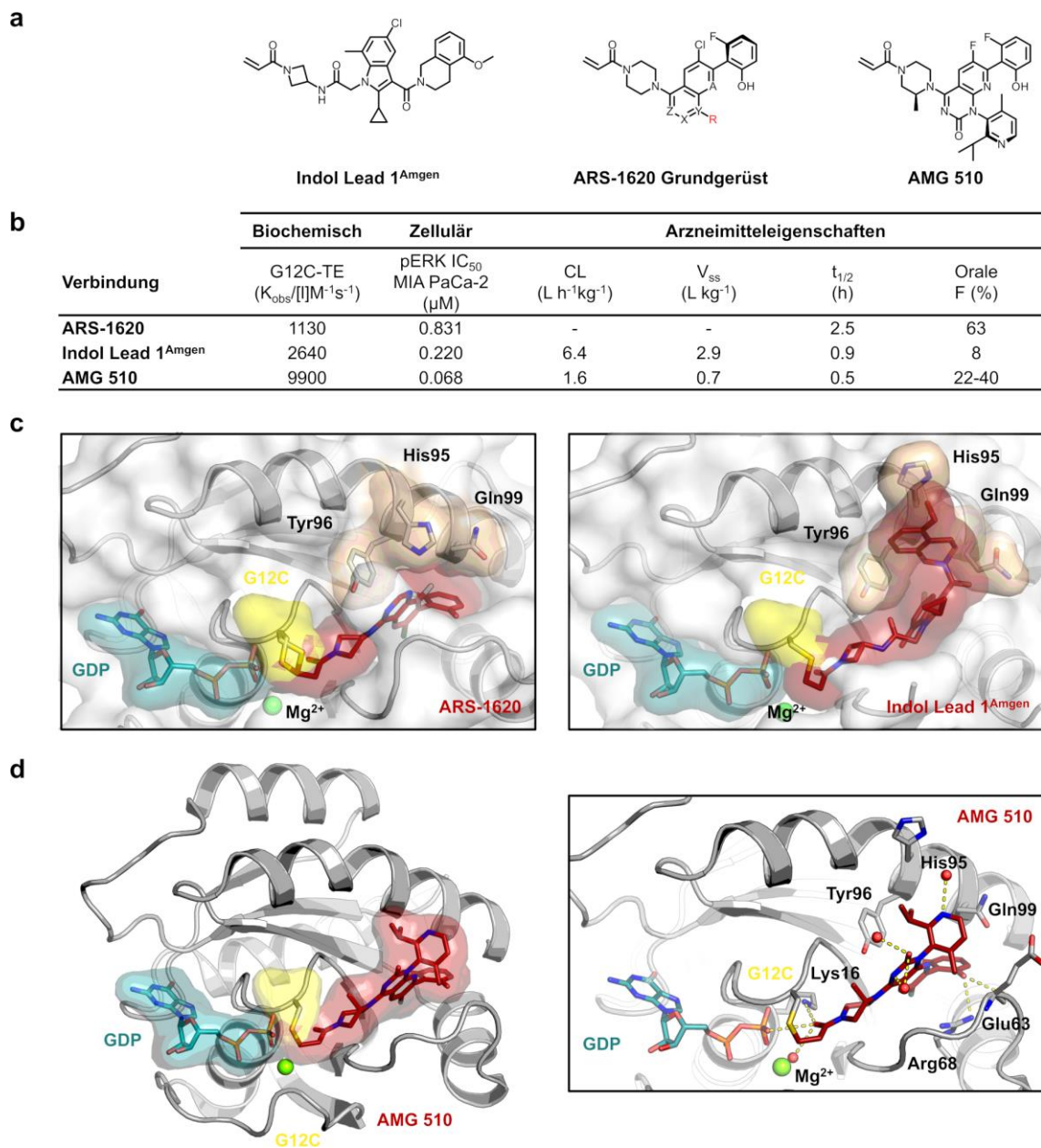


Abbildung 6 | Entwicklung von AMG 510. (a) Chemische Strukturen der Indol-Leitstruktur 1^{Amgen}, ARS-1620-Grundgerüst und AMG 510; (b) Biochemische und zelluläre Daten sowie arzneimittelähnliche Eigenschaften der gezeigten Verbindungen; (c) Struktureller Vergleich der KRasG12C-Bindungsmodi von ARS-1620 (PDB: 5v9u) und der Indol-Leitstruktur 1^{Amgen} (PDB: 6p8z); (d) Ko-Kristallstruktur von KRasG12C:GDP in Komplex mit AMG 510 (PDB: 6oim). [Abbildung modifiziert nach Goebel *et al.*⁴]

Derzeit sind weitere klinische Studien mit Sotorasib als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen bei Patienten mit NSCLC oder anderen soliden Tumoren geplant.⁸⁴⁻⁸⁷

MRTX849, entwickelt von Mirati Therapeutics, wurde im Januar 2019 zu den klinischen Studien am Menschen zugelassen (NCT03785249).¹⁰ In Zusammenarbeit mit Array BioPharma identifizierte Mirati Therapeutics die Verbindung 4^{Fell} mit mikromolarer Inhibition der onkogenen Ras-Signalweiterleitung.⁸⁸ Die Ko-Kristallstruktur von Verbindung 4^{Fell}, im Komplex mit KRasG12C bestätigte die kovalente Modifikation des mutierten Cysteins und ein strukturbasierter Wirkstoffdesign-Ansatz führte über Verbindung 13^{Fell} mit einer verbesserten Löslichkeit und zellulärer Potenz schließlich zur Entdeckung von MRTX849.⁷⁻⁸ MRTX849 weist dabei eine zelluläre Aktivität im nanomolaren Bereich mit günstigen arzneimittelähnlichen Eigenschaften auf (Abb. 7). In präklinischen Studien konnte zudem eine dosisabhängige Hemmung des Tumorwachstums sowie eine Tumorregression in Xenograft-Modellen beobachtet werden. MRTX849 (Adagrasib) wird derzeit in einer klinischen Studie (Phase I/II) an Patienten mit fortgeschrittenen mutierten KRasG12C-Tumoren, darunter NSCLC und Darmkrebs getestet (NCT03785249).^{10, 89} 79 Patienten mit NSCLC und 31 Patienten mit CRC wurden zweimal täglich 600 mg MRTX849 verabreicht. Während der Behandlung haben 45 % der NSCLC- und 17 % der CRC-Patienten auf die Therapie angesprochen und eine Krankheitskontrolle konnte bei 96 % der NSCLC- und 94 % der CRC-Patienten beobachtet werden. Adagrasib ist somit neben Sotorasib ein zweiter vielversprechender Kandidat bei der Behandlung von KRasG12C-mutierten soliden Tumoren.⁹⁰⁻⁹¹ Da bereits anhand erster vorläufiger Daten aus den klinischen Studien eine herausragende Ansprechrate gezeigt werden konnte, wurde Adagrasib erst kürzlich zu einem beschleunigten Zulassungsverfahren der FDA (*Breakthrough Therapy Designation*) zugelassen. Derzeit sind weitere klinische Studien mit Adagrasib als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen, darunter Rezeptortyrosinkinase (RTK)-Inhibitoren (Afatinib, Cetuximab), der PD-1-Inhibitor Pembrolizumab und dem SHP2-Inhibitor TNO155 von Novartis geplant.^{10, 92-95}

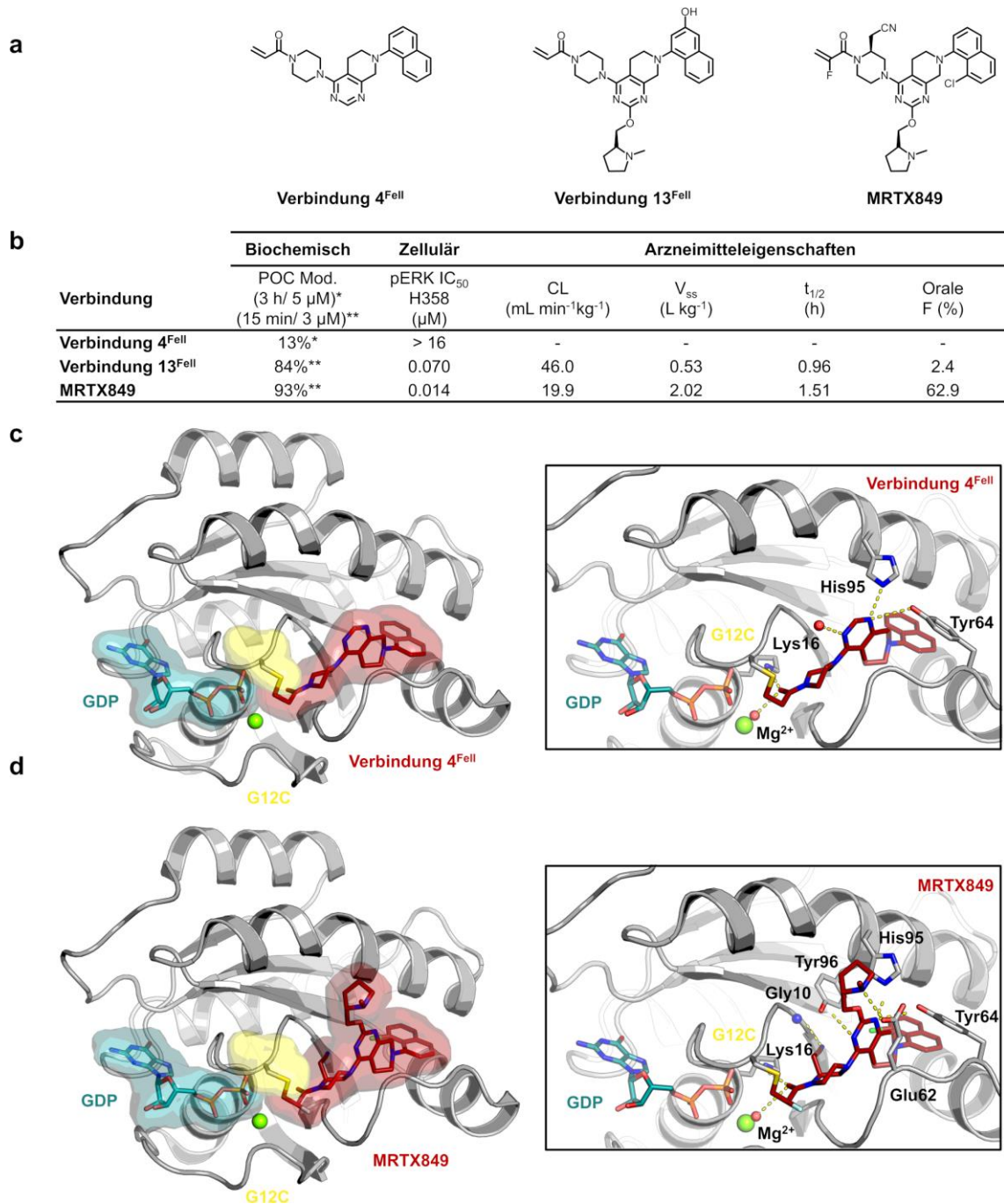


Abbildung 7 | Entwicklung von MRTX849. (a) Chemische Strukturen von Verbindung 4^{Fell}, Verbindung 13^{Fell} und MRTX849; (b) Biochemische und zelluläre Daten sowie arzneimittelähnliche Eigenschaften der gezeigten Verbindungen; (c) Ko-Kristallstruktur von KRasG12C:GDP in Komplex mit Verbindung 4^{Fell} (PDB: 6n2j); (d) Ko-Kristallstruktur von KRasG12C:GDP in Komplex mit MRTX849 (PDB: 6ut0). [Abbildung modifiziert nach Goebel *et al.*⁴]

JNJ-74699157 (ARS-3248) wurde von Wellspring Bioscience in Kooperation mit Johnson & Johnson entwickelt und im Juli 2019 zu den klinischen Studien am Menschen zugelassen (NCT04006301). Aufgrund von dosislimitierender Toxizität und fehlender Wirksamkeit ist JNJ-74699157 jedoch in der klinischen Phase gescheitert.⁹⁶

1.2.2 KRasG13C – eine noch unerforschte onkogene Ras Mutante

Die zielgerichtete Adressierung der KRasG12C-Mutation demonstrierte erstmals die therapeutische Zugänglichkeit von mutierten KRas-Proteinen und stellte damit einen Meilenstein in der personalisierten Medizin dar. Aufgrund dieser bahnbrechenden Entdeckung rückten weitere onkogene KRas-Mutationen in den Fokus der akademischen sowie der industriellen Forschung. Erst kürzlich berichtete Mirati Therapeutics von einem vielversprechenden nicht-kovalenten KRas-Inhibitor MRTX1133, der selektiv die G12D-Mutation adressiert.⁹⁷⁻⁹⁸

Insgesamt weisen rund 12 % aller Tumore mit einer KRas-Mutation ein erworbenes Cystein auf (Abb. 8a).⁹⁹⁻¹⁰⁰ Neben der in Position 12 auftretenden Punktmutation gibt es noch eine weitere Mutation im P-loop, die bei einer Reihe von Tumoren auftritt. Eine Mutation des benachbarten Glycins in Position 13 ist bei etwa 14 % der Tumoren mit einer KRas-Mutation zu beobachten und bei etwa 6 % dieser Fälle wird ein erworbenes Cystein gefunden (Abb. 8a).⁹⁹⁻¹⁰⁰ Die KRasG13C-Mutation, welche vor allem bei Lungen- und Darmkrebs vorkommt, ist jedoch als Zielstruktur in der zielgerichteten Krebstherapie noch weitestgehend unerforscht (Abb. 8b). Wie bereits zuvor beschrieben, zeichnen sich Mutationen in Position 13 neben einer verminderten GTP-Hydrolyse ebenfalls durch einen erhöhten GEF-unabhängigen Nukleotidaustausch aus, welches ebenfalls die onkogenen Eigenschaften dieser Mutante erklärt und die Dringlichkeit der Entwicklung von selektiven KRasG13C-Inhibitoren für die Anwendung in der Präzisionsmedizin widerspiegelt.

Anhand einer Durchmusterung der COSMIC-Datenbank nach häufig erworbenen Cystein-Mutationen bei Onkogenen postulierten *Visscher et al.* bereits im Jahre 2016 KRasG13C als potentielle Zielstruktur für die Entwicklung kovalenter Therapeutika. Der Cysteinrest in Position 13, der nur eine Aminosäure von G12C entfernt liegt, ist oberflächenexponiert und somit gut zugänglich für Cystein-reaktive Gruppen. Im Vergleich zu G12C befindet sich die G13C-Mutation auf dem P-loop näher an der Nukleotidbindetasche und könnte somit durch Modifikation des Nukleotidgrundgerüsts mit einer Thiol-reaktiven Gruppe kovalent modifiziert werden (Abb. 8a). Ein Vorteil dieses Ansatzes ist, dass unter Berücksichtigung der Erhaltung essentieller reversibler Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein kovalente Inhibitoren mit vergleichbaren pikomolaren Affinitäten generiert werden.⁹⁹

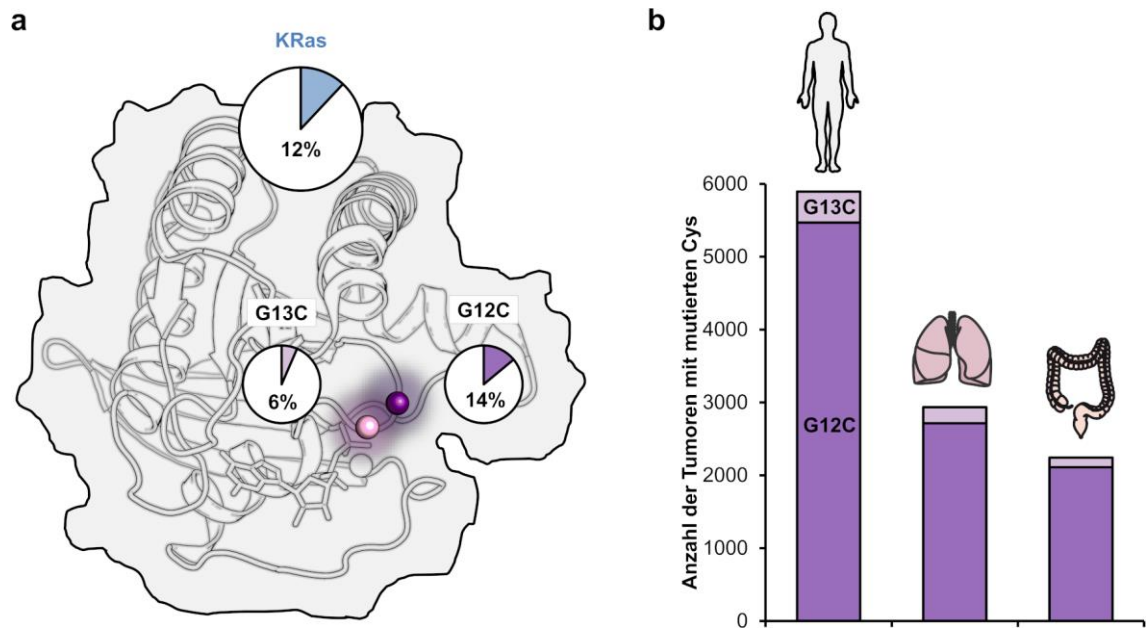


Abbildung 8 | KRasG12C vs. KRasG13C. (a) Graphische Darstellung der GTPase KRas, innerhalb dieser die G12C- (lila) und G13C-Mutation (rosa) als Sphären hervorgehoben sind. Die prozentuale Verteilung der erworbenen Cysteine aller KRas-Mutationen sowie die der G12C- und G13C-Mutation sind als Kreisdiagramme dargestellt; (b) Anzahl der Tumoren mit einer KRasG12C- (lila) und KRasG13C-Mutation (rosa) basierend auf Daten der COSMIC-Datenbank.⁹⁹⁻¹⁰⁰

2 MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

Ras-Proteine sind die am häufigsten mutierten Onkogene in menschlichen Tumoren und stellen daher attraktive Zielstrukturen in der Wirkstoffforschung dar. Die im Jahre 1981 entdeckten Onkogene wurden jedoch lange Zeit aufgrund pikomolarer Nukleotidaffinitäten sowie fehlender allosterischer Bindetaschen als nicht adressierbare Zielstrukturen eingestuft. Erst die selektive Adressierung der KRasG12C-Mutante mittels kovalenter KRasG12C-S-IIP-Inhibitoren führte durch intensive Forschung sowohl im akademischen als auch im industriellen Bereich zur unabhängigen Entwicklung der drei vielversprechenden klinischen Kandidaten AMG 510 (Amgen), MRTX849 (Mirati Therapeutics) und JNJ-74699157/ARS-3248 (J&J Wellspring Bioscience). Im Mai 2021 wurde schließlich Sotorasib (LUMAKRAS™) von der FDA für die Behandlung von KRasG12C-mutierten NSCLC zugelassen, welches erstmals die therapeutische Anfälligkeit von mutierten KRas-Proteinen demonstrierte und somit einen Meilenstein in der personalisierten Medizin darstellt.

Neben der Adressierung der *switch-II*-Tasche entwickelten Gray und Kollegen parallel Nukleotid-kompetitive Inhibitoren, die ebenfalls kovalent an KRasG12C binden. Die am β -Phosphat der GDP-Derivate eingeführten elektrophilen Gruppen führten jedoch zu einem dramatischen Verlust der reversiblen Bindungsaffinität aufgrund fehlender essentieller Wechselwirkungen mit dem Protein und dem Mg^{2+} -Ion.

Vor diesem Hintergrund sollten im Rahmen dieser Arbeit mittels strukturbasiertem Wirkstoffdesign Nukleotidanaloga entwickelt werden, welche kovalent an die onkogenen KRas-Varianten KRasG12C und/oder KRasG13C binden und mit den unmodifizierten Nukleotiden konkurrieren können (Abb. 9). Um die von Gray und Kollegen beschriebenen Limitierungen zu überwinden, sollte zunächst anhand bereits publizierter KRas-Kristallstrukturen eine geeignete Position für die Modifikation der Nukleotide mit einer elektrophilen Gruppe identifiziert werden.

Die Bindungseigenschaften der dargestellten Nukleotidderivate sollten im Anschluss durch biochemische Methoden bestimmt werden. Insbesondere eine detaillierte kinetische Charakterisierung sollte Aufschluss über die reversiblen Affinitäten der Nukleotidanaloga im Vergleich zu den natürlichen Nukleotiden GDP und GTP geben.

Mittels GEF-katalysiertem Nukleotidaustausch sowie GAP-stimulierter GTP-Hydrolyse sollte zudem der Einfluss der kovalenten Modifikation auf die Interaktion der modifizierten KRas-Proteine mit regulatorischen Proteinen untersucht werden.

Um einen tiefergehenden Einblick in den Bindemodus der kovalenten Nukleotidanaloga zu erhalten, sollten zudem strukturelle Untersuchungen durchgeführt werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher ein robustes Protokoll für die Kristallisation der mit den Nukleotidanaloga modifizierten KRas-Proteine im Arbeitskreis etabliert werden, um anhand von verschiedenen generierten KRas-Komplexstrukturen das Design einer zweiten Generation von Nukleotidanaloga mit verbesserten Bindungseigenschaften zu ermöglichen.

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit von mutierten KRas-abhängigen Krebszelllinien sollten im Rahmen dieser Arbeit artifizielle KRas-abhängige Zelllinien, darunter NIH-3T3 sowie Ba/F3-Zellen generiert werden, die in Zukunft für die Charakterisierung mutantenselektiver KRas-Inhibitoren genutzt werden könnten. Für die zelluläre Charakterisierung der in dieser Arbeit dargestellten Nukleotidanaloga, die aufgrund ihres anionischen Charakters nicht die Zellmembran überwinden können, sollten abschließend verschiedene Strategien für den Transfer der Nukleotidderivate in Zellen untersucht werden.

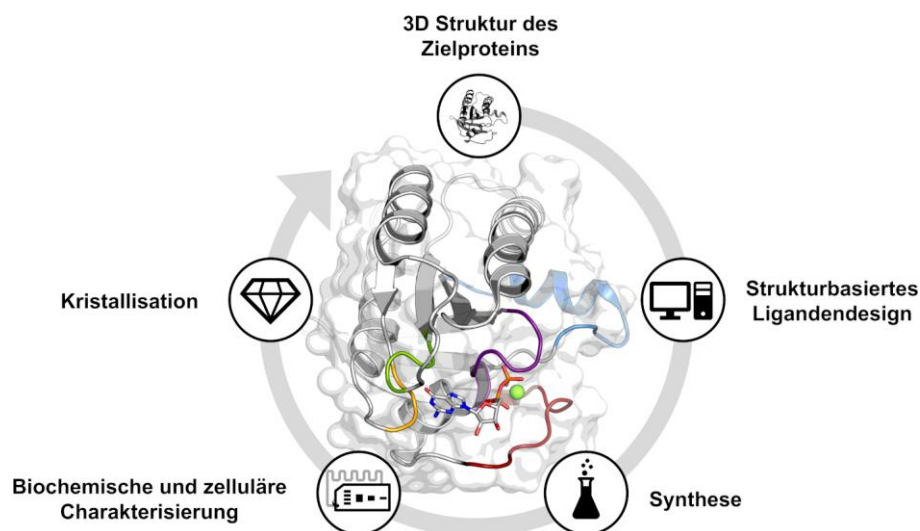


Abbildung 9 | Zyklus des strukturbasierten Wirkstoffdesigns. Ausgehend von einer Kristallstruktur des Zielproteins werden Liganden mit Hilfe von computergestützten Methoden designt. Die synthetisierten Liganden werden im Anschluss in biochemischen und zellulären Assays charakterisiert. Mittels Ko-Kristallisation wird der Bindemodus der Liganden entschlüsselt, welches als Startpunkt für einen weiteren Zyklus des strukturbasierten Wirkstoffdesigns dient, um Liganden mit verbesserten Bindungseigenschaften zu erhalten.¹⁰¹

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1 Rationales Design kovalenter Nukleotid-basierter KRas-Inhibitoren

Das strukturbasierte Wirkstoffdesign ist ein wichtiges Werkzeug innerhalb der medizinischen Chemie und ermöglicht auf Grundlage bereits verfügbarer Kristallstrukturen klinisch relevanter Zielproteine das rationale Design einer Bibliothek an kleinen Molekülen, die spezifisch die Bindungstaschen der Zielproteine adressieren (Abb. 9).¹⁰¹

Basierend auf den bisher publizierten Kristallstrukturen der Ras-Proteine sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst eine fokussierte Bibliothek von Guaninnukleotid-basierten Verbindungen designt werden, welche kovalent an klinisch relevante onkogene KRas-Proteine mit Mutationen innerhalb des P-loops (G12C und G13C) binden können und diese selektiv inhibieren.

Das Konzept der Nukleotid-kompetitiven Inhibition wurde anfänglich aufgrund der hohen Affinität von GDP und GTP gegenüber GTPasen verworfen. Erst in Kombination mit einer kovalenten Bindung der Inhibitoren erlangte dieser Ansatz erneut Aufmerksamkeit im akademischen Umfeld. Mit dem von Hunter *et al.* entwickelten GDP-Derivat SML-8-73-1, welches am β -Phosphat eine elektrophile Gruppe zur Ausbildung einer irreversiblen Bindung aufweist, konnte in der Vergangenheit erfolgreich die onkogene Mutante KRasG12C kovalent adressiert werden (Abb. 10b).¹⁰² Dieser Ansatz war zwar unter bestimmten Bedingungen *in vitro* vielversprechend, jedoch konnten SML-8-73-1 sowie die aus dem GDP-Derivat abgeleiteten Prodrugs zellulär aufgrund der relativ geringen reversiblen Affinität ($K_D = 0.14 \mu\text{M}$) – verursacht durch fehlende essentielle Interaktionen mit dem Protein und dem Magnesiumion – nicht mit den unmodifizierten Nukleotiden ($K_D = 2.5 \text{ pM}$ für GDP) innerhalb der Zelle konkurrieren.^{13, 15, 103} Um den Ansatz der kovalenten Nukleotid-kompetitiven Inhibitoren daher erfolgreich *in vivo* umzusetzen, müssen Verbindungen generiert werden, welche aufgrund einer intakten Diphosphat-Struktur vergleichbare reversible Affinitäten wie die natürlichen Nukleotide GDP und GTP aufweisen und ebenfalls über eine elektrophile Gruppe zur Ausbildung einer irreversiblen Bindung an einer anderen Stelle innerhalb des Nukleotidgrundgerüsts verfügen.

Die von Wiegandt *et al.* beschriebenen GDP-Derivate, die eine elektrophile Gruppe an der N2-Position der Guaninbase besitzen und ursprünglich für die GTPase Ypt7Q35C entwickelt wurden, weisen zwar eine intakte Diphosphat-Struktur auf, jedoch ist die Derivatisierungsposition zu weit entfernt, als dass eine kovalente Bindung an KRasG12C oder KRasG13C erfolgen könnte (Abb. 10a).¹⁰³⁻¹⁰⁴

Um die von Hunter *et al.* und Wiegandt *et al.* beschriebenen Limitierungen zu überwinden und Nukleotidanaloga zu generieren, welche aufgrund vergleichbarer reversibler Affinitäten innerhalb der Zelle mit GDP und GTP konkurrieren können, wurde die 2',3'-Position der Riboseinheit als potentielle Derivatisierungsposition identifiziert, da Modifikationen an dieser Position die Nukleotidaffinität nicht wesentlich verändern.¹⁰⁵ Im Rahmen dieser Arbeit sollten demnach Nukleotidanaloga synthetisiert werden, welche eine elektrophile Gruppe an den 2',3'-OH-Gruppen der Ribose für eine kovalente Modifikation onkogener KRas-Proteine mit Mutationen innerhalb des P-loops (G12C und G13C) besitzen (Abb. 10d). Nukleotidderivate mit verschiedenen Linkerlängen (eda: Ethylendiamin, pda: Propylendiamin und bda: Butylendiamin) basierend auf dem GDP-, GTP- sowie dGTP-Grundgerüst sollten generiert werden, um eine optimale Ausrichtung der Thiol-reaktiven Gruppe für die jeweiligen KRas-Mutanten zu erzielen. Neben den Acrylamid-Derivaten, die potenziell über eine Michael-Addition irreversibel an KRasG12C oder KRasG13C binden können, sollten ebenfalls entsprechende Acetamid-Derivate als nicht reaktive Kontrollverbindungen generiert werden (Abb. 10e).

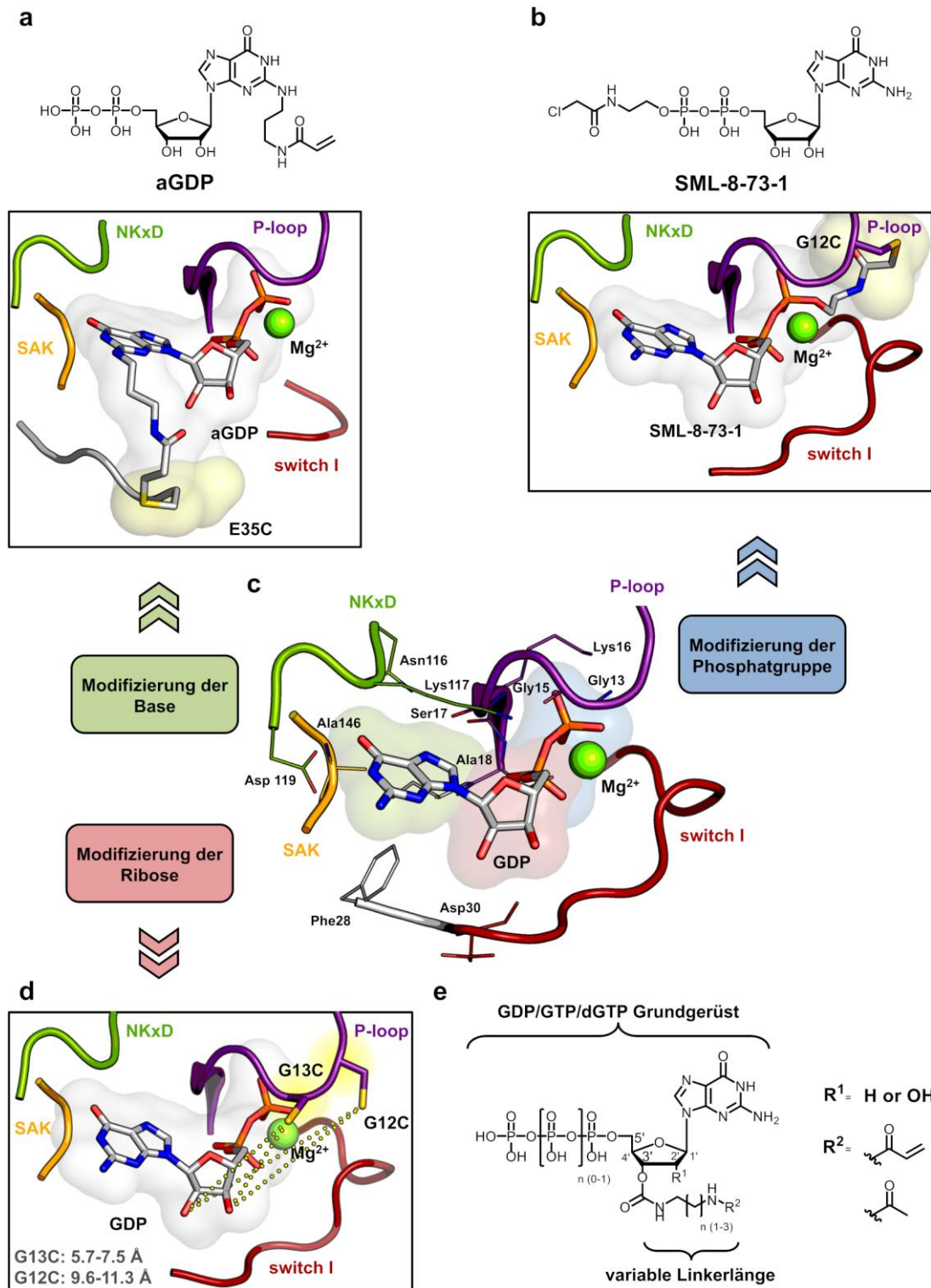


Abbildung 10 | Rationales Design von 2',3'-modifizierten Nukleotidanaloga. (a) Chemische Struktur von aGDP sowie Kristallstruktur von Ypt7Q35C–aGDP (PDB: 4phf); (b) Chemische Struktur von SML-8-73-1 sowie Kristallstruktur von KRasG12C in Komplex mit SML-8-73-1 (PDB: 4nmm); (c) Analyse der Kristallstruktur von KRasWT:GDP hinsichtlich der Generierung einer fokussierten Bibliothek von Guaninnukleotid-basierten Verbindungen; (d) Modell von KRasG12C und KRasG13C (basierend auf PDB: 4obe), welches die Abstände zwischen dem Cysteinrest und den zu modifizierenden OH-Gruppen der Ribose zeigt; (e) Allgemeine Zielstruktur der Nukleotidanaloga, bei denen eine elektrophile Gruppe unter Variation der Linkerlänge an der 2',3'-Position der Riboseinheit eingeführt werden sollen.

Eine große Herausforderung bei der Entwicklung von Nukleotid-kompetitiven Inhibitoren ist neben den hohen Affinitäten sowie zellulären Konzentrationen von GDP und GTP die Selektivität der Nukleotidanaloga gegenüber anderen GTPasen, da die Aminosäuresequenz der Nukleotidbindetasche innerhalb der Ras-Superfamilie hoch konserviert ist.¹⁰⁶ Ein multiples Alignment der G-Domäne der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen sollte daher vorab mit den designten Nukleotidderivaten durchgeführt werden, um Aufschluss über mögliche *off-targets* zu erhalten. Bei der mit dem Uniprot-Server angefertigten Sequenzüberlagerung der über 150 GTPasen, wurden die Bereiche markiert, welche theoretisch in Reichweite des eda-Linkers ($\sim 10 \text{ \AA}$) sowie des bda-Linkers ($\sim 12 \text{ \AA}$) liegen (Abb. A1). Anschließend wurden die innerhalb dieser Regionen befindlichen Cysteine gekennzeichnet und die GTPasen, welche Cysteine in Reichweite der Linker aufweisen, im Rahmen eines Cystein-*Profiling*s zusammengefasst (Abb. 11, Tab. A2) Nur etwa 7 % der GTPasen besitzen Cysteine innerhalb des P-loops und nur drei der insgesamt über 150 GTPasen weisen an der Position, die dem Rest 13 in KRas entspricht, eine Cysteinseitenkette auf (Arl4a, RheBL1 und Rab21). An Position 12 hingegen besitzt nur eine GTPase der Ras-Superfamilie ein Cystein (Ift22). Darüber hinaus weisen eine Reihe von GTPasen ebenfalls Cysteine in Regionen außerhalb des P-loops in der Nähe des Nukleotids auf. Diese Bereiche sind jedoch zumeist weiter entfernt von den Positionen 12 und 13, sodass bei Optimierung der Liganden durch geeignete Gestaltung der Linker und Optimierung der Ausrichtung der reaktiven Gruppe eine ausreichende Spezifität gegenüber KRasG12C oder KRasG13C zu erwarten ist.

Es ist somit davon auszugehen, dass die auf Grundlage von KRas-Kristallstrukturen (KRasWT und KRasG12C) sowie einer Sequenzüberlagerung der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen designten Nukleotidanaloga nicht als breite GTPase-Inhibitoren fungieren und eine ausreichende Selektivität hinsichtlich der gewünschten P-loop Mutationen (G12C und G13C) aufweisen werden.

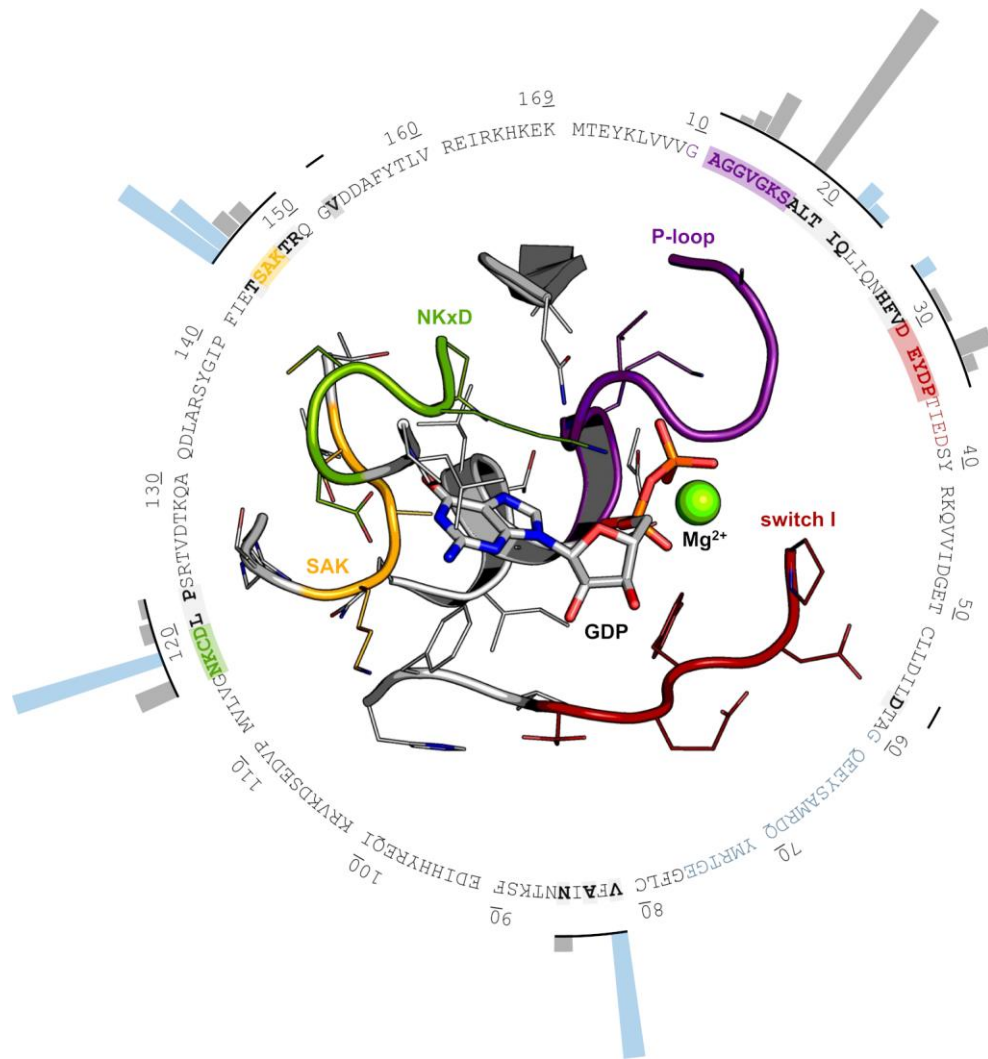


Abbildung 11 | Cystein-Profiling. Die charakteristischen Elemente der kleinen GTPasen sind anhand der Kristallstruktur von KRasWT (PDB: 4obe) entsprechend farblich markiert (G1 (P-loop): violett, G2 (*switch-I*): rot, G4 (NKxD): grün, G5 (SAK): gelb). Die Bereiche innerhalb der GTPasen, die in Reichweite des eda-Linkers ($\sim 10 \text{ \AA}$, grau) und des bda-Linkers ($\sim 12 \text{ \AA}$, blau) liegen sind in der Sequenz farblich hervorgehoben. Die Anzahl der GTPasen, die innerhalb dieser Regionen Cysteine aufweisen sind durch Balken angedeutet und in Tab. A2 zusammengefasst. Das für das Cystein-Profiling vorab erstellte multiple Alignment der G-Domäne der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen ist in Abb. A1 dargestellt.

3.2 Synthese und Charakterisierung von kovalenten Guaninnukleotid-basierten Verbindungen

Anders als die im Arbeitskreis von Prof. Dr. Daniel Rauh routinemäßig durchgeführten Synthesen klassischer kleiner organischer Moleküle, bestand die größte Herausforderung bei der Synthese der Guaninnukleotid-basierten Verbindungen zunächst in der Handhabung sowie Etablierung geeigneter Systeme zur Darstellung, Reinigung und Analyse der Zielverbindungen.

Viele Nukleotidsynthesen werden unter wasserfreien oder nahezu wasserfreien Bedingungen durchgeführt. Daher besteht der erste Schritt häufig darin, die TEA-, Pyridinium- oder TBA-Salze der kommerziell erhältlichen Natrium-, Lithium- oder anderen wasserlöslichen Salze unter Verwendung von Kationenaustauschern herzustellen. Die am weitesten verbreitete präparative Chromatographietechnik zur Reinigung der negativ geladenen Nukleotide ist die Anionenaustauschchromatographie, die in Kombination mit einem variablen UV-VIS Detektor eine Isolierung der synthetisierten Nukleotidenaloga ermöglicht. Eine abschließende Charakterisierung von neu synthetisierten Nukleotidderivaten umfasst in der Regel chromatographische und spektrale Techniken, um neben einer eindeutigen Strukturzuordnung auch den Reinheitsgrad zu bestimmen.¹⁰⁷

Im folgenden Kapitel wird die Etablierung eines robusten Systems für die Synthese der Guaninnukleotid-basierten Zielverbindungen beschrieben. Nach erfolgreicher Synthese sollte die Reinheit der dargestellten Nukleotidanaloga über isokratische HPLC-Läufe bestimmt werden. Im Falle der 2',3'-modifizierten Nukleotide sollte zudem die pH-abhängige Trennung der 2',3'-Isomere untersucht und die prozentuale Verteilung der Isomere über NMR-Spektroskopie bestimmt werden.

3.2.1 Synthese der Nukleotidanaloga

Die Synthese der Nukleotidanaloga wurde nach dem von Cremo *et al.* (1990) festgelegten und von Eberth *et al.* (2005) beschriebenen Protokoll durchgeführt (Abb. 12).^{105, 108}

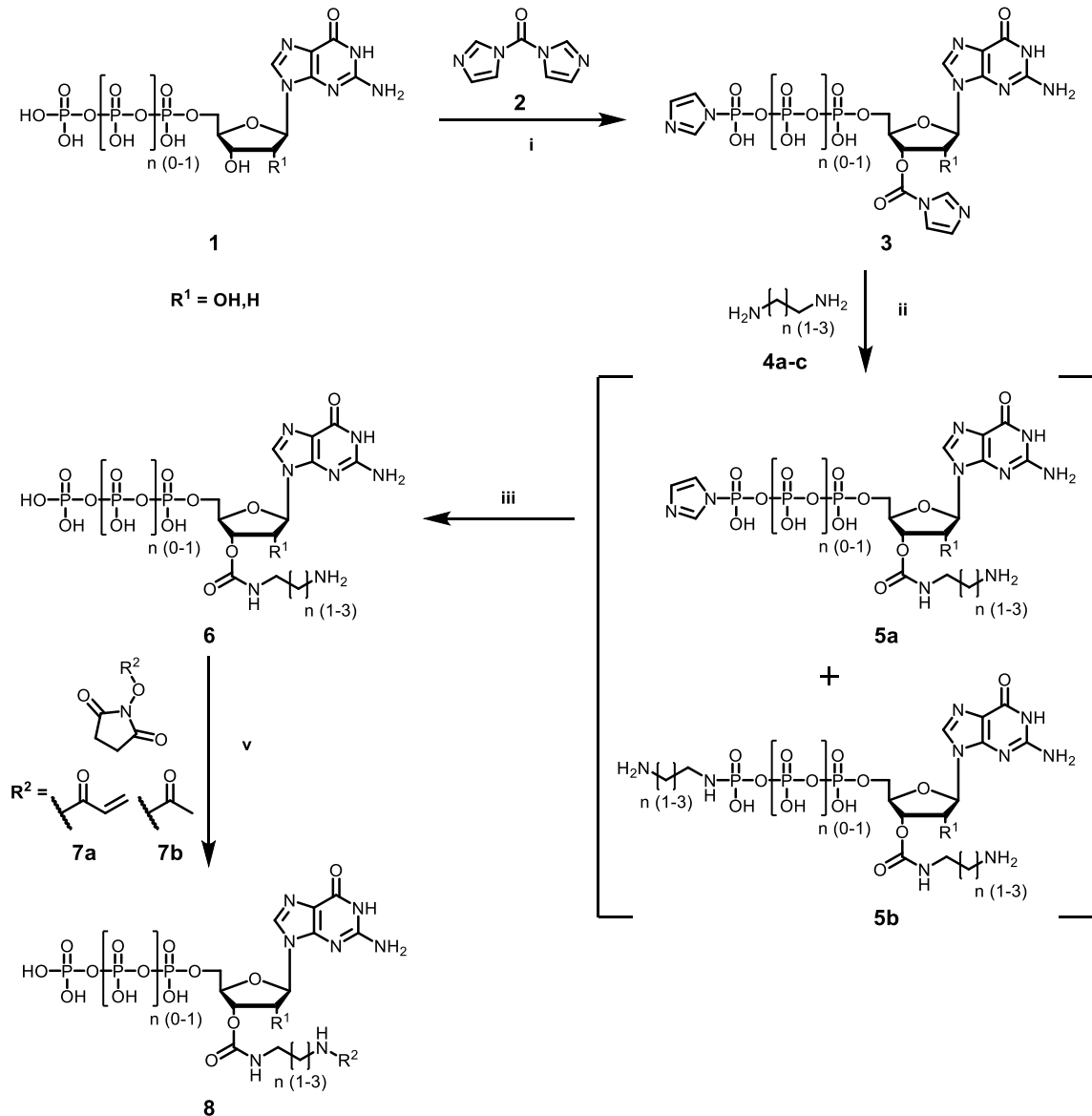


Abbildung 12 | Syntheschema der Nukleotid-basierten Zielverbindungen. Reagenzien und Bedingungen: (i) 5 eq. CDI (**2**) DMF, 4 °C, 24 h; (ii) 5 eq. **4a-c**, DMF; (iii) ddH₂O/HCl pH 1.5, 4 °C, 1-3 d; (v) 100 mM Tetraborat-Puffer, RT, 24 h.

Als Ausgangspunkt der Syntheseroute dienen die kommerziell erhältlichen Natriumsalze der Nucleotide GDP, GTP und dGTP (**1**), die über einen Kationenaustauscher in eine DMF-lösliche Form überführt wurden. Dabei wurde das Säulenmaterial zunächst durch Lagerung in ddH₂O/Pyridin (1:1) und anschließendes Waschen mit ddH₂O in die

Pyridiniumform überführt. Anschließend wurden die Natriumsalze der Nukleotide auf die Säule gegeben und mit einem Gemisch aus ddH₂O/MeOH (1:1) von der Säule eluiert, wobei die Natriumionen gegen Protonen ausgetauscht wurden. Da die eluierten Nukleotide unter sauren Bedingungen nicht stabil sind, wurden diese durch Zugabe von TBA in die entsprechenden TBA-Salze überführt. Anschließend wurden die DMF-löslichen Nukleotide mit Carbonyldiimidazol (CDI, **2**) umgesetzt, wobei durch nukleophile Substitution der Imidazoleinheiten durch die 2'- und 3'-Hydroxylgruppen der Ribose das Intermediat **3** generiert wurde. Im Falle von GDP und GTP als Startmaterial wurde dabei ein zyklisches Carbonat gebildet.¹⁰⁹ Neben der Modifizierung der Ribose wurde zudem durch Reaktion von CDI mit den finalen Phosphorsäureestern das entsprechende Phosphoramidat unter Abspaltung von Imidazol und CO₂ gebildet. Durch die anschließende Zugabe der primären Amine (**4a-c**) wurden die entsprechenden Carbamate (**5**) gebildet. Um unterschiedliche Linkerlängen zu generieren wurden dabei Ethylendiamin (eda, **4a**), Propylendiamin (pda, **4b**) und Butylendiamin (bda, **4c**) verwendet. Die dabei entstandenen Feststoffe konnte durch Zentrifugation und anschließendes mehrmaliges Waschen mit trockenem DMF isoliert werden. Dabei wurden sowohl Derivate mit einer Imidazol-modifizierten als auch solche mit den primären Aminen-modifizierten terminalen Phosphatgruppe beobachtet. Durch die anschließende saure Hydrolyse bei pH 1.5 konnte das Phosphoramidat gespalten und das entstandene freie Amin mittels Ionenaustauschchromatographie gereinigt werden. Zur Reinigung der modifizierten Nukleotide wurde ein starker Anionenaustauscher mit quartären Ammoniumionen als funktionelle Gruppe verwendet und die Elution der Nukleotide erfolgte bei linearer Erhöhung der Konzentration eines Konterions (50 mM – 1 M TEA) in der mobilen Phase (Abb. 13a) Die gesammelten Fraktionen wurden mittels HPLC unter Verwendung von TBAB als Gegenion im Laufpuffer analysiert (Kapitel 3.2.2). Die Produkt-enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert und das TEA-Salz im Anschluss durch mehrmalige Aufnahme in MeOH und anschließender Einengung am Rotationsverdampfer entfernt. Im finalen Reaktionsschritt wurden die freien Amine (**4a-c**) innerhalb einer Additions-Eliminierungsreaktion¹¹⁰ mit den aktiven Estern Acryloxysuccinimid (**7a**) oder Acetoxysuccinimid (**7b**) umgesetzt, um den Michael-Akzeptor bzw. das reversible Analogon darzustellen. Die Zielverbindungen wurden abschließend erneut über die Q-Sepharose-Säule gereinigt (Abb. 13b) und die Reinheit mittels isokratischer HPLC-Läufe bestimmt (Kapitel 3.2.2).

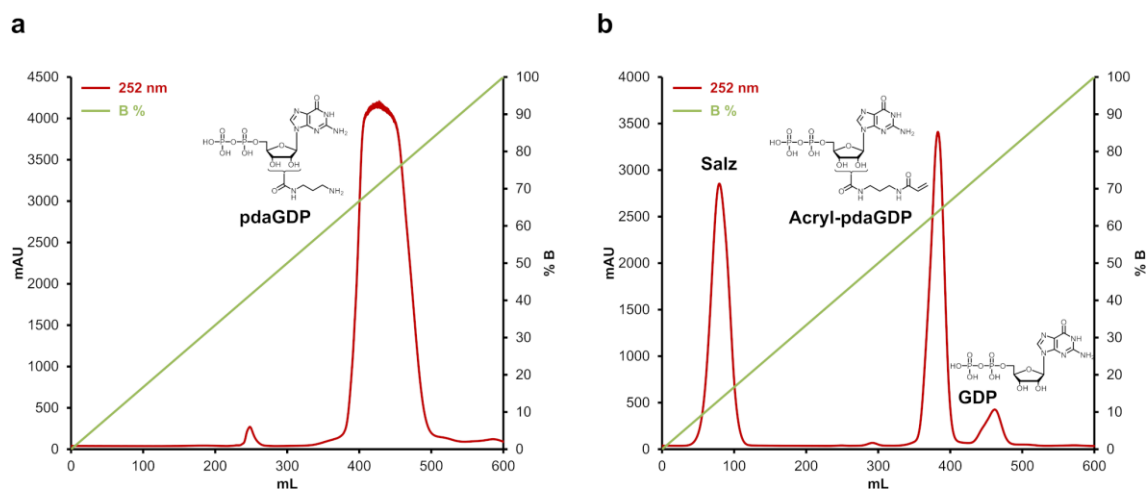


Abbildung 13 | Reinigung der Nucleotidanaloga. (a) Chromatogramm des Anionenaustauschers von pdaGDP. (b) Chromatogramm des Anionenaustauschers von Acryl-pdaGDP (**8b**). Die Nucleotidanaloga eluieren zwischen 70 und 80 % Puffer B (grün).

Insgesamt konnten mit dieser Syntheseroute 15 verschiedene Guanosinnucleotidderivate erfolgreich dargestellt werden (Tab. 1).

Tabelle 1 | Übersicht der dargestellten Nucleotidanaloga (8a-8o). Nucleotidderivate mit verschiedenen Linkerlängen (eda, pda und bda) wurden basierend auf dem GDP, GTP sowie dGTP-Grundgerüst hergestellt. Neben den Acrylamid-Derivaten wurden ebenfalls Acetamid-Derivate als Kontrollverbindungen generiert.

	Nucleotid	#	Linker	R ²
GDP		8a	eda	
		8b	pda	
		8c	bda	
		8d	eda	
		8e	pda	
		8f	bda	
GTP		8g	eda	
		8h	pda	
		8i	bda	
		8j	eda	
		8k	pda	
dGTP		8l	bda	
		8m	eda	
		8n	pda	
		8o	bda	

3.2.2 Isokratische Trennung der Nukleotidanaloga

Die Reinheit der Nukleotidverbindungen wurde durch HPLC unter Verwendung von Tetrabutylammoniumbromid als Gegenion im Laufpuffer bestimmt (50 mM KP_i pH 6.6, 10 mM TBAB, 16 % ACN).¹⁰⁴ Die positiv geladenen TBA-Ionen interagieren dabei mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleotide, wodurch die Retentionszeit mit steigender Zahl an Phosphatgruppen zunimmt. Die Retentionszeiten aller synthetisierten Nukleotidanaloga wurden mit dem Gmix, der Guanosin, GMP, GDP, GppNHp und GTP enthält, verglichen (Abb. 14). Guanosin weist dabei die geringste Retentionszeit (~2.5 min) auf, gefolgt von GMP mit einer Phosphatgruppe (~3.3 min) und GDP mit zwei Phosphatgruppen (~5.3 min). Das nicht hydrolysierbare GTP-Analogon GppNHp, welches zwischen dem β - und γ -Phosphat eine Amin-Gruppe besitzt, eluiert zwischen sechs und sieben Minuten und weist zudem ein zweites charakteristisches Signal bei etwa vier Minuten für das Abbauprodukt GppNH₂ auf.¹¹¹ GTP mit insgesamt drei Phosphatgruppen besitzt die höchste Retentionszeit und eluiert bei etwa neun Minuten. Die beschriebenen Retentionszeiten des Gmix beziehen sich dabei auf das im Laufpuffer enthaltene ACN (16 %) und können je nach Pufferzusammensetzung variieren.

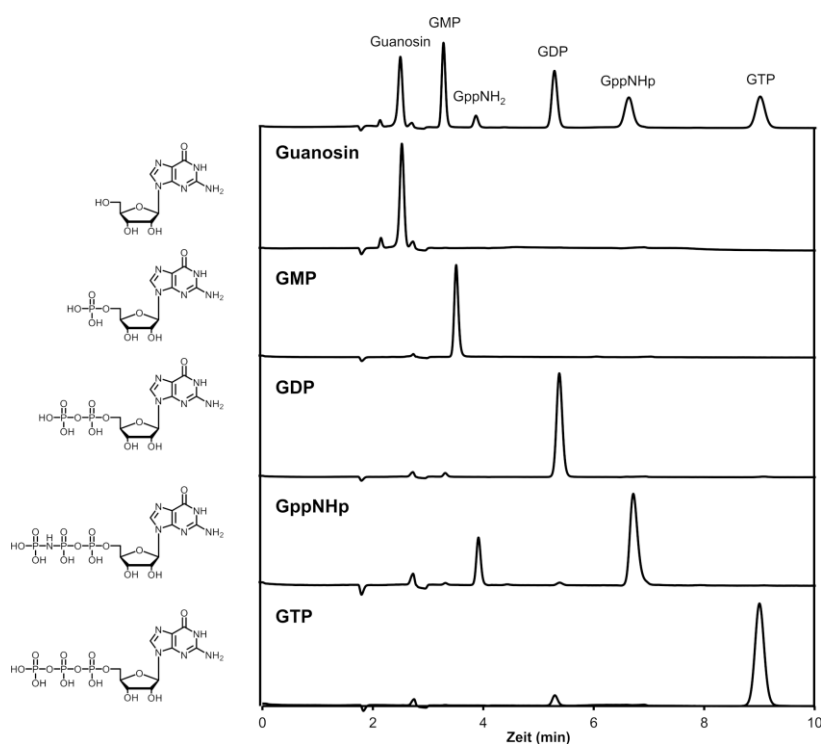


Abbildung 14 | Isokratische Trennung der Bestandteile des Gmix. Basierend auf der Wechselwirkung mit dem Gegenion TBA und in Gegenwart von 16% ACN im Laufpuffer weisen die Verbindungen folgende Retentionszeiten auf: Guanosin (2.5 min), GMP (3.3 min), GppNH₂ (3.9 min), GDP (5.3 min), GppNHp (6.7 min), GTP (9.0 min).

Die mittels der beschriebenen Syntheseroute generierten Nukleotidanaloga weisen im Falle von GDP- und GTP-Derivaten zwei charakteristische Signale für das entsprechende 2'-Isomer und 3'-Isomer auf. Im Gleichgewicht liegt dabei zu 60-70 % das 3'-Isomer und zu 30-40 % das 2'-Isomer vor.¹⁰⁸ Die dGTP-Derivate hingegen weisen dementsprechend ein charakteristisches Signal für das 3'-Derivat auf. Die freien Amine der synthetisierten Nukleotidanaloga, die die Vorstufe der finalen Derivate darstellten, wiesen dabei die geringste Retentionszeit auf, gefolgt von den Acetamid-Kontrollverbindungen und den Acrylamiden, die potentiell über den Michael-Akzeptor kovalent an das mutierte Protein binden können (Abb. 15).

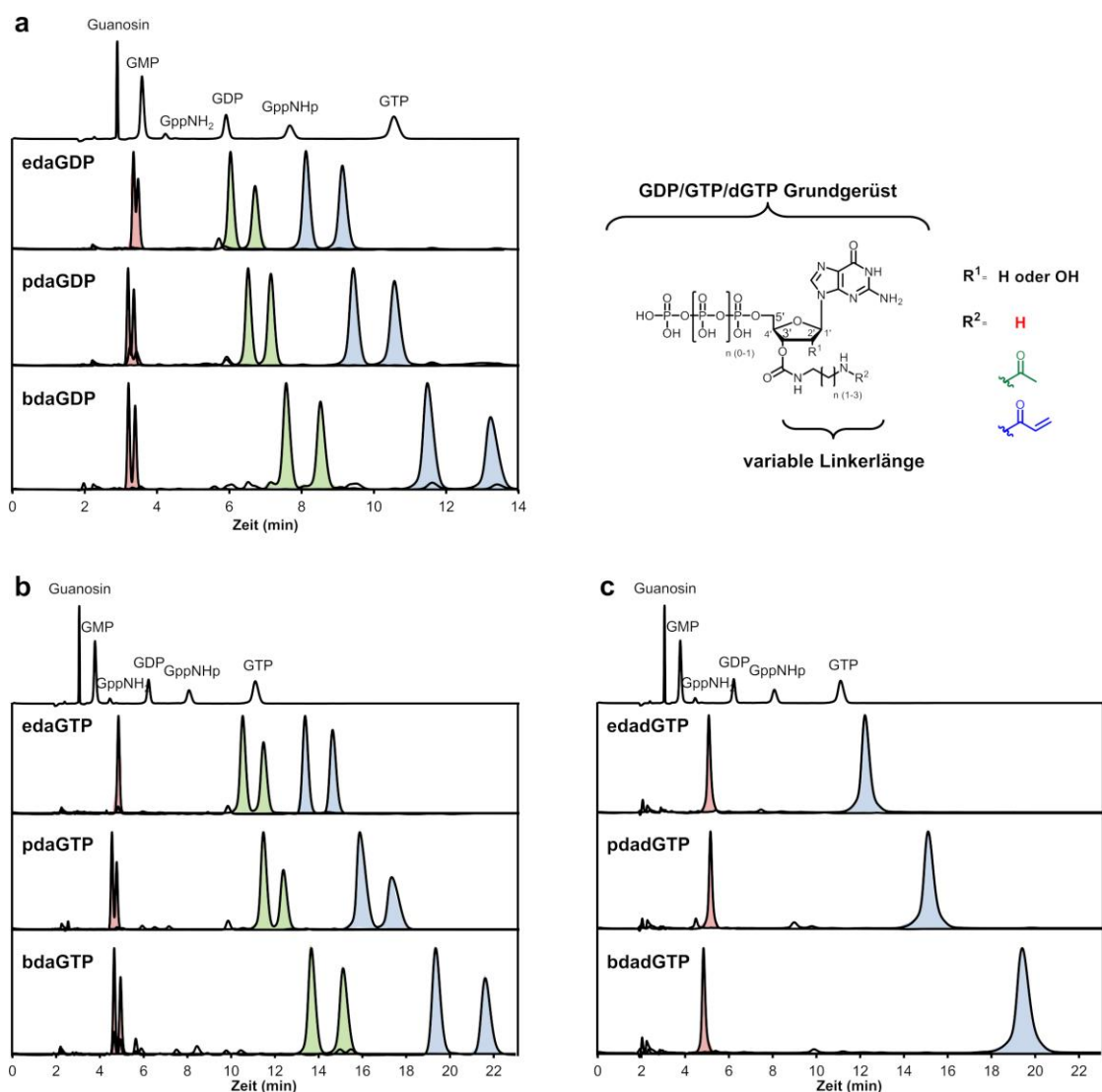


Abbildung 15 | Isokratische Trennung der dargestellten Nukleotidanaloga. Isokratische HPLC-Läufe von (a) GDP-basierten (b) GTP-basierten und (c) dGTP-basierten Nukleotid-Analoga (rot: freie Amine, grün: Acetamide, blau: Acrylamide). Für GDP und GTP Derivate konnten zwei überlappende Signale entsprechend den 2'- und 3'-Isomeren beobachtet werden, wohingegen die dGTP-Derivate ein Signal für das entsprechende 3'-Isomer aufwiesen.

Sowohl die Acetamide als auch die Acrylamide können dabei über den aliphatischen Rest zusätzlich mit der hydrophoben Festphasen-Matrix (C-18) interagieren, wodurch die Verbindungen länger auf der Säule zurückgehalten werden als die freien Amine und demnach später eluieren. Im Vergleich zu den GDP-Derivaten konnten für die GTP und dGTP-Derivate aufgrund der zusätzlichen Phosphatgruppe höhere Retentionszeiten beobachtet werden. Insgesamt wurde bei dem Großteil der dargestellten Nukleotidanaloga eine Reinheit von über 90 % beobachtet (Kapitel 5.3.1).

Im Gegensatz zu 2',3'-Isomeren von Riboseestern, bei denen innerhalb von Minuten bei physiologischem pH-Wert wieder ein Isomerengemisch entsteht,¹¹²⁻¹¹⁴ ist es möglich 2',3'-Isomere von Carbamaten bei einem niedrigen pH-Wert chromatographisch zu trennen und aufgrund der deutlich langsameren Transcarbamoylierung bei einem physiologischen pH-Wert ohne signifikante Reequilibration zu verwenden.^{107, 115} Anhand von Acryl-pdaGDP (**8b**) wurde daher die pH-abhängige Trennung der 2',3'-Isomere untersucht, wobei bei einem pH-Wert von 6.6 zunächst die beiden Isomere voneinander getrennt wurden (Abb. 16).

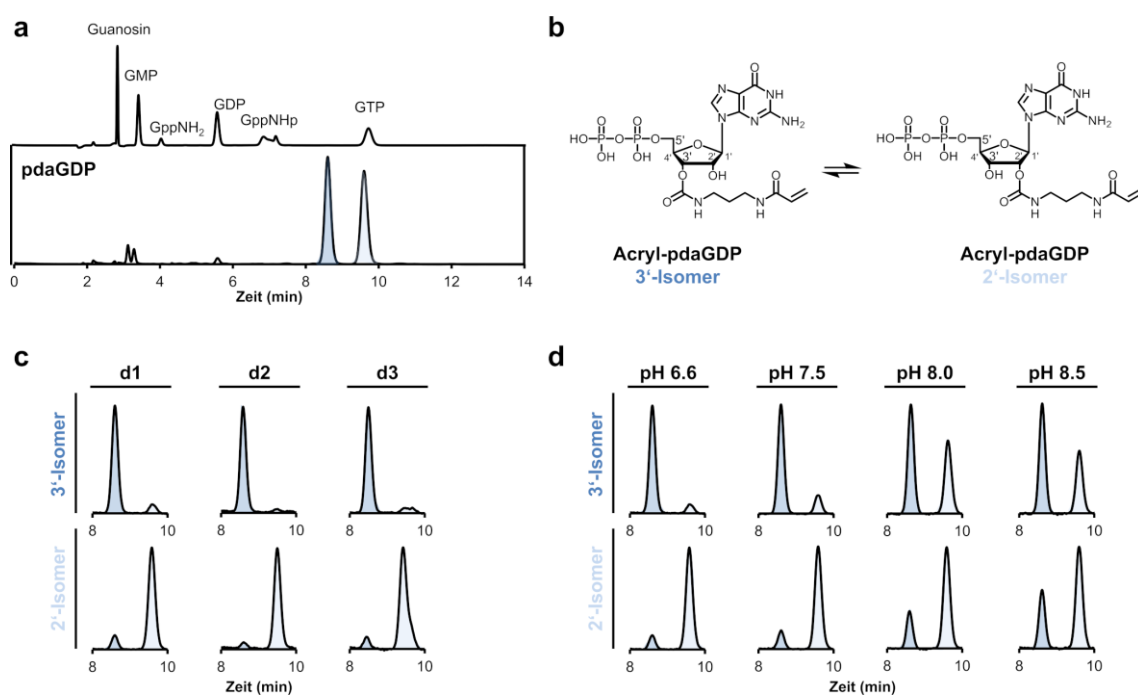


Abbildung 16 | pH-abhängige Trennung der 2',3'-Isomere von Acryl-pdaGDP (8b**).** (a) Isokratische HPLC-Läufe von Acryl-pdaGDP (**8b**) mit zwei charakteristischen Signalen für das 2'- und 3'-Isomer; (b) Strukturen der 2',3'-Isomere von Acryl-pdaGDP (**8b**); (c) Isokratische Trennung der 2',3'-Isomere und anschließende Inkubation bei pH 6.6; (c) pH-abhängige Trennung der 2',3'-Isomere und anschließende Inkubation bei pH 6.6, 7.5 8.0 und 8.5 für 24 h bei RT.

Trotz einer insgesamt dreitägigen Inkubation bei Raumtemperatur konnte bei pH 6.6 keine Reequilibration beobachtet werden. Durch die Erhöhung des pH-Wertes, bei der die Transcarbamoylierung begünstigt wird, konnten hingegen bereits nach 24 Stunden die Reequilibration der Isomere gesteigert werden. Da unter physiologischen Bedingungen bei einem pH-Wert von 7.5 kein reines Isomer erhalten werden konnte und die Isomere ein unterschiedliches Bindevverhalten gegenüber Ras aufweisen könnten, wurden zudem die dGTP-Derivate hergestellt (Abb. 15c).¹¹³⁻¹¹⁴

3.2.3 NMR-Untersuchungen

Eine Charakterisierung von Nukleotidderivaten umfasst in der Regel chromatographische und spektrale Techniken, um neben einer eindeutigen Strukturzuordnung auch den Reinheitsgrad zu bestimmen. Die Aufnahme eindimensionaler ¹H-NMR-Spektren neu synthetisierte Nukleotidanaloga gehört mittlerweile zur gängigen Praxis und eine eindeutige Zuordnung von ¹H-NMR-Signale kann unter Berücksichtigung von zweidimensionalen NMR-Spektren (COSY (engl.: *correlated spectroscopy*) oder NOESY (engl.: *nuclear overhauser enhancement spectroscopy*)) erfolgen. Für die Aufnahme eines ¹H-NMR-Spektrum werden typischerweise 10 mM des Nukleotids als Natriumsalz in neutralem D₂O verwendet, wobei DSS als interner Standard verwendet wird. Der pH-Wert der zu untersuchenden Nukleotidlösung kann mit NaOD oder DCI eingestellt werden. Typischerweise werden die Spektren bei 35 bis 40 °C aufgenommen, um eine Überlagerung des restlichen H₂O-Signals mit dem Ribosering zu vermeiden.¹¹⁶ Eine nützliche Referenz für standardmäßige ¹H-chemische Verschiebungen und Kopplungskonstanten von zahlreichen Nukleotiden wurde von Son und Chachaty bereits im Jahre 1977 publiziert, so bspw. für Guanosinnukleotiden, die mit einem *inhouse* erzeugten ¹H-NMR-Spektrum von kommerziell erhältlichem GDP übereinstimmen (Abb. 17).¹¹⁶

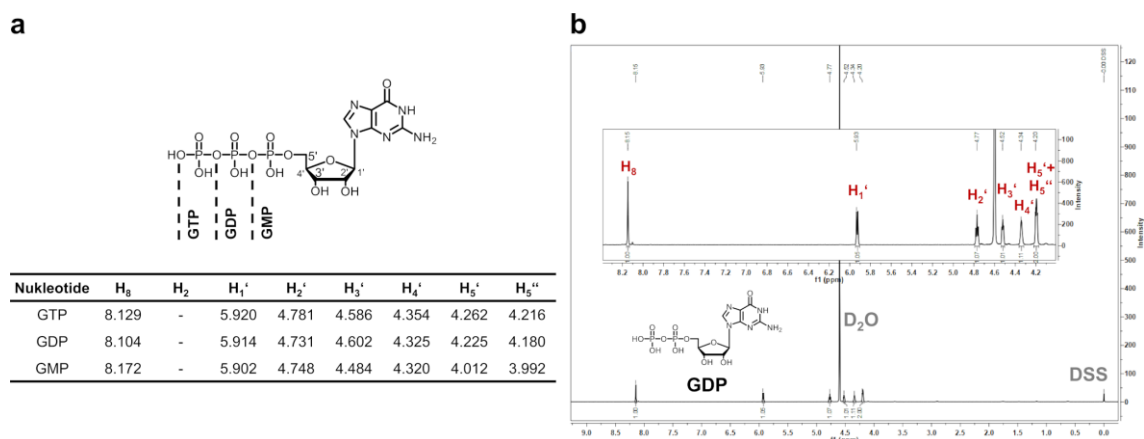


Abbildung 17 | NMR-Untersuchungen von GDP. (a) Chemische Verschiebungen von Guanosinnukleotiden-Protonen nach Son und Chachaty *et al.* (1977); (b) ¹H-NMR-Spektrum von GDP in ddH₂O bei 40 °C. Als Referenz wurde DSS verwendet.

In der Vergangenheit hat sich die Aufnahme von ¹H-NMR-Spektren zudem als ein nützliches Werkzeug zum Verständnis des chemischen Gleichgewichts zwischen 2', 3'-Ethern und Carbamaten des Riboseringes erwiesen. Dabei wurden die Anteile an 2'- und 3'-Isomeren durch Messung der relativen Fläche unter den Resonanzsignalen für H₈, H₁' , H₂' und H₃' bestimmt. Mahmood *et al.* (1987) und Cremonesi *et al.* (1990) konnten anhand von ¹H-NMR-Spektren das in der Literatur beschriebene Isomerenverhältnis sowohl für Riboseester als auch Carbamate bestätigen.^{108, 117}

Um das Isomerenverhältnis der im Rahmen dieser Arbeit synthetisierten 2',3'-Nukleotidanaloga zu charakterisieren wurden nach dem zuvor beschriebenen Protokoll exemplarisch eine Probe von Acetyl-edaGDP (**8d**) vorbereitet und ein ¹H-NMR-Spektrum bei 500 MHz und 40 °C aufgenommen. Um eine eindeutige Zuordnung der Signale für das 2'- und 3'-Isomer zu ermöglichen wurde zudem ein NOESY-Spektrum aufgenommen. Das NOESY-Experiment ermöglicht dabei die Auflösung von koppelnden Protonen, die zwar über viele Bindungen voneinander getrennt sind, sich aber in räumlicher Nähe befinden.¹¹⁸ Mit Hilfe der aufgenommenen NMR-Spektren konnte das Vorliegen von zwei verschiedenen Spezies bestätigt werden, da für jedes Proton zwei spezifische Resonanzsignale beobachtet werden konnten (Abb. 18). Durch Integration der relativen Fläche unter dem Resonanzsignal für H₈ wurde das Isomerenverhältnis bestimmt und auf diese Weise etwa 60 % des 3'-Isomers und 40 % des 2'-Isomers beobachtet. Neben den spezifischen Resonanzsignalen für das Nukleotidgrundgerüst konnten ebenfalls zwei charakteristische Signale für die Acylgruppe der einzelnen Isomeren detektiert werden, die das zuvor bestimmte Isomerenverhältnis bestätigten.

Die charakteristischen Signale für den eda-Linker konnten jedoch nicht eindeutig identifiziert werden, da bei der Aufreinigung der Nukleotide mit dem TEAB-Puffer die entsprechenden TEA-Salze generiert wurden, deren Signale die eda-Signale überlagern. Durch eine anschließende Umwandlung der TEA-Salze in die entsprechenden Na^+ -Salze konnte ebenfalls kein Spektrum erhalten werden, die eine Zuordnung der Signale für den eda-Linker ermöglichten, sodass dieser Ansatz verworfen wurde. In Kombination mit der Aufnahme eines hochaufgelösten Massenspektrums konnte die Identifikation von Acyl-edagDP (**8d**) jedoch eindeutig bestätigt werden. Kürzlich publizierten Huecas *et al.* analoge Spektren für mant-GTP, die mit den hier erhaltenen Ergebnissen übereinstimmen.¹¹⁹

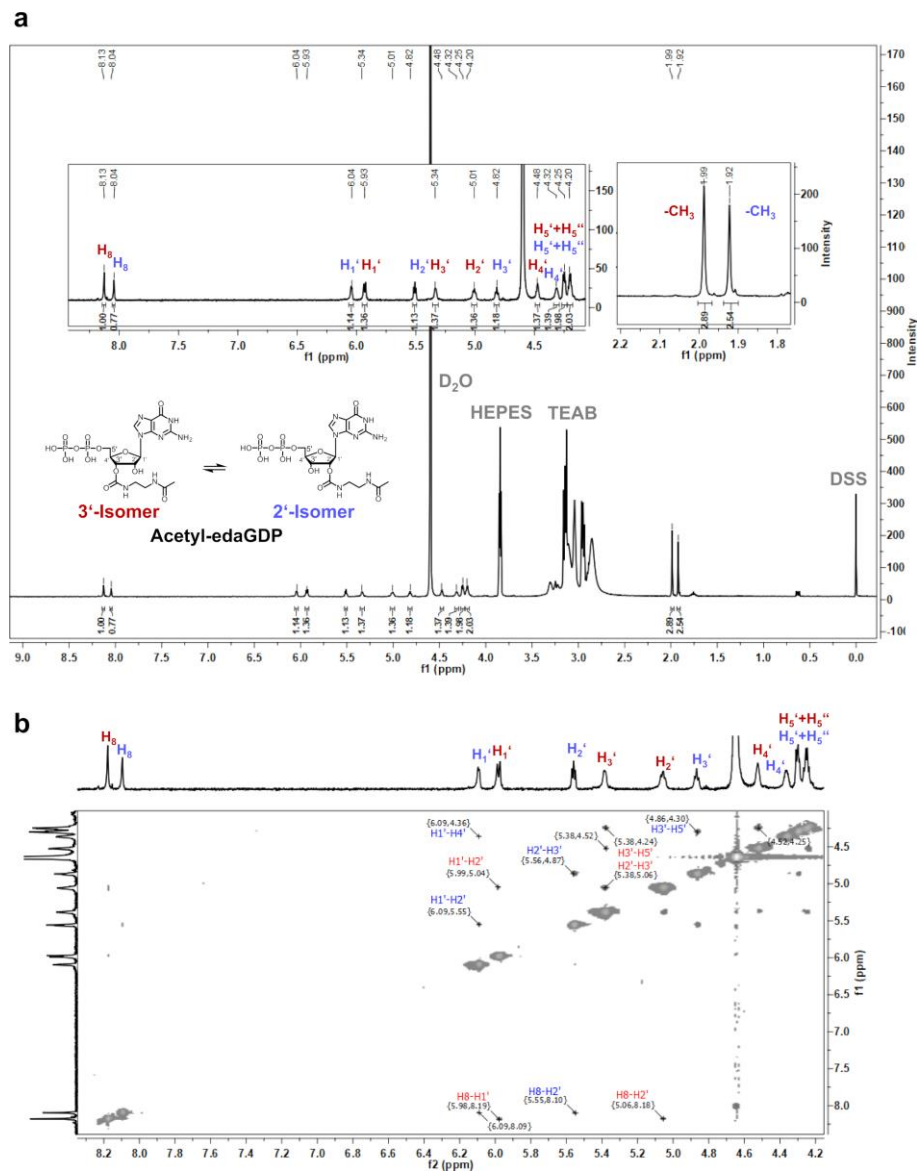


Abbildung 18 | NMR-Untersuchungen von Acetyl-edagDP (8d**).** (a) ^1H -NMR-Spektrum von Acetyl-edagDP aufgenommen bei 500 MHz und 40 °C; (b) NOESY-Spektrum von Acetyl-edagDP aufgenommen bei 500 MHz und 40 °C. Die Signale für das 2'-Isomer sind in blau und für das 3'-Isomer in rot markiert.

3.3 Biochemische Charakterisierung

Nach der erfolgreichen Synthese der geplanten Guanosinnukleotidderivate erfolgte die biochemische Charakterisierung der Verbindungen. Aufgrund der sehr hohen Affinitäten der natürlichen Nukleotide GDP und GTP gegenüber Ras ist eine detaillierte biochemische Evaluierung Nukleotid-kompetitiver Inhibitoren nicht trivial.¹⁵ Jeganathan *et al.* postulierten einen Arbeitsablauf für die Charakterisierung potenzieller Nukleotid-kompetitiver Inhibitoren von Ras-Proteinen.¹⁰³ Demnach ist im Falle von kovalenten Nukleotid-kompetitiven Inhibitoren ebenfalls eine detaillierte Bestimmung der reversiblen Affinitäten der generierten Nukleotidanaloga essentiell, um Verbindungen zu entwickeln, die *in vivo* mit den unmodifizierten Nukleotiden GDP und GTP konkurrieren können.

Im folgenden Kapitel wird die detaillierte biochemische und kinetische Charakterisierung der zuvor generierten Nukleotidanaloga beschrieben. Nachdem die für die biochemische Charakterisierung genutzten verkürzten KRas-Konstrukte erfolgreich exprimiert und aufgereinigt wurden, sollte zunächst das kovalente Bindevverhalten der Nukleotidderivate über massenspektrometrische Untersuchungen untersucht werden. Der Einfluss des eingeführten Linkers sollte anschließend über eine detaillierte kinetische Untersuchung sowie mittels GEF-katalysierten Nukleotidaustausch und GAP-stimulierter GTP-Hydrolyse bestimmt werden.

3.3.1 Proteinexpression und -reinigung der verkürzten KRas-Konstrukte

Die für die biochemische Charakterisierung verwendeten KRas₁₋₁₆₉-Konstrukte, die nicht über die drei Oberflächencysteine C51, C80 und C118 verfügen (*Cys-light*)⁴⁷, wurden zunächst mit dem bereits in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll exprimiert und gereinigt (Abb. 19). Nachfolgend sind die Proteinexpression und -reinigung der verkürzten Konstrukte exemplarisch für KRasG13C₁₋₁₆₉ (*Cys-light*) gezeigt. Die Reinigung vom WT sowie von der G12C-Mutante wurden analog durchgeführt.*

* Durchführung der Expression und Reinigung der KRas₁₋₁₆₉-Konstrukte von Andreas Arndt (technischer Assistent der AG Rauh, TU Dortmund) und B.Sc. Paul Siebers (studentische Hilfskraft der AG Rauh, TU Dortmund).

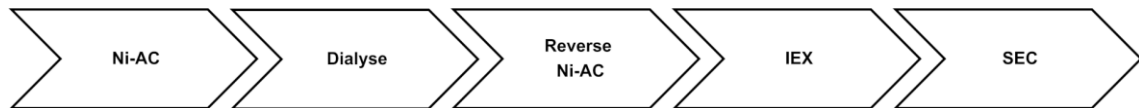


Abbildung 19 | Reinigungsprotokoll für die KRas₁₋₁₆₉-Konstrukte. Nach der Isolierung der KRas-Proteine über eine Nickel-Affinitätschromatographie (Ni-AC) wurde über Nacht eine Dialyse bei zeitgleicher Abspaltung des His₆-tags durch die TEV-Protease durchgeführt. Nach einer zweiten reversen Ni-AC sowie einer Ionenaustauschchromatographie (IEX) wurde eine Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt und das reine Protein bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Nach der erfolgreichen heterologen Expression in BL21 (DE3)-Zellen durch IPTG-vermittelte Induktion wurden die Zielproteine zunächst aus dem geklärten Zelllysate mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie (Ni-AC) isoliert. Die N-terminal mit einem Hexahistidin-tag versehenen Zielproteine interagieren dabei mit den Ni²⁺-Ionen der Säulenmatrix und können durch Anlegen eines linearen Imidazol-Gradienten von der Säule eluiert werden. Die Fraktionen des Eluats wurden mittels SDS-PAGE analysiert, wobei eine Bande für das Zielproteins auf einer Höhe von etwa 21 kDa zu beobachten war (Abb. 20).

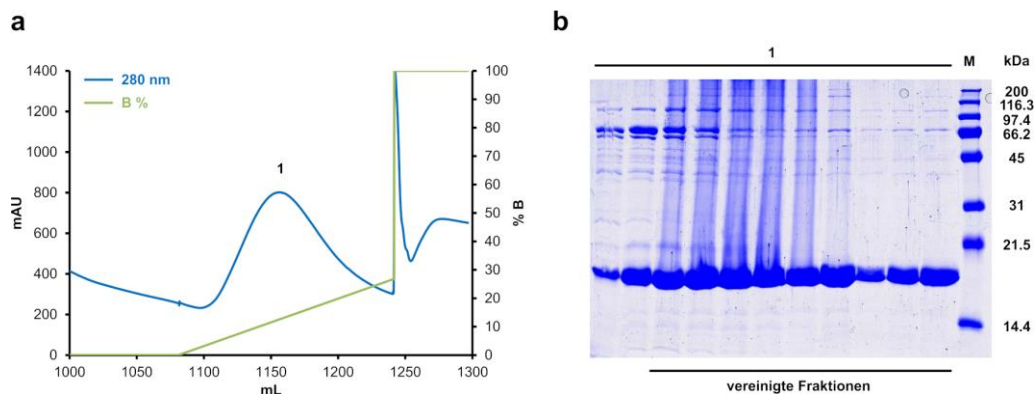


Abbildung 20 | Erste Ni²⁺-Affinitätschromatographie. (a) Chromatogramm der ersten Ni-AC von KRasG13C₁₋₁₆₉ (*Cys-light*) (blau: Absorption bei 280 nm; grün: Anteil des Imidazol-haltigen Elutionspuffers); (b) Analyse der Fraktionen der Ni-AC mittels SDS-PAGE (1: Fraktionen des ersten Eluatpeaks, M: Marker Unstained SDS-PAGE Standards, broad range).

Die Zielprotein-enthaltenen Fraktionen (Eluatpeak 1) wurden vereinigt und zur Abspaltung des His₆-tags über Nacht in Gegenwart von TEV-Protease dialysiert. Eine zweite reverse Ni-AC wurde zur Abtrennung der TEV-Protease sowie des ungeschnittenen Proteins durchgeführt und das geschnittene Protein, konnte erfolgreich im Durchfluss der Säule aufgefangen werden (Abb. 21).

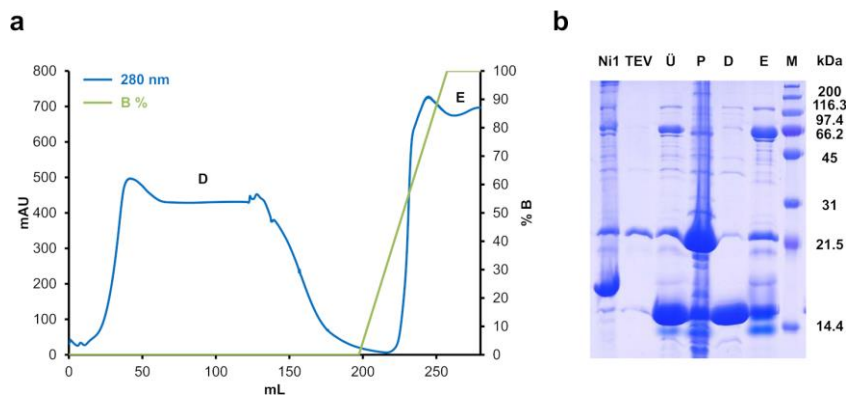


Abbildung 21 | Reverse Ni²⁺-Affinitätschromatographie. (a) Chromatogramm der zweiten reversen Ni-AC von KRasG13C₁₋₁₆₉ (*Cys-light*) (blau: Absorption bei 280 nm; grün: Anteil des Imidazol-haltigen Elutionspuffers); (b) Analyse der Fraktionen der Ni-AC mittels SDS-PAGE (Ni1: vereinigte Eluatfraktionen der ersten Ni-AC, TEV: TEV-Protease, Ü: Überstand, P: Pellet, E: Eluat, M: Marker Unstained SDS-PAGE Standards, broad range).

Mit einer daran anknüpfenden Ionenaustauschchromatographie (IEX) wurden die Proteine weiter gereinigt. Die Elution der Ras-Proteine erfolgte durch einen linearen Gradienten unter Erhöhung der NaCl-Konzentration. Die erhaltenen Fraktionen des ersten Eluatpeaks wurden mittels SDS-PAGE analysiert, wobei eine Anreicherung des Proteins, welches eine Größe von etwa 19 kDa aufweist, zu beobachten war (Abb. 22).

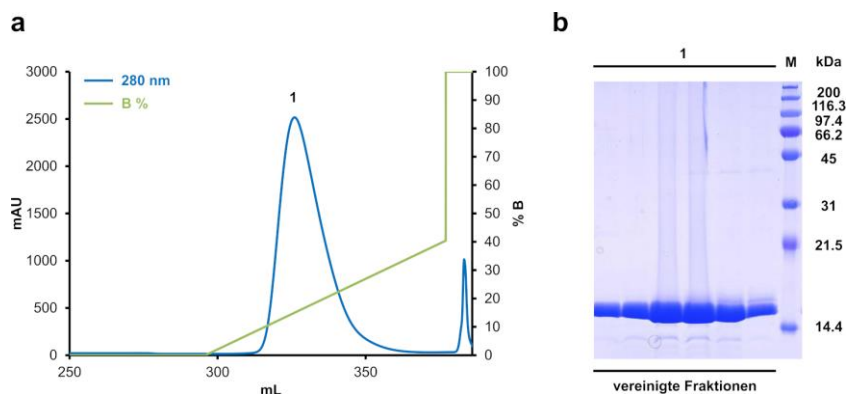


Abbildung 22 | Ionenaustauschchromatographie. (a) Chromatogramm der IEX von KRasG13C₁₋₁₆₉ (*Cys-light*) (blau: Absorption bei 280 nm; grün: Anteil des Elutionspuffers); (b) Analyse der Fraktionen der IEX mittels SDS-PAGE (1: Fraktionen des ersten Eluatpeaks, M: Marker Unstained SDS-PAGE Standards, broad range).

Die Zielprotein-enthaltenen Fraktionen (Eluatpeak 1) wurden vereinigt und abschließend über eine Größenausschlusschromatographie (SEC) der Größe nach aufgetrennt, um verbliebene Verunreinigungen abzutrennen und die Proteine in monomerer Form zu

erhalten. In allen mittels SDS-PAGE analysierten Fraktionen des Eluatpeaks konnte das Zielprotein in hoher Reinheit beobachtet werden (Abb. 23).

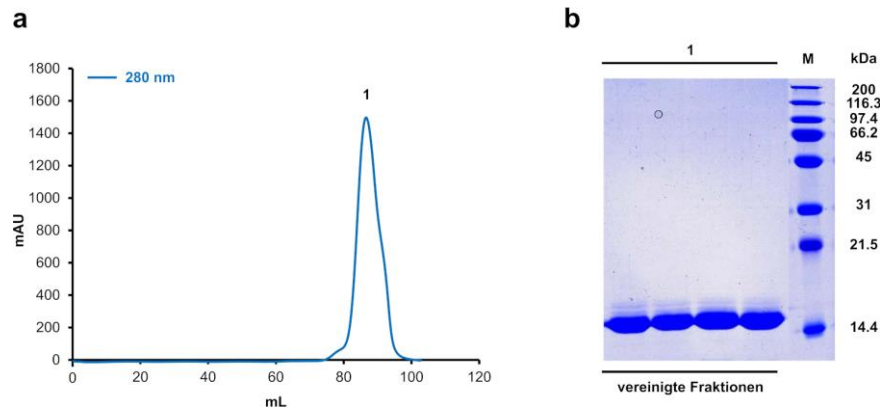


Abbildung 23 | Größenausschlusschromatographie. (a) Chromatogramm der SEC von KRasG13C₁₋₁₆₉ (*Cys-light*) (blau: Absorption bei 280 nm); (b) Analyse der Fraktionen der SEC mittels SDS-PAGE (1: Fraktionen des ersten Eluatpeaks, M: Marker Unstained SDS-PAGE Standards, broad range).

Mithilfe des zuvor etablierten Reinigungsprotokolls konnten alle drei KRas₁₋₁₆₉-Konstrukte erfolgreich über insgesamt vier chromatographische Arbeitsschritte in hoher Reinheit erhalten werden, wobei je nach Konstrukt zwischen 0.5 und 2 mg pro Liter Expressionskultur gewonnen werden konnten. Für eine eindeutige Zuordnung der gereinigten KRas-Proteine wurden zusätzlich Proben mittels ESI-Massenspektrometrie analysiert. Die dekonvolutierten Massenspektren korrelierten dabei mit dem theoretischen Molekulargewicht von KRas Wildtyp sowie der Mutanten (Abb. 24).

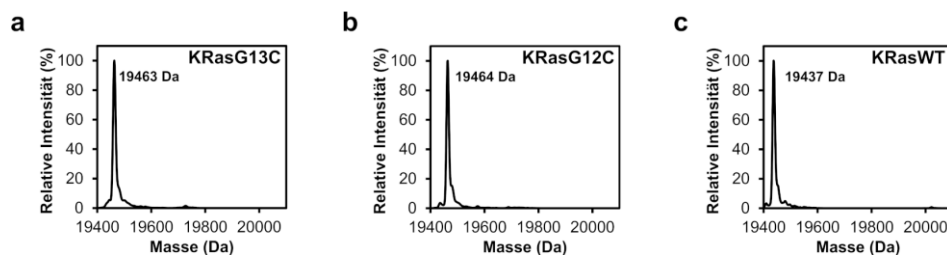


Abbildung 24 | Massenspektren der KRas₁₋₁₆₉-Konstrukte. Massenspektren von (a) KRasG13C₁₋₁₆₉ (*Cys-light*), MW_{berechnet}: 19464 Da; (b) KRasG12C₁₋₁₆₉ (*Cys-light*), MW_{berechnet}: 19464 Da und KRasWT₁₋₁₆₉, MW_{berechnet}: 19440 Da.

Die erfolgreich gereinigten KRas₁₋₁₆₉-Konstrukte konnten anschließend neben Kristallisationsexperimenten (Kapitel 3.4) für die biochemische Charakterisierung der synthetisierten Nukleotidanaloga verwendet werden.

3.3.2 Massenspektrometrische Evaluierung

Die erfolgreich gereinigten KRas₁₋₁₆₉-Konstrukte konnten im Anschluss innerhalb von massenspektrometrischen Untersuchungen für den Nachweis einer irreversiblen Modifikation der Zielproteine durch die zuvor dargestellten Nukleotidanaloga genutzt werden, wobei bei einer erfolgreichen kovalenten Bindung eine Verschiebung des Massenspektrums um die jeweilige Masse der Bindungspartner zu erwarten ist.

Die synthetisierten Acrylamid-Derivate wiesen eine selektive Bindung an KRasG13C auf, wohingegen bei der G12C-Mutante keine kovalente Modifikation beobachtet werden konnte (Abb. 25, Abb. A3).

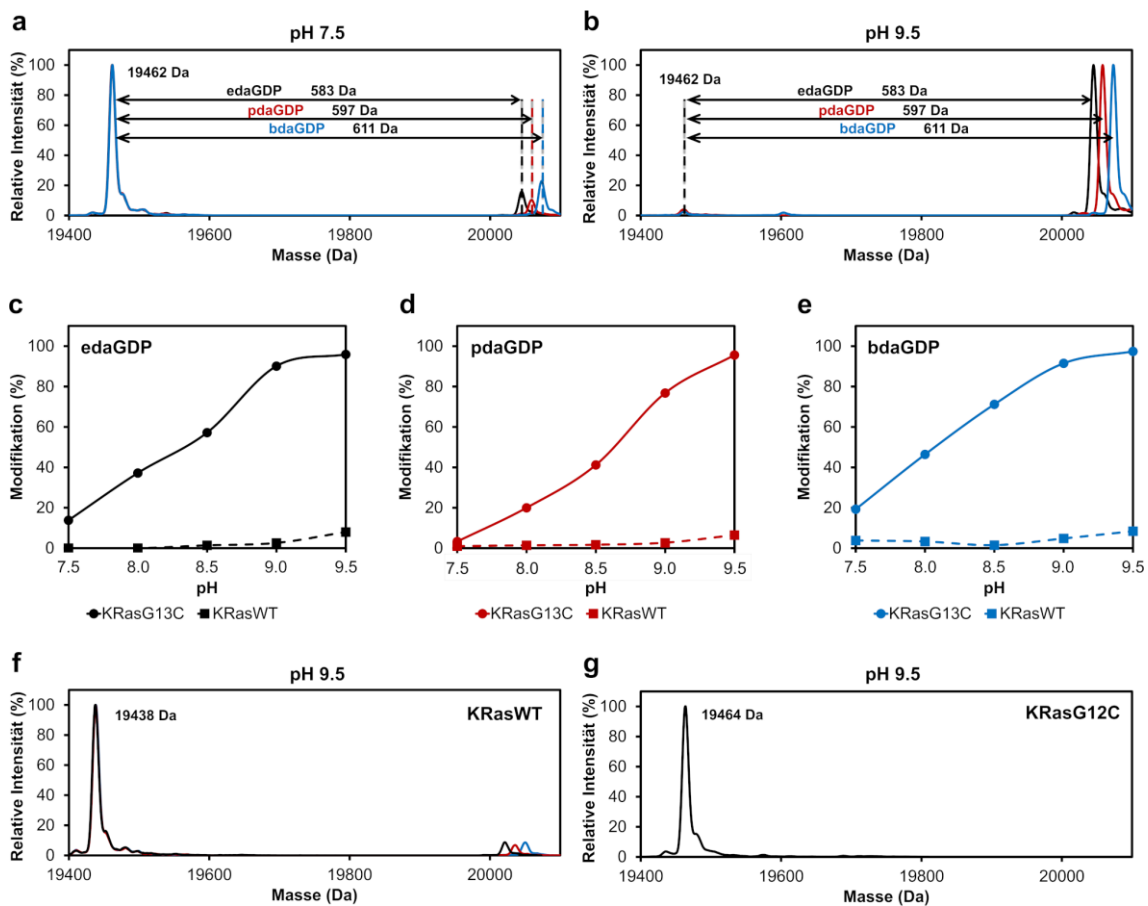


Abbildung 25 | pH-abhängige Evaluierung. (a, b) Massenspektren von KRasG13C₁₋₁₆₉ (*Cys-light*) nach Inkubation mit 10 äq. der Acrylamid-Derivate edaGDP (8a), pdaGDP (8b) und bdaGDP (8c) bei pH 7.5 und pH 9.5 für 24 h bei RT; (c-e) pH-anhängige Modifikation der KRas-Proteine mit edaGDP (schwarz), pdaGDP (rot) und bdaGDP (blau) für 24 h bei RT; (f, g) Massenspektren von KRasWT₁₋₁₆₉ und KRasG12C₁₋₁₆₉ (*Cys-light*) nach Inkubation mit den Acrylamid-Derivaten edaGDP (8a), pdaGDP (8b) und bdaGDP (8c) bei pH 9.5 für 24 h bei RT.

Dabei konnte nach einer 24-stündigen Inkubation der Acrylamid-Derivate (**8a-8c**) mit KRasG13C bei pH 7.5 lediglich eine geringfügige kovalente Modifikation beobachtet werden, die auch durch Erhöhung der Nukleotidäquivalente nicht gesteigert werden konnte (Abb. 25a). Um die Nukleophilie des Cysteins an der Position G13C zu erhöhen und somit die Ausbildung einer kovalenten Bindung der Acrylamid-Derivate zu fördern, wurde daraufhin der pH-Wert schrittweise erhöht. Mit steigendem pH-Wert konnte dabei eine verbesserte kovalente Modifikation von KRasG13C durch die Nukleotidanaloga detektiert werden. Bei einem pH-Wert von 9.5 konnte für alle Nukleotidanaloga eine fast vollständige Modifikation der G13C-Mutante nachgewiesen werden (Abb. 25b-e). Um die Spezifität der Reaktion gegenüber KRasG13C weiter zu untersuchen, wurden zudem massenspektrometrische Untersuchungen mit dem Wildtyp-Protein durchgeführt, welches im Gegensatz zu den zuvor verwendeten *Cys-light* Konstrukten zusätzlich über die oberflächenexponierten Cysteine (C51S/C80L/C118S) verfügt. Für KRasWT wurden nur bei sehr hohen pH-Werten im Bereich von pH 9 bis 9.5 eine geringe unspezifische kovalente Modifikation beobachtet, die jedoch im Vergleich zu der Modifikation von KRasG13C vernachlässigbar ist (Abb. 25c-f). Die generierten Acetamid-Derivate (**8d-8f**) hingegen, welche als Kontrollverbindungen dienten, zeigten weder eine Bindung an die Cystein-Mutanten noch an den Wildtyp (Abb. A4).

Durch eine zeitaufgelöste Analyse der kovalenten Proteinmodifikation konnte zudem gezeigt werden, dass der eda-Linker im Gegensatz zum pda- und bda-Linker eine besonders effiziente Bindungsbildung aufweist, die vermutlich auf eine begünstigte Orientierung des *warheads* und/oder eine reduzierte Flexibilität des Linkers zurückzuführen ist. Dabei lag bereits nach etwa drei Stunden der Großteil des Proteins modifiziert vor, wohingegen die kovalente Modifikation im Falle von pda und bda einem linearen Verlauf folgte (Abb. 26a). Bei Verwendung von dGTP-Analoga war die Rate der kovalenten Proteinmodifikation im Falle des eda-Derivats weiter erhöht, was darauf hindeutet, dass eine Modifikation an der 3'-Position der Ribose begünstigt ist und eine bessere Orientierung des *warheads* zum Cystein an Position 13 erlaubt (Abb. 26a). Bei der Inkubation von KRasG13C mit den GTP-Analoga konnte zudem beobachtet werden, dass die GTP-Derivate nach erfolgter kovalenter Bindung im aktiven Zentrum von Ras zu den entsprechenden GDP-Derivaten hydrolysiert wurden, welches als Beleg für die vollständig native und katalytisch aktive Konformation der gereinigten Proteine (auch bei pH 9.5) über den Inkubationszeitraum gesehen werden kann (Abb. 26b).

Eine zeitaufgelöste Analyse der kovalenten Bindungsbildung entweder mit GDP- oder GTP-Derivaten führte zu vergleichbaren kovalenten Proteinmodifikationsraten (Abb. 26c).

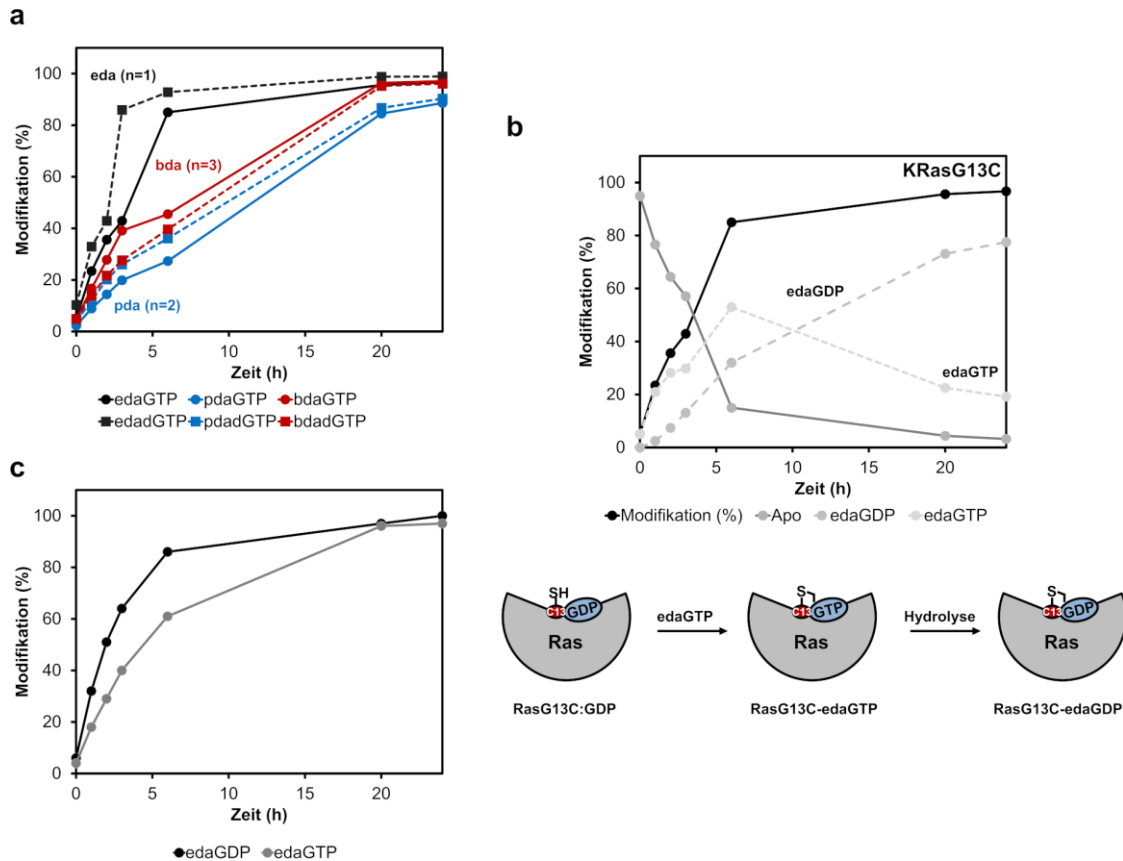


Abbildung 26 | Zeit-abhängige Evaluierung der kovalenten Modifikation von KRasG13C. (a) Zeitaufgelöste kovalente Modifikation von KRasG13C₁₋₁₆₉ (Cys-light) mit den GTP und dGTP Acrylamid-Derivaten; (b) Zeitaufgelöste kovalente Modifikation von KRasG13C₁₋₁₆₉ (Cys-light) nach Inkubation mit Acryl-edaGTP inklusive der schematischen Darstellung der GDP/GTP-Hydrolyse; (c) Vergleich der kovalenten Modifikation von KRasG13C₁₋₁₆₉ (Cys-light) mit Acryl-edaGDP (8a) und Acryl-edaGTP (8g).

3.3.3 Kinetische Charakterisierung

Für die nachfolgende kinetische Charakterisierung der erfolgreich synthetisierten Nukleotidanaloga und der Bestimmung des Einflusses der Linker an der 2',3'-Position der Ribose wurden die reversiblen Affinitäten der Nukleotidanaloga gegenüber KRasWT im Vergleich zu unmodifiziertem GDP/GTP bestimmt. Ein Maß für die Affinität, mit der der Ligand an das Protein bindet, ist die sogenannte Dissoziationskonstante (K_D), die sich aus dem Quotienten der Assoziations- und der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante

(k_{on} und k_{off}) zusammensetzt. Je höher die Affinität eines Proteins zu einem Liganden ist, desto niedriger ist die entsprechende Dissoziationskonstante (Abb. 27).¹²⁰ Die Bindungsaffinität wird durch nichtkovalente intermolekulare Wechselwirkungen, darunter Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische und hydrophobe Interaktionen sowie Van-der-Waals-Kräfte beeinflusst.

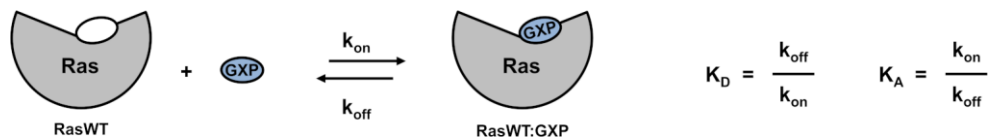


Abbildung 27 | Schematische Darstellung der reversiblen Protein-Liganden-Bindungsaffinität. Ein Maß für die Bindungsaffinität, mit der ein Ligand an das Protein bindet, ist die Dissoziationskonstante (K_D), die sich aus den Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation (k_{on}) und Dissoziation (k_{off}) zusammensetzt. Der Kehrwert von K_D wird als Assoziationskonstante (K_A) bezeichnet.

Die natürlichen Nukleotide GDP und GTP weisen Dissoziationskonstanten im pikomolaren Bereich gegenüber GTPasen auf, weshalb eine detaillierte kinetische Untersuchung bei der Entwicklung von Nukleotid-kompetitiven Inhibitoren essentiell ist.^{54-55, 103}

3.3.3.1 Bestimmung der Nukleotidassoziation

Die Bestimmung der Kinetik der Nukleotidassoziation (k_{on}), welche innerhalb weniger Sekunden vollständig abläuft, erfolgte unter Verwendung der *stopped-flow* Methode, die eine schnelle Vermengung der beiden Interaktionspartner bei der gleichzeitigen Aufnahme des Fluoreszenzsignals ermöglicht.⁵⁴

Für die Assoziation wurden zunächst 1 μM nukleotidfreies KRas* mit 2 μM mantdGDP gemischt, gefolgt von Konkurrenzexperimenten zwischen mantdGDP (2 μM) und zunehmenden Mengen konkurrierender Nukleotide (1, 2 und 6 μM), um die Assoziation der synthetisierten Nukleotidanaloga zu bestimmen. Die kompetitive Bindung zwischen mantdGDP und GDP führte dabei zu einer signifikanten Abnahme des Fluoreszenzsignals, da geringere Mengen mantdGDP durch die Konkurrenz mit dem nicht fluoreszenzmarkierten konkurrierenden Nukleotid an KRas binden können

* Bereitstellung von nukleotidfreiem KRas durch Nathalie Bleimling (AG Goody, MPI Dortmund).

(Abb. 28a). Aus der zeitabhängigen Änderung der detektierten Fluoreszenz konnte durch Anpassung der Daten an ein zuvor beschriebenes Modell,¹⁵ bei dem sich nukleotidfreies KRas in einem Gleichgewicht zwischen einem bindungskompetenten und einem nicht-kompetenten Zustand aufgrund der Instabilität von KRas in Abwesenheit von Nukleotiden befindet, die entsprechenden Assoziationskonstanten für GDP und analog für die synthetisierten Nukleotidanaloga bestimmt werden (Abb. 28, Tab. 2).

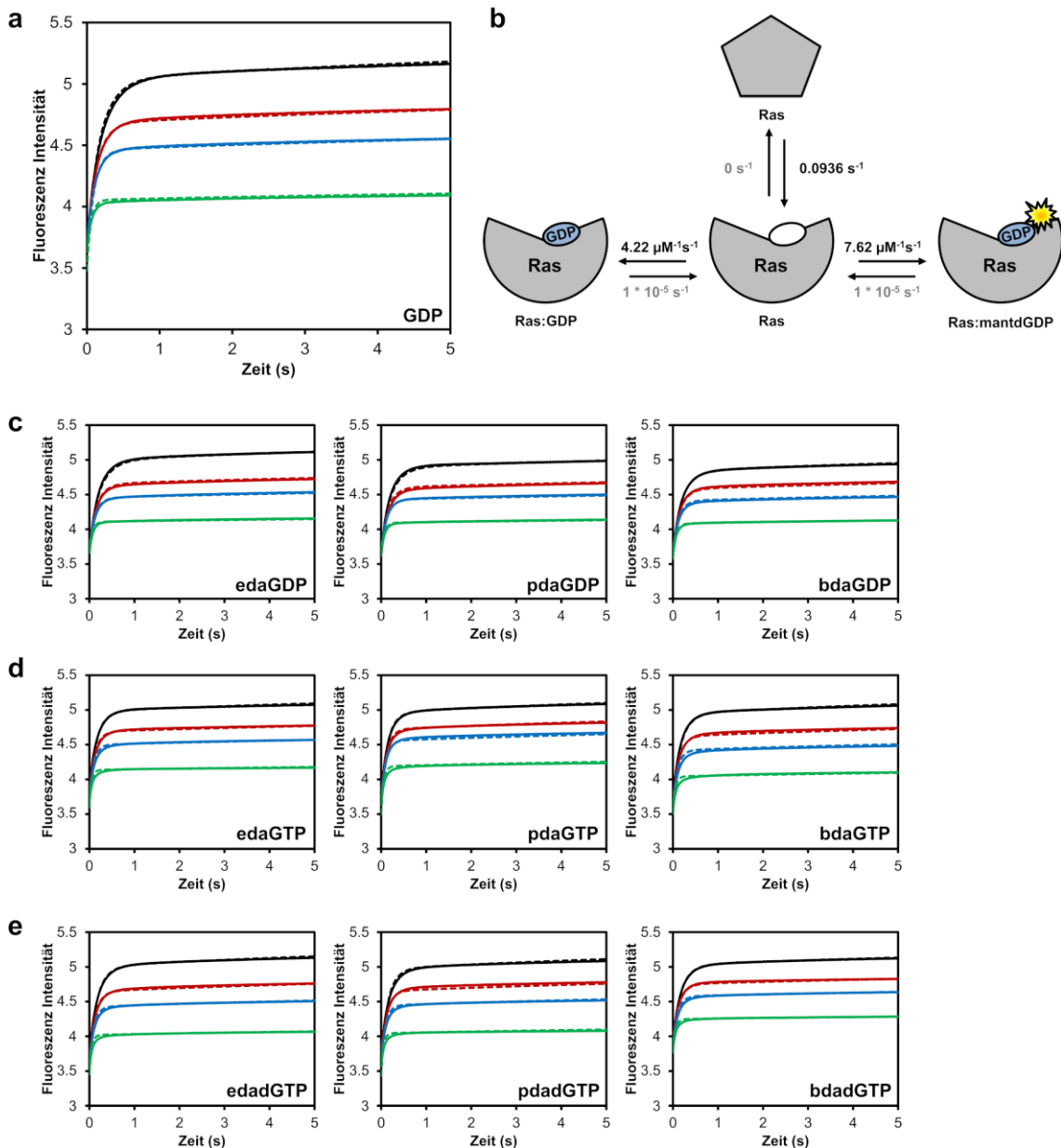


Abbildung 28 | Kinetik der Nukleotidassoziation (k_{on}). (a) Kompetitive Bindungsexperimente von GDP und mantdGDP; 1 μM KRas und 2 μM mantdGDP wurden in Abwesenheit (schwarze Kurve) oder in Anwesenheit von 1 μM (rot), 2 μM (blau) oder 6 μM (grün) konkurrierender Nukleotide in einem *stopped-flow*-Instrument verwendet; (b) Die Bindungskurven wurden mit KinTek Explorer global an das dargestellte Modell angepasst, um die entsprechenden Assoziationsraten (k_{on}) zu erhalten; (c, d, e) Kompetitive Bindungsexperimente zwischen mantdGDP und den GDP-, GTP- und dGTP-Analoga.

Die Assoziationskonstanten für die synthetisierten Nukleotidanaloga sind dabei vergleichbar mit denen der unmodifizierten Nukleotide, sodass geschlossen werden kann, dass der an Position 2',3' vorhandene Linker keinen Einfluss auf die Assoziation der Nukleotidderivate hat, welches bei der Entwicklung Nukleotid-kompetitiver Inhibitoren berücksichtigt werden muss.

Tabelle 2 | Übersicht der mittels *stopped-flow* Spektroskopie ermittelten k_{on} -Werte.

	Nukleotid	eda	pda	bda	
k_{on} [$\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]	GDP	4.22	3.73	3.34	3.12
	GTP	5.23	4.39	3.36	4.21
	dGTP	-	4.51	4.38	4.06

3.3.3.2 Bestimmung der relativen Proteinaffinitäten

Um die konkurrierende Bindung der modifizierten Nukleotide mit GDP/GTP weiter zu analysieren, wurden zudem die relativen Affinitäten der Nukleotidanaloga gegenüber RasWT mit einem HPLC-basierten Assay untersucht.

Dabei wurde KRasWT:GDP mit gleichen Mengen edaGDP, pdaGDP oder bdaGDP gemischt und entweder für sieben Tage bei Raumtemperatur in Abwesenheit von EDTA, für 24 Stunden bei 4 °C in Gegenwart von 10 mM EDTA oder aber für eine Stunde bei Raumtemperatur in Gegenwart von katalytischen Mengen SOS inkubiert, um die Rate des Nukleotidaustauschs zu erhöhen. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten wurden die ungebundenen Nukleotide durch einen Pufferaustausch entfernt und der Nukleotidzustand der Ras-Proteine durch isokratische HPLC-Läufe analysiert (Abb. 29). Durch die Integration der Flächen unter den entsprechenden Signalen für GDP und den entsprechenden Signalen für die Nukleotidanaloga nach verschiedenen Zeitpunkten wurde das relative Verhältnis der gebundenen Nukleotide der Ras-Proteine bestimmt. Sowohl in Abwesenheit von EDTA als auch in Anwesenheit von EDTA oder SOS konnten signifikante Mengen GDP durch die Nukleotidanaloga in der Bindungstasche von Ras verdrängt werden und es wurden nahezu 1:1 Verhältnisse von GDP- bzw. Nukleotidanaloga-gebundenem Zustand beobachtet. Die synthetisierten Nukleotidderivate weisen demnach ähnliche relative Affinitäten im Vergleich zu GDP auf.

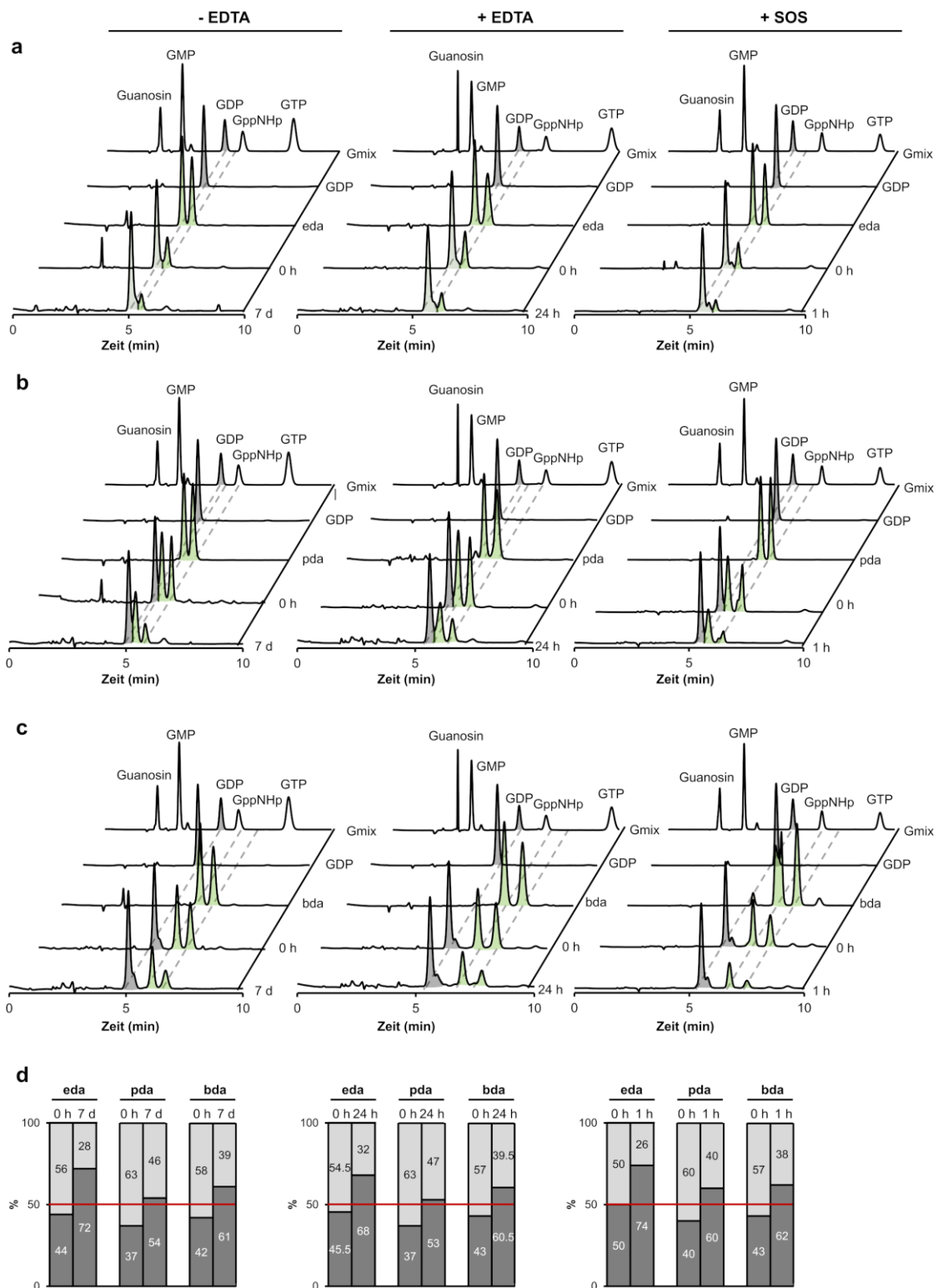


Abbildung 29 | HPLC-basierter Assay zur Bestimmung der relativen Affinitäten. (a, b, c) Konkurrenzexperimente mit GDP und den Acetamid-Derivaten der Nucleotidanaloga (8d-8f); 50 μ M KRasWT:GDP wurden mit 50 μ M edaGDP, pdaGDP oder bdaGDP gemischt und in Abwesenheit von EDTA für 7 d bei RT, in Gegenwart von 10 mM EDTA für 24 h bei 4 °C oder in Anwesenheit 0.5 μ M SOS für 1 h bei RT inkubiert. Nach erfolgtem Pufferaustausch wurden die resultierenden Mischungen durch isokratische HPLC-Läufe analysiert; (d) Die durch das Ras-Protein gebundenen Nucleotide wurden mittels der HPLC-Analyse quantifiziert und die relativen Mengen nach der Entfernung der überschüssigen ungebundenen Nucleotide aufgetragen.

Anhand der mit dem HPLC-Assay ermittelten prozentualen Verteilung konnten im Anschluss die relativen Assoziationskonstanten (K_{relA}) für pdaGDP und bdaGDP berechnet werden. Die Überlagerung des GDP-Signals verhinderte hingegen eine exakte Bestimmung der relativen Assoziationskonstante für edaGDP. Eine ausführliche Berechnung der nachfolgend genannten Größen ist im Anhang aufgeführt (Kapitel 7.5).^{*} Für pdaGDP und bdaGDP wurden K_{relA} -Werte von 0.30 ± 0.04 bzw. 0.26 ± 0.01 relativ zu GDP ermittelt. Mit Hilfe des von Jeganathan *et al.* beschriebenen K_D -Werts für GDP von 2.5 pM konnten schließlich nach Bestimmung der K_A -Werte die entsprechenden Dissoziationskonstanten berechnet werden (Tab. 3).¹⁰³ Die k_{off} -Werte, welche unter Berücksichtigung der mittels *stopped-flow* Spektroskopie ermittelten k_{on} -Werte berechnet werden konnten, liegen analog zu GDP in der Größenordnung von $10^{-5} s^{-1}$ (Tab. 2, Tab. 3). Sowohl für pdaGDP als auch bdaGDP wurden K_D -Werte im einstelligen pikomolaren Bereich berechnet, die mit dem Referenzwert von GDP vergleichbar sind. Der angeheftete Linker hat somit keine oder nur einen geringen Einfluss auf die Interaktion und die reversible Affinität der synthetisierten Nukleotidanaloga. Im Vergleich dazu weist das am β -Phosphat modifizierte SML-8-73-1¹³ aufgrund fehlender essentieller Wechselwirkungen mit dem Protein und dem Mg^{2+} -Ion einen K_D -Wert von 0.14 μM auf.

Tabelle 3 | Übersicht der berechneten kinetischen Parameter (K_D , k_{on} und k_{off}) von pdaGDP und bdaGDP. Als Referenz sind ebenfalls die K_D -Werte von GDP sowie dem Nukleotidanalogen SML-8-73-1 aufgeführt.^{15, 103}

	K_D [pM]	k_{on} [$\mu M^{-1}s^{-1}$]	k_{off} [s^{-1}]
GDP	2.5	4.22	1.1×10^{-5}
pdaGDP	8.6 ± 1.3	3.34	2.9×10^{-5}
bdaGDP	9.6 ± 0.5	3.12	3.0×10^{-5}
SML-8-73-1	140000	-	-

^{*} Die Berechnung der Dissoziationskonstanten erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Roger S. Goody (MPI Dortmund) sowie Dr. Matthias P. Müller (Akademischer Rat, AG Rauh, TU Dortmund).

3.3.4 GEF-katalysierter Nukleotidaustausch

Anhand massenspektrometrischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die synthetisierten Acrylamid-Derivate der Nukleotidanaloga in der Lage sind über den Michael-Akzeptor irreversibel an KRasG13C zu binden. Im Folgenden sollte überprüft werden, ob die kovalente Bindung das Ras-Protein im entsprechenden Nukleotidzustand festsetzt oder ob trotz der kovalenten Bindung weiterhin ein Austausch des Nukleotids möglich ist und ein weiteres Nukleotid nicht-kovalent im aktiven Zentrum binden kann.

Hierfür wurden 5 μM der KRas-Proteine zunächst mit 10 μM mantdGDP gemischt und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen von SOS* (0.25 μM und 0.5 μM) versetzt. Die Änderung der Fluoreszenzintensität ermöglichte anschließend über den gebundenen Nukleotidzustand der Ras-Proteine Rückschlüsse auf den GEF-katalysierten Nukleotidaustausch (Abb. 30). Im Fall von KRasWT und KRasG13C-edaGDP führte die Vorinkubation von KRas mit mantdGDP zu einem annähernd stabilen Fluoreszenzsignal. Im Gegensatz dazu wurde für G13C-Mutante im GDP-gebundenen Zustand auch in Abwesenheit von SOS ein signifikanter zeitabhängiger Anstieg des Fluoreszenzsignals beobachtet, was auf eine drastisch erhöhte intrinsische Nukleotid-Austauschrate zurückzuführen ist. Dieser Effekt, welcher ebenfalls bei KRasG13C:acetyledaGDP beobachtet werden konnte, wurde bereits von Hunter *et al.* für die G13D-Mutante beschrieben und trägt vermutlich zur Verschiebung der relativen Abundanz des inaktiven GDP-gebundenen und des aktiven GTP-gebundenen Zustands zugunsten der aktiven Form und somit zu einer gesteigerten Signalweiterleitung und dem onkogenen Effekt dieser Mutanten bei (Abb. 30c und e).⁵¹ Nach der Zugabe von SOS konkurrieren die zuvor gebundenen Nukleotide und das zugegebene fluoreszierende mantdGDP um die Bindungsstelle, und es konnte sowohl für KRasWT als auch für KRasG13C und KRasG13C:acetyledaGDP ein konzentrationsabhängiger Nukleotidaustausch über eine Erhöhung der Fluoreszenzintensität beobachtet werden (Abb. 30a,b und e). Im Falle der kovalent modifizierten G13C-Mutante hingegen konnte kein SOS-katalysierter Nukleotidaustausch festgestellt werden (Abb. 30c).

KRasG13C-edaGDP ist somit aufgrund der kovalenten Bindung im inaktiven Zustand gefangen und eine onkogene KRasG13C-Signalweiterleitung wäre somit durch die kovalente Bindung vermutlich gehemmt.

* Bereitstellung von SOS durch Nathalie Bleimling (AG Goody, MPI Dortmund).

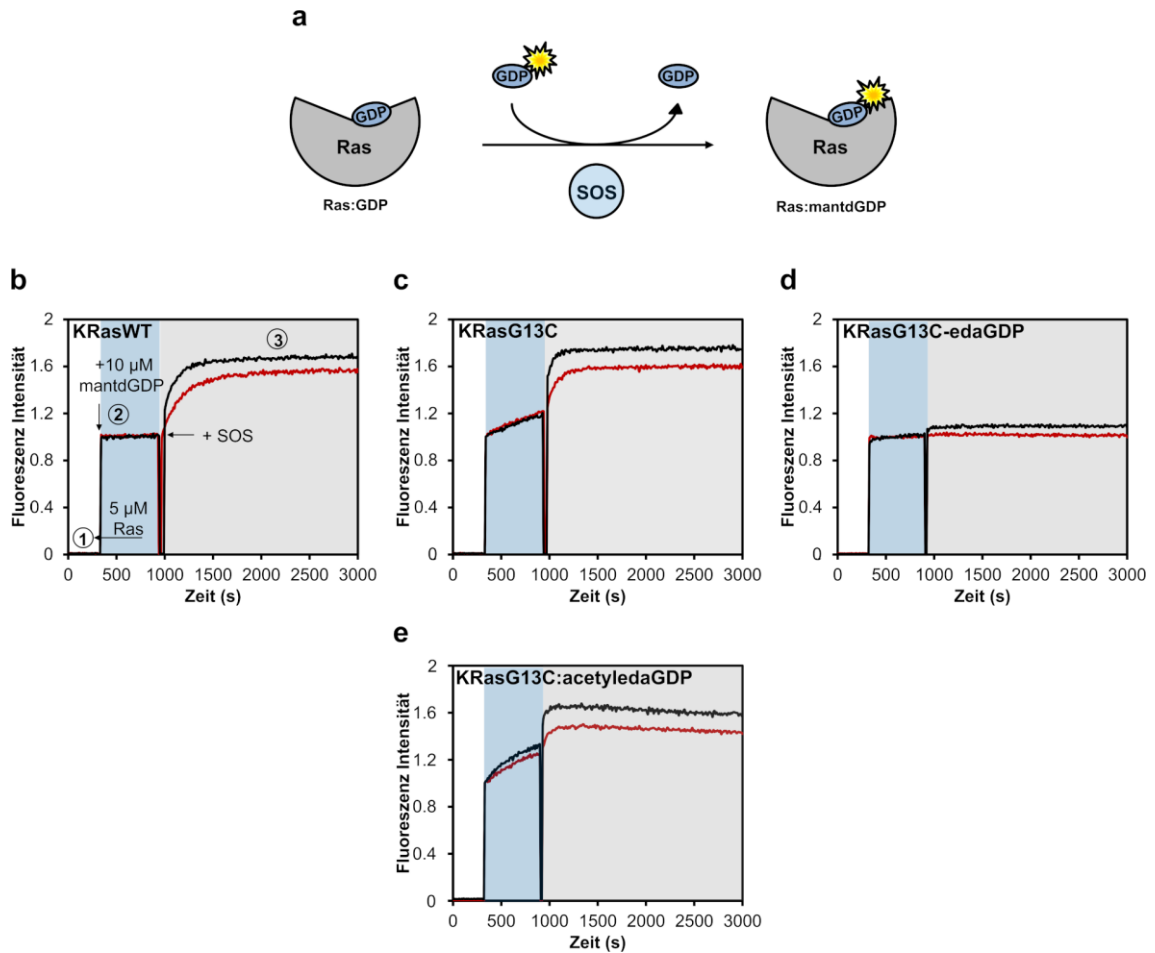


Abbildung 30 | GEF-katalysierter Nukleotidaustausch-Assay. (a) Schematische Darstellung des GEF-katalysierten Nukleotidaustausch-Assays; **(b, c, d, e)** SOS-katalysierter Nukleotidaustausch von KRasWT:GDP, KRasG13C:GDP, KRasG13C-edaGDP und KRasG13C:acetyledaGDP (Schritt 1), die mit einem Überschuss an mantdGDP (Schritt 2, blau hinterlegt) und anschließend mit 0.25 μM (rote Kurve) oder 0.5 μM (schwarz) SOS (Schritt 3, grau hinterlegt) versetzt wurden.

3.3.5 GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse

Da zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden konnte, ob die GDP-Derivate bei der Zellaufnahme phosphoryliert werden und so eine Aktivierung des Signalwegs bewirken, wurde die GTP-Hydrolyse von kovalent modifiziertem KRasG13C-edaGTP und vergleichend von KRasWT:GTP als Kontrolle untersucht.

Für die Charakterisierung der GAP-stimulierten GTP-Hydrolyse wurde KRasG13C₁₋₁₆₉ zunächst mit einem zehnfachen Überschuss an AcryledaGTP (**8g**) bei pH 9.5 kovalent modifiziert. Die kovalente Proteinmodifikation erfolgte dabei in Gegenwart von 50 mM EDTA, um die intrinsische GTP-Hydrolyse weitestmöglich zu unterdrücken (Abb. A5). Im Falle von KRasWT₁₋₁₆₉ wurde hingegen ein Nukleotidaustausch mit GTP bei pH 7.5 in Gegenwart von 50 mM EDTA durchgeführt (Abb. A6). Um nicht gebundenes Nukleotid zu entfernen wurden die Ras-Proteine anschließend unter Verwendung von Zentrifugalfiltereinheiten gewaschen. Die GTP-Hydrolyse wurde anschließend durch Zugabe von 2 mM MgCl₂ in Abwesenheit oder Anwesenheit von Ras-GAP* gestartet. Zu bestimmten Zeitpunkten (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten) wurden Proben entnommen und der Nukleotidzustand der Ras-Proteine durch isokratische HPLC-Läufe (KRasWT:GTP) bzw. massenspektrometrische Analysen (KRasG13C₁₋₁₆₉-edaGTP) und Integration der Fläche unter den entsprechenden GTP- und GDP-Signalen bestimmt (Abb. 31).

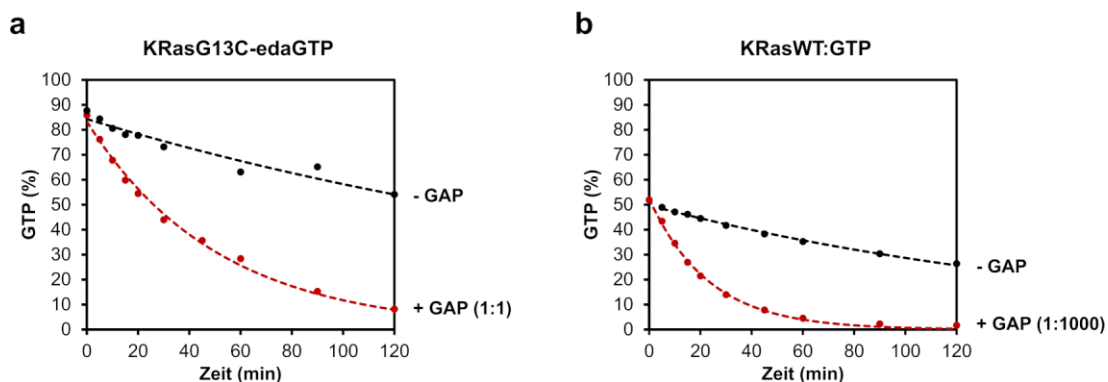


Abbildung 31 | GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse (a) Die intrinsische (schwarz) und die GAP-stimulierte (rot) GTP-Hydrolyse von KRasG13C-edaGTP wurde mittels ESI-MS bestimmt. (b) Die intrinsische (schwarz) und die GAP-stimulierte (rot) GTP-Hydrolyse von KRasWT:GTP wurde mittels HPLC gemessen. Während die GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse für KRasWT:GTP bereits bei katalytischen Mengen an GAP (GAP:Ras 1:1000, [GAP] = 0.005 μ M) beobachtet werden konnte, setzte diese im Fall von KRasG13C-edaGTP erst bei höhere Mengen an GAP (GAP:Ras 1:1, [GAP] = 50 μ M) ein.

* Bereitstellung von GAP durch Dr. Amrita Rai (AG Goody, MPI Dortmund).

Durch die Auftragung der relativen Mengen von GTP (%) in Abhängigkeit von der Zeit konnten im Anschluss mit Hilfe von Origin die Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) für KRasG13C-edaGTP sowie KRasWT:GTP bestimmt werden (Tab. 4).

Tabelle 4 | Übersicht über die ermittelten Halbwertszeiten ($t_{1/2}$) der intrinsischen sowie GAP-stimulierten GTP-Hydrolyse von KRasG13C-edaGTP und KRasWT:GTP. Als Referenz ist ebenfalls die intrinsische Halbwertszeit der GTP-Hydrolyse von KRasG12C aufgeführt.¹²¹

		- GAP	+ GAP
$t_{1/2}$ [min]	KRasG13C	187	35
	KRasWT	126	16
	KRasG12C	300	-

Die intrinsische GTP-Hydrolyse von KRasG13C-edaGTP ($t_{1/2} = 187$ min) ist dabei vergleichbar mit der von KRasWT:GTP ($t_{1/2} = 126$ min) und sogar schneller als bei der KRasG12C-Mutante ($t_{1/2} = 300$ min).¹²¹ Die meisten KRasG12- und G13-Mutationen verhindern jedoch, dass das katalytische Arginin der GAPs die GTP-Hydrolyse verstärkt.⁴⁹ Während die GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse für KRasWT:GTP bereits bei katalytischen GAP-Konzentrationen (GAP 1:1000, $t_{1/2} = 16$ min) zu beobachten ist, werden für KRasG13C-edaGTP höhere GAP-Mengen (GAP 1:1, $t_{1/2} = 35$ min) benötigt, welches vermutlich auf die nicht richtige Ausrichtung des Argininfingers von Ras-GAP aufgrund der vorliegenden Mutation zurückzuführen ist (Abb. 32a). Li *et al.* berichteten jedoch kürzlich, dass die GTPase-Aktivität von mutiertem G12- und G13-mutierten KRas-Proteinen durch Argininfinger-unabhängige GAPs verstärkt werden können. Ein Beispiel dafür ist RGS3, von dem man bisher annahm, dass es nur die GTP-Hydrolyse von heterotrimeren G-Proteinen stimuliert.¹²¹ Basierend auf der Alphafold-Struktur von RGS3,¹²²⁻¹²³ der $G\alpha 1$ -RGS3-Komplexstruktur (PDB: 1agr)¹²⁴ sowie der Kristallstruktur des Ras-RasGAP-Komplexes (PDB: 1wq1)⁴⁹ wurde daher ein Model des Ras-RGS3-Komplexes erstellt,* aus dem ersichtlich wird, dass der katalytische Asparaginrest, der vermutlich die GAP-Aktivität von RGS3 vermittelt, vom P-loop weg orientiert ist und somit möglicherweise weniger durch Mutationen an Position 12 und 13 in Ras behindert wird (Abb. 32b).¹²¹

* Modellierung des Ras-RGS3-Komplexes von Dr. Matthias P. Müller (Akademischer Rat, AG Rauh, TU Dortmund).

Der elektrophile Linker der generierten Nukleotidanaloga, welcher an der 2',3'-Position der Ribose für eine kovalente Modifikation von KRasG13C eingebracht wurde, führt nach diesem Modell ebenfalls zu einem sterischen Konflikt mit dem katalytischen Argininfinger von Ras:GAP, welches die drastisch höheren benötigten GAP-Mengen erklären würde. In Gegenwart von RGS3 hingegen hat der Linker vermutlich keinen negativen Einfluss auf die korrekte Positionierung des katalytischen Asparaginrests und somit auf die GAP-vermittelte GTP-Hydrolyse (Abb. 32c).

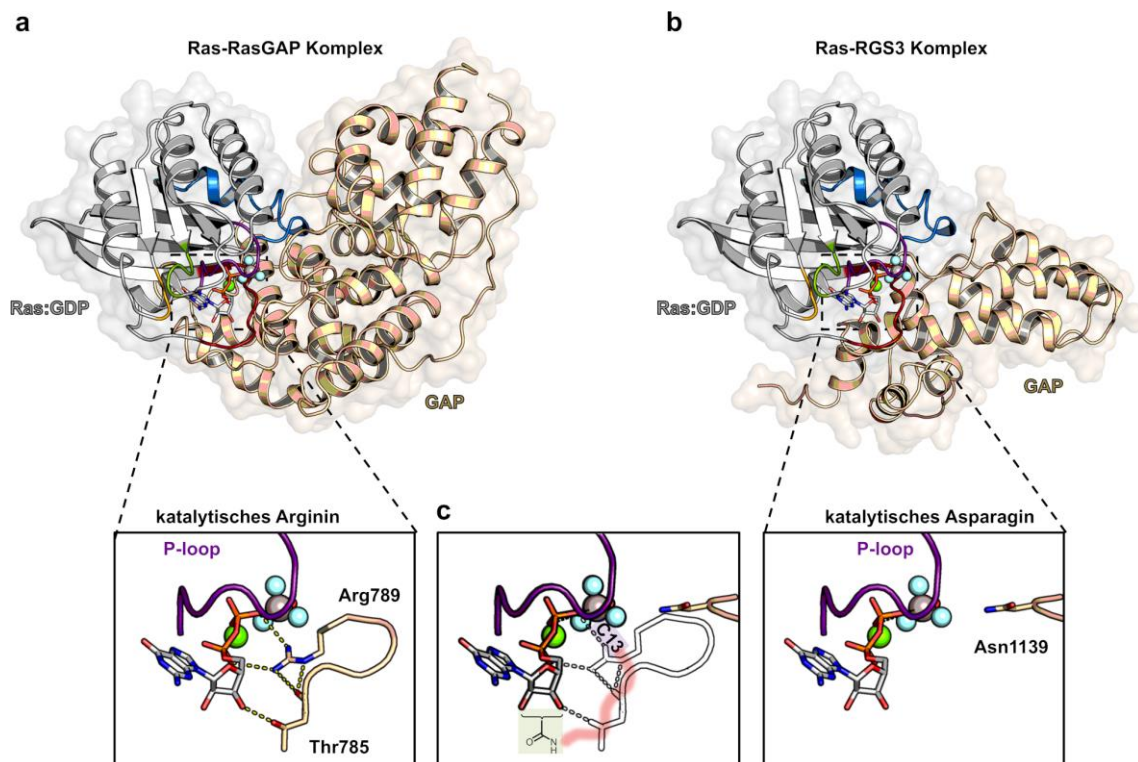


Abbildung 32 | Ras-RasGAP Komplex (a) Kristallstruktur des Ras-RasGAP Komplexes (PDB: 1wq1). Neben dem katalytischen Argininfinger wechselwirkt ebenfalls der in unmittelbarer Nähe befindliche Threoninrest mit der 3'-OH-Gruppe der Ribose, welches ebenfalls die fehlende GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse erklären könnte; (b) Modellierung des Ras-RGS3-Komplexes basierend auf der Alphafold-Struktur von RGS3, der G α 1-RGS3-Komplexstruktur (PDB: 1agr) sowie der Kristallstruktur des Ras-RasGAP-Komplexes (PDB: 1wq1); (c) Strukturelle Überlagerung der Nukleotidbindetasche von Ras-RasGAP (PDB: 1wq1) und des modellierten Ras-RGS3 Komplexes.

Zusammenfassend konnte jedoch gezeigt werden, dass KRasG13C nach einer kovalenten Modifikation mit den generierten Nukleosiddiphosphaten im inaktiven Zustand verbleibt, und selbst bei Reaktion von KRas mit Nukleosidtriphosphat innerhalb der Zelle das Protein durch die intrinsische GTP-Hydrolyse und möglicherweise in geringerem Maße durch die von GAPs wie RGS3 katalysierte Hydrolyse inaktiviert wird.

3.4 Strukturbiologische Untersuchungen

Die Strukturaufklärung klinisch relevanter Zielproteine mittels Röntgenkristallographie ermöglicht neben der Auflösung der dreidimensionalen Struktur der Proteine die Aufklärung essentieller Wechselwirkungen zwischen Protein und Ligand und ist daher ein wichtiges Werkzeug der medizinischen Chemie. Die gewonnenen strukturellen Informationen über das Vorhandensein adressierbarer Bindetaschen oder im Falle von Ko-Kristallstrukturen über die Bindemodi von Liganden, ermöglichen dabei die rationale Entwicklung neuer Liganden mit optimierten Bindungseigenschaften.¹²⁵

Im folgenden Kapitel wird die Etablierung eines robusten Kristallisationssystems für die onkogene KRasG13C Mutante beschrieben, wobei das bereits in Kapitel 3.3.1 erwähnte verkürzte Kristallisationskonstrukt KRasG13C₁₋₁₆₉, das nicht über die drei Oberflächencysteine C51, C80 und C118 (*Cys-light*) verfügt, verwendet wurde.

3.4.1 Probenvorbereitung für die Kristallisation

Da aus den zuvor gezeigten massenspektrometrischen Experimenten ersichtlich wurde, dass erst ab einen pH-Wert von 9.5 eine fast vollständige Modifikation von KRasG13C erzielt werden konnte, wurde das Protein für die Kristallisationsansätze zunächst mit einem zehnfachen Überschuss der Acryl-tragenden Nukleotidderivate für 24 Stunden bei Raumtemperatur und pH 9.5 inkubiert, wobei der Nukleotidaustausch in Gegenwart von EDTA begünstigt wurde (Abb. 25). Die kovalente Modifikation des Proteins wurde mittels ESI-MS überwacht und nach 24 Stunden wurde der Nukleotidaustausch durch Zugabe von Magnesiumchlorid beendet. Um überschüssige, nicht gebundene Nukleotide zu entfernen und zudem das Protein in den finalen Kristallisationspuffer zu überführen, wurde anschließend eine Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt (Abb. 33a,b). Die vereinten und konzentrierten Fraktionen wurden hinsichtlich einer erfolgreichen kovalenten Proteinmodifikation mittels ESI-MS überprüft, wobei für alle drei Linkerlängen eine fast vollständige Modifikation von KRasG13C beobachtet werden konnte (Abb. 33c).

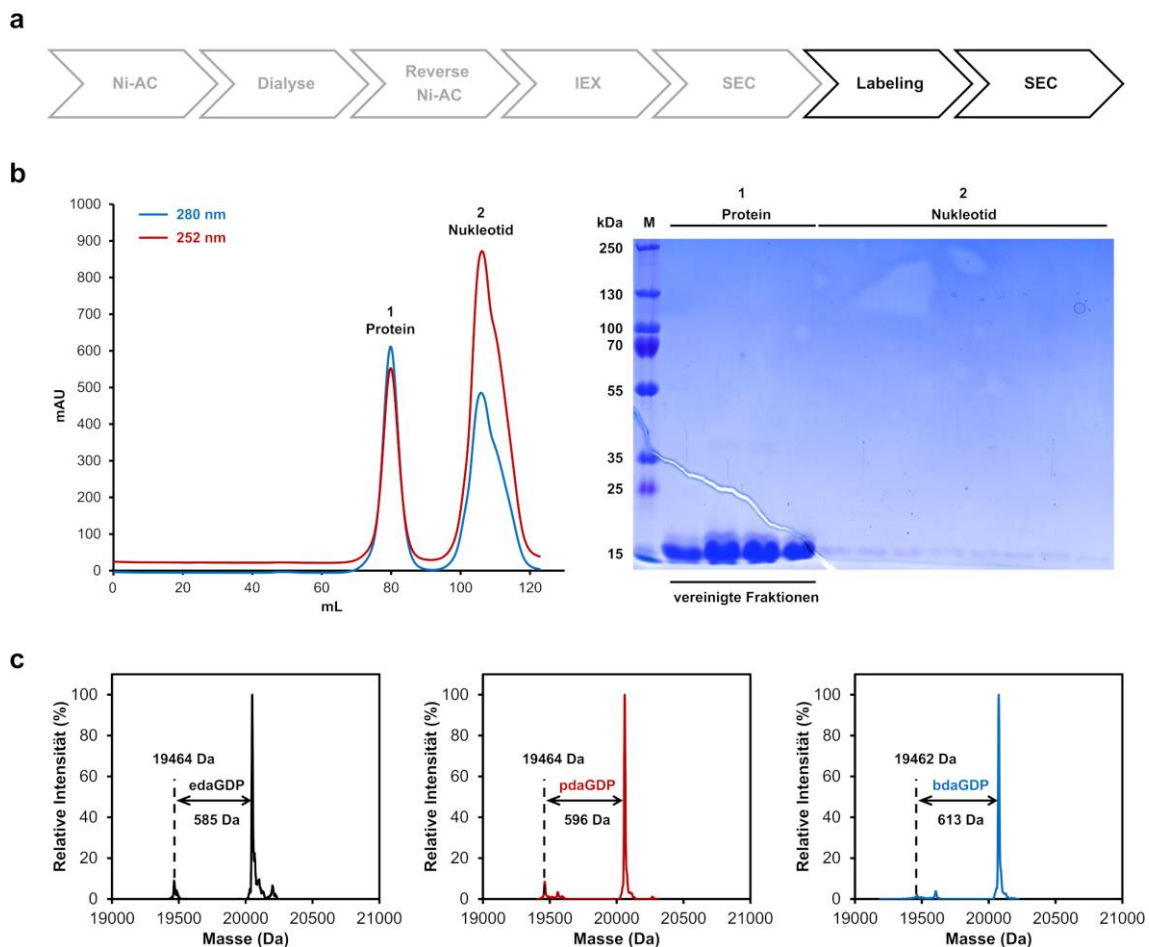


Abbildung 33 | Probenvorbereitung für die Kristallisation. (a) Reinigungsprotokoll für kovalent modifiziertes KRasG13C₁₋₁₆₉ (*Cys-light*). Nach erfolgter Reinigung der KRasG13C-Proteine (grau) wurden diese mit den Acrylamid-Derivaten edaGTP, pdaGDP und bdaGDP bei pH 9.5 für 24 h bei RT inkubiert und anschließend über eine zweite Größenausschlusschromatographie (SEC) überschüssiges Nukleotid entfernt; (b) Chromatogramm der SEC von KRasG13C-edaGDP (blau: Absorption bei 280 nm, rot: Absorption bei 252 nm); (b) Analyse der Fraktionen der SEC mittels SDS-PAGE (1: vereinigte Fraktionen des ersten Eluats, M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10-250 kDa); (c) Massenspektren von KRasG13C₁₋₁₆₉ (*Cys-light*) nach erfolgter Inkubation mit den Acrylamid-Derivaten edaGDP (schwarz), pdaGDP (rot) und bdaGDP (blau) bei pH 9.5.

3.4.2 Proteinkristallographie

Die Identifizierung von Kristallisationsbedingungen stellt eine besondere Herausforderung innerhalb des strukturbasierten Wirkstoffdesigns dar, da eine Vorhersage spezifischer proteinabhängiger Kristallisationsparameter bislang nicht möglich ist. Um für jedes Protein die optimalen Kristallisationsbedingungen zu ermitteln, muss daher auf umfangreiche Screening-Experimente unter Variation vieler verschiedener Parameter zurückgegriffen werden.¹²⁶⁻¹²⁷

Da zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Arbeit keine publizierten Kristallisationsbedingungen für die KRasG13C-Mutante vorhanden waren, wurden initiale Screening-Experimente mit kommerziell erhältlichen Proteinkristallisations-Screens (JCSG Core I-IV Suites, PEGs und PACT) bei 4 °C und 20 °C mit der *sitting drop* Methode durchgeführt. Bei der auf Dampfdiffusion beruhenden Methode wird durch Zugabe eines Fällungsmittels (z.B. Polyethylenglykol (PEG) oder Ammoniumsulfat) und langsame Konzentrierung durch Übergang der Wassermoleküle aus dem Proteintropfen in das Reservoir (Konzentrationsunterschied) die Löslichkeitsgrenze der Proteine überschritten und es kommt unter idealen Bedingungen zur Ausbildung von Proteinkristallen. Neben der Apo-Form der KRas-Proteine wurden ebenfalls die mit den Nukleotidanaloga Acryl-edaGDP (**8a**), Acryl-pdaGDP (**8b**) und Acryl-bdaGDP (**8c**) modifizierte KRas-Proteine in verschiedenen Konzentrationen verwendet, um gegebenenfalls zu einer Stabilisierung des Proteins beizutragen und somit die Kristallisation zu fördern. Im Rahmen dieser Screening-Experimente konnte ein kristalliner Niederschlag vorwiegend bei 20 °C und ab einer Proteinkonzentration von etwa 60 mg/mL beobachtet werden, wohingegen die Vielzahl der Tropfen bei 4 °C klar geblieben ist. Bereits nach 24 Stunden konnte sowohl für KRas-edaGDP (0.2 M (NH₄)F, 20 % PEG3350) als auch für KRas-bdaGDP (0.2 M NaF, 20 % PEG3350) Kristallwachstum in fluoridhaltigen Kristallisationsbedingungen beobachtet werden. Während im Falle von KRas-edaGDP aus dem anfänglichen kristallinen Niederschlag über Nacht eine einzige Kristallplatte entstanden ist, konnten bei KRas-bdaGDP viele kleine stäbchenförmige Kristalle verzeichnet werden (Abb. 34a).

Mit den identifizierten Kristallisationsbedingungen konnte dahingegen kein Kristallwachstum für das Apo-Protein beobachtet werden, welches vermutlich auf die fehlende Stabilisierung der Nukleotid-gebundenen inaktiven Konformation durch die kovalente Bindung der Nukleotid-Analoga zurückzuführen ist. Auch für pdaGDP, welches im Vergleich zu edaGDP und bdaGDP eine geringere Rate der kovalenten Proteinmodifikation aufweist, konnte kein Kristallwachstum beobachtet werden (Abb. 25 und Abb. 26).

Sowohl von KRas-edaGDP als auch von KRas-bdaGDP konnten an der *Swiss Light Source* (SLS) des Paul Scherrer Instituts (PSI) erfolgreich Datensätze mit Auflösungen zwischen 1.6 und 1.7 Å aufgenommen werden (Abb. 34b, Tab. A5).

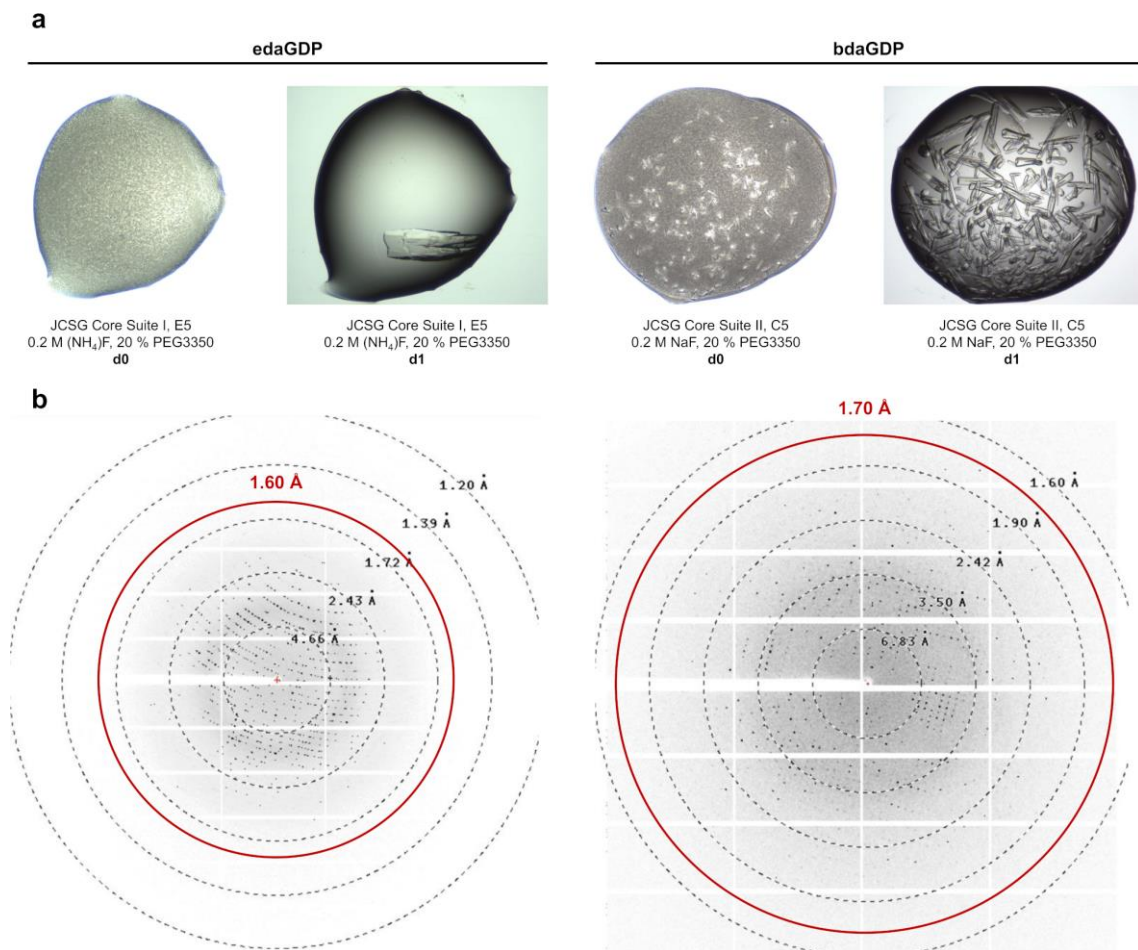


Abbildung 34 | Kristallisation von KRasG13C. (a) Proteinkristalle von KRas-edaGDP (Reservoir-Lösung: 0.2 M (NH₄)F, 20 % PEG3350) und KRas-bdaGDP (Reservoir-Lösung: 0.2 M NaF, 20 % PEG3350 bei 20 °C nach d0 und d1; (b) Diffraktionsbild eines KRasG13C-Kristalls im Komplex mit edaGDP (links) und bdaGDP (rechts).

Die von KRasG13C erhaltenen Kristalle weisen dabei die hexagonale Raumgruppe P6₃ mit einem Molekül in der asymmetrischen Einheit auf, wie zuvor bereits von Ostrem *et al.* für die KRasG12C-Mutante publiziert wurde (PDB: 4l8g).⁴⁷ Die vollständigen Datenstatistiken der erhaltenen KRasG13C-Kristallstrukturen sind im Anhang zusammengefasst (Tab. A5).*

* Die Proteinkristallisation erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Matthias P. Müller (Akademischer Rat, AG Rauh, TU Dortmund).

3.4.3 Analyse der Komplexstruktur von KRasG13C mit edaGDP und bdaGDP

Die in dieser Arbeit generierten Komplexkristallstrukturen von KRasG13C-edaGDP (PDB: 7ok3) und KRasG13C-bdaGDP (PDB: 7ok4) ermöglichten einen detaillierten Einblick in den Bindemodus der kovalenten Nukleotid-basierten Verbindungen (Abb. 35).

Die Röntgenkristallstrukturen der onkogenen KRasG13C-Mutanten sowohl im edaGDP- als auch im bdaGDP-gebundenen Zustand weisen eine hohe Ähnlichkeit zu den bereits publizierten KRasWT-Kristallstrukturen im inaktiven GDP-gebundenen Zustand (siehe bspw. PDB: 4obe) auf (Abb. 35a und b). Innerhalb der Nukleotidbindetasche ist das Nukleotidgrundgerüst sowie die kovalente Bindung für beide Nukleotidanaloga mit dem Cystein in Position 13 anhand der Elektronendichte gut aufgelöst, wobei jedoch nur die jeweiligen 3'-Isomere von edaGDP und bdaGDP deutlich definiert sind (Abb. 35f und g). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen der MS-Experimente überein, insofern diese für die dGTP-Derivate eine schnellere Rate der kovalenten Proteinmodifikation im Vergleich zu den gemischten Isomeren zeigten (Abb. 26a). Neben den hochkonservierten Wildtyp-Interaktionen zwischen Protein und Nukleotid bilden die Nukleotidderivate edaGDP und bdaGDP über den jeweiligen Linker zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen mit Asp30 sowie einigen Wassermolekülen aus (Abb. 35c und e).

Die Strukturanalyse bestätigte somit den erwarteten Bindemodus der Nukleotidanaloga und die hohe reversible Affinität, die mit den natürlichen Nukleotiden vergleichbar ist, und wird in weiteren Studien zur Gestaltung und Optimierung der Linker-Region dieser Analoga dienen.

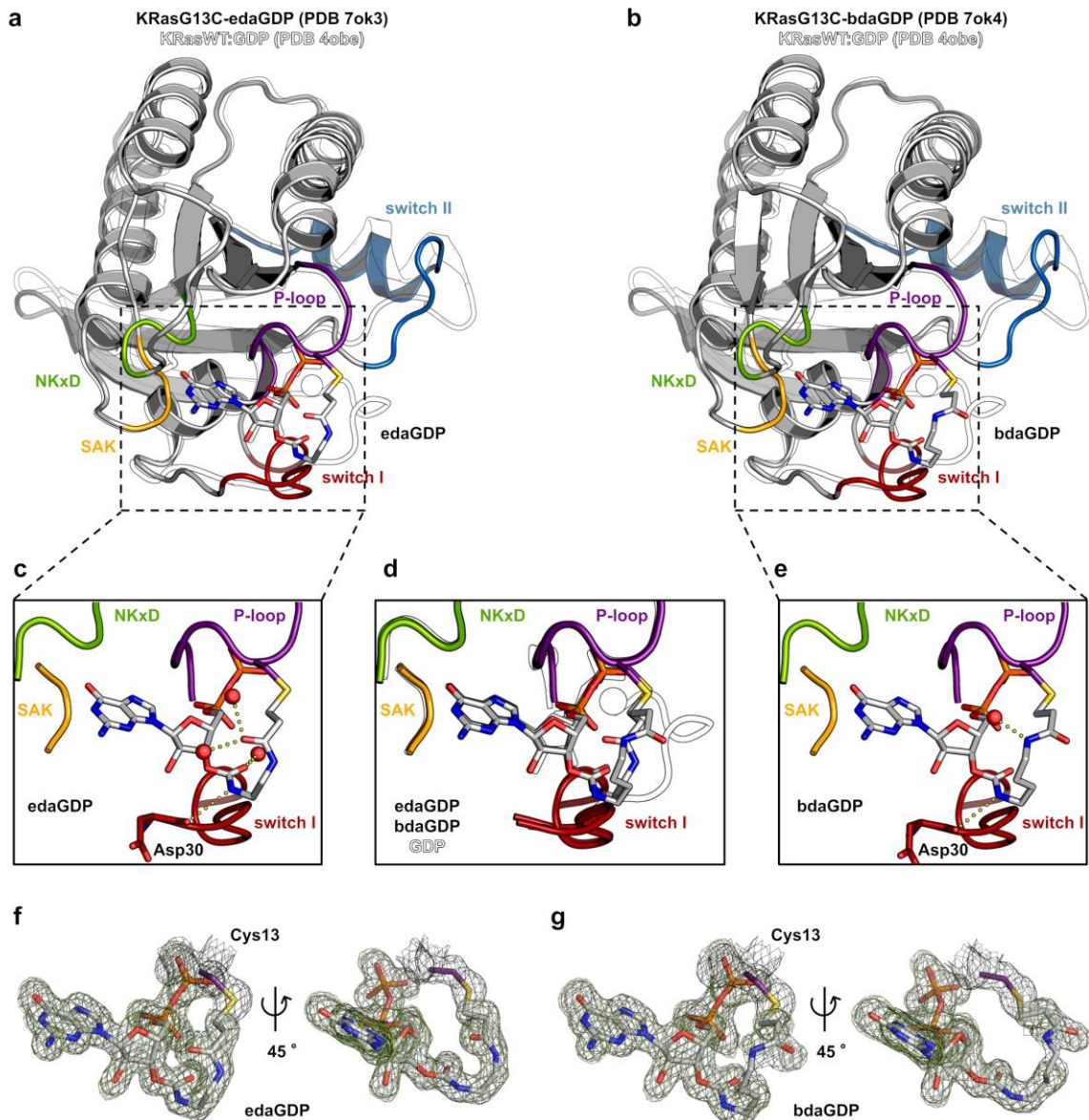


Abbildung 35 | Kristallstrukturen von KRasG13C-edaGDP und KRasG13C-bdaGDP. (a) Überlagerung der Kristallstrukturen von KRasG13C-edaGDP (grau, P-loop: violett, *switch-I*: rot, *switch-II*: blau, NKxD: grün, SAK: gelb, PDB: 7ok3) und KRasWT:GDP (weiß, PDB: 4obe); (b) Überlagerung der Kristallstrukturen von KRasG13C-bdaGDP (grau, P-loop: violett, *switch-I*: rot, *switch-II*: blau, NKxD: grün, SAK: gelb, PDB: 7ok4) und KRasWT:GDP (weiß, PDB: 4obe); (c) Detaildarstellung der Nukleotidbindetasche in KRasG13C-edaGDP; (d) Strukturelle Überlagerung der Nukleotidbindetasche von KRasWT:GDP und den kovalent gebundenen G13C-Mutanten; (e) Detaildarstellung der Nukleotidbindetasche in KRasG13C-bdaGDP; (f) 2Fo-Fc-Elektronendichtekarte (grau, r.m.s.d. = 1.0) und Fo-Fc *Simulated Annealing Omit*-Elektronendichtekarte (grün, r.m.s.d. = 2.5) von edaGDP; (g) 2Fo-Fc-Elektronendichtekarte (grau, r.m.s.d. = 1.0) und Fo-Fc *Simulated Annealing Omit*-Elektronendichtekarte (grün, r.m.s.d. = 2.5) von bdaGDP.

3.4.4 Bestimmung der Mg^{2+} -Affinität

Im aktiven Zentrum der KRasG13C-Kristallstrukturen konnte interessanterweise kein Mg^{2+} -Ion beobachtet werden, obwohl im Puffer eine Mg^{2+} -Konzentration von 2 mM vorlag. Darüber hinaus führte ebenfalls das *soaking* von Kristallen des kovalenten KRasG13C-edaGDP-Komplexes in Gegenwart von 20 mM $MgCl_2$ zu keiner Besetzung der Mg^{2+} -Bindungsstelle. Da jedoch eine Metallkoordination für eine effiziente Nukleotidbindung essentiell ist und geprüft werden sollte, dass die Mg^{2+} -Bindung nicht grundsätzlich durch die modifizierten Nukleotide beeinträchtigt ist, wurden daraufhin die Mg^{2+} -Affinitäten für KRasG13C im Vergleich zum Wildtyp bestimmt.^{54, 128}

Um die Mg^{2+} -Affinitäten der beiden KRas-Proteine zu vergleichen wurden analog zu den von John *et al.* beschriebenen Experimenten Fluoreszenztitrations mit KRasG13C und KRasWT im mantdGDP-gebundenen Zustand durchgeführt (Abb. A7).^{54, 128} Dabei wurden 1 μM KRas:mantdGDP gegen steigende Konzentrationen an $MgCl_2$ titriert (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 und 25 μM) und die resultierenden Kurven durch Auftragung der relativen Fluoreszenzintensität gegen die $MgCl_2$ -Konzentration analysiert. Hierbei konnte keine Änderung der Mg^{2+} -Affinität für die G13C-Mutante im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden (Abb. 36).

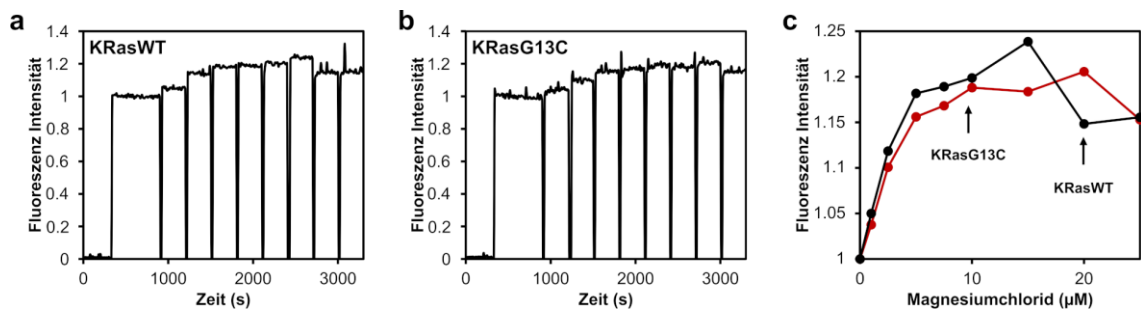


Abbildung 36 | Mg^{2+} -Affinitätsassay. (a, b) Fluoreszenz-Titration von KRasWT:mantdGDP oder KRasG13C:mantdGDP mit steigenden Konzentrationen von Mg^{2+} (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 und 25 μM); (c) Die resultierenden Kurven wurden durch Auftragen der relativen Fluoreszenzintensität gegen die $MgCl_2$ -Konzentration analysiert.

Die Ursache der fehlenden Mg^{2+} -Ionen in den beobachteten Röntgenkristallstrukturen lag somit nicht in einer verminderten Fähigkeit des Proteins, Mg^{2+} -Ionen zu binden. Vermutlich ist der Grund darin zu finden, dass der für die Kristallisation der KRasG13C-Mutanten verwendete Kristallisationspuffer hohe Konzentrationen der Salze NH_4F bzw.

NaF enthält, welches vermutlich zu einer Ausfällung von schwer löslichem MgF_2 führte und somit das Magnesium nicht mehr für die Bindung in der Nukleotidtasche verfügbar war. In der PDB sind zudem weitere Modelle von Ras zu finden, die ebenfalls kein Mg^{2+} -Ion in der Bindetasche besitzen. Auch hier lassen die publizierten Kristallisationsbedingungen vermuten, dass komplexierende und teils chelatierende Verbindungen (wie bspw. Citrat und Kakodylat) ähnliche Effekte hatten (PDB: 4m1o, 4lyf, 4lyh, 4m21, 4m1s, 4m1t, 4m1t, 4m1y).⁴⁷

Der allgemeine Bindemodus der kovalenten Nukleotidanaloga und die bekannten Wechselwirkungen mit dem Ras-Protein sind jedoch im Wesentlichen identisch mit anderen bekannten Strukturen von Ras und kleinen GTPasen im Allgemeinen.

3.4.5 Berechnung der pK_a -Werte

Während KRasG12C in der Vergangenheit erfolgreich adressiert wurde, ist die KRasG13C-Mutante bislang als Angriffsziel in der personalisierten Krebstherapie weitestgehend unerforscht. Dazu beigetragen haben vermutlich mitunter fehlende Kristallstrukturen von KRasG13C, welche basierend auf den strukturellen Informationen die rationale Entwicklung von selektiven KRasG13C-Inhibitoren ermöglichen. Mit den im Rahmen dieser Arbeit generierten Kristallstrukturen von KRasG13C-edaGDP (PDB: 7ok3) und KRasG13C-bdaGDP (PDB: 7ok4) sollten daher weitere Computer-gestützte Rechnungen hinsichtlich der Adressierbarkeit des Cysteins an Position 13 im Vergleich zum Cystein an Position 12 durchgeführt werden.

Cysteine enthalten als einzige Aminosäure eine freie Thiol-Gruppe (-SH), die unter bestimmten Bedingungen mit einer Vielzahl an Elektrophilen reagieren kann.¹²⁹ Die Reaktivität des Cysteins ist sehr komplex, im Wesentlichen jedoch von dem Deprotonierungsgrad des Thiols und damit einhergehend von dem pK_a -Wert des Cystein-Rests abhängig.¹³⁰ Reaktivere Cysteine weisen dabei einen niedrigeren pK_a -Wert und somit eine höhere Wahrscheinlichkeit, dass sich das Cystein im nukleophilen Thiolat-Zustand befindet, auf. Demnach sind Cysteine mit niedrigeren pK_a -Werten (bei entsprechendem pH) generell zugänglicher für eine kovalente Modifikation.¹³¹ Die Bestimmung der pK_a -Werte von potentiell adressierbaren Cysteinresten ist jedoch bei der Entwicklung von kovalenten Inhibitoren für klinisch relevante onkogene Proteine nicht trivial.

Um die Reaktivität des Cysteins an Position 13 in KRasG13C zu untersuchen, wurden daher pK_a -Berechnungen auf Basis der in dieser Arbeit generierten KRasG13C-Kristallstrukturen durchgeführt. Als Vergleich wurden zudem die pK_a -Werte für die KRasG12C-Mutante auf Grundlage bereits veröffentlichter Kristallstrukturen (PDB: 4ldj und 4l8g) berechnet.* Um bei diesen Berechnungen ebenfalls den Einfluss der negativen Ladung von GDP zu bestimmen, wurden Berechnungen sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart eines Nukleotids im aktiven Zentrum durchgeführt. Bei den KRasG13C-Strukturen wurden zudem vorab die Linker der Nukleotidanaloga entfernt, sodass für die pK_a -Berechnungen alle Kristallstrukturen GDP sowie ein freies Cystein innerhalb der Nukleotidbindetasche aufwiesen (Tab. 5).

Sowohl für die G12C- als auch für die G13C-Mutation konnte im GDP-gebundenen Zustand eine Verschiebung des pK_a -Wertes um 1 bis 1.3 Einheiten im Vergleich zum nukleotidfreien Zustand beobachtet werden. Der Einfluss der negativen Ladung von GDP auf das Cystein in Position 12 bzw. 13 ist somit vergleichbar, obwohl sich Cys13 im Vergleich zu Cys12 auf dem P-loop näher an der Nukleotidbindetasche und somit näher an der negativen Ladung von GDP befindet. Generell deuten die Rechnungen an, dass die beiden Cysteine pK_a -Werte in der gleichen Größenordnung (pK_a : ~ 10) zeigen, wobei der Cysteinrest in Position 13 einen geringfügig niedrigeren pK_a -Wert besitzt.

Tabelle 5 | Übersicht der berechneten pK_a -Werte der KRasG12C- und G13C-Mutanten in Gegenwart (+) und Abwesenheit (-) von GDP. Bei den G13C-Mutanten wurde der Linker entfernt, so dass alle Kristallstrukturen GDP und ein freies Cystein im aktiven Zentrum für die Berechnungen aufweisen.

KRas Mutante	Kristallstruktur		pKa Cys (12/13)		
	PDB	Ligand	+	-	Δ
G13C	7ok3	GDP (von edaGDP)	9.85	8.85	1.0
	7ok4	GDP (von bdaGDP)	9.85	8.85	1.0
G12C	4ldj	GDP	10.65	9.35	1.3
	4l8g	GDP	10.35	9.05	1.3

Beide Cysteine sollten demnach bei einem physiologischen pH-Wert teilweise deprotoniert vorliegen und somit für eine kovalente Adressierung mit einem elektrophilen Acrylamid-modifizierten Inhibitor zugänglich sein.

* Berechnung der pK_a -Werte der KRasG12C- und KRasG13C-Mutante von M. Sc. Helge Vatheuer und Prof. Dr. Paul Czodrowski (AG Czodrowski, MPI Dortmund).

Da die generelle Adressierbarkeit der KRasG12C-Variante bereits in der Literatur beschrieben ist⁵⁻¹⁴ sind diese Experimente ein starkes Indiz, dass auch die KRasG13C-Variante basierend auf den durchgeführten pK_a-Berechnungen kovalent adressierbar sein sollte. Eine selektive Modifikation von KRasG13C konnte bereits erfolgreich mit den innerhalb dieser Arbeit synthetisierten Nukleotidanaloga gezeigt werden. Die Rate der kovalenten Proteinmodifikation war jedoch bei einem physiologischen pH-Wert recht gering und die G13C-Mutante lag nach 24 h nur zu etwa 20 % modifiziert vor. Bei höheren pH-Werten hingegen wurde das Protein vollständig modifiziert.

Da eine Messung der pK_a-Werte nicht trivial ist wurden hier die pK_a-Werte auf Grundlage der generierten KRasG13C-Kristallstrukturen berechnet. Diese Berechnung ist im Allgemeinen nicht sehr exakt, jedoch zeigt ein Vergleich mit dem bewiesenermaßen adressierbaren Cystein in Position 12, dass auch das benachbarte C13 generell bei einem physiologischen pH-Wert adressierbar sein sollte. Um die Reaktivität der Nukleotidanaloga gegenüber KRasG13C zu steigern, ist daher vermutlich lediglich eine Optimierung des Linkers für eine bessere Ausrichtung des *warheads* notwendig.

3.5 Zellbiologische Charakterisierung

Innerhalb der biochemischen sowie strukturellen Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Nukleotidanaloga konnte eine selektive Adressierung der klinisch relevanten KRasG13C-Mutante beobachtet werden. Aufbauend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen der *in vitro* Untersuchungen, sollte im Anschluss die Wirksamkeit der generierten Nukleotidderivate in komplexeren, zellulären Systemen überprüft werden.

Im folgenden Kapitel wird die detaillierte zelluläre Evaluierung der Nukleotidanaloga beschrieben. Neben der erfolgreichen Etablierung von artifiziellen zellulären Modellsystemen, die in Zukunft für die Charakterisierung mutantenselektiver KRas-Inhibitoren genutzt werden können, sollten verschiedene Strategien für den Transfer der negativ geladenen Nukleotidderivate in KRasG13C mutierten Krebszelllinien getestet werden, darunter ein NTP-vermittelter Transfer sowie Elektroporation. Erst durch die Elektroporation intakter und *in vitro* modifizierter KRas-Proteine in Hela-Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine robuste Methode für eine initiale zelluläre Charakterisierung der dargestellten Nukleotidanaloga etabliert werden.

3.5.1 Etablierung von artifiziellen KRas-abhängigen Zelllinien

Aufgrund der limitierenden Verfügbarkeit von KRasG13C-abhängigen humanen Krebszelllinien sollten zunächst artifizielle KRas-mutierte Zelllinien, darunter Ba/F3 sowie NIH-3T3 Zellen generiert werden, die eine Charakterisierung mutantenselektiver KRas-Inhibitoren ermöglichen.

3.5.1.1 Ba/F3-Zellen

Mit den murinen Ba/F3-Zellen sollte ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung des Einflusses einer mutantenspezifischen KRas-Inhibition auf die Zellproliferation generiert werden.*

* Etablierung von KRas-abhängigen Ba/F3-Zellen im Rahmen der Bachelorarbeit von Sandra Koska (AG Rauh, TU Dortmund) in Zusammenarbeit mit M.Sc. Laura Depta (AG Rauh, TU Dortmund).

Ba/F3-Zellen sind murine Pro-B-Zellen, deren Überleben und Proliferation vom Wachstumsfaktor Interleukin-3 (IL-3) abhängig sind.¹³² Durch Einbringung eines Onkogens über retrovirale Transduktion wird jedoch ein IL-3-unabhängiges Zellwachstum in Abhängigkeit von dem eingeführten Onkogen induziert. Ba/F3-Zellen sind daher ein beliebtes Modellsystem für die Entwicklung und Charakterisierung von Inhibitoren zur zielgerichteten Adressierung eines Onkogens und finden besonders in der Kinaseforschung breite Anwendung.¹³³ Neben der Generierung von diversen Kinase-abhängigen Ba/F3-Zelllinien wurden von White *et al.* auch KRasG12D-abhängige Ba/F3-Zellen beschrieben.¹³⁴ Für die Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten KRasG13C-Nukleotidanaloga wurde daher ebenfalls versucht KRas-abhängige Ba/F3-Zellen zu generieren. Neben der KRasG13C-Mutation für die Evaluierung der Nukleotidderivate wurde zudem die KRasG12C-Mutation in die Ba/F3-Zellen eingeführt, um die Mutantenselektivität der erzeugten Verbindungen zu überprüfen. Die seinerzeit in den klinischen Studien befindlichen KRasG12C-Inhibitoren AMG 510 und MRTX849 sollten zur Kontrolle der Funktionalität und Selektivität der erzeugten Zellmodelle getestet werden. Eine schematische Übersicht zur Generierung der KRas-abhängigen Ba/F3-Zellen ist in Abbildung 37 dargestellt.

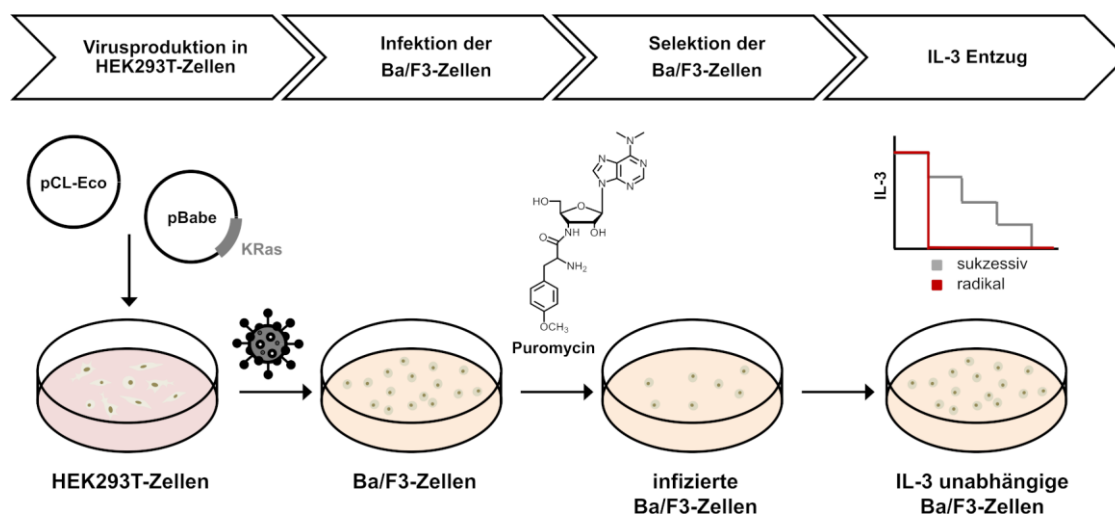


Abbildung 37 | Schematische Darstellung des Protokolls zur Etablierung KRas-abhängiger Ba/F3-Zellen. In HEK293T-Zellen wurden zunächst durch Co-Transfektion eines Verpackungs- (pCL-Eco) und Transferplasmids (pBabe) retrovirale Vektoren generiert, welche die mutierten Ras-Onkogene in das Wirtgenom der Ba/F3-Zellen einbauen. Durch einen anschließenden sukzessiven oder radikalen IL-3-Entzug wurden IL-3-unabhängige Ba/F3-Zellen generiert, deren Überleben nun vom künstlich eingeführten Onkogen abhängig ist.

Für die Erzeugung von KRasG12C und KRasG13C-abhängigen Ba/F3-Zellen, wurde zunächst der Virus für die anschließende retrovirale Infektion der Ba/F3 -Zellen in HEK293T-Zellen produziert. Neben dem Verpackungsplasmid (pCLEco) wurde jeweils ein Transferplasmid (pBabe), welches die mutierten KRas-Gene enthielten, über das Transfektionsreagenz TransIT-LT1 (Mirus Bio LLC) in HEK293T-Zellen eingebracht.¹³⁵⁻¹³⁶ Wohingegen der pBabe-KRasG12C-Vektor* (Addgene) kommerziell erhältlich war, musste für die Einbringung der G13C-Mutation zunächst eine ortsgerichtete Mutagenese ausgehend von dem kommerziell erhältlichen pBabe-KRasWT-Vektor* (Addgene) erfolgen (Tab. A6, Abb. A11). Analog zu der Transfektion der pBabe-KRas-Vektoren wurde zudem der pBabe-mKate-Vektor†, der für das rot fluoreszierende mKate-Protein codiert, als visuelle Kontrolle der Infektion in HEK293T-Zellen eingebracht. Nach insgesamt 72 Stunden konnte bei der Infektionskontrolle eine deutliche rote Fluoreszenz beobachtet werden, welches auf einer erfolgreiche Virusproduktion schließen lässt (Abb. 38b). Der retrovirale Virus der KRas-Ansätze wurde geerntet und die Ba/F3-Zellen direkt im Anschluss infiziert. Die anschließende Selektion der infizierten Ba/F3-Zellen mit Puromycin, welche nach erfolgreicher Infektion eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum besitzen, führt zu einer leichten Reduktion der Zellzahl. Innerhalb der 7-tägigen Selektion sterben nicht-infizierte Zellen ab, welches auf eine erfolgreiche Transfektion und Selektion der infizierten Zellpopulation hindeutet (Abb. 38a).

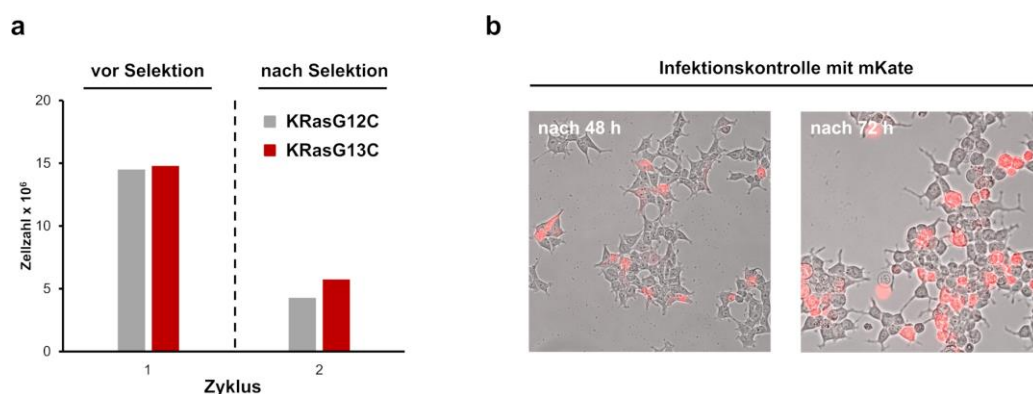


Abbildung 38 | Infektion und Selektion der Ba/F3-Zellen. (a) Zellzahlen vor und nach der Selektion der infizierten Ba/F3-Zellen mit Puromycin; (b) Infektionskontrolle mit dem rot fluoreszierenden mKate-Protein nach 48 h und 72 h.

* Bereitstellung von pBABA-KRasG12C sowie pBABA-KRasWT durch Channing Der (Addgene plasmid # 58901 und # 75282).

† Bereitstellung von pBABA-mKate durch M.Sc. Melissa Lubeck (AG Rauh, TU Dortmund).

Um im Anschluss an die Selektion IL-3-unabhängige Ba/F3-Zellen zu generieren, die eine Abhängigkeit gegenüber der eingeführten Ras-Onkogene aufweisen, erfolgte der Entzug des Wachstumsfaktors. Neben einem radikalen Entzug, bei dem nach anfänglicher Kultivierung in Gegenwart von 10 ng/μL IL-3 der Wachstumsfaktor vollständig entzogen wurde, wurde ebenfalls ein sukzessiver Entzug angewendet, bei dem die IL-3-Konzentration schrittweise von 10 ng/μL auf 5, 2.5, 1 und 0.1 ng/μL reduziert und IL-3 anschließend vollständig entfernt wurde (Abb. 39a und b). Sowohl beim radikalen als auch beim sukzessiven IL-3-Entzug konnten nach einer anfänglichen Abnahme der Zellzahlen für KRasG12C und KRasG13C nach vollständigem IL-3-Entzug ein Anstieg der Zellzahlen für KRasG12C beobachtet werden. Somit deutete das Wachstum der KRasG12C-infizierten Ba/F3-Zellen auf eine erfolgreiche Transduktion mit dem KRasG12C-Gen und dem Erreichen einer onkogenen Abhängigkeit hin. Zur Charakterisierung und Identifizierung der KRasG12C erzeugten Ba/F3-Zellen wurde anschließend zum Nachweis des eingefügten KRas-Onkogens eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Durch den mittels Western Blot nachgewiesenen HA-tag, welcher mit KRasG12C-Gen fusioniert auf dem pBabe-Vektor vorlag, konnte die erfolgreiche Einbringung des KRas-Gens in die Ba/F3-Zellen belegt werden (Abb. 39c). Neben der Western Blot-Analyse wurde zudem eine Genomisolierung und anschließende -sequenzierung der Ba/F3-Zellen durchgeführt, wodurch ebenfalls die erfolgreiche Generierung KRasG12C abhängiger Ba/F3-Zellen bestätigt werden konnte (Abb. A12). Somit konnte durch Einführung der KRasG12C-Mutation das fehlenden IL-3-Signal in Ba/F3-Zellen ersetzt werden. Im Falle der KRasG13C-Mutation konnten jedoch weder mit dem radikalen noch mit dem sukzessiven Entzug IL-3-unabhängige Ba/F3-Zellen erzeugt werden. KRasG13C besitzt daher möglicherweise ein zu geringes onkogenes Potential, welches für das Überleben der transformierten Ba/F3-Zellen nicht ausreichend ist. Somit konnte mit dem verwendeten Protokoll kein murines Ba/F3-Modellsystem zur Darstellung der onkogenen Abhängigkeit der KRasG13C-Mutante generiert werden, die eine nachfolgende Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit erzeugten KRasG13C-spezifischen Nukleotidanaloga ermöglichte.

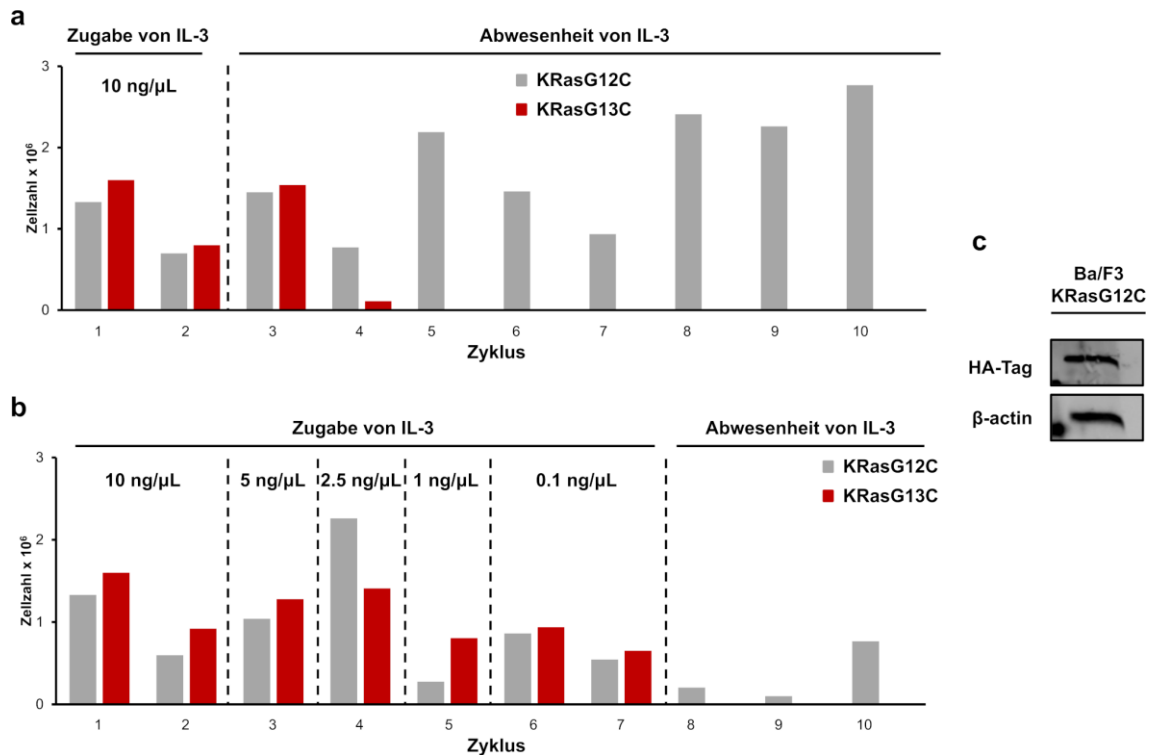


Abbildung 39 | IL-3-Entzug. Zellzahlen der infizierten Ba/F3-Zellen während (a) des radikalen und (b) des sukzessiven IL-3-Entzugs für KRasG12C (grau) und KRasG13C (rot); (c) Western Blot-Analyse nach IL-3-Entzug der Ba/F3-KRasG12C-Zellen.

Die Ba/F3-KRasG12C-Zellen konnten hingegen erfolgreich mit dem oben beschriebenen Protokoll generiert werden und wurden daher für die Testung selektiver KRasG12C-Inhibitoren verwendet. Der Einfluss der KRasG12C-Inhibitoren auf die Zellproliferation der Ba/F3-KRasG12C-Zellen wurde zunächst mit dem kommerziell erhältlichen CellTiter-Glo (CTG) Assay (Promega) bestimmt. Als Kontrollen wurde neben der parental Ba/F3-Zelllinie ebenfalls die humane H358-Zelllinie verwendet, die eine KRasG12C-Mutation aufweist. Der CTG-Assay basiert dabei auf der Bestimmung der Anzahl lebender Zellen durch Quantifizierung von vorhandenem ATP, das ein Indiz für metabolisch aktive Zellen ist. Im Rahmen einer ATP-abhängigen Luciferase-katalysierten Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin wird dabei ein Lumineszenzsignal erzeugt, welches proportional zur vorhandenen ATP-Menge und somit zur Anzahl lebender Zellen ist.¹³⁷

Für den CellTiter-Glo[®]-Viabilitätsassay wurde zunächst der lineare Wachstumsbereich der verwendeten Zelllinien bestimmt, indem die Zellen in einer seriellen Verdünnungsreihe (0, 50, 200, 200, 400, 800, 1600, 3200 Zellen/well) ausplattiert und nach vier Tagen die Lumineszenz ausgelesen wurden.

Durch Auftragung der Lumineszenz gegen die verwendete Zellzahl/*well* konnte somit die optimale Zellzahl bestimmt werden. Aufgrund der unterschiedlichen Proliferationsraten der einzelnen Zelllinien wurden variierende Zellzahlen zwischen 100 und 800 Zellen/*well* ermittelt (Abb. 40a). Um im Anschluss die inhibitorische Wirksamkeit der getesteten Verbindungen auf die Proliferation der einzelnen Zelllinien mittels CTG-Assay durch Bestimmung der halbmaximale effektive Inhibitor-Konzentration (EC_{50}) zu validieren, wurden die Zellen gemäß der ermittelten optimalen Zellzahl ausgesät und für vier Tage in Gegenwart der jeweiligen Inhibitoren (0.1 nM bis 30 μ M) inkubiert. Neben KRasG12C-Inhibitoren und von ARS-853 abgeleiteten CovClick-Fragmenten (Tab. A10)* wurden die Zellen mit einer Reihe von Referenzverbindungen behandelt, darunter panRas-[†], PDE δ -[‡], Kinase- und PARP-Inhibitoren. Die Zellen wurden zudem mit DMSO als Negativkontrolle sowie mit Staurosporin als Positivkontrolle inkubiert. Die ermittelten Lumineszenzen wurden auf diese Kontrollen normalisiert und Dosis-Wirkungskurven generiert, anhand dieser der EC_{50} -Wert als Maß für die zelluläre Aktivität der Verbindungen ermittelt wurde (Abb. 40b). Insgesamt konnte für die Ba/F3-KRasG12C Zelllinie eine Sensitivität gegenüber einer KRasG12C-Inhibition im Vergleich zu der parentalen Ba/F3-Zelllinie beobachtet werden. Die inhibitorische Wirksamkeit der KRasG12C-Inhibitoren in den generierten Ba/F3-KRasG12C-Zellen korreliert dabei mit dem Entwicklungszeitpunkt dieser Verbindungen. Während die initial von dem Shokat-Labor entwickelten KRasG12C-Inhibitoren 9 und 12 keine selektive Aktivität in den G12C-mutierten Zelllinien aufwiesen, konnte jeweils eine gesteigerte zelluläre Potenz der klinischen Kandidaten AMG 510 und MRTX849 festgestellt werden. Dieser Trend, der den Erfolg der Optimierung der KRasG12C-Inhibitoren widerspiegelt, konnte auch in Experimenten mit den H358-Zellen beobachtet werden. Die vergleichsweise hohe Aktivität einiger Verbindungen in parentalen Ba/F3-Zellen ist hierbei vermutlich auf zytotoxische Effekte zurückzuführen. Die von ARS-853 abgeleiteten CovClick-Fragmente wiesen keinerlei zelluläre Aktivität auf, welches die Wichtigkeit der Substituenten zur Ausbildung essentieller Protein-Ligand-Wechselwirkungen verdeutlicht (Tab. A10). Bei den Referenzverbindungen konnten hingegen in parentalen sowie in G12C-mutierten Ba/F3-Zellen vergleichbare EC_{50} -Werte beobachtet werden.

* Synthese der CovClick-Fragmente im Rahmen der Masterarbeit von Lisa Goebel (AG Rauh, TU Dortmund).

[†] Synthese von panRas3144 durch M.Sc. Tobias Grabe (AG Rauh, TU Dortmund).

[‡] Bereitstellung des PDE δ -Inhibitors Deltarasin durch die AG Waldmann (MPI Dortmund).

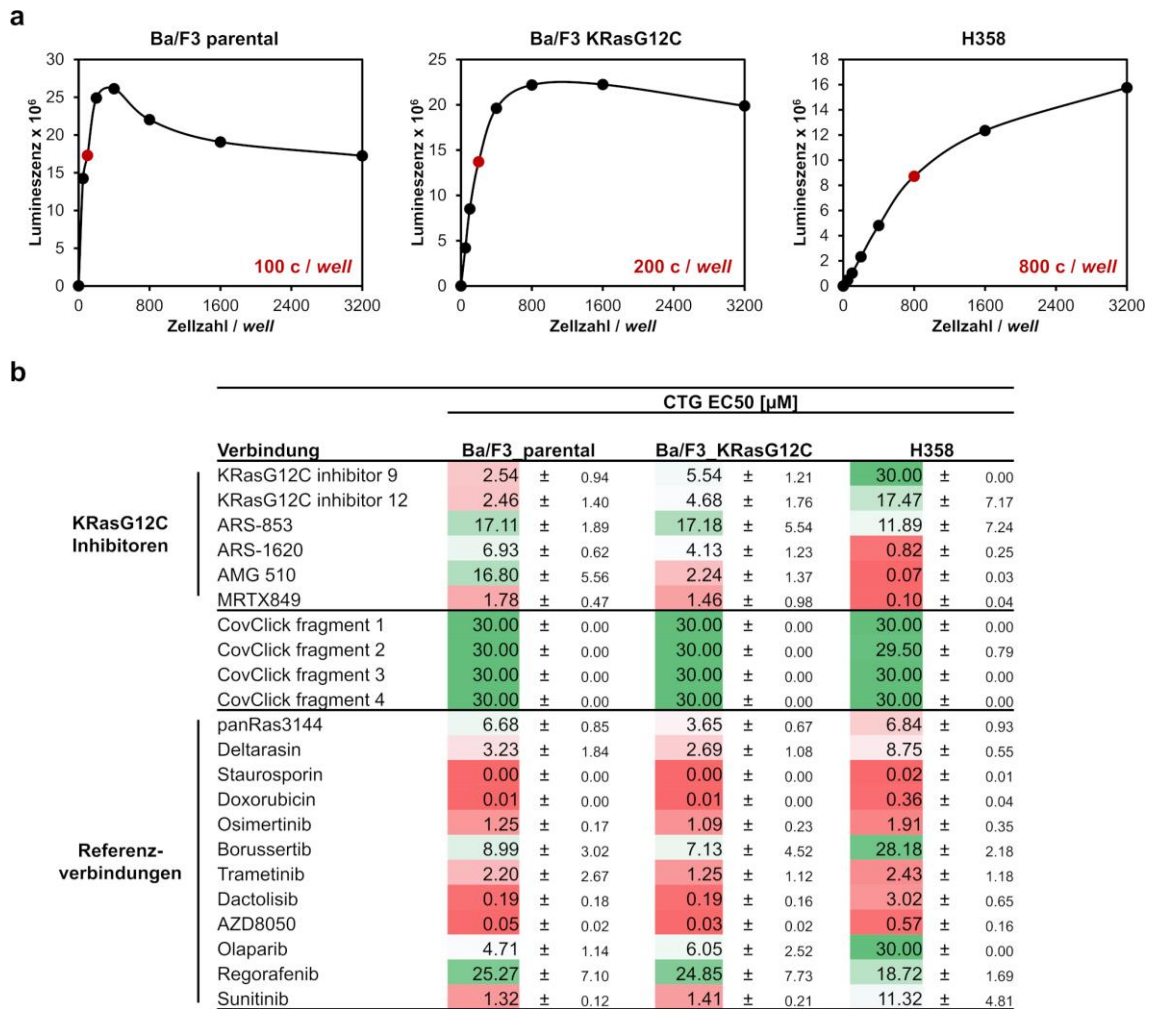


Abbildung 40 | CellTiter-Glo®-Viabilitätsassay. (a) Zellzahloptimierung. Grafische Auftragungen der im CTG-Assay detektierten Lumineszenzsignale gegen die verwendete Anzahl an Zellen pro well zur Bestimmung der optimalen Zellzahlen für die parentalen Ba/F3-, die generierten Ba/F3-KRasG12C- und H358-Zellen; (b) Bestimmung der EC₅₀-Werte verschiedener Referenzverbindungen und KRasG12C-Inhibitoren für die parentalen Ba/F3-, die generierten Ba/F3-KRasG12C- und H358-Zellen.

Um den Einfluss der KRasG12C-Inhibition auf die Ba/F3-KRasG12C-Zelllinie weiter zu untersuchen, wurden zudem Western Blot-Analysen mit den klinischen Kandidaten AMG 510 und MRTX849 angefertigt. Als Positivkontrolle wurde erneut die G12C-mutierte H358-Zelllinie verwendet. Bei der Behandlung mit AMG 510 und MRTX849 konnte sowohl in den Ba/F3-KRasG12C-Zellen als auch in den H358-Zellen eine konzentrationsabhängige Inhibition des nachgeschalteten Signalweges und eine Abnahme von pCraf, pErk und pS6 beobachtet werden (Abb. 41).

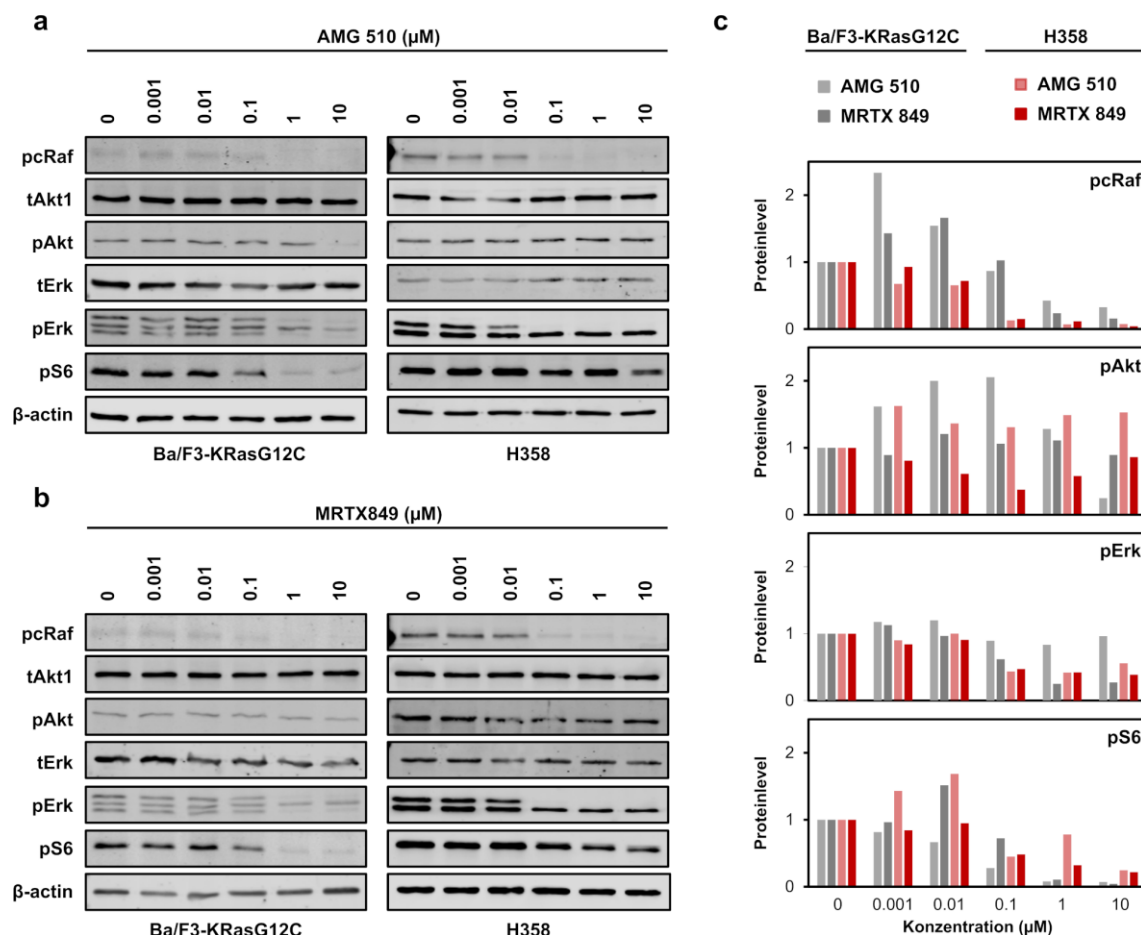


Abbildung 41 | Zelluläre Charakterisierung der generierten Ba/F3-KRasG12C Zelllinie. Western Blot-Analyse in Ba/F3-KRasG12C und H358 nach Behandlung mit (a) AMG 510 und (b) MRTX849; (c) Quantifizierung der Phosphorylierungslevel verschiedener *downstream*-Proteine nach Behandlung mit den jeweiligen Inhibitoren.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit erfolgreich ein Modellsystem für die onkogene KRasG12C-Variante erzeugt werden, die eine vergleichende Validierung der Referenzverbindungen AMG 510 und MRTX849 ermöglichen.

Eine onkogene Abhängigkeit der KRasG13C-Mutante in Ba/F3-Zellen konnte hingegen nicht generiert werden, welches eine Charakterisierung der zuvor erzeugten KRasG13C-Nukleotidderivate ermöglichen würde. In zukünftigen Arbeiten können jedoch weitere Versuche hierzu mit der G13C-Variante wiederholt werden, um auch hier ein valides Modellsystem zu erhalten.

3.5.1.2 NIH-3T3-Zellen

Da sich die Ba/F3-Zellen als kein optimales Modellsystem zur Darstellung einer onkogenen Abhängigkeit der KRas-Mutation herausstellten und die Generierung IL-3-unabhängiger Ba/F3-KRasG13C-Zellen erfolglos blieb, wurden daraufhin NIH-3T3 Zellen als Modellsystem ausgewählt. Die NIH-3T3-Zellen sind aufgrund der relativ einfachen Transfektion und Empfindlichkeit gegenüber der Transformation durch Aktivierung des Ras-Signalweges ein beliebtes Zellsystem für die Charakterisierung der Eigenschaften von Ras-Onkogenen.¹³⁸

Für die Erzeugung KRas-transformierter NIH-3T3-Zellen wurden zunächst die KRas-Gensequenzen mittels Restriktions-/Ligationsprotokoll in pcDNA-Vektoren eingebracht, die eine Expression der Gensequenzen unter Kontrolle des CMV-Promotors in murinen Zellen ermöglichen. Als Donorplasmide wurden die pBabe-Vektoren mit den entsprechenden KRas-Varianten (KRasWT, KRasG12C und KRasG13C) verwendet. Die pcDNA-Vektoren mCherry-C1 und mOrange-N1¹³⁹ (Addgene) dienten als Zielplasmide, wobei die mCherry-Konstrukte als visuelle Transfektionskontrolle dienten und der Einbau in den mOrange-Vektor in der Expression von KRas-Proteinen ohne Fluoreszenztag (*untagged*) resultierte.

Mit Hilfe des LipofectamineTM 3000 Reagent Protocol (ThermoFisher Scientific) wurde im Anschluss die Transfektion der zuvor ausplattierten NIH-3T3-Zellen vorgenommen. Nach insgesamt 72 Stunden konnte für die mCherry-Kontrollkonstrukte eine deutliche rote Fluoreszenz beobachtet werden, welche auf eine erfolgreiche Transfektion der KRas-Gene schließen ließ (Abb. 42).

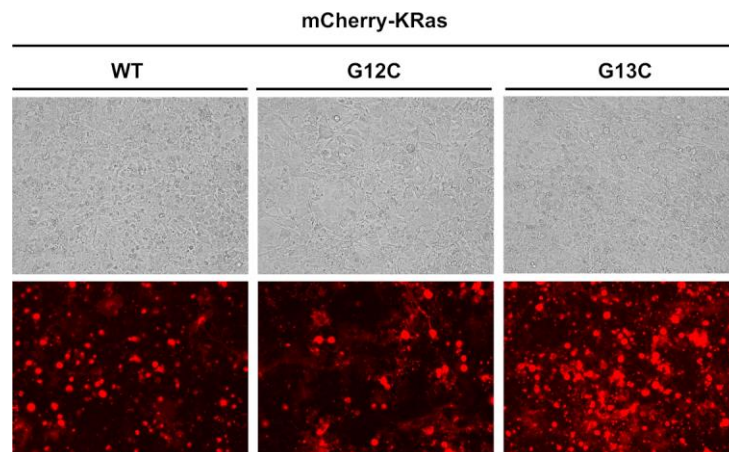


Abbildung 42 | Lipofectamin-vermittelte Transfektion. Transfektionskontrolle der NIH-3T3-Zellen mit den rot fluoreszierenden mCherry-KRas-Konstrukten nach 72 h.

Aus den KRas-transformierten NIH-3T3-Zellen wurden im Anschluss Zelllysate generiert und Western Blots angefertigt, um Veränderungen der Phosphorylierungslevel von Proteinen, welche Ras nachgeschaltet sind, zu ermitteln. Nach erfolgter Transfektion konnte für alle KRas-Varianten mit und ohne *tag* eine Hochregulierung von pcRaf, pErk und insbesondere pS6 beobachtet werden, wohingegen das Phosphorylierungslevel von Akt nicht beeinflusst wurde. Eine gesteigerte Aktivierung der Ras-Signalkaskade konnte dabei von KRasWT über KRasG12C bis hin zu KRasG13C detektiert werden, welches die onkogenen Eigenschaften der jeweiligen Mutationen widerspiegelt. Das am N-Terminus befindliche mCherry schien dabei trotz der relativen Größe in Bezug auf KRas selbst keinen Einfluss auf die Aktivierung der Ras-Signalkaskade zu haben (Abb. 43).

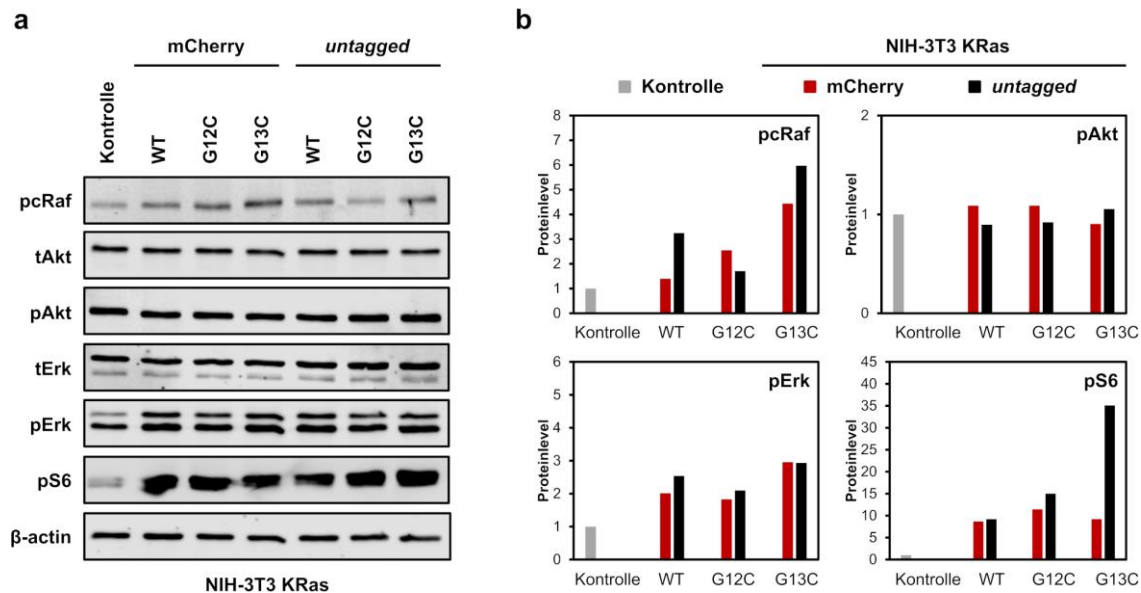


Abbildung 43 | Zelluläre Charakterisierung der Ras-transformierten NIH-3T3-Zellen. (a) Western Blot-Analyse der Ras-transformierten NIH-3T3-Zellen. **(b)** Quantifizierung der Phosphorylierungslevel verschiedener *downstream*-Proteine in den Ras-transformierten NIH-3T3-Zellen.

Mit dem hier verwendeten Protokoll zur Generierung Ras-transformierter NIH-3T3-Zellen konnte ein geeignetes zelluläres Modellsystem zur Charakterisierung der onkogenen Eigenschaften von Ras-Mutationen generiert werden, welches zukünftig die Charakterisierung der intrazellulären *on-Target*-Inhibition mutantenselektiver KRas-Inhibitoren im Arbeitskreis ermöglicht. Für die Evaluation der in dieser Arbeit generierten Nukleotidanaloga zur Adressierung von KRasG13C musste jedoch zunächst eine geeignete Methode für den aktiven Transport der negativ geladenen Nukleotid-Derivate über die Zellmembran validiert werden.

3.5.2 Charakterisierung der Nukleotidanaloga in KRasG13C-mutierten Krebszelllinien

Aufgrund der negativen Ladung sind Nukleotide nicht in der Lage, die Zellmembran zu passieren, sodass in zellbasierten Assays sowie in der klinischen Anwendung häufig die entsprechenden neutralen Vorstufen (Nukleoside oder Prodrug-Derivate) zum Einsatz kommen.¹⁴⁰⁻¹⁴¹ Nach erfolgreicher Aufnahme sowie der chemischen und/oder enzymatischen Abspaltung biolabiler Schutzgruppen im Falle der Prodrug-Derivate werden intrazellulär biologisch aktive Metabolite nach sequenzieller Phosphorylierung durch entsprechende Kinasen generiert. Im Falle von unnatürlichen Nukleotidanaloga sind die Phosphorylierungsschritte aufgrund der Spezifität von Nukleosid/Nukleotid-phosphorylierenden Kinasen nur bedingt effizient. Für die Charakterisierung der dargestellten Nukleotidanaloga wurden daher verschiedene Methoden für den aktiven Transport in KRasG13C-mutierte Zellen getestet. Neben einem NTP-Transporter, der selektiv an die Nukleotidanaloga bindet und diese in die Zelle schleust, wurden mittels Elektroporation reversible Risse in der Zellmembran erzeugt, die eine Aufnahme der dargestellten Nukleotidanaloga ermöglichen sollte.

3.5.2.1 NTP-Transporter

Mit Hilfe des von Zawad *et al.* entwickelten NTP-Transporters können biologisch aktive Nukleotide direkt in Zellen transportiert werden.¹⁴² Der NTP-Transporter besteht aus einem Rezeptor, der zunächst einen nicht-kovalenten Komplex mit einem Triphosphat-Anion ausbildet, und einem zellpenetrierenden Linker, der anschließend einen Transport über die Zellmembran ermöglicht. Innerhalb der Zelle wird schließlich der komplexierte Triphosphat-Anteil von der Rezeptorstelle durch kompetitive Verdrängung mit den natürlich vorhandenen NTPs wie Adenosintriphosphat (ATP) freigesetzt (Abb. 44).

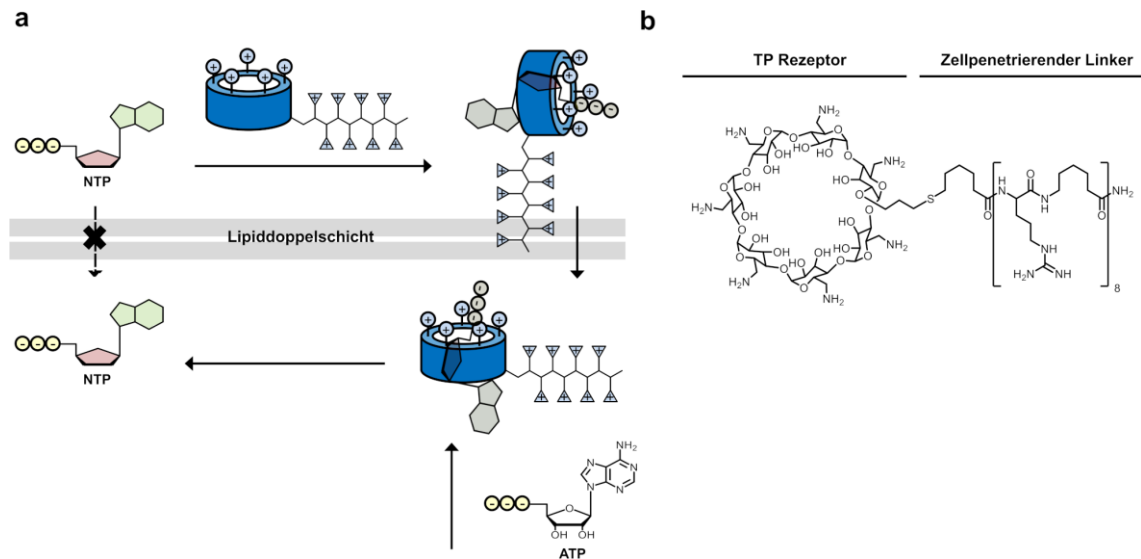


Abbildung 44 | NTP-Transporter. (a) Schematische Darstellung des hypothetischen Transportmechanismus eines NTPs durch den NTP-Transporter; (b) Chemische Struktur des NTP-Transporters, der über einen Triphosphat (TP)-Rezeptor sowie einen zellpenetrierenden Linker verfügt.

Für die zelluläre Charakterisierung von Acryl-edaGTP (**8g**), welches in massenspektrometrischen Untersuchungen zu einer besonders effizienten Adduktbildung führte, wurden die Krebszelllinien H1355 und H1734 verwendet, die eine heterozygote KRasG13C-Mutation aufweisen (Abb. A13 und A14). Die KRasG13C-mutierten Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (10, 50, 100, 500 μM) einer 1:1 Mischung des NTP-Transporters und des Nukleotidderivats behandelt und zu Kontrollzwecken zusätzlich entweder mit 500 μM NTP-Transporter oder mit 500 μM von Acryl-edaGTP behandelt. Nach einer zehnmütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Transporter-Mischung entfernt und die Zellen nach zweimaligem Waschen für weitere 24 bis 48 Stunden bei 37 $^{\circ}\text{C}$ und 5 % CO_2 inkubiert bevor Zellysate generiert wurden. Im Rahmen anschließender Western Blot-Analysen konnte sowohl in H1355-Zellen als auch in H1734-Zellen bei höheren Konzentrationen (100-500 μM) zum Teil eine dosisabhängige Runterregulierung der Phosphorylierung verschiedener *downstream*-Proteine wie pCraf, pAkt, pErk und pS6 beobachtet werden. Gleichzeitig konnte jedoch kein stabiles Phospho-Signal in den Kontrollproben, die entweder nur mit dem NTP-Transporter oder Acryl-edaGTP behandelt wurden, beobachtet werden, sodass die Runterregulierung bei höheren Konzentrationen vermutlich auf toxische Effekte beruhen (Abb. 45).

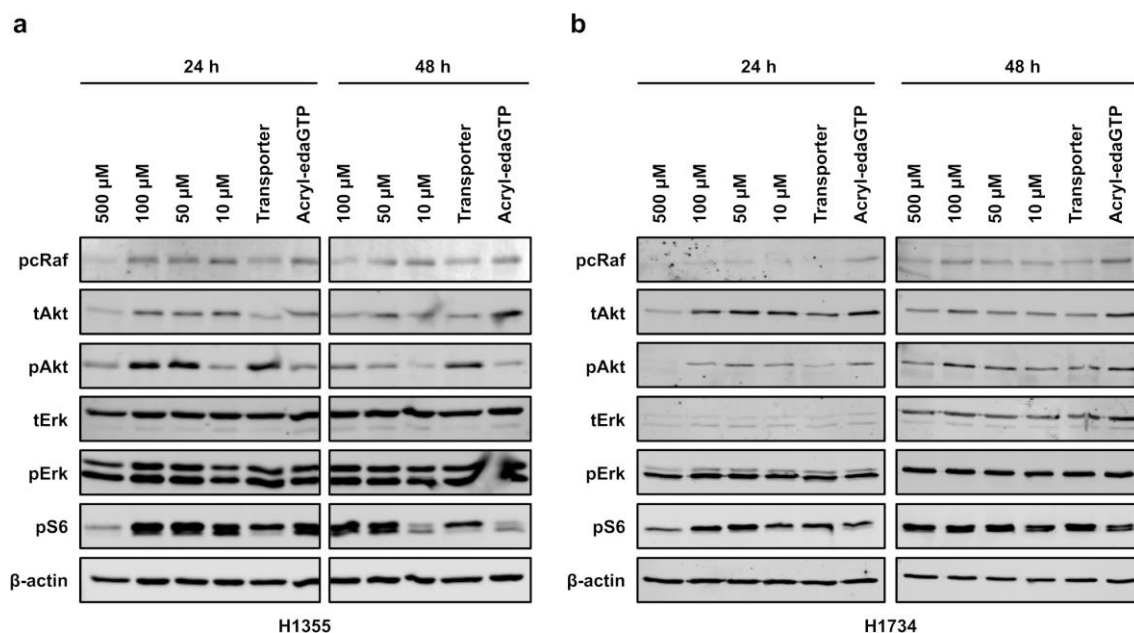


Abbildung 45 | Zelluläre Charakterisierung der Nukleotidanaloga mittels NTP-Transporter. Western Blot-Analyse nach NTP-Transporter-vermittelte Aufnahme von 10-500 μM einer 1:1 Mischung des NTP-Transporters und Acryl-edaGTP (**8g**) in (a) H1355-Zellen und (b) H1734-Zellen. Als Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich entweder mit 500 μM NTP-Transporter oder mit 500 μM von Acryl-edaGTP behandelt.

Insgesamt konnte mit Hilfe des NTP-Transporters aufgrund nicht signifikanter Veränderungen der Phosphorylierungslevel von nachgeschalteten Proteinen sowohl in H1355- als auch H1734-Zellen keine Charakterisierung der dargestellten Nukleotidanaloga vorgenommen werden. Die Interpretation der Daten ist aufgrund nicht definierter intrazellulärer Konzentration der Nukleotidanaloga sowie durch eine geringe Reaktivität dieser Verbindungen bei einem physiologischen pH-Wert derzeit nicht aussagekräftig. Nach erfolgter Optimierung des Linkers für eine bessere Ausrichtung des *warheads*, um eine effektive kovalente Bindung an KRasG13C in den Zellen auszubilden, sollte der NTP-Transporter-vermittelte Transport in zukünftige Untersuchungen zunächst mit Hilfe von Fluorophor-markierten Nukleotidderivaten wie zum Beispiel tamra-GTP oder mantGTP validiert werden.

3.5.2.2 Elektroporation

Mit Hilfe der Elektroporation wird die Durchlässigkeit der Zellmembran durch Anlegen eines elektrischen Feldes erhöht, um Makromoleküle wie Nucleinsäuren (DNA/RNA) oder Proteine in Zellen einzuschleusen.¹⁴³

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch Elektroporation von H1355-Zellen in Gegenwart von Acryl-edaGDP (**8a**) der Einfluss der Nucleotidanaloga auf die onkogene KRasG13C-Signalweiterleitung untersucht. Infolge der durch elektrische Impulse entstandenen reversiblen Risse in der Zellmembran gelangen die Nucleotidanaloga in die KRasG13C-mutierten Zellen und Veränderungen der Protein-Phosphorylierungslevel, welche Ras nachgeschaltet sind, wurden anschließend in den transfizierten Zellen mittels Western Blot analysiert (Abb. 46).

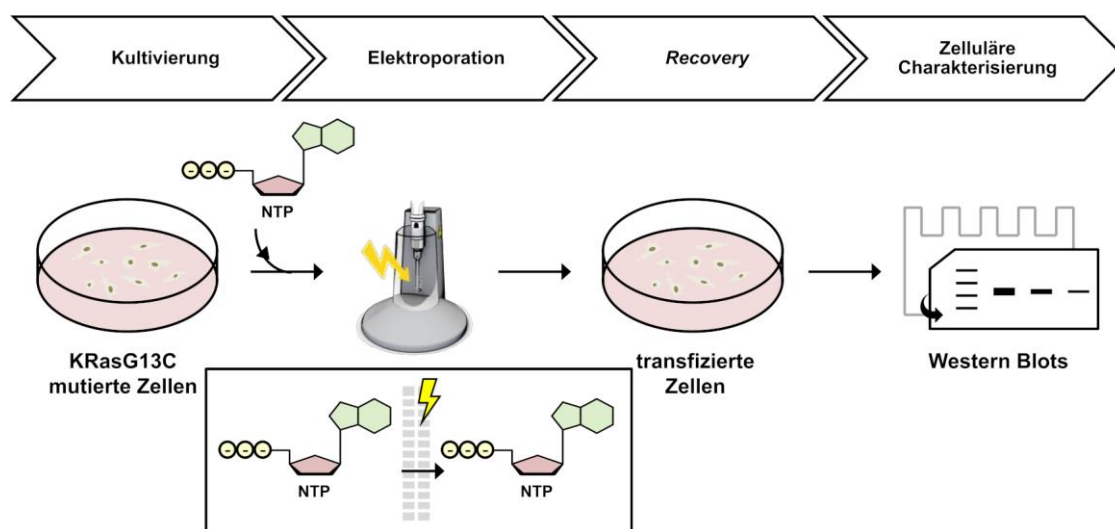


Abbildung 46 | Schematische Darstellung der Elektroporation von Nucleotidanaloga. Die KRasG13C-mutierten Zellen wurden nach erfolgreicher Kultivierung geerntet und zusammen mit den NTPs elektroporiert. Nach einer 24-stündigen *Recovery*-Periode wurden für die anschließende zelluläre Charakterisierung Western Blots angefertigt.

Da die für den Transfer verwendeten Parameter für die verschiedenen Elektroporationssysteme spezifisch sind, wurden zunächst Elektroporationsexperimente mit dem Fluorophor-markierten Nucleotidderivat tamra-edaGDP durchgeführt. Tamra-edaGDP wurde über die zuvor beschriebene Syntheseroute dargestellt, wobei im letzten Schritt die tamra-Gruppe über die Kupplung an einen aktiven Ester eingeführt wurde (Kapitel 7.11).¹⁰⁵

Für die Bestimmung der Nukleotidkonzentration wurden zunächst Elektroporationsexperimente in HeLa-Zellen durchgeführt, welche bereits als eine geeignete Zelllinie für Elektroporationen beschrieben wurde.¹⁴⁴ Die HeLa-Zellen wurden unter Variation der Nukleotidkonzentration (0-500 μM) zwei aufeinanderfolgenden elektrischen Impulsen bei 1000 V und einer Dauer von 35 ms ausgesetzt, um einen Transfer von tamra-edaGDP über die in der Zellmembran erzeugten reversiblen Risse zu ermöglichen. Nach einer 24-stündigen *Recovery* Periode wurden zur Bestimmung der optimalen Nukleotidkonzentration mikroskopische Aufnahmen angefertigt.* Erst bei einer Nukleotidkonzentration von 500 μM konnte ein rotes Fluoreszenzsignal beobachtet werden, welches auf einen erfolgreichen Transfer von tamra-edaGDP in HeLa-Zellen hindeutet (Abb. 47a). Neben der Nukleotidkonzentration müssen jedoch auch die Einstellungen des EP-Pulses (Spannung, Dauer und Anzahl der Wiederholungen) für entsprechende Experimente in den KRasG13C-mutierten H1355-Zellen optimiert werden. Bei einer gleichbleibenden Nukleotidkonzentration von 500 μM wurden daher anschließend Elektroporationsversuche in H1355-Zellen unter Variation der Spannung (800, 900 und 1000 V) durchgeführt, um einen geeigneten Kompromiss zwischen Zellviabilität und effizientem Nukleotidtransfer zu erreichen. Mit zunehmender Spannungsstärke konnte anhand eines steigenden Fluoreszenzsignals ein verbesserter Transfer von tamra-edaGDP in H1355-Zellen beobachtet werden. Zeitgleich konnte jedoch ebenfalls eine Abnahme der Zellviabilität bei hoher Spannung detektiert werden (Abb. 47b). Aufgrund des nur minimal geringer detektierten Fluoreszenzsignals und der deutlich verbesserten Zellviabilität bei einer geringeren Spannungsstärke wurde für die nachfolgenden Experimente mit den kovalenten KRasG13C-Nukleotidanaloga eine Spannung von 800 V verwendet.

* Durchführung der Mikroskopie von Dr. Stefano Maffini (AG Musacchio, MPI Dortmund).

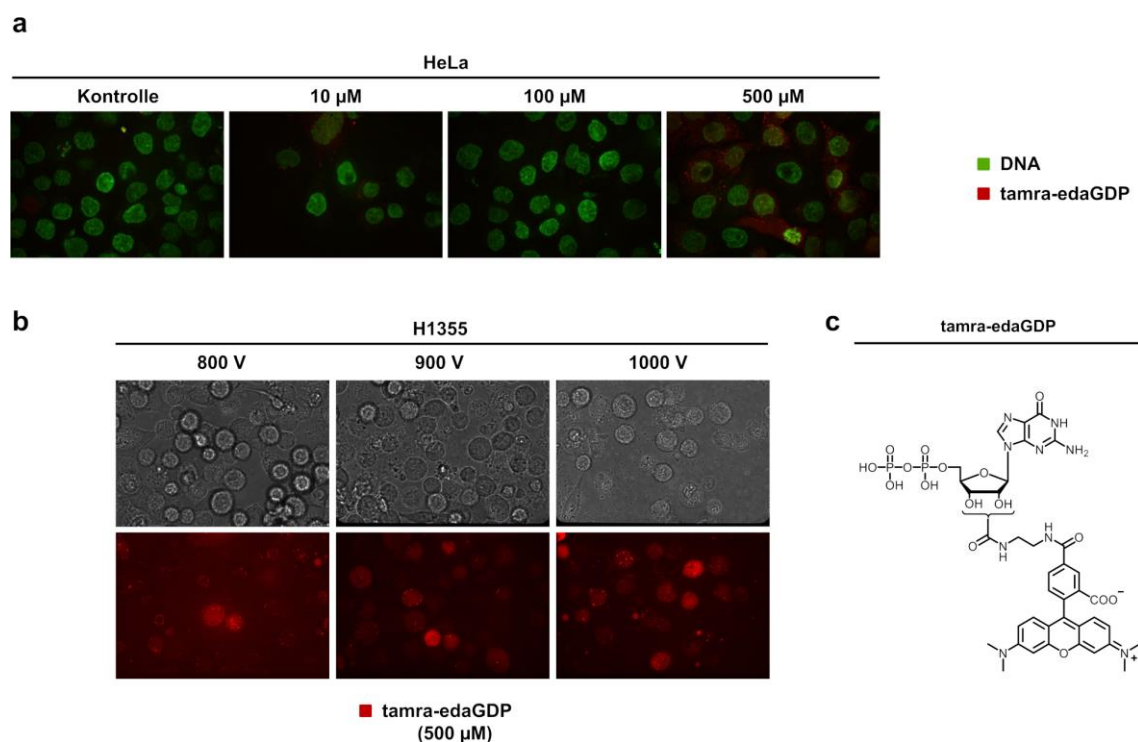


Abbildung 47 | Elektroporation von tamra-edaGDP. Zur Identifizierung der geeigneten Bedingungen wurden zunächst Elektroporationsexperimente mit tamra-edaGDP unter (a) Variation der Nucleotidkonzentration in HeLa-Zellen sowie (b) Variation der Spannung in H1355-Zellen durchgeführt; (c) Chemische Struktur von tamra-edaGDP.

Für die Elektroporation wurden zunächst drei Millionen Zellen pro Experiment geerntet und gewaschen und in einem Elektroporationspuffer resuspendiert, der bereits 500 μM des kovalent bindenden KRasG13C-Inhibitor Acryl-edaGDP (**8a**) enthielt. Darüber hinaus wurden zudem das reversible Acetyl-edaGDP-Derivat (**8d**) als Kontrolle sowie ddH₂O als zusätzliche Negativkontrolle verwendet.* Die einzelnen EP-Lösungen wurden zwei aufeinanderfolgenden elektrischen Impulsen bei 800 V und einer Dauer von 35 ms ausgesetzt, um einen Transfer der Nucleotidanaloga in die Zelle zu ermöglichen. Um nicht-internalisierte, membranassoziierte Proteine zu entfernen, wurden die Zellen anschließend gewaschen und in frisches Medium überführt. Nach einer 24- bzw. 48-stündigen *Recovery*-Periode wurden Zelllysate generiert und Western Blots angefertigt, um Veränderungen der Phosphorylierungslevel von Proteinen, welche Ras nachgeschaltet sind, zu detektieren (Abb. 48).

* Elektroporation und Western Blot-Analyse von Acryl-edaGDP in H1355-Zellen im Rahmen der Bachelorarbeit von Sandra Koska (AG Rauh, TU Dortmund).

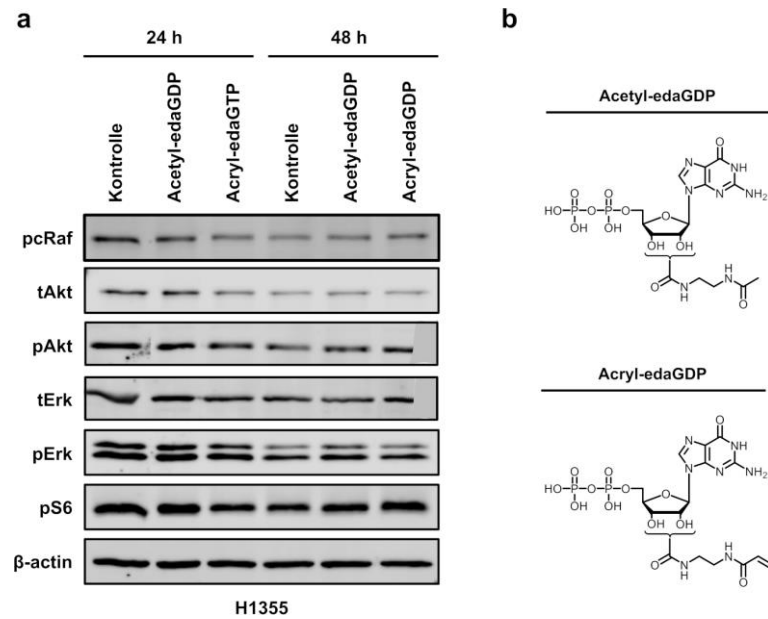


Abbildung 48 | Zelluläre Charakterisierung der Nukleotidanaloga mittels Elektroporation. (a) Western Blot-Analyse nach Elektroporation von 500 μ M Acryl-edaGDP (**8a**) und Acetyl-edaGDP (**8d**). Als Kontrolle wurde die Elektroporation mit ddH₂O-versetztem Puffer R durchgeführt; (b) Chemische Strukturen von Acetyl-edaGDP (**8a**) und Acryl-edaGDP (**8d**).

Anhand der generierten Westen Blots konnte jedoch keine spezifische Inhibition der Signalkaskade der Ras nachgeschalteten Proteine durch Acryl-edaGDP beobachtet werden. Zwar erschien die Intensität der Banden nach einer 48-stündigen *Recovery*-Periode schwächer, jedoch ist kein Unterschied zwischen Kontrolle, Negativkontrolle und Acryl-edaGDP erkennbar, sodass dies vermutlich auf eine verringerte Viabilität zurückzuführen ist.

Somit konnte mit Hilfe der Elektroporation in KRasG13C-abhängige H1355-Zellen in Gegenwart kovalent bindender Nukleotidanaloga keine Abnahme von nachgeschalteten Proteinen beobachtet werden. Dies ist vermutlich zum einen auf die hohe intrazelluläre Konzentration von GDP und GTP sowie zum anderen auf eine unvollständige Adduktbildung bei dem hier vorliegenden physiologischen pH-Wert zurückzuführen. In zukünftigen Arbeiten sollten diese Experimente daher nach erfolgter Optimierung der Reaktivität der Nukleotidanaloga wiederholt werden.

Um dennoch die Elektroporation als Werkzeug für die zelluläre Charakterisierung der Nukleotidanaloga auf die onkogene Signalweiterleitung der KRasG13C Mutante zu nutzen, wurden daher im Anschluss Elektroporationsexperimente mit rekombinant hergestellten und *in vitro* modifizierten Ras-Proteinen durchgeführt.

3.5.3 Elektroporation rekombinanter Proteine in HeLa-Zellen

Da innerhalb der zuvor beschriebenen Elektroporationsexperimente mit den generierten Nukleotiden kein Effekt auf die onkogene Ras-Signalweiterleitung beobachtet werden konnte, sollten im Anschluss entsprechende Versuche mit rekombinanten KRas-Varianten in HeLa-Zellen durchgeführt werden.

Die für die zelluläre Evaluierung benötigten Vollängen-Proteine sollten dabei zunächst erfolgreich exprimiert und gereinigt werden, wobei die G13C-Mutation vorab mittels QuickChange-Mutagenese eingeführt wurde sollte. Eine nachfolgende selektive kovalente Modifikation der KRasG13C-Mutante sollte mit Acryl-edaGDP (**8a**), bei dem im Rahmen der massenspektrometrischen Experimente eine besonders effiziente Bindungsbildung beobachtet werden konnte, durchgeführt und mittels *in vitro* Farnesylierung sowie MS/MS-Studien nachgewiesen werden. Mittels Western Blot-Analyse sollte abschließend die zelluläre Evaluierung der Nukleotidanaloga erfolgen, wobei neben KRasG13C-edaGDP als Kontrollen KRasWT, KRasG13C sowie KRasG13C:acetyledaGDP in HeLa-Zellen elektroporiert werden sollten.

3.5.3.1 Proteinexpression und -reinigung sowie Labelling der Vollängenkonstrukte

Da die Reinigung der verkürzten KRas-Konstrukte bereits erfolgreich in der Arbeitsgruppe etabliert worden war (Kapitel 3.3.1), wurde ein analoges Reinigungsprotokoll verfolgt, wobei aufgrund der hohen Reinheit des Proteins nach der zweiten Ni²⁺-Affinitätschromatographie auf eine Ionenaustauschchromatographie verzichtet wurde (Abb. 49).

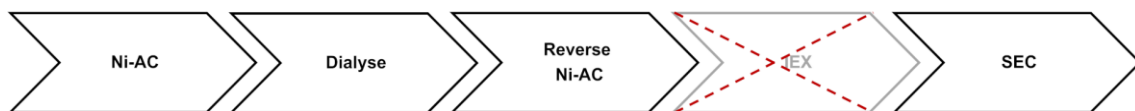


Abbildung 49 | Reinigungsprotokoll für die KRas-Vollängenkonstrukte. Nach der Isolierung der KRas-Proteine über eine Nickel-Affinitätschromatographie (Ni-AC) wurde über Nacht eine Dialyse bei zeitgleicher Abspaltung des His₆-tags durch die TEV-Protease durchgeführt. Nach einer zweiten reversen Ni-AC sowie einer Größenausschlusschromatographie (SEC) wurde das reine Protein bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Im Vergleich zu den verkürzten KRas-Proteinen konnte auf die Ionenaustauschchromatographie (IEX) im Reinigungsprotokoll verzichtet werden.

Die Reinigung der Vollängenkonstrukte ist im Anhang (Kapitel 7.12) sowohl für KRasWT als auch für KRasG13C, welches zunächst durch ortsgerichtete Mutagenese des KRas-Vollängenkonstruktes hergestellt werden musste, dargestellt (Tab. A7, Abb. A10).^{*} Insgesamt konnten die Vollängenkonstrukte durch das optimierte Reinigungsprotokoll erfolgreich in hoher Reinheit erhalten werden. Abschließende massenspektrometrische Untersuchungen bestätigten die Identität der aufgereinigten KRas-Konstrukte (Abb. 50).

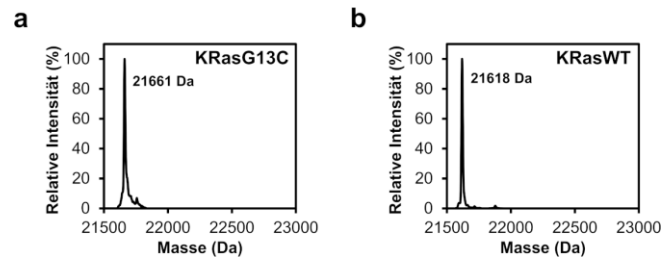


Abbildung 50 | Massenspektren der KRas-Vollängenkonstrukte. Massenspektren von (a) KRasG13C ($MW_{\text{berechnet}}$: 21664 Da) und (b) KRasWT ($MW_{\text{berechnet}}$: 21618 Da).

Die erfolgreich gereinigten KRas-Vollängenkonstrukte konnten anschließend für die zelluläre Evaluierung der synthetisierten Nukleotidanaloga mittels Elektroporation verwendet werden, wobei die G13C-Mutante zunächst kovalent mit den Nukleotidanaloga modifiziert werden musste. Im Gegensatz zu den verkürzten KRas₁₋₁₆₉-Konstrukten verfügen die Vollängenkonstrukte neben den Oberflächencysteinen C51, C80 und C118 innerhalb der hypervariablen Region (HVR) am C-Terminus über ein frei zugängliches Cystein. Durch posttranslationale Farnesylierung des in der sogenannten CAAX-Box vorkommenden Cysteins wird die für die Aktivität von Ras-Proteinen wichtige Lokalisation an der Plasmamembran vermittelt. Um demnach unerwünschte unspezifische kovalente Modifizierungen des Cysteins der CAAX-Box sowie der zusätzlichen Oberflächencysteine bei hohem pH-Wert zu verhindern, wurde zunächst ein Nukleotidaustausch bei pH 7.5 in Gegenwart von EDTA durchgeführt. Der Nukleotidaustausch wurde dabei mit einem zehnfachen Überschuss an Acryl-edaGDP (**8a**) für je drei Stunden bei 4 °C durchgeführt, da dieser Inhibitor in den vorherigen massenspektrometrischen Untersuchungen eine besonders effiziente Adduktbildung zeigte.

^{*} Expression und Aufreinigung der KRas-Vollängenkonstrukte im Rahmen der Bachelorarbeit von Sandra Koska (AG Rauh, TU Dortmund) in Zusammenarbeit mit Nadine Schmidt (technische Assistentin, AG Rauh, TU Dortmund).

Durch die anschließende Zugabe von Magnesiumchlorid wurde der Nukleotidaustausch beendet und anschließend überschüssiges Nukleotid unter Verwendung von Zentrifugeneinheiten entfernt. Nach erfolgreichem Nukleotidaustausch bei pH 7.5 lag bereits ein kleiner Teil (~10 %) der Ras-Proteine kovalent modifiziert vor, welches mit den vorangegangenen pH-abhängigen massenspektrometrischen Analysen korrespondiert (Abb. 51a). Der pH-Wert wurde anschließend auf pH 9.5 erhöht, um die kovalente Bindungsbildung zwischen dem Nukleotidanalogen und Cys13 zu begünstigen. Um das Protein anschließend wieder in einen Puffer mit physiologischem pH zu überführen und eventuell aggregiertes Protein abzutrennen, wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt (Abb. 51b).

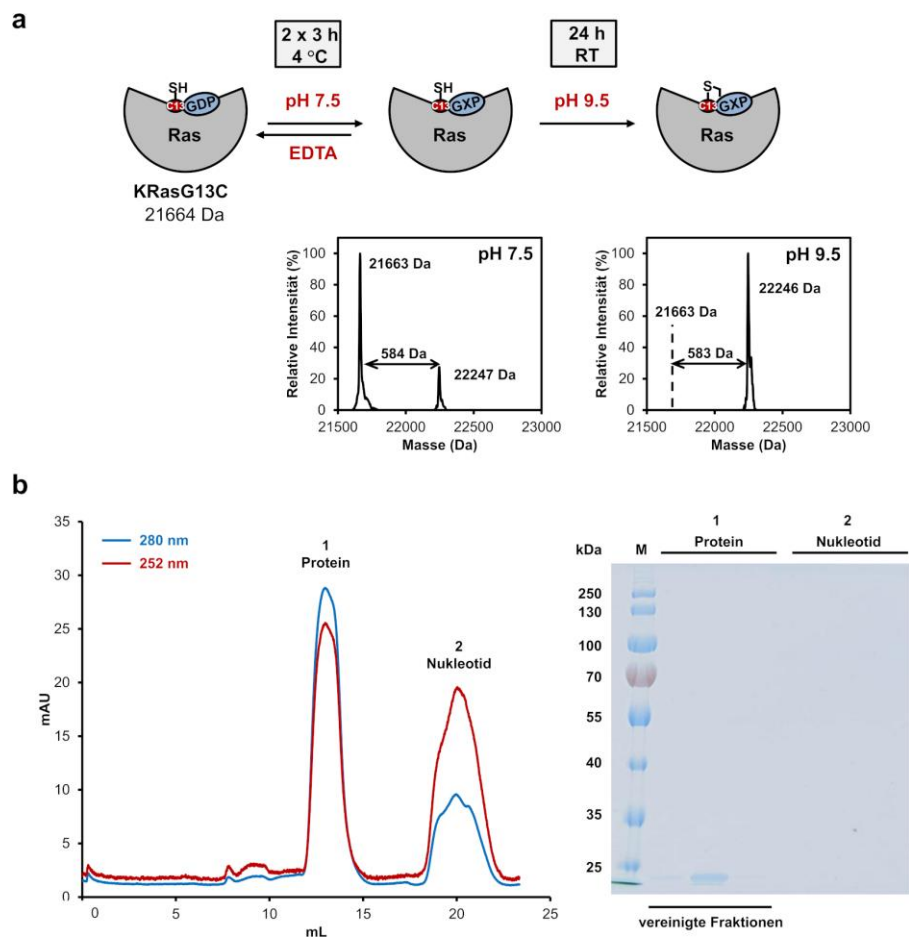


Abbildung 51 | Labelling-Experimente mit dem Volllängenkonstrukt KRasG13C. (a) Schematische Darstellung der kovalenten Modifikation von KRasG13C. Der Nukleotidaustausch wurde in Gegenwart von EDTA bei pH 7.5 durchgeführt, gefolgt von der kovalenten Modifikation von KRasG13C bei pH 9.5, um unerwünschte Modifizierung anderer Cysteine und insbesondere des Cysteins der CAAX-Box zu verhindern. Der Nukleotidaustausch und die kovalente Proteinmodifikation wurden mittels ESI-MS kontrolliert; (b) Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie (SEC) von KRasG13C-edaGDP (blau: Absorption bei 280 nm, rot: Absorption bei 252 nm) und die anschließende Analyse der Fraktionen der SEC mittels SDS-PAGE (M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder; 1: vereinigte Fraktionen).

3.5.3.2 *in vitro* Farnesylierung

Nach der erfolgreichen kovalenten Modifikation von KRasG13C mit Acryl-edaGDP wurde zur Überprüfung der Position der kovalenten Proteinmodifikation eine *in vitro* Farnesylierung durchgeführt.* Hierbei sollte überprüft werden, ob eine unspezifische Modifizierung des Cysteins der CAAX-Box stattgefunden hat.

Die Ras-Proteine wurden dabei in Gegenwart von Farnesylpyrophosphat (FPP) und der Farnesyltransferase (FTase), die die Übertragung eines Farnesylrests von FPP auf das Cystein innerhalb der CAAX-Box von Ras katalysiert, inkubiert.¹⁴⁵⁻¹⁴⁶ Neben dem zuvor hergestellten KRasG13C-edaGDP wurde zudem KRasWT als Kontrolle für eine Stunde bei Raumtemperatur *in vitro* farnesyliert. Die kovalente Proteinmodifikation wurde im Anschluss mit Hilfe massenspektrometrischer Untersuchungen überprüft und es konnte sowohl für KRasG13C-edaGDP als auch für KRasWT eine vollständige Farnesylierung detektiert werden. Innerhalb des Massespektrums konnte dabei eine Verschiebung der Signale um die Masse einer Farnesylgruppe (~205 Da) beobachtet werden (Abb. 52).

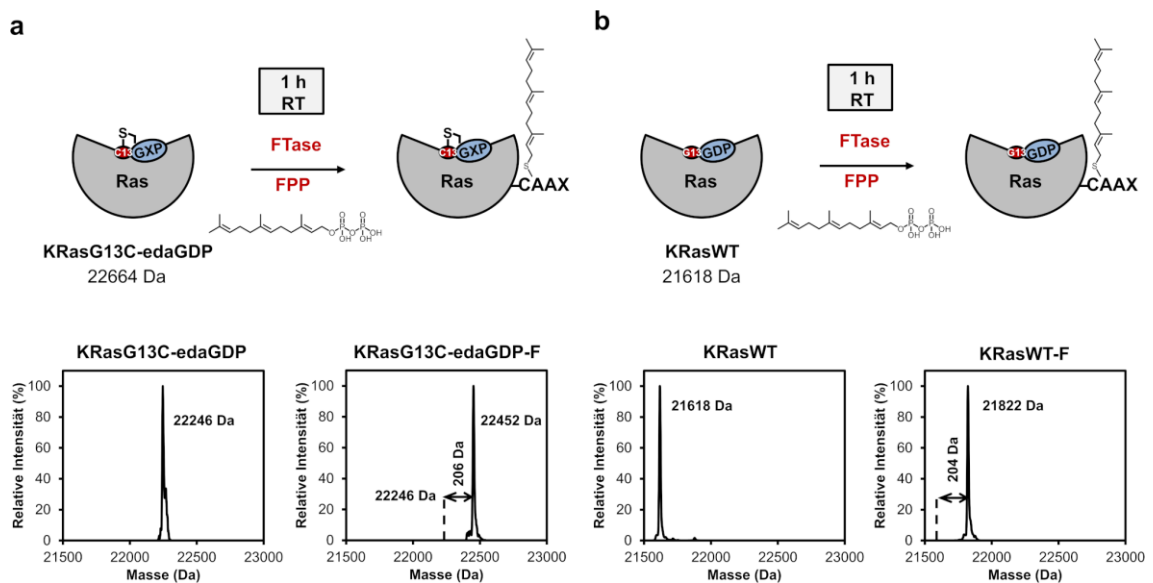


Abbildung 52 | *In vitro* Farnesylierung. Schematische Darstellung der *in vitro* Farnesylierung von (a) KRasG13C-edaGDP und (b) KRasWT als Kontrollexperiment. Die posttranslationale Modifikation wurde mittels ESI-MS kontrolliert, wobei sowohl für KRasG13C-edaGDP als auch für KRasWT eine vollständige Farnesylierung des freien Cysteins in der CAAX-Box beobachtet werden konnte.

* Durchführung der *in vitro* Farnesylierung in Kooperation mit Dr. Amrita Rai (AG Goody, MPI Dortmund).

Eine vollständige Farnesylierung von KRasG13C-edaGDP deutet somit auf ein freies Cystein innerhalb der CAAX-Box hin und ist somit ein indirekter Nachweis für die ausschließliche kovalente Bindung von edaGDP an das mutierte Cystein innerhalb der Nukleotidbindetasche von Ras.

3.5.3.3 MS/MS-Experimente

Neben einer *in vitro* Farnesylierung wurden zudem MS/MS-Experimente mit KRasG13C-edaGDP durchgeführt, um die Position der kovalenten Proteinmodifikation zu verifizieren.*

Für die MS/MS-Experimente wurden KRasG13C-edaGDP sowie KRasG13C als Kontrolle zunächst proteolytisch mit Trypsin verdaut und anschließend per Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Mittels HPLC und gekoppelter ESI-MS/MS konnte anhand der aus dem tryptischen Verdau erhaltenen Peptide eine nahezu vollständige Sequenzabdeckung nachgewiesen werden. Bis auf den C-Terminus der Ras-Proteine, der aufgrund der darin vorkommenden multiplen Lysinseitenketten von Trypsin mehrfach geschnitten und daher nicht aufgelöst werden konnte, wurden alle anderen resultierenden Sequenzfragmente der Ras-Proteine identifiziert (Abb 53a). Ein direkter Nachweis für die kovalente Proteinmodifikation von Cys13 in der Nukleotidbindetasche konnte durch die Tandem-Massenspektroskopie jedoch nicht erzielt werden, da die Modifikation vermutlich an der Amidbindung innerhalb des Linkers von edaGDP fragmentiert. Bei der Verwendung der GluC-Protease und anschließender MS/MS konnte ebenfalls keine Adduktbildung beobachtet werden, wengleich hier aufgrund der GluC-Schnittstellen die komplette Sequenz abgedeckt werden konnte (Tab. A12). Durch den Vergleich der Peptidintensitäten bei dem tryptischen Verdau von KRasG13C-edaGDP und KRasG13C konnte jedoch gezeigt werden, dass die Intensitäten der Peptide GHMTEYKLVVGAGCVGK und LVVVGAGCVGK, die das vermutlich modifizierte Cystein in Position 13 enthalten, bei KRasG13C-edaGDP (Probe s2) deutlich geringer waren als bei KRasG13C (Probe s1), welches ein Hinweis auf eine kovalente Modifikation von Cys13 ist. Alle anderen Peptide der unmodifizierten und modifizierten Proteine hingegen wiesen eine vergleichbare Intensität auf (Abb. 53b und c).

* Durchführung der MS/MS-Experimente in Kooperation mit Dr. Petra Janning (AG Waldmann, MPI Dortmund).

Neben den beiden Cystein-enthaltenen Peptiden war jedoch auch die Intensität des Startpeptids GHMTEYK bei KRasG13C-edaGDP deutlich geringer als bei den unmodifizierten Proteinen, da vermutlich das Lys6 für einen Angriff von Trypsin durch die in direkter räumlicher Nähe befindliche kovalenten Modifikation von Cys13 blockiert wird.

a

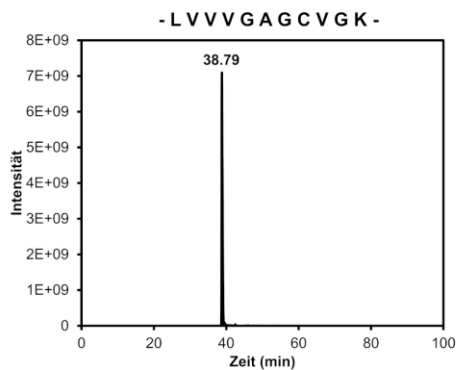
```

      10      20      30      40      50      60      70      80
GH MTEYKLVVVG ACVVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET CLLDILDITAG QEEYSAMRDQ YMRTGGGFLC
      90      100     110     120     130     140     150     160
KRas VFAINNTKSF EDIHHYREQI KRVKDSEDPV MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ GVDDAFYTLV
      170     180     188
REIRKHKEKM SKDGKSKKKK SKTKCVIM
    
```

b

Sequenz	Start Position	End Position	KRasG13C				KRasG13C-edaGDP				MW s1	MW s2	MW s2
			Intensität s1-a	Intensität s1-b	Intensität s1-c	Intensität s1-d	Intensität s2-a	Intensität s2-b	Intensität s2-c	Intensität s2-d			
			GHMTEYK	-2	5	1.8E+09	2.1E+09	2.4E+09	4.1E+08				
GHMTEYKLVVVGAGCVGK	-2	16	2.1E+09	1.6E+09	7.1E+08	1.7E+09			1.1E+07	1.6E+07	1.5E+09	1.4E+07	109.4
LVVVGAGCVGK	6	16	5.6E+10	5.3E+10	4.6E+10	5.3E+10			3.9E+09		5.2E+10	3.9E+09	13.5
SALTIQLIQNHFVDEYDPTIEDSYR	17	41	4.3E+10	5.0E+10	3.7E+10	4.1E+10	4.0E+10	4.1E+10	4.6E+10	2.7E+10	4.3E+10	3.8E+10	1.1
KQVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMR	42	68	1.4E+10	1.6E+10	1.1E+10	1.3E+10	9.4E+09	1.1E+10	1.2E+10	5.1E+09	1.3E+10	9.4E+09	1.4
QVVIDGETCLLDILDITAGQEEYSAMR	43	68	2.2E+10	2.9E+10	2.3E+10	2.1E+10	1.2E+10	2.0E+10	2.2E+10	6.0E+09	2.4E+10	1.5E+10	1.6
TGEGFLCVFAINNTK	74	88	2.8E+10	2.8E+10	2.4E+10	2.6E+10	1.9E+10	2.4E+10	2.3E+10	1.3E+10	2.6E+10	2.0E+10	1.3
TGEGFLCVFAINNTKSFEDIHHR	74	97	4.5E+08	6.0E+08	3.9E+08	2.3E+08	1.7E+08	3.7E+08	1.2E+08	1.1E+08	4.2E+08	1.9E+08	2.2
SFEDIHHR	89	97	9.0E+10	5.4E+10	5.1E+10	4.7E+10	2.3E+10	4.0E+10	3.8E+10	2.5E+10	6.1E+10	3.2E+10	1.9
VKDSEDPV MVLVGNK	103	117	4.4E+10	5.9E+10	3.6E+10	9.9E+09	7.8E+09	1.7E+10	1.4E+10	9.4E+09	3.7E+10	1.2E+10	3.1
VKDSEDPV MVLVGNKCDLPSR	103	123	1.4E+08	1.2E+08	1.8E+08	2.2E+08	6.4E+07	1.3E+08	1.3E+08		1.7E+08	1.1E+08	1.5
DSEDPV MVLVGNK	105	117	1.5E+10	1.8E+10	1.2E+10	1.5E+10	5.7E+09	1.5E+10	1.4E+10	4.0E+09	1.5E+10	9.6E+09	1.6
TVDTKQAQDLAR	124	135	2.7E+08	3.5E+08	2.4E+08	4.4E+08	9.4E+07	5.7E+07	3.2E+07	1.1E+07	3.3E+08	4.8E+07	6.7
SYGIPFIETSAK	136	147	4.5E+10	4.8E+10	3.6E+10	4.0E+10	3.2E+10	4.0E+10	4.1E+10	1.8E+10	4.2E+10	3.3E+10	1.3
QGVDDAFYTLVR	150	161	4.0E+10	4.6E+10	3.7E+10	4.3E+10	2.7E+10	3.6E+10	3.6E+10	1.7E+10	4.1E+10	2.9E+10	1.4

c



d

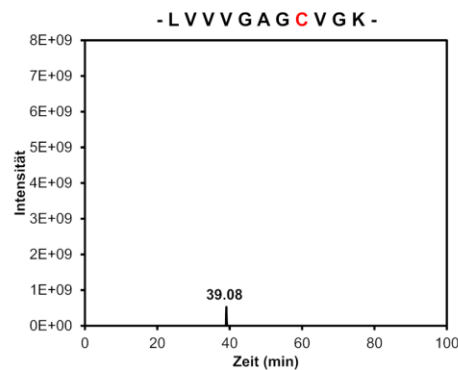


Abbildung 53 | MS/MS-Experimente. (a) Übersicht über die Sequenzabdeckung. Die identifizierten Bereiche des Proteins sind grün markiert; (b) Vergleich der Intensitäten aller Peptide von KRas nach tryptischem Verdau, die in allen vier Replikaten des unmodifizierten Proteins mit einer Intensität von mindestens 1E8 detektiert wurden; (c) Ionenchromatogramm des Peptids LVVVGAGCVGK (m/z: 529,805+-5 ppm, 2-fach geladen) für KRasG13C und (d) KRasG13C-edaGDP.

Zusammengefasst lieferten die massenspektrometrischen Analysen neben der *in vitro* Farnesylierung ebenfalls einen indirekten Nachweis für die kovalente Adressierung von Cys13 der KRasG13C-Vollängenkonstrukte mit den dargestellten Nukleotidanaloga.

3.5.3.4 Western Blots

Nach erfolgreicher Expression und Reinigung der KRas-Volllängenkonstrukte sowie der selektiven Modifikation der KRasG13C-Mutante mit Acryl-edaGDP und deren Validierung über *in vitro* Farnesylierung und MS/MS-Untersuchungen wurde der Einfluss der Nukleotidanaloga nach Elektroporation der entsprechend modifizierten Proteine zellulär charakterisiert.

Im Vergleich zu den vorangegangenen Elektroporationsexperimenten mit den Nukleotidanaloga in KRasG13C-mutierten Zelllinien wurden HeLa-Zellen als Modellsystem für die zelluläre Evaluierung der Nukleotidderivate mittels Elektroporation rekombinanter Ras-Proteine verwendet.* Für die Elektroporation der KRas-Volllängenkonstrukte (KRasWT, KRasG13C und KRasG13C-edaGDP) wurden zunächst drei Millionen Zellen pro Experiment geerntet, gewaschen und in einem Elektroporationspuffer resuspendiert, der bereits steigende Konzentrationen (0, 50, 100, 200 und 300 µg) der jeweiligen KRas-Proteine enthielt. Die Proteinlösungen wurden zwei aufeinanderfolgenden elektrischen Impulsen bei 1000 V und einer Dauer von 35 ms ausgesetzt, die einen Transfer der KRas-Proteine in die Zelle ermöglichen sollten. Um nicht-internalisierte, membranassoziierte Proteine zu entfernen, wurden die Zellen anschließend gewaschen und in frisches Medium überführt. Nach einer 24-stündigen *Recovery*-Periode wurden Zelllysate generiert und Western Blots angefertigt, um Veränderungen der Phosphorylierungslevel von Proteinen, welche Ras nachgeschaltet sind, nach der Elektroporation von kovalent modifiziertem KRasG13C-edaGDP im Vergleich zu KRasG13C sowie KRasWT zu detektieren. Zusätzlich wurden ebenfalls Elektroporationsexperimente mit KRasG13C:acetyledaGDP als Kontrolle durchgeführt (Abb. A23). Für alle KRas-Varianten konnte erwartungsgemäß ein konzentrationsabhängiger Anstieg an KRas beobachtet werden, welches auf einen erfolgreichen Transfer der rekombinanten Proteine über die Zellmembran in die HeLa-Zellen hindeutet (Abb. 54a-c, Abb. A23-A25). Die dabei teilweise auftretende Massenverschiebung von elektroporiertem KRas (50–300 µg) im Vergleich zu intrinsisch exprimiertem Protein (0 µg) ist dabei möglicherweise auf eine nicht vollständige Farnesylierung und C-terminale Prozessierung zurückzuführen (Abb. A25). Für KRasG13C und KRasG13C:acetyledaGDP konnte anhand der nachgewiesenen Bandenintensitäten eine konzentrationsabhängige Aktivierung des Signalwegs und eine Hochregulierung von

* Planung der Elektroporationsexperimente in Kooperation mit Dr. Stefano Maffini (AG Musacchio, MPI Dortmund).

pcRaf, pAkt, pErk und pS6 beobachtet werden (Abb. 54b und d, Abb. A23). Für kovalent modifiziertes KRasG13C-edaGDP konnte hingegen, ähnlich wie für KRasWT, kein Anstieg der Phosphorylierungslevel der nachgeschalteten Proteine detektiert werden (Abb. 54a, c und d). KRas-edaGDP ist somit aufgrund der kovalenten Proteinmodifikation im inaktiven Zustand gefangen und eine onkogene KRasG13C-Signalweiterleitung gehemmt.

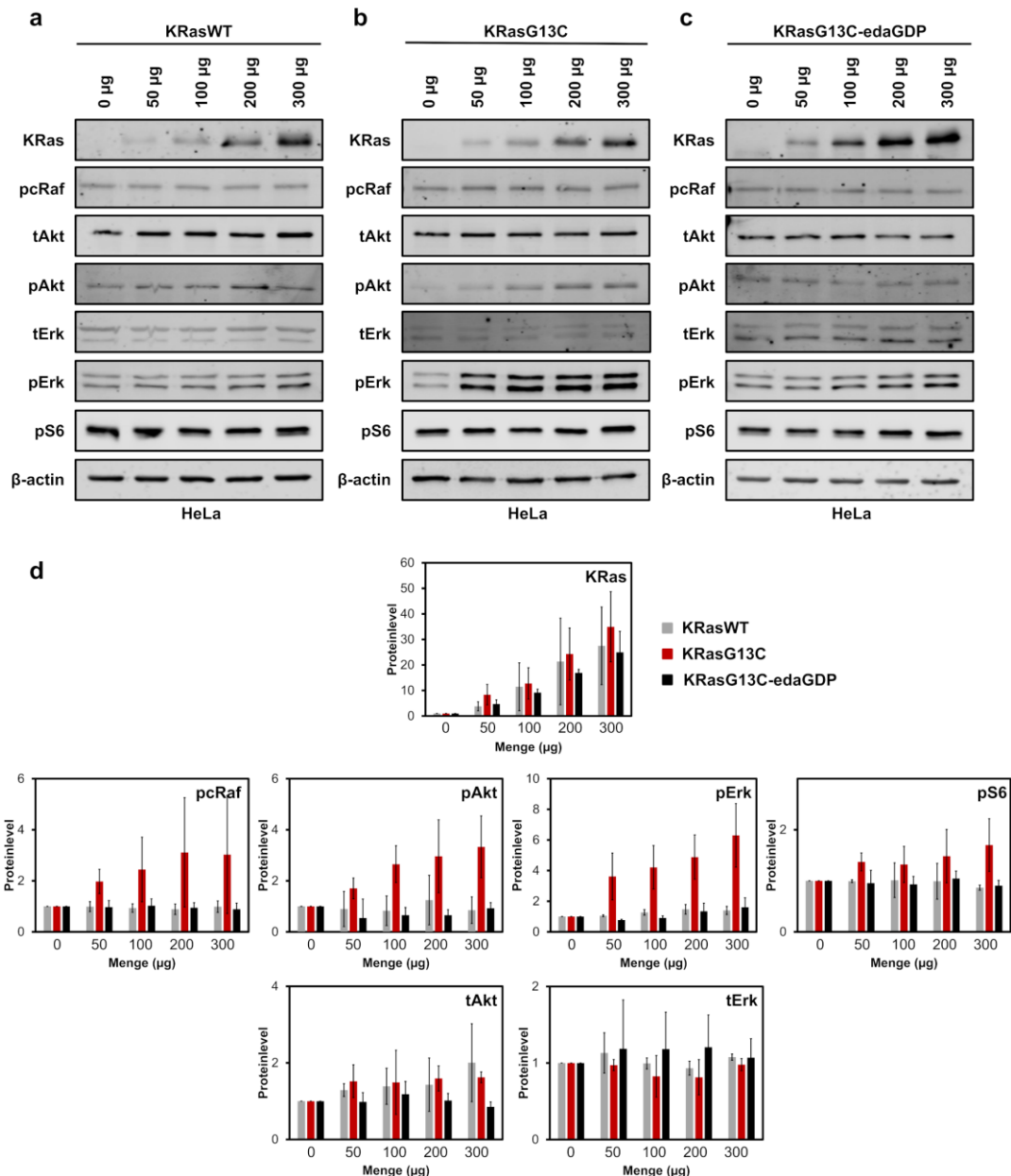


Abbildung 54 | Zelluläre Evaluierung nukleotidbasierter kovalenter Inhibitoren. Western Blot-Analyse nach Elektroporation der angegebenen Mengen der KRas-Volllängenkonstrukte **(a)** KRasWT, **(b)** KRasG13C und **(c)** KRasG13C-edaGDP in HeLa-Zellen; **(d)** Die Quantifizierung der Western Blots wurde mit Empiria Studio (Li-Cor) durchgeführt. Das mittlere Proteinlevel wurde gegen steigende Proteinmengen aufgetragen. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für jede Messung (n = 3). Die Replikate sind im Anhang dargestellt (Abb. A24).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch die Methode der Elektroporation von rekombinanten KRas-Proteinen und der selektiven Modifikation der G13C-Mutante *in vitro* ein Modellsystem generiert wurde, durch welches der onkogene Effekt des Ras-Proteins *in vivo* quantifiziert und die Wirkung der Nukleotid-basierten Inhibitoren gezeigt werden kann.

Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit nach dem erfolgreichen Beispiel der selektiven Inhibition von KRasG12C durch Shokat und Kollegen erstmals die KRasG13C-Mutante erfolgreich adressiert, welches einen Meilenstein in der personalisierten Medizin von KRasG13C-getriebenen Krebserkrankungen darstellt.

4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Die kleine GTPase Ras nimmt aufgrund ihrer Funktion als molekularer Schalter eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion essentieller zellulärer Prozesse ein. Ras-Proteine sind jedoch die am häufigsten mutierten Onkogene in menschlichen Tumoren, darunter drei der tödlichsten Formen (Lungen-, Darm- und Bauchspeicheldrüsenkrebs), und stellen daher attraktive therapeutische Ziele in der Wirkstoffforschung dar. Eine bei Lungenkrebs weit verbreitete genetische Läsion ist die KRasG12C-Mutation, welche erst kürzlich nach Identifizierung der bis dahin unentdeckten *switch-II*-Tasche erfolgreich adressiert werden konnte.⁴⁷ Im Zuge nachfolgender intensiver Forschung wurde der KRasG12C-Inhibitor Sotorasib (LUMAKRAS™) entwickelt, der im Mai 2021 die Zulassung für die Behandlung von KRasG12C-mutiertem NSCLC erlangte und erstmals die therapeutische Anfälligkeit von mutierten KRas-Proteinen demonstrierte. Neben der KRasG12C-Mutation gibt es jedoch noch eine weitere prominente Cystein-Mutation innerhalb des P-loops. Diese KRasG13C-Mutation, die insbesondere in Lungen- und Darmkrebs vorkommt, ist jedoch als Zielstruktur in der zielgerichteten Krebstherapie noch weitestgehend unerforscht.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieser Arbeit mittels strukturbasiertem Wirkstoffdesign Nukleotidanaloga entwickelt, welche einen Thiol-reaktiven Linker an den 2',3'-OH-Gruppen der Ribose für eine kovalente Proteinmodifikation tragen. Innerhalb von massenspektrometrischen Experimenten konnte eine selektive Adressierung der KRasG13C-Mutation beobachtet werden, ohne dabei KRasG12C oder KRasWT zu adressieren.

Aufgrund der hohen Affinität von GDP/GTP für Ras sowie der hohen zellulären Nukleotidkonzentration wurde anschließend eine detaillierte kinetische Charakterisierung durchgeführt, innerhalb welcher die Affinitäten der Nukleotidanaloga gegenüber Ras bestimmt wurden. Neben der Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante für die Nukleotidassoziation (k_{on}) mit einer bereits etablierten *stopped-flow* Methode konnte zur tiefergehenden Evaluierung der Bindungskinetiken ein HPLC-basierter Assay zur weiteren Evaluation der Affinitäten erfolgreich etabliert werden. Die Affinitäten der synthetisierten Nukleotidderivate waren dabei mit denen der unmodifizierten Nukleotide vergleichbar, sodass der eingeführte Linker an der 2',3'-Position der Ribose keinen Einfluss auf die reversible Affinität hat.

Im Rahmen der biochemischen Charakterisierung wurde zudem die Interaktion der KRasG13C-Mutation mit dem Guaninnukleotidaustauschfaktor (GEF) SOS sowie dem GTPase-aktivierenden Protein (GAP) RasGAP p120 untersucht. Dabei konnte zum einen gezeigt werden, dass KRasG13C im Vergleich zum Wildtyp eine drastisch erhöhte intrinsische Nukleotidaustauschrate besitzt, welches die onkogene Eigenschaft dieser Mutante erklärt und die Dringlichkeit der Entwicklung von selektiven KRasG13C-Inhibitoren für die Anwendung in der Präzisionsmedizin widerspiegelt. Im Gegensatz zu KRasWT sowie KRasG13C:acetyledaGDP konnte infolge einer kovalenten Proteinmodifikation für KRasG13C-edaGDP kein GEF-katalysierter Nukleotidaustausch beobachtet werden, sodass kovalent modifiziertes KRasG13C im inaktiven Zustand gefangen ist. Um die Interaktion mit GAPs zu evaluieren wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl die intrinsische als auch die GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse mit Hilfe eines HPLC-basierten Assays gemessen. Während die intrinsische GTP-Hydrolyse von KRasG13C mit der von KRasWT vergleichbar war und sogar schneller als bei der KRasG12C-Mutante ablief, konnte in Gegenwart von Ras-GAP für kovalent modifizierte KRasG13C jedoch keine gesteigerte GTP-Hydrolyse beobachtet werden. Durch eine Modellierung des Ras-RGS3-Komplexes konnte jedoch gezeigt werden, dass RGS3 durch einen Argininfinger-unabhängigen Mechanismus die GAP-Aktivität auf G12- oder G13-substituierte KRas-Proteine vermutlich vermitteln kann.

Innerhalb dieser Arbeit konnten zudem Komplexkristallstrukturen der onkogenen KRasG13C-Mutanten sowohl im edaGDP als auch im bdaGDP-gebundenen Zustand erhalten werden, die den zuvor erwarteten Bindemodus sowie die kovalente Bindungsknüpfung an Cys13 bestätigten. Hierbei lag in der Nukleotidbindetasche lediglich das jeweilige 3'-Isomer der Nukleotidanaloga gebunden vor, welches in Übereinstimmung mit den MS-Experimenten steht, in denen die entsprechenden Deoxy-Derivate im Vergleich zu den gemischten Isomeren eine höhere Effizienz der kovalenten Proteinmodifikation zeigten. Für edadGTP konnte dabei eine besonders effiziente Bindungsbildung beobachtet werden, welches vermutlich auf eine begünstigte Orientierung des *warhead* zurückzuführen ist. Um die kovalente Modifikation von KRasG13C zu optimieren, könnte daher zukünftig basierend auf den eda-Deoxynukleotiden die Flexibilität des Linkers weiter reduziert werden, indem rigide zyklische Linker eingesetzt werden (Abb. 55).

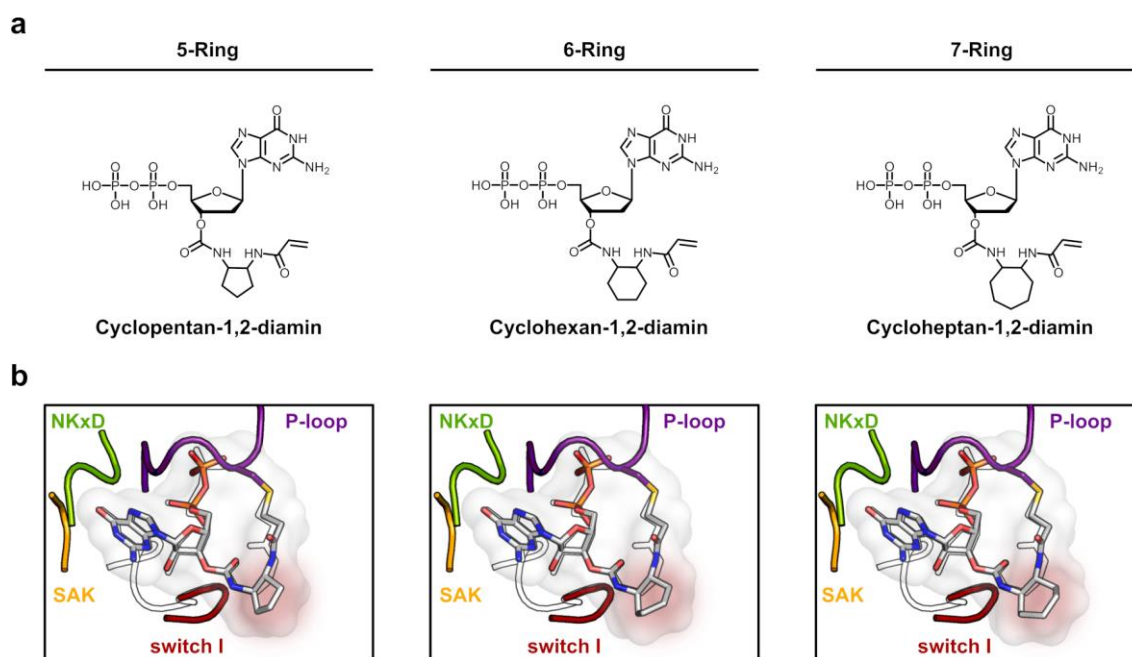


Abbildung 55 | Dockingposen potentieller Nukleotidanaloga mit einem zyklischen Linker. (a) Chemische Strukturen der potentiellen kovalent Nukleotidanaloga, die an der 3'-Position der Ribose einen zyklischen Linker mit einem terminalen *warhead* aufweisen. **(b)** Dockingposen der drei Nukleotidderivate in KRasG13C-edaGDP (weiss). Das Docking wurde mit LigandScout durchgeführt.¹⁴⁷

Eine geeignete Modifizierung des Linkers zwischen dem Nukleotid und dem elektrophilen *warhead* könnte darüber hinaus auch KRasG12C zu einem möglichen Ziel der Adressierung entsprechender Nukleotidanaloga machen.

Im aktiven Zentrum der KRasG13C-Kristallstrukturen konnte interessanterweise kein Magnesiumion beobachtet werden, obwohl eine Metallkoordination für die stabilisierte Bindung von Nukleotiden essentiell ist. Die daraufhin bestimmte Magnesium-Affinität von KRasG13C war dabei mit der von KRasWT vergleichbar, sodass das fehlende Mg^{2+} -Ion vermutlich auf das im Kristallisationspuffer vorkommende NH_4F bzw. NaF und die daraus resultierende Bildung von schwer löslichem MgF_2 zurückzuführen ist. Um diese These zu bestätigen, könnten in Zukunft weitere Screeningexperimente zur Kristallisation von KRasG13C in Abwesenheit von entsprechenden komplexierenden Reagenzien durchgeführt werden.

Mit den innerhalb dieser Arbeit generierten Kristallstrukturen wurden zudem Computergestützte Berechnungen sowie Modellierungen durchgeführt. Zum einen wurden die pK_a -Werte der Cysteine an Position 12 und 13 bestimmt, um die Reaktivitäten von Cy13 und Cys12 vergleichend zu untersuchen.

Der pK_a -Wert des Cysteins der G13C-Mutante liegt dabei in der gleichen Größenordnung (~ 10) wie der der G12C-Mutante, welche in der Vergangenheit bereits erfolgreich adressiert werden konnte. Die G13C-Mutation sollte demnach über die im Rahmen dieser Arbeit generierten kovalent bindenden Nukleotidanaloga hinaus ebenfalls durch niedermolekulare arzneimittelähnliche Verbindungen adressierbar sein. Neben einem wie in dieser Arbeit beschriebenen strukturbasierten Ansatz könnte daher zudem ein Screening-basierter Ansatz von kommerziell erhältlichen Fragmentbibliotheken verwendet werden, um selektive und kovalent-bindende kleine Moleküle als Inhibitoren für KRasG13C zu entwickeln.

Zum anderen wurden ebenfalls weitere Modellierungen von KRas-edaGDP mit der GAP-Domäne von RasGAP sowie RGS3 durchgeführt. Wie bereits zuvor postuliert führt neben der G13C-Mutation ebenfalls der angeheftete Linker der Nukleotidanaloga zu einem sterischen Zusammenstoß mit dem katalytischen Argininfinger von Ras-GAP. Der katalytische Asparaginrest hingegen, der die GAP-Aktivität von RGS3 gegenüber KRas vermittelt, zeigt sich in den Modellen dem P-loop abgewandt und wird somit wahrscheinlich weniger von der G13C-Mutation sowie dem angehefteten Linker der Nukleotidderivate beeinflusst (Abb. 56). Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte zusätzlich die GTP-Hydrolyse von KRasG13C im GTP-gebundenen sowie kovalent-modifiziertem Zustand in Gegenwart von RGS3-GAP untersucht werden.

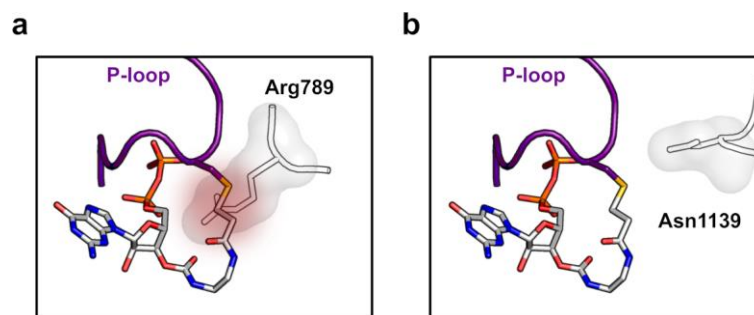


Abbildung 56 | KRasG13C-edaGDP-GAP-Komplex. (a) Modellierung von KRasG13C-edaGDP im Komplex mit der RasGAP-Domäne basierend auf der Kristallstruktur des Ras-RasGAP-Komplexes (PDB: 1wq1); (b) Modellierung von KRasG13C-edaGDP im Komplex mit der GAP-Domäne von RGS3 basierend auf der AlphaFold-Struktur von RGS3, der $G\alpha 1$ -RGS3-Komplexstruktur (PDB: 1agr) sowie der Kristallstruktur des Ras-RasGAP-Komplexes (PDB: 1wq1).

Im Rahmen der zellulären Charakterisierung wurden zunächst aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit von KRasG13C-abhängigen Krebszelllinien verschiedene Modelle zur Generierung solcher mutierten Zelllinien untersucht.

Wohingegen mit Hilfe des Ba/F3-Systems lediglich KRasG12C-abhängige Zellen generiert werden konnten, stellte sich die Generierung Ras-mutierten NIH-3T3-Zellen als vielversprechende Strategie heraus. Nach erfolgter Transfektion konnte neben KRasWT und KRasG12C ebenfalls für KRasG13C eine Hochregulierung des Ras-Signalweges beobachtet werden, welches eine erfolgreiche Überexpression vom Wildtyp-Protein sowie die onkogene Eigenschaften der Mutationen widerspiegelt. Aufgrund der durchgeführten transienten Transfektion erfolgte die Expression der KRas-Varianten lediglich über einen kurzen Zeitraum. Im Gegensatz dazu würden stabil transfizierte NIH-3T3-Zellen die permanent anhaltende Expression mutierter KRas-Proteine erlauben.¹⁴⁸

Für die zelluläre Charakterisierung der generierten Nukleotidanaloga wurden verschiedene Methoden für den aktiven Transport der negativ geladenen Nukleotidderivate über die Zellmembran validiert. Nach der Untersuchung von NTP-Transporter-vermittelten Transfer sowie der Elektroporation der Nukleotidanaloga in KRasG13C-mutierte Krebszelllinien konnte schließlich mittels Elektroporation rekombinanter KRas-Proteine in HeLa-Zellen eine robuste Methode für eine initiale zelluläre Charakterisierung der dargestellten Nukleotidanaloga identifiziert und etabliert werden. Hierfür wurden die entsprechenden KRas-Vollängenproteine exprimiert und gereinigt sowie KRasG13C kovalent mit Acryl-edaGDP (**8a**) modifiziert. Die kovalente Modifikation der KRasG13C-Mutante wurde anschließend mittels *in vitro* Farnesylierung und MS/MS-Studien nachgewiesen. Mittels Western Blot-Analyse erfolgte die zelluläre Evaluierung der Nukleotidanaloga, innerhalb welcher für KRasG13C, welches aufgrund der kovalenten Proteinmodifikation im inaktiven Zustand gefangen ist, eine Inhibition der onkogenen Signalweiterleitung beobachtet werden konnte.

Somit konnte nach dem erfolgreichen Beispiel der selektiven Inhibition von KRasG12C durch Shokat und Kollegen im Rahmen dieser Arbeit erstmals die bisher weitestgehend unerforschte KRasG13C-Mutante mit Hilfe von Nukleotid-basierten kovalenten Inhibitoren erfolgreich adressiert und so ein Meilenstein in der personalisierten Medizin von KRasG13C-getriebenen Krebserkrankungen erzielt werden.

Weitere Optimierungen der Nukleotidanaloga hinsichtlich der Zellpermeabilität durch die Synthese der entsprechenden Prodrug-Derivate, bei denen die negative Ladung der Phosphate durch Veresterungen maskiert werden, werden derzeit untersucht (Abb. 57).*

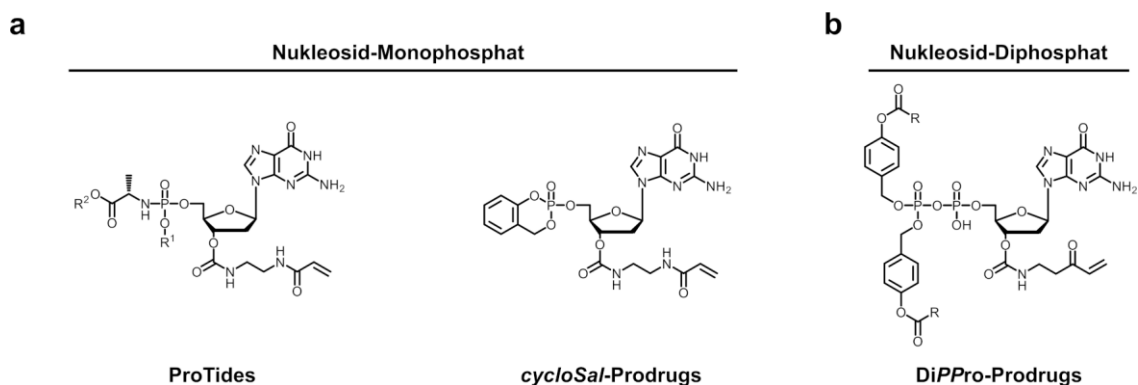


Abbildung 57 | Zielstrukturen potentieller Nukleotid-Prodrugs. (a) Chemische Strukturen potentieller Nukleotid-Monophosphat-Prodrugs. Innerhalb der Zelle werden die entsprechenden Nukleosidmonophosphate im Falle der ProTides¹⁴⁰ (R1: Acryl-, R2: Alkylgruppe) durch enzymatische Spaltung und bei den cycloSal-Prodrugs¹⁴⁹ durch chemische Hydrolyse freigesetzt; (b) Chemische Struktur potentieller Nukleotid-Diphosphat-Prodrugs (R: Alkylgruppe), welche innerhalb der Zelle von Esterasen zum aktiven Nukleosiddiphosphat umgesetzt werden.¹⁵⁰

In zukünftigen Untersuchungen sollte zudem nach erfolgter Optimierung sowohl der Reaktivität bei physiologischem pH als auch der Zellpermeabilität der Nukleotidanaloga die gezielte zelluläre *on-Target*-Inhibition von KRasG13C in Gegenwart von endogenem GDP/GTP mithilfe von *Pulldown*-Experimenten und Proteom-Analysen überprüft werden.

* Synthese von Nukleotid-Prodrugs von Dr. Rajesh Gontla sowie im Rahmen der Masterarbeit von Christian Böhm (AG Rauh, TU Dortmund).

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Material

Alle Standardchemikalien und Reagenzien wurden, wenn nicht weiter ausgeführt, von folgenden Anbietern in angemessener Reinheit für die Synthese sowie Charakterisierung der Nukleotidanaloga bezogen: Alfa Aesar, Cell Signaling Technologies, Deutero, Jena Bioscience, Li-COR, Merck, New England Biolabs, Sigma-Aldrich, TCI Chemicals, ThermoFisher Scientific, VWR.

Neben den standardmäßig verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden die in den folgenden Kapiteln aufgelisteten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien verwendet (Tab. 6-14).

5.1.1 Geräte

Tabelle 6 | Übersicht über verwendete Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blotting-System	Pierce™ Power Blotter	Thermo Fischer Scientific
Fluorometer	FluoroMax®-4	Horiba
	Stopped Flow SX18MV	Applied Photophysics
FPLC-Systeme	ÄKTA pure ÄKTA start	GE Healthcare
Gefriertrocknungsanlage	Alpha 2-4 LDplus	Christ
Gelelektrophoresesysteme	Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad
	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	
Geldokumentationsanlage	Gel Doc™ XR+	Bio-Rad
HPLC-System	1100er Serie	Agilent
Inkubatoren	CB 150	Binder
	MaxQ™ 8000	ThermoFisher Scientific
Kristallplatten-Imager	Rock Imager® 1000	Formulatrix
LCMS-Systeme	UltiMate™ 3000 HPLC-System LCQ Fleet	ThermoFisher Scientific
	UltiMate™ 3000 HPLC-System Velos Pro™	ThermoFisher Scientific
	Accela HPLC-System LTQ Orbitrap	ThermoFisher Scientific
	UltiMate™ 3000 RSLCnano System Orbitrap Fusion™ Lumos™ Tribrid™	ThermoFisher Scientific
	Echo 520 Liquid Handler	Labcyte
Liquid Handling Systeme	MultiDrop™ Combi Reagent Dispenser	ThermoFisher Scientific
Microfluidizer	M-110L Microfluidizer®	Microfluidics
Mikroskope	EVOS Flويد	ThermoFisher Scientific
	EVOS XL Core	ThermoFisher Scientific

Tabelle 6 | Übersicht über verwendete Geräte (Fortsetzung).

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Mikrotiterplatten- Lesegeräte	Infinite [®] M1000	Tecan
	EnVision Multilabel Plate Reader	PerkinElmer
NMR-Systeme	AV500 Avance III HD	Bruker
pH-Messgerät	SevenCompact [™]	Mettler Toledo
Pipettierroboter	Mosquito [®] LCP	TTP Labtech
	dragonfly [®] discovery	TTP Labtech
Plattformschüttler	Titramax 100	Heidolph
	Polymax 1040	
Photometer	NanoDrop [™] 2000	ThermoFisher Scientific
Pipetten	Research [®] plus	Eppendorf
Röntgendiffraktometer	D8 VENTURE	Bruker
Rotationsverdampfer	Rotavapor [®]	Büchi
Spannungsquelle	PowerPac [™] Basic Power Supply	Bio-Rad
Sterilbank	HERASafe [®] KS	ThermoFisher Scientific
Thermocycler	Mastercycler [®] pro	Eppendorf
Thermoschüttler	Thermomixer [®] C	Eppendorf
Transfektionssystem	Neon [™] Transfection System	Invitrogen
Vakuumpkonzentrator	Concentrator Plus	Eppendorf
Western Blot-Imager	Odyssey [®] CLx	LI-COR
Zellzähler	Countess [™] II Automated Cell Counter	ThermoFisher Scientific
Zentrifugen	Centrifuge 5424	Eppendorf
	Centrifuge 5424R	
	Centrifuge 5804R	
	Sorvall [®] RC-6 [™] Plus	ThermoFisher Scientific

5.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7 | Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Dialyseschlauch	Spectra/Por [®] 7 MWCO 10000	Carl Roth
Kultivierungsflaschen	TC-Flasche T25, T75, T125	Sarstedt
Kultivierungsschale	TC-Schale 35/60	Sarstedt
Objektträger	Countess [™] cell counting chamber slides	Thermo Fisher Scientific
Pipettenspitzen	TipOne Pipettenspitze [®] (10, 20, 100, 200, 1000 µL)	Starlab
	96-well sitting drop iQ plate	TTP Labtech
Platten	384-well low dead volume microplates (384LDV)	Labcyte
	384-well polypropylene microplates (384PP)	Labcyte
	384-well Small Volume [™] HiBase Mikroplatte	Greiner Bio-One

Tabelle 7 | Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien (Fortsetzung).

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Platten	384-well Zellkultur Mikroplatte, μ Clear [®]	Greiner Bio-One
	MicroWell Platte, 96 well	Nunc
	TC-Platte 6 Well Standard	Sarstedt
PVDF-Membran	Immobilon-FL PVDF-Membran	Merck Millipore
Reaktionsgefäße	PCR Tubes	Eppendorf
	Safe-Lock Tubes (1.5/2 mL)	Eppendorf
	SafeSeal Reagiergefäße (1.5/2 mL)	Sarstedt
Serologische Pipetten	1, 2, 5, 10 und 25 mL	Sarstedt
Sterilfilter	Filtropur S, 0.2/0.45 μ m	Sarstedt
Zellschaber	Zellschaber mit 2-Positions-Klinge (16 cm)	Sarstedt
Zentrifugendiftereinheiten	Amicon [®] Ultra-4/-15 MWCO 10 kDa	Merck
Zentrifugenröhrchen	Schraubröhre, 15/50 ml, PP	Sarstedt

5.1.3 Chemikalien, Reagenzien und Kits

Tabelle 8 | Übersicht über verwendete Chemikalien und Reagenzien.

	Bezeichnung	Hersteller
FPLC-Säulen	HiLoad [®] 16/60 Superdex [®] 75 pg	GE Healthcare
	HiLoad [®] 16/60 Superdex [®] 200 pg	GE Healthcare
	Ni-NTA Agarose	Qiagen
	Ni-NTA Superflow Cartridge, 5 mL	Qiagen
	Q Sepharose [®] Fast Flow	GE Healthcare
Gel-Blottingpapier	Superdex [®] 75 10/300 GL	GE Healthcare
	Gel-Blottingpapier GB005 Dicke 1.5 mm	Whatman
HPLC-Säulen	50/3 Nucleodur C18 gravity Säule (1.8 μ m)	Macherey-Nagel
	AdvanceBio Desalting-RP Cartridge	Agilent Technologies
	Hypersil GOLD-Säule	ThermoFisher Scientific
	PepMap100 RSLC C18 nano-HPLC Säule	Dionex
Kationenaustauscher	ProntoSIL [®] 120-5-C18-AQ	Bischoff
	Ionenaustauscher I	Merck
	AMG 510	MedChemExpress
	ARS-853	UCSF, Shokat Lab
	ARS-1620	MedChemExpress
KRas	Deltarasin	MPI Dortmund, AG Waldmann
Referenz-Verbindungen	KRasG12C inhibitor 9	SelleckChem
	KRasG12C inhibitor 12	SelleckChem
	MRTX849	MedChemExpress
	PanRas3144	Tobias Grabe, AG Rauh

Tabelle 8 | Übersicht über verwendete Chemikalien und Reagenzien (Fortsetzung).

	Bezeichnung	Hersteller
Marker	Chameleon® Duo Pre-stained Protein Ladder	Li-COR
	GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	ThermoFisher Scientific
	PageRuler™ Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific
	PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	ThermoFisher Scientific
Nukleotide	Deoxynucleotide (dNTP) Solution Set	New England Biolabs
	Guanosin	Alfa Aesar
	GMP	Alfa Aesar
	GDP	Jena Bioscience
	GppNHp	Jena Bioscience
	GTP	Jena Bioscience
	dGTP	Carbosynth Limited
	mantdGDP	Jena Bioscience
Puffer	10x CutSmart® Buffer	New England Biolabs
	Odyssey® Blocking Buffer, TBS	Li-COR
	5x <i>OneTaq</i> ® HS Buffer	New England Biolabs
	5x <i>Phusion</i> ® HF Buffer	New England Biolabs
	Pierce™ 1-Step-Transferpuffer	ThermoFisher Scientific
	RIPA-Puffer, 10X	New England Biolabs
Protease/Phosphatase Inhibitor	10x T4 DNA Ligase Reaction Buffer	New England Biolabs
	Pierce™ Protease Inhibitor Tablets, EDTA-free	ThermoFisher Scientific
	cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche
	PhosStop™, phosphatase inhibitor tablets	Sigma-Aldrich

Tabelle 9 | Übersicht über verwendete Kits.

Kit	Hersteller
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Lipofectamine™ 3000 Transfection Kit	Invitrogen
Neon Transfection System Kits	Invitrogen
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific
Proteinkristallisations-Screens (JCSG Core I -IV Suites, PEGs, PACT)	Qiagen
QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
SilverXpress™ Silver Staining Kit	Invitrogen

5.1.4 Bakterien, Enzyme und Plasmide

Tabelle 10 | Übersicht über verwendete Bakterien, Enzyme und Plasmide.

	Bezeichnung	Hersteller
Bakterien	<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Novagen
	<i>E. coli</i> BL21 Codon Plus (DE3) RIL	Agilent Technologies
	<i>E. coli</i> XL10-Gold	Stratagene
Enzyme	<i>DpnI</i>	New England Biolabs
	Farnesyltransferase	MPI Dortmund (AG Goody)
	<i>KpnI</i> HF	New England Biolabs
	<i>OneTaq</i> [®] Hot Start DNA-Polymerase	New England Biolabs
	<i>Phusion</i> [®] High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs
	<i>SacI</i> HF	New England Biolabs
	T4 DNA-Ligase	New England Biolabs
	TEV-Protease	TU Dortmund (AG Rauh)
Plasmide	Trypsin recombinant, Proteomics Grade	Roche
	mCherry-C1	Addgene
	mOrange-N1	Addgene
	pBabe-KRasG12C	Addgene
	pBabe-KRasWT	Addgene
	pCL-Eco	Addgene
	pET19mod_KRasWT ₁₋₁₆₉	MPI Dortmund (AG Goody)
	pET19mod_KRas ₁₋₁₆₉ _Cys-light_G12C	MPI Dortmund (AG Goody)
	pET19mod_KRas ₁₋₁₆₉ _Cys-light_G13C	MPI Dortmund (AG Goody)
	pET19mod_KRasWT	MPI Dortmund (AG Goody)

5.1.5 Zelllinien, Zellkulturreagenzien und Antikörper

Tabelle 11 | Übersicht über verwendete Zelllinien.

Zelllinie	Herkunft	Produkt#
BaF3 (parental)	AG Sos	-
BaF3 KRasG12C	-	-
HEK239T	AG Summerer	-
HeLa	ATCC	CCL-2
H358	AG Dehmelt	-
H1355	ATCC	CRL-5865
H1734	ATCC	CRL-5891
NIH/3T3	ATCC	CRL-1658

Tabelle 12 | Übersicht über verwendete Zellkulturreagenzien.

Zellkulturreagenz	Bezeichnung	Hersteller
Antibiotika	Penicillin-Streptomycin, 100x	Gibco®, ThermoFisher Scientific
	Puromycin	Gibco®, ThermoFisher Scientific
Fötales Kälberserum	FBS	Gibco®, ThermoFisher Scientific
	FBS Good Forte	PAN-Biotech
Interleukin	IL-3	PeptoTech
NTP-Transporter	BioTracker™ NTP-Transporter Molecule	Sigma-Aldrich
Phosphatgepufferte Salzlösung	DPBS	Gibco®, ThermoFisher Scientific
Transfektionsreagenz	TransIT®-LT1	Mirus
Trypan Blau	Trypan Blau, 0.4 %	Sigma Aldrich
Trypsin	Trypsin-EDTA, 0.25%, Phenolrot	Gibco®, ThermoFisher Scientific
Zellkulturmedien	RPMI 1640+GlutaMAX™	Gibco®, ThermoFisher Scientific
	DMEM+GlutaMAX™	Gibco®, ThermoFisher Scientific
	Opti-MEM™	Gibco®, ThermoFisher Scientific

Tabelle 13 | Übersicht über verwendete Antikörper.

Antikörper	MW (kDa)	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Produkt#
KRas	21	Maus	1:1000	Sigma-Aldrich	SAB1404011
pcRaf	74	Kaninchen	1:1000	CST	9427
tAkt	60	Kaninchen	1:1000	CST	2938
pAkt					9018
tErk	42/44	Maus	1:2000	CST	4696
pErk		Kaninchen	1:2000		4370
tS6	32	Maus	1:1000	CST	2317
pS6		Kaninchen	1:2000		4858
β-Aktin	42	Maus	1:5000	Sigma-Aldrich	A5441
	45	Kaninchen	1:1000	CST	4970
anti-Mouse (DyLight™ 680 Conjugate)	-	Ziege	1:15000	CST	5470
anti-Rabbit (DyLight™ 800 4X PEG Conjugate)	-	Ziege	1:30000	CST	5151

5.1.6 Programme

Tabelle 14 | Übersicht über verwendete Programme.

Verwendungszweck	Programm	Entwickler
CTG	quattro/Workflow	Quattro Research
Kinetik	Agilent ChemStation	Agilent Technologies
	KinTek Explorer ¹⁵¹	KinTek Corporation
Klonierung	Snappene	GSL Biotech LLC
Kristallisation	Rock Maker®	Formulatrix
Laborjournal	ChemDraw Professional	PerkinElmer
	Quattro Research Software-Paket	Quattro Research
MS	MagTran ¹⁵²	Amgen
	Xcalibur™	Thermo Fisher Scientific
NMR	MestReNova	Mestrelab Research
pKa-Berechnungen	OpenEye pKa-Pro prospector ¹⁵³	OpenEye Scientific Software, Inc.
WB	Image Studio Lite	Li-COR
	Empiria Studio	Li-COR
X-Ray	COOT ¹⁵⁴	Paul Emsley Kevin D. Cowtan
	LigandScout ¹⁴⁷	Inte:Ligand Paul Adams Randy Read
	Phenix ¹⁵⁵	Jane & Dave Richardson Tom Terwilliger
	PyMOL ¹⁵⁶	Schrödinger
	XDS ¹⁵⁷	Wolfgang Kabsch

5.2 Computergestützte Methoden

5.2.1 Multiples Sequenzalignment

Das multiple Sequenzalignment der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen wurde unter Verwendung von Clustal Omega¹⁵⁸⁻¹⁵⁹ mit Uniprot erstellt.¹⁶⁰⁻¹⁶¹ Die für die Sequenzüberlagerung verwendeten UniProt-IDs sind der Abbildung A1 zu entnehmen.

5.2.2 pK_a-Berechnungen

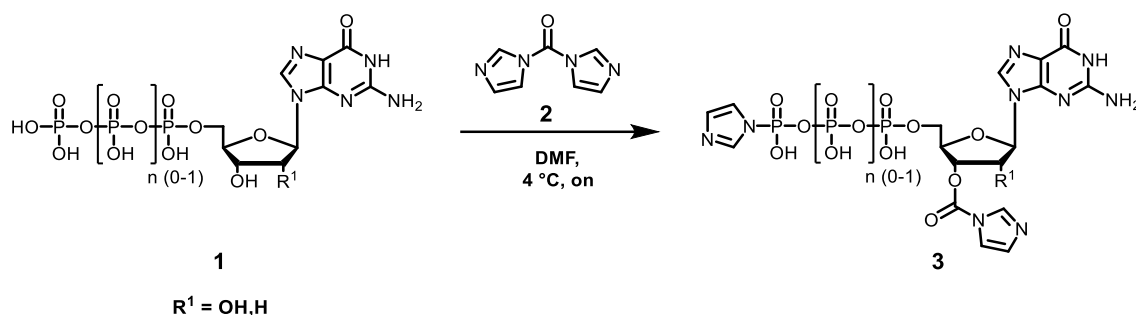
Für die pK_a-Wert Berechnung von Proteinen wurde ein Programm von OpenEye verwendet, das auf dem Zap Finite-Differenzen-Poisson-Boltzmann-Solver basiert.¹⁵³ Für die Partialladungen des Proteins wurden Delphi-Radien und CHARMM36 All-Hydrogen-Partialladungen verwendet. Innerhalb der KRasG13C-Kristallstrukturen wurden die Linker der eda und bdaGDP-Derivate vorab entfernt. Die am1bccsym-Methode wurde verwendet, um den Liganden geeignete Teilladungen zuzuordnen. Es wurde ein inneres Dielektrikum von 10, eine Ionenstärke von 0.05 M und eine Ionisierung (d. h. ein pH-Wert) von 7.5 verwendet. Für Cystein wurde ein Referenz-pK_a-Wert von 8.6 verwendet. Alle Wasserstoffatome wurden explizit modelliert, und mit Ausnahme der Orientierungen der OH- und SH-Protonen, die in 10°-Schritten abgetastet wurden, wurde der Rest der Struktur statisch belassen. Die Optimierungen des Ionisierungszustands und der SH-Orientierung wurden durch die Anwendung von zehn Millionen Monte-Carlo-Schritten erreicht.¹⁶²

5.3 Organische Synthese von Nukleotid-basierten Inhibitoren

Die Synthese der Nukleotidanaloga wurde nach dem von Cremo *et al.* (1990) festgelegten und von Eberth *et al.* (2005) beschriebenen Protokoll durchgeführt.^{105, 108}

5.3.1 Synthetische Verfahren und Charakterisierung der Verbindungen

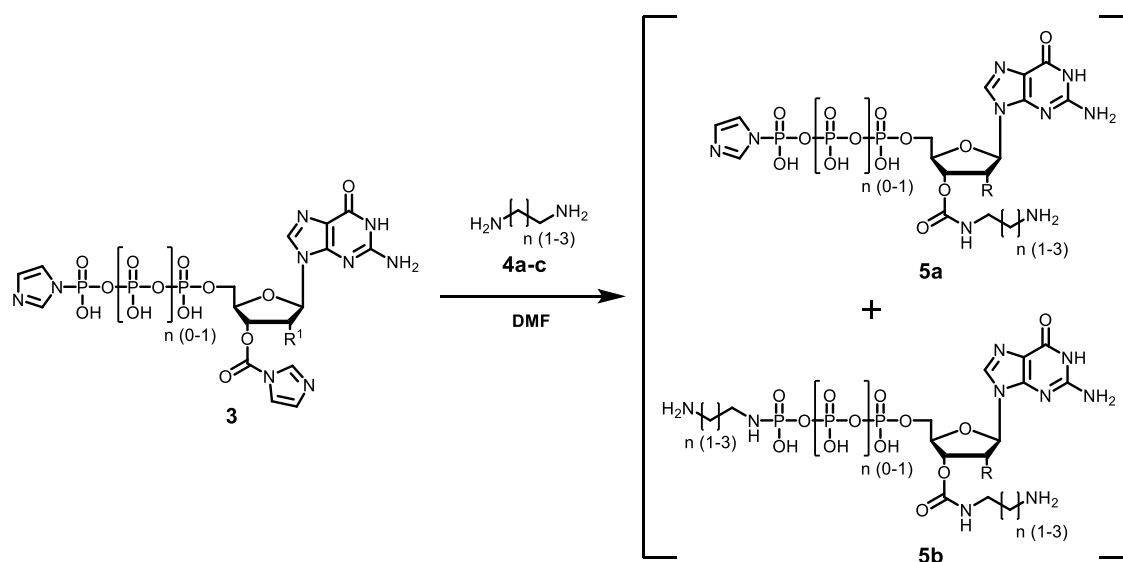
Mit Hilfe eines stark sauren Kationenaustauschers (Ionenaustauscher I der Firma Merck) wurde das Nukleotid (**1**) zunächst in eine DMF-lösliche Form überführt. Hierzu wurde das zuvor gequellte Säulenmaterial in eine Säule (Durchmesser 2 cm, Füllhöhe 15 bis 20 cm) gefüllt und für eine Stunde in Pyridin/H₂O (1:1) gelagert. Nachdem das Säulenmaterial mit insgesamt 250 mL ddH₂O gewaschen worden ist, wurde 0.5 mmol des Nukleotids, das in einem Gesamtvolumen von 3 mL gelöst vorliegt, mit einer Pasteurpipette auf die Säule aufgetragen. Die Elution des Nukleotids erfolgte mit einer Mischung bestehend aus MeOH/H₂O (1:1) in einen Rundkolben, in dem zuvor 1 mL TBA gegeben wurde. Nachdem das Lösungsmittelgemisch am Rotationsverdampfer entfernt wurde, wurde der Rückstand mit insgesamt dreimal 20 mL DMF versetzt, und erneut eingengt.



Reaktion mit CDI. Der Rückstand wurde in insgesamt 20 mL DMF gelöst und die Reaktionslösung nach Zugabe von 2.5 mmol CDI (**2**) unter Argon-Atmosphäre über Nacht bei 0 °C gerührt. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 150 μ L MeOH beendet. Die bei dieser Reaktion entstehenden Verbindungen wurden ohne weitere Aufarbeitung für die nachfolgende Reaktion verwendet.

HRMS (ESI-MS):

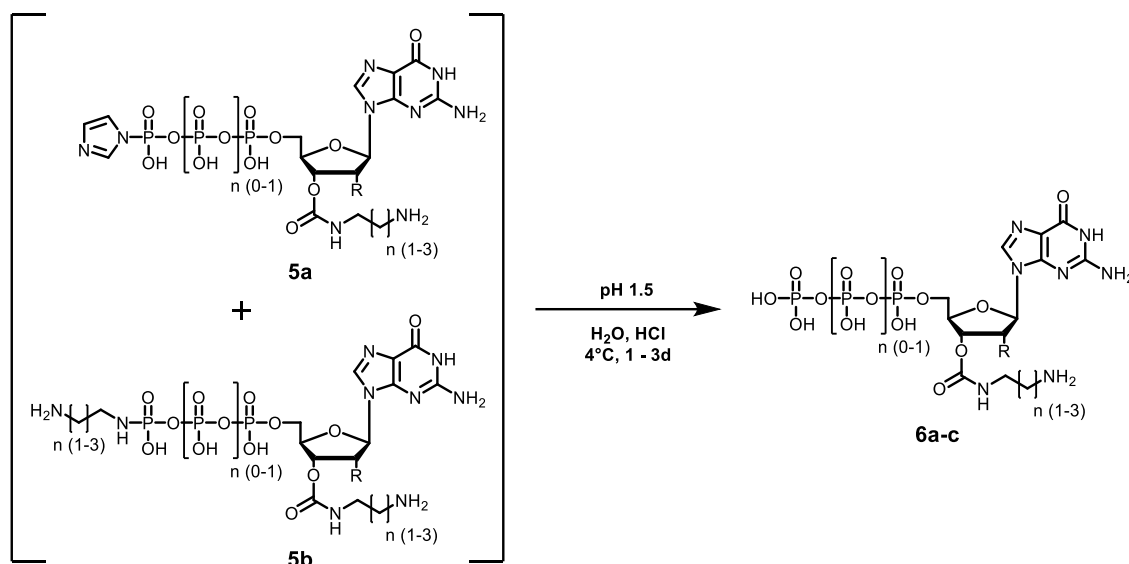
Nukleotid	berechnet	[M-H] ⁻	gefunden
GDP	518.0232	C ₁₄ H ₁₄ N ₇ O ₁₁ P ₂	518.0220
GTP	597.9895	C ₁₄ H ₁₅ N ₇ O ₁₄ P ₃	597.9869
dGTP	650.0315	C ₁₇ H ₁₉ N ₇ O ₁₃ P ₃	650.0304



Umsetzung mit den Diaminen. In 5 mL trockenem DMF wurden 2.5 mmol eda/pda/bda (**4a-c**) gelöst und zur resultierenden Reaktionslösung langsam hinzugegeben. Der durch die Zugabe von eda/pda/bda entstandene Niederschlag wurde bei 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert und erneut zwei Mal mit 30 mL trockenem DMF versetzt und zentrifugiert. Abschließend wurde das Pellet in insgesamt 30 mL ddH₂O gelöst. Die bei der Umsetzung mit eda/pda/bda entstandenen Produkte wurden ohne weitere Aufarbeitung für die nachfolgende Reaktion verwendet.

LCMS (ESI-MS):

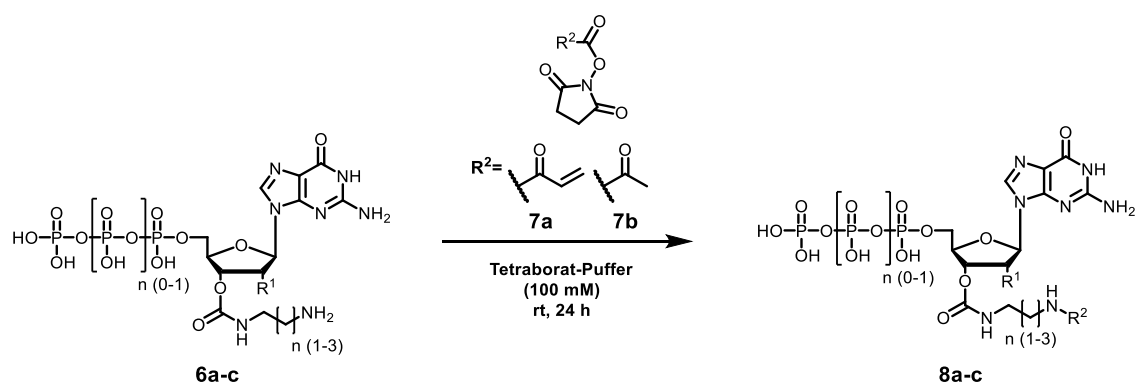
Nukleotid	Linker	berechnet	[M-H] ⁻	gefunden
GDP	eda	578.1	C ₁₆ H ₂₂ N ₉ O ₁₁ P ₂	578.1
	pda	592.1	C ₁₇ H ₂₄ N ₉ O ₁₁ P ₂	592.1
	bda	606.1	C ₁₈ H ₂₆ N ₉ O ₁₁ P ₂	606.1
GTP	eda	658.1	C ₁₆ H ₂₃ N ₉ O ₁₄ P ₃	658.0
	pda	672.1	C ₁₇ H ₂₅ N ₉ O ₁₄ P ₃	672.1
	bda	686.1	C ₁₈ H ₂₇ N ₉ O ₁₄ P ₃	686.1
dGTP	eda	634.1	C ₁₅ H ₂₇ N ₉ O ₁₃ P ₃	634.1
	pda	662.1	C ₁₇ H ₃₁ N ₉ O ₁₃ P ₃	662.1
	bda	690.2	C ₁₉ H ₃₅ N ₉ O ₁₃ P ₃	690.2



Abspaltung der Imidazol/Diamin-Einheit vom Phosphatrest. Die Reaktionslösung wurde mit 0.25 M HCl auf einen pH-Wert von 1.5 eingestellt und über Nacht bei 4 °C gerührt. Nach Beendigung der Reaktion wurde ein pH-Wert von 7.5 durch Zugabe von 0.25 M NaOH eingestellt und die Nukleotid-Lösung mit ddH₂O auf ein Gesamtvolumen von 100 mL verdünnt. Die Probe wurde mit Hilfe eines Spritzenfilters filtriert und für die Reinigung über eine Q-Sepharose-Säule an der FPLC verwendet. Nach erfolgter Auftragung der Nukleotid-Lösung auf die zuvor mit Puffer A (50 mM TEAB) äquilibrierte Säule erfolgte die Elution bei einer Flussrate von 1 mL/min und einem linearen Gradienten von 0-100 % Puffer B (1 M TEAB) über 600 Minuten. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels HPLC unter Verwendung von TBAB als Gegenion im Laufpuffer analysiert (50 mM KP_i pH 6.6, 10 mM TBAB, 16 % ACN; Säule: ProntoSIL[®] 120-5-C18-AQ, Bischoff) und die Produkt-enthaltenden Fraktionen vereinigt. Nachdem das Lösungsmittelgemisch am Rotationsverdampfer entfernt wurde, wurde der Rückstand in 10 mL ddH₂O aufgenommen und lyophilisiert. Der resultierende Feststoff wurde in etwa 1 mL ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert.

HRMS (ESI-MS):

Nukleotid	Linker	berechnet	[M-H] ⁻	gefunden	Reinheit (%)	Ausbeute (%)
GDP	eda	528.0651	C ₁₃ H ₂₀ N ₇ O ₁₂ P ₂	528.0654	90	38
	pda	542.0802	C ₁₄ H ₂₂ N ₇ O ₁₂ P ₂	542.0809	> 95	65
	bda	556.0964	C ₁₅ H ₂₄ N ₇ O ₁₂ P ₂	556.0960	> 95	29
GTP	eda	608.0314	C ₁₃ H ₂₁ N ₇ O ₁₅ P ₃	608.0289	89	56
	pda	662.0471	C ₁₄ H ₂₃ N ₇ O ₁₅ P ₃	662.0471	87	83
	bda	636.0621	C ₁₅ H ₂₅ N ₇ O ₁₅ P ₃	636.0603	94	67
dGTP	eda	592.0359	C ₁₃ H ₂₁ N ₇ O ₁₄ P ₃	592.0349	84	23
	pda	606.0516	C ₁₄ H ₂₃ N ₇ O ₁₄ P ₃	606.0521	93	11
	bda	620.0672	C ₁₅ H ₂₅ N ₇ O ₁₄ P ₃	620.0663	90	34



Darstellung der Acrylamid- und Acetylamid-Derivate. Zu einer Lösung bestehend aus eda/pda/bda-GDP/GTP/dGTP (21.33 μmol) in 0.4 mL Tetraboratpuffer (100 mM, pH 8.5) wurde der aktive Ester (21.33 μmol), gelöst in 25 μL DMSO, hinzugefügt und die Reaktionslösung für 24 bis 48 h bei Raumtemperatur gerührt. Die anschließende Reinigung der Nucleotide erfolgte ebenfalls über eine Q-Sepharose-Säule unter den oben genannten Bedingungen. Nach Vereinigung der Produkt-enhaltenden Fraktionen wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in ddH₂O aufgenommen und lyophilisiert. Die Nucleotidanaloga wurden anschließend bei -20 °C als konzentrierte Lösung (~ 100 mM) in 100 mM HEPES (pH 7.5) gelagert.

HRMS (ESI-MS):

Acrylamid	Linker	berechnet	[M-H] ⁻	gefunden	Reinheit (%)	Ausbeute (%)
GDP	eda	582.0751	C ₁₆ H ₂₂ N ₇ O ₁₃ P ₂	582.0741	> 95	57
	pda	596.0907	C ₁₇ H ₂₄ N ₇ O ₁₃ P ₂	596.0907	87	65
	bda	610.1064	C ₁₈ H ₂₆ N ₇ O ₁₃ P ₂	610.1062	> 95	78
GTP	eda	662.0414	C ₁₆ H ₂₃ N ₇ O ₁₆ P ₃	662.0394	93	54
	pda	676.0571	C ₁₇ H ₂₅ N ₇ O ₁₆ P ₃	676.0551	> 95	63
	bda	690.0727	C ₁₈ H ₂₇ N ₇ O ₁₆ P ₃	690.0705	86	75
dGTP	eda	646.0465	C ₁₆ H ₂₃ N ₇ O ₁₅ P ₃	646.0452	93	63
	pda	660.0621	C ₁₇ H ₂₅ N ₇ O ₁₅ P ₃	660.0611	90	81
	bda	674.0778	C ₁₈ H ₂₇ N ₇ O ₁₅ P ₃	674.0771	93	74

Acetylamid	Linker	berechnet	[M-H] ⁻	gefunden	Reinheit (%)	Ausbeute (%)
GDP	eda	570.0751	C ₁₅ H ₂₂ N ₇ O ₁₃ P ₂	570.0734	> 95	57
	pda	584.0907	C ₁₆ H ₂₄ N ₇ O ₁₃ P ₂	584.0889	90	51
	bda	598.1064	C ₁₇ H ₂₆ N ₇ O ₁₃ P ₂	598.1042	80	73
GTP	eda	650.0414	C ₁₅ H ₂₃ N ₇ O ₁₆ P ₃	650.0392	> 95	23
	pda	664.0571	C ₁₆ H ₂₅ N ₇ O ₁₆ P ₃	664.0553	94	40
	bda	678.0727	C ₁₇ H ₂₇ N ₇ O ₁₆ P ₃	678.0700	93	31

5.3.2 Isokratische Trennung der Nukleotidanaloga

Die Reinheit der Nukleotidverbindungen wurde durch HPLC unter Verwendung von Tetrabutylammoniumbromid als Gegenion im Laufpuffer bestimmt (50 mM KPi pH 6.6, 10 mM TBAB, 16 % ACN; Säule: ProntoSIL[®] 120-5-C18-AQ, Bischoff). Die Retentionszeiten der Verbindungen wurden mit dem Gmix (Guanosin, GMP, GDP, GppNHp und GTP) verglichen.

5.3.3 Konzentrationsbestimmung der Nukleotide

Die Konzentration der Nukleotide wurde über die Messung der Absorption bei 252 nm an einem NanoDrop[™] 2000 Spektrophotometer (ThermoFisher Scientific) unter Berücksichtigung des molaren Extinktionskoeffizienten von GDP und GTP ($\epsilon_{252} = 13.700 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetz berechnet.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon * c * d \quad (1)$$

(A: Absorption, I_0 : Intensität des einfallenden Lichts, I: Intensität des transmittierten Lichts, ϵ : molarer Extinktionskoeffizient, c: Konzentration, d: Schichtdicke der Küvette).

5.3.4 Massenspektrometrie

Niedrigauflösende Massenspektrometrie (LCMS). Die LCMS-Messungen wurden mit einem UltiMate[™] 3000 HPLC-System (ThermoFisher Scientific) in Kombination mit einem LCQ Fleet Ionenfallen-Massenspektrometer (Säule: 50/3 Nucleodur C18 gravity Säule, 1.8 μm , Macherey-Nagel) durchgeführt. Für die Auswertung der LCMS-Spektren wurde die Software Xcalibur[™] (ThermoFisher Scientific) verwendet.

Hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS). Die hochaufgelöste Masse wurde mit einem LTQ Orbitrap-Massenspektrometer gekoppelt an ein Accela HPLC-System (Säule: Hypersil GOLD-Säule) von der Firma ThermoFisher Scientific bestimmt. Die Auswertung der HRMS-Spektren erfolgte mit dem Programm Xcalibur[™] (ThermoFisher Scientific).

5.3.5. NMR-Spektroskopie

Die Analytik der synthetisierten Verbindungen mit Hilfe von ^1H -NMR- und ^{13}C -NMR-Spektren erfolgte durch ein AV500 Avance III HD (CryoProbe)-Spektrometer der Firma Bruker. Als Lösungsmittel wurde Deuteriumoxid (D_2O) verwendet, welches mit Natriumdeuteriooxid (NaOD) oder Deuteriumchlorid (DCl) auf pD 7.5 eingestellt wurde. Als interner Standard wurde zusätzlich Natrium-3-(trimethylsilyl)propan-1-sulfonathydrat (DSS) eingesetzt. Die Multiplizitäten der Signale erhalten folgende Abkürzungen: s (Singulett), d (Dublett), t (Triplet), q (Quartett), m (Multipllett). Die Auswertung der NMR-Spektren erfolgte mit MestReNova (Mestrelab Research).

5.4 Molekularbiologische Methoden

5.4.1. Mutagenese

Für die Einbringung einzelner Punktmutationen innerhalb der KRas-Proteine wurde die QuickChange-Mutagenese verwendet. Hierfür wurde zunächst eine Mutagenese-PCR mit zuvor designten Primern (Tab. A6-A7), die die gewünschten KRas Punktmutation aufweisen, durchgeführt. Anschließend wurde die parentale DNA durch Zugabe von *DpnI* verdaut.

Mutagenese-PCR. Für die Mutagenese-PCR wurden die einzelnen Komponenten des PCR-Ansatzes auf Eis zusammenpipettiert und in einem Thermocycler (Eppendorf) entsprechend des gewählten PCR-Programms inkubiert (Tab. 15).

Tabelle 15 | Mutagenese. Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der Mutagenese-PCR.

Komponente	Menge	Reaktionsschritt	T	t	
Templat-DNA	100 ng	1x	Initiale Denaturierung	98°C	30 s
<i>forward</i> Primer (1 μM)	1 μL	35x	Denaturierung	98°C	10 s
<i>reversed</i> Primer (1 μM)	1 μL		Hybridisierung	52°C	30 s
5x Phusion HF Buffer	4 μL		Elongation	72°C	90 s
dNTP-Mix (10 mM)	0.4 μL	1x	Finale Elongation	72°C	5 min
DMSO	0.4 μL	1x		4°C	∞
Phusion DNA-Polymerase	0.2 μL				
ddH ₂ O	auf 20 μL auffüllen				

DpnI-Verdau. Um die methylierte Templat-DNA spezifisch abzubauen, wurde der PCR-Ansatz anschließend mit 0.5 μL *DpnI* versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.4.2. Klonierung nach dem Restriktions-/Ligationsprotokoll

Für die Einbringung der KRas Gensequenz in pcDNA-Vektoren, die eine Expression der Gensequenzen unter Kontrolle des CMV-Promotors in murinen Zellen ermöglichen, wurde das Restriktions-/Ligationsprotokoll verwendet. Als Donorplasmide wurden die pBabe-Vektoren mit den entsprechenden KRas-Varianten (KRasWT, KRasG12C und KRasG13C) verwendet. Die von Dr. Jörn Weisner bereitgestellten pcDNA-Vektoren (mCherry-C1 und mOrange-N1, Addgene) dienten dabei als Zielplasmide.

PCR des Inserts und DpnI-Verdau. Zur Amplifizierung des Gens aus dem Donorvektor (pBabe-Vektoren) und Einbringung der Reaktionsschnittstellen *SacI* (5'-Ende) und *KpnI* (3'-Ende) vor und nach dem Zielgen wurde zunächst eine PCR durchgeführt (Tab. 16).

Tabelle 16 | PCR des Inserts. Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der PCR zur Vervielfältigung des Inserts.

Komponente	Menge		Reaktionsschritt	T	t
Templat-DNA	100 ng	1x	Initiale Denaturierung	98°C	30 s
<i>forward</i> Primer (10 μM)	1 μL	35x	Denaturierung	98°C	10 s
<i>reversed</i> Primer (10 μM)	1 μL		Hybridisierung	58°C	30 s
5x Phusion HF Buffer	4 μL		Elongation	72°C	90 s
dNTP-Mix (10 mM)	0.4 μL	1x	Finale Elongation	72°C	5 min
Phusion DNA-Polymerase	0.2 μL	1x		4°C	∞
ddH ₂ O	auf 20 μL auffüllen				

Anschließend wurde die methylierte Templat-DNA wie zuvor unter Abschnitt 5.4.1 beschrieben durch Zugabe von *DpnI* über Nacht bei 37 °C abgebaut. Die Reinigung des PCR-Produkts erfolgte unter Verwendung des QIAquick PCR-Reinigungskits (Qiagen).

Restriktionsverdau des PCR-Produkts und des Zielplasmids. Zur Erzeugung zueinander kompatibler, überhängender Enden von PCR-Produkt und Zielplasmid wurde ein Doppelverdau des PCR-Produkts und des Zielplasmids mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *KpnI* vorgenommen. Zur Vermeidung der Selbstligation des Zielvektors wurde zusätzlich die alkalische Phosphatase CIP zum Restriktionsansatz des Zielplasmids hinzugefügt. Die Restriktionsansätze wurden dabei auf Eis zusammen pipettiert und für 1 h bei 37 °C und 500 rpm in einem Thermoschüttler (Eppendorf) inkubiert (Tab. 17).

Tabelle 17 | Restriktionsverdau. Ansatz für den Restriktionsverdau der Zielplasmide (links) und der PCR-Produkte (rechts).

Komponente	Menge	Komponente	Menge
Zielplasmid	3-6 µg	PCR-Produkt	45 µL
<i>SacI</i> HF	1 µL	<i>SacI</i> HF	1 µL
<i>KpnI</i> HF	1 µL	<i>KpnI</i> HF	1 µL
CIP	1 µL	10x CutSmart Buffer	6 µL
10x CutSmart Buffer	4 µL	ddH ₂ O	7 µL
ddH ₂ O	auf 40 µL auffüllen		

Durch eine fünfminütige Inkubation bei 80 °C wurden die Restriktionsenzyme anschließend inaktiviert. Die Reinigung der Reaktionsansätze erfolgte mit Hilfe des QIAquick PCR-Reinigungskits (Qiagen).

DNA-Ligation. In den Restriktionsansätzen für die Einbringung der KRas-Gene in die Zielplasmide wurde das Verhältnis zwischen dem Insert und dem Zielplasmid variiert, um die Einbauwahrscheinlichkeit zu erhöhen (Tab. 18). Zur Kontrolle der Selbstligation wurde zudem ein Ansatz ohne Insert verwendet. Die Restriktionsansätze wurden über Nacht bei 16 °C in einem Thermoschüttler (Eppendorf) inkubiert.

Tabelle 18 | DNA-Ligation. Zusammensetzung der Ligationsansätze.

Komponente	Menge
Ratio Insert:Zielplasmid	1:1, 3:1, 5:1
10x Rapid Ligation Puffer	1 µL
T4-DNA-Ligase	0.5 µL
ddH ₂ O	auf 10 µL auffüllen

5.4.3. Transformation und Selektion

Für die Einbringung von DNA in kompetente *E. coli* XL10-Gold-Zellen wurde eine Transformation mittels Hitzeschock durchgeführt. Dazu wurden 50 μL der chemisch-kompetenten Zellen mit 1 μL Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation durch einen Hitzeschock für 1 min bei 42 °C in einem Thermoschüttler (Eppendorf). Nach weiterer Inkubation für 5 min auf Eis wurden 200 μL LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz für 1 h bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. 100 μL der transformierten Zellen wurden anschließend unter sterilen Bedingungen auf einer Antibiotika-haltigen LB-Agarplatte zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

5.4.4. Kolonie-PCR

Zur Überprüfung positiver Klone wurde von den über Nacht gewachsenen Kolonien eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurde von der LB-Agarplatte jeweils eine Kolonie mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und in ein PCR-Gefäß überführt. Die für die Kolonie-PCR notwendigen Komponenten wurden auf Eis zusammengegeben und in einem Thermocycler (Eppendorf) entsprechend des gewählten PCR-Programms inkubiert (Tab. 19).

Tabelle 19 | Kolonie-PCR. Zusammensetzung und Reaktionsbedingungen der Kolonie-PCR zur Identifizierung positiver Klone.

Komponente	Menge		Reaktionsschritt	T	t
Kolonie	1	1x	Initiale Denaturierung	98°C	30 s
<i>forward</i> Primer (10 μM)	0.5 μL	35x	Denaturierung	98°C	10 s
<i>reversed</i> Primer (10 μM)	0.5 μL		Hybridisierung	58°C	30 s
5x OneTaq HS Buffer	5.0 μL		Elongation	72°C	90 s
dNTP-Mix (10 mM)	0.5 μL	1x	Finale Elongation	72°C	5 min
OneTaq Polymerase	0.125 μL	1x		4°C	∞
ddH ₂ O	auf 25 μL auffüllen				

5.4.5. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Identifikation positiver Klone wurde die DNA nach einer Kolonie-PCR mittels einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dazu wurden 5 μ L der Kolonie-PCR-Produkte mit jeweils 1 μ L 6x Orange G versetzt und anschließend neben einem Größenmarker auf einem 1 %-igen Agarosegel, versetzt mit dem fluoreszenten DNA-Farbstoff SYBRTM Safe (ThermoFisher Scientific), aufgetragen und bei 100 V für etwa 40 min aufgetrennt. Zur Visualisierung der aufgetrennten DNA wurde das Gel DocTM XR+ Dokumentationssystem (BioRad) verwendet. Als Größenstandard wurde der GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific) genutzt.

TBE-Laufpuffer: 90 mM Tris-Base, 90 mM Borsäure, 10 mM EDTA, pH 8.3.

5.4.6. Plasmidamplifizierung, -isolierung und -sequenzierung

Für die Amplifizierung der selektierten Plasmide wurden die mittels Kolonie-PCR analysierten Kolonien in jeweils 5 mL LB-Medium, versetzt mit Ampicillin (1:1000), über Nacht bei 37 °C und 150 rpm kultiviert. Die anschließende Isolierung der Plasmide erfolgte unter Verwendung des QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen). Die Konzentration der gereinigten Plasmide wurde durch Absorptionsmessungen bei Wellenlängen von 260 nm und 280 nm an einem NanoDropTM 2000-Spektrophotometer (ThermoFisher Scientific) bestimmt. Die abschließende Sequenzierung der isolierten Plasmide wurde bei Eurofins Genomics durchgeführt. Die für die Sequenzierung verwendeten Primer sind in im Anhang aufgeführt (Tab. A8, Abb. A8 und A9).

5.4.7. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse der verwendeten Protein-Präparationen erfolgte über Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Die entsprechenden Proben wurden dafür mit dem 4x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden jeweils 10 μ g der Proben neben einem Größenstandard auf einem 12 %-igen Polyacrylamid-Gel aufgetragen und bei einer konstanten elektrischen Spannung von 30 mA für 1 h größenpezifisch separiert. Zur Visualisierung der Proteine wurde das Gel mit einer Coomassie-Brilliant-Blau Färbelösung für 20 min angefärbt und anschließend mit einer Entfärbelösung für 20 min entfärbt. Bis zur Aufnahme der Gele

mittels Gel Doc™ XR+ Dokumentationssystem (BioRad) wurde das Gel in ddH₂O gelagert. Als Größenstandards diente der PageRuler Plus Prestained Ladder (ThermoFisher Scientific).

4x SDS-Probenpuffer: 0.5 M Tris pH 6.8, 20% (w/v) β -Mercaptoethanol, 8% (w/v) SDS, 5 mg/L Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerin.

Laufpuffer: 25 mM Tris pH 8.3, 200 mM Glycin, 3.5 mM SDS.

Färbelösung: 0.2 % (g/v) Coomassie-Brilliant-Blau G-250 in 10 % Essigsäure, 45 % (v/v) in Ethanol.

Entfärbelösung: 10 % Essigsäure, 40 % Ethanol, 50 % H₂O.

5.5 Proteinexpression und-reinigung

Die säulenchromatographische Reinigung der Ras-Proteine erfolgte an den Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC)-Systemen ÄKTA™ start und ÄKTA™ pure (GE Healthcare) bei 4 °C. Der Erfolg der Reinigung wurde mittels SDS-PAGE (Kapitel 5.4.7) überprüft und die Proteinkonzentration durch Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 280 nm an einem NanoDrop™ 2000-Spektralphotometer (ThermoFisher Scientific) unter Berücksichtigung der jeweiligen molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten nach Lambert-Beer bestimmt (Kapitel 7.3 und 7.12).

5.5.1. Verkürzte KRas-Konstrukte

Die Expression und Reinigung der verkürzten KRas-Konstrukte, die neben strukturbiologischen Untersuchungen auch in biochemischen und biophysikalischen Assays verwendet wurden, erfolgte unter Einsatz eines dreistufigen Reinigungsprotokolls.

KRas₁₋₁₆₉ *Cys-light* (C51S C80L C118S) mit einem spaltbaren *N*-terminalen His₆-tag wurde in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen bei 37 °C exprimiert. Die Proteinexpression wurde bei A₆₀₀ = 0.45 durch Zugabe von 0.3 mM IPTG induziert und über Nacht bei 19 °C inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation gesammelt und das erhaltene Pellet in Ni-NTA-Puffer A resuspendiert. Die Zellen wurden mittels Mikrofluidizer lysiert, und nach Zentrifugation (35.000 ×g, 60 min) wurde der Überstand auf eine mit Ni-NTA-Puffer A voräquilibrierte Ni-Affinitätschromatographiesäule (Ni-NTA Superflow,

20 mL, Qiagen) geladen. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen mit Ni-NTA-Puffer A entfernt und die Elution der spezifisch gebundenen Proteine erfolgte mit einem linearen Imidazol-Gradienten (40 mM - 500 mM) über einen Zeitraum von 45 min. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert und die Zielprotein-enthaltenen Fraktionen für die weitere Reinigung vereinigt. Zur Abspaltung des *N*-terminalen His₆-tags wurde mit TEV-Protease über Nacht bei 4 °C gegen den Dialyse-Puffer dialysiert. Das gespaltene Protein wurde anschließend mit Hilfe eines Spritzenfilters filtriert und auf eine mit Ni-NTA-Puffer A voräquilibrierte zweite Ni-Affinitätschromatographiesäule geladen, wobei das Zielprotein aufgrund der vorherigen Abspaltung des Affinitätsankers im Durchfluss vorzufinden ist. Der Durchfluss wurde mit Hilfe von Zentrifugeneinheiten (MWCO 10 kDa) auf ein Volumen von etwa 1 bis 2 mL aufkonzentriert und für die anschließende SEC verwendet. Die Proteinlösung wurde auf eine zuvor mit SEC-Puffer äquilibrierte Chromatographiesäule (HiLoad 16/60 Superdex 75 pg, GE Healthcare) aufgetragen und die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einem Fluss von 1 mL/min. Die Fraktionen, die reines Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und mit Hilfe von Zentrifugeneinheiten (MWCO 10 kDa) konzentriert. Die Konzentration der gereinigten Proteine wurde bestimmt und die Proteine wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Ni-NTA-Puffer A: 50 mM Tris pH 8.0, 250 mM NaCl, 40 mM Imidazol, 4 mM MgCl₂, 10 µM GDP, 1 mM DTT und 5% Glycerin.

Ni-NTA-Puffer B: 50 mM Tris pH 8.0, 250 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 4 mM MgCl₂, 10 µM GDP, 1 mM DTT und 5% Glycerin.

Dialyse-Puffer: 25 mM Tris pH 8.0, 100 mM NaCl, 4 mM MgCl₂, 10 µM GDP, 1 mM DTT und 5% Glycerin.

SEC-Puffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 µM GDP, 1 mM DTT und 5% Glycerin.

5.5.2. KRas-Vollängenkonstrukte

Die Expression und Reinigung der KRas-Vollängenkonstrukte, die für die zelluläre Charakterisierung der Nukleotidanaloga verwendet wurden, erfolgte unter Berücksichtigung weniger Abweichungen analog zu der Reinigung der verkürzten KRas-Konstrukte.

Die KRas-Volllängenkonstrukte mit einem spaltbaren *N*-terminalen His₆-tag wurden in *E. coli* BL21 (DE3) RIL-Zellen bei 37 °C exprimiert. Die Induktion mit 0.2 mM IPTG wurde, nach Erreichen eines OD₆₀₀-Werts von 0.5 und nach Inkubation der Expressionskulturen bei 4 °C für 30 min, durchgeführt und das Wachstum bei 20 °C und 120 rpm über Nacht fortgesetzt. Die Bakterienzellen wurden mittels Zentrifugation geerntet und das erhaltene Zellpellet zur Durchführung des Zellaufschlusses in doppelter Menge Ni-NTA-Puffer A resuspendiert und für 30 min bei 4 °C gerührt. Die Zellen wurden anschließend mit Hilfe eines Microfluidizers aufgeschlossen. Im Anschluss wurde das Lysat mit einem Protease-Inhibitorcocktail (1 Tablette) und CHAPS (1 % (m/v)) versetzt und bei 4 °C für 1 h gerührt, um die Löslichkeit der Proteine zu erhöhen. Mittels Zentrifugation (20.000 rpm, 60 min) wurden die unlöslichen Zellbestandteile abgetrennt und der lösliche Überstand nach Filtration auf eine mit Ni-NTA-Puffer A voräquilibrierte Ni-Affinitätschromatographiesäule (Ni-NTA Superflow, 5 mL, Qiagen) geladen. Um unspezifisch gebundene Proteine abzutrennen wurde die Ni-NTA-Säule zunächst mit Ni-NTA-Puffer A, sowie mit Ni-NTA-Puffer A und 2 % Ni-NTA-Puffer B gewaschen, bevor die Zielproteine durch einen Stufengradienten mit Ni-NTA-Puffer B eluiert wurden. Die Zielprotein-enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt und zur Abspaltung des Affinitätsankers mit TEV-Protease versetzt und über Nacht bei 4 °C gegen den Dialyse-Puffer dialysiert. Nach erfolgter Dialyse wurde die Proteinlösung zentrifugiert (5000 rpm, 10 min) und der Überstand auf die bereits mit Dialysepuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule aufgetragen. Nach Waschen mit Dialysepuffer wurde das Zielprotein durch einen Stufengradienten mit Ni-NTA-Puffer B, beginnend bei 2 %, eluiert. Die Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt und unter Verwendung von Zentrifugenfiltereinheiten (MWCO 10 kDa) auf ein Volumen von etwa 1 bis 2 mL konzentriert. Die Proteinlösung wurde auf eine zuvor mit SEC-Puffer äquilibrierte SEC-Säule (HiLoad 16/60 Superdex 75 pg, GE Healthcare) aufgetragen und die Auftrennung der Proteine erfolgte bei einem Fluss von 1 mL/min. Die Zielprotein-enthaltenen Fraktionen wurden vereinigt, konzentriert und bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Ni-NTA-Puffer A: 50 mM HEPES pH 7.2, 500 mM LiCl, 1 mM MgCl₂, 10 µM GDP, 2 mM β-Mercaptoethanol.

Ni-NTA-Puffer B: 50 mM HEPES pH 7.2, 500 mM LiCl, 500 mM Imidazol, 1 mM MgCl₂, 10 µM GDP, 2 mM β-Mercaptoethanol.

Dialyse-Puffer: 20 mM HEPES pH 7.2, 200 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 μM GDP, 2 mM β-Mercaptoethanol, 5 % Glycerol.

SEC-Puffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 10 μM GDP, 1 mM TCEP, 5 % Glycerol.

5.6 Biochemische und biophysikalische Methoden

5.6.1. Protein-Massenspektrometrie

Kovalente Proteinmodifikation und ESI-MS-Analyse. Die massenspektrometrische Charakterisierung gereinigter KRas-Proteine sowie der Nachweis von kovalenten Modifikationen an KRasG13C erfolgte mittels UltiMate 3000 HPLC-System (ThermoFisher Scientific) gekoppelt an einer VelosPro 2D-Ionenfalle-Massenspektrometer (ThermoFisher Scientific).

Für die kovalente Modifikation der verkürzten KRas-Proteine wurde 50 μM KRas₁₋₁₆₉ mit einem zehnfachen Überschuss der modifizierten Nukleotide in 100 mM CHES (pH 9.5), 50 mM NaCl, 1 mM TCEP und 1 mM EDTA inkubiert. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für die entsprechende Zeit wurde die Modifikation des Proteins mittels ESI-MS kontrolliert. Für die kovalente Modifikation der KRas Vollängen-Proteine wurde zunächst 50 μM Ras-Protein mit einem zehnfachen Überschuss der modifizierten Nukleotide in 20 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM TCEP, 5 % Glycerin und 10 mM EDTA für 3 h bei 4 °C inkubiert. Der Nukleotid austausch wurde durch die Zugabe von 20 mM MgCl₂ beendet und die Ras-Proteine wurden unter Verwendung von Zentrifugenfiltereinheiten (MWCO 10 kDa) gewaschen, um überschüssige, nicht gebundene Nukleotide zu entfernen. Nach dem Nukleotid austausch wurden 50 μM Ras Vollängen-Protein in 100 mM CHES (pH 9.5), 50 mM NaCl, 1 mM TCEP und 1 mM EDTA bei Raumtemperatur für 24 h inkubiert. Die kovalente Proteinmodifikation wurde mittels ESI-MS kontrolliert. Die erhaltenen Rohdaten wurden mit der Software XcaliburTM sowie MagTran¹⁵² ausgewertet.

Tryptischer Verdau und ESI-MS/MS-Analyse. Zur Ermittlung der Position der Proteinmodifikation durch die kovalenten Nukleotidanaloga wurden nach tryptischem Proteinverdau Tandem-Massenspektrometrie-Experimente durchgeführt.

Dabei wurden die Proben (50 pmol) zunächst in 100 mM TEAB gelöst und für 1 h bei 55 °C in Gegenwart von 10 mM TCEP inkubiert. Nach Zugabe von 17 mM Iodacetamid wurden die Proben für 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe von vorgekühltem Aceton gefällt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Nach dem Trocknen der Pellets wurde Trypsin (Roche) zugegeben und die Proben wurden bei 37 °C unter Schütteln (300 rpm) über Nacht verdaut. Der Verdau wurde durch Zugabe von 2 % TFA gestoppt und nach erfolgter *stage tip*¹⁶³ Reinigung wurden die Proben in einem Vakuumkonzentrator (Eppendorf) für etwa 1 h bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert. Für die anschließende nanoHPLC-MS/MS-Analyse wurden die Proben in 20 µL 0.1 % wässriger TFA gelöst. 3 µL der Proben wurden mit einem UltiMate™ 3000 RSLCnano-System (ThermoFisher Scientific) gekoppelt mit einem Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap-Massenspektrometer injiziert. Die Proben wurden zunächst für 5 min über eine Vorsäulenkartusche (5 µm, 100 Å, 300 µm ID * 5 mm, Dionex) bei einer Flussrate von 30 µL/min entsalzt. Die entsalzten Proben wurden auf eine PepMap100 RSLC C18 nano-HPLC-Säule (2 µm, 100 Å, 75 µm ID × 50 cm, nanoViper, Dionex) unter Verwendung eines linearen Gradienten, beginnend mit 95 % Lösungsmittel A (Wasser mit 0.1 % Ameisensäure) / 5 % Lösungsmittel B (Acetonitril mit 0.1 % Ameisensäure) und ansteigend auf 30 % Lösungsmittel B in 90 min bei einer Flussrate von 300 nL/min aufgetragen. Anschließend wurde die Säule gewaschen und auf die Ausgangsbedingungen reäquilibriert. Der Massenbereich von 300-1650 m/z wurde mit einer Auflösung von 70000 für einen vollständigen Scan erfasst, gefolgt von bis zu zehn *High Energy Collision Dissociation* (HCD) MS/MS-Scans der intensivsten, mindestens doppelt geladenen Ionen mit einer Auflösung von 17500 und einer NCE-Energie von 25 %. Die Datenauswertung erfolgte mit der MaxQuant-Software¹⁶⁴ einschließlich des Andromeda-Suchalgorithmus¹⁶⁵ und der Suche nach der KRas-Sequenz zusammen mit einer Datenbank, die typische Verunreinigungen wie Keratine, Trypsin usw. enthält. Die Suche wurde für volle enzymatische Trypsinspaltungen durchgeführt, die zwei Fehlsplaltungen zulassen. Für die Datenbanksuche wurden Oxidation von Methionin und N-terminale Acetylierung von Proteinen, Carbamidomethylierung von Cysteinen und Nukleotidanaloga-basierte Modifikation von Cysteinen als variable Modifikationen definiert.

5.6.2. Proteinassoziation mittels *stopped-flow*

Die Kinetik der Assoziation der Nukleotidanaloga wurde mit einer *stopped-flow*-Apparatur (Applied Photophysics) bei 25 °C analysiert, bei der die beiden Interaktionspartner zur gleichzeitigen Aufnahme des Fluoreszenzsignals in eine Messzelle injiziert werden.

Hierfür wurde 1 µM nukleotidfreies KRas¹⁵ in einer Spritze schnell mit 2 µM mantdGDP in der anderen Spritze gemischt. In nachfolgenden Experimenten enthielt die zweite Spritze zusätzlich die modifizierten Nukleotide mit steigenden Konzentrationen (1, 2 und 6 µM). Die resultierenden Verlaufskurven wurden mit KinTek Explorer global gefittet, um die entsprechenden Assoziationsgeschwindigkeitskonstanten wie zuvor beschrieben zu erhalten.¹⁵¹

***stopped-flow*-Puffer:** 25 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl₂ und 0.5 mM TCEP.

5.6.3. Bestimmung der relativen Affinitäten mittels HPLC-basiertem Assay

Die relativen Affinitäten der Nukleotidanaloga wurden mit einem HPLC-basierten Assay bestimmt. Dabei wurden 50 µM KRasWT:GDP mit 50 µM der Acetamid-Derivate edaGDP, pdaGDP oder bdaGDP gemischt und entweder für sieben Tage bei RT in Abwesenheit von EDTA, für 24 h bei 4 °C in Gegenwart von 10 mM EDTA oder für 1 h bei RT in Gegenwart von 0.5 µM SOS inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Ras-Proteine zur Abtrennung überschüssiger und ungebundener Nukleotide gewaschen, konzentriert und mittels isokratischer HPLC-Läufe analysiert. Die resultierenden Kurven wurden durch Integration der Flächen unter den entsprechenden Signalen für GDP und der Nukleotidanaloga nach verschiedenen Zeitpunkten mit Hilfe der Agilent ChemStation Software ausgewertet.

HPLC-Puffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM TCEP, 5 % Glycerin.

5.6.4. SOS-katalysierter Nukleotidaustausch

Der SOS-katalysierte Nukleotidaustausch wurde bei 25 °C in einem FluoroMax[®]-4-Spektralfluorometer (Horiba) verfolgt. 5 µM KRas₁₋₁₆₉ wurden mit 10 µM mantdGDP und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen von SOS (0.25 µM und 0.5 µM) gemischt. Nach Anregung bei 360 nm wurde die Emission bei 440 nm gemessen.

Nukleotidaustausch-Puffer: 20 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂ und 1 mM TCEP.

5.6.5. GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse

Zur Untersuchung der GAP-stimulierten GTP-Hydrolyse wurde zunächst für KRas_{WT1-169} ein Nukleotidaustausch mit GTP bei pH 7.5 und für KRas_{G13C1-169} eine kovalente Modifikation mit einem zehnfachen Überschuss an Acryl-edaGTP bei pH 9.5 durchgeführt (in Gegenwart von 50 mM EDTA zur Blockierung der intrinsischen GTP-Hydrolyse). Nach der Inkubation wurden die Ras-Proteine fünfmal mit GAP-Puffer unter Verwendung von Zentrifugalfiltereinheiten (MWCO 10 kDa) gewaschen, um nicht gebundenes Nukleotid zu entfernen. Der Nukleotidaustausch von KRas_{WT1-169} wurde mittels isokratischer HPLC-Läufe kontrolliert, und die kovalente Modifikation von KRas_{G13C1-169} wurde mittels ESI-MS überprüft. Die GTP-Hydrolyse der Ras-Proteine wurde durch Zugabe von 2 mM MgCl₂ in Abwesenheit oder Anwesenheit von Ras-GAP (1:1000 für KRas_{WT1-169}:GTP und 1:1 für KRas_{G13C1-169}-edaGTP) initiiert. Zu bestimmten Zeitpunkten (0, 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten) wurden Proben entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für KRas_{WT1-169}:GTP wurden die Proben aufgetaut und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden bei 14.000 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend mittels isokratischer HPLC-Läufe analysiert. Für KRas_{G13C1-169}-edaGTP wurden die Proben zentrifugiert und mittels ESI-MS analysiert. Die Menge jedes Nukleotids wurde aus der Flächenintegration der GTP- und GDP-Signale mithilfe von Origin bestimmt.

GAP-Puffer: 20 mM HEPES (pH 7.5), 100 mM NaCl und 1 mM TCEP.

5.6.6. Mg²⁺-Affinitäts-Assay

Zur Bestimmung der Mg²⁺-Affinität von KRasWT und KRasG13C wurden 100 µM der Ras-Proteine mit einem fünffachen Überschuss an mantdGDP im Nukleotidaustauschpuffer inkubiert. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C für zwei bis drei Stunden und der Nukleotidaustausch wurde mittels isokratischer HPLC-Läufe überprüft (Kap. 5.3.2). Die Proteinlösungen wurden in den MG-Puffer überführt und nach anschließender Konzentration für den Mg²⁺-Affinitätstest verwendet, der bei 25 °C in einem FluoroMax-3-Spektrofluorimeter (Anregung bei 360 nm, Emission bei 440 nm) analysiert wurde. 1 µM Ras:mantdGDP wurde gegen steigende Konzentrationen an MgCl₂ (1, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 und 25 µM) titriert und die resultierenden Kurven durch Auftragen der relativen Fluoreszenzintensität gegen die MgCl₂-Konzentration analysiert.

Nukleotidaustauschpuffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP, 5 % Glycerin und 10 mM EDTA.

MG-Puffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM TCEP und 5 % Glycerin.

5.6.7. *in vitro* Farnesylierung

Für eine *in vitro* Farnesylierung wurden 50 µM der KRas-Vollängen-Proteine mit 250 µM Farnesylpyrophosphat (FPP) und 10 µM Farnesyltransferase (FTase) gemischt. Nach der Inkubation bei RT für 1 h wurde die Mischung bei 14.000 rpm für 10 min und 4 °C zentrifugiert und mittels ESI-MS analysiert.

5.7 Proteinkristallisation

5.7.1. Probenvorbereitung für die Kristallisation

Für die Kristallisation von KRasG13C₁₋₁₆₉ *Cys-light* wurde das gereinigte Protein zunächst mit den Nukleotidanaloga kovalent modifiziert, indem 100 µM KRas mit einem zehnfachen Überschuss der Acrylamid-Derivate bei RT und pH 9.5 für 24 h inkubiert wurden. Die Modifikation des Proteins wurde mittels ESI-MS überwacht und durch Zugabe von 20 mM MgCl₂ beendet. Um überschüssige Nukleotide zu entfernen und zudem das Protein in den finalen Kristallisationspuffer zu überführen, wurde eine SEC

(HiLoad 16/60 Superdex 200 pg, GE Healthcare) durchgeführt. Die gereinigten Proteine wurden mithilfe von Zentrifugeneinheiten (MWCO 10 kDa) auf ~70 mg/mL konzentriert und für die nachfolgenden Kristallisationsexperimente verwendet.

Kristallisationspuffer: 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM TCEP und 5 % Glycerin.

5.7.2. Screening-Experimente

Um die anfänglichen Kristallisationsbedingungen zu identifizieren, wurden *Screening*-Experimente mit kommerziell erhältlichen Proteinkristallisations-Screens (JCSG Core I-IV Suites, PEGs und PACT, Qiagen) bei 4 °C und 20 °C mit der *sitting-Drop*-Methode durchgeführt. Dabei wurden die Reservoir-Lösungen in 96-well-Kristallisationsplatten (96-well sitting drop iQ plate, TTP Labtech) vorgelegt und mittels eines Mosquito LCP Pipettierroboters (TTP Labtech) 100 nL Reservoirlösung mit 100 nL Proteinlösung unterschiedlicher Konzentrationen versetzt. Die Kristallisationsplatten wurden anschließend bei 4 °C und 20 °C in einem Kristallisationsplatten-Imager (Rock Imager 1000, Formulatrix) gelagert. Entstandene Kristalle wurden mit 20 % Glycerin kryogeschützt bevor sie in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

5.7.3. Röntgenstrukturanalyse

Die entstandenen Kristalle wurden intern an einem D8 VENTURE-Röntgendiffraktometer (Bruker) getestet. Von Kristallen, die eine charakteristische Proteinstreuung aufwiesen, wurden anschließend Datensätze an der PXII X10SA-*beamline* der Synchrotron Lichtquelle Schweiz (Paul Scherrer Institut, Villigen, Schweiz) aufgenommen. Die Datensätze wurden mit XDS¹⁵⁷ indiziert und mit XSCALE skaliert. Die Kristallstruktur wurde durch molekularen Ersatz mit PHASER unter Verwendung einer bereits publizierten KRasWT:GDP Struktur (PDB: 4obe) als Modell gelöst.¹⁶⁶ Die manuelle Modellierung der Struktur in der asymmetrischen Einheit wurde mit dem Programm COOT¹⁵⁴ durchgeführt und mit Hilfe des Dundee PRODRG-Servers¹⁶⁷ die Inhibitor-Topologie-Datei generiert. Für die Strukturverfeinerung wurde PHENIX.refine¹⁵⁵ verwendet und mit dem PDB_REDO-Server¹⁶⁸ optimiert. Zur Visualisierung der finalen Kristallstrukturen wurde PyMOL¹⁵⁶ verwendet.

5.8 Zellbiologische Methoden

5.8.1. Zellkultivierung

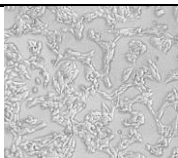
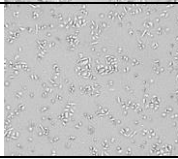
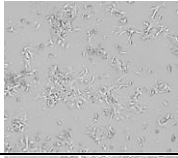
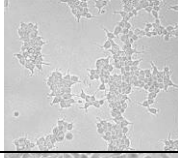
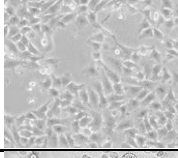
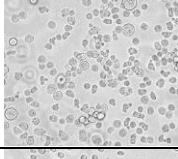
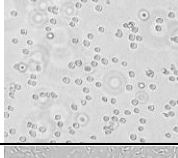
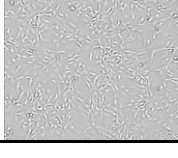
Die Kultivierung aller in Tabelle 20 aufgelisteten Zelllinien erfolgte in einem befeuchteten Inkubator in Gegenwart von 5 % CO₂ bei 37 °C. Alle zellbiologischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilbank (HERASafe[®] KS, ThermoFisher Scientific) durchgeführt. Alle verwendeten Medien, Lösungen und Verbrauchsmaterialien wurden steril erworben, steril filtriert oder autoklaviert. Medien und Lösungen, die bei zellbiologischen Arbeiten verwendet wurden, wurden vorab im Wasserbad auf 37 °C temperiert.

Bei der Inkulturnahme aller Zelllinien wurden die kryokonservierten Zellen zunächst in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, bevor sie mit frischem Medium versetzt in Zellkulturflaschen (T25, T75 oder T125; Sarstedt) überführt und kultiviert wurden. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneuert und sobald die Zellen eine Konfluenz von 80-90 % erreichten, wurden die Zellen vereinzelt.

Im Falle von adhärennten Zelllinien wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Durch die anschließende Zugabe einer 0.25 %-igen Trypsin-EDTA-Lösung und Inkubation bei 37 °C für 5 min wurden die Zellen von der Oberfläche abgelöst und nach Zugabe von frischem Medium für 5 min bei 200 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert und die Zellen für die Weiterkultivierung nach den in Tabelle 20 angegebenen Passagier-Verhältnissen ausgesät. Im Falle einer Suspensionskultur wurde der Trypsinierungsschritt übersprungen und die Zellen wurden direkt zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Countess[™] II Automated Cell Counter (ThermoFisher Scientific), wobei durch Zugabe von 10 µL Trypanblau-Färbelösung zu 10 µL der Zellsuspension zusätzlich die Zellviabilität überprüft werden konnte.

Mittels Kryokonservierung erfolgte eine längerfristige Lagerung der Zellen bei -150 °C. Hierfür wurde das Zellpellet in Kultivierungsmedium, versetzt mit 10 % DMSO, resuspendiert und eine Zelldichte von 1x10⁶ Zellen/mL eingestellt. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen (1 mL) überführt und zunächst für 24 h in einem mit Isopropanol befüllten Gefrierbehälter (Mr Frosty[™], Thermo Fisher Scientific) bei -80 °C runtergekühlt, bevor die endgültige Lagerung der Zellen bei -150 °C erfolgte.

Tabelle 20 | Übersicht über die verwendeten Zelllinien. Für die humanen sowie murinen Zelllinien wurden neben den Charakteristika (Gewebe/Erkrankung/Mutation; Applikation) das Kultivierungsmedium sowie das Passagier-Verhältnis aufgelistet.

Zelllinie		Charakteristika	Medium	Passagier-Verhältnis	
<i>Homo sapiens</i> (Human)		adhärent	Lunge Adenokarzinom KRasG12C	RPMI 1640+GlutaMAX™ 10% FBS 1% PenStrep	1:10
			Lunge Adenokarzinom KRasG13C	RPMI 1640+GlutaMAX™ 10% FBS 1% PenStrep	1:10
			Lunge Adenokarzinom KRasG13C	RPMI 1640+GlutaMAX™ 10% FBS Good Forte 1% PenStrep	1:2
			Niere Transfektionswirt	DMEM+GlutaMAX™ 10% FBS 1% PenStrep	1:10
			Cervix Adenokarzinom Transfektionswirt	DMEM+GlutaMAX™ 10% FBS 1% PenStrep	1:10
<i>Mus musculus</i> (Mouse)		Suspension	IL-3-abhängige Pro-B-Zellen	RPMI 1640+GlutaMAX™ 10% FBS 1% PenStrep 0.1 mg/mL IL-3	1 x 10 ⁵ Zellen/mL
			IL-3-unabhängige Pro-B-Zellen KRasG12C	RPMI 1640+GlutaMAX™ 10% FBS 1% PenStrep	2 x 10 ⁵ Zellen/mL
		adhärent	Transfektionswirt	DMEM+GlutaMAX™ 10% FBS 1% PenStrep	1:10

5.8.2. Genomsequenzierung

Zur Überprüfung der Identität einiger Zelllinien und dem Nachweis bestimmter KRas-Mutationen wurde eine Genomsequenzierung durchgeführt. Die genomische DNA wurde hierfür mit dem QIAmp DNA Mini Kit (Qiagen) isoliert und nach Vervielfältigung mittels PCR mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt. Die Sequenzierung wurde bei Eurofins Genomics durchgeführt (Tab. A9, Abb. A12-14).

5.8.3. Transfektion

Retrovirus-vermittelte Transfektion. Für die Infektion der Ba/F3-Zellen wurde zunächst ein Retrovirus mittels liposomaler Transfektion in HEK293T-Zellen generiert. Hierzu wurden 10^5 HEK293T-Zellen in einer TC-Schale (Sarstedt) in 5 mL Medium ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Folgetag wurde der in Tabelle 21 aufgelistete Transfektionsansatz, der zuvor 20 min bei RT inkubiert wurde, zu den Zellen pipettiert. Nach einer 72-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde der Virus geerntet, indem der Virus-enhaltene Überstand mit Hilfe eines Spritzenfilters (0.45 µM) steril filtriert und entweder direkt für die Infektion der Ba/F3-Zellen verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert wurde.

Tabelle 21 | Retrovirus-vermittelte Transfektion. Zusammensetzung des Transfektionsansatzes.

Komponente		Menge
Vektor	pBabe-KRasG12C	2.5 µg
	oder pBabe-KRasG13C	
Verpackungsplasmid	pCL-Eco	2.5 µg
Transfektionsreagenz	TransIT [®] -LT1	7.5 µL
Medium	Gibco [™]	250 µL
	Opti-MEM [™]	

Für die nachfolgende Infektion der Ba/F3-Zellen mit den zuvor generierten Retroviren wurden 2×10^6 Ba/F3-Zellen in 5 mL Infektionsmedium (serumfrei) in einer TC-Flasche T25 (Sarstedt) vorgelegt und mit 2 mL des zuvor erzeugten Retrovirus versetzt. Zusätzlich wurden dem Medium murines IL-3 (0.1 mg/mL) als notwendiger Wachstumsfaktor sowie Polybrene (0.8 µg/mL) zur Verbesserung der Infektionseffizienz hinzugefügt. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium erneuert und nach weiteren 48 h die Zellen durch Zugabe von Puromycin (5 µg/mL) selektiert. Nach erfolgreicher Selektion mit Puromycin über einen Zeitraum von 7 d wurden die Ba/F3-Zellen in Abwesenheit von IL-3 kultiviert und nach Wiedereintreten des Zellwachstums alle 48 h passagiert (1×10^5 Zellen/mL).

Lipofectamin-vermittelte Transfektion. Die Erzeugung von KRas-transformierten NIH/3T3-Zellen erfolgte unter Verwendung des Lipofectamine™ 3000 Reagent Protocol (ThermoFisher Scientific). Hierzu wurden 10^6 Zellen auf einer 6-well-Platte in 2 mL Medium ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und das Medium durch un-supplementiertes Opti-MEM™-Medium (Gibco®, ThermoFisher Scientific) ersetzt. Der DNA-Lipidkomplex, der zuvor nach Herstellerangaben vorbereitet und für 15 min bei RT inkubiert wurde, wurde anschließend zu den Zellen gegeben. Die transfizierten Zellen wurden für weitere 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und anschließend analysiert (Tab. 22).

Tabelle 22 | Lipofectamin-vermittelte Transfektion. Zusammensetzung des Transfektionsansatzes.

Komponente	Menge
DNA	mCherry-KRas oder untagged-KRas 2.5 µg
Transfektionsreagenz	Lipofectamine™ 3000 P3000™ Reagent 3.75 oder 7.5 µL 5 µL
Medium	Opti-MEM™ 250 µL

5.8.4. NTP-Transporter-Assay

Für den effizienten Transport der kovalenten Nukleotidanaloga in Zellen, wurde der BioTracker™ NTP-Transporter (Merck) eingesetzt.¹⁴² Hierfür wurden 10^6 Zellen auf einer 6-well-Platte in 2 mL Medium ausgesät und für 24 h bzw. 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die adhärenen Zellen wurden zweimal mit Tricin-Puffer gewaschen und anschließend mit verschiedenen Konzentrationen (10, 50, 100, 500 µM) einer 1:1-Mischung des BioTracker™-NTP-Transporter und entsprechendem Nukleotidderivat inkubiert. Zu Kontrollzwecken wurden die Zellen zusätzlich entweder mit 500 µM BioTracker™-NTP-Transporter oder mit 500 µM des Nukleotidderivats behandelt. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei RT wurde die Transporter-Mischung entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen für weitere 24 h bis 48 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert bevor Zellysate für eine nachfolgende Western Blot-Analyse generiert wurden.

Tricin-Puffer: 5 mM Tricin pH 7.4, 11 mM Glukose, 125 mM NaCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, 5.4 mM KCl.

5.8.5. Elektroporation

Die Elektroporation der KRas-Volllänge-Konstrukte (KRasWT, KRasG13C, KRasG13C:acetyledaGDP und KRasG13C-edaGDP) wurde nach dem von Alex *et al.* beschriebenen Protokoll unter Verwendung des Neon Transfection System Kits (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) durchgeführt.¹⁴⁴ Für die Elektroporation wurden zunächst drei Mio. Zellen pro Experiment durch Trypsinisierung geerntet, mit PBS gewaschen und in 85 µL des Elektroporationspuffers R (Invitrogen) resuspendiert. Proteinproben für jedes Konstrukt (0, 50, 100, 200 und 300 µg) wurden 1:1 in Puffer R verdünnt und anschließend 30 µL des Protein-Mastermixes zur Zellsuspension gegeben. Die EP-Proteinlösung wurde in eine 100 mL Neon-Pipettenspitze (Invitrogen) überführt und mit zwei aufeinanderfolgenden Impulsen bei 1000 V und einer Dauer von 35 ms elektroporiert. Nach der Elektroporation wurden die Zellen zweimal mit PBS (15 mL) gewaschen, um nicht-internalisiertes extrazelluläres Protein zu entfernen, und das Zellpellet in 2 mL frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in 6-well-Zellkulturplatten (Sarstedt) transferiert und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem befeuchteten Inkubator inkubiert, bevor Zelllysate für die nachfolgende Western Blot-Analyse angefertigt wurden.

5.8.6. Western Blot-Analyse

Für die zelluläre Evaluierung der Nukleotidderivate wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen nach entsprechender Behandlung mit den Nukleotidanaloga zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 100 µL Phosphatase- und Proteaseinhibitorhaltigem RIPA-Puffer (CST) lysiert. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert und dann durch Abschaben und anschließender Zentrifugation bei 14.000 rpm für 10 min bei 4 °C geerntet. Die Proteinkonzentrationen wurden mit dem Pierce™ BCA-Protein-Assay (ThermoFisher Scientific) gemäß der empfohlenen Vorgehensweise des Herstellers bestimmt und durch Zugabe von ddH₂O und 4x SDS-Probenpuffer auf 1 mg/mL eingestellt. Nachdem die Proben für 5 min bei 95 °C denaturiert wurden, wurden diese bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Äquivalente Proteinmengen (10 µg) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit dem Pierce™ 1-Step-Transferpuffer (ThermoFisher Scientific) und dem Pierce™ Power Blotter (ThermoFisher Scientific) auf Immobilon-FL PVDF-Membranen

(Merck) übertragen. Die Membranen wurden für 5 min mit ddH₂O gewaschen und nachfolgend für 1 h bei Raumtemperatur mit Odyssey[®] Blocking Buffer TBS (Li-COR) blockiert. Nachdem die Membranen dreimal mit je 5 mL TBS-T gewaschen wurden, erfolgte die Inkubation mit in Odyssey[®] Blocking Buffer TBS-verdünnten primären Antikörpern über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Nach der Inkubation der primären Antikörper wurden die Membranen erneut dreimal mit je 5 mL TBS-T für 5 min gewaschen, bevor sie mit den sekundären Antikörpern, verdünnt in Odyssey[®] Blocking Buffer TBS, für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert wurden. Nach der Inkubation der sekundären Antikörper wurden die Membranen dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen und anschließend mit einem Odyssey[®] CLx Imaging-System (Li-COR) gescannt. Die erhaltenen Aufnahmen wurden mit der Software Image Studio Lite (Li-COR) final bearbeitet und mit der Software Empiria Studio (Li-COR) quantifiziert. Die zum Nachweis der einzelnen Proteine verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle 23 aufgelistet.

TBS-T: 50 mM TRIS pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05 % Tween 20.

Tabelle 23 | Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.

Antikörper	MW (kDa)	Wirt	Verdünnung
KRas	21	Maus	1:1000
pcRaf	74	Kaninchen	1:1000
tAkt pAkt	60	Kaninchen	1:1000
tErk pErk	42/44	Maus Kaninchen	1:2000 1:2000
tS6 pS6	32	Maus Kaninchen	1:1000 1:2000
β-Aktin	42	Maus	1:5000
	45	Kaninchen	1:1000
anti-Mouse (DyLight™ 680 Conjugate)	-	Ziege	1:15000
anti-Rabbit (DyLight™ 800 4X PEG Conjugate)	-	Ziege	1:30000

5.8.7. CellTiter-Glo®-Viabilitätsassay

Der CellTiter-Glo®-Viabilitätsassay wurde zur Bestimmung der anti-proliferativen Eigenschaften bestimmter Inhibitoren gegenüber klinisch relevanten Zelllinien verwendet.

Dabei wurde zunächst der lineare Wachstumsbereich jeder Zelllinie bestimmt, indem die Zellen auf einer 384-*well*-Platte in Verdünnungsreihen (0, 50, 200, 200, 400, 800, 1600, 3200 Zellen/*well* in 25 µL) ausplattiert wurden. Nach einer Inkubationszeit von 4 d bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte die Zellviabilitätsmessung mittels CTG-Reagenzes, wie nachfolgend beschrieben.

Nach erfolgter Zellzahloptimierung wurden die Zellen mit der entsprechenden Zellzahl mittels Multidrop™ Dispenser (ThermoFisher Scientific) kontaktlos auf einer 384-*well*-Platte ausgesät und 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer Feuchtekammer inkubiert. Die Testsubstanzen wurden neben einer Negativkontrolle (DMSO) sowie einer Positivkontrolle (Staurosporin) mit dem Echo 520 Liquid Handler (Labcyte) in Verdünnungsreihen (0.1 nM - 30 µM) auf die Zellsuspension transferiert. Nach einer weiteren 72-stündigen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer Feuchtekammer wurden 25 µL CTG®-Reagenz/PBS (1:1) mittels Mutlidrop™ auf die Zellen pipettiert. Die Assayplatte wurde für 2 min bei 1200 rpm geschüttelt, um die Zellyse zu induzieren, und anschließend für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert, um das lumineszierende Signal zu stabilisieren. Das Auslesen der Assayplatten erfolgte mit einem Envision Plate Reader (Perkin Elmer), wobei das lumineszente Signal über 500 ms detektiert wurde. Die anschließende Bestimmung der EC₅₀-Werte aus den Rohdaten erfolgte mit dem Programm Workflow aus dem Quattro Research Software Paket.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Cox, A. D.; Fesik, S. W.; Kimmelman, A. C.; Luo, J.; Der, C. J., Drugging the undruggable RAS: Mission possible? *Nature reviews. Drug discovery* **2014**, *13* (11), 828-51.
2. Moore, A. R.; Rosenberg, S. C.; McCormick, F.; Malek, S., RAS-targeted therapies: is the undruggable drugged? *Nature reviews. Drug discovery* **2020**, *19* (8), 533-552.
3. Dang, C. V.; Reddy, E. P.; Shokat, K. M.; Soucek, L., Drugging the 'undruggable' cancer targets. *Nature reviews. Cancer* **2017**, *17* (8), 502-508.
4. Goebel, L.; Müller, M. P.; Goody, R. S.; Rauh, D., KRasG12C inhibitors in clinical trials: a short historical perspective. *RSC medicinal chemistry* **2020**, *11* (7), 760-770.
5. Canon, J.; Rex, K.; Saiki, A. Y.; Mohr, C.; Cooke, K.; Bagal, D.; Gaida, K.; Holt, T.; Knutson, C. G.; Koppada, N.; Lanman, B. A.; Werner, J.; Rapaport, A. S.; San Miguel, T.; Ortiz, R.; Osgood, T.; Sun, J. R.; Zhu, X.; McCarter, J. D.; Volak, L. P.; Houk, B. E.; Fakih, M. G.; O'Neil, B. H.; Price, T. J.; Falchook, G. S.; Desai, J.; Kuo, J.; Govindan, R.; Hong, D. S.; Ouyang, W.; Henary, H.; Arvedson, T.; Cee, V. J.; Lipford, J. R., The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Nature* **2019**, *575* (7781), 217-223.
6. Hong, D. S.; Fakih, M. G.; Strickler, J. H.; Desai, J.; Durm, G. A.; Shapiro, G. I.; Falchook, G. S.; Price, T. J.; Sacher, A.; Denlinger, C. S.; Bang, Y. J.; Dy, G. K.; Krauss, J. C.; Kuboki, Y.; Kuo, J. C.; Coveler, A. L.; Park, K.; Kim, T. W.; Barlesi, F.; Munster, P. N.; Ramalingam, S. S.; Burns, T. F.; Meric-Bernstam, F.; Henary, H.; Ngang, J.; Ngarmchamnanrith, G.; Kim, J.; Houk, B. E.; Canon, J.; Lipford, J. R.; Friberg, G.; Lito, P.; Govindan, R.; Li, B. T., KRAS(G12C) Inhibition with Sotorasib in Advanced Solid Tumors. *The New England journal of medicine* **2020**, *383* (13), 1207-1217.
7. Hallin, J.; Engstrom, L. D.; Hargis, L.; Calinisan, A.; Aranda, R.; Briere, D. M.; Sudhakar, N.; Bowcut, V.; Baer, B. R.; Ballard, J. A.; Burkard, M. R.; Fell, J. B.; Fischer, J. P.; Vigers, G. P.; Xue, Y.; Gatto, S.; Fernandez-Banet, J.; Pavlicek, A.; Velastagui, K.; Chao, R. C.; Barton, J.; Pierobon, M.; Baldelli, E.; Patricoin, E. F., 3rd; Cassidy, D. P.; Marx, M. A.; Rybkin, II; Johnson, M. L.; Ou, S. I.; Lito, P.; Papadopoulos, K. P.; Jänne, P. A.; Olson, P.; Christensen, J. G., The KRAS(G12C) Inhibitor MRTX849 Provides Insight toward Therapeutic Susceptibility of KRAS-Mutant Cancers in Mouse Models and Patients. *Cancer discovery* **2020**, *10* (1), 54-71.
8. Fell, J. B.; Fischer, J. P.; Baer, B. R.; Blake, J. F.; Bouhana, K.; Briere, D. M.; Brown, K. D.; Burgess, L. E.; Burns, A. C.; Burkard, M. R.; Chiang, H.; Chicarelli, M. J.; Cook, A. W.; Gaudino, J. J.; Hallin, J.; Hanson, L.; Hartley, D. P.; Hicken, E. J.; Hingorani, G. P.; Hinklin, R. J.; Mejia, M. J.; Olson, P.; Otten, J. N.; Rhodes, S. P.; Rodriguez, M. E.; Savechenkov, P.; Smith, D. J.; Sudhakar, N.; Sullivan, F. X.; Tang, T. P.; Vigers, G. P.; Wollenberg, L.; Christensen, J. G.; Marx, M. A., Identification of the Clinical Development Candidate MRTX849, a Covalent KRAS(G12C) Inhibitor for the Treatment of Cancer. *Journal of medicinal chemistry* **2020**, *63* (13), 6679-6693.

9. clinicaltrials.gov, A Phase 1/2, Study Evaluating the Safety, Tolerability, PK, and Efficacy of AMG 510 in Subjects With Solid Tumors With a Specific KRAS Mutation. **2018**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03600883>.
10. clinicaltrials.gov, Phase 1/2 Study of MRTX849 in Patients With Cancer Having a KRAS G12C Mutation. **2018**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03785249>.
11. clinicaltrials.gov, First-in-Human Study of JNJ-74699157 in Participants With Tumors Harboring the KRAS G12C Mutation. **2019**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04006301>.
12. Mullard, A., FDA approves first-in-class KRAS inhibitor. *Nature reviews. Drug discovery* **2021**.
13. Lim, S. M.; Westover, K. D.; Ficarro, S. B.; Harrison, R. A.; Choi, H. G.; Pacold, M. E.; Carrasco, M.; Hunter, J.; Kim, N. D.; Xie, T.; Sim, T.; Jänne, P. A.; Meyerson, M.; Marto, J. A.; Engen, J. R.; Gray, N. S., Therapeutic targeting of oncogenic K-Ras by a covalent catalytic site inhibitor. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2014**, *53* (1), 199-204.
14. Xiong, Y.; Lu, J.; Hunter, J.; Li, L.; Scott, D.; Choi, H. G.; Lim, S. M.; Manandhar, A.; Gondi, S.; Sim, T.; Westover, K. D.; Gray, N. S., Covalent Guanosine Mimetic Inhibitors of G12C KRAS. *ACS medicinal chemistry letters* **2017**, *8* (1), 61-66.
15. Müller, M. P.; Jeganathan, S.; Heidrich, A.; Campos, J.; Goody, R. S., Nucleotide based covalent inhibitors of KRas can only be efficient in vivo if they bind reversibly with GTP-like affinity. *Scientific reports* **2017**, *7* (1), 3687.
16. Ferlay J, E. M., Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I, Bray F, Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. **2020**, <https://gco.iarc.fr/today>, Stand: 29.05.2021.
17. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F., Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians* **2021**, *71* (3), 209-249.
18. Weinstein, I. B., Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer. *Science (New York, N.Y.)* **2002**, *297* (5578), 63-4.
19. Sharma, S. V.; Fischbach, M. A.; Haber, D. A.; Settleman, J., "Oncogenic shock": explaining oncogene addiction through differential signal attenuation. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2006**, *12* (14 Pt 2), 4392s-4395s.
20. Hopkins, A. L.; Groom, C. R., The druggable genome. *Nature reviews. Drug discovery* **2002**, *1* (9), 727-30.
21. DeFeo, D.; Gonda, M. A.; Young, H. A.; Chang, E. H.; Lowy, D. R.; Scolnick, E. M.; Ellis, R. W., Analysis of two divergent rat genomic clones homologous to the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1981**, *78* (6), 3328-32.
22. Wennerberg, K.; Rossman, K. L.; Der, C. J., The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science* **2005**, *118* (Pt 5), 843-6.

23. Malumbres, M.; Barbacid, M., RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews. Cancer* **2003**, *3* (6), 459-65.
24. Cox, A. D.; Der, C. J., Ras history: The saga continues. *Small GTPases* **2010**, *1* (1), 2-27.
25. Weiss, R. A., A perspective on the early days of RAS research. *Cancer metastasis reviews* **2020**, *39* (4), 1023-1028.
26. Kirsten, W. H.; Mayer, L. A., Morphologic responses to a murine erythroblastosis virus. *Journal of the National Cancer Institute* **1967**, *39* (2), 311-35.
27. Harvey, J. J., An Unidentified Virus which causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature* **1964**, *204* (4963), 1104-1105.
28. Shimizu, K.; Goldfarb, M.; Suard, Y.; Perucho, M.; Li, Y.; Kamata, T.; Feramisco, J.; Stavnezer, E.; Fogh, J.; Wigler, M. H., Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1983**, *80* (8), 2112-6.
29. Hall, A.; Marshall, C. J.; Spurr, N. K.; Weiss, R. A., Identification of transforming gene in two human sarcoma cell lines as a new member of the ras gene family located on chromosome 1. *Nature* **1983**, *303* (5916), 396-400.
30. Hobbs, G. A.; Der, C. J.; Rossman, K. L., RAS isoforms and mutations in cancer at a glance. *Journal of cell science* **2016**, *129* (7), 1287-92.
31. Valencia, A.; Chardin, P.; Wittinghofer, A.; Sander, C., The ras protein family: evolutionary tree and role of conserved amino acids. *Biochemistry* **1991**, *30* (19), 4637-48.
32. Bourne, H. R.; Sanders, D. A.; McCormick, F., The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **1991**, *349* (6305), 117-27.
33. Saraste, M.; Sibbald, P. R.; Wittinghofer, A., The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends in biochemical sciences* **1990**, *15* (11), 430-4.
34. Milburn, M. V.; Tong, L.; deVos, A. M.; Brünger, A.; Yamaizumi, Z.; Nishimura, S.; Kim, S. H., Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science (New York, N.Y.)* **1990**, *247* (4945), 939-45.
35. Herrmann, C., Ras-effector interactions: after one decade. *Current opinion in structural biology* **2003**, *13* (1), 122-9.
36. Zhong, J. M.; Chen-Hwang, M. C.; Hwang, Y. W., Switching nucleotide specificity of Ha-Ras p21 by a single amino acid substitution at aspartate 119. *The Journal of biological chemistry* **1995**, *270* (17), 10002-7.
37. Rensland, H.; John, J.; Linke, R.; Simon, I.; Schlichting, I.; Wittinghofer, A.; Goody, R. S., Substrate and product structural requirements for binding of nucleotides to H-ras p21: the mechanism of discrimination between guanosine and adenosine nucleotides. *Biochemistry* **1995**, *34* (2), 593-9.

38. Schmidt, G.; Lenzen, C.; Simon, I.; Deuter, R.; Cool, R. H.; Goody, R. S.; Wittinghofer, A., Biochemical and biological consequences of changing the specificity of p21ras from guanosine to xanthosine nucleotides. *Oncogene* **1996**, *12* (1), 87-96.
39. Hancock, J. F.; Magee, A. I.; Childs, J. E.; Marshall, C. J., All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* **1989**, *57* (7), 1167-77.
40. Hancock, J. F.; Paterson, H.; Marshall, C. J., A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **1990**, *63* (1), 133-9.
41. Goody, R. S.; Müller, M. P.; Rauh, D., Mutant-Specific Targeting of Ras G12C Activity by Covalently Reacting Small Molecules. *Cell chemical biology* **2019**, *26* (10), 1338-1348.
42. Vetter, I. R.; Wittinghofer, A., The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science (New York, N.Y.)* **2001**, *294* (5545), 1299-304.
43. Karnoub, A. E.; Weinberg, R. A., Ras oncogenes: split personalities. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2008**, *9* (7), 517-31.
44. Boriack-Sjodin, P. A.; Margarit, S. M.; Bar-Sagi, D.; Kuriyan, J., The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature* **1998**, *394* (6691), 337-43.
45. Ahmadian, M. R.; Stege, P.; Scheffzek, K.; Wittinghofer, A., Confirmation of the arginine-finger hypothesis for the GAP-stimulated GTP-hydrolysis reaction of Ras. *Nature structural biology* **1997**, *4* (9), 686-9.
46. Bos, J. L.; Rehmann, H.; Wittinghofer, A., GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **2007**, *129* (5), 865-77.
47. Ostrem, J. M.; Peters, U.; Sos, M. L.; Wells, J. A.; Shokat, K. M., K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* **2013**, *503* (7477), 548-51.
48. Simanshu, D. K.; Nissley, D. V.; McCormick, F., RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell* **2017**, *170* (1), 17-33.
49. Scheffzek, K.; Ahmadian, M. R.; Kabsch, W.; Wiesmüller, L.; Lautwein, A.; Schmitz, F.; Wittinghofer, A., The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science (New York, N.Y.)* **1997**, *277* (5324), 333-8.
50. Buhrman, G.; Holzapfel, G.; Fetics, S.; Mattos, C., Allosteric modulation of Ras positions Q61 for a direct role in catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107* (11), 4931-6.
51. Hunter, J. C.; Manandhar, A.; Carrasco, M. A.; Gurbani, D.; Gondi, S.; Westover, K. D., Biochemical and Structural Analysis of Common Cancer-Associated KRAS Mutations. *Molecular cancer research : MCR* **2015**, *13* (9), 1325-35.
52. Thaimattam, R.; Banerjee, R.; Miglani, R.; Iqbal, J., Protein kinase inhibitors: structural insights into selectivity. *Current pharmaceutical design* **2007**, *13* (27), 2751-65.
53. Traut, T. W., Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and cellular biochemistry* **1994**, *140* (1), 1-22.

54. John, J.; Sohmen, R.; Feuerstein, J.; Linke, R.; Wittinghofer, A.; Goody, R. S., Kinetics of interaction of nucleotides with nucleotide-free H-ras p21. *Biochemistry* **1990**, *29* (25), 6058-65.
55. Goody, R. S.; Frech, M.; Wittinghofer, A., Affinity of guanine nucleotide binding proteins for their ligands: facts and artefacts. *Trends in biochemical sciences* **1991**, *16* (9), 327-8.
56. Dekker, F. J.; Rocks, O.; Vartak, N.; Menninger, S.; Hedberg, C.; Balamurugan, R.; Wetzell, S.; Renner, S.; Gerauer, M.; Schölermann, B.; Rusch, M.; Kramer, J. W.; Rauh, D.; Coates, G. W.; Brunsveld, L.; Bastiaens, P. I.; Waldmann, H., Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling. *Nature chemical biology* **2010**, *6* (6), 449-56.
57. Berndt, N.; Hamilton, A. D.; Sebt, S. M., Targeting protein prenylation for cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* **2011**, *11* (11), 775-91.
58. Whyte, D. B.; Kirschmeier, P.; Hockenberry, T. N.; Nunez-Oliva, I.; James, L.; Catino, J. J.; Bishop, W. R.; Pai, J. K., K- and N-Ras are geranylgeranylated in cells treated with farnesyl protein transferase inhibitors. *The Journal of biological chemistry* **1997**, *272* (22), 14459-64.
59. Ho, A. L.; Brana, I.; Haddad, R.; Bauman, J.; Bible, K.; Oosting, S.; Wong, D. J.; Ahn, M. J.; Boni, V.; Even, C.; Fayette, J.; Flor, M. J.; Harrington, K.; Kim, S. B.; Licitra, L.; Nixon, I.; Saba, N. F.; Hackenberg, S.; Specenier, P.; Worden, F.; Balsara, B.; Leoni, M.; Martell, B.; Scholz, C.; Gualberto, A., Tipifarnib in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma With HRAS Mutations. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2021**, *39* (17), 1856-1864.
60. Zimmermann, G.; Papke, B.; Ismail, S.; Vartak, N.; Chandra, A.; Hoffmann, M.; Hahn, S. A.; Triola, G.; Wittinghofer, A.; Bastiaens, P. I.; Waldmann, H., Small molecule inhibition of the KRAS-PDE δ interaction impairs oncogenic KRAS signalling. *Nature* **2013**, *497* (7451), 638-42.
61. Papke, B.; Murarka, S.; Vogel, H. A.; Martín-Gago, P.; Kovacevic, M.; Truxius, D. C.; Fansa, E. K.; Ismail, S.; Zimmermann, G.; Heinelt, K.; Schultz-Fademrecht, C.; Al Saabi, A.; Baumann, M.; Nussbaumer, P.; Wittinghofer, A.; Waldmann, H.; Bastiaens, P. I., Identification of pyrazolopyridazinones as PDE δ inhibitors. *Nature communications* **2016**, *7*, 11360.
62. Martín-Gago, P.; Fansa, E. K.; Klein, C. H.; Murarka, S.; Janning, P.; Schürmann, M.; Metz, M.; Ismail, S.; Schultz-Fademrecht, C.; Baumann, M.; Bastiaens, P. I.; Wittinghofer, A.; Waldmann, H., A PDE δ -KRas Inhibitor Chemotype with up to Seven H-Bonds and Picomolar Affinity that Prevents Efficient Inhibitor Release by Arl2. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2017**, *56* (9), 2423-2428.
63. Janku, F.; Yap, T. A.; Meric-Bernstam, F., Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway? *Nature reviews. Clinical oncology* **2018**, *15* (5), 273-291.

64. Heidorn, S. J.; Milagre, C.; Whittaker, S.; Nourry, A.; Niculescu-Duvas, I.; Dhomen, N.; Hussain, J.; Reis-Filho, J. S.; Springer, C. J.; Pritchard, C.; Marais, R., Kinase-dead BRAF and oncogenic RAS cooperate to drive tumor progression through CRAF. *Cell* **2010**, *140* (2), 209-21.
65. Hatzivassiliou, G.; Song, K.; Yen, I.; Brandhuber, B. J.; Anderson, D. J.; Alvarado, R.; Ludlam, M. J.; Stokoe, D.; Gloor, S. L.; Vigers, G.; Morales, T.; Aliagas, I.; Liu, B.; Sideris, S.; Hoeflich, K. P.; Jaiswal, B. S.; Seshagiri, S.; Koeppen, H.; Belvin, M.; Friedman, L. S.; Malek, S., RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth. *Nature* **2010**, *464* (7287), 431-5.
66. Poulikakos, P. I.; Zhang, C.; Bollag, G.; Shokat, K. M.; Rosen, N., RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* **2010**, *464* (7287), 427-30.
67. Duncan, J. S.; Whittle, M. C.; Nakamura, K.; Abell, A. N.; Midland, A. A.; Zawistowski, J. S.; Johnson, N. L.; Granger, D. A.; Jordan, N. V.; Darr, D. B.; Usary, J.; Kuan, P. F.; Smalley, D. M.; Major, B.; He, X.; Hoadley, K. A.; Zhou, B.; Sharpless, N. E.; Perou, C. M.; Kim, W. Y.; Gomez, S. M.; Chen, X.; Jin, J.; Frye, S. V.; Earp, H. S.; Graves, L. M.; Johnson, G. L., Dynamic reprogramming of the kinome in response to targeted MEK inhibition in triple-negative breast cancer. *Cell* **2012**, *149* (2), 307-21.
68. clinicaltrials.gov, Study to Test Different Doses of BI1701963 Alone and Combined With Trametinib in Patients With Different Types of Advanced Cancer (Solid Tumours With KRAS Mutation). **2019**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04111458>.
69. Margarit, S. M.; Sondermann, H.; Hall, B. E.; Nagar, B.; Hoelz, A.; Pirruccello, M.; Bar-Sagi, D.; Kuriyan, J., Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS. *Cell* **2003**, *112* (5), 685-95.
70. Jeng, H. H.; Taylor, L. J.; Bar-Sagi, D., Sos-mediated cross-activation of wild-type Ras by oncogenic Ras is essential for tumorigenesis. *Nature communications* **2012**, *3*, 1168.
71. clinicaltrials.gov, Dose Finding Study of TNO155 in Adult Patients With Advanced Solid Tumors. **2017**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03114319>.
72. clinicaltrials.gov, A First in Human, Dose Escalation Study of JAB-3068 (SHP2 Inhibitor) in Adult Patients with Advanced Solid Tumors. **2018**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03518554>.
73. clinicaltrials.gov, Dose Escalation of RMC-4630 Monotherapy in Relapsed/Refractory Solid Tumors. **2018**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03634982>.
74. clinicaltrials.gov, A First-in-Human, Phase 1 Study of JAB-3312 in Adult Patients With Advanced Solid Tumors. **2019**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04045496>.
75. clinicaltrials.gov, RLY-1971 in Subjects With Advanced or Metastatic Solid Tumors. **2020**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04252339>.

-
76. clinicaltrials.gov, First-in-Human Study of the SHP2 Inhibitor BBP-398 in Patients With Advanced Solid Tumors. **2020**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04528836>.
77. clinicaltrials.gov, A Dose Escalation/Expansion Study of ERAS-601 in Patients With Advanced or Metastatic Solid Tumors (FLAGSHP-1). **2020**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04670679>.
78. clinicaltrials.gov, A Study to Investigate Safety and Tolerability of SH3809 Tablet in Patients With Advanced Solid Tumors. **2021**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04843033>.
79. Janes, M. R.; Zhang, J.; Li, L. S.; Hansen, R.; Peters, U.; Guo, X.; Chen, Y.; Babbar, A.; Firdaus, S. J.; Darjania, L.; Feng, J.; Chen, J. H.; Li, S.; Li, S.; Long, Y. O.; Thach, C.; Liu, Y.; Zariéh, A.; Ely, T.; Kucharski, J. M.; Kessler, L. V.; Wu, T.; Yu, K.; Wang, Y.; Yao, Y.; Deng, X.; Zarrinkar, P. P.; Brehmer, D.; Dhanak, D.; Lorenzi, M. V.; Hu-Lowe, D.; Patricelli, M. P.; Ren, P.; Liu, Y., Targeting KRAS Mutant Cancers with a Covalent G12C-Specific Inhibitor. *Cell* **2018**, *172* (3), 578-589.e17.
80. Erlanson, D. A.; Braisted, A. C.; Raphael, D. R.; Randal, M.; Stroud, R. M.; Gordon, E. M.; Wells, J. A., Site-directed ligand discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, *97* (17), 9367-72.
81. Patricelli, M. P.; Janes, M. R.; Li, L. S.; Hansen, R.; Peters, U.; Kessler, L. V.; Chen, Y.; Kucharski, J. M.; Feng, J.; Ely, T.; Chen, J. H.; Firdaus, S. J.; Babbar, A.; Ren, P.; Liu, Y., Selective Inhibition of Oncogenic KRAS Output with Small Molecules Targeting the Inactive State. *Cancer discovery* **2016**, *6* (3), 316-29.
82. Shin, Y.; Jeong, J. W.; Wurz, R. P.; Achanta, P.; Arvedson, T.; Bartberger, M. D.; Campuzano, I. D. G.; Fucini, R.; Hansen, S. K.; Ingersoll, J.; Iwig, J. S.; Lipford, J. R.; Ma, V.; Kopecky, D. J.; McCarter, J.; San Miguel, T.; Mohr, C.; Sabet, S.; Saiki, A. Y.; Sawayama, A.; Sethofer, S.; Tegley, C. M.; Volak, L. P.; Yang, K.; Lanman, B. A.; Erlanson, D. A.; Cee, V. J., Discovery of N-(1-Acryloylazetidind-3-yl)-2-(1H-indol-1-yl)acetamides as Covalent Inhibitors of KRAS(G12C). *ACS medicinal chemistry letters* **2019**, *10* (9), 1302-1308.
83. Lanman, B. A.; Allen, J. R.; Allen, J. G.; Amegadzie, A. K.; Ashton, K. S.; Booker, S. K.; Chen, J. J.; Chen, N.; Frohn, M. J.; Goodman, G.; Kopecky, D. J.; Liu, L.; Lopez, P.; Low, J. D.; Ma, V.; Minatti, A. E.; Nguyen, T. T.; Nishimura, N.; Pickrell, A. J.; Reed, A. B.; Shin, Y.; Siegmund, A. C.; Tamayo, N. A.; Tegley, C. M.; Walton, M. C.; Wang, H. L.; Wurz, R. P.; Xue, M.; Yang, K. C.; Achanta, P.; Bartberger, M. D.; Canon, J.; Hollis, L. S.; McCarter, J. D.; Mohr, C.; Rex, K.; Saiki, A. Y.; San Miguel, T.; Volak, L. P.; Wang, K. H.; Whittington, D. A.; Zech, S. G.; Lipford, J. R.; Cee, V. J., Discovery of a Covalent Inhibitor of KRAS(G12C) (AMG 510) for the Treatment of Solid Tumors. *Journal of medicinal chemistry* **2020**, *63* (1), 52-65.
84. clinicaltrials.gov, AMG 510 Activity in Subjects With Advanced Solid Tumors With KRAS p.G12C Mutation. **2019**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04185883>.
85. clinicaltrials.gov, AMG 510 Ethnic Sensitivity Study. **2020**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04380753>.

86. clinicaltrials.gov, Study to Compare AMG 510 "Proposed INN Sotorasib" With Docetaxel in Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC). **2020**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04303780>.
87. clinicaltrials.gov, Expanded Access of AMG 510 (Sotorasib). **2020**, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04667234>.
88. Fell, J. B.; Fischer, J. P.; Baer, B. R.; Ballard, J.; Blake, J. F.; Bouhana, K.; Brandhuber, B. J.; Briere, D. M.; Burgess, L. E.; Burkard, M. R.; Chiang, H.; Chicarelli, M. J.; Davidson, K.; Gaudino, J. J.; Hallin, J.; Hanson, L.; Hee, K.; Hicken, E. J.; Hinklin, R. J.; Marx, M. A.; Mejia, M. J.; Olson, P.; Savechenkov, P.; Sudhakar, N.; Tang, T. P.; Vigers, G. P.; Zecca, H.; Christensen, J. G., Discovery of Tetrahydropyridopyrimidines as Irreversible Covalent Inhibitors of KRAS-G12C with In Vivo Activity. *ACS medicinal chemistry letters* **2018**, *9* (12), 1230-1234.
89. Ou, S. I.; Jänne, P. A.; Leal, T. A.; Rybkin, I.; Sabari, J. K.; Barve, M. A.; Bazhenova, L. A.; Johnson, M. L.; Velastegui, K. L.; Cilliers, C.; Christensen, J. G.; Yan, X.; Chao, R. C.; Papadopoulos, K. P., First-in-Human Phase I/IB Dose-Finding Study of Adagrasib (MRTX849) in Patients With Advanced KRAS(G12C) Solid Tumors (KRYSTAL-1). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **2022**, Jco2102752.
90. Jänne, P. A.; Rybkin, I. I.; Spira, A. I.; Riely, G. J.; Papadopoulos, K. P.; Sabari, J. K.; Johnson, M. L.; Heist, R. S.; Bazhenova, L.; Barve, M.; Pacheco, J. M.; Leal, T. A.; Velastegui, K.; Cornelius, C.; Olson, P.; Christensen, J. G.; Kheoh, T.; Chao, R. C.; Ou, S. H. I., KRYSTAL-1: Activity and Safety of Adagrasib (MRTX849) in Advanced/Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Harboring KRAS G12C Mutation. *EORTC-NCI-AACR Symposium* **2020**, Abstract LBA3. Presented October 25, 2020.
91. Johnson, M. L.; Ou, S. H. I.; Barve, M.; Rybkin, I. I.; Papadopoulos, K. P.; Leal, T. A.; Velastegui, K.; Christensen, J. G.; Kheoh, T.; Chao, R. C.; Weiss, J., KRYSTAL-1: Activity and Safety of Adagrasib (MRTX849) in Patients with Colorectal Cancer (CRC) and Other Solid Tumors Harboring a KRAS G12C Mutation. *EORTC-NCI-AACR Symposium* **2020**, Abstract LBA4. Presented October 25, 2020.
92. clinicaltrials.gov, Phase 1/2 Study in Patients With Cancer Having a KRAS G12C Mutation. **2020**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04330664>.
93. clinicaltrials.gov, Phase 2 Trial of MRTX849 Plus Pembrolizumab for NSCLC With KRAS G12C Mutation. **2020**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04613596>.
94. clinicaltrials.gov, Phase 3 Study of MRTX849 vs Docetaxel in Patients With Advanced Non-Small Cell Lung Cancer With KRAS G12C Mutation. **2020**, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04685135>.
95. clinicaltrials.gov, Phase 3 Study of MRTX849 With Cetuximab vs Chemotherapy in Patients With Advanced Colorectal Cancer With KRAS G12C Mutation. **2021**, <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04793958>.

96. Wang, J.; Martin-Romano, P.; Cassier, P.; Johnson, M.; Haura, E.; Lenox, L.; Guo, Y.; Bandyopadhyay, N.; Russell, M.; Shearin, E.; Lauring, J.; Dahan, L., Phase I Study of JNJ-74699157 in Patients with Advanced Solid Tumors Harboring the KRAS G12C Mutation. *The oncologist* **2022**.
97. Wang, X.; Allen, S.; Blake, J. F.; Bowcut, V.; Briere, D. M.; Calinisan, A.; Dahlke, J. R.; Fell, J. B.; Fischer, J. P.; Gunn, R. J.; Hallin, J.; Laguer, J.; Lawson, J. D.; Medwid, J.; Newhouse, B.; Nguyen, P.; O'Leary, J. M.; Olson, P.; Pajk, S.; Rahbaek, L.; Rodriguez, M.; Smith, C. R.; Tang, T. P.; Thomas, N. C.; Vanderpool, D.; Vigers, G. P.; Christensen, J. G.; Marx, M. A., Identification of MRTX1133, a Noncovalent, Potent, and Selective KRAS(G12D) Inhibitor. *Journal of medicinal chemistry* **2021**.
98. Zheng, Q.; Peacock, D. M.; Shokat, K. M., Drugging the Next Undruggable KRAS Allele-Gly12Asp. *Journal of medicinal chemistry* **2022**, *65* (4), 3119-3122.
99. Visscher, M.; Arkin, M. R.; Dansen, T. B., Covalent targeting of acquired cysteines in cancer. *Current opinion in chemical biology* **2016**, *30*, 61-67.
100. Tate, J. G.; Bamford, S.; Jubb, H. C.; Sondka, Z.; Beare, D. M.; Bindal, N.; Boutselakis, H.; Cole, C. G.; Creatore, C.; Dawson, E.; Fish, P.; Harsha, B.; Hathaway, C.; Jupe, S. C.; Kok, C. Y.; Noble, K.; Ponting, L.; Ramshaw, C. C.; Rye, C. E.; Speedy, H. E.; Stefancsik, R.; Thompson, S. L.; Wang, S.; Ward, S.; Campbell, P. J.; Forbes, S. A., COSMIC: the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer. *Nucleic acids research* **2019**, *47* (D1), D941-d947.
101. Klebe, G., Recent developments in structure-based drug design. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* **2000**, *78* (5), 269-81.
102. Hunter, J. C.; Gurbani, D.; Ficarro, S. B.; Carrasco, M. A.; Lim, S. M.; Choi, H. G.; Xie, T.; Marto, J. A.; Chen, Z.; Gray, N. S.; Westover, K. D., In situ selectivity profiling and crystal structure of SML-8-73-1, an active site inhibitor of oncogenic K-Ras G12C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2014**, *111* (24), 8895-900.
103. Jeganathan, S.; Müller, M. P.; Ali, I.; Goody, R. S., Assays for Nucleotide Competitive Reversible and Irreversible Inhibitors of Ras GTPases. *Biochemistry* **2018**, *57* (31), 4690-4699.
104. Wiegandt, D.; Vieweg, S.; Hofmann, F.; Koch, D.; Li, F.; Wu, Y. W.; Itzen, A.; Müller, M. P.; Goody, R. S., Locking GTPases covalently in their functional states. *Nature communications* **2015**, *6*, 7773.
105. Eberth, A.; Dvorsky, R.; Becker, C. F.; Beste, A.; Goody, R. S.; Ahmadian, M. R., Monitoring the real-time kinetics of the hydrolysis reaction of guanine nucleotide-binding proteins. *Biological chemistry* **2005**, *386* (11), 1105-14.
106. Hunter, J. C.; Gray, N. S.; Westover, K. D., Chapter 9 - GTP-Competitive Inhibitors of RAS Family Members. **2017**, 155-174.
107. Cremo, C. R., Fluorescent nucleotides: synthesis and characterization. *Methods in enzymology* **2003**, *360*, 128-77.
108. Cremo, C. R.; Neuron, J. M.; Yount, R. G., Interaction of myosin subfragment 1 with fluorescent ribose-modified nucleotides. A comparison of vanadate trapping and SH1-SH2 cross-linking. *Biochemistry* **1990**, *29* (13), 3309-19.

109. Maeda, M.; Patel, A. D.; Hampton, A., Formation of ribonucleotide 2',3'-cyclic carbonates during conversion of ribonucleoside 5'-phosphates to diphosphates and triphosphates by the phosphorimidazolide procedure. *Nucleic acids research* **1977**, *4* (8), 2843-53.
110. Michael, A., Ueber die Addition von Natriumacetessig- und Natriummalonsäureäthern zu den Aethern ungesättigter Säuren. *Journal für Praktische Chemie* **1887**, *35* (1), 349-356.
111. Eckstein, F.; Kettler, M.; Parmeggiani, A., Guanylylimidodiphosphate and its interaction with amino acid polymerization factors. *Biochemical and biophysical research communications* **1971**, *45* (5), 1151-8.
112. Reese, C.; Trentham, D., Acyl migration in ribonucleoside derivatives. *Tetrahedron letters* **1965**, *29*, 2467-72.
113. Eccleston, J. F.; Moore, K. J.; Brownbridge, G. G.; Webb, M. R.; Lowe, P. N., Fluorescence approaches to the study of the p21ras GTPase mechanism. *Biochemical Society transactions* **1991**, *19* (2), 432-7.
114. Rensland, H.; Lautwein, A.; Wittinghofer, A.; Goody, R. S., Is there a rate-limiting step before GTP cleavage by H-ras p21? *Biochemistry* **1991**, *30* (46), 11181-5.
115. Jameson, D. M.; Eccleston, J. F., Fluorescent nucleotide analogs: synthesis and applications. *Methods in enzymology* **1997**, *278*, 363-90.
116. Son, T. D.; Chachaty, C., Proton NMR and spin lattice relaxation study of nucleoside di- and triphosphates in neutral aqueous solutions. *Biochimica et biophysica acta* **1977**, *500* (2), 405-18.
117. Mahmood, R.; Cremona, C.; Nakamaye, K. L.; Yount, R. G., The interaction and photolabeling of myosin subfragment 1 with 3'(2')-O-(4-benzoyl)benzoyladenine 5'-triphosphate. *The Journal of biological chemistry* **1987**, *262* (30), 14479-86.
118. Anet, F. A. L.; Bourn, A. J. R., Nuclear Magnetic Resonance Spectral Assignments from Nuclear Overhauser Effects I. *Journal of the American Chemical Society* **1965**, *87* (22), 5250-5251.
119. Huecas, S.; Marcelo, F.; Perona, A.; Ruiz-Ávila, L. B.; Morreale, A.; Cañada, F. J.; Jiménez-Barbero, J.; Andreu, J. M., Beyond a Fluorescent Probe: Inhibition of Cell Division Protein FtsZ by mant-GTP Elucidated by NMR and Biochemical Approaches. *ACS chemical biology* **2015**, *10* (10), 2382-92.
120. Graefe, K. H.; Lutz, W.; Bönsch, H., *Duale Reihe Pharmakologie und Toxikologie*. Thieme: Stuttgart, 2016.
121. Li, C.; Vides, A.; Kim, D.; Xue, J. Y.; Zhao, Y.; Lito, P., The G protein signaling regulator RGS3 enhances the GTPase activity of KRAS. *Science (New York, N.Y.)* **2021**, *374* (6564), 197-201.

122. Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S. A. A.; Ballard, A. J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A. W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D., Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **2021**, *596* (7873), 583-589.
123. Varadi, M.; Anyango, S.; Deshpande, M.; Nair, S.; Natassia, C.; Yordanova, G.; Yuan, D.; Stroe, O.; Wood, G.; Laydon, A.; Žídek, A.; Green, T.; Tunyasuvunakool, K.; Petersen, S.; Jumper, J.; Clancy, E.; Green, R.; Vora, A.; Lutfi, M.; Figurnov, M.; Cowie, A.; Hobbs, N.; Kohli, P.; Kleywegt, G.; Birney, E.; Hassabis, D.; Velankar, S., AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic acids research* **2022**, *50* (D1), D439-d444.
124. Tesmer, J. J.; Berman, D. M.; Gilman, A. G.; Sprang, S. R., Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* **1997**, *89* (2), 251-61.
125. Klebe, G., *Wirkstoffdesign - Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*. Spektrum Akademischer Verlag: 2009.
126. Rhodes, G., *Crystallography Made Crystal Clear - A Guide for Users of Macromolecular Models*. Academic Press: 2006.
127. McPherson, A., Introduction to protein crystallization. *Methods (San Diego, Calif.)* **2004**, *34* (3), 254-65.
128. John, J.; Rensland, H.; Schlichting, I.; Vetter, I.; Borasio, G. D.; Goody, R. S.; Wittinghofer, A., Kinetic and structural analysis of the Mg(2+)-binding site of the guanine nucleotide-binding protein p21H-ras. *The Journal of biological chemistry* **1993**, *268* (2), 923-9.
129. Shannon, D. A.; Weerapana, E., Covalent protein modification: the current landscape of residue-specific electrophiles. *Current opinion in chemical biology* **2015**, *24*, 18-26.
130. Ferrer-Sueta, G.; Manta, B.; Botti, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Denicola, A., Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chemical research in toxicology* **2011**, *24* (4), 434-50.
131. Awoonor-Williams, E.; Rowley, C. N., How Reactive are Druggable Cysteines in Protein Kinases? *Journal of chemical information and modeling* **2018**, *58* (9), 1935-1946.
132. Palacios, R.; Steinmetz, M., II-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell* **1985**, *41* (3), 727-34.
133. Warmuth, M.; Kim, S.; Gu, X. J.; Xia, G.; Adrián, F., Ba/F3 cells and their use in kinase drug discovery. *Current opinion in oncology* **2007**, *19* (1), 55-60.

134. White, Y.; Bagchi, A.; Van Ziffle, J.; Inguva, A.; Bollag, G.; Zhang, C.; Carias, H.; Dickens, D.; Loh, M.; Shannon, K.; Firestone, A. J., KRAS insertion mutations are oncogenic and exhibit distinct functional properties. *Nature communications* **2016**, *7*, 10647.
135. 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* **1996**, *70* (8), 5701-5.
136. Morgenstern, J. P.; Land, H., Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic acids research* **1990**, *18* (12), 3587-96.
137. Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor, L., Cell Viability Assays. In *Assay Guidance Manual*, Markossian, S.; Grossman, A.; Brimacombe, K.; Arkin, M.; Auld, D.; Austin, C. P.; Baell, J.; Chung, T. D. Y.; Coussens, N. P.; Dahlin, J. L.; Devanarayan, V.; Foley, T. L.; Glicksman, M.; Hall, M. D.; Haas, J. V.; Hoare, S. R. J.; Inglese, J.; Iversen, P. W.; Kales, S. C.; Lal-Nag, M.; Li, Z.; McGee, J.; McManus, O.; Riss, T.; Saradjian, P.; Sittampalam, G. S.; Tarselli, M.; Trask, O. J., Jr.; Wang, Y.; Weidner, J. R.; Wildey, M. J.; Wilson, K.; Xia, M.; Xu, X., Eds. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda (MD), 2004.
138. Clark, G. J.; Cox, A. D.; Graham, S. M.; Der, C. J., Biological assays for Ras transformation. *Methods in enzymology* **1995**, *255*, 395-412.
139. Kremers, G. J.; Hazelwood, K. L.; Murphy, C. S.; Davidson, M. W.; Piston, D. W., Photoconversion in orange and red fluorescent proteins. *Nature methods* **2009**, *6* (5), 355-8.
140. Mehellou, Y.; Rattan, H. S.; Balzarini, J., The ProTide Prodrug Technology: From the Concept to the Clinic. *Journal of medicinal chemistry* **2018**, *61* (6), 2211-2226.
141. Alanazi, A. S.; James, E.; Mehellou, Y., The ProTide Prodrug Technology: Where Next? *ACS medicinal chemistry letters* **2019**, *10* (1), 2-5.
142. Zawada, Z.; Tatar, A.; Mocilac, P.; Buděšínský, M.; Kraus, T., Transport of Nucleoside Triphosphates into Cells by Artificial Molecular Transporters. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* **2018**, *57* (31), 9891-9895.
143. Tsong, T. Y., Electroporation of cell membranes. *Biophysical journal* **1991**, *60* (2), 297-306.
144. Alex, A.; Piano, V.; Polley, S.; Stuiver, M.; Voss, S.; Ciossani, G.; Overlack, K.; Voss, B.; Wohlgemuth, S.; Petrovic, A.; Wu, Y.; Selenko, P.; Musacchio, A.; Maffini, S., Electroporated recombinant proteins as tools for in vivo functional complementation, imaging and chemical biology. *eLife* **2019**, *8*.
145. Sinensky, M.; Lutz, R. J., The prenylation of proteins. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **1992**, *14* (1), 25-31.
146. Fu, H. W.; Casey, P. J., Enzymology and biology of CaaX protein prenylation. *Recent progress in hormone research* **1999**, *54*, 315-42; discussion 342-3.

147. Wolber, G.; Langer, T., LigandScout: 3-D pharmacophores derived from protein-bound ligands and their use as virtual screening filters. *Journal of chemical information and modeling* **2005**, *45* (1), 160-9.
148. Guerrero, S.; Casanova, I.; Farré, L.; Mazo, A.; Capellà, G.; Mangués, R., K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer research* **2000**, *60* (23), 6750-6.
149. Meier, C.; Meerbach, A.; Balzarini, J., Cyclosal-pronucleotides--development of first and second generation chemical trojan horses for antiviral chemotherapy. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **2004**, *9*, 873-90.
150. Meier, C., Nucleoside diphosphate and triphosphate prodrugs - An unsolvable task? *Antiviral chemistry & chemotherapy* **2017**, *25* (3), 69-82.
151. Johnson, K. A.; Simpson, Z. B.; Blom, T., Global kinetic explorer: a new computer program for dynamic simulation and fitting of kinetic data. *Analytical biochemistry* **2009**, *387* (1), 20-9.
152. Zhang, Z.; Marshall, A. G., A universal algorithm for fast and automated charge state deconvolution of electrospray mass-to-charge ratio spectra. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1998**, *9* (3), 225-33.
153. pKa-Prospector 1.1.6.0: OpenEye Scientific Software, S. F., NM. <http://www.eyesopen.com>.
154. Emsley, P.; Cowtan, K., Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2004**, *60* (Pt 12 Pt 1), 2126-32.
155. Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H., PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2010**, *66* (Pt 2), 213-21.
156. The PyMOL Molecular Graphics System, V., Schrödinger, LLC.
157. Kabsch, W., XDS. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2010**, *66* (Pt 2), 125-32.
158. Sievers, F.; Wilm, A.; Dineen, D.; Gibson, T. J.; Karplus, K.; Li, W.; Lopez, R.; McWilliam, H.; Remmert, M.; Söding, J.; Thompson, J. D.; Higgins, D. G., Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology* **2011**, *7*, 539.
159. Sievers, F.; Higgins, D. G., Clustal Omega for making accurate alignments of many protein sequences. *Protein science : a publication of the Protein Society* **2018**, *27* (1), 135-145.
160. UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic acids research* **2021**, *49* (D1), D480-d489.
161. Pundir, S.; Martin, M. J.; O'Donovan, C., UniProt Tools. *Current protocols in bioinformatics* **2016**, *53*, 1.29.1-1.29.15.

162. Word, J. M.; Nicholls, A., Application of the Gaussian dielectric boundary in Zap to the prediction of protein pKa values. *Proteins* **2011**, 79 (12), 3400-9.
163. Rappsilber, J.; Mann, M.; Ishihama, Y., Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nature protocols* **2007**, 2 (8), 1896-906.
164. Cox, J.; Mann, M., MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* **2008**, 26 (12), 1367-72.
165. Cox, J.; Neuhauser, N.; Michalski, A.; Scheltema, R. A.; Olsen, J. V.; Mann, M., Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. *Journal of proteome research* **2011**, 10 (4), 1794-805.
166. Read, R. J., Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2001**, 57 (Pt 10), 1373-82.
167. Schüttelkopf, A. W.; van Aalten, D. M., PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **2004**, 60 (Pt 8), 1355-63.
168. Joosten, R. P.; Long, F.; Murshudov, G. N.; Perrakis, A., The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCrJ* **2014**, 1 (Pt 4), 213-20.

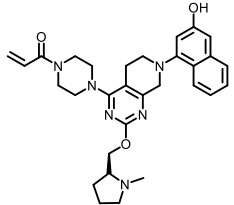
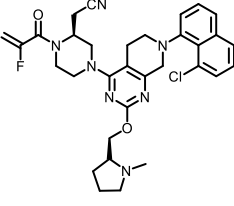
7 ANHANG

7.1 Historischer Überblick über S-IIP Inhibitoren für KRasG12C

Tabelle A1 | KRasG12C S-IIP-Inhibitoren.

Verbindung in Publikation	Chemische Struktur	PDB ID	Referenz	Herkunft	ID
2E07		-	Ostrem <i>et al.</i> (2013)	Kevan Shokat	-
6H05		-	Ostrem <i>et al.</i> (2013)	Kevan Shokat	-
Verbindung 6		4luc	Ostrem <i>et al.</i> (2013)	Kevan Shokat	-
Verbindung 9		4lyh 4lyj	Ostrem <i>et al.</i> (2013)	Kevan Shokat	-
Verbindung 12		-	Ostrem <i>et al.</i> (2013)	Kevan Shokat	-
ARS-107		6b0v	Patricelli <i>et al.</i> (2016)	Wellspring Bioscience	-
ARS-853		5f2e	Patricelli <i>et al.</i> (2016)	Wellspring Bioscience	-
ARS-1620		5v9u	Janes <i>et al.</i> (2018)	Wellspring Bioscience	-
Indole lead 1		6p8z	Shin <i>et al.</i> (2019)	Amgen	-
AMG 510		6oim	Canon <i>et al.</i> (2019)	Amgen	NCT03600883 NCT04185883 NCT04380753 NCT04303780 NCT04887064 NCT04667234
Verbindung 4		6n2j	Fell <i>et al.</i> (2018)	Array BioPharma Mirati Therapeutics	-

Tabelle A1 | KRasG12C S-IIP-Inhibitoren (Fortsetzung).

Verbindung in Publikation	Chemische Struktur	PDB ID	Referenz	Herkunft	ID
Verbindung 13		-	Fell <i>et al.</i> (2018)	Array BioPharma Mirati Therapeutics	-
MRTX849		6uto	Hallin <i>et al.</i> (2019) Fell <i>et al.</i> (2020)	Mirati Therapeutics	NCT03785249 NCT04330664 NCT04613596 NCT04685135 NCT04793958
JNJ-74699157 (ARS-3248)	-	-	-	J&J Wellspring Bioscience	NCT04006301

7 ANHANG

Table with 4 columns: ID, Accession, Description, and Position. Contains entries for REG, RERGL, RHEB, RHEBL1, RIT1, RIT2, RRAS, RRAS2, GEM, REM1, REM2, RRAD, CDC42, RAC1, RAC2, RAC3, RHOA, RHOB, RHOBTB1, RHOBTB2, RHOC, RHOD, RHOF, RHOG, RHOH, RHQ, RHOU, RHOV, RND1, RND2, RND3, RAN, RHOT1, RHOT2, IFT22, RABL2A, RABL2B, RABL3, RABL6, RRAGA, RRAGB, RRAGC, RRAGD.

Table with 4 columns: ID, Accession, Description, and Position. Contains entries for ARF1, ARF3, ARF4, ARF5, ARF6, ARL1, ARL2, ARL3, ARL4A, ARL4C, ARL4D, ARL5A, ARL5B, ARL5C, ARL6, ARL8A, ARL8B, ARL9, ARL10, ARL11, ARL13A, ARL13B, ARL14, ARL15, ARL16, ARL17, ARFRP1, SAR1A, SAR1B, TRIM23, IFT27, RAB1A, RAB1B, RAB1C, RAB2A, RAB2B, RAB3A, RAB3B, RAB3C, RAB3D, RAB4A, RAB4B, RAB5A, RAB5B, RAB5C, RAB6A, RAB6B, RAB6C, RAB7A, RAB7B, RAB8A, RAB8B, RAB9A, RAB9B, RAB10, RAB11A, RAB11B, RAB12, RAB13, RAB14, RAB15, RAB17, RAB18, RAB19, RAB20, RAB21, RAB22A, RAB23, RAB24, RAB25, RAB26, RAB27A, RAB27B, RAB28, RAB29, RAB30, RAB31, RAB32.

7 ANHANG

RAB3B	P20337	T	QIKTYSWD	NAQV-ILVGNKCDMEE	E	E	RVVPTKGG	LL	AEQ-L	157	
RAB3C	Q96E17	T	QIKTYSWD	NAQV-ILVGNKCDMED	E	E	RVVPTKGG	HL	GEQ-L	165	
RAB3D	Q95716	T	QIKTYSWD	NAQV-ILVGNKCDLED	E	E	RVVPAEDGR	RL	ADD-L	157	
RAB4A	P20338	T	DARMLASQ	NIVI-ILCGNKCDLDA	D	D	RVVPLEAS	RF	AQE-N	148	
RAB4B	P61718	T	DARMLASQ	NIVI-ILCGNKCDLEA	D	D	RVVPLEAS	RF	AQE-N	143	
RAB5A	P20339	K	ELQRQASP	NIVI-ALAGNKADLAN	E	E	KRAVDFQEAQ	SY	ADD-N	155	
RAB5B	P61020	K	ELQRQASP	SIVI-ALAGNKADLAN	E	E	KRMVVEEAQ	AV	ADD-N	155	
RAB5C	P51148	K	ELQRQASP	NIVI-ALAGNKADLAN	E	E	KRAVDFQEAQ	AV	ADD-N	156	
RAB6A	P20340	D	DVRTERGS	DVII-MLVGNKDLIAD	E	E	KROVSIEERGE	RK	AKE-L	148	
RAB6A	Q9NRW1	D	DVRTERGS	DVII-MLVGNKDLIAD	E	E	KROITIEERGE	QR	AKE-L	148	
RAB6C	Q9H0N0	D	DVRTERGS	DVII-MLVGNKDLIAD	E	E	KROVSIEERGE	RK	AKG-L	148	
RAB7A	P51149	D	EFLIQASPR	DPENFPF-VLGNKDLIDLE	E	E	RQVATKRAQ	AW	CYS-K	146	
RAB7B	Q96A8H	G	DVLAKIVP	MEQSYPM-VLGNKDLIAD	E	E	RKVQEQVAQ	GW	CRE-K	145	
RAB8A	P61006	R	NIEEHASA	DVEK-MLGNKCDVND	K	K	ROVSKERGE	KL	ALD-Y	143	
RAB8B	Q92930	R	NIEEHASA	DVER-MLGNKCDMND	K	K	ROVSKERGE	KL	AID-Y	143	
RAB9A	P51151	K	EFYIYADV	EPESFPF-VLGNKDLISE	E	E	ROVSTEEAQ	AW	CRD-N	145	
RAB9B	Q9NP90	K	EFYIYADV	DPEHFPF-VLGNKDKED	E	E	ROVSTEEAQ	TW	CME-N	145	
RAB10	P61026	R	NIDEHANE	DVER-MLGNKCDMDD	K	K	RVVPKGGE	QF	ARE-H	144	
RAB11A	P62491	K	ELRDHADS	NIVI-MLVGNKSDLRH	L	L	RAVPTDEAR	AF	AEK-N	146	
RAB11B	Q15907	K	ELRDHADS	NIVI-MLVGNKSDLRH	L	L	RAVPTDEAR	AF	AEK-N	146	
RAB12	Q61Q22	K	MIDKYASE	DAEL-ILVGNKDLCEB	D	D	REITRQOGE	KF	AQOIT	178	
RAB13	P51153	K	SIEKENASA	GVER-LLGNKCDMEA	K	K	RKVQEQVAQ	KL	ARE-H	143	
RAB14	P61106	T	DARMLNDP	NIVI-ILGNKADLEA	Q	Q	RDVYTEAAQ	QP	AEB-N	146	
RAB15	P59190	S	DVDEYAPK	GVQK-ILIGNKADEEQ	K	K	ROVGREQQG	QL	AKE-Y	143	
RAB17	Q9H077	K	DLEEELHP	GEVLV-MLVGNKDLISQ	E	E	EREVTFQEGK	EF	ADS-Q	154	
RAB18	Q9NP72	N	ELETYCTR	NDIVN-MLGNKDLKRE	N	N	REVDNRNGL	KF	ARK-H	143	
RAB19	A4D1S5	H	EIEKYGAA	NVVI-MLGNKCDLWE	E	E	RHVLFEEDAK	TL	AEK-Y	152	
RAB20	Q9NX57	L	GLDITASK	DCLF-AIVGNKVDITEGALAGQKEECSFNMDAGRVSPRAHQVLEDAV	E	E	AL	YKILKLYKMLDEQDVP	173		
RAB21	Q9UL25	K	ELRKMGNP	EICL-CIVGNKDLLEK	E	E	ERHVSIEBAE	SY	AES-V	154	
RAB22A	Q9UL26	K	ELRQHGP	NLIV-AIAGNKCDLID	E	E	VREVMERDAK	DY	ADS-I	140	
RAB23	Q9ULC3	E	KVVAEVEG	DIPT-VLVGNKDLIDL	D	D	SCIKNEEAE	AL	AKR-L	143	
RAB24	Q96905	K	ELRSLEEG	CQI-YLCTGKSDLLEED	E	E	RRRRRVDFHDVQ	DY	ADN-I	146	
RAB25	P57735	K	ELYDHAEA	TIVV-MLGNKSDLSQ	A	A	REVPTTEAR	MF	AEN-N	147	
RAB26	Q9ULM5	T	EIHEYAOH	DVAL-MLGNKVDLSAH	E	E	RVVREDGE	KL	AKE-Y	199	
RAB27A	P51159	S	QLQMHAYC	ENPDI-VLGNKSDLED	Q	Q	RVVKEEAT	AL	AEK-Y	155	
RAB27B	000194	S	QLQMHAYC	ENPDI-VLGNKADLPD	Q	Q	RVVNERQAR	EL	ADK-Y	155	
RAB28	P51157	T	VVK-KVSE	ESETQPLVALVGNKDLLE	HM	HM	RTIKPEKHL	R	FOQEN	G 152	
RAB29	Q14966	Q	NDLSDKLTLP	NGEVPFC-LILLANCKDLSFWA	E	E	V-SDQDID	RF	SKB-N	146	
RAB30	Q15771	R	ELIQEAS	KVIT-VLGNKDLLE	R	R	RVVSGQAE	EF	SEA-Q	144	
RAB31	Q13636	K	ELKEHPE	NLIV-AIAGNKCDLSD	E	E	IRBVPKDAK	VF	AES-I	149	
RAB32	Q13637	S	DLDSKVHLP	NGSPIPA-VLLANCKDQNKDS	E	E	SO-SPSQVD	QE	CKE-H	160	
RAB33A	Q14088	Q	ECNGHAPV	PLVVK-VLGNKCDLRE	Q	Q	IQVPSNLAL	KF	ADA-H	173	
RAB33B	Q9H082	E	ECKQHLLA	NDIPR-ILVGNKCDLRS	A	A	IQVPTDLAQ	KF	ADT-H	170	
RAB34	Q9BZG1	A	DALKENDP	SSVLL-FLVGSKKDLSTPA	Q	Q	VALMEKDAL	QV	AQE-M	190	
RAB35	Q15286	H	EINQNC-D	DVCR-ILVGNKNDPPE	R	R	KVVEVEDAY	KF	AGQ-M	142	
RAB36	Q95755	E	DALRENEA	GSCFI-FLVGTKKDLLSGA	A	A	CEQAEADAV	HL	ARE-M	261	
RAB37	Q96AX2	T	EIHEYAOH	DVVI-MLGNKADMSA	E	E	RVRSEDGE	TL	ARE-Y	165	
RAB38	P57729	N	DLDSKLSLP	NGKPVSV-VLLANCKDQKDV	E	E	LMNGLKMD	QF	CKE-H	150	
RAB39A	Q14964	E	EAKMYVQP	FRIVF-VLVGHKCDLAS	E	E	ROVTREEAE	KL	SAD-C	149	
RAB39B	Q96DA2	E	ETKVHVQP	YQIVF-VLVGHKCDLDT	Q	Q	ROVTRHEAE	KL	AAA-Y	145	
RAB40A	Q8WXH6	K	KIEEHAP	GVPK-ILVGNRHLHAF	K	K	ROVPREQAQ	AY	AER-L	148	
RAB40B	Q12829	K	EIDEHAP	GVPK-ILVGNRHLHAF	K	K	ROVPREQAQ	AY	AER-L	148	
RAB40C	Q96S21	K	EIDEHAP	GVPR-ILVGNRHLHAF	K	K	ROVPREQAQ	AY	AEK-N	148	
RAB41	Q5U725	E	HVRAERGD	DVVI-MLGNKDLIDN	E	E	KROVTAEGEE	EK	SRN-L	166	
RAB42	Q8M420	Q	EVMATQGP	DKVIP-LLVGHKSDLSQ	T	T	RCVSAQGE	EL	AAS-L	151	
RAB43	Q86Y56	E	DVRKYAGS	NIVQ-LLGNKSDLE	L	L	RVVGLBAQ	SL	AEB-Y	153	
RAB44	Q73693	P	CLQKQD	GVVI-LLGNKSDLE	E	E	ROVSEQAQ	QL	AEB-N	149	
RASEF	Q81Z41	D	MIEDAAHE	TVPI-MLVGNKADIRDTAETEGQ	E	E	KCVPHGGE	KL	AMT-Y	682	
DIRAS1	Q95057	K	LIV-QIKG	S-V-EDIPV-MLVGNKCDTE	Q	Q	REVDTRAE	A	VAQEW	K 143	
DIRAS2	Q96H08	E	QIC-EIKG	D-V-ESIPV-MLVGNKCDTEP	S	S	REVSSEAE	A	LARTW	K 144	
DIRAS3	Q95661	E	LIC-KIKG	NNL-HKFPV-MLVGNKSDT	H	H	REVALNDGA	T	CAMEW	N 174	
ERAS	Q72444	E	IW-ATWG	PHPAQPL-VLGNKCDLV	TT	TT	AGDAHAAA	A	LAHAW	G 174	
HRAS	P01112	E	QIK-RVKD	S-DDVPM-VLGNKCDLA	A	A	RTVESRQAQ	D	LARSY	G 138	
KRAS	P01116	E	QIK-RVKD	S-DDVPM-VLGNKCDLP	E	E	RTVDTKQAQ	D	LARSY	G 138	
MRAS	Q14807	Q	LIL-RVKD	R-ESFPM-VLGNKCDLV	HL	HL	RKITREQK	E	MATKH	N 149	
NKIRAS1	Q9NYS0	K	EID-KPKD	K-KEVAL-VLGNKCDLIS	EQ	EQ	ROVDAEVAQ	K	WAKSE	K 143	
NKIRAS2	Q9NYS9	K	EID-KSKD	K-KEVTL-VLGNKCDLQ	EQ	EQ	RVVDPVAQ	H	WAKSE	K 143	
NRAS	P01111	E	QIK-RVKD	S-DDVPM-VLGNKCDLP	T	T	RTVDTKQAQ	E	LAKSY	G 138	
RALA	P11233	E	QIL-RVKE	D-ENVPF-VLGNKSDLE	DK	DK	ROVSVEEAK	N	RAEQW	N 150	
RALB	P11234	E	QIL-RVKA	EEDKIPL-VLGNKSDLE	ER	ER	ROVSVEEAR	S	KAEBW	G 151	
RAP1A	P62834	E	QIL-RVKD	T-EDVPM-VLGNKCDLE	DE	DE	RVVKGEGG	N	LARQW	CN 140	
RAP1B	P61224	E	QIL-RVKD	T-DDVPM-VLGNKCDLE	DE	DE	RVVKGEGG	N	LARQW	CN 140	
RAP2A	P10114	D	QIL-RVKR	Y-EKVPV-VLGNKCDLE	SE	SE	REVSSEAE	A	LAEBW	G 139	
RAP2B	P61225	D	QIL-RVKR	Y-ERVPM-VLGNKCDLE	SE	SE	REVSSEAE	A	LAEBW	G 139	
RAP2C	Q9Y315	D	QIV-RVKR	Y-EKVPV-VLGNKCDLE	PE	PE	REVMSEGR	A	LAQEW	G 139	
RASD1	Q9Y272	Q	QIL-DTKS	CLKNKTEN-VDPVL-VICGNKDRDP	Y	Y	REVDQREI	QLV	GDDQ	R 170	
RASD2	Q96D21	K	QIL-EVKK	CLKNKTKEA-AELPM-VICGNKDHGE	LC	LC	RQVPTTEA	ELL	VSGDE	N 165	
RASL10A	Q92737	Q	RIAEPRAG	A-PEAPI-VLGNKDRDQ	RL	RL	RFGPRRALS	AL	VRRGW	R 153	
RASL10B	Q96S79	Q	QILETRVIG	T-SETPI-ILVGNKDLQ	RG	RG	RVRPRNVS	HL	VRKTV	K 152	
RASL11A	Q6T310	Q	HIR-KVHP	D-SKAPV-ILVGNKDL	HA	HA	ROVQTDGI	Q	LANEL	G 170	
RASL11B	Q9BPW5	Q	HVQ-QLHL	G-TRLPV-VVANKADLL	HI	HI	KQVDPQLGL	Q	LASML	G 175	
RASL12	Q9N9N1	E	LLALHAKET	Q-RSIPA-LLGNKDLMA	QY	QY	ROVTKAEGV	A	LAGEF	G 157	
RERG	Q96A58	N	ILD-EIKK	P-KNVTL-ILVGNKADLD	HS	HS	ROVSTEER	K	LATEL	A 141	
RERGL	G5EA41										
RHEB	Q15382	G	KLL-DMVG	K-VQIPV-MLVGNKDLH	ME	ME	RVVSYEGK	A	LAESW	N 142	
RHEBL1	Q8TA17	Q	KLH-EHGG	K-TRVPP-VLGNKADLS	PE	PE	REVQAEGL	K	LAESW	G 142	
RT1	Q92963	Q	LIV-RVRR	T-DDVPM-VLGNKCDLQ	QL	QL	ROVTKEEGL	A	LAREF	S 157	
RT2	Q99578	E	LIF-QVRH	T-YEIPV-VLGNKDLLE	QF	QF	ROVSTEEGL	S	LAQBY	N 156	
RRAS	P10301	T	QIL-RVKD	R-DDVPM-VLGNKCDLE	SO	SO	ROVPRSEAS	A	FGASH	H 165	
RRAS2	P62070	R	QIL-RVKD	R-DEPVM-LLGNKADLD	HQ	HQ	ROVTEQEGG	Q	LARQL	K 150	
CRP1	Q55669	I	QLR-RARQ	T-EDIPV-ILVGNKSDLV	RC	RC	REVSSEAE	A	CAVVF	D 214	
REM1	Q75628	I	QLR-RHQ	A-DHVPV-ILVGNKADLA	RC	RC	REVSSEAE	A	CAVVF	D 218	
REM2	Q81YK8	L	RLR-AGRQ	H-HDLPV-ILVGNKSDLA	RS	RS	REVSLEGR	H	LAGTL	S 252	
RRAD	P55042	V	QLR-RARQ	T-DDVPI-ILVGNKSDLV	RS	RS	REVSDEGR	A	CAVVF	D 226	
CDC42	P60953	P	EITH-HC	PKTTP-LLVGTQDLRDDPS	TIE	TIE	KLAKN	KQKPIPTAE	KL	ARDL	149
RAC1	P63000	P	EVRH-HC	PNTPI-ILVGTQLDLRDDK	TIE	TIE	KLKEK	KLFTIYPQGL	AM	AKEI	149
RAC2	P15153	P	EVRH-HC	PSTPI-ILVGTQLDLRDDK	TIE	TIE	KLKEK	KLAPITYPQGL	AL	AKEI	149
RAC3	P60763	P	EVRH-HC	PHTPI-ILVGTQLDLRDDK	TIE	TIE	RLRDK	KLAPITYPQGL	AM	AREI	149
RHOA	P61586	P	EVKH-FC	PNVPI-ILVGNKDLRNDH	TR	TR	ELAKM	KQEPVPEGR	DM	ANRI	151
RHOB	P62745	P	EVKH-FC	PNVPI-ILVGNKDLRNDH	VRT	VRT	ELAKM	KQEPVPTDGR	AM	AVRI	151
RHOBTB1	Q94844	P	EIKH-FC	PRTPV-ILVGTQLDLRYADLEAVN	RARRLARP	RARRLARP	IKRGLDLPPEKGR	EV	AKEL	181	
RHOBTB2	Q9BY26	P	EIKH-FC	PRAVP-ILVGTQLDLRYADLEAVN	RARRLARP	RARRLARP	IKPNIILPEKGR	EV	AKEL	181	
RHOC	P08134	P	EVKH-FC	PNVPI-ILVGNKDLRQDEH	TR	TR	ELAKM	KQEPVSEGR	DM	ANRI	151
RHOD	000212	P	EVNH-FC	KKVPV-ILVGTQDLRDKS	LVN	LVRN	KLRRN	GLEPVYHRGQ	EM	ARSV	163
RHOF	Q9HHB0	P	EVTH-HC	RGIPM-VLIGKTLRDKKE	QLR	QLR	KLRAA	GLEPIITYMGL	SA	CEQI	165
RHOG	P84095	P	EVCH-HC	PDVPI-ILVGTQDLRQAPD	TLR	TLR	RLKEQ	GQAPITPQGG	AL	AKQI	149
RHOH	Q15669	E	ELRS-NL	PCFVP-LVAVITQDGRMGP	H	H	RASCYNAMEGK	KL	AQDV	143	
RHOJ	Q9H485	S	ELKQ-CM	PHVPV-VLIGTQDLRDDPK	TIA	TIA	RLLYM	KEKPIVYEGV	KL	AKAI	167
RHOQ	P17081	P	ELKE-YA	PNVPP-LLIGTQDLRDDPK	TIA	TIA	RINDM	KEKPIVYEGV	KL	AKET	155
RHOV	Q7L0Q8	P	EIRK-HC	PKAPI-ILVGTQDLRDEVK	VLI	VLI	ELDKC	KEKPVPEAAK	LC	AEEI	195
RHOV	Q96L33	P	EIRT-HN	PQAPV-LLVGTQDLRDDVN	VLI	VLI	QLDQC	GREGVPQQAQ	GL	AEEK	178
RND1	Q92730	T	EILD-YC	PSTRV-LLIGTQDLRDDLS	TLM	TLM	ELSHQ	KQAPISYEQG	AI	AKQL	159
RND2	P52198	G	ETQE-FC	PNAKV-VLVCQKLMRTDLA	TLR	TLR	ELSHQ	RLIPVTEOQT	VL	AKQV	153
RND3	P61587	G	EIQE-FC	PNTKM-VLVCQKDLRDTVDS	TLV	TLV	ELSNH	ROVPSYDQGA	NM	AKQI	169
RAN	P62826	R	DLRVCE	NIPV-VLVCQKVDIKD				RKVKASIV	FH	RRK	142
RHOT1	Q8IX12	P	LINERTKDD	SRLLP-ILVGNKSDLVSESS				METILPI	M	NOYT	139
RHOT2	Q8IX11	P	LWNGGTGQ	PRVPV-ILVGNKSDLVSESS				MEAVLPI	M	SOFP	139
IPT22	Q9H7X7	S	CFVQPSLQ	DTQCM-LIAHKKPGSDDKG	SL	SL	SLSPPLNKL	KLIVSHLEDD	PEET	R 158	
RABL2A	Q9UBK7	T	ELREFRP	E1PC-IVVANKIDLIN				VTQKSF	NF	AKK-F	151
RABL2B	Q9UNT1	T	ELREFRP	E1PC-IVVANKIDLIN				VTQKSF	NF	AKK-F	151
RABL3	Q5HY18	L	EALNRDLVPTGVLVNNGDYDQEQP	ADNQP1L-LVIGTQDLRQIH	ET	ET	KRHEVLRFT	AF	LAEDFN	PEEIND 179	
RABL6	Q3YEC7	P	KVP	THVPV-CVLGNRYDMG	EH	EH	RVLPDDVR	DFI-DNLDPRP		G 203	
RRAGA	Q71523	YQVSCLEA1LQN		SPDKV1-FCLVHRKMDLVQEDQRD				LIFKER	EE-DL-R	RLS	152
RRAGB	Q5V2M2	YQVSCLEA1LQN		SPDKV1-FCLVHRKMDLVQEDQRD				LIFKER	EE-DL-R	RLS	213
RRAGC	Q9H90	I	TVSKAYK	VNDFMNF-EVPHKVDGLSDHRIET				QRDIHQAN	DDLADAGLEK	H-LSF	218
RRAGD	Q9NL2	L	TVTRAYK	VNDFMNF-EVPHKVDGLSDHRIET				QRDIHQAN	DDLADAGLEK	H-LSF	216

7 ANHANG

RRAS2	P62070	VT--YMEASAK-I--R--M-NV--DQA--PHELVRVIRKFPQEQCPP--S-----PEP--TRK-----	192
GEM	P55040	CK--FIETSAA-V--Q--H-NV--KEL--FEGIVRQVRLRRDSKEKN--ER-----RLAYQKRKESMPKARRFWGK	272
REM1	Q75628	CK--FIETSAT-L--Q--H-NV--AEL--FEGVVRQLRRRRDSAAK-----EPPAPRRPASLAQRARRFLAR	274
REM2	Q81YX8	CK--HIETSAA-L--H--H-NT--REL--FEGAVRQILRRGRNHAG--GQ-----RPD--PGSPGFPAPARRRSLTKAKRFLAN	318
RRAD	P55042	CK--FIETSAA-L--H--H-NV--QAL--FEGVVRQILRRDRSKEAN--AR-----RQAGTRRRRESLQKAKRFLGR	284
CD42	P60953	-KAVKYLECSAL-T--Q--K-GL--KNV--FDEAILAALPEPPPKK--S--R-----	186
RAC1	P63000	-GAVKYLECSAL-T--Q--R-GL--KTV--FDEAIRAVLCPPPVKK-RK--R-----	187
RAC2	P15153	-DSVKYLECSAL-T--Q--R-GL--KTV--FDEAIRAVLCPPQPTQ-QK--R-----	187
RAC3	P60763	-GSVKYLECSAL-T--Q--R-GL--KTV--FDEAIRAVLCPPPVKK-PG--K-----	187
RHOA	P61586	-GAPGYMECSAK-T--K--D-GV--REV--FEMATRAALQARRGK-KS-----	188
RHOB	P62745	-QAVDYMECSAK-T--K--E-GV--REV--FETATRAALQKRYGSO-N-----	187
RHOBTB1	094844	-GL-PYYETSUVF-D--Q--F-GI--KDV--FDNAIRAALISRRHLQPKWSHLK--KVQK-----P-----	227
RHOBTB2	Q98Y26	-GI-PYYETSUVV-A--Q--F-GI--KDV--FDNAIRAALISRRHLQPKWSHLR--NVQR-----P-----	227
RHOC	P08134	-SAPGYMECSAK-T--K--E-GV--REV--FEMATRAALQKRYGSO-N-----	188
RHOD	000212	-GAVDYMECSAK-L--H--D-NV--HAV--FQEAALVALSSRGKRF--WRIT-----	203
RHOF	Q9HBH0	-RAALYLECSAK-F--R--E-NV--EDV--FREAAKVALSALKKAQ-RQKRRR-----	206
RHOG	P84095	-HAVRYMECSAL-Q--Q--D-GV--KEV--FAEAVRAVNLPTIKR--G--R-----	186
RHOH	Q15669	-RAKGYMECSAL-S--N--R-GV--QOV--FECVAVTAVNQARRN--RRRFSH-----	184
RHOJ	Q9H4E5	-GAQCYMECSAL-T--Q--K-GL--KAV--FDEAILTIFFPKKKKK--RCSGEG-----	208
RHOQ	P17081	-GACCYMECSAL-T--Q--K-GL--KTV--FDEAILIILTPPKHTV--KRRIGS-----	196
RHOU	Q7L0Q8	-KAASYMECSAL-T--Q--K-NL--KEV--FDAIIVAGIQYSYDTQO-QPKKSK-----SRTF-----D-----	241
RHOV	Q96133	-RACVYLECSAL-T--Q--K-NL--KEV--FDSALISALEHARLE--K-----KLA--K-----	219
RND1	Q92730	-GAEYLEGSAP-T--S--EKSJ--HSI--FRTASMLCLNKPSPPL--QKSPVR-----SLSK-----R-----	206
RND2	P52198	-GAVSYVECSAR-S--S--ERSV--RDV--FHVATVSLGRGHRQL-RLTDISR-----RGMQ-----R-----	200
RND3	P61587	-GATVYLECSAL-Q--S--ENSV--RDI--FHVATLACVNTKMKV--KKNKSQ-----RATK-----R-----	216
RAN	P62826	-NL-QYDYSAA-D--G--T-NV--VKL--FNDAIRLAVSYKQNSQDFMDFBIFQ--ELENF--SLEQ-----E-----	203
RHOT1	Q81X12	-BIETVCSAK-N--L--K-NI--SEL--FYAQKAVLHPTPLPYDPE--AK-----EMKP-----A-----	184
RHOT2	Q81X11	-BIETVCSAK-N--L--R-NI--SEL--FYAQKAVLHPTPLPYDPE--AK-----QLRP-----A-----	184
IPT22	Q9H7X7	MEFIKYLKSIIN-----SMSESREDEMSINT-----	185
RABL2A	Q9UBK7	-SL-PLYFVSAA-D--G--T-NV--VKL--FNDAIRLAVSYKQNSQDFMDFBIFQ--ELENF--SLEQ-----E-----	203
RABL2B	Q9UNT1	-SL-PLYFVSAA-D--G--T-NV--VKL--FNDAIRLAVSYKQNSQDFMDFBIFQ--ELENF--SLEQ-----E-----	203
RABL3	Q5HY18	CTNPRYLAAGSS-N--A--V-KL--SRF--FDKVIKRYVLEKQNP-----GFPDR-----KRFQ-----AGTLKSLHYD--	236
RABL6	Q3YEC7	SSYPRYAESGSMK-N--S--F-GLKYLHKKFFNIPFLQRETLRLQLEQLLMDMAYL--EEL--SVQOE-----TEDQNYGIFL	272
RRAGA	Q7L523	--RPLECSAF-R--T--SIWDE-TL--YKA--WSSIVYQLIPNVQLENNLRNFAE--I-----IEADEVLLFERAT	210
RRAGB	Q5VMZ2	--RPLECSAF-R--T--SIWDE-TL--YKA--WSSIVYQLIPNVQLENNLRNFAE--I-----IEADEVLLFERAT	271
RRAGC	Q9HB90	--YLT--S--IYDH-SI--FEA--FSKVVQKLIPLQPLTLENNLRNFAE--N-----SGIEKAPFLFDVVS	266
RRAGD	Q9NLQ2	--YLT--S--IYDH-SI--FEA--FSKVVQKLIPLQPLTLENNLRNFAE--N-----SGIEKAPFLFDVVS	267
ARF1	P84077	-----	
ARF3	P61204	-----	
ARF4	P18085	-----	
ARF5	P84085	-----	
ARF6	P62330	-----	
ARL1	P40616	-----	
ARL2	P36404	-----	
ARL3	P36405	-----	
ARL4A	P40617	-----	
ARL4C	P56559	-----	
ARL4D	P49703	-----	
ARL5A	Q9V689	-----	
ARL5B	Q96K2C	-----	
ARL5C	A6NH57	-----	
ARL6	Q9H0F7	-----	
ARL8A	Q96BM9	-----	
ARL8B	Q9NVJ2	-----	
ARL9	Q6T311	-----	
ARL10	Q8N8L6	-----	
ARL11	Q969Q4	-----	
ARL13A	Q5H913	SHSF--S--TRTGMSK--EKRQH--LEQC--SIE--	239
ARL13B	Q3SXY8	KQER--A--ERVKRLR--EERKQNEQEA--ELDT	243
ARL14	Q8N4G2	-----	
ARL15	Q9NXU5	-----	
ARL16	Q0P5N6	-----	
ARL17	Q81VW1	-----	
ARFRF1	Q13795	-----	
SAR1A	Q9NR31	-----	
SAR1B	Q9V6B6	-----	
TRIM23	P36406	-----	
IPT27	Q9BM83	-----	
RAB1A	P62820	--TP--VKQSG--GGCC--	205
RAB1B	Q9H0U4	--TP--VKPAG--GGCC--	201
RAB1C	Q92928	--TP--VKPAG--GGCC--	201
RAB2A	P61019	--NATHAG--N-QGQQAAG--GGCC--	212
RAB2B	Q8WUD1	--TSVGPASAS-QR--N-SRDIGSN--SGCC--	216
RAB3A	P20336	--QQ--VPPH--QDCAC--	220
RAB3B	P20337	--TP--PLLQ--QNCSC--	219
RAB3C	Q96E17	--TP--PPPQ--PNCAC--	227
RAB3D	Q95716	--AP--APQP--SSCSC--	219
RAB4A	P20338	--LRSPRR--A-QAPNAQE--CGC--	218
RAB4B	P61018	--LRQPRS--A-QAVAPQP--CGC--	213
RAB5A	P20339	--P-TQP--TR--NGCCSN--	215
RAB5B	P61020	--Q-SQQ--NK--SQCCSN--	215
RAB5C	P51148	--N-NPA--SR--SQCCSN--	216
RAB6A	P20340	--P-QEQPVSE--GGCSC--	208
RAB6B	Q9NRW1	--P-QEPPASE--GGCSC--	208
RAB6C	Q9H0N0	--P-QEQTVSE--GGCSCVSPMS--S--	214
RAB7A	P51149	--RAKAS--AESCS--	207
RAB7B	Q96AH8	--PDQSR--SRCC--	199
RAB8A	P61006	--TPD--Q-QKRSSF--FRVLL--	207
RAB8B	Q92930	--TEN--R-SKTSF--FRCSLL--	207
RAB9A	P51151	--KPKPS--SSCC--	201
RAB9B	Q9NP90	--GSKAG--SSCC--	201
RAB10	P61026	--GW--K-S--KCC--	200
RAB11A	P62491	--PPT--T-EN--KPK--VQCCQNI--	216
RAB11B	Q15907	--PPT--T-DGQPKNK--LQCCQNI--	218
RAB12	Q6IQ22	--IPPE--L-PPRP--VRCC--	244
RAB13	P51153	--T-CDKKNP--NKCSLG--	203
RAB14	P61106	--GRL-TS--E-PQPREG--CGC--	215
RAB15	P59190	--GKPE--G-PAN--SS--KTCWC--	212
RAB17	Q9H0T7	--K-GPA--RQ--AKCCAH--	212
RAB18	Q9NP72	--G-Q-GGAC--GGYCSV--	206
RAB19	A4D185	--LM--AQQPSK--THCTC--	217
RAB20	Q9NX57	--H-KPKKTR--SGCCA--	234
RAB21	Q9UL25	--Q-AQT--SG--GGCCSSG--	225
RAB22A	Q9UL26	--Q-PSE--PK--RSCC--	194
RAB23	Q9ULC3	NGGDVINLRPN-K-QR--T-KKRNPF--SSCSIP--	237
RAB24	Q969Q5	--K-PNP--YF--YSCCHH--	203
RAB25	P57735	--AG--Q-EPGPEK--RACCSL--	213
RAB26	Q9ULW5	--REGRG--ASCCRP--	256
RAB27A	P51159	--Q-LSEKKEK--GACCC--	221
RAB27B	000194	--L-DGKPPPE--KKCIC--	218
RAB28	P51157	--P--MSRTVNPSS--MCAVQ--	221
RAB29	Q14966	--K-S--SS--WSCC--	203
RAB30	Q15771	--LP--GEGKSI--YLTCCNFM--	203
RAB31	Q13636	--P-TMQ--AS--RRCC--	194
RAB32	Q13637	--E-TLRAENK--SGCC--	225
RAB33A	Q14089	--PQBAK--TSCPC--	237
RAB33B	Q9H082	--KPEKPA--MTCWC--	229
RAB34	Q9BZG1	--DDS-NL--Y-LTASKK--PTCCP--	259
RAB35	Q15286	--TK--NSKRR--KRCC--	201
RAB36	Q95755	--SPP-ET--Q-ESKRPSS--LGCC--	333
RAB37	Q96AX2	--SQKKR--SSCCSF--	223
RAB38	P57729	--STKVASC--SGCAKS--	211

RAB39A	Q14964	---VPNTVHS-----S-EEAVKPR-----KECFK-----	217
RAB39B	Q96DA2	---VPNVVHS-----S-EEVVKSE-----RRCLC-----	213
RAB40A	Q8WXH6	-----LQ-----DLCCRTIVSC-----TP	205
RAB40B	Q12829	-----LQ-----DLCCRAVVSC-----TP	205
RAB40C	Q96S21	-----LQ-----DLCCRAIVSC-----TP	205
RAB41	Q53T25	-----F-E-----E-----SGNRSYC-----	222
RAB42	Q8N420	---KTQIPRS-----P-SRKQHS-----GFCQC-----	218
RAB43	Q86YS6	-----GEG-----WGCGC-----	212
RAB44	Q726P3	-----A-PKRPPKR-----FGCCS-----	1021
RASEF	Q81Z41	-----SKKSPQM-----KNCCNG-----	740
DIRAS1	Q95057	-----RVKG-----KCTLM-----	198
DIRAS2	Q96HU8	-----KLGK-----KCVIM-----	199
DIRAS3	Q95661	-----KLLD-----KCIIM-----	229
ERAS	Q7Z444	---KQATCHC-----GCSVA-----	233
HRAS	P01112	-----CMSCK-----CVLS-----	189
KRAS	P01116	-----CVKIK-----KCIIM-----	189
MRAS	O14807	-----RATGTHKL-----QCIVL-----	208
NKIRAS1	Q9NYS0	-----S-----EN-----	192
NKIRAS2	Q9NYR9	-----L-----DG-----	191
NRAS	P01111	-----CMGLP-----CVVM-----	189
RALA	P11233	-----A-K-----RIRE-----RCCLL-----	206
RALB	P11234	-----K-K-----SFKK-----RCCLL-----	206
RAP1A	P62834	-----EKKKPKKK-----SCILL-----	184
RAP1B	P61224	-----PGKARKKS-----SCQLL-----	184
RAP2A	P10114	-----DKDDPCCS-----ACNIQ-----	183
RAP2B	P61225	-----NGDEGCCS-----ACVIL-----	183
RAP2C	Q9Y3L5	-----EKDQCCCT-----TCVVO-----	183
RASD1	Q9Y272	PFARRPS-VHSDLMYIREK-ASAGSQAKDKE-----RCVIS-----	281
RASD2	Q96D21	PFARRPS-VNSDLKYIKAK-VLREGQAKRED-----KCTIQ-----	266
RASL10A	Q92737	-----LHPA-----RCSLM-----	203
RASL10B	Q96S79	-----LRRN-----RCAIM-----	203
RASL11A	Q6T310	-----L-KRRFKQALS-----PKVKAPSA-----	240
RASL11B	Q9BPW5	-----L-KRRFKQALS-----AKVRTVTS-----	247
RASL12	Q9NYN1	-----L-TARHGLA-S-----CTPNTLST-----	226
REG	Q96A58	-----VKQAIN-----KMLTKISS-----	199
REERGL	G5EA41	-----S-----SCSVM-----	184
RHEB	Q15382	-----R-----RCHML-----	183
RHEBL1	Q8TA17	-----K-----SPFRFKKDSVT-----	219
RIT1	Q92963	-----K-----GSLKKRNMWT-----	217
RIT2	Q99578	-----K-----RKKGGGC-----PCVLL-----	218
RRAS	P10301	-----EKDKKGC-----HCVIF-----	204
RRAS2	P62070	-----IVAKNNK-NMAFKLK--SK-----SCHDLSVL-----	296
GEM	P55040	-----L-TARSAR-RRALKAR--SK-----SCHNLAVL-----	298
REM1	O75628	-----LVPRNAK--FFKQR--SR-----SCHDLSVL-----	340
REM2	Q81YK8	-----IVARNSR-KMAFRAK--SK-----SCHDLSVL-----	308
RRAD	P55042	-----RCVLL-----	191
CDC42	P60953	-----KCLL-----	192
RAC1	P63000	-----ACSL-----	192
RAC2	P15153	-----KCTVF-----	192
RAC3	P60763	-----GCLVL-----	193
RHGA	P61586	-----GCINCKVL-----	196
RHOB	P62745	-----PPVIK1PECPMSMGTNEAACLLDNPLCADVLF-----	271
RHOBTB1	O94844	-----PPI1VVPDPSSSECPAHLLEDPLCADVLLV-----	271
RHOBTB2	Q9BY26	-----GCPIL-----	193
RHOC	P08134	-----QGFCVVT-----	210
RHOD	O00212	-----LCGLL-----	211
RHOF	Q9HBH0	-----SCILL-----	191
RHOG	P84095	-----S--CCSII-----	214
RHOH	Q15669	-----R-INCKIP-----	191
RHOJ	Q9H4E5	-----S--CCSII-----	214
RHOQ	P17081	-----RCINCLIT-----	205
RHOU	Q7L0Q8	-----KMNLSKSW-----WKKYCCFV-----	258
RHOV	Q96L33	-----GVRTLSRRC-----WKKFFCFV-----	236
RND1	Q92730	-----LLHLPSRSE-----LI--SSTFKKKEKAKSCSIM-----	232
RND2	P52198	-----SAQLSGRPD-----RGN-EGEIHKDRAKSCNLM-----	227
RND3	P61587	-----ISHMPSRPE-----LSAVATDLRDKAKSCTVM-----	244
RAN	P62826	-----EVAQTALPDE-----D-----	213
RHOT1	Q8IX12	-----CIKALTR-----IFKISDQDNDGTLDNAELNFFQICPNTPLA-----	P 223
RHOT2	Q8IX11	-----CAQALTR-----IFRLSDQDLDQALSDEELNAFQKSCPGHPLA-----	P 223
IFT22	Q9H7X7	-----S--SIETPS-----EEVASPHS-----	228
RABL2A	Q9UBK7	-----EEDVDPQEQS-----S--SIETPS-----EEAASPHS-----	228
RABL2B	Q9UNT1	-----EEDVDPQEQS-----S--SIETPS-----EEAASPHS-----	228
RABL3	Q5HY18	-----GSSSPGTPQAPQ-----	322
RABL6	Q3YEC7	EMMEARSRGHASPLAANGQSPSPGQSPVVPAGAVST-----GSSSPGTPQAPQ-----	322
RRAGA	Q7L523	FLVISHYQC-K-----EQRDVHR-----FEKISNIKQF--KLSCS	243
RRAGB	Q5V2M2	FLVISHYQC-K-----EQRDAHR-----FEKISNIKQF--KLSCS	304
RRAGC	Q9HB90	KIYIAT--D-S-----SPVDMQS-----YELCC-DMIDVVIDVSCI	298
RRAGD	Q9NQL2	KIYIAT--D-S-----TPVDMQT-----YELCC-DMIDVVIDVSCI	299

Abbildung A1 | Sequenzalignment der Ras-Superfamilie der kleinen GTPasen. Das multiple Alignment der G-Domäne der Ras-Superfamilie kleiner GTPasen wurde mit UniProt erstellt. Die für die Sequenzüberlagerung verwendeten UniProt-IDs sind der Abbildung zu entnehmen. Die Bereiche innerhalb der GTPasen, die in Reichweite des eda-Linkers liegen sind grau hervorgehoben. Bereiche die zusätzlich in Reichweite des bda-Linkers liegen sind hingegen blau markiert. Die innerhalb dieser Regionen befindlichen Cysteine sind rot gekennzeichnet.

Tabelle A2 | Cystein-Aminosäureseitenketten in GTPasen. Ausgehend von den 2',3'-OH-Gruppen des Nukleotids (PDB: 4obe) wurde innerhalb der Reichweite der *warheads* (10 Å für eda und 12 Å für bda) nach Cysteinresten bei den GTPasen der Ras-Superfamilie gesucht. Nur etwa 7 % der GTPasen besitzen Cysteine innerhalb des P-loops. Insgesamt drei der über 150 GTPasen weisen an der Position 13 und nur eine GTPase an Position 12 einen Cysteinrest auf und sind daher potenzielle *off-Targets* der designierten Nukleotidderivate.

Aminosäure Position																				
12	13	14	18	21	22	27	29	30	32	33	81	85	116	118	120	121	144	145	146	147
IPT22	ARL4A RAB21 RHEBL1	RHOA RHOB RHOC RHOD RHOF RND1 RND2 RND3	RAB1A RAB1B RAB1C RAB2A RAB2B RAB4A RAB4B RAB8A RAB8B RAB10 RAB13 RAB14 RAB15 RAB19 RAB26 RAB30 RAB33A RAB33B RAB34 RAB37 RAB39A RAB39B RAB43 CDC42 RAC1 RAC2 RAC3 RHOA RHOB RHOC RHOG RHOJ RHOQ	RAB15 RAB31 RHOBTB1 RHOBTB2	RAB28 RHOG	ERAS RND1 RND3	RAB12	RAB41	RAB12 RAB14 RAB39A RAB41 RASL10B GEM	ARL5C NKIRAS1	RIT1 RIT2 CDC42 RAC1 RAC2 RAC3 RHOA RHOB RHOBTB1 RHOBTB2 RHOC RHOD RHOF RHOG RHOH RHOJ RHOQ RHOV RND1 RND2 RND3	RASL10A RASL10B ARL1	RHOBTB1 RHOBTB2 RHOD RHOF RND1 RND2 RND3	RAB1A RAB3B RAB3C RAB3D RAB8A RAB8B RAB10 RAB13 RAB19 RAB22A RAB29 RAB31 RAB32 RAB33A RAB33B RAB38 RAB39A RAB39B DIRAS1 DIRAS2 ERAS HRAS KRAS NKIRAS2 NRAS RAP1A RAP1B	RAB12 RAB44	RHOD	ARL2 ARL3 ARL4D ARL5A ARL5B ARL5C ARL11 ARL13A ARL13B ARL14 ARL15 ARL17 ARFRP1 SAR1A SAR1B TRIM23 RAB44 RASL10A RASL10B RERG	ARF1 ARF3 ARF4 ARF5 ARF6 ARL4A ARL4C ARL5A ARL5B ARL5C ARL14	ARL8A ARL8B RRAGA RRAGB	RAB15 RAS12 RERG

7.3 Reinigung der verkürzten KRas-Konstrukte

10 20 30 40 50 60
 MGH~~HHHHH~~AE NLYFQGHMTE YKLVVVGAGG VGKSALTIQL IQNHFVDEYD PTIEDSYRKQ
 70 80 90 100 110 120
 VVIDGETSLI DILDTAGQEE YSAMRDQYMR TEGEGFLLVFA INNTKSFEDI HHYREQIKRV
 130 140 150 160 170 180
 KDS~~EDVPMVL~~ VGNKSDLPSR TVDTKQAQDL ARSYGIPFIE TSAKTRQGV~~D~~ DAFYTLVREI

 RKHKEK

Abbildung A2 | Proteinsequenz des verkürzten Konstrukts von KRasWT vor Abspaltung des His₆-tags.

Tabelle A3 | Überblick über Molekulargewichte (MW), die isoelektrischen Punkte (pI) und Extinktionskoeffizienten (ϵ) der verkürzten KRas-Konstrukte (ungeschnitten (geschnitten)).

	KRasWT	KRasG12C	KRasG13C
MW (Da)	21.294 (19.418)	21.340 (19.464)	21.340 (19.464)
pI	5.85 (5.39)	5.85 (5.39)	5.85 (5.39)
ϵ (M⁻¹ cm⁻¹)	13410 (11920) + 7765 (GDP)	13410 (11920) + 7765 (GDP)	13410 (11920) + 7765 (GDP)

7.4 Massenspektren

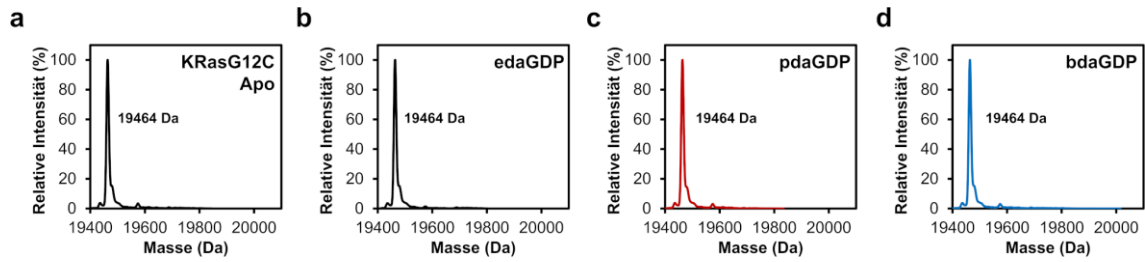


Abbildung A3 | MS-Spektren von KRasG12C. (a, b, c, d) Massenspektren von KRasG12C₁₋₁₆₉ (Cys-light) nach Inkubation mit 10 äq. der Acrylamid-Derivate edaGDP, pdaGDP und bdaGDP bei pH 9.5

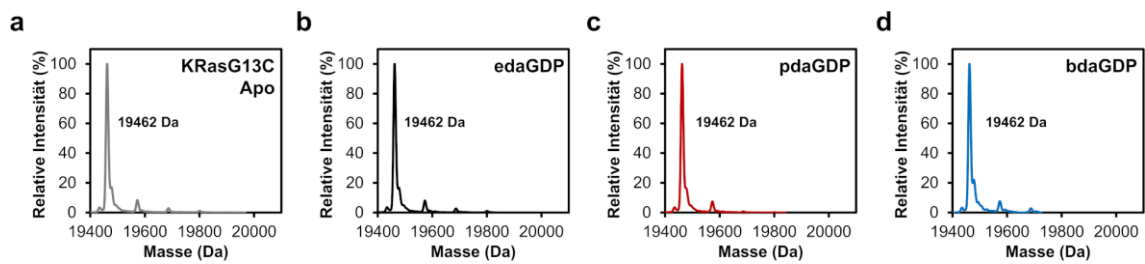
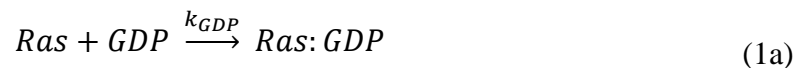


Abbildung A4 | MS-Spektren von KRasG13C. (a, b, c, d) Massenspektren von KRasG13C₁₋₁₆₉ (Cys-light) nach Inkubation mit 10 äq. der Acetamid-Derivate edaGDP, pdaGDP und bdaGDP bei pH 9.5

7.5 Berechnungen der Affinitäten

Im Folgenden werden die Berechnung der K_D -Werte für pdaGDP und bdaGDP am Beispiel des in Anwesenheit von EDTA durchgeführten HPLC-Assays vorgestellt:

Die Assoziationsratenkonstante beschreibt die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante für die Bildung des GDP- (Gleichung 1a) oder aGDP (Gleichung 1b)-gebundenen Ras-Komplexes.



Durch Umstellen der in (Gleichung 1a) und (Gleichung 1b) aufgeführten Gleichgewichtsreaktionen ergeben sich für K_{GDP} (Gleichung 2a) und K_{aGDP} (Gleichung 2b) folgende Zusammenhänge:

$$K_{GDP} = \frac{[Ras:GDP]}{[Ras][GDP]} \quad (2a)$$

$$K_{aGDP} = \frac{[Ras:aGDP]}{[Ras][aGDP]} \quad (2b)$$

Unter der Annahme, dass die bei dem HPLC-Assay eingesetzte Konzentration für aGDP 50 μM ist, können unter Verwendung der ermittelten prozentualen Anteile zum Zeitpunkt $t = 0 \text{ h}$ folgende GDP-Konzentrationen für pdaGDP (Gleichung 3a) und bdaGDP (Gleichung 3b) ermittelt werden (Abb. 29):

$$GDP_{total} = \frac{\%_{GDP}}{\%_{pdaGDP}} = \frac{37 \%}{63 \%} \times 50 \mu\text{M} = 29.4 \mu\text{M} \quad (3a)$$

$$GDP_{total} = \frac{\%_{GDP}}{\%_{bdaGDP}} = \frac{43 \%}{57 \%} \times 50 \mu\text{M} = 37.7 \mu\text{M} \quad (3b)$$

Die Konzentrationen der in Gleichung (2b) aufgeführten Komponenten können unter Berücksichtigung der zuvor berechneten totalen GDP-Konzentrationen wie folgt für pdaGDP (Gleichung 4a-d) und bdaGDP (Gleichung 5a-d) berechnet werden:

$$[Ras: pdaGDP] = \frac{47}{100} \times 29.4 \mu M = 13.8 \mu M \quad (4a)$$

$$[Ras: GDP] = \frac{53}{100} \times 29.4 \mu M = 15.6 \mu M \quad (4b)$$

$$[pdaGDP] = 50 \mu M - 13.8 \mu M = 36.2 \mu M \quad (4c)$$

$$[GDP] = 29.4 \mu M - 15.6 \mu M = 13.8 \mu M \quad (4d)$$

$$[Ras: bdaGDP] = \frac{39.5}{100} \times 37.7 \mu M = 14.9 \mu M \quad (5a)$$

$$[Ras: GDP] = \frac{60.5}{100} \times 37.7 \mu M = 22.8 \mu M \quad (5b)$$

$$[bdaGDP] = 50 \mu M - 14.9 \mu M = 35.1 \mu M \quad (5c)$$

$$[GDP] = 37.7 \mu M - 22.8 \mu M = 14.9 \mu M \quad (5d)$$

Die relativen Assoziationskonstante K_{relA} können durch folgende Formel (6) berechnet werden:

$$K_{relA} = \frac{K_{aGDP}}{K_{GDP}} = \frac{[Ras: aGDP] \times [GDP]}{[aGDP] \times [Ras: GDP]} \quad (6)$$

Durch Einsetzen der aus (Gleichung 4a-d) und (Gleichung 5a-d) ermittelten Konzentrationen der einzelnen Komponenten in (Gleichung 6) können die relativen Assoziationskonstanten K_{relA} für pdaGDP (Gleichung 7a) und bdaGDP (Gleichung 7b) berechnet werden:

$$K_{relA} = \frac{K_{pdaGDP}}{K_{GDP}} = \frac{13.8 \mu M \times 13.8 \mu M}{36.2 \mu M \times 15.6 \mu M} = 0.34 \quad (7a)$$

$$K_{relA} = \frac{K_{bdaGDP}}{K_{GDP}} = \frac{14.9 \mu M \times 14.9 \mu M}{35.1 \mu M \times 22.8 \mu M} = 0.28 \quad (7b)$$

Aus den relativen Assoziationskonstanten K_{relA} kann durch Multiplikation mit der Assoziationskonstante von GDP die K_A -Werte der Nukleotidanaloga berechnet werden (Gleichung 8):

$$K_A = K_{AGDP} \times K_{relA} \quad (8)$$

Als Referenzwert für GDP wurde der von Jeganathan *et al.* beschriebene K_D -Wert von 2.5 pM verwendet.¹⁰³ Durch Einsetzen des Referenzwertes in $K_A = \frac{1}{K_D}$ wurde ein K_A -Wert für GDP von 0.4 pM⁻¹ ermittelt. Es ergeben sich demnach folgende K_A -Werte für pdaGDP (Gleichung 9a) und bdaGDP (Gleichung 9b):

$$K_A pdaGDP = 0.4 \text{ pM}^{-1} \times 0.34 = 0.136 \text{ pM}^{-1} \quad (9a)$$

$$K_A bdaGDP = 0.4 \text{ pM}^{-1} \times 0.28 = 0.112 \text{ pM}^{-1} \quad (9b)$$

Durch die Umwandlung der ermittelten K_A -Werte in die entsprechenden K_D -Werte mittels $K_D = \frac{1}{K_A}$ konnten folgende Dissoziationskonstanten für pdaGDP (Gleichung 10a) und bdaGDP (Gleichung 10b) bestimmt werden:

$$K_D pdaGDP = \frac{1}{0.136 \text{ pM}^{-1}} = 7.4 \text{ pM} \quad (10a)$$

$$K_D bdaGDP = \frac{1}{0.112 \text{ pM}^{-1}} = 8.9 \text{ pM} \quad (10b)$$

Analoge Berechnungen wurden ebenfalls für die in Abwesenheit von EDTA und in Gegenwart von SOS durchgeführten HPLC-Messungen durchgeführt und sind in der nachstehenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle A4 | Übersicht über die mittels HPLC-Assay (-EDTA, +EDTA, +SOS) berechneten K_D -Werte von pdaGDP und bdaGDP Als Referenz sind ebenfalls die K_D -Werte von GDP sowie dem Nukleotidanalogen SML-8-73-1 aufgeführt.

	Nukleotid	-EDTA	+EDTA	+SOS
	GDP		2.5	
K_D [pM]	pdaGDP	8.0	7.4	10.4
	bdaGDP	10.0	8.9	10.0
	SML-8-73-1		140000	

7.6 Etablierung des GTP-Hydrolyse-Assays

7.6.1 GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse von KRasG13C-edaGTP

Die intrinsische und die GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse von KRasG13C-edaGTP wurde mittels ESI-MS analysiert.

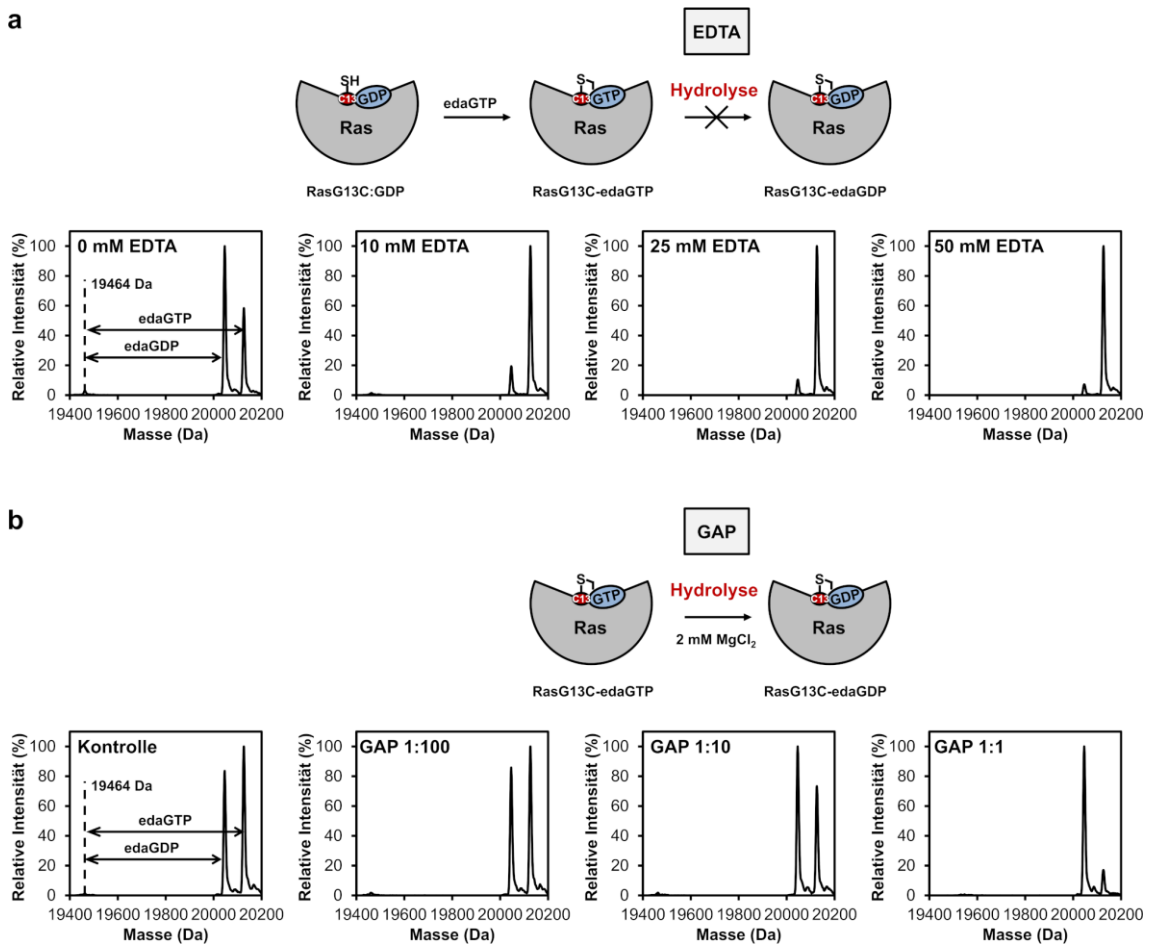


Abbildung A5 | GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse von KRasG13C-edaGTP (a) Blockierung der intrinsischen GTP-Hydrolyse bei der kovalenten Modifizierung von KRasG13C₁₋₁₆₉ (*Cys-light*) mit Acryl-edaGTP durch Zugabe von EDTA (0, 10, 25 und 50 mM). In Gegenwart von 50 mM EDTA konnte eine ausreichende Blockierung der intrinsischen GTP-Hydrolyse beobachtet werden; (b) Beschleunigung der intrinsischen GTP-Hydrolyse durch Zugabe von GAP (1:100, 1:10 und 1:1). Eine GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse konnte erst bei einer sehr hohen Konzentration an GAP (50 μ M, Verhältnis 1:1) nach 1 h detektiert werden.

7.6.2 GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse von KRasWT:GTP

Die intrinsische und die GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse von KRasWT:GTP wurde mittels isokratischer HPLC-Läufe analysiert.

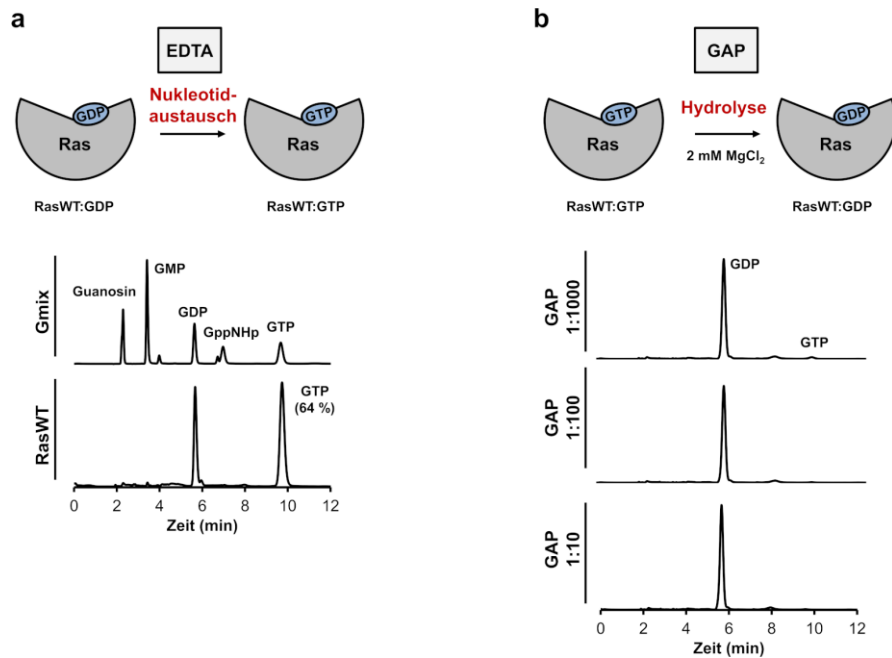


Abbildung A6 | GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse von KRasWT:GTP (a) Blockierung der intrinsischen GTP-Hydrolyse bei der Herstellung von KRasWT:GTP durch Zugabe von 50 mM EDTA. Nach erfolgtem Nucleotidaustausch lag KRas zu 64 % im GTP-gebundenen Zustand vor; (b) Beschleunigung der intrinsischen GTP-Hydrolyse durch Zugabe von GAP (1:100, 1:10 und 1:1). Eine GAP-stimulierte GTP-Hydrolyse konnte für KRasWT:GTP bereits bei katalytischen Mengen an GAP (0.05 μ M, Verhältnis 1:1000) nach 1 h beobachtet werden.

7.7 Datenstatistiken der KRasG13C-Kristallstrukturen

Tabelle A5 | Datenstatistiken der Ko-Kristallstrukturen von KRasG13C-edaGDP und KRasG13C-bdaGDP. Die Werte in den Klammern beziehen sich auf die jeweils höchste Auflösungsschale.

Datensammlung	KRasG13C-edaGDP (PDB: 7ok3)	KRasG13C-bdaGDP (PDB: 7ok4)
Raumgruppe	P 63	P 63
Zellkonstanten		
a, b, c (Å)	73.40, 73.40, 54.20	73.90, 73.90, 54.80
α , β , γ (°)	90.00, 90.00, 120.00	90.00, 90.00, 120.00
Auflösung (Å)	41.243 – 1.6 (1.7-1.6)	41.625 – 1.7 (1.8-1.7)
R _{meas} (%)	10.3 (101.6)	7.1 (159.6)
R _{merge} (%)	9.8 (96.6)	7.0 (155.7)
I/ σ	12.71 (2.40)	24.52 (2.26)
CC _{1/2}	99.9 (80.1)	100.0 (78.4)
Vollständigkeit (%)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
Redundanz	10.1 (10.4)	20.3 (20.5)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	41.243 – 1.6	41.625 – 1.7
Anzahl der Reflexe	22009	18838
R _{work} / R _{free}	15.80/20.01 (23.30/30.62)	16.53/18.24 (26.43/35.58)
Anzahl der Atome		
Protein	1386	1336
Ligand/Ion	38	40
Wasser	187	106
B-Faktoren		
Protein	27.02	36.92
Ligand/Ion	18.91	30.77
Wasser	36.23	45.00
Standardabweichung		
Bindungslängen (Å)	0.016	0.004
Bindungswinkel (°)	1.483	0.711
Wellenlänge (Å)	0.91504	0.999
Temperatur (K)	100	100
Röntgenquelle	X10SA am SLS (Villigen, CH)	X10SA am SLS (Villigen, CH)
Detektor	Pilatus 6M	EIGER2 x 16M

Tabelle A5 | Datenstatistiken der Ko-Kristallstrukturen von KRasG13C-edaGDP und KRasG13C-bdaGDP. Die Werte in den Klammern beziehen sich auf die jeweils höchste Auflösungsschale.
(Fortsetzung)

Ramachandran Plot

Reste in bevorzugtem Bereich (%)	97.62	97.02
Reste in erlaubten Bereichen (%)	2.38	2.98
Ausreißer (%)	0.00	0.00

7.8 Etablierung des Mg^{2+} -Affinitäts-Assays

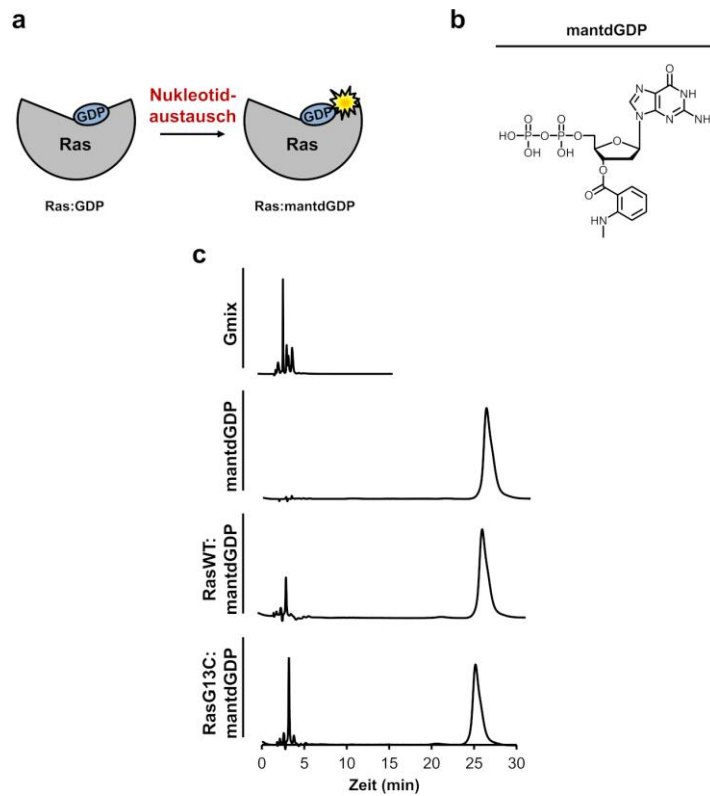


Abbildung A7 | Herstellung von mantdGDP-gebundenem KRas (a) Zur Herstellung von mantdGDP-gebundenen Ras-Proteinen wurde ein Nukleotidaustausch in Gegenwart von EDTA bei pH 7.5 durchgeführt; **(b)** Chemische Struktur von mantdGDP; **(c)** Die Beladung von KRasWT und KRasG13C mit mantdGDP wurde mittels isokratischer HPLC-Läufe analysiert (Puffer: 50 mM KPi pH 6.6, 10 mM TBAB, 25 % ACN).

7.9 Mutagenesen und Sequenzierungen

7.9.1 Primer

Tabelle A6 | Übersicht über die bei der QuickChange-Mutagenese von pBabe-KRasWT → pBabe-KRasG13C verwendeten Primer.

	Primer	Sequenz (5'→3')
Mutagenese	G13C_fw	GTAGTTGGAGCTGGCTGCGTAGGCAAGAGTG
	G13C_rv	CACTCTTGCCTACGCAGCCAGCTCCAACACTAC
Sequenzierung	pBabe 3'	ACCCTAACTGACACACATTCC
	pBabe 5'	CTTTATCCAGCCCTCAC

Tabelle A7 | Übersicht über die bei der QuickChange-Mutagenese von pETmod19_KRasWT_fl → pETmod19_KRasG13C_fl verwendeten Primer.

	Primer	Sequenz (5'→3')
Mutagenese	G13C_fw	AAGCTTGTTGTGTGTTGGCGCCGGCTGTGTGGGCAAGAGTGCCTG
	G13C_rv	CAGCGCACTCTTGCCCACACAGCCGGCGCCAACAACAACAAGCTT
Sequenzierung	T7' fw	TAATACGACTCACTATAGGG
	T7' rv	CTAGTTATTGCTCAGCGGT

Tabelle A8 | Übersicht über die bei der Subklonierung der KRas-Gensequenz aus den pBabe-Plasmiden in pcDNA-Vektoren verwendeten Primer.

pcDNA	Primer	Sequenz (5'→3')
Klonierung	kras kpnI rev	GATCGGTACCTTACATAATTACACACTTTGTCTTTGACTTC
	kras sacI for	GATCGAGCTCTCGCCACCATGACTGAATATAAACTTGTG
Sequenzierung	mCherry_seq_for	GACATCACCTCCCACAACGAG
	CMV_seq_for	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG

Tabelle A9 | Übersicht über die für die Genomsequenzierung von H1355 und H1734 verwendeten Primer.

	Primer	Sequenz (5'→3')
Sequenzierung	KRas f	TTTGAGAGCCTTTAGCCGCC
	KRas r	ACCCAAAGAACCATAAACTGTAG

7.9.2 Sequenzierungen

7.9.2.1 Plasmidsequenzierungen



Abbildung A8 | Plasmidsequenzierungen der mCherry pcDNA-Vektoren. Sequenzausschnitt der Sequenzierung von (a) pC_KRasWT, (b) pC_KRasG12C und (c) pC_KRasG13C.



Abbildung A9 | Plasmidsequenzierungen der mOrange pcDNA-Vektoren. Sequenzausschnitt der Sequenzierung von (a) pC_KRasWT, (b) pC_KRasG12C und (c) pC_KRasG13C.

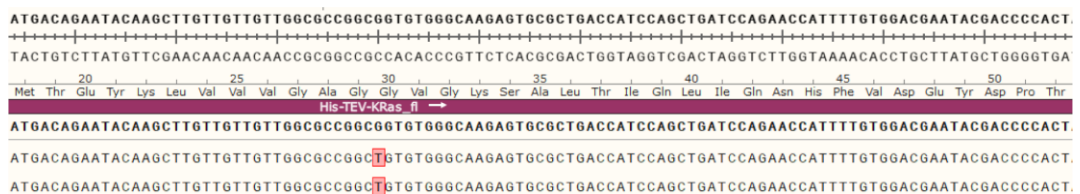


Abbildung A10 | Plasmidsequenzierung pET19mod_KRasG13C-fl. Sequenzausschnitt der Sequenzierung des pET19mod_KRasG13C-fl Plasmids.


```

atgactgaatataaaccttggtagttggagctggcggcgtaggcaagagtccttgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaaca
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
tactgacttatattgaaacaccatcaacctcgaccgccgatccgttctcacggaactgctatgctgattaagcttagtaaaacacctgcttatactaggttgt
1   5   10  15  20  25  30  35
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr
K-Ras
atgactgaatataaaccttggtagttggagctggcggcgtaggcaagagtccttgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaaca
ATGACTGAATATAAACCTTGGTAGTTGGAGCTGGCTTGCCTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTGTTGGACGAATATGATCCAACA
ATGACTGAATATAAACCTTGGTAGTTGGAGCTGGCTTGCCTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTGTTGGACGAATATGATCCAACA

```

Abbildung A11 | Plasmidsequenzierung pBabe-KRasG13C. Sequenzausschnitt der Sequenzierung des pBabe-KRasG13C-Plasmids.

7.9.2.2 Genomsequenzierungen

```

atg actgaatataaaccttggtagttggagctggcggcgtaggcaagagtccttgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaaca
+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
tac tgacttatattgaaacaccatcaacctcgaccgccgatccgttctcacggaactgctatgctgattaagcttagtaaaacacctgcttatactaggttgt
1   5   10  15  20  25  30  35
Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr Asp Pro Thr
K-Ras
atg actgaatataaaccttggtagttggagctggcggcgtaggcaagagtccttgacgatacagctaattcagaatcattttgtggacgaatatgatccaaca
ATGACTGAATATAAACCTTGGTAGTTGGAGCTTGCCTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTGTTGGACGAATATGATCCAACA
ATG ACTGAATATAAACCTTGGTAGTTGGAGCTTGCCTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTGTTGGACGAATATGATCCAACA

```

Abbildung A12 | Genomsequenzierung Ba/F3-KRasG12C. Sequenzausschnitt der Genomsequenzierung KRasG12C-abhängigen Ba/F3-Zellen.



Abbildung A13 | Genomsequenzierung H1355. Sequenzausschnitt der Genomsequenzierung der H1355-Zellen.

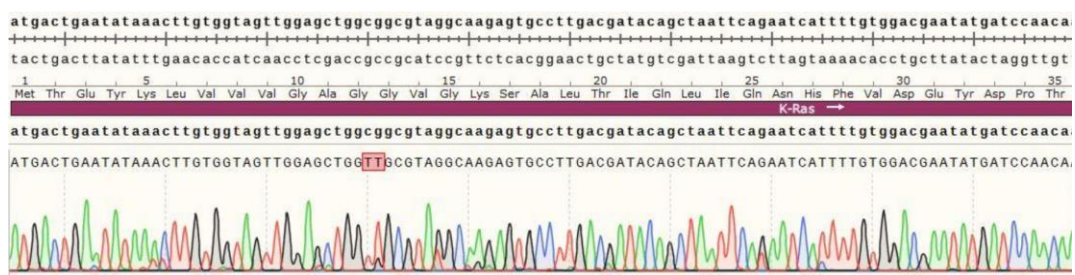
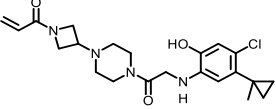
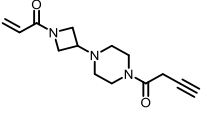
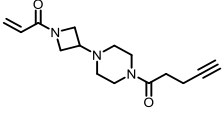
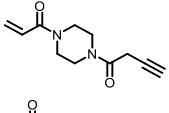
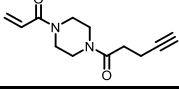


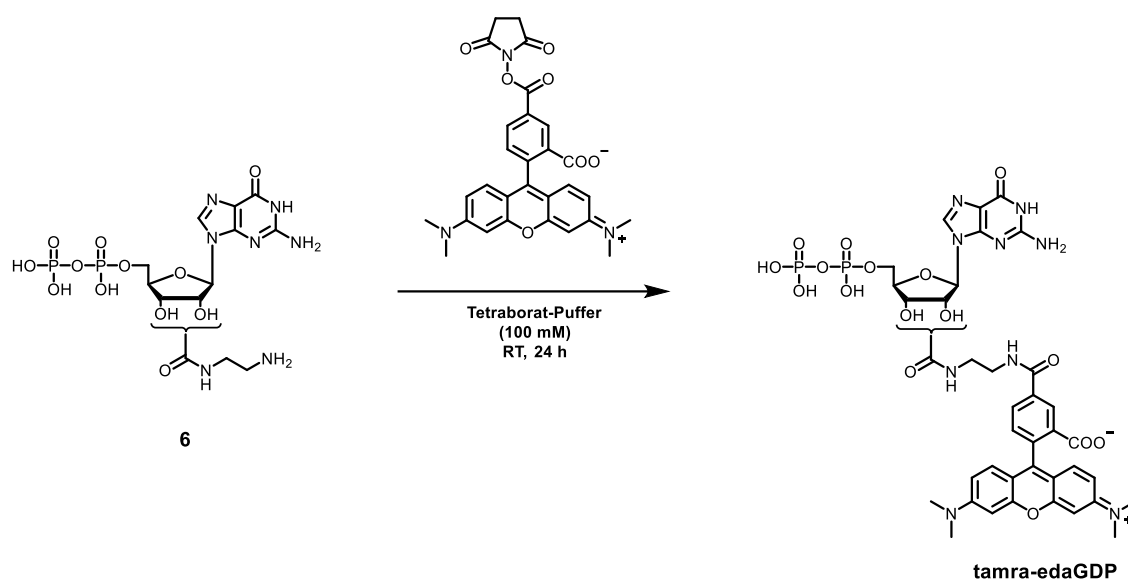
Abbildung A14 | Genomsequenzierung H1734. Sequenzausschnitt der Genomsequenzierung der H1734-Zellen.

7.10 CovClick-Fragmente für KRasG12C

Tabelle A10 | Übersicht über die CovClick-Fragmente. Basierend auf dem chemischen Grundgerüst von ARS-853 wurden CovClick-Fragmente entwickelt, welche als Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer KRasG12C-Inhibitoren dienen sollten.

Verbindung	Chemische Struktur
ARS-853	
CovClick-Fragment 1	
CovClick-Fragment 2	
CovClick-Fragment 3	
CovClick-Fragment 4	

7.11 Darstellung von tamra-edaGDP



Zu einer Lösung bestehend aus edaGDP (47.3 μmol) in 0.8 mL Tetraboratpuffer (100 mM, pH 8.5) wurde 5-tamra-SE (5-Carboxytetramethylrhodamin, Succinimidylester) (18.9 μmol) in DMSO (25 μL) hinzugefügt und die Reaktionslösung für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die anschließende Reinigung und Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte analog wie zuvor beschrieben (Kapitel 5.3.1).

LCMS (ESI-MS):

	berechnet	$[\text{M}-\text{H}]^-$	gefunden	Reinheit (%)	Ausbeute (%)
tamra-edaGDP	940.2	$\text{C}_{38}\text{H}_{40}\text{N}_9\text{O}_{16}\text{P}_2$	940.2	90	48

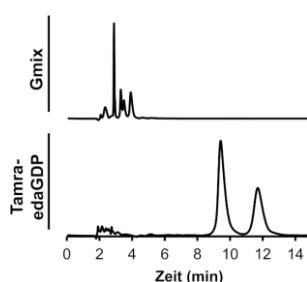


Abbildung A15 | Isokratische Trennung von tamra-edaGDP. Isokratischer HPLC-Lauf von tamra-edaGDP zur Analyse der Reinheit (~ 90 %).

7.12 Reinigung der KRas-Volllängenkonstrukte

$\overline{10}$ $\overline{20}$ $\overline{30}$ $\overline{40}$ $\overline{50}$ $\overline{60}$
 MGHHHHHHA E NLYFQGHMTE YKLVVVGAGG VGKSALTIQL IQNHFVDEYD PTIEDSYRKQ

 $\overline{70}$ $\overline{80}$ $\overline{90}$ $\overline{100}$ $\overline{110}$ $\overline{120}$
 VVIDGETCLL DILDTAGQEE YSAMRDQYMR TEGEFLCVFA INNTKSFEDI HHYREQIKRV

 $\overline{130}$ $\overline{140}$ $\overline{150}$ $\overline{160}$ $\overline{170}$ $\overline{180}$
 KDSVDPMVL VGNKCDLPSR TVDTKQAQDL ARSYGIPFIE TSAKTRQGV DAFYTLVREI

 $\overline{190}$ $\overline{200}$
 RKHK EKMSKD GKKKKKSKT KCVIM

Abbildung A16 | Proteinsequenz des Volllängenkonstrukts von KRasWT vor Abspaltung des His₆-tags.

Tabelle A11 | Überblick über Molekulargewichte (MW), der isoelektrischen Punkte (pI) und Extinktionskoeffizienten (ϵ) der Volllängenkonstrukte von KRas (ungeschnitten (geschnitten)).

	KRasWT	KRasG13C
MW (Da)	23.495 (21.618)	23.541 (21.664)
pI	7.73 (8.27)	7.70 (8.22)
ϵ (M⁻¹ cm⁻¹)	13410 (11920) + 7765 (GDP)	13410 (11920) + 7765 (GDP)

7.12.1 KRasWT-Volllänge

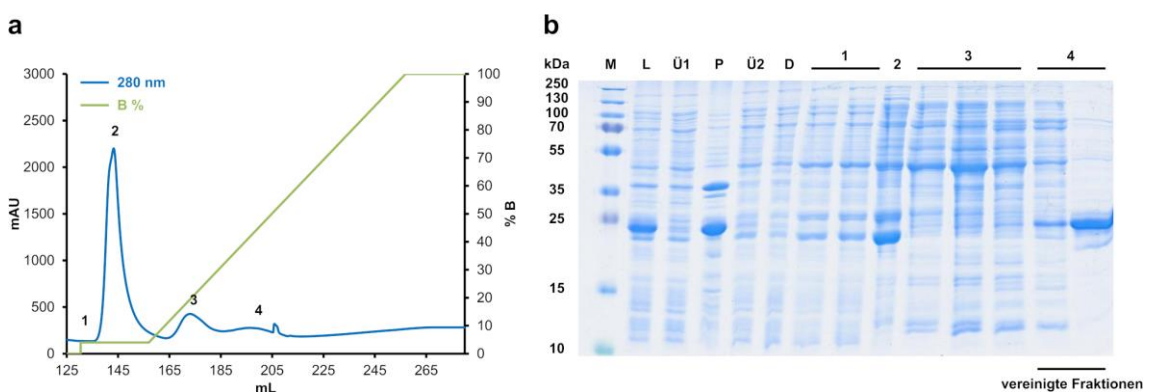


Abbildung A17 | Erste Ni²⁺-Affinitätschromatographie. (a) Chromatogramm der ersten Ni-AC des KRasWT-Volllängenkonstrukts (blau: Absorption bei 280 nm; grün: Anteil des Imidazol-haltigen Elutionspuffers); (b) Analyse der Fraktionen der Ni-AC mittels SDS-PAGE (M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, L: Lysat, Ü1: Überstand vor der Zentrifugation, P: Pellet, Ü2: Überstand nach der Zentrifugation, D: Durchfluss, 1-2: Waschfraktion, 3-4: Eluatfraktionen).

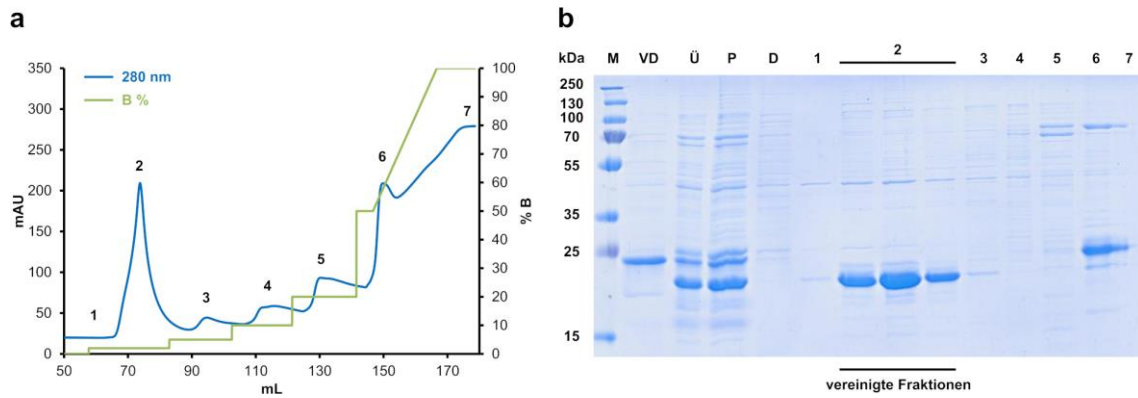


Abbildung A18 | Reverse Ni²⁺-Affinitätschromatographie. (a) Chromatogramm der zweiten reversen Ni-AC des KRasWT-Volllängenkonstrukts (blau: Absorption bei 280 nm; grün: Anteil des Imidazolhaltigen Elutionspuffers); (b) Analyse der Fraktionen der Ni-AC mittels SDS-PAGE (M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, VD: vor der Dialyse, Ü: Überstand, P: Pellet, D: Durchfluss, 1-7: Eluatfraktionen).

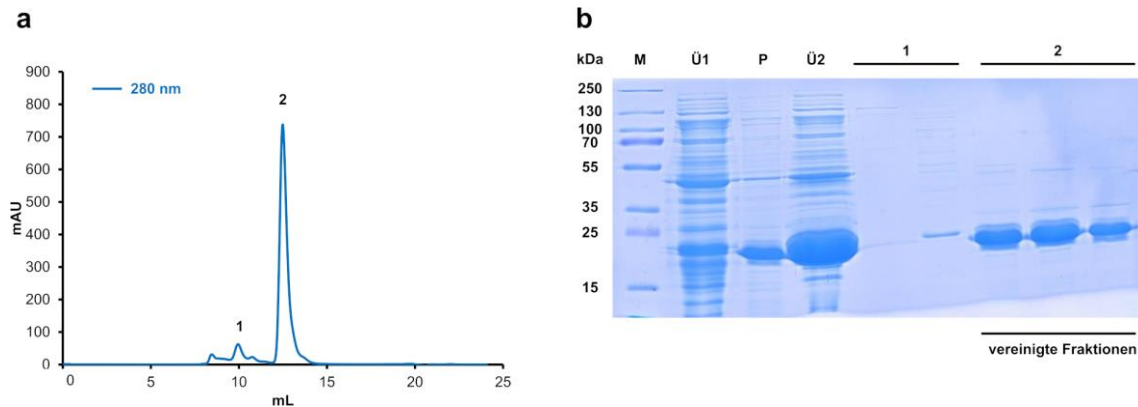


Abbildung A19 | Größenausschlusschromatographie. (a) Chromatogramm der SEC des KRasWT-Volllängenkonstrukts (blau: Absorption bei 280 nm); (b) Analyse der Fraktionen der SEC mittels SDS-PAGE (M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Ü1: Überstand vor dem Aufkonzentrieren, P: Pellet nach dem Aufkonzentrieren, Ü2: Überstand nach dem Aufkonzentrieren, 1-2: Eluatfraktionen).

7.12.2 KRasG13C-Volllänge

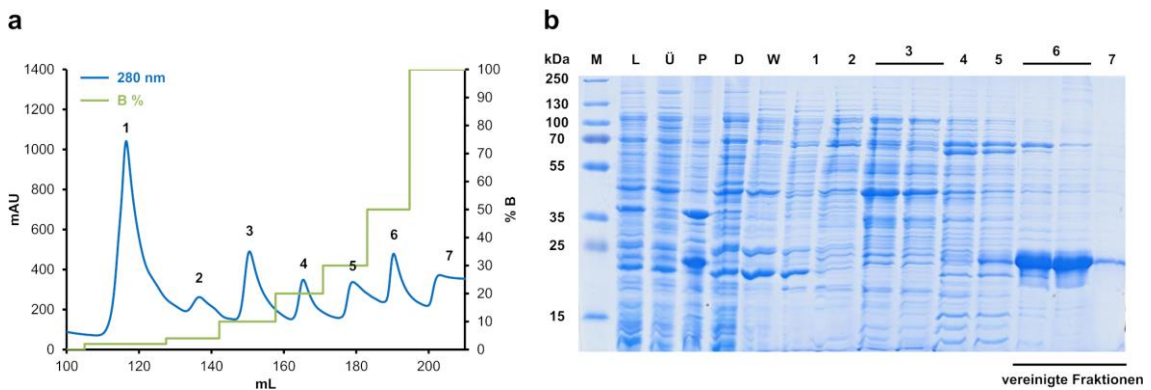


Abbildung 20 | Erste Ni²⁺-Affinitätschromatographie. (a) Chromatogramm der ersten Ni-AC des KRasG13C-Volllängenkonstrukts (blau: Absorption bei 280 nm; grün: Anteil des Imidazolhaltigen Elutionspuffers); (b) Analyse der Fraktionen der Ni-AC mittels SDS-PAGE (M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, L: Lysat, Ü: Überstand, P: Pellet, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, 1-7: Eluatfraktionen).

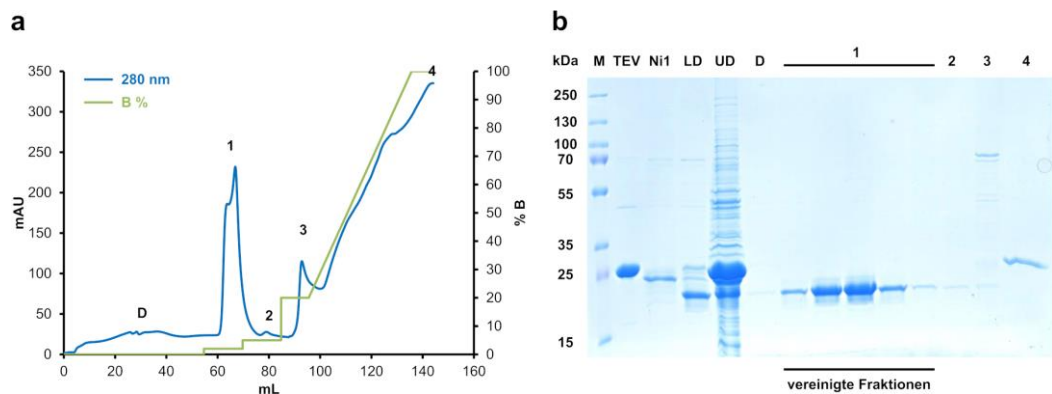


Abbildung 21 | Reverse Ni²⁺-Affinitätschromatographie. (a) Chromatogramm der zweiten reversen Ni-AC des KRasG13C-Volllängenkonstrukts (blau: Absorption bei 280 nm; grün: Anteil des Imidazolhaltigen Elutionspuffers); (b) Analyse der Fraktionen der Ni-AC mittels SDS-PAGE (M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, TEV: TEV-Protease, Ni1: vereinigte Eluatfraktionen der ersten Ni-AC, LD: lösliche Fraktion der Dialyse, UD: unlösliche Fraktion der Dialyse, D: Durchfluss, 1-4: Eluatfraktionen).

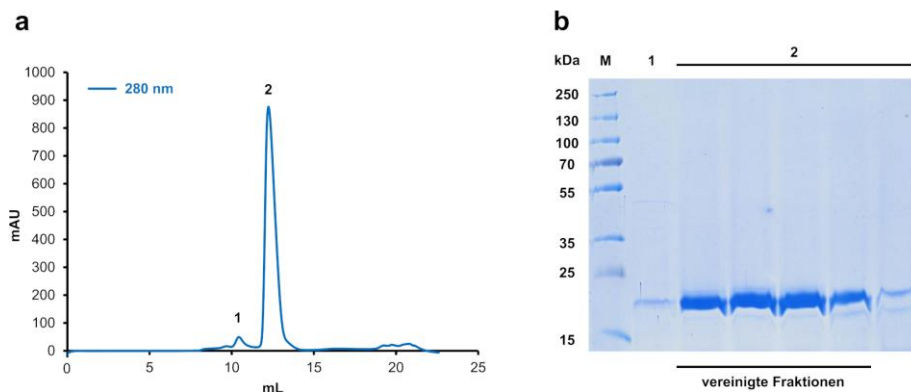


Abbildung 22 | Größenausschlusschromatographie. (a) Chromatogramm der SEC des KRasG13C-Volllängenkonstrukts (blau: Absorption bei 280 nm); (b) Analyse der Fraktionen der SEC mittels SDS-PAGE (M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, 1-2: Eluatfraktionen).

7.13 MS/MS-Analysen mit GluC

Tabelle A12 | Ergebnis der MS/MS-Analyse nach Verdau von KRasG13C (s1) und KRasG13C-edaGDP (s2) mit der GluC-Protease. Im Gegensatz zum tryptischen Verdau konnte die vollständige Sequenz von KRas abgedeckt werden, jedoch konnte hier keine Adduktbildung beobachtet werden.

ID	Gen	Peptide		Peptide (<i>unique</i>)		MW (kDa)	Sequenzabdeckung (%)		Intensität	
		s1	s2	s1	s2		s1	s2	s1	s2
P0C1U8	GluC	13	13	13	13	36.325	31.8	38.1	6.7E+09	6.0E+09
P13645	KRT10	3	2	3	2	58.826	4.6	1.7	1.6E+07	7.1E+06
Probe	Probe	26	21	4	2	21.665	100	100	4.3E+11	1.7E+11
P01112; P01111	HRAS; NRAS	14	13	1	2	21.298	56.6	60.3	3.7E+07	2.1E+07
P01116-2	KRAS	23	21	0	0	21.424	98.4	98.4	4.2E+08	2.4E+09
P0A6A8	acpP	1	2	1	2	8.6394	20.5	44.9	5.3E+06	1.3E+08
P0A6F9	groS	0	3	0	3	10.387	0	35.1	0	3.8E+07
P0A6K6	deoB	2	1	2	1	44.369	7.4	2	9.0E+06	2.3E+06
P0A7J0	ribB	3	14	3	14	23.353	20.3	62.2	5.1E+07	9.4E+08
P0A9A9	fur	0	4	0	4	16.795	0	54.1	0	6.6E+07
P0A9W9	yrdA	0	3	0	3	20.245	0	29.9	0	4.7E+07
P0AAT9	ybeL	0	2	0	2	18.797	0	16.2	0	7.3E+06
P0AB55	yciI	0	3	0	3	10.602	0	57.1	0	2.0E+07
P0ACD4	iscU	0	2	0	2	13.848	0	21.1	0	2.1E+07
P0ACE7	hinT	4	3	4	3	13.241	50.4	31.1	1.2E+08	3.7E+07
P0AE18	map	0	2	0	2	29.33	0	11	0	2.6E+06
P0AEX9	malE	0	2	0	2	43.387	0	9.3	0	4.9E+06
P39172	znuA	0	3	0	3	33.777	0	15.5	0	1.2E+07
P45565	ais	2	0	2	0	22.256	19.5	0	9.1E+07	0
P63417	yhbS	0	3	0	3	18.534	0	28.7	0	1.3E+07
P69783	crr	0	5	0	5	18.251	0	45	0	9.7E+06
P69828	gatA	0	2	0	2	16.907	0	14	0	1.2E+07
P75949	nagZ	4	0	4	0	37.594	29.9	0	1.0E+08	0
Q96MA6	AK8	2	1	2	1	54.925	2.5	2.5	3.1E+07	7.4E+07

7.14 Western Blot-Analyse

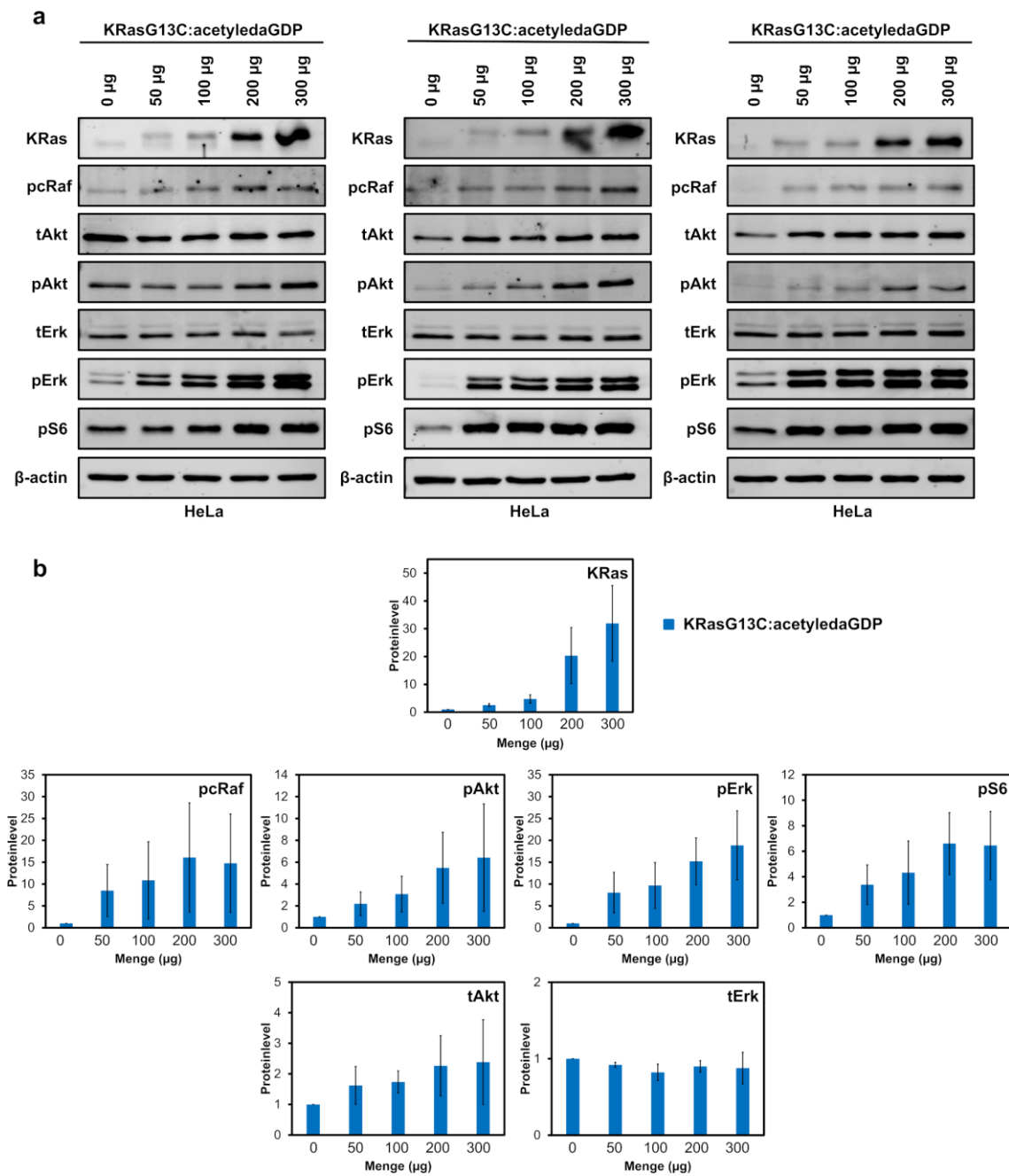


Abbildung A23 | Elektroporation von KRas:acetyledaGDP. (a) Western Blot-Analyse nach Elektroporation der angegebenen Mengen von KRasG13C:acetyledaGDP in HeLa-Zellen (n = 3 biologische Replikate); (b) Quantifizierung der KRas-Proteinlevel aus Western Blots.

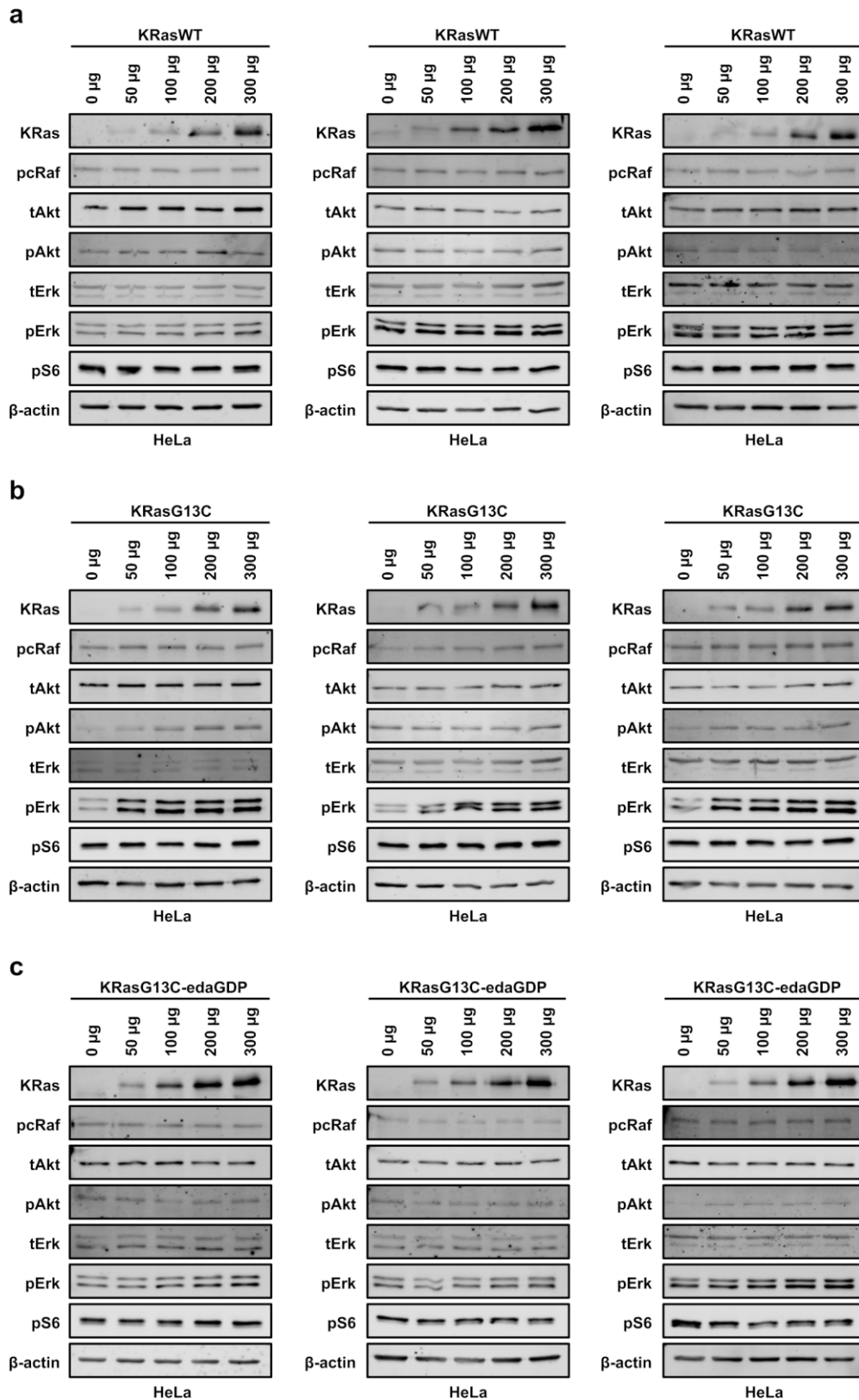


Abbildung A24 | *In vitro* Immunoblotting-Experimente. Western Blot-Analyse nach Elektroporation der angegebenen Mengen von (a) KRasWT, (b) KRasG13C und (c) KRasG13C-edaGDP in HeLa-Zellen (n = 3 biologische Replikate).

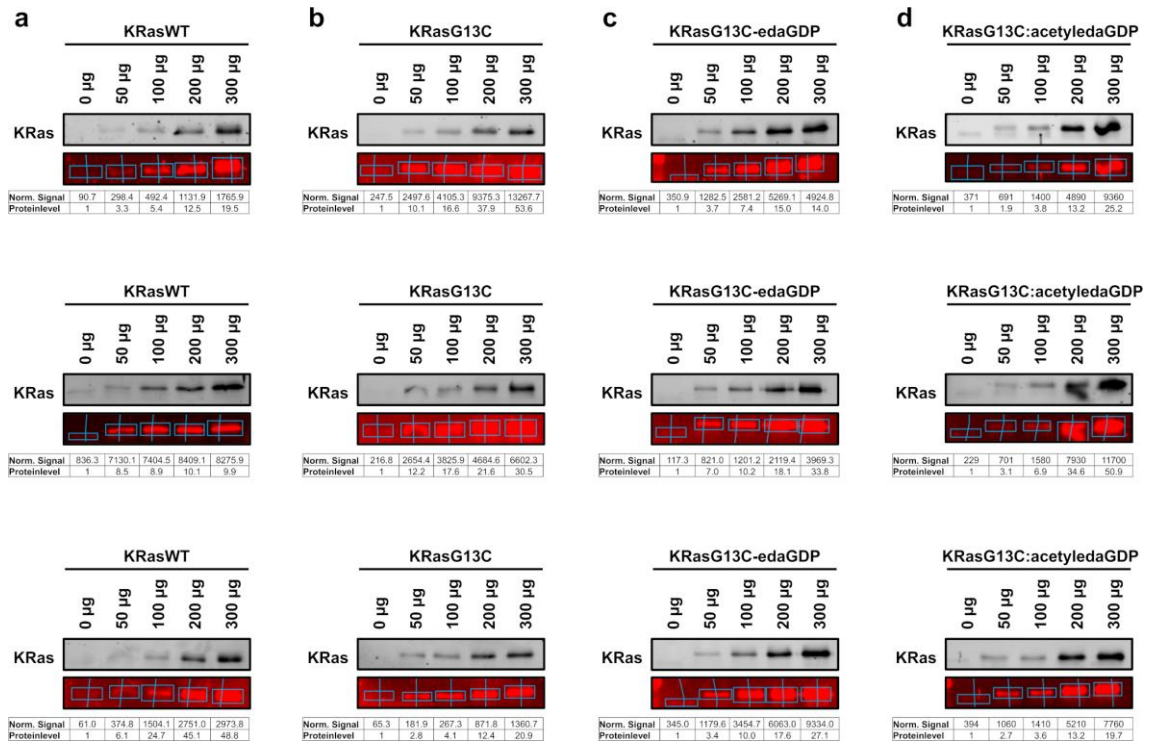


Abbildung A25 | Elektroporation von KRas. Quantifizierung der KRas-Proteinlevel aus Western Blots nach Elektroporation der angegebenen Mengen von (a) KRasWT, (b) KRasG13C, (c) KRasG13C-edaGDP und (d) KRasG13C:acetyledaGDP in HeLa-Zellen mit Empiria Studio (Li-Cor). Aufgrund der relativ geringen Expressionswerte von Ras wurde der Kontrast entsprechend erhöht, um das intrinsisch exprimierte Protein sichtbar zu machen.

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Goebel, Lisa

149549

Name, Vorname
(Surname, first name)

Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

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

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

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

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

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

The submission of a false affidavit is punishable.

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

I have taken note of the above official notification.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

Design, Synthese und Evaluation Mutanten-selektiver Inhibitoren zur

Adressierung onkogener KRas-Varianten

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

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

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

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

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

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)