

Biochemische & Strukturbiologische Charakterisierung der Rezeptortyrosinkinasen KIT & PDGFRA

DISSERTATION

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

Technische Universität Dortmund
Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

Vorgelegt von

Alina Teuber

geb. 04.12.1994 in Schwelm

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh
2. Gutachter: Prof. Dr. Sebastian Bauer

Dortmund, Februar 2024

“Remember to look up at the stars and not down at your feet. Never give up work. Work gives you meaning and purpose and life is empty without it. If you are lucky enough to find love, remember it is there and don't throw it away.”

Stephen Hawking

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2020 bis Dezember 2023 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Daniel Rauh im Fachbereich Chemische Biologie der Fakultät für Chemie und Chemische Biologie der Technischen Universität Dortmund angefertigt.

Im Rahmen dieser Arbeit sind die Masterarbeiten von Frederik Schramm (2021) und Daniel Busick (2022) entstanden. Ergebnisse dieser Arbeiten sind an entsprechenden Stellen markiert.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits im Rahmen der eigenen Masterarbeit unter Anleitung von Dr. Ina Landel erhoben und in Ihrer Doktorarbeit veröffentlicht. Entsprechende Stellen sind im Verlauf der Arbeit angegeben.

Publikationen & Patente

PUBLIKATIONEN

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

[1] **A. Teuber**[‡], T. Schulz[‡], B. S. Fletcher, R. Gontla, T. Mühlenberg, M.-L. Zischinsky, J. Niggenaber, J. Weisner, S. B. Kleinbölting, J. Lategahn, S. Sievers, M. P. Müller, S. Bauer, D. Rauh; Avapritinib-Based SAR Studies Unveil a Binding Pocket in KIT and PDGFRA. *Nature Communications* **2024**, *15*, 63.

[2] T. Mühlenberg, J. Falkenhorst, T. Schulz, B. S. Fletcher, **A. Teuber**, D. Krzeczieska, I. Klooster, M. Lundberg, L. Wilson, J. Lategahn, M. von Mehren, S. Grunewald, A. I. Tüns, E. Wardelmann, J. K. Sicklick, M. Brahmi, C. Serrano, H.-U. Schildhaus, S. Sievers, J. Treckmann, M. C. Heinrich, C. P. Raut, W.-B. Ou, A. Marino-Enriquez, S. George, D. Rauh, J. A. Fletcher, S. Bauer; KIT ATP-Binding Pocket/Activation Loop Mutations in GI Stromal Tumor: Emerging Mechanisms of Kinase Inhibitor Escape. *Journal of Clinical Oncology* **2024**, *0*, JCO.23.01197.

[3] **A. Teuber**, J. Niggenaber, S. B. Kleinbölting, D. Busick, J. Warmuth, I. Landel, M. P. Müller, D. Rauh; Illuminating New Opportunities in GIST Treatment: A Structural Analysis Approach. *In preparation*.

PATENTE

D. Rauh, A. Teuber, T. Schulz, J. Warmuth, J. Lategahn, S. Sievers, T. Mühlenberg, S. Bauer, Compounds for use in the treatment of gastrointestinal stromal tumor (GIST), EP 23209032.

[‡] Diese Autoren trugen gleichermaßen zur Publikation bei.

Kristallstrukturen

Im Rahmen dieser Arbeit sind 43 Kristallstrukturen entstanden, von denen bisher 21 in der *Protein Data Bank* veröffentlicht (1-12) bzw. zum Zeitpunkt des Einreichens dieser Arbeit final deponiert (13-21) wurden. Die Nummerierung der Kristallstrukturen ist in hochgestellten Zahlen angegeben:

PDB-ID	Titel
8PQ9 ¹	c-KIT kinase domain in complex with avapritinib
8PQA ²	c-KIT kinase domain in complex with avapritinib derivative 4
8PQB ³	c-KIT kinase domain in complex with avapritinib derivative 8
8PQC ⁴	c-KIT kinase domain in complex with avapritinib derivative 9
8PQD ⁵	c-KIT kinase domain in complex with avapritinib derivative 10
8PQE ⁶	c-KIT kinase domain in complex with avapritinib derivative 11
8PQF ⁷	c-KIT kinase domain in complex with avapritinib derivative 12
8PQG ⁸	c-KIT T670I mutated kinase domain in complex with avapritinib
8PQH ⁹	PDGFRA T674I mutant kinase domain in complex with avapritinib
8PQI ¹⁰	PDGFRA T674I mutant kinase domain in complex with avapritinib derivative 9
8PQJ ¹¹	PDGFRA wild-type kinase domain
8PQK ¹²	apo crystal structure of PDGFRA-T674I kinase domain
8S13 ¹³	apo c-KIT-wt kinase domain
8S14 ¹⁴	c-KIT kinase domain in complex with sunitinib
8S15 ¹⁵	c-KIT kinase domain in complex with nintedanib
8S16 ¹⁶	c-KIT kinase domain in complex with imatinib
8S17 ¹⁷	c-KIT kinase domain in complex with ponatinib
8S18 ¹⁸	c-KIT kinase domain in complex with S116836
8S19 ¹⁹	c-KIT kinase domain in complex with staurosporine
8S1A ²⁰	c-KIT kinase domain in complex with crenolanib
8S1B ²¹	c-KIT kinase domain in complex with IDRX-42 via soaking

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
AML	Akute myeloische Leukämie (engl.: <i>acute myeloid leukemia</i>)
BBB	<i>blood brain barrier</i> (Blut-Hirn-Schranke)
BCR-ABL	<i>breakpoint cluster region-Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
CML	Chronische myeloische Leukämie (engl.: <i>chronic myeloid leukemia</i>)
COMAS	<i>Compound Management and Screening Center</i> (MPI Dortmund)
c-SRC	<i>cellular sarcoma</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPF	Dortmund <i>Protein Facility</i>
ECD	Extrazelluläre Domäne, engl.: <i>extracellular domain</i>
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinase</i>
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
FBS	Fetales Kälberserum (engl.: <i>fetal bovine serum</i>)
FDA	<i>U.S. Food and Drug Administration</i>
FLT3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
GDP/GTP	Guanosindi- bzw. triphosphat
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HTRF	<i>homogeneous time-resolved fluorescence</i>
HTS	Hochdurchsatz-Screening (engl.: <i>high-throughput screening</i>)
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
JMD	Juxtamembrandomäne (engl.: <i>juxtamembrane domain</i>)
KIT	Humaner Stammzellfaktor-Rezeptor (engl.: <i>human stem cell factor receptor</i>)
LB	<i>lysogeny broth</i>
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MR	Molekularer Ersatz
NRTK	Nicht-Rezeptortyrosinkinase
NSCLC	Nicht-kleinzelliger Lungenkrebs (engl.: <i>non small cell lung cancer</i>)
NTA	Nitrilotriessigsäure (engl.: <i>nitrile triacetate</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PDGFRA/B	<i>platelet-derived growth factor receptor alpha/beta</i>
PSI	Paul-Scherrer-Institut
PTM	Posttranslationale Modifikation
Ras	<i>rat sarcoma</i>
Raf	<i>rat fibrosarcoma</i>
RTK	Rezeptortyrosinkinase
SAR	Struktur-Aktivitäts-Beziehung (engl. <i>structure-activity relationship</i>)
SCF	Stammzellfaktor (engl.: <i>stem cell factor</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gelelektrophorese (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis</i>)
SEC	Größenausschluss-Chromatographie (engl.: <i>size exclusion chromatography</i>)
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SLS	<i>Swiss Light Source</i>
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression medium</i>
SR	Scharnierregion (engl.: <i>hinge</i>)
TB	<i>terrific broth</i>

TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
TSA	<i>thermal shift assay</i>
TMD	Transmembrandomäne (engl.: <i>transmembrane domain</i>)
VEGFR	Vaskulär endothelialer Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl.: <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>)
wt	Wildtyp
WTZ	Westdeutsches Tumorzentrum

Inhaltsverzeichnis

Publikationen & Patente	V
Kristallstrukturen	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Inhaltsverzeichnis	XI
Kurzfassung	1
Abstract	5
1 Einleitung	7
1.1 Proteinkinasen in der Präzisionsonkologie	8
1.2 Klasse III Rezeptortyrosinkinasen: KIT & PDGFRA	10
1.2.1 Proteinkinasen als Wirkstoffziele: Klassifizierung von Kinaseinhibitoren	14
1.3 Gastrointestinale Stromatumore: Klinische Relevanz von KIT & PDGFRA	16
1.4 Behandlungsstrategien in GIST	20
2 Motivation & Zielsetzung	25
3 Ergebnisse & Diskussion	27
3.1 Allgemeines über KIT & PDGFRA in GIST	27
3.2 Massenspektrometrische Analysen	28
3.3 Allgemeine Beschreibung des Biochemischen HTRF® TK-KinEASE Assay-Systems	30
3.4 Allgemeines über Strukturbiologische Untersuchungen	31
3.4.1 Konstruktdesign der PDGFRA-Kristallisationskonstrukte	33
3.4.2 Etablierung der Reinigungsprotokolle	34
3.4.3 Etablierung eines Kristallisationssystems für PDGFRA-wt	40
3.4.4 Etablierung eines Kristallisationssystems für PDGFRA-T674I	43
3.4.5 Konstruktdesign der KIT-Kristallisationskonstrukte	46
3.4.6 Etablierung der Reinigungsprotokolle	48
3.4.7 <i>Thermal Shift Assay</i> (TSA) mit KIT-wt & -T670I	53
3.4.8 Etablierung eines Kristallisationssystems für KIT-wt	55
3.4.9 Etablierung eines Kristallisationssystems für KIT-T670I	60
3.5 Biochemische & Strukturbiologische Untersuchungen von KIT & PDGFRA	62
3.5.1 Ligandenfreie Strukturanalyse von KIT & PDGFRA	62
3.5.2 Vergleich kommerziell verfügbarer Inhibitoren	65
3.5.3 Vergleich kommerziell verfügbarer Typ IIa-Inhibitoren	67
3.5.4 Vergleich kommerziell verfügbarer Typ IIb-Inhibitoren	84
3.5.5 Vergleich kommerziell verfügbarer Typ I- bzw. Typ I½-Inhibitoren	90

3.6	Struktur-basiertes Wirkstoffdesign.....	104
3.6.1	Profilierung Ripretinib-basierter Inhibitoren	105
3.6.2	Profilierung Ponatinib-basierter Inhibitoren	107
3.6.3	Profilierung NDI-1-basierter Derivate.....	119
3.6.4	Profilierung Avapritinib-basierter Derivate.....	124
3.7	Zusammenfassung & Ausblick.....	141
4	Literaturverzeichnis.....	149
5	Materialien & Methoden	157
5.1	Generelle Anmerkungen.....	157
5.1.1	Verwendete Geräte	157
5.1.2	Verwendete Verbrauchsmaterialien	158
5.1.3	Zelllinien & Bakterienstämme, Enzyme & Reagenzien	159
5.1.4	Verwendete Gene & Plasmide	160
5.2	Molekularbiologische Methoden	161
5.2.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	161
5.3	Aktivitätsbasiertes Assaysystem (KinEASE™)	162
5.3.1	HTRF® TK-KinEASE Assay-Beschreibung.....	162
5.3.2	Etablierung des HTRF® TK-KinEASE Systems.....	163
5.4	Zellkultur	165
5.4.1	Zellkultur der PDGFRA-Produkte in Sf9-Insektenzellen.....	165
5.4.2	Mikrobiologische Arbeiten für die Expression in <i>E. coli</i> -Zellen	168
5.5	Proteinreinigung der KIT- und PDGFRA-Proteine	170
5.5.1	Zellyse	170
5.5.2	Nickel-Affinitätschromatographie, Dialyse und Protease-Verdau.....	170
5.5.3	Reverse Ni-NTA-Affinitätschromatographie.....	171
5.5.4	Größenausschluss-Chromatographie.....	171
5.6	Analysemethoden	172
5.6.1	Natrium-Dodecylsulfat (SDS-)-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	172
5.6.2	Western Blot.....	172
5.6.3	Thermal Shift Assay (TSA).....	173
5.6.4	Massenspektrometrische (MS) Analysen.....	173
5.7	Proteinkristallisation.....	174
5.7.1	Probenvorbereitung.....	174
5.7.2	<i>Screening</i> -Experimente	174
5.7.3	Kristallisations- <i>Fine Screens</i>	175
5.7.4	Additiv- <i>Screen</i> für die Kristallisationsbedingungen von KIT-wt.....	175

5.7.5	<i>Seeding</i> -Experimente von KIT-wt.....	175
5.7.6	<i>Soaking</i> -Experimente.....	176
5.8	Röntgenstrukturanalyse.....	176
5.9	<i>Docking</i> -Studien.....	177
6	Anhang.....	179
6.1	Etablierung des HTRF® TK-KinEASE Assaysystems.....	179
6.1.1	Kinasetitration & Enzymkinetik.....	179
6.1.2	Ermittlung von Substrat- und ATP- K_M von KIT-wt.....	179
6.1.3	Ermittlung von Substrat- und ATP- K_M von PDGFRA-wt.....	180
6.1.4	Ermittlung von Substrat- und ATP- K_M von PDGFRA-G680R.....	180
6.1.5	Etablierung des HTRF®-Assaysystems für PDGFRA-D842V.....	181
6.1.6	Zusammenfassung der HTRF® TK KinEASE-Etablierung.....	182
6.2	Aminosäuresequenzen.....	183
6.2.1	Aminosäuresequenz von KIT-wt und KIT-T670I.....	183
6.2.2	Aminosäuresequenz des PDGFRA-wt und PDGFRA-T674I.....	184
6.2.3	Kristallisationskonstrukte von KIT- & PDGFRA-Mutanten.....	185
6.3	Proteinreinigung der KIT- & PDGFRA-Zielproteine.....	186
6.3.1	Reinigung von PDGFRA-wt.....	186
6.3.2	Reinigung von KIT-wt.....	189
6.4	Strukturbiologische Untersuchungen.....	191
6.4.1	Sequenzalignment verwandter Kinasen von KIT & PDGFRA.....	191
6.4.2	Strukturbiologische Untersuchungen.....	193
6.4.3	Kovalente Adressierung von KIT & PDGFRA.....	197
6.4.4	Avapritinib-Derivate.....	198
6.5	Ursprung und Genotyp verwendeter Zelllinien.....	201
6.6	Datenstatistik-Tabellen der gelösten Kristallstrukturen.....	202
	Danksagung.....	211
	Eidesstattliche Versicherung (Affidavit).....	215

Kurzfassung

Die Rezeptortyrosinkinase KIT und PDGFRA spielen eine essenzielle Rolle in einer Vielzahl von Signaltransduktionskaskaden, welche grundlegende Zellprozesse wie Proliferation und das Überleben der Zelle regulieren. Diese Signalwege werden von Liganden, die an die extrazelluläre Domäne binden, gesteuert, welche wiederum eine Rezeptor-Dimerisierung und intrazelluläre Aktivierung der katalytisch aktiven Kinasedomäne zur Folge haben. KIT und PDGFRA wurden in ~80 % bzw. in ~15 % der auftretenden Fälle von gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) als treibende Onkogene identifiziert, wobei Primärmutationen innerhalb der Rezeptoren eine Abhängigkeit von der entsprechenden Kinase und den nachgeschalteten Signalwegen induzieren. Die auftretenden Mutationen weisen zudem meist einen Liganden-unabhängigen Aktivierungsmechanismus auf, sodass die Kinasedomänen konstitutiv aktiviert vorliegen. GIST sind weitestgehend Chemotherapie- und Strahlentherapie-resistent und stellen deshalb seit Jahrzehnten eine schwer zu behandelnde Krebserkrankung mit schlechter Prognose für die Patienten dar. Seit Anfang der 2000er Jahre wird neben der Chemo- oder Strahlentherapie auch vermehrt die Präzisionsonkologie zur Behandlung von Krebserkrankungen angewendet. Durch die Identifizierung der treibenden Onkogene konnten speziell gegen das jeweilige Onkogen gerichtete Wirkstoffe entwickelt werden. Das Paradebeispiel hierfür stellt Imatinib dar, welches zur Inhibition der Fusionskinase BCR-ABL und somit für die Behandlung chronisch myeloischer Leukämie (CML, engl.: *chronic myeloid leukemia*) entwickelt wurde. In den darauffolgenden Jahren konnte ebenfalls eine Wirkung von Imatinib bei der Behandlung von GIST nachgewiesen werden. Dieses *repurposing* von bereits für andere Indikationen zugelassenen Wirkstoffen wurde für die Behandlung von GIST eine immer wichtigere Therapiestrategie, da bis zum Jahre 2020 kein Wirkstoff für die selektive Inhibition von KIT und PDGFRA entwickelt und zugelassen worden war. Eine große Problematik stellen unter anderem auftretende Resistenzmutationen dar, die zur Unwirksamkeit der Inhibitoren beim Patienten führen und somit ein Fortschreiten der Krankheit hervorrufen.

Vor dem Hintergrund der klinischen Herausforderungen im Umgang mit GIST, insbesondere aufgrund der Entstehung von Resistenzmutationen gegenüber den zugelassenen Inhibitoren, richtet sich der Fokus dieser Arbeit auf die Evaluierung von niedermolekularen Liganden der relevanten Onkogene KIT und PDGFRA in biochemischen, biophysikalischen und strukturellen Systemen. Hierfür wurden fokussierte Substanzbibliotheken, welche auf unterschiedlichen Grundgerüsten basieren, hinsichtlich ihrer inhibitorischen Potenz

gegenüber den Zielproteinen KIT und PDGFRA profiliert und Struktur-Aktivitäts-Beziehungen abgeleitet.

Als große Herausforderung stellte sich die Etablierung von Expressions-, Reinigungs- und Kristallisationssystemen für klinisch relevante Mutationen heraus, wobei sich bereits die Expression der Zielproteine als problematisch erwies. Deshalb wurden zusätzlich zu den bereits vorhandenen Konstrukten 19 weitere Genkonstrukte generiert, welche in der Zukunft die erfolgreiche Etablierung der genannten Systeme ermöglichen könnten. Der Großteil der hier generierten Konstrukte befindet sich zum aktuellen Zeitpunkt in einem vorläufigen Stadium und ist Gegenteil aktueller Arbeiten in der Arbeitsgruppe.

Weiter wurden die Wildtyp-Proteine und die Türsteher-mutierten Varianten von KIT und PDGFRA erfolgreich heterolog in Bakterien- bzw. Insektenzellen exprimiert und säulenchromatographisch gereinigt.

Die Identifizierung eines Cysteins in der *backpocket* und eines Cysteins in der ATP-Bindetasche der Kinasedomänen führte zur Etablierung einer fokussierten Bibliothek *warhead*-tragender Inhibitoren. Die gereinigten Proteine konnten somit für die Untersuchung der kovalent-modifizierenden Eigenschaften dieser Liganden in massenspektrometrischen Vermessungen verwendet, sowie für strukturelle Untersuchungen mittels Röntgenkristallographie eingesetzt werden. Hierdurch konnten Substanzen identifiziert werden, die nachweislich irreversibel an die Zielproteine KIT-wt und PDGFRA-T674I binden, und somit ein neuartiges Adressierungskonzept der Kinasen etabliert und validiert werden.

Durch strukturelle Vergleiche der verschiedenen Inhibitortypen gebunden an ihre Zielproteine konnten Schlussfolgerungen für weitere Struktur-basierte Designstrategien neuer Inhibitoren erarbeitet werden. Initiale strukturelle Untersuchungen halfen, unterschiedliche Kinasekonformationen zu identifizieren und zugrundeliegende Aktivierungsmechanismen zu verstehen. Darüber hinaus wurde für den erst 2020 zugelassenen Wirkstoff Avapritinib (Ayvakit®) der detaillierte Bindungsmodus in KIT-wt, KIT-T670I und PDGFRA-T674I aufgeklärt und eine neue Subtasche in den Kinasen identifiziert, welche essenziell für die potente Bindung des Liganden ist. Insgesamt sind 43 Kristallstrukturen entstanden, wovon 32 Strukturen zum aktuellen Zeitpunkt finalisiert wurden. Von diesen finalen Strukturen wurden bereits 21 in der *Protein Data Bank* (PDB) veröffentlicht bzw. deponiert. Weitere 11 der insgesamt 43 Kristallstrukturen sind Gegenstand aktueller Analysen auf Geheimhaltungsbasis und werden deshalb im Rahmen dieser Arbeit nicht diskutiert.

In Kombination mit den erhaltenen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen legten die Kristallstrukturen einen Grundstein für das Design optimierter Liganden zur Adressierung von KIT und PDGFRA im Kontext von GIST. Zusammen mit der Aufklärung von auftretenden Resistenzmutationen können entscheidende Informationen für die Weiterentwicklung von Therapieansätzen erhalten werden. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ermöglichen also ein tieferes Verständnis der molekularen Grundlagen von GIST.

Abstract

The receptor tyrosine kinases KIT and PDGFRA play essential roles in a variety of signal transduction cascades that regulate fundamental cellular processes such as proliferation and cell survival. These signaling pathways are controlled by ligands that bind to the extracellular domain, resulting in receptor dimerization and intracellular activation of the catalytically active kinase domain. KIT and PDGFRA have been identified as driving oncogenes in ~80% and ~15% of gastrointestinal stromal tumor (GIST) cases, respectively, with primary mutations within the receptors inducing dependence on the corresponding kinase and downstream signaling pathways. In addition, the mutations that occur tend to mediate a ligand-independent activation mechanism, resulting in constitutive activation of the kinase domains. GISTs are largely resistant to chemotherapy and radiotherapy and have been a difficult-to-treat cancer with a poor prognosis for patients for decades. Since the early 2000s, precision oncology has increasingly been used to treat cancer alongside chemotherapy and radiotherapy. By identifying the driving oncogenes, it has been possible to develop drugs that specifically target the oncogene of interest. The prime example of this is imatinib, which was developed to inhibit the BCR-ABL fusion kinase for the treatment of chronic myeloid leukemia (CML). In the following years, imatinib was also shown to be effective in the treatment of GIST. This repurposing of agents already approved for other indications became an increasingly important therapeutic strategy for the treatment of GIST, as no agent for the selective inhibition of KIT and PDGFRA had been developed and approved by 2020. A major concern is the emergence of resistance mutations that render inhibitors ineffective in patients, leading to disease progression.

Against the background of the clinical challenges in the treatment of GIST, in particular due to the emergence of resistance mutations against the approved inhibitors, the focus of this work is the evaluation of small molecule ligands of the relevant oncogenes KIT and PDGFRA in biochemical, biophysical and structural biological systems. For this purpose, focused compound libraries based on different scaffolds were profiled with respect to their inhibitory potency against the target proteins KIT and PDGFRA and structure-activity relationships were derived.

The establishment of expression, purification and crystallization systems for clinically relevant mutations proved to be a major challenge, as the expression of the target proteins already proved to be problematic. Therefore, in addition to the existing constructs, 19 additional gene constructs were generated that may allow the successful establishment of

these systems in the future. The majority of these constructs are currently at a preliminary stage and are the subject of the current work in the group.

In addition, the wild-type proteins and the gatekeeper-mutated variants of KIT and PDGFRA were successfully heterologously expressed in bacterial and insect cells, respectively, and purified by column chromatography.

The identification of a cysteine in the backpocket and a cysteine in the ATP-binding pocket of the kinase domains led to the establishment of a focused library of warhead-bearing inhibitors. The purified proteins were then used to investigate the covalent modifying properties of these ligands by mass spectrometry and structural biology studies using X-ray crystallography. As a result, compounds were identified that were shown to bind irreversibly to the target proteins KIT-wt and PDGFRA-T674I, thereby establishing and validating a novel kinase targeting concept.

Structural comparisons of the different inhibitor types bound to their target proteins allowed conclusions to be drawn for further structure-based design strategies for new inhibitors. Initial structural biology studies helped to identify different kinase conformations and to understand the underlying activation mechanisms. In addition, the detailed binding mode of the drug avapritinib (Ayvakit®), which was only approved in 2020, bound to KIT-wt, KIT-T670I and PDGFRA-T674I was elucidated and a new sub-pocket in the kinases essential for potent ligand binding was identified. A total of 43 crystal structures were generated, of which 32 have been finalized to date. Of these final structures, 21 have already been published or deposited in the Protein Data Bank (PDB). A further 11 of the 43 crystal structures are the subject of ongoing analyses on a confidential basis and are therefore not discussed in this thesis.

Together with the structure-activity relationships obtained, the crystal structures provided the basis for the design of optimized ligands for targeting KIT and PDGFRA in the context of GIST. Together with the elucidation of resistance mutations, this will again provide crucial information for the further development of therapeutic approaches. Thus, the results presented in this study provide a deeper understanding of the molecular basis of GIST.

1 Einleitung

Krebs stellt neben kardiovaskulären Erkrankungen eine der häufigsten Todesursachen weltweit dar. Laut Zahlen der WHO starben im Jahre 2020 fast 10 Millionen Menschen an einer Krebserkrankung, wobei Brust-, Lungen-, Kolon- und Rectum- sowie Prostata-Krebs die häufigsten Krebsarten repräsentieren.^[1] Die Ursachen für Krebserkrankungen lassen sich auf Veränderungen der Erbinformation zurückführen, weshalb Krebs als Erkrankung des Genoms klassifiziert werden kann.^[2] Die Ursachen für Krebs sind vielfältig: Alkoholmissbrauch, Übergewicht, ungesunde Lebensweisen, aber vor allem auch eine genetische Prädisposition.^[3] Aber auch das sich durch den medizinischen Fortschritt immer weiter erhöhende Lebensalter ist eine Ursache steigender Inzidenzen, wodurch es vor allem zu ineffizienteren Reparaturmechanismen in Zellen kommen kann und diese dadurch entarten können. Bereits im Jahr 2000 formulierten DOUGLAS HANAHAN und ROBERT A. WEINBERG die *hallmarks of cancer*, welche grundlegende Charakteristika der Krebsentwicklung beschreiben sollten (Abbildung 1).^[4,5]

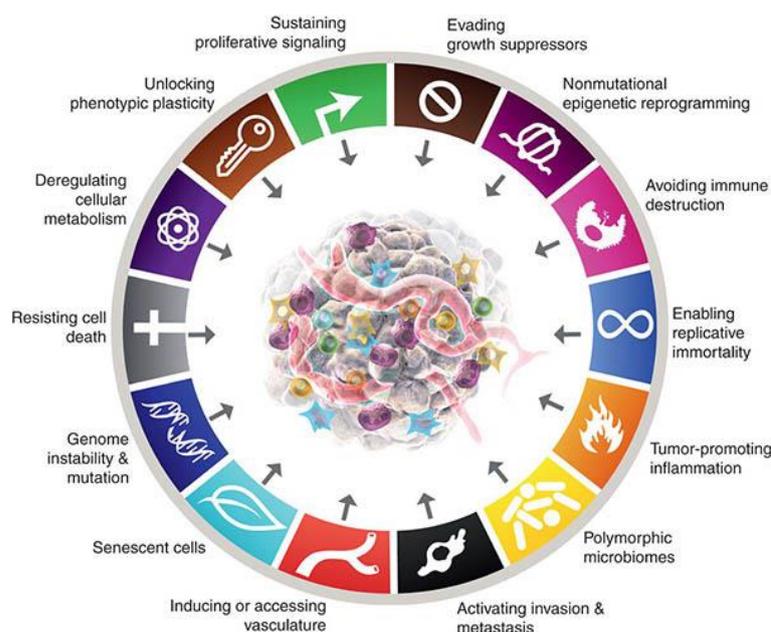


Abbildung 1: Grafische Übersicht der *hallmarks of cancer* nach HANAHAN, veröffentlicht 2022,^[5] aufbauend auf vorherigen Publikationen von HANAHAN und WEINBERG. Repräsentiert sind die Eigenschaften, welche Krebserkrankungen aufweisen, um eine normale Regulation des Zellebens zu umgehen.

Die ersten sechs Eigenschaften beinhalteten unterschiedliche Charakteristika hinsichtlich Wachstums- und Reproduktionssignalen, Tumorausbreitung und die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen.^[4,5] Durch den immerwährenden Fortschritt in der Krebsforschung konnten im Jahr 2011 vier weitere *hallmarks* hinzugefügt werden, welche ebenfalls von HANAHAN und WEINBERG in *Cell* veröffentlicht wurden. Diese Erweiterung bezog zwei weitere Merkmale zum Metabolismus und zur Umgehung des Immunsystems mit ein.

Weiter wurden zwei Krebs-fördernde Merkmale hinzugefügt, welche die genomische Instabilität und Entzündungsentwicklung betrachteten.^[6] Eine dritte Ausgabe im Jahr 2022, veröffentlicht von HANAHAN in *Cancer Discovery*, erweiterte die *hallmarks* ein weiteres Mal um vier Merkmale, welche weitere Charakteristika der Mikroumgebung und der (epi-)genetischen Flexibilität von Krebszellen mit einbezogen.^[5] Zur Behandlung ist die korrekte Diagnosestellung essenziell, da nur dann die richtige Therapieform ausgewählt werden kann. Die häufigste Erst-Therapie beinhaltet die Resektion des Tumorgewebes, gefolgt von anschließender Chemo- oder Strahlentherapie, aber auch die seit ca. Anfang der 2000er Jahre immer mehr Beachtung findende Behandlung mittels Präzisionsmedizin.^[7, 8] Dabei werden Patienten hinsichtlich ihrer genetischen Läsionen in Gruppen unterteilt, woraufhin eine spezifische Therapieform ausgewählt und durchgeführt werden kann. Die hier identifizierten Läsionen geben demnach die richtige Krebstherapie für den richtigen Patienten zum richtigen Zeitpunkt vor.^[9] Mutationen in Onkogenen können zu konstitutiver Aktivität führen und somit zu einem zentralen Kontrollpunkt für Progression werden, während Mutationen in Tumorsuppressor-Genen einen gegenteiligen Effekt, die Deaktivierung von Kontrollmechanismen, in der Zelle hervorrufen.^[9, 10] Als erstes Beispiel für Präzisionsmedizin auf dem Gebiet der Onkologie (auch Präzisionsonkologie genannt) kann hier die Behandlung chronisch myeloischer Leukämie (CML, engl.: *chronic myeloid leukemia*) mit dem *small molecule* Imatinib (Gleevec™/Glivec®, Novartis AG, Abbildung 9) aufgebracht werden, welches spezifisch die durch Chromosomentranslokation hervorgerufene Fusionskinase BCR-ABL bindet und daraufhin dessen Funktion als Phosphorylgruppenüberträger unterdrückt. Als erster Tyrosinkinaseinhibitor (TKI) wurde Imatinib 2001 durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zugelassen und legte somit den Grundstein für die Präzisionsonkologie.^[11]

1.1 Proteinkinasen in der Präzisionsonkologie

Die Genfamilie der humanen Proteinkinasen beinhaltet 518 Mitglieder und macht ca. 1,7 % des humanen Genoms aus. Hinsichtlich ihrer Substratspezifität können sie in Serin/Threonin- und Tyrosin-Kinasen (STK bzw. TK) unterteilt werden. Proteinkinasen spielen eine wichtige Rolle in nahezu allen Bereichen zellulärer Funktionen wie z. B. der Zellteilung, Transkription, Zellmigration oder auch beim programmierten Zelltod (Apoptose).^[12] Durch die Übertragung der γ -Phosphorylgruppe von Adenosin-Triphosphat (ATP), welches durch Mg^{2+} koordiniert wird, auf ein Proteinsubstrat, können nachgeschaltete Proteine aktiviert oder deaktiviert werden. Dies resultiert in einem An- oder Abschalten biologischer Funktionen.^[13] Die 90 bekannten Tyrosin-Kinasen können weiter in 58 Rezeptortyrosinkinasen (RTKs),^[14] und 32 Nicht-Rezeptortyrosinkinasen (NRTKs) unterteilt werden, wobei die RTKs durch

1.2 Klasse III Rezeptortyrosinkinasen: KIT & PDGFRA

Eine Unterklasse der RTKs ist die Klasse III, welcher KIT (SCFR, Stammzellfaktor-Rezeptor, engl.: *stem cell factor receptor*), CSF1R (engl.: *colony-stimulating factor 1 receptor*), FLT3 (engl.: *fms-related tyrosine kinase 3*) und PDGFRA/B (engl.: *platelet-derived growth factor receptor α/β*) zugeordnet werden können.^[18] Die ECD dieser Rezeptoren besteht aus fünf Immunglobulin (Ig)-ähnlichen Untereinheiten, aufgeteilt in D1 bis D5.^[19] Diese ECD ist über eine TMD mit dem intrazellulären Teil des Rezeptors verbunden, wobei der KD eine regulatorische Juxtamembrandomäne (JMD, engl.: *juxtamembrane domain*) vorausgeht (Abbildung 3A).^[20] Die katalytische Domäne kann weiter in eine N-terminale und eine C-terminale Subdomäne unterteilt werden, welche durch die Scharnierregion (SR, engl.: *hinge region*) miteinander verbunden sind (Abbildung 3B). Am Anfang dieser Scharnierregion befindet sich die Türsteher-Aminosäure (engl.: *gatekeeper*), welche sowohl den Zugang zur ATP-Bindetasche für ATP, aber auch andere Liganden sowie zur dahinter liegenden hydrophoben Tasche (engl.: *backpocket*) reguliert.^[21, 22] Außerdem weist die katalytische Domäne die folgenden regulatorischen Elemente auf: die α C-Helix und Gly-reiche Schleife in der N-terminalen Subdomäne und die sich in der C-terminalen Subdomäne befindliche Aktivierungsschleife (AL, engl.: *activation loop*), welche wiederum das regulatorische Asp-Phe-Gly (DFG)-Motiv enthält. Eine weitere Besonderheit der RTKs der Klasse III besteht aus der sogenannten Kinase-Insertionsschleife (KID, engl.: *kinase insert domain*), welche mit 68-97 Aminosäuren im Vergleich zu anderen Kinasen eine außergewöhnliche Länge haben kann und für die Rekrutierung von Interaktionspartnern an phosphorylierte Aminosäure-Seitenketten innerhalb der KID wichtig ist.^[23, 24] Aufgrund der Größe der KID wird in der Literatur die Kinasedomäne dieser RTK-Klasse oftmals in Tyrosinkinasedomäne 1 und 2 unterteilt, wobei es sich lediglich um eine durch die KID verbundene Domäne handelt.^[20]

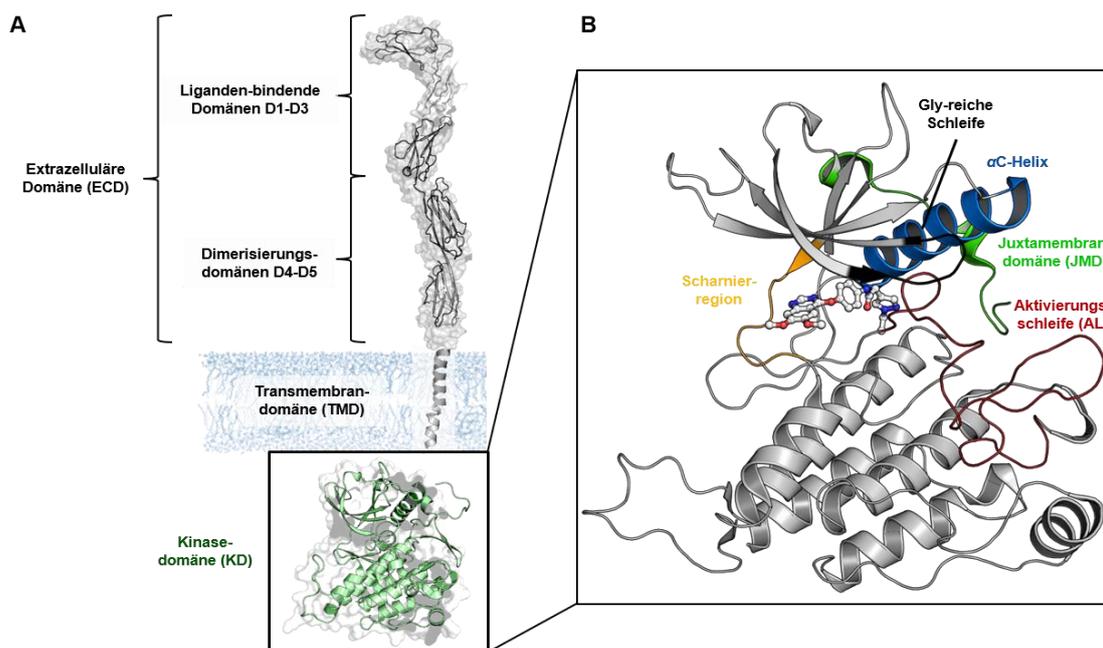


Abbildung 3: Schematische Darstellung der RTKs Klasse III. **A:** Schematische Darstellung der vollständigen Rezeptortyrosinkinase KIT. Die extrazelluläre Domäne (ECD, PDB-ID: 2E9W) besteht aus den Untereinheiten D1-D5, welche über die Transmembrandomäne (TMD) mit der Juxtamembrandomäne (JMD) gefolgt von der Kinasedomäne (KD, PDB-ID: 6GQK) verbunden ist. **B:** Graphische Darstellung der katalytischen Kinasedomäne (PDB-ID: 6GQK). Diese enthält unterschiedliche regulatorische Elemente: Juxtamembrandomäne (grün), α C-Helix (blau), Gly-reiche Schleife (schwarz), Scharnierregion (orange), Aktivierungsschleife (rot).

Rezeptortyrosinkinasen der Klasse III unterliegen, wie andere RTKs auch, einem präzise regulierten Aktivierungsmechanismus. In ihrer nativen Form liegen diese RTKs meist als freie Monomere in der Zellmembran vor.^[25] Der intrazelluläre Teil des Rezeptors wird in diesem Zustand durch die JMD auto-inhibiert. Das bedeutet, dass die JMD in die *backpocket* der KD gefaltet ist und somit die Aktivierungsschleife daran hindert, in ihre aktive Konformation überzugehen. Das Phenylalanin des DFG-Motivs ragt in dieser Konformation in die ATP-Bindetasche hinein, wodurch die Bindung von ATP verhindert wird (Abbildung 4I). Durch Ligandenbindung an die Domänen D1-D3 der ECD, z. B. durch den Stammzellfaktor (SCF, engl.: *stem cell factor*) an KIT oder den *platelet-derived growth factor* (PDGF) an PDGFRA, wird eine Rezeptor-Dimerisierung initiiert, welche eine globale Umorientierung der RTKs hervorruft. Dabei kommt es zu homotypischen Interaktionen zwischen D4-D5 der ECD mit den entsprechenden Domänen des zweiten Rezeptors, was zu einem 2:2-KIT-SCF-Komplex führt.^[26-28]

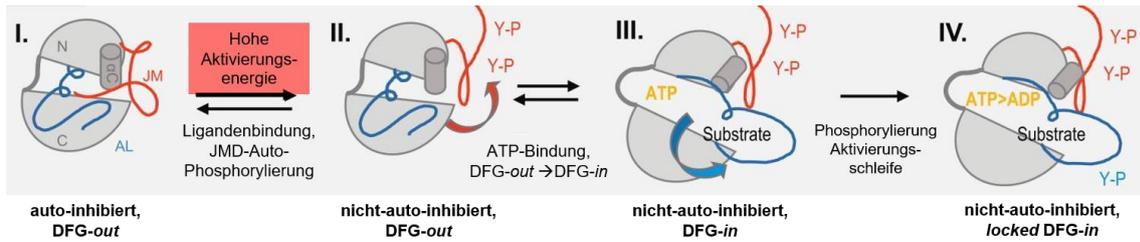


Abbildung 4: Aktivierungsmechanismus der Kinasedomänen von RTKs Klasse III. Die Aktivierung erfolgt in vier aufeinander folgenden Schritten von einer auto-inhibierten DFG-out-Konformation, über eine nicht-auto-inhibierte DFG-out-Konformation zu einer nicht-auto-inhibierten DFG-in bzw. einer nicht-auto-inhibierten *locked* DFG-in-Konformation der Kinasedomäne.^[25]

Die Dimerisierung bewirkt intrazellulär eine *trans*-Auto-Phosphorylierung, zunächst von Tyrosin-Resten in der Juxtamembrandomäne (Abbildung 4II), anschließend in der Kinase-Insertionsschleife und dann in der Aktivierungsschleife,^[29] wobei das Konformationsgleichgewicht in Richtung einer aktiven DFG-in-Konformation verschoben wird (Abbildung 4III-IV). Im Zuge dieses Aktivierungsmechanismus löst sich die JMD aus der *backpocket* und nimmt eine von dieser Bindetasche entfernte Konformation ein, während die Aktivierungsschleife eine um ca. 180° gedrehte Konformation in wiederum diese *backpocket* einnimmt (Abbildung 4III/IV). Durch diese Konformationsänderung wird ebenfalls das DFG-Motiv gedreht, sodass das Aspartat in die ATP-Bindetasche hineinragt, was folglich die ATP-Bindung ermöglicht. Das Phenylalanin des Motivs ragt dann in einen hydrophoben Bereich der *backpocket* hinein und stabilisiert somit weiter die aktive Kinasekonformation durch Ausbildung des sogenannten *R-spine*.^[30] Dieses flexible Rückgrat wird in KIT aus den Aminosäuren Leu644, Leu656, His790 und Phe811 (Met648, Leu660, His816 und Phe837 in PDGFRA) gebildet und stellt ein weiteres Merkmal aktiver Kinasekonformationen dar, wobei die beiden Subdomänen innerhalb der Kinase miteinander verbunden werden. Weiterhin wird während der Aktivierung die α C-Helix zur Bindetasche hingedreht, was die ATP-Affinität der Kinasedomäne weiter erhöht. Die α C-Helix besitzt ein konserviertes Glutamat (Glu640 in KIT, Glu644 in PDGFRA), welches in der DFG-in-Konformation der Kinase eine Salzbrücke mit dem katalytischen Lysin (Lys623 in KIT, Lys627 in PDGFRA) eingeht.^[31] Auch die Gly-reiche Schleife erfährt eine Umorientierung näher zur ATP-Bindetasche hin und koordiniert so die α - und β -Phosphatgruppen des gebundenen ATP, wodurch das γ -Phosphat für den Katalysemechanismus korrekt orientiert wird. Durch den beschriebenen Aktivierungsmechanismus kommt es *downstream* zur Weiterleitung von unterschiedlichen Signalen bis in den Zellkern, was wiederum die Transkription bestimmter Gene hervorruft, welche daraufhin zu Proliferation, Differenzierung oder auch anti-apoptotischen Signalen führen können. Hervorzuheben sind hier sowohl die Signalvermittlung über den PI3K-AKT-mTOR-Signalweg, als auch über den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg (Abbildung 5).^[32]

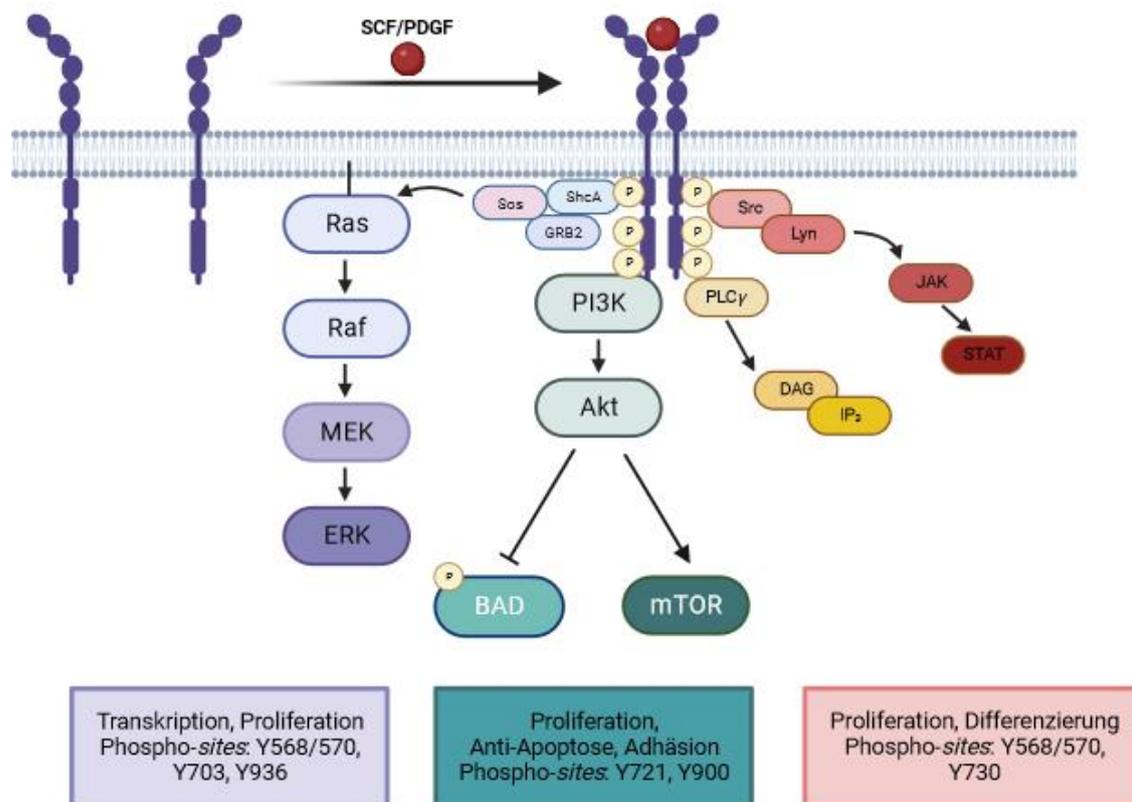


Abbildung 5: Schematische Darstellung der durch KIT aktivierten Signalwege. P: Phosphatgruppen, Lila: Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg; GRB2: *growth factor receptor-bound protein*, Sos: *son of sevenless*, ShcA: SHC-transformierendes Protein, Ras: *rat sarcoma*, Raf: *rat fibrosarcoma*, MEK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase, ERK: *extracellular-signal regulated kinase*, Grün: PI3K-AKT-mTOR-Signalweg; PI3K: Phosphoinositid-3-Kinase, AKT: Proteinkinase B, mTOR: *mechanistic target of rapamycin*, BAD: *Bcl-2-Antagonist-of-cell-death*, Gelb/Rot: SRC-JAK-STAT-Signalweg; PLC γ : Phosphoinositid-Phospholipase C, DAG: Diacylglycerin, IP $_3$: Inositoltriphosphat, JAK: Januskinase, STAT: Signal-Transduktor und Transkriptions-Aktivator. Angegeben sind die entsprechenden phosphorylierten Tyrosin-Seitenketten von KIT.^[32, 33] Abbildung erstellt mit Biorender.com.

Im Falle des PI3K-AKT-mTOR-Signalweges werden durch Rekrutierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), der Serin/Threonin-Kinase Proteinkinase B (AKT) und des *mechanistic target of rapamycin* (mTOR) anti-apoptotische Zellprozesse aktiviert, wobei durch die Aktivierung von AKT außerdem pro-apoptotische Prozesse durch Inhibierung des *Bcl-2-antagonist-of-cell-death* (BAD) unterbunden werden. Weiterhin hat die Aktivierung von KIT und PDGFRA Einfluss auf den SRC-JAK-STAT-Signalweg, wobei schlussendlich ein Proliferations- und Differenzierungssignal in der Zelle initiiert wird. Jedoch scheint die Januskinase (JAK)-abhängige Aktivierung von Signal-Transduktor und Transkriptions-Aktivator (STAT)-Proteinen keine entscheidende Rolle auf das Überleben oder die Proliferation bestimmter KIT/PDGFRA-abhängiger Zelllinien zu haben.^[34] Aufgrund von Mutationen in den beschriebenen RTKs kann es zur Dysregulation und darauffolgend zur Entartung von kontrollierten Zellprozessen kommen.

Der Grund dafür ist eine konstitutive Aktivität der Proteine, welche häufig durch eine Liganden-unabhängige Aktivierung hervorgerufen wird und zu Krebserkrankungen wie z. B. gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) führen kann.^[32, 35-38]

1.2.1 Proteinkinasen als Wirkstoffziele: Klassifizierung von Kinaseinhibitoren

Die biologische Funktion von Proteinkinasen kann durch Kinaseinhibitoren unterbunden werden, wobei diese meist kompetitiv zu ATP im aktiven Zentrum der Kinasedomäne binden. Seit der Zulassung von Imatinib wurden eine Reihe weiterer Inhibitoren zur Behandlung unterschiedlicher Erkrankungen wie z. B. der rheumatoiden Arthritis oder der pulmonaren Fibrose, zugelassen, wobei die meisten Zulassungen im Bereich der Krebstherapie erfolgten. Dabei wird ausgenutzt, dass die Kinasedomänen trotz hoher Konservierung untereinander feine Unterschiede in der Bindetasche aufweisen, wodurch die gewünschte Kinase-Selektivität erlangt werden kann. Da Inhibitoren an unterschiedliche Konformationen der Proteinkinasen binden können, werden die Inhibitoren entsprechend ihrer Bindungsmodi in verschiedene Typen unterteilt, dessen Klassifizierung immer wieder aktualisiert, erweitert und zusammenfassend von ROBERT ROSKOSKI JR. veröffentlicht wurde.^[13, 39, 40] Basierend auf einer Vielzahl von Daten wurden die *small molecule* Proteinkinaseinhibitoren in sieben Hauptgruppen aufgeteilt, welche reversibel (Typ I, I½, II, III, IV, V) und irreversibel an das Zielprotein bindende Inhibitoren (Typ VI) umfassen (Abbildung 6). Typ I½- und Typ II-Inhibitoren wurden weiter in Typen a und b untergliedert, welche die Besetzung der *backpocket* (a) oder das Aussparen der *backpocket* (b) beschreiben. Typ I-Inhibitoren binden neben der ATP-Bindetasche ebenfalls die Lösungsmittel-exponierte Tasche der Kinasedomäne, während sich das Protein in der aktiven Konformation befindet. Historisch gesehen wurde in früheren Publikationen jedoch nicht genauer definiert, welche Konformation von Typ I-Inhibitoren gebunden werden, weshalb diese ein breiteres Spektrum von Kinasezuständen abdecken können.^[13, 41] Typ II-Inhibitoren hingegen binden an eine inaktive DFG-*out*-Konformation. Die Typen III und IV werden als allosterische Inhibitoren bezeichnet und sind durch die Bindung des Inhibitors in einer Tasche entweder direkt neben der ATP-Bindestelle (III) oder aber weit entfernt von dieser (IV) gekennzeichnet. Typ V-Inhibitoren weisen mit Bindung an zwei unterschiedliche Bereiche der Kinasedomäne ein bivalentes Verhalten auf.^[42] Im Gegensatz zu den Typen I-V binden Inhibitoren des Typs VI kovalent an ihre Zielproteine und sind somit irreversibel an diese gebunden.^[39, 40]

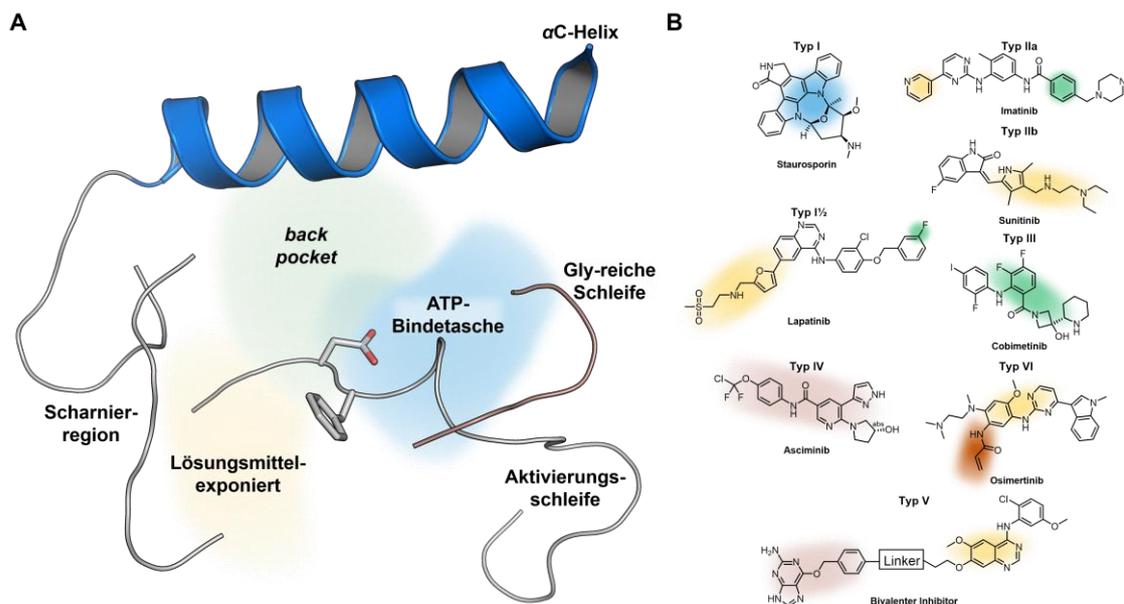


Abbildung 6: Schematische Darstellung der verschiedenen Inhibitortypen und der von ihnen adressierten Bindetaschen innerhalb der Kinasedomäne. A: Darstellung der Kinasedomäne mit regulatorischen Elementen, lokalisiert um die ATP-Bindetasche. **B:** Einteilung der Inhibitoren nach Typen I-VI. Farblich kodiert sind die Elemente, welche in den unterschiedlichen Bindetaschen der Kinasedomäne binden. Hervorzuheben sind die Typen IV und V,^[43] welche Bindetaschen entfernt von der ATP-Bindetasche binden (lila) und der Typ VI Inhibitor Osimertinib, welcher eine reaktive Gruppe zur kovalenten Modifizierung des Zielproteins beinhaltet (braun). Zur Orientierung wurden folgende PDB-IDs verwendet: 1XBC, 3BBT, 1T46, 3G0E, 7M0V, 8SSN, 6JWL.

1.3 Gastrointestinale Stromatumore: Klinische Relevanz von KIT & PDGFRA

Gastrointestinale Stromatumore (GIST) sind mit einer Inzidenz von 10-15 Neuerkrankungen je 1 Millionen Menschen im Jahr die häufigste Sarkomerkkrankung, wobei sie unter diesen ca. 20 % der Erkrankungen ausmachen und Männer und Frauen gleichermaßen betroffen sind.^[44-46] Am häufigsten treten diese Tumore im Magen (50-60 %), im Dünndarm (20-30 %) und im Enddarm bzw. im Rektum (5-10 %) auf.^[44] Ihren Ursprung haben GIST in den interstitiellen Zellen von Cajal, welche für die Koordination der peristaltischen Aktivität des Magen-Darm-Traktes verantwortlich sind.^[47] Die Diagnose von GIST erfolgt häufig über eine immunohistologische Färbung für KIT (CD117).^[48] Die häufigste primäre Therapieform ist die Tumorresektion, wobei bei etwa 50 % der Patienten bereits bei Diagnose eingetretene Metastasenbildung beobachtet werden kann,^[49] was eine vollständige Resektion des Tumors unmöglich macht. Ein weiteres Problem stellt die intrinsische Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie dar, wobei die Ursachen hierfür bisher nicht abschließend geklärt sind.^[50] Die unter diesen Umständen mit GIST diagnostizierten Patienten waren viele Jahre mit schlechten Prognosen und einer kurzen Überlebensdauer konfrontiert. Durch die Entschlüsselung des menschlichen Genoms,^[51] und der damit einhergehenden Entschlüsselung der genetischen Grundlage von Onkogenen konnten jedoch KIT und PDGFRA mit jeweils ~80 % bzw. ~15 % als treibende Onkogene in GIST identifiziert werden.^[52-54] Bei ca. 5 % der Patienten kann keine Expression von KIT und PDGFRA nachgewiesen werden, weshalb diese umgangssprachlich als Wildtyp-GIST bezeichnet werden, wobei die Bezeichnung als nicht-KIT/PDGFRA-mutierte GIST akkurater ist.^[52] Diese GIST weisen entweder ein Fehlen des Succinat-Dehydrogenase-Komplexes (*SDH-deficient*), aktivierende Mutationen in der B-Isoform von *rat fibrosarcoma* (BRAF) oder *loss-of-function* Mutationen im Neurofibromatose-1-Gen (NF-1) auf.^[54-56] Wie bereits in Kapitel 1.2 beschrieben wurde, können die primär treibenden Onkogene KIT und PDGFRA der Klasse III Rezeptortyrosinkinasen zugeordnet werden, welche einer hohen intrinsischen Regulierung und einem Aktivierungsmechanismus mittels extrazellulärer Bindung von Wachstumsfaktoren unterliegen.^[57] In GIST treten Primärmutationen zumeist in Exon 9 und 11 in KIT,^[58-60] bzw. in Exon 12 und 18 in PDGFRA auf.^[61-63] Dabei lassen sich die Mutationen weiter in Deletionen, Insertionen, Substitutionen oder auch Deletions-Insertions-Mutationen unterteilen. Seltener treten Primärmutationen in KIT in Exon 13, 14 und 17 und in PDGFRA in Exon 10 und 14 auf (Abbildung 7).^[52] All den Mutationen ist jedoch gemein, dass sie eine Verschiebung des Konformationsgleichgewichts in der Kinasedomäne zur Folge haben.

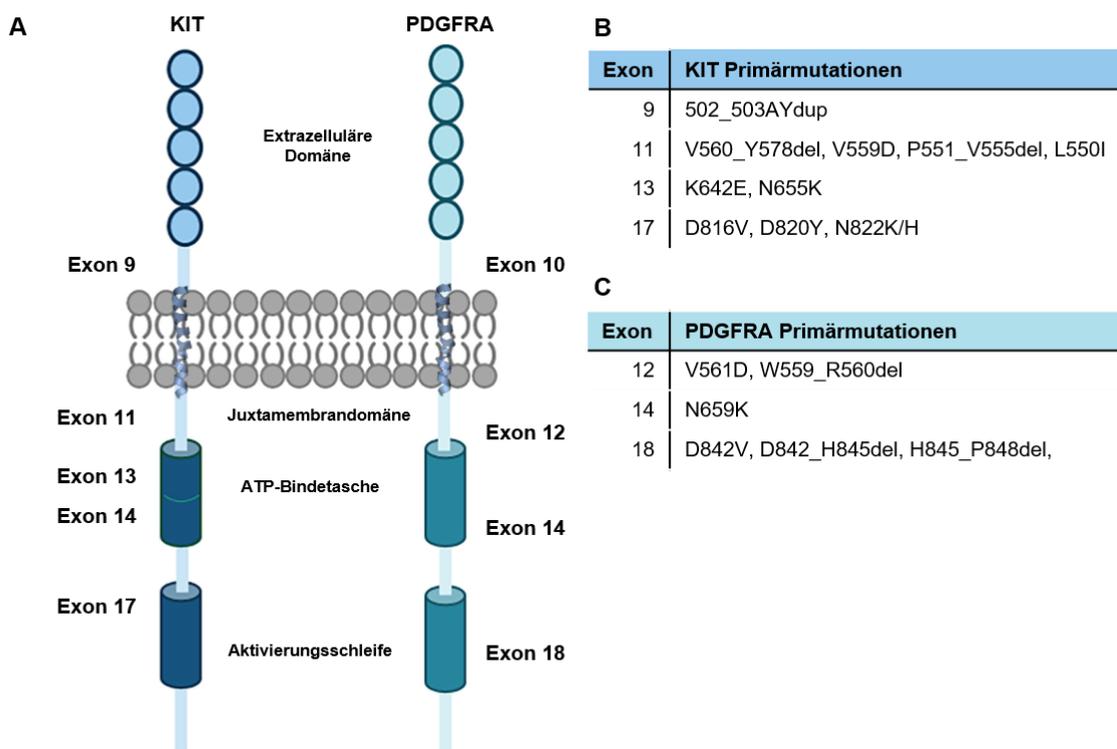


Abbildung 7: Lokalisation auftretender Primärmutationen in unterschiedlichen Exons der RTK KIT und PDGFRA. **A:** Schematische Darstellung der Rezeptortyrosinkinasen KIT und PDGFRA inklusive der Lokalisation der Primärmutationen. **B:** Aufzählung ausgewählter Primärmutationen in KIT. **C:** Aufzählung ausgewählter Primärmutationen in PDGFRA. Abbildung adaptiert von BAUER *et al.*^[46, 52, 62, 64]

Exon 9 Mutationen in KIT kommen vor allem im Dünndarm in etwa 10-15 % der GIST-Patienten vor und zeigen ein aggressives klinisches Verhalten.^[65] Die strukturelle Grundlage für die in der D5-Domäne der ECD auftretenden Duplikationsmutation A502_Y503dup wurde erst im Jahr 2023 von KRIMMER und BERTOLETTI *et al.* mittels cryo-Elektronenmikroskopie (EM)-Experimenten aufgeklärt. Durch die Strukturanalyse von Homodimeren des KIT-Rezeptors konnte festgestellt werden, dass die D5-Domänen der Mutante eine ähnliche asymmetrische Anordnung wie auch der Wildtyp (wt)-Rezeptor einnehmen, wobei jedoch eine umfassendere Oberfläche zwischen den beiden D5-Domänen erkennbar war. Durch die Duplikationsmutation werden stärkere hydrophobe Interaktionen zwischen den zueinanderstehenden Aminosäureseitenketten und auch weitere Wasserstoffbrückenbindungen des Peptidrückgrats induziert (Abbildung 8).^[66]

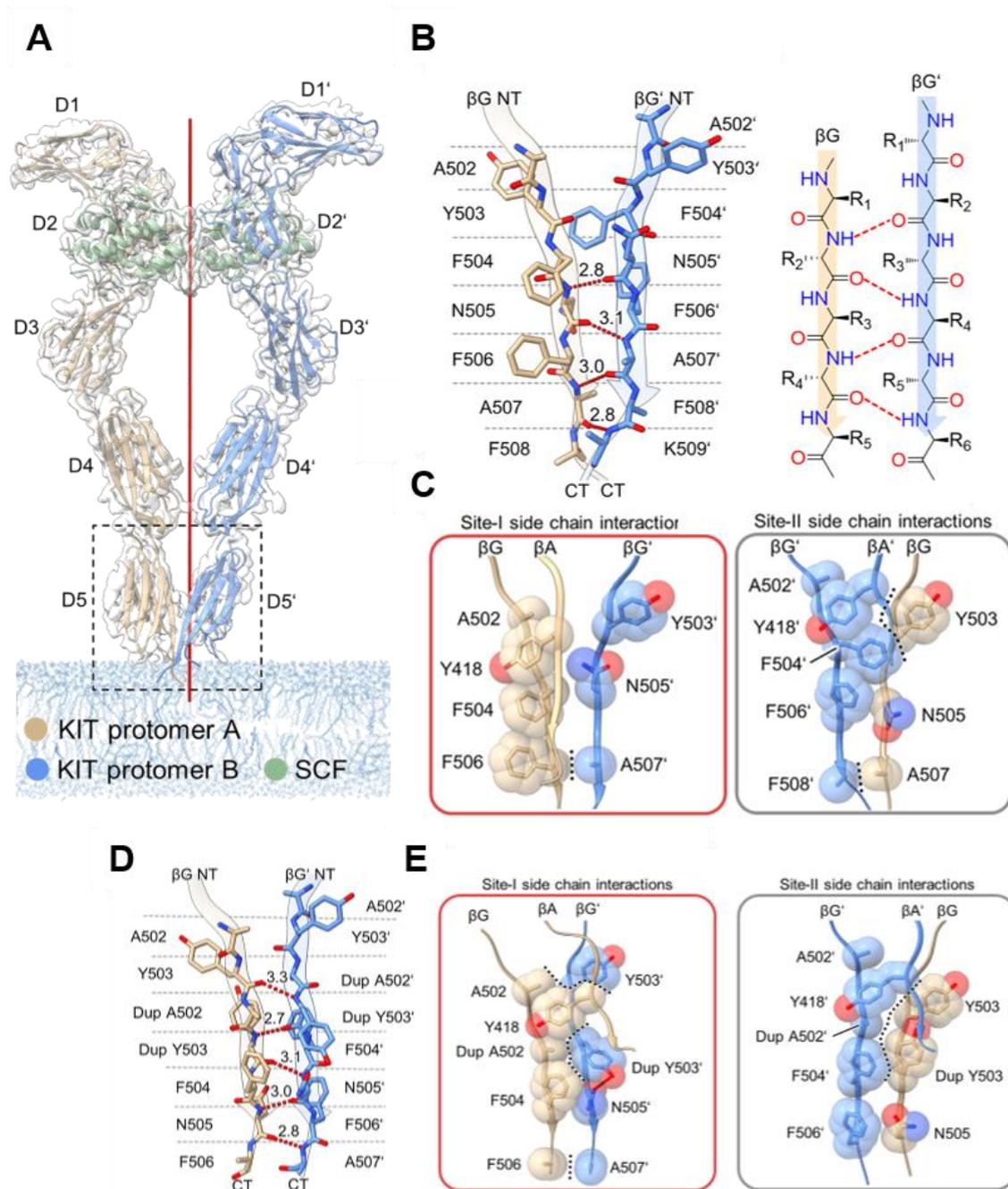


Abbildung 8: Darstellung der cryo-EM Struktur der extrazellulären Domänen eines KIT-wt:SCF-Dimers.

Die Farbkodierung ist konsistent in allen Panelen: KIT-Protomer A in beige, KIT-Protomer B in blau, SCF-Homodimer in grün. **A:** cryo-EM-Karte (graues Volumen) der ECD des KIT-wt:SCF-Dimers. Das in die cryo-EM-Karte eingepasste Strukturmodell zeigt KIT-Protomer A (beige), KIT-Protomer B (blau) und das SCF-Homodimer (grün). Die rote Linie kennzeichnet die doppelte Rotationssymmetrieachse. **B:** Nahaufnahme der umrahmten asymmetrischen $\beta G:\beta G'$ -Grenzfläche aus (A) mit rot gestrichelten Linien, die die Wasserstoffbrückenbindungen des Rückgrats darstellen (Abstände in Å). **C/E:** Seitenkettenwechselwirkungen an Seite I und Seite II mit hydrophoben Packungswechselwirkungen der D5-D5'-Domänen von KIT-wt (C) und KIT-A502_Y503dup (E), dargestellt durch schwarz gestrichelte Linien. Die Seitenketten sind als Stäbchen dargestellt, und ihre van-der-Waals-Radien sind als halbtransparente Kugeln dargestellt, um die Formkomplementarität hervorzuheben. Die Rückgrat-atome wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit weggelassen. Die Seitenketten von F508' (C) und F506 (E) wurden aufgrund der schlecht definierten cryo-EM-Dichte nicht in das Modell aufgenommen. **D:** Asymmetrische D5:D5'-Grenzfläche, gebildet durch β -Stränge βG und $\beta G'$ mit rot gestrichelten Linien, die Wasserstoffbrückenbindungen im Rückgrat darstellen (Abstände in Å). Darstellung und Beschriftung übernommen von KRIMMER und BERTOLETTI *et al.*^[66]

Weiterhin wurde bereits in vorherigen Publikationen vermutet, dass die Duplikation zu einer erhöhten Affinität zweier Rezeptor-Monomere zueinander führt, was durch RESHETNYAK *et al.* näher untersucht wurde.^[27, 28] Primärmutationen in Exon 11 in KIT bzw. Exon 12 in PDGFRA sind in der Juxtamembrandomäne lokalisiert.^[67, 68] Sowohl Substitutions-, als auch Deletionsmutationen führen zu einer Unterbindung der auto-inhibitorischen Lokalisation der JMD in der *backpocket* des Proteins. Durch z. B. die Substitution von Val559 in KIT bzw. Val561 in PDGFRA durch ein Aspartat, gehen hydrophobe Wechselwirkungen der JMD verloren.^[69] Nicht nur aufgrund der Größe des Aspartats, aber auch durch die Einführung einer geladenen Aminosäure-Seitenkette wird somit die inaktive Kinasekonformation destabilisiert.^[70] Durch diese Destabilisierung kann die Kinasedomäne Liganden-unabhängig in seine aktive Konformation übergehen und vermittelt somit eine konstitutive Aktivität nachgeschalteter Effektoren.^[45, 65] Weitere auftretende Primärmutationen befinden sich in Exon 17 in KIT bzw. analog in Exon 18 in PDGFRA, wobei in KIT vor allem Substitutionen auftreten, während in PDGFRA auch vermehrt Deletionen detektiert werden können.^[71, 72] Die beobachteten Mutationen sind in der Aktivierungsschleife der Kinasedomänen lokalisiert. Die Substitution eines geladenen Aspartats (Asp816 in KIT, Asp842 in PDGFRA) durch ein unpolares, hydrophobes Valin kann wie auch bei Mutationen der JMD zur Unterbrechung von Interaktionsnetzwerken führen, was eine Destabilisierung der Aktivierungsschleife zur Folge hat. Auch hier wird eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der aktiven Kinasekonformation induziert, welche in Abhängigkeit der jeweiligen Mutation stärker oder schwächer sein kann.^[73]

1.4 Behandlungsstrategien in GIST

Neben der Entdeckung von KIT und PDGFRA als treibende Onkogene bei der Entwicklung von GIST, war die Entwicklung von Imatinib eine weitere Revolution in der GIST-Behandlung, da hier neben der Aktivität gegenüber BCR-ABL ebenfalls eine inhibierende Wirkung gegenüber KIT nachgewiesen werden konnte. Somit stand zum ersten Mal eine zielgerichtete Krebstherapie für diese Chemo- und Strahlentherapie-resistenten Neoplasien zur Verfügung,^[74, 75] welche eine signifikante Erhöhung der Überlebensraten der Patienten sicherte. Dabei bindet Imatinib als Tyrosinkinase-Inhibitor (TKI) vom Typ IIa eine nicht-auto-inhibierte DFG-out-Konformation direkt in der ATP-Bindestelle der mutierten RTK, was somit die Weitergabe von Wachstumssignalen in den Zellkern verhindert.^[76, 77] Beim Einsatz von Imatinib als Erstlinientherapie wird zunächst der Mutationsstatus der Erkrankung ermittelt. Bei KIT Exon 11, 13, 17 oder PDGFRA Exon 12 oder 14 mutierten GIST werden meist 400 mg pro Tag in Tablettenform verabreicht. Bei KIT Exon 9 mutierten GIST wird eine Dosiserhöhung auf 800 mg pro Tag empfohlen, was aufgrund der guten Verträglichkeit von Imatinib möglich ist.^[78] Nur durch diese Dosiserhöhung wird eine klinisch effektive Inhibierung des Rezeptors hervorgerufen. Weiterhin gibt es unterschiedliche PDGFRA Exon 18-Mutationen, ausgenommen D842V, welche ebenfalls auf Imatinib-Therapie ansprechen.^[79] Obwohl mit dieser Erstlinientherapie eine gute Wirksamkeit und eine signifikante Steigerung der Überlebensraten erzielt werden können, kann bei einem Großteil der Patienten eine Imatinib-Resistenz und somit das Fortschreiten der Krankheit beobachtet werden. Diese Resistenz wird meist durch die Entstehung von Sekundärmutationen vermittelt, welche eine Kinasekonformation induzieren, die für die Bindung des Inhibitors weniger gut geeignet ist. Die am häufigsten in KIT auftretenden Resistenzmutationen betreffen Exon 13 (V654A), Exon 14 (T670I) und verschiedene Codons in Exon 17.^[80] Durch das Auftreten der Mutation der Türsteher-Aminosäure in zahlreichen Kinasen, ist der Resistenz-vermittelnde Mechanismus bereits gut verstanden.^[81] Hierbei kommt es durch die Einführung einer größeren Aminosäure-Seitenkette sowohl zu einer sterischen Repulsion, als auch zu einem Verlust polarer Interaktionen, die von den meisten Inhibitoren mit der Seitenkette der Wildtyp-Aminosäure eingegangen werden. Für das Verständnis der V654A-Mutation, welche unmittelbar unterhalb der α C-Helix lokalisiert ist, wurden MD-Simulationen in der Arbeitsgruppe Rauh durchgeführt und von KAITSIOTOU *et al.* veröffentlicht. Hier wird postuliert, dass durch die Einführung eines sterisch weniger anspruchsvolleren Alanins anstelle des Valins die regulatorische α C-Helix eine höhere Flexibilität erhält und somit bevorzugt in ihre *in*-Konformation näher zur ATP-Bindetasche übergeht, was die aktive Kinasekonformation begünstigen würde.

Weiterhin kann ein Verlust von hydrophoben Interaktionen mit dem Inhibitor ein Herabsinken der Bindungsaffinität herbeiführen.^[82] Während Sekundärmutationen in der ATP-Bindetasche vor allem die direkte Ligandenbindung beeinflussen, kann für Resistenzmutationen innerhalb der Aktivierungsschleife die Stabilisierung einer aktiven Kinasekonformation postuliert werden, welche für die Bindung von Imatinib wesentlich weniger favorisiert ist.^[52, 83] Für die Behandlung Imatinib-resistenter GIST stehen mit Sunitinib (Sutent®, Pfizer Inc.), Regorafenib (Stivarga®, Bayer AG) und Ripretinib (Qinlock®, Deciphera Pharmaceuticals) weitere Therapielinien zur Verfügung, wobei der letztgenannte Wirkstoff erst 2020 zugelassen wurde (Abbildung 9). Für die Behandlung von PDGFRA-D842V-mutierten GIST steht mit Avapritinib (Ayvakit®, Blueprint Medicines Corporation) nur ein Therapeutikum zur Verfügung.

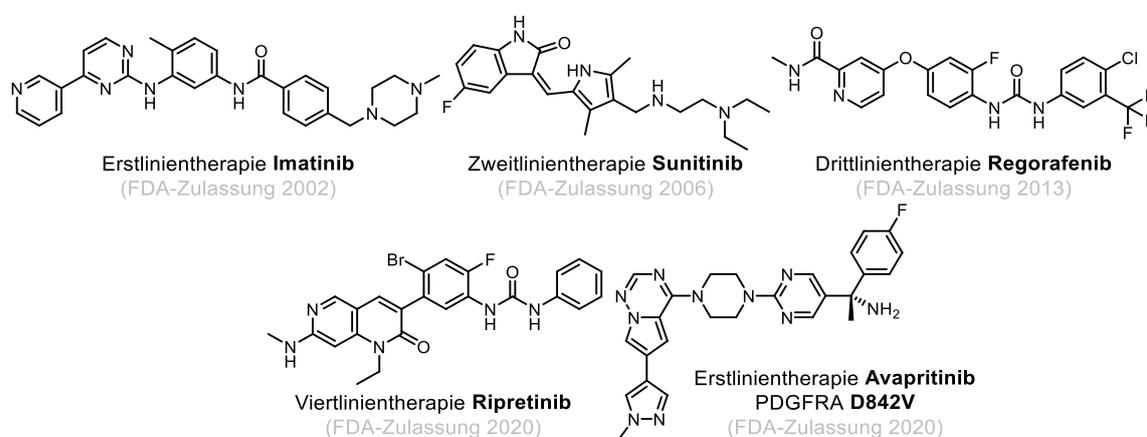


Abbildung 9: Chemische Strukturen der für GIST-Behandlung zugelassenen Therapeutika. Die Inhibitoren sind in aufsteigenden Therapielinien sortiert, welche durch aufkommende Resistenzmutationen verwendet werden. Erstlinientherapie: Imatinib mit FDA-Zulassung 2002. Zweitlinientherapie: Sunitinib mit FDA-Zulassung 2006. Drittlinientherapie: Regorafenib mit FDA-Zulassung 2013. Viertlinientherapie: Ripretinib mit FDA-Zulassung 2020. Erstlinientherapie von PDGFRA-D842V-mutierten GIST: Avapritinib mit FDA-Zulassung 2020.

Sunitinib ist ein Multikinase-Inhibitor, welcher 2006 die Zulassung zur Behandlung Imatinib-resistenter GIST erhielt und ursprünglich für die Behandlung des Nierenzellkarzinoms entwickelt wurde.^[84] Dieser TKI kann als Typ IIb-Inhibitor sowohl die auto-inhibierte, als auch die nicht-auto-inhibierte DFG-*out*-Konformation der Kinase binden, da er nicht die *backpocket* des Proteins besetzt. Weiterhin wird Sunitinib in einigen anderen Kinasen als Typ I $\frac{1}{2}$ -Inhibitor eingestuft, weshalb es denkbar wäre, dass ebenfalls spezifische DFG-*in*-Konformationen von KIT gebunden werden könnten.^[39, 85] Aufgrund der geringen Kinase-Selektivität, werden geringe Dosen (50 mg/Tag, 4 Wochen lang, dann 2 Wochen Pause) eingesetzt, um auftretende Nebenwirkungen zu verhindern bzw. zu verringern.^[86] Die Effektivität von Sunitinib hängt wie auch bei Imatinib stark vom Mutationsstatus des Patienten ab. Patienten mit KIT Exon 9-mutierten GIST wiesen in Studien mit 12,3 Monaten ein wesentlich längeres mittleres Progressions-freies Überleben (mPFS, engl.: *median progression free survival*) als Patienten mit KIT Exon 11-mutierten GIST mit sieben Monaten

auf.^[87, 88] Weiterhin kann beobachtet werden, dass Patienten mit Sekundärmutationen in KIT Exons 13 und 14 ein wesentlich erhöhtes mPFS aufweisen als Patienten mit detektierbaren Sekundärmutationen in Exons 17 und 18.^[87] Erst seit 2013 steht mit Regorafenib eine zugelassene Drittlinientherapie bei Imatinib- und Sunitinib-resistenten GIST zur Verfügung, wobei diese ursprünglich für die Behandlung von Kolon- und Rektum-, sowie Nierenkrebs mit einem Fokus auf der Inhibition von Raf und dem vaskulär-endotheliale Wachstumsfaktor-Rezeptor (VEGFR, engl.: *vascular endothelial growth factor receptor*) entwickelt wurde.^[89] Die Wirksamkeit dieses Multikinase-Inhibitors als Drittlinientherapeutikum wurde in der Phase III-Studie GRID nachgewiesen, wobei ein mPFS von 4,8 Monaten mit Regorafenib gegenüber 0,9 Monaten mit Placebo festgestellt wurde.^[50] Dieser wie Imatinib als Typ IIa einzuordnende TKI blockiert die Angiogenese des Tumors, die Tumorbildung sowie weitere Kinasen in der Tumor-Mikroumgebung. Aufgrund des Auftretens massiver Nebenwirkungen, werden Patienten unter Regorafenib-Therapie engmaschig überwacht.^[90] In einer weiteren Phase II-Studie konnte ein signifikanter Nutzen von Regorafenib bei Patienten mit KIT Exon 17 Sekundärmutationen festgestellt werden, wobei erneut beobachtet wurde, dass eine Wirksamkeit eng mit dem genauen Mutationsstatus des Patienten verknüpft ist.^[91] Auf Basis der durchgeführten klinischen Studien und der Analysen der Mutationsstati der Patienten wurde ein komplementäres Inhibitionsprofil von Sunitinib und Regorafenib festgestellt, wobei Sunitinib ein guter bis moderater Inhibitor für Sekundärmutationen in KIT Exon 13 und 14 ist, während Regorafenib vor allem KIT Exon 17 Sekundärmutationen adressieren kann.^[92] Da weder die Inhibition durch Sunitinib noch durch Regorafenib das gesamte Spektrum auftretender Sekundärmutationen abdeckt, wird in einigen Fällen die Patienten-Behandlung zu einer großen Herausforderung. Hinzu kommt die geringe Selektivität von Sunitinib und Regorafenib auf KIT bzw. PDGFRA gegenüber anderen Kinasen, da keiner der in den ersten Therapielinien eingesetzten Inhibitoren speziell für die Inhibition von KIT und PDGFRA entwickelt wurde. Im Gegensatz dazu wurde mit Ripretinib im Jahr 2020 als Viertlinien-Therapie der erste, speziell für KIT-mutierte GIST entwickelte Typ IIa-Kinaseinhibitor zugelassen. Grundlage für die Behandlung ist die Phase III-Studie INVICTUS (NCT03353753), welche die Sicherheit, Verträglichkeit und Wirksamkeit von Ripretinib im Vergleich zu Placebo untersuchte.^[93] Eingesetzt wurde Ripretinib hier bei Patienten, welche zuvor Imatinib, Sunitinib und Regorafenib als Therapeutika erhalten hatten. Es konnte ein verlängertes mPFS mit 6,3 Monaten mit Ripretinib gegenüber 1 Monat mit Placebo nachgewiesen werden.^[94] Die Besonderheit bei Ripretinib war unter anderem die wirksame Inhibition von KIT-Varianten mit Mutationen in der Aktivierungsschleife, welche von vorherigen Therapielinien nicht adressiert werden konnten.

Weitere Studien wurden hinsichtlich der Verwendung von Ripretinib als Zweitlinientherapeutikum im Vergleich zu Sunitinib durchgeführt (INTRIGUE, NCT03673501), wobei keine Überlegenheit von Ripretinib innerhalb des therapeutischen Fensters erzielt und die Studie somit als Negativstudie gewertet werden konnte.^[95] Der einzige Vorteil ist die Bindung und Inhibition AL-mutierter KIT-Varianten. Während Imatinib und die weiteren Therapielinien sehr potent gegenüber speziellen KIT- und PDGFRA-Mutationen sind, stellte eine spezielle Primärmutation in PDGFRA Exon 18, nämlich D842V, seit Jahrzehnten eine resistente Mutation gegenüber den zugelassenen Inhibitoren dar. Patienten mit dieser speziellen PDGFRA-Primärmutation waren bis zur Zulassung von Avapritinib (Ayvakit™/Ayvakyt®, Blueprint Medicines) in 2020 mit schlechten Prognosen und geringen Überlebensraten konfrontiert.^[52, 53, 96, 97] Durch die Mutation eines polaren Aspartats zu einem hydrophoben Valin wird das Konformationsgleichgewicht so deutlich in Richtung der aktiven DFG-*in*-Konformation verschoben, dass Typ II-Inhibitoren die Kinase nicht mehr binden und somit nachgeschaltete Signale nicht unterbunden werden können.^[61] Durch Avapritinib wurde erstmalig ein an die DFG-*in*-Konformation bindender Inhibitor speziell für die Adressierung dieser PDGFRA-Mutante zur Behandlung von GIST zugelassen, was einen signifikanten Paradigmenwechsel in der Patienten-Behandlung zur Folge hatte.^[61, 96] Durch die Bindung der aktiven DFG-*in*-Konformation könnte Avapritinib weiterhin auch AL-mutierte KIT-Varianten inhibieren und besitzt somit nicht nur Relevanz in der GIST-Therapie, sondern z. B. auch im Bereich der fortgeschrittenen systemischen Mastozytose (ASM, engl.: *advanced systemic mastocytosis*).^[54, 98] Obwohl die allgemeine Toxizität in Folge der Avapritinib-Therapie überschaubar ist, führen schwerwiegende kognitive Nebenwirkungen in einer kleinen Patientengruppe zum Therapie-Abbruch und somit zum Fortschreiten der Krankheit mit einer mittleren Überlebensrate (mOS, engl.: *median overall survival*) von nur wenigen Wochen.^[99, 100] Ebenfalls können, wie es auch bei der Behandlung mit anderen TKIs beobachtet wird, Resistenzmutationen analog wie in KIT auftreten, welche ebenfalls die Krankheit fortschreiten lassen. Während auch hier die Mechanismen für bestimmte Sekundärmutationen in Exon 14 (V658A) oder Exon 15 (T674I/R) durch das Auftreten vergleichbarer Mutationen in KIT oder anderen Kinasen, gut verstanden sind, können diese für weitere Mutationen in Exon 13 (V598F), Exon 14 (G652E, N659K) und Exon 15 (Y676C, G680R) lediglich postuliert werden.^[61] Desweiteren stehen nach Avapritinib-Therapie keinerlei weitere Therapielinien für die Patienten zur Verfügung, was das Auftreten der kognitiven Nebenwirkungen und auch der Resistenzmutationen besonders dramatisch macht, da Patienten bei Absetzen von Avapritinib mit einem schnellen Todesurteil konfrontiert sind.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass sowohl Nebenwirkungen durch Verwendung von Multikinase-Inhibitoren wie Sunitinib und Regorafenib, aber auch das Fehlen neuer Therapieansätze die Behandlung von GIST-Patienten zu einer großen Herausforderung machen. Bis auf Ripretinib und Avapritinib wurde keiner der Inhibitoren speziell für KIT- bzw. PDGFRA-Hemmung entwickelt und keiner der Inhibitoren kann ein breites Spektrum von Primär- und Sekundärmutationen adressieren (Abbildung 10).

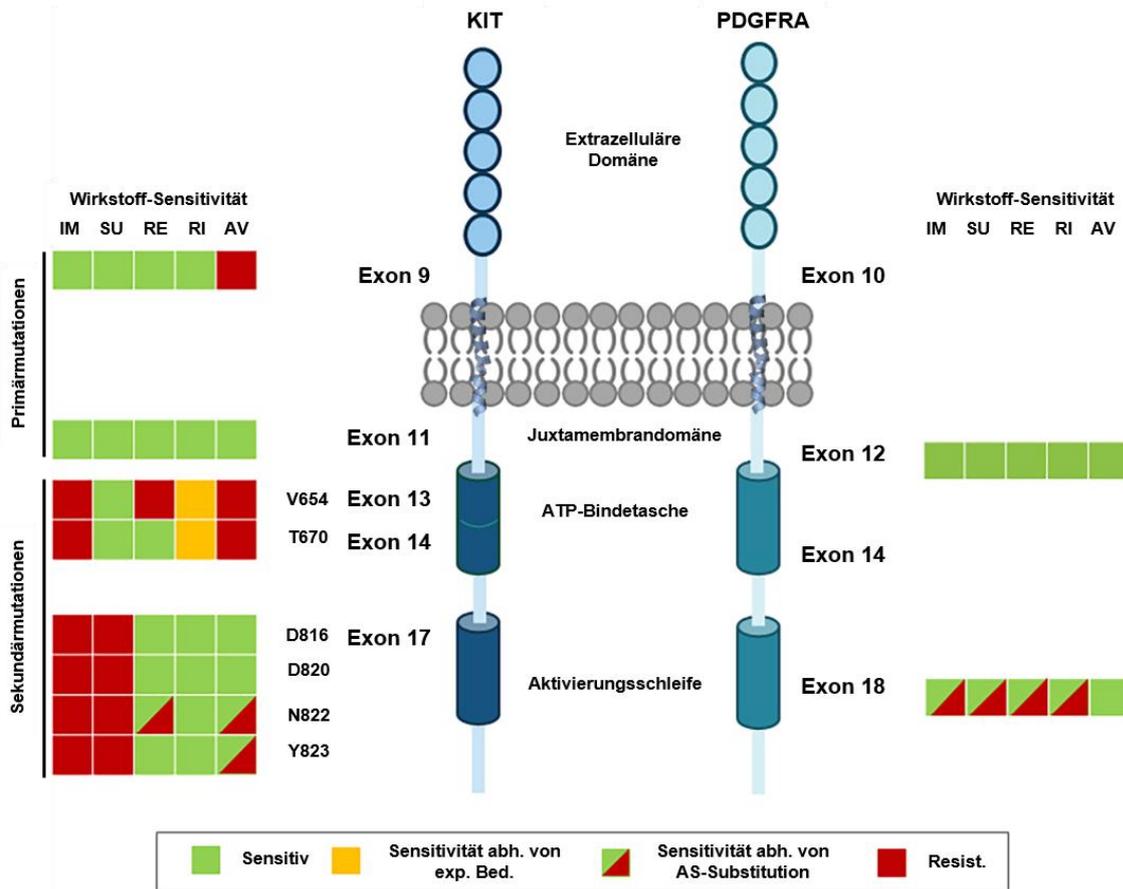


Abbildung 10: Wirkstoff-Sensitivitäten für Primär- und Sekundärmutationen in GIST. IM: Imatinib. SU: Sunitinib. RE: Regorafenib. RI: Ripretinib. AV: Avapritinib. Grün: Sensitiv. Orange: Sensitivität beruht auf den experimentellen Bedingungen. Rot/grün: Sensitivität beruht auf der genauen Aminosäure-Substitution, wobei beachtet werden sollte, dass in PDGFRA Exon 18 nur nicht-D842V-Mutationen teilweise von IM, SU, RE und RI inhibiert werden können. Rot: Resistent. Abbildung adaptiert von BAUER *et al.*^[46, 52, 62, 64]

Patienten mit der Diagnose GIST sind demnach häufig mit schlechten Prognosen konfrontiert. Nur bei einer sehr kleinen Subpopulation der Patienten führt z. B. eine Dauerbehandlung mit Imatinib zum langjährigen Erfolg.^[101] Die Entwicklung von unterschiedlichsten Resistenzmutationen zeigt die medizinische Notwendigkeit der Entwicklung weiterer, spezifischer Inhibitoren auf, um GIST-Patienten mehr Hoffnung geben zu können.

2 Motivation & Zielsetzung

Die in GIST auftretenden Mutationen in KIT und PDGFRA stellen das Paradebeispiel für die Nutzung der zielgerichteten Krebstherapie dar. Obwohl in beiden Kinasen teilweise vergleichbare Mutationen als Primär- oder Sekundärmutationen auftreten können, zeigt sich auf klinischer Seite ein sehr diverses Verhaltensbild der Kinasen gegenüber der Nutzung von Inhibitoren. Zum einen zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Kinasen bei der Inhibition durch Liganden selbst, zum anderen sind die Auswirkungen bestimmter Mutationen auf konformationelle Gleichgewichte der Kinasen nicht vollständig aufgeklärt. Somit besteht eine erhebliche Lücke beim Verständnis auftretender Mutationen und dessen Auswirkungen. Auch das Fehlen von speziell für die Behandlung von GIST entwickelten Wirkstoffen, stellt eine große Herausforderung dar. Obwohl hier mit Ripretinib und Avapritinib 2020 erstmals zielgerichtet für KIT bzw. PDGFRA entwickelte Inhibitoren zugelassen wurden, konnten schnell Resistenzmutationen identifiziert werden, welche folglich zu einer Wirkungslosigkeit der Inhibitoren führt. Deshalb ist die Entwicklung neuer Inhibitoren unabdingbar, um neue Perspektiven in der GIST-Behandlung schaffen zu können.

Für die Entwicklung neuer Inhibitoren sind sowohl Aktivitätsstudien, als auch strukturelle Untersuchungen der Zielproteine notwendig. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit neben den bereits vorhandenen KIT-basierten biochemischen Assaysystemen ebenfalls Systeme zur Validierung der entwickelten Inhibitoren gegenüber PDGFRA etabliert werden. Diese biochemischen Assays sollten einen ersten Einblick in die Aktivitäten der Liganden gegenüber den getesteten Kinasen geben, aber auch Eindruck über mögliche Verschiebungen der Selektivitäten bestimmter funktioneller Gruppen gegenüber einer der getesteten Kinasen geben.

Für den Nachweis einer kovalenten Adressierung von KIT bzw. PDGFRA, sollten robuste Systeme zur massenspektrometrischen Verfolgung der kovalenten Bindungsbildung zwischen Liganden und Zielproteinen entwickelt werden.

Für ein tiefgreifendes Verständnis von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen sowie die strukturbasierte Optimierung von Inhibitoren wird ein robustes Kristallisationssystem benötigt, um dreidimensionale Strukturen der Zielproteine im Komplex mit verschiedenen Liganden erhalten zu können. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit Expressions-, Reinigungs- und Kristallisationsprotokolle für KIT und PDGFRA etabliert werden. Mithilfe der so erhaltenen Kristallisationsbedingungen sollten dann Komplexstrukturen mit verschiedenen Inhibitor-Typen generiert werden, sodass weitere chemische Optimierungen stattfinden können.

Durch die hohe Anzahl und Variation auftretender Mutationen in den Zielproteinen sollten ebenfalls klinisch-relevante Mutanten heterolog exprimiert, säulenchromatographisch gereinigt und für Kristallisationsexperimente verwendet werden.

3 Ergebnisse & Diskussion

3.1 Allgemeines über KIT & PDGFRA in GIST

Gastrointestinale Stromatumore stellten bis zur Zulassung von Imatinib eine große Herausforderung bei der Patientenbehandlung dar. Durch eine weitestgehende Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie waren erfolgreiche Behandlungen auf ein Minimum beschränkt. Die Entdeckung, dass Imatinib neben BCR-ABL ebenfalls bestimmte KIT- und PDGFRA-Mutanten effektiv hemmen kann, führte zu einem drastischen Anstieg der Überlebensrate. Durch die Entwicklung von Resistenzmutationen kann wiederum ein Fortschreiten der Erkrankung bei vielen Patienten beobachtet werden.^[65, 102] Auch die geringe Anzahl an bisher zugelassenen Wirkstoffen zur Behandlung von GIST schränkt die Therapiemöglichkeiten weiter stark ein. Durch die Identifikation von KIT bzw. PDGFRA als treibende Onkogene können durch Aufklärung der dreidimensionalen Strukturen der Proteine im Komplex mit den eingesetzten Wirkstoffen Bindungsmodi und Resistenzmechanismen aufgeklärt und basierend auf dem erhaltenen Wissen neue Ansätze für die Entwicklung optimierter Inhibitoren entwickelt werden. Eine weitere Strategie könnte das *repurposing* bereits für andere Indikationen zugelassener Wirkstoffe für die Behandlung von GIST sein.^[103] Auch an dieser Stelle stellt Imatinib das Paradebeispiel dar, da dieses ursprünglich für die Behandlung von CML entwickelt wurde. Im Kontext von GIST wird dafür häufig die Verwandtschaft zwischen einzelnen Kinasen ausgenutzt, wozu vor allem FLT3, VEGFR2, BCR-ABL und c-SRC gehören. Mit einer prozentualen Übereinstimmung von 33-52 % der Aminosäuresequenz der Kinasedomänen weisen diese Kinasen eine relativ hohe Vergleichbarkeit untereinander auf (Tabelle 1, Anh. 6.4.1, Abbildung 81, Abbildung 82).

Tabelle 1: Prozentuale Übereinstimmung der Proteinsequenzen der verglichenen Kinasedomänen. Der Sequenzvergleich erfolgte ohne Hinzunahme der JMD-Sequenzen der RTKs KIT, PDGFRA, FLT3 und VEGFR2 mit dem *Alignment-Tool* von UniProt, welches auf BLAST basiert.

Kinase	KIT	PDGFRA	FLT3	VEGFR2	BCR-ABL	c-SRC
KIT	100	52.28	52.28	45.84	35.18	37.92
PDGFRA	52.28	100	51.03	42.7	33.06	38.66
FLT3	52.28	51.03	100	46.58	36.51	40.15
VEGFR2	45.84	42.7	46.58	100	33.65	36.03
BCR-ABL	35.18	33.06	36.51	33.65	100	47.45
c-SRC	37.92	38.66	40.15	36.03	47.45	100

Da sich das Prinzip des *repurposing* in der GIST-Behandlung bereits als wertvolles Werkzeug herausgestellt hat, sollten in präklinischen Tests ebenfalls Inhibitoren dieser nah verwandten Proteinkinasen auf ihre Aktivität gegenüber KIT und PDGFRA untersucht werden. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht nur die für GIST-Therapie zugelassenen Wirkstoffe Imatinib, Sunitinib, Regorafenib, Ripretinib und Avapritinib untersucht, sondern auch weitere, möglicherweise interessante Inhibitoren.

3.2 Massenspektrometrische Analysen

Durch initiale strukturelle biologische Untersuchungen bereits veröffentlichter Kristallstrukturen konnten in KIT und PDGFRA zwei potenziell adressierbare Cysteine identifiziert werden (Abbildung 11). Eines dieser Cysteine liegt in der *backpocket* des Proteins (Cys788 in KIT, Cys814 in PDGFRA) und konnte in der Literatur bereits erfolgreich in KIT adressiert werden.^[104] Das zweite Cystein ist in der Aktivierungsschleife lokalisiert (Cys809 in KIT, Cys835 in PDGFRA). Da beide Cysteine durch ihre Lokalisierung als adressierbar angesehen wurden, wurden deshalb in den einzelnen Teilprojekten des GIST-Projektes unter anderem auch Liganden² mit Cystein-reaktiven Gruppen dekoriert. Beim Design der Liganden wurde darauf geachtet, welches der Cysteine in welcher Kinasekonformation adressiert werden kann. Anhand der in Kristallstrukturen auftretenden unterschiedlichen Kinasekonformationen konnte geschlussfolgert werden, dass das in der *backpocket* lokalisierte Cystein an Position 788 in KIT bzw. 814 in PDGFRA lediglich durch die Bindung von Typ IIa-Inhibitoren an die DFG-*out*-Konformation adressiert werden kann, da in einer DFG-*in*-Konformation das entsprechende Cystein von der Aktivierungsschleife verdeckt wird.^[105-107] Weiterhin wurde geschlussfolgert, dass das Cystein an Position 809 in KIT bzw. 835 in PDGFRA sowohl von Typ I- als auch Typ II-Inhibitoren kovalent modifiziert werden könnte. Zur Untersuchung der Bindungsbildung wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt.

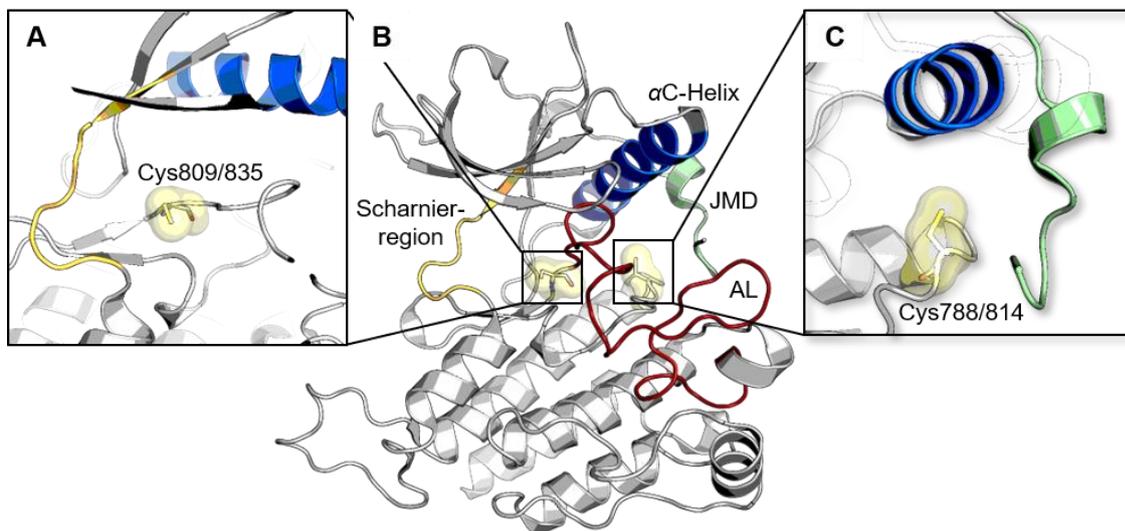


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Position der zu adressierenden Cysteine in den Zielproteinen. A: Lokalisierung der Cysteine 809 und 835 unmittelbar vor dem DFG-Motiv. B: Übersicht der Kinasedomäne. C: Lokalisierung der Cysteine 788 und 814 in der *backpocket*. Blau: α C-Helix, Orange: Scharnierregion, Grün: Juxtamembrandomäne, Rot: Aktivierungsschleife.

² Synthese durchgeführt von Dr. H. Kaitsiotou, Dr. J. Hardick und T. Schulz (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen ihrer Promotion und Dr. R. Gontla (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seines PostDocs.

Für die massenspektrometrische Analyse der Adduktbildung wurden unterschiedliche Inkubationszeiten, Temperaturen, pH-Werte sowie variierende Ligandenüberschüsse gewählt, da bereits in ersten Experimenten beobachtet werden konnte, dass bei den initial genutzten Bedingungen (pH 8,0, 24 h Inkubation) lediglich eine moderate Adduktbildung vorhanden war. Deshalb wurde im Verlauf der Arbeit ein Protokoll etabliert, welches die Bindungsbildung vor allem bei pH 9,5 verfolgen sollte, da mit steigendem pH-Wert die Reaktivität der Cysteine durch Deprotonierung erhöht wird. Weitere Variationen brachten keine signifikanten Verbesserungen. Insgesamt wurden im Rahmen dieser Arbeit ~460 Proteinproben vermessen, wobei aufgrund der besseren Verfügbarkeit vor allem KIT-wt für ~370 Messungen genutzt wurde. Insgesamt zeigten von 37 Liganden lediglich fünf eine partielle Adduktbildung.

3.3 Allgemeine Beschreibung des Biochemischen HTRF® TK-KinEASE Assay-Systems

Das in dieser Arbeit etablierte und genutzte HTRF® TK-KinEASE Assaysystem ist eine generische Methode zur Erhebung der Tyrosinkinase-Aktivität mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET). Hierfür werden ein Substrat und ein universell einsetzbares Detektionssystem genutzt, welches auf folgenden Grundlagen basiert: Der enzymatische Schritt beinhaltet die Inkubation der Zielkinase mit einem Biotin-markierten Substrat, welches durch ATP-Zugabe von der Tyrosinkinase phosphoryliert wird. Im Detektionsschritt werden der Reaktion sowohl ein Eu^{3+} -Kryptat gekoppelter anti-pTyr-Antikörper (FRET-Donor), als auch XL665-gekoppeltes Streptavidin (FRET-Akzeptor) und EDTA hinzugefügt, welches Mg^{2+} komplexiert und aus der Reaktion entfernt, um die Enzymreaktion zu stoppen. Anschließend erfolgt die Messung der Emission bei einer Wellenlänge von 665 nm bzw. 620 nm und einer Anregungswellenlänge von 317 nm (Abbildung 12).

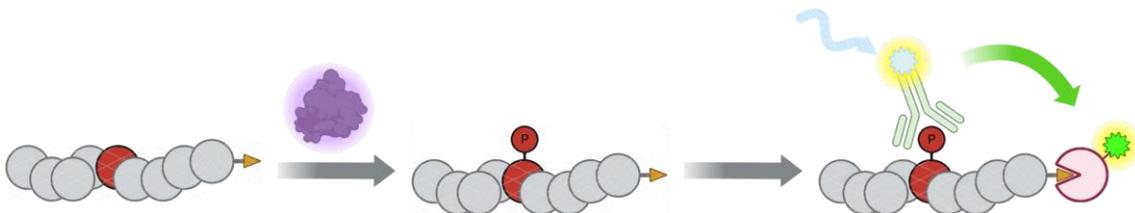


Abbildung 12: Illustration des Grundprinzips des HTRF-Assays. Der verwendete Assay beruht auf dem HTRF® KinEASE-TK Assaysystem von PerkinElmer. Grau: Biotinyliertes Substratpeptid. Rot: Tyrosin im Substratpeptid, welches im ersten Inkubationsschritt phosphoryliert wird. Lila: eingesetzte Tyrosinkinase. Hellgrün: Eu^{3+} -Kryptat-gekoppelter Antikörper, der an phosphoryliertes Tyrosin bindet. Hellrot: Fluorophor-gekoppeltes Streptavidin, welches an Biotin bindet. Die Abbildung wurde erstellt mit BioRender.com.

3.4 Allgemeines über Strukturbiologische Untersuchungen

Für die Entwicklung zielgerichteter Krebstherapien sind Struktur-lösende Verfahren wie z. B. die Proteinkristallisation,^[108] oder die Strukturaufklärung mittels cryo-Elektronenmikroskopie, aber auch mittels *nuclear magnetic resonance* (NMR)-Spektroskopie,^[109, 110] essenzielle Werkzeuge. Mithilfe dieser Methoden können die dreidimensionalen Strukturen komplexer Makromoleküle wie Proteine auf atomarer Ebene gelöst werden. Die Auflösungsgrenze bei der Proteinkristallisation ist dabei mit der verwendeten Wellenlänge korreliert und wird als minimaler Abstand zweier unterscheidbarer Punkte definiert. Da z. B. eine C-C-Einfachbindung eine Bindungslänge von ca. 1,54 Å aufweist, sind Röntgen- oder Synchrotronstrahlung gut geeignet für die Lösung dreidimensionaler Proteinstrukturen, wobei Synchrotronstrahlung energiereicher als Röntgenstrahlung ist,^[111] und deshalb noch höhere Auflösungen erzielt werden können.^[112, 113] Da Röntgenstrahlung jedoch nur schlecht mit Materie wechselwirkt, müssen die Proteine in kristalliner Form vorliegen. Kristalle zeichnen sich durch einen hoch geordneten Aufbau aus sich wiederholenden Einheiten (Elementarzelle) aus, welche wiederum die asymmetrischen Einheiten enthalten. Die asymmetrischen Einheiten können durch Symmetrioperationen ineinander überführt werden und geben die Punkt- bzw. Raumgruppe des Kristalls vor. Aufgrund der periodischen Anordnung der Moleküle können Signale durch konstruktive Interferenz verstärkt und an den Elektronenschalen gebeugte Röntgenstrahlung detektiert werden.^[114, 115] Bereits die Überführung des Proteins aus der flüssigen Phase in die kristalline Phase stellt die erste Hürde dar. Das Ziel ist es, das Protein langsam durch den Entzug von Wasser aus der Lösung über seine Löslichkeitsgrenze zu überführen, sodass es hoch geordnete Kristalle bildet. Für die Überführung des Proteins in diese kristalline Phase werden neben hoch reinem Protein auch unterschiedlichste Substanzen, wie z. B. Puffersubstanzen, Präzipitationsmittel oder Salze und unterschiedliche pH-Werte, als Reservoir verwendet.^[116] Die exakten Bedingungen für eine erfolgreiche Proteinkristallisation können jedoch nicht vorhergesagt werden, weshalb die Identifikation geeigneter Bedingungen in Abhängigkeit des Proteins sehr komplex werden kann. Wenn eine erfolgreiche Etablierung eines Kristallisationssystems erzielt wurde, kann ein Kristall hochenergetischer Strahlung ausgesetzt und unter Rotation des Kristalls im Röntgenstrahl ein Datensatz aufgenommen werden. Auf den Diffraktionsbildern eines Datensatzes lassen sich dann regelmäßig angeordnete Reflexe identifizieren. Die anschließende Datenprozessierung beinhaltet die Datenreduktion, bei der den Reflexen im Rahmen der Indizierung Miller Indizes (h, k, l),^[117] zugeordnet und durch anschließende Integration die Intensität und die Standardabweichung der Reflexe bestimmt werden.

Bei der Skalierung werden dann symmetrieverwandte Reflexe in Tabellen zusammengefasst und die Abweichung bestimmt, sodass am Ende eine Strukturfaktoramplitude bestimmt werden kann. Bei Beugungsexperimenten werden also die Position und die Intensitäten der Reflexe gemessen, die Phaseninformation geht jedoch verloren.^[118] Um dieses Phasenproblem zu lösen, werden oftmals bereits publizierte Proteinstrukturen für das *molecular replacement* (MR) verwendet, wobei das Protein in die Elektronendichtekarte eingepasst und ein Diffraktionsexperiment simuliert wird.^[119] Durch diesen Vorgang kann dann die Phaseninformation für den selbstständig generierten Datensatz erhalten und die Proteinstruktur gelöst werden. Da für die Proteinkristallisation hoch reines Protein benötigt wird, sollen im Folgenden sowohl das Konstruktdesign, die Reinigungsprotokolle und die Etablierung von Kristallisationssystemen von PDGFRA-wt, PDGFRA-T674I, KIT-wt und KIT-T670I vorgestellt werden. Zusätzlich zu den hier aufgeführten und untersuchten Proteinen wurden weitere 19 Konstrukte erstellt, die teilweise klinisch relevante Einzel- bzw. Doppelmutationen von KIT bzw. PDGFRA enthielten. Diese sollten analog zu den Wildtyp- und Türsteher-mutierten Proteinen für strukturelle Untersuchungen genutzt werden, wobei sich bereits die Expression der Proteine als große Herausforderung darstellte. Eine Übersicht über die unterschiedlichen Konstrukte und zugehörigen Expressionssysteme ist tabellarisch in Anhang 6.2.3 aufgeführt.

3.4.1 Konstruktdesign der PDGFRA-Kristallisationskonstrukte

Die Kristallisationskonstrukte des PDGFRA-wt-Proteins und der Türsteher-Mutante PDGFRA-T674I basierten auf der bereits veröffentlichten Kristallstruktur des PDGFRA-wt (PDB-ID: 5GRN) und wurden hinsichtlich des Expressionssystems in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) Codon-optimiert.^{3,[120, 121]} Die Konstrukte waren mit einem His₁₀-Tag und einer Erkennungssequenz für die *PreScission*-Protease ausgestattet, um über das in Abbildung 13 gezeigte Reinigungsprotokoll isoliert und gereinigt werden zu können.^[120] Die *PreScission*-Protease verfügte zudem auch über einen His₆-Tag, weshalb sie im dritten Schritt nach der Dialyse und proteolytischen Spaltung leicht vom Zielprotein abgetrennt werden konnte. Zusätzlich enthielt das Konstrukt eine Deletion der flexiblen Kinase-Insertions-Schleife (Aminosäuren 697-768).



Abbildung 13: Reinigungsstrategie der PDGFRA-Kristallisationskonstrukte. IMAC: engl. *immobilized metal affinity chromatography*. SEC: Größenausschluss-Chromatographie, engl. *size exclusion chromatography*.

Die Mutation der Türsteher-Aminosäure Threonin an Position 674 zu Isoleucin wurde durch ortsgerichtete Mutagenese eingebracht.^{4,[121, 122]} Die Virusgeneration mit dem *flashBAC*-System (Oxford Expression Technologies Ltd.) wurde an der *Dortmund Protein Facility* des Max-Planck-Instituts für Molekulare Physiologie (Dortmund) durchgeführt. Mit dem erhaltenen P3-Virus wurden wiederum Testexpressionen durchgeführt, um einen geeigneten Inkubationszeitraum für die heterologe Expression im präparativen Maßstab zu finden. Auf Basis dieser Studien wurden 72 Stunden als ideale Inkubationszeit für die Expression gewählt.

³ Generierung der Kristallisationskonstrukte von KIT und PDGFRA durch L. Kröll (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seiner Bachelorarbeit. Veröffentlicht in der Doktorarbeit von Dr. I. Landel (AG Rauh, TU Dortmund).

⁴ Generierung des Kristallisationskonstrukts von PDGFRA-T674I durch A. Teuber (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen ihrer Masterarbeit.

3.4.2 Etablierung der Reinigungsprotokolle

Die Reinigungen von PDGFRA-wt,^{5,[122]} und PDGFRA-T674I verliefen nach dem gleichen Reinigungsprotokoll mit identischen Pufferzusammensetzungen, weshalb im Folgenden lediglich die Reinigung von PDGFRA-T674I gezeigt wird. Chromatogramme, sowie SDS-Gele, Western Blots und auch Silbergelfärbungen von PDGFRA-wt sind im Anhang 6.3.1 zu finden. Nach dem Zellaufschluss wurde das filtrierte Lysat auf eine Ni²⁺-NTA-Säule unter Beobachtung des UV-Signals aufgetragen. Da das Zielprotein mit einem His₁₀-Tag versehen war, wurde in diesem Schritt die Affinität des poly-Histidins an das Säulenmaterial ausgenutzt (Abbildung 14). Die Elution des Zielproteins erfolgte über eine stetige Erhöhung der Imidazol-Konzentration von 0 – 50 % mit Ni-Puffer B, wodurch das Zielprotein von der Säule eluiert wurde. Um weiterhin an der Säule gebundene Proteine von dieser zu spülen, wurde eine Schlagelution mit 100 % des Ni-Puffer B durchgeführt. Zur Analyse des ersten Reinigungsschritts wurde sowohl eine SDS-PAGE als auch ein Western Blot zum spezifischen Nachweis His-getaggtter Proteine angefertigt.

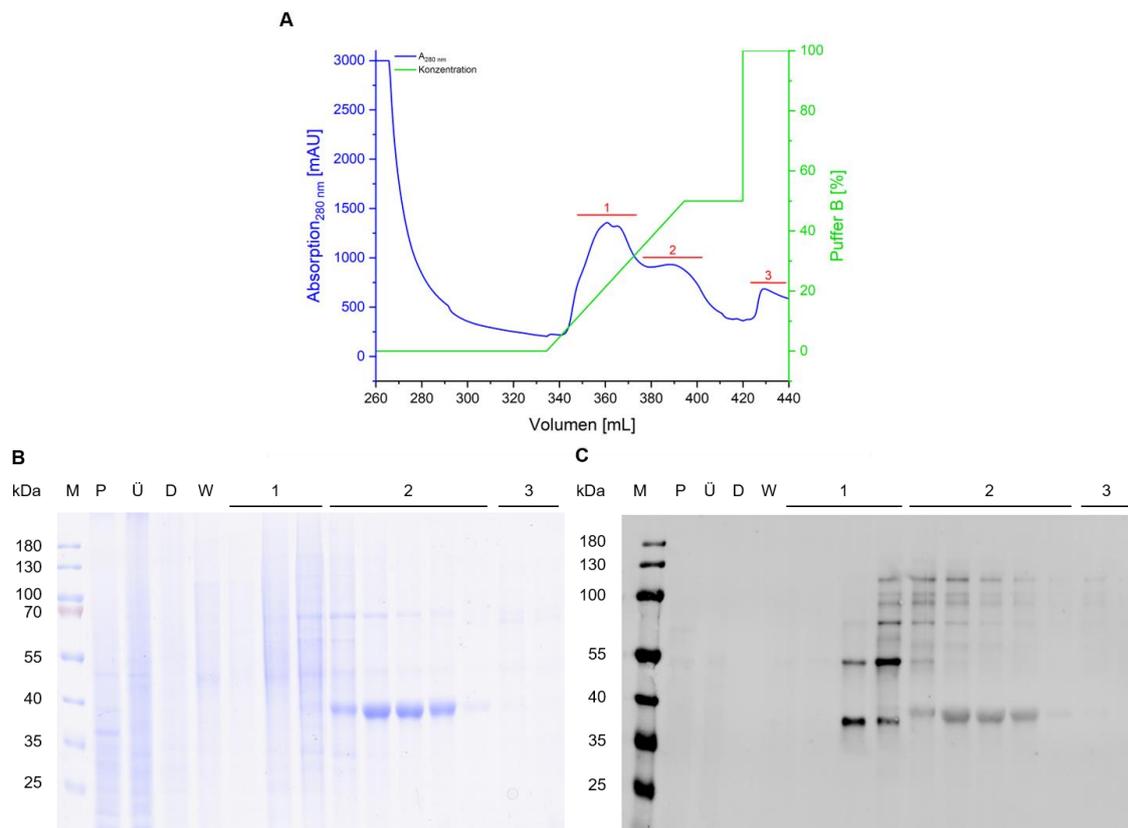


Abbildung 14: Erste Nickel-Affinitätschromatographie von PDGFRA-T674I. **A:** Chromatogramm des Reinigungsschritts. Blau: Absorption bei 280 nm. Grün: Prozentuale Konzentration des Elutionspuffers B. Rot (1-3): Zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot verwendete Fraktionen des Reinigungsschritts. **B:** Mit Coomassie gefärbtes SDS-Gel zur Analyse des Reinigungsschritts hinsichtlich der Proteinreinheit.

⁵ Etabliert von A. Teuber im Rahmen ihrer Masterarbeit (AG Rauh, TU Dortmund).

C: Western Blot zum spezifischen Nachweis His-*Tag* markierter Proteine in der Proteinlösung. kDa: Kilodalton, M: Marker, P: Pellet, Ü: Überstand, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, 1-3: Elutionsfraktionen.

Im Chromatogramm in Abbildung 14A ließen sich drei Elutionssignale erkennen, wobei das Zielprotein den Fraktionen des Elutionssignals (2) zugeordnet wurde. Sowohl im SDS-Gel aus auch im Western Blot ließen sich deutliche Banden mit einem Molekulargewicht von ~40 kDa erkennen, welche ebenfalls dem Zielprotein mit einem Molekulargewicht von 42,816 kDa zugeordnet werden konnten. Weder in der Bahn des Pellets (P) noch in der Bahn des Überstands (Ü) wurde eine Bande auf Höhe der molekularen Masse des Zielproteins erkannt, was durch eine zu geringe Konzentration des Zielproteins in diesen Proben oder durch eine zu hohe Verdünnung der Probe verursacht worden sein könnte. Weiterhin wurden auch im Durchfluss (D) und in der Waschfraktion (W) keine Banden auf Höhe des Molekulargewichts des Zielproteins identifiziert. Die Fraktionen, welche dem Elutionssignal (1) zugeordnet werden konnten, enthielten Verunreinigungen, welche vom Zielprotein abgetrennt wurden. In den Fraktionen des Elutionssignals (3) waren lediglich schwache Banden höhermolekularer Proteine erkennbar. Im Western Blot (Abbildung 14C) wurden bereits in den Elutionsfraktionen von Signal (1) mehrere Banden sichtbar, welche sowohl einem niedrigeren, als auch vermehrt höheren Molekulargewichten zugeordnet werden konnten. Neben den deutlichen Banden des Zielproteins der Elutionsfraktionen (2) wurden ebenfalls Banden mit höherem Molekulargewicht identifiziert. Diese neben dem Zielprotein identifizierten Proteine schienen demnach sowohl eine erhöhte Affinität zur Säulenmatrix, als auch zum verwendeten Antikörper zu besitzen. Es wurde vermutet, dass es sich um Hitzeschock-Proteine oder Chaperone handelt, wobei tiefgreifende Untersuchungen zur Identifikation der Proteine an dieser Stelle nicht durchgeführt wurden. Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht in Gegenwart der *PreScission*-Protease dialysiert. Dies diente sowohl zur proteolytischen Abspaltung des His₁₀-*Tags*, als auch zur Erniedrigung der Imidazol-Konzentration im vorliegenden Proteinpuffer. Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung zentrifugiert, der Überstand dekantiert und anschließend erneut auf die Ni²⁺-NTA-Säule aufgetragen. Zur Elution an der Säule verbliebener Proteine wurde eine Schlagelution durchgeführt. Zur Kontrolle der proteolytischen Spaltung wurden die Fraktionen gesammelt und erneut mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abbildung 15), wofür ebenfalls eine ungeschnittene Proteinprobe des ersten Reinigungsschrittes aufgetragen wurde.

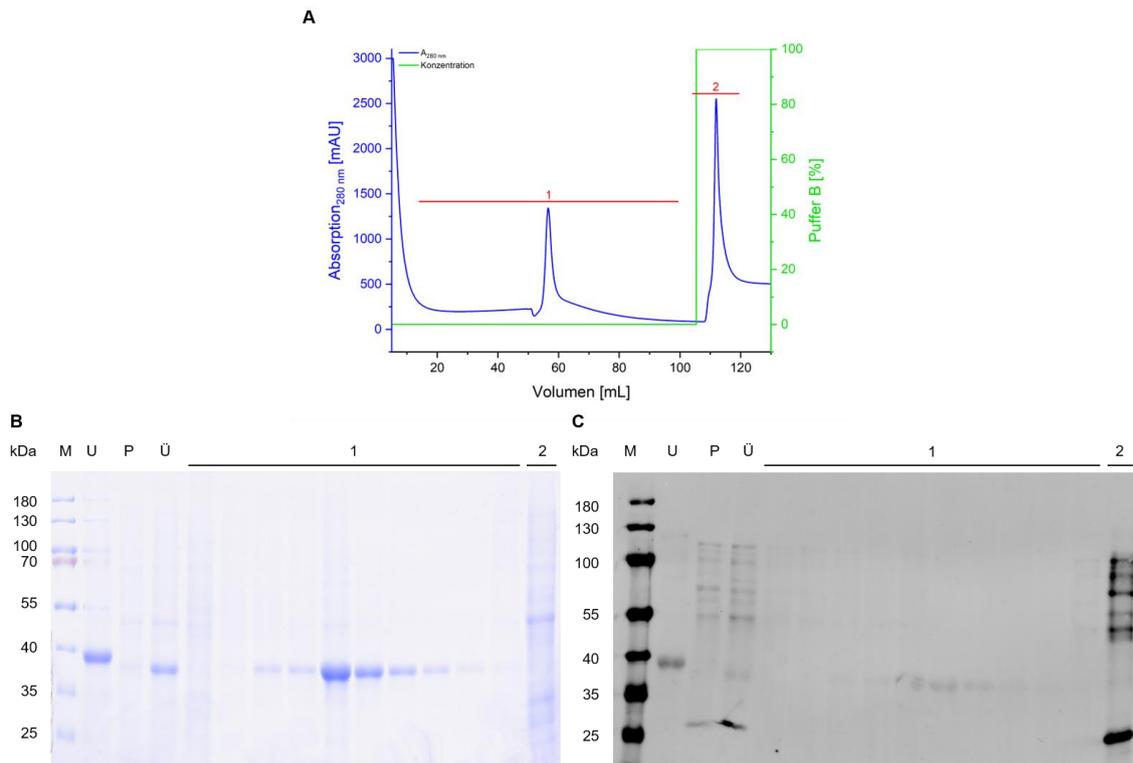


Abbildung 15: Reverse Nickel-Affinitätschromatographie von PDGFRA-T674I nach proteolytischer Spaltung und Dialyse über Nacht. Dieser Schritt diente zur Trennung von proteolytisch gespaltenem und ungespaltenem Protein. **A:** Chromatogramm des Reinigungsschritts. Blau: Absorption bei 280 nm. Grün: Prozentuale Konzentration des Elutionspuffers B. Rot (1-2): Fraktionen, welche zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot genutzt wurden. **B:** Mit Coomassie-Färbelösung gefärbtes SDS-Gel zur Analyse des Reinigungsschritts hinsichtlich der Proteinreinheit. **C:** Western Blot zum spezifischen Nachweis His-Tag tragender Proteine in der Proteinlösung. kDa: Kilodalton, M: Marker, U: Ungeschnittenes Protein, P: Pellet, Ü: Überstand, 1-2: Elutionsfraktionen.

Im Chromatogramm des zweiten Reinigungsschritts konnten zwei Bereiche unterschieden werden. Der erste Bereich zeichnete sich durch ein konstant verlaufendes UV-Signal bei ~ 250 mAU aus, welches durch einen einzigen Peak bei 60 mL und 1250 mAU getrennt wurde. Der zweite Elutionsbereich bezog sich auf das UV-Signal während der Elution mit 100 % Ni-Puffer B (Abbildung 15A). Im SDS-Gel (Abbildung 15B) war beim Vergleich der Proben von ungeschnittenem Protein (U), Pellet (P) und Überstand (Ü) nach der Dialyse eine klare Verschiebung des Molekulargewichts des Zielproteins festzustellen, was zunächst ein Zeichen für eine erfolgreiche proteolytische Spaltung darstellte. Weiterhin war in der Bahn des Pellets (P) erkennbar, dass Verunreinigungen aus der Proteinlösung entfernt werden konnten. In den Bahnen der ersten Elutionsfraktion (1) konnten klar Banden in Höhe des Molekulargewichtes von proteolytisch gespaltenem PDGFRA-T674I erkannt werden. In der Bahn der Elutionsfraktionen (2) wurden erneut sowohl Verunreinigungen mit höherem als auch niedrigerem Molekulargewicht identifiziert, welche erfolgreich vom Zielprotein abgetrennt werden konnten. Im zugehörigen Western Blot (Abbildung 15C) des Reinigungsschrittes ließ sich in der Bahn der ungeschnittenen Proteinprobe, in welcher das Zielprotein noch einen His₁₀-Tag trug, eine deutliche Bande identifizieren.

Ebenfalls wurden Banden im Pellet (P) und Überstand (Ü) beobachtet, welche bereits im ersten Reinigungsschritt beobachtet wurden. Besonders auffällig war eine Bande bei ~25 kDa, welche ebenfalls prominent in den Elutionsfraktionen (2) auftrat und der *PreScission*-Protease zugeordnet wurde. Außerdem waren auch auf Höhe des Zielproteins schwache Färbungen erkennbar, welche jedoch eine deutliche Verschiebung des Molekulargewichts verglichen zum ungeschnittenen Protein aufwiesen. Dies deutete auf eine gewisse Bindungsaffinität des geschnittenen Zielproteins zum Antikörper hin. Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, auf eine maximale Proteinkonzentration von 20 mg/mL konzentriert und auf eine Größenausschluss-Chromatographie-Säule aufgetragen. Zur Analyse wurde neben der Coomassie-gefärbten SDS-PAGE ebenfalls eine Silbergefärbung durchgeführt, da diese sensitiver als die Coomassie-Färbung ist und demnach noch minimale Verunreinigungen in der finalen Proteinlösung detektieren sollte (Abbildung 16).

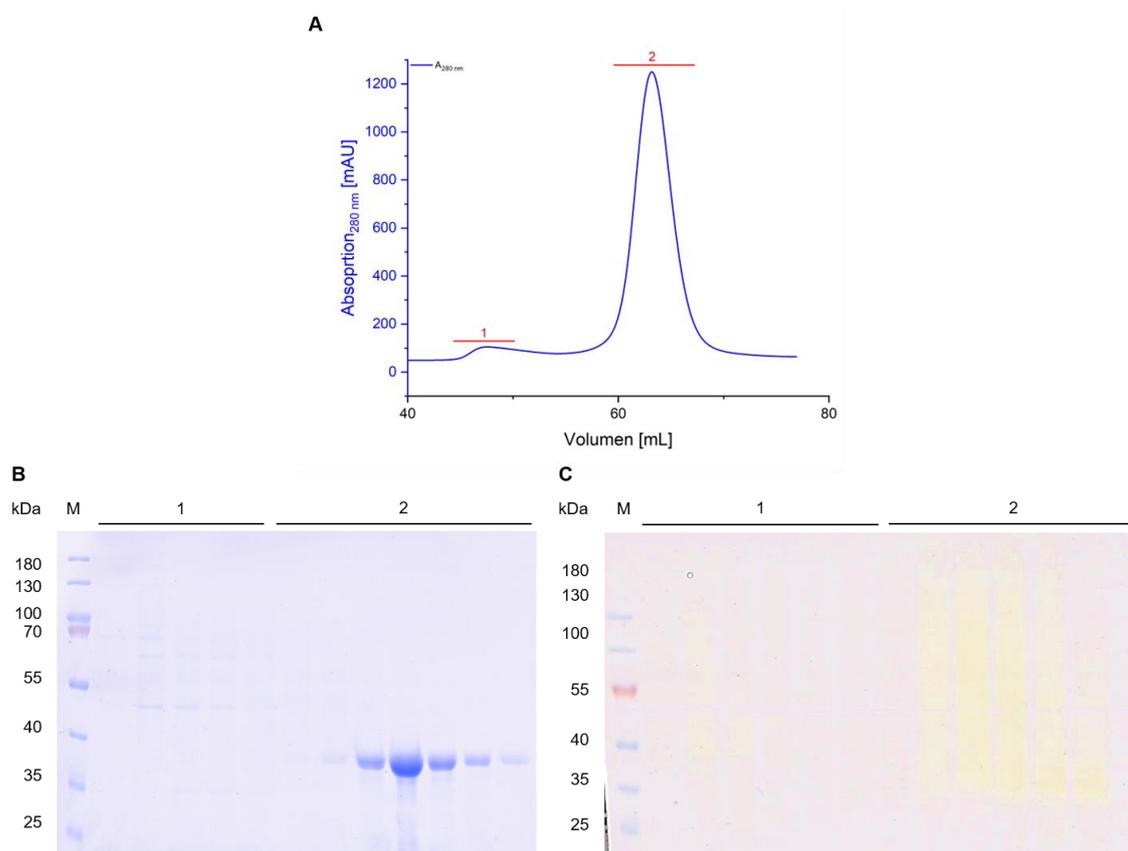


Abbildung 16: Größenausschluss-Chromatographie von PDGFRA-T674L. **A:** Chromatogramm des Reinigungsschritts. Blau: Absorption bei 280 nm. Rot (1-2): Fraktionen, welche zur Analyse mittels SDS-PAGE und Silbergefärbung genutzt wurden. **B:** Mit Coomassie-Färbelösung gefärbtes SDS-Gel zur Analyse des Reinigungsschritts hinsichtlich der Proteinreinheit. **C:** Silbergefärbung zur sensitiveren Analyse der Proteinreinheit in den Elutionsfraktionen. kDa: Kilodalton, M: Marker, 1-2: Elutionsfraktionen.

Im Chromatogramm der SEC konnten zwei Elutionsbereiche differenziert werden (Abbildung 16A). Der erste Bereich (1) zeigte lediglich einen geringen Anstieg des UV-Signals, während der zweite Elutionsbereich (2) einen deutlichen Anstieg des UV-Signals bis auf ~1300 mAU aufwies. Im Coomassie-gefärbten Gel war deutlich erkennbar, dass in den Elutionsfraktionen (1) Proteine höheren Molekulargewichts abgetrennt wurden, während sich im zweiten Elutionsbereich (2) das Zielprotein befand (Abbildung 16B). Durch die höhere Sensitivität der Silbergefärbung konnten in diesem Schritt ebenfalls Verunreinigungen eines höheren Molekulargewichts des Elutionssignals (1) identifiziert werden. Weiterhin konnten deutliche Banden in den Fraktionen des Elutionssignals (2) beobachtet werden. Insgesamt schien jedoch eine zu lange Inkubationszeit des Gels gewählt worden zu sein, da keine einzeln vorliegenden Banden erkennbar waren (Abbildung 16C). Weiterhin könnte vermutet werden, dass sich die im Coomassie-Gel identifizierten Proteine nicht ideal mit einer Silbergefärbung färben ließen. Insgesamt wurden ~0,3 mg Protein je Liter Expressionskultur erhalten. Um höhere Proteinausbeuten zu erhalten, sind Optimierungen bei der Virengeneration und Expression denkbar.

Da während der Reinigung keinerlei Präzipitation oder Ähnliches beobachtet wurde, schienen die verwendeten Pufferbedingungen akzeptabel gewesen zu sein.

Die Reinigung von PDGFRA-wt wurde analog zu PDGFRA-T674I (Anh. 6.3.1, Abbildung 75-Abbildung 77) durchgeführt. Am Ende konnte das Protein in einer vergleichbaren Reinheit erhalten werden, so dass es für Folgeexperimente eingesetzt wurde. Die Ausbeute lag mit 0,5 mg Protein pro Liter Expressionskultur geringfügig höher als die von PDGFRA-T674I. Auch hier könnten zukünftig Optimierungsansätze bei der Virengenerierung und der Proteinexpression verfolgt werden, um die Proteinausbeute zu steigern. Die Proteinidentität wurde nach der Reinigung mittels HPLC-gekoppelter ESI-MS (Abbildung 17) validiert und erste Kristallisationsansätze wurden durchgeführt. In den dekonvolutierten Massenspektren sind sowohl die berechneten Massen des apo-Proteins (MW_{calc}), als auch ein- und zweifach phosphorylierte Protein-Spezies erkennbar, welche eine Massenverschiebung um jeweils ~80 Da hervorruft.

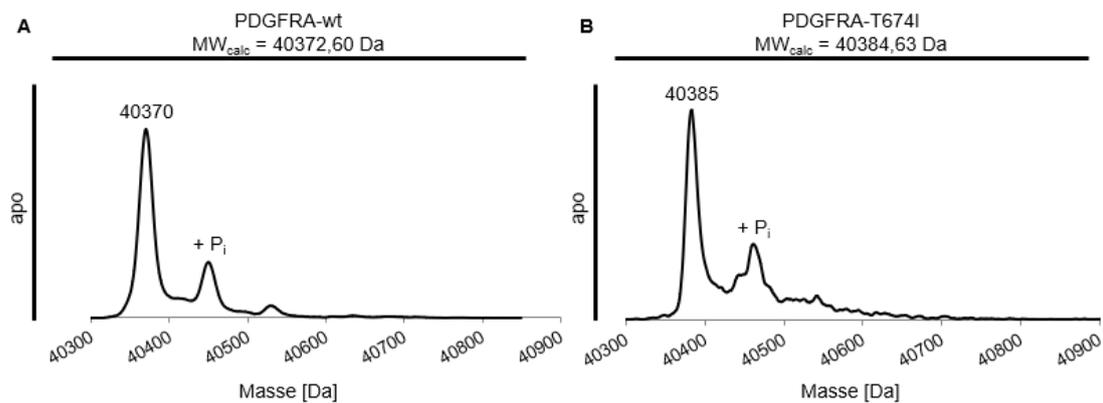


Abbildung 17: Dekonvolutierte ESI-Massenspektren von PDGFRA-wt und -T674I. **A:** Dekonvolutierte Massenspektren des apo PDGFRA-wt nach der Reinigung mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 40372,60 Da. **B:** Dekonvolutierte Massenspektren des apo PDGFRA-T674I nach der Reinigung mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 40384,63 Da. MW_{calc}: kalkuliertes Molekulargewicht des zugehörigen Zielproteins, Da: Dalton. Zusätzlich angegeben sind die gemessenen Molekulargewichte der Proteine.

3.4.3 Etablierung eines Kristallisationssystems für PDGFRA-wt

Für das Struktur-basierte Wirkstoffdesign werden dreidimensionale Strukturen von Zielproteinen benötigt. Dafür sind Methoden wie z. B. die Proteinkristallisation oder Elektronenmikroskopie unabdingbare Werkzeuge. Für die Etablierung eines Kristallisationssystems für PDGFRA-wt wurde zunächst versucht, bereits publizierte Kristallisationsbedingungen nachzustellen (PDB-IDs: 5K5X, 6A32, 6JOI). Dafür wurde sowohl das Liganden-ungebundene Protein (apo) eingesetzt, aber auch Protein verwendet, welches mit einem dreifachen Überschuss unterschiedlicher Liganden für eine Stunde auf Eis vorinkubiert wurde. Zusätzlich wurden die Salz- und die Präzipitant-Konzentrationen variiert, um einen erweiterten Bereich der Literatur-beschriebenen Bedingungen abzudecken. Die Proteinkonzentration wurde zwischen 5 mg/mL und 10 mg/mL variiert. Für die erfolgreiche Proteinkristallisation spielt ebenfalls die Homogenität der Proteinlösung eine entscheidende Rolle. Da in den Massenspektren neben der apo-Masse ebenfalls Massen von Phospho-Spezies der Proteine identifiziert werden konnten, wurde für einige der Kristallisationsexperimente von PDGFRA-wt eine Dephosphorylierung mit λ -Phosphatase über Nacht mit anschließender SEC zur Entfernung der Phosphatase durchgeführt (Abbildung 18). Die Dephosphorylierung wurde mittels HPLC-gekoppelter ESI-MS geprüft. Das auf diese Weise dephosphorylierte Protein wird folgend als PDGFRA-wt^{dephospho} bezeichnet. Weitere Optimierungsversuche wurden bereits in der eigenen Masterarbeit durchgeführt und beinhalteten sowohl *Screening*- als auch *Seeding*-Experimente,⁶ da während der Kristallisationsexperimente überwiegend kristalline Nadelcluster generiert werden konnten (Abbildung 18B).^[122] Hier ließen sich lediglich Präzipitatbildung oder klare Tropfen, aber keine signifikanten Verbesserungen des Kristallwachstums erzielen.

⁶ Durchgeführt von A. Teuber im Rahmen ihrer Masterarbeit (AG Rauh, TU Dortmund).

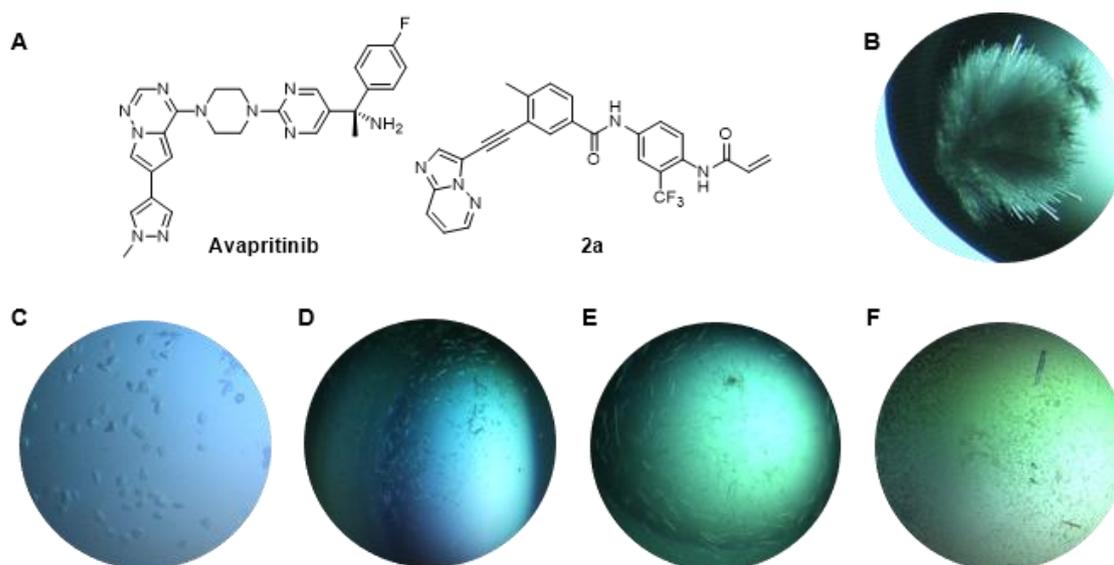


Abbildung 18: 2D-Strukturen und Kristallbilder der zur Co-Kristallisation verwendeten Liganden Avapritinib und 2a. **A:** Chemische Strukturen von Avapritinib und **2a**. **B:** Kristallnadeln von apo-PDGFRΑ-wt. 10 mg/mL, 12 °C, 17 % PEG3350, 100 mM Bis-Tris-Propan, pH 7,5 (basierend auf PDB-ID: 6A32). **C:** Kristallmorphologien nach Co-Kristallisation mit **2a**. 10 mg/mL, 20 °C, 300 mM KCl (basierend auf PDB-ID: 5GRN). **D:** Kristallnadeln nach Co-Kristallisation von PDGFRΑ-wt^{dephospho} mit Avapritinib. 5 mg/mL, 20 °C, 10 % PEG3350, 125 mM KCl, pH 5,8 (basierend auf PDB-ID: 5GRN). **E:** Kristallnadeln nach Co-Kristallisation von PDGFRΑ-wt^{dephospho} mit Avapritinib. 10 mg/mL, 20 °C, 18 % PEG3350, 150 mM KCl, pH 7 (basierend auf 5GRN). **F:** Orthorhombische Stäbchen nach Co-Kristallisation von PDGFRΑ-wt^{dephospho} mit Avapritinib. 7,5 mg/mL, 20 °C, 13 % PEG3350, 150 mM KCl, 100 mM HEPES, pH 7,5.

Im Zuge der Optimierungsversuche der Kristallisation von PDGFRΑ-wt wurden unterschiedliche Kristallmorphologien beobachtet. Während bei der Kristallisation des apo-Proteins stark aggregierte Nadelcluster mit vereinzelt, großen Nadeln (Abbildung 18B) erhalten wurden, konnten bei der Co-Kristallisation mit **2a** kleine, verwachsene Morphologien (Abbildung 18C) identifiziert werden, welche sich jedoch nicht fischen ließen und nach ca. zehn Tagen wieder in Lösung gegangen waren. Daher sollte hier unmittelbar nach der Beobachtung der nicht klar identifizierbaren Morphologien bei neuen Experimenten direkt auf Protein- oder Salzkristallisation z. B. mit einem UV-Mikroskop getestet werden. Für die in Abbildung 18B gezeigten Nadelcluster konnte eine einzelne, lange Nadel mithilfe von *picking tools* vom Cluster getrennt und anschließend gefischt werden. Der Kristall wurde am Synchrotron vermessen und ein Datensatz konnte aufgenommen werden. Nach der Prozessierung dieses Datensatzes konnten für PDGFRΑ-wt eine neue Raumgruppe und auch Zellkonstanten ermittelt werden (Abbildung 19B, C). Am vielversprechendsten an dieser Stelle erschien die Co-Kristallisation mit Avapritinib, da neben feinen Kristallnadeln (Abbildung 18D, E) auch orthorhombische Stäbchen gewachsen waren (Abbildung 18F). Auch hier wurde ein Datensatz aufgenommen, der aufgrund der prägnanten Eisinge und der damit einhergehenden unzureichenden Diffraktion bis lediglich $\sim 3,5$ Ångström nicht prozessiert werden konnte (Abbildung 19A).

Die Reproduktion dieser Kristalle erwies sich als schwierig. Durch die geringe Anzahl an Co-Kristallen konnte zudem kein geeignetes cryo-Reagenz zur Schützung der Kristalle vor Eisbildung unmittelbar vor dem Einfrieren gefunden werden.

Aufbauend auf den gefundenen Kristallisationsbedingungen wurden weitere Kristallisationsexperimente zur Optimierung durchgeführt, die jedoch erfolglos blieben. Auch für PDGFRA-wt^{dephospho} wurden weitere Optimierungsversuche durchgeführt, die jedoch ebenfalls kein verbessertes Kristallwachstum zeigten.

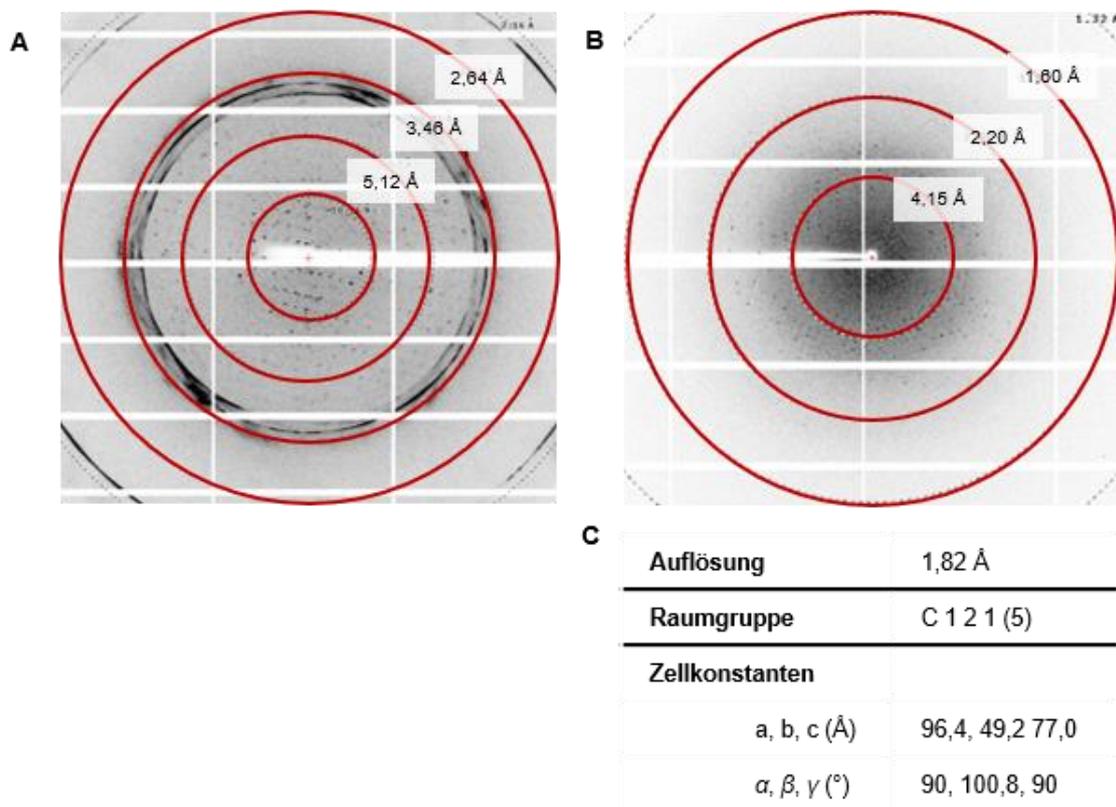


Abbildung 19: Difraktionsbilder von apo PDGFRA-wt und im Komplex mit Avapritinib. **A:** Beispielhaftes Difraktionsbild des Co-Kristalls von PDGFRA-wt mit Avapritinib. Sichtbar ist eine starke Vereisung des Kristalls mit einer Proteindiffraktion bis max. 3,5 Å. **B:** Beispielhaftes Difraktionsbild mit Proteindiffraktion bis ~2,2 Å. **C:** Erhaltene Auflösung, Raumgruppe und Zellkonstanten des apo PDGFRA-wt Datensatzes.

3.4.4 Etablierung eines Kristallisationssystems für PDGFRA-T674I

3.4.4.1 Co-Kristallisation von PDGFRA-T674I

Für PDGFRA-T674I sollten ebenfalls geeignete Kristallisationsbedingungen gefunden und etabliert werden. Auch an dieser Stelle wurden zunächst Literatur-bekannte Bedingungen (PDB-ID: 5GRN) nachgestellt. Zusätzlich erfolgte die Durchmusterung von 672 Bedingungen in kommerziell erhältlichen Hochdurchsatz-Screens (JCSG Core Suite I-IV und PEGs I-II, NeXtal Biotech, MemGold I, Molecular Dimensions) zur Identifikation neuer geeigneter Kristallisationsbedingungen. Dabei konnte eine Vielzahl neuer Konditionen ausgemacht werden. Bevorzugt wurden hierbei höhermolekulare PEGs (PEG3000–8000) mit einer Konzentration von 15-30 % (w/v) als Präzipitationsmittel, meist in Kombination mit 100 mM Puffern, wie z. B. Tris, CHES, Bicine und HEPES. Seltener wurden Puffersysteme mit pH-Werten unterhalb des physiologischen pH-Werts gefunden. Die vielversprechendsten Bedingungen sollten dann in *Fine Screens* übersetzt werden.

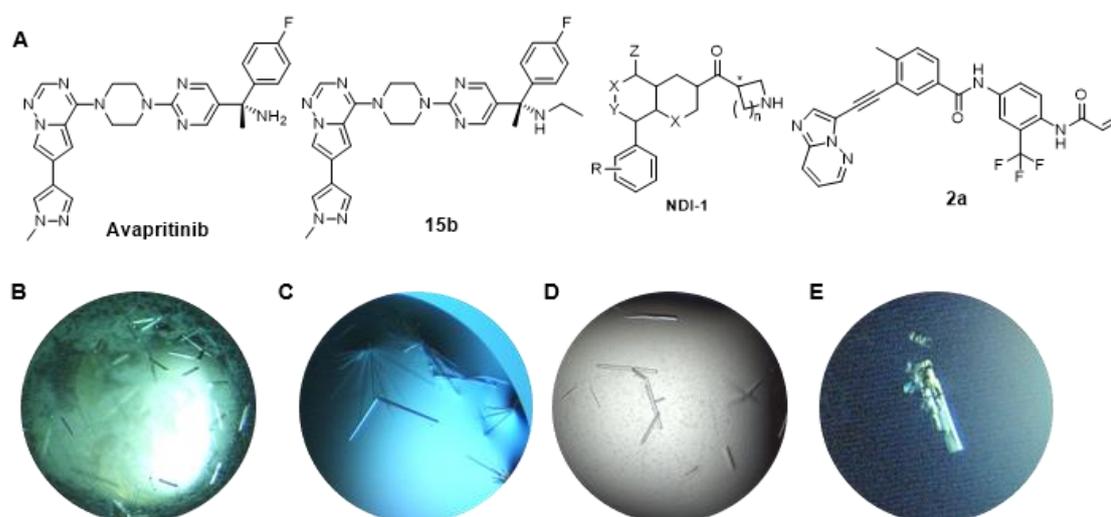


Abbildung 20: 2D-Strukturen der zur Co-Kristallisation verwendeten Liganden Avapritinib, 15b, NDI-1 und 2a und Kristallbilder. **A:** Chemische Strukturen von Avapritinib, **15b**, **NDI-1** und **2a**. **B:** Co-Kristalle von PDGFRA-T674I in Komplex mit Avapritinib. 10 mg/mL, 20 °C, 13 % PEG3350, 200 mM KCl (basierend auf PDB-ID: 5GRN). **C:** Orthorhombische Co-Kristalle nach Co-Kristallisation mit Avapritinib-Derivat **15b**. 5 mg/mL, 20 °C, 5 % PEG1000, 200 mM KCl (Bedingungen aus dem PEGs I-Screen, NeXtal Biotech). **D:** Orthorhombische Stäbchen nach Co-Kristallisation mit NDI-1. 7,5 mg/mL, 20 °C, 25 % PEG1000, 100 mM Tris, pH 8,5 (Bedingungen aus dem PEGs I-Screen, NeXtal Biotech). **E:** Co-Kristall mit **2a**. 5 mg/mL, 20 °C, 18 % PEG3350, 100 mM KCl (basierend auf PDB-ID: 5GRN).

Bereits in den ersten Kristallisationsexperimenten mit PDGFRA-T674I konnten Kristalle mit publizierten Kristallisationsbedingungen erhalten werden, wobei diese meist eine orthorhombisch-stäbchenförmige Morphologie aufwiesen (Abbildung 20B-D). Besonders auffällig war die häufig auftretende Kristallisation am Rand des Tropfens, wo meist mehrere Stäbchen zu Clustern zusammengewachsen waren (Abbildung 20C).

Weiterhin konnte beobachtet werden, dass in Abhängigkeit der gewählten Bedingungen ausgefallenes Protein in Form von unlöslichem Präzipitat neben den Kristallen in den Tropfen vorlag (Abbildung 20B). Im Falle des auf Ponatinib-basierenden Typ IIa-Inhibitors **2a** wuchs ein großer, verwachsener Kristall, der beim Fischen mithilfe von *picking tools* in kleinere Fragmente gebrochen wurde (Abbildung 20E). Ebenfalls gefischt wurden die Kristalle aus den weiteren Tropfen, welche schließlich für die Aufnahme von Datensätzen am Synchrotron vermessen wurden. Die erhaltenen Zellparameter der Co-Kristallstruktur von PDGFRA-T674I in Komplex mit **2a** waren vergleichbar mit denen der bereits publizierten Struktur von PDGFRA-wt im Komplex mit dem Typ IIa-Inhibitor Imatinib (PDB-ID: 6JOL, Abbildung 21A, C). Weiterhin waren ebenfalls die Zellparameter der erhaltenen Kristallstruktur von PDGFRA-T674I im Komplex mit Avapritinib vergleichbar mit den Zellparametern einer publizierten Co-Kristallstruktur von PDGFRA-wt im Komplex mit dem Typ I-Inhibitor Crenolanib (Abbildung 21B, D). Dies deutete darauf hin, dass in Abhängigkeit des Inhibitortyps unterschiedliche Anordnungen der Moleküle im Kristall während des Kristallisationsvorgangs entstehen können.

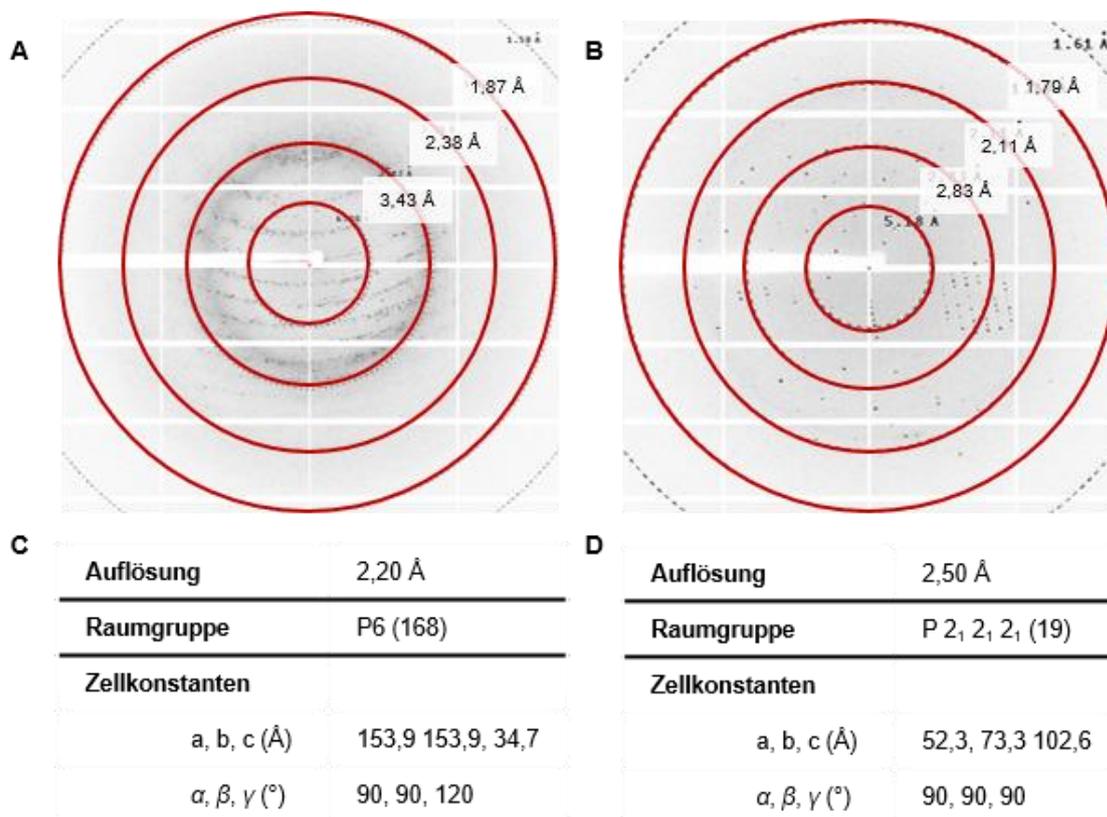


Abbildung 21: Diffractionsbilder von PDGFRA-T674I im Komplex mit **2a und Avapritinib und erhaltene Zellparameter.** **A:** Beispielhaftes Diffractionsbild des Co-Kristalls von PDGFRA-T674I mit **2a**. Sichtbar ist eine Proteindiffraction bis $\sim 2,3$ Å. **B:** Beispielhaftes Diffractionsbild des Co-Kristalls von PDGFRA-T674I mit Avapritinib mit sichtbarer Proteindiffraction bis $\sim 2,2$ Å. **C:** Erhaltene Auflösung, Raumgruppe und Zellkonstanten des Datensatzes von PDGFRA-T674I im Komplex mit **2a**. **D:** Erhaltene Auflösung, Raumgruppe und Zellkonstanten des Datensatzes von PDGFRA-T674I im Komplex mit Avapritinib.

Lediglich für die Co-Kristalle aus dem in Abbildung 20D gezeigten Kristallisationstropfen konnte kein lösbarer Datensatz erhalten werden, da eine stark anisotrope Diffraktion vorlag. Da eine Reproduktion der Kristalle in *Fine Screens* nicht möglich war, wurden *Soaking*-Experimente durchgeführt, welche im nächsten Kapitel beschrieben werden.

3.4.4.2 *Soaking*-Experimente von PDGFRA-T674I

Da es im Fall von NDI-1 und dessen Derivaten nicht möglich war für Diffraktionsexperimente geeignete Co-Kristalle zu generieren, wurden *Soaking*-Experimente durchgeführt. Dafür wird ausgenutzt, dass Proteinkristalle einen hohen Wasseranteil enthalten und Liganden durch die Wasserkanäle im Kristall diffundieren können. An dieser Stelle musste beachtet werden, welcher Inhibitortyp in den Kristall eingebracht werden sollte. Bereits während der eigenen Masterarbeit wurden für KIT-wt Kristalle des apo-Proteins erhalten, wobei die Kinase eine auto-inhibierte DFG-out-Konformation aufwies. Bei durchgeführten *Soaking*-Experimenten sowohl mit Typ I- als auch mit Typ IIa-Inhibitoren in diese Kristalle von apo KIT-wt wurde beobachtet, dass keine Konformationsänderung ausgehend vom apo-Zustand durchlaufen wurde und somit keine Ligandenbindung identifiziert werden konnte.^{7,[121]} Deshalb wurden für das *Soaking* von NDI-1 Co-Kristalle von PDGFRA-T674I in Komplex mit Avapritinib verwendet. Die Kristalle wurden gefischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und am Synchrotron vermessen. Bei der folgenden Datenprozessierung fiel auf, dass die Kristalle eine Anisotropie aufwiesen, welche mit den *ungesoakten* Co-Kristallen nicht beobachtet wurde. Das Diffraktionslimit konnte mithilfe des *STARANISO server* (Global Phasing Ltd.) festgelegt und die Daten schließlich prozessiert werden.

⁷ Durchgeführt von A. Teuber (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen ihrer Masterarbeit. Veröffentlicht in der Doktorarbeit von Dr. I. Landel (AG Rauh, TU Dortmund).

3.4.5 Konstruktdesign der KIT-Kristallisationskonstrukte

Die Genkonstrukte von KIT-wt sowie der Türsteher-Mutante KIT-T670I basierten ebenso wie die PDGFRA-Konstrukte auf einer bereits publizierten Kristallstruktur (PDB-ID: 6GQK).^[123] Die Gensequenz des Wildtyp-Proteins wurde für die Expression in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen Codon-optimiert und zusammen mit der katalytischen Domäne der Tyrosinphosphatase YopH aus *Yersinia enterocolitica* in einen pCDFDuet-1-Vektor kloniert.^{8,[120, 121, 124, 125]} Die Phosphatase sollte ko-exprimiert werden, um die Auto-Phosphorylierung und -Aktivierung von KIT in *E. coli* und die damit verbundene Phosphorylierung intrazellulärer Substrate zu verhindern, was potenziell toxisch sein könnte und dadurch die Expression unterdrücken würde.^[124] Die Kinasedomäne selbst beinhaltete die Aminosäuren 550-934, wobei die Kinase-Insertions-Schleife (Aminosäuren 688-765) durch die Aminosäuresequenz EFVPYKVAPEDLYKDFLT ersetzt wurde.^[123] Zusätzlich wurden Mutationen in die Gensequenz eingebracht, die für die Kristallisation als vorteilhaft erachtet wurden (Abbildung 22, Anh. 6.2.1).^[126] GAJIWALA *et al.* führten zudem biochemische Studien bezüglich der Deletion der Kinase-Insertions-Schleife hinsichtlich ihres Einflusses auf die Aktivität von Inhibitoren durch. Es konnte festgestellt werden, dass diese keinen Einfluss auf die Inhibitoraktivität hatte und demnach, wie im Konstruktdesign durchgeführt, deletiert und durch eine verkürzte Linkersequenz ersetzt werden konnte.^[102] Weiterhin verfügten die Konstrukte über einen N-terminalen His₆-Tag zur Reinigung mittels Nickel-Affinitätschromatographie, sowie über eine Spaltstelle für die Thrombin-Protease, um den Affinitäts-Tag vor der Kristallisation abspalten zu können. Die Mutation von Threonin an Position 670 zu Isoleucin wurde mittels ortsgerichteter Mutagenese durchgeführt. Die Reinigung erfolgte analog zu dem in Abbildung 13 gezeigten Schema. Zusätzlich wurden weitere KIT-Mutanten während dieser Arbeit im pCDFDuet-1-Vektor dargestellt und sowohl Testexpressionen als auch Zellaufschlüsse durchgeführt, um bei der folgenden Analyse per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung zwischen löslichem und unlöslichem Zielprotein unterscheiden zu können. Da hier jedoch lediglich unlösliches Protein erhalten wurde, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit KIT-wt und KIT-T670I gearbeitet.

⁸ Dargestellt von L. Kröll (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seiner Bachelorarbeit. Veröffentlicht in der Doktorarbeit von Dr. I. Landel (AG Rauh, TU Dortmund).

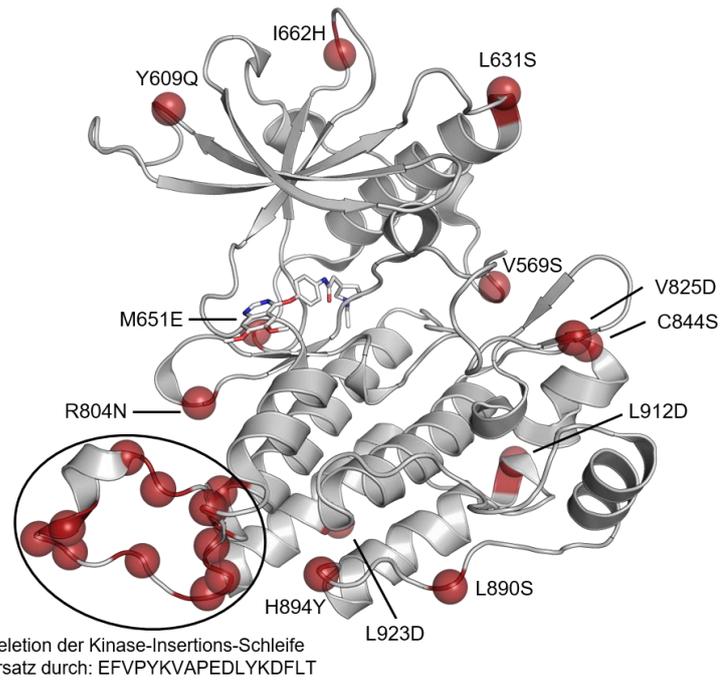


Abbildung 22: Graphische Darstellung des KIT-Kristallisationskonstrukts. Rot: in der Kinasedomäne eingeführte Mutationen von ZHANG *et al.* zur Verbesserung des Kristallisationsprozesses. Der mit einem Oval markierte Bereich zeigt die Deletion der Kinase-Insertions-Schleife und den Ersatz durch eine Aminosäure-Sequenz an.

3.4.6 Etablierung der Reinigungsprotokolle

Die Reinigung der beiden KIT-Konstrukte verlief unter identischen Bedingungen. An dieser Stelle wird lediglich die Reinigung von KIT-T670I dargestellt, da das Protokoll des Wildtyp-Proteins bereits in der Doktorarbeit von Dr. Ina Landel enthalten ist.^{9,[121]} Die entsprechenden Gele und Chromatogramme befinden sich im Anhang 6.3.2. Nach dem Zellaufschluss wurde das Lysat zentrifugiert und anschließend filtriert, um verbliebene Schwebstoffe vor dem Auftragen auf die Säule zu entfernen. Das Lysat wurde für den ersten Reinigungsschritt auf eine Ni²⁺-NTA-Säule geladen und anschließend mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution des Proteins erfolgte über einen linearen Gradienten der Imidazol-Konzentration von 0-50 % des Elutionspuffers und einer anschließenden Schlagelution, um an der Säule verbliebene Proteine zu eluieren (Abbildung 23).

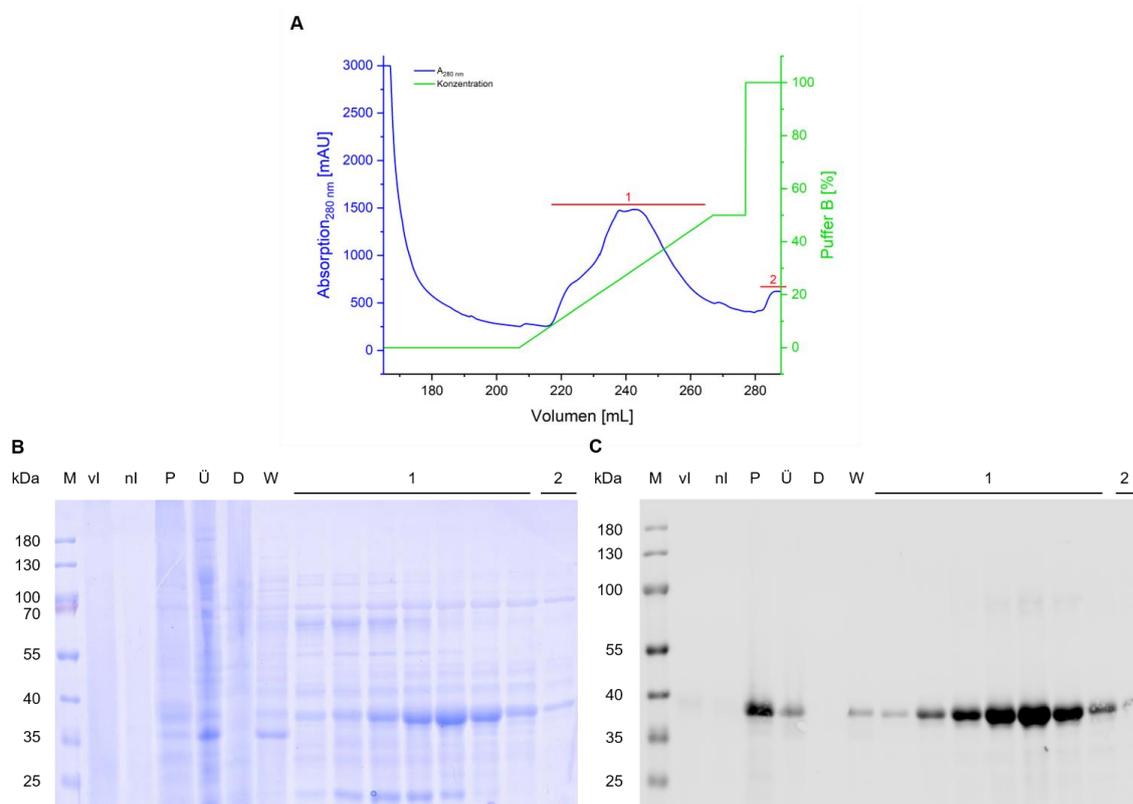


Abbildung 23: Erste Nickel-Affinitätschromatographie von KIT-T670I. **A:** Chromatogramm des ersten Reinigungsschrittes. Blau: Absorption bei 280 nm, Grün: Konzentration des Elutionspuffers, Rot: Fraktionen zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot. **B:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel zur Analyse der eluierten Proteinfraktionen. **C:** Western Blot zum Nachweis His-getaggt Proteine in den Elutionsfraktionen. kDa: Kilodalton, M: Marker, vl: vor Induktion, nl: nach Induktion, P: Pellet, Ü: Überstand, D: Durchfluss, W: Waschfraktion. 1-2: Elutionsfraktionen.

⁹ Etabliert von A. Teuber (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen ihrer Masterarbeit. Veröffentlicht in der Doktorarbeit von Dr. I. Landel (AG Rauh, TU Dortmund).

Im Chromatogramm (Abbildung 23A) ließen sich zwei Elutionssignale erkennen, eines bei ~210-270 mL und eines nach der Schlagelution mit 100 % Imidazol bei ~280-300 mL. Auf dem Coomassie-gefärbten SDS-Gel (Abbildung 23B) waren in den Bahnen vor und nach der Induktion (vI bzw. nI) keine deutlichen Banden identifizierbar. Das könnte auf eine zu hohe Verdünnung der zuvor angesetzten Proben hindeuten. Sowohl im Pellet (P) als auch im Überstand (Ü) und der Waschfraktion (W) ließen sich zwei deutliche Banden bei je ~40 kDa und 35 kDa erkennen, welche dem Zielprotein KIT-T670I (39,044 kDa) und der Phosphatase YopH (33,5 kDa) zugeordnet wurden. Der Grund für unlösliches Protein könnte eine mögliche Toxizität des Zielproteins oder eine fehlerhafte Proteinfaltung sein. Es fiel auf, dass in der Waschfraktion deutlich mehr YopH relativ zum Zielprotein von der Säule gewaschen wurde, da die YopH-Phosphatase keinen *His-Tag* trug. Sowohl in den Elutionsfraktionen des ersten und des zweiten Elutionssignals konnten Banden auf Höhe des Molekulargewichts von KIT-T670I identifiziert werden, was auf eine erfolgreiche Expression hindeutete. Auch im Western Blot (Abbildung 23C) wurden deutliche Banden auf einer Höhe von ~40 kDa ausgemacht, welche die Anwesenheit des Zielproteins bestätigten. Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht in Gegenwart von Thrombin zur proteolytischen Abspaltung des *His₆-Tags* und zur Verringerung der Imidazol-Konzentration in der Proteinlösung dialysiert. Am nächsten Tag wurde die Lösung zentrifugiert, woraufhin erneut eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie folgte, um geschnittenes Protein von ungeschnittenem abzutrennen (Abbildung 24). Dann wurde ein schrittweiser Gradient von 0-30 % und von 30-50 % Elutionspuffer eingestellt. Zum Schluss wurde erneut eine Schlagelution mit 100 % Elutionspuffer durchgeführt. Für die Analyse der Elutionsfraktionen mithilfe eines SDS-Gels und Western Blot wurde zur Überprüfung der proteolytischen Spaltung ebenfalls eine Probe des ungeschnittenen Proteins verwendet.

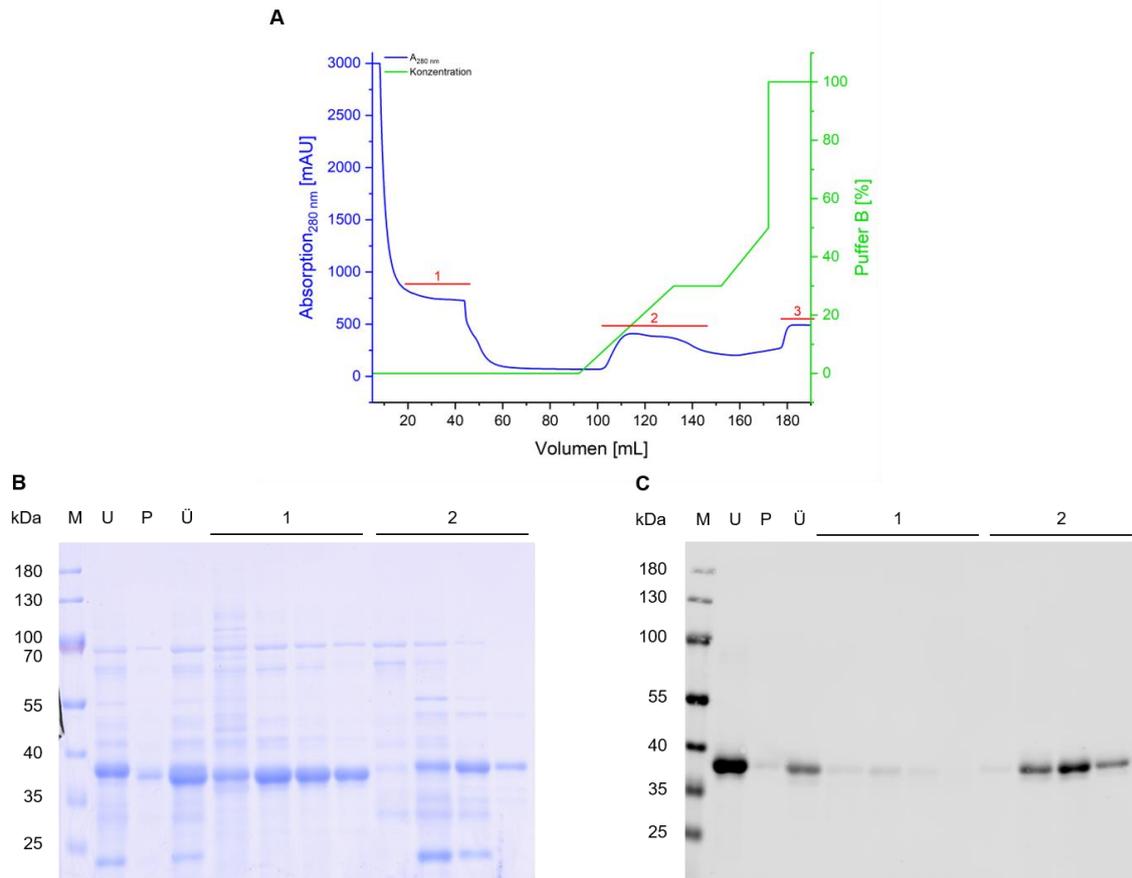


Abbildung 24: Zweite Nickel-Affinitätschromatographie von KIT-T670I nach proteolytischer Spaltung. A: Chromatogramm des zweiten Reinigungsschritts. Blau: Absorption bei 280 nm, Grün: Prozentuale Konzentration des Elutionspuffers, Rot: für die Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot gesammelte Fraktionen. **B:** Coomassie-gefärbtes SDS-Gel der Elutionsfraktionen. **C:** Western Blot der Elutionsfraktionen. kDa: Kilodalton, M: Marker, U: Probe des ungeschnittenen Proteins, P: Pellet, Ü: Überstand, 1–3: gesammelte Elutionsfraktionen.

Im Chromatogramm (Abbildung 24A) des zweiten Reinigungsschritts konnten drei Bereiche unterschieden werden. Beim Vergleich der ungeschnittenen Proteinprobe (U) mit der Probe des Pellets (P) und des Überstands (Ü) nach der Dialyse ließ sich sowohl ungeschnittenes als auch geschnittenes Protein nach der proteolytischen Spaltung des His₆-Tags in der Proteinlösung indentifizieren (Abbildung 24B). Dies wurde an zwei sehr nah beieinander liegenden Banden bei ~40 kDa ersichtlich, während diese in der Probe des ungeschnittenen Proteins lediglich als eine Bande erkennbar war. Weiterhin auffällig war, dass noch viele Verunreinigungen in der Proteinlösung vorlagen. In den Elutionsfraktionen (1) schienen überwiegend höhermolekulare Proteine als Verunreinigungen vorzuliegen, während in den Elutionsfraktionen (2) ebenfalls niedermolekulare Proteine identifiziert werden konnten. Beim Vergleich der Elutionsfraktionen ließ sich erkennen, dass im ersten Bereich geschnittenes Protein fraktioniert wurde, was durch eine leichte Verschiebung zu einem niedrigeren Molekulargewicht deutlich wurde, während im zweiten Bereich noch deutliche Banden des ungeschnittenen Proteins erkennbar waren.

An dieser Stelle der Analyse waren zwei Erklärungen denkbar: einerseits könnte die eingesetzte Thrombin-Menge unzureichend gewesen sein, andererseits könnte das Protein anteilig fehlgefaltet vorgelegen haben, sodass es zwar an das Säulenmaterial binden konnte, aber die Schnittstelle nicht zugänglich für Thrombin war. Im Western Blot (Abbildung 24C) ließ sich ebenfalls deutlich erkennen, dass in der Proteinlösung nach der Dialyse noch ungeschnittenes Protein vorhanden war.

Die das geschnittene Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt, auf eine maximale Proteinkonzentration von 20 mg/mL konzentriert und für einen letzten Reinigungsschritt auf eine SEC-Säule aufgetragen. Zusätzlich zur Analyse mittels Coomassie-Färbung wurde eine Silbergefärbung durchgeführt (Abbildung 25C).

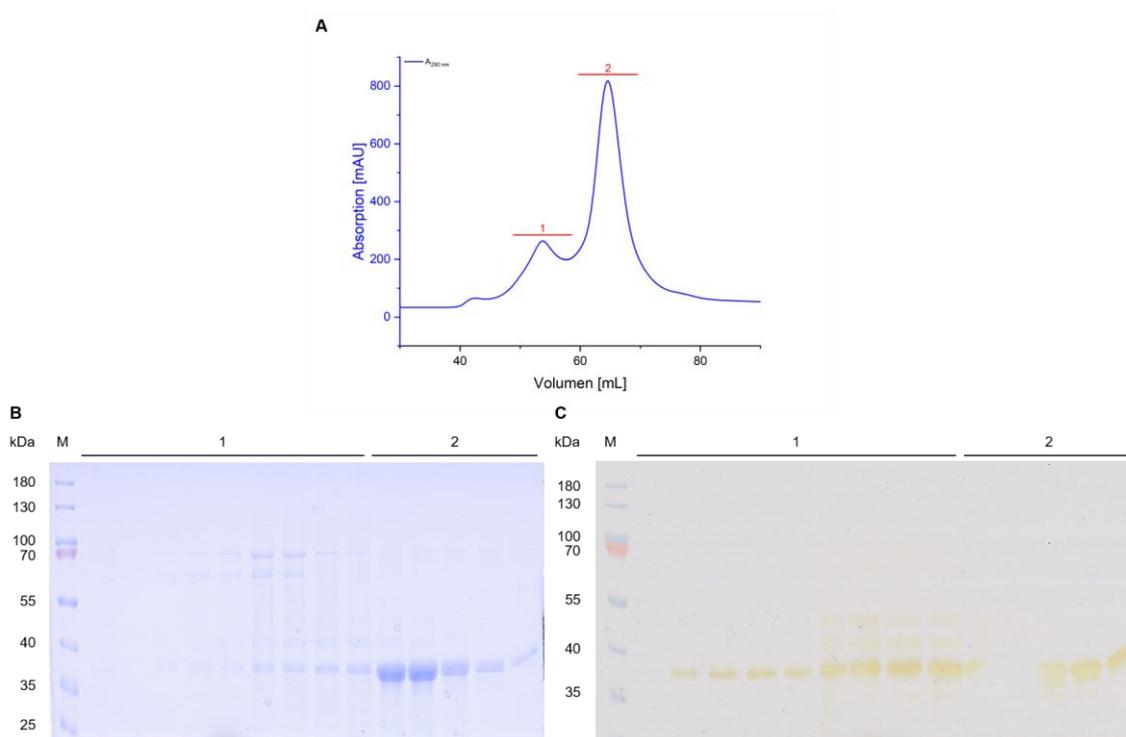


Abbildung 25: Größenausschluss-Chromatographie von KIT-T670I. A: Chromatogramm des letzten Reinigungsschrittes. Blau: Absorption bei 280 nm, Rot: Fraktionen für die Analyse mittels SDS-PAGE. B: Coomassie-gefärbtes SDS-Gel des letzten Reinigungsschrittes. C: Silber-gefärbtes SDS-Gel des letzten Reinigungsschrittes. kDa: Kilodalton, M: Marker, 1-2: Gesammelte Fraktionen zur Analyse mittels SDS-PAGE.

Im Chromatogramm (Abbildung 25A) des letzten Reinigungsschrittes konnten zwei Signale identifiziert werden, die bei einem Volumen von ~60 mL überlagerten. Im Coomassie-gefärbten Gel konnten in den Fraktionen des ersten Signals (1) vor allem höhermolekulare Verunreinigungen, aber auch Banden auf Höhe des Zielproteins identifiziert werden. Diese deuteten auf mögliche Oligomere des Zielproteins im Puffer hin, welche jedoch erfolgreich abgetrennt werden konnten.

In den Fraktionen des zweiten Signals (2) ließen sich vor allem Banden identifizieren, die dem Zielprotein KIT-T670I mit einem Molekulargewicht von 37,162 kDa zugeordnet wurden. Weiterhin erkennbar waren Proteinbanden mit einem höheren Molekulargewicht. Durch die Silbergefärbung (Abbildung 25C) war erkennbar, dass nur minimale Verunreinigungen des Zielproteins vorlagen, weshalb es für Folgeexperimente inklusive Massenspektrometrie und Kristallisation genutzt wurde.

Die Reinigung von KIT-wt wurde analog zu der Türsteher-Mutante KIT-T670I durchgeführt. Auffällig beim Vergleich der Reinigungen war, dass bei KIT-wt ein wesentlich geringerer Anteil des Proteins nach der Dialyse ungeschnitten vorlag. Insgesamt ließ sich jedoch in beiden Reinigungsprotokollen eine Optimierung der proteolytischen Spaltung als notwendig bewerten. Mit 2 mg/L Expressionskultur bei KIT-wt lag die Ausbeute ca. zehn Mal höher als die von KIT-T670I, wobei lediglich 0,2 mg/L Expressionskultur isoliert werden konnten. Weitere Optimierungsversuche hinsichtlich Expression und Reinigung wären daher denkbar. Da die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ausbeuten jedoch für die Kristallisation hinreichend waren, wurde dies nicht weiterverfolgt. Die Identität der Zielproteine wurde zunächst mittels HPLC-gekoppelter ESI-MS geklärt (Abbildung 26), in deren entfalteten Spektren die kalkulierten Molekulargewichte der apo-Proteine (MW_{calc}) detektiert werden konnten. Im Vergleich zu den PDGFRA-Konstrukten wurden hier keine Phospho-Spezies der Proteine beobachtet, was aufgrund der Co-Expression mit der katalytischen Domäne von YopH erwartet wurde.

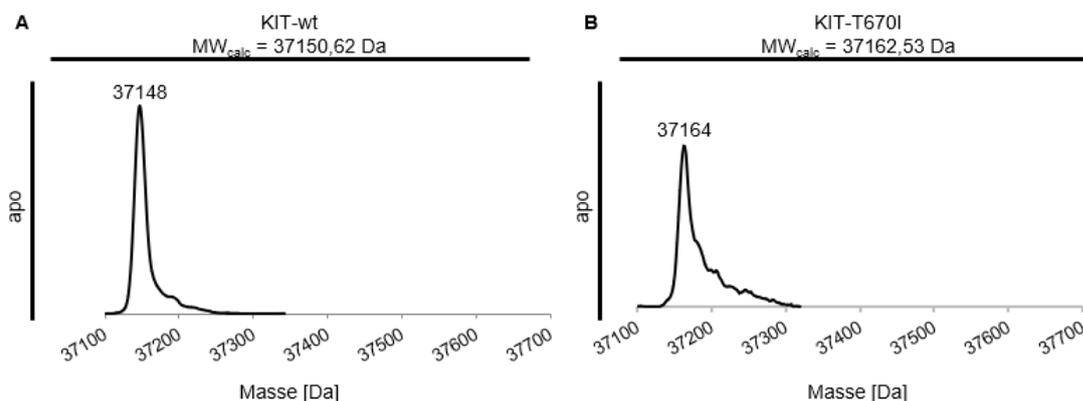


Abbildung 26: Dekonvolutierte ESI-Massenspektren von KIT-wt und KIT-T670I. A: Dekonvolutierte Massenspektren des apo KIT-wt nach der Reinigung mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 37150,62 Da. B: Dekonvolutierte Massenspektren des apo KIT-T670I nach der Reinigung mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 37162,53 Da. MW_{calc} : kalkuliertes Molekulargewicht des zugehörigen Zielproteins. Zusätzlich angegeben sind die gemessenen Molekulargewichte der Proteine.

3.4.7 Thermal Shift Assay (TSA) mit KIT-wt & -T670I

Da sowohl bei der Reinigung von KIT-wt¹⁰ als auch bei der Reinigung von KIT-T670I¹¹ ein nicht zu verachtender Anteil des jeweiligen Zielproteins unlöslich im Pellet vorlag, wurden für beide Proteine *Thermal Shift Assays* durchgeführt, um mehr Informationen hinsichtlich der Proteinestabilität in Gegenwart unterschiedlicher Puffersubstanzen, pH-Werten und Salzkonzentrationen zu erhalten (Tabelle 2).^[127] Für die Durchführung wurde der kommerziell erhältliche *Solubility & Stability Screen 2* von Hampton Research verwendet, in welchem Puffersubstanzen mit einem pH-Bereich von 5,5-9,5 gegen aufsteigende NaCl-Konzentrationen titriert werden. Das Protein wurde dann in diesen Puffern hinsichtlich seiner Thermostabilität untersucht, wobei sich ein Farbstoff an die hydrophoben Regionen des denaturierten Proteins anlagerte und somit zu einer Signalerhöhung führte.

Tabelle 2: Schmelztemperaturen von KIT-wt bei variierender NaCl-Konzentration und aufsteigenden pH-Werten von 5,5–9,5. Bis-Tris-P.: Bis-Tris-Propan, Gly: Glycin. Aufsteigende Schmelztemperaturen sind nach Farbkodierung von blau (niedrig) nach rot (hoch) sortiert.

NaCl [M]	Puffersubstanz								
	Succinyl- Säure	MES	Bis- Tris	Imidazol	HEPES	Tris	Bis- Tris-P.	AMPD	Gly
pH	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5
0	39,2	39,8	42,7	44,3	46,0	46,2	45,3	43,6	41,5
0,05	39,8	40,8	43,3	45,0	47,1	46,9	46,1	44,4	41,6
0,1	40,0	40,9	43,3	45,2	47,3	47,3	46,6	45,9	42,0
0,15	40,7	40,9	43,5	45,5	47,7	47,5	46,7	44,8	41,1
0,2	41,1	41,0	43,8	46,0	47,8	47,7	47,1	45,3	41,7
0,25	41,5	41,0	43,7	45,8	48,3	47,9	47,1	45,6	42,5

Insgesamt ließ sich für KIT-wt ein breites Spektrum an Schmelztemperaturen zwischen 39,2 °C und 48,3 °C beobachten. Dabei wurde deutlich, dass vor allem bei niedrigen pH-Werten im Bereich zwischen 5,5 und 6,5 geringe Schmelztemperaturen (39,2–41,4 °C) des Proteins erhalten wurden, was darauf hindeutete, dass das Protein hier weniger gut in seiner nativen Form stabilisiert wurde. Diese Beobachtung wurde dadurch unterstützt, dass die erhobenen Daten bei pH 4,5 mit Natriumacetat und pH 5,0 mit Natriumcitrat nicht für eine Auswertung geeignet waren. Ein für das Zielprotein besser geeigneter Pufferbereich lag zwischen den pH-Werten 7,0 und 8,5, da hier Schmelztemperaturen von 44,3–48,3 °C erhalten wurden, was auf eine gute Stabilisierung des Proteins durch die in der Proteinreinigung verwendeten Puffersysteme hinwies.

¹⁰ TSA durchgeführt von F. Schramm (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seiner Masterarbeit.

¹¹ TSA durchgeführt in Zusammenarbeit mit A. Wagner (AG Rauh, TU Dortmund).

Eine deutlich reduzierte Schmelztemperatur des Proteins konnte bei pH 9,5 beobachtet werden, was auf eine verringerte Proteinstabilität bei höheren pH-Werten hinweist und ebenfalls durch Ergebnisse massenspektrometrischer Analysen unterstützt wurde, die in Kapitel 3.6.2 näher beleuchtet werden.

Für KIT-T670I wurde analog zu KIT-wt ein Thermostabilitäts-Assay durchgeführt, da weder für die Expression, noch für die Reinigung von KIT-T670I Protokolle aus der Literatur zur Verfügung standen. Die Schmelztemperaturen sind in Tabelle 3 zu finden.

Tabelle 3: Schmelztemperaturen von KIT-T670I bei variierender NaCl-Konzentration und aufsteigenden pH-Werten von 5,0–9,5. NaC: Natriumcitrat, Bis-Tris-P.: Bis-Tris-Propan, Gly: Glycin. Aufsteigende Schmelztemperaturen sind nach Farbkodierung von blau (niedrig) nach rot (hoch) sortiert.

NaCl [M]	Puffersubstanz									
	NaC	Succinyl-Säure	MES	Bis-Tris	Imidazol	HEPES	Tris	Bis-Tris-P.	AMPD	Gly
pH	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	9,5
0	33.9	35.3	37.0	40.4	41.8	42.3	43.3	42.2	40.1	40.7
0,05	34.1	36.4	38.1	41.1	42.6	43.5	44.3	43.7	41.8	42.2
0,1	34.4	37.0	38.2	41.3	42.9	43.6	44.1	43.5	42.8	42.7
0,15	34.6	36.9	38.4	41.4	43.0	44.2	44.0	44.1	43.7	43.2
0,2	34.0	37.5	38.3	41.2	43.1	44.4	44.1	44.1	43.6	42.0
0,25	35.2	37.7	38.5	41.6	43.2	44.4	44.4	44.5	44.3	43.7

Auch für KIT-T670I ließen sich die erhobenen Daten für pH 4,5 nicht auswerten. Auch wurde ersichtlich, dass unter pH 6,5 nur Schmelztemperaturen unter 40 °C ermittelt werden konnten, was auf eine Instabilität des Zielproteins hindeutete. Die höchsten Schmelztemperaturen konnten für pH-Werte zwischen 7,0 und 9,5 und einer Salzkonzentration zwischen 150 und 1000 mM NaCl festgestellt werden. Die beste Proteinstabilisierung konnte insgesamt in Tris bei pH 8,0 erhalten werden, wobei bereits bei 50 mM NaCl eine Schmelztemperatur von 44,3 °C kalkuliert wurde. Den Ergebnissen zufolge könnte für folgende Proteinreinigungen die zuvor verwendete Puffersubstanz HEPES durch Tris ausgetauscht und die Salzkonzentration auf 50 oder 100 mM NaCl erniedrigt oder auf 250 mM NaCl erhöht werden.

3.4.8 Etablierung eines Kristallisationssystems für KIT-wt

3.4.8.1 Co-Kristallisation von KIT-wt

Die Etablierung eines Kristallisationssystems für KIT-wt erfolgte teilweise bereits in der eigenen Masterarbeit und wurde zu Anteilen in der Doktorarbeit von Dr. I. Landel veröffentlicht.^[121, 122] Da zum damaligen Zeitpunkt jedoch nur wenige Kristalle erhalten und Strukturen des Proteins gelöst werden konnten, sollte eine weitere Optimierung stattfinden. Wie in den Kapiteln 3.4.3 und 3.4.4 für die PDGFRA-Varianten bereits beschrieben, wurde auch für KIT-wt zunächst eine Reproduktion Literatur-bekannter Bedingungen getestet. Vor allem die Kristallisation von Typ IIa-Inhibitoren stellte sich als schwierig heraus, weshalb zusätzlich zu den *Screenings* in der eigenen Masterarbeit kommerzielle Kristallisationsbedingungen im Hochdurchsatz getestet wurden. So sollten spezifisch Bedingungen für die Co-Kristallisation mit den unterschiedlichen Inhibitortypen gefunden werden, da zuvor meist nur für Diffraktionsexperimente geeignete Kristalle mit apo-Protein oder Protein im Komplex mit die DFG-*in*-Konformation stabilisierenden Inhibitoren erhalten wurden. Deshalb wurden hier vor allem kommerzielle *Screens* verwendet, welche gegebenenfalls unüblichere Bedingungen enthalten (MemGold I, Molecular Dimensions, PACT, Classics, PEGs I, JCSG Core Suite I, NeXtal Biotech). Für die kovalenten Inhibitoren wurde zudem versucht, das Protein zunächst bei höherem pH-Wert kovalent zu modifizieren und damit sowohl *Fine* als auch Hochdurchsatz-*Screenings* anzusetzen. Hier konnten jedoch nur Bedingungen für Kristalle des apo-Proteins bzw. Kristalle mit einem kovalenten Avapritinib-Derivat gefunden werden. Sowohl das apo-Protein, als auch Derivat **14b** wurden als Positiv-Kontrolle verwendet, da Derivat **14b** ebenfalls bereits durch Inkubation bei pH 8 kristallisierte und eine kovalente Bindung in der erhaltenen Kristallstruktur beobachtet werden konnte (Abbildung 67D). Als besonders förderlich für die Kristallisation waren insgesamt PEGs höheren Molekulargewichts, vor allem PEG3350, in Kombination mit unterschiedlichsten Salzen, wie z. B. Li₃-Citrat, Na₃-Citrat oder NH₄F, ohne eine Angabe des pH-Wertes der Salzlösungen. Bei noch höheren Molekulargewichten des PEGs (z. B. PEG6000) war meist zusätzlich noch eine Puffersubstanz wie Tris oder Bis-Tris-Propan erforderlich für die Kristallisation. Die Bedingungen aus den Hochdurchsatz-*Screens*, welche am vielversprechendsten angesehen wurden, sollten dann in *Fine Screens* reproduziert werden, wobei sowohl die Präzipitant- und Salzkonzentration, als auch der pH-Wert variiert wurden.

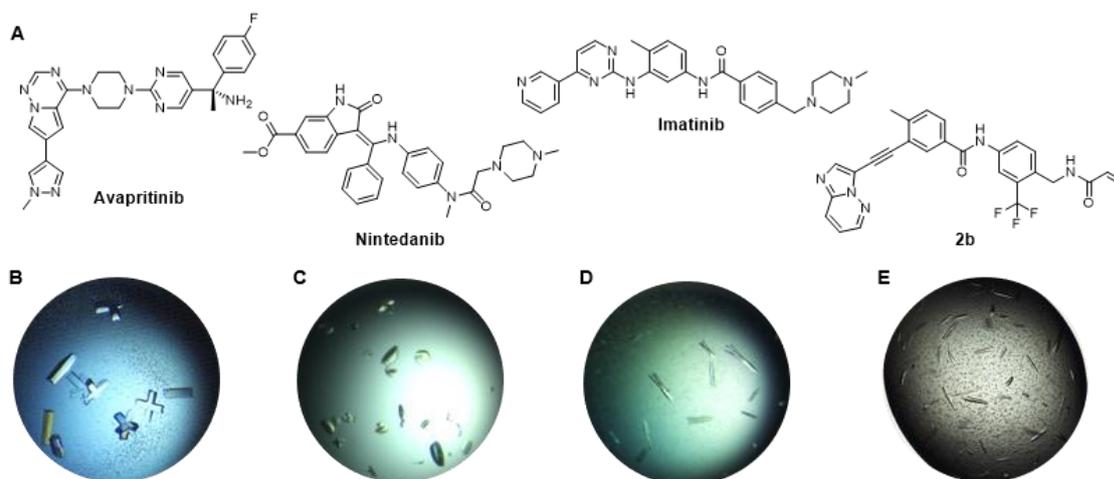


Abbildung 27: Co-Kristallisationsexperimente von KIT-wt im Komplex mit unterschiedlichen Liganden.
A: Chemische Strukturen der Liganden, welche in den hier gezeigten Kristallisationstropfen co-kristallisiert wurden. **B:** Co-Kristallisation von Avapritinib mit KIT-wt. Kristallisationsbedingungen: 6,6 mg/mL, 12 °C, 10 % PEG8000, 20 % Ethylenglykol, 30 mM NaF, 30 mM NaI, 30 mM NaBr, 100 mM Bicine, pH 8,5. **C:** Co-Kristallisation von Nintedanib mit KIT-wt. Kristallisationsbedingungen: 6 mg/mL, 20 °C, 1 M Na₃-Citrat, 100 mM HEPES, pH 7,0. **D:** Co-Kristallisation von Imatinib mit KIT-wt. Kristallisationsbedingungen: 6 mg/mL, 20 °C, 18 % PEG3350, 100 mM Na₃-Citrat. **E:** Co-Kristallisation von **2b** mit KIT-wt. Kristallisationsbedingungen gefunden im PACT-Screen (NeXtal Biotech): 7,5 mg/mL, 20 °C, 20 % PEG3350, 200 mM NaI, 100 mM Bis-Tris-Propan, pH 7,5.

Während der zahlreichen Co-Kristallisationsexperimente mit unterschiedlichen Inhibitortypen wurden verschiedene Kristallmorphologien beobachtet. Während KIT-wt im Komplex mit Avapritinib oder dessen Derivaten eher in kreuzförmigen oder orthorhombischen Stäbchen kristallisierte (Abbildung 27B), wurden bei der Kristallisation mit Nintedanib, einem Typ IIb-Inhibitor, halbmondförmige oder runde Kristalle identifiziert (Abbildung 27C). Mit Typ IIa-Inhibitoren, wie z. B. Imatinib, wurden hingegen verwachsene Stäbchen bzw. Nadeln erkannt (Abbildung 27D, E). Die Kristalle wurden gefischt und am Synchrotron für Diffraktionsexperimente genutzt. Es konnten erfolgreich Datensätze aufgenommen und die Strukturen gelöst werden. Vor allem bei den Co-Kristallen von Avapritinib und Nintedanib wurden teilweise sehr nah beieinander liegende Reflexe beobachtet, welche einer langen Achse der Einheitszelle zugeordnet werden konnten (Abbildung 28), welche nicht untypisch für KIT-Kristalle zu sein schien, was durch einen Vergleich mit bereits veröffentlichten Kristallstrukturen ersichtlich wurde (PDB-ID: 7KHK, 7KHJ, 6KLA, 6ITV, 6ITT). Die Reflexe dieser Achse ließen sich jedoch am Synchrotron deutlich besser voneinander trennen als am Arbeitskreis-internen Diffraktometer (D8Venture, Bruker). Ebenfalls auffällig bei der Prozessierung der Datensätze von KIT-wt im Komplex mit unterschiedlichsten Liganden war das Auftreten diverser Raumgruppen (5, 19, 152, 179) und demnach der Symmetrieeoperatoren der Moleküle im Kristall, wenngleich Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$ (19) am häufigsten vorkam.

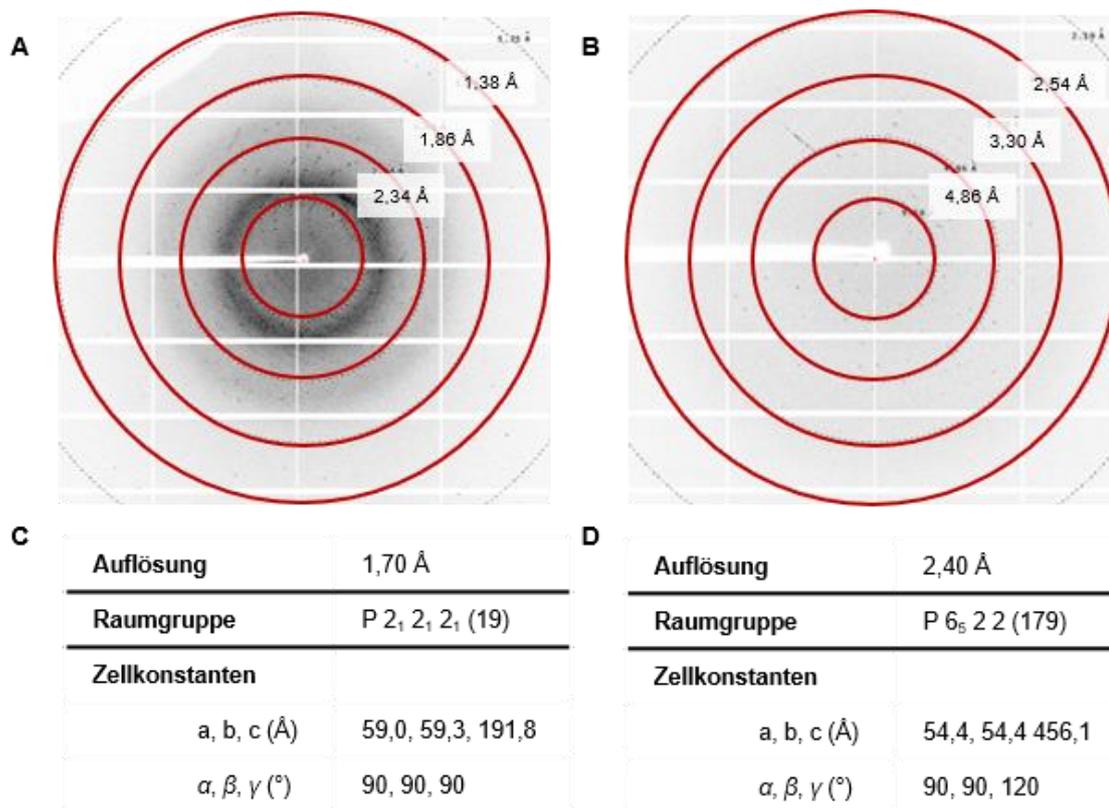


Abbildung 28: Diffractionsbilder von KIT-wt im Komplex mit Avapritinib (A) und Nintedanib (B). A: Diffractionsbild des Co-Kristalls von KIT-wt mit Avapritinib. Sichtbar ist eine Proteindiffraktion bis ~1,8 Å. B: Diffractionsbild des Co-Kristalls von KIT-wt mit Nintedanib mit sichtbarer Proteindiffraktion bis ~2,7 Å. C: Erhaltene Auflösung, Raumgruppe und Zellkonstanten des Datensatzes von KIT-wt im Komplex mit Avapritinib. D: Erhaltene Auflösung, Raumgruppe und Zellkonstanten des Datensatzes von KIT-wt im Komplex mit Nintedanib.

3.4.8.2 Seeding von KIT-wt

Da sowohl die Reproduktion Literatur-bekannter Bedingungen als auch die Reproduktion in Hochdurchsatz-Screens gefundener Kristallisationsbedingungen nur für ausgewählte Inhibitoren erfolgreich war, wurden *Seeding*-Experimente zur Initiierung der Co-Kristallisation eines interessanten NDI-1-Derivates durchgeführt.^{12,[128]} Beim *Seeding* wird ein Verfahren ausgenutzt, bei dem bereits vorhandene Kristalle zerkleinert und in unterschiedlichen Konzentrationen verdünnt werden. Es wurde ein Protokoll von Hampton Research verwendet, in welchem die *Seeding-Stocks* dann zum Kristallisationstropfen hinzugefügt wurden, um als Impfkristall die Proteinkristallisation zu initiieren. Es wurde beobachtet, dass abhängig von der Verdünnung der *Seeding*-Stammlösung unterschiedliche Kristallmorphologien erhalten wurden, wobei zunächst sehr große Abstände der Verdünnungen (1:20, 1:200, 1:20000) gewählt wurden.

¹² Durchgeführt von D. Busick (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seiner Masterarbeit.

Bei einer 1:20- bzw. 1:20000-Verdünnung der *Seeding*-Stammlösung wurden sehr viele Kristallisationskeime beobachtet, welche kleine Nadelcluster bildeten (Abbildung 29B, D, E, G). Bei einer 1:200-Verdünnung wurden hingegen Platten- oder Nadel-förmige Kristalle erhalten (Abbildung 29C, F). Daraus konnte geschlossen werden, dass in zukünftigen *Seeding*-Ansätzen Verdünnungen im Bereich von 1:200 getestet werden sollten. Im Rahmen dieser Arbeit konnten aber noch keine für Diffraktionsexperimente geeigneten Kristalle generiert werden.

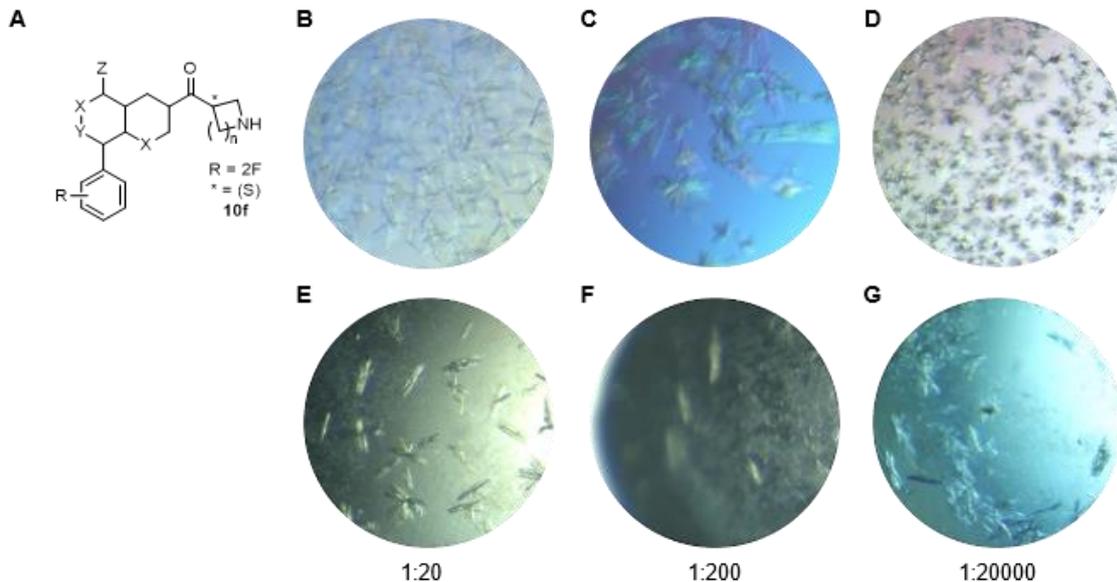


Abbildung 29: Kristallisationstropfen der *seeding*-Experimente. **A:** Chemische Struktur des zur Co-Kristallisation genutzten Liganden. **B:** apo-Kristallisation von KIT-wt. Kristallisationsbedingungen: 10 mg/mL, 12 °C, 18 % PEG3350, 200 mM Na₃-Citrat, 3 % Ethylenglykol, 3 % 1,6-Hexandiol, *seeding*-Stock: 1:20. **C:** apo-Kristallisation von KIT-wt. Kristallisationsbedingungen: 10 mg/mL, 12 °C, 18 % PEG3350, 200 mM Na₃-Citrat, 3 % Ethylenglykol, 3 % 1,6-Hexandiol, *seeding*-Stock: 1:200. **D:** apo-Kristallisation von KIT-wt. Kristallisationsbedingungen: 10 mg/mL, 12 °C, 18 % PEG3350, 200 mM Na₃-Citrat, 3 % Ethylenglykol, 3 % 1,6-Hexandiol, *seeding*-Stock: 1:20000. **E:** Co-Kristallisation von KIT-wt im Komplex mit **10f**. Kristallisationsbedingungen: 7 mg/mL, 12 °C, 12 % PEG3350, 50 mM Na₃-Citrat, pH 5,5, 3 % 1,6-Hexandiol, *seeding*-Stock: 1:20. **F:** Co-Kristallisation von KIT-wt im Komplex mit **10f**. Kristallisationsbedingungen: 7 mg/mL, 12 °C, 12 % PEG3350, 50 mM Na₃-Citrat, pH 5,5, 3 % 1,6-Hexandiol, *seeding*-Stock: 1:200. **G:** Co-Kristallisation von KIT-wt im Komplex mit **10f**. Kristallisationsbedingungen: 7 mg/mL, 12 °C, 12 % PEG3350, 50 mM Na₃-Citrat, pH 5,5, 3 % 1,6-Hexandiol, *seeding*-Stock: 1:20000.

3.4.8.3 *Soaking* von KIT-wt

Wie für PDGFRA-T674I wurden auch für KIT-wt *Soaking*-Experimente durchgeführt. Diese wurden bereits anteilig in der Doktorarbeit von Dr. I. Landel veröffentlicht.^[121] Aber auch im Rahmen dieser Arbeit wurden erneut *Soaking*-Experimente durchgeführt, da für ausgewählte Liganden keine für Diffraktionsexperimente geeigneten Kristalle mithilfe der in Kapitel 5.7 beschriebenen Methoden generiert werden konnten. Weiterhin wurde bei Co-Kristallen mit NDI-1 und dessen Derivaten bis auf wenige Ausnahmen bei Aufnahme von Datensätzen sowie bei der Datenprozessierung eine starke Anisotropie detektiert, weshalb die erhaltenen Datensätze nicht für die Strukturlösung genutzt werden konnten. Die variierenden Protokolle zur Durchführung der *Soaking*-Experimente sind in Kapitel 5.7.6 im Anhang aufgeführt. Für die Experimente wurden aufgrund der hohen Reproduzierbarkeit Co-Kristalle von KIT-wt mit Avapritinib, dessen Derivaten oder mit Crenolanib verwendet. Während der Inkubation und iterativen Überführung in mehrere, den Liganden enthaltenden Kristallisationstropfen, konnte eine teilweise Auflösung der Kristalle bereits nach 20 min festgestellt werden. Daher wurde in weiteren Ansätzen zunächst das DMSO aus dem Liganden-*Stock* evaporiert und die Liganden in der Hälfte des Ursprungsvolumens in Größenausschluss-Puffer des Proteins aufgenommen. Da auch hier eine anteilige Auflösung der Kristalle nach kurzen Inkubationszeiten beobachtet wurde, wäre z. B. eine vorherige Fixierung der Kristalle mithilfe von Glutaraldehyd denkbar. Bei der direkten Zugabe der Inhibitor-Lösung in den Kristallisationstropfen konnten für einige Liganden Inkubationszeiten von mehr als zwei Tagen erzielt werden, ohne dass eine Auflösung der Kristalle beobachtet wurde. Durch diesen Vorgang konnten schlussendlich die Kristallstrukturen von KIT-wt im Komplex mit IDRX-42 und NDI-1 gelöst werden. Weitere Strukturen von NDI-1-Derivaten wurden ebenfalls generiert. Die strukturbiochemische Analyse dieser Derivate ist Gegenstand aktueller Arbeiten.

3.4.9 Etablierung eines Kristallisationssystems für KIT-T670I

Für die Türsteher-Mutante KIT-T670I waren vor dieser Arbeit weder Reinigungs- noch Kristallisationssysteme Literatur-beschrieben. Daher wurden für die Kristallisation neben der Übertragung von *Fine Screen* Bedingungen des KIT-wt auch Hochdurchsatz-*Screens* (JCSG Core Suite I-IV, PACT, Classics, NeXtal biotech, MemGold I, Molecular Dimensions) durchgeführt, um möglicherweise für diese KIT-Variante besser funktionierende Bedingungen zu finden. Da aus der Kristallisation des KIT-wt bereits bekannt war, dass Avapritinib das Protein für die Kristallisation positiv zu stabilisieren schien, wurden vor allem Co-Kristallisationsansätze in Gegenwart dieses Inhibitors durchmustert. Dabei konnten einige vielversprechende Bedingungen identifiziert werden, welche dann in *Fine Screens* übersetzt werden sollten. Da in vielen Bedingungen der getesteten *Screens* die Entstehung von Präzipitat beobachtet wurde, wurde die Proteinkonzentration im Folgenden iterativ herabgesetzt (Abbildung 30).

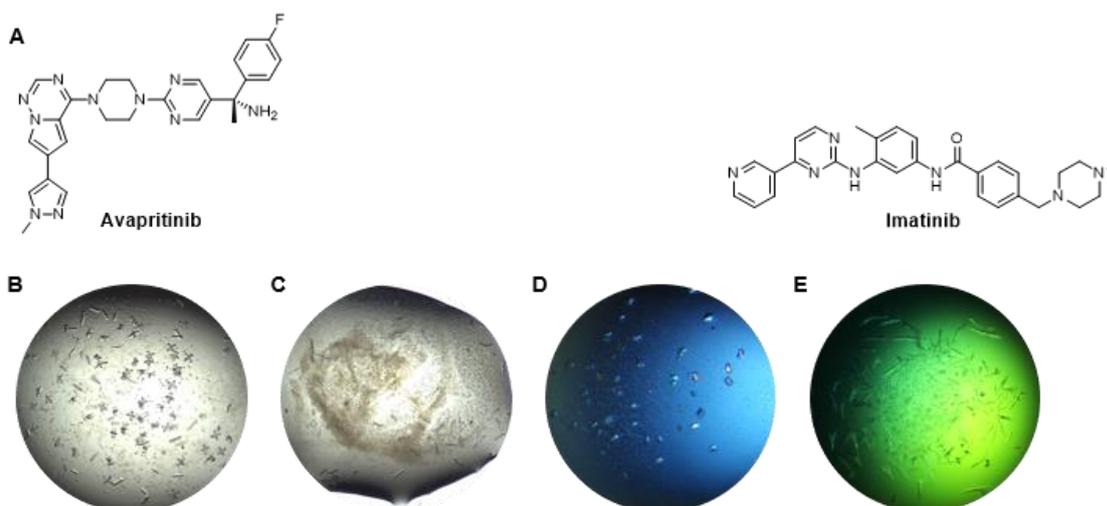


Abbildung 30: Co-Kristallisationsexperimente von KIT-T670I im Komplex mit Avapritinib (B-D) oder Imatinib (E). **A:** Chemische Strukturen der co-kristallisierten Liganden Avapritinib und Imatinib. **B:** Co-Kristallisation von KIT-T670I mit Avapritinib. Kristallisationsbedingungen aus dem Classics-*Screen*: 10 mg/mL, 20 °C, 20 % PEG4000, 10 % Isopropanol, 100 mM HEPES, pH 7,5. **C:** Co-Kristallisation von KIT-T670I mit Avapritinib. Kristallisationsbedingungen aus dem PACT-*Screen*: 10 mg/mL, 20 °C, 25 % PEG1500, 100 mM MIB-Puffer, pH 7. **D:** Co-Kristallisation von KIT-T670I mit Avapritinib. Kristallisationsbedingungen: 6 mg/mL, 20 °C, 25 % PEG3350, 100 mM NaF, 100 mM Bis-Tris-Propan, pH6,5. **E:** Co-Kristallisation von KIT-T670I mit Avapritinib. Kristallisationsbedingungen: 4 mg/mL, 20 °C, 25 % PEG3350, 200 mM Na-Citrat, 100 mM Bis-Tris-Propan, pH 6,5.

Während der Kristallisationsexperimente war erkennbar, dass die Co-Kristalle von KIT-T670I im Komplex mit Avapritinib in den Hochdurchsatz-*Screens* ebenfalls eine kreuzförmige Morphologie wie bei KIT-wt im Komplex mit Avapritinib aufwiesen (Abbildung 30B), welche sich jedoch in *Fine Screens* als eher verwachsene, kleine Würfel reproduzieren ließen. Außerdem konnten in den Hochdurchsatz-*Screens* Nadel- bzw. Stäbchenförmige Kristalle identifiziert werden (Abbildung 30C).

Beim Versuch, die Proteinkonzentration weiter zu senken und eine Co-Kristallisation mit Imatinib durchzuführen, konnten lediglich fragile, verwachsene Nadeln erhalten werden (Abbildung 30E). Diese könnten jedoch als gute Startpunkte für weitere Kristallisationsexperimente genutzt oder aber auch zum *Seeding* verwendet werden. Die Co-Kristalle mit Avapritinib wurden gefischt, am Synchrotron für Diffraktionsexperimente verwendet und zugehörige Datensätze wurden aufgenommen (Abbildung 31). Durch die Datenprozessierung konnten die Zellparameter und die Raumgruppe erhalten werden, welche vergleichbar mit denen der Co-Kristallstruktur von KIT-wt im Komplex mit Avapritinib waren.

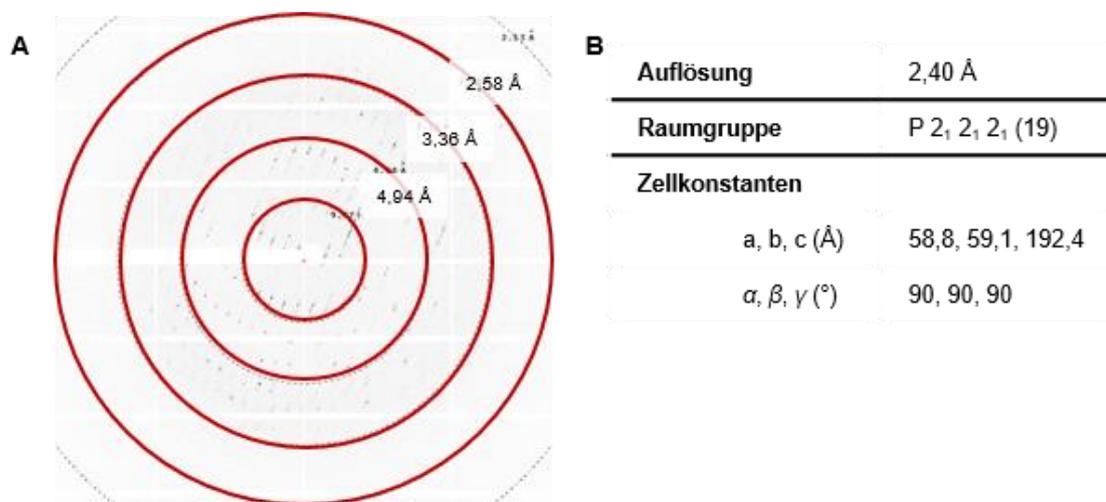


Abbildung 31: Diffraktionsbild von KIT-T670I im Komplex mit Avapritinib. A: Beispielhaftes Diffraktionsbild des Co-Kristalls von KIT-T670I mit Avapritinib. Sichtbar ist eine Proteindiffraktion bis $\sim 2,5$ Å. **B:** Erhaltene Auflösung, Raumgruppe und Zellkonstanten des Datensatzes von KIT-T670I im Komplex mit Avapritinib.

3.5 Biochemische & Strukturbiologische Untersuchungen von KIT & PDGFRA

Obwohl bereits einige Komplexstrukturen mit zugelassenen Wirkstoffen beschrieben und in der Literatur veröffentlicht waren, wurden mit dem im Rahmen dieser Arbeit etablierten Kristallisationssystem einige Kristallstrukturen erhalten. Diese schlossen sowohl kommerziell verfügbare sowie im Arbeitskreis synthetisierte Inhibitoren ein. Um einen Einblick in die Bindungsmodi und Wirkmechanismen der Inhibitoren in ihren Zielproteinen zu erhalten, werden im Folgenden die in dieser Arbeit generierten Kristallstrukturen näher analysiert. Dabei werden vor allem bei den kommerziell verfügbaren Inhibitoren ebenfalls Resistenzmechanismen näher untersucht. Die zu untersuchenden Resistenzmutationen wurden mit dem *Mutagenesis-Tool* von PyMol 2.0.6 eingeführt, wobei bei der Türsteher-Mutation das Rotamer gewählt wurde, welches in den selbstständig gelösten Kristallstrukturen dieser Mutanten am häufigsten auftrat. Es sollte jedoch immer beachtet werden, dass eine Umorientierung der Aminosäure-Seitenkette durch Ligandenbindung in einem dynamischen System in Lösung nicht auszuschließen ist. Zusätzlich sollte bemerkt werden, dass mithilfe dieses *Tools* lediglich Einblicke in die Resistenzmechanismen gegeben werden können, die in der Zukunft durch experimentelle Daten untermauert oder auch widerlegt werden sollten. Zur weiteren Interaktionsanalyse werden ebenfalls Pharmakophormodelle mit LigandScout v.4.4.8 analysiert (Anh. 6.4).

3.5.1 Ligandenfreie Strukturanalyse von KIT & PDGFRA

Für das Verständnis von Bindungsmodi von Inhibitoren ist auch die Strukturanalyse von nicht-Liganden-gebundenen Proteinen wichtig, um zu verstehen, welchen Konformationsänderungen ein Protein unterliegt. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit apo-Kristallstrukturen von KIT-wt, PDGFRA-wt und PDGFRA-T674I gelöst (Abbildung 32). Es kann beobachtet werden, dass die Kinasedomänen in einer auto-inhibierten Konformation vorliegen, bei der die JMD in die *backpocket* hineinragt. Weiterhin kann eine DFG- und α C-Helix-*out*-Konformation festgestellt werden, was weiter für eine inaktive Kinasekonformation spricht, wobei Phe811 (KIT) bzw. Phe837 (PDGFRA) des DFG-Motivs in die ATP-Bindetasche des Proteins zeigt, während Asp810 (KIT) bzw. Asp836 (PDGFRA) die *backpocket* besetzt. Außerdem ragt Leu813 (KIT) bzw. Leu839 (PDGFRA) des LARDI-Motivs der Kinasen, das dem DFG-Motiv folgt, in dieser Konformation in eine hydrophobe Tasche zwischen der Gly-reichen Schleife und der α C-Helix, welche in Kapitel 3.5.5.1 noch weiter erläutert wird. Innerhalb der *backpocket* bindet ein Tryptophan (557 in KIT, 559 in PDGFRA) in eine hydrophobe Subtasche. In KIT wird diese Tasche aus den Aminosäuren Leu783, Cys788, His790, Ile808, Cys809 und Asp810 gebildet und stabilisiert somit die inaktive Kinasekonformation (Abbildung 32A, B).

Die häufig auftretende Primärmutation W557_K558del in KIT würde einen Verlust dieses Interaktionsmuster zwischen den beiden Domänen des Proteins zur Folge haben, was daraufhin das Herauslösen der JMD aus der *backpocket* bewirken würde und die Kinase somit eine erleichterte Konformationsänderung in Richtung des aktiven Zustands durchlaufen könnte. Die durch diese Deletion hervorgerufene Verschiebung des Konformationsgleichgewichts würde zudem ohne die Bindung des extrazellulären Liganden hervorgerufen werden, was zu einer intrazellulären konstitutiven Aktivität des Proteins führt.

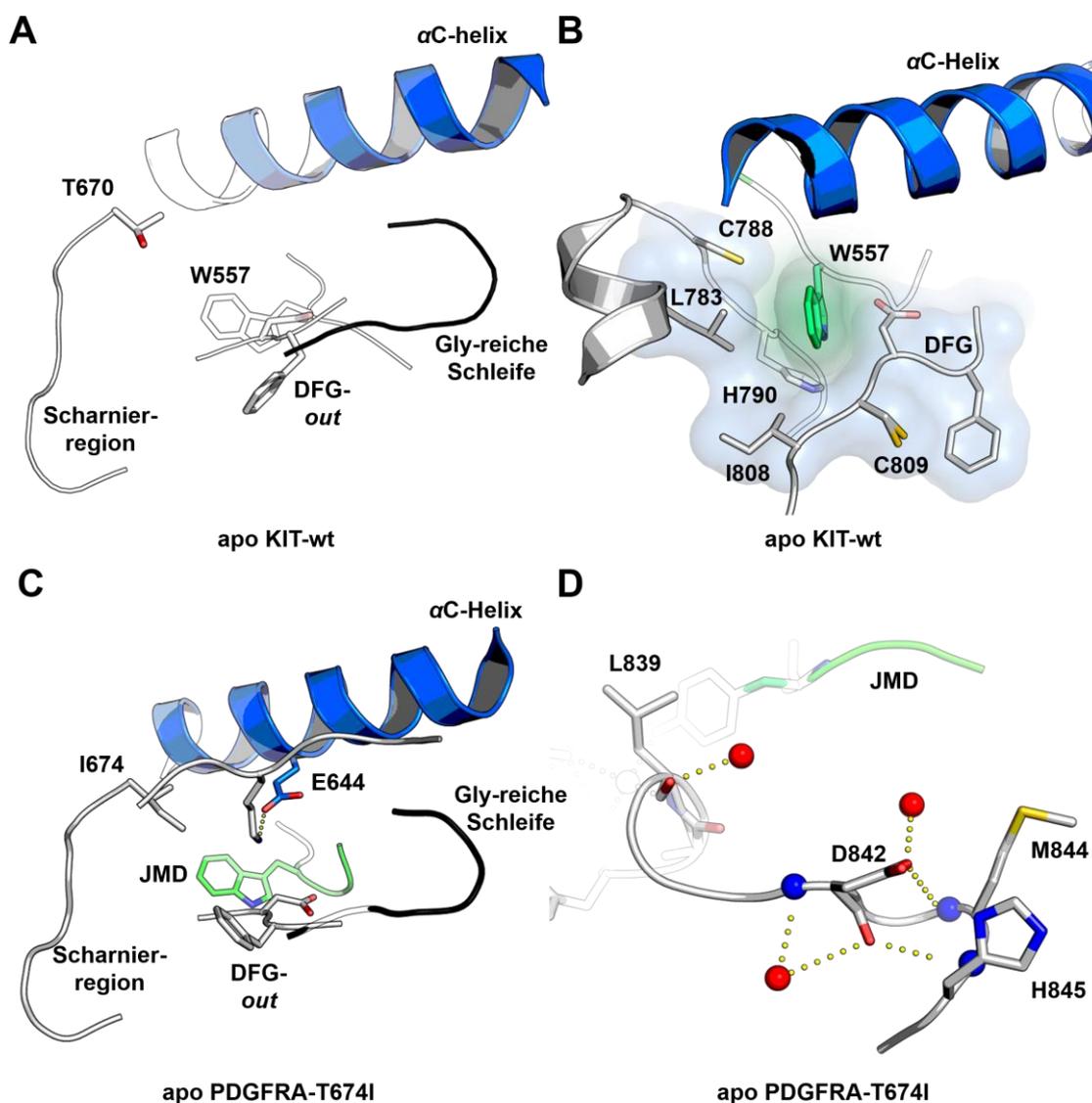


Abbildung 32: Kristallstruktur von apo KIT-wt (A, B) und apo PDGFRA-T674I (C, D). A: Übersicht der auto-inhibierten Kinasekonformation von KIT-wt. B: Analyse des Bindungsmodus von Trp557 in der *backpocket* der Kinase, welches eine auto-inhibitorische Funktion einnimmt. Eine weit verbreitete Primärmutation in Patienten an dieser Stelle tritt als W557_K558del-Mutation auf. C: Übersicht der auto-inhibierten Kinasekonformation von PDGFRA-T674I. D: Interaktionsmuster des Asp842, welches als D842V-Mutation die häufigste Primärmutation in PDGFRA darstellt.

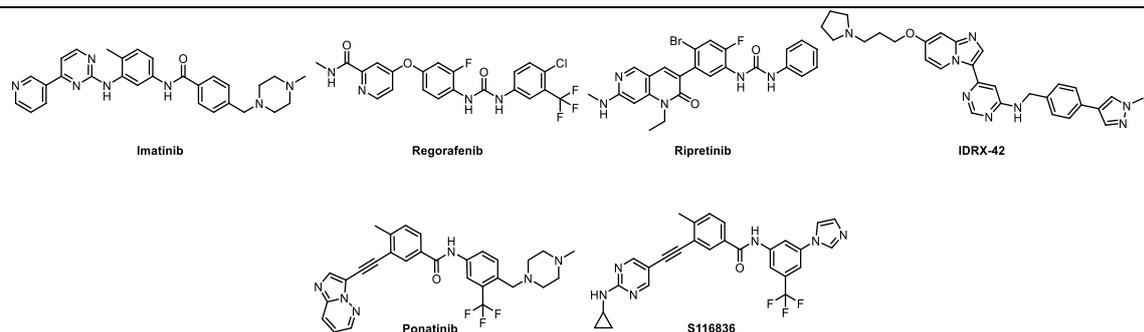
Die in Exon 18 auftretende und aktivierende D842V-Primärmutation in PDGFRA kann durch Betrachtung der apo-Kristallstruktur von PDGFRA-wt verstanden werden (Abbildung 32C, D). Die Seitenkette des Asp842 geht in der inaktiven Konformation polare Interaktionen mit dem Rückgrat von Met844 und der Carbonylsauerstoff des Proteinrückgrats von Asp842 Interaktionen mit dem Amin des Rückgrats von His845 ein und stabilisiert so die Aktivierungsschleife in ihrer inaktiven Konformation (Abbildung 32D). Die Einführung einer hydrophoben Seitenkette wie bei einem Valin würde zum Verlust dieser stabilisierenden Kräfte führen. An dieser Stelle könnte also davon ausgegangen werden, dass das Gleichgewicht eine Verschiebung in Richtung der aktiven Kinasekonformation erfährt, da wichtige Interaktionspunkte zur Erhaltung der inaktiven Konformation der Aktivierungsschleife unterbrochen würden. Wie bereits erläutert wurde, weisen alle apo-Kristallstrukturen eine auto-inhibierte Kinasekonformation auf. Beim Vergleich der apo-KIT-Struktur (Abbildung 32A) mit den Kristallstrukturen von PDGFRA (Abbildung 32C) fällt zunächst einmal auf, dass das Phenylalanin des DFG-Motivs in PDGFRA weiter in die ATP-Bindetasche hineinragt, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass in der apo-Struktur von KIT ein Ethylenglycol-Molekül an die Scharnierregion gebunden hat, welches in den verwendeten Kristallisationsbedingungen enthalten war. In beiden PDGFRA-Strukturen ist das katalytische Lysin an Position 627 inklusive der Seitenkette aufgelöst und wird durch eine polare Interaktion mit Glu644 in der α C-Helix stabilisiert (Abbildung 32C).

Da für PDGFRA sowohl eine Kristallstruktur des Wildtypproteins als auch der Türsteher-mutierten Variante erhalten werden konnte, soll auch die Auswirkung dieser Mutation untersucht werden. Bei der Analyse des Interaktionsmusters der apo-Kristallstruktur des PDGFRA-wt kann zwischen der Türsteher-Aminosäure Thr674 und weiteren Aminosäuren in der ATP-Bindetasche ein komplexes Wassernetzwerk identifiziert werden, was die wichtigsten regulatorischen Elemente miteinander verknüpft (Anh. 6.4.2, Abbildung 83). Der Türsteherrest Thr674 selbst geht zwei polare Interaktionen ein, wobei eine davon zum Rückgrat des direkt benachbarten Glu675 ausgerichtet ist und ebenfalls in der apo KIT-wt-Struktur identifiziert werden kann. Im Vergleich dazu kann diese Interaktion in der Kristallstruktur der Türsteher-Variante nicht beobachtet werden, was eine mögliche erhöhte Flexibilität der Scharnierregion zur Folge haben könnte, was sich auch auf Regionen weiter entfernt im Protein auswirken könnte. Durch die Einbringung einer hydrophoben Seitenkette wird zudem ein Wassermolekül verdrängt, welches im Wildtypprotein den Türsteher mit den regulatorischen Elementen der Kinasedomäne verbindet. Auch dieser Interaktionspunkt geht durch die Mutation zu einem Isoleucin verloren.

3.5.2 Vergleich kommerziell verfügbarer Inhibitoren

Die Behandlung von GIST stellt aufgrund der intrinsischen Resistenz gegenüber Chemotherapie und Strahlentherapie sowie der begrenzten Anzahl zugelassener Wirkstoffe eine große Herausforderung dar. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht nur die für die GIST-Therapie zugelassenen Inhibitoren biochemisch profiliert und strukturebiologisch untersucht, sondern auch diverse kommerziell verfügbare Inhibitoren, welche in der Literatur und auch in präklinischen Studien inhibitorische Aktivität gegenüber KIT und/oder PDGFRA zeigten. Dazu zählen unter anderem IDRX-42, Ponatinib, S116836, Nintedanib und Crenolanib. Für die biochemischen Aktivitätsstudien wurden hauptsächlich KIT-wt, KIT-D816H, PDGFRA-wt, PDGFRA-D842V und VEGFR2-wt verwendet, wobei VEGFR2-wt als bekanntes *off-target* von KIT- und PDGFRA-adressierenden Inhibitoren gilt. Die Auswahl der AL-Mutanten neben den Wildtyp-Proteinen war von besonderer Bedeutung, da sich die Therapie dieser Mutanten in der Klinik als besonders anspruchsvoll darstellt. Weiterhin war die kommerzielle Verfügbarkeit von klinisch relevanten Mutanten der Kinasen stark limitiert, weshalb nur ausgewählte Kinasen als Modellsysteme verwendet wurden. Für strukturebiologische Untersuchungen wurde hauptsächlich KIT-wt verwendet, wobei durch die nahe Verwandtschaft zwischen KIT und PDGFRA teilweise Rückschlüsse auf ähnliche Mechanismen in PDGFRA und andersherum gezogen werden können. Analysiert werden die biochemischen und strukturebiologischen Daten in der Reihenfolge der vorliegenden Inhibitorklassen. Demnach werden zunächst die Analysen von Typ IIa-Inhibitoren (Imatinib, Regorafenib, Ripretinib, IDXR-42, Ponatinib, S116836, Tabelle 4) vorgestellt, gefolgt von Typ IIb-Inhibitoren (Sunitinib, Nintedanib, Tabelle 5) und Typ I- bzw. Typ I½-Inhibitoren (Avapritinib, Crenolanib, NDI-1, Staurosporin, Tabelle 6).

Tabelle 4: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte kommerziell erhältlicher Inhibitoren.
 Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung. n ≥ 3. * bedeutet n=2, n.d. = *no data available*/keine Daten vorhanden.



Inhibitor	Typ	HTRF IC ₅₀ [nM]				
		KIT-wt	KIT-D816H	PDGFRA-wt	PDGFRA-D842V	VEGFR2-wt
Imatinib	IIa	41 ± 7	480 ± 90	n.d.	1200 ± 250	3000 ± 0
Regorafenib		36 ± 12	200 ± 100*	4 ± 0,4	220 ± 15	n.d.
Ripretinib		2 ± 0,5	2 ± 0,4	0,6 ± 0,3	2 ± 0,6	0,9 ± 0,1
IDRX-42		n.d.	4 ± 0,6	n.d.	1900 ± 340	n.d.
Ponatinib		0,7 ± 0,4	14 ± 4	0,1 ± 0,02	16 ± 6,8	0,2 ± 0,03
S116836		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

3.5.3 Vergleich kommerziell verfügbarer Typ IIa-Inhibitoren

3.5.3.1 Strukturbiologische Untersuchungen von Imatinib

Imatinib zeigt auf KIT-wt mit 41 nM eine gute Aktivität, während es auf den AL-Mutanten KIT-D816H und PDGFRA-D842V mit jeweils 478 nM und 1201 nM als deutlich inaktiver eingestuft wird. Einen Vorteil zeigt hier die Inaktivität gegenüber VEGFR2-wt, sodass Imatinib als KIT-wt selektiv angesehen werden kann. Der Bindungsmodus von Imatinib im Komplex verschiedener Kinasen wurde bereits aufgeklärt, wobei im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls mit dem eigens etablierten Kristallisationssystem eine Komplexstruktur in KIT-wt erhalten wurde (Abbildung 33). Es lässt sich zunächst beobachten, dass Imatinib als Typ IIa-Inhibitor an die Scharnierregion und in die *backpocket* des Proteins bindet (Abbildung 33A), was vergleichbar mit den in der Literatur beschriebenen Bindungsmodi von KIT mit Imatinib ist.^[69]

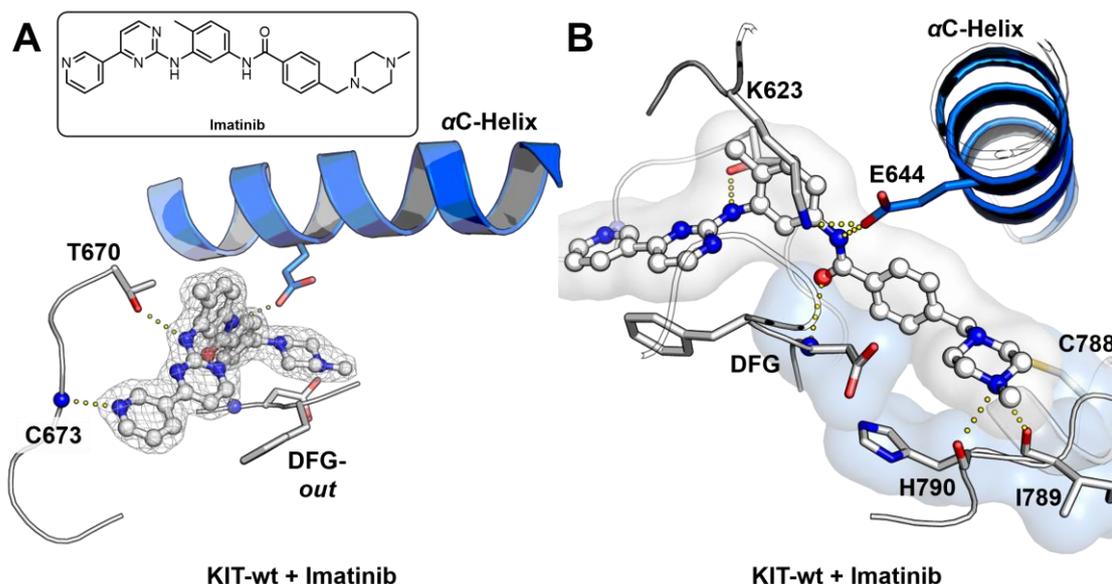


Abbildung 33: Komplexstruktur von KIT-wt mit Imatinib. **A:** Chemische Struktur von Imatinib und Übersicht der Komplexstruktur. $[2F_o - F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0)-Elektronendichtekarte von Imatinib und polare Interaktionen innerhalb der Bindetasche. **B:** Oberflächenrepräsentation und polare Interaktionen von Imatinib in der *backpocket*.

Die Pyridin-Einheit des Scharnierregion-bindenden Elements geht dabei eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Rückgrat-NH von Cys673 mit dem Stickstoffatom des Pyridins ein. Weiterhin ist eine direkte polare Interaktion zwischen dem verbrückenden Amid-Stickstoff mit der Seitenkette der Türsteher-Aminosäure Thr670 identifizierbar (Abbildung 33A). Der Stickstoff der Amid-Gruppe des Inhibitors zeigt weiter eine Interaktion mit dem Glu640 der α C-Helix, während der Sauerstoff mit dem Rückgrat von Asp810 interagiert (Abbildung 33B). Das Methylpiperazin in der *backpocket* wird durch eine Salzbrücke zum Protein-Rückgrat von Ile789 und His790 stabilisiert (Abbildung 33B).

Über die gesamte Bindungslänge des Liganden erstrecken sich weiterhin hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Imatinib und den Aminosäuren Leu595, Val603, Ala621, Leu644, Val654, Val668, Tyr672, Leu799 und Phe811 (Anh. 6.4.2, Abbildung 84). Dieses komplexe Interaktionsmuster könnte zu der hohen Selektivität von Imatinib beitragen, wobei aber auch davon auszugehen ist, dass eine Störung des Interaktionsmusters zu einem drastischen Aktivitätsverlust führen könnte. Wie in der biochemischen Profilierung beobachtet wurde, ist Imatinib gegenüber Mutationen der Aktivierungsschleife wesentlich weniger aktiv, was auf struktureller Seite durch das Binden einer sehr spezifischen Kinasekonformation erklärt werden kann. Für eine optimale Bindung von Imatinib wird eine inaktive DFG-*out*-Konformation benötigt, welche im Falle einer AL-Mutation jedoch weniger begünstigt wird.

Die prominentesten Resistenzmutationen während der Therapie mit Imatinib treten unterhalb der α C-Helix (V654A) und an der Stelle der Türsteher-Aminosäure (T670I) auf. Wie bereits beschrieben, geht Imatinib eine Wasserstoffbrückenbindung mit Thr670 und hydrophobe Wechselwirkungen mit Val654 ein (Abbildung 34A).

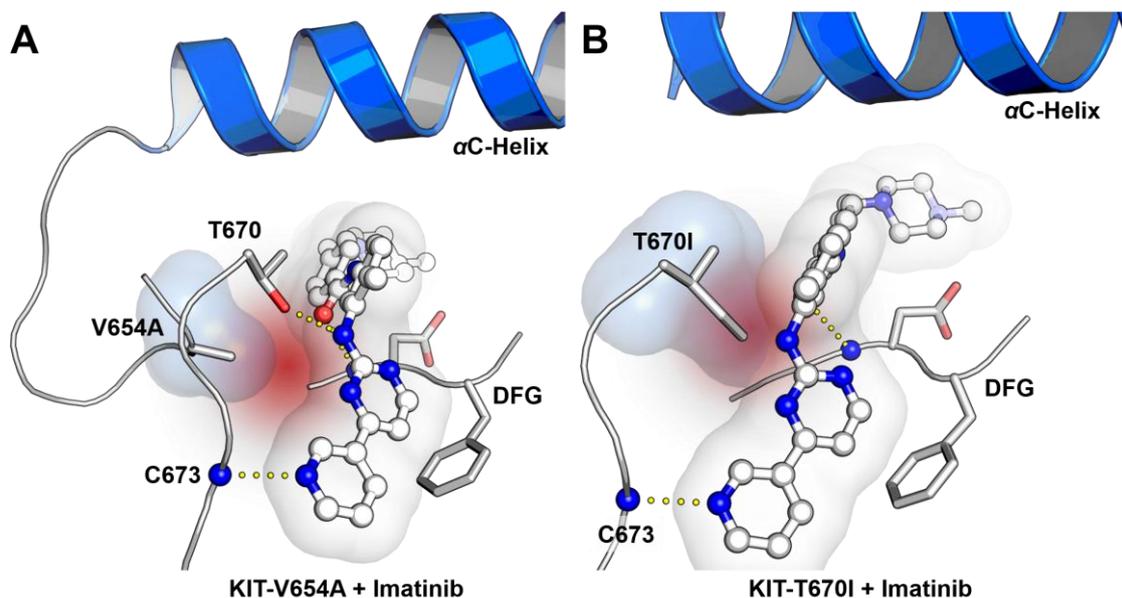


Abbildung 34: Strukturelle Analyse von klinisch auftretenden Resistenzmutationen gegen Imatinib. **A:** Repräsentation der V654A-Mutation, welche zum Verlust hydrophober Interaktionen zwischen Ligand und Aminosäure führt. **B:** Repräsentation der T670I-Mutation, welche zu einer sterischen Interferenz mit dem Liganden führt. Mutationen wurden eingeführt mit dem *Mutagenesis-Tool* in PyMol 2.0.6.

Durch eine Mutation von Val654 zu Alanin würde eine sterisch wesentlich weniger anspruchsvolle Seitenkette eingeführt werden, was sowohl zu einem Verlust der direkten hydrophoben Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Liganden führen würde, als auch zu einer erhöhten Flexibilität der das Alanin umgebenden Elemente innerhalb des Proteins (Abbildung 34A). Hier ließe sich vor allem eine erhöhte Flexibilität der α C-Helix vermuten, was eine Kinasekonformation zu Folge hätte, welche für die Ligandenbindung durch Imatinib weniger präferiert wäre.^[82] Der Mechanismus der Türsteher-Mutation ist in der Literatur bereits vielfach beschrieben und gut verstanden. In KIT führt die Mutation zu einem Austausch von einer polaren Seitenkette eines Threonins durch eine hydrophobe, sterisch anspruchsvollere Seitenkette eines Isoleucins (Abbildung 34B). Auch an dieser Stelle käme es zu einem Verlust einer direkten Interaktion zwischen dem Inhibitor und dem Protein, was zu einem Aktivitätsverlust führen würde. Weiterhin würde die Einführung einer Isoleucin-Seitenkette zu einer sterischen Abstoßung führen, was für den Inhibitor eine unfavorisierte Positionierung im Protein zur Folge hätte.

3.5.3.2 Strukturbiologische Untersuchungen von Regorafenib

Auch das Drittlinien-Therapeutikum Regorafenib zeigt lediglich auf den Wildtyp-Proteinen (36 nM bzw. 4 nM) gute Aktivitäten, während die AL-Mutanten weniger potent inhibiert werden (204 nM (KIT-D816H), 221 nM (PDGFRA-D842V)). Da im Rahmen dieser Arbeit keine Kristallstruktur von Regorafenib erhalten werden konnte, kann über den exakten Bindungsmodus und die Auswirkungen von Resistenzmutationen nur spekuliert werden. Auch in der Literatur sind bisher lediglich Kristallstrukturen des Regorafenib-Derivats Sorafenib zu finden, wobei sich dieses nur durch das nicht vorhandene Fluoratom des *backpocket*-bindenden Motivs von Regorafenib unterscheidet (Abbildung 35C).

Bei den hier erhaltenen Kristallstrukturen von Sorafenib gebunden an die Proteinkinase p38 (PDB-IDs: 3HEG, 3GCS) ist keine eindeutige Orientierung des an die Scharnierregion bindenden Elements identifizierbar, da entweder das Rückgrat-NH von Met109 mit dem Sauerstoff der Amid-Gruppe oder mit dem Stickstoff der benachbarten Pyridineinheit Interaktionen eingeht.^[129, 130] Bei ersterer Struktur sollte jedoch die Qualität der Datenstatistiken mit $R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ mit jeweils 23,6 % und 30,9 % bei einer Auflösung von 2,20 Å und 3,1 % RAMACHANDRAN-*outlier* beachtet werden. In VEGFR2 (PDB-IDs: 4ASD, 3WZE) können hingegen Wechselwirkungen des Amid-Stickstoffs von Sorafenib mit dem Carbonylsauerstoff des Rückgrats von Cys919 in zwei unabhängigen Publikationen beobachtet werden.^[131, 132]

Während weiter in p38 eine Salzbrücke zwischen Glu71 der α C-Helix und dem Harnstoff-Motiv von Sorafenib vorliegt, geht das entsprechende Glu885 in VEGFR2 lediglich eine polare Interaktion mit dem N2 des Harnstoff-Motivs und eine weitere Interaktion mit dem katalytischen Lys868 ein. Dieses Interaktionsmuster tritt ebenfalls für weitere Typ IIa-Inhibitoren der im Rahmen dieser Arbeit gelösten Kristallstrukturen auf. Um weiteren Aufschluss über einen möglichen Bindungsmodus von Regorafenib zu erhalten, wurden *Docking*-Studien mit GOLD (Hermes) durchgeführt. Als Templat wurde die Komplexstruktur von KIT-wt mit Imatinib gewählt (Kapitel 3.5.3.1). Anhand der in der Literatur für Sorafenib beschriebenen Bindungsmodi in unterschiedlichen Kinasen und mithilfe einer intern von Dr. M. Bührmann zur Verfügung gestellten Kristallstruktur von Regorafenib gebunden an eine andere Zielkinase, wurden Analysen erstellt, welche in Abbildung 35 zu sehen sind. Es sollte an dieser Stelle jedoch immer beachtet werden, dass aufgrund der unterschiedlichen zur Verfügung stehenden Strukturen lediglich Hypothesen aufgestellt werden können, welche zukünftig durch experimentelle Daten untermauert oder widerlegt werden sollten.

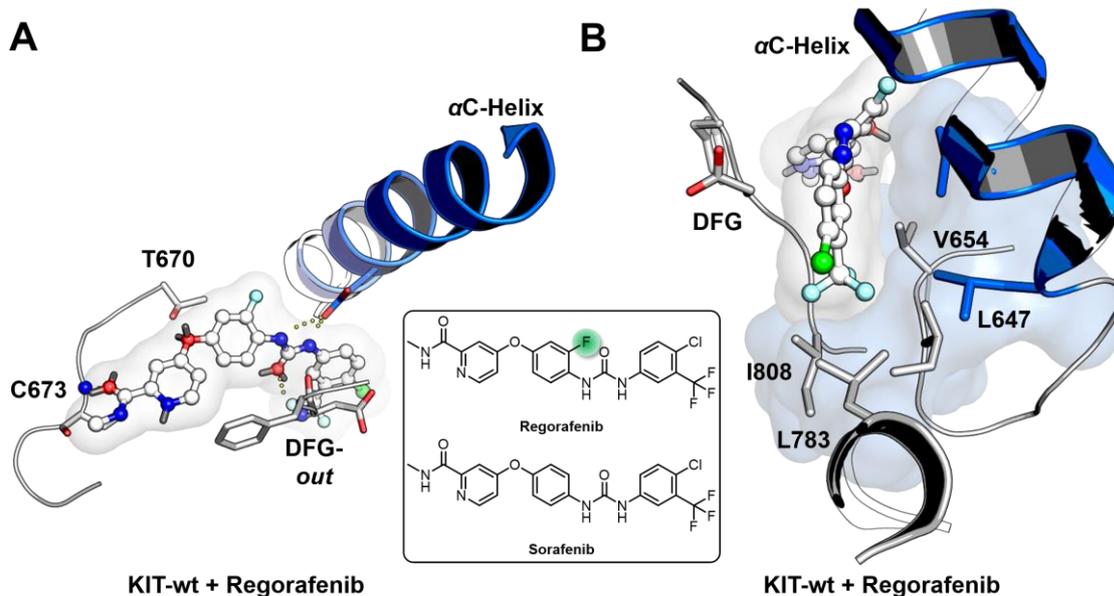


Abbildung 35: Docking-Struktur von KIT-wt mit Regorafenib. **A:** Übersicht der *Docking*-Struktur mit Oberflächenrepräsentation von Regorafenib und polare Interaktionen innerhalb der Bindetasche. **B:** Oberflächenrepräsentation von Regorafenib in der *backpocket*. **C:** Chemische Strukturen von Regorafenib und Sorafenib.

Wie erwartet zeigt auch Regorafenib den Bindungsmodus eines Typ IIa-Inhibitors, wobei die Amid-Gruppe mit dem Carbonylsauerstoff eine polare Interaktion mit dem Stickstoff des Rückgrats von Cys673 eingeht. Hier wäre jedoch auch durch die Analyse der oben genannten Kristallstrukturen denkbar, dass die Pyridin-Einheit eine um 180° rotierte Bindungspose einnehmen könnte und somit eine Interaktion zwischen dem Pyridin-Stickstoff und dem Rückgrat von Cys673 in der Scharnierregion eingehen würde.

Weiter wird die Pyridin-Einheit von der Phenylalanin-Seitenkette von Phe811 des DFG-Motivs stabilisiert. Weitere Interaktionen können zwischen den Stickstoffen des Harnstoff-Motivs mit Glu640 und zwischen dem Sauerstoff des Harnstoff-Motivs und dem Amin-Stickstoff des Rückgrats von Asp810 des DFG-Motivs identifiziert werden (Abbildung 35A).

Die CF₃-Gruppe von Regorafenib ist in einer hydrophoben Subtasche innerhalb der *backpocket* des Proteins gebunden, welche aus den Aminosäuren Leu644, Leu647, Ile653, Val654, Leu783 und Ile808 gebildet wird.

Im Vergleich zu Imatinib ragt Regorafenib weniger weit in die *backpocket* hinein, was vorteilhaft für die Bindung gegenüber AL-Mutanten sein könnte, da eine höhere Flexibilität der Aktivierungsschleife akzeptabel wäre. Dies wäre vor allem beim Auftreten sekundärer Mutationen innerhalb dieser Aktivierungsschleife von Vorteil, was durch die klinische Wirksamkeit von Regorafenib gegenüber bestimmten AL-Mutationen unterstützt wird. Weiter stellt sich jedoch die Frage, welche Folge die prominentesten Imatinib-Resistenzmutationen V654A und T670I auf den Bindungsmodus von Regorafenib haben (Abbildung 36).

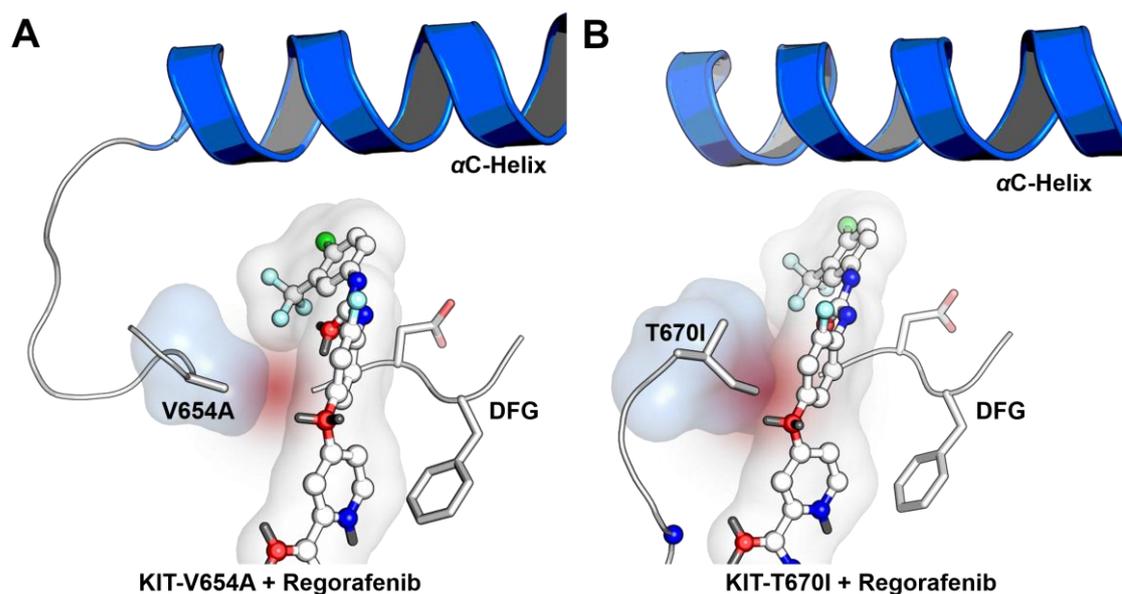


Abbildung 36: Strukturelle Analyse von klinisch auftretenden Resistenzmutationen gegen Imatinib und Auswirkungen auf den Bindungsmodus von Regorafenib. A: Repräsentation der V654A-Mutation, welche zum Verlust hydrophober Interaktionen zwischen dem Ligand und der Aminosäure führt. B: Repräsentation der T670I-Mutation, welche zu einer sterischen Interferenz mit dem Liganden führt. Mutationen wurden eingeführt mit dem *Mutagenesis-Tool* in PyMol 2.0.6.

Eine initiale strukturelle Analyse der Mutationen KIT-V654A und KIT-T670I zeigt einen negativen Einfluss auf den Bindungsmodus von Regorafenib. Da Val654 zur Bildung der hydrophoben Subtasche und somit zur Bindung der CF₃-Gruppe beiträgt, würde eine Mutation zu einem sterisch weniger anspruchsvollen Alanin zum Verlust wichtiger hydrophober Interaktionen führen und somit die Bindung von Regorafenib beeinflussen (Abbildung 36A). Auch bei Einführung eines sterisch anspruchsvollen Isoleucins an Position 670 würde es durch sterische Hinderung zu einem negativen Einfluss auf den Bindungsmodus kommen (Abbildung 36B). Für die Prüfung dieser Hypothesen ist jedoch eine experimentell erhaltene Struktur von KIT im Komplex mit Regorafenib unumgänglich.

3.5.3.3 Strukturbiologische Untersuchungen von Ripretinib

Der erst 2020 zugelassene Viertlinien-Inhibitor Ripretinib zeigt auf allen getesteten Proteinen hohe Aktivitäten, womit er zu diesem Zeitpunkt den ersten Typ IIa-Inhibitor mit guter Wirksamkeit auf AL-Mutanten darstellt. Auch in der Klinik konnte die Aktivität des Inhibitors in AL-mutierten GIST-Patienten nachgewiesen werden (INVICTUS Studie, NCT03353753). Obwohl Ripretinib speziell für die Behandlung von GIST entwickelt wurde, weist es jedoch mit 0,9 nM auch eine hohe Aktivität gegenüber VEGFR2-wt auf, was diesen Wirkstoff im Vergleich mit z. B. Imatinib weniger selektiv macht. Auch für Ripretinib konnte keine Komplexstruktur erhalten werden, weshalb für strukturelle Analysen die publizierte Kristallstruktur (PDB-ID: 6MOB) eines Halogen-Derivats von Ripretinib verwendet wird, welches anstelle des Brom-Substituenten ein Chlor an jener Position trägt (Abbildung 37C).^[133]

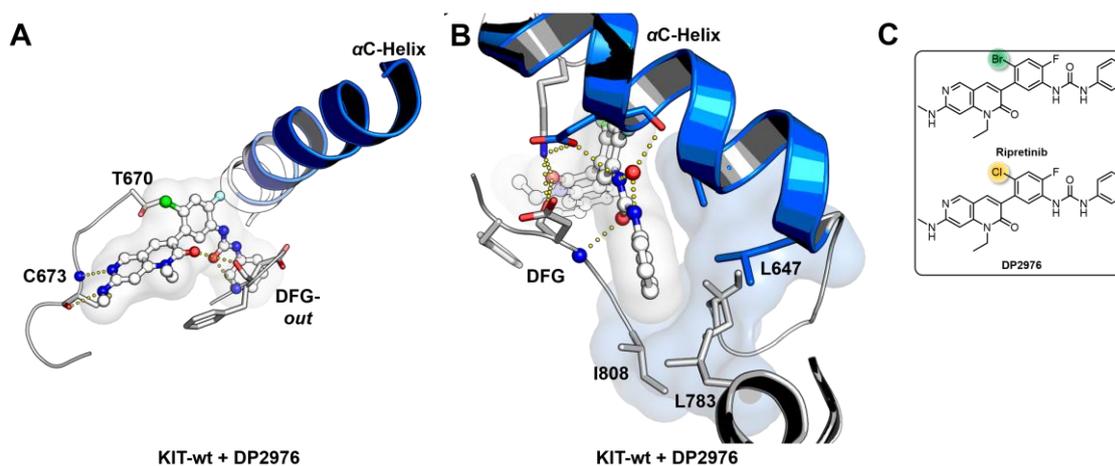


Abbildung 37: Komplexstruktur von KIT-wt gebunden an DP2976 (PDB-ID: 6MOB). A: Übersicht der Komplexstruktur mit Oberflächenrepräsentation von DP2976 und polare Interaktionen innerhalb der Bindetasche. B: Oberflächenrepräsentation von DP2976 in der *backpocket* von KIT-wt. C: Chemische Strukturen von Ripretinib und DP2976.

In der Komplexstruktur des Halogen-Derivats DP2976 von Ripretinib können polare Interaktionen des 1,7-Naphthyridinon-Grundgerüsts mit dem Amin-Stickstoff des Rückgrats von Cys673 identifiziert werden. Weiter ist eine Interaktion des Stickstoffs des 8-Aminomethyl-Substituenten mit dem Carbonylsauerstoff von Cys673 vorhanden (Abbildung 37A). Weitere polare Interaktionen bestehen zwischen dem 2-Sauerstoff der Naphthyridinon-Einheit und dem Carbonylsauerstoff von Asp810 des DFG-Motivs und zwischen dem Sauerstoff des Harnstoff-Motivs des Liganden in der *backpocket* und dem Amin-Stickstoff von Asp810 (Abbildung 37B). Die Seitenkette von Phe810 stabilisiert zusätzlich die Ethyl-Einheit durch hydrophobe Interaktionen. Wie auch bereits für Regorafenib identifiziert, ist auch der Phenyl-Substituent von Ripretinib bzw. hier DP2976 in einer hydrophoben Subtasche der *backpocket* gebunden, welche von Leu644, Leu647, Ile653, Leu783 und Ile808 gebildet wird. Hier fällt der Einbau zweier Rotamere der Ile653-Seitenkette auf, welcher durch die Elektronendichte unterstützt wird und auf eine Flexibilität der hydrophoben Seitenkette hindeutet, obwohl diese Aminosäure zur Bildung der hydrophoben Subtasche beiträgt. Die Wirksamkeit gegenüber Mutationen der Aktivierungsschleife kann auch und vor allem für Ripretinib durch die reduzierte Besetzung der *backpocket* des Proteins erklärt werden. Da als *backpocket*-Element lediglich ein Phenylrest vorhanden ist, der noch einmal einen deutlich kleineren räumlichen Anspruch im Vergleich zum CF₃- und Chlor-Substituenten in Regorafenib besitzt, kann auch von Ripretinib ein größeres konformationelles Spektrum der Aktivierungsschleife gebunden werden, was durch Mutationen in dieser ausgelöst würde. Auch für Ripretinib bzw. DP2976 werden an dieser Stelle jedoch zusätzlich die Bindung der KIT-V654A- und KIT-T670I-mutierten Varianten untersucht (Abbildung 38).

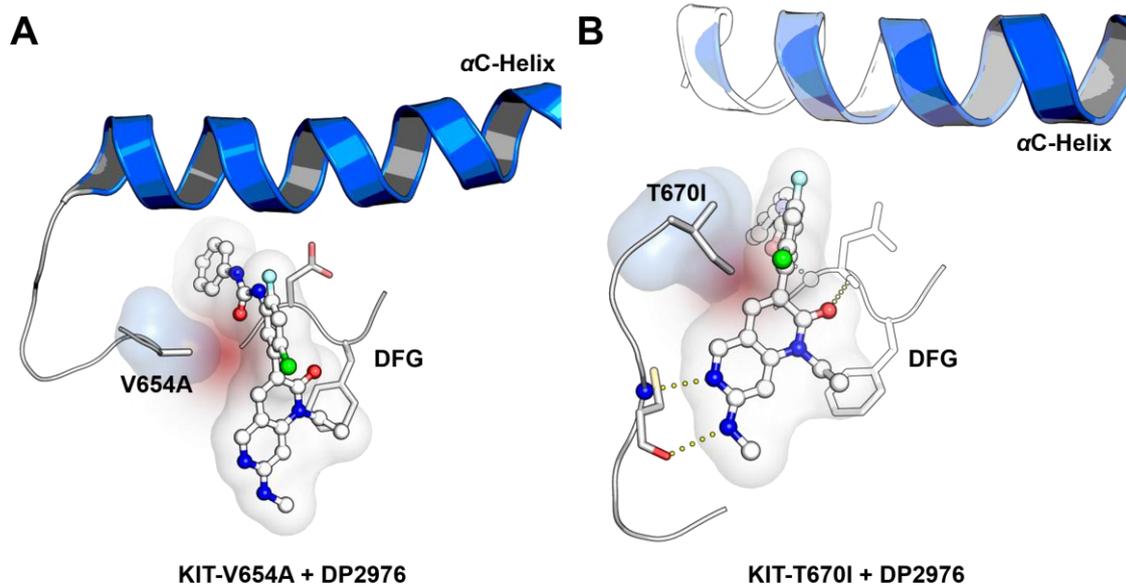


Abbildung 38: Strukturelle Analyse von klinisch auftretenden Resistenzmutationen durch Imatinib und Auswirkungen auf den Bindungsmodus von DP2976. **A:** Repräsentation der V654A-Mutation, welche zum Verlust hydrophober Interaktionen zwischen dem Ligand und der Aminosäure führt. **B:** Repräsentation der T670I-Mutation, welche zu einer sterischen Interferenz mit dem Liganden führt. Mutationen wurden eingeführt mit dem *Mutagenesis-Tool* in PyMol 2.0.6.

Für beide auftretenden Mutationen könnte entweder ein Verlust wichtiger hydrophober Interaktionen (V654A, Abbildung 38A) oder sterische Hinderung (T670I, Abbildung 38B) durch Einführung einer sterisch anspruchsvollen Isoleucin-Seitenkette beobachtet werden. Insgesamt lässt sich also festhalten, dass mit den aktuell zugelassenen Therapielinien, vor allem die Türsteher-Mutation T670I in KIT nicht effektiv adressiert werden kann, was die Notwendigkeit weiterer Wirkstoff-Entwicklung deutlich macht.

3.5.3.4 Strukturbiologische Untersuchungen von IDRX-42

Der durch Hochdurchsatz-Screenings und Leitstruktur-Optimierung entwickelte neuartige Inhibitor IDRX-42 (ehemals M4205) von der Merck KGaA wurde speziell für die Adressierung von V654A-mutiertem KIT entwickelt, sollte aber insgesamt im Vergleich zu anderen Inhibitoren ein breiteres Spektrum auftretender KIT-Mutationen adressieren können.^[134] In den biochemischen Daten werden sowohl die Aktivität als auch die Selektivität mit 4 nM auf KIT-D816H gegenüber 1900 nM auf PDGFRA-D842V weiter untermauert.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltene Komplexstruktur mit KIT-wt wurde durch *Soaking* erhalten und soll daher auch mit der bereits publizierten Co-Kristallstruktur hinsichtlich der Unterschiede verglichen werden. Bei der Analyse der *Soaking*-Struktur fällt auf, dass der Ligand ebenfalls wie Imatinib, Regorafenib und Ripretinib als Typ IIa-Inhibitor an das Protein gebunden ist (Abbildung 39). Da für das *Soaking* Kristalle verwendet wurden, welche zuvor mit einem Typ I-Inhibitor co-kristallisiert wurden, musste die Kinase eine große konformationelle Änderung der Aktivierungsschleife durchlaufen, um in die DFG-*out*-Konformation überzugehen. Die konformationelle Änderung hatte dabei keinen großen Einfluss auf die Qualität des Kristalls, da die Struktur eine Auflösung von 2 Å aufweist. Sowohl die Zellkonstanten als auch die Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$ entsprechen denjenigen der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Co-Kristallstrukturen mit Typ I-Inhibitoren.

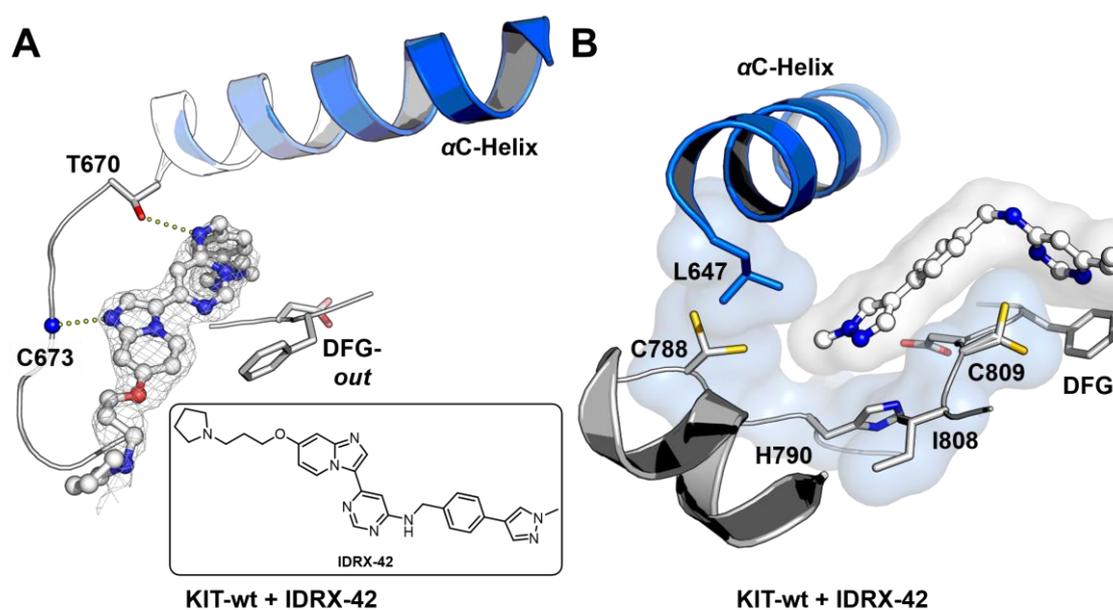


Abbildung 39: Soaking-Struktur von KIT-wt mit IDRX-42. A: Chemische Struktur von IDRX-42 und Übersicht der *Soaking*-Struktur. $|2F_o - F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0)-Elektronendichtekarte von IDRX-42 und polare Interaktionen innerhalb der Bindetasche. B: Oberflächenrepräsentation von IDRX-42 in der *backpocket* des Proteins.

Das N1 der Imidazopyridin-Einheit des Inhibitors weist eine Wasserstoffbrückenbindung mit der Amino-Gruppe des Rückgrats von Cys673 in der Scharnierregion auf (Abbildung 39A). Auch mit der Seitenkette der Türsteher-Aminosäure Thr670 können polare Interaktionen mit IDRX-42 festgestellt werden (Anh. 6.4.2, Abbildung 85). Weitere polare Interaktionen sind nicht vorhanden. Wie in Abbildung 39B erkennbar ist, lassen sich sowohl in der ATP-Bindetasche als auch in der *backpocket* hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Leu595, Leu644, Val654, Thr670, Tyr672 und Leu799 identifizieren (Anh. 6.4.2, Abbildung 85). Interessanterweise konnte in Molekül B der asymmetrischen Einheit unterhalb der α C-Helix während des Strukturbaus weitere $|F_o - F_c|$ -Elektronendichte identifiziert werden, welche durch ihre Anordnung und Form zwei weiteren Ligandenmolekülen zugeordnet werden kann (nicht gezeigt). Diese zusätzliche Bindung weiterer Ligandenmoleküle könnte durch die während des *Soakings* stark erhöhte lokale Konzentration des zugegebenen Inhibitors hervorgerufen worden sein, was möglicherweise zu einer Stabilisierung der Proteinmoleküle beigetragen.

Auch für IDRX-42 werden hydrophobe Wechselwirkungen mit Val654 bzw. polare Interaktionen mit Thr670 beobachtet. Da IDRX-42 durch *Screening* und Testung spezieller KIT-Mutanten entwickelt wurde, sollen auch hier die nach Imatinib-Therapie am häufigsten auftretenden Resistenzmutationen an den Positionen dieser beiden Aminosäuren analysiert werden (Abbildung 40).

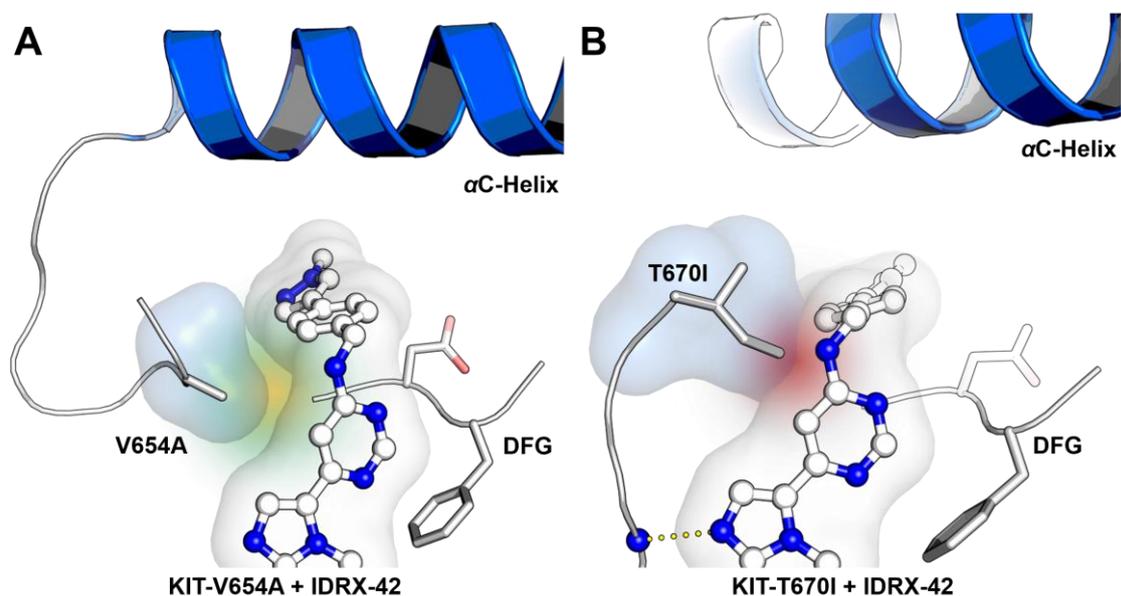


Abbildung 40: Analyse der während der Entwicklung von IDRX-42 untersuchten Resistenzmutationen. A: Interaktionen von IDRX-42 mit V654A. **B:** Durch Einführung eines sterisch anspruchsvollen Isoleucins wird die effiziente Bindung von IDRX-42 an das Zielprotein verhindert. Mutationen wurden eingeführt mit dem *Mutagenesis-Tool* in PyMol 2.0.6.

IDRX-42 konnte als erster Ligand effektiv und mit guten Aktivitäten an V654A-mutiertes KIT binden.^[134] Dies lässt sich dadurch erklären, dass der Ligand nicht nur Wechselwirkungen mit der Seitenkette der Aminosäure Val654 eingeht, sondern auch mit dem Rückgrat der Aminosäure (Abbildung 40A). Bei einer Mutation könnte deshalb geschlussfolgert werden, dass zwar ein Verlust der Wechselwirkungen mit der Seitenkette, aber nicht mit dem Rückgrat der Aminosäure verzeichnet würde (Abbildung 40A). Wie schon bei den anderen Inhibitoren früherer Therapielinien stellte auch bei der Entwicklung von IDRX-42 die Mutation der Türsteher-Aminosäure Thr670 zu einem Isoleucin in präklinischen Studien ein Problem dar. Die räumliche Nähe, aber auch der Verlust einer polaren Interaktion durch die Einführung eines Isoleucins, führt zu einer deutlichen sterischen Hinderung zwischen dem Protein und dem Ligand (Abbildung 40B), wodurch dieser aus dem favorisierten Bindungsmodus verdrängt würde. Durch das vergleichsweise reduzierte Interaktionsmuster des Liganden mit dem Protein und durch die vielen drehbaren Bindungen im Liganden selbst, könnte jedoch eine erhöhte Aktivität gegenüber Mutationen in der Aktivierungsschleife geschlussfolgert werden, welche zumindest in biochemischen Assays bereits nachgewiesen wurde.^[134] Durch die erhöhte Flexibilität könnte der Inhibitor somit die Möglichkeit haben, ein breiteres konformationelles Spektrum der Zielkinase im Vergleich zu anderen Liganden zu adressieren und somit zu inhibieren.

Da in der Literatur bereits eine Co-Kristallstruktur von IDRX-42 (PDB-ID: 7ZW8) vorhanden war, sollen im Folgenden Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten analysiert werden (Abbildung 41). Als erster Unterschied lässt sich feststellen, dass für die publizierte Co-Kristallstruktur ein Insektenzell-basiertes Genkonstrukt verwendet wurde, welches auf der PDB-ID 3G0E basierte, während im gesamten Rahmen dieser Arbeit ein auf der PDB-ID 6GQK basiertes Kristallisationskonstrukt, exprimiert in *E. coli*, verwendet wurde. Mit jeweils 2.0 Å bei der *Soaking*-Struktur und 2.1 Å bei der Co-Kristallstruktur sind die Strukturen im gleichen Auflösungsrahmen angesiedelt. Die Raumgruppe $P 2_1 2_1 2_1$ ist identisch, während sich die Längen der Zellkonstanten drastisch unterscheiden. Dies lässt sich zum einen auf die unterschiedlichen Kristallisationskonstrukte, aber auch auf den Unterschied zwischen *Soaking* und Co-Kristallisation zurückzuführen. Bei einem ersten strukturellen Vergleich fällt eine sehr gute Übereinstimmung der Strukturen auf (Abbildung 41).

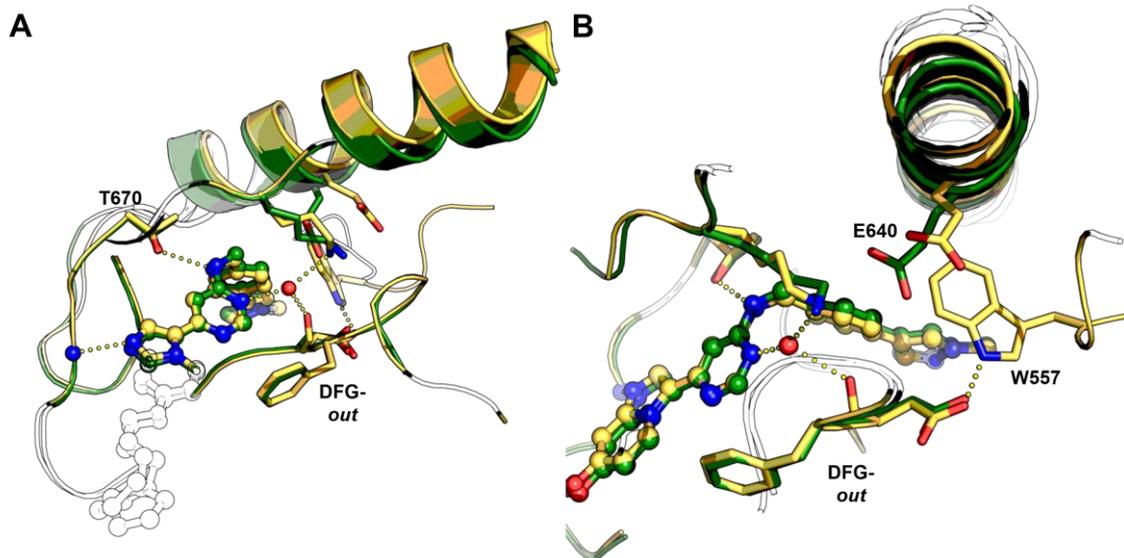


Abbildung 41: Struktureller Vergleich der *Soaking*-Struktur mit der publizierten Co-Kristallstruktur von IDR-42 (PDB-ID: 7ZW8). **A:** Übersicht der alignierten Strukturen. Grün: *Soaking*-Struktur, welche im Rahmen dieser Arbeit generiert werden konnte. Gelb: publizierte Co-Kristallstruktur (PDB-ID: 7ZW8). **B:** Repräsentation des DFG-Motivs und der *backpocket* der alignierten Kristallstrukturen. Grün: *Soaking*-Struktur, welche im Rahmen dieser Arbeit generiert werden konnte. Gelb: publizierte Co-Kristallstruktur (PDB-ID: 7ZW8).

Es lässt sich feststellen, dass die α C-Helix der *Soaking*-Struktur im Vergleich zur Co-Kristallstruktur etwas herabgesenkt zur Bindetasche orientiert ist (Abbildung 41A). Dieser Unterschied fällt jedoch so gering aus, dass er auch als kristallographisches Artefakt angesehen werden kann. Auch die Scharnierregion und die DFG-Motive zeigen eine identische Ausrichtung. Die beobachtete polare Interaktion des Liganden mit der Seitenkette der Türsteher-Aminosäure Thr670 ist auch in der publizierten Co-Kristallstruktur präsent und kann bereits in der Komplexstruktur mit einem Vorläufermolekül von IDR-42 identifiziert werden (PDB-ID: 7ZY6). Ein Unterschied zwischen den Strukturen tritt bei der Analyse der *backpocket*-Bindung auf (Abbildung 41B). In der publizierten Co-Kristallstruktur ragt die JMD mit Trp557 in die *backpocket* des Proteins herein, wobei diese eine Konformation einnimmt, in der Trp557 sowohl eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Asp810 des DFG-Motivs, als auch hydrophobe Wechselwirkungen mit IDR-42 eingeht. In der *Soaking*-Struktur hingegen kann eine von der *backpocket* weg gedrehte Konformation der JMD beobachtet werden. Auch dieser Unterschied lässt sich potenziell durch die unterschiedlichen Kristallisationsvorgänge erklären, wobei insgesamt jedoch geschlussfolgert werden kann, dass in beiden Fällen die Stabilisierung der regulatorischen α C-Helix vorteilhaft zur Ligandenbindung und zur Stabilisierung des Proteins im Kristall beizutragen scheint.

3.5.3.5 Strukturbiologische Untersuchungen von Ponatinib

Für die Behandlung von GIST könnte ebenfalls Ponatinib von großem Interesse sein, da dieser Typ IIa-Inhibitor als einziger Inhibitor wirksam gegenüber der in CML auftretenden BCR-ABL-T315I-Mutation ist. Außerdem weist der Inhibitor mit 14 nM auf KIT-D816H und 16 nM auf PDGFRA-D842V eine höhere Aktivität gegenüber den AL-mutierten Kinasen auf als z. B. Imatinib und Regorafenib.

Die bisherigen Strukturanalysen der erhaltenen Kristallstrukturen lassen den Schluss zu, dass bisher keiner der zugelassenen Inhibitoren die Türsteher-Mutation effektiv zu adressieren scheint, da die verwendeten Inhibitoren direkte Interaktionen mit der Seitenkette des Thr670 eingehen. Um die Türsteher-Mutation T315I in BCR-ABL zu umgehen, wurde deshalb von Ariad Pharmaceuticals der Wirkstoff Ponatinib mit einem Alkin-Linker entwickelt und 2012 durch die FDA in einem beschleunigten Verfahren für die Behandlung von CML zugelassen. Auf struktureller Ebene ist auch Ponatinib als Typ IIa-Inhibitor an eine DFG-*out*-Konformation von KIT-wt gebunden, wobei ein komplexes Interaktionsmuster identifiziert werden kann (Abbildung 42, Anh. 6.4.2, Abbildung 86).

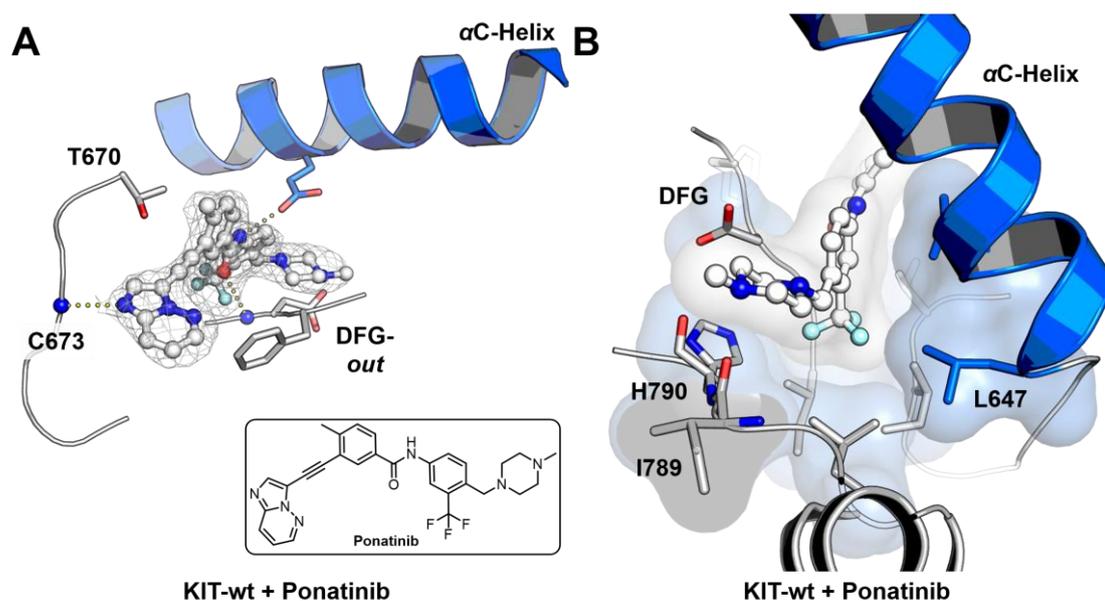


Abbildung 42: Komplexstruktur von Ponatinib mit KIT-wt. A: Chemische Struktur von Ponatinib und Übersicht des Bindungsmodus in KIT-wt. $[2F_o - F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0)-Elektronendichtekarte von Ponatinib. B: Interaktionsmuster der CF₃-Gruppe von Ponatinib in der *backpocket* des Proteins.

Der N1-Stickstoff des Imidazopyridazins geht als Element, welches mit der Scharnierregion interagiert, eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Stickstoff des Rückgrats von Cys673 ein. Weitere polare Interaktionen können nur mit dem Stickstoff der verbrückenden Amid-Funktion und dem Asp810 des DFG-Motivs beobachtet werden. Auch eine ionische Interaktion zwischen dem Methylpiperazin und dem Rückgrat von His790 ist erkennbar (Abbildung 42B, Anh. 6.4.2, Abbildung 86).

Die CF₃-Gruppe bindet wie auch bei Regorafenib in eine hydrophobe Tasche, welche aus Val643, Leu644, Leu647, Ile653, Val654, Leu783 und Ile808 gebildet wird und eine komplementäre Form zur CF₃-Gruppe einnimmt (Abbildung 42B, Anh. 6.4.2, Abbildung 86). Diese Komplementarität erklärt auf struktureller Ebene, weshalb dieser Substituent des Liganden essenziell für die Aktivität im Protein ist. Die Ligandenbindung wird weiter durch hydrophobe Interaktionen mit Leu595, Val603, Ala621, Val622, Val668, Thr670, Tyr672, Leu799 und Phe811 unterstützt.

Da Ponatinib extra für die in BCR-ABL auftretende T315I-Mutation entwickelt wurde, soll unter anderem untersucht werden, ob in KIT ebenfalls eine Adressierung der analogen Türsteher-Mutation T670I durch Ponatinib möglich wäre (Abbildung 43).

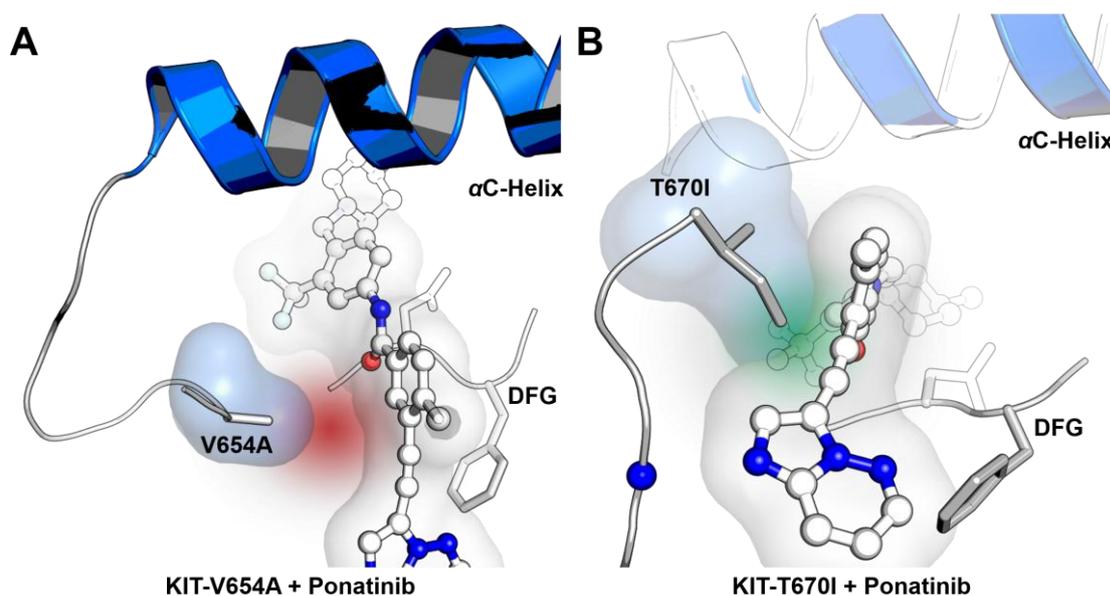


Abbildung 43: Strukturanalyse von Ponatinib zum Verständnis von auftretenden Resistenzmutationen. A: Verlust an Interaktionen durch Einführung eines sterisch weniger anspruchsvollen Alanins (V654A). **B:** Entwicklung hydrophober Wechselwirkungen mit Ponatinib durch Einführung eines sterisch anspruchsvollen Isoleucins bei auftretender Mutation der Türsteher-Aminosäure. Mutationen wurden eingeführt mit dem *Mutagenesis-Tool* in PyMol 2.0.6.

Es wurde bereits erläutert, dass die CF₃-Gruppe des Inhibitors in eine hydrophobe Tasche bindet, an dessen Bildung ebenfalls Val654 beteiligt ist. Zwischen dem Protein und dem Liganden bestehen an dieser Stelle hydrophobe Wechselwirkungen (Abbildung 43A). Durch eine V654A-Mutation würden nicht nur Interaktionen innerhalb der hydrophoben Tasche der CF₃-Gruppe, sondern auch Wechselwirkungen mit dem Phenylrest des Liganden verloren gehen. Eine Mutation an dieser Stelle würde also zu einem deutlichen Aktivitätsverlust führen. Bei Analyse der Türsteher-Mutation wird deutlich, dass der Alkin-Linker von Ponatinib im Falle einer T670I-Mutation nicht nur sterisch weniger betroffen wäre, sondern dass durch die Ile-Seitenkette hydrophobe Wechselwirkungen hervorgerufen werden würden, welche vorteilhaft für eine Ligandenbindung sein könnten (Abbildung 43B).

Es lässt sich also schlussfolgern, dass Ponatinib der erste Inhibitor mit Wirkung bei T670I-mutierten GIST sein könnte. Dennoch können auch von Ponatinib nicht alle Mutationen inhibiert werden, da durch den spezifischen Bindungsmodus weit in die *backpocket* des Proteins ebenfalls nur bestimmte Konformationen gebunden werden können.

3.5.3.6 Strukturbiochemische Untersuchungen von S116836

Ein weiterer, bisher lediglich präklinisch getesteter Inhibitor ist S116836, welcher ebenfalls für die Adressierung von T315I-mutierten CML-Erkrankungen entwickelt wurde.^[135, 136]

Im Rahmen dieser Arbeit sind noch keine biochemischen Daten vorhanden, was zukünftig nachgeholt werden sollte. Auffällig ist, dass auch beim Design von S116836 ein Alkin-Linker verwendet wurde, um die Türsteher-Mutation umgehen zu können. Strukturell ähneln sich S116836 und Ponatinib jedoch wenig. Während Ponatinib als Scharnierregion-bindendes Element ein Imidazopyridazin besitzt, ist dieses bei S116836 durch ein an Pyrimidin gekoppeltes 2-N-Cyclopropyl ausgetauscht (Abbildung 44A). Als Löslichkeitsgruppe besitzt S116836 eine N1-verlinkte Imidazol-Einheit, während Ponatinib an dieser Stelle ein Methylpiperazin trägt. Die erhaltene Komplexstruktur weist eine Auflösung von 2,1 Å und die für Typ IIa-Inhibitoren typischen Zellkonstanten auf. Insgesamt lässt sich auch an dieser Stelle ein für diese Inhibitorklasse typischer Bindungsmodus feststellen, wobei sowohl das DFG-Motiv als auch die α C-Helix eine *out*-Konformation einnehmen (Abbildung 44A).

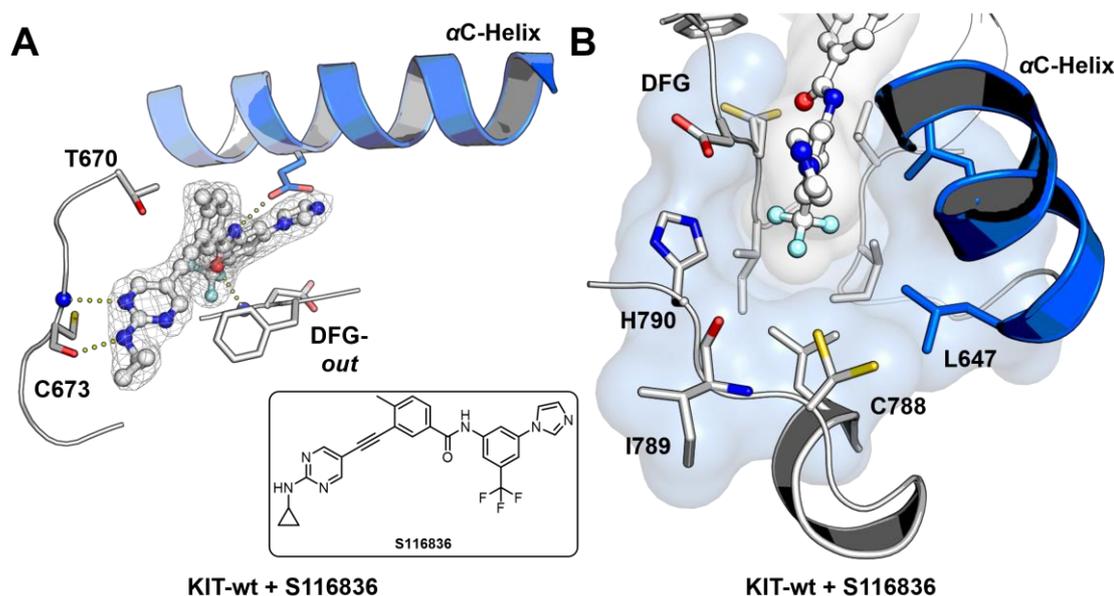


Abbildung 44: Komplexstruktur von KIT-wt gebunden an S116836. A: Chemische Struktur von S116836 und Übersicht des Bindungsmodus in KIT-wt. $|2F_o - F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0)-Elektronendichtekarte von S116836. **B:** Illustration des *backpocket*-Elements. Dargestellt ist die hydrophobe Subtasche, welche durch die CF₃-Gruppe des Liganden adressiert wird.

Durch die 2-N-Cyclopropyl-gekoppelte Pyrimidin-Einheit weist der Ligand zwei polare Interaktionen sowohl mit dem Sauerstoff als auch mit dem Stickstoff des Rückgrats von Cys673 auf (Abbildung 44A). Hier ist jedoch die exakte Orientierung der N-Cyclopropyl-Einheit entscheidend für die Ausprägung der Interaktion mit dem Sauerstoff des Rückgrats. Weitere Wechselwirkungen bestehen zwischen der Amidgruppe, Glu640 und Asp810, wobei der Stickstoff der Amidgruppe mit der Seitenkette von Glu640 interagiert, während der Sauerstoff eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Stickstoff des Rückgrats von Asp810 eingeht (Abbildung 44A, Anh. 6.4.2, Abbildung 87). Durch diese polaren Interaktionen zwischen dem Liganden und dem Protein werden die regulatorischen Elemente des Proteins in einer spezifischen Konformation stabilisiert. Wie auch in den Komplexstrukturen von Regorafenib und Ponatinib beobachtet wird, adressiert die CF₃-Gruppe des Liganden eine hydrophobe Subtasche in der *backpocket* des Proteins, welche komplementär zu der Form des CF₃-Substituenten ist. Auch hier wird die hydrophobe Subtasche durch die Aminosäuren Ile653, Val654, Leu783 und Ile808 aufgebaut. Die Imidazol-Gruppe zeigt im Vergleich zum Methylpiperazin von Ponatinib keine weiteren Interaktionen mit dem Protein. Die Aryl- und Carbonylreste weisen zusätzlich hydrophobe Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Leu595, Val621, Val622, Val668, Thr670, Tyr672, Leu799 und Phe811 auf (Anh. 6.4.2, Abbildung 87).

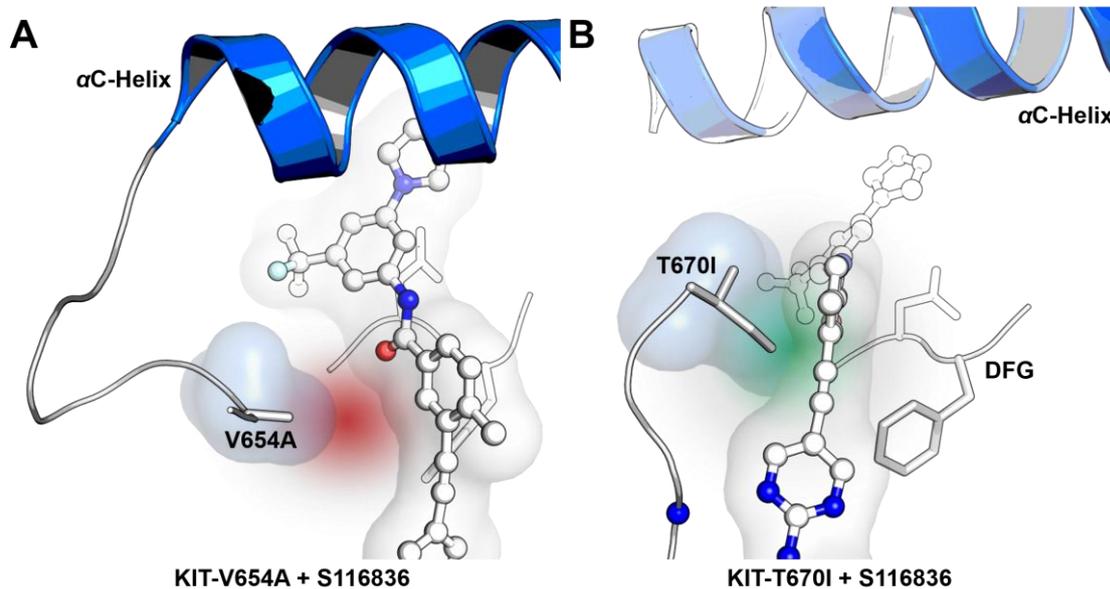


Abbildung 45: Strukturanalyse von S116836 zum Verständnis von auftretenden Resistenzmutationen.
A: Verlust an Interaktionen durch Einführung eines sterisch weniger anspruchsvollen Alanins (V654A).
B: Entwicklung hydrophober Wechselwirkungen mit Ponatinib durch Einführung eines sterisch anspruchsvollen Isoleucins bei auftretender Mutation der Türsteher-Aminosäure. Mutationen wurden eingeführt mit dem *Mutagenesis-Tool* in PyMol 2.0.6.

Wie auch bei Ponatinib trägt Val654 zum Aufbau der hydrophoben Subtasche und dadurch zur Bindung der CF₃-Gruppe bei, was auch an dieser Stelle bei einer V654A-Mutation einen Aktivitätsverlust des Liganden bewirken würde (Abbildung 45A). Ebenfalls kann durch die Strukturanalyse von S116836 gebunden an KIT-wt ermittelt werden, dass eine Adressierung der T670I-Mutante durch den enthaltenen Alkin-Linker möglich wäre (Abbildung 45B). Insgesamt weist der Ligand ein reduziertes Interaktionsmuster im Vergleich zu Ponatinib auf, was sich positiv auf die Aktivität gegenüber Mutationen in der Aktivierungsschleife auswirken könnte.

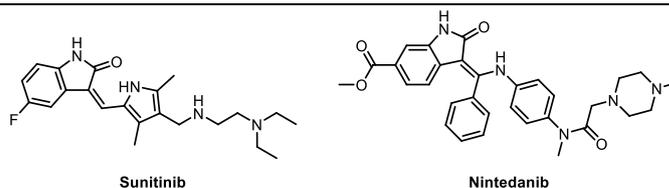
3.5.4 Vergleich kommerziell verfügbarer Typ IIb-Inhibitoren

3.5.4.1 Strukturbiologische Untersuchungen von Sunitinib

Sunitinib zeigt sowohl für die Wildtypproteine als auch für die AL-Mutanten von KIT und PDGFRA IC₅₀-Werte im ein- bzw. zweistellig nanomolaren Bereich. Als Multikinase-Inhibitor zeigt Sunitinib jedoch ebenfalls hohe Aktivität gegenüber VEGFR2-wt mit einem IC₅₀-Wert von 13 nM (Tabelle 5). Dies erhöht somit auch die Wahrscheinlichkeit von Nebenwirkungen.

Tabelle 5: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte kommerziell erhältlicher Typ IIb-Inhibitoren. Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung. n ≥ 3. n.d. = *no data available*/keine Daten vorhanden.

		HTRF IC ₅₀ [nM]				
Inhibitor	Typ	KIT-wt	KIT-D816H	PDGFRA-wt	PDGFRA-D842V	VEGFR2-wt
Sunitinib	IIb	2 ± 1	52 ± 14	3 ± 1	34 ± 8	13 ± 1,4
Nintedanib		0,5 ± 0,3	1 ± 0,2	0,2 ± 0,1	3 ± 2,1	n.d.



Dieser Multikinase-Inhibitor besitzt ein Indolinon-Grundgerüst als Scharnierregion-bindendes Element und nimmt innerhalb der Kinase einen Typ IIb-Bindungsmodus in einer auto-inhibierten DFG-*out*-Konformation ein (Abbildung 46A). Die erhaltene Komplexstruktur mit KIT-wt weist mit 1,5 Å eine hohe Auflösung auf und die erhaltene Raumgruppe C 1 2 1 entspricht derjenigen der apo KIT-wt-Struktur.

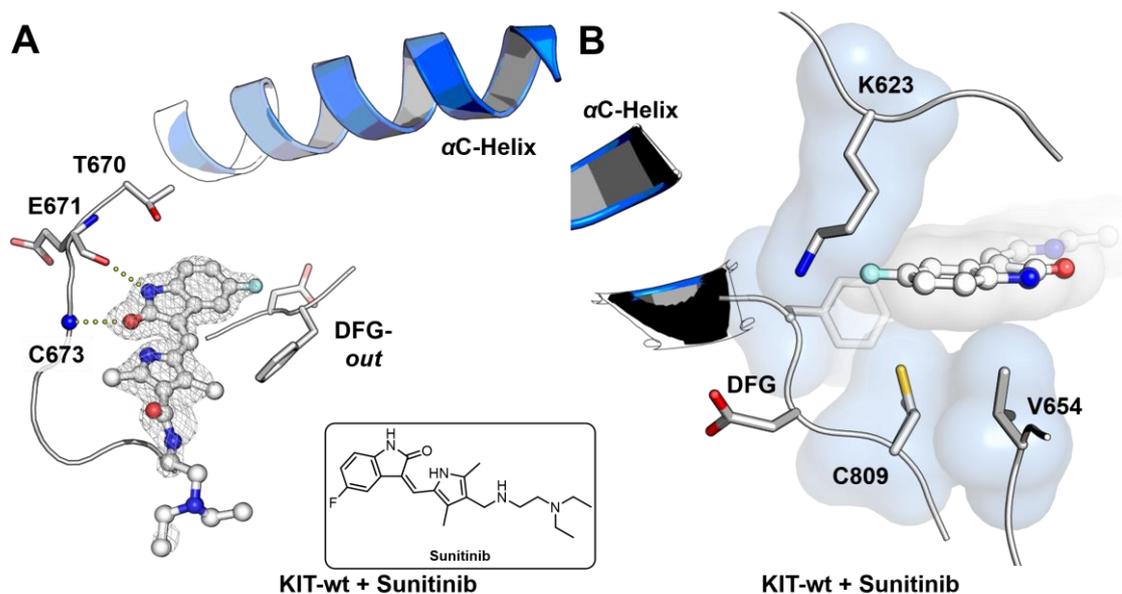


Abbildung 46: Komplexstruktur von KIT-wt gebunden an Sunitinib. **A:** Chemische Struktur von Sunitinib und Übersicht der Komplexstruktur. $|2F_o - F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0)-Elektronendichtekarte von Sunitinib und polare Interaktionen innerhalb der Bindetasche. **B:** Oberflächenrepräsentation der Bindetasche des Indolinon-Grundgerüsts von Sunitinib.

Das Interaktionsmuster von Sunitinib ist im Vergleich mit dem von z. B. Imatinib in KIT-wt reduzierter, da der Ligand eine Lösungsmittel-exponierte Bindungspose einnimmt und demnach nicht in die *backpocket* oder weiter in die ATP-Bindetasche hineinragt. Interessanterweise bindet Sunitinib eine Kinasekonformation, in welcher die JMD in die *backpocket* des Proteins hineinragt. Der Sauerstoff des Indolinons geht eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rückgrat-NH von Cys673 und der Indolinon-Stickstoff mit dem Carbonylsauerstoff des Rückgrats von Glu671 ein (Abbildung 46A). Hydrophobe Wechselwirkungen bestehen zwischen Sunitinib und den Aminosäuren Leu595, Val603, Ala621, Val654, Thr670, Tyr672, Leu799, Phe811 und Ala814 (Abbildung 46B, Anh. 6.4.2, Abbildung 88).

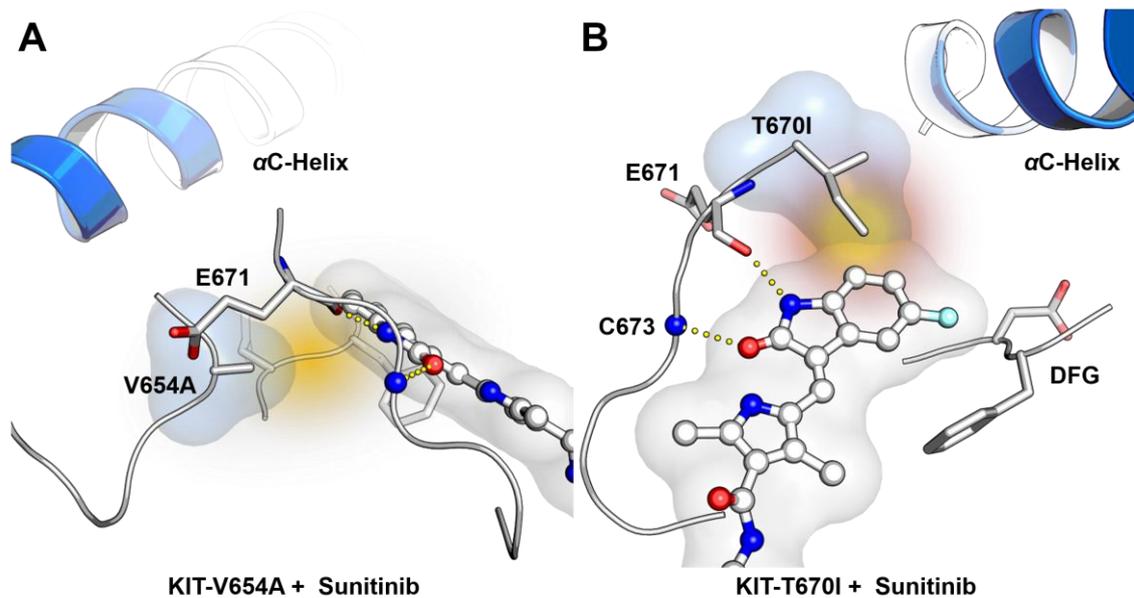


Abbildung 47: Analyse der am häufigsten auftretenden Resistenzmutationen. A: Reduzierte Interaktionen von Sunitinib mit V654A durch Einführung einer sterisch weniger anspruchsvolleren Aminosäure. B: Durch Einführung eines sterisch anspruchsvollen Isoleucins wird die effiziente Bindung von Sunitinib an das Zielprotein herabgesetzt. Mutationen wurden eingeführt mit dem *Mutagenesis-Tool* in PyMol 2.0.6.

Die Imatinib-Resistenz vermittelnden Mutationen V654A und T670I lassen sich teilweise durch die Verwendung von Sunitinib adressieren, was sich durch die Interaktionsmuster mit den entsprechenden Aminosäuren erklären lässt (Abbildung 47). Es ist erkennbar, dass keine direkten polaren Interaktionen zwischen dem Liganden und den entsprechenden Aminosäuren bestehen. Weiterhin sind die hydrophoben Wechselwirkungen von Val654 mit Sunitinib wesentlich weniger stark ausgeprägt als mit den analysierten Typ IIa-Inhibitoren, was bei einer Mutation zu Alanin zu einem geringeren Aktivitätsverlust führen sollte (Abbildung 47A). Im Falle einer auftretenden T670I-Mutation, hervorgerufen durch Imatinib-Therapie, käme es zwar zu einer sterischen Hinderung, welche jedoch auch an dieser Stelle wesentlich weniger ausgeprägt wäre als z. B. mit Imatinib, Regorafenib oder Ripretinib (Abbildung 47B). Aufgrund dieser Analysen kann geschlossen werden, dass sich die Wirksamkeit von Sunitinib auf struktureller Ebene erklären lässt, wobei dennoch eine Reduzierung des inhibitorischen Effekts beachtet werden sollte. Weiterhin wird Sunitinib in anderen Kinasen als Typ I-Inhibitor zur Bindung von aktiven DFG-*in*-Konformationen beschrieben.^[137] Es wäre demnach denkbar, dass auch bestimmte aktive Konformationen von Sunitinib gebunden werden könnten. Hier sollte jedoch beachtet werden, dass durch die Absenkung der Gly-reichen Schleife während des Übergangs in die aktive Kinasekonformation, die Sunitinib-Bindung weniger präferiert wird, weshalb z. B. spezielle Mutationen der Aktivierungsschleife nicht effektiv von Sunitinib adressiert werden könnten.

3.5.4.2 Strukturbiologische Untersuchung von Nintedanib

Nintedanib ist ein von Boehringer Ingelheim entwickelter TKI, welcher unter anderem die Angiogenese von Tumoren unterdrückt.^[103, 138] Entwickelt wurde der Wirkstoff für die Adressierung von VEGFR, FGFR und PDGFRA/B und ist zugelassen für die Kombinations-Therapie des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC, engl.: *non-small cell lung cancer*) mit Docetaxel.^[138] Nicht nur seine Aktivität gegenüber den genannten RTKs, sondern auch die durch das Indolinon-Grundgerüst auftretende Verwandtschaft zu Sunitinib, machen Nintedanib zu einem interessanten Inhibitor im Bereich der klinischen Adressierung von KIT und PDGFRA. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass Nintedanib bestimmte GIST-Zelllinien effektiv im Wachstum hemmen kann, was laut der Literatur nicht allein durch KIT-Inhibition ausgelöst wird.^[103] Auf biochemischer Ebene zeigt Nintedanib mit 1 nM bzw. 3 nM gegenüber KIT-D816H bzw. PDGFRA-D842V eine 52- bzw. 11,33-fach höhere inhibitorische Aktivität auf den entsprechenden Zielproteinen im Vergleich zu Sunitinib. Dieser Trend ist noch deutlicher beim Vergleich mit den IC₅₀-Werten von Imatinib (KIT-D816H: 480 nM, PDGFRA-D842V: 1200 nM) und Regorafenib (KIT-D816H: 200 nM, PDGFRA-D842V: 220 nM) ausgeprägt.

Wesentliche Unterschiede zwischen Sunitinib und Nintedanib stellen zum einen die Löslichkeits-fördernde Gruppe dar und zum anderen die eingebrachte Phenylgruppe unterhalb der Indolinon-Einheit in Nintedanib. Die erhaltene Raumgruppe P 6₅ 2 2 tritt für KIT-wt zum ersten Mal auf. Dieser Raumgruppe liegt eine sehr hohe Symmetrie zugrunde. Auch die erhaltenen Zellkonstanten mit $a/b = 54 \text{ \AA}$ und $c = 460 \text{ \AA}$ sind bisher von publizierten Kristallstrukturen von KIT nicht bekannt. Bei Analyse der erhaltenen Komplexstruktur mit KIT-wt wird zunächst wie auch in der Komplexstruktur von Sunitinib der Typ IIb-Bindungsmodus in einer DFG-*out*-Kinasekonformation deutlich, wobei der N1-Stickstoff des Indolinons eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Rückgrat von Glu671 eingeht, während das Sauerstoffatom polare Interaktionen mit dem Stickstoff des Rückgrats von Cys673 aufweist (Abbildung 48A). Im Vergleich zur Sunitinib-Struktur ist die JMD jedoch nicht in der *backpocket* stabilisiert, sondern aus ihr herausgedreht. Es liegt also keine auto-inhibierte Konformation des Proteins vor.

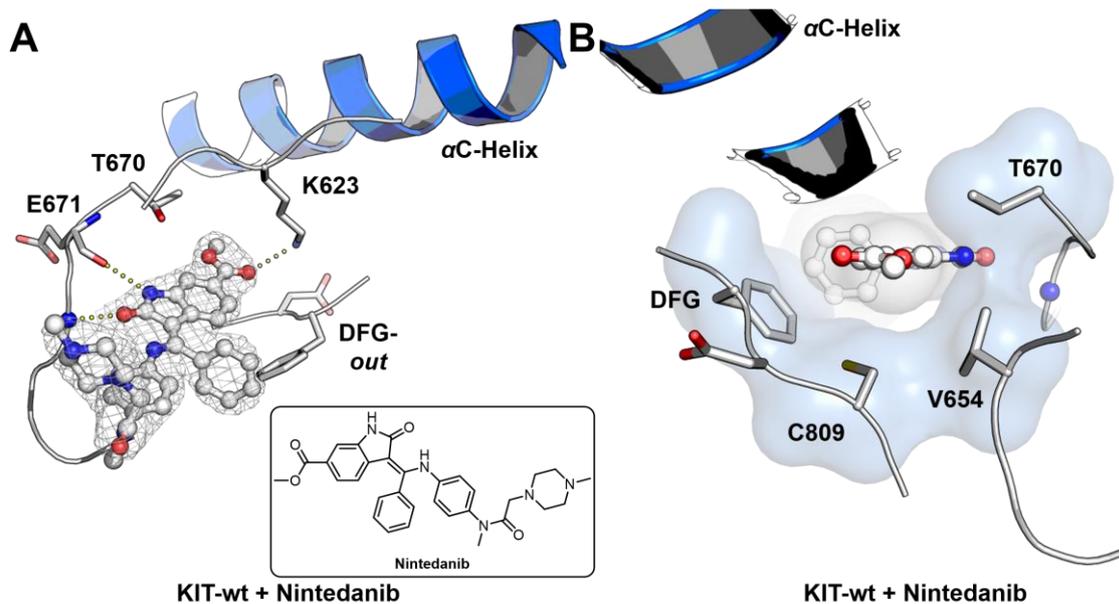


Abbildung 48: Komplexstruktur von KIT-wt gebunden an Nintedanib. **A:** Chemische Struktur von Nintedanib und Übersicht des Bindungsmodus in KIT-wt. $[2F_o - F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0)-Elektronendichtekarte von Nintedanib. **B:** Interaktionsmuster von Nintedanib in Richtung der *backpocket*.

Für den Methyl-Ester-Substituenten des Liganden können direkte Interaktionen mit dem katalytischen Lys623 beobachtet werden, welches dadurch in seiner Konformation stabilisiert wird. (Abbildung 48A). Eine Besonderheit stellt die eingeführte Phenylgruppe unterhalb des Indolinon-Grundgerüsts dar, da diese das Phe811 des DFG-Motivs durch aromatische Wechselwirkungen der Systeme in einer spezifischen Konformation stabilisiert. Diese Stabilisierung könnte vorteilhaft für die Bindung an ein breiteres konformationelles Spektrum der Kinase sein. Weiterhin kann eine ionische Interaktion zwischen dem Methylpiperazin und Glu605 detektiert werden (Anh. 6.4.2, Abbildung 89). Auch eine Reihe hydrophober Wechselwirkungen von Nintedanib mit den Aminosäuren Leu595, Val603, Ala621, Val654, Tyr672 und Leu799 treten auf, welche weiter zur Aktivität des Inhibitors beitragen. Da es bereits vier zugelassene Therapielinien für KIT-mutierte GIST gibt, ist auch an dieser Stelle die strukturelle Analyse auftretender Mutationen essenziell (Abbildung 49).

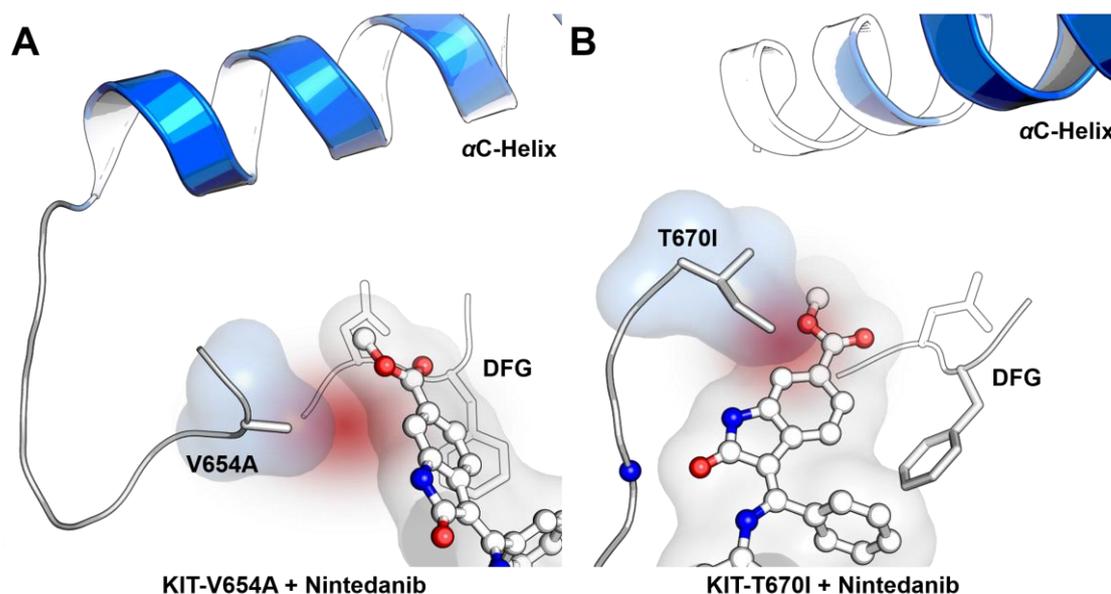


Abbildung 49: Strukturanalyse von Nintedanib zum Verständnis von auftretenden Resistenzmutationen.
A: Verlust an Interaktionen durch Einführung eines sterisch weniger anspruchsvollen Alanins (V654A).
B: Sterische Hinderung der effizienten Bindung von Nintedanib durch Einführung eines sterisch anspruchsvollen Isoleucins bei auftretender Mutation der Türsteher-Aminosäure. Mutationen wurden eingeführt mit dem *Mutagenesis-Tool* in PyMol 2.0.6.

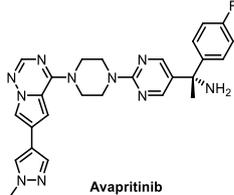
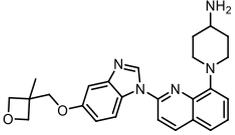
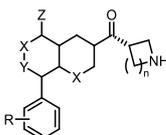
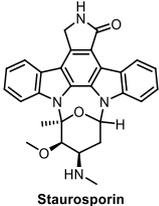
Da für Nintedanib hydrophobe Interaktionen mit Val654 identifiziert werden können, würde im Falle einer Mutation zu einem Alanin die Seitenkette durch eine sterisch wesentlich weniger anspruchsvolle Seitenkette ausgetauscht werden. Demnach würde diese Mutation, wie bereits bei anderen Inhibitoren zuvor, in einem Aktivitätsverlust des Inhibitors resultieren (Abbildung 49A). Mit der Türsteher-Aminosäure Thr670 werden für Nintedanib weder polare noch hydrophobe Interaktionen beobachtet, weshalb denkbar wäre, dass die Einführung einer Isoleucin-Seitenkette durch Mutation dieser Aminosäure keinen Einfluss auf den Bindungsmodus des Liganden hat. Die Wirksamkeit von Nintedanib in T670I-mutierten Zelllinien wurde bereits nachgewiesen.^[103] Im Rahmen der Strukturanalyse kann jedoch eine Interferenz zwischen dem Liganden und der Isoleucin-Seitenkette identifiziert werden, was sich in Folge dessen ebenfalls auf die Interaktion der Methyl-Ester-Gruppe mit Lys623 auswirken würde (Abbildung 49B). Weiterhin käme es zu einer Abstoßung zwischen der hydrophoben Ile-Seitenkette und der polaren Methyl-Ester-Gruppe des Inhibitors. Es wäre jedoch denkbar, dass durch die Phenylgruppe, welche mit Phe811 des DFG-Motivs interagiert, die Kinasekonformation starrer gehalten wird als im Vergleich zu anderen Inhibitoren und sich diese Interaktion wiederum positiv auf die Wirksamkeit des Inhibitors niederschlägt.

3.5.5 Vergleich kommerziell verfügbarer Typ I- bzw. Typ I_{1/2}-Inhibitoren

3.5.5.1 Strukturbiologische Untersuchungen von Avapritinib

GIST-Patienten mit der häufigsten PDGFRA-Mutation, D842V, hatten bis zur Zulassung von Avapritinib im Jahr 2020 schlechte Prognosen, da sich keiner der anderen zuvor zugelassenen Wirkstoffe als effektive Behandlungsmethode gegen diese Mutante erwies. Die Zulassung basierte auf der NAVIGATOR-Studie, welche eine *overall response rate* von 90 % in einem Zeitraum vom 26.10.2015-16.11.2018 (*data cutoff*) aufwies.^[99] Als einziger zugelassener Inhibitor für die Therapie von Patienten mit PDGFRA-D842V-mutierten GIST zeigt Avapritinib IC₅₀-Werte im sub-nanomolaren Bereich für PDGFRA-wt, PDGFRA-D842V und KIT-D816H und im einstellig nanomolaren Bereich für KIT-wt, während die geringe Aktivität auf VEGFR2-wt für eine gute Selektivität gegenüber anderen Kinasen gedeutet werden kann (Tabelle 6).

Tabelle 6: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte kommerziell erhältlicher Typ I- bzw. Typ I_{1/2}-Inhibitoren. Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung. n ≥ 3. n.d. = *no data available*/keine Daten vorhanden.

		HTRF IC ₅₀ [nM]				
Inhibitor	Typ	KIT-wt	KIT-D816H	PDGFRA-wt	PDGFRA-D842V	VEGFR2-wt
 Avapritinib	I _{1/2}	6 ± 1	0,5 ± 0,3	<0,1	<0,1	130 ± 30
 Crenolanib	I	6700 ± 850	1 ± 0,5	5100 ± 50	5800 ± 860	20000
 NDI-1	I	2 ± 0,2	0,3 ± 0,1	<0,1	<0,1	2 ± 0,1
 Staurosporin	I	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Vom Entwickler Blueprint Medicines wurden weder Informationen über die medizinisch-chemische Entwicklung des Wirkstoffes, noch über den Bindungsmodus des Liganden an das Zielprotein preisgegeben. Neben den kognitiven Nebenwirkungen wurden nach der Behandlung mit Avapritinib in den klinischen Studien zudem zahlreiche Resistenzmutationen identifiziert.^[61, 96, 100] Um Resistenzmechanismen verstehen und überwinden zu können, ist die Aufklärung des Bindungsmodus dieses Wirkstoffes in seinen Zielproteinen unabdingbar, da Patienten durch das Auftreten von Resistenzmutationen keine therapeutischen Alternativen zu Avapritinib haben.

Da sich die D842V-Mutation in der Aktivierungsschleife befindet und der Austausch einer polaren, negativ geladenen Seitenkette durch eine hydrophobe, kleinere Seitenkette zu vollständig anderen Eigenschaften an dieser Position führt, kommt es zum Verlust polarer Kontakte, welche die Kinase üblicherweise in ihrer DFG-*out*-Konformation stabilisieren. Durch die Mutation kann es demnach zu einer drastischen Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der aktiven Kinasekonformation kommen (Abbildung 50).

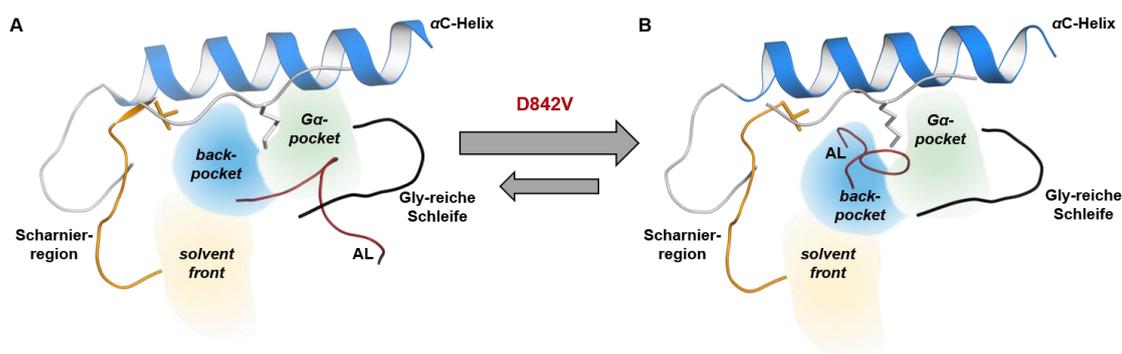


Abbildung 50: Schematische Darstellung der inaktiven DFG-*out* (A, PDB-ID: 8PQJ)- und der aktiven DFG-*in* (B, PDB-ID: 8PQH)-Konformation. Das Gleichgewicht zwischen den Konformationen wird durch die D842V-Mutation zur aktiven Kinasekonformation verschoben.

Für die strukturelle Aufklärung des Bindungsmodus von Avapritinib an sein Zielprotein gab es in der Literatur mehrere Ansätze, welche auf unterschiedlichen Technologien beruhten und sich in den Ergebnissen teilweise voneinander unterschieden. Hier sollte jedoch bemerkt werden, dass alle Ansätze auf *in silico*-Experimenten basierten und kein experimenteller Nachweis des Bindungsmodus veröffentlicht wurde. GARDINO *et al.* zeigten ein *Docking* von Avapritinib in eine Hybridstruktur. Diese bestand aus einer Kristallstruktur von Imatinib in KIT-wt in der inaktiven Konformation (PDB-ID:1T46), bei welcher die Aktivierungsschleife mit dem von KIT in einer aktiven Konformation (PDB-ID: 1PKG) ausgetauscht wurde.^[139] GILREATH *et al.* spekulierten über den exakten Bindungsmodus auf Basis von Komplexstrukturen und Strukturanalysen anderer Typ I-Inhibitoren in verwandten Kinasen.^[140] WINGER *et al.* nutzten molekulares *Docking* einer aktiven KIT-D816V-Struktur, um nähere Informationen über die Resistenzmutationen gegenüber Avapritinib in KIT herauszufinden.^[141] GRUNEWALD *et al.* veröffentlichten eine Reihe von Resistenzmutationen, welche durch die Behandlung mit Avapritinib in PDGFRA aufgetreten sind. Für die strukturelle Analyse in dieser Publikation stellte unsere Arbeitsgruppe bereits ein *Docking* eines Homologie-Modells einer PDGFRA-D842V-Struktur zur Verfügung, welche durch Molekuldynamik-Simulation (MD) unterstützt wurden.^[61] Durch die unterschiedlichen Ergebnisse der *in silico*-Experimente ergibt sich umso mehr die Wichtigkeit einer experimentellen Aufklärung des Bindungsmodus, welcher dann als Grundlage für die Entwicklung von Inhibitoren der nächsten Generation genutzt werden kann.

Da im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich Co-Kristalle von Avapritinib gebunden an KIT-wt, KIT-T670I und PDGFRA-T674I generiert und die Strukturen aufgeklärt werden konnten, sollen diese im Folgenden näher beleuchtet werden (Abbildung 51, Anh. 6.4.4, Abbildung 94).

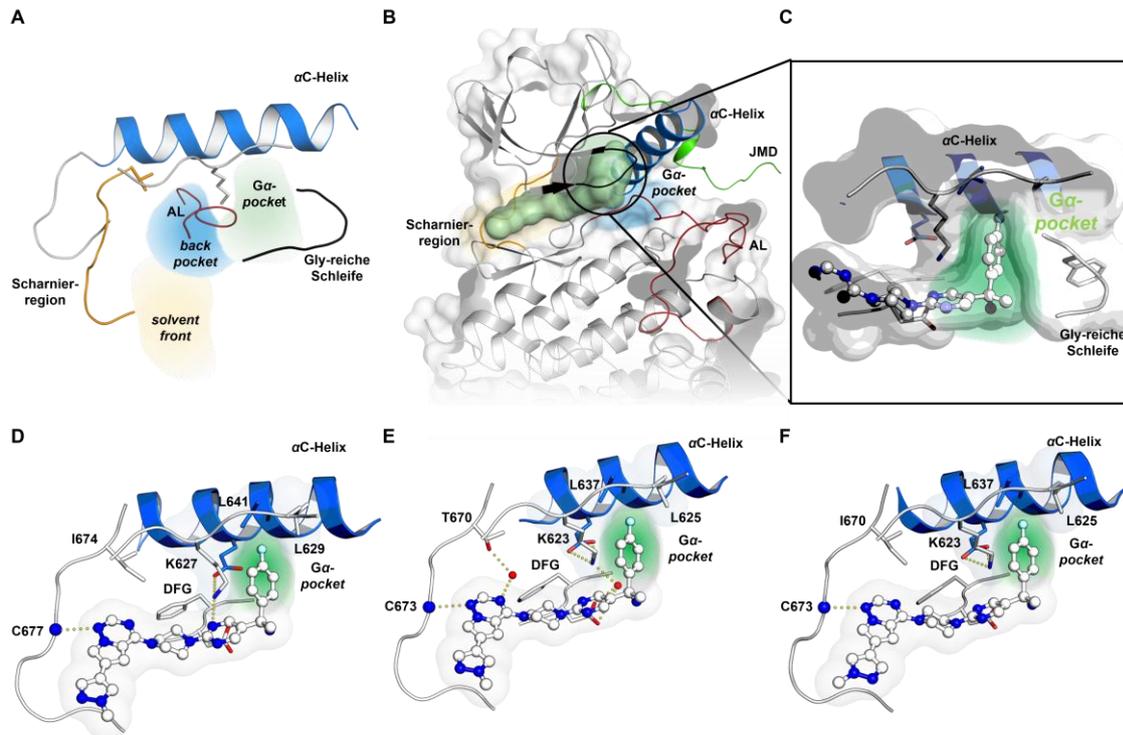


Abbildung 51: Graphische Darstellungen der Kinasen KIT-wt, KIT-T670I und PDGFRA-T674I in Komplex mit Avapritinib. **A:** Aktive DFG-*in*-Konformation der Kinase, welche von Avapritinib gebunden werden kann (PDB-ID: 8PQH, Ligand nicht gezeigt). **B:** Übersicht der Kristallstruktur von PDGFRA-T674I im Komplex mit Avapritinib (PDB-ID: 8PQH). **C:** Die von Avapritinib besetzte Subtasche, welche im weiteren Verlauf der Arbeit *G α -pocket* genannt werden wird. **D:** Komplexstruktur von PDGFRA-T674I und Avapritinib. **E:** Komplexstruktur von KIT-wt und Avapritinib. **F:** Komplexstruktur von KIT-T670I mit Avapritinib.

Die Einblicke in den Bindungsmodus eines Wirkstoffes mithilfe von Komplexstrukturen sind essenziell für das detaillierte Verständnis von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und, wie oben bereits beschrieben, wichtig für die Entwicklung neuer Kinaseinhibitoren. Zudem ermöglichen Kristallstrukturen die zugrundeliegenden Mechanismen von Resistenzmutationen auf molekularer bzw. atomarer Ebene zu verstehen. Der auch bereits in der Literatur vermutete und beschriebene DFG-*in*-Zustand der Kinase kann an dieser Stelle bestätigt werden (Abbildung 51A-C), wobei die Aktivierungsschleife eine Konformation einnimmt, in welcher das Asp836 (PDGFRA) bzw. Asp810 (KIT) des DFG-Motivs in die ATP-Bindetasche hineinragt (Abbildung 51D-F). Avapritinib geht in diesem Bindungsmodus mit dem N2-Stickstoff des Pyrrolotriazins eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Amid-Stickstoff des Proteinrückgrats von Cys677 (PDGFRA) bzw. Cys673 (KIT) ein. Der N1-Stickstoff interagiert über ein Wassermolekül mit der Türsteher-Aminosäure Thr670 in KIT-wt, was entsprechend der Mutationen weder in PDGFRA-T674I, noch in KIT-T670I

beobachtet werden kann. Das Lösungsmittel-exponierte Methyl-Pyrazol interagiert mit Arg597 (PDGFRA) über Kation- π -Wechselwirkungen, welche in den Kristallstrukturen von KIT-wt und -T670I nicht vorhanden sind, obwohl an der korrespondierenden Stelle der Aminosäurekette ein Lysin statt eines Arginins vorliegt (Anh. 6.4.4, Abbildung 95). Eine klare Orientierung der Methylgruppe des Pyrazols lässt sich in keiner der Kristallstrukturen feststellen, weshalb geschlossen werden kann, dass die Methyl-Pyrazol-Gruppe frei rotieren kann. Das verbrückende Piperazin geht weitere Interaktionen mit Val607 und Cys835 (PDGFRA) bzw. Val603 und Cys809 (KIT) ein, während das Pyrimidin mit Val607 interagiert und zusätzlich eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem katalytischen Lys627 eingeht. Letztere Interaktion kann in den Strukturen von KIT erneut nicht identifiziert werden (Abbildung 51D-F). Diese zusätzlichen Interaktionen, welche zwischen dem Liganden und PDGFRA beobachtet werden, könnten ein Indiz für die höhere inhibitorische Aktivität gegenüber PDGFRA im Vergleich zu KIT sein. Weiterhin bilden Gly605 und Val607 der Gly-reichen Schleife, Leu641 der α C-Helix, das katalytische Lys627 und Leu629 eine hydrophobe Tasche, welche die Form des Fluorophenyl-Restes von Avapritinib zu umschließen scheint. Außerdem geht das katalytische Lys627 zusätzliche Kation- π -Wechselwirkungen mit dem Fluorophenyl-Rest ein. Diese Bindetasche erstreckt sich hinter der ATP-Bindetasche, ist jedoch auch klar von der *backpocket* des Proteins zu unterscheiden, da diese sich nicht hinter der Scharnierregion mit der Türsteher-Aminosäure und der Aktivierungsschleife befindet (Abbildung 51C). Aufgrund dieser Analysen wird die von Avapritinibs Fluorophenyl-Rest gebundene Tasche im weiteren Verlauf als *G α -pocket* bezeichnet, da diese Tasche zuvor in der Literatur weder für KIT, noch für PDGFRA genauer beleuchtet und auch nicht von anderen Inhibitoren adressiert wurde. Dies wird ebenfalls im Vergleich mit bereits publizierten Kristallstrukturen deutlich (Abbildung 52).

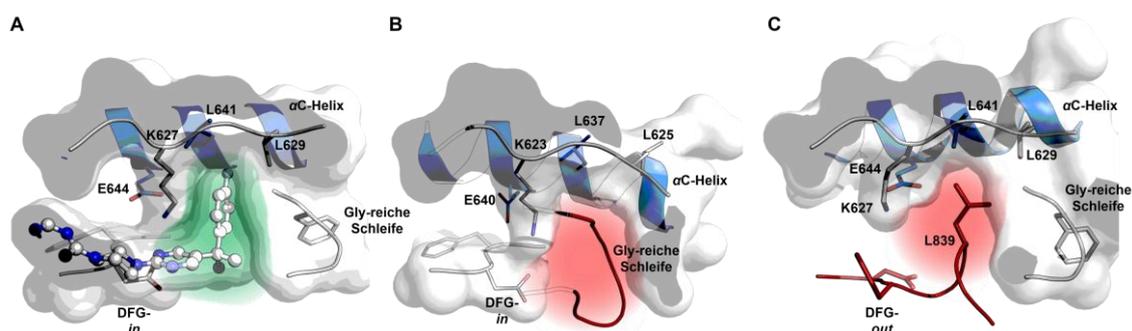


Abbildung 52: Graphische Darstellung der *G α -pocket*. A: *G α -pocket*, welche von Avapritinib adressiert werden kann. B: Kristallstruktur einer aktivierten KIT-Kinasedomäne in ihrer DFG-*in*-Konformation (PDB-ID: 1PKG). C: apo-PDGFR-wt Struktur in ihrer DFG-*out*-Konformation (PDB-ID: 8PQJ).

Basierend auf der Analyse unterschiedlicher Kinasekonformationen und verschiedener Komplexstrukturen mit diversen Inhibitoren kann festgestellt werden, dass die *Gα-pocket* nur durch den einzigartigen Aufbau von Avapritinib im Vergleich zu anderen Inhibitoren adressiert wird. Ob es sich hier um einen *induced fit*- oder *conformational selection*-Mechanismus handelt, ist unklar.

Beim Vergleich mit einer aktivierten Kristallstruktur von KIT (PDB-ID: 1PKG, Abbildung 52B) fällt auf, dass der Bereich der Tasche durch die Gly-reiche Schleife eingenommen wird. Außerdem lässt sich eine starke Drehung der α C-Helix hin zur ATP-Bindetasche feststellen, was die Bindung von Avapritinib durch eine Verkleinerung der *Gα-pocket* ebenfalls erschweren würde. Im Kontrast dazu ist die α C-Helix in der inaktiven DFG-*out*-Konformation etwas weiter nach oben gerichtet. Die Seitenkette von Leu839, welches sich unmittelbar hinter dem DFG-Motiv befindet, nimmt hier einen Platz in der beschriebenen Tasche ein, welche dann ebenfalls nicht zugänglich für Avapritinib ist (Abbildung 52C). Aufgrund dieser Analysen lässt sich schlussfolgern, dass Avapritinib eher als Typ I $\frac{1}{2}$ -Inhibitor statt als Typ I-Inhibitor einzuordnen ist, da Avapritinib zwar eine DFG-*in*-Konformation bindet, wobei zugleich eine α C-Helix-*out*-Konformation des Proteins stabilisiert wird. Weiterhin ahmt Avapritinib mit der Besetzung der *Gα-pocket* die Bindung des Leucins der Aktivierungsschleife nach, was ein Strukturmerkmal der inaktiven Kinasekonformation von KIT und PDGFRA ist.

Auch die Entstehung von Resistenzmutationen durch Avapritinib-Therapie stellt ein großes Problem dar, da die Patienten zum jetzigen Zeitpunkt keine alternativen Therapiemöglichkeiten haben. Die Analyse der bereits bekannten Resistenzmutationen ist deshalb unabdingbar. Dabei können vor allem Resistenzmutationen in der Nähe der Scharnierregion sowie der ATP-Bindetasche beobachtet werden (V658A, N659K, T674I/R, G680R, Abbildung 53). Seltener treten Resistenzmutationen in der *Gα-pocket* auf (G605A). Die unmittelbare Lokalisation der G605A-Mutation an der Gly-reichen Schleife und somit der *Gα-pocket* könnte zu einem direkten sterischen Konflikt zwischen der Alanin-Seitenkette und dem für die Aktivität wichtigen Fluorophenyl-Rest von Avapritinib führen. Weiterhin ist jedoch nicht bekannt, in welche Richtung das Gleichgewicht der Kinasekonformation durch die jeweiligen Mutationen verschoben wird.

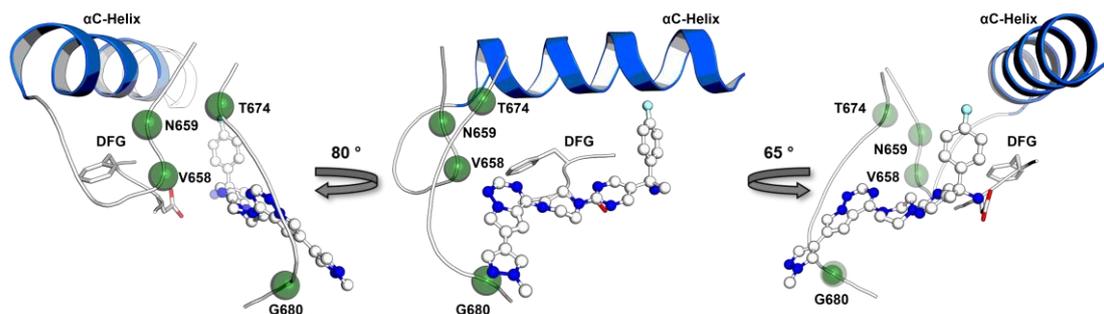


Abbildung 53: Übersicht auftretender Resistenzmutationen während der Therapie mit Avapritinib. Mutationen treten vor allem in bzw. nahe der ATP-Bindetasche von PDGFRA auf (V658A, N659K, T674I/R, G680R). Für die Darstellung wurde die Komplexstruktur von PDGFRA-T674I im Komplex mit Avapritinib (PDB-ID: 8PQH) aus verschiedenen Betrachtungswinkeln verwendet.

Da für drei der vier in Abbildung 53 aufgeführten Mutationen keine Kristallstrukturen zur Verfügung stehen, können an dieser Stelle lediglich Vermutungen hinsichtlich des genauen Resistenzmechanismus angestellt werden. Der Mechanismus einer Mutation wie V658A wurde zumindest für KIT (V654A/G) bereits beschrieben, wobei die Lokalisation dieser Aminosäure unterhalb der α C-Helix einerseits zu einer erhöhten Flexibilität dieser und einer damit einhergehenden Verschiebung des Konformationsgleichgewichts zur aktiven Konformation führen könnte. Weiterhin könnten destabilisierende Effekte zwischen V658A, Cys835 vor dem DFG-Motiv der Aktivierungsschleife und des Liganden selbst zu einer verminderten Affinität führen. Destabilisierende Effekte könnten auch im Falle der N659K-Mutation ein Grund für Resistenz sein, da durch die Mutation möglicherweise wichtige Interaktionsanker in der Schleifenregion unmittelbar nach der α C-Helix gebrochen werden würden und somit eine für den Liganden weniger vorteilhafte Kinasekonformation eingenommen wird. Bei den Mutationen T674I/R und G680R wären neben dem Verlust wichtiger Interaktionspunkte vor allem sterische Interferenzen bei der Ligandenbindung denkbar, die durch den räumlichen Anspruch der Aminosäure-Seitenketten hervorgerufen werden würden. Für solche Analysen können sowohl die bereits besprochene Komplexstruktur von Avapritinib in KIT-wt, aber auch eine Struktur von Avapritinib in KIT-T670I verwendet werden, welche als Türsteher-Mutante von KIT für Vergleiche ein gutes Pendant zur Struktur von PDGFRA darstellt (Abbildung 54A, B). Weiterhin werden PDGFRA-wt und -T674I apo-Strukturen analysiert, die die Beobachtungen weiter unterstützen (Abbildung 54C, D).

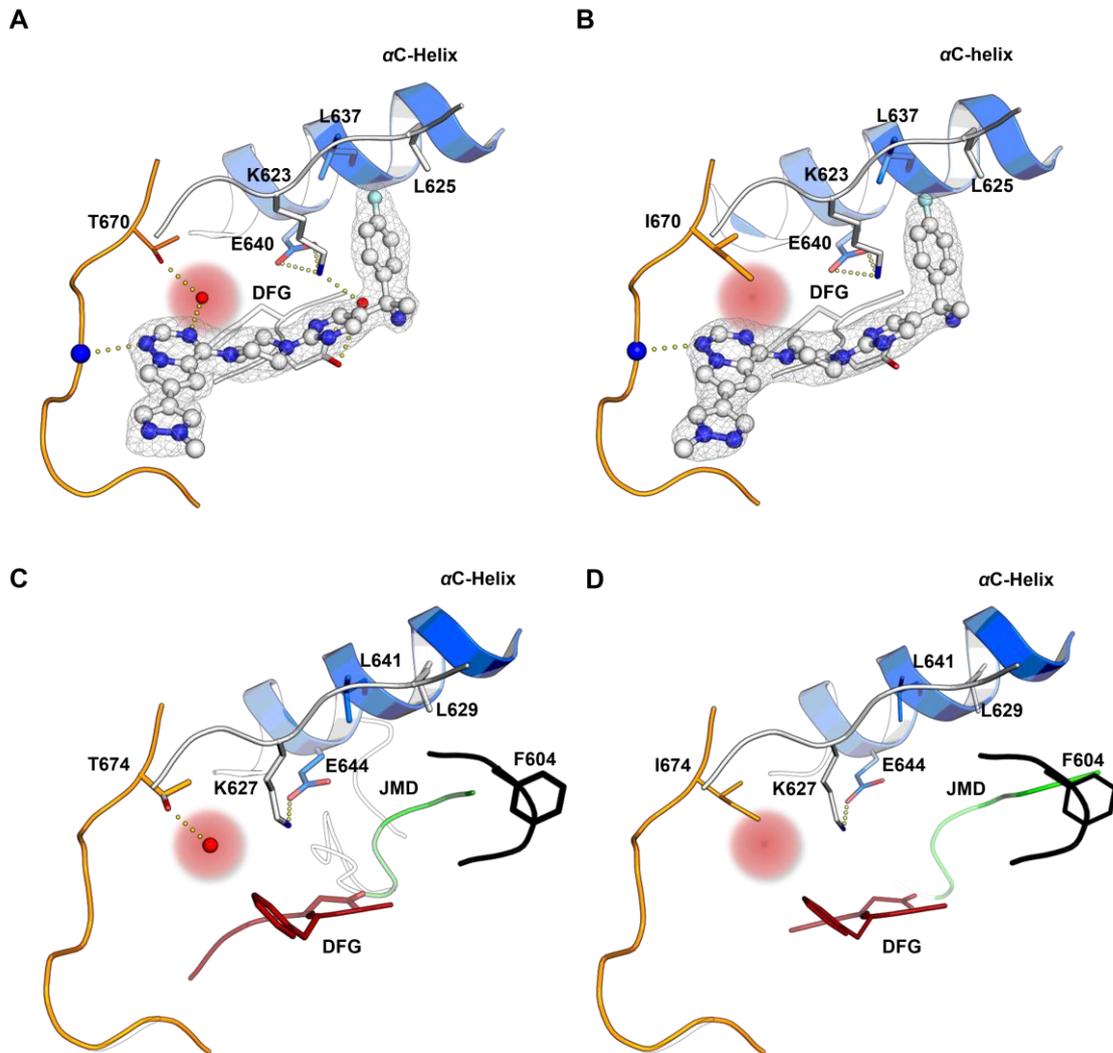


Abbildung 54: Strukturanalyse hinsichtlich des Resistenzmechanismus der Türsteher-Mutation. A: Komplexstruktur von Avapritinib in KIT-wt. B: Komplexstruktur von Avapritinib in KIT-T670I. C: apo-Struktur von PDGFRA-wt. D: apo-Struktur von PDGFRA-T674I.

Wie bereits beschrieben, interagiert Avapritinib mit dem N2-Stickstoff des Pyrrolotriazins über ein Wassermolekül verbrückt mit der Aminosäure-Seitenkette von Thr670 in der Komplexstruktur von KIT-wt. Wenn diese Aminosäure zu einem Isoleucin mutiert, kann diese Interaktion nicht mehr beobachtet werden, da dieser Platz von der Ile-Seitenkette eingenommen und das Wasser verdrängt wird. Eine Mutation zu sterisch anspruchsvolleren Aminosäuren oder aber auch zu Aminosäuren mit unterschiedlichen elektronischen Eigenschaften sind folglich Resistenz-vermittelnd. Unterstützt wird die Hypothese des Mechanismus durch das Lösen zweier apo-Strukturen von PDGFRA-wt und PDGFRA-T674I, wobei das Wassermolekül ebenfalls in der Wildtyp-Struktur, aber nicht in der der Türsteher-Mutante identifiziert werden kann (Abbildung 54C, D).

Auch beim Vergleich mit veröffentlichten Kristallstrukturen wird deutlich, dass die Bindung des Wassermoleküls im Falle des Wildtyp-Proteins konserviert zu sein scheint (PDB-IDs: 1T45, 6GQK, 6GQL, 6GQM). Bei der Mutation zu einem sterisch noch anspruchsvolleren Arginin (PDGFRA-T674R) würde vermutlich nicht nur die Verdrängung des Wassermoleküls eine entscheidende Rolle spielen, sondern sowohl ein direkter sterischer Konflikt mit dem Inhibitor als auch die generelle Beschaffenheit der ATP-Bindetasche, die ATP-Affinität und auch die Dynamik der Kinase selbst. Die gleiche Hypothese der sterischen Interferenz kann auch für die G680R-Mutation angenommen werden. Für tiefere Einblicke in die Resistenzmechanismen ist es demnach von höchster Wichtigkeit, die verschiedenen Mutanten in Komplex mit unterschiedlichen Liganden zu kristallisieren und dessen Strukturen zu lösen. Da Kristallstrukturen jedoch nur eine bestimmte Kinasekonformation zu einem bestimmten Zeitpunkt wiedergeben, wären für die Aufklärung der Kinasedynamiken auch Experimente in Lösung denkbar. Diese würden z. B. die EPR- oder NMR-Spektroskopie einschließen. Um weitere Informationen hinsichtlich des Aktivitätsstatus der Kinase zu erhalten, könnten Zell-basierte Studien per Western Blots helfen, um die Aktivierung nachgeschalteter Proteine näher zu untersuchen.

3.5.5.2 Strukturbiologische Untersuchungen von Crenolanib

Ein Typ I-Inhibitor, welcher bereits in klinischen Studien getestet wurde, ist Crenolanib.¹³ Crenolanib wurde spezifisch als Typ I-Inhibitor für die Hemmung von Klasse III-Rezeptortyrosinkinasen entwickelt, vornehmlich für die Inhibition von FLT3 und PDGFRA/B, und zeigte in klinischen Studien Aktivität in Imatinib-resistenten PDGFRA-D842V-mutierten GIST.^[142] Mit hohen einstellig mikromolaren Aktivitäten in der biochemischen Profilierung sowohl gegenüber PDGFRA-wt, PDGFRA-D842V, als auch KIT-wt mit jeweils 5057 nM, 5846 nM bzw. 6648 nM lässt sich diese in der Klinik beobachtete Aktivität jedoch nicht rekapitulieren. Als Typ I-Inhibitor bindet Crenolanib bevorzugt eine DFG-*in*-Konformation, was durch die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen, hoch aufgelösten Co-Kristallstruktur (1,85 Å) bestätigt wird (Abbildung 55A). Die Zellkonstanten entsprechen denjenigen der anderen Typ I-Inhibitoren gebunden an KIT. Hier ist zudem anzumerken, dass es in der PDB ebenfalls zwei Kristallstrukturen von PDGFRA-T674I im Komplex mit Crenolanib gibt.

¹³ <https://clinicaltrials.gov/study/NCT02847429#study-overview>, NCT02847429.

Während in der publizierten Co-Kristallstruktur der wie hier beobachtete DFG-*in*-Zustand der Kinase identifiziert wird (PDB-ID: 6JOI), liegt in einer veröffentlichten *Soaking*-Struktur eine interessante intermediäre Kinasekonformation vor (PDB-ID: 6JOJ).

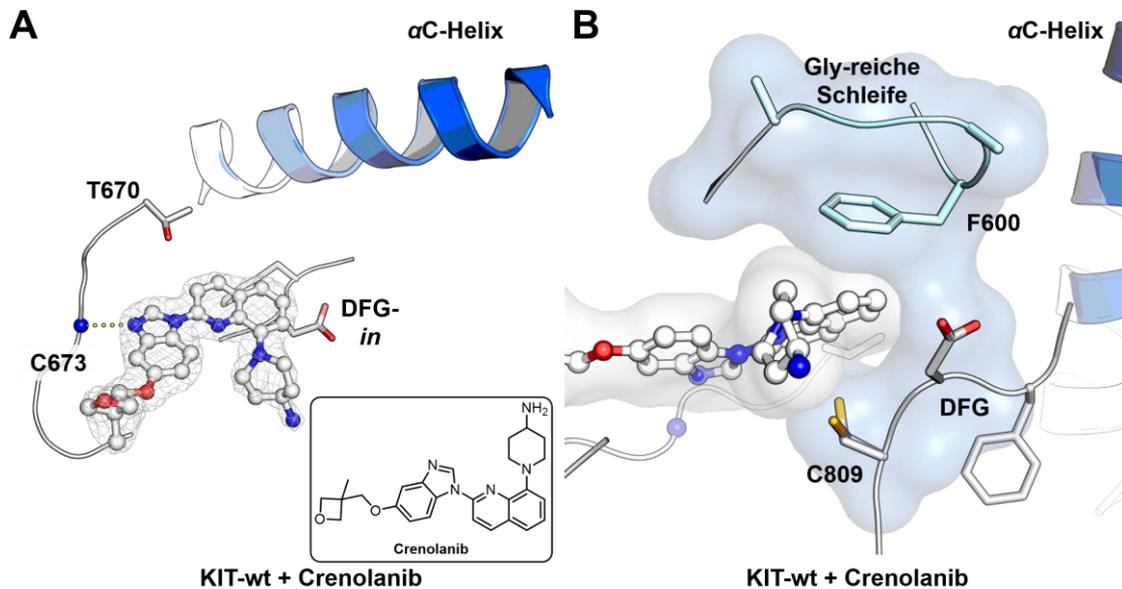


Abbildung 55: Komplexstruktur von KIT-wt gebunden an Crenolanib. **A:** Chemische Struktur von Crenolanib und Übersicht des Bindungsmodus in KIT-wt. $[2F_o - F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0)-Elektronendichtekarte von Crenolanib. **B:** Bindetasche von Crenolanib, welche von der Gly-reichen Schleife und der Aktivierungsschleife gebildet wird.

Das Scharnierregion-bindende Element von Crenolanib wird durch die Benzimidazol-Einheit gebildet, welche mit dem Stickstoff des Rückgrats von Cys673 eine Wasserstoffbrückenbindung eingeht. Eine weitere direkte Interaktion besteht zwischen dem Sauerstoff des Methyloxetans und Lys593 (Anh. 6.4.2, Abbildung 90). Auch für PDGFRA wäre an dieser Stelle eine direkte Interaktion denkbar, da an der korrespondierenden Stelle ein Arginin in der Aminosäure-Sequenz enthalten ist. Während lediglich zwei polare Interaktionen zwischen dem Liganden und dem Protein beobachtet werden, weist die Struktur weitreichende hydrophobe Interaktionen zwischen Crenolanib und den Aminosäuren Leu595, Phe600, Val603, Val621, Val654, Thr670 und Leu799 auf (Anh. 6.4.2, Abbildung 90). Als besonders interessant gilt hier die Wechselwirkung zwischen der Quinolin-Einheit von Crenolanib mit Phe600 der Gly-reichen Schleife. Im Gegensatz zu den bisher erhaltenen Komplexstrukturen, ragt die Seitenkette des Phenylalanins in die ATP-Bindetasche hinein und ruft somit eine π - π -Wechselwirkung in einer *edge-to-face*-Anordnung mit dem Liganden hervor (Abbildung 55B).

Crenolanib und Avapritinib stellen die einzigen Inhibitoren dar, die für die Adressierung von aktiven Kinasekonformationen designt wurden. In präklinischen Tests konnte für Crenolanib Wirksamkeit sowohl auf PDGFRA-D842V, als auch auf PDGFRA-D842V/T674I und PDGFRA-D842V/V561D exprimierenden CHO-Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 56).^[142]

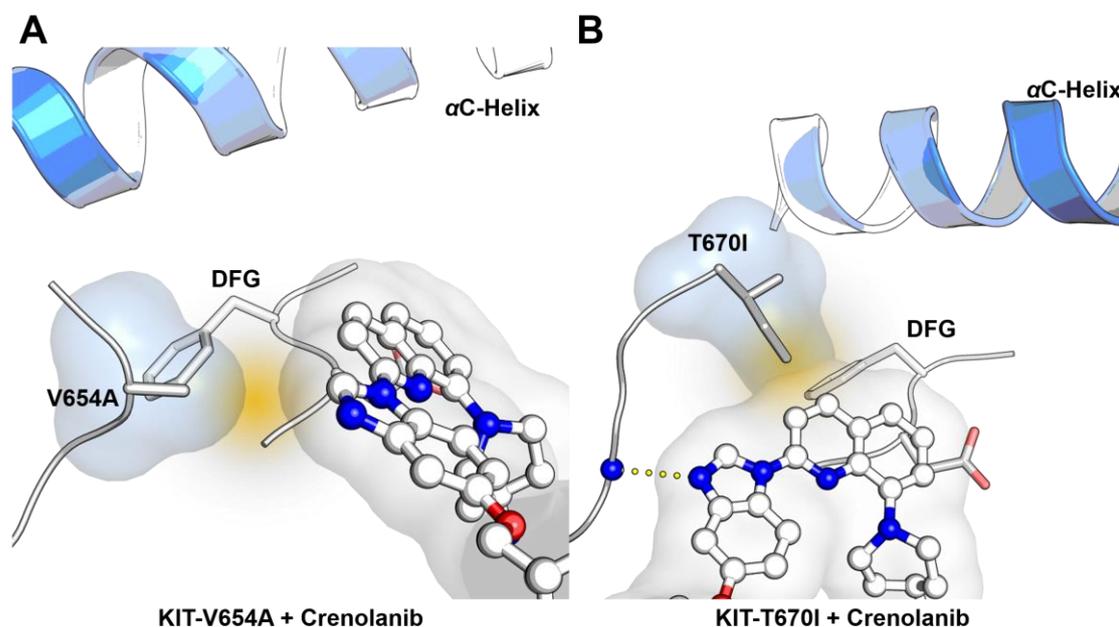


Abbildung 56: Strukturanalyse der prominentesten Resistenzmutationen. A: Oberflächendarstellung der Aminosäuren Val654 und Thr670 und Crenolanib. B: Oberflächendarstellung der mutierten Aminosäuren V654A und T670I zur Verdeutlichung des möglichen Einflusses auf den Bindungsmodus von Crenolanib. Mutationen wurden eingeführt mit dem *Mutagenesis-Tool* in PyMol 2.0.6.

Im Falle einer V654A-Mutation würden, wie auch bereits bei einigen anderen Inhibitoren, hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem Protein und dem Liganden verloren gehen (Abbildung 56A). Diese Mutation ist äquivalent mit der V658A-Mutation in PDGFRA, wodurch davon ausgegangen werden kann, dass vergleichbare Mechanismen hinsichtlich der Kinsedynamik hervorgerufen werden würden. Da zwar Wechselwirkungen zwischen Thr670 und Crenolanib bestehen, Crenolanib jedoch als Typ I-Inhibitor die *backpocket* nicht besetzt, käme es bei einer T670I-Mutation zwar zu einer gewissen sterischen Hinderung, diese wäre aber weit weniger ausgeprägt als bei z. B. Imatinib, Regorafenib und Ripretinib (Abbildung 56B). Weiterhin wäre die Einführung hydrophober Wechselwirkungen zwischen der Ile-Seitenkette und dem Quinolin-Grundgerüst von Crenolanib denkbar, was für die Wirksamkeit sogar potenziell von Vorteil wäre. Die klinische Effizienz des Inhibitors muss jedoch noch weiter untersucht werden.

3.5.5.3 Strukturbiologische Untersuchungen von NDI-1

Ein weiterer interessanter Kandidat für klinische Studien könnte auch der Inhibitor *new dortmund inhibitor 1* (NDI-1) darstellen. Dieser Inhibitor wurde in einem zellbasierten Hochdurchsatz-Screen am *Compound Management and Screening Center* (COMAS, Dortmund) unter der Leitung von Dr. Sonja Sievers gefunden. Für den Screen wurden unterschiedlichste Inhibitoren auf der T1-a-D842V-Zelllinie hinsichtlich ihrer Aktivität getestet. Die Bibliothek enthielt sowohl von der FDA zugelassene Wirkstoffe als auch Inhibitoren, welche bereits in klinischen Studien profiliert wurden, jedoch keine Zulassung für die getestete Indikation erhalten haben. NDI-1 zeigte in diesem Screen hohe inhibitorische Potenz und auch in folgenden Profilierungen auf weiteren PDGFRA-mutierten GIST-Zelllinien konnten gute Aktivitäten erhalten werden. Auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten biochemischen Profilierung des Inhibitors sind IC_{50} -Werte von $<0,1$ nM gegenüber PDGFRA-wt und PDGFRA-D842V bzw. 2 nM und 0,3 nM gegenüber KIT-wt und KIT-D816H zu verzeichnen. Dies deutet auf eine hohe Potenz des Liganden hin, wobei sich mit 2 nM gegenüber VEGFR2-wt ebenfalls eine vermeintlich geringe Selektivität gegenüber den Zielproteinen feststellen lässt. Ein großer Vorteil des Inhibitors scheint die hohe Aktivität auch gegenüber den AL-Mutanten KIT-D816H und PDGFRA-D842V zu sein, welche für z. B. Imatinib und Regorafenib nicht beobachtet wird. Unter anderem aus diesem Grund wird NDI-1 auch strukturbiologisch untersucht. Es konnten Co-Kristalle von KIT-wt sowie PDGFRA-T674I erhalten werden, welche jedoch eine starke Anisotropie aufwiesen. Deshalb konnten die erhaltenen Datensätze nicht für die Datenprozessierung verwendet werden. Aufgrund der hohen Aktivität gegenüber den Zielproteinen wurde deshalb ein *Soaking*-Ansatz versucht, bei dem Co-Kristalle von Avapritinib mit NDI-1 inkubiert wurden (Kapitel 5.7.6). Nach der Generierung von Datensätzen konnten auch für diese Kristalle eine Anisotropie festgestellt werden, jedoch ließ sich das Diffraktionslimit mithilfe des *STARANISO servers* (Global Phasing, Ltd.) bestimmen und die Strukturen liegen zur Analyse vor (Abbildung 57).

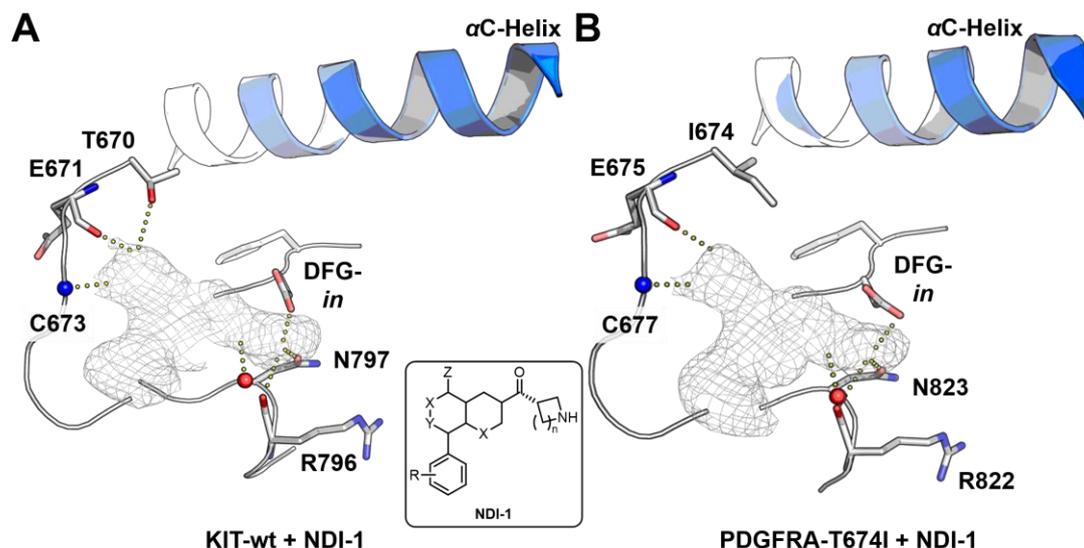


Abbildung 57: Soaking-Strukturen von NDI-1 gebunden an KIT-wt (A) und PDGFRA-T674I (B). A: Übersicht des Bindungsmodus von NDI-1 gebunden an KIT-wt und chemische Struktur von NDI-1. $[2F_o - F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0)-Elektronendichtekarte von NDI-1. B: Übersicht des Bindungsmodus von PDGFRA-T674I im Komplex mit NDI-1. $[2F_o - F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0)-Elektronendichtekarte von NDI-1.

Bei der Analyse der *Soaking*-Strukturen kann in beiden Zielproteinen eine DFG-*in*-Konformation beobachtet werden. Der Ligand interagiert über polare Interaktionen mit der Scharnierregion. In der Struktur mit KIT-wt können Wechselwirkungen mit dem Sauerstoff der Aminosäure-Seitenkette des Türsteherrestes Thr670 sowie mit dem Carbonylsauerstoff des Rückgrats von Glu671 und dem Stickstoff des Rückgrats von Cys673 identifiziert werden (Abbildung 57A). Erstere ist in der Struktur von PDGFRA-T674I nicht präsent, da durch die T674I-Mutation kein Sauerstoff für eine polare Interaktion mit dem Liganden zur Verfügung steht (Abbildung 57B). Innerhalb der Ribose-Tasche können in beiden Strukturen direkte Interaktionen mit dem Aspartat des DFG-Motivs (Asp810 in KIT-wt, Asp836 in PDGFRA-T674I) beobachtet werden (Abbildung 57A, B). Die Bindung des Liganden in der Ribose-Tasche wird an dieser Stelle weiter von Interaktionen mit dem Carbonylsauerstoff des Rückgrats von Arg796 (KIT-wt) bzw. Arg822 (PDGFRA-T674I) und mit der Seitenkette von Asn797 (KIT-wt) bzw. Asn823 (PDGFRA-T674I) unterstützt. Dieses Interaktionsmuster innerhalb der Ribose-Tasche könnte unter anderem ausschlaggebend für die hohe inhibitorische Potenz des Wirkstoffes sein. Um weiteren Aufschluss über die genauen Wirkmechanismen von NDI-1 zu erhalten, sollten tiefergehende Analysen in weiteren Protein-Varianten durchgeführt werden. Vor allem vor dem Hintergrund von Resistenzmutationen, welche während der Behandlung mit anderen Inhibitoren, wie z. B. Avapritinib, auftreten können, sollte NDI-1 weiter profiliert und untersucht werden.

3.5.5.4 Strukturbiologische Untersuchungen von Staurosporin

Staurosporin ist ein natürlich vorkommender pan-Kinaseinhibitor, der erstmals aus *Streptomyces staurosporeus* isoliert wurde und im Rahmen dieser Arbeit vor allem Anwendung als Positivkontrolle in biochemischen Assays fand.^[143, 144] Als natürliches Vorbild dient Staurosporin jedoch auch der Weiterentwicklung von Derivaten, welche eine erhöhte Selektivität aufweisen sollen.^[145] Ein Beispiel dafür ist Midostaurin, welches für FLT3-positive akute myeloische Leukämie (AML, engl.: *acute myeloid leukemia*), aber auch bei drei Formen der systemischen Mastozytose zugelassen ist. Hier besitzt es Relevanz durch Inhibition von KIT und PDGFRA, weshalb es ebenfalls für die Behandlung von GIST von Bedeutung sein könnte (Abbildung 58C).^[141, 146] Als pan-Kinaseinhibitor bindet Staurosporin spezifisch eine DFG-*in*-Kinasekonformation von KIT-wt (Abbildung 58A).

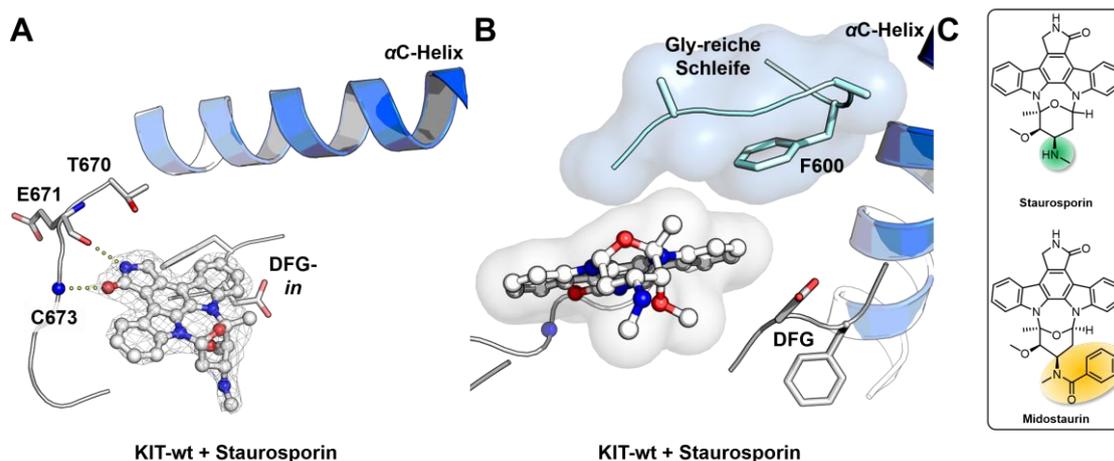


Abbildung 58: Kristallstruktur von KIT-wt im Komplex mit Staurosporin. **A:** Kristallstruktur von KIT-wt im Komplex mit Staurosporin. $[2F_o - F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0)-Elektronendichtekarte von Staurosporin. **B:** Bindetasche von Staurosporin, welche von der Gly-reichen Schleife und der Aktivierungsschleife gebildet wird.

Die Indolinon-Einheit interagiert über den Carbonylsauerstoff mit dem Stickstoff des Rückgrats von Cys673, während der N1-Stickstoff mit dem Sauerstoff des Rückgrats von Glu671 eine Wasserstoffbrückenbindung bildet (Abbildung 58A). Dieses Interaktionsmuster ist ebenfalls für die Indolinon-Einheiten der Inhibitoren Sunitinib und Nintedanib präsent. Eine ionische Interaktion kann für die Lösungsmittel-exponierte Amin-Gruppe mit Asp677 ausgemacht werden, wobei diese vermutlich im Falle von Midostaurin weniger relevant sein könnte. Weitere hydrophobe Wechselwirkungen bestehen zwischen dem Liganden und den Aminosäuren Leu595, Val603, Phe600 und Leu799 (Anh. 6.4.2, Abbildung 91). Auch hier ist erneut die Orientierung der Seitenkette von Phe600 in die Bindetasche hinein besonders interessant, da wie bei Crenolanib eine π - π -Wechselwirkung hervorgerufen wird.

Für die nähere Untersuchung wird die erhaltene Komplexstruktur im Folgenden mit einer inaktiven apo KIT-wt-Struktur und einer aktiven ADP-gebundenen KIT-wt-Struktur (PDB-ID: 1PKG) verglichen (Abbildung 59).

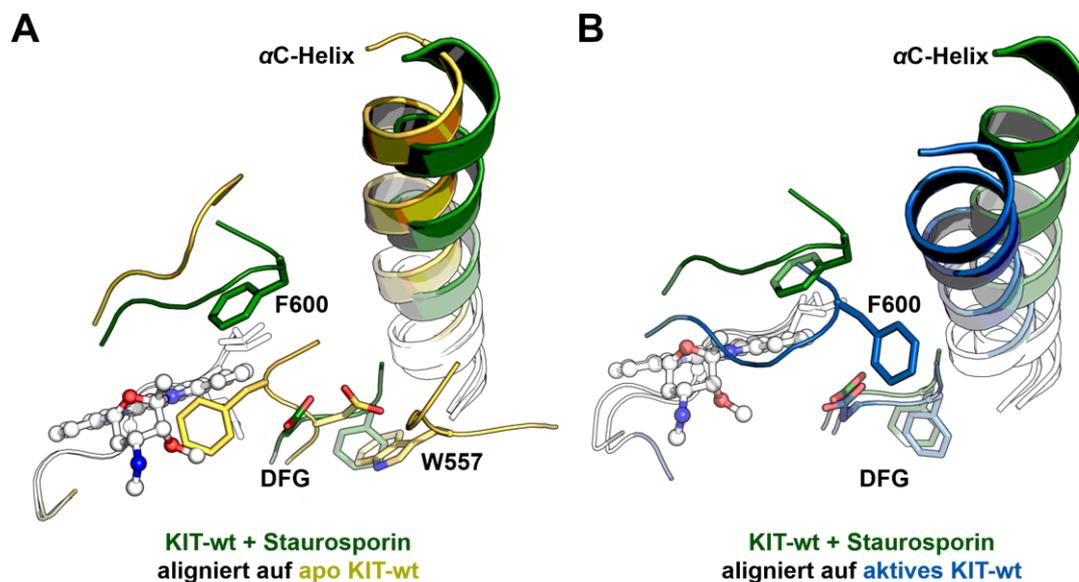


Abbildung 59: Strukturvergleiche von Staurosporin gebunden in KIT-wt mit einer inaktiven (A) bzw. einer aktiven (B) KIT-wt-Struktur. A: *Alignment* der Komplexstruktur von Staurosporin und der auto-inhibierten apo-KIT-wt Struktur. B: *Alignment* der Komplexstruktur von Staurosporin mit einer ADP-gebundenen aktiven KIT-wt-Struktur (PDB-ID: 1PKG, Ligand nicht gezeigt).

Die α C-Helix ist in der Staurosporin-Struktur (grün) im Vergleich zur apo KIT-Struktur (gelb) etwas von der Bindetasche weggedreht. Die Gly-reiche Schleife zeigt eine Orientierung zur Bindetasche hin, wodurch die π - π -Interaktion zwischen Phe600 und dem Liganden ausgebildet wird (Abbildung 59A). Zusätzlich wird deutlich, dass Staurosporin die inaktive DFG-out-Konformation einer Kinase nicht adressieren kann, da Phe811 in der DFG-out-Konformation mit der Ethergruppe des Liganden interferieren würde. Beim Vergleich mit einer aktiven, ADP-gebundenen Kristallstruktur von KIT (Abbildung 59B, blau, PDB-ID: 1PKG, Ligand nicht gezeigt), weisen die DFG-Motive eine nahezu identische Orientierung auf, während sowohl die Gly-reiche Schleife, als auch die α C-Helix in der aktivierten Kristallstruktur wesentlich weiter zur ATP-Bindetasche hin rotiert sind. Die Gly-reiche Schleife ist an der Orientierung des ATP bzw. ADP beteiligt, weshalb diese eine Herabsenkung in Richtung der ATP-Bindetasche im Vergleich zur Staurosporin-Struktur zeigt, wobei die Seitenkette von Phe600 im Vergleich zur Staurosporin-Struktur aus der ATP-Bindetasche herausgedreht ist.

3.6 Struktur-basiertes Wirkstoffdesign

Auf Basis der Literatur-bekanntesten Daten sowie der im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse, wurden innerhalb des GIST-Projekts in der AG Rauh innovative Ansätze hinsichtlich des Designs und der Optimierung neuer Inhibitoren erarbeitet. Dafür wurden vier der getesteten Wirkstoffe als vielversprechende Startpunkte angesehen: i) Ripretinib aufgrund seiner hohen Aktivität gegenüber AL-Mutanten, ii) Ponatinib als potenter Inhibitor in einer klinischen Studie¹⁴ und zur Umgehung der Tüster-Mutation,^[147] iii) NDI-1 mit hoher Aktivität auf ausgewählten PDGFRA-mutierten GIST-Zelllinien und iv) Avapritinib als *first-in-class* Inhibitor zur Behandlung von PDGFRA-D842V-mutierten GIST. Durch die Identifizierung von zwei Cysteinen in den Zielproteinen, welche für die kovalente Adressierung geeignet schienen, wurden in den Teilprojekten i), ii) und iv) zusätzlich kovalente Design-Ansätze verfolgt, während im Teilprojekt iii) vor allem eine Erhöhung der Selektivität gegenüber anderen Kinasen bei Erhaltung der Aktivität als Ziel ausgegeben wurde.

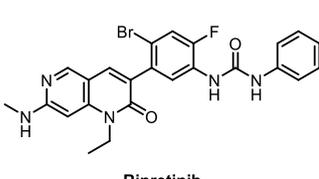
Bereits bei der Analyse der biochemischen Daten lässt sich feststellen, dass sich trotz der nahen Verwandtschaft von KIT und PDGFRA ein sehr diverses Bild beim Ansprechen auf unterschiedliche Inhibitoren zeigt. Daraus kann geschlossen werden, dass sich eine simultane Adressierung in der Entwicklung eines Inhibitors für beide Zielproteine als erschwert erweisen könnte. Daher sollte zusätzlich eine voneinander unabhängige Design-Strategie zur Adressierung der Zielproteine in zukünftigen Design-Ansätzen in Betracht gezogen werden.

¹⁴ POETIG, NCT03171389,
<https://clinicaltrials.gov/study/NCT03171389?term=POETIG&intr=ponatinib&rank=1#more-information>

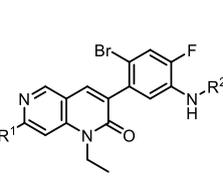
3.6.1 Profilierung Ripretinib-basierter Inhibitoren

Durch sein einzigartiges Wirkungsprofil, auf AL-mutierten KIT-Varianten aktiv zu sein, stellt Ripretinib einen interessanten Startpunkt für weitere Optimierungen dar. Dafür wurde eine kleine Serie aus sechs Inhibitoren synthetisiert,¹⁵ welche sowohl die aktivitätsfördernden Elemente evaluieren als auch die Cysteine in den Zielkinasen kovalent modifizieren sollte (Tabelle 7). Zunächst wurde das Grundgerüst (**1a**) von Ripretinib synthetisiert, welches dann in C7-Position mit einer Methyl-Amino-Einheit und in C5-Position mit einer Acrylamid-Gruppe dekoriert wurde (**1b**). Weiterhin wurde statt der Methyl-Amino-Gruppe ein Chlorid-Substituent eingebracht, oder das *backpocket*-Element als Linker zum reaktiven *warhead* weiter variiert (**1c**, **1d**, **1e**, **1f**).

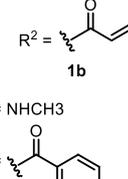
Tabelle 7: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte der Ripretinib-basierten Derivate. Variiert wurden die Bindeelemente der Lösungsmittel-exponierten und *backpocket*-bindenden Elemente. Die Positionen zur Installation der reaktiven Gruppen wurden gewählt, um sowohl Cys788 (KIT) bzw. Cys814 (PDGFRA) in der *backpocket* zu binden, als auch Cys809 (KIT) bzw. Cys835 (PDGFRA) vor dem DFG-Motiv. Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung. n ≥ 3, n.d. = no data available/keine Daten vorhanden.

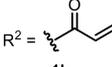


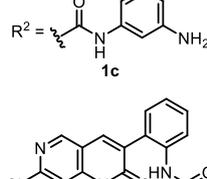
Ripretinib

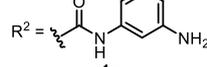


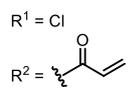
1a
R¹ = NHCH₃
R² = H

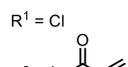


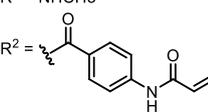
1b
R¹ = NHCH₃
R² = 

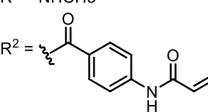


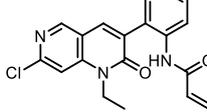
1c
R¹ = NHCH₃
R² = 



1d
R¹ = Cl
R² = 



1e
R¹ = NHCH₃
R² = 



1f

Inhibitor	HTRF IC ₅₀ [nM]				
	KIT-wt	KIT-D816H	PDGFRA-wt	PDGFRA-D842V	VEGFR2-wt
Ripretinib	2 ± 0,5	2 ± 0,4	0,6 ± 0,3	2 ± 0,6	0,9 ± 0,1
1a	4 ± 1	250 ± 20	24 ± 10	430 ± 110	1100 ± 160
1b	12 ± 3	70 ± 6	5 ± 2	560 ± 90	23 ± 2
1c	4 ± 1	n.d.	16 ± 6	20000	7 ± 0,6
1d	150 ± 50	n.d.	4 ± 1	17000 ± 4500	5400 ± 730
1e	8 ± 0,4	n.d.	8 ± 5	170 ± 20	72 ± 2
1f	20000	n.d.	83 ± 11	40 ± 13	20000

Beim Vergleich mit der Parentalverbindung Ripretinib fällt zunächst einmal auf, dass die neu synthetisierten Inhibitoren vor allem auf den AL-Mutanten KIT-D816H und PDGFRA-D842V an inhibitorischer Potenz verlieren. Während eine sterische Reduzierung des *backpocket*-Elements (**1a**) in den Wildtyp-Proteinen größtenteils toleriert wird, führt es in den AL-Mutanten zu einem starken Aktivitätsverlust. Da die Mutationen in der Aktivierungsschleife das Konformationsgleichgewicht in Richtung der aktiven Kinase verschieben, könnte durch reduzierte *backpocket*-Elemente der Inhibitoren eine erhöhte Flexibilität der

¹⁵ Synthese durchgeführt von Dr. R. Gontla (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seines PostDocs.

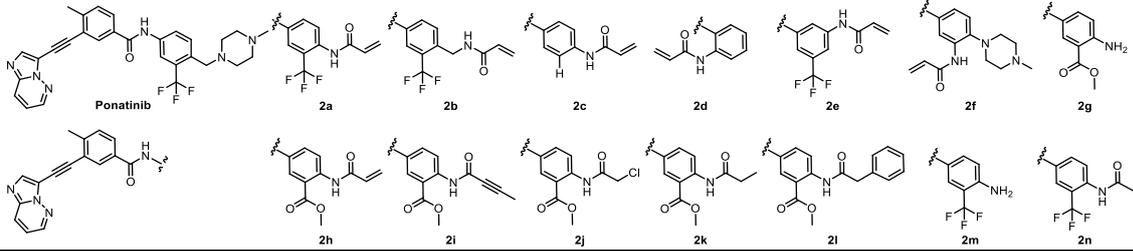
Aktivierungsschleife hervorgerufen werden, wodurch die Inhibitoren nicht mehr effektiv binden könnten. Dadurch könnte ein leichter Übergang in den aktiven DFG-*in*-Zustand der Kinase ermöglicht werden. Die Installation eines Acrylamids in **1b** zur kovalenten Adressierung des Cys809 in KIT bzw. Cys835 in PDGFRA vor dem DFG-Motiv führt zu einem 2,8-fachen Aktivitätsverlust auf KIT-wt, während jedoch auf KIT-D816H mit 71 nM die Aktivität um das ca. 3,6-fache im Vergleich zu **1a** gesteigert wird. Insgesamt kann beobachtet werden, dass die Installation eines größeren *backpocket*-Elements vorteilhaft für die Aktivität in KIT- und PDGFRA-wt ist, während in PDGFRA-D842V ein gegenteiliger Effekt gezeigt wird, was besonders anhand der Aktivitäten von **1c** (20000 nM) und **1d** (17000 nM) deutlich wird. Durch die Installation eines größeren, unpolaren Phenylacrylamid-Restes kann auf PDGFRA-D842V jedoch erneut eine gesteigerte Aktivität (170 nM) erzielt werden. Weiterhin lässt sich feststellen, dass eine hohe inhibitorische Potenz gegenüber KIT-Varianten mit einer erhöhten Aktivität gegen VEGFR2-wt einhergeht. Deshalb sollte bei zukünftigen Design-Ansätzen verstärkt auf die Selektivität der Inhibitoren gegenüber VEGFR2-wt geachtet werden. Durch den limitierten Umfang der Ligandenserie können nur oberflächliche Einblicke in Struktur-Aktivitäts-Beziehungen und in die kovalente Adressierung der Zielproteine erhalten werden. Weiter lässt die vorliegende Datenlage keinen Schluss über die kovalente Modifikation der Cysteine zu, weshalb tiefergreifende Experimente, wie z. B. Zeit-aufgelöste HTRF-Messungen oder massenspektrometrische Verfolgung der kovalenten Bindungsbildung, durchgeführt werden sollten.

3.6.2 Profilierung Ponatinib-basierter Inhibitoren

Als noch nicht für GIST-Therapie zugelassener Inhibitor, der sich aber in einer klinischen Studie (POETIG, NCT03171389) befand, stellt Ponatinib ein weiteres interessantes Grundgerüst für die weitere Optimierung dar. Mit dem enthaltenen Alkin-Linker umgeht Ponatinib als erster Inhibitor die prominente Türsteher-Mutation T315I in BCR-ABL, weshalb dieser Wirkstoff ebenfalls für GIST-Patienten von großer Bedeutung sein könnte. Die Resistenz-vermittelnde Türsteher-Mutation T670I in KIT wird von keinem der bisher zugelassenen Inhibitoren effektiv adressiert, sodass Patienten mit dem Fortschreiten ihrer Krankheit konfrontiert sind. Auch eine strukturelle Analyse zeigt, dass die Umgehung der Türsteher-Mutation mit Ponatinib als Inhibitor möglich ist (Kapitel 3.5.3.5). Um das Potenzial von Ponatinib-basierten Liganden zur Inhibition von KIT-T670I zu charakterisieren, wurden Designansätze verfolgt, welche die Derivatisierung des *backpocket*-Elements zur Bildung einer kovalenten Bindung (Tabelle 8),^[105-107] und die Einführung eines reversen Amids als Linker zwischen dem *backpocket*-Element und dem an die Scharnierregion bindenden Element aus synthetischen Gründen beinhalteten (Tabelle 9). Zudem werden durch die Verkürzung zu Liganden vom Typ III und den Austausch des an die Scharnierregion bindenden Elements wichtige Interaktionsmuster der Liganden untersucht (Tabelle 10). Abschließend wird der vollständige Ersatz des *backpocket*-Elements durch rigide Benzimidazol- bzw. Benzothiazol-Elemente diskutiert (Tabelle 11).^{16,[107]}

¹⁶ Synthese durchgeführt von Dr. H. Kaitsiotou, Dr. J. Hardick und T. Schulz (alle AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen ihrer Promotion, und Dr. R. Gontla (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seines PostDocs.

Tabelle 8: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte der Ponatinib-basierten Inhibitoren zur Untersuchung des Einflusses der *backpocket*-Besetzung. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung, n \geq 3. * n = 2. *no data available*/keine Daten vorhanden.



HTRF IC ₅₀ [nM]					
Inhibitor	KIT-wt	KIT-D816H	PDGFRA-wt	PDGFRA-D842V	VEGFR2-wt
Ponatinib	0,7 \pm 0,4	14 \pm 4	0,1 \pm 0,02	16 \pm 7	0,2 \pm 0,03
2a	2 \pm 0,4	16 \pm 7	0,8 \pm 0,3	100 \pm 24	n.d.
2b	2 \pm 0,4	45 \pm 23	<0,1	<0,1	0,7 \pm 0,07
2c	110 \pm 100	20000	9 \pm 4	20000	530 \pm 40
2d	45 \pm 10	n.d.	16 \pm 9	20000	6700 \pm 5700
2e	n.d.	41 \pm 17	n.d.	n.d.	n.d.
2f	33 \pm 18	n.d.	44 \pm 27	2600 \pm 1200	700 \pm 34
2g	6 \pm 1	1200 \pm 580	4 \pm 0,5	640 \pm 62	22 \pm 1
2h	13 \pm 5	1700 \pm 1000	4 \pm 2	5800 \pm 2400	16 \pm 1
2i	15 \pm 5	12000 \pm 6100	7 \pm 3	10000 \pm 4200	21 \pm 1
2j	7 \pm 2	440 \pm 150	2 \pm 0,4	510 \pm 200	4 \pm 0,3
2k	8 \pm 4	1700 \pm 870	4 \pm 1	9200 \pm 150*	6 \pm 0,5
2l	170 \pm 75	20000	100 \pm 50	20000	440 \pm 11
2m	0,6 \pm 0,03	36 \pm 15	0,3 \pm 0,1	40 \pm 11	0,8 \pm 0,08
2n	n.d.	20000	n.d.	n.d.	n.d.

Insgesamt fällt bei der Datenanalyse auf, dass eine Variation des *backpocket*-Elements bei den meisten Liganden mit einem deutlichen Aktivitätsverlust einhergeht. Hervorzuheben sind die Liganden **2a** und **2m**, welche mit einer Aktivität von jeweils 0,8 nM und 0,3 nM gegenüber PDGFRA-wt bzw. 0,6 nM gegenüber KIT-wt (**2m**) eine zu Ponatinib vergleichbare Potenz aufweisen. Der Austausch des Methyl-Piperazins von Ponatinib durch eine Acrylamid-Einheit oder durch eine freie NH₂-Gruppe scheint demnach auf den Wildtyp-Proteinen gut tolerierbar zu sein, obwohl das Methyl-Piperazin Interaktionen in der *backpocket* eingeht, welche aber möglicherweise durch die vorhandenen funktionellen Gruppen effektiv substituiert werden können. Während für **2a** mit 16 nM auf KIT-wt eine zu Ponatinib vergleichbare Aktivität beobachtet wird, führt die Installation des Acrylamid-Elements zu einer 6,25-fach verminderten Inhibitoraktivität auf PDGFRA-D842V. Dies könnte durch eine Verschiebung zu einer aktiven Kinasekonformation durch die Mutation hervorgerufen werden, wodurch das adressierende Cystein verdeckt und der Inhibitor im Allgemeinen einen weniger präferierten Bindungsmodus einnehmen würde. Für **2m** hingegen lassen sich mit 36 nM auf KIT-D816H und 40 nM auf PDGFRA-D842V deutlich geringere Aktivitäten im Vergleich zu Ponatinib identifizieren, welche durch das kleinere *backpocket*-Element und somit einer

potenziell erhöhten Flexibilität des AL erklärbar wären. Die zusätzliche Einbringung einer Methylenbrücke vor dem Acrylamid in **2b** zeigt hinsichtlich KIT-D816H einen Aktivitätsverlust um das 2,8-fache im Vergleich mit **2a**. Bemerkenswert ist hier wiederum die hohe erhaltene Aktivität von $<0,1$ nM sowohl gegenüber PDGFRA-wt als auch gegenüber PDGFRA-D842V. Wie bereits bei der Evaluierung der Ripretinib-Derivate beobachtet wurde, scheint die Dekoration mit hydrophoben Elementen in der *backpocket* von PDGFRA zu gesteigerten Aktivitäten und somit möglicherweise zu einem Selektivitätsvorteil zu führen. Die Substitution der CF_3 -Gruppe durch eine Methyl-Ester-Einheit (**2g-2l**) oder durch einen *warhead* (**2f**) zeigt bei der biochemischen Profilierung keine Aktivitätssteigerung. Es wird ein deutlicher Aktivitätsverlust der Derivate auf beiden getesteten AL-Mutanten festgestellt. Auch die Installation der diversen reaktiven Gruppen erscheint unvorteilhaft, da die entsprechenden freien Amine **2g** und **2m** eine höhere Aktivität auf den Wildtyp-Proteinen aufweisen. Hier zeigt lediglich **2a** eine vergleichbare Inhibition wie Ponatinib auf KIT-D816H. Auch eine Installation eines sterisch anspruchsvollen Phenylrestes (**2l**) hat einen vollständigen Aktivitätsverlust auf den Mutanten zur Folge. Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die Modifikation des *backpocket*-Elements nur bei ausgewählten Liganden in zu Ponatinib-vergleichbaren IC_{50} -Werten resultiert, während zeitgleich nur eine geringe Selektivitätssteigerung gegenüber VEGFR2-wt erreicht wird.

Wie bereits in Kapitel 3.2 beschrieben, ist Cys788 in der *backpocket* von KIT nur in der DFG-*out*-Konformation adressierbar, da andernfalls die Aktivierungsschleife die Zugänglichkeit zum Cystein einschränkt und es somit zu einer sterischen Hinderung bei der Bindungsbildung kommt. Für die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden zunächst folgende Standardbedingungen verwendet: Inkubation für 1 h bzw. 24 h, pH 8,0, 5-facher Ligandenüberschuss. Diese Bedingungen bilden zunächst keine physiologischen Konditionen ab, dienen jedoch der Etablierung und Validierung des kovalenten Ansatzes durch eine höhere Reaktivität des zu adressierenden Cysteins bei höheren pH-Werten. Bei erfolgreicher Umsetzung wäre dementsprechend eine weitergehende Profilierung bei physiologischen Bedingungen umzusetzen. Da sich bereits im Verlaufe der eigenen Masterarbeit herausstellte, dass bei diesem System entweder keine oder nur eine geringe Adduktbildung erreicht werden konnte, wurden unterschiedliche Bedingungen zur Optimierung der Bindungsbildung getestet. Zunächst sollten verschiedene pH-Werte ausgetestet werden (Abbildung 60). Die für das pH-*Screening* verwendeten Puffersubstanzen sind in Kapitel 5.6.4 aufgeführt.

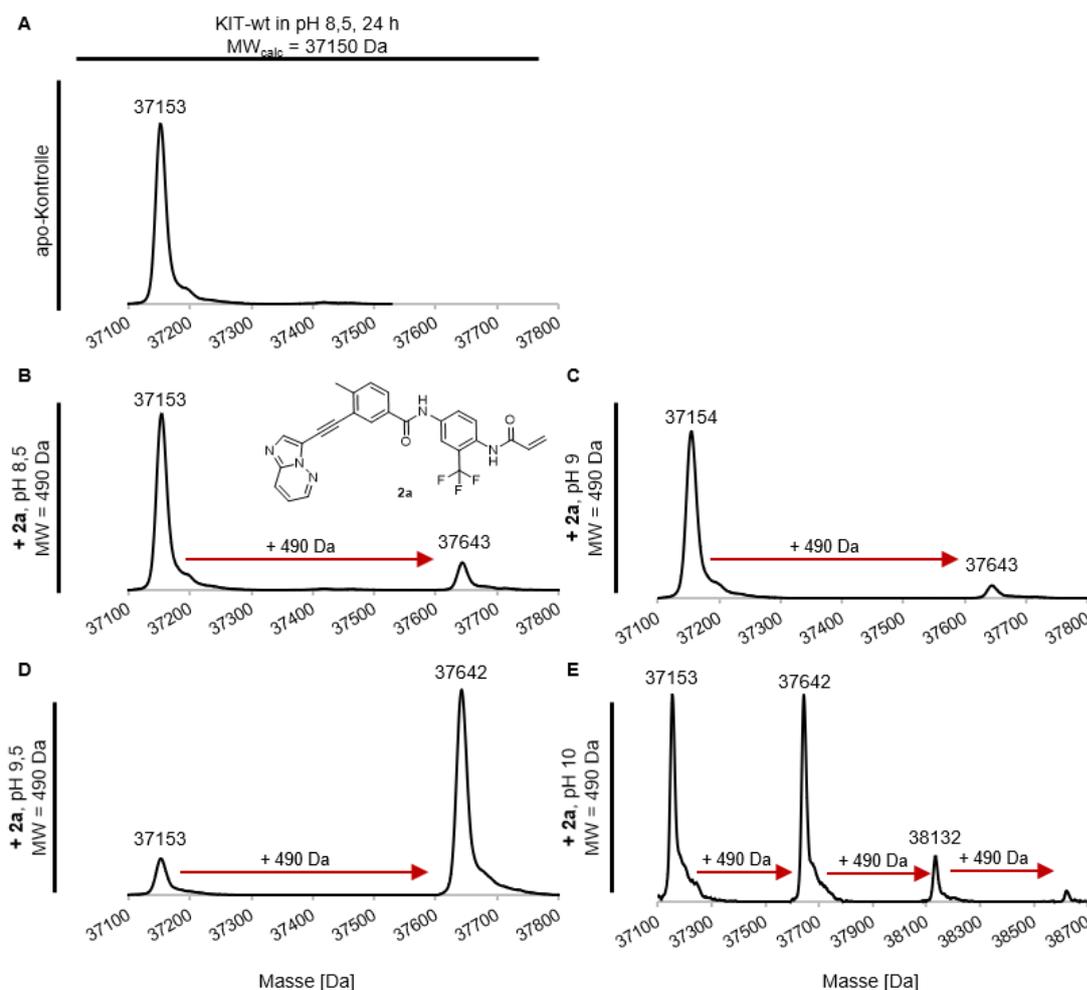


Abbildung 60: Dekonvolvierte ESI-Massenspektren von KIT-wt, inkubiert mit 2a bei unterschiedlichen pH-Werten. **A:** Dekonvolviertes ESI-Massenspektrum von apo KIT-wt bei pH 8,5. **B:** Chemische Struktur des verwendeten Liganden **2a** und dekonvolviertes ESI-Massenspektrum von KIT-wt nach 24 h Inkubationszeit mit **2a** bei pH-Wert 8,5. **C-E:** Dekonvolvierten ESI-Massenspektren von KIT-wt nach 24 h Inkubationszeit mit **2a** bei den pH-Werten 9,0 (**D**), 9,5 (**E**) und 10 (**F**). Die Ligandenfreie Form des Proteins besitzt ein Molekulargewicht von 37150 Da. MW_{calc.}: kalkuliertes Molekulargewicht des Zielproteins. MW: Molekulargewicht des Liganden. Zusätzlich angegeben sind die gemessenen Molekulargewichte des Proteins bzw. der Protein-Liganden-Komplexes.

Bei der Analyse der pH-abhängigen Messungen kann zunächst die Liganden-ungebundene Form des Proteins mit einem Molekulargewicht von 37150 Da detektiert werden (Abbildung 60A). Obwohl auch Messungen nach jeweils einer Stunde durchgeführt wurden, kann nach der kurzen Inkubationszeit keine Adduktbildung beobachtet werden. Nach 24 h Inkubationszeit hingegen wird bei einem erhöhten pH-Wert von 8,5 eine partielle Massenverschiebung um ~490 Da beobachtet, die einer einfachen, kovalenten Modifikation des Zielproteins mit dem verwendeten Liganden **2a** zugeordnet werden kann (Abbildung 60B). Eine ähnliche prozentuale Verschiebung lässt sich auch bei der Inkubation in pH 9,0 identifizieren, während bei der Inkubation in pH 9,5 nach 24 h eine deutliche Verschiebung hin zur Adduktmasse zu verzeichnen ist (Abbildung 60C, D).

Bei der Inkubation des Proteins mit **2a** in einem Puffersystem mit einem pH-Wert von 10, wird neben einer hauptsächlich auftretenden einfachen Adduktmasse auch eine zwei- und dreifache Adduktbildung detektiert (Abbildung 60E). Es wäre denkbar, dass durch den hohen pH-Wert von 10 einerseits Oberflächencysteine, wie z. B. Cys673 und Cys674 der Scharnierregion von KIT, reaktiver werden und somit eine unspezifische Reaktion mit dem Liganden hervorgerufen wird, oder das Protein eine partielle Entfaltung aufgrund des hohen pH-Wertes durchläuft, wodurch Cysteine, die ursprünglich im Proteininneren verborgen liegen, freigelegt werden und unspezifisch mit der Testsubstanz reagieren. Letztere Vermutung wird ebenfalls durch die Reduktion der in Kapitel 3.4.7 ermittelten Schmelztemperatur von KIT-wt bei hohen pH-Werten unterstützt. Insgesamt kann geschlussfolgert werden, dass ein Puffersystem mit einem pH-Wert von 9,5 für Ligand **2a** als geeignet angesehen wird, um eine einfache Adduktbildung nach 24 h zu erhalten. Die Bindungs-Spezifität könnte weiter über Tandem-MS-Analysen erfolgen.

Mit dem Ponatinib-basierten Liganden **2a** im Komplex mit PDGFRA-T674I konnte zusätzlich erfolgreich ein Kristallisationsexperiment und eine Strukturaufklärung durchgeführt werden (Abbildung 61). Neben der Identifikation einer kovalenten Bindung des Liganden an Cys814 des Zielproteins, kann eine nicht-auto-inhibierte DFG-out-Konformation der Kinase beobachtet werden.

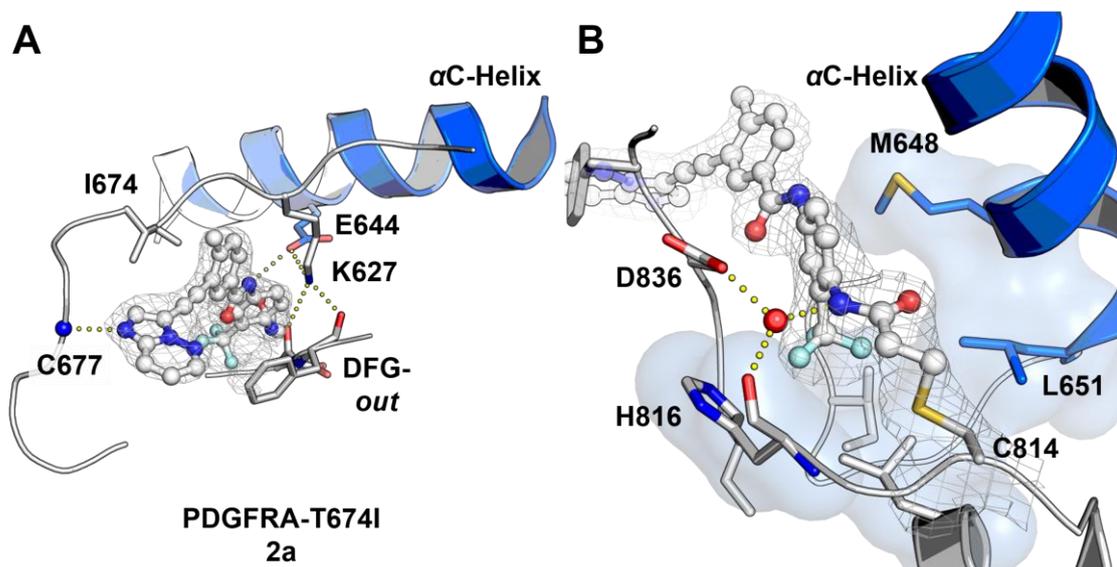
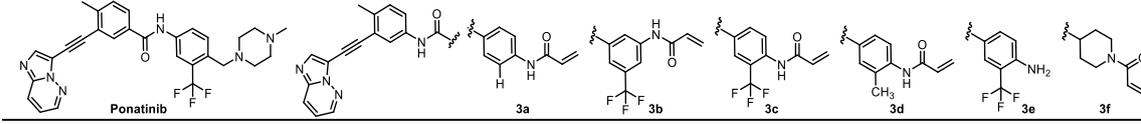


Abbildung 61: Komplexstruktur von PDGFRA-T674I mit 2a. A: Übersicht der Komplexstruktur von **2a** in PDGFRA-T674I. $|2F_o - F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0)-Elektronendichtekarte von **2a**. B: Ansicht der *backpocket* und der kovalenten Bindung des Liganden an Cys814. $|2F_o - F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0)-Elektronendichtekarte des Liganden und Cys814.

Das Phenylalanin des DFG-Motivs ragt in dieser Konformation in die ATP-Bindetasche hinein, wobei das Aspartat des DFG-Motivs von der ATP-Bindetasche weg in die *backpocket* zeigt (Abbildung 61A). Bei näherer Analyse des Bindungsmodus kann ein komplexes Interaktionsmuster zwischen dem Liganden und Protein identifiziert werden (Abbildung 61B), wobei vor allem polare Interaktionen zwischen dem katalytischen Lys627, dem Rückgrat von Phe837 des DFG-Motivs, Glu644 der α C-Helix und dem verbrückenden Amid des Liganden beobachtet werden können. Außerdem lässt sich eine Wasser-vermittelte Interaktion zwischen der Seitenkette von Asp836 des DFG-Motivs, des Rückgrats von His816 und dem Stickstoff des Acrylamid-*warheads* identifizieren. Die Interaktionsmuster induzieren eine für die Ligandenbindung geeignete Kinasekonformation. Weiterhin kann bei der biochemischen Evaluierung der unterschiedlichen Ponatinib-Derivate und bei der Analyse der Kristallstruktur von KIT-wt im Komplex mit Ponatinib festgestellt werden, dass die CF₃-Gruppe des Liganden essenziell für die Aktivität ist. Wie bereits bei der Komplexstruktur von Ponatinib beschrieben, bindet die CF₃-Gruppe in einer hydrophoben Subtasche der *backpocket*, welche auch an dieser Stelle von den zu KIT korrespondierenden Aminosäuren Ile647, Met648, Leu651, Ile657, Val658, Leu809 und Ile834 in PDGFRA gebildet wird (Abbildung 61B, Anh. 6.4.3, Abbildung 92). Die Substitution dieser CF₃-Gruppe würde demnach zu einem Verlust wichtiger Interaktionen und einer Affinitätsreduzierung führen, wie es bereits in biochemischen Analysen vermutet wurde und mithilfe der durchgeführten Strukturanalysen untermauert wird. Weiterhin lässt sich schlussfolgern, dass eine Einführung einer zusätzlichen Methyleneinheit vor dem Acrylamid (**2b**) zu einer veränderten Ausrichtung der reaktiven Gruppe führt und somit eine kovalente Adressierung des Cysteins in der *backpocket* weniger favorisiert sein könnte.

Da sich die Ponatinib-Synthese als sehr herausfordernd herausstellte, wurde zudem eine fokussierte Bibliothek leichter zugänglicher Derivate mit einem reversen Amid zur Verknüpfung des Scharnierregion-bindenden Elements und des *backpocket*-Elements synthetisiert und biochemisch evaluiert (Tabelle 9).

Tabelle 9: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte der Ponatinib-basierten Inhibitoren, welche ein reverses Amid zur Verknüpfung des Scharnierregion-bindenden Elements und des *backpocket*-Elements tragen. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung, $n \geq 3$. * $n = 1$. n.d. = *no data available*/keine Daten vorhanden.



Inhibitor	HTRF IC ₅₀ [nM]				
	KIT-wt	KIT-D816H	PDGFRA-wt	PDGFRA-D842V	VEGFR2-wt
Ponatinib	0,7 \pm 0,4	14 \pm 4	0,1 \pm 0,02	16 \pm 7	0,2 \pm 0,03
3a	7*	20000	n.d.	n.d.	270 \pm 14
3b	4 \pm 2	130 \pm 52	2 \pm 0,7	5500 \pm 1200	18 \pm 1
3c	2 \pm 2	41 \pm 11	n.d.	n.d.	8 \pm 1
3d	10 \pm 4	20000	6 \pm 2	20000	190 \pm 34
3e	1 \pm 0,4	168 \pm 72	0,3 \pm 0,1	250 \pm 27	8 \pm 0,8
3f	3300 \pm 2000	20000	73 \pm 58	15000 \pm 4000	16000 \pm 1700

Bei den Derivaten mit dem reversen Amid lassen sich insgesamt gute Aktivitäten gegenüber den Wildtyp-Proteinen feststellen, wobei lediglich **3f** eine geringe Potenz gegenüber KIT-wt und VEGFR2-wt zeigt. Mit 73 nM auf PDGFRA-wt kann jedoch gute Inhibition im Vergleich zu 3300 nM auf KIT-wt festgestellt werden, was möglicherweise ein interessanter Ansatzpunkt für selektive PDGFRA-Inhibitoren sein könnte und durch strukturelle Untersuchungen weiter analysiert werden sollte. Weiterhin wird nur für **3c** eine gute Hemmung mit 41 nM auf KIT-D816H beobachtet, während die anderen Derivate auf den AL-Mutanten dreistellig nanomolare Potenzen oder Inaktivität zeigen. Für Derivate **3a** und **3d** lässt sich eine leicht erhöhte Selektivität gegenüber VEGFR2-wt feststellen, was durch den Austausch der CF₃-Gruppe durch ein Wasserstoffatom bzw. eine Methyl-Gruppe hervorgerufen wird.

Die vielfältigen konformationellen Änderungen von KIT und PDGFRA sind bereits detailreich in der Literatur beschrieben. Somit kann davon ausgegangen werden, dass das apo-Protein in seiner nativen, nicht-phosphorylierten Form in der auto-inhibierten DFG-*out*-Konformation vorliegt. Um dahingehend nähere Informationen zu erhalten und Aufschluss über die Bindung von Typ IIa-Inhibitoren zu erlangen, wurde KIT-wt in Gegenwart von 2 mM MgCl₂ und 2 mM ATP bei 4 °C inkubiert. So sollten Informationen über die Fähigkeit der Auto-Phosphorylierung und der damit einhergehenden katalytischen Aktivität des exprimierten und gereinigten Proteins erhalten werden. Nach einer Inkubation über Nacht wurde eine Größenausschluss-Chromatographie durchgeführt und zusätzlich jeweils die Liganden **2a** und **3c** hinzugegeben, um die Adduktbildung bei pH 8,0 zu verfolgen (Abbildung 62). Das in Gegenwart von MgCl₂ und ATP inkubierte Protein wird fortlaufend KIT-wt^{ATP} genannt.

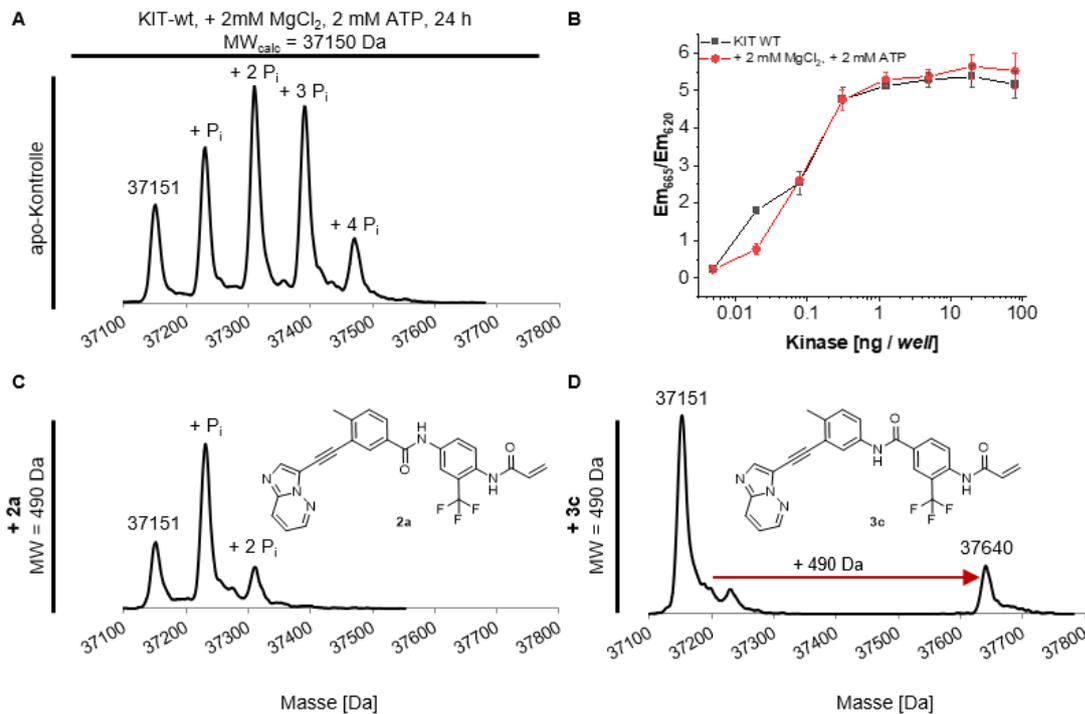


Abbildung 62: Dekonvolvierte ESI-Massenspektren von KIT-wt, inkubiert mit 2a und 3c nach Inkubation in Gegenwart von 2 mM MgCl₂ und 2 mM ATP über Nacht. A: Dekonvolviertes ESI-Massenspektrum nach 24 h Inkubationszeit bei pH-Wert 8,0 in Gegenwart von 2 mM MgCl₂ und 2 mM ATP. Am nächsten Tag wurden die Liganden **2a** (C) und **3c** (D) hinzugegeben. Zur Testung der Kinaseaktivität wurde eine Kinase-Titration angelehnt an das HTRF® TK KinEASE-Assaysystem durchgeführt (B). P_i: Phosphorylgruppe, dessen Molekulargewicht ~80 Da entspricht. Zusätzlich angegeben sind die gemessenen Molekulargewichte des Proteins bzw. der Protein-Liganden-Komplexes.

Das Massenspektrum von KIT-wt^{ATP} unmittelbar nach der Inkubation zeigt die Anwesenheit von fünf verschiedenen Spezies, welche sich in ihrer molekularen Masse um jeweils ~80 Da unterscheiden. Diese Verschiebungen können dem unphosphorylierten apo-Protein sowie der jeweils einfach, zweifach, dreifach bzw. vierfach phosphorylierten Protein-Spezies zugeordnet werden (Abbildung 62A). Hieraus wird ersichtlich, dass das exprimierte und gereinigte Protein aktiv und damit auch in der Lage ist, eine Auto-Phosphorylierung zu katalysieren. Diese Phospho-Spezies des Proteins wurden in den zuvor aufgenommenen apo-Massenspektren aufgrund der Co-Expression mit der katalytischen Domäne der YopH-Phosphatase nicht beobachtet, da es bereits während der Expression zu einer YopH-vermittelten Dephosphorylierung kommt. Die Aktivität der exprimierten und gereinigten Kinase wurde mittels Kinase-Titration bestimmt. Dabei können für KIT-wt und KIT-wt^{ATP} ähnliche Kinaseaktivitäten festgestellt werden, weshalb für eine tiefergehende Differenzierung der Proteinvarianten eine Analyse hinsichtlich ATP- und Substrat-K_M interessant wäre (Abbildung 62B). Außerdem könnten die ähnlichen Aktivitäten während der Kinasetitration auf eine schnelle Auto-Phosphorylierung des Proteins bei 20 °C hindeuten.

Weiterhin wurde KIT-wt^{ATP} mit den Liganden **2a** bzw. **3c** für 24 h bei einem pH-Wert von 8,0 inkubiert, wobei lediglich für **3c** eine marginal ausgeprägte Bindungsbildung beobachtet werden kann (Abbildung 62C, D). Interessanterweise scheint sich die zuvor detektierte Phosphorylierung des Zielproteins in Gegenwart der Liganden wieder abgebaut zu haben. Es lässt sich jedoch feststellen, dass eine Inkubation in Gegenwart von MgCl₂ und ATP zur Auto-Phosphorylierung des Zielproteins nicht zu einer besseren Zugänglichkeit des zu adressierenden Cysteins führt, da weniger Adduktbildung als zuvor beobachtet wird. Um Aufschluss über die genauen Phosphorylierungspositionen zu erhalten, wären auch an dieser Stelle Tandem-MS-Experimente denkbar.

Für massenspektrometrische Experimente mit PDGFRA wurde die bereits in der Reinigung etablierte PDGFRA-T674I-Variante verwendet. Die Messungen erfolgten zunächst bei einem pH-Wert von 8,0 mit einem fünffachem Ligandenüberschuss nach jeweils einer bzw. 24 h. Da nach einer Stunde Inkubation keine Adduktbildung detektiert wird, sind hier lediglich die Massenspektren nach 24 h Inkubation gezeigt (Abbildung 63).

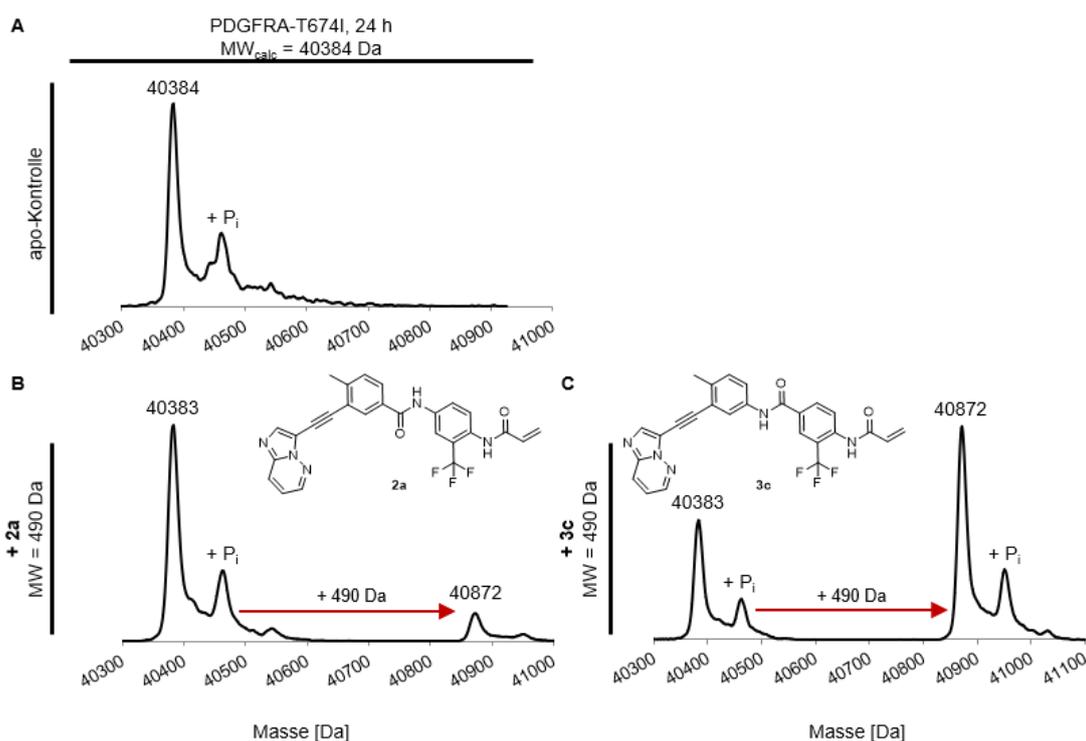
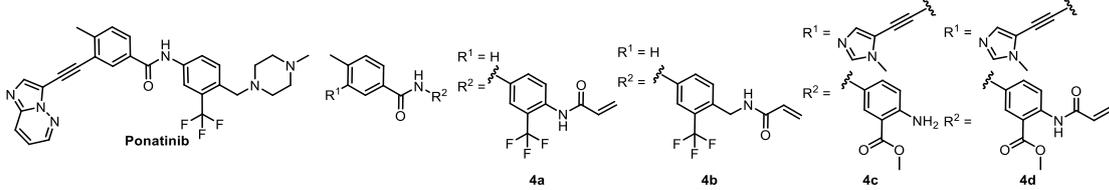


Abbildung 63: Dekonvolutierte ESI-Massenspektren von PDGFRA-T674I inkubiert mit 2a und 3c bei pH 8,0. **A:** Dekonvolutierte ESI-Massenspektren von apo PDGFRA-T674I nach 24 h Inkubationszeit bei einem pH-Wert von 8,0. Die apo-Form des Proteins besitzt ein Molekulargewicht von 40384 Da. **B:** Chemische Struktur von **2a** und dekonvolutierte ESI-Massenspektren von PDGFRA-T674I nach 24 h Inkubation mit **2a**. **C:** Chemische Struktur von **3c** und dekonvolutierte ESI-Massenspektren von PDGFRA-T674I nach 24 h Inkubation mit **3c**. MW_{calc}: kalkuliertes Molekulargewicht des Zielproteins. MW: molare Masse des zugefügten Liganden. Da: Dalton. P_i: Phosphorylgruppe, dessen Molekulargewicht ~80 Da entspricht. Zusätzlich angegeben sind die gemessenen Molekulargewichte des Proteins bzw. der Protein-Liganden-Komplexes.

Das entfaltete apo-Massenspektrum zeigt eine Masse von ~ 40384 Da, welche dem Zielprotein zugeordnet werden kann (Abbildung 63A). Weiter lässt sich eine einfach phosphorylierte Spezies des Zielproteins mit einer Massenverschiebung von ~ 80 Da zu einem größeren Molekulargewicht hin identifizieren, welche einer Phosphorylierung als post-translationale Modifikation zugeordnet werden kann. Beim Vergleich der erhaltenen Massenspektren nach Inkubation mit **2a** bzw. **3c** kann für **3c** eine deutliche Massenverschiebung um ~ 490 Da beobachtet werden, während mit **2a** eine geringer ausgeprägte Adduktbildung detektiert wird (Abbildung 63B, C). Bei der Bindung der Liganden an das Zielprotein scheint es jedoch keine Präferenz hinsichtlich der Phospho-Spezies des Proteins zu geben, da ebenfalls Addukte mit einer Masse des einfach phosphorylierten Proteins beobachtet werden können. Da auch nach 24 h Inkubationszeit keine vollständige Bindung des Liganden an das Zielprotein beobachtet wird, sollten auch für PDGFRA Optimierungen hinsichtlich Temperatur, pH-Wert und Liganden-Überschuss vorgenommen werden.

Da durch die Änderung des *backpocket*-Elements zwar vergleichbar aktive Inhibitoren synthetisiert werden konnten, die im Vergleich zu Ponatinib jedoch keine höhere Aktivität oder Selektivität gegenüber VEGFR2-wt aufweisen, wird ebenfalls die Derivatisierung der Lösungsmittel-exponierten Region bzw. des an die Scharnierregion-bindenden Imidazopyridazins des Liganden evaluiert (Tabelle 10). Dabei wurde es entweder vollständig entfernt (**4a**, **4b**) oder durch kleinere Bindeelemente (**4c**, **4d**) ersetzt. Aus synthetischen Gründen wurde hier ebenfalls mit dem jeweiligen reversen Amid im Vergleich zu Ponatinib gearbeitet.

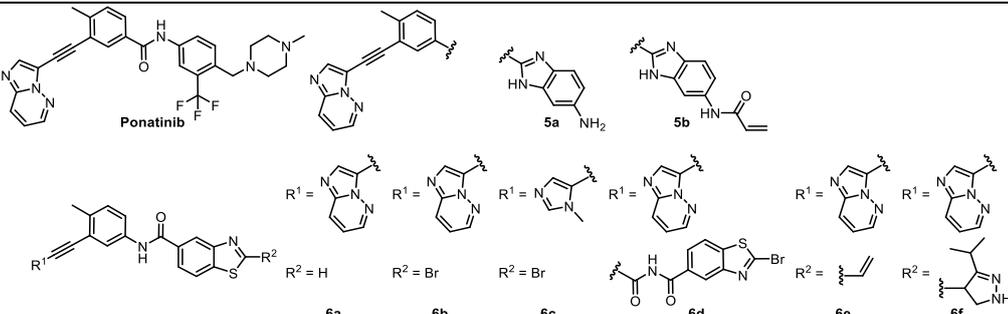
Tabelle 10: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte von Ponatinib-Derivaten. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung, $n \geq 3$. n.d. = no data available/keine Daten vorhanden.

					
HTRF IC ₅₀ [nM]					
Inhibitor	KIT-wt	KIT-D816H	PDGFRA-wt	PDGFRA-D842V	VEGFR2-wt
Ponatinib	0,7 \pm 0,4	14 \pm 4	0,1 \pm 0,02	16 \pm 7	0,2 \pm 0,03
4a	n.d.	20000	n.d.	n.d.	20000
4b	n.d.	20000	n.d.	n.d.	11000 \pm 1220
4c	380 \pm 60	20000	410 \pm 190	20000	2000 \pm 660
4d	130 \pm 17	13400 \pm 11400	110 \pm 38	7000 \pm 1500	500 \pm 60

Die als Typ III-Inhibitoren klassifizierbaren Derivate **4a** und **4b** erweisen sich als vollständig inaktiv, obwohl die bereits zuvor als essenziell befundene CF₃-Gruppe beibehalten bleibt. Daraus lässt sich schließen, dass ebenfalls die Bindung an die Scharnierregion essenziell zur Aktivität der Liganden beiträgt. Auch für Derivate **4c** und **4d** können auf den Wildtyp-Proteinen stark verringerte Aktivitäten und auf den AL-mutierten Zielproteinen lediglich mikromolare inhibitorische Potenzen ermittelt werden. Auch diese Ergebnisse verdeutlichen, dass das Scharnierregion-bindende Motiv einen essenziellen Beitrag zur Aktivität leistet. Es sollte jedoch ebenfalls die Substitution der CF₃-Gruppe durch eine Ester-Gruppe in **4c** und **4d** beachtet werden, welche wie bereits zuvor diskutiert zu einer verminderten Aktivität führt (Tabelle 8). Interessanterweise lässt sich im Gegensatz zu den in Tabelle 8 gezeigten Derivaten **2g** und **2h** eine geringere Aktivität des freien Amins **4c** gegenüber dem Acrylamid-Derivat **4d** feststellen, was einen gegenläufigen Trend der zwei Liganden-Gruppen aufzeigt. Um die Bindungsmodi der Inhibitoren näher untersuchen zu können, sollten zukünftig strukturelle Studien durchgeführt werden, was im Rahmen dieser Arbeit jedoch nicht erfolgreich umgesetzt werden konnte.

Als abschließende Serie der Ponatinib-basierten Derivate wurde eine Rigidisierung des *backpocket*-Elements durchgeführt, indem es durch Benzimidazol- bzw. Benzothiazol-Gruppen ausgetauscht wurde (Tabelle 11).

Tabelle 11: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte der Ponatinib-basierten Inhibitoren zur Evaluierung von Benzimidazol bzw. Benzothiazolen als alternatives *backpocket*-Element. Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung, n ≥ 3. * n = 2. n.d. = no data available/keine Daten vorhanden.



Inhibitor	HTRF IC ₅₀ [nM]				
	KIT-wt	KIT-D816H	PDGFRA-wt	PDGFRA-D842V	VEGFR2-wt
Ponatinib	0,7 ± 0,4	14 ± 4	0,1 ± 0,02	16 ± 7	0,2 ± 0,03
5a	1300 ± 110*	13000 ± 12000	170 ± 60	20000	20000
5b	4800 ± 300	20000	850 ± 230	20000	20000
6a	2 ± 1	n.d.	1 ± 0,9	3000 ± 480	80 ± 12
6b	3 ± 1	n.d.	2 ± 1	20000	20 ± 1,40
6c	25 ± 16	n.d.	18 ± 8	20000	1200 ± 280
6d	300 ± 180	n.d.	190 ± 130	16000 ± 4000	14000 ± 9000
6e	160 ± 23	n.d.	44 ± 19	37 ± 12	1100 ± 68
6f	620 ± 400	n.d.	820 ± 520	20000	n.d.

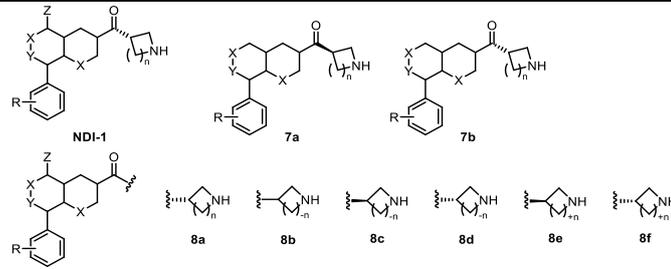
Die Rigidisierung des *backpocket*-bindenden Elements ist insgesamt wenig toleriert. Die Benzimidazol-Derivate zeigen vollständige Inaktivität auf AL-mutiertem KIT und PDGFRA, aber auch auf VEGFR2-wt. Immerhin kann für **5a** mit 170 nM noch eine moderate Aktivität auf PDGFRA-wt ermittelt werden. Auch für die Benzothiazol-Derivate **6d** und **6f** wird durch die Einbringung größerer Substituenten ein Verlust der inhibitorischen Potenz festgestellt, während bei den sterisch weniger anspruchsvollen Derivaten **6a** und **6b** IC₅₀-Werte im einstellig nanomolaren Bereich auf den Wildtyp-Proteinen erhalten werden. Demnach scheinen die kleineren Substituenten dieser Serie in der *backpocket* insgesamt besser toleriert zu werden. Mit 44 nM gegenüber PDGFRA-wt und 37 nM gegenüber PDGFRA-D842V weist **6e** eine gute inhibitorische Potenz auf, was erneut darauf hindeutet, dass eine Selektivitätssteigerung gegenüber KIT-wt und VEGFR2-wt durch die Einbringung eines Ethen-Restes erreicht werden kann. Dieses Verhalten konnte zuvor bereits für **3f** auf PDGFRA-wt beobachtet werden. Auch an dieser Stelle sind strukturelle Untersuchungen der hier diskutierten Derivate Gegenstand aktueller Arbeiten.

In diesem Teilprojekt wurde eine große Bandbreite neuartiger Ponatinib-Derivate synthetisiert. Als essenziell erweisen sich sowohl das an die Scharnierregion bindende Imidazopyridazin als auch die CF₃-Gruppe zur Adressierung einer hydrophoben Subtasche in der *backpocket*. Substitutionen dieser Gruppen zeigen sich in allen Untersuchungen als nachteilig. Weiterhin lässt sich feststellen, dass die Einbringung hydrophober Gruppen innerhalb der *backpocket* eine leichte Verschiebung der Selektivität in Richtung PDGFRA gegenüber KIT und auch VEGFR2-wt induziert, was ein interessanter Ansatzpunkt für die Entwicklung PDGFRA-selektiver Inhibitoren sein könnte.

3.6.3 Profilierung NDI-1-basierter Derivate

Die Derivatisierung von NDI-1 erfolgte in einem mehrstufigen Prozess, wobei ein besonderes Augenmerk daraufgelegt wurde, chemische Gruppen in iterativen Schritten zu derivatisieren, um einen klaren Einblick in die Wichtigkeit der einzelnen Bestandteile des Liganden zu erhalten.¹⁷ Dafür wurde der Inhibitor in drei Bereiche eingeteilt: i) das an die Scharnierregion bindende Element, ii) das Lösungsmittel-exponierte Motiv des Liganden und iii) das Motiv zur Bindung der Ribose-Tasche. Zunächst wurden das (*S*)- und das (*R*)-konfigurierte Isomer von NDI-1 ohne das Scharnierregion-bindende Element (**7a**, **7b**) synthetisiert. Zusätzlich wurde eine Reihe von Derivaten des Ribose-Tasche-Motivs designt, welche sich sowohl in der Konfiguration des Stereozentrums, als auch in der Ringgröße unterscheiden (Tabelle 12).

Tabelle 12: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte der NDI-1-Derivate zur Evaluierung des Scharnierregion-bindenden Elements sowie des in der Ribose-Tasche bindenden Elements. Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung. n ≥ 3. * n = 2. -n = weniger Kohlenstoffatome als NDI-1. +n = mehr Kohlenstoffatome als NDI-1. n.d. = *no data available*/keine Daten vorhanden.



Inhibitor	HTRF IC ₅₀ [nM]			
	KIT-wt	KIT-D816H	PDGFRA-wt	PDGFRA-D842V
NDI-1	2 ± 0,2	0,3 ± 0,1	<0,1	<0,1
7a	20000	n.d.	20000	20000
7b	20000	n.d.	20000	20000
8a	n.d.	24 ± 11	n.d.	360 ± 250
8b	n.d.	45 ± 28*	n.d.	310 ± 160
8c	n.d.	1 ± 0,4	n.d.	9 ± 5
8d	n.d.	7 ± 2	n.d.	61 ± 31
8e	n.d.	0,2 ± 0,1	n.d.	0,5 ± 0,3
8f	n.d.	3 ± 0,5	n.d.	12 ± 8

Bei Derivaten **7a** und **7b**, welche kein Scharnierregion-bindendes Element tragen, wird bei den Messungen der IC₅₀-Werte sowohl auf den Wildtyp-Proteinen als auch auf PDGFRA-D842V deutlich, dass eine vollständige Inaktivität vorliegt. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Bindung an die Scharnierregion essenziell zur Aktivität der Liganden beiträgt.

¹⁷ Wenn nicht anders angegeben: Synthese durchgeführt von J. Warmuth (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seiner Promotion in Zusammenarbeit mit im Labor tätigen Auszubildenden der Chemie.

Bei den verschiedenen Derivaten zur Adressierung der Ribose-Tasche durch Variation der Ringgröße werden die (*S*)-konfigurierten Derivate gegenüber den (*R*)-konfigurierten Derivaten insgesamt besser toleriert. Sterisch weniger anspruchsvolle Derivate weisen im Vergleich zum Parentalmolekül und im Vergleich zu größeren Ringen in der Ribose-Tasche geringere Aktivitäten auf, wobei dieser Trend für PDGFRA-D842V stärker ausgeprägt ist als für KIT-D816H. Von PDGFRA-D842V ist folglich die Derivatisierung des Elements zur Bindung in der Ribose-Tasche insgesamt weniger gut toleriert als von KIT-D816H, was gegebenenfalls für einen Selektivitätsvorteil ausgenutzt werden könnte. Die erhaltenen IC₅₀-Werte dieser Serie geben Hinweise auf den Einfluss der korrekten Ausrichtung der Liganden durch Variation des Ribose-Tasche bindenden Motivs. Eine weitere Beobachtung ist die höhere Sensitivität von PDGFRA gegenüber Veränderungen des in der Ribose-Tasche bindenden Elements.

Eine weitere Derivat-Serie zur Evaluierung der Bindung in der Ribose-Tasche wurde durch die Variation der chemischen Eigenschaften erhalten. Dafür wurden Elemente eingebracht, welche deutlich andere chemische Eigenschaften in der Ribose-Tasche im Vergleich zum Parentalmolekül aufweisen (Tabelle 13).

Tabelle 13: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte der NDI-1-Derivate zur Evaluierung der Ribose-Tasche durch Variation der chemischen Eigenschaften. Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung. n ≥ 3. * n = 2. -n = weniger Kohlenstoffatome als NDI-1. +n = mehr Kohlenstoffatome als NDI-1. n.d. = *no data available*/keine Daten vorhanden.

Inhibitor	HTRF IC ₅₀ [nM]	
	KIT-D816H	PDGFRA-D842V
NDI-1	0,3 ± 0,1	<0,1
9a	70 ± 28	300 ± 130
9b	4 ± 2	31 ± 16
9c	4 ± 3	38 ± 10
9d	2 ± 1	11 ± 6
9e	15 ± 6	22 ± 10
9f	47 ± 23	500 ± 281*
9g	630 ± 460	3700 ± 1900
9h	58 ± 13	n.d.
9i	37 ± 4	n.d.
9j	130 ± 44	n.d.
9k	0,7 ± 0,1	n.d.
9l	5 ± 4	n.d.

Für alle Derivate dieser Serie zur Veränderung der chemischen Eigenschaften zur Bindung in der Ribose-Tasche lässt sich ein Aktivitätsverlust gegenüber den getesteten Kinasen im Vergleich zum Parentalmolekül feststellen. Erneut ist dieser Trend wie auch bereits bei der Variation der Ringgröße für PDGFRA-D842V stärker ausgeprägt als für KIT-D816H. Auch die Einbringung aromatischer Systeme (**9e-9g, 9i-9j**) führt zu einem Aktivitätsverlust, wobei mit Ausnahme von **9g** und **9j** trotzdem noch zweistellig nanomolare Aktivitäten erhalten werden können. Für die zusätzliche Installation einer exozyklischen Methylgruppe (**9g**) ist der Potenzverlust um das jeweils ~2100-fache (KIT-D816H) bzw. ~37000-fache (PDGFRA-D842V) am deutlichsten. Einstellig nanomolare (KIT-D816H) bzw. niedrig zweistellig nanomolare (PDGFRA-D842V) IC_{50} -Werte zeigen die Derivate **9b-d**, wobei sich vor allem die Einbringung eines exozyklischen, *trans*-konfigurierten Motivs (**9d**) als vorteilhaft erweist, was ebenfalls auf PDGFRA-D842V mit 11 nM die höchste Aktivität dieser Serie widerspiegelt. Zusammenfassend lässt sich also auch bei dieser Serie beobachten, dass Änderungen der chemischen Eigenschaften zur Bindung in der Ribose-Tasche in KIT-D816H besser toleriert werden als in PDGFRA-D842V, wobei sich jedoch für beide Proteine insgesamt eine sehr gute Toleranz gegenüber exozyklischen Resten zeigt.

Als weiterer essenzieller Bestandteil von NDI-1 kann der Lösungsmittel-exponierte Bestandteil identifiziert werden, wobei in einer ersten Serie einfache Halogenid-Derivate des Parentalmoleküls designt wurden (**10a-10j**). Ebenso sollte die Einbringung einer zusätzlichen Methoxygruppe (**10k**) sowie einer Nitrosogruppe (**10l**), aber auch die Substitution durch ein aromatisches System mit veränderten chemischen Eigenschaften (**10m**) untersucht werden (Tabelle 14). Da sich während der Evaluierung der Besetzung der Ribose-Tasche die (*S*)-konfigurierten Derivate als favorisiert herausgestellt haben, wurde für die Derivate **10k-10m** jeweils der (*S*)-konfigurierte Grundbaustein genutzt.

Tabelle 14: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte der NDI-1-Derivate zur Evaluierung des Lösungsmittel-exponierten Elements. Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung. n ≥ 3. n.d. = no data available/keine Daten vorhanden.

Chemische Strukturen		R = I * = (S) 10a	R = Br * = (S) 10b	R = Br * = (R) 10c	R = F * = (S) 10d	R = F * = (R) 10e	R = 2F * = (S) 10f	R = 2F * = (R) 10g	
NDI-1		R = 2F * = (S) 10h	R = 2F * = (R) 10i	R = 2F * = (S) 10j	R = OMe, F * = (S) 10k	R = NO ₂ * = (S) 10l	R = N * = (S) 10m		
					HTRF IC₅₀ [nM]				
Inhibitor	KIT-wt	KIT-D816H	PDGFRA-wt	PDGFRA-D842V					
NDI-1	2 ± 0,2	0,3 ± 0,1	<0,1	<0,1					
10a	n.d.	<0,1	n.d.	<0,1					
10b	0,1 ± 0,03	0,3 ± 0,2	<0,1	<0,1					
10c	n.d.	4 ± 2	n.d.	6 ± 5					
10d	n.d.	0,3 ± 0,2	n.d.	1 ± 0,6					
10e	n.d.	n.d.	n.d.	17 ± 9					
10f	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1					
10g	n.d.	n.d.	n.d.	11 ± 7					
10h	0,9 ± 0,4	0,5 ± 0,2	1,6 ± 0,3	3 ± 2					
10i	n.d.	n.d.	n.d.	58 ± 24					
10j	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,0	0,1 ± 0					
10k	n.d.	0,2 ± 0,1	n.d.	0,8 ± 0,4					
10l	n.d.	0,1 ± 0,1	n.d.	<0,1					
10m	n.d.	0,3 ± 0,1	n.d.	<0,1					

Insgesamt können für alle Derivate der Lösungsmittel-Front hohe Aktivitäten mit subnanomolaren bis zweistellig nanomolaren IC₅₀-Werten festgestellt werden, wobei erneut eine leichte Bevorzugung der (S)-konfigurierten Derivate **10b**, **10d**, **10f** und **10h** gegenüber den jeweiligen (R)-konfigurierten Gegenstücken vorliegt. Durch die Variation der exakten Halogenierungs-Muster der Derivate **10f-i** könnte zudem eine Strategie hinsichtlich der Kinase-Selektivität erzielt werden. Sehr gut toleriert wird in dieser Serie die Derivatisierung hinsichtlich der chemischen Eigenschaften des Lösungsmittel-exponierten Motivs, da die Derivate **10l-m** mit NDI-1 vergleichbare IC₅₀-Werte gegenüber den getesteten Kinasen aufweisen. Durch die Einführung von zusätzlichen H-Brücken-Akzeptoren wie z. B. einer Methoxy-Gruppe in der Lösungsmittel-exponierten Gruppe könnten vorteilhafte Interaktionen zwischen dem Liganden und den Zielproteinen hervorgerufen werden, welche sich positiv auf die Aktivität auswirken könnten. An dieser Stelle wären ebenfalls strukturbiochemische Untersuchungen hilfreich, um tiefere Einblicke in die zugrundeliegende Struktur-Aktivitäts-Beziehung zu erhalten. Insofern die hohen Aktivitäten durch strukturbiochemische Untersuchungen erklärt und auf zusätzliche Wechselwirkungen zurückgeführt werden könnten, könnten zukünftige Designansätze zur Entwicklung selektiver Derivate dienen.

Als letzte Derivat-Serie sollte auch das Lösungsmittel-exponierte Motiv durch größere Substituenten mit variierenden chemischen Eigenschaften ausgetauscht werden (Tabelle 15). Durch die bevorzugte (*S*)-Konfiguration in der Ribose-Tasche, wurden für diese Serie nur Derivate dieser Konfiguration designt.

Tabelle 15: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte der NDI-1-Derivate zur Evaluierung des Lösungsmittel-exponierten Elements. Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung. n ≥ 3. n.d. = *no data available*/keine Daten vorhanden.

HTRF IC ₅₀ [nM]		
Inhibitor	KIT-D816H	PDGFRA-D842V
NDI-1	0,3 ± 0,1	<0,1
11a	0,6 ± 0,2	0,2 ± 0,1
11b	n.d.	0,1 ± 0
11c	0,3 ± 0,1	1 ± 0,8
11d	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,2
11e	n.d.	<0,1
11f	n.d.	0,5 ± 0,1
11g	n.d.	<0,1
11h	<0,1	0,2 ± 0,1
11i	0,1 ± 0	0,1 ± 0
11j	<0,1	0,2 ± 0,1
11k	0,4 ± 0,1	9 ± 1

Für alle Derivate der Serie lassen sich sehr hohe Aktivitäten im subnanomolaren bzw. einstellig nanomolaren Bereich detektieren, welche ähnlich zu denen des Parentalmoleküls sind. Mit 9 nM auf PDGFRA-D842V zeigt Ligand **11k** die geringste Aktivität der Serie, wobei diese immer noch einer sehr hohen inhibitorischen Potenz zugeordnet werden kann. Bei Analyse der erhaltenen IC₅₀-Werte ist keine Verschiebung der Selektivität gegenüber KIT-D816H oder PDGFRA-D842V zu beobachten. Demnach kann geschlossen werden, dass durch Modifikation der Lösungsmittel-exponierten Molekülreste durch die Einbringung sterisch anspruchsvoller Elemente sehr hohe Aktivitäten, aber keine höhere Selektivität erreicht werden kann.

Die strukturbiochemische Untersuchung von zehn, im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen, *Soaking*-Kristallstrukturen von NDI-1-Derivaten ist Gegenstand aktueller Arbeiten.

3.6.4 Profilierung Avapritinib-basierter Derivate

Als einziger für die Behandlung von PDGFRA-D842V-positivem GIST zugelassener Inhibitor besitzt Avapritinib ein Alleinstellungsmerkmal. Aufgrund der auftretenden Resistenzmutationen in Folge der Avapritinib-Behandlung, aber auch wegen der Avapritinib-assoziierten kognitiven Nebenwirkungen, wurde in der Arbeitsgruppe eine Serie an Liganden synthetisiert, bei der Kernelemente des Inhibitors systematisch permutiert wurden, um die zugehörigen Eigenschaften untersuchen und die auftretenden Probleme potenziell umgehen zu können.¹⁸ Deshalb bestand dieses Teilprojekt aus weiteren drei Untergruppen: i) Dekonstruktion von Avapritinib und Derivatisierung von Kernelementen (Tabelle 16), ii) Einbringung reaktiver Gruppen zur kovalenten Modifikation von Cys809 (KIT) bzw. Cys835 (PDGFRA) (Tabelle 17) und iii) Derivatisierung des freien Amins (Tabelle 18).

Im Rahmen des Dekonstruktionsansatzes wurden an das Scharnierregion-bindende Element (**12a**), welches kommerziell verfügbar war, Piperazin-(**12b-d**) oder auch *spiro*-Linker (**13a-c**) als strukturell komplexe, hoch gesättigte Strukturen mit signifikantem dreidimensionalem Charakter angebracht (Tabelle 16). Ligand **12d** kann zudem als Vergleichsinhibitor zu Avapritinib bezüglich der Profilierung des Stereozentrums angesehen werden. Da es bei den anvisierten Avapritinib-Derivaten vor allem um die Aktivität auf AL-Mutanten geht, wurden für die biochemische Analyse hauptsächlich KIT-D816H und PDGFRA-D842V verwendet.

Tabelle 16: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte der Avapritinib-basierten Derivate zur Evaluierung der einzelnen Interaktionspunkte. Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung, n ≥ 3. * n = 2. N.d. = no data available/keine Daten vorhanden.

HTRF IC ₅₀ [nM]				
Inhibitor	KIT-wt	KIT-D816H	PDGFRA-wt	PDGFRA-D842V
Avapritinib	6 ± 1	0,5 ± 0,3	<0,1	<0,1
12a	20000	n.d.	1500 ± 330	6100 ± 2600
12b	n.d.	1300 ± 530	n.d.	4900 ± 2200
12c	n.d.	48 ± 22	n.d.	28 ± 11
12d	n.d.	4 ± 1	n.d.	0,6 ± 0,1
13a	n.d.	40 ± 8*	n.d.	220 ± 49
13b	n.d.	100 ± 15*	n.d.	750 ± 200
13c	n.d.	2200 ± 170*	n.d.	7400 ± 1100

¹⁸ Wenn nicht anders angegeben: Synthese durchgeführt von T. Schulz (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seiner Promotion und Dr. R. Gontla (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seines PostDocs.

Das isolierte Scharnierregion-bindende Element **12a** zeigt keine Aktivität und auch die Einbringung des Piperazins (**12b**) steigert die Inhibition der Zielproteine nicht signifikant. Die inhibitorische Potenz kann durch weitere Installation eines Pyrimidins (**12c**) um das ~27-fache auf KIT-D816H und das ~175-fache auf PDGFRA-D842V im Vergleich zu **12b** gesteigert werden. Die zusätzliche Modifikation mit einem Benzyl-Substituenten (**12d**) steigert die Potenz erneut um das ~14-fache auf KIT-D816H und um das ~46-fache auf PDGFRA-D842V im Vergleich zu **12c**. Die Einbringung des Diaza-*spiro*-Nonans (**13a**) scheint in KIT-D816H mit 39 nM tolerierbar, aber nicht favorisiert zu sein, während sowohl **13a** (220 nM), **13b** (750 nM), als auch **13c** (7400 nM) in PDGFRA-D842V schlechte Hemmung zeigen. Dieser Aktivitätsverlust könnte ein Anzeichen dafür sein, dass der Ligand durch das ursprünglich vorkommende Piperazin als Linker in die korrekte Position gebracht wird und somit eine ideale Ausrichtung im Protein erhält. Durch die veränderten dreidimensionalen Strukturen der *spiro*-Linker lässt sich vermuten, dass eine vorteilhafte Bindung im Protein verhindert wird und diese somit zu einer geringeren inhibitorischen Potenz führen.

Mithilfe der in Kapitel 3.5.5.1 beschriebenen ersten strukturellen Analysen der Komplexstrukturen von Avapritinib mit seinen Zielproteinen wurden Ausgangsvektoren identifiziert, welche über einfache Derivatisierungsstrategien modifiziert werden sollten (Abbildung 64A). Dabei wurden zwei Ziele definiert: i) die Aktivität der Derivate sollte vergleichbar mit der von Avapritinib bleiben und ii) die Eigenschaften hinsichtlich der Penetration der Blut-Hirn-Schranke sollten optimiert werden.

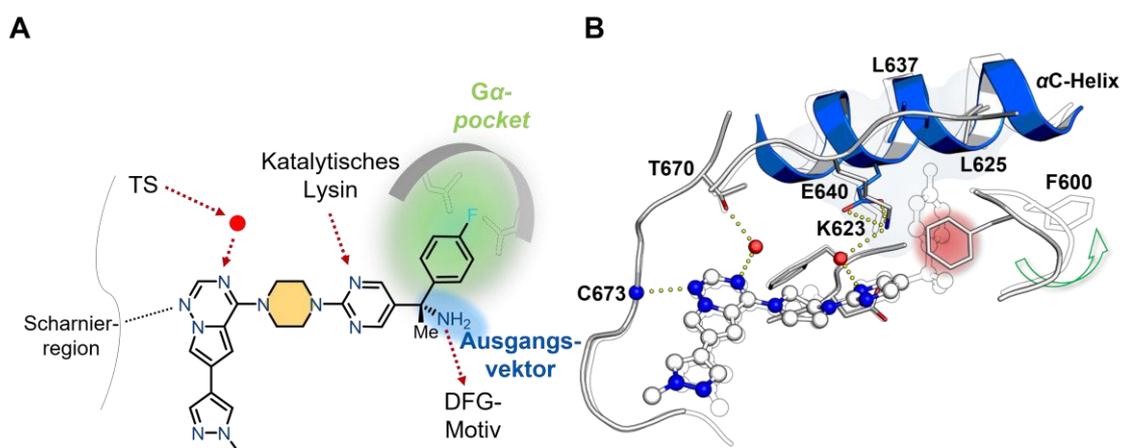


Abbildung 64: Schematische Darstellung der Strukturanalyse von Avapritinib inklusive wichtiger Interaktionsmuster und möglicher Ausgangsvektoren für synthetische Derivatisierung. A: Chemische Struktur von Avapritinib inkl. aller wichtigen Interaktions- und Derivatisierungspunkte. TS: Türsteher-Aminosäure, Grün: α -pocket, Gelb: verlinkendes Piperazin, Blau: Freies Amin als Ausgangsvektor für einfache Derivatisierungsstrategien. B: Vergleich der Kristallstruktur von Avapritinib (PDB-ID: 8PQ9) und **12c** (PDB-ID: 8PQA) gebunden an KIT-wt.

Wie oben bereits beschrieben, scheint der Fluorophenyl-Rest von Avapritinib eine tragende Rolle für dessen Aktivität im Zielprotein und auch für die Selektivität gegenüber anderen Kinasen einzunehmen (Kapitel 3.5.5.1). Um dessen Einfluss weiter zu untersuchen, wurde ein Derivat synthetisiert, welches weder das Stereozentrum, noch den Fluorophenyl-Rest beinhaltet (Abbildung 64B). Beim Vergleich dieses verkürzten Derivates mit der Kristallstruktur von Avapritinib in KIT-wt lässt sich zunächst eine grundsätzlich ähnliche DFG-*in*-Konformation der Kinase feststellen. Während regulatorische Elemente wie z. B. die α C-Helix und das DFG-Motiv die gleiche Konformation zeigen, lässt sich ein starker Unterschied in der Gly-reichen Schleife feststellen. Besonders hervorzuheben ist hier die Konformation der Seitenkette von Phe600. Während die Seitenkette in der Komplexstruktur von Avapritinib aus der Bindetasche herausragt und die Gly-reiche Schleife selbst eine aufgerichtete, von der ATP-Bindetasche weg gedrehte Konformation einnimmt, kann in der Komplexstruktur mit Derivat **12c** eine Rotation der Phe600-Seitenkette in die ATP-Bindetasche hinein beobachtet werden. Durch diese Rotation des Phenyl-Restes wird die zuvor analysierte *Ga-pocket* besetzt. Wie bereits erläutert, lässt sich bei biochemischen Messungen ein Aktivitätsverlust um das ~350-fache für das Derivat im Vergleich zu Avapritinib feststellen (PDGFRA-D842V: 35 nM vs. <0,1 nM). Zusammen mit der Strukturanalyse lässt sich demnach eine Potenzsteigerung durch Installation des Fluorophenyl-Restes und der damit einhergehenden Bindung in die *Ga-pocket* beobachten. Da für das verbrückende Piperazin keine signifikanten polaren Interaktionsmuster beobachtet werden können, sollte dieses Element durch heterozyklische *spiro*-Verbindungen (Diazspiro-Nonan bzw. -Heptan) ersetzt werden, um sowohl den Einfluss des Piperazins selbst, aber auch den Einfluss des Stereozentrums von Avapritinib zu untersuchen. In den biochemischen Messungen zeigen die synthetisierten Derivate **13c** (7400 nM) und **13b** (750 nM) in PDGFRA-D842V eine moderate bis geringe Aktivität. Dieser Trend wird noch deutlicher im zellulären System¹⁹ beobachtet, wobei das Heptan-Derivat **13c** vollständige Inaktivität zeigt (Tabelle 16). Da für diese Derivate keine Komplexstrukturen generiert werden konnten, kann lediglich vermutet werden, dass das Piperazin eine entscheidende Rolle für die korrekte Ausrichtung des Inhibitors in der *Ga-pocket* spielt.

¹⁹ Durchgeführt von B. S. Fletcher unter Anleitung von Dr. T. Mühlenberg (WTZ Essen).

Zur kovalenten Adressierung von KIT und PDGFRA durch Avapritinib-Derivate wurde zunächst eine Synthesestrategie erarbeitet, bei der für die Anbringung einer reaktiven Gruppe das Pyrimidin durch eine Phenyl-Gruppe ausgetauscht wurde. Für die weitere Dekoration wurden entweder ein Acetyl-Rest oder ein Weinrebamid an C3-Position des Phenylrings angebracht (Tabelle 17).

Tabelle 17: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte der kovalenten Avapritinib-basierten Derivate. Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung, n ≥ 3. n.d. = *no data available*/keine Daten vorhanden.

HTRF IC ₅₀ [nM]					
Inhibitor	KIT-wt	KIT-D816H	PDGFRA-wt	PDGFRA-D842V	VEGFR2-wt
Avapritinib	6 ± 1	0,5 ± 0,3	<0,1	<0,1	130 ± 34
14a	n.d.	1300 ± 300	n.d.	680 ± 75	n.d.
14b	6700 ± 130	350 ± 36	66 ± 14	74 ± 25	12100 ± 1200
14c	950 ± 450	n.d.	199 ± 62	570 ± 66	430 ± 45
14d	6500 ± 1500	860 ± 400	59 ± 41	150 ± 120	15000 ± 8500
14e	5800 ± 1800	2600 ± 800	118 ± 113	260 ± 120	9100 ± 3600
14f	n.d.	1600 ± 130	n.d.	n.d.	n.d.
14g	n.d.	300 ± 220	n.d.	69 ± 14	n.d.
14h	n.d.	310 ± 120	n.d.	210 ± 46	n.d.
14i	n.d.	440 ± 170	n.d.	820 ± 300	n.d.
14j	n.d.	4100 ± 120	n.d.	2700 ± 1600	n.d.
14k	n.d.	1100 ± 82	n.d.	630 ± 250	n.d.

Bei Analyse der erhaltenen Daten kann festgestellt werden, dass lediglich **14b**, **14d** und **14g** zweistellig nanomolare Aktivitäten gegenüber PDGFRA-wt (**14b**, **14d**) bzw. PDGFRA-D842V (**14b**, **14g**) zeigen, während die anderen synthetisierten Derivate lediglich drei- bis vierstellig nanomolare inhibitorische Potenz aufweisen können. Die Installation des Acrylamids in **14b** scheint weniger gut toleriert zu werden. Trotz der weitreichenden Inaktivität kann eine gering ausgeprägte Überlegenheit der Inhibitoren auf PDGFRA gegenüber KIT festgestellt werden. Dieser Trend lässt sich auch im Vergleich mit VEGFR2-wt beobachten. Ebenfalls wird ersichtlich, dass die Anbringung des Weinrebamids in C3-Position schlechter toleriert wird als die Acetyl-Gruppe. Obwohl **14c** und **14f** durch Modifikation mit einem Fluorophenyl- bzw. einem Fluorophenylamid-Rest eine wichtige pharmakophorische Eigenschaft des Parentalmoleküls beinhalten, werden auch hier lediglich dreistellig nanomolare inhibitorische Potenzen beobachtet, was möglicherweise auf das Fehlen des stereogenen Zentrums des Parentalmoleküls zurückzuführen ist.

Insgesamt scheint also auch die Einbringung eines *warheads* bzw. des reversiblen Gegenstücks die präferierte Ausrichtung des Liganden im Protein nicht erzielt werden zu können, wodurch es zu einem ausgeprägten Verlust der inhibitorischen Potenz kommt.

Auch die von Avapritinib abgeleiteten *warhead*-dekorierten Derivate sollten massenspektrometrisch hinsichtlich einer Adduktbildung zwischen dem Protein und dem Liganden untersucht werden. Für die massenspektrometrische Verfolgung der Adduktbildung wurde ein auf den zuvor aufbauenden Experimenten angepasstes Protokoll verwendet, wobei die Messungen grundsätzlich in einem pH-Wert von 9,5 durchgeführt wurden. Zunächst wurde das kovalente Derivat **14e** in einem fünf- bzw. zehnfachen Überschuss zum Protein hinzugeben und nach 24 h vermessen (Abbildung 65).

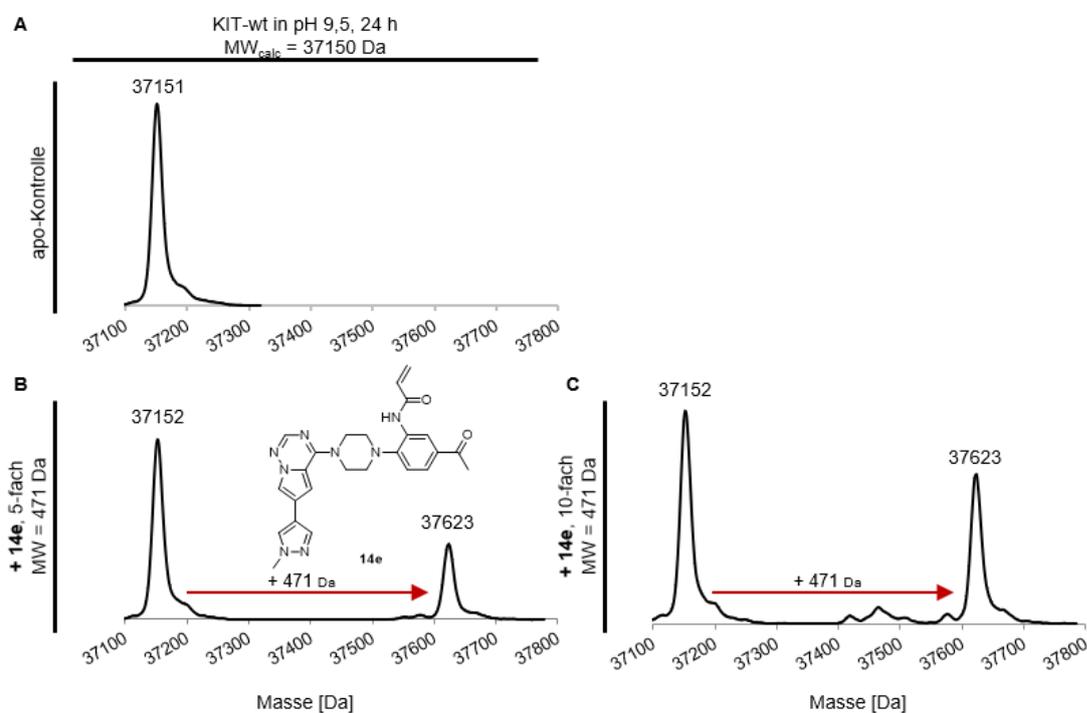


Abbildung 65: Dekonvolutierte ESI-Massenspektren von KIT-wt inkubiert mit fünf- bzw. zehnfachem Überschuss von 14e. **A:** Dekonvolutierte ESI-Massenspektren von apo KIT-wt nach 24 h in pH 9,5. **B:** Chemische Struktur des Liganden **14e** und dekonvolutierte ESI-Massenspektren nach 24 h Inkubationszeit mit einem fünffachen Ligandenüberschuss von **14e**. **D:** Dekonvolutierte ESI-Massenspektren nach 24 h Inkubationszeit mit einem zehnfachen Ligandenüberschuss von **14e**. Zusätzlich angegeben sind die gemessenen Molekulargewichte des Proteins bzw. der Protein-Liganden-Komplexes.

Sowohl mit einem fünffachen als auch einem zehnfachen Ligandenüberschuss werden Massen mit einer Verschiebung von ~ 471 Da im Vergleich zur apo-Masse detektiert. Diese Massenverschiebung entspricht dem molekularen Gewicht des eingesetzten Liganden **14e** (Abbildung 65**B, C**). Bei einem zehnfachen Überschuss lässt sich eine erhöhte Adduktbildung vermuten, wobei die Spezifität der Bindung des Liganden an das Protein *via* Tandem-Massen-Spektrometrie evaluiert werden sollte.

Da sich die kovalente Adressierung beider Cysteine in KIT und PDGFRA herausfordernd darstellte, wurden die Liganden **14b**, **14h**, **14i** und **14k** mit variierenden reaktiven Gruppen versehen²⁰ und in einem fünffachen Überschuss zum Protein hinzugegeben. Die Messungen wurden nach jeweils einer bzw. 24 h durchgeführt (Abbildung 66).

²⁰ Synthese durchgeführt von H. Jantzen (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen ihrer Bachelorarbeit und Dr. R. Gontla (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seines PostDocs.

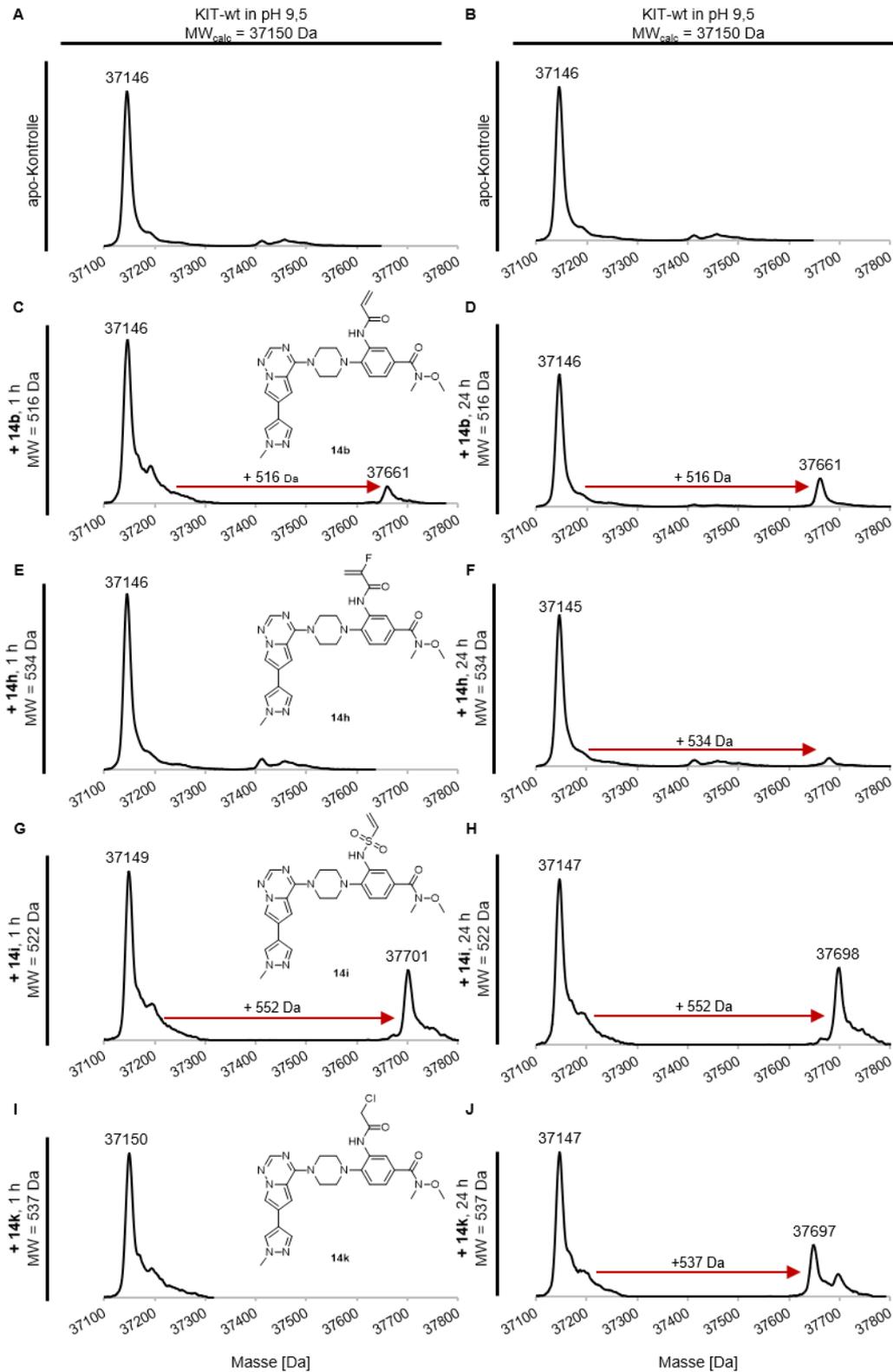


Abbildung 66: Dekonvolvierte ESI-Massenspektren von KIT-wt, inkubiert mit einem fünffachen Überschuss von 14b, 14h, 14i und 14k bei pH 9,5. Gezeigt sind die dekonvolvierten ESI-Massenspektren nach 1 bzw. 24 h Inkubationszeit. **A, B:** Dekonvolvierte ESI-Massenspektren von apo KIT-wt nach 1 h (**A**) und 24 h (**B**) Inkubation bei pH 9,5. **C, D:** Chemische Struktur von **14b** und dekonvolvierte ESI-Massenspektren nach 1 h (**C**) und 24 h (**D**) Inkubation mit **14b**. **E, F:** Chemische Struktur von **14h** und dekonvolvierte ESI-Massenspektren nach 1 h (**E**) und 24 h (**F**) Inkubation mit **14h**. **G, H:** Chemische Struktur von **14i** und dekonvolvierte ESI-Massenspektren nach 1 h (**G**) und 24 h (**H**) Inkubation mit **14i**. **I, J:** Chemische Struktur von **14k** und dekonvolvierte ESI-Massenspektren nach 1 h (**I**) und 24 h (**J**) Inkubation mit **14k**.

In allen Massenspektren wird zunächst eine Masse mit 37150 Da identifiziert, welche dem Zielprotein zugeordnet werden kann. Nach einstündiger Inkubation lässt sich lediglich für **14b** und **14i** eine zusätzliche Massenverschiebung um ~516 Da bzw. 552 Da beobachten, welche jeweils dem Protein-Ligand-Addukt zugeordnet wird, wobei diese für **14i** stärker ausgeprägt ist (Abbildung 66C, G). Nach 24 h Inkubationszeit wird für alle Proteinproben eine Massenverschiebung entsprechend des Molekulargewichts des jeweiligen Liganden beobachtet, wobei diese für **14h** am geringfügigsten ausfällt (Abbildung 66E, F). Auch für **14b** und **14i** wird im Vergleich zu den nach einer Stunde gemessenen Proben nur eine marginale weitere Steigerung der Adduktbildung erreicht (Abbildung 66D, H). Anhand dieser Ergebnisse kann abgeleitet werden, dass auch mit vermeintlich reaktiveren Gruppen als *warhead* im Vergleich zum Acrylamid, wie z. B. einem Chloracetamid oder einem Vinylsulfonamid, keine signifikante Erhöhung der Adduktbildung erreicht werden kann, obwohl das Acrylamid-tragende Derivat **14b** mit einem IC₅₀ von 6700 nM gegenüber KIT-wt zusätzlich die geringste Aktivität zum Zielprotein aufweist (Tabelle 17). Dies könnte einerseits auf die generell geringe Nukleophilie des Cysteins zurückzuführen sein. Andererseits könnte die geringe Aktivität der Liganden zum Zielprotein auf das Fehlen des Fluorophenyl-Motivs zur Bindung der *Gα-pocket* zurückzuführen sein, was sich insgesamt in IC₅₀-Werten im hohen drei- bis vierstelligen nanomolaren Bereich gegenüber KIT-wt äußert. Da die inhibitorischen Potenzen gegenüber PDGFRA mit IC₅₀-Werten im hohen zwei- bis niedrigem dreistelligen nanomolaren Bereich vergleichsweise höher sind als gegenüber KIT-wt, sollten vergleichbare Massen-Experimente für PDGFRA-wt und PDGFRA-T674I durchgeführt werden. Für die Spezifität der Bindungsbildung sollten zudem Tandem-MS-Experimente durchgeführt werden.

Aufgrund der beobachteten partiellen Adduktbildung in massenspektrometrischen Experimenten, wurden **14b** und **14e** für Co-Kristallisationsexperimente mit KIT-wt und anschließender Strukturanalyse genutzt (Abbildung 67). Es konnte davon ausgegangen werden, dass die Liganden als Avapritinib-Derivate eine DFG-*in*-Konformation binden bzw. stabilisieren würden.

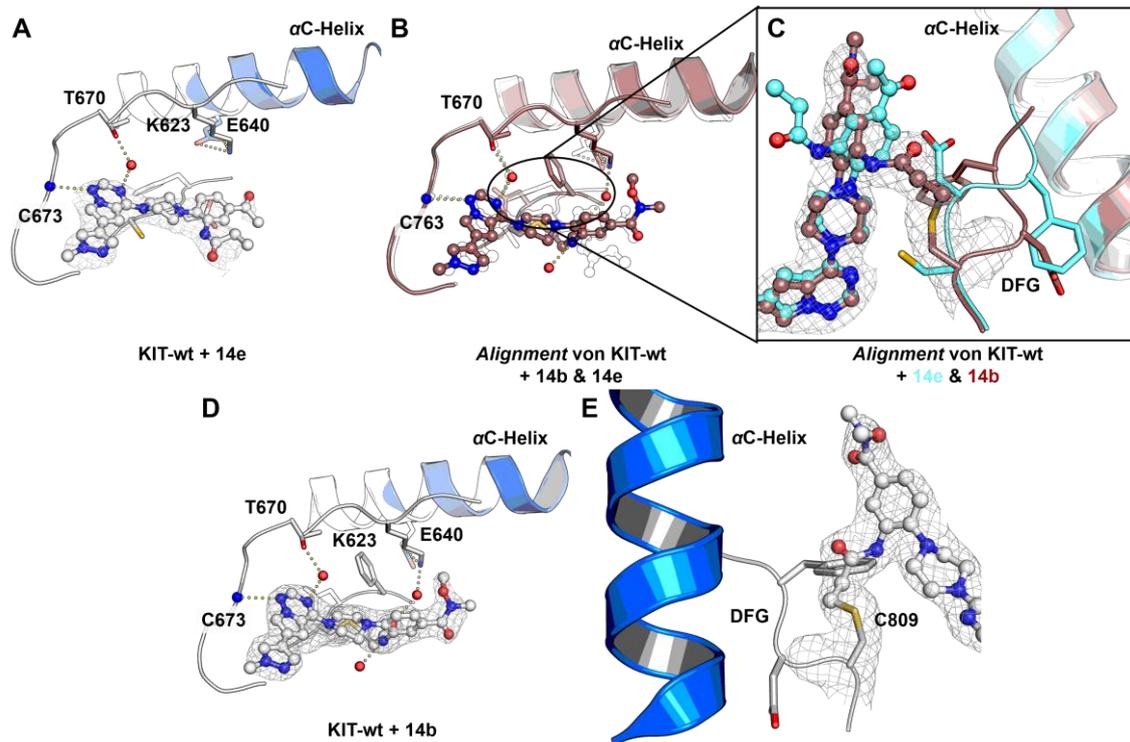


Abbildung 67: Co-Kristallstrukturen von 14e (A) und 14b (D) gebunden an KIT-wt. A: Übersicht der Komplexstruktur von **14e** in KIT-wt. B: Überlagerung der Komplexstrukturen von **14b** und **14e** gebunden an KIT-wt. Braun: Struktur von **14b** in KIT-wt. Gezeichnet: Struktur von **14e** in KIT-wt. C: Detailsicht der Aktivierungsschleifen der Kristallstrukturen von **14b** und **14e** gebunden an KIT-wt. Braun: Struktur von **14b** in KIT-wt, Cyan: Struktur von **14e** in KIT-wt. $|2F_o - F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0) -Elektronendichtekarte von **14b** gebunden an Cys809 in KIT-wt. D: Übersicht von **14b** gebunden an KIT-wt. $|2F_o - F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0)-Elektronendichtekarte von **14b**. E: Bindetasche von **14c** kovalent gebunden an Cys809 vor dem DFG-Motiv. $|2F_o - F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0) -Elektronendichtekarte von **14c** gebunden an Cys809.

In beiden generierten Kristallstrukturen nimmt die Aktivierungsschleife eine in die *backpocket* hineingefaltete Konformation ein und hat somit eine um $\sim 180^\circ$ gedrehte Orientierung zum Pendant in der inaktiven DFG-*out*-Konformation inne (Abbildung 67A, D). Polare Interaktionen zwischen dem Protein und dem Liganden werden nur durch das an die Scharnierregion bindende Element und Cys673 bzw. Thr670 ausgebildet, wobei letztere über ein Wassermolekül verbrückt ist. Zudem fällt auf, dass der Acrylamid-Rest in **14e** zur kovalenten Adressierung von Cys809 von der ATP-Bindetasche weg in Richtung Lösungsmittel-exponierter Region ragt und somit keine kovalente Modifikation initiiert wird (Abbildung 67A). Dieses Ergebnis unterstützt die geringe, in den massenspektrometrischen Experimenten beobachtete Adduktbildung und lässt vermuten, dass eine kovalente Bindungsbildung entweder verhindert oder nur sehr langsam ablaufen wird. Bei Analyse der $|2F_o - F_c|$ - und *simulated annealing* $|F_o - F_c|$ -omit-Elektronendichtekarten wird jedoch zusätzlich deutlich, dass insbesondere der *warhead*-tragende Ligandenbereich nicht vollständig von den Elektronendichten beschrieben werden kann, was zusätzlich auf eine partielle Flexibilität des Liganden hindeutet (Abbildung 67A, Anh. 6.4.4, Abbildung 95).

Dies unterstützt ebenfalls die Hypothese einer verringerten Bindungsbildung, da bei einer erhöhten Flexibilität das Binden der korrekten Konformation des Proteins und des Liganden erschwert ist.

Bei der Strukturanalyse von **14b** im Komplex mit KIT-wt kann deutlich eine kovalente Bindung von der Acrylamid-Einheit zu Cys809 des Proteins identifiziert werden (Abbildung 67D, E). Es treten wie auch in der Komplexstruktur von **14e** in KIT-wt polare Interaktionen zwischen dem Scharnierregion-bindenden Element, Cys673 und Thr670 auf, wobei auch hier die letztere über ein Wassermolekül verbrückt ist. Weiterhin besteht eine Wasser-medierte Interaktion zwischen dem Sauerstoff der Acrylamid-Einheit und dem katalytischen Lys623 (Abbildung 93E-H). Eine eindeutige Differenzierung zwischen aktiv und inaktiv bzw. DFG-*in* und DFG-*out*-Konformation kann bei dieser Komplexstruktur jedoch nicht klar getroffen werden, da die Aktivierungsschleife zwar eine Konformation einnimmt, die einer aktiven Kinase zugeordnet werden kann, das DFG-Motiv jedoch einen intermediären Zustand zwischen DFG-*in*- und DFG-*out*-Konformation zeigt. Hierbei ragt das Asp810 des DFG-Motivs erneut von der ATP-Bindetasche weg, während die Seitenkette des Phe811 leicht in die ATP-Bindetasche hinein geneigt ist (Abbildung 67C, D, E). Es lässt sich dennoch ein deutlicher Unterschied zwischen dieser Konformation des DFG-Motivs und der einer DFG-*out*-Konformation erkennen, bei welcher das Phenylalanin vollständig in die ATP-Bindetasche hineinragt. Auch beim Vergleich der Komplexstrukturen von **14b** und **14e** gebunden an KIT-wt wird diese konformationelle Besonderheit deutlich (Abbildung 67B, C). Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, dass für die kovalente Bindungsbildung des Cys809 von KIT bzw. Cys836 von PDGFRA vor dem DFG-Motiv eine neue, in der Literatur bisher noch nicht bekannte Konformation der Kinase eingenommen werden muss. Es scheint ein Intermediat zwischen DFG-*in*- und DFG-*out*-Zustand mit einer aktiven Konformation der Aktivierungsschleife hervorgerufen zu werden, der von der Kinase möglicherweise nicht favorisiert ist, weshalb eine Bindungsbildung erschwert sein dürfte (Abbildung 67E). Die Adressierung eines solchen spezifischen Kinasezustands könnte jedoch Türen für das Design vollständig neuartiger Inhibitoren öffnen, die ein breiteres Spektrum an DFG-*out*- aber auch DFG-*in*-Konformationen inhibieren könnten.

Als abschließende Serie wurde das freie Amin von Avapritinib durch Einschritt-Synthesen modifiziert (Tabelle 18).²¹ Dies sollte entweder durch Einbringung hydrophober Reste (**15a-b**, **16a-c**) oder durch signifikante Erhöhung des Molekulargewichts (**16d**) die Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit reduzieren.^[148, 149]

Tabelle 18: Chemische Strukturen und Übersicht der IC₅₀-Werte der Avapritinib-basierten Amin-Derivate. Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung, n ≥ 3. * n = 2. n.d. = no data available/keine Daten vorhanden.

		HTRF IC ₅₀ [nM]			
Inhibitor	KIT-wt	KIT-D816H	PDGFRA-wt	PDGFRA-D842V	VEGFR2-wt
Avapritinib	6 ± 1	0,5 ± 0,3	<0,1	<0,1	130 ± 34
15a	79 ± 26	2 ± 2	1 ± 0,3	0,4 ± 0,1	4300 ± 1000
15b	<0,1	0,4 ± 0,2	0,1 ± 0,1	<0,1	320 ± 6
16a	14 ± 1	<0,1	<0,1	0,5 ± 0,1	68 ± 1
16b	8 ± 0,2	<0,1	<0,1	<0,1	55 ± 5
16c	n.d.	0,7 ± 0,4	n.d.	0,2 ± 0,1	n.d.
16d	n.d.	2 ± 0,2	n.d.	0,2 ± 0,1	n.d.

Im Allgemeinen lässt sich feststellen, dass alle Amin-Derivate eine inhibitorische Potenz im subnanomolaren bis maximal zweistellig nanomolaren Bereich aufweisen, welche vergleichbar mit der von Avapritinib sind. Durch Dimethylierung (**15a**) bzw. Ethylierung (**15b**) kann zusätzlich die Selektivität gegenüber VEGFR2-wt deutlich gesteigert werden, während diese durch Einbringung größerer Reste wie einer Acetamid-Gruppe (**16a**) oder einer Acrylamid-Gruppe (**16b**) gesenkt wird. Zusätzlich kann beobachtet werden, dass die Einbringung größerer Reste scheinbar eine leichte Selektivität für PDGFRA-wt gegenüber KIT-wt bewirken, wobei auch gegenüber KIT-wt und KIT-D816H noch ein- bis niedrig zweistellig nanomolare Aktivitäten erhalten werden. Durch minimale chemische Veränderungen des freienamins können somit hoch potente Inhibitoren synthetisiert werden, welche für die zelluläre Evaluierung und physikochemische Untersuchungen interessant sein könnten.

Insgesamt ließ sich feststellen, dass die Derivate **15a-b** und **16a-d** mit Avapritinib vergleichbare Aktivitäten aufzeigen, weshalb diese Serie in einer Reihe von Kristallisationsexperimenten für KIT-wt und PDGFRA-T674I verwendet wurden.

²¹ Synthese durchgeführt von T. Schulz (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seiner Promotion und Dr. R. Gontla (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seines PostDocs.

Für die Derivate **15a** und **15b** werden keine signifikanten Konformationsänderungen der Kinase im Vergleich zu den Strukturen mit Avapritinib beobachtet.

Lediglich beim ethylierten Derivat **15b** wird in der Komplexstruktur in KIT-wt die Verdrängung eines Wassermoleküls aus der Bindetasche beobachtet (Anh. 6.4.4, Abbildung 96). Weitere Einblicke in die Struktur-Aktivitäts-Beziehung wurden mithilfe der amidierten Derivate **16a-d** erhalten, welche sowohl in biochemischen, als auch zellulären Messungen vergleichbare Aktivitäten wie Avapritinib aufweisen, aber auch weitere interessante Interaktionsmuster in den Komplexstrukturen zeigen (Abbildung 68).

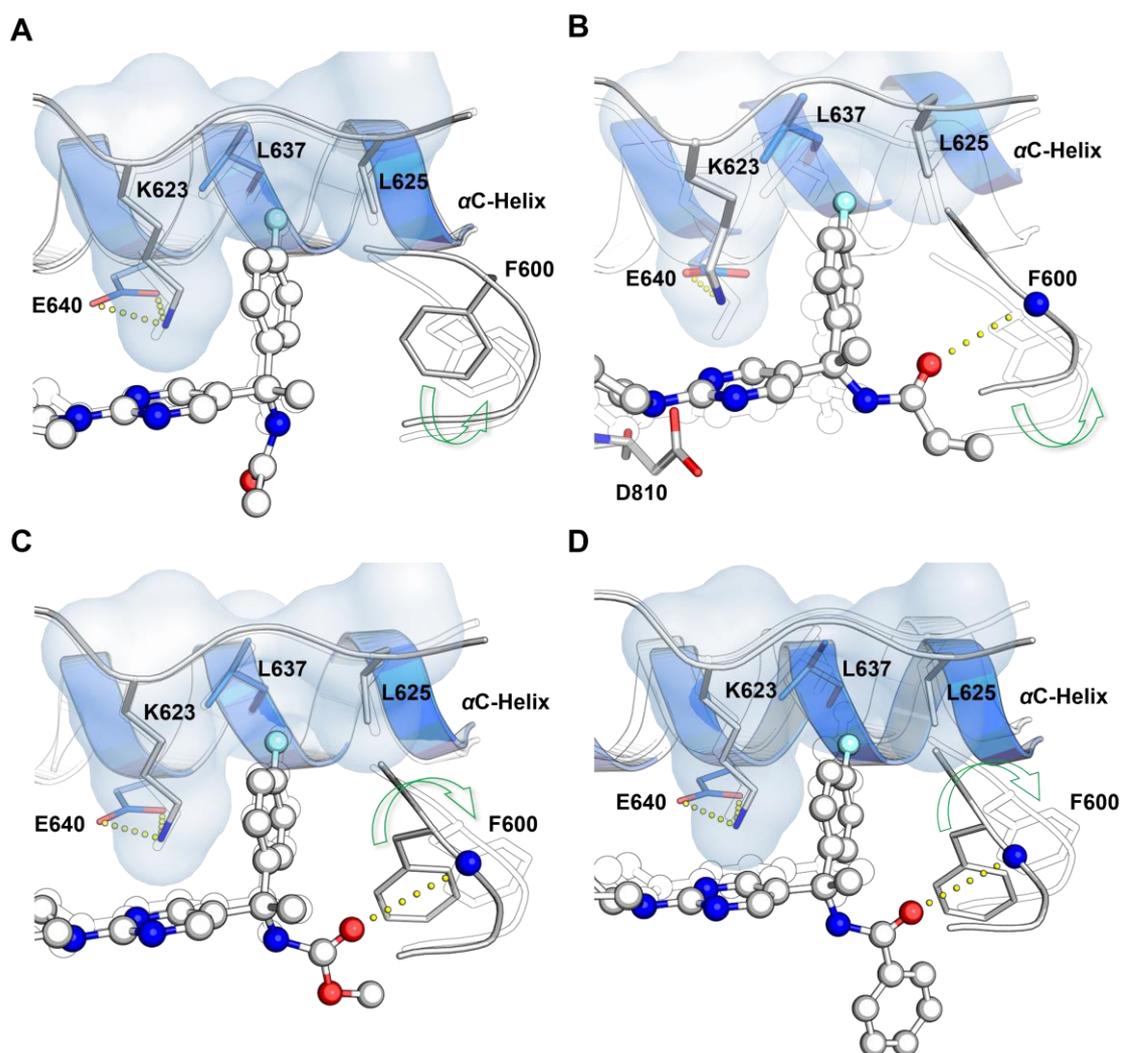


Abbildung 68: Analyse des Bindungsmodus der Derivate **16a**, **16b**, **16c** und **16d** im Komplex mit KIT-wt. **A:** Komplexstruktur von **16a** in KIT-wt. **B:** Komplexstruktur von **16b** in KIT-wt. **C:** Komplexstruktur von **16c** in KIT-wt. **D:** Komplexstruktur von **16d** in KIT-wt.

Auch die Komplexstrukturen der Amid-Derivate zeigen zunächst eine DFG-*in*-Konformation, wie sie bereits bei Avapritinib selbst beobachtet wird. Da die Derivate durch Einbringung einer Acetyl-, Acrylamid- bzw. Carbamat-Gruppe am stereogenen Zentrum des Inhibitors verändert wurden, wurden die Auswirkungen auf die regulatorischen Elemente und vor allem auf die *Gα-pocket* näher untersucht.

Durch die Einbringung einer Acetylgruppe können zwei unterschiedliche Konformationen des Liganden im jeweiligen Molekül der asymmetrischen Einheit beobachtet werden. Während sich eine der Acetylgruppen in Richtung des Asp810 des DFG-Motivs und somit in die ATP-Bindetasche orientiert, kann im anderen Molekül der asymmetrischen Einheit eine konformationelle Flexibilität des Liganden beobachtet werden. Hier kann die Acetylgruppe mit einer Besetzung von jeweils 50 % in Richtung des Asp810, aber auch zur Gly-reichen Schleife orientiert, eingebaut werden (Abbildung 68A, Anh. 6.4.4, Abbildung 97, Abbildung 98). Durch die Rotation der Acetylgruppe in die ATP-Bindetasche kann ebenfalls eine Umorientierung der Benzylgruppe von Phe600 der Gly-reichen Schleife näher zur Bindetasche hin beobachtet werden, während im zweiten Molekül eine Rotation nach außen, von der Bindetasche weg, erkennbar ist. Während bei der Analyse von **16a** im Komplex mit KIT-wt eine konformationelle Flexibilität des Liganden identifiziert wird, kann bei der Komplexstruktur von **16b** eine polare Interaktion zwischen dem Sauerstoff des Acrylamids und der Amin-Gruppe des Proteinrückgrats von Phe600 beobachtet werden, was eine Umorientierung der Gly-reichen Schleife weg von der ATP-Bindetasche zur Folge hat (Abbildung 68B). Weiterhin scheint die Bindung dieses Liganden eine Drehung der α C-Helix weg von der Bindetasche im Vergleich zur Komplexstruktur mit Avapritinib zu induzieren. Interessanterweise zeigt die Komplexstruktur von **16c** einen gegenläufigen Trend hinsichtlich der Orientierung der Gly-reichen Schleife, da hier zwar ebenfalls eine polare Interaktion des Sauerstoffs der Carbamat-Gruppe identifiziert wird, aber die Gly-reiche Schleife erneut eine Rotation in Richtung der ATP-Bindetasche einnimmt und nicht von ihr weg gedreht wird (Abbildung 68C). Die Beobachtung, dass mit der Modifikation des freien Amins vor allem die Orientierung des Phenylalanins in der Gly-reichen Schleife beeinflusst werden kann, ließ die Synthese von **16d** zu, wobei hier durch π - π -Wechselwirkungen eine Stabilisierung der Gly-reichen Schleife und der Benzyl-Seitenkette von Phe600 erreicht werden sollte. In der Komplexstruktur kann lediglich für ein Molekül in der asymmetrischen Einheit eine direkte Interaktion des Amid-Sauerstoffs mit der Amin-Gruppe des Rückgrats von Phe600 identifiziert werden (Abbildung 68D). Weiterhin sind auch die erwarteten π - π -Wechselwirkungen nur in diesem Molekül präsent, wobei die Benzyl-Gruppen des Liganden und der Aminosäure sich nicht direkt gegenüber liegen, sondern etwas zueinander verkippt

sind. Nichtsdestotrotz könnten diese zusätzlichen Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und dem Protein vorteilhaft für eine Stabilisierung des Protein-Ligand-Komplexes sein. Die beobachteten Interaktionsmuster der Amid-Derivate könnten interessante Startpunkte für weitere Synthesen von Derivaten sein, welche ein erhöhtes Interaktionsmuster zwischen dem Protein und den Liganden aufweisen. Hier sollte jedoch vor allem auch auf einen Aktivitätserhalt geachtet werden.

3.6.4.1 Exkurs: Zelluläre Aktivität & Penetration der Blut-Hirn-Schranke

Die untersuchten Amin-Derivate am stereogenen Zentrum von Avapritinib zeigen auf den getesteten Zielproteinen gute Aktivitäten mit IC_{50} -Werten im einstelligen bis subnanomolaren Bereich, weshalb sie zusätzlich hinsichtlich ihrer zellulären Potenz untersucht wurden.²² Zunächst wurden die Substanzen mittels *CellTiter-Glo* (CTG)-Assay in den folgenden Zelllinien analysiert (Tabelle 19). Für die Profilierung wurde zum einen die aus einem Patienten stammende GIST-T1-Zelllinie (RRID:CVCL_4976) verwendet, welche eine Deletion in Exon 11 (V560_Y578del) von KIT aufweist.^[150] Als zweite KIT-mutierte Zelllinie wurde GIST-T1-D816E (RRID:CVCL_A9N0) genutzt, welche durch Langzeitbehandlung der GIST-T1 mit Imatinib generiert wurde.^[147] Für die Evaluierung gegenüber PDGFRA wurden die mittels CRISPR/Cas9-generierten T1-a-D842V- und T1-a-D842V/G680R-Zelllinien verwendet. Für einen Einblick in die Selektivität der Inhibitoren wurde die GIST48B-Zelllinie genutzt, welche weder KIT- noch PDGFRA-abhängig ist.^[151] Eine tabellarische Übersicht der verwendeten Zelllinien und deren Ursprung befindet sich zudem im Anhang 6.5, Tabelle 32.

Tabelle 19: Übersicht der GR_{50} -Werte der Avapritinib-basierten Amin-Derivate aus den Zellexperimenten. Daten entsprechen dem Mittelwert \pm Standardabweichung, $n \geq 3$.

Inhibitor	CTG GR_{50} [nM]				
	GIST-T1	GIST-T1-D816E	T1-a-D842V	T1-a-G680R	GIST48B
Avapritinib	36 \pm 10	67 \pm 18	15 \pm 8	1600 \pm 370	1300 \pm 190
15a	250 \pm 74	520 \pm 94	58 \pm 13	2600 \pm 380	1900 \pm 470
15b	92 \pm 16	240 \pm 51	26 \pm 5	2800 \pm 460	4000 \pm 650
16a	39 \pm 6	86 \pm 19	26 \pm 21	3300 \pm 530	4800 \pm 2600
16b	39 \pm 7	89 \pm 23	24 \pm 6	4000 \pm 740	3500 \pm 1000
16c	60 \pm 12	130 \pm 37	19 \pm 6	3200 \pm 58	4900 \pm 1400
16d	290 \pm 180	640 \pm 110	51 \pm 7	5700 \pm 440	≥ 10000

²² CTG-Experimente durchgeführt von B. S. Fletcher (WTZ Essen) und Dr. S. Sievers (COMAS, Max-Planck-Institut für Molekulare Physiologie, Dortmund). Western Blot-Studien durchgeführt von B. S. Fletcher (WTZ Essen). CRISPR/Cas9-Zelllinien generiert von Dr. T. Mühlenberg (WTZ Essen).

Für die beiden alkylierten Derivate **15a** und **15b** fällt eine geringere Aktivität auf den KIT-Zelllinien im Vergleich zur T1-a-D842V-Zelllinie auf, wobei eine Ethylierung (**15b**) vor allem auf der T1-D816E-Zelllinie nicht toleriert wird. Eine gute inhibitorische Wirkung wird im Gegensatz dazu für die amidierten Derivate **16a** und **16b** mit jeweils 39 nM und **16c** mit 60 nM gegenüber der GIST-T1-Zelllinie beobachtet, während die weitere Einbringung eines großen Phenylrestes (**16d**) auf den KIT-Zelllinien nicht toleriert wird und auch auf T1-a-D842V mit 51 nM eine geringere Aktivität im Vergleich zu den anderen Derivaten zeigt. Auffällig ist zudem die Inaktivität in der ebenfalls Avapritinib-resistenten T1-a-D842V/G680R-Zelllinie. Dies könnte an der Lokalisation der Mutation am Eingang der ATP-Bindetasche der Kinase liegen, da am Scharnierregion-bindenden Element keine Veränderungen vorgenommen wurden und es dadurch zu einer sterischen Abstoßung des eingeführten Arginins mit dem Inhibitor kommen könnte. Eine moderate Steigerung kann jedoch hinsichtlich der Selektivität gegenüber der GIST48B-Zelllinie beobachtet werden, da hier die GR₅₀-Werte um das ca. zwei- bis dreifache höher liegen als die von Avapritinib und für Derivat **16d** eine vollständige Inaktivität von über 10 µM identifiziert werden kann. Auf Grundlage der Zellexperimente wurden die Derivate **16a-16c** als am vielversprechendsten angesehen, weshalb diese für Western Blot-Studien genutzt wurden, um den *on-target*-Effekt der Substanzen im zellulären System sowie den Einfluss auf nachgeschaltete Proteine zu untersuchen. Die Zellen der T1-a-D842V-Linie wurden für 24 Stunden mit 10–300 nM Inhibitor behandelt (Abbildung 69).

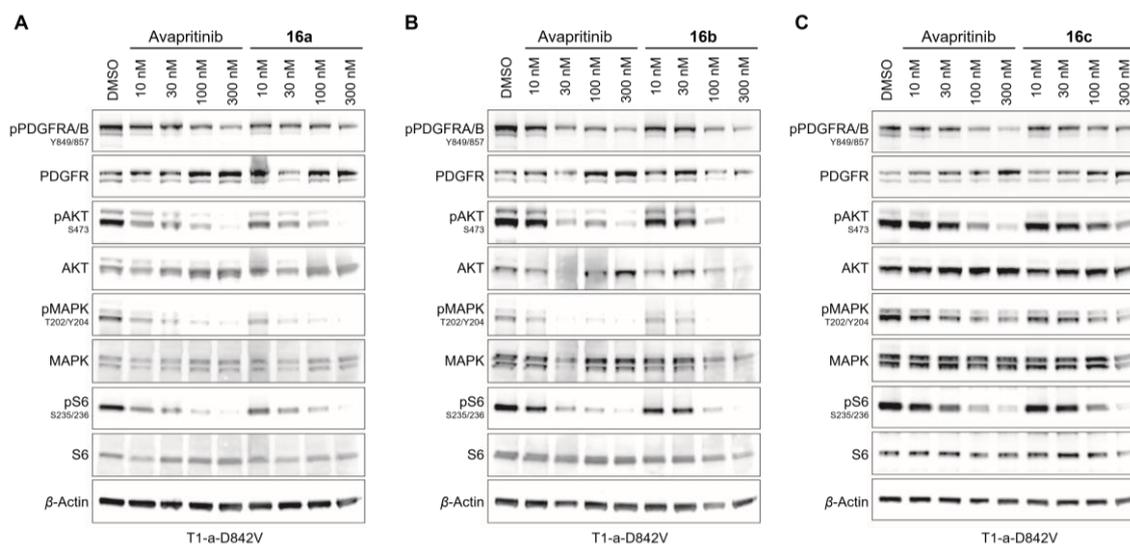


Abbildung 69: Western Blot-Analyse der Derivate 16a-c im Vergleich mit Avapritinib. A-C: Dosis-abhängige Regulierung von pPDGFRA-D842V in T1-a-D842V. p: phospho, AKT: Proteinkinase B, MAPK: mitogen-aktivierte Proteinkinase, S6: ribosomales Protein S6.

Die Ergebnisse der Western Blot-Studien zeigen eine Reduktion des phospho-PDGFR- α -D842V-Signals, was darauf schließen lässt, dass die Liganden das Zielprotein effektiv binden. Weiterhin wird deutlich, dass auch die Phosphorylierung wichtiger nachgeschalteter Proteine wie z. B. AKT und MAPK in Folge der PDGFR- α -Inhibition Dosis-abhängig runter reguliert werden kann. Die zellulären Aktivitäten der Inhibitoren liegen mit jeweils 26 nM für **16a** und **16b** und 19 nM für **16c** gegenüber T1-a-D842V im gleichen inhibitorischen Bereich wie Avapritinib mit 15 nM, weshalb für die Inhibitoren ähnliche Effekte in den Western Blot-Studien wie für Avapritinib erwartet worden waren.

Da auch die Untersuchung der Blut-Hirn-Schranken-Penetration (BBB, engl.: *blood brain barrier*) in diesem Teilprojekt von großer Bedeutung war, wurden sowohl *in silico* physikochemische Parameter zur anschließenden Bestimmung von *central nervous system multiparameter optimization* (CNS-MPO)-scores berechnet,^[152, 153] als auch *in vitro* MDCKII-MDR1-Assays durchgeführt (Tabelle 20).^[148]

Tabelle 20: Physikochemische Parameter und Ergebnisse des MDCKII-MDR1-Assays. Messungen für die MDCKII-MDR1-Daten wurden in drei unabhängigen Messungen durchgeführt. *=berechnet mit MarvinSketch 22.13.0 von Chemaxon. n.d. = *no data available*/keine Daten vorhanden.

Inhibitor	Physikochemischer Parameter* ²³						CNS-MPO score	MDCKII-MDR1 ($P_{app} A \rightarrow B$) [$\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$] ²⁴
	cloPP*	clogD*	MW*	TPSA*	HBD*	pK _a *		
Avapritinib	3,26	2,12	498,57	106,29	2	8,52	3,52	12,5
15a	4,08	3,59	526,62	83,51	0	7,72	3,67	n.d.
15b	4,05	3,25	526,62	91,30	1	8,13	3,46	n.d.
16a	3,08	3,08	540,61	109,37	1	2,79	3,52	11,3
16b	3,84	3,84	552,62	109,37	1	2,79	2,77	10,1
16c	3,70	3,70	556,61	118,60	1	2,79	2,60	12,4
16d	4,94	4,94	602,68	109,37	1	2,79	2,14	3,5

Sowohl für die alkylierten Avapritinib-Derivate **15a** (3,67) und **15b** (3,46), als auch für das acetylierte Derivat **16a** (3,25) werden CNS-MPO scores in einem vergleichbaren Bereich wie Avapritinib (3,52) erhalten. Dies lässt den Schluss zu, dass bei diesen Derivaten basierend auf der *in silico* Evaluierung eine Reduzierung der BBB-Penetration als unwahrscheinlich angesehen werden kann. Für die amidierten Derivate **16b** (2,77), **16c** (2,60), und **16d** (2,14) werden insgesamt geringere CNS-MPO-scores im Vergleich zu Avapritinib erhalten, wobei **16d** als am vielversprechendsten hinsichtlich einer reduzierten BBB-Penetration anzusehen ist. Dieser Trend kann ebenfalls in den *in vitro* Studien zur BBB-Penetration ermittelt werden, welche mittels MDCKII-MDR1-Assay durchgeführt wurden.

²³ Berechnungen durchgeführt von T. Schulz (AG Rauh, TU Dortmund) im Rahmen seiner Promotion.

²⁴ MDCKII-MDR1-Assays durchgeführt von Dr. M.-L. Zischinsky (LDC Dortmund).

Hier dient die ermittelte apparente Permeabilität von der apikalen zur basolateralen ($P_{app}(A \rightarrow B)$) Seite der Abschätzung der Hirngängigkeit der getesteten Verbindung. Für Avapritinib wird ein $P_{app}(A \rightarrow B)$ von $12,5 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ gemessen, was auf eine hohe Penetration der Blut-Hirn-Schranke hindeutet.^[154, 155] Für **16a** ($11,3 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), **16b** ($10,1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) und **16c** ($12,38 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) kann keine signifikante Verringerung der Hirngängigkeit beobachtet werden, während für **16d** mit einem $P_{app}(A \rightarrow B) = 3,46 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ wie bereits bei den *in silico* Berechnungen eine signifikante Verbesserung gegenüber den anderen Derivaten und Avapritinib erzielt wird.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass die Derivatisierung des freienamins von Avapritinib eine Möglichkeit bietet, die BBB-Gängigkeit und somit die Nebenwirkungen der Therapie zu verringern. Jedoch sollte ebenfalls darauf geachtet werden, dass die zellulären Aktivitäten erhalten bleiben, wobei **16d** zwar eine deutlich verringerte BBB-Penetration, jedoch mit 51 nM (T1-a-D842V) auch einen 3,4-fachen Aktivitätsverlust gegenüber Avapritinib (15 nM , T1-a-D842V) aufweist. Für ein tieferes Verständnis des Verhaltens der Derivate, sollten weitere *in vitro* pharmakokinetische und pharmakodynamische Eigenschaften, wie z. B. die Metabolisierung, die Löslichkeit, Stabilität und Zellpenetration ermittelt werden.

3.7 Zusammenfassung & Ausblick

KIT und PDGFRA spielen als treibende Onkogene eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von GIST und stellen Schlüsselstrukturen in der modernen Krebsforschung dar. Die translationale Krebsforschung, die die klinische Arbeit mit Patienten mit der akademischen Erforschung von GIST und der Entwicklung zielgerichteter Therapien verbindet, gewinnt in dieser Indikation aufgrund der Seltenheit in der Patientenpopulation besonders an Bedeutung. Vor diesem Hintergrund kann das Verständnis molekularer Mechanismen ein Grundbaustein für innovative therapeutische Ansätze der Zukunft liefern.

Im Rahmen dieser Arbeit gelang es, Reinigungsprotokolle und Kristallisationssysteme für die Wildtyp-Proteine und die Türsteher-mutierten Varianten von KIT und PDGFRA zu etablieren. Die Säulen-chromatographischen Reinigungen der Zielproteine wurden erfolgreich durchgeführt und die Proteine konnten in hoher Reinheit und ausreichenden Ausbeuten für Folgeexperimente, wie z. B. massenspektrometrische Analysen oder Kristallisationsansätze, erhalten werden. Für weitere Mutanten der Zielproteine wurden sowohl Testexpressionen als auch Reinigungsversuche durchgeführt, wobei jedoch keine geeigneten Konditionen identifiziert werden konnten.

Um Einblicke in die Protein-Ligand-Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zu erhalten und darauf aufbauend mögliche Ansätze für das Struktur-basierte Wirkstoffdesign erlangen zu können, wurden biochemische, Aktivitäts-basierte Assays etabliert und strukturelle Untersuchungen durchgeführt. Hier wurden die durch Imatinib hervorgerufenen Resistenzmutationen KIT-V654A und KIT-T670I untersucht, da gerade diese Mutationen mitunter die größten Herausforderungen bei der Behandlung von Patienten darstellen.

Für das Verständnis grundlegender Aktivierungsmechanismen wurden zunächst drei apo-Kristallstrukturen von KIT-wt, PDGFRA-wt und PDGFRA-T674I sowie 13 Komplexstrukturen mit kommerziell verfügbaren Inhibitoren unterschiedlicher Typen generiert. Für die apo-Strukturen wurde eine auto-inhibierte DFG-out-Konformation identifiziert, bei welcher die Juxtamembrandomäne eine regulatorische Funktion als Pseudosubstrat in der *backpocket* der Kinasedomäne einnimmt. Des Weiteren wurde erkannt, dass z. B. die in PDGFRA auftretende Primärmutation D842V einen Verlust eines Interaktionsnetzwerkes innerhalb der Aktivierungsschleife induziert, was zu einer Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung der aktiven Kinasekonformation zur Folge hat.

Die Strukturanalyse der Komplexstrukturen beschränkte sich vornehmlich auf KIT-wt. Für alle Typ IIa-Inhibitoren wurde eine nicht-auto-inhibierte DFG-*out*-Konformation der Kinase identifiziert, wobei jeder der Liganden zusätzlich zur Interaktion mit der Scharnierregion auch die *backpocket* des Zielproteins besetzte. Die Liganden Imatinib und Ponatinib ragten dabei durch das Tragen einer Methyl-Piperazin-Gruppe jeweils am tiefsten in diese Subtasche. Zusätzlich bildeten die Liganden Wechselwirkungen mit Aminosäuren unterhalb der α C-Helix aus, was potenziell zu einer Stabilisierung der α C-Helix führt. Analoge Interaktionsmuster werden in der auto-inhibierten Konformation durch die Bindung der JMD in der *backpocket* hervorgerufen.

Da für Regorafenib keine Komplexstruktur erhalten werden konnte, wurden *Docking*-Studien durchgeführt und mit bereits publizierten Kristallstrukturen des Regorafenib-Derivats Sorafenib verglichen. Dabei fiel auf, dass das Scharnierregion-bindende N-Methylpicolinamid frei drehbar zu sein scheint. Dieser Einblick könnte wertvoll für Derivatisierungs-Ansätze sein, wobei durch Rigidisierung des Liganden eine definierte Konformation induziert werden könnte. Sowohl für Ripretinib als auch für IDRX-42 und Ponatinib konnten im Vergleich zu Imatinib und Regorafenib gesteigerte inhibitorische Aktivitäten gegenüber den Aktivierungsschleifen-Mutanten (AL-Mutanten) festgestellt werden, wobei für IDRX-42 eine deutliche Selektivität für KIT-D816H gegenüber PDGFRA-D842V beobachtet wurde. Bei der Analyse der Imatinib-Resistenz-vermittelnden V654A- und T670I-Mutationen wurde deutlich, dass die V654A-Mutation lediglich von IDRX-42 adressiert werden kann, da der Ligand nicht nur durch Interaktionen mit der Aminosäuren-Seitenkette, sondern auch durch Wechselwirkungen mit dem Rückgrat von Val654 stabilisiert wurde. Diese Wirksamkeit wurde in präklinischen Studien beschrieben und wird durch die Strukturanalyse weiter validiert. Im Falle der Türsteher-Mutation KIT-T670I wurden lediglich Ponatinib und S116836 als geeignete Inhibitoren identifiziert, da diese Liganden einen Alkin-Linker besitzen und somit mit der Ile-Seitenkette der Aminosäure hydrophobe Wechselwirkungen eingehen würden, statt sterisch mit ihr zu interferieren, wie es für Imatinib, Regorafenib, Ripretinib und IDRX-42 beobachtet wurde.

Die Komplexstrukturen von Sunitinib und Nintedanib in KIT-wt zeigten charakteristische Merkmale für einen Typ IIb-Bindungsmodi, wobei die JMD in der Komplexstruktur mit Nintedanib eher eine von der *backpocket* weg orientierte Konformation einnahm. Des Weiteren konnten reduzierte Interaktionsmuster für Sunitinib und Nintedanib im Vergleich mit den Typ IIa-Inhibitoren beobachtet werden, da diese die *backpocket* nicht besetzen und lediglich Interaktionen mit der Scharnierregion eingehen und somit eine vornehmlich Lösungsmittel-exponierte Bindungspose aufweisen.

Nintedanib zeigte in der biochemischen Profilierung eine weitaus bessere Aktivität gegenüber Mutationen in der Aktivierungsschleife, wobei die Phenylgruppe des Liganden zur favorisierten Stabilisierung des Phenylalanins des DFG-Motivs beiträgt. Bei der Analyse der Resistenzmutationen konnten jedoch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Inhibitoren festgestellt werden. Dadurch, dass Nintedanib weiter in die ATP-Bindetasche hineinragt, würde der Ligand im Fall der T670I-Türstehermutation aus seiner präferierten Bindungspose verdrängt werden. Bei Sunitinib hingegen wäre diese sterische Interferenz weniger stark ausgeprägt, da dieser Inhibitor keine räumliche Annäherung zur Türsteher-Aminosäure vorweist.

Als Typ I- bzw. Typ I $\frac{1}{2}$ -Inhibitoren wurden schließlich Avapritinib, Crenolanib, NDI-1 und Staurosporin untersucht. Avapritinib hat in einer zuvor von anderen Inhibitoren im GIST-Feld nicht adressierten Subtasche zwischen der Gly-reichen Schleife und der α C-Helix gebunden. Dieser Bindungsmodus stabilisierte die Kinase in einer α C-Helix-out-Konformation, wobei ebenfalls die Gly-reiche Schleife eher die Konformation einer inaktiven Kinase einnahm. Durch die Lokalisation dieser Subtasche und durch die Bindung einer DFG-in- aber α C-Helix-out-Konformation wurde die Tasche als $G\alpha$ -pocket bezeichnet und Avapritinib als Typ I $\frac{1}{2}$ -Inhibitor eingestuft. Um diese Subtasche in der Kinasedomäne weiter zu untersuchen, wurde ein chemischer Dekonstruktionsansatz von Avapritinib durchgeführt. Einerseits konnte dafür in biochemischen Evaluierungen der verkürzten Derivate festgestellt werden, dass diese weniger aktiv waren als Avapritinib. Andererseits wurde durch das Lösen einer Kristallstruktur eines Derivates, welchem das stereogene Zentrum und der Fluorophenyl-Rest fehlten, herausgefunden, dass die $G\alpha$ -pocket dann durch die Phenylalanin-Seitenkette von Phe600 in der Gly-reichen Schleife besetzt wird. Die Besetzung der $G\alpha$ -pocket scheint also einen wesentlichen Beitrag zur Stabilität der Kinase beizutragen. Die Analyse der Komplexstrukturen von Avapritinib zeigte die Besonderheit des Inhibitors auf, was ihn einzigartig in der GIST-Therapie macht und seine Wirksamkeit und Selektivität auch und vor allem gegenüber PDGFRA-D842V erklärt.

Zusätzlich konnte der Resistenz-vermittelnde Mechanismus der Türsteher-Mutation für Avapritinib strukturebiologisch aufgeklärt werden. Es wurde eine Wasser-vermittelte Interaktion zwischen der Threonin-Seitenkette an der Türsteher-Position identifiziert, welche durch eine Mutation zu einem Isoleucin verloren geht und folglich zu einem direkten Aktivitätsverlust durch Reduzierung der Affinität des Liganden zum Zielprotein führt.

Für den in einem zellbasierten Assay gefundenen Inhibitor NDI-1 konnten gute inhibitorische Aktivitäten gegenüber den getesteten Zielproteinen festgestellt werden. Strukturbiologische Untersuchungen zeigten z. B. polare Interaktionen des Liganden mit dem Aspartat des DFG-Motivs in der Aktivierungsschleife, wodurch diese in ihrer Flexibilität eingeschränkt wird. Insgesamt trägt diese detaillierte strukturbiologische Analyse maßgeblich dazu bei, das breite Wirkungsspektrum von NDI-1 gegenüber den verschiedenen für GIST relevanten Mutationsvarianten besser zu verstehen, indem sie aufzeigt, wie NDI-1 spezifisch mit den Zielproteinen interagiert und deren Aktivität effektiv inhibiert.

Sowohl für Crenolanib als auch für Staurosporin konnten im Rahmen der strukturbiologischen Untersuchungen weitere Einblicke in Regulationsmechanismen der Ligandenbindung und deren Auswirkungen auf die Kinasekonformation erhalten werden. Während in den inaktiven DFG-*out*-Komplexen von Typ II-Inhibitoren ein Leucin der Aktivierungsschleife die *Ga-pocket* besetzte, wurde diese in den Komplexstrukturen mit den beiden Typ I-Inhibitoren vom Phenylalanin an Position 600 in der Gly-reichen Schleife ausgefüllt, wobei die Aminosäure-Seitenkette dieses Phenylalanins hydrophobe π - π -Wechselwirkungen mit dem jeweiligen Inhibitor eingeht. Dieser Mechanismus zeigt demnach noch einmal deutlich auf, dass die Adressierung der *Ga-pocket*, entweder durch Proteineigene Strukturen oder durch die Besetzung mit Liganden, unabdingbar für die Stabilisierung der Kinase zu sein scheint.

Aufbauend auf dem gewonnenen Verständnis von Aktivierungsmechanismen der Zielproteine KIT und PDGFRA und der Wirksamkeit von Inhibitoren auf unterschiedlichen Mutanten dieser Zielproteine, wurden in der Arbeitsgruppe neue Design und Synthesansätze verfolgt, welche im Rahmen dieser Arbeit biochemisch, massenspektrometrisch und strukturbiologisch untersucht wurden. Als Grundgerüste für Designansätze wurden Ripretinib, Ponatinib, NDI-1 und Avapritinib gewählt, da jeder dieser Inhibitoren für sich einzigartige Eigenschaften besitzt. Die Derivatisierung Ponatinib-basierter Liganden stellte jedoch nicht nur synthetisch eine Herausforderung dar, sondern zusätzlich war die Erhaltung der Aktivität gegenüber den gewählten Zielproteinen vergleichsweise herausfordernd. Sowohl die Substitution des an die Scharnierregion bindenden Elements als auch der CF₃-Gruppe erwiesen sich im Hinblick auf die inhibitorische Potenz als erfolglos. Die Einbringung einer reaktiven Gruppe zur kovalenten Adressierung von Cysteinen in KIT und PDGFRA brachte bisher weder bei den Ponatinib-basierten Liganden, noch bei Avapritinib-basierten Liganden eine Aktivitätssteigerung.

Für die massenspektrometrische Analyse der kovalenten Bindungsbildung wurde eine Vielzahl von Reaktionsbedingungen durchmustert, wobei die Temperatur, der pH-Wert und der Ligandenüberschuss relativ zur eingesetzten Proteinkonzentration als Parameter variiert wurden. Unter den optimierten Bedingungen konnte für eine Auswahl an Substanzen eine irreversible Modifikation der Zielproteine detektiert werden. Zudem wurden drei Komplexkristallstrukturen erhalten, von denen zwei eine kovalente Bindung mit den getesteten Liganden zeigten.

Der auf Ponatinib-basierte Ligand **2a** konnte erfolgreich im Komplex mit PDGFRA-T674I co-kristallisiert werden, zeigte mit 16 nM eine vielversprechende inhibitorische Aktivität auf KIT-D816H und war das erste Beispiel für eine kovalente Adressierung von Cys814 in PDGFRA. Zusammen mit der Komplexstruktur von **14b** gebunden an Cys809 in KIT-wt stellten diese Strukturen ein erstes *proof-of-concept* für die in dieser Arbeit beschriebenen kovalenten Adressierungsstrategie von KIT und PDGFRA dar.

Die fokussierte Derivatisierung von NDI-1 erbrachte hochaktive Liganden mit zum Teil subnanomolaren Potenzen auf den getesteten Zielproteinen, wobei jene Substanzen mit (*S*)-konfigurierten Elementen zur Besetzung der Ribose-Tasche bessere Aktivitäten zeigten als die (*R*)-konfigurierten Gegenstücke. Das Scharnierregion-bindende Element wurde als essenziell für die Aktivität der Liganden identifiziert. Weiterhin konnten durch Derivatisierung der Lösungsmittel-exponierten Region die inhibitorischen Aktivitäten optimiert werden. Insgesamt stellen die hier profilierten Liganden auf Basis von NDI-1 eine äußerst vielversprechende Substanzgruppe dar, welche sich insbesondere durch die synthetische Zugänglichkeit und Derivatisierbarkeit, ihre ausgeprägte inhibitorische Aktivität gegenüber den gewählten Zielproteinen sowie ihre vielversprechenden *in vitro* PK-Eigenschaften auszeichnet.

Auch für die Derivate der Avapritinib-Serie wurden zunächst essenzielle Bestandteile des Liganden durch einen chemischen Dekonstruktionsansatz evaluiert. Hierbei zeigten sich vor allem **12c** und **12d** als aktiv gegenüber den Zielproteinen, während eine Substitution des Piperazins durch die verwendeten *spiro*-Linker den gegenteiligen Effekt bewirkte. Die erfolgreiche Generierung von Kristallstrukturen von **16a**, **16b**, **16c** und **16d** ließ zudem den Schluss zu, dass die Konformationen der Glyc-reichen Schleife und der Seitenkette von Phenylalanin an Position 600 durch die Einbringung von unterschiedlichen Substituenten am freien Amin vom parentalen Avapritinib moduliert werden können.

In Western Blot-Studien konnte für **16a**, **16b** und **16c** der *on-target*-Effekt gegenüber PDGFRA-D842V validiert werden, welcher sich durch die potente Runterregulierung von phospho-PDGFRA sowie der Reduktion der Phosphorylierung von nachgeschalteten Effektor-Proteinen auszeichnet.

Zusätzlich wurden in Kooperation mit der LDC GmbH in Dortmund Studien zur Evaluierung der Blut-Hirn-Schranken-Penetration durchgeführt, da bei Avapritinib-Behandlung schwerwiegende kognitive Nebenwirkungen bei den Patienten beobachtet werden können. Hier deutete vor allem Verbindung **16d** mit einem $P_{app}(A \rightarrow B) = 3,46 \mu\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ auf eine verminderte Permeation und einer damit potenziell einhergehenden reduzierten Hirngängigkeit hin und stellt somit einen interessanten Startpunkt für weitere Optimierungen dar.

Insgesamt tragen die beschriebenen Arbeiten einen wesentlichen Teil zum struktur-basierten Wirkstoffdesign bei, was auf die Optimierung von Inhibitoren für die Adressierung spezifischer Zielproteine abzielt. Durch die Strukturanalysen konnten Einblicke in die molekularen Grundlagen von KIT und PDGFRA gebunden an Inhibitoren in unterschiedlichen Konformationen gewonnen werden. Zusammen mit der Aufklärung von auftretenden Resistenzmutationen können somit entscheidende Informationen für die Weiterentwicklung von Therapieansätzen entwickelt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ermöglichen also ein tieferes Verständnis der molekularen Grundlagen von GIST und können die Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien vorantreiben.

Auch zukünftig bedarf es einer engen Zusammenarbeit zwischen Klinik und Forschung, um neue Mutationen zu identifizieren und entsprechende Therapeutika zu entwickeln. Hierfür ist ein interdisziplinäres Zusammenspiel erforderlich.

Die Einführung neuartiger Verbindungen wie PROTACs zur Adressierung von KIT und PDGFRA bietet eine vielversprechende Alternative zur klassischen Adressierung der Zielproteine. Vorteilhaft wäre hier, dass PROTACs ebenfalls Wirkstoff-resistente Zielproteine adressieren und für den Proteinabbau markieren können. Außerdem zeigen sie meist eine höhere Selektivität verglichen mit Inhibitoren.^[156] Auch das Weiterverfolgen kovalenter Design-Ansätze wäre denkbar, wobei vor allem eine erhöhte Selektivität und eine Reduktion der Dosierung vorteilhaft wären.^[157] Um diesen Ansatz zu verfolgen, sollten jedoch zusätzliche Studien bezüglich der Halbwertszeiten der Zielproteine KIT und PDGFRA und den zugehörigen Mutanten erfolgen, da eine kovalente Adressierung eher bei Proteinen mit größeren Halbwertszeiten im Patienten zu Erfolgen führt.

Auch könnte über die Verwendung von Antikörpertherapien nachgedacht werden, welche bereits in der Klinik für andere ausgewählte Krebserkrankungen verwendet wird. Dabei wird die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren adressiert und eine Dimerisierung unterbunden. Diese zeichnet sich vor allem durch die hohe Spezifität gegenüber den Zielproteinen, hohe Affinitäten und hohe Stabilitäten im Blutserum aus.^[158]

Da die Lokalisation von KIT- und PDGFRA-Mutanten innerhalb der Zelle jedoch nicht vollständig geklärt ist, wären an dieser Stelle zellbasierte Studien hinsichtlich der Rekrutierung an die Zellmembran interessant.

Aufbauend auf den hier vorgestellten Arbeiten und die strukturbioologischen Untersuchungen werden in der Arbeitsgruppe aktuell bereits neue Genkonstrukte designt, welche durch den Ausschluss flexibler Proteinregionen eine höhere Stabilität der Mutationsvarianten für die Kristallisation und eine verbesserte Kristallpackung erhoffen lassen. Für die Modellierung von Mutationen der extrazellulären Domänen sollten zudem Genkonstrukte erstellt werden, welche den Volllängen-Rezeptor abbilden. An dieser Stelle wären zudem cryoelektronenmikroskopische Untersuchungen der Rezeptoren vorstellbar, wobei zusätzlich auf eine gute Auflösung der Kinasedomäne geachtet werden sollte, welche in der Literatur für KIT und PDGFRA bisher nicht erzielt werden konnte. Für die Expression von klinisch relevanten Mutanten könnten Expressionen in Gegenwart von Inhibitoren durchgeführt werden, um eine mögliche Toxizität der überexprimierten Zielproteine in den Expressionssystemen zu verhindern.

Ein weiterer wichtiger Aspekt auf dem Gebiet der GIST-Forschung stellt die Entwicklung von Resistenzmutationen dar. Durch die limitierte Verfügbarkeit klinisch relevanter Mutanten für biochemische Assays und das Fehlen der extrazellulären Domäne innerhalb dieser verwendeten Konstrukte, scheinen biochemische Assays eine verringerte Relevanz für die Prädiktivität der Inhibitor-Aktivitäten gegenüber den Zielproteinen zu besitzen. Die bereits etablierten GIST-Zelllinien und der immer währende Fortschritt in der Generierung neuer KIT- und PDGFRA-abhängiger Zelllinien, scheint hingegen die Vorhersagbarkeit des Ansprechens auf Inhibitoren signifikant darstellen zu können. Außerdem könnte die Vorhersage von auftretenden Resistenzmutationen in zellbasierten Systemen zusätzlich ein hilfreiches *tool* sein, um bereits vor dem Auftreten in der Klinik die ersten Studien hinsichtlich strukturbioologischer Auswirkungen und möglicher Designstrategien für Wirkstoffe durchführen zu können.

Als interdisziplinäres Projekt auf dem Gebiet von GIST stellt diese Arbeit die essenzielle Brücke zwischen Grundlagenforschung und klinischer Anwendung dar, indem eine immer währende Überführung von Erkenntnissen aus dem Labor in die Klinik zum Patienten und wieder zurück ermöglicht wurde.

Durch die kontinuierliche Interaktion zwischen chemischen Biologen, Medizinal-Chemikern, Strukturbiologen, *Screening*-Experten, Zellbiologen und Ärzten mit direktem Zugang zu Patienten wird darauf abgezielt, Fortschritte in der Erforschung von GIST zu erlangen, um schlussendlich die Lebensqualität der Patienten zu verbessern.

4 Literaturverzeichnis

- [1] H. Sung, J. Ferlay, R. L. Siegel, *et al.*, *CA Cancer J Clin* **2021**, *71*, 209-249.
- [2] L. A. Garraway, J. Verweij, K. V. Ballman, *J Clin Oncol* **2013**, *31*, 1803-1805.
- [3] C. B. Blackadar, *World J Clin Oncol* **2016**, *7*, 54-86.
- [4] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2000**, *100*, 57-70.
- [5] D. Hanahan, *Cancer Discov* **2022**, *12*, 31-46.
- [6] D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **2011**, *144*, 646-674.
- [7] D. T. Debela, S. G. Muzazu, K. D. Heraro, *et al.*, *SAGE Open Med* **2021**, *9*, 20503121211034366.
- [8] D. Nguyen, C. D. Gocke, *Virchows Arch* **2017**, *471*, 175-194.
- [9] L. Schwartzberg, E. S. Kim, D. Liu, *et al.*, *Am Soc Clin Oncol Educ Book* **2017**, *37*, 160-169.
- [10] B. Vogelstein, K. W. Kinzler, *Nat Med* **2004**, *10*, 789-799.
- [11] R. Kurzrock, H. M. Kantarjian, B. J. Druker, *et al.*, *Ann Intern Med* **2003**, *138*, 819-830.
- [12] G. Manning, D. B. Whyte, R. Martinez, *et al.*, *Science* **2002**, *298*, 1912-1934.
- [13] R. Roskoski, Jr., *Pharmacol Res* **2015**, *100*, 1-23.
- [14] M. A. Lemmon, J. Schlessinger, *Cell* **2010**, *141*, 1117-1134.
- [15] A. Ullrich, J. Schlessinger, *Cell* **1990**, *61*, 203-212.
- [16] J. P. Wagner, A. Wolf-Yadlin, M. Sevecka, *et al.*, *Sci Signal* **2013**, *6*, ra58.
- [17] M. G. Scioli, A. Bielli, P. Gentile, *et al.*, *Int J Mol Sci* **2014**, *15*, 6517-6526.
- [18] K. Verstraete, S. N. Savvides, *Nat Rev Cancer* **2012**, *12*, 753-766.
- [19] H. Liu, X. Chen, P. J. Focia, *et al.*, *EMBO J* **2007**, *26*, 891-901.
- [20] R. Berenstein, *Biomark Insights* **2015**, *10*, 1-14.
- [21] P. J. Alaimo, Z. A. Knight, K. M. Shokat, *Bioorg Med Chem* **2005**, *13*, 2825-2836.
- [22] N. M. Levinson, S. G. Boxer, *Nat Chem Biol* **2014**, *10*, 127-132.
- [23] F. Inizan, M. Hanna, M. Stolyarchuk, *et al.*, *Sci Rep* **2020**, *10*, 5401.
- [24] L. E. Locascio, D. J. Donoghue, *Trends Biochem Sci* **2013**, *38*, 75-84.

-
- [25] L. R. Klug, J. D. Kent, M. C. Heinrich, *Pharmacol Ther* **2018**, *191*, 123-134.
- [26] M. A. Lemmon, D. Pinchasi, M. Zhou, *et al.*, *J Biol Chem* **1997**, *272*, 6311-6317.
- [27] A. V. Reshetnyak, Y. Opatowsky, T. J. Boggon, *et al.*, *Mol Cell* **2015**, *57*, 191-201.
- [28] S. Yuzawa, Y. Opatowsky, Z. Zhang, *et al.*, *Cell* **2007**, *130*, 323-334.
- [29] J. Lennartsson, T. Jelacic, D. Linnekin, *et al.*, *Stem Cells* **2005**, *23*, 16-43.
- [30] S. S. Taylor, A. S. Shaw, N. Kannan, *et al.*, *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1854*, 1567-1574.
- [31] S. S. Taylor, A. P. Kornev, *Trends Biochem Sci* **2011**, *36*, 65-77.
- [32] Z. C. Feng, M. Riopel, A. Popell, *et al.*, *Diabetologia* **2015**, *58*, 654-665.
- [33] H. Yamamoto, Y. Oda, *Pathol Int* **2015**, *65*, 9-18.
- [34] S. Bauer, A. Duensing, G. D. Demetri, *et al.*, *Oncogene* **2007**, *26*, 7560-7568.
- [35] S. Agarwal, J. U. Kazi, L. Rönstrand, *J Biol Chem* **2013**, *288*, 22460-22468.
- [36] M. F. Brizzi, P. Dentelli, A. Rosso, *et al.*, *J Biol Chem* **1999**, *274*, 16965-16972.
- [37] K. Thömmes, J. Lennartsson, M. Carlberg, *et al.*, *Biochemical Journal* **1999**, *341*, 211-216.
- [38] I. Timokhina, H. Kissel, G. Stella, *et al.*, *EMBO J* **1998**, *17*, 6250-6262.
- [39] R. Roskoski, Jr., *Pharmacol Res* **2016**, *103*, 26-48.
- [40] R. Roskoski, Jr., *Pharmacol Res* **2021**, *165*, 105463.
- [41] A. C. Dar, K. M. Shokat, *Annu Rev Biochem* **2011**, *80*, 769-795.
- [42] V. Lamba, I. Ghosh, *Curr Pharm Des* **2012**, *18*, 2936-2945.
- [43] Z. B. Hill, B. G. Perera, D. J. Maly, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 6686-6688.
- [44] K. Soreide, O. M. Sandvik, J. A. Soreide, *et al.*, *Cancer Epidemiol* **2016**, *40*, 39-46.
- [45] M. C. Heinrich, B. P. Rubin, B. J. Longley, *et al.*, *Hum Pathol* **2002**, *33*, 484-495.
- [46] S. Hirota, K. Isozaki, Y. Moriyama, *et al.*, *Science* **1998**, *279*, 577-580.
- [47] A. Duensing, M. C. Heinrich, C. D. Fletcher, *et al.*, *Cancer Invest* **2004**, *22*, 106-116.
- [48] C. D. Fletcher, J. J. Berman, C. Corless, *et al.*, *Hum Pathol* **2002**, *33*, 459-465.
- [49] L. Silverstone, F. Gaillard, **2009**.

-
- [50] G. D. Demetri, P. Reichardt, Y. K. Kang, *et al.*, *Lancet* **2013**, *381*, 295-302.
- [51] C. International Human Genome Sequencing, *Nature* **2004**, *431*, 931-945.
- [52] S. Bauer, S. George, M. von Mehren, *et al.*, *Front Oncol* **2021**, *11*, 672500.
- [53] P. G. Casali, J. Y. Blay, N. Abecassis, *et al.*, *Ann Oncol* **2022**, *33*, 20-33.
- [54] C. Serrano, S. George, *Clin Cancer Res* **2020**, *26*, 5078-5085.
- [55] M. G. Belinsky, L. Rink, M. von Mehren, *Front Oncol* **2013**, *3*, 117.
- [56] I. Hostein, N. Faur, C. Primois, *et al.*, *Am J Clin Pathol* **2010**, *133*, 141-148.
- [57] Z. Szucs, K. Thway, C. Fisher, *et al.*, *Future Oncol* **2017**, *13*, 93-107.
- [58] M. C. Heinrich, K. Owzar, C. L. Corless, *et al.*, *J Clin Oncol* **2008**, *26*, 5360-5367.
- [59] M. L. Lux, B. P. Rubin, T. L. Biase, *et al.*, *Am J Pathol* **2000**, *156*, 791-795.
- [60] A. Wozniak, P. Rutkowski, P. Schöffski, *et al.*, *Clin Cancer Res* **2014**, *20*, 6105-6116.
- [61] S. Grunewald, L. R. Klug, T. Mühlenberg, *et al.*, *Cancer Discov* **2021**, *11*, 108-125.
- [62] M. C. Heinrich, C. L. Corless, A. Duensing, *et al.*, *Science* **2003**, *299*, 708-710.
- [63] J. Lasota, A. Dansonka-Mieszkowska, L. H. Sobin, *et al.*, *Lab Invest* **2004**, *84*, 874-883.
- [64] N. Wong, C. Garcia-Petit, A. Dangoor, *et al.*, *Cancer Genet* **2022**, *268-269*, 46-54.
- [65] C. R. Antonescu, P. Besmer, T. Guo, *et al.*, *Clin Cancer Res* **2005**, *11*, 4182-4190.
- [66] S. G. Krimmer, N. Bertoletti, Y. Suzuki, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2023**, *120*, e2300054120.
- [67] C. L. Corless, C. M. Barnett, M. C. Heinrich, *Nat Rev Cancer* **2011**, *11*, 865-878.
- [68] H. Ding, X. Yu, Y. Yu, *et al.*, *Oncol Rep* **2020**, *43*, 751-764.
- [69] C. D. Mol, D. R. Dougan, T. R. Schneider, *et al.*, *J Biol Chem* **2004**, *279*, 31655-31663.
- [70] C. L. Corless, M. C. Heinrich, *Annu Rev Pathol* **2008**, *3*, 557-586.
- [71] J. Martin-Broto, V. Martinez-Marin, C. Serrano, *et al.*, *Clin Transl Oncol* **2017**, *19*, 536-545.
- [72] K. Pauls, S. Merkelbach-Bruse, D. Thal, *et al.*, *Histopathology* **2005**, *46*, 166-175.
- [73] C. L. Corless, A. Schroeder, D. Griffith, *et al.*, *J Clin Oncol* **2005**, *23*, 5357-5364.

-
- [74] N. B. Lydon, B. J. Druker, *Leuk Res* **2004**, *28 Suppl 1*, S29-38.
- [75] B. Peng, P. Lloyd, H. Schran, *Clin Pharmacokinet* **2005**, *44*, 879-894.
- [76] E. Buchdunger, T. O'Reilly, J. Wood, *Eur J Cancer* **2002**, *38 Suppl 5*, S28-36.
- [77] C. Tarn, Y. V. Skorobogatko, T. Taguchi, *et al.*, *Cancer Res* **2006**, *66*, 5477-5486.
- [78] M. Debiec-Rychter, R. Sciot, A. Le Cesne, *et al.*, *Eur J Cancer* **2006**, *42*, 1093-1103.
- [79] J. Y. Blay, Y. K. Kang, T. Nishida, *et al.*, *Nat Rev Dis Primers* **2021**, *7*, 22.
- [80] G. Z. Li, C. P. Raut, *Onco Targets Ther* **2019**, *12*, 5123-5133.
- [81] M. Azam, M. A. Seeliger, N. S. Gray, *et al.*, *Nat Struct Mol Biol* **2008**, *15*, 1109-1118.
- [82] H. Kaitsiotou, M. Keul, J. Hardick, *et al.*, *J Med Chem* **2017**, *60*, 8801-8815.
- [83] A. W. Gramza, C. L. Corless, M. C. Heinrich, *Clin Cancer Res* **2009**, *15*, 7510-7518.
- [84] T. J. Abrams, L. B. Lee, L. J. Murray, *et al.*, *Molecular cancer therapeutics* **2003**, *2*, 471-478.
- [85] M. Malinska, K. N. Jarzemska, A. M. Goral, *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2014**, *70*, 1257-1270.
- [86] G. D. Demetri, A. T. van Oosterom, C. R. Garrett, *et al.*, *Lancet* **2006**, *368*, 1329-1338.
- [87] M. C. Heinrich, R. G. Maki, C. L. Corless, *et al.*, *J Clin Oncol* **2008**, *26*, 5352-5359.
- [88] P. Reichardt, G. D. Demetri, H. Gelderblom, *et al.*, *BMC Cancer* **2016**, *16*, 22.
- [89] D. Zopf, R. Heinig, K.-H. Thierauch, *et al.*, *Cancer Research* **2010**, *70*, 1666-1666.
- [90] M. Fukudo, K. Asai, C. Tani, *et al.*, *Invest New Drugs* **2021**, *39*, 1422-1431.
- [91] C. N. Yeh, M. H. Chen, Y. Y. Chen, *et al.*, *Oncotarget* **2017**, *8*, 44121-44130.
- [92] C. Serrano, A. Marino-Enriquez, D. L. Tao, *et al.*, *Br J Cancer* **2019**, *120*, 612-620.
- [93] J. Y. Blay, C. Serrano, M. C. Heinrich, *et al.*, *Lancet Oncol* **2020**, *21*, 923-934.
- [94] P. Thirasastr, N. Somaiah, *Clin Exp Gastroenterol* **2023**, *16*, 11-19.
- [95] S. Bauer, R. L. Jones, J. Y. Blay, *et al.*, *J Clin Oncol* **2022**, *40*, 3918-3928.
- [96] R. L. Jones, C. Serrano, M. von Mehren, *et al.*, *Eur J Cancer* **2021**, *145*, 132-142.
- [97] A. Rizzo, M. A. Pantaleo, A. Astolfi, *et al.*, *Cancers (Basel)* **2021**, *13*.

-
- [98] S. Dhillon, *Drugs* **2020**, *80*, 433-439.
- [99] M. C. Heinrich, R. L. Jones, M. von Mehren, *et al.*, *Lancet Oncol* **2020**, *21*, 935-946.
- [100] C. P. Joseph, S. N. Abaricia, M. A. Angelis, *et al.*, *Oncologist* **2021**, *26*, e622-e631.
- [101] R. P. DeMatteo, K. V. Ballman, C. R. Antonescu, *et al.*, *Ann Surg* **2013**, *258*, 422-429.
- [102] K. S. Gajiwala, J. C. Wu, J. Christensen, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 1542-1547.
- [103] J. Liu, J. Gao, A. Wang, *et al.*, *Mol Oncol* **2022**, *16*, 1761-1774.
- [104] K. McAulay, E. A. Hoyt, M. Thomas, *et al.*, *J Am Chem Soc* **2020**, *142*, 10358-10372.
- [105] J. Hardick, *Dissertation* **2021**, *Technische Universität Dortmund*.
- [106] H. Kaitsiotou, *Dissertation* **2018**, *Technische Universität Dortmund*.
- [107] T. Schulz, *Masterarbeit* **2021**, *Technische Universität Dortmund*.
- [108] S. D. Durbin, G. Feher, *Annu Rev Phys Chem* **1996**, *47*, 171-204.
- [109] G. T. Montelione, D. Zheng, Y. J. Huang, *et al.*, *Nat Struct Biol* **2000**, *7 Suppl*, 982-985.
- [110] D. Zheng, Y. J. Huang, H. N. Moseley, *et al.*, *Protein Sci* **2003**, *12*, 1232-1246.
- [111] W. A. Hendrickson, *Trends Biochem Sci* **2000**, *25*, 637-643.
- [112] E. Abbe, *Archiv für Mikroskopische Anatomie* **1873**, *9*, 413-468.
- [113] E. H. Stelzer, *Nature* **2002**, *417*, 806-807.
- [114] G. Rhodes, *Crystallography Made Crystal Clear, Vol. 3rd Edition*, **2006**.
- [115] E. Riedel, C. Janiak, *Anorganische Chemie*, **2010**.
- [116] A. McPherson, J. A. Gavira, *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **2014**, *70*, 2-20.
- [117] F. C. Frank, *Acta Crystallographica* **1965**, *18*, 862-866.
- [118] G. Taylor, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2003**, *59*, 1881-1890.
- [119] M. G. Rossmann, *Acta Crystallogr A* **1990**, *46 (Pt 2)*, 73-82.
- [120] L. Kröll, *Bachelorarbeit* **2020**, *Technische Universität Dortmund*.

-
- [121] I. Landel, *Dissertation* **2020**, Technische Universität Dortmund.
- [122] A. Teuber, *Masterarbeit* **2020**, Technische Universität Dortmund.
- [123] J. G. Kettle, R. Anjum, E. Barry, *et al.*, *J Med Chem* **2018**, *61*, 8797-8810.
- [124] M. A. Seeliger, M. Young, M. N. Henderson, *et al.*, *Protein Sci* **2005**, *14*, 3135-3139.
- [125] Y. H. Wang, M. K. Ayrapetov, X. Lin, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* **2006**, *346*, 606-611.
- [126] C. Zhang, P. N. Ibrahim, J. Zhang, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 5689-5694.
- [127] F. Schramm, *Masterarbeit* **2021**, Technische Universität Dortmund.
- [128] D. Busick, *Masterarbeit* **2022**, Technische Universität Dortmund.
- [129] H. V. Namboodiri, M. Bukhtiyarova, J. Ramcharan, *et al.*, *Biochemistry* **2010**, *49*, 3611-3618.
- [130] J. R. Simard, M. Getlik, C. Grutter, *et al.*, *J Am Chem Soc* **2009**, *131*, 13286-13296.
- [131] M. McTigue, B. W. Murray, J. H. Chen, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 18281-18289.
- [132] K. Okamoto, M. Ikemori-Kawada, A. Jestel, *et al.*, *ACS Med Chem Lett* **2015**, *6*, 89-94.
- [133] B. D. Smith, M. D. Kaufman, W. P. Lu, *et al.*, *Cancer Cell* **2019**, *35*, 738-751 e739.
- [134] A. Blum, D. Dorsch, N. Linde, *et al.*, *J Med Chem* **2023**, *66*, 2386-2395.
- [135] P. Gupta, G. N. Zhang, A. M. Barbuti, *et al.*, *Cancer Lett* **2020**, *472*, 132-141.
- [136] Y. Shen, X. Ren, K. Ding, *et al.*, *Oncotarget* **2014**, *5*, 10407-10420.
- [137] A. K. Kutach, A. G. Villasenor, D. Lam, *et al.*, *Chem Biol Drug Des* **2010**, *76*, 154-163.
- [138] C. Caglevic, M. Grassi, L. Raez, *et al.*, *Ther Adv Respir Dis* **2015**, *9*, 164-172.
- [139] A. K. Gardino, E. K. Evans, J. L. Kim, *et al.*, *Mol Cell Oncol* **2018**, *5*, e1435183.
- [140] J. A. Gilreath, L. Tchertanov, M. W. Deininger, *Clin Pharmacol* **2019**, *11*, 77-92.
- [141] B. Apsel Winger, W. A. Cortopassi, D. Garrido Ruiz, *et al.*, *Cancer Res* **2019**, *79*, 4283-4292.
- [142] M. C. Heinrich, D. Griffith, A. McKinley, *et al.*, *Clin Cancer Res* **2012**, *18*, 4375-4384.

-
- [143] S. Omura, Y. Iwai, A. Hirano, *et al.*, *J Antibiot (Tokyo)* **1977**, *30*, 275-282.
- [144] T. Tamaoki, H. Nomoto, I. Takahashi, *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun* **1986**, *135*, 397-402.
- [145] K. Mizuno, T. C. Saido, S. Ohno, *et al.*, *FEBS Lett* **1993**, *330*, 114-116.
- [146] J. Gotlib, H. C. Kluin-Nelemans, T. I. George, *et al.*, *N Engl J Med* **2016**, *374*, 2530-2541.
- [147] A. P. Garner, J. M. Gozgit, R. Anjum, *et al.*, *Clin Cancer Res* **2014**, *20*, 5745-5755.
- [148] H. Kadry, B. Noorani, L. Cucullo, *Fluids Barriers CNS* **2020**, *17*, 69.
- [149] W. M. Pardridge, *J Cereb Blood Flow Metab* **2012**, *32*, 1959-1972.
- [150] T. Taguchi, H. Sonobe, S. Toyonaga, *et al.*, *Lab Invest* **2002**, *82*, 663-665.
- [151] T. Mühlenberg, Y. Zhang, A. J. Wagner, *et al.*, *Cancer Res* **2009**, *69*, 6941-6950.
- [152] T. T. Wager, R. Y. Chandrasekaran, X. Hou, *et al.*, *ACS Chem Neurosci* **2010**, *1*, 420-434.
- [153] T. T. Wager, X. Hou, P. R. Verhoest, *et al.*, *ACS Chem Neurosci* **2010**, *1*, 435-449.
- [154] J. P. Courad, D. Besse, C. Delchambre, *et al.*, *Life Sci* **2001**, *69*, 1455-1464.
- [155] H. Yang, Q. Wang, W. F. Elmquist, *Pharm Res* **1996**, *13*, 1570-1575.
- [156] X. Sun, H. Gao, Y. Yang, *et al.*, *Signal Transduct Target Ther* **2019**, *4*, 64.
- [157] F. Sutanto, M. Konstantinidou, A. Domling, *RSC Med Chem* **2020**, *11*, 876-884.
- [158] S. Zinn, R. Vazquez-Lombardi, C. Zimmermann, *et al.*, *Nat Cancer* **2023**, *4*, 165-180.
- [159] I. J. Tickle, C. Flensburg, P. Keller, *et al.*, *Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.* **2018**.
- [160] R. J. Read, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2001**, *57*, 1373-1382.
- [161] P. Emsley, K. Cowtan, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2004**, *60*, 2126-2132.
- [162] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkoczi, *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2010**, *66*, 213-221.
- [163] O. S. Smart, T. O. Womack, C. Flensburg, *et al.*, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2012**, *68*, 368-380.
- [164] Schrödinger, LLC, **2015**.

5 Materialien & Methoden

5.1 Generelle Anmerkungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden Chemikalien und Reagenzien von folgenden Firmen bezogen: Carl Roth, Sigma-Aldrich (Teil von Merck), Thermo Fisher Scientific, SERVA, Fluka (Teil von Sigma-Aldrich), Merck Millipore, Invitrogen, Alfa Aesar, VWR, New England Biolabs, Bio-Rad, GE Healthcare, Pierce (Teil von Thermo Fisher Scientific), Novagen, Acros (Teil von Thermo Fisher Scientific) und Perkin Elmer bezogen. Chemikalien für die Proteinkristallisation wurden in kristallographischer Reinheit bezogen.

Zellkulturarbeiten mit Insektenzellen wurden unter aseptischen Bedingungen an Sicherheitswerkbänken der Klasse 2 durchgeführt, welche vor Beginn der Arbeiten inklusive aller für die Arbeiten verwendeten Geräte und Einmalartikel mit Bacillol® AF (BODE Chemie) sterilisiert wurde.

5.1.1 Verwendete Geräte

Bezeichnung	Artikel- und Herstellerangaben
Autoklav	VX-150, Systec GmbH
Echtzeit PCR-Zyklus	Lightcycler 480 Instrument II, Roche
FPLC System	Äkta pure™, GE Healthcare NGC Chromatography System®, Bio-Rad Laboratories
Fluoreszenz-Imager	Odyssey CLx Imaging System, LI-COR Biosciences
Gelelektrophoresesystem	Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, Hercules
HPLC-gekoppeltes Massenspektrometer	Dionex UltiMate 3000, HPG-3400SD Pump, WPS-3000TSL Autosampler, TCC-3000SD Column Compartment, DAD-3000 Diode Array Detector, Thermo Fisher Scientific, Velos Pro Dual Pressure Linear Ion Trap Mass Spectrometer, Thermo Fisher Scientific
Hochdruckhomogenisator	Microfluidizer M-110L Pneumatic, Microfluidics Corp.
Inkubatoren	MaxQ™ 8000, Thermo Fisher Scientific Minitron, Infors HAT Multitron Standard/Pro, Infors HT
Kristallplatten-Imager	Crystal Detect 2.1.5.9619, Formulatrix
Kugelmühle	Precellys Evolution, Bertin Technologies
Kühlzentrifuge	Sorvall Evolution RC, Thermo Fisher Scientific
Kühlzentrifugen-Rotoren	SA-600, SA-800, SLC-6000, FiberLite F8-6x1000y, Thermo Fisher Scientific
<i>Liquid-Handler</i>	ECHO 520, ECHO 650, LabCyte Inc.
Massenspektrometer	VelosPro, Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplatten <i>Dispenser</i>	MultiDrop™ Combi Reagent Dispenser, Thermo Fisher Scientific
Mikrotiterplatten <i>Reader</i>	EnVision 2104 Multilabel Plate Reader, PerkinElmer
Pipettierroboter	Mosquito® Crystal, TTP Labtech

Röntgengenerator	D8 Venture, Röntgenquelle: I μ S 3.0, Bruker, Detektor: Photon III, Bruker
Sterilbank	HERAsafe®, Thermo Fisher Scientific
Thermoblock	ThermoMixer C, Eppendorf
Thermocycler	Mastercycler® Pro, Eppendorf
UV/Vis-Spektrometer	NanoDrop One ^c , Thermo Scientific
Western Blotter	Pierce™ Power Station, Thermo Scientific
Zellzähler	Countess II, Life Technologies
Zentrifugen	5804R/5424/5424R, Eppendorf

5.1.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Artikel- und Herstellerangaben
Additiv <i>Screens</i>	OptiSalt, Hampton Research Silver-Bullet HR2-096, Hampton Research
Aufreinigungskits	<i>QIAprep</i> spin MiniPrep-Kit, Qiagen <i>QIAquick</i> PCR Purification Kit, Qiagen
Dialyseschlauch	Spectra/Por® MWCO 6-8 kDa, Spectrum Laboratories, Inc. Spectra/Por® MWCO 10-12 kDa, Spectrum Laboratories, Inc.
FPLC-Säulen	Ni-NTA Superflow Cartridge, Qiagen HisTrap crude Q FF, Cytiva HiLoad 16/600 Superdex 75 pg, Cytiva Superdex 10/300 75 pg Increase, Cytiva
Kristallisations- <i>Loops</i>	Mounted CryoLoops, Hampton Research
Kristallisationsplatten	EasyXtal 15-well Tool X-Seal, NeXtal Biotechnologies <i>Triple Sitting Drop</i> 96-well plate, TTP Labtech
Kristallisations- <i>Screens</i>	JCSG Core I-IV Suite, Qiagen PEG I-II Suite, Qiagen PACT Suite, Qiagen MemGold I, Molecular Dimensions
Mikrotiterplatten	<i>384-well Small Volume</i> ™ HiBase Mikroplatte, Greiner Bio-One <i>384-well polypropylene microplates</i> , 384PP, Labcyte Inc. <i>384-well low dead volume microplates</i> , 384LDV, Labcyte Inc.
Spritzenvorsatzfilter	Filtropur S, 0,45 μ m, Sarstedt Filtropur S, 0,2 μ m, Sarstedt
Western Blot-Membran	<i>PVDF-Membrane</i> Immobilon-FL S, 0,45 μ m, Merck Millipore
Zentrifugenfilter	Amicon® Ultra-15 MWCO 10000 Vivaspin 6/20 MWCO 10 kDa, Sartorius

5.1.3 Zelllinien & Bakterienstämme, Enzyme & Reagenzien

Bezeichnung	Herstellerangaben
<i>Escherichia coli</i> XL10Gold	Stratagene
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	Novagen, Merck Millipore
<i>Spodoptera frugiperda</i> Sf9	Gibco®, Thermo Fisher Scientific
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
OneTaq® Hot Start DNA Polymerase	New England Biolabs
Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs
Thrombin	SERVA
<i>PreScission</i> Protease	AG Rauh
KIT-wt	Proqinase
KIT-V559D/T670I	Proqinase
KIT-D816H	Proqinase
KIT-V559D/V654A	Proqinase
PDGFRA-wt	Proqinase
PDGFRA-G680R	SignalChem
PDGFRA-D842V	Invitrogen (Thermo Fisher Scientific)
VEGFR2-wt	Life technologies (Thermo Fisher Scientific)
<i>DpnI</i>	New England Biolabs
<i>Sall</i>	New England Biolabs
<i>NotI</i>	New England Biolabs
Pierce™ Protease Inhibitor Tablets, EDTA-free	Thermo Fisher Scientific
cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
Odyssey® Blocking Buffer, TBS	LI-COR
DPBS-Puffer	Gibco®, Thermo Fisher Scientific
HTRF® KinEASE™ TK HTRF Assay Kit	Cisbio, PerkinElmer
Trypan Blau, 0,4 %	Gibco®, Thermo Fisher Scientific
Cellfectin™ II Reagent	Gibco®, Thermo Fisher Scientific
Sf-900™ III SFM	Gibco®, Thermo Fisher Scientific
Deoxynucleotide Solution Set	New England Biolabs
PageRuler™ PreStained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific

5.1.4 Verwendete Gene & Plasmide

Die während dieser Arbeit verwendeten Plasmid- und Proteinkonstrukte basierten auf Konstrukten bereits publizierter Kristallstrukturen. Für Kristallisationsstudien von humanem KIT wurde Codon-optimierte DNA, die für die Reste 551-934 von humanem KIT (Uniprot-ID: P10721) kodiert, einschließlich eines N-terminalen His₆-Tags und einer Thrombin-Schnittstelle, zusammen mit der kodierenden Sequenz für die katalytische Domäne der Phosphatase YopH (Uniprot-ID: P15273, Aminosäure 164-468) in einen pCDFDuet-1-Expressionsvektor kloniert. Das Konstrukt basiert auf der veröffentlichten Kristallstruktur der KIT-Kinasedomäne (PDB-ID: 6GQK), einschließlich mehrerer Aminosäuresubstitutionen (I563S, V569S, Y609Q, L631S, M651E, I662H, D768H, R804N, V825D, C844S, H890S, H894Y, L912D, L923D) und einer Deletion der Kinase-Insertions-Schleife innerhalb der C-terminalen Subdomäne (Aminosäuren 688-765), die durch EFVPYKQVAPEDLYKDFLT ersetzt wurde. Die T670I-Mutation wurde durch ortsgerichtete Mutagenese (NEB) eingeführt. Für Kristallisationsstudien von humanem PDGFRA wurde Codon-optimierte DNA, die für die Reste 550-973 von menschlichem PDGFRA (Uniprot-ID: P16234) kodiert, einschließlich eines N-terminalen His₁₀-Tags und einer *PreScission*-Schnittstelle in einen pIEX/Bac-3-Expressionsvektor kloniert. Das Konstrukt basiert auf der veröffentlichten Kristallstruktur der PDGFRA-Kinasedomäne (PDB-ID: 5GRN), einschließlich einer Deletion der Kinase-Insertions-Schleife innerhalb der C-terminalen Subdomäne (Aminosäuren 697-768). Die T674I-Mutation wurde durch ortsgerichtete Mutagenese (NEB) eingeführt.

Tabelle 21: Auflistung der verwendeten Kinasedomänen einschließlich der Expressionssysteme und Antibiotikaresistenzen.

Expressionssystem	Plasmid	Gen	Antibiotikaresistenz
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	pCDFDuet-1	YopH + KIT-wt YopH + KIT-T670I	Streptomycin
Sf9	pIEX/Bac-3	PDGFRA-wt PDGFRA-T674I	Ampicillin

5.2 Molekularbiologische Methoden

5.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA erfolgt heutzutage mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: *polymerase chain reaction*). Dabei wird ein DNA-Templat mit Primern, dNTPs und einer geeigneten, hitzestabilen Polymerase in Mg^{2+} -haltigen Puffern amplifiziert. Die in dieser Arbeit durchgeführten ortsgerichteten Mutagenesen wurden nach einem adaptierten QuikChange™ II *Site-Directed Mutagenesis*-Protokoll (Stratagene) durchgeführt.

Tabelle 22: Zusammensetzung der PCR-Ansätze.

Komponente	Volumen / Menge
5x Phusion HF Buffer	4 μ L
dNTP-Mix (100 μ M)	0,4 μ L
Forward Primer (10 μ M)	0,4 μ L
Reverse Primer (10 μ M)	0,4 μ L
Templat-DNA	50 ng
DMSO	1,2 μ L
Phusion® DNA-Polymerase	0,2 μ L
ddH ₂ O	Auf 20 μ L

Tabelle 23: Temperatur- und Zyklusabfolge der Mutagenese-PCR.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	10 min	1
Denaturierung	95 °C	1 min	16
Hybridisierung	55-62 °C	1 min	
Elongation	72 °C	30 s / kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
--	4 °C	∞	--

Nach der PCR wurden die Ansätze mit 0,5 μ l *DpnI* 3 Stunden bei 37 °C zur Restriktion methylierter DNA inkubiert und anschließend mithilfe eines QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) den Herstellerangaben entsprechend gereinigt und mit sterilem ddH₂O eluiert. Die erhaltene DNA wurde dann wie in Kapitel 5.4.2.1 beschrieben in *E. coli* XL10Gold-Zellen transformiert.

5.3 Aktivitätsbasiertes Assaysystem (KinEASE™)

5.3.1 HTRF® TK-KinEASE Assay-Beschreibung

Die Etablierung der HTRF®-Assaysysteme erfolgte nach Anweisung des Herstellers Cisbio (Codolet, FR) und beinhaltet folgende Schritte: SEB-Titration, Enzym-Titration, Enzymkinetik, Substrat- und ATP-Titration und die Optimierung des Biotin-Streptavidin-Verhältnisses. Sowohl die Etablierungsschritte als auch die Erhebung der Daten erfolgte in weißen *384 well* Mikrotiterplatten mit je 25 µL Fassungsvermögen (Greiner BioOne GmbH). Der Transfer der Flüssigkeiten erfolgte mithilfe eines MultiDrop™ Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific). Der Transfer von in DMSO gelösten Liganden erfolgte mittels des ECHO 520 bzw. ECHO 650 *Liquid Handlers* (Labcyte Inc.). Ausgelesen wurden die Daten mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät EnVision 2104 (PerkinElmer). Da während erster Etablierungsversuche eine geringe Kinaseaktivität beobachtet wurde, wurde von einer SEB-Titration abgesehen und jedem Reaktionspuffer 50 nM SEB direkt zugesetzt. Die visuellen Darstellungen sind im Anhang 6.1 zu finden, da für ausgewählte Kinasen einzelne Schritte aufgrund nicht zufriedenstellender Ergebnisse wiederholt werden mussten. Prinzipiell erfolgte sowohl die Assay-Etablierung als auch die anschließende Determination von IC₅₀-Werten in festgelegten Puffersystemen (Tabelle 24).

Tabelle 24: Zusammensetzung des Reaktions- und Detektionspuffer, welche im HTRF-Assay für Kinase-, Substrat-, ATP- und Fluorophor-Lösung genutzt werden.

Reaktionspuffer	5 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 0,0001 % TritonX, 50 mM HEPES (pH 7,0), 40 mM Na ₃ VO ₄ , 0,02 % NaN ₃ , 0,01 % BSA
Detektionspuffer	25 mM HEPES (pH 7,0), 0,05 % BSA, 0,4 M KF, 10 mM EDTA

Für die Bestimmung der IC₅₀-Werte unterschiedlicher Liganden wurden prinzipiell, wenn nicht anders angegeben, drei unabhängige Messungen in Duplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung angegeben. Die Auswertung erfolgte mit der Quattro Software Suite 11.2.0.3 (Quattro Research GmbH). Hierfür wurden die Kinasen (5 µL) vor Zugabe der Startlösung (2,5 µL) für 30 min mit den zu untersuchenden Inhibitoren (2,5 µL) in acht Konzentrationen und Duplikaten inkubiert. Die Startlösung beinhaltet hier die in der Etablierung ermittelten Substrat- und ATP-Konzentrationen. Nach der in der Enzymkinetik ermittelten Reaktionszeit wurden die Reaktionen durch Zugabe der Stopplösung (10 µL) gestoppt und 60 min vor dem Auslesen inkubiert.

5.3.2 Etablierung des HTRF® TK-KinEASE Systems

5.3.2.1 Enzymtitration & Enzymkinetik

Da von einer SEB-Titration abgesehen wurde, wurde als erster Schritt eine Enzymtitration durchgeführt, um herauszufinden, wann das Signal 80 % des Maximums erreicht. Bei diesem Schritt werden sättigende Konzentrationen des Substrats (1 μM) sowie ATP (100 μM) eingesetzt. Die Kinase wurde ausgehend von 100 ng/*well* jeweils in sieben Schritten vierfach verdünnt, wobei für jede Konzentration vier Datenpunkte aufgenommen wurden. Durch Zugabe der Substrat-ATP-Lösung (2,5 $\mu\text{L}/\text{well}$) wurde die Reaktion gestartet und für 30 min inkubiert, bevor Stopp-Lösung (10 $\mu\text{L}/\text{well}$), welche Biotin und Streptavidin enthält, mit einem Verhältnis von 8:1 (Substrat:Fluorophor) zum Stoppen der Reaktion hinzugegeben wurde. Die erhaltenen Daten wurden graphisch gegen die logarithmierten Werte der Kinasmengen aufgetragen und resultierten in einem sigmoidalen Verlauf, aus dessen linearem Steigungsbereich die optimale Proteinkonzentration bei 80 % des Maximalquotienten ermittelt werden konnte (Abbildung 70). Die Ermittlung der Enzymkinetik hängt von der Kinase- und der Substratkonzentration ab und die Messungen wurden jeweils drei Mal durchgeführt. Hierbei wurden Zeitverlaufsstudien mit konstanter Kinase-, Substrat- und ATP-Konzentration durchgeführt, wobei die Kinasekonzentration derjenigen aus der Kinasetitration ermittelten Konzentration entspricht. Ebenfalls wurden hier die Substrat- und ATP-Konzentrationen (1 μM bzw. 100 μM) aus dem ersten Schritt verwendet, wobei die Reaktionen jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 1-120 min gestoppt wurden. Die ausgelesenen Signale wurden dann gegen die Zeit aufgetragen und aus dem linearen Bereich (Korrelationskoeffizient $R^2 > 0,99$) der Mittelwerte wurden dann die optimalen Inkubationszeiten für folgende Experimente ermittelt (Abbildung 70).

5.3.2.2 Substrat- & ATP- K_M

Für die Ermittlung der Substrat- K_M wurde die zuvor ermittelte optimale Enzymkonzentration und sättigende ATP-Konzentrationen (100 μM) verwendet. Die Substratkonzentration wurde ausgehend von 2 μM in einer Verdünnungsreihe (12 Datenpunkte in Duplikaten) in Zweifachverdünnungen ermittelt. Da das Verhältnis von Substrat zum verwendeten Fluorophor stets 8:1 bleiben sollte, musste an dieser Stelle ebenfalls eine Verdünnungsreihe des Fluorophors erstellt werden. Durch Erhöhung der XL665-Konzentration kann ebenfalls das Hintergrundsignal der Messung ansteigen, weshalb zusätzlich für jede XL665-Konzentration eine Negativkontrolle ohne Enzym pipettiert wurde. Die Datenpunkte dieser Vergleichsmessung wurden für anschließende Berechnungen von den Datenpunkten mit

Kinase subtrahiert. Gestoppt wurden die Reaktionen nach den in der Enzymkinetik ermittelten, optimalen Zeitpunkten jeder Kinase.

Die Ermittlung der ATP- K_M wurde analog zu der des Substrates durchgeführt, wobei hier jedoch die ATP-Konzentration ausgehend von 900 μM in Dreifach-Verdünnungsschritten mit je vier Datenpunkten pro ATP-Konzentration variiert und die Substratkonzentration (1 μM) konstant gehalten wurde. Für den Detektionsschritt wurde hier die Konzentration des Fluorophors (62,5 nM) ebenfalls konstant gehalten. Die Ermittlung der Substrat- und ATP- K_M -Werte erfolgte für jede Kinase in drei unabhängigen Messungen. Die erhaltenen Signale wurden dann gegen die Substrat- bzw. die ATP-Konzentration aufgetragen und mittels Michaelis-Menten-Gleichung gefittet, um die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit K_M jeder Kinase hinsichtlich Substrat und ATP zu bestimmen (Abbildung 71, Abbildung 72, Abbildung 73).

5.3.2.3 Optimierung des Biotin-Streptavidin-Verhältnisses

Eine Optimierung des Biotin-Streptavidin-Verhältnisses wurde durchgeführt, um eine mögliche Erhöhung des Signals zu erhalten. Durchgeführt wird diese Optimierung mit den idealen Enzym-, Substrat- und ATP-Konzentrationen, welche in den vorherigen Schritten ermittelt wurden. Es wurden je eine Negativkontrolle ohne Enzym, als auch folgende Biotin-Streptavidin-Verhältnisse verwendet: 2:1, 4:1 und 8:1. Für jedes Substrat-Fluorophor-Verhältnis wurden in je einer Einzelmessung Quadruplikate aufgenommen, die Mittelwerte aus den Enzym- und den Hintergrundmessungen wurden ermittelt und ein Quotient wurde gebildet. Daraus ergab sich dementsprechend das Verhältnis zwischen Reaktion und Hintergrund, woraus dann das optimale Verhältnis von Substrat und Fluorophor ermittelt werden konnte.

5.4 Zellkultur

5.4.1 Zellkultur der PDGFRA-Produkte in Sf9-Insektenzellen

5.4.1.1 Kultivierung der Sf9-Insektenzellen

Für die heterologe Expression der PDGFRA-Zielproteine wurden Sf9-Insektenzellen verwendet. Diese wurden für die einfache Passagierung bei einer Zelldichte von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/mL in SF900™ III SFM-Medium (Gibco®, Thermo Fisher Scientific) bei 27 °C und 120 rpm für drei bis vier Tage inkubiert, bevor sie erneut in frischem Medium auf die Zelldichte verdünnt wurden.

5.4.1.2 Transfektion von Sf9-Zellen mithilfe des *flashBAC*-Systems

Für die Transfektion von Insektenzellen und zur Generierung von Baculoviren wurden die von Thermo Fisher Scientific sowie Oxford Expression Technologies Ltd. zur Verfügung gestellten Protokolle verwendet und für die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte angepasst und optimiert, insofern nötig.

5.4.1.2.1 Vorbereitung der Sf9-Zellen

Für die Vorbereitung auf eine Transfektion sollten die Sf9-Insektenzellen eine Viabilität > 95 % und eine Zelldichte von $1,5 \cdot 10^6$ – $2,0 \cdot 10^6$ Zellen/mL aufweisen. Dann wurden die Zellen mit Grace's Medium (Thermo Fisher Scientific) auf eine Zelldichte von $0,6 \cdot 10^6$ Zellen/mL verdünnt und die optische Dichte erneut kontrolliert. Auf einer 24-*well* Platte wurden je *well* 400 µL der Zellsuspension ausgesät und die Zellen durch Schwenken in den *wells* verteilt. Durch Inkubation bei 27 °C für eine Stunde in einer Feuchtekammer können die Zellen an der Oberfläche der Platte anhaften.

5.4.1.2.2 Vorbereitung des Transfektions-*Master-Mixes*

Je Transfektionsansatz wurden 200 µL Grace's Medium mit 2 µL Cellfectin versetzt und vorsichtig gemischt. Daraufhin wurden entsprechend der Gesamtanzahl der Ansätze je 20 ng *flashBAC*-DNA hinzugefügt und erneut vorsichtig gemischt. Je 203 µL des Mixes wurden in sterile 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt und je 100 ng Transfer-Vektor hinzugefügt. Dieser Mix wurde dann bei Raumtemperatur für 20–30 min inkubiert. Währenddessen wurde das Medium von den Zellen entfernt und *well* für *well* mit 200 µL frischem Grace's Medium gewaschen.

5.4.1.2.3 Transfektion der Sf9-Insektenzellen

Nachdem die Zellen für die Transfektion vorbereitet wurden, wurde das restliche Medium abgenommen und der Transfektions-*Master-Mix* tropfenweise in die *wells* mit den Insektenzellen pipettiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zellen nicht austrocknen. Dann wurde bei 27 °C über Nacht in einer Feuchtekammer inkubiert und anschließend 200 µL Sf900™ III SFM-Medium hinzugefügt. Daraufhin folgte eine weitere Inkubation bei 27 °C über sieben Tage in einer Feuchtekammer.

5.4.1.3 Virusamplifikation

5.4.1.3.1 P1-Virus ernten

Nach der in Kapitel 5.4.1.2.3 durchgeführten Transfektion der Sf9-Insektenzellen wurde nach fünf Tagen auf Anzeichen einer Infektion der Zellen getestet. Nach sieben Tagen wurden die Zellen in sterile 1,5 mL-Reaktionsgefäße überführt.

5.4.1.3.2 P1 -> P2-Virusamplifikation

Für die Amplifikation des P1-Virus wurden 4 mL Sf9-Insektenzellen mit einer Zelldichte von $0,5 \cdot 10^6$ Zellen/mL in einer 6 mm Petrischale ausgesät und mit 400 µL P1-Virus versetzt. Die Zellen wurden bei 27 °C für vier Tage in einer Feuchtekammer inkubiert und jeden Tag auf Infektion hin untersucht. Die P2-Viren wurden bei 4 °C und 3000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig in ein 5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Für die Lagerung bei 6 °C wurde jedem Ansatz 2 % FBS hinzugefügt.

5.4.1.3.3 P2 -> P3-Virusamplifikation

Für die Amplifikation des P2-Virus wurden die Sf9-Insektenzellen auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/mL verdünnt. Der Ansatz wurde je 50 mL Zellen mit 40 µL P2-Virus versetzt und bei 27 °C und 120 rpm inkubiert. Daraufhin wurde jeden Tag die Zellviabilität kontrolliert, maximal jedoch über sieben Tage. Bei einer Viabilität von 70-80 % wurden die Zellen in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4 °C und 4500 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde durch einen 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter (Sarstedt) steril filtriert und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Der so erhaltene P3-Virus wurde bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung dunkel gelagert.

5.4.1.4 Testexpression in Sf9-Zellen

Um die Proteinexpression und die Inkubationsdauer in kleinem Maßstab zu testen, wurden Testexpressionen durchgeführt. Dafür wurden 50 mL Sf9-Zellen mit einer Zelldichte von $3 \cdot 10^6$ Zellen/mL mit 1,7 mL P3-Virus versetzt und über fünf Tage bei 27 °C und 120 rpm inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ebenfalls eine Kultur ohne P3-Virus angesetzt.

Zur Überprüfung der Proteinexpression wurden jeweils nach 24 Stunden je 5 mL der Kultur entnommen und 5 min bei 4 °C und 4500 g zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 1 mL Lysepuffer resuspendiert und ein Zellaufschluss mittels Kugelmühle durchgeführt. Die erhaltenen Proben wurden erneut 10 min bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert und Proben von Pellet und Überstand zur Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese entnommen.

PDGFRA	Lysepuffer	20 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Imidazol, 1 mM TCEP, Protease-Inhibitor-Cocktail.
KIT	Lysepuffer	40 mM HEPES (pH 8,0), 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 % Glycerol, 1 mM TCEP, Protease-Inhibitor-Cocktail.

5.4.1.5 Heterologe Expression in Sf9-Zellen im präparativen Maßstab

Für die heterologe Expression der PDGFRA-Zielproteine wurden jeweils 1,5 L Sf9-Zellen bei einer optischen Dichte $OD = 3,0 \cdot 10^6$ Zellen/mL mit 50 mL P3-Virus des jeweiligen Genkonstrukts versetzt und bei 27 °C und 120 rpm für drei Tage inkubiert. Nach Beendigung der Expression wurden die Zellen bei 4 °C und 2000 g für 20 min zentrifugiert, das Pellet anschließend in PBS-Puffer resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde erneut bei 4 °C und 4500 g für 10 min zentrifugiert, der Überstand des PBS-Puffers wurde dekantiert und das verbliebene Zellpellet in flüssigem Stickstoff für die anschließende Lagerung bei -80 °C kryokonserviert.

PBS-Puffer	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 (pH 7,4).
-------------------	--

5.4.2 Mikrobiologische Arbeiten für die Expression in *E. coli*-Zellen

5.4.2.1 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen durch Hitzeschock

Für die Amplifikation der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden *E. coli* XL10Gold-Zellen verwendet, während für die heterologe Expression der KIT-Zielproteine *E. coli* BL21(DE3) - Zellen verwendet wurden. Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* XL10Gold- oder BL21(DE3)-Zellen wurden je 50 µL der kryokonservierten Zellen auf Eis aufgetaut und mit je 1 µL der gewünschten DNA versetzt. Dieser Ansatz wurde 15 – 30 min auf Eis inkubiert, bevor die Zellsuspension einem einminütigem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt wurde. Daraufhin wurden die Zellen erneut 2 min auf Eis gelagert, um anschließend nach Zugabe von 800 µL SOC-Medium bei 37 °C und 900 rpm für drei Stunden inkubiert zu werden. Nach der Inkubation wurden die Zellen 5 min bei 2000 g pelletiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Zellen in 100 µL frischem Medium resuspendiert und auf einer Antibiotika-haltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

5.4.2.2 Übernachtskulturen und Plasmid-Isolierung

Für Übernachtskulturen zur Plasmidamplifikation wurden 5 mL LB-Medium mit der entsprechenden Menge Antibiotikum (Streptomycin/Ampicillin: 100 µg/mL) versetzt und je eine Kolonie der auf den in Abschnitt 5.4.2.1 generierten LB-Agarplatten in das Medium überführt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Für die Plasmidisolierung wurde das *QIAprep spin* MiniPrep-Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. Zur Überprüfung der Identität der Plasmide wurden Sequenzierungsansätze nach Anleitung des Herstellers (Eurofins Genomics) pipettiert und weggeschickt. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit dem Programm *SnapGene*® 4.3.11 (Dotmatics) analysiert.

5.4.2.3 Testexpression in *E. coli* BL21(DE3)

Für Testexpressionen in *E. coli* BL21 (DE3) wurde eine LB-Agarplatte, wie in Abschnitt 5.4.2.1 beschrieben, angefertigt und eine Übernachtskultur (Abschnitt 5.4.2.2) angesetzt. Hier wurde diesmal jedoch nur eine Kolonie der LB-Agarplatte in Medium überführt. Am nächsten Tag wurden 50 mL TB-Medium mit 1 mL Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte $OD_{600} = 0,6$ bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Nach Erreichen der optischen Dichte wurde die Kultur auf ca. 16 °C gekühlt, die Expression des Zielproteins mit 0,4 mM IPTG induziert und über Nacht bei 18 °C und 120 rpm geschüttelt. Jeweils vor und nach Induktion wurde je 1 mL der Kultur für die Analyse mittels SDS-PAGE entnommen. Die Probe vor der Induktion wurde in 150 µL PBS-Puffer resuspendiert, 75 µL entnommen und mit 25 µL vierfach SDS-Probenpuffer versetzt. Die Probe nach der Induktion wurde in 1 mL PBS-Puffer

resuspendiert und ebenfalls 75 μ L entnommen und mit 25 μ L vierfach SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden bei 95 °C für 10 min denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gefroren.

5.4.2.4 Heterologe Expression in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen im präparativem Maßstab

Für die heterologe Expression der KIT-Zielproteine im präparativen Maßstab wurden *E. coli* BL21(DE3) wie in Abschnitt 5.4.2.1 transformiert, auf einer Streptomycin-haltigen LB-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 295 mL TB-Medium mit Phosphatpuffer und Antibiotikum in einem Erlenmeyerkolben vorgelegt. Die LB-Agarplatte wurde mit 5 mL TB-Medium abgewaschen und die Zellsuspension in den Erlenmeyerkolben überführt. Das Zielvolumen von insgesamt 300 mL wurde gewählt, damit von der LB-Agarplatte eine möglichst homogene Zellsuspension erhalten, die Zelldichte bei der anschließenden Inkubation über Nacht bei 37 °C und 120 rpm nicht zu stark ansteigt. Am nächsten Tag wurden jeweils 2,5 L TB-Medium mit Phosphatpuffer und Antibiotikum mit 10 mL Vorkultur versetzt und bei 37 °C und 120 rpm so lange inkubiert, bis eine optische Dichte von $OD_{600} = 0,6$ erhalten wurde. Vor der Induktion mit 0,4 mM IPTG wurden die Kolben auf ~20 °C heruntergekühlt und eine Probe für die Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese entnommen. Nach IPTG-Zugabe wurde über Nacht bei 18 °C und 120 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine weitere Probe zur Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese entnommen, die Zellen bei 4 °C, 3000 g und 20 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde anschließend in flüssigem Stickstoff kryokonserviert und bei -80 °C gelagert. Die entnommenen Proben vor und nach der Induktion zur Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese wurden jeweils 5 min bei 3000 g pelletiert und der Überstand abdekantiert. Die Probe vor der Induktion wurde in 150 μ L PBS-Puffer resuspendiert, 75 μ L entnommen und mit 25 μ L vierfach SDS-Probenpuffer versetzt.

Die Probe nach der Induktion wurde in 1 mL PBS-Puffer resuspendiert und ebenfalls 75 μ L entnommen und mit 25 μ L vierfach SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden bei 95 °C für 10 min denaturiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gefroren.

5.5 Proteinreinigung der KIT- und PDGFRA-Proteine

5.5.1 Zellyse

Für den Zellaufschluss wurde das Sf9-Zellpellet (PDGFRA) bzw. das *E. coli* BL21(DE3)-Zellpellet (KIT) zunächst in 4 mL Lysepuffer je Gramm Zellpellet vollständig resuspendiert und mit einer Protease-Inhibitor-Tablette (Roche) bei 4 °C inkubiert. Dann wurde ein Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisator durchgeführt und für 30–45 min mit 1 % (w/v) CHAPS für eine erhöhte Löslichkeit der Zielproteine inkubiert. Durch Zentrifugation für eine Stunde bei 4 °C und 75000 g wurden die löslichen von den unlöslichen Bestandteilen abgetrennt und der Überstand durch 0,45 µm Spritzenvorsatzfilter steril filtriert. Für die spätere Analyse mittels SDS-PAGE wurden Proben aus dem Überstand (50 µL H₂O, 25 µL Überstand, 25 µL Probenpuffer) und von den unlöslichen Bestandteilen (Pellet in H₂O resuspendiert, 30 µL resuspendiertes Pellet, 10 µL Probenpuffer) entnommen.

PDGFRA	Lysepuffer	20 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Imidazol, 1 mM TCEP, Protease-Inhibitor-Cocktail.
KIT	Lysepuffer	40 mM HEPES (pH 8,0), 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 % Glycerol, 1 mM TCEP Protease-Inhibitor-Cocktail.

5.5.2 Nickel-Affinitätschromatographie, Dialyse und Protease-Verdau

Als erster Reinigungsschritt wurde eine Ni-Affinitätschromatographie (HisTrap crude Q FF 5 mL, Cytiva bzw. Ni-NTA Superflow Cartridge 5 mL, Qiagen) durchgeführt, da die Zielproteine über einen N-terminalen His₁₀-Tag (PDGFRA) bzw. über einen His₆-Tag (KIT) verfügten. Um die Säule vorzubereiten, wurde diese mit ddH₂O, 0,5 M NaOH-Lösung und erneut ddH₂O gewaschen, dabei wurden sowohl auf die Stabilität des UV-Signal als auch der Leitfähigkeit geachtet. Dann wurde die Säule mit Waschpuffer äquilibriert und die löslichen Bestandteile des Zellysats mit einer Flussrate von 2 mL/min auf die Säule aufgetragen. Nach Beladen der Säule wurde diese so lange mit Waschpuffer gewaschen, bis ein konstantes UV-Signal beobachtet werden konnte. Zur Elution der Zielproteine wurde ein Gradient von 0–250 mM Imidazol über 30 min und einer Flussrate von 2 mL/min eingestellt und die Fraktionen gesammelt. Anschließend wurde noch eine Schlagelution mit 500 mM Imidazol durchgeführt, um auf der Säule verbliebene Proteine ebenfalls zu eluieren. Von den gesammelten Fraktionen wurden Proben für die Analyse mittels SDS-PAGE entnommen. Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, mit 0,03 mg *PreScission*-Protease je 1 mg Zielprotein (1:30, PDGFRA) bzw. mit 1 U Thrombin pro 100 µg Zielprotein versetzt und über Nacht dialysiert. Dies sollte zur proteolytischen Abtrennung des Affinitäts-Tags und zum Pufferaustausch dienen.

PDGFRA	Waschpuffer	20 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Imidazol, 1 mM TCEP.
	Elutionspuffer	20 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 500 mM Imidazol, 1 mM TCEP.
	Dialysepuffer	20 mM Tris (pH 8,0), 50 mM NaCl, 1 % Glycerol, 1 mM TCEP.
KIT	Waschpuffer	40 mM HEPES (pH 8,0), 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 % Glycerol, 1 mM TCEP.
	Elutionspuffer	40 mM HEPES (pH 8,0), 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10 % Glycerol, 1 mM TCEP.
	Dialysepuffer	40 mM HEPES (pH 8,0), 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10 % Glycerol, 0,5 mM TCEP.

5.5.3 Reverse Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Nach der Dialyse wurde die Proteinlösung 10 min bei 4 °C und 4500 g zentrifugiert, um möglicherweise ausgefallenes Protein aus der Lösung zu entfernen. Dann wurde eine reverse Ni-Affinitätschromatographie durchgeführt, um geschnittenes Protein von ungeschnittenem Protein abzutrennen. Dafür wurde die Säule erneut wie in Abschnitt 5.5.2 vorbereitet und mit der Proteinlösung beladen und Fraktionen des Zielproteins gesammelt. Zur Entfernung von an der Säule verbliebenen Proteinen wurde eine Schlagelution mit 500 mM Imidazol durchgeführt. Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert, vereinigt und anschließend mit einem Zentrifugalkonzentrator (MWCO 10 kDa, Vivaspin, Sartorius) auf eine maximale Proteinkonzentration von 20 mg/mL konzentriert.

PDGFRA	Waschpuffer	20 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM Imidazol, 1 mM TCEP.
	Elutionspuffer	20 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 500 mM Imidazol, 1 mM TCEP.
KIT	Waschpuffer	40 mM HEPES (pH 8,0), 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10 % Glycerol, 1 mM TCEP.
	Elutionspuffer	40 mM HEPES (pH 8,0), 300 mM NaCl, 500 mM Imidazol, 10 % Glycerol, 1 mM TCEP.

5.5.4 Größenausschluss-Chromatographie

Als weiterer Reinigungsschritt und zur Entfernung von Oligomeren aus der Proteinlösung wurde eine SEC (HiLoad 16/600 75 µg, Cytiva) durchgeführt. Dafür wurde die aus der reversen Ni-Affinitätschromatographie erhaltene Proteinlösung 10 min bei 4 °C und 21160 g zentrifugiert und der erhaltene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Proteinlösung auf die mit SEC-Puffer äquilibrierte SEC-Säule mit einer Flussrate von 1 mL/min aufgetragen. Eine Analyse erfolgte erneut mittels SDS-PAGE. Die das Zielprotein enthaltenden Fraktionen wurden mit einem Zentrifugalkonzentrator auf eine maximale Konzentration von 10 mg/mL konzentriert und entweder unmittelbar für Folgeexperimente genutzt oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

PDGFRA	SEC-Puffer	20 mM Tris (pH 8,0), 150 mM NaCl, 1 % Glycerol, 1 mM TCEP.
KIT	SEC-Puffer	20 mM Tris (pH 8,0), 200 mM NaCl, 1 mM TCEP.

5.6 Analysemethoden

5.6.1 Natrium-Dodecylsulfat (SDS-)-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Überprüfung der Reinigungsschritte der Zielproteine wurde eine Natrium-Dodecylsulfat (SDS, engl.: *sodium dodecyl sulfate*) - Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) durchgeführt. Dafür wurden, wenn nicht anders angegeben, je 30 μ L Probe mit 10 μ L 4x Probenpuffer versetzt. Die Trennung der Proteine erfolgte in 12 %-igen Gelen über 40 min bei einer konstanten Stromstärke $I = 40$ mA pro Gel. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung gefärbt. Als Größenstandard diente der PageRuler™ Prestained (Thermo Scientific).

SDS-Probenpuffer (4x)	100 mM Tris (pH 6,8), 200 mM DTT, 1 M β -Mercaptoethanol.
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris (pH 8,5), 200 mM Glycerol, 3,5 mM SDS.
Coomassie-Färbelösung	4 % (w/v) SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerol, 0,2 % Coomassie Brilliant R-250, 10 % Essigsäure, 40 % Ethanol.

5.6.2 Western Blot

Um einen spezifischen Nachweis der Zielproteine zu ermöglichen, wurden je von der ersten und zweiten Ni-Affinitätschromatographie Western Blots mit einem Fluorophor-gekoppelten anti-His₆-Antikörper durchgeführt. Dafür wurden zunächst SDS-Gele wie in Abschnitt 5.6.1 beschrieben erstellt, welche jedoch statt gefärbt zu werden, mithilfe des Pierce™ Power Blotters (Thermo Fisher Scientific) auf Immobilon-FL PVDF-Membranen (Merck-Millipore) transferiert wurden. Dieser Transfer erfolgte mit dem Pierce™ 1-Step Transfer Buffer (Thermo Fisher Scientific) im *semi-dry*-Verfahren, bevor nach dem Transfer jede Membran für 5 min mit ddH₂O gewaschen wurde. Anschließend wurden die Membranen zur Blockierung freier Bindungsstellen mit 10 mL Odyssey® Blocking Buffer (LI-COR) für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden die Membranen drei Mal für je 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen, bevor sie über Nacht mit 5 mL des Antikörpers (1:10000) bei 4 °C unter Schütteln inkubiert wurden. Am folgenden Tag wurden die Membranen erneut drei Mal für je 5 min mit TBS-T-Puffer gewaschen. Die Fluoreszenz des Fluorophor-gekoppelten Antikörpers wurde mit einem Odyssey® CLx Imaging System (LI-COR) detektiert und die erhaltenen Aufnahmen mit der Software Image Studio Lite (LI-COR) bearbeitet und ausgewertet.

TBS-T-Puffer	50 mM Tris (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20.
---------------------	--

5.6.3 Thermal Shift Assay (TSA)

Da im Zuge dieser Arbeit KIT-T670I exprimiert und gereinigt wurde, für welches in der Literatur keine Reinigungs- und Kristallisationsprotokolle beschrieben waren, wurde nach der ersten Proteinreinigung ein *Thermal Shift Assay* zur Evaluierung der Proteinstabilität und -löslichkeit durchgeführt. Hierfür wurde der *Solubility & Stability Screen 2* (Hampton Research) genutzt, in welchem pH-Werte von 4,0–9,5 und Natriumchlorid-Konzentrationen von 0–1 M variiert werden. Für die Durchführung des Assays wurden je 2 µL Protein mit einer Konzentration von 1 mg/mL mit 11 µL ddH₂O und 5 µL *Screening*-Bedingung in einer thermostabilen 384er-qPCR-Platte (Brand) gemischt. Zuletzt wurden 2 µL 50x Sypro Orange hinzugefügt und für eine Minute bei 500 rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Assay wurde in einem CFX384 System (BioRad Inc.) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mittels Microsoft Excel und Origin 2021.

5.6.4 Massenspektrometrische (MS) Analysen

Für die massenspektrometrische Verfolgung der Bindungsbildung kovalenter Moleküle an Cys788/809 in KIT oder Cys814/835 in PDGFRA wurden die Proteine aus einem 10 mg/mL-Stock mit jeweiligem Puffer unterschiedlicher pH-Werte (7,5-10,0) auf 0,5 mg/mL verdünnt. Hierfür wurden die jeweiligen SEC-Puffer genutzt, wobei für die pH-Werte 7,5-8,5 Tris und für die pH-Werte 9,0-10,0 CHES als Puffersubstanzen verwendet wurden. Dann wurden jeweils 5–10-fache Überschüsse der Inhibitoren hinzugefügt und bis zu 24 Stunden inkubiert. Vor den massenspektrometrischen Messungen wurden die Proben 10 min bei 4 °C und 21160 g zentrifugiert und in ein für die Messungen vorgesehenes Gefäß überführt.

PDGFRA	MS-Puffer	20 mM Puffersubstanz (pH 7,5-10,0), 150 mM NaCl, 1 % Glycerol, 1 mM TCEP.
KIT	MS-Puffer	20 mM Puffersubstanz (pH 7,5-10,0), 200 mM NaCl, 1 mM TCEP.

5.7 Proteinkristallisation

5.7.1 Probenvorbereitung

Für die Kristallisation wurde Protein unmittelbar nach dem letzten Reinigungsschritt genutzt oder zuvor gereinigtes und kryo-konserviertes Protein verwendet. Zur Abtrennung denaturierter oder oligomerisierter Proteine wurde nach dem Auftauen der PDGFRA-Zielproteine zusätzlich eine SEC (Superdex 10/300 Increase 75 pg, Cytiva) durchgeführt. Für die Co-Kristallisation wurden die Proteine auf unterschiedliche Konzentrationen von 3–10 mg/mL konzentriert und mit einem dreifachem Ligandenüberschuss für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proteine 10 min bei 4 °C und 21160 g zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

5.7.2 *Screening*-Experimente

Um potenzielle Kristallisationsbedingungen für die unterschiedlichen Zielproteine zu identifizieren, wurden kommerzielle *Screening*-Experimente (Tabelle 25) mit den wie in Schritt 5.7.1 vorbereiteten Proteinen bei 4 °C oder 20 °C durchgeführt. Dafür wurden 96 well TTP Labtech IQ Platten (TTP Labtech) oder MRC3-well *Crystallisation Plates* (Jena Biosciences) für die *sitting drop*-Methode verwendet. In den Vertiefungen der Platten wurden je 70 µL Reservoir des jeweiligen *Screens* vorgelegt und daraufhin je 0,1 µL Reservoir mit 0,1 µL Proteinlösung mithilfe eines Pipettierroboters Mosquito® Crystal (TTP Labtech) gemischt. Um ein schnelles Austrocknen der Tropfen zu verhindern, erfolgte der Pipettiervorgang des Roboters in einem Milieu mit hoher Luftfeuchtigkeit. Die *Screening*-Platten wurden anschließend luftdicht mit durchsichtiger Folie verschlossen und regelmäßig mithilfe eines Kristallplatten-*Imagers* (Crystal Detect 2.1.5.9619, Formulatrix) über 21 Tage auf Kristallwachstum geprüft.

Tabelle 25: Kommerzielle Kristallisations-*Screens* zur Durchmusterung geeigneter Kristallisationsbedingungen im Hochdurchsatz.

Screen	JCSG Core Suite I-IV	PACT Suite	PEG Suite I/II	Classics I/II	MemGold™
Hersteller	NeXtal Biotech			Molecular Dimensions	

5.7.3 Kristallisations-*Fine Screens*

Für die Optimierung der sowohl in kommerziellen *Screens* gefundenen, als auch der bereits publizierten Kristallisationsbedingungen wurden *Fine Screens* in *15 well*-Kristallisationsplatten (EasyXtal *15-well* Tools XSeal, NeXtal Biotech) durchgeführt. Dafür wurden in jede Vertiefung 500 μL Reservoir vorgelegt. Anschließend wurde je 1 μL Reservoir mit je 1 μL der in Schritt 5.7.1 vorbereiteten Proteinlösung auf einem Kristallisationsdeckel für die *hanging drop*-Methode vereinigt und luftdicht auf das zugehörige *well* geschraubt. Die Inkubation der Kristallisationsansätze erfolgte bei 12, 18 oder 20 °C. Das Kristallwachstum wurde in regelmäßigen Abständen lichtmikroskopisch verfolgt.

5.7.4 Additiv-*Screen* für die Kristallisationsbedingungen von KIT-wt

Zur weiteren Optimierung der reproduzierten Kristallisationsbedingungen aus kommerziellen *Screens* und der Literatur, wurden Additiv-*Screens* genutzt. Dafür wurden in *96 well*-Platten je 63 μL Reservoir mit 1,1-facher Konzentration vorgelegt und mit 7 μL Additiv versetzt. Die *Screening*-Platten wurden dann bei 20 °C und 450 g für 2 min zentrifugiert, um eine gute Durchmischung der Reservoir- und Additiv-Lösungen zu gewährleisten. Daraufhin wurden, wie in Schritt 5.7.2 beschrieben, erneut 0,1 μL Reservoir mit 0,1 μL Proteinlösung mithilfe des Mosquito® Crystal (TTP Labtech) gemischt, die Platten luftdicht mit durchsichtiger Folie verschlossen und über 21 Tage bei 4 °C in einem Kristallplatten-*Imager* (Crystal Detect 2.1.5.9619, Formulatrix) auf Kristallwachstum überprüft.

5.7.5 *Seeding*-Experimente von KIT-wt

Ein weiterer Optimierungsansatz der gefundenen Kristallisationsbedingungen sah das sogenannte *Seeding* vor. Die Herstellung der *Seeding*-Lösungen erfolgte nach Anweisungen des von Hampton Research zur Verfügung gestellten Protokolls „*Seed Bead User Guide*“ (HR2-320, Hampton Research). Hierfür wurden bereits erhaltene, aber nicht für Röntgendiffraktionsexperimente geeignete Kristalle mithilfe des *Crystal Crusher* (Hampton Research) zerkleinert und in ein *Seed Bead*-Reaktionsgefäß überführt. Die in diesem Reaktionsgefäß enthaltene Glaskugel zerkleinert dann durch mehrfaches Vortexen die Kristalle in Mikrokristalle, welche dann durch weitere Verdünnung *Seeding*-Stocks unterschiedlicher Konzentrationen ergeben. Wie in Schritt 5.7.3 wurden daraufhin *Fine Screens* angesetzt, wobei zum Reservoir-Protein-Gemisch zusätzlich 0,2 μL *Seeding*-Lösung hinzugefügt wurden. Das Kristallwachstum wurde regelmäßig lichtmikroskopisch verfolgt.

5.7.6 *Soaking*-Experimente

Da mit einigen der synthetisierten Liganden keine für die Strukturanalyse geeigneten Kristalle erhalten werden konnten, wurden *Soaking*-Experimente durchgeführt. Hierfür wurden Co-Kristalle genutzt, welche die Proteine in ihrer für die Liganden erwarteten Konformation enthielten. Dementsprechend wurden für die *Soaking*-Experimente von Typ I-Inhibitoren Co-Kristalle verwendet, die ebenfalls mit Typ I-Inhibitoren co-kristallisiert worden waren. Für die Experimente gab es zwei Vorgehensweisen. Einerseits wurden die Liganden in entsprechendem Reservoir 1:1 verdünnt, drei Tropfen auf einen neuen Kristallisationsdeckel gesetzt und der zu *soakende* Kristall aus seinem Muttertropfen in die neuen Tropfen überführt. Hier wurden sie je Tropfen für 10–15 min inkubiert und anschließend gefischt. Da beobachtet werden konnte, dass sich einige der Kristalle auflösten bzw. eine rissige, rauhe Oberfläche aufwiesen, wurden einige der Kristalle bereits früher gefischt. Andererseits wurde versucht, das DMSO der Ligandenstocks zu evaporieren und die Liganden selbst in SEC-Protein-Puffer aufzunehmen. Dann wurden erneut mehrere Tropfen auf einen frischen Deckel gesetzt und die Kristalle in den ersten Tropfen überführt. Weiter wurden 0,2-0,5 μL in DMSO oder in SEC-Protein-Puffer gelöste Liganden direkt neben die zu *soakenden* Co-Kristallisationstropfen gesetzt und eine Lösungsmittelbrücke mithilfe einer Pipettenspitze zwischen den Tropfen hergestellt, um den Liganden unmittelbar in die vorhandenen Co-Kristalle diffundieren zu lassen. Die Kristalle wurden nach 4-72 Stunden gefischt und in flüssigem Stickstoff gefroren.

5.8 Röntgenstrukturanalyse

Entstandene Kristalle wurden mit *Mounted CryoLoops* (Hampton Research) aus dem Tropfen gefischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. In Abhängigkeit von den Kristallisationsbedingungen erfolgte vor dem Fischen der Kristalle zusätzlich eine kryogene Schützung, indem entweder 20 %-iges Ethylenglycol direkt zum Kristallisationstropfen zugegeben wurde oder durch Überführung in einen Tropfen, der aus einem Gemisch des Reservoirs und 1-2,5 M NaCl-Lösung bestand, aus dem der Kristall dann gefischt wurde. Zunächst wurden die Kristalle mithilfe des im Arbeitskreis verfügbaren Röntgendiffraktometers (D8 Venture, Röntgenquelle: $\text{I}\mu\text{S}$ 3.0, Detektor: Photon III, Bruker) mit einer Belichtungszeit von 60 s und einem Abstand von 70-150 mm auf Proteindiffraktion hin untersucht. Um bessere Auflösungen zu erhalten, wurden die Kristalle zusätzlich an der *Swiss Light Source* (PSI, Villingen, Schweiz) oder an der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble, Frankreich) vermessen und Datensätze aufgenommen. Angaben zu Detektoren und Wellenlängen der jeweiligen Datensätze der in dieser Arbeit diskutierten Kristallstrukturen befinden sich im Anhang 6.6.

Die Datenprozessierung, welche die Indizierung und Integration der erhaltenen Diffraktionsmuster beinhaltet, wurde mit dem Programm XDS oder XDSAPP3 durchgeführt. Für die Skalierung der Datensätze wurde das Programm XSCALE genutzt. Für anisotrope Datensätze wurde zusätzlich das Diffraktionslimit mit Hilfe des STARANISO *servers* festgelegt.^[159] Die Analyse der aus der Datenprozessierung erhaltenen mtz-Dateien wurde mit Xtriage durchgeführt. Der molekulare Ersatz erfolgte mithilfe von PHASER.^[160] Als Templat für die ersten erhaltenen Kristallstrukturen der Zielproteine dienten publizierte Kristallstrukturen, auf denen die hier verwendeten Konstrukte basieren (PDB-ID: 6GQK für KIT, PDB-ID: 5GRN für PDGFRA). Durch die iterative Verbesserung der eigenen Strukturbibliothek wurden im weiteren Verlauf der Arbeit eigene Kristallstrukturen als Templat für den molekularen Ersatz genutzt, welche durch Löschen der Liganden und der Wassermoleküle für diesen vorbereitet wurden. Sowohl Xtriage, als auch PHASER sind in der Phenix *Program Suite* enthalten. Auf den molekularen Ersatz folgten iterative Zyklen manueller Justierung der Kristallstrukturen mit COOT 0.8.9.1,^[161] gefolgt von computergestützten *Refinements* mittels PHENIX *refine* (Phenix 1.14-3260).^[162] Eingebaute Liganden wurden mit dem Programm eLBOW (Phenix), AceDRG (CCP4i2 1.1.0) oder dem GRADE Server,^[163] parametrisiert. Eine Qualitätsüberprüfung der Kristallstrukturen erfolgte mit dem PDB *Validation Server*. Die Visualisierung der Kristallstrukturen erfolgte mit dem Programm PyMOL (Schrödinger).^[164]

5.9 Docking-Studien

Die Generierung der *Docking*-Struktur von Regorafenib gebunden an KIT-wt wurde mithilfe von GOLD (Hermes 2023.3.0, Build 392256) des Cambridge *Crystallographic Data Centre, Inc.* (CCDC, Boston, MA, USA) durchgeführt. Als Templat wurde Kette A der Komplexstruktur von Imatinib gebunden an KIT-wt verwendet, welche zunächst mit dem Online-Tool PROTEINSPLUS (Zentrum für Bioinformatik, ZBH, Universität Hamburg, Hamburg, DE) protoniert wurde. Der Ligand wurde mit ChemDraw zweidimensional dargestellt und mit LigandScout (v.4.4.8, Build 20211116 [i1_10]) von der Inte:Ligand GmbH (Wien, AT) energieminiert. Anschließend erfolgte das *Docking* mit einer definierten, rigiden Bindetasche von 7,5 Å um den Ursprungsliganden und den *Scoring*-Funktionen ChemPLP und ChemScore. Als Vergleich für geeignete Bindeposen wurden sowohl veröffentlichte Komplexstrukturen von Sorafenib gebunden an p38 oder VEGFR2 und eine im Arbeitskreis gelöste Kristallstruktur von Regorafenib gebunden an eine weitere Zielkinase genutzt.

6 Anhang

6.1 Etablierung des HTRF® TK-KinEASE Assaysystems

6.1.1 Kinasetitration & Enzymkinetik

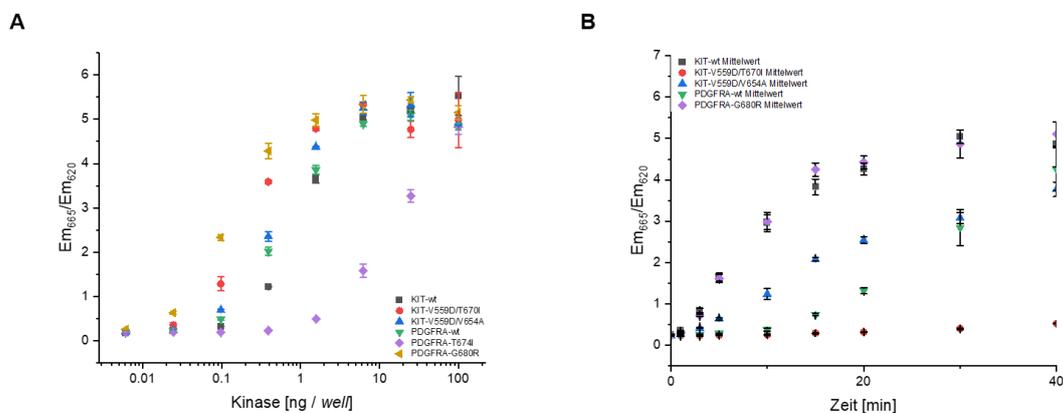


Abbildung 70: Graphische Darstellung der Kinasetitrationen und der Enzymkinetiken. **A:** Der Quotient der Emissionen bei 665 nm und 620 nm wurden gegen den Logarithmus der pro Kavität enthaltenen Kinasekonzentration aufgetragen, was im Idealfall zu einem sigmoidalen Kurvenverlauf führt. **B:** Der Quotienten-Mittelwert der Emission bei 665 nm und 620 nm jeder Kinase wurde gegen die Zeit aufgetragen, um die ideale Reaktionszeit jeder Kinase zu bestimmen.

6.1.2 Ermittlung von Substrat- und ATP- K_M von KIT-wt

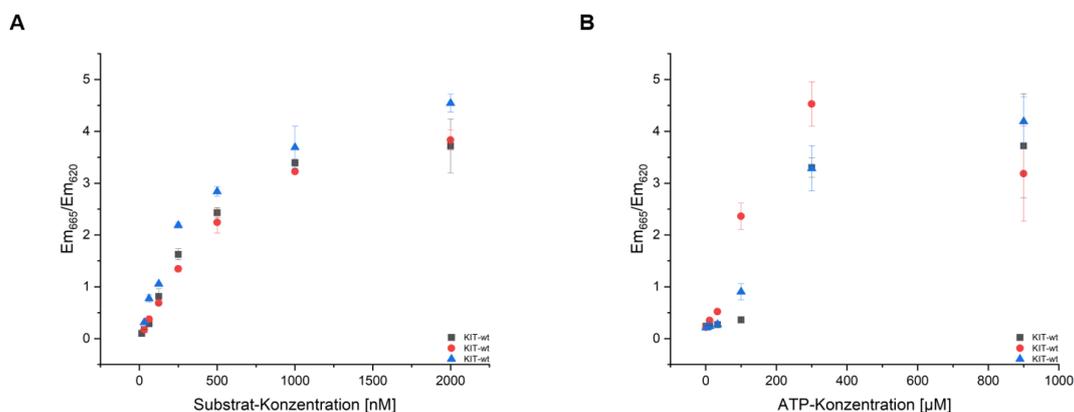


Abbildung 71: Graphische Darstellung zur Ermittlung der Substrat (A)- bzw. ATP (B)- K_M von KIT-wt. Jede Ermittlung der K_M -Werte wurde je Kinase drei Mal durchgeführt, die erhaltenen Graphen wurden an die Michaelis-Menten-Gleichung gefittet und der Mittelwert wurde bestimmt. **A:** Auftragung des Emissionsquotienten Em_{665}/Em_{620} gegen die Substratkonzentration zur Ermittlung der Substrat- K_M von KIT-wt. **B:** Auftragung des Emissionsquotienten Em_{665}/Em_{620} gegen die Substratkonzentration zur Ermittlung der ATP- K_M von KIT-wt.

6.1.3 Ermittlung von Substrat- und ATP- K_M von PDGFRA-wt

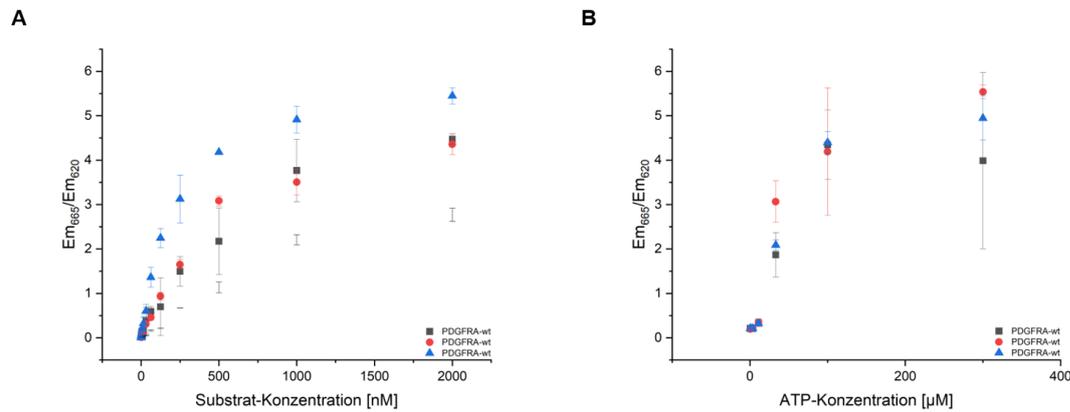


Abbildung 72: Graphische Darstellung zur Ermittlung der Substrat (A)- bzw. ATP (B)- K_M von PDGFRA-wt. Jede Ermittlung der K_M -Werte wurde je Kinase drei Mal durchgeführt, die erhaltenen Graphen wurden an die Michaelis-Menten-Gleichung gefittet und der Mittelwert wurde bestimmt. **A:** Auftragung des Emissionsquotienten Em_{665}/Em_{620} gegen die Substratkonzentration zur Ermittlung der Substrat- K_M von PDGFRA-wt. **B:** Auftragung des Emissionsquotienten Em_{665}/Em_{620} gegen die Substratkonzentration zur Ermittlung der ATP- K_M von PDGFRA-wt.

6.1.4 Ermittlung von Substrat- und ATP- K_M von PDGFRA-G680R

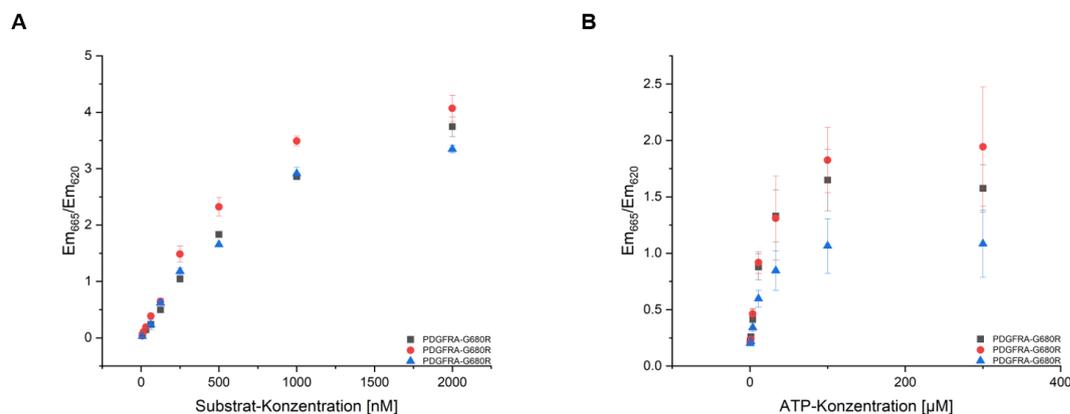


Abbildung 73: Graphische Darstellung zur Ermittlung der Substrat (A)- bzw. ATP (B)- K_M von PDGFRA-G680R. Jede Ermittlung der K_M -Werte wurde je Kinase drei Mal durchgeführt, die erhaltenen Graphen wurden an die Michaelis-Menten-Gleichung gefittet und der Mittelwert wurde bestimmt. **A:** Auftragung des Emissionsquotienten Em_{665}/Em_{620} gegen die Substratkonzentration zur Ermittlung der Substrat- K_M von PDGFRA-G680R. **B:** Auftragung des Emissionsquotienten Em_{665}/Em_{620} gegen die Substratkonzentration zur Ermittlung der ATP- K_M von PDGFRA-G680R.

6.1.5 Etablierung des HTRF®-Assaysystems für PDGFRA-D842V

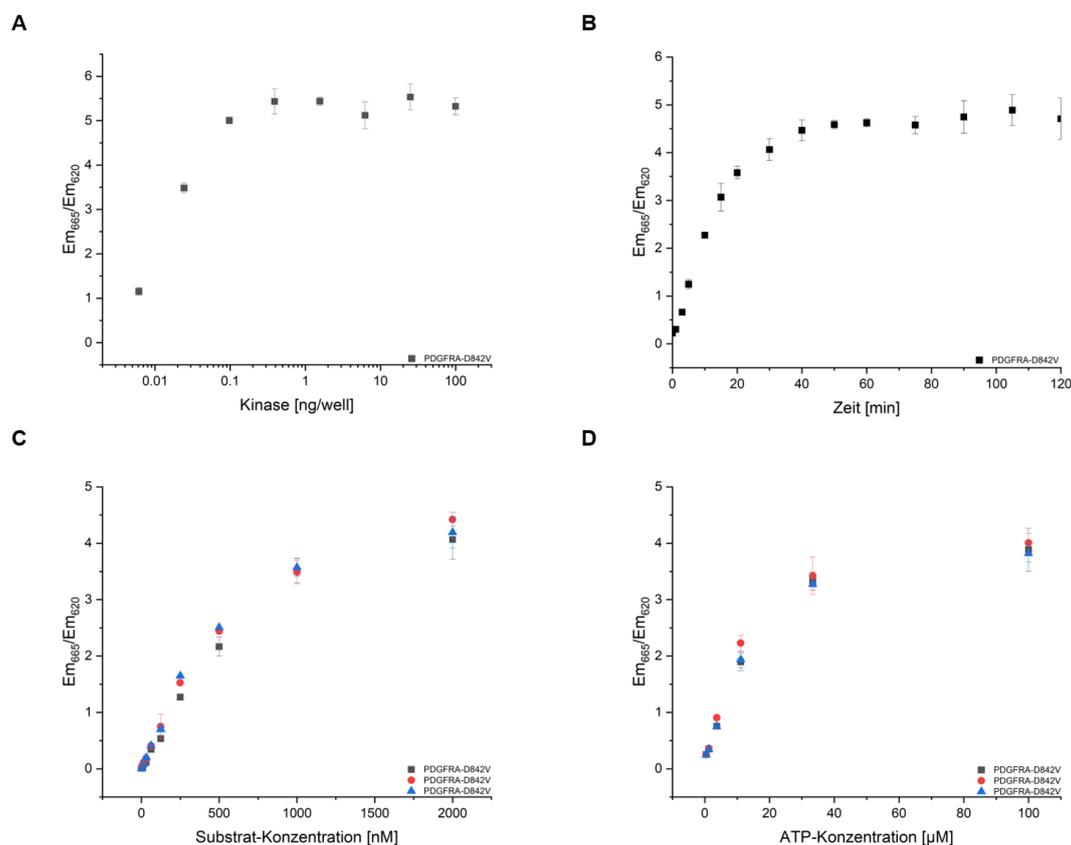


Abbildung 74: Graphische Darstellung der Kinasetitration (A), der Enzymkinetik (B) sowie der Ermittlung der Substrat (C)- bzw. ATP (D)- K_M von PDGFRA-D842V. **A:** Der Quotient der Emissionen bei 665 nm und 620 nm wurde gegen den Logarithmus der pro Kavität enthaltenen Kinasemenge aufgetragen, was im Idealfall zu einem sigmoidalen Kurvenverlauf führt. **B:** Der Quotienten-Mittelwert der Emission bei 665 nm und 620 nm jeder Kinase wurde gegen die Zeit aufgetragen, um die ideale Reaktionszeit jeder Kinase zu bestimmen. **C, D:** Jede Ermittlung der K_M -Werte wurde je Kinase drei Mal durchgeführt, die erhaltenen Graphen wurden an die Michaelis-Menten-Gleichung gefittet und der Mittelwert wurde bestimmt. **C:** Auftragung des Emissionsquotienten Em_{665}/Em_{620} gegen die Substratkonzentration zur Ermittlung der Substrat- K_M von PDGFRA-D842V. **D:** Auftragung des Emissionsquotienten Em_{665}/Em_{620} gegen die Substratkonzentration zur Ermittlung der ATP- K_M von PDGFRA-D842V.

6.1.6 Zusammenfassung der HTRF® TK KinEASE-Etablierung

Da für die biochemischen Messungen im Rahmen dieser Arbeit Liganden gegenüber verschiedenen Kinasen hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität getestet werden sollten, mussten die HTRF®-Protokolle an die jeweiligen Kinasen angepasst werden. Da weder für KIT-wt, noch KIT-V559D/V654A oder KIT-V559D/T670I das gleiche Protein-*batch* vom Hersteller zur Verfügung gestellt werden konnte, mussten auch für die zuvor im Arbeitskreis etablierten Proteine die Aufsetzung des Assays erfolgen.^[106] Für den KIT-wt konnte das System erfolgreich re-etabliert werden, während sowohl für KIT-V559D/V654A als auch KIT-V559D/T670I keine zufriedenstellenden Ergebnisse erzielt wurden. Für PDGFRA-wt, PDGFRA-G680R und PDGFRA-D842V konnten erfolgreich Assay-Protokolle etabliert werden. Lediglich PDGFRA-T674I zeigte bereits bei der Enzymtitration keine ausreichende Aktivität, weshalb im weiteren Verlauf auf diese Kinase verzichtet wurde. Die ermittelten Parameter für jede Kinase können Tabelle 26 entnommen werden.

Tabelle 26: Verwendete Parameter zur Durchführung der HTRF® TK-KinEASE Assays für unterschiedliche Kinasen zur Ermittlung von IC₅₀-Werten.

Kinase	KIT-wt	PDGFRA-wt	PDGFRA-G680R	PDGFRA-D842V
Hersteller	Proqinase	Proqinase	SignalChem	Invitrogen
Lot	0997-0000-1 (010)	1057-0000-1 (011)	X3408-18	2343231B
Enzym	2,53 ng / well	1,68 ng / well	0,38 ng / well	0,0421 ng / well
Substrat	550 nM	455 nM	886 nM	775 nM
ATP	200 µM	57 µM	11 µM	14 µM
Biotin-XL665	8:1	8:1	8:1	8:1
Vorinkubation	30 min	30 min	30 min	30 min
Reaktion	20 min	40 min	15 min	15 min
Stop	60 min	60 min	60 min	60 min

6.2 Aminosäuresequenzen

6.2.1 Aminosäuresequenz von KIT-wt und KIT-T670I

Tabelle 27: Grundlegende Informationen zur Herkunft und zum Konstruktdesign der in dieser Arbeit verwendeten KIT-Zielproteine KIT-wt und -T670I. Molekulargewichte (MW) und Extinktionskoeffizienten (ϵ) der Zielproteine wurden mit dem ExPasy ProtParam-Tool des *Swiss Institute of Bioinformatics* berechnet.

Proteinname	KIT/Stammzellfaktor-Rezeptor
Organismus	<i>Homo sapiens</i>
UniProtKB	P10721
Besonderheiten	Aminosäuren 551-934, Ersatz der Kinase-Insertions-Schleife (Aminosäuren 688-765) durch die Aminosäuresequenz EFVPYKQVAPEDLYKDFLT, zusätzlich konstruierte Mutationen: I563S, V569S, Y609Q, L631S, M651E, I662H, D768H, R804N, V825D, C844S, L890S, H894Y, L912D, L923D, N-terminaler His ₆ -Tag, Thrombin-Schnittstelle.
MW _{calc} (wt, pET15b)	39169,67 Da (mit His ₆ -Tag) / 37287,62 Da (ohne His ₆ -Tag)
ϵ (wt, pET15b)	58705 M ⁻¹ cm ⁻¹
MW _{calc} (wt, pCDFDuet-1)	39032,53 Da (mit His ₆ -Tag) / 37150,62 Da (ohne His ₆ -Tag)
ϵ (wt, pCDFDuet-1)	58705 M ⁻¹ cm ⁻¹
MW _{calc} (T670I, pCDFDuet-1)	39044,58 Da (mit His ₆ -Tag) / 37162,53 Da (ohne His ₆ -Tag)
ϵ (T670I, pCDFDuet-1)	58705 M ⁻¹ cm ⁻¹

Die Aminosäuresequenz des KIT-Wildtyps basiert auf der publizierten Struktur der PDB-ID 6GQK:

MGSSHHHHHSSGLVPR/GSHMPMYEVQWKVVEESNGNNSYIDPTQLPYDHKWEFPRNRLSFGK
 TLGAGAFGKVVVEATAQGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAHSTEREALMSELKVLSYLGHNENIVNLLG
 ACTHGGPTLVI TEYCCYGDLLNFLRRKRDEFVVPYKQVAPEDLYKDFLTLEHLLSFSYQVAKGMAFL
 ASKNCIHRDLAARNILLTHGNITKICDFGLARDIKNDSNYVDKGNARLPVKWMAPEISFNSVYTF
 ESDVWSYGI FLWELFSLGSSPYPGMPVDSKFKYKMIKEGFRMSSPEYAPAEMYDIMKTCWDADPDK
 RPTFKQIVQDIEKQISESTNH

Orange: His₆-Tag, **Blau:** Thrombin-Schnittstelle, **Rot:** Histidin, welches durch Klonierung der KIT-Genkonstrukte in den pCDFDuet-1-Vektor im pCDFDuet-1-Konstrukt nicht mehr vorhanden ist, **Grün:** Türsteher-Aminosäure (Thr670), welche durch ortsgerichtete Mutagenese zu Isoleucin (Ile670) mutiert wurde.

Tabelle 28: Primer-Sequenzen für die ortsgerichtete Mutagenese der Türsteher-Aminosäure Thr670 zu Isoleucin.

Primer	Sequenz 5'-3'
<i>Forward</i>	GGTCCGACACTGGTTATTATTGAATATTGTTGTTATGGCG
<i>Reverse</i>	CGCCATAACAACAATATTCAATAATAACCAGTGTCGGACC

6.2.2 Aminosäuresequenz des PDGFRA-wt und PDGFRA-T674I

Tabelle 29: Grundlegende Informationen zur Herkunft und zum Konstruktdesign der in dieser Arbeit verwendeten PDGFRA-Zielproteine PDGFRA-wt und -T674I. Molekulargewichte (MW) und Extinktionskoeffizienten (ϵ) der Zielproteine wurden mit dem Expsy ProtParam-Tool des *Swiss Institute of Bioinformatics* berechnet.

Proteinname	PDGFRA/ <i>platelet-derived growth factor receptor α</i>
Organismus	<i>Homo sapiens</i>
UniProtKB	P16234
Besonderheiten	Aminosäuren 550-973, Deletion der Kinase-Insertions-Schleife (Aminosäuren 697-768), N-terminaler His ₁₀ -Tag, <i>PreScission</i> -Schnittstelle.
MW _{calc} (wt)	42804,30 Da (mit His ₁₀ -Tag) / 40372,60 Da (ohne His ₁₀ -Tag)
ϵ (wt)	62800 M ⁻¹ cm ⁻¹
MW _{calc} (T674I)	42816,32 (mit His ₁₀ -Tag) / 40384,63 (ohne His ₁₀ -Tag)
ϵ (T674I)	62800 M ⁻¹ cm ⁻¹

Die Aminosäuresequenz des PDGFRA-Wildtyps basiert auf der publizierten Struktur der PDB-ID 5GRN:

MAHHHHHHHHHHHGALEVL**FQ**/GPGKQKPRYEIRWRVIESISPDGHEYIYVDPMQLPYDSRWEFPR
 DGLVLGRVLGSGAFGKVVVEGTAYGLSRSQPVMKVAVKMLKPTARSSEKQALMSELKIMTHLGPLL
 NIVNLLGACTKSGPIYII**TE**YCFYGDLVNYLHKNRDSFLSHKKKSMMLDSEVKNLLSDDNSEGLTL
 LDLLSFTYQVARGMEFLASKNCVHRDLAARNVLLAQGKIVKICDFGLARDIMHDSNYVSKGSTFL
 PVKWMAPESIFDONLYTTLSDVWSYGILLWEIFSLGGTPYPGMMVDSTFYNKIKSGYRMAKPDHAT
 SEVYEIMVKCWNSEPEKRPSFYHLSEIVENLLPGQYKKSYEKIHLDFLKSD

Orange: His₁₀-Tag, **Blau:** *PreScission*-Schnittstelle. **Grün:** Türsteher-Aminosäure (Thr674), welche durch ortsgerichtete Mutagenese zu Isoleucin (Ile674) mutiert wurde.

Tabelle 30: Primer für die ortsgerichtete Mutagenese der Türsteher-Aminosäure Thr674 zu Isoleucin.

Primer	Sequenz 5'-3'
<i>Forward</i>	GTCCTATCTACATCATCATTGAGTACTGCTTCTACGG
<i>Reverse</i>	CCGTAGAAGCAGTACTCAATGATGATGTAGATAGGAC

6.2.3 Kristallisationskonstrukte von KIT- & PDGFRA-Mutanten

Tabelle 31: Übersicht über Kristallisationskonstrukte klinisch relevanter Mutationen von KIT und PDGFRA. Diese wurden entweder als Einzelmutationen oder als Mehrfachmutationen zur Erforschung der Auswirkungen der jeweiligen Mutationen auf das Verhalten der Kinasedomänen eingeführt. Aufgeführt sind die Mutationen, die PDB-IDs, welche als Grundlage für die Konstrukte verwendet wurden, die Expressionsvektoren und die unterschiedlichen Expressionssysteme, um eine möglichst hohe Flexibilität erhalten zu können.

Protein	Mutation	PDB-ID Basis	Vektor	Expressionssystem
KIT	V559D	6GQK	pCDFDuet-1	<i>E. coli</i>
	V654A	6GQK	pCDFDuet-1	<i>E. coli</i>
	T670I	6GQK	pCDFDuet-1	<i>E. coli</i>
	D820Y	6GQK	pCDFDuet-1	<i>E. coli</i>
	Y823D	6GQK	pCDFDuet-1	<i>E. coli</i>
PDGFRA	V589F	5GRN	pIEX/Bac3	Insektenzellen
	G652E	5GRN	pIEX/Bac3	Insektenzellen
	V658A	5GRN	pIEX/Bac3	Insektenzellen
	T674R	5GRN	pIEX/Bac3	Insektenzellen
	Y676C	5GRN	pIEX/Bac3	Insektenzellen
	G680R	5GRN	pIEX/Bac3	Insektenzellen
PDGFRA	--	5GRN	pEGBacMam	Insekten-/Säugerzellen
	T674I	5GRN	pEGBacMam	Insekten-/Säugerzellen
	T674R	5GRN	pEGBacMam	Insekten-/Säugerzellen
	D842V	5GRN	pEGBacMam	Insekten-/Säugerzellen
	D842V/V589F	5GRN	pEGBacMam	Insekten-/Säugerzellen
	D842V/G652E	5GRN	pEGBacMam	Insekten-/Säugerzellen
	D842V/T674R	5GRN	pEGBacMam	Insekten-/Säugerzellen
	D842V/G680R	5GRN	pEGBacMam	Insekten-/Säugerzellen

6.3 Proteinreinigung der KIT- & PDGFRA-Zielproteine

6.3.1 Reinigung von PDGFRA-wt

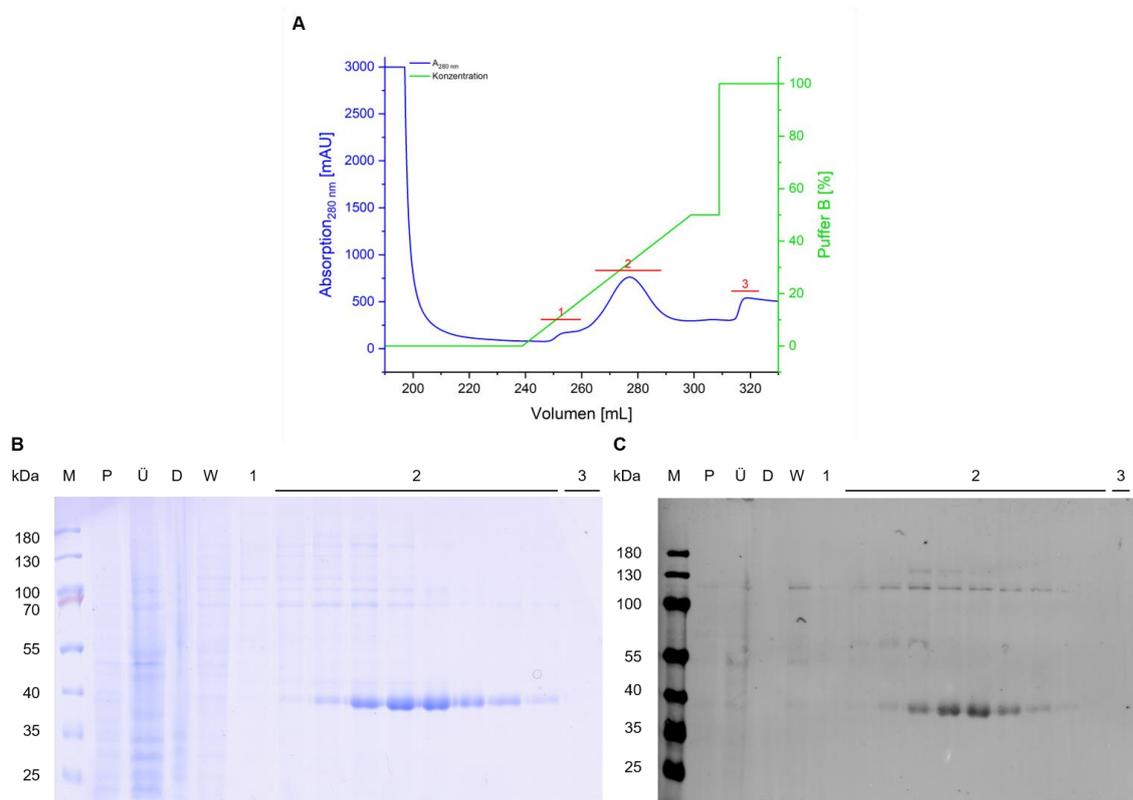


Abbildung 75: Erste Nickel-Affinitätschromatographie von PDGFRA-wt. **A:** Chromatogramm des Reinigungsschritts. Blau: Absorption bei 280 nm. Grün: Prozentuale Konzentration des Elutionspuffers. **B:** Rot (1-3): Zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot verwendete Fraktionen des Reinigungsschritts. **B:** Mit Coomassie-Färbelösung gefärbtes SDS-Gel zur Analyse des Reinigungsschritts hinsichtlich der Proteinreinheit. **C:** Western Blot zum spezifischen Nachweis His-Tag tragender Proteine in der Proteinlösung. kDa: Kilodalton, M: Marker, P: Pellet, Ü: Überstand, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, 1-3: Elutionsfraktionen.

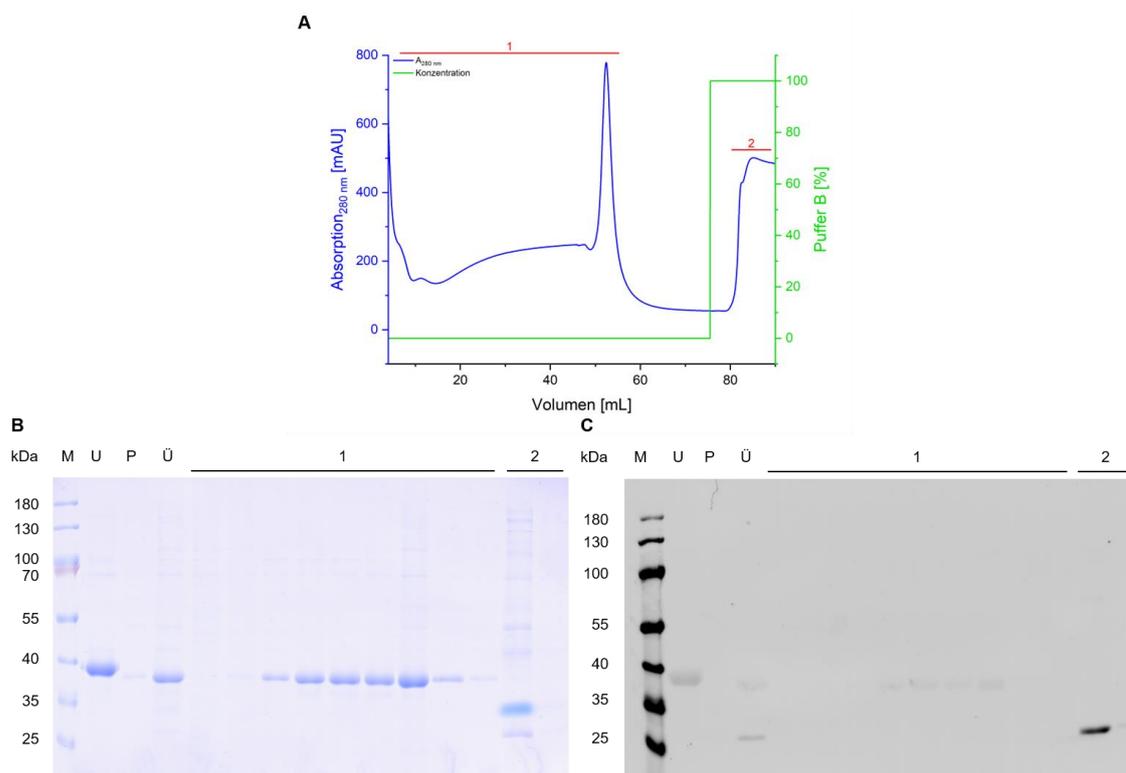


Abbildung 76: Zweite Nickel-Affinitätschromatographie von PDGFRA-wt nach proteolytischer Spaltung und Dialyse über Nacht. Dieser Schritt diente zur Trennung von proteolytisch gespaltenem und ungespaltenem Protein. **A:** Chromatogramm des Reinigungsschritts. Blau: Absorption bei 280 nm. Grün: Prozentuale Konzentration des Elutionspuffers B. Rot (1-2): Fraktionen, welche zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot genutzt wurden. **B:** Mit Coomassie-Färbelösung gefärbtes SDS-Gel zur Analyse des Reinigungsschritts hinsichtlich der Proteinreinheit. **C:** Western Blot zum spezifischen Nachweis His-Tag tragender Proteine in der Proteinlösung. kDa: Kilodalton, M: Marker, U: Ungeschnittenes Protein, P: Pellet, Ü: Überstand, 1-2: Elutionsfraktionen.

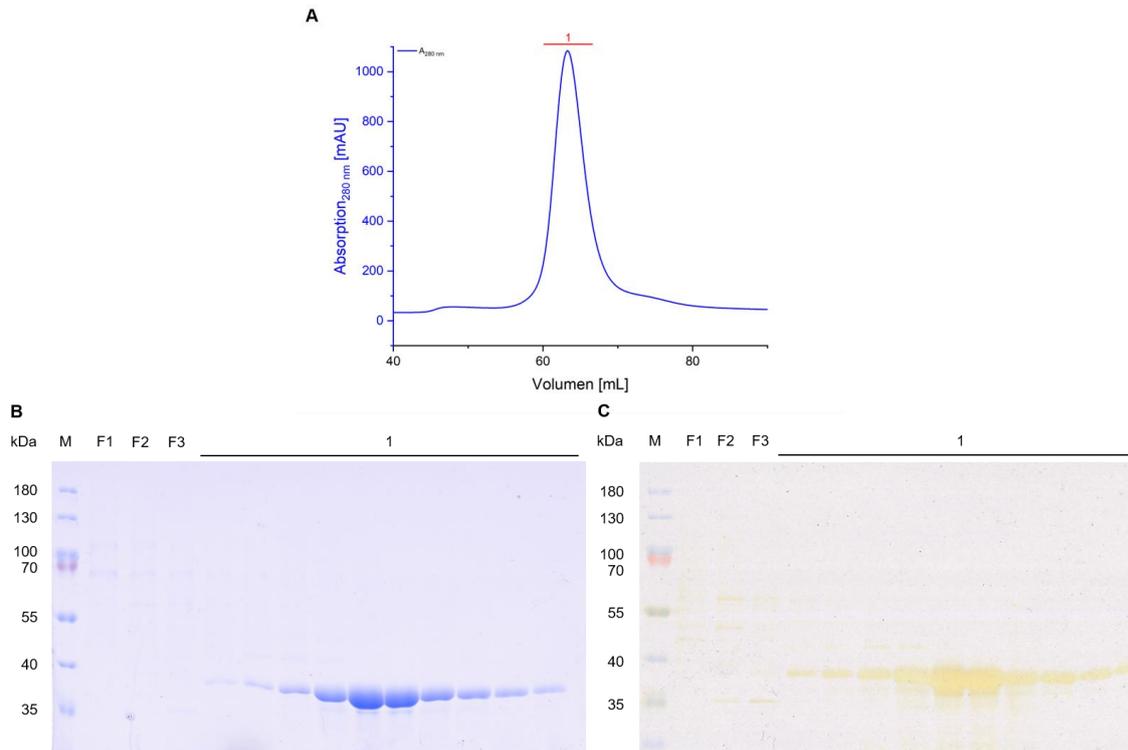


Abbildung 77: Größenausschluss-Chromatographie von PDGFRA-wt. **A:** Chromatogramm des Reinigungsschritts. Blau: Absorption bei 280 nm. Rot (1): Fraktionen, welche zur Analyse mittels SDS-PAGE und Silbergefärbung genutzt wurden. **B:** Mit Coomassie-Färbelösung gefärbtes SDS-Gel zur Analyse des Reinigungsschritts hinsichtlich der Proteinreinheit. **C:** Silbergefärbung zur sensitiveren Analyse der Proteinreinheit in den Elutionsfraktionen. kDa: Kilodalton, M: Marker, 1: Elutionsfraktion F1-F3: Einzelproben, die für die Analyse vor der Elutionsfraktion 1 von der Säule eluiert wurden.

6.3.2 Reinigung von KIT-wt

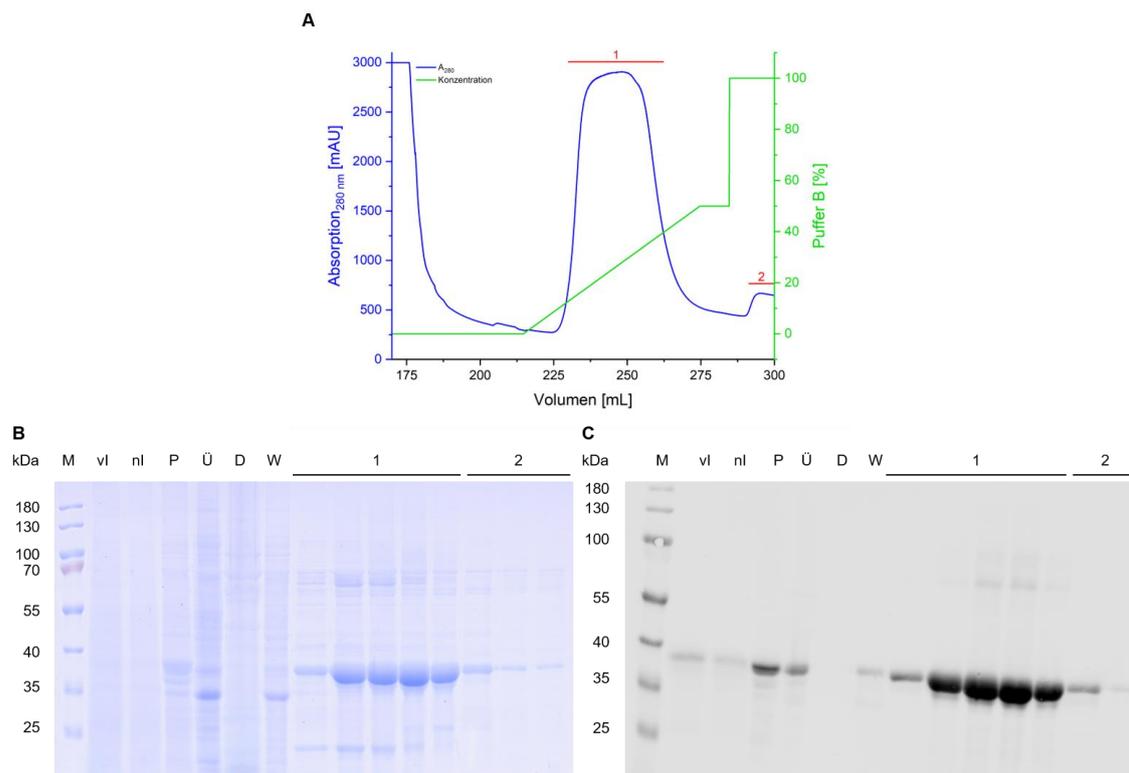


Abbildung 78: Erste Nickel-Affinitätschromatographie von KIT-wt. **A:** Chromatogramm des Reinigungsschritts. Blau: Absorption bei 280 nm. Grün: Prozentuale Konzentration des Elutionspuffers B. Rot (1-2): Zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot verwendete Fraktionen des Reinigungsschritts. **B:** Mit Coomassie-Färbelösung gefärbtes SDS-Gel zur Analyse des Reinigungsschritts hinsichtlich der Proteinreinheit. **C:** Western Blot zum spezifischen Nachweis His-Tag tragender Proteine in der Proteinlösung. kDa: Kilodalton, M: Marker, vl: vor Induktion, nl: nach Induktion, P: Pellet, Ü: Überstand, D: Durchfluss, W: Waschfraktion, 1-2: Elutionsfraktionen.

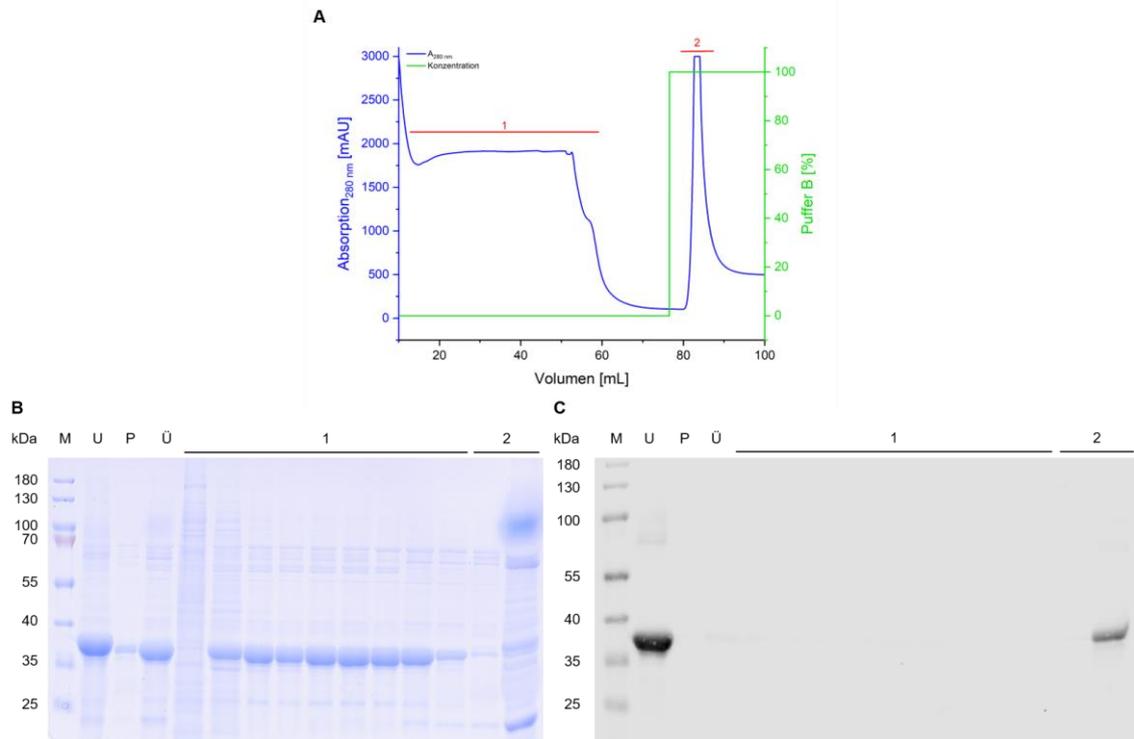


Abbildung 79: Zweite Nickel-Affinitätschromatographie von KIT-wt nach proteolytischer Spaltung und Dialyse über Nacht. A: Chromatogramm des Reinigungsschritts. Blau: Absorption bei 280 nm. Grün: Prozentuale Konzentration des Elutionspuffers. B. Rot (1-2): Zur Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot verwendete Fraktionen des Reinigungsschritts. **B:** Mit Coomassie-Färbelösung gefärbtes SDS-Gel zur Analyse des Reinigungsschritts hinsichtlich der Proteinreinheit. **C:** Western Blot zum spezifischen Nachweis His-Tag tragender Proteine in der Proteinlösung. kDa: Kilodalton, M: Marker, P: Pellet, Ü: Überstand, 1-2: Elutionsfraktionen.

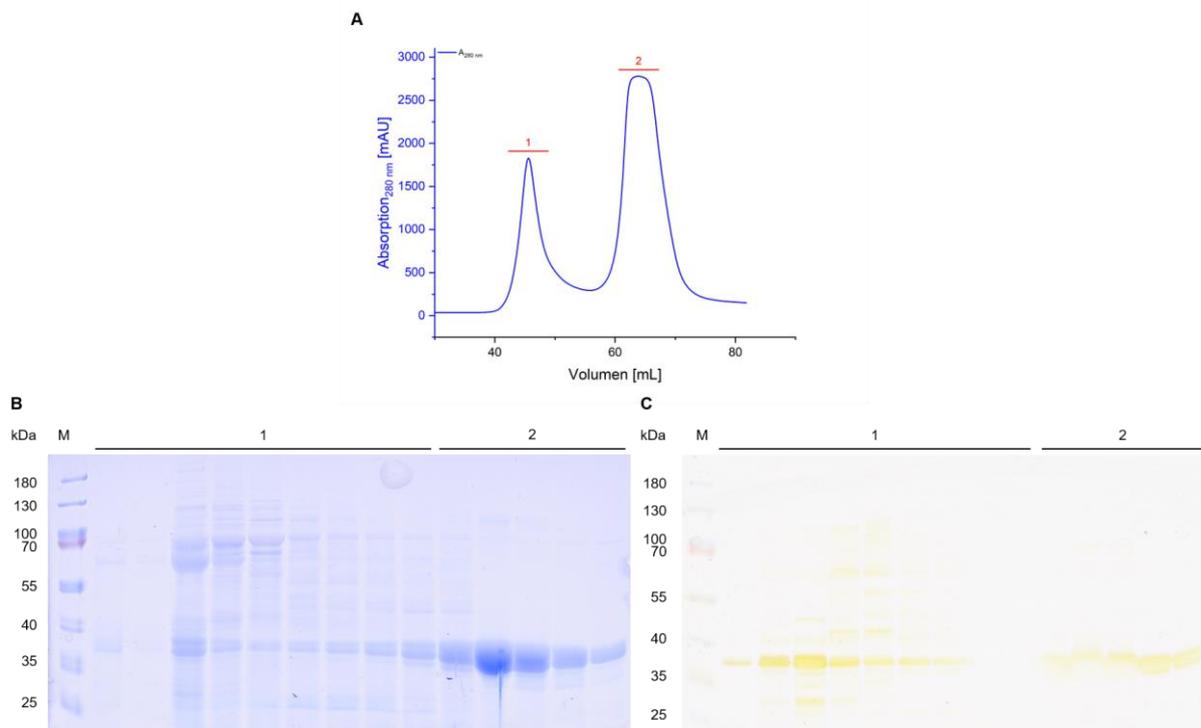


Abbildung 80: Größenausschluss-Chromatographie von KIT-wt. A: Chromatogramm des Reinigungsschritts. Blau: Absorption bei 280 nm. Rot (1-2): Fraktionen, welche zur Analyse mittels SDS-PAGE und Silbergefärbung genutzt wurden. **B:** Mit Coomassie-Färbelösung gefärbtes SDS-Gel zur Analyse des Reinigungsschritts hinsichtlich

der Proteinreinheit. C: Silbergefärbung zur sensitiveren Analyse der Proteinreinheit in den Elutionsfraktionen. kDa: Kilodalton, M: Marker, 1-2: Elutionsfraktionen.

6.4 Strukturbiologische Untersuchungen

6.4.1 Sequenzalignment verwandter Kinasen von KIT & PDGFRA

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

sp|P10721-1|KIT_HUMAN      WEFPRNRLSFGKTLGAGAFGKVVVEATAYGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAHLTEREALMSEL      60
sp|P16234|PGFRA_HUMAN     WEFPRDGLVLGRVLGSGAFGKVVVEGTAYGLSRSQPVMKVAVKMLKPTARSSEKQALMSEL      60
sp|P36888|FLT3_HUMAN      WEFPRENLEFGKVLGSGAFGKVMNATAYGISKTGVSIVAVKMLKEKADSSEREALMSEL      60
sp|P35968|VEGFR2_HUMAN   WEFPRDRCLKLGPLGRGAFGQVIEADAFGIDKTATCRTVAVKMLKEGATHSEHRALMSEL      60
tr|A9UF07|A9UF07_HUMAN   WEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKK-----YSLTVAVKTLKEDTMEV--EEFLKEA      53
sp|P12931|SRC_HUMAN       WEIPRESLRLEVKLGQCGFGEVVMGTWNG-----T-TRVAIKTLKPGTMSP--EAFQLQEA      52
      **:* : : **:*:* . **:* * : . :.*

sp|P10721-1|KIT_HUMAN     KVLSTLGNHMNIVNLLGACTI-GGPTLVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICSKQED--HA      117
sp|P16234|PGFRA_HUMAN     KIMTHLGPLNIVNLLGACTK-SGPIYIITEYCFYGDVNLVHKNRDSFSLSHHPEK--PK      117
sp|P36888|FLT3_HUMAN      KMMTQLGSHENIVNLLGACTL-SGPIYLIIEYCCYGDLLNVLRSKREKFRHTWTEI--FK      117
sp|P35968|VEGFR2_HUMAN   KILIHIGHHLNVNLLGACTKPGGPLMVIVEFCKFGNLSTYLRSKRNEFVYKTKGARFR      120
tr|A9UF07|A9UF07_HUMAN   AVMKEI-KHPNVLQVLGVCTR-EPPFYIITEFMTYGNLLDYLRECNRQE-----      100
sp|P12931|SRC_HUMAN       QVMKKL-RHEKLVQLYAVVS--EPIYIVTEYMSKGSLLDFLKGETGKY-----      98
      :: : * ::*:* .. : * :: * :*. * :* :

sp|P10721-1|KIT_HUMAN     EAALYKNLLHSKES-----SCSDSTNEYMDMKPGVSYV-VPT-----KA      155
sp|P16234|PGFRA_HUMAN     KELDIFGLNPADESTRSYVILSFENNGDYMDMQADTTQYVPMLEKREKVSYSIDIQRSLY      177
sp|P36888|FLT3_HUMAN      EHNFS--FYPTFQSHPN-----S--SMPGSREVQIHPDSD-----QISGL-----      153
sp|P35968|VEGFR2_HUMAN   QGKDYVGAIPVDLKRRLDSITSS-----QSS-----      145
tr|A9UF07|A9UF07_HUMAN   -----      100
sp|P12931|SRC_HUMAN       -----      98

sp|P10721-1|KIT_HUMAN     DKRRSVRIGSYIER-DVTPAIMEDDELALDLEDLLSFSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLAA      214
sp|P16234|PGFRA_HUMAN     DRPASYKKKSMILDS-EVKNLLSDDNSEGLTLLDLSFTYQVARGMEFLASKNCVHRDLAA      236
sp|P36888|FLT3_HUMAN      -HGNSFHSEDEIEYENQKRLEEEEDLNVLTFEDLLCFAYQVAKGMEFLFKSCVHRDLAA      212
sp|P35968|VEGFR2_HUMAN   SASSGFVEEKSLSDVEEEEAPEELDKDFLTLEHLICYSFQVAKGMEFLASRKC IHRDLAA      205
tr|A9UF07|A9UF07_HUMAN   -----VNAVVLLYMATQISSAMEYLEKKNFIHRDLAA      132
sp|P12931|SRC_HUMAN       -----LRLPQLVDMAAQIASGMAYVERMNYVHRDLRA      130
      : * : : * : . * : : . :**** *

sp|P10721-1|KIT_HUMAN     RNILLTHGRITKICDFGLARDIKRNSNYVVKGNARLPVKWMAPEISFNCVYTFESDVWSY      274
sp|P16234|PGFRA_HUMAN     RNVLLAQGKIVKICDFGLARDIMHDSNYVSKGSTFLPVKWMAPEISFDNLYTTLSDVWSY      296
sp|P36888|FLT3_HUMAN      RNVLVTHGKVVKICDFGLARDIMSDSNYVVRGNARLPVKWMAPEISLEFGIYTIKSDVWSY      272
sp|P35968|VEGFR2_HUMAN   RNILLSEKNVVKICDFGLARDIYKDPDYVRKGDARLPKWMAPETIFDRVYTIQSDVWSF      265
tr|A9UF07|A9UF07_HUMAN   RNCLVGENHLVKVADFGLSRLM-TGDTYTAHAGAKFPIKWTAPESLAYNKFSIKSDVWAF      191
sp|P12931|SRC_HUMAN       ANILVGENLVCKVADFGFLARLI-EDNEYTARQGAQKFIKWTAPEAALYGRFTIKSDVWSF      189
      * * : . : * :***** * : . * : : : * : * * * : : : * * * :

```

Abbildung 81: Sequenzalignment 1 von KIT und PDGFRA mit FLT3 (UniProt: P36888), VEGFR2 (UniProt: P35968), BCR-ABL (UniProt: A9UF07) und c-SRC (UniProt: P12931). Gezeigt sind die alignierten Proteinsequenzen (Einbuchstabencode) der intrazellulären Kinasedomänen. *: vollständige Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen den Kinasen.

sp P10721-1 KIT_HUMAN	GIFLWELFSLGSSPYPGMPVDSKFYKMIKEGFRMLSPEHAPAEMYDIMKTCWDADPLKRP	334
sp P16234 PGFRA_HUMAN	GILLWEIFSLGGTPYPGMVDSTFYNKIKSGYRMAKPDHATSEVYEIMVKCWNSEPEKRP	356
sp P36888 FLT3_HUMAN	GILLWEIFSLGVNYPYPGIPVDANFYKLIQNGFKMDQPFYATEEIIYIIMQSCWAFDSRKR	332
sp P35968 VEGFR2_HUMAN	GVLLWEIFSLGASPYPGVKIDEDEFRRLEKGTMRAPDYTTPEMYQTMDCWHGEPSSQRP	325
tr A9UF07 A9UF07_HUMAN	GVLLWEIATYGMSPYPGIDL-SQVYELLEKDYRMERPEGCPEKVYELMRACWQWNPSTRP	250
sp P12931 SRC_HUMAN	GILLTELTTKGRVYPYPMGVN-REVLQDQVERGYRMPCCPECPESLHDLMCQCWRKEPEERP	248
	: * : : * ***** . : : * * : : * * * : .**	
sp P10721-1 KIT_HUMAN	TFKQIVQLIEKQISESTNHI-----YSNLAN-----CSPNRQKPVVDHSVRIN	377
sp P16234 PGFRA_HUMAN	SFYHLSEIVENLLPGQYKKS-----YEKIHL-----DFLKSDFPAVAR-MRVD	398
sp P36888 FLT3_HUMAN	SFPNLTSLFLGCQLADAEEM-----YQNVGD-----RVSECPHYQNR--RPF	373
sp P35968 VEGFR2_HUMAN	TFSELVEHLGNLLQANAQQDGKD--YIVLPISETLSMEEDSGLSLPTSPVSCMEEEEEV--	381
tr A9UF07 A9UF07_HUMAN	SFAEIHQAFETMFQESSISDEVEKELGKQGVRGAVS----TLLQAPELP--TKTRTSRRA	304
sp P12931 SRC_HUMAN	TFEYLQAFLEDYFTSTPEQYQGENL-----	274
	:* : . :	
sp P10721-1 KIT_HUMAN	S---VGSTASS-----QPL---LV-----	391
sp P16234 PGFRA_HUMAN	SDNAYIGVTYKNEEDKLDKDWEGGL-DEQ-RLSADSGYIIPL---PDIDP-----	442
sp P36888 FLT3_HUMAN	SREMDLGL-----LSPQ---AQV-----	388
sp P35968 VEGFR2_HUMAN	---CDPKFHYDNTAG-ISQYLQNSKRKSRPVSVKTFEDIPLE-EPEVKV-----	425
tr A9UF07 A9UF07_HUMAN	---AEHRDITDV-----PEMPHSGQGQESDPLDHEPAVSPLLPRKERGPPE	347
sp P12931 SRC_HUMAN	-----	274
sp P10721-1 KIT_HUMAN	-----H--DDV-----	395
sp P16234 PGFRA_HUMAN	-----VPEE--EDLGKRN-----HS-----SQT-SEESAI	465
sp P36888 FLT3_HUMAN	-----EDS-----	391
sp P35968 VEGFR2_HUMAN	-----IPDDNQIDSGMVLASEELKTLEDRTKLSPSFGGMVPSKSRRESVA-SEGSNQ	475
tr A9UF07 A9UF07_HUMAN	GGLNEDERLLPKDKKTNLFSALIKKKKTAPTTPKRSSSFREMDGQPERGAGEEEGRDI	407
sp P12931 SRC_HUMAN	-----	274
sp P10721-1 KIT_HUMAN	-----	395
sp P16234 PGFRA_HUMAN	ETGSSS-----STFIKREDETIEDIDMDDIGIDSSD----LVEDSFL-----	504
sp P36888 FLT3_HUMAN	-----	391
sp P35968 VEGFR2_HUMAN	TSGYQSGYHSDDTDTTVYSSEEAELLKL----IEIGVQIGSTAQILQPDSTLSSPPV	530
tr A9UF07 A9UF07_HUMAN	SNGALA-FTPLDT-----ADPAKSPKPSNGAGVPNG----ALRESGGSGFRSPHL	452
sp P12931 SRC_HUMAN	-----	274

Abbildung 82: Sequenzalignment 2 von KIT und PDGFRA mit FLT3 (UniProt: P36888), VEGFR2 (UniProt: P35968), BCR-ABL (UniProt: A9UF07) und c-SRC (UniProt: P12931). Gezeigt sind die alignierten Proteinsequenzen (Einbuchstabencode) der intrazellulären Kinasedomänen. *: vollständige Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen den Kinasen.

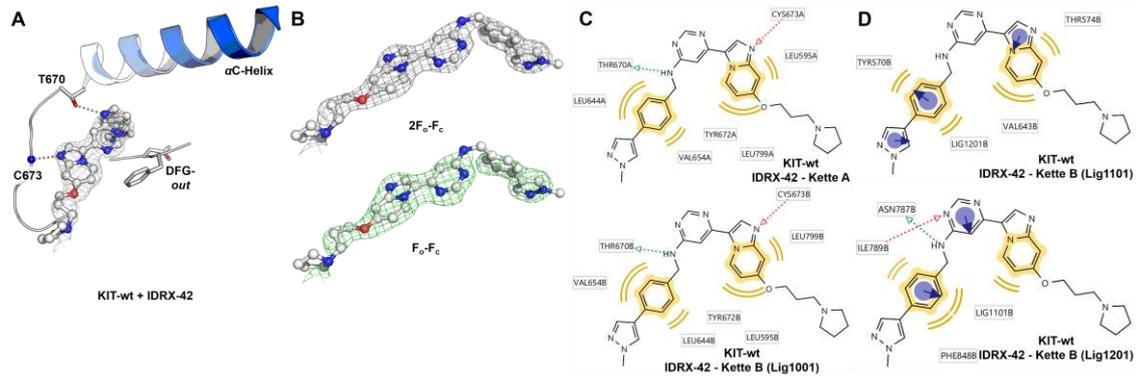


Abbildung 85: Elektronendichtekarten der Soaking-Struktur von IDRX-42 in KIT-wt. A: Übersicht des gebundenen Liganden. B: $[2F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0) - und *simulated annealing* $[F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 2,8)-omit-Elektronendichtekarten von IDRX-42. C/D: Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von IDRX-42 gebunden an KIT-wt. Zur Erstellung der Pharmakophor-Modelle und der zugehörigen 2D-Visualisierung wurde LigandScout (v. 4.4.8) verwendet.

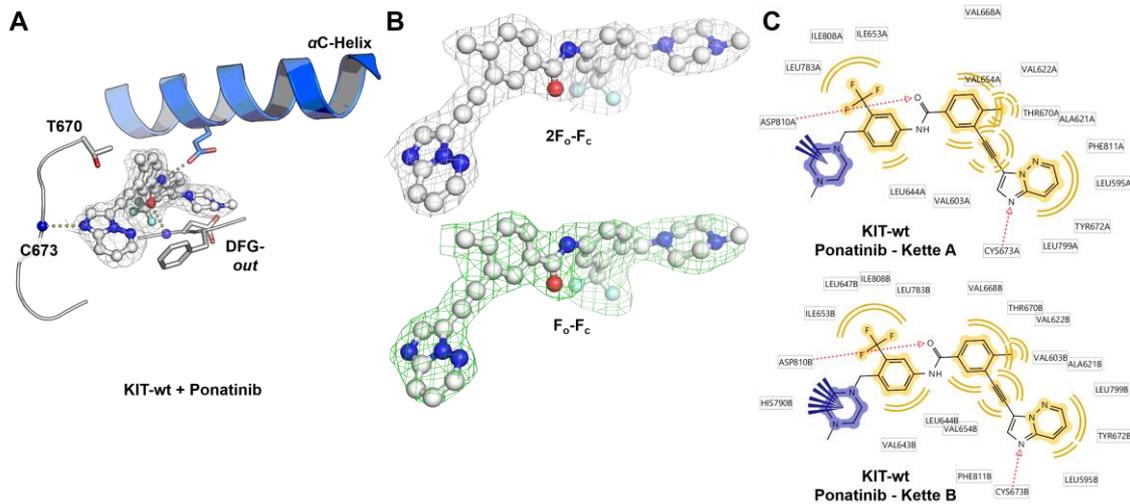


Abbildung 86: Elektronendichtekarten der Komplexstruktur von Ponatinib in KIT-wt. A: Übersicht des gebundenen Liganden. B: $[2F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0) - und *simulated annealing* $[F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 2,8)-omit-Elektronendichtekarten von Sunitinib. C: Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von Ponatinib gebunden an KIT-wt. Zur Erstellung der Pharmakophor-Modelle und der zugehörigen 2D-Visualisierung wurde LigandScout (v. 4.4.8) verwendet.

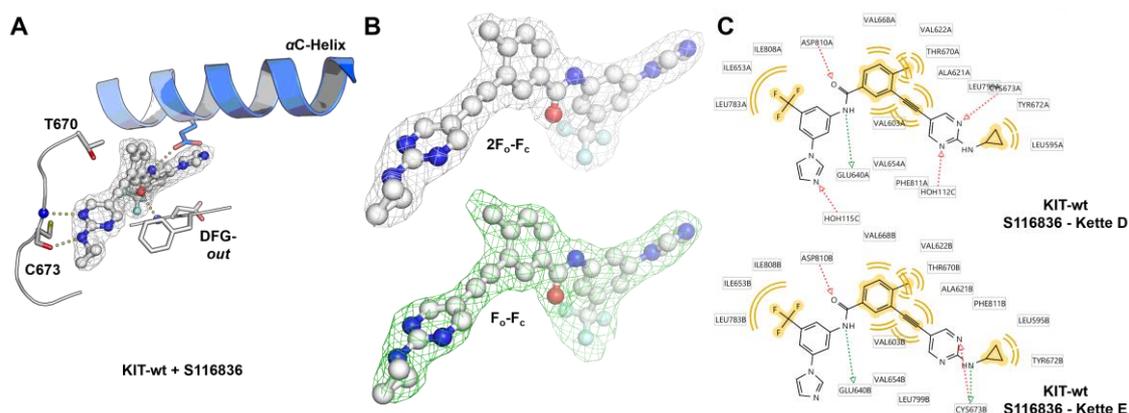


Abbildung 87: Elektronendichtekarten der Komplexstruktur von S116836 in KIT-wt. **A:** Übersicht des gebundenen Liganden. **B:** $[2F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0) - und *simulated annealing* $[F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 2,8)-omit-Elektronendichtekarten von S116836. **C:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von S116836 gebunden an KIT-wt. Zur Erstellung der Pharmakophor-Modelle und der zugehörigen 2D-Visualisierung wurde LigandScout (v. 4.4.8) verwendet.

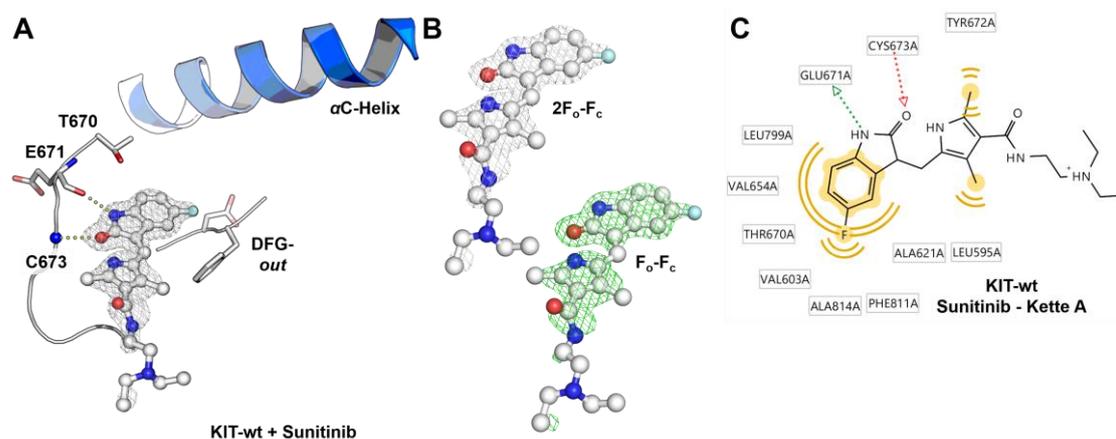


Abbildung 88: Elektronendichtekarten der Komplexstruktur von Sunitinib in KIT-wt. **A:** Übersicht des gebundenen Liganden. **B:** $[2F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0) - und *simulated annealing* $[F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 2,8)-omit-Elektronendichtekarten von Sunitinib. **C:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von Sunitinib gebunden an KIT-wt. Zur Erstellung der Pharmakophor-Modelle und der zugehörigen 2D-Visualisierung wurde LigandScout (v. 4.4.8) verwendet.

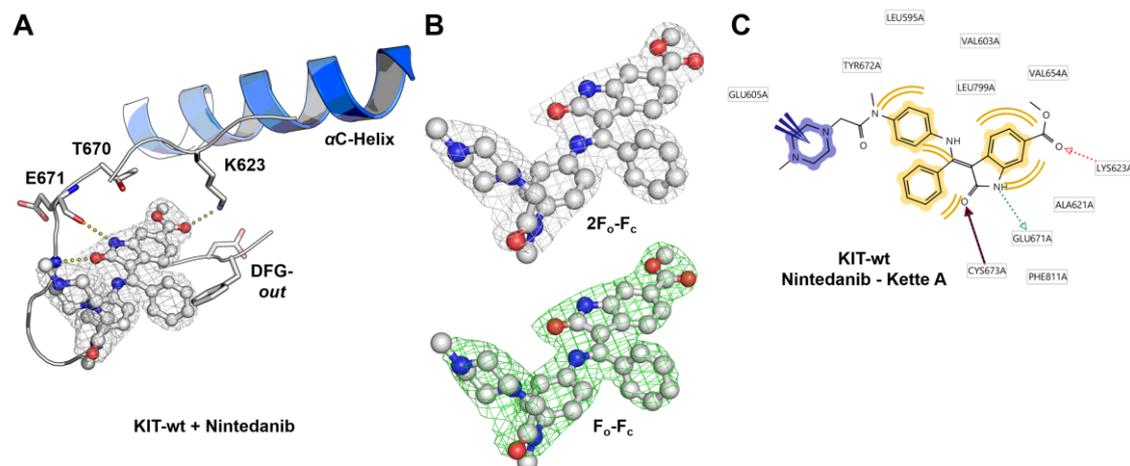


Abbildung 89: Elektronendichtekarten der Komplexstruktur von Nintedanib in KIT-wt. **A:** Übersicht des gebundenen Liganden. **B:** $[2F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0) - und *simulated annealing* $[F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 2,8)-omit-Elektronendichtekarten von Nintedanib. **C:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von Nintedanib gebunden an KIT-wt. Zur Erstellung der Pharmakophor-Modelle und der zugehörigen 2D-Visualisierung wurde LigandScout (v. 4.4.8) verwendet.

gebunden an KIT-wt. Zur Erstellung der Pharmakophor-Modelle und der zugehörigen 2D-Visualisierung wurde LigandScout (v. 4.4.8) verwendet.

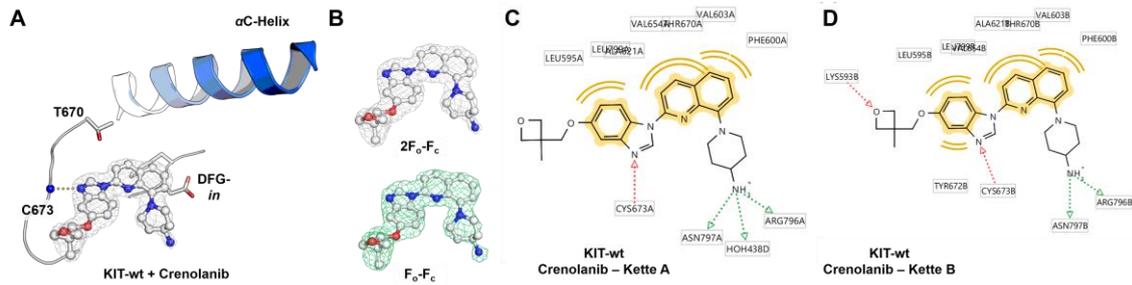


Abbildung 90: Elektronendichtekarten der Komplexstruktur von Crenolanib in KIT-wt. A: Übersicht des gebundenen Liganden. B: $[2F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0) - und *simulated annealing* $[F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 2,8)-omit-Elektronendichtekarten von Crenolanib. C: Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von Crenolanib gebunden an KIT-wt. Zur Erstellung der Pharmakophor-Modelle und der zugehörigen 2D-Visualisierung wurde LigandScout (v. 4.4.8) verwendet.

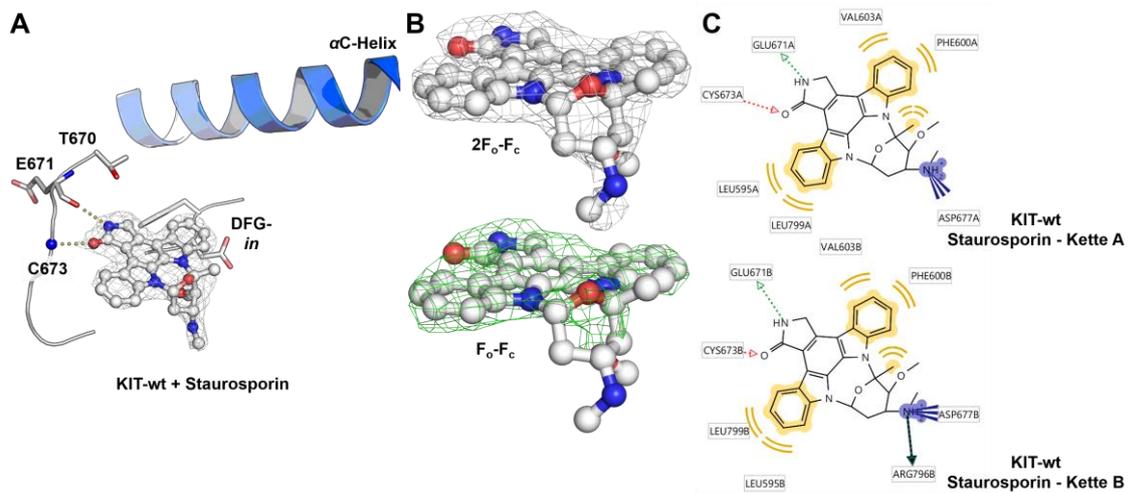


Abbildung 91: Elektronendichtekarten der Komplexstruktur von Staurosporin in KIT-wt. A: Übersicht des gebundenen Liganden. B: $[2F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0) - und *simulated annealing* $[F_o-F_c]$ (r.m.s.d. = 2,8)-omit-Elektronendichtekarten von Staurosporin. C: Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von Staurosporin gebunden an KIT-wt. Zur Erstellung der Pharmakophor-Modelle und der zugehörigen 2D-Visualisierung wurde LigandScout (v. 4.4.8) verwendet.

6.4.3 Kovalente Adressierung von KIT & PDGFRA

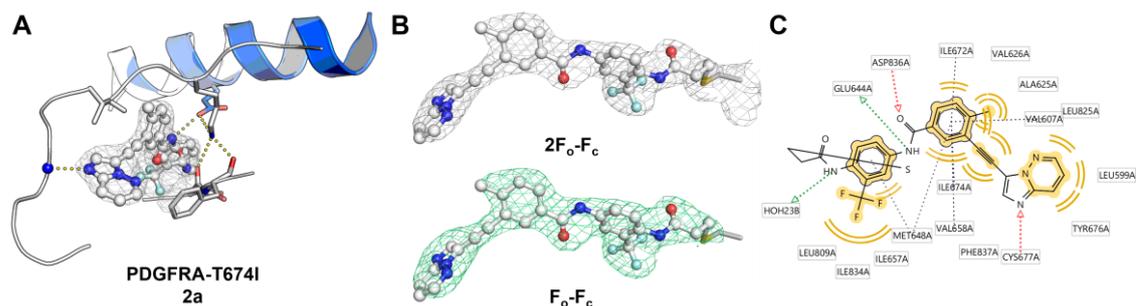


Abbildung 92: Elektronendichtekarten und 2D-Pharmakophor der Komplexstruktur von 2a in PDGFRA-T674I. A: Übersicht des gebundenen Liganden. B: $|2F_0-F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0)- und *simulated annealing* $|F_0-F_c|$ (r.m.s.d. = 2,8) -omit-Elektronendichtekarte von 2a. C: „d-Pharmakophor-Modell von 2a gebunden an PDGFRA-T674I. Generierung des Pharmakophor-Modells und der zugehörigen 2D-Visualisierung mit LigandScout (v. 4.4.8).

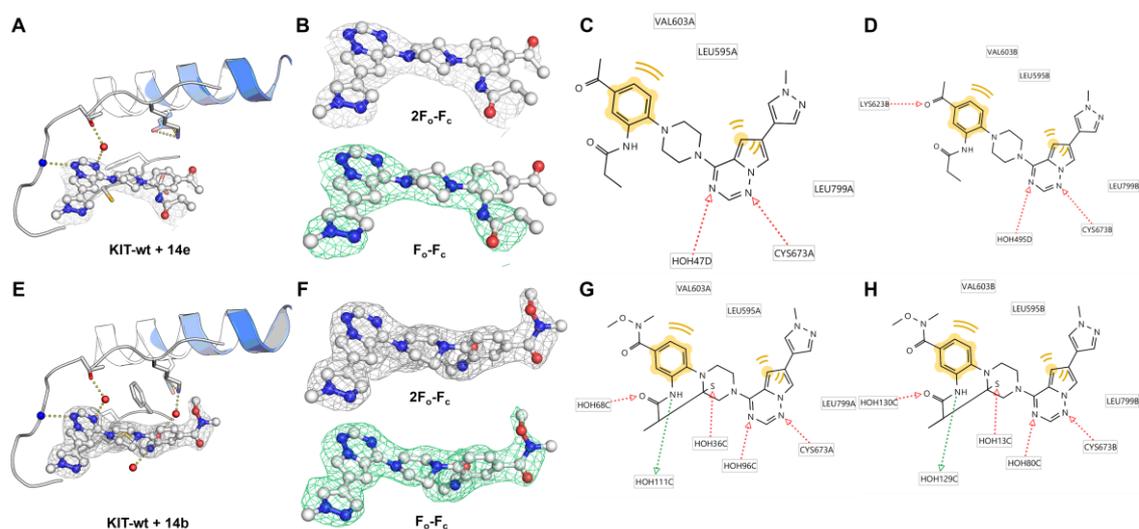


Abbildung 93: Elektronendichtekarten der Komplexstrukturen von 14e und 14b in KIT-wt. A: Übersicht des gebundenen Liganden 14e. B: $|2F_0-F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0)- und *simulated annealing* $|F_0-F_c|$ (r.m.s.d. = 2,8)-omit Elektronendichtekarte des Liganden 14e. C: Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von 14e gebunden an KIT-wt. D: Übersicht des gebundenen Liganden 14b. E: $|2F_0-F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0)- und *simulated annealing* $|F_0-F_c|$ (r.m.s.d. = 2,8)-omit-Elektronendichtekarte des Liganden 14b. F: Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von 14b gebunden an KIT-wt. Zur Erstellung der Pharmakophor-Modelle und der zugehörigen 2D-Visualisierung wurde LigandScout (v. 4.4.8) verwendet.

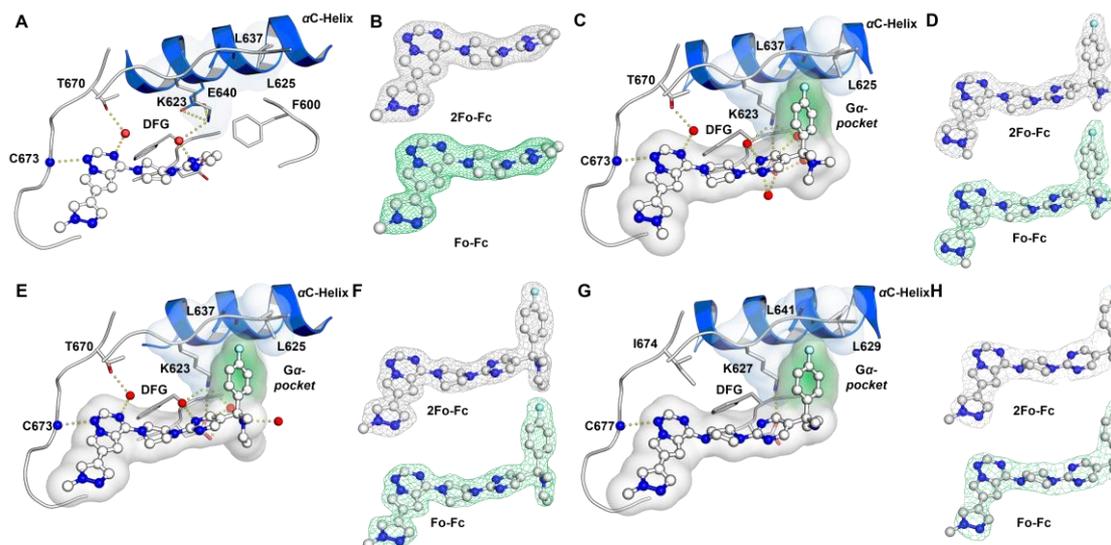


Abbildung 96: Kristallstrukturen von 12c, 15a und 15b im Komplex mit KIT-wt und 15b im Komplex mit KIT-wt und PDGFRA-T674I. A: Kristallstruktur von 12c im Komplex mit KIT-wt. B: $|2F_o-F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0) - und *simulated annealing* $|F_o-F_c|$ (r.m.s.d. = 2,8) - omit-Elektronendichtekarten von 12c im Komplex mit KIT-wt. C: Kristallstruktur von 15a im Komplex mit KIT-wt. D: $|2F_o-F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0) - und *simulated annealing* $|F_o-F_c|$ (r.m.s.d. = 2,8) - omit-Elektronendichtekarten von 15a im Komplex mit KIT-wt. E: Kristallstruktur von 15b im Komplex mit KIT-wt. F: $|2F_o-F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0) - und *simulated annealing* $|F_o-F_c|$ (r.m.s.d. = 2,8) - omit-Elektronendichtekarten von 15b im Komplex mit KIT-wt. G: Kristallstruktur von 15b im Komplex mit PDGFRA-T674I. H: $|2F_o-F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0) - und *simulated annealing* $|F_o-F_c|$ (r.m.s.d. = 2,8) - omit-Elektronendichtekarten von 15b im Komplex mit PDGFRA-T674I.

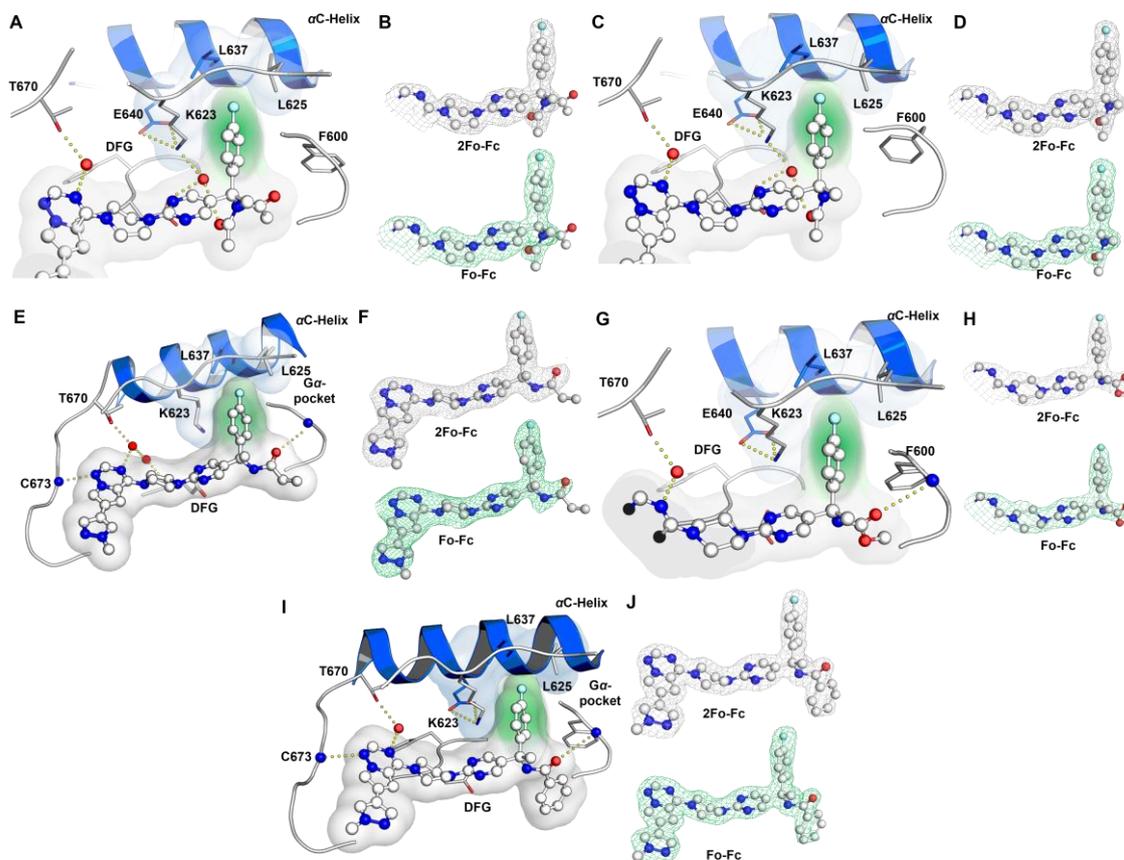


Abbildung 97: Kristallstrukturen von 16a, 16b, 16c und 16d im Komplex mit KIT-wt. A, C: Kristallstruktur von 16a im Komplex mit KIT-wt. B, D: $|2F_o-F_c|$ (r.m.s.d. = 1,0) - und *simulated annealing* $|F_o-F_c|$ (r.m.s.d. = 2,8) - omit-Elektronendichtekarten von 16a im Komplex mit KIT-wt. E: Kristallstruktur von 16b im Komplex mit KIT-wt.

F: $[2F_o - F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0) – und *simulated annealing* $|F_o - F_c|$ (r.m.s.d. = 2,8) – *omit*-Elektronendichtekarten von **16b** in Komplex mit KIT-wt. **G:** Kristallstruktur von **16c** im Komplex mit KIT-wt. **H:** $[2F_o - F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0) – und *simulated annealing* $|F_o - F_c|$ (r.m.s.d. = 2,8) – *omit*-Elektronendichtekarten von **16c** in Komplex mit KIT-wt. **I:** Kristallstruktur von **16d** im Komplex mit KIT-wt. **J:** $[2F_o - F_c]$ (r.m.s.d. = 1,0) – und *simulated annealing* $|F_o - F_c|$ (r.m.s.d. = 2,8) – *omit*-Elektronendichtekarten von **16d** in Komplex mit KIT-wt.

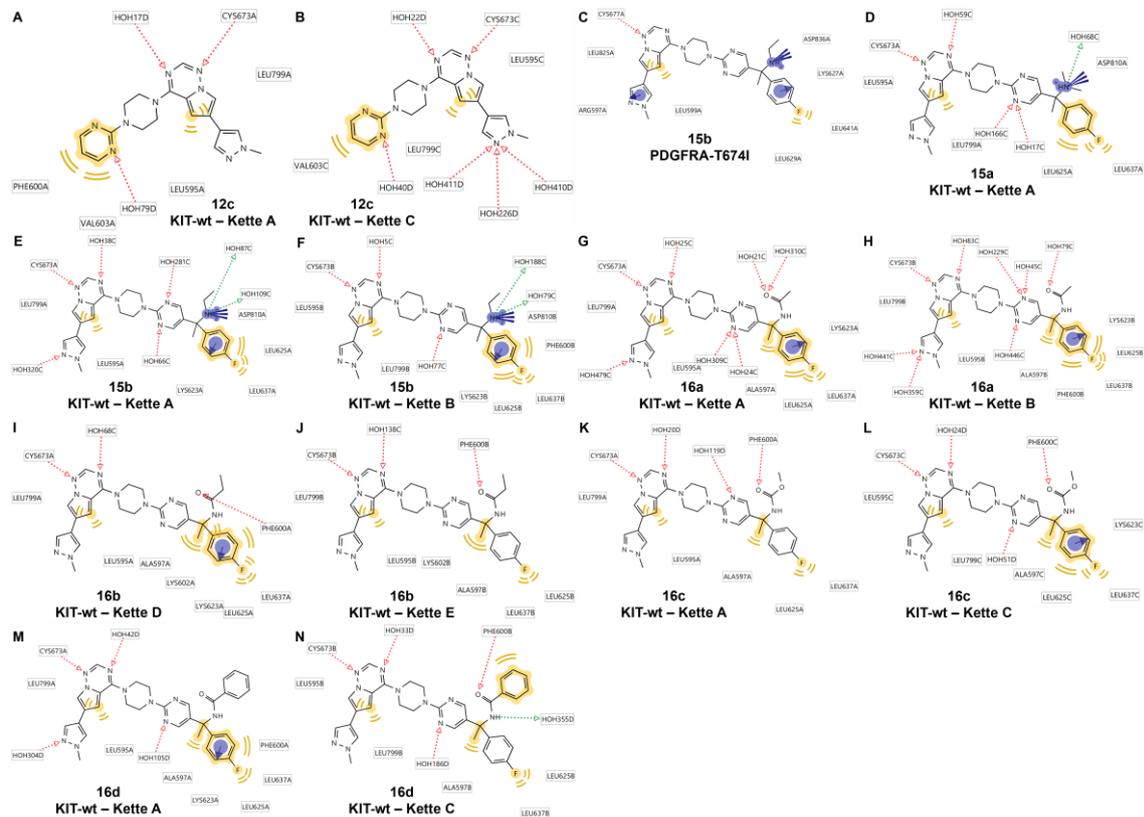


Abbildung 98: Visualisierung der 2D Pharmakophor-Modelle der Avapritinib-Derivate. A: Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **12c** gebunden in KIT-wt, Kette A. **B:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **12c** gebunden in KIT-wt, Kette B. **C:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **15a** gebunden in PDGFRA-T674I. **D:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **15b** gebunden in KIT-wt, Kette A. **E:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **15a** gebunden in KIT-wt, Kette A. **F:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **15a** gebunden in KIT-wt, Kette B. **G:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **16a** gebunden in KIT-wt, Kette A. **H:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **16a** gebunden in KIT-wt, Kette B. **I:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **16b** gebunden in KIT-wt, Kette D. **J:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **16b** gebunden in KIT-wt, Kette E. **K:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **16c** gebunden in KIT-wt, Kette A. **L:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **16c** gebunden in KIT-wt, Kette C. **M:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **16d** gebunden in KIT-wt, Kette A. **N:** Repräsentation pharmakophorischer Eigenschaften von **12c** gebunden in KIT-wt, Kette A.

6.5 Ursprung und Genotyp verwendeter Zelllinien

Tabelle 32: Genotypen und Ursprünge der verwendeten GIST-Zelllinien.

Zelllinie	Genotyp	Ursprung
GIST-T1	Primär aktivierende Mutation in KIT Exon 11 (RRID: CVCL_4976, V560_Y578del)	Etabliert von Takahiro Taguchi (Kochi University, Kochi, Japan)
T1-D816E	Primär aktivierende Mutation in KIT Exon 11, Sekundärmutation D816E (RRID: CVCL_A9N0)	Langzeit-Behandlung mit Imatinib von GIST-T1, Brian Rubin (Cleveland Clinic, OH)
T1-a-D842V	Endogene PDGFRA Primärmutation D842V	CRISPR/Cas9-medierte Gen-Editierung, Thomas Mühlenberg (WTZ Essen, Germany)
T1-a-G680R	Endogene PDGFRA Primärmutation D842V, Sekundärmutation G680R	CRISPR/Cas9-medierte Gen-Editierung, Thomas Mühlenberg (WTZ Essen, Germany)
GIST-48B	KIT/PDGFR unabhängige Zelllinie (RRID: CVCL_M441)	Etabliert von Jonathan Fletcher (Brigham and Women's Hospital, Boston, MA)

6.6 Datenstatistik-Tabellen der gelösten Kristallstrukturen

Tabelle 33: Datenstatistik-Tabelle der gelösten Strukturen von KIT-wt apo bzw. im Komplex mit Sunitinib oder Nintedanib. Sofern nicht anders angegeben, geben Zahlen in Klammern die entsprechenden Werte der höchsten Auflösungsschale wieder.

Datensammlung	KIT-wt apo	KIT-wt + Sunitinib	KIT-wt + Nintedanib
Raumgruppe	C 1 2 1 (5)	C 1 2 1 (5)	P 6 ₅ 2 2 (179)
Zellkonstanten			
a, b, c (Å)	99,28 69,32 56,13	97,77 69,82 55,93	54,35 54,35 456,07
α, β, γ (°)	90 117 90	90, 117, 90	90, 90, 120
Auflösung (Å)	43,94-2,0 (2,071-2,0)	43,42-1,50	46,82-2,4 (2,486-2,4)
R _{meas} (%)	10,59 (114,5)	5,0 (154,1)	16,23 (149,6)
I/σI	14,20 (1,95)	16,52 (0,97)	22,53 (3,13)
CC _{1/2}	99,8 (66,2)	99,9 (57,0)	99,9 (95,3)
Vollständigkeit (%)	99,93 (100)	95,35 (79,0)	99,79 (99,52)
Redundanz	6,90 (6,51)	6,8 (5,3)	36,70 (36,0)
Modellverfeinerung			
Auflösung (Å)	44,86-2,00 (2,09-2,00)	43,42-1,50 (1,53-1,50)	46,82-2,40 (2,55-2,40)
Anzahl der Reflexe	22871	51205	17006
R _{work} /R _{free}	0,2044/0,2357 (0,3444/0,3469)	0,186/0,211 (0,188/0,214)	0,2199/0,2604 (0,2839/0,3295)
Anzahl der Atome			
Protein	2364 (Kette A: 2364)	2425 (Kette A: 2425)	2472 (Kette A: 2472)
Ligand/Ion	8 (Kette C: 8)	38 (Kette A: 37, Kette B: 1)	40 (Kette A: 40)
Wasser	122	197	43
B-Faktoren (Å²)			
Protein	42,45 (Kette A: 42,45)	40,27 (Kette A: 40,27)	57,90 (Kette A: 57,90)
Ligand/Ion	46,92 (Kette C: 46,92)	59,59 (Kette B: 69,05, Kette B: 50,12)	53,62 (Kette A: 53,62)
Wasser	44,01	45,91	54,02
RMS-Abweichung			
Bindungslängen (Å)	0,004	0,005	0,002
Bindungswinkel (°)	0,602	0,764	0,47
Wellenlänge (Å)		0,999	
Temperatur (K)		100	
Röntgenquelle		Si (111)	
Detektor		EIGER2 16M	EIGER2 X 9M
Ramachandran Plot			
Outliers (%)	0	0	0
Erlaubt (%)	0,68	1,02	1,96
Favorisiert (%)	99,32	98,98	98,04

Tabelle 34: Datenstatistik-Tabelle der gelösten Strukturen von KIT-wt im Komplex mit Imatinib oder Ponatinib. Sofern nicht anders angegeben, geben Zahlen in Klammern die entsprechenden Werte der höchsten Auflösungsschale wieder.

Datensammlung	KIT-wt + Imatinib		KIT-wt + Ponatinib		KIT-wt + NDI-1	
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)		P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)		P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	
Zellkonstanten						
a, b, c (Å)	87,23 90,14, 90,86		88,01 90,61 91,41		56,61 58,43 190,13	
α, β, γ (°)	90 90 90		90 90 90		90 90 90	
Auflösung (Å)	45,43-1,85	(1,90-1,85)	45,71-2,20	(2,30-2,20)	38,87-2,33	(2,141-2,33)
R _{meas} (%)	10,2 (189,2)		15,1 (186,1)		11,18 (58,43)	
I/σI	14,30 (1,04)		10,58 (1,09)		20,17 (2,25)	
CC _{1/2}	99,0 (59,5)		99,3 (68,4)		99,9 (89,1)	
Vollständigkeit (%)	100 (100)		100 (99,9)		99,9 (99,9)	
Redundanz	13,62 (13,14)		13,54 (13,99)		13,03 (13,83)	
Modellverfeinerung						
Auflösung (Å)	40,38-1,85	(1,88-1,85)	45,31-2,20	(2,26-2,20)	37,38-2,33	(2,45-2,33)
Anzahl der Reflexe	61757		37740		20219	
R _{work} /R _{free}	0,1760/0,2073 (0,4084/0,4480)		0,2032/0,2301 (0,3818/0,3894)		0,2222/0,2605 (0,4733/0,2890)	
Anzahl der Atome						
Protein	4716 (Kette A: 2448, Kette B: 2268)		4655 (Kette A: 2419, Kette B: 2236)		4140 (Kette A: 2130, Kette C: 2010)	
Ligand	77 (Kette A: 37, Kette B: 37)		78 (Kette A: 39, Kette B: 39)		50 (Kette B: 25, Kette D: 25)	
Ion	3 (Kette C: 3)		4 (Kette D: 4)		--	
Wasser	420		177		58	
B-Faktoren (Å²)						
Protein	46,24 (Kette A: 41,66, Kette B: 51,52)		59,69 (Kette A: 54,67, Kette B: 65,6)		62,05 (Kette A: 56,20, Kette C: 68,26)	
Ligand	35,43 (Kette A: 30,52, Kette B: 39,79, Kette C: 35,7)		48,35 (Kette A: 42,82, Kette B: 53,88)		47,72 (Kette B: 47,70, Kette D: 47,75)	
Ion	--		56,89 (Kette D: 56,89)		--	
Wasser	46,83		53,63		58,76	
RMS-Abweichung						
Bindungslängen (Å)	0,007		0,003		0,003	
Bindungswinkel (°)	0,79		0,539		0,598	
Wellenlänge (Å)	1,000				0,999	
Temperatur (K)			100			
Röntgenquelle			Si (111)			
Detektor			EIGER2 16M			
Ramachandran Plot						
Outliers (%)	0		0		0	
Erlaubt (%)	2,06		2,24		2,53	
Favorisiert (%)	97,94		97,76		97,47	

Tabelle 35: Datenstatistik-Tabelle der gelösten Strukturen von KIT-wt im Komplex mit S116836, Staurosporin oder Crenolanib. Sofern nicht anders angegeben, geben Zahlen in Klammern die entsprechenden Werte der höchsten Auflösungsschale wieder.

Datensammlung	KIT-wt + S116836	KIT-wt Staurosporin	+ KIT-wt + Crenolanib
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Zellkonstanten			
a, b, c (Å)	87,63 90,79 91,11	59,04 59,34 192,34	59,54 59,53 191,41
α, β, γ (°)	90 90 90	90 90 90	90 90 90
Auflösung (Å)	45,4-2,1 (2,20-2,10)	43,61-2,3 (2,40-2,30)	47,85-1,85 (1,95-1,85)
R _{meas} (%)	13,2 (163,5)	11,5 (72,3)	11,4 (132,8)
I/σI	13,09 (1,64)	10,76 (2,39)	12,76 (2,30)
CC _{1/2}	99,9 (77,1)	99,6 (73,9)	99,6 (82,9)
Vollständigkeit (%)	100 (100)	98,9 (98,6)	99,9 (99,9)
Redundanz	13,61 (14,1)	5,72 (5,52)	12,96 (12,57)
Modellverfeinerung			
Auflösung (Å)	45,40-2,1 (2,15-2,1)	43,61-2,30 (2,37-2,30)	43,53-1,85 (1,88-1,85)
Anzahl der Reflexe	43069	30570	59012
R _{work} /R _{free}	0,1929/0,2179 (0,3096/0,3337)	0,1837/0,2081 (0,2709/0,2900)	0,1869/0,2085 (0,3192/0,3896)
Anzahl der Atome			
Protein	4575 (Kette A: 2386, Kette B: 2189)	4602 (Kette A: 2297, Kette B: 2305)	4801 (Kette A: 2413, Kette B: 2388)
Ligand/Ion	75 (Kette D: 37, Kette E: 37, Kette F: 1)	70 (Kette A: 35, Kette B: 35)	66 (Kette A: 33, Kette B: 33)
Wasser	243	185	393
B-Faktoren (Å²)			
Protein	52,03 (Kette A: 48,55, Kette B: 56,44)	46,46 (Kette A: 48,17, Kette B: 46,12)	40,92 (Kette A: 40,20, Kette B: 41,87)
Ligand/Ion	40,60 (Kette D: 35,76, Kette E: 45,43, Kette F: 40,87)	44,81 (Kette A: 48,88, Kette B: 40,73)	37,28 (Kette A: 36,44, Kette B: 38,11)
Wasser	49,51	44,18	43,38
RMS-Abweichung			
Bindungslängen (Å)	0,004	0,002	0,008
Bindungswinkel (°)	0,65	0,48	1,02
Wellenlänge (Å)	1,000	0,967	0,886
Temperatur (K)		100	
Röntgenquelle		Si (111)	
Detektor	EIGER2 16M	EIGER X 4M	EIGER2 16M
Ramachandran Plot			
Outliers (%)	0	0	0
Erlaubt (%)	1,57	3,64	1,89
Favorisiert (%)	98,43	96,36	98,11

Tabelle 36: Datenstatistik-Tabelle der gelösten Strukturen von KIT-wt im Komplex mit **14a** und **14b**. Sofern nicht anders angegeben, geben Zahlen in Klammern die entsprechenden Werte der höchsten Auflösungsschale wieder.

Datensammlung	KIT-wt + IDRX-42	KIT-wt + 14e	KIT-wt + 14b
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Zellkonstanten			
a, b, c (Å)	58,70 59,29 192,46	58,63 58,73 193,59	59,66 59,2 193
α, β, γ (°)	90 90 90	90 90 90	90 90 90
Auflösung (Å)	48,12-2,00 (2,10-2,0)	43,4-2,15 (2,20-2,15)	32,41-2,15 (2,27-2,15)
R _{meas} (%)	7,4 (112,2)	7,7 (160,6)	8,99 (165,8)
I/σI	11,79 (1,53)	19,71 (1,78)	18,49 (1,64)
CC _{1/2}	99,8 (77,9)	100 (85,6)	99,9 (73,1)
Vollständigkeit (%)	99,1 (97,0)	100 (100)	99,94 (99,97)
Redundanz	5,51 (5,44)	13,44 (13,92)	13,4 (14,0)
Modellverfeinerung			
Auflösung (Å)	48,12-2,00 (2,04-2,00)	41,49-2,15 (2,21-2,15)	35,18-2,15 (2,20-2,15)
Anzahl der Reflexe	45940	37257	38088
R _{work} /R _{free}	0,2015/0,2288 (0,3196/0,3219)	0,2140/0,2322 (0,3488/0,4060)	0,2021/0,2251 (0,2930/0,3143)
Anzahl der Atome			
Protein	4401 (Kette A: 2157, Kette B: 2244)	4496 (Kette A: 2325, Kette B: 2171)	4573 (Kette A: 2298, Kette B: 2275)
Ligand	152 (Kette A: 38, Kette B: 114)	70 (Kette A: 35, Kette B: 35)	76 (Kette E: 38, Kette F: 38)
Ion	2		
Wasser	109	117	154
B-Faktoren (Å²)			
Protein	57,32 (Kette A: 61,87, Kette B: 53,94)	64,82 (Kette A: 62,93, Kette B: 68,68)	59,57 (Kette A: 58,96, Kette B: 61,44)
Ligand	72,56 (Kette A: 60,87, Kette B: 76,46)	74,67 (Kette A: 67,45, Kette B: 81,88)	52,98 (Kette E: 51,05, Kette F: 54,92)
Ion	89,08	60,49	55,66
Wasser	55,34		
RMS-Abweichung			
Bindungslängen (Å)	0,005	0,007	0,003
Bindungswinkel (°)	0,622	0,89	0,52
Wellenlänge (Å)	0,91881	0,999	1,000
Temperatur (K)	100		100
Röntgenquelle	Si (111)		Si (111)
Detektor	EIGER2 X 9M		EIGER2 16M
Ramachandran Plot			
Outliers (%)	0	0	0
Erlaubt (%)	1,64	1,24	174
Favorisiert (%)	98,36	98,76	98,26

Tabelle 37: Datenstatistik-Tabelle der gelösten Strukturen von KIT-wt und -T670I im Komplex mit Avapritinib, oder KIT-wt im Komplex mit **12c**. Sofern nicht anders angegeben, geben Zahlen in Klammern die entsprechenden Werte der höchsten Auflösungsschale wieder.

Datensammlung	KIT-WT + Avapritinib (PDB-ID: 8PQ9)	KIT-T670I + Avapritinib (PDB-ID: 8PQG)	KIT-WT + 12c (PDB- ID: 8PQA)
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Zellkonstanten			
a, b, c (Å)	59,02 59,30 191,76	58,75 59,09 192,42	58,76 58,88 193,41
α, β, γ (°)	90 90 90	90 90 90	90 90 90
Auflösung (Å)	47,94-1,70 (1,80- 1,70)	48,11-2,40 (2,50- 2,40)	43,48-1,65 (1,70- 1,65)
R _{meas} (%)	5,7 (139,1)	10 (170,9)	6,1 (260,6)
I/σI	22,42 (1,89)	14,36 (1,21)	19,49 (0,88)
CC _{1/2}	100 (99,9)	99,8 (99,5)	100 (99,8)
Vollständigkeit (%)	99,9 (89,5)	99,9 (55,7)	100 (77,9)
Redundanz	13,37 (13,43)	10,92 (8,27)	13,38 (13,68)
Modellverfeinerung			
Auflösung (Å)	35,00-1,70 (1,72- 1,70)	48,10-2,40 (2,49- 2,40)	38,21-1,65 (1,67- 1,65)
Anzahl der Reflexe	74920	27015	81530
R _{work} /R _{free}	0,1905/0,2044 (0,5068/0,4994)	0,2061/0,2311 (0,3354/0,3866)	0,1877/0,2140 (0,5886/0,5600)
Anzahl der Atome			
Protein	4667 (Kette A: 2327, Kette C: 2340) 79 (Kette B: 37, Kette D: 37, Kette F: 5)	4614 (Kette A: 2274, Kette C: 2340) 75 (Kette D: 37, Kette E: 37)	4696 (Kette A: 2323, Kette C: 2373) 54 (Kette B: 27, Kette E: 27)
Ligand/Ion			
Wasser	486	42	475
B-Faktoren (Å²)			
Protein	40,88 (Kette A: 41,84, Kette C: 41,11)	67,71 (Kette A: 69,56, Kette C: 67,35)	44,79 (Kette A: 47,06, Kette C: 43,56)
Ligand/Ion	38,21 (Kette B: 39,56, Kette D: 36,05, Kette F: 44,24)	61,53 (Kette D: 65,34, Kette E: 57,72)	42,48 (Kette B: 46,54, Kette E: 38,42)
Wasser	47,88	64,18	48,09
RMS-Abweichung			
Bindungslängen (Å)	0,006	0,004	0,010
Bindungswinkel (°)	0,873	0,586	0,986
Wellenlänge (Å)	0,999	1,000	0,999
Temperatur (K)		100	
Röntgenquelle		Si (111)	
Detektor		EIGER2 16M	
Ramachandran Plot			
Outliers (%)	0	0	0
Erlaubt (%)	1,36	2,59	2,23
Favorisiert (%)	98,64	97,41	97,77

Tabelle 38: Datenstatistik-Tabelle der gelösten Strukturen von KIT-wt im Komplex mit **15a**, **15b** oder **16a**. Sofern nicht anders angegeben, geben Zahlen in Klammern die entsprechenden Werte der höchsten Auflösungsschale wieder.

Datensammlung	KIT-WT + 15a (PDB-ID: 8PQB)	KIT-WT + 15b (PDB-ID: 8PQC)	KIT-WT + 16a (PDB-ID: 8PQD)
Raumgruppe	P 3 ₁ 2 1 (152)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Zellkonstanten			
a, b, c (Å)	55,67 55,67 186,08	59,22 59,22 192,60	59,39 59,37 192,89
α, β, γ (°)	90 90 120	90 90 90	90 90 90
Auflösung (Å)	48,21-1,87 (1,90-1,87)	48,15-1,77 (1,80-1,77)	48,22-1,50 (1,60-1,50)
R _{meas} (%)	7,8 (156,0)	12,9 (169,1)	7,7 (126,5)
I/σI	21,19 (2,03)	17,03 (1,48)	16,16 (2,02)
CC _{1/2}	100 (100)	100 (99,5)	99,0 (98,6)
Vollständigkeit (%)	99,9 (75,3)	99,9 (61,3)	99,9 (84,5)
Redundanz	18,15 (18,48)	11,60 (6,72)	13,90 (14,36)
Modellverfeinerung			
Auflösung (Å)	46,67-1,87 (1,94-1,87)	43,53-1,77 (1,80-1,77)	41,99-1,50 (1,52-1,50)
Anzahl der Reflexe	28621	67004	108872
R _{work} /R _{free}	0,1980/0,2339 (0,3819-0,3964)	0,1814/0,2063 (0,3910-0,4003)	0,1746/0,1943 (0,2941/0,3373)
Anzahl der Atome			
Protein	2217 (Kette A: 2217)	4727 (Kette A: 2373, Kette B: 2354)	4762 (Kette A: 2369, Kette B: 2393)
Ligand/Ion	39 (Kette B: 39)	78 (Kette D: 39, Kette E: 39)	84 (Kette D: 44, Kette E: 40)
Wasser	154	317	602
B-Faktoren (Å²)			
Protein	41,24 (Kette A: 41,24)	33,78 (Kette A: 34,35, Kette B: 34,20)	33,84 (Kette A: 33,92, Kette B: 34,76)
Ligand/Ion	36,83 (Kette B: 36,83)	29,43 (Kette D: 28,35, Kette E: 30,50)	33,84 (Kette A: 33,92, Kette B: 34,76)
Wasser	42,87	37,11	41,73
RMS-Abweichung			
Bindungslängen (Å)	0,005	0,008	0,008
Bindungswinkel (°)	0,76	0,944	0,864
Wellenlänge (Å)	0,873	0,873	0,976
Temperatur (K)		100	
Röntgenquelle		Si (111)	
Detektor	PILATUS	PILATUS	EIGER2 16M
Ramachandran Plot			
Outliers (%)	0	0	0
Erlaubt (%)	1,10	1,72	1,87
Favorisiert (%)	98,90	98,28	98,13

Tabelle 39: Datenstatistik-Tabelle der gelösten Strukturen von KIT-wt im Komplex mit **16b**, **16c** oder **16d**. Sofern nicht anders angegeben, geben Zahlen in Klammern die entsprechenden Werte der höchsten Auflösungsschale wieder.

Datensammlung	KIT-WT + 16b (PDB-ID: 8PQE)	KIT-WT + 16c (PDB-ID: 8PQF)	KIT-wt + 16d
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Zellkonstanten			
a, b, c (Å)	58,97 62,52 191,60	58,09 59,25 191,83	58,82 59,23 193,10
α, β, γ (°)	90 90 90	90 90 90	90 90 90
Auflösung (Å)	44,69-2,00 (2,10-2,00)	47,96-1,90 (2,00-1,90)	43,59-1,65 (1,70-1,65)
R _{meas} (%)	6,7 (225,0)	9,4 (159,7)	6,9 (185,1)
I/σI	19,57 (1,22)	14,58 (1,53)	17,37 (1,35)
CC _{1/2}	100 (100)	100 (100)	99,9 (79,6)
Vollständigkeit (%)	100 (70,1)	99,9 (73,8)	99,9 (100)
Redundanz	13,28 (13,98)	13,36 (12,86)	13,31 (13,80)
Modellverfeinerung			
Auflösung (Å)	44,69-2,00 (2,04-2,00)	43,00-1,90 (1,93-1,90)	43,58-1,65 (1,67-1,65)
Anzahl der Reflexe	48818	53176	82066
R _{work} /R _{free}	0,2135/0,2556 (0,4123/0,4374)	0,1957/0,2186 (0,3447/0,3412)	0,1891/0,2119 (0,4019/0,3991)
Anzahl der Atome			
Protein	4382 (Kette A: 2173, Kette B: 2209)	4667 (Kette A: 2329, Kette C: 2338)	4727 (Kette A: 2375, Kette B: 2352)
Ligand	86 (Kette D: 41, Kette E: 41, Kette A: 4)	82 (Kette B: 41, Kette E: 41)	90 (Kette A: 45, Kette B: 45)
Ion	2 (Kette G: 1, Kette F: 1)	--	--
Wasser	137	284	342
B-Faktoren (Å²)			
Protein	62,57 (Kette A: 61,02, Kette B: 64,99)	47,60 (Kette A: 49,77, Kette C: 46,35)	43,05 (Kette A: 43,61, Kette B: 43,25)
Ligand	63,84 (Kette D: 64,82, Kette E: 61,77, Kette A: 74,89)	45,61 (Kette B: 47,89, Kette E: 43,32)	42,11 (Kette A: 45,03, Kette B: 39,19)
Ion	59,83 (Kette G: 72,37, Kette F: 47,29)	--	--
Wasser	60,95	49,33	47,22
RMS-Abweichung			
Bindungslängen (Å)	0,004	0,003	0,006
Bindungswinkel (°)	1,015	0,634	0,859
Wellenlänge (Å)	0,999	1,000	0,886
Temperatur (K)		100	
Röntgenquelle		Si (111)	
Detektor		EIGER2 16M	
Ramachandran Plot			
Outliers (%)	0	0	0
Erlaubt (%)	0,73	1,56	2,08
Favorisiert (%)	99,27	98,44	97,92

Tabelle 40: Datenstatistik-Tabelle der gelösten Strukturen von PDGFRA-wt und -T674I apo. Sofern nicht anders angegeben, geben Zahlen in Klammern die entsprechenden Werte der höchsten Auflösungsschale wieder.

Datensammlung	PDGFRA-wt (PDB-ID: 8PQJ)	apo	PDGFRA-T674I (PDB-ID: 8PQK)	apo	PDGFRA-T674I + Avapritinib (PDB-ID: 8PQH)
Raumgruppe	C 1 2 1 (5)		C 1 2 1 (5)		P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)
Zellkonstanten					
a, b, c (Å)	96,38 49,18 77,04		95,90 49,02 76,98		52,27 73,26 102,59
α, β, γ (°)	90 100,78 90		90 100,70 90		90 100,69 90
Auflösung (Å)	47,34-1,82	(1,90-	47,12-2,00	(2,10-	46,57-2,50 (2,60-
	1,82)		2,00)		2,50)
R _{meas} (%)	8,7 (171,3)		12,9 (85,1)		8,0 (149,9)
I/σI	12,45 (1,21)		9,24 (2,04)		18,79 (2,06)
CC _{1/2}	99,9 (100)		99, (98,1)		100 (100)
Vollständigkeit (%)	99,9 (46,1)		99,7 (78,2)		99,9 (77,0)
Redundanz	6,84 (6,52)		6,82 (6,69)		13,09 (13,67)
Modellverfeinerung					
Auflösung (Å)	37,84-1,82	(1,88-	43,81-2,00(2,08-2,00)		46,57-2,5 (2,60-2,50)
	1,82)				
Anzahl der Reflexe	31998		23797		14174
R _{work} /R _{free}	0,1838/0,2151		0,1960/0,2219		0,2184/0,2486
	(0,4402/0,4581)		(0,3095/0,3573)		(0,3543/0,3967)
Anzahl der Atome					
Protein	2632 (Kette A: 2632)		2579 (Kette A: 2579)		2430 (Kette A: 2430)
Ligand	--		--		44 (Kette B: 37, Kette D: 7)
Wasser	204		138		23
B-Faktoren (Å²)					
Protein	40,20 (Kette A: 40,20)		37,36 (Kette A: 37,36)		80,52 (Kette A: 80,52)
Ligand	--		--		74,59 (Kette B: 72,65, Kette D: 84,89)
Wasser	44,63		41,17		74,69
RMS-Abweichung					
Bindungslängen (Å)	0,005		0,002		0,009
Bindungswinkel (°)	0,776		0,473		1,004
Wellenlänge (Å)	0,999		1,000		1,000
Temperatur (K)			100		
Röntgenquelle			Si (111)		
Detektor			EIGER2 16M		
Ramachandran Plot					
Outliers (%)	0		0		0
Erlaubt (%)	0,93		1,27		2,54
Favorisiert (%)	99,07		98,73		97,46

Tabelle 41: Datenstatistik-Tabelle der gelösten Strukturen von PDGFRA-T674I im Komplex mit Avapritinib oder **15b**. Sofern nicht anders angegeben, geben Zahlen in Klammern die entsprechenden Werte der höchsten Auflösungsschale wieder.

Datensammlung	PDGFRA-T674I + 15b (PDB-ID: 8PQI)	PDGFRA-T674I + NDI- 1	PDGFRA-T674I + 2a
Raumgruppe	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	P 6 (168)
Zellkonstanten			
a, b, c (Å)	52,39 74,04 102,26	52,29 73,22 101,07	135,92 135,92 34,69
α, β, γ (°)	90,00 90,00 90,00	90 90 90	90 90 120
Auflösung (Å)	46,63-2,60 (2,70-2,6)	46,47-2,26 (2,50-2,26)	44,49-2,20 (2,30-2,20)
R _{meas} (%)	11,8 (160,7)	9,6 (158,2)	9,0 (120,5)
I/σI	12,39 (1,80)	15,93 (1,74)	19,17 (2,89)
CC _{1/2}	98,3 (99,9)	99,9 (80,9)	99,9 (84,7)
Vollständigkeit (%)	99,8 (87,6)	100 (99,9)	100 (100)
Redundanz	13,05 (13,54)	13,1 (12,3)	20,0 (20,7)
Modellverfeinerung			
Auflösung (Å)	46,63-2,60 (2,86-2,60)	41,61-2,27 (2,45-2,27)	33,98-2,20 (2,32-2,20)
Anzahl der Reflexe	12197	13254	19061
R _{work} /R _{free}	0,2320/0,2540 (0,3184/0,3117)	0,2206/0,2393 (0,3570/0,3050)	0,1860/0,2172 (0,2484/0,2989)
Anzahl der Atome			
Protein	2352 (Kette A: 2352)	2235 (Kette A: 2235)	2188 (Kette A: 2188)
Ligand	46 (Kette D: 39, Kette C: 7)	32 (Kette B: 25, Kette D: 7)	36 (Kette C: 36)
Wasser	8	78	60
B-Faktoren (Å²)			
Protein	79,69 (Kette A: 79,69)	60,88 (Kette A: 60,88)	65,04 (Kette A: 65,04)
Ligand	76,75 (Kette D: 73,29, Kette C: 96,07)	60,59 (Kette B: 58,04, Kette D: 69,71)	55,88 (Kette C: 55,88)
Wasser	69,97	60,55	59,50
RMS-Abweichung			
Bindungslängen (Å)	0,002	0,003	0,006
Bindungswinkel (°)	0,594	0,519	0,798
Wellenlänge (Å)	1,000	0,999	
Temperatur (K)		100	
Röntgenquelle		Si (111)	
Detektor		EIGER2 16M	
Ramachandran Plot			
Outliers (%)	0	0	0
Erlaubt (%)	2,39	3,87	0,72
Favorisiert (%)	97,61	96,13	99,28

Danksagung

Mein erster und größter Dank gilt Prof. Dr. Daniel Rauh, welcher mir dieses großartige und spannende Projekt gegeben hat. Durch die immerwährende Unterstützung konnte ich viele Freiheiten genießen und das gesamte Projekt auf biologischer Seite selbst gestalten. Außerdem danke ich Ihm für die Ausdauer und Geduld.

Ein weiterer Dank gilt Prof. Dr. Sebastian Bauer. Nicht nur für die Übernahme des Korreferats, sondern auch für die enge und einzigartige Zusammenarbeit, die wir über die Jahre entwickelt haben, bin ich unendlich dankbar. Die medizinischen Einblicke haben auch mein Projekt zu großen Teilen beeinflusst und vorangetrieben.

Insgesamt möchte ich der gesamten AG Rauh für die vielen angenehmen Stunden im Laboralltag, aber auch neben der Arbeit danken. Ein besonderer Dank gilt hier dem GIST-Team, welches über die Zeit unterschiedliche Mitglieder beinhaltete: Ina, Rajesh, Jonas und Jonas, Julia, Tom, Giorgia, Frederik, Daniel, Adina, Andrea, Maria, Hannah. Ebenfalls danke ich explizit meinen Masterstudenten Frederik Schramm und Daniel Busick für ihre Beiträge zu dieser Dissertation.

Weiterhin möchte ich unseren helfenden Händen danken, die vor allem auch neben der Laborarbeit im Hintergrund viele unterschiedliche Dinge für uns regeln und uns immer helfen: Martina Reibner, Maria Sergani, Alicia Wachholz, Ulrich Schoppe, Petra Alhorn und Andreas Arndt. Letzterem möchte ich besonders für die Übernahme der biochemischen Assays während des letzten Jahres meiner Promotion danken.

An dieser Stelle gilt mein Dank auch externen helfenden Händen: Dr. Raphael Gasper-Schönenbrücher danke ich für die Regelung aller aufkommenden Angelegenheiten im Bezug auf Kristallisation und die vielen Messungen am Synchrotron. Auch der ZE Biotechnologie des MPI Dortmund möchte ich für die Generierung der Viren für die Insektenzellexpression danken. Ein weiterer großer Dank gilt auch Eva Sandbothe und Jens Warmers, die bei allen Fragen und Problemen im Bezug auf die Velos zur Verfügung standen und stets Zeit fanden, mir zu helfen, wo es nur ging. Auch bedanken möchte ich mich bei Dr. Mia-Lisa Zischinsky für die Vermessung der MDCKII-MDR1-Daten.

Besonderer Dank gilt ebenfalls Dr. Sonja Sievers des COMAS am MPI Dortmund für die vielen zellulären Experimente und die vielseitigen *Screening*-Möglichkeiten. Hier möchte ich mich ebenfalls bei der gesamten AG Bauer für die gesamte Kooperationsarbeit danken. Jedes einzelne Meeting mit dem gesamten GIST-Team war besonders, man hat immer etwas dazu gelernt und einen anderen Blickwinkel auf das gesamte Gebiet erhalten.

Auch die FORTRESS-Meetings haben mich sehr bereichert und haben viel Spaß gemacht, auch neben dem wissenschaftlichen Programm. Dank gilt hier vor allem: Dr. Thomas Mühlenberg, Julia Ketzler, Ben Fletcher, Dr. Johanna Falkenhorst und allen weiteren Laborzugehörigen.

Auch neben dem Labor gab es Personen in der Arbeitsgruppe, die immer ein offenes Ohr hatten, wenn mal alles zu viel wurde und die mir immer zur Seite standen. Dr. Matthias P. Müller, welcher mir nicht nur fachlich bei Fragen zur Kristallisation weitergeholfen hat, sondern der mich auch bei allem zur Velos unterstützt hat, immer ein offenes Ohr hatte und mich immer wieder aufgebaut hat. Danke! Dr. Janina Niggenaber, mit der ich im Labor, aber auch im Büro, im Kaffeeraum und auch im privaten Umfeld viele Stunden verbringen durfte und der ich bei allen Themen ein Ohr abkauen konnte. Danke!

Für die Durchsicht dieser Arbeit bedanke ich mich herzlich bei Dr. Janina Niggenaber und Dr. Jörn Weisner.

Aber auch neben der Arbeit gab es eine Reihe an Personen, die immer zu mir gehalten und mich immer weiter unterstützt haben, selbst wenn ich mal für drei Monate kein Lebenszeichen von mir gegeben habe, weil ich mich in der Arbeit verkrochen habe. Von meinen Freunden konnte ich immer auf ehrliche Meinungen und Ratschläge vertrauen, was diese Freundschaften so wertvoll macht. Danke an die famosen 2-23, die Eierschädel und die Minions. Ohne Euch hätte ich all' das nicht geschafft!

Mein letzter und größter Dank gilt den Personen, die mich auf dem vollständigen Weg begleitet und alle Höhen und Tiefen miterlebt haben. Ich weiß, ihr hattet es nicht immer leicht mit mir über die letzten Jahre: meine Eltern und meine Familie. Danke!

*“Success is not a doorway,
It’s a staircase.”*

Dottie Walters

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Name, Vorname
(Surname, first name)

Matrikel-Nr.
(Enrolment number)

Belehrung:

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

Die Abgabe einer falschen Versicherung an Eides statt ist strafbar.

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

Die oben stehende Belehrung habe ich zur Kenntnis genommen:

Official notification:

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

The submission of a false affidavit is punishable.

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

I have taken note of the above official notification.

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)

Titel der Dissertation:
(Title of the thesis):

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

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

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

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

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

Ort, Datum
(Place, date)

Unterschrift
(Signature)