

DISSERTATION

Kristallisation und strukturebiologische Charakterisierung klinisch-relevanter Mutationsvarianten der Rezeptor- Tyrosinkinasen EGFR und Her2

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktorin der Naturwissenschaften, Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

Technische Universität Dortmund, Fakultät für Chemie und Chemische Biologie

Vorgelegt von: Janina Niggenaber
geb. 22.05.1991 in Lengerich

Dortmund, 2021

1. Gutachter: Prof. Dr. Daniel Rauh
2. Gutachter: Prof. Dr. Carsten Watzl

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

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Publikationen entstanden:

⁺Diese Autoren trugen gleichermaßen zur Publikation bei.

J. Niggenaber⁺, J. Hardick⁺, J. Lategahn, D. Rauh. Structure Defines Function: Clinically Relevant Mutations in ErbB Kinases. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 40-51.

J. Lategahn, M. Keul, P. Klövekorn, H. L. Tumbrink, **J. Niggenaber**, M. P. Müller, L. Hodson, M. Flasshoff, J. Hardick, T. Grabe, J. Engel, C. Schultz-Fademrecht, M. Baumann, J. Ketzer, T. Mühlenberg, W. Hiller, G. Günther, A. Unger, H. Müller, A. Heimsoeth, C. Golz, B. Blank-Landeshammer, L. Kollipara, R. P. Zahedi, C. Strohmann, J. G. Hengstler, W. A. L. van Otterlo, S. Bauer, D. Rauh. Inhibition of Osimertinib-Resistant Epidermal Growth Factor Receptor EGFR-T790M/C797S. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10789-10801.

J. Lategahn⁺, J. Hardick⁺, T. Grabe⁺, **J. Niggenaber**⁺, K. Jeyakumar, M. Keul, H. L. Tumbrink, C. Becker, L. Hodson, T. Kirschner, P. Klövekorn, J. Ketzer, M. Baumann, S. Terheyden, A. Unger, J. Weisner, M. P. Müller, W. A. L. van Otterlo, S. Bauer, D. Rauh. Targeting Her2-insYVMA with Covalent Inhibitors – A Focused Compound Screening and Structure-Based Design Approach. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 11725-11755.

J. Niggenaber, L. Heyden, T. Grabe, M. P. Müller, J. Lategahn, D. Rauh. Complex Crystal Structures of EGFR with Third-Generation Kinase Inhibitors and Simultaneously Bound Allosteric Ligands. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 2484-2490.

Im Zeitraum dieser Arbeit wurden 47 finale Kristallstrukturen generiert. Davon sind bisher zwölf in der *Protein Data Bank* (PDB) publiziert:

PDB-ID	Titel
6S8A	Crystal Structure of EGFR-T790M/C797S in Complex with Covalent Pyrrolopyrimidine 19h
6S89	Crystal Structure of EGFR-T790M/C797S in Complex with Covalent Pyrrolopyrimidine 19g
6TFU	Crystal Structure of EGFR T790M/V948R in Complex with Covalent Pyrrolopyrimidine 14d
6TFV	Crystal Structure of EGFR T790M/V948R in Complex with Covalent Pyrrolopyrimidine 18b
6TFW	Crystal Structure of EGFR T790M/V948R in Complex with Covalent Pyrrolopyrimidine 18d
6TFY	Crystal Structure of EGFR T790M/V948R in Complex with Covalent Pyrrolopyrimidine 18c
6TFZ	Crystal Structure of EGFR T790M/V948R in Complex with Covalent Pyrrolopyrimidine 19
6TG0	Crystal Structure of EGFR T790M/V948R in Complex with Covalent Pyrrolopyrimidine 21a
6TG1	Crystal Structure of EGFR T790M/V948R in Complex with Covalent Pyrrolopyrimidine 21b
6Z4B	Crystal Structure of EGFR-T790M/V948R in Complex with Osimertinib and EAI045
6Z4D	Crystal Structure of EGFR-T790M/V948R in Complex with Mavelertinib and EAI001
7A2A	Crystal Structure of EGFR-T790M/V948R in Complex with Spebrutinib and EAI001

DANKSAGUNG

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Daniel Rauh für die interessante Aufgabenstellung sowie die gute Betreuung während meiner Dissertation. Prof. Dr. Carsten Watzl möchte ich für die Übernahme des Koreferats herzlich danken.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Jonas Lategahn, Dr. Marina Keul, Tobias Grabe, Kirujan Jeyakumar und Julia Hardick die gemeinsam mit mir an den verschiedenen interdisziplinären Projekten gearbeitet haben. Außerdem möchte ich meinen ehemaligen Studentinnen Alina Teuber, Kim Walbrunn und Leonie Heyden herzlich für ihre engagierte Arbeit an den Projekten danken. Ein großer Dank gilt ebenfalls Ina Landel, Laura Depta, Lisa Goebel und Alina Teuber mit denen ich viel Zeit im Labor und in der Kristallographie verbracht habe. Bei dem Stichwort Kristallisation möchte ich ganz besonders Dr. Matthias Müller meinen Dank aussprechen. Ebenso möchte ich Dr. Raphael Gasper-Schönenbrücher und dem ganzen Team danken, dass die SLS-Trips organisiert und durchführt. Außerdem möchte ich mich weiterhin ganz herzlich bei Andreas Arndt für die Unterstützung im Laboralltag sowie Martina Reibner, Petra Alhorn, Maria Sergani und Ulrich Schoppe für die Unterstützung in administrativen Bereichen bedanken.

Ein großes Dankeschön geht ebenfalls an alle derzeitigen und ehemaligen Kollegen der AG Rauh für die gute Zusammenarbeit aber auch die schönen Stunden außerhalb des Labors: Jörn, Silke, Lena, Shivakrishna, Rajesh, Mike, Marius, Sven, Jonas, Helena, Patrik, Niklas, Steven und Bianca.

Außerdem danke ich den Mitarbeitern der DPF am Max-Planck-Institut Dortmund für die Generierung der Viren für die Proteinexpression in Insektenzellen sowie Prof. Dr. Waldmann für die Nutzung der Massenspektrometer. Hierbei danke ich besonders Jens Warmers für die Einweisung und Unterstützung bei den durchgeführten Messungen. Weiterhin danke ich den Mitgliedern des EMODI-Projekts.

Abschließend möchte ich meiner Familie und meinen Freund Jonas für die Unterstützung während der gesamten Promotion und in allen Lebenslagen von ganzen Herzen danken.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	15
1. Einleitung	17
1.1. Mutationen innerhalb der Kinase-Domänen von EGFR und Her2	18
1.1.1. Punktmutationen innerhalb der Aktivierungsschleife	19
1.1.2. Deletionsmutationen des ELREA-Motivs	21
1.1.3. Insertionsmutationen nahe der regulatorischen α C-Helix	22
1.1.4. Punktmutationen innerhalb der Scharnierregion	24
1.1.5. Punktmutationen innerhalb der Glycin-reichen Schleife	27
2. Motivation und Zielsetzung	29
3. Ergebnisse und Diskussion	31
3.1. Proteinkristallisation klinisch-relevanter EGFR-Mutanten	31
3.1.1. Konstruktdesign der EGFR-Kristallisationskonstrukte	31
3.1.2. Proteinexpression in Insektenzellen	34
3.1.3. Etablierung und Optimierung der Proteinreinigungsstrategie	35
3.1.4. Etablierung von Co-Kristallisationssystemen	41
3.1.5. Etablierung von Soakingsystemen	47
3.1.6. Zusammenfassung	49
3.2. Simultane Co-Kristallisationen in EGFR-T790M/V948R	50
3.2.1. Strukturbiologische Untersuchungen	51
3.2.2. Zusammenfassung	61
3.3. Entwicklung von Inhibitoren der Osimertinib-resistenten EGFR-T790M/C797S-Mutante	62
3.3.1. Pyrrolopyrimidin-basierte EGFR-Inhibitoren	62
3.3.2. Strukturbiologische Analyse der wirksamsten Verbindungen in EGFR-T790M/C797S	65
3.3.3. Zusammenfassung	67
3.4. Potenzielle Wirkstoffkandidaten zur Adressierung von Exon20-Insertionsmutationen	68
3.4.1. Strukturbiologische Analyse	68
3.4.2. Zusammenfassung	72
3.5. Kovalente Inhibitoren zur Adressierung von Her2-A775_G776insYVMA	73
3.5.1. Pyrrolopyrimidin-basierte Her2-Inhibitoren	73
3.5.2. Strukturbiologische Analyse der Verbindung 5d	77
3.5.3. Strukturbiologische Optimierung der Inhibitoren	79
3.5.4. Strukturbiologische Analyse der optimierten Inhibitoren	81

3.5.5. Zusammenfassung	84
3.6. Proteinkristallisation klinisch-relevanter Her2-Mutanten	86
3.6.1. Konstruktdesign der Her2-Kristallisationskonstrukte	86
3.6.2. Proteinexpression in Insektenzellen	87
3.6.3. Etablierung und Optimierung der Proteinreinigungsstrategie	87
3.6.4. Etablierung von Co-Kristallisationssystemen	92
3.6.5. Identifizierung geeigneter-Kristallisationsbedingungen für Her2-WT (pCB05)	95
3.6.6. Zusammenfassung	99
4. Zusammenfassung und Ausblick	101
5. Summary and Outlook	103
6. Material und Methoden	105
6.1. Allgemeine Anmerkungen	105
6.1.1. Verbrauchsmaterialien	105
6.1.2. Verwendete Geräte	106
6.1.3. Verwendete Proteine, Reagenzien, Medien und Kits	107
6.1.4. Verwendete Bakterienstämme und Insektenzelllinien	107
6.1.5. Allgemeine Lösungen und Puffer	108
6.2. Molekularbiologische Methoden	108
6.2.1. Plasmide	108
6.2.2. Mutagenese-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	109
6.2.3. Transformation von chemisch kompetenten Zellen	109
6.2.4. Plasmid-Amplifikation und Sequenzierung	109
6.3. Proteinexpression in Insektenzellen	110
6.3.1. Zellkultur	110
6.3.2. Transfektion in Sf9-Zellen	110
6.3.3. Virusamplifikation	110
6.3.4. Testexpression und Bestimmung des Erntezeitpunktes	111
6.3.5. Heterologe Expression im präparativen Maßstab	111
6.4. Proteinreinigung der EGFR-Konstrukte	111
6.4.1. Zellyse	111
6.4.2. Erste Nickel-Affinitätschromatographie und Dialyse	112
6.4.3. Zweite Nickel-Affinitätschromatographie	112
6.4.4. Größenausschlusschromatographie	112
6.5. Proteinreinigung von Her2-WT	113
6.5.1. Zellyse	113
6.5.2. Nickel-Affinitätschromatographie	113
6.5.3. Größenausschlusschromatographie	114

6.5.4. Finale Größenausschlusschromatographie	114
6.6. Analysemethoden	114
6.6.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	114
6.6.2. Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung	115
6.6.3. Pufferstabilitätstest	115
6.7. Strukturbiologische Untersuchungen	115
6.7.1. Proteinvorbereitung	115
6.7.2. Kristallisations-Screening	116
6.7.3. Kristallisations- <i>Fine</i> -Screen	116
6.7.4. Additiv-Screen	116
6.7.5. <i>Seeding</i> -Experiment	117
6.7.6. <i>Soaking</i> -Experiment	117
6.7.7. Fischen der Proteinkristalle	117
6.7.8. Datensammlung	117
6.7.9. Datenprozessierung	118
7. Anhang	119
7.1. Kristallisationskonstrukte klinisch-relevanter Exon20-Insertionsmutationen von EGFR	119
7.2. Sequenzen EGFR-Kristallisationskonstrukte	120
7.3. Proteinreinigungsparameter der EGFR-Kristallisationskonstrukte	125
7.4. Vergleich der Pufferzusammensetzung der Proteinreinigung der EGFR-Konstrukte	126
7.5. Proteinreinigung von EGFR-T790M/V948R (pMK33)	127
7.6. Proteinreinigung von EGFR-D770_N771insNPG (pJN06)	128
7.7. Sequenzen Her2-Kristallisationskonstrukte	130
7.8. Proteinreinigungsparameter der Her2-Kristallisationskonstrukte	130
7.9. Vergleich der Pufferzusammensetzung der Proteinreinigung der Her2-Konstrukte	131
7.10. Datenstatistiken der komplexen EGFR-Kristallstrukturen	133
7.10.1. EGFR-T790M/V948R-Kristallstrukturen im Komplex mit Osimertinib und EAI045, Mavelertinib und EAI001 und Spebrutinib und EAI001	133
7.10.2. EGFR-T790M/C797S-Kristallstrukturen im Komplex mit den Verbindungen 3g und 3h	135
7.10.3. EGFR-T790M/V948R-Kristallstrukturen im Komplex mit Poziotinib und TAK-788 und die EGFR-WT-Kristallstruktur im Komplex mit TAK-788	137

7.10.4. EGFR-T790M/V948R-Kristallstrukturen im Komplex mit den Verbindungen 5d, 6b, 6c, 6d, 7, 9a und 9b	139
7.11. Detaillierte Darstellungen der Interaktionen zwischen den Inhibitoren und den EGFR-Mutanten	145
8. Literaturverzeichnis	153
9. Eidesstattliche Versicherung	167

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AEX	Anionenaustauschchromatographie (engl. <i>Anion exchange chromatography</i>)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BTK	Bruton's Tyrosinkinase
cSrc	Zelluläre Sarcoma Kinase (engl. <i>cellular sarcoma</i>)
CTG	CellTiter-Glo
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
del	Deletion
delins	Deletionsinsertion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DPF	Dortmund Protein Facility
DTT	Dithiothreitol
EC₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
E. coli	Escherichia coli
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. <i>epidermal growth factor receptor</i>)
ErbB	Erythroblastisches Leukemie, Viral homologes Onkogen
FPLC	Schnelle-Protein-Flüssigkeits-Chromatographie (engl. <i>fast protein liquid chromatography</i>)
Her2/3/4	Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2/3/4 (engl. <i>human epidermal growth factor receptor</i>)
His₆-Tag	Hexahistidin-Tag
HPLC	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HTRF	homogene Zeit-aufgelöste Fluoreszenz (engl. <i>homogeneous time resolved fluorescence</i>)
IC₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration

ins	Insertion
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LC	Flüssigchromatographie (enlg. <i>liquid chromatography</i>)
MD	Molekulardynamik
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MR	Molekularer Ersatz (enlg. <i>molecular replacement</i>)
MS	Massenspektrometrie (enlg. <i>mass spectrometry</i>)
MWCO	enlg. molecular weight cut off
Ni-AC	Nickel-Affinitätschromatographie (enlg. <i>nickel affinity chromatography</i>)
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungencarzinom (enlg. <i>non-small cell lung cancer</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (enlg. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Protein Data Bank
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)
PSI	Paul Scherrer Institut
r.m.s.d.	enlg. Root-mean-square deviation
SCLC	kleinzelliges Lungencarzinom (<i>small cell lung cancer</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (enlg. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEC	Größenausschlusschromatographie (enlg. <i>size exclusion chromatography</i>)
Sf	Spodoptera frugiperda
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp

1. EINLEITUNG

Lungenkrebs ist die häufigste Ursache für krebsbedingte Todesfälle weltweit.^[1] Hierbei wird histologisch in das Nicht-kleinzellige Lungenkarzinom (NSCLC, engl. *non-small cell lung cancer*) und das seltener auftretende kleinzellige Lungenkarzinom (SCLC, engl. *small cell lung cancer*) unterschieden.^[2,3] Im Gegensatz zur Behandlung vom aggressiven und schnell metastasierenden SCLC, hat in den letzten Jahren die sogenannte Präzisionsmedizin die Krebstherapie von NSCLC-Patienten revolutioniert. Die Identifizierung von prädikativen Biomarkern sowie das detaillierte genetische Verständnis ermöglichte die Entwicklung niedermolekularer Verbindungen zur gezielten Inhibierung der aberranten Zielstrukturen genetisch definierter Patientengruppen. Durch die gezielte Adressierung der onkogenen Zielproteine können die Nebenwirkungen verringert werden, wodurch die Präzisionsmedizin eine vielversprechende Alternative zur platinbasierten Chemotherapie darstellt, da dadurch eine deutliche Verbesserung der Überlebensraten und der Lebensqualität erzielt werden kann.^[3,4]

Genetische Mutationen, die zur Entstehung und zur Progression von NSCLC führen, sind häufig in den Rezeptor-Tyrosinkinasen zu finden. Hierbei sind im Rahmen dieser Arbeit vor allem der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (engl. *epidermal growth factor receptor*, EGFR) sowie der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (Her2) zu nennen. Beide Rezeptoren gehören zur ErbB-Familie, die neben EGFR und Her2 ebenfalls die Rezeptoren Her3 und Her4 beherbergt. Die eng verwandten Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindungsdomäne, einem transmembranen Segment sowie einer intrazellulären Kinase-Domäne, die wiederum aus verschiedenen Strukturelementen besteht, wie nachfolgend erläutert.^[5,6] Außerdem unterliegt die Kinase-Domäne dem Gleichgewicht zwischen aktiver und inaktiver Konformation (Abbildung 2A). Dabei erfolgt die Aktivierung der Kinase durch extrazelluläre Ligandenbindung, gefolgt von der Rezeptor-Dimerisierung, wodurch asymmetrische Dimere der intrazellulären Kinase-Einheit gebildet werden.^[7-9] Dies ermöglicht daraufhin die Interaktion des C-Terminus der Aktivator-Kinase mit dem N-Terminus der Empfänger-Kinase. Die inaktive Empfänger-Kinase besitzt eine nach außen rotierte α C-Helix, die es der Aktivierungsschleife erlaubt ein kurzes helikales Segment neben der Helix zu bilden (Abbildung 2A, inaktiv).^[7,10] Durch die Interaktion mit der Aktivator-Kinase wird eine strukturelle Umordnung der Empfänger-Kinase erzwungen, die zum aktiven Zustand führt. Die aktivierte Konformation weist dabei eine gestreckte Aktivierungsschleife auf, die durch ein kurzes antiparalleles Segment stabilisiert wird, um die Eindrehung der α C-Helix zu ermöglichen, die die Interaktionsfläche mit der Aktivator-Kinase bildet. Außerdem bildet die Aminosäure Glu762 eine charakteristische Salzbrücke zur Seitenkette des katalytischen Lys745 aus (Abbildung 2A, aktiv). Dieses teilaktive Dimer wird dann nach der Transautophosphorylierung vollständig aktiviert.^[7,10,11]

Die so aktivierten Rezeptoren übernehmen daraufhin wichtige Rollen in verschiedenen Signaltransduktionswegen, die die Proliferation, Apoptose und den Zelltod regulieren. Allerdings führen Dysregulation, z.B. durch Mutationen, der EGFR- und Her2-Signalwege zu aberrantem Zellwachstum und letztlich zur Tumorentstehung.^[5,6,12]

1.1. Mutationen innerhalb der Kinase-Domänen von EGFR und Her2

Die Kinase-Domänen von EGFR und Her2 bestehen aus verschiedenen Strukturelementen, die wichtige Rollen bei der Aktivierung der Kinase übernehmen. Bisher sind verschiedene aktivierende sowie Wirkstoff-resistente Mutationen innerhalb der Kinase-Domäne bekannt, die die verschiedenen Strukturelemente betreffen. Hierzu zählen Punktmutationen innerhalb der Aktivierungsschleife, Deletionen in Exon19 im und um das regulatorisch wichtige ELREA-Motiv, Insertionsmutationen in Exon20 nach bzw. in der regulatorischen α C-Helix, Punktmutationen innerhalb der Scharnierregion sowie Punktmutationen in der Glycin-reichen Schleife (Abbildung 1), auf die in den folgenden Abschnitten detailliert eingegangen wird.

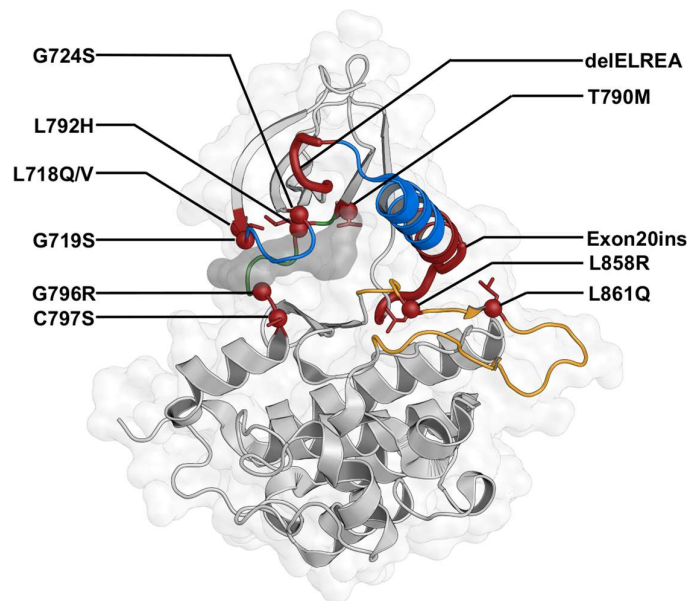


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kinase-Domäne von EGFR. Dargestellt sind die klinisch-relevanten Punktmutationen sowie Deletions- und Insertionsmutationen in den verschiedenen Strukturelementen. Hierzu zählen die Punktmutationen L718Q/V direkt vor sowie G719S und G724S in der Glycin-reichen Schleife (blau), die Deletionen des ELREA-Motivs, die Insertionsmutationen in Exon20 direkt neben und in der α C-Helix (blau), die Punktmutationen L858R und L861Q innerhalb der Aktivierungsschleife (orange) sowie die Punktmutationen T790M, L792H, G796R und C797S in der Scharnierregion (grün).

1.1.1. Punktmutationen innerhalb der Aktivierungsschleife

Mutationen, die das oben beschriebene Gleichgewicht der Kinase-Konformationen zum aktiven Zustand verschieben, werden als aktivierende Mutationen bezeichnet.^[13] Eine der häufigsten aktivierenden EGFR-Mutationen, die in NSCLC-Patienten gefunden wird, ist die Punktmutation L858R in Exon21, die in etwa 38 % der Fälle auftritt.^[14] Diese Mutation ist zentral in dem entscheidenden helikalen Element der Aktivierungsschleife lokalisiert (Abbildung 2B, orange). Durch eine polare Wechselwirkung des Rückgrat-Carbonyls von Leu858 und dem Amid-Stickstoff von Leu862 wird dieses helikale-Motiv zusätzlich stabilisiert. Durch die Lokalisierung der Leu858-Seitenkette im hydrophoben Bereich zwischen α C-Helix und Glycin-reicher Schleife übernimmt sie eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung des inaktiven Zustands. Konkret sind an der Stabilisierung die Reste Leu858, Leu861 und Leu862 (Aktivierungsschleife), Leu788, Leu777, Met766, Ile759 und Leu747 (α C-Helix und angrenzende Regionen) sowie Phe723 (Glycin-reiche Schleife) beteiligt. Die mutierte, viel größere und geladene Arg858-Seitenkette unterbricht die hydrophobe Anordnung und ist somit inkompatibel mit dem inaktiven Zustand der Kinase. Aus diesem Grund verschiebt die Punktmutation L858R die Kinase-Domäne in Richtung der aktiven Konformation, da das helikale Element durch den sterischen Einfluss des Arg858 aufgelöst wird und die α C-Helix dadurch Raum zur Drehung nach innen, in den aktiven Zustand, hat. Darüber hinaus stabilisiert Arg858 den aktiven Zustand der mutierten Kinase weiter, indem es ein Netzwerk polarer Interaktionen mit Arg836 und Tyr891 bildet (Abbildung 2B, blau).^[15]

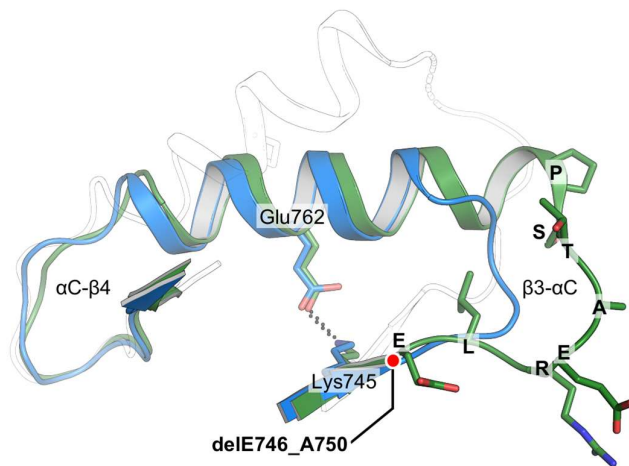
Eine weitere bei Patienten beobachtete Punktmutation innerhalb der Aktivierungsschleife ist L861Q. Die Aminosäure Leu861 liegt ebenfalls wie Leu858 im helikalen Element der Aktivierungsschleife (Abbildung 2B, orange) und ist am oben beschriebenen hydrophoben Cluster beteiligt. Daher wird ein ähnlicher Mechanismus der EGFR-Aktivierung angenommen.^[15,16]

Für die Behandlung von NSCLC-Patienten mit den oben beschriebenen aktivierenden Punktmutationen sind die Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) der ersten Generation Gefitinib^[17,18] und Erlotinib^[19] (Abbildung 3B) zugelassen und im klinischen Einsatz. Die 4-Aminoquinazolin-basierten reversiblen Inhibitoren konkurrieren mit dem Co-Faktor Adenosintriphosphat (ATP) um die Bindung im aktiven Zentrum der Kinase. Auch die Inhibitoren der zweiten Generation wie Afatinib^[20,21] und Dacomitinib^[22,23] (Abbildung 3B) sind für die Behandlung der aktivierenden Mutationen zugelassen. Diese Inhibitoren besitzen jedoch ein Acrylamid das kovalent an ein Cystein (Cys797) in der ATP-Bindetasche bindet. Auf diese Weise wird die Konkurrenz mit ATP um die Bindungsstelle verringert, die Verweildauer des Wirkstoffs am Zielort maximiert und die Selektivität innerhalb des Kinoms erhöht.^[20-23]

1.1.2. Deletionsmutationen des ELREA-Motivs

Neben den bereits beschriebenen Punktmutationen innerhalb der Aktivierungsschleife sind Deletionsmutationen in Exon19 eine weitere Gruppe der aktivierenden Mutationen, die in 46 % der Patienten beobachtet wird. Diese Mutationen betreffen den β 3- α C-Proteinstrang direkt neben der α C-Helix.^[14,27-29] Die klinisch-häufigste Mutation ist die Deletion des kompletten ELREA-Motivs (delE746_A750) gefolgt von delREAT und delLRE.^[30] Das ELREA-Motiv spielt eine wichtige Rolle beim Übergang zwischen der aktiven und inaktiven Konformation der α C-Helix und vermittelt die erforderliche Flexibilität der Region.^[31] Die Deletion des Motivs führt zum Verlust der Helizität des N-terminalen Teils der α C-Helix, der daraufhin neu positioniert wird, um eine enge β 3- α C-Schleife zu bilden, damit die charakteristische Glu762-Lys745-Salzbrücke erhalten bleibt. Die reduzierte Länge und Flexibilität dieses Strangs blockiert daher den Übergang der α C-Helix in die inaktive Konformation, wodurch die aktive Konformation der Kinase begünstigt wird (Abbildung 3A).^[30,32] Weitere Studien zeigten, dass die Deletion von fünf Aminosäuren zur optimalen Ausrichtung der α C-Helix für die katalytische Aktivität führt, während die Deletion von sechs oder mehr Aminosäuren zu strukturellen Störungen führt, die die Kinase-Aktivität vermindern.^[30]

A



B

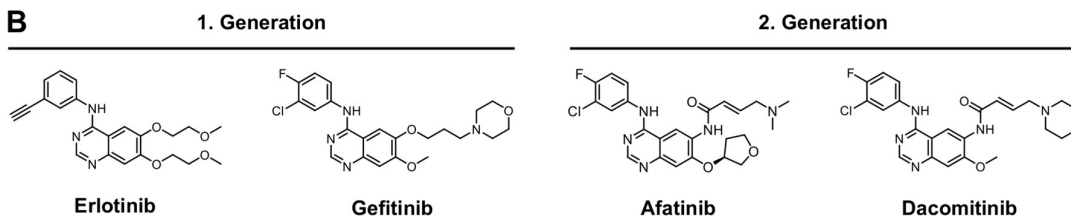


Abbildung 3: Deletionen des ELREA-Motivs in Exon19 und TKIs der ersten und zweiten Generation. **A:** MD-Simulationen (blau) deuten darauf hin, dass Deletionsmutationen die Kinase in ihrer aktiven Konformation (grün; PDB-ID: 1M17) halten, indem sie die Flexibilität der α C-Helix einschränken, die für den Übergang in die inaktive Kinase-Konformation (schwarz umrandet; PDB-ID: 2JIV) entscheidend ist. **B:** Chemische Strukturen der Inhibitoren der ersten und zweiten Generation.^[26]

Die beschriebenen Deletionsmutationen sind ebenfalls sensitiv gegenüber den Inhibitoren der ersten und zweiten Generation (Abbildung 3B) und ermöglichen die effektive Behandlung von NSCLC-Patienten in der Klinik.^[17-23]

1.1.3. Insertionsmutationen nahe der regulatorischen α C-Helix

In 9 % der NSCLC-Patienten wurden *in-frame*-Insertionsmutationen innerhalb von Exon20 in EGFR gefunden.^[14] Im Gegensatz zu den bereits vorgestellten aktivierenden Mutationen, sind die meisten Exon20-Insertionsmutationen primär resistent gegen alle zugelassenen niedermolekularen TKIs, sodass die derzeitige Behandlungsmöglichkeit auf die Chemotherapie begrenzt ist.^[33] Klinisch relevante Insertionsmutationen treten vor allem in der Nähe der α C-Helix innerhalb der α C- β 4-Schleife auf. Die Mutationen D770_N771insSVD und V769_D770insASV machen zusammen 36 % der EGFR-Exon20-Insertionen aus (Abbildung 4A).^[14,34] Jedoch ist das Verständnis der molekularen Merkmale dieser Art von Mutation bisher noch begrenzt. Bekannt ist jedoch, dass die eingefügten Reste nicht im direkten Kontakt mit der ATP-Bindungsstelle stehen, allerdings ist anzunehmen, dass eine Wirkstoffresistenz durch eine schmalere Bindungsstelle entstehen könnte, die mit der Bindung von Inhibitoren der dritten Generation (Abbildung 5E) inkompatibel ist.^[35] Außerdem konnte durch kristallographische Studien bisher nur eine einzige Kristallstruktur einer Insertionsmutante von EGFR gelöst werden. In dieser schwach aufgelösten Co-Kristallstruktur ist der Quinazolin-basierte Inhibitor der zweiten Generation PD16839352^[36] kovalent an EGFR-D770_N771insNPG gebunden. Die beschriebene Insertionsmutation liegt am C-terminalen Ende der α C-Helix unmittelbar nach der Aminosäure Asp770, die zusammen mit den drei inserierten Aminosäuren Asparagin, Prolin und Glycin eine enge Windung bildet. In dieser Anordnung hält eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Peptidrückgrat-Carbonyl von Asp770 und dem Amid des eingefügten Glycins die Kinase in ihrer aktiven Konformation, da die α C-Helix in der aktiven, nach innen rotierten Position gehalten wird (Abbildung 4B).^[33]

Basierend auf dieser Kristallstruktur schlugen KOSAKA *et al.* vor, dass die Aminosäure Asp770 aufgrund ihrer Lokalisierung eine Schlüsselrolle in der Translokation zwischen der aktiven und der inaktiven Konformation spielt. Im EGFR-WT wird während des Übergangs in die inaktive Konformation die Seitenkette von Arg776 neu positioniert, um Wasserstoffbrückenbindungen mit den Rückgrat-Carbonylgruppen von Ala767 am Ende der α C-Helix und Leu703 zu bilden. Die eingeführten Reste führen jedoch zu einer Reposition von Asp770 und blockieren für Arg776 sterisch den Zugang zum Ende der α C-Helix (Abbildung 4B). Bei Exon20-Insertionen, die Asp770 durch ein flexibles Glycin (D770delinsGY; Abbildung 4A) ersetzen, kann der Zugang von Arg776 und Ala767 wiederhergestellt werden, wodurch diese Mutanten sensitiv gegenüber Afatinib sind.^[34]

YASUDA *et al.* analysierten ein Homologiemodell von A763_Y764insFQEA-mutiertem EGFR. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Exon20-Mutationen, die die α C- β 4-Schleife oder den Anfang der α C-Helix betreffen, werden diese vier Aminosäuren zentral in die regulatorische α C-Helix eingefügt (Abbildung 4A). Es wird erwartet, dass die FQEA-Sequenz eine zusätzliche helikale Windung bildet und das Register der benachbarten Reste zum N-Terminus hin verschiebt. Auf diese Weise wird das katalytisch wichtige Glu762 um eine Windung verschoben und effektiv durch den inserierten Glutaminsäure-Rest ersetzt. Noch wichtiger ist, dass die Mutation eine kleinere Alanin-Seitenkette an der früheren Position von Ile759 platziert. Ile759 ist ebenfalls am hydrophoben Interaktionsnetzwerk um Leu858 (Abbildung 2B) involviert, das zur Stabilisierung des inaktiven Zustands unerlässlich ist. Hier erklärt eine abgeschwächte Wechselwirkung durch den inserierten Alanin-Rest die Sensitivität gegenüber niedermolekularen Inhibitoren.^[33]

HIRANO *et al.* führten weitere Homologiemodell-basierte Studien zur Mutation Y764_V765insHH durch (Abbildung 4A). Es ist anzunehmen, dass das katalytisch essentielle Glu762 seine Position beibehält, während die eingefügten Reste zum C-Terminus hin verschoben werden. Auf diese Weise werden zwei Histidin-Reste eingefügt, wobei der Erste direkt die Bindung von Inhibitoren auf Quinazolin-Basis stört und der Zweite die hydrophobe Interaktion mit Leu858 unterbricht.^[37]

Bemerkenswert ist, dass die Exon20-Mutationen in Her2 eine strukturelle Ähnlichkeit mit den EGFR-Insertionsmutationen aufweisen. Die beobachteten Her2-Insertionsmutationen sind jedoch weniger heterogen, wobei A775_G776insYVMA 80 % der in Her2 gefundenen Mutationen in NSCLC ausmacht (Abbildung 4C).^[38] Daten, die auf eine erfolgreiche Behandlung von Her2-mutierten Tumoren mit TKIs hindeuten, sind bisher nur begrenzt verfügbar.^[34] Jedoch sind zwei Kristallstrukturen der Her2-WT-Kinase-Domäne in der *Protein Data Bank* (PDB) hinterlegt und zeigen ein flexibles GVG-Motiv neben der regulatorischen α C-Helix.^[39,40] Diese Struktur unterscheidet Her2 von den übrigen ErbB-Kinasen, die an homologer Position eine SVD-Sequenz besitzen (Abbildung 4A und 4B). Die Her2-Insertionsmutationen sind neben diesem flexiblen Motiv lokalisiert. Daher vermuteten AERTGEERTS *et al.*, dass die Insertionsmutationen eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung der α C- β 4-Schleifenregion besitzen, was zu einer reduzierten Flexibilität der α C-Helix führt.^[39]

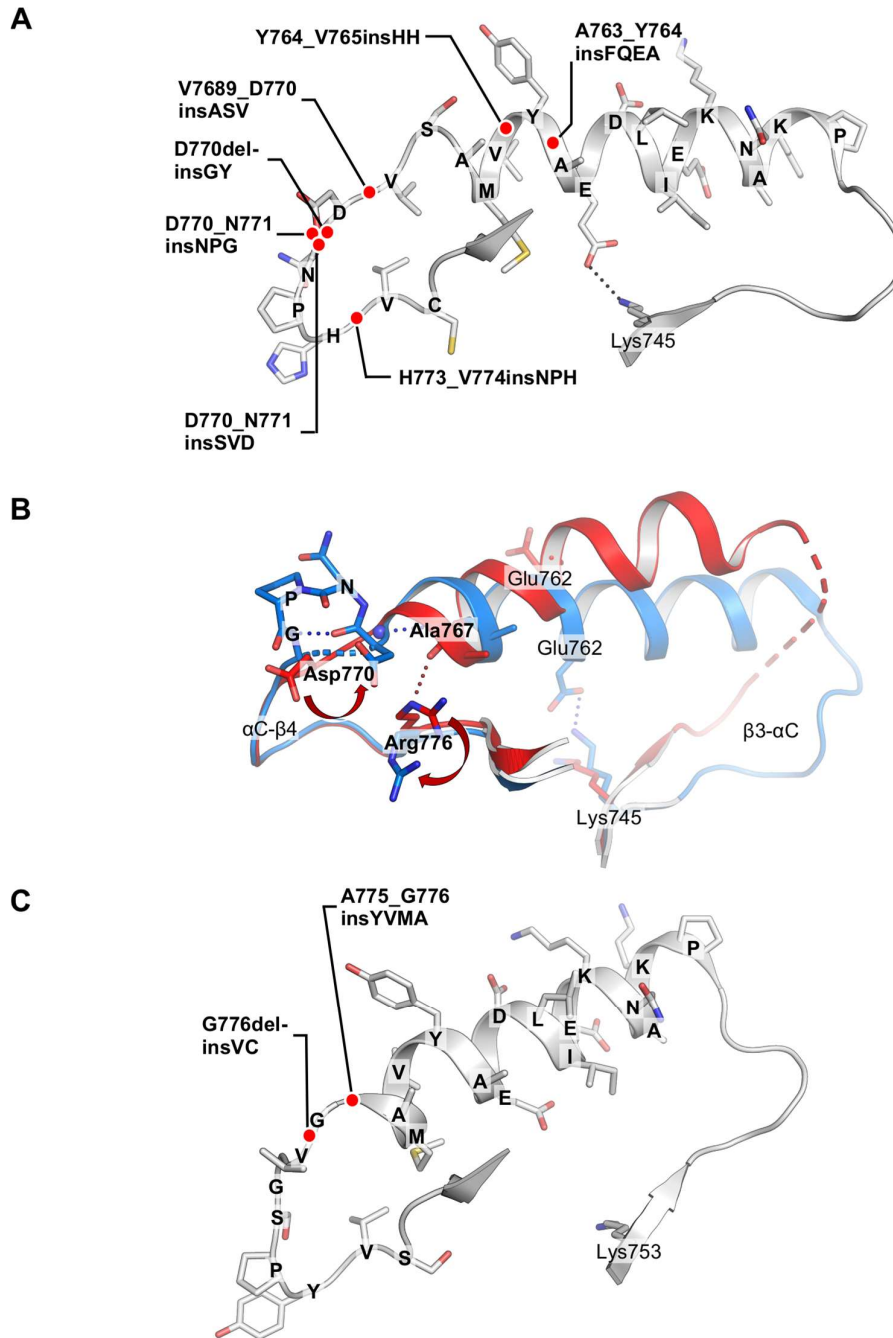


Abbildung 4: Insertionsmutationen in Exon20. **A:** Überblick über die häufigsten klinisch-relevanten EGFR-Insertionsmutationen in Exon20 (PDB-ID: 1M17). **B:** Die Kristallstruktur von EGFR-D770_N771insNPG (blau; PDB-ID: 4LRM) zeigt, dass die Kinase in ihrer aktiven Konformation gehalten wird, indem die Aminosäure Arg776 daran gehindert wird die inaktive Konformation zu stabilisieren (rot; PDB-ID: 1XKK). **C:** Überblick über die klinisch häufigsten Her2-Insertionsmutationen in Exon 20 (PDB-ID: 3PP0).^[26]

1.1.4. Punktmutationen innerhalb der Scharnierregion

Die Wirksamkeit von TKIs der ersten und zweiten Generation wird durch das Auftreten der Resistenzmutation der Türsteher-Aminosäure Thr790 innerhalb der ATP-Bindetasche begrenzt.^[41,42]

Dabei wird das Thr790 durch das sterisch anspruchsvollere Methionin (T790M) ersetzt. Die Methionin-Seitenkette führt dabei zum sterischen Konflikt mit den Anilin-Resten der Quinazolin-basierten Inhibitoren der ersten beiden Inhibitor-Generationen (Abbildung 5A).^[43,44] Um diese Art der Wirkstoffresistenz zu überwinden wurde eine dritte Generation von TKIs entwickelt, die über ein neuartiges Grundgerüst verfügen, dass die sterische Interferenz mit Met790 vermeidet. Außerdem binden die Inhibitoren kovalent an das Cys797 innerhalb der ATP-Bindetasche während sie gegenüber dem EGFR-WT selektiv sind.^[45] Inhibitoren der dritten Generation sind z.B. Osimertinib,^[46-48] und Olmutinib^[49] (Abbildung 5E).

Die Entstehung der Punktmutation C797S während der Behandlung von NSCLC-Patienten mit Osimertinib schränkt den Erfolg dieser Inhibitoren erneut ein. Die Substitution des besonders nukleophilen Cysteins durch ein weniger nukleophiles Serin verhindert die Bildung der kovalenten Bindung, was zum Wirkungsverlust führt (Abbildung 5B).^[50,51] Bis jetzt sind keine TKIs der vierten Generation für klinische Anwendung verfügbar, die diese zweite Resistenzmutation überwinden können. Allerdings stellen allosterische Inhibitoren einen vielversprechenden Ansatz zur Überwindung dieser Wirkstoffresistenz dar, da sie in einer alternativen Bindetasche der inaktiven Kinase binden (siehe Abschnitt 3.2).^[52]

Die gewonnenen Erkenntnisse über den Bindungsmodus von TKIs innerhalb der EGFR-Bindungsstelle könnten leicht auf weitere Punktmutationen übertragen werden, die die Bindungsstelle betreffen und eine Wirkstoffresistenz durch direkte Interferenz mit den niedermolekularen Inhibitoren aufweisen. Jüngste Berichte haben Mutationen identifiziert, die das Gly796 durch polare und sterisch anspruchsvollere Aminosäuren (G796S/R/D) ersetzen. Das Gly796 ist an der Lippe des aktiven Zentrums neben dem Cys797 lokalisiert. Der Austausch des Glycins durch eine Aminosäure mit größerer Seitenkette hat enorme Auswirkung auf die Ligandenbindung, da dadurch sterische Interferenzen mit den Löslichkeitsgruppen und Grundgerüsten der bisher verfügbaren Inhibitoren einhergehen (Abbildung 5C).^[53-56] Eine weitere bei NSCLC-Patienten beobachtete Punktmutation betrifft das Leu792 innerhalb der Scharnierregion. Hierbei wird dieses durch verschiedene Aminosäuren wie His, Tyr, Phe, Arg, Pro und Val ersetzt. Das Leu792 weist wichtige Wechselwirkungen mit der Methoxygruppe von Osimertinib oder Rociletinib^[57] (Abbildung 5E) auf wohingegen der Austausch der Aminosäure zur Resistenz gegenüber den Inhibitoren führt (Abbildung 5C).^[53,54] Angesichts struktureller Überlegungen wird davon ausgegangen, dass Inhibitoren, die nicht mit Leu792 interagieren, bei dieser Art von Mutation einen deutlich reduzierten Resistenzgrad aufweisen. Ein ähnlicher Effekt wurde bei Mutationen von Leu718 beobachtet.^[53,58-60] Diese spezielle Seitenkette ist Teil des hydrophoben Klammer-Motivs (engl. *hydrophobic clamp*), das wichtige hydrophobe Wechselwirkungen mit TKIs der dritten Generation aufweist.^[61] Die Punktmutation L718V führt daher zum Verlust der hydrophoben Kontakte mit den Inhibitoren,

während die Punktmutation L718Q zu einem sterischen Konflikt führt (Abbildung 5D). Allerdings wurde festgestellt, dass die Kinase beim Vorhandensein der L718V-Mutation die Sensitivität gegenüber Afatinib beibehält.^[53]

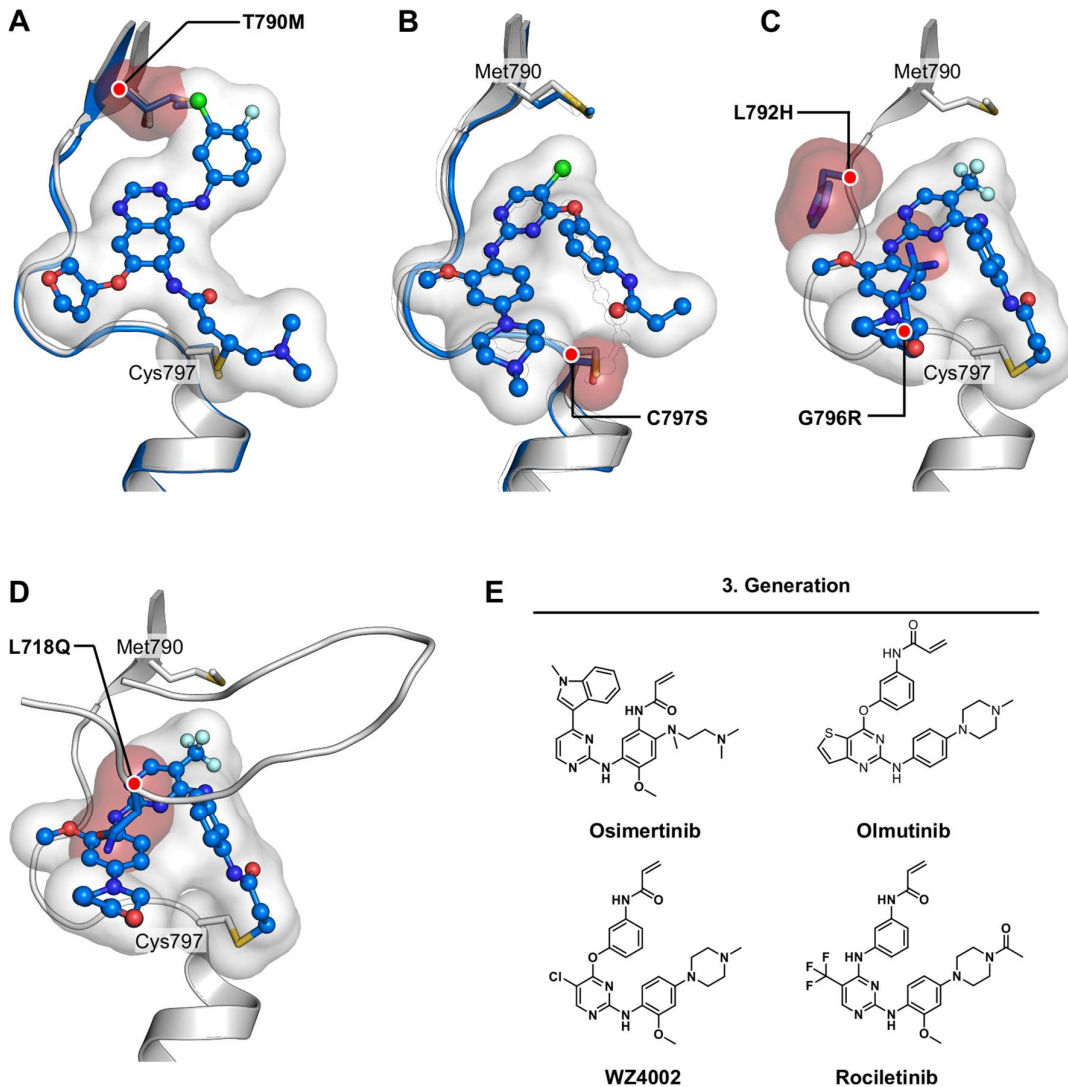


Abbildung 5: Punktmutationen innerhalb der ATP-Bindetasche. **A:** Die T790M-Mutation behindert die Bindung von EGFR-Inhibitoren der ersten und zweiten Generation durch erhöhten sterischen Bedarf. Dargestellt ist die Bindung von Afatinib in EGFR-WT (grau; PDB-ID: 4G5J) überlagert mit T790M-mutierten Apo-EGFR (blau; PDB-ID: 3UG1). **B:** Die C797S-Mutation verhindert die Bindung kovalenter Inhibitoren der dritten Generation durch reduzierte Reaktivität der Ser797-Seitenkette. Dargestellt ist der Bindungsmodus des reversiblen Inhibitors WZ4003 (grau; PDB-ID: 5X2K) überlagert mit C797S-mutiertem EGFR (blau; PDB-ID: 5XGN) im Vergleich zum Bindungsmodus des kovalenten WZ4002 (schwarz umrandet; PDB-ID: 3IKA). **C:** G796R- und L792H-Mutationen verhindern die Bindung von Inhibitoren der dritten Generation (PDB-ID: 5XDK). **D:** Die L718Q-Mutation behindert die Bindung von Inhibitoren der dritten Generation (PDB-ID: 5XDK). **E:** Chemische Strukturen der Inhibitoren der dritten Generation.^[26]

1.1.5. Punktmutationen innerhalb der Glycin-reichen Schleife

Die Glycin-reiche Schleife ist ein wichtiges Strukturelement der Kinase-Domäne und spielt eine entscheidende Rolle bei der ATP- oder Ligandenbindung. Das hochkonservierte und flexible Element liegt wie ein Deckel über dem aktiven Zentrum (Abbildung 6) und zeichnet sich durch ein kanonisches GxGxxG-Sequenzmuster aus, in dem x für eine beliebige Aminosäure steht (GSGAFG-Sequenz in EGFR). Aufgrund des Einflusses auf das aktive Zentrum hat die Schleife ebenfalls einen großen Einfluss auf die Affinität der Inhibitoren. Daher ist es nicht überraschend, dass Punktmutationen in dieser Region einen Einfluss auf die Ligandenbindung haben.^[62,63]

In etwa 2 % der EGFR-positiven NSCLC-Patienten werden Mutationen des Gly719 beobachtet, wobei das Glycin am häufigsten durch ein Serin, Cystein oder Alanin substituiert wird.^[14,15,64-66] Die genannten Mutanten sind sensitiv gegenüber der Behandlung mit Inhibitoren der ersten und zweiten Generation.^[27,28] Es wird jedoch vermutet, dass die G719S-Mutation eine leichte Verschiebung der Glycin-reichen Schleife induziert (Abbildung 6), wodurch die Affinität für ATP aber auch Inhibitoren der ersten Generation wie Gefitinib verringert wird.^[15,66] Allerdings wird eine stabilisierende Wirkung auf die Konformation der aktiven Kinase angenommen, was im Einklang mit der erhöhten Kinase-Aktivität dieser Mutante steht, wodurch auch eine mögliche Erklärung für die Sensitivität gegenüber TKIs der ersten Generation gegeben ist.^[15] Interessanterweise sind Mutationen des Gly719 resistent gegenüber Osimertinib, wahrscheinlich aufgrund des benachbarten Leu718, das eine wichtige Rolle bei der Bindung von Inhibitoren der dritten Generation spielt.^[53,61,67]

Eine weitere, immer häufiger beobachtete Punktmutation G724S betrifft das letzte Glycin der Glycin-reichen Schleife.^[68,69] Allerdings wurde diese Mutationen in Verbindung mit Deletionsmutationen in Exon19 beobachtet.^[32] Durch umfangreiche Studien wurde von FASSUNKE *et al.* vermutet, dass die Substitution durch ein Serin zu einer schmalen Bindetasche führt (Abbildung 6). Auf diese Weise ist die Resistenz gegenüber Inhibitoren der dritten Generation aufgrund von sterischer Abstoßung zu erklären. Eine weitere Schlussfolgerung könnte jedoch auch der Verlust entscheidender Interaktionen mit den Inhibitoren der dritten Generation sein. In Übereinstimmung mit den Erkenntnissen aus Strukturanalysen sind Inhibitoren der zweiten Generation, wie z.B. Afatinib, wirksam, da ihr Quinazolin-Grundgerüst potenzielle sterische Konflikte vermeidet und ihre kovalente Wirkungsweise für eine anhaltende Bindung sorgt.^[32] Durch BROWN *et al.* wurde durch *in silico*-Methoden eine G724S-induzierte Konformation der Glycin-reichen Schleife gefunden, die einen Verlust der Interaktion mit Osimertinib bewirkt. Dabei wurde die beobachtete Resistenz auf eine Unterbrechung der Interaktion des Inhibitors mit Phe723 zurückgeführt, während Inhibitoren der zweiten Generation nicht von dieser Interaktion abhängen und sensitiv bleiben.^[70]

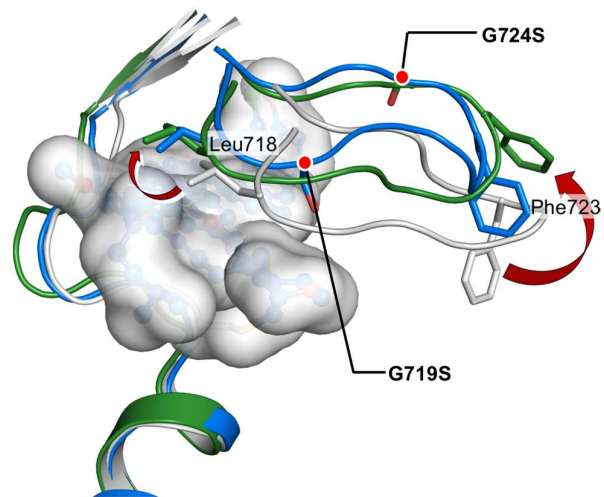


Abbildung 6: Mutationen innerhalb der flexiblen Glycin-reichen Schleife (GSGAFG-Motiv). Man geht davon aus, dass G719S- oder G724S-Mutationen die Dynamik beeinflussen, was zu sterischen Abstoßungen oder zum Verlust entscheidender Interaktionen mit z.B. Leu718 oder Phe723 bei der Bindung verschiedener Inhibitoren (graue Oberflächen) führt. Dargestellt ist die Überlagerung der EGFR-Kristallstrukturen, die eine Exon20-Insertionsmutation (grau; PDB-ID: 4LRM) und die G719S-Mutation (blau; PDB-ID: 2ITO) besitzen sowie eine MD-Simulation von EGFR-G724S (grün).^[26]

2. MOTIVATION UND ZIELSETZUNG

In dem Bestreben eine vierte Generation von Inhibitoren zu entwickeln, die auf (multi-)mutiertes EGFR abzielt, ist ein detailliertes Verständnis erforderlich, wie Mutationen die Aktivität der Kinase sowie die Sensitivität gegenüber den Wirkstoffen beeinflussen.^[12] Ebenso ist die Entwicklung von neuartigen Inhibitoren zur Überwindung der aktivierenden Insertionsmutationen in Exon20 von Her2 sowie EGFR von großem medizinischem Interesse.^[14,33,71-74] Vor diesem Hintergrund sind strukturelle Systeme der Schlüssel, um detaillierte Einblicke in die molekularen Merkmale des Rezeptors auf atomarer Ebene zu gewinnen.

Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit die Etablierung struktureller Systeme verschiedener klinisch-relevanter EGFR- sowie Her2-Varianten, um mit deren Hilfe die Optimierung potentieller Zielverbindungen vorantreiben zu können. Hierzu sollte zunächst die Proteinreinigung der verschiedenen Kinase-Varianten optimiert werden. Aufbauend darauf sollten geeignete Bedingungen für die Proteinkristallisation gefunden werden, die qualitativ hochwertige Proteinkristalle für die Strukturaufklärung liefern.

In Co-Kristallisationsexperimenten sollten allosterische Inhibitoren mit ausgewählten ATP-kompetitiven Inhibitoren der dritten Generation in EGFR-T790M/V948R kristallisiert werden, um neue Wirkstoffkombinationen zu identifizieren, sowie die simultane Bindung beider Inhibitor-Typen in der Kinase-Domäne durch Aufklärung der Strukturen nachweisen zu können. Basierend auf diesen Ergebnissen können neuartige Inhibitoren entwickelt werden, auch besonders im Hinblick auf die Wirkstoffresistenzmutation C797S.

Des Weiteren wurden in einem strukturbasierten Ansatz kovalente Inhibitoren zur Adressierung der EGFR-L858R/T790M-Doppelmutante charakterisiert, die allerdings ebenso hohe Potenz bezüglich der Tripelmutante EGFR-L858R/T790M/C797S besaßen. Zur detaillierten Aufklärung der Bindemodi sowie zur Identifizierung einer strukturellen Erklärung für die hohe Potenz gegenüber der Tripelmutante, sollten strukturelle Analysen mit EGFR-T790M/C797S durchgeführt werden.

Da viele der Insertionsmutationen in Exon20 von EGFR aber auch Her2 Wirkstoffresistenzen gegenüber allen derzeit zugelassenen TKI aufweisen, ist die Entwicklung neuartiger Inhibitoren zur gezielten Adressierung von enormer Wichtigkeit. Aus diesem Grund sollte die strukturelle Analyse von potentiellen Wirkstoffkandidaten in EGFR-T790M/V948R als Modellsystem durchgeführt werden, um detaillierte Einblicke in die Bindemodi aber auch das Interaktionsnetzwerk der Inhibitoren zu erhalten. Ebenso sollten neuartige laborinterne Inhibitoren zur gezielten Adressierung einer Her2-Insertionsmutation strukturell charakterisiert werden, um Ansätze zur Optimierung der Verbindungen zu identifizieren.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Proteinkristallisation klinisch-relevanter EGFR-Mutanten

Die strukturelle Analyse klinisch-relevanter Zielproteine, vor allem in Komplex mit kleinen Molekülen, ist eine wichtige Aufgabe der Wirkstoffforschung. Daher stellt die Identifizierung und Etablierung von verlässlichen Kristallisationssystemen der relevanten EGFR-Mutanten eine Schlüsselaufgabe dieser Arbeit dar. Wichtige Stellschrauben zur erfolgreichen Proteinkristallisation sind neben der Identifizierung geeigneter Kristallisationsbedingungen auch das Design der Kristallisationskonstrukte, die Proteinexpression und die Proteinreinigung. Aus diesem Grund war die Etablierung und Optimierung einer neuen Proteinreinigungsstrategie der Zielproteine, eine zentrale Aufgabe im Rahmen dieser Arbeit.

3.1.1. Konstruktdesign der EGFR-Kristallisationskonstrukte

Die EGFR-Konstrukte, die hier für die Proteinkristallisation genutzt wurden codieren die Aminosäuren 696-1022 der humanen EGF-Rezeptor Kinase-Domäne (Uniproteintrag P00533). Zudem besitzen sie einen His₆-Affinitätstag für die Proteinreinigung und eine Protease-Schnittstelle zur anschließenden Entfernung des Tags. In der Vergangenheit wurden bereits das EGFR-WT-Konstrukt (pCB02) sowie das klinisch-relevante EGFR-T790M-Konstrukt (pCB17) erstellt.^[75] ^a Die Konstrukte sind für die Expression in Insektenzellen codonoptimiert. Allerdings konnte zum damaligen Zeitpunkt noch keine Überexpression der Zielproteine in Insektenzellen erreicht werden, wodurch nur geringe Mengen der Proteine für die Kristallisation zur Verfügung standen. Dadurch war, bis auf wenige Ausnahmen, keine Generierung von Proteinkristallen für die weitere Strukturaufklärung möglich.^[75] Aus diesem Grund wurden optimierte EGFR-Konstrukte erzeugt, um die Proteinkristallisation der Zielproteine zu erleichtern. Hierzu wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt.^[10,76,77]

Der erste Ansatz führte durch das Ersetzen von drei geladenen Aminosäuren (Glu865, Glu866 und Lys867) der oberflächenexponierten Aktivierungsschleife der Kinase durch Alanine zu einer Erniedrigung der Oberflächenentropie (Abbildung 7A). Dieser Ansatz beruht auf der Annahme, dass geladene und flexible aufeinander folgende Aminosäuren wie Lysine, Glutamine und Glutaminsäuren eine hohe konformationelle Entropie besitzen und dadurch die Ausbildung von Kristallkontakten stören.^[76,78-80] Wichtig zu beachten ist, dass der Austausch der Aminosäuren nur in Schleifen-Regionen durchgeführt wird und dass nur

^aDesign der Kristallisationskonstrukte pCB02 und pCB17: Dr. C. Becker im Rahmen seiner Promotion.

Aminosäuren ohne funktionelle Rolle innerhalb des Proteins ausgetauscht werden dürfen.^[76] Unter Beachtung dieser Vorgaben, konnten zwei klinisch-relevante Kristallisationskonstrukte generiert werden. Das erste weist neben den Oberflächenmutationen die Türsteher-Mutation T790M (pMK25) auf. Das zweite Konstrukt besitzt neben der T790M-Mutation zusätzlich die Resistenzmutation C797S (pMK29).^{[77],b}

Beim zweiten Ansatz wurde neben der klinisch-relevanten T790M-Mutation die zusätzliche Punktmutation V948R (pMK33) eingebracht (Abbildung 7A).^{[77,81],c} Die V948R-Mutation, die im C-terminalen Bereich der Kinase-Domäne lokalisiert ist, verhindert die Bildung der asymmetrischen Dimere der Rezeptoren. Bei der Ausbildung von Proteinkristallen bildet das ursprünglich vorliegende Val948 eines Monomers Interaktionen zu zwei Aminosäuren (Ile706 und Leu782) des benachbarten Monomers aus. Diese Interaktionen werden durch den Austausch des Valins durch ein Arginin unterbunden, da der Austausch zu einer sterischen und elektronischen Abstoßung der Aminosäuren-Reste und somit zur Verhinderung der Homo-Dimerisierung führt (Abbildung 7B). Die Unterbindung der Dimerisierung soll ebenfalls die Proteinkristallisation begünstigen, da die Dimerbildung tendenziell als störend eingestuft wird.^[10]

Da neben den oben genannten Punktmutationen auch weitere Resistenzmutationen des EGF-Rezeptors für die Wirkstoffentwicklung von großem Interesse sind, wurden weitere Konstrukte generiert.^[5,14,33,34,36] Diese Konstrukte basieren auf dem EGFR-WT-Konstrukt und weisen Exon20-Insertionsmutationen auf (Abbildung 7A und Tabelle A1),^{[82],d} wobei bisher nur das Konstrukt EGFR-D770_N771insNPG (pJN06) für erste Proteinreinigungs- und Proteinkristallisations-Ansätze genutzt wurde.

^b Design der Kristallisationskonstrukte pMK25 und pMK29: Dr. M. Keul im Rahmen ihrer Promotion.

^c Design der Kristallisationskonstrukts pMK33: Dr. M. Keul im Rahmen ihrer Promotion. Mutagenese durchgeführt durch J. Niggenaber im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

^d Design der Kristallisationskonstrukte pJN01-pJN12: J. Niggenaber. Mutagenese durchgeführt durch K. Walbrunn im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

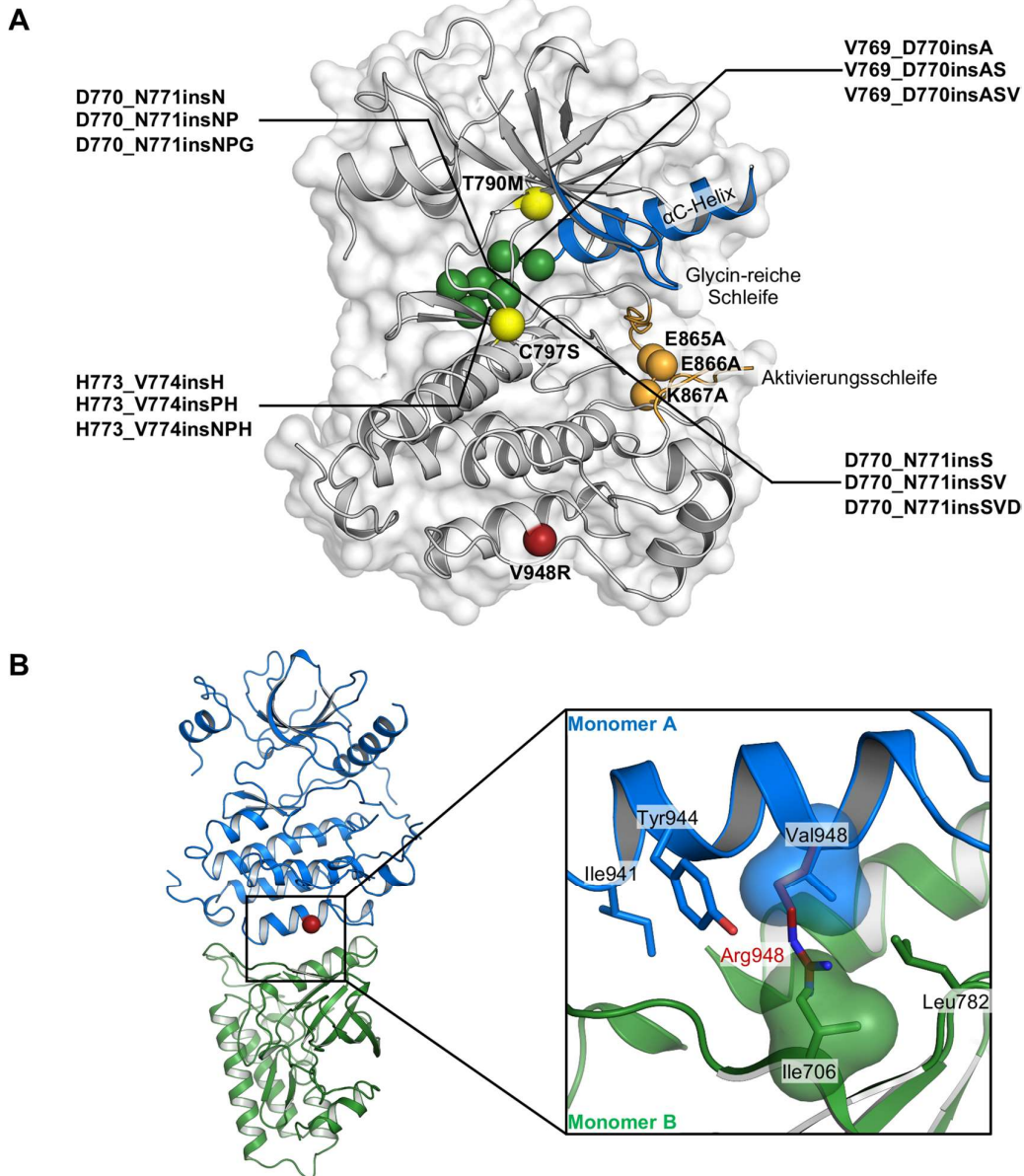


Abbildung 7: Design der EGFR-Kristallisationskonstrukte. **A:** Schematische Darstellung der Kinase-Domäne von EGFR mit den mutierten Aminosäuren. Durch die Mutation von polaren oberflächenexponierten Aminosäuren in der Aktivierungsschleife zu Alaninen (E865A, E866A und K867A, orange) kann die Oberflächenentropie des Proteins erniedrigt werden, wodurch die Proteinkristallisation gefördert wird. Ein weiterer Ansatz fördert die Proteinkristallisation durch die Punktmutation V948R (rot), da dadurch die Dimerisierung des Proteins unterbunden wird. Die klinisch-relevanten Punktmutationen T790M und C797S (gelb) wurden in den entsprechenden Konstrukten ebenfalls eingeführt. Außerdem wurden Konstrukte generiert, die Insertionsmutationen in Exon20 (grün) enthalten, die direkt neben der α C-Helix eingeführt wurden. **B:** Darstellung eines asymmetrischen Dimers. Im vergrößerten Ausschnitt ist die Kontaktfläche zwischen Monomer A (blau) und Monomer B (grün) gezeigt. Dabei interagiert das Val948 von Monomer A (blau) mit dem Ile706 von Monomer B (grün). Der Austausch durch Arg748 (rot) führt zu sterischen Interferenzen und dadurch zur Unterbindung der Dimerbildung.

In Tabelle 1 sind alle EGFR-Kristallisationskonstrukte aufgeführt, die bisher für die Proteinkristallisation genutzt wurden. Die Sequenzalignments aller Konstrukte sind im Anhang der Arbeit (Abbildung A1-A5) aufgeführt.

Tabelle 1. Übersicht der für die Proteinkristallisation verwendeten EGFR-Konstrukte.

Bezeichnung	Interne Abkürzung	Konstrukt	Mutation
EGFR-WT	pCB02	pIEX/Bac3 AS 696-1022	-
EGFR-T790M	pCB17	pIEX/Bac3 AS 696-1022	T790M
EGFR- T790M/E865A/E866A/ K867A	pMK25	pIEX/Bac3 AS 696-1022	T790M, E865A, E866A, K867A
EGFR- T790M/C797S/E865A/ E866A/K867A	pMK29	pIEX/Bac3 AS 696-1022	T790M, C797S, E865A, E866A, K867A
EGFR-T790M/V948R	pMK33	pIEX/Bac3 AS 696-1022	T790M, V948R
EGFR- D770_N771insNPG	pJN06	pIEX/Bac3 AS 696-1025	D770_N771insNPG

3.1.2. Proteinexpression in Insektenzellen

Da in der Vergangenheit die Überexpression der Zielproteine ein großes Problem darstellte, wurde die Optimierung der Expression unter Verwendung verschiedener Insektenzellen vorgenommen.^{[77],e} Hierbei wurden neben den bisher verwendeten Sf9-Zellen auch die Hi5-Zellen oder TNAO-Zellen für die Expression getestet. Schlussendlich hat sich der Wechsel des verwendeten Mediums vom EX-CELL 405-Medium (Sigma-Aldrich) hin zum Sf-900 III SFM-Medium (Gibco) als erfolgreich herausgestellt. Die Überexpression der Zielproteine konnte unter Verwendung dieses Mediums und der Sf9-Zellen erreicht werden. Somit konnte die Ausbeute des Proteins drastisch erhöht werden und für die späteren Kristallisationsexperimente waren somit ausreichende Mengen der Proteine vorhanden. Außerdem wurde für jedes EGFR-Konstrukt vor der Expression im präparativen Maßstab eine Testexpression durchgeführt, um den optimalen Zeitpunkt der Zellernte zu identifizieren. Beispielhaft ist in Abbildung 8 das Ergebnis der Testexpression des Konstrukts EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A (pMK29) gezeigt.^[81] Hierzu wurde eine Testexpression angesetzt und Proben nach 24, 48, 72 und 96 h entnommen und anschließend mittels SDS-PAGE analysiert.

^e Optimierung der Proteinexpression: Dr. M. Keul im Rahmen ihrer Promotion.

Beim Vergleich zur Kontrollkultur ist bei den Proben eine zusätzliche Proteinbande bei ca. 40 kDa zu erkennen. Diese Bande kann aufgrund der Größe dem Zielprotein zugeordnet werden. Zudem ist erkennbar, dass die Proteinmenge in den Probe nach 72 h und 96 h nicht deutlich zunimmt. Aus diesem Grund wurden Expressionen dieses Konstrukts im großen Maßstab nach 72 h geerntet.^{[81],f} Die Analysen des optimalen Ernte-Zeitpunkts wurden mit allen neuen EGFR-Konstrukten durchgeführt, wobei die Ernte in den meisten Fällen nach 72 h erfolgte.

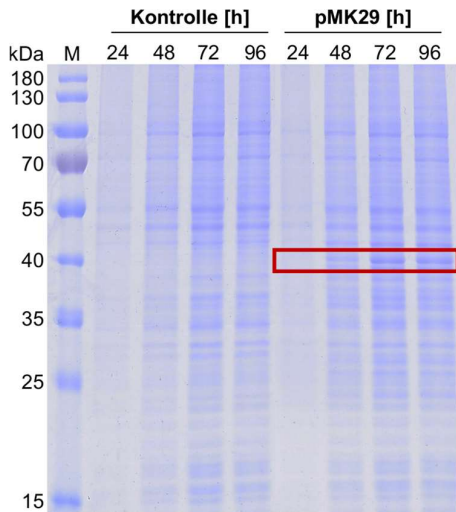


Abbildung 8: Testexpression des Konstrukts EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K866A (pMK29) in S9-Zellen. Aufgetragen wurden folgende Proben: M: Marker, Entnommene Probe der Kontrolle und der Testexpression nach 24, 48, 72 und 96 h. Auf der Höhe von ca. 40 kDa sind Banden erkennbar, die dem Zielprotein zugeordnet werden können (rot markiert).

3.1.3. Etablierung und Optimierung der Proteinreinigungsstrategie

Neben der Proteinexpression hat auch die Proteinreinigungsstrategie einen großen Einfluss auf den Erfolg der anschließenden Proteinkristallisation, da nicht nur eine große Menge des Zielproteins benötigt wird, sondern auch eine hohe Reinheit des Proteins von Nöten ist. Da die ausreichenden Ausbeuten der Zielproteine durch die Optimierung der Expression bereits erzielt werden konnten, musste im weiteren Verlauf auch die Reinigungsstrategie angepasst werden.^{[77],g} In der Vergangenheit wurden in der AG Rauh zwei verschiedene Reinigungsprotokolle eingesetzt (Abbildung 9A und 9B).^h Die Abfolge der Reinigungsschritte sowie die verwendeten Puffer waren hierbei identisch, nur wurde bei dem zweiten Protokoll noch eine

^f Bestimmung des Erntezeitpunkts für das Konstrukt pMK29: J. Niggenaber im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

^g Optimierung der Proteinreinigungsstrategie: In Zusammenarbeit mit Dr. M. Keul im Rahmen ihrer Promotion.

^h Bisherige Reinigungsprotokolle der EGFR-Kristallisationskonstrukte: Dr. C. Becker im Rahmen seiner Promotion und Dr. M. Keul im Rahmen ihrer Promotion.

Anionenaustauschchromatographie der finalen Größenausschlusschromatographie vorgeschaltet.

Ziel dieses zusätzlichen Reinigungsschrittes war die Auftrennung des Gemisches anhand des Phosphorylierungsmusters der Zielproteine, die häufig durch die heterologe Expression in komplexeren Expressionssystemen auftreten. Für die anschließende Größenausschlusschromatographie und die darauffolgende Proteinkristallisation wurde daraufhin nur die unphosphorylierte Spezies eingesetzt. Die Verwendung der etablierten Reinigungsprotokolle hat, mit Ausnahme weniger Ansätze, jedoch nicht zum Kristallwachstum der Zielproteine geführt. Aus diesem Grund wurde die von HANAN *et al.* etablierte Proteinreinigungsstrategie getestet.^[83] In Abbildung 9C ist der Ablauf der Reinigung nach HANAN *et al.* dargestellt. Ein Vergleich der Pufferzusammensetzung ist in Tabelle A3 im Anhang dargestellt. Ein deutlicher Unterschied ist, dass anstelle von Dithiothreitol (DTT) das mildere Reduktionsmittel Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) genutzt wurde. Außerdem wird ein zusätzlicher Puffer für die Zellyse verwendet, der, im Vergleich zu allen folgenden Puffern, einen geringeren pH-Wert (pH 7,5) aufweist. Im finalen Schritt wurde das reine Zielprotein in einen finalen Puffer überführt, der eine deutlich geringe Salzkonzentration aufweist.

A



B



C



Abbildung 9: In der Vergangenheit in der AG Rauh etablierte Reinigungsstrategien und das Reinigungsprotokoll nach HANAN *et al.*. **A:** Die bisherige Reinigungsstrategie für die EGFR-Kristallisationskonstrukte besteht aus einer Nickel-Affinitätschromatographie (Ni-AC, grün), gefolgt von einer Dialyse über Nacht mit gleichzeitiger Abspaltung des His₆-Tags (blau). Daran schließt sich eine weitere Nickel-Affinitätschromatographie (grün) an, gefolgt von einer Anionenaustauschchromatographie (AEX, rot). Abschließend wurde eine Größenausschlusschromatographie (SEC, orange) durchgeführt. **B:** Diese Reinigungsstrategie ist identisch zur Strategie in A, nur wurde hierbei auf die Anionenaustauschchromatographie verzichtet. **C:** Darstellung der Reinigungsstrategie nach HANAN *et al.*, die ebenfalls mit einer Nickel-Affinitätschromatographie (grün) beginnt. Während der Dialyse über Nacht wurde auch hier gleichzeitig der His₆-Tag abgespalten (blau). Darauf folgte eine weitere Nickel-Affinitätschromatographie (grün), eine erste Größenausschlusschromatographie (orange), eine Anionenaustauschchromatographie (rot) und anschließend eine finale zweite Größenausschlusschromatographie (gelb) zur Überführung in den finalen Puffer.

Im folgenden Abschnitt wird die Reinigungsstrategie nach HANAN *et al.* am Beispiel des Kristallisationskonstrukts EGFR-T790M/V948R (pMK33) gezeigt. Alle Reinigungsschritte erfolgten bei 4 °C unter Verwendung des FPLC-Systems ÄKTA pure (GE Healthcare) und wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Nach erfolgreicher Zellyse und Klärung des Lysats wurde eine Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt. Hierbei konnte das Zielprotein durch den N-Terminale His₆-Tag an das nickelhaltige Säulenmaterial binden. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch einen linearen Imidazol-Gradienten (Abbildung 10). Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigte, dass sowohl in der Pellet-Fraktion als auch in der Überstand-Fraktion das Zielprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa enthalten ist. Der Durchfluss der Affinitätssäule hingegen weist das Zielprotein nicht auf. Diese Fraktion enthält viele Proteinverunreinigungen, die beim Durchlaufen der Säule nicht an das Säulenmaterial gebunden haben und somit bereits vom Zielprotein abgetrennt werden konnten. Durch einen linearen Imidazol-Gradienten wurde das Zielprotein im nächsten Schritt von der Säule eluiert (Peak 1, Fraktionen 1-10). Die Fraktionen des Zielproteins wurden vereinigt und über Nacht gegen einen Puffer mit niedrigerer Salzkonzentration dialysiert wobei durch Zugabe von Thrombin der His₆-Tag des Proteins abgespalten wurde.

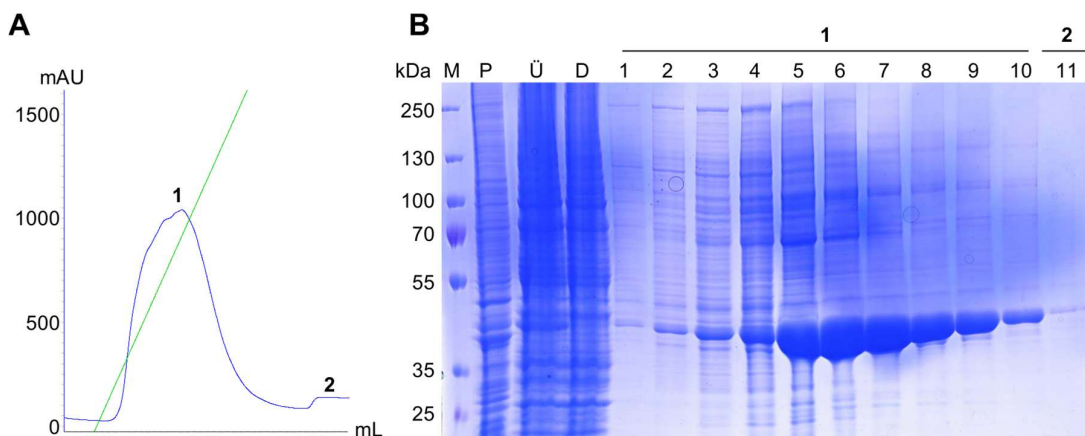


Abbildung 10: Nickel-Affinitätschromatographie als erster Schritt der Proteinreinigung. **A:** Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie des Kristallisationskonstrukts EGFR-T790M/V948R (pMK33). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Grün: linearer Elutionsgradient mit 250 mM Imidazol bei 100 %. **B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie. P: Pellet nach erfolgreicher Zellyse. Ü: Überstand nach erfolgreicher Zellyse. D: Durchfluss der Affinitätssäule. 1-10: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks 1. Das Zielprotein ist durch deutliche Banden auf der Höhe von 40 kDa erkennbar.

Nach der Dialyse wurde eine weitere Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt, um das gespaltene Protein von verbliebenen Verunreinigungen und von ungespaltenem Protein abzutrennen (Abbildung 11). Durch den Verlust des His₆-Tags konnte das Zielprotein nicht mehr an das Säulenmaterial binden und war somit im Durchfluss der Säule (Peak 1) zu finden. Dies wird durch die Proteinbanden auf der SDS-PAGE mit einer Größe von ca. 37 kDa bestätigt.

Durch den zweiten Peak des Chromatogramms sowie die Fraktionen 10-11 der SDS-PAGE wird deutlich, dass ein Teil des Proteins während der Dialyse nicht geschnitten wurde und somit weiterhin neben anderen unspezifischen Verunreinigungen an das Säulenmaterial binden konnte und erst durch den Imidazol-Gradienten von der Säule eluiert wurde. Außerdem kann eine Fehlfaltung des Zielproteins die Spaltung des His₆-Tags verhindert haben.

Das SDS-Gel verdeutlicht, dass durch diesen zweiten Reinigungsschritt viele weitere Verunreinigungen vom Zielprotein abgetrennt werden konnten. Die Fraktionen des Durchflusses wurden vereinigt und auf ein Volumen von 2 mL eingengt.

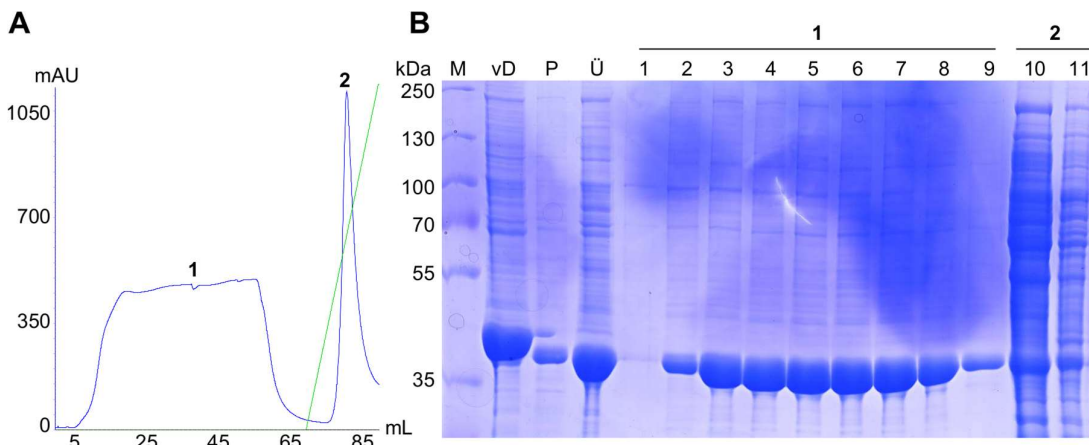


Abbildung 11: Nickel-Affinitätschromatographie als zweiter Schritt der Proteinreinigung. **A:** Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie des Kristallisationskonstrukts EGFR-T790M/V948R (pMK33). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Grün: linearer Elutionsgradient mit 250 mM Imidazol bei 100 %. **B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie. vD: Proteingemisch vor der Dialyse. P: Pellet nach Dialyse. Ü: Überstand nach Dialyse. 1-9: verschiedene Fraktionen des Durchflusses; 10-11: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks. Das Zielprotein ist durch deutliche Banden auf der Höhe von 37 kDa erkennbar.

Der nächste Schritt der Proteinreinigungsstrategie war eine Größenausschlusschromatographie, durch deren Hilfe die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt wurden (Abbildung 12). Das Chromatogramm weist zwei Peaks auf, wobei im ersten Peak einige Verunreinigungen mit einem höheren Molekulargewicht sowie das Zielprotein enthalten sind. Vermutlich sind die Proteinbanden auf der Höhe von ca. 37 kDa den Dimeren des Zielproteins zuzuordnen. Des Weiteren ist durch das SDS-Gel deutlich, dass der zweite Peak das Zielprotein in hoher Konzentration und bereits in hoher Reinheit enthält. Diese Fraktionen wurden für die weitere Reinigung vereinigt.

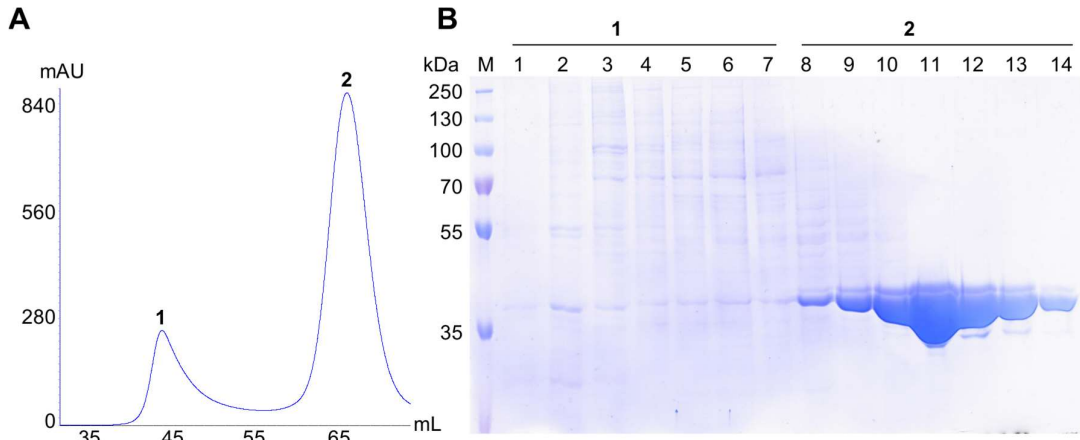


Abbildung 12: Größenausschlusschromatographie als dritter Schritt der Proteinreinigung. **A:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie des Kristallisationskonstrukts EGFR-T790M/V948R (pMK33). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. **B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Größenausschlusschromatographie. 1-7: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks 1. 8-14: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks 2. Das Zielprotein ist durch deutliche Banden auf der Höhe von 37 kDa erkennbar.

Der vierte Schritt der Proteinreinigung war eine Anionenaustauschchromatographie, die das Auftrennen des Phosphospezies-Gemisches ermöglichen sollte. Hierzu wurde ein Säulenmaterial verwendet, das eine hohe Affinität gegenüber anionischen Molekülen besitzt. Allerdings konnte dieser Schritt der Reinigung nicht erfolgreich durchgeführt werden, da das Zielprotein aufgrund eines Problems des FPLC-Systems vor Beginn der Elution direkt von der Säule eluiert wurde, ohne eine Trennung anhand des Phosphorylierungsmusters zu erhalten (Abbildung 13). Daher wurden alle Fraktionen des ersten Peaks für die Überführung in den finalen Puffer vereinigt und das Volumen auf 1 mL eingengt.

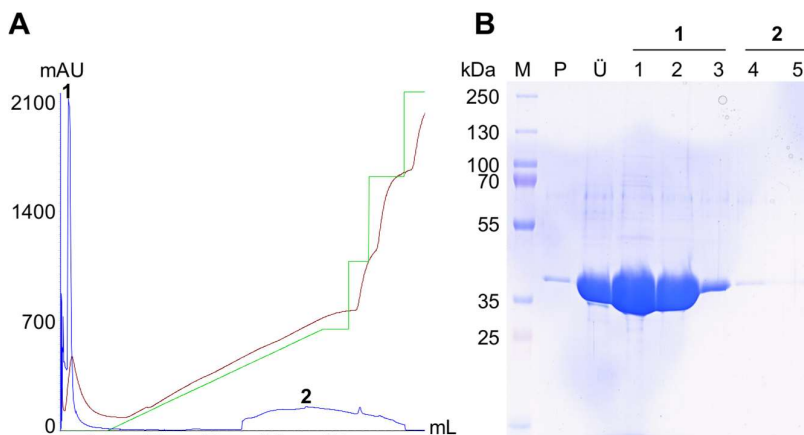


Abbildung 13: Anionenaustauschchromatographie als vierter Schritt der Proteinreinigung. **A:** Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie des Kristallisationskonstrukts EGFR-T790M/V948R (pMK33). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Grün: linearer Elutionsgradient mit 300 mM NaCl bei 100 %. **B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie. P: Pellet. Ü: Überstand. 1-3: verschiedene Fraktionen des Peaks vor Beginn der Elution. 4-5: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks durch stufenweise Erhöhung der Salzkonzentration. Das Zielprotein ist durch deutliche Banden auf der Höhe von 37 kDa erkennbar.

Nach der finalen Größenausschlusschromatographie, zur Überführung des Proteins in den finalen Puffer, wurden Proteinkristallisationsexperimente durchgeführt. Hierbei konnte erstmalig das Wachstum von Proteinkristallen beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde seitdem auf die Anionenaustauschchromatographie verzichtet. Außerdem wurde die erste Größenausschlusschromatographie direkt mit einem leicht veränderten finalen Puffer durchgeführt (Tabelle A3). Durch diese Optimierungen konnte die Anzahl der durchzuführenden Säulen von fünf auf drei verkürzt werden (Abbildung 14). Dieses optimierte Reinigungsprotokoll (Abbildungen A6-A8) wurde seitdem ebenfalls erfolgreich für die Kristallisationskonstrukte EGFR-WT (pCB02), EGFR-T790M (pCB17) und EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A (pMK29) eingesetzt. Außerdem führt die Verkürzung der Reinigungsstrategie zu einer deutlichen Erhöhung der Proteinausbeute.

A**B**

Abbildung 14: Reinigungsprotokoll nach HANAN *et al.* und das neue verkürzte Reinigungsprotokoll. **A:** Darstellung der Reinigungsstrategie nach HANAN *et al.*, die mit einer Nickel-Affinitätschromatographie (grün) beginnt. Während der Dialyse über Nacht wurde hier gleichzeitig der His₆-Tag abgespalten (blau). Darauf folgt eine weitere Nickel-Affinitätschromatographie (grün), eine erste Größenausschlusschromatographie (orange), eine Anionenaustauschchromatographie (rot) und anschließend eine finale zweite Größenausschlusschromatographie (gelb) zur Überführung in den finalen Kristallisationspuffer. **B:** Darstellung der neuen optimierten und verkürzten Reinigungsstrategie. Hier wurde im Vergleich zum Protokoll nach HANAN *et al.* auf die Anionenaustauschchromatographie sowie die zweite Größenausschlusschromatographie verzichtet.

Für das Kristallisationskonstrukt EGFR-D770_N771insNPG (pJN06) wurde die optimierte Reinigungsstrategie anfänglich ebenfalls getestet, allerdings aggregierte das Protein vor der ersten Größenausschlusschromatographie. Daher muss die Proteinreinigungsstrategie für dieses Konstrukt zukünftig weiter optimiert werden.

3.1.4. Etablierung von Co-Kristallisationssystemen

Strukturbiologische Analysen klinisch-relevanter Zielproteine, besonders in Verbindung mit verschiedenen Liganden, sind eine wichtige Aufgabe der Wirkstoffentwicklung im Bereich der medizinischen Chemie. Durch aufgeklärte Komplexkristallstrukturen können die Protein-Ligand-Wechselwirkungen analysiert und visualisiert werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen stellt die Entwicklung und Optimierung der Inhibitoren einen iterativen Prozess der Wirkstoffentwicklung dar. Allerdings stellt die Identifizierung geeigneter Kristallisationsbedingungen einen schwer planbaren Schritt dar, der für jedes Protein, selbst für jede Mutante eines Proteins verschieden sein kann. Daher ist die Etablierung verlässlicher Kristallisationssysteme ein wichtiger Schritt für die erfolgreiche Strukturanalyse.

Die Identifizierung geeigneten Bedingungen für die Co-Kristallisationen ausgewählter klinisch-relevanter EGFR-Konstrukte mit verschiedenen niedermolekularen Verbindungen, stellte eine zentrale Aufgabe dieser Arbeit dar. Hierzu wurden die reinen Zielproteine vorab mit 2- bis 3-fachem molekularem Überschuss der Inhibitoren für 1-2 h auf Eis inkubiert, um die Inhibitor-Protein-Komplexbildung zu ermöglichen. In vielen Ansätzen wurden irreversible Inhibitoren verwendet, die das Cys797 innerhalb der ATP-Bindetasche der Zielkinase kovalent modifizieren. Durch massenspektrometrische Analysen konnte die hohe Reaktivität der Verbindungen nachgewiesen werden, da bereits nach 1-2-stündiger Inkubation das Protein kovalent modifiziert vorlag (Abbildung 15).

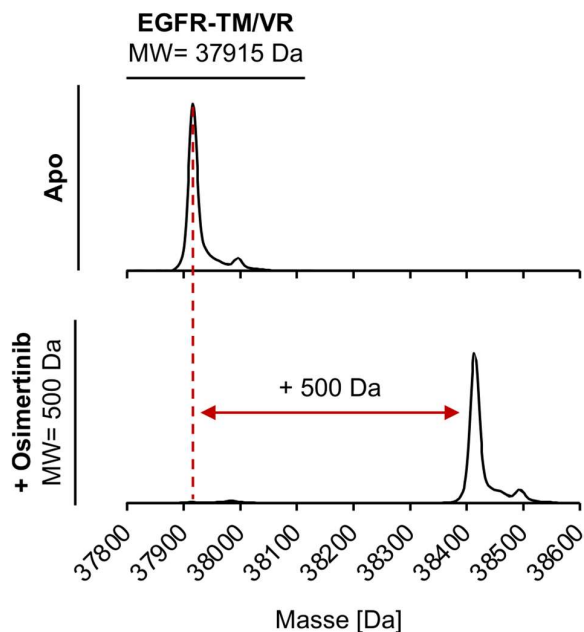


Abbildung 15: Massenspektrometrische Analyse der kovalenten Bindungsbildung von EGFR-T790M/V948R und 3-fachem Überschuss Osimertinib nach vorheriger Inkubation auf Eis. Die vollständige Modifizierung des Zielproteins ist an der Massenverschiebung um das molekulare Gewicht des Inhibitors (500 Da) zu erkennen.

Abbildung 15 zeigt beispielhaft die Ergebnisse der Inkubation auf Eis von EGFR-T790M/V948R mit 3-fachem Überschuss Osimertinib. Die Massenzunahme von 500 Da entspricht hierbei dem molekularen Gewicht des Inhibitors. Die Proteine wurden nach Überprüfung der kovalenten Modifikation für die anschließenden Kristallisationsexperimente eingesetzt.

3.1.4.1. EGFR-T790M/V948R (pMK33)

Für die Proteinkristallisation des EGFR-T790M/E865A/E866A/K867A-Konstrukts (pMK25) wurden in der Vergangenheit neben literaturbekannten Bedingungen^[75,84] auch ungefähr 600 kommerziell erhältliche Kristallisationsbedingungen in Screening-Experimenten getestet (JCSG Core I-IV, JCSG⁺ Suite und Classics Suite von Qiagen). Hierbei konnten zwei potentielle Konditionen gefunden werden, die beide PEG3350 als Fällungsmittel enthalten und in denen kleine kubische bzw. nadelförmige Kristalle gewachsen sind (Abbildung 16: A: 20 % PEG3350, 200 mM NH₄-Formiat, 20 °C. B: 20 % PEG3350, 200 mM MgSO₄, 20 °C). Diese Proteinkristalle wurden daraufhin an der *Swiss Light Source* (SLS) des Paul Scherrer Instituts (PSI) vermessen. Bei der Messung wurden die Kristalle mit Synchrotronlicht beschossen, das durch Ablenkung der Elektronen des Elektronenrings entsteht. Allerdings konnte keine ausreichende Proteindiffraktion erhalten werden, sodass kein Datensatz für die anschließende Strukturaufklärung aufgenommen werden konnte. Aus diesem Grund wurden die identifizierten Bedingungen für nachfolgende *Fine*-Screens genutzt, in denen systematisch Proteinkonzentration sowie Fällungsmittelkonzentration und Salzkonzentration variiert wurden. Durch die durchgeführten *Fine*-Screens konnte mit einer der zwei getesteten Bedingungen (Abbildung 16: C: 22,5 % PEG3350, 100 mM MgSO₄, 20 °C) das Kristallwachstum reproduziert werden.^{[81],i} Allerdings konnte durch die Variation der einzelnen Komponenten kein positiver Trend in Bezug auf die Größe und Beschaffenheit der Kristalle vernommen werden. Aus diesem Grund wurden die identifizierten Bedingungen in weiteren *Fine*-Screens auch für das Kristallisationskonstrukt EGFR-T790M/V948R (pMK33) getestet. Allerdings konnte hierbei zunächst nur kristalliner Niederschlag identifiziert werden (Abbildung 16: D: 20 % PEG3350, 50 mM MgSO₄, 20 °C). Gleichzeitig wurde auch der Einfluss verschiedener Additive (*Additive Screen* von Hampton Research) bei unterschiedlichen Temperaturen auf das Kristallwachstum untersucht. Hierbei konnte die Zugabe von 3 % Ethylenglycol bei 20 °C das Proteinkristallwachstum induzieren (Abbildung 16: E: 22,5 % PEG3350, 100 mM MgSO₄, 3 % Ethylenglycol, 20 °C). Basierend auf diesem Ergebnis wurden weitere *Fine*-Screens unter Variation der Konzentrationen von PEG3350 als Fällungsmittel, MgSO₄ als Salz und Ethylenglycol als Additiv bei 20 °C durchgeführt.

ⁱScreening-Experimente sowie *Fine*-Screens mit pMK25: J. Niggenaber im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

Das Ergebnis waren die ersten länglichen Kristalle (Abbildung 16: F: 27,5 % PEG3350, 200 mM MgSO₄, 4 % Ethylenglycol, 20 °C), die eine ausreichende Größe für die Röntgenanalyse aufwiesen und zur ersten Komplexkristallstruktur von EGFR-T790M/V948R mit gebundenem Inhibitor führten. Somit konnte ein verlässliches Kristallisationssystem etabliert werden, bei dem der ideale Kristallisationsbereich bei 20-37,5 % PEG3350, sowie 100 mM MgSO₄ und 0-4 % Ethylenglycol und die ideale Proteinkonzentration zwischen 5,5-7,5 mg/mL liegt.

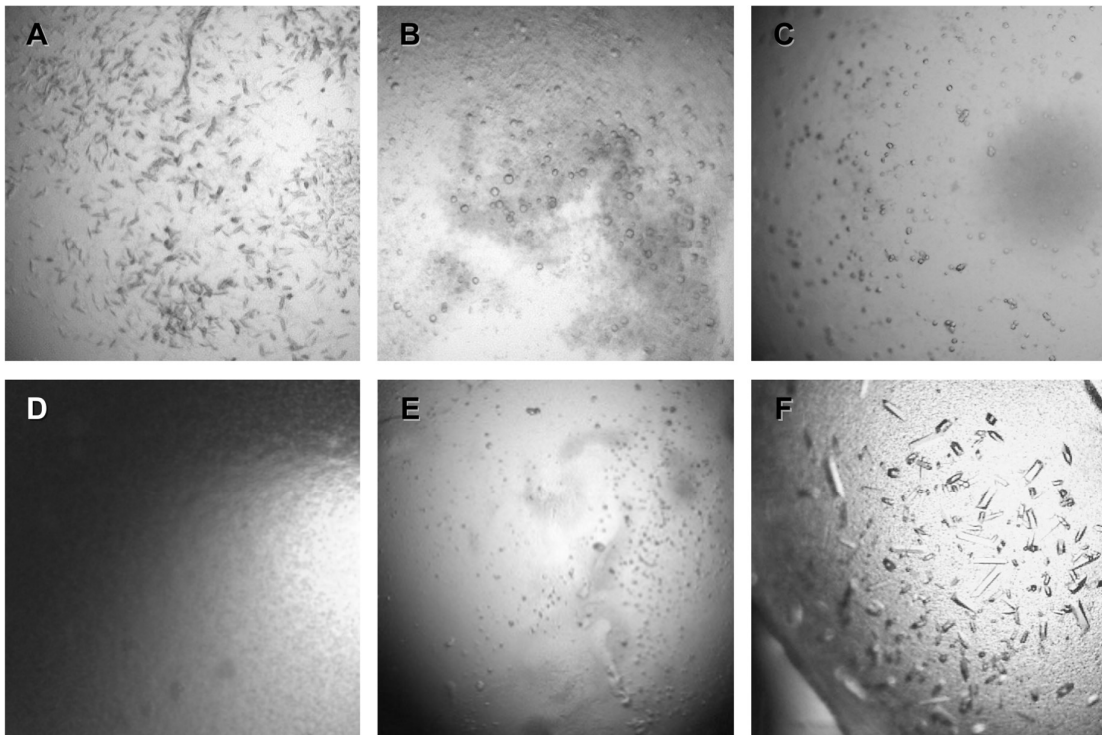


Abbildung 16: Beispielhafte Mikroskopie-Aufnahmen verschiedener Kristallisationsansätze der Kristallisationskonstrukte EGFR-T790M/E865A/E866A/K867A (pMK25) und EGFR-T790M/V948R (pMK33). **A-C:** Kristallisations-Experiment mit dem EGFR-T790M/E856A/E866A/K867A-Konstrukt. **D-F:** Kristallisations-Experiment mit dem EGFR-T790M/V948R-Konstrukt unter Verwendung nachstehender Kristallisationsbedingungen. **A:** 20 % PEG3350, 200 mM NH₄-Formiat, 20 °C. **B:** 20 % PEG3350, 200 mM MgSO₄, 20 °C. **C:** 22,5 % PEG3350, 100 mM MgSO₄, 20 °C. **D:** 20 % PEG3350, 50 mM MgSO₄, 20 °C. **E:** 22,5 % PEG3350, 100 mM MgSO₄, 3 % Ethylenglycol, 20 °C. **F:** 27,5 % PEG3350, 200 mM MgSO₄, 4 % Ethylenglycol, 20 °C.

Die wachsenden Proteinkristalle weisen jedoch nicht immer die gleiche Morphologie auf. Neben den in Abbildung 16F gezeigten länglichen und eher schmalen Kristallen wurden unter anderem auch nadelförmige sowie rechteckige Kristallmorphologien gefunden (Abbildung 17). Auch die Anordnungen der Atome innerhalb der verschiedenen Kristalle sind unterschiedlich. Bisher wurden sowohl monokline als auch orthorhombische Kristallsysteme gefunden (Tabelle 2). Hierbei ist auffällig, dass bei gleicher Raumgruppe ($P 2_1 2_1 2_1$) unterschiedlich viele Moleküle pro asymmetrische Einheit enthalten sein können und die Einheitszellenparameter hierbei variieren.

Tabelle 2: Bisherige Raumgruppen und Kristallsysteme der Kristalle von EGFR-T790M/V948R sowie deren Einheitszellenparameter und die Anzahl der Moleküle pro asymmetrische Einheit. Die Einheitszellenparameter sind hierbei gerundet aufgezeigt.

Raumgruppe	Kristallsystem	Einheitszellenparameter	Moleküle pro Einheit
P 1 2 ₁ 1 (4)	monoklin	a; b; c (Å) = 75, 82, 90 α; β; γ (°) = 90; 91; 90	4
P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	orthorhombisch	a; b; c (Å) = 35; 70; 112 α; β; γ (°) = 90; 90; 90	1
P 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (19)	orthorhombisch	a; b; c (Å) = 75; 84; 92 α; β; γ (°) = 90; 90; 90	2
I 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ (24)	orthorhombisch	a; b; c (Å) = 70; 90; 109 α; β; γ (°) = 90; 90; 90	1

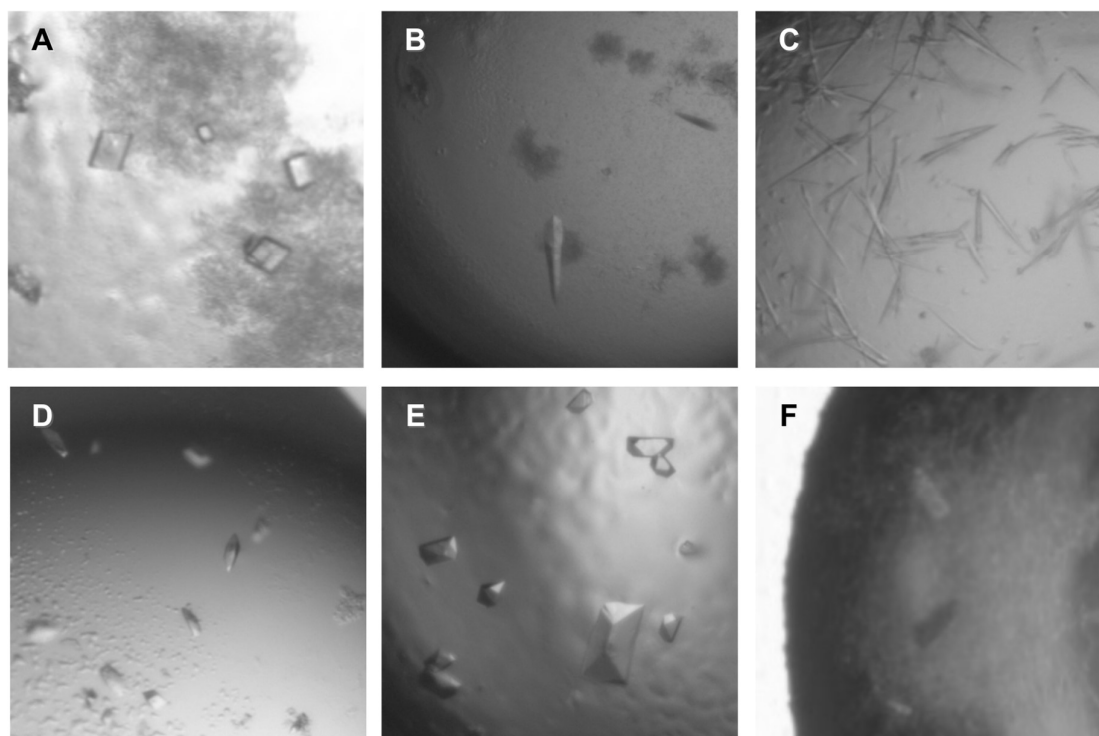


Abbildung 17: Beispielhafte Mikroskopie-Aufnahmen verschiedener Kristalle von EGFR-T790M/V948R mit unterschiedlichen Kristallmorphologien unter Verwendung nachstehender Kristallisationsbedingungen. **A:** Rechteckige Kristalle, 25 % PEG3350, 100 mM MgSO₄, 4 % Ethylenglycol 20 °C. **B:** Große Nadeln, 27,5 % PEG3350, 100 mM MgSO₄, 4 % Ethylenglycol 20 °C. **C:** Viele kleine Nadeln, 35 % PEG3350, 100 mM MgSO₄, 4 % Ethylenglycol, 20 °C. **D:** Kleine eher schale Kristalle, 30 % PEG3350, 100 mM MgSO₄, 4 % Ethylenglycol 20 °C. **E:** Große rechteckige Kristalle 30 % PEG3350, 100 mM MgSO₄, 20 °C. **F:** Große rechteckige Kristalle, 27,5 % PEG3350, 100 mM MgSO₄, 2 % Ethylenglycol, 20 °C.

3.1.4.2. EGFR-T790M/C797F/E865A/E866A/K867A (pMK29)

Für das Kristallisationskonstrukt EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A (pMK29) wurden literaturbekannten Bedingungen,^[75,84] die in der Vergangenheit auch bereits für ein anderes EGFR-Konstrukt (pCB17)^j zu Kristallwachstum bei 20 °C geführt haben, getestet. Zu Beginn konnte jedoch nur das Wachstum sehr kleiner kubischer Kristalle (Abbildung 18: A: 1,1 M Na-K-Tartrat, 100 mM Na-MES (pH 6,5), 20 °C) bei einer Proteinkonzentration von 7,5 mg/mL verzeichnet werden. Daher wurde die Proteinkonzentration im Weiteren auf 3-5,2 mg/mL erniedrigt, da auch in der Literatur niedrigere Konzentrationen beschrieben sind. Da daraufhin nur kleine kubische Kristalle wuchsen, wurde der Einfluss verschiedener Additive (*Additive-Screen* von Hampton Research) auf das Kristallwachstum untersucht. Hierbei konnte das Wachstum kubischer Kristalle mit 4 % der Additive 1,3-Propandiol bzw. Acetonitril beobachtet werden (Abbildung 18: B: 1,1 M Na-K-Tartrat, 100 mM Na-MES (pH 6,5), 4 % 1,3-Propandiol, 20 °C. C: 1,1 M Na-K-Tartrat, 100 mM Na-MES (pH 6,5), 4 % Acetonitril, 20 °C). Dieses Ergebnis wurde als Ausgangspunkt für folgende *Fine-Screens* genutzt, in denen ein Kristallwachstum unter Verwendung von 1,3-Propandiol bei einer Proteinkonzentration von 3 mg/mL identifiziert werden konnte (Abbildung 18: D: 1,4 M Na-K-Tartrat, 75 mM Na-MES (pH 6,5), 4 % 1,3-Propandiol, 20 °C). Da die gewachsenen Kristalle noch immer relativ klein waren, wurde in weiteren *Fine-Screens* die Proteinkonzentration auf 4 mg/mL erhöht. Des Weiteren wurden höhere Na-K-Tartrat-Konzentrationen (1,2-1,6 M) sowie pH-Werte von 6,5 bis 7,5 der Na-MES-Lösung für die Kristallisation eingesetzt. So konnte das Kristallwachstum ausreichend großer kubischer Kristalle induziert werden (Abbildung 18: E: 1,4 M Na-K-Tartrat, 100 mM Na-MES (pH 6,5), 4 % 1,3-Propandiol, 20 °C), die in Beugungsexperimenten zu verwendbaren Datensätzen führten, die zur Strukturaufklärung genutzt werden konnten. Somit konnte ein verlässliches Kristallisationssystem etabliert werden bei dem der ideale Kristallisationsbereich zwischen 1,2-1,6 M Na-K-Tartrat, 100 mM Na-MES (pH 6,5-7,5) und 0-4 % 1,3-Propandiol bei 20 °C liegt. Die ideale Proteinkonzentration liegt zwischen 3,5-5,5 mg/mL.^k

Alle wachsenden kubischen Proteinkristalle weisen die Raumgruppe I 2 3 auf. Zudem liegt immer nur ein Molekül pro asymmetrische Einheit vor.

Zusätzlich wurde das Kristallwachstum unter den etablierten Bedingungen des EGFR-T790M/V948R-Konstrukts des vorherigen Abschnitts 3.1.4.1 untersucht. Hierbei konnte das Kristallwachstum kleiner kubischer Kristalle beobachtet werden (Abbildung 18: F: 20 % PEG3350, 100 mM MgSO₄, 3 % Ethylenglycol, 20 °C).

^j Generierung der Kristallstrukturen von pCB17 in Komplex mit niedermolekularen Verbindungen: Dr. C. Becker im Rahmen seiner Promotion.

^k Optimierung der Kristallisationsbedingungen für pMK29: In Zusammenarbeit mit Dr. M. Keul im Rahmen ihrer Promotion.

Allerdings wurden diese Kristallisationsbedingungen nicht weiterverfolgt, da das bereits beschriebene Kristallisationssystem ein verlässliches Kristallwachstum ermöglichte.

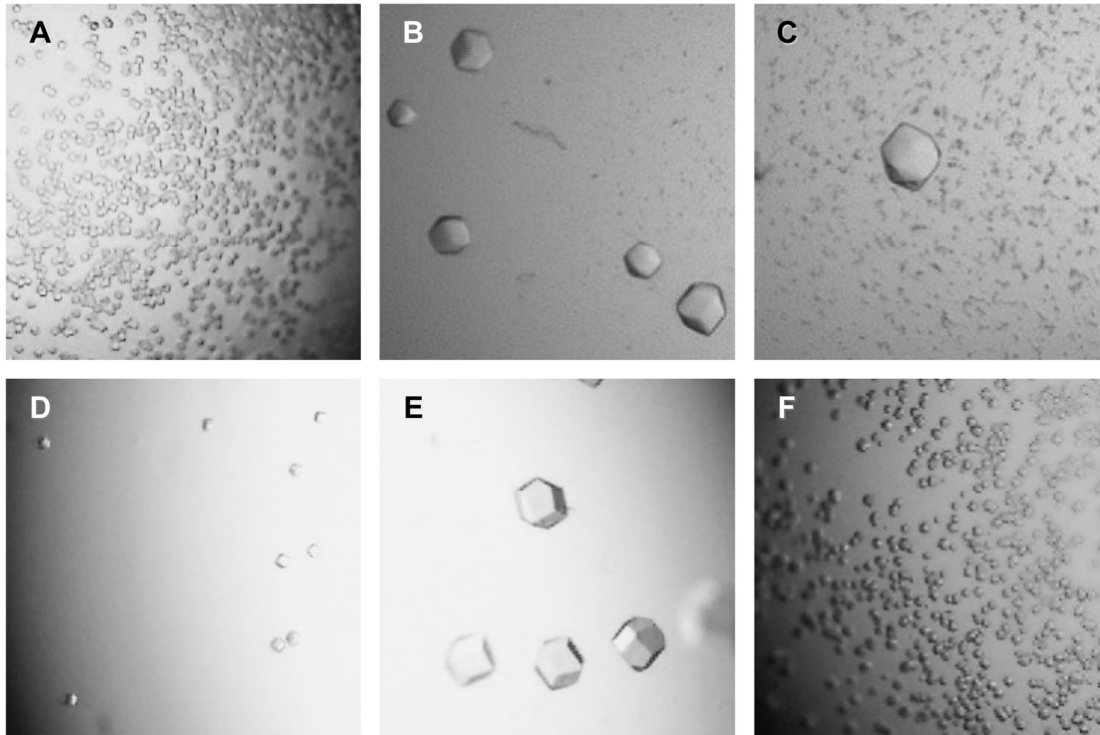


Abbildung 18: Beispielhafte Mikroskopie-Aufnahmen verschiedener kubischer Kristalle von EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A. Hierbei ist in **A**, **D**, **E** und **F** das Wachstum der Kristalle in *Fine-Screens* gezeigt. In **B** und **C** hingegen wird das Kristallwachstum während des Additiv-Screens im kleineren Maßstab gezeigt. Für die Kristallisationen wurden folgende Kristallisationsbedingungen verwendet: **A:** 1,1 M Na-K-Tartrat, 100 mM Na-MES (pH 6,5), 20 °C. **B:** 1,1 M Na-K-Tartrat, 100 mM Na-MES (pH 6,5), 4 % 1,3-Propandiol, 20 °C. **C:** 1,1 M Na-K-Tartrat, 100 mM Na-MES (pH 6,5), 4 % Acetonitril, 20 °C. **D:** 1,4 M Na-K-Tartrat, 75 mM Na-MES (pH 6,5), 4 % 1,3-Propandiol, 20 °C. **E:** 1,4 M Na-K-Tartrat, 100 mM Na-MES (pH 6,5), 4 % 1,3-Propandiol, 20 °C. **F:** 20 % PEG3350, 100 mM MgSO₄, 3 % Ethylenglycol, 20 °C.

3.1.4.3. EGFR-T790M (pCB17)

Das EGFR-T790M-Konstrukt (pCB17) wurde bereits in der Vergangenheit erfolgreich basierend auf literaturbekannten Bedingungen kristallisiert.^[75,84] Da die Bedingungen ebenfalls die Verwendung von Na-K-Tartrat und Na-MES beschreiben, wurde für dieses Kristallisationskonstrukt die in Abschnitt 3.1.4.2 optimierten Bedingungen für die Kristallisation getestet.^[85] Dabei wurde ebenfalls das Wachstum großer kubischer Kristalle beobachtet, die in Beugungsexperimenten verwendbare Datensätze für die Strukturaufklärung lieferten. Aus diesem Grund konnte auch für dieses Konstrukt ein optimiertes Kristallisationssystem (1,2-1,6 M Na-K-Tartrat, 100 mM Na-MES (pH 6,5-7,5) und

[†] Etablierung der Proteinkristallisation von pCB17: Dr. C. Becker im Rahmen seiner Promotion.

0-4 % 1,3-Propanediol, 20 °C; Proteinkonzentration von 3,5-5,5 mg/mL) etabliert werden.^{[85],m}

3.1.5. Etablierung von Soakingsystemen

Neben der Co-Kristallisation eines Zielproteins mit verschiedenen Inhibitoren stellt das *Soaking*-Experiment eine weitere Option zur Generierung komplexer Kristallstrukturen zur Analyse der Protein-Ligand-Wechselwirkungen dar. Für einen häufig durchgeführten *Soaking*-Ansatz erfolgt zunächst die Kristallisation des Zielproteins ohne Zugabe der gewünschten Verbindung. Die niedermolekularen Verbindungen werden nachfolgend direkt zu den gewachsenen Kristallen gegeben. Wichtig ist, dass die Kristallpackungskontakte der genutzten Kristalle im Bereich der Ligandenbindungsstelle nicht zu eng sind, da sonst die Diffusion der Verbindungen verhindert werden kann. Allerdings ist auch beim *Soaking* die wichtigste Voraussetzung die Etablierung eines reproduzierbaren Kristallisationssystems für das jeweilige Zielprotein.

3.1.5.1. EGFR-WT (pCB02)

Da bei dem EGFR-WT eine gut zugängliche Bindungsstelle für die Liganden vorliegt, ist das Protein für *Soaking*-Experimente verwendbar. In der Vergangenheit wurden bereits erste *Soaking*-Experimente mit EGFR-WT durchgeführt. Allerdings lag die Auflösung der generierten Struktur nur bei 3,7 Å.^{[75,86],n}

Das Kristallwachstum des Apo-Proteins konnte ebenfalls durch die Verwendung von Na-K-Tartrat und Na-MES induziert werden, wodurch auch für dieses Konstrukt ein verlässliches Kristallisationssystem (1,2-1,6 M Na-K-Tartrat, 100 mM Na-MES (pH 6,5-7,5) und 0-4 % 1,3-Propanediol, 20 °C, Proteinkonzentration von 3,5-5,5 mg/mL) vorliegt.

Allerdings konnte zunächst beobachtet werden, dass die Zugabe der 10 mM Stammlösungen der Verbindungen in DMSO die Kristallbeschaffenheit bereits nach einer Stunde deutlich verschlechtert hat (Abbildung 19A-19C). Die Zugabe führte in vielen Fällen sogar zur kompletten Auflösung der Kristalle. Dieses Problem konnte auch in der Vergangenheit beobachtet werden. Das hatte im Folgenden ebenfalls einen Einfluss auf die Qualität der in Beugungsexperimenten generierten Datensätze. Aus diesem Grund wurde die Durchführung der *Soaking*-Experimente weiter optimiert.^{[85],o}

^m Optimierung der Proteinkristallisation von pCB17: L. Heyden im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

ⁿ Anfängliche *Soaking*-Experimente mit pCB02: Dr. C. Becker im Rahmen seiner Promotion und I. Landel im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit.

^o Optimierung des *Soaking*-Experiments: In Zusammenarbeit mit L. Heyden im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

Hierfür wurde das DMSO der Stammlösungen verdampft und die Verbindungen anschließend im finalen Puffer der Proteinreinigung aufgenommen. Auch wenn die vollständige Lösung der Verbindungen in wässriger Lösung nicht eintrat, wurden diese zu den gewachsenen Kristallen hinzugegeben. Über einen Zeitraum von 24 h (Abbildung 19D-19E) konnte keine optische Veränderung der Kristalle beobachtet werden. Auch nach 48 h besaßen die Kristalle scharfe Kanten und wiesen keine äußerlichen Beeinträchtigungen auf. Im Weiteren waren die erhaltenen Daten der Beugungsexperimente vergleichbar zu Daten unbehandelter Kristalle. Zudem konnte durch die errechnete Elektronendichte eindeutig bestätigt werden, dass die Verbindungen erfolgreich in der ATP-Bindetasche der Kinase-Domäne gebunden haben. Bei kovalenten Verbindungen konnte anhand der generierten Elektronendichte die kovalente Modifikation des Proteins eindeutig bestätigt werden. Somit konnte ein optimiertes Protokoll für *Soaking*-Experimente des EGFR-WT-Konstrukts etabliert werden.

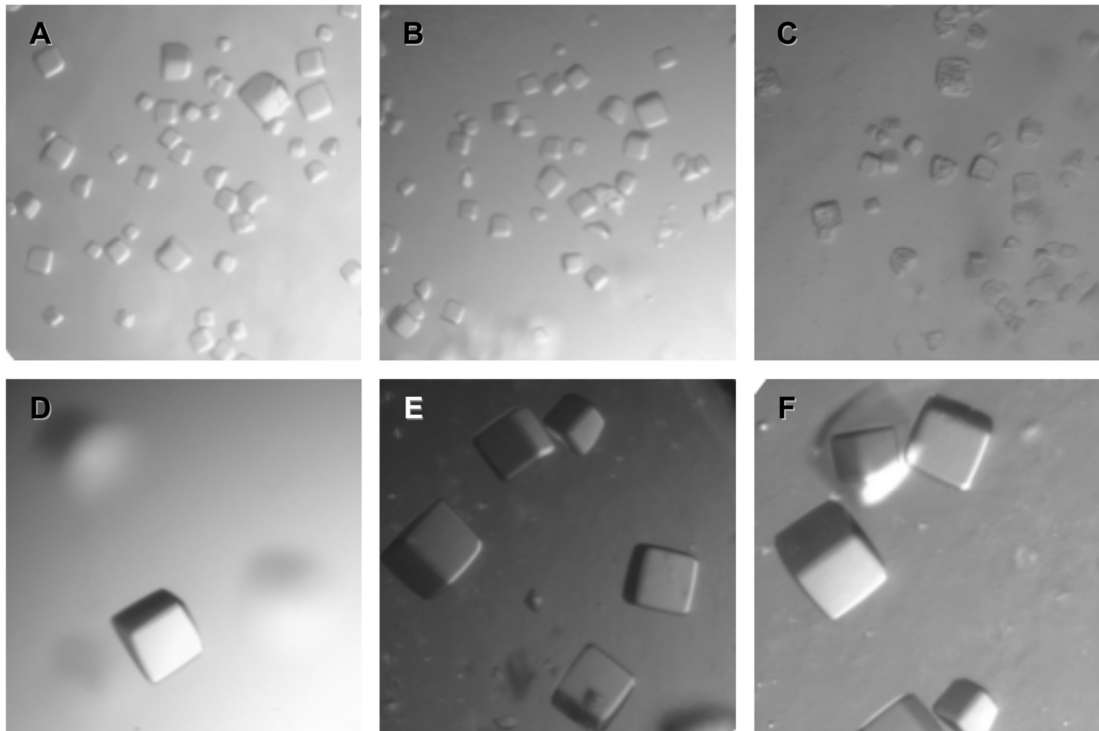


Abbildung 19: Beispielhafte Mikroskopie-Aufnahmen der Kristalle von EGFR-WT nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit den Referenzverbindungen. Hierbei sind in **A**, **B**, und **C** Kristalle nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inkubation mit 10 mM Stammlösungen der Verbindungen in DMSO gezeigt. In **D**, **E**, und **F** sind Kristalle nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inkubation mit den im finalen Reinigungspuffer aufgenommenen Verbindungen gezeigt: **A:** Apo-Kristalle vor Zugabe von 0,2 μ L der 10 mM Stammlösungen der Verbindungen in DMSO. **B:** Kristalle direkt nach der Zugabe von 0,2 μ L der 10 mM Stammlösungen der Verbindungen in DMSO. **C:** Kristalle 1 h nach der Zugabe von 0,2 μ L der 10 mM Stammlösungen der Verbindungen in DMSO. **D:** Apo-Kristalle vor Zugabe von 0,2 μ L der in Puffer gelösten Verbindungen. **E:** Kristalle direkt nach Zugabe von 0,2 μ L der in Puffer gelösten Verbindungen. **F:** Kristalle 24 h nach Zugabe von 0,2 μ L der in Puffer gelösten Verbindungen.

3.1.6. Zusammenfassung

Da das Design der Kristallisationskonstrukte und die Proteinexpression bereits in der Vergangenheit optimiert werden konnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Proteinreinigungsstrategie für vier klinisch-relevante Kristallisationskonstrukte (EGFR-WT, EGFR-T790M, EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A und EGFR-T790M/V948R), zum einen durch Verkürzung des Protokolls und zum anderen durch veränderte Pufferzusammensetzungen optimiert. Außerdem konnten für diese vier Konstrukte verlässliche Kristallisationssysteme identifiziert werden. Für drei der Konstrukte wurde hierbei die Co-Kristallisation mit diversen Verbindungen als Verfahren der Wahl etabliert. Für das EGFR-WT-Konstrukt hingegen wurde das *Soaking*-Experiment optimiert.

3.2. Simultane Co-Kristallisationen in EGFR-T790M/V948R

Ein vielversprechender Ansatz zur Überwindung von Wirkstoff-resistenten Mutationen innerhalb der ATP-Bindetasche stellt die Behandlung mit allosterischen Inhibitoren dar. Hierzu zählen unter anderem EAI001,^[52] EAI045^[52,87] sowie der optimierte Inhibitor JBJ-04-125-02^[88] (Abbildung 20A). Aber auch die auf einem Dibenzodiazepinon-Grundgerüst basierenden Inhibitoren EAI002, DDC4002 sowie die optimierte „Verbindung 3“ (Abbildung 20B) sind hier zu nennen.^[89] Diese Inhibitoren binden in eine alternativen Bindetasche der inaktiven Kinase, die durch die nach außen verlagerte α C-Helix entsteht. Zudem weisen die Inhibitoren eine Selektivität gegenüber EGFR-WT auf, die durch den direkten Kontakt der Inhibitoren zum Türsteher-Methionin (Met790) der Mutante entsteht.^[52] Außerdem können die allosterischen Inhibitoren den inaktiven EGFR-WT aufgrund sterischer Abstoßung mit Aminosäuren der aktiven Schleife nicht binden.^[15,52] Allerdings ist dieser Behandlungsansatz limitiert, da durch die erhöhte asymmetrische EGFR-Dimerbildung die allosterische Bindungsstelle zerstört wird.^[10,52] Daher müssen die meisten allosterischen Inhibitoren mit Antikörpern wie Cetuximab kombiniert werden, welche die Dimerbildung verhindern. Die klinische Anwendung ist allerdings durch die fehlende Mutanten-Spezifität des Antikörpers eingeschränkt.^[90,91] Kürzlich publizierte Studien von TO *et al.* zeigten, dass der allosterische Inhibitor JBJ-04-125-02 zusammen mit Osimertinib in EGFR binden kann. Zudem führte diese simultane Bindung der Inhibitoren *in vitro* und *in vivo* zur Steigerung der Wirksamkeit im Vergleich zur Monotherapie.^[88] Allerdings fehlten bisher die strukturellen Einblicke der simultanen Bindung beider Inhibitor-Typen.

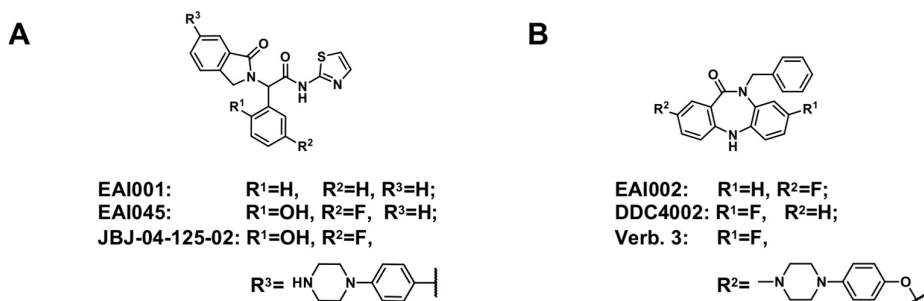


Abbildung 20: Chemische Strukturen der allosterischen Inhibitoren. **A:** Chemische Strukturen der allosterischen Inhibitoren EAI001, EAI045, JBJ-04-125-02. **B:** Chemische Strukturen der Dibenzodiazepinon-basierten allosterischen Inhibitoren EAI002, DDC4002 sowie der optimierten „Verbindung 3“.

3.2.1. Strukturbiologische Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, basierend auf dem etablierten Kristallisationssystem für EGFR-T790M/V948R, Co-Kristallstrukturen generiert, die eine simultane Bindung von allosterischen und ATP-kompetitiven Inhibitoren der dritten Generation aufzeigen.^p Diese Strukturen ermöglichen einen detaillierten Einblick in die Bindemodi beider Inhibitor-Typen in der ATP- bzw. allosterischen Bindetasche des mutierten EGFR.^[85,92]

3.2.1.1. Simultane Co-Kristallisation von EGFR-T790M/V948R mit Osimertinib und EAI045

Zur Visualisierung der Bindemodi von Osimertinib und den allosterischen Inhibitoren zusammen in Wirkstoff-resistentem EGFR, wurden zu Beginn strukturelle Alignments angefertigt. Bisher publizierte Kristallstrukturen mit allosterischen Inhibitoren zeigen eine ähnliche Orientierung und Lokalisierung des Aminothiazol-Rests bzw. des Benzyl-Rings der Dibenzodiazepinon-basierten Inhibitoren in Richtung der ATP-Bindetasche. Daher wurde beispielhaft die Struktur von EAI045 gebunden an EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6P1L) sowie Osimertinib (modifiziert von PDB-ID 4LI5) eingesetzt. Das Alignment verdeutlichte, in Übereinstimmung mit den Studien von TO *et al.*, dass beide Verbindungen nebeneinander in die benachbarten Bindetaschen der inaktiven Kinase binden können (Abbildung 22C).^[88]

Um diese Erkenntnisse weiter zu verifizieren und einen detaillierten strukturellen Einblick zu erlangen, wurden Kristallisationsexperimente mit Osimertinib und dem allosterischen Inhibitor EAI045 in mutiertem EGFR durchgeführt. Hierfür wurde ein Kristallisationskonstrukt gewählt, das neben der Wirkstoff-resistenten T790M-Mutation zusätzlich die V948R-Mutation enthält. Diese zusätzliche Mutation unterbindet die Dimerisierung von EGFR, sodass die Kinase in der inaktiven Konformation mit nach außen verlagerter α C-Helix vorliegt und die essenzielle allosterische Bindetasche zugänglich wird.^[7,10,52] Für die Kristallisation wurde das im Arbeitskreis etablierte Kristallisationssystem für EGFR-T790M/V948R eingesetzt, das zu reproduzierbarem Kristallwachstum führte. Die kovalente Bindungsbildung des Michael-Akzeptors von Osimertinib und des Cys797 der ATP-Bindetasche von EGFR während der Inkubation wurde sowohl in Anwesenheit aber auch zur Kontrolle in Abwesenheit des allosterischen Inhibitors EAI045 mittels Protein-Massenspektrometrie überwacht und konnte in beiden Fällen durch eine Zunahme des Molekulargewichts des Proteins um 500 Da bestätigt werden (Abbildung 22B).

^p Simultane Co-Kristallisationen in EGFR-T790M/V948R: In Zusammenarbeit mit L. Heyden im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

Die gewachsenen Proteinkristalle der simultanen Kristallisationsansätze wurden am SLS vermessen und ein erhaltener Datensatz führte zur finalen Co-Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,5 Å (Abbildung 22D, Datenstatistik in Tabelle A6 im Anhang).

Durch die gut definierte Elektronendichte der erhaltenen Kristallstruktur konnte sowohl die kovalente Bindung als auch die Orientierungen beider Inhibitoren innerhalb der Bindetaschen eindeutig aufgelöst werden (Abbildung 22E). Ebenso sind die zwei typischen Wasserstoffbrückenbindungen des Aminopyrimidin-Grundgerüsts von Osimertinib zum Peptidrückgrat von Met793 innerhalb der Scharnierregion zu erkennen. Darüber hinaus ist der Inhibitor an hydrophoben Wechselwirkungen mit den Aminosäuren der hydrophoben Klammer (Leu718, Val726 und Leu844) sowie den Aminosäuren Ala743, Leu792 und Gly796 beteiligt (Abbildung A13A im Anhang). Der Vergleich des Bindemodus von Osimertinib in der erhaltenen Struktur mit kürzlich publizierten Kristallstrukturen (PDB-IDs: 6JX4, 6JWL und 6JXT) zeigt einen identischen Bindemodus (Abbildung 21A). Lediglich die flexible Löslichkeitsgruppe besitzt andere Orientierungen. Die publizierte Co-Kristallstruktur von EGFR-T790M (PDB-ID: 6JX0) beschreibt hingegen eine Drehung des Indol-Rings des Inhibitors, die durch einzigartige Interaktionen zwischen Protein und Inhibitor durch YUN et al. begründet wird. Diese Orientierung wäre jedoch aufgrund eines sterischen Zusammenstoßes mit dem Indol-Ring nicht mit der simultanen Bindung allosterischer Inhibitoren vereinbar (Abbildung 21B).^[93]

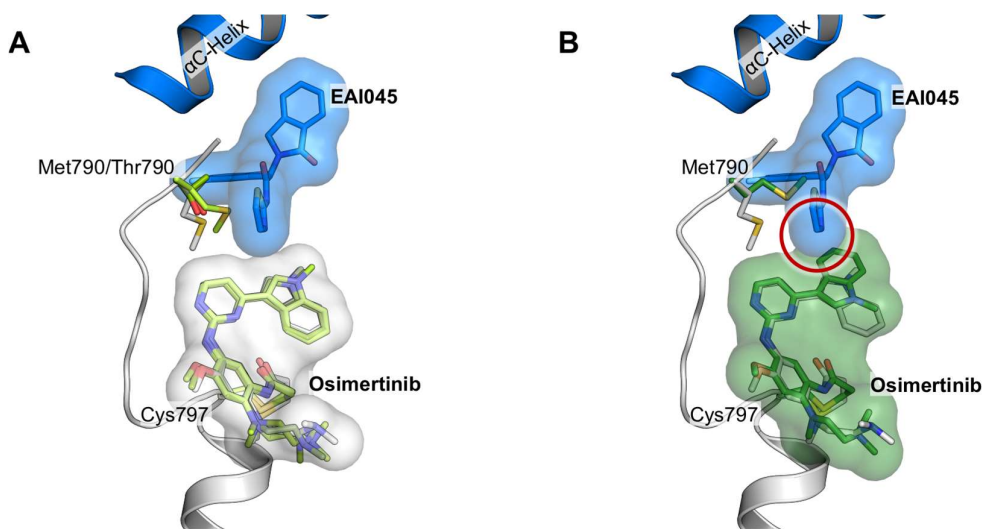


Abbildung 21: Überlagerung der generierten Kristallstruktur von Osimertinib und EAI045 gebunden in EGFR-T790M/V948R mit den publizierten Kristallstrukturen von Osimertinib gebunden in diversen EGFR-Mutanten. **A:** Überlagerung von Osimertinib (grau) simultan gebunden mit EAI045 in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6Z4B) und drei publizierten Kristallstrukturen (PDB-IDs: 6JX4, 6JWL und 6JXT) von Osimertinib (hellgrün) gebunden in diversen EGFR-Mutanten. **B:** Überlagerung von Osimertinib (grau) simultan gebunden mit EAI045 in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6Z4B) und der publizierten Kristallstruktur (PDB-ID: 6JX0) von Osimertinib (grün) gebunden in EGFR-T790M mit gedrehtem Indol-Ring. Der rote Kreis zeigt den sterischen Zusammenstoß des gedrehten Indol-Rings mit dem allosterischen Inhibitor.^[92]

Die generierte Kristallstruktur zeigt ebenfalls, dass der Aminothiazol-Ring von EAI045 zwischen dem Türsteher-Methionin (Met790) und dem katalytischen Lysin (Lys745) liegt und somit im direkten Kontakt zum Met790 steht. Der Isoindolin-1-on-Ring hingegen ragt in den hydrophoben Spalt am Ende der allosterischen Tasche, der von Leu747, Ile759, Ala763, Met766, Leu777, Leu788 und Leu862 gebildet wird. Die Seitenketten von Leu858 und Leu861 sind in dieser Struktur nicht aufgelöst. Zusätzlich ist eine Wasserstoffbrückenbindung vom Carbonyl-Sauerstoff des Isoindolin-1-ons zur Seitenkette des katalytischen Lys745 ausgebildet. Weitere Wasserstoffbrückenbindungen werden von der Hydroxylgruppe des *papa*-Fluorphenols und dem Amid-NH von EAI045 an das Carbonyl der Hauptkette von Phe865 beziehungsweise an die Asp855-Seitenkette innerhalb des DFG-Motivs ausgebildet (Abbildung A13A im Anhang).

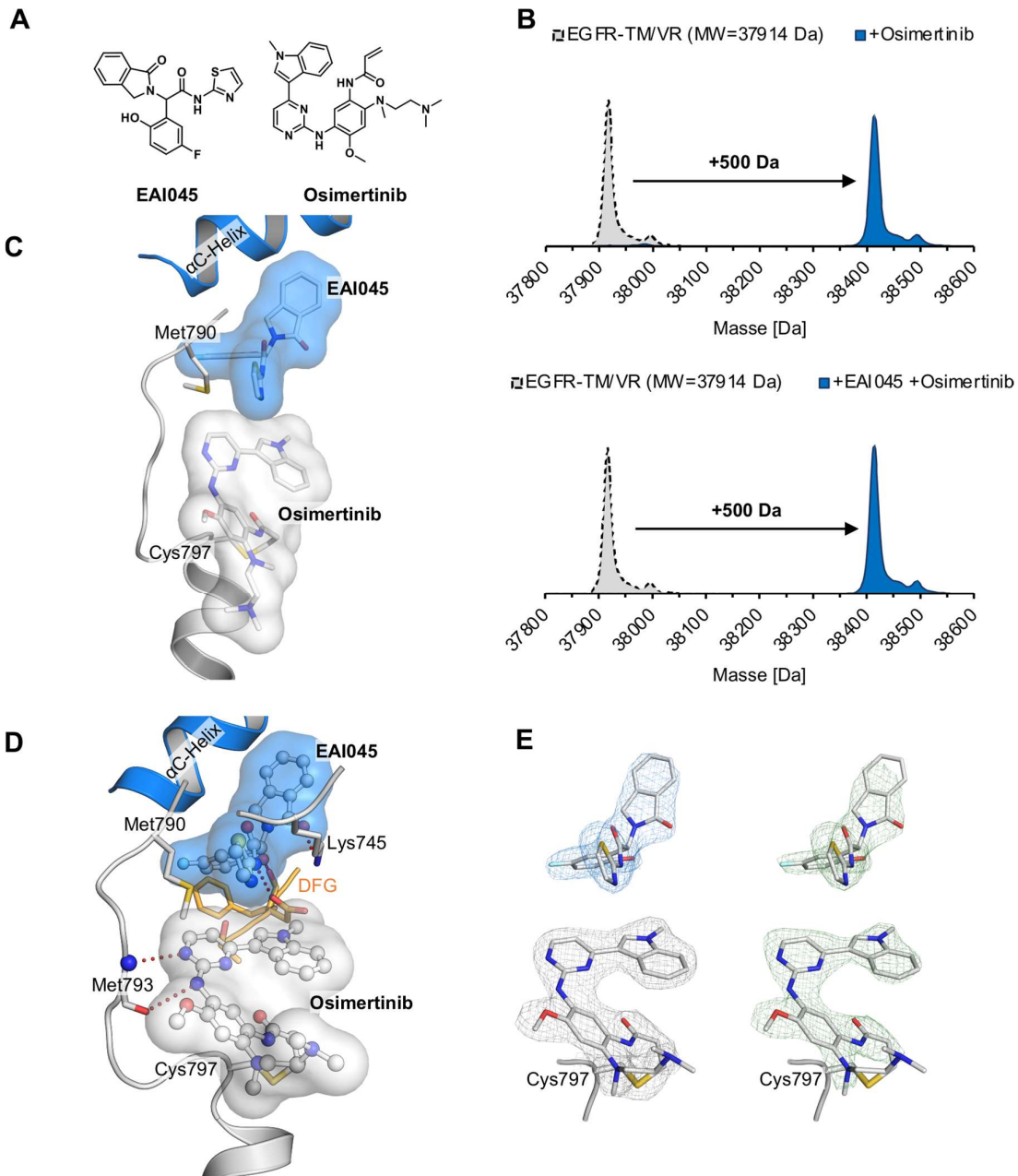


Abbildung 22: Chemische Strukturen, strukturelles Alignment, Massenspektren, komplexe Kristallstrukturen und Elektronendichtekarten beider Inhibitor-Typen in EGFR-T790M/V948R. **A:** Chemische Strukturen von Osimertinib und EAI045. **B:** Massenspektren von Apo-EGFR-T790M/V948R (grau) und EGFR-T790M/V948R inkubiert mit Osimertinib (blau) in An- und Abwesenheit von EAI045. **C:** Strukturelles Alignment von EAI045 gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6P1L) zusammen mit Osimertinib (modifiziert von PDB-ID: 4LI5). **D:** Komplexkristallstruktur von Osimertinib (grau) und EAI045 (blau) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6Z4B) mit einer Auflösung von 2,5 Å. **E:** 2FoFc-Elektronendichtekarte von Osimertinib (grau) und EAI045 (blau) konturiert bei einem r.m.s.d. von 1 und FoFc-simulated-annealing-omit-Elektronendichtekarte von Osimertinib und EAI045 (grün) konturiert bei einem r.m.s.d. von 2,8.^[92]

3.2.1.2. Simultane Co-Kristallisation von EGFR-T790M/V948R mit Mavelertinib und EAI001

Durch Erweiterung des strukturellen Alignments von EAI045 (PDB-ID: 6P1L) mit anderen literaturbekannten Inhibitoren der dritten Generation konnte Mavelertinib^[94] (PDB-ID: 5UGC), ein weiterer EGFR-Inhibitor der dritten Generation, als potentieller Kombinationspartner gefunden werden. Mavelertinib spart die Region um das Türsteher-Methionin, ähnlich wie Osimertinib, aus (Abbildung 23A und 23C). Diese Erkenntnisse sind bisher nicht beschrieben worden, da sich vorherige Studien von TO *et al.*^[88] auf Afatinib, WZ4002 und Osimertinib beschränkten.

Basierend auf diesem Ergebnis wurden Kristallisationsexperimente mit den im Abschnitt 3.1.4.1 etablierten Konditionen angesetzt, in denen Kristallwachstum in Gegenwart von Mavelertinib und dem allosterischen Inhibitor EAI001^[95] beobachtet wurde. Durch massenspektrometrische Analyse während der Inkubation der Protein-Inhibitor-Proben konnte die kovalente Modifikation der EGFR-Mutante durch Mavelertinib in Anwesenheit sowie in Abwesenheit des allosterischen Inhibitors durch die Zunahme der molekularen Masse des Proteins um 415 Da bestätigt werden (Abbildung 23B). Die erhaltenen Kristalle der simultanen Kristallisationsansätze wurden am SLS in Beugungsexperimenten vermessen und zeigten eine gute Diffraktion des Röntgenlichts, sodass eine finale Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,0 Å erhalten wurde (Abbildung 23D, Datenstatistik in Tabelle A6 im Anhang).

Die Bindemodi beider Inhibitoren in den jeweiligen Bindetaschen von EGFR-T790M/V948R sowie die kovalente Bindung von Mavelertinib an das Cys797 konnten durch gut definierte Elektronendichte aufgelöst werden (Abbildung 23E). Die Struktur zeigt, dass auch Mavelertinib zwei Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat von Met793 ausbildet und an hydrophoben Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Leu718, Val726, Ala743, Leu792, Gly796 und Leu844 beteiligt ist. Aufgrund der guten Auflösung der Struktur kann zusätzlich ein wasservermitteltes Netzwerk um den Michael-Akzeptor von Mavelertinib mit den Aminosäuren Asp800 und Arg841 identifiziert werden. Der Bindungsmodus von EAI001 ähnelt dem bereits beschriebenen von EAI045. Allerdings liegt eine Wasserstoffbrückenbindung weniger vor, da der allosterische Inhibitor keinen Phenolring wie EAI045 aufweist. Demnach werden polare Kontakte mit den katalytischen Lys745 und Asp855 sowie unpolare Wechselwirkungen mit Leu747, Ile759, Ala763, Met766, Leu777, Leu788, Met790 und Leu858 ausgebildet. Die Aminosäuren Leu861 und Leu862 sind in dieser Struktur nicht aufgelöst (Abbildung A14A im Anhang).

⁹ Synthese: T. Grabe im Rahmen seiner Master-Arbeit.

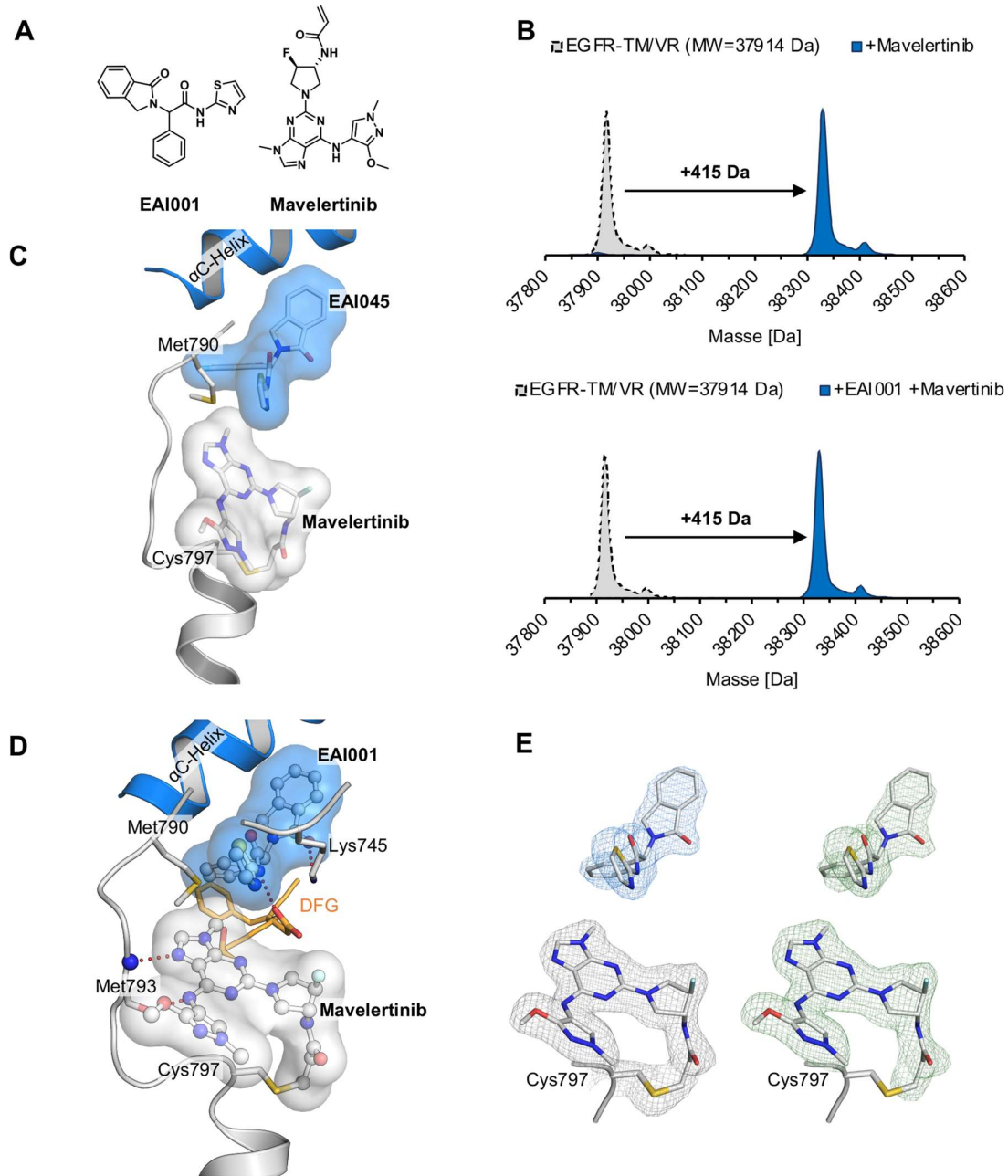


Abbildung 23: Chemische Strukturen, strukturelles Alignment, Massenspektren, Komplexkristallstrukturen und Elektronendichtekarten beider Inhibitor-Typen in EGFR-T790M/V948R. **A:** Chemische Strukturen von Mavelertinib und EAI001. **B:** Massenspektren vom Apo-EGFR-T790M/V948R (grau) und EGFR-T790M/V948R inkubiert mit Mavelertinib (blau) in An- und Abwesenheit von EAI001. **C:** Strukturelles Alignment von EAI045 gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6P1L) zusammen mit Mavelertinib (PDB-ID: 5UGC). **D:** Komplexkristallstruktur von Mavelertinib (grau) und EAI001 (blau) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6Z4D) mit einer Auflösung von 2,0 Å. **E:** 2FoFc-Elektronendichtekarte von Mavelertinib (grau) und EAI001 (blau) konturiert bei einem r.m.s.d. von 1 und FoFc-*simulated-annealing-omit*-Elektronendichtekarte von Mavelertinib und EAI001 (grün) konturiert bei einem r.m.s.d. von 2,8.^[92]

Wie bereits erwähnt, können allosterische Inhibitoren den inaktiven Zustand von EGFR-WT nicht binden. Grund hierfür sind die Seitenketten der Aminosäuren Leu858 und Leu861 der Aktivierungsschleife, die im inaktiven Zustand in einem kurzen helikalen Element vorliegen.

Diese Anordnung der Aminosäuren führt bei der Bindung allosterischer Inhibitoren zum sterischen Konflikt. Daher ist die L858R-Mutation, die das kurze helikale Element der inaktiven Kinase-Konformation unterbricht, für die Bindung allosterischer Inhibitoren erforderlich (Abbildung 24B).^[15,52] Diese Mutation ist jedoch in dem verwendeten Kristallisationskonstrukt nicht vorhanden. Jedoch konnte eine Neuausrichtung von Leu858 durch die Bindung von EAI001 beobachtet werden, die zu einer strukturellen Veränderung des helikalen Elements der Aktivierungsschleife führte, sodass Leu858 zum hydrophoben Netzwerk von EAI001 beiträgt, aber nicht mit dem Inhibitor kollidiert (Abbildung 24A). Diese strukturelle Änderung könnte zu einem Bindungsenergie-Nachteil führen, wodurch die Selektivität der allosterischen Inhibitoren für EGFR-L858R zu erklären wäre.

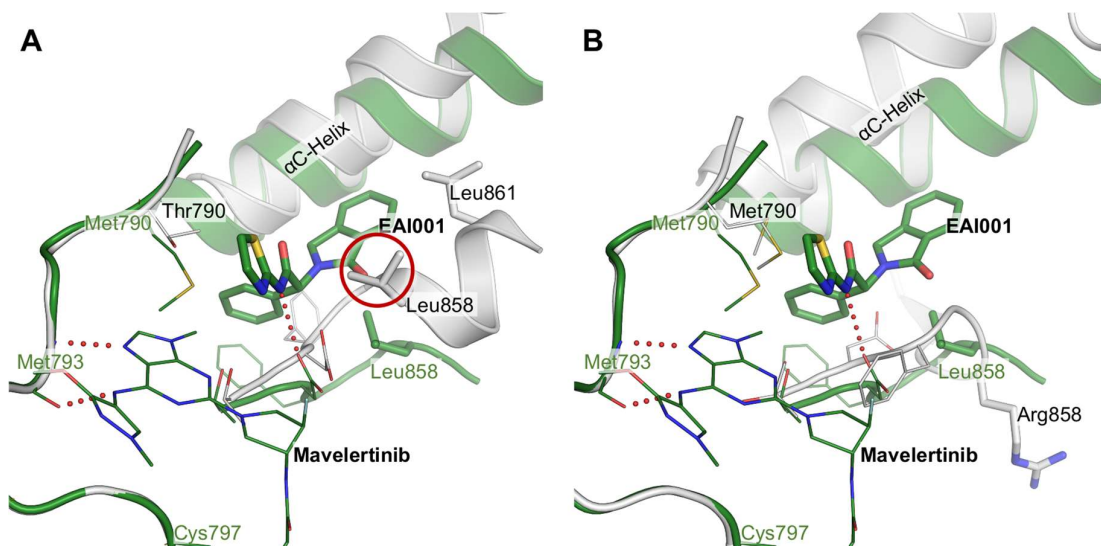


Abbildung 24: Überlagerung der Kristallstruktur von Mavelertinib und EAI001 gebunden in EGFR-T790M/V948R mit der inaktiven Konformation des EGFR-WT und mit EGFR-L858R/T790M/V948R. **A:** Überlagerung der Kristallstruktur von Mavelertinib (grüne Linien) und EAI001 (grün) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6Z4D, grüne Struktur) und der inaktiven Konformation des EGFR-WT (PDB-ID: 2GS7, graue Struktur). Der rote Kreis zeigt den sterischen Konflikt der Seitenkette Leu858 des inaktiven Zustands des EGFR-WT mit dem allosterischen Inhibitor EAI001 an. **B:** Überlagerung der Kristallstruktur von Mavelertinib (grüne Linien) und EAI001 (grün) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6Z4D, grüne Struktur) und EGFR-L858R/T790M/V948R (PDB-ID: 5HG5, graue Struktur). Die L858R-Mutation führt zu konformationellen Veränderungen innerhalb der Aktivierungsschleife, sodass allosterische Inhibitoren ohne sterische Kollisionen binden können. Innerhalb der generierten Kristallstruktur von EGFR-T790M/V948R (grün) induziert die Bindung von EAI001 eine Neuausrichtung von Leu858, sodass kein Konflikt mit EAI001 auftritt.^[92]

Die Einheitszelle des Kristalls weist zwei Moleküle von EGFR auf. Der allosterische Inhibitor ist jedoch nur in einer der beiden Ketten gebunden. Die Kette ohne EAI001 zeigt, dass die Seitenkette des Phe723 innerhalb der Glycin-reichen Schleife in Richtung Mavelertinib orientiert vorliegt und mit einem Abstand von 4,2 Å zum oben

beschriebenen hydrophoben Netzwerk beiträgt. Das Türsteher-Methionin weist aufgrund des fehlenden direkten Kontakts mit dem allosterischen Inhibitor eine leicht veränderte Konformation auf. Außerdem ist innerhalb der nicht besetzten allosterischen Tasche ein wasservermittelttes Netzwerk von Mavelertinib mit Arg841 und dem DFG-Motiv vorgelagerten Thr854 zu erkennen (Abbildung A14A im Anhang).

3.2.1.3. Simultane Co-Kristallisation von EGFR-T790M/V948R mit Spebrutinib und EAI001

Das Ergebnis des strukturellen Alignments von EAI045 (PDB-ID: 6P1L) mit dem literaturbekannten EGFR-Inhibitor WZ4002^[96,97] (PDB-ID: 3IKA), zeigte einen sterischen Konflikt des Chlor-Substituenten mit dem Aminothiazol von EAI045 (Abbildung 26C). Die Suche nach weiteren literaturbekannten Kombinationspartnern führte daraufhin zu Spebrutinib,^[98] einem Bruton's Tyrosinkinase (BTK)-Inhibitor (Abbildung 26A). Spebrutinib weist eine strukturelle Ähnlichkeit zu WZ4002 auf, besitzt allerdings einen kleineren Fluor-Substituenten anstelle des Chlors von WZ4002, wodurch der sterische Zusammenstoß mit dem allosterischen Inhibitor umgangen werden sollte.

Daher wurden Kristallisationsexperimente mit Spebrutinib und den allosterischen Inhibitoren angesetzt, die zum Kristallwachstum in Kombination mit dem allosterischen Inhibitor EAI001 führten. Die Kristalle wurden ebenfalls am SLS vermessen und führten zu einer Co-Kristallstruktur mit einer Auflösung von 1,9 Å (Abbildung 24D, Datenstatistik in Tabelle A6 im Anhang).

Die kovalente Bindungsbildung des Michael-Akzeptors von Spebrutinib mit der Seitenkette von Cys797 wurde auch bei diesem Ansatz durch Massenspektrometrie und eine gut definierte Elektronendichte bestätigt (Abbildung 24B und 24E). Die Ausbildung der zwei typischen Wasserstoffbrückenbindungen zu Met793 der Scharnierregion ist auch bei Spebrutinib erkennbar und auch die hydrophoben Wechselwirkungen umfassen, wie bereits bei Osimertinib und Mavelertinib, die Aminosäuren Leu718, Val726, Ala743, Leu792, Gly796 und Leu844 (Abbildung A13B im Anhang). Die gelöste Struktur weist jedoch einen interessanten Unterschied zu den gelösten Kristallstrukturen von Osimertinib bzw. Mavelertinib und den allosterischen Inhibitoren auf. Die Seitenkette des Phe723 innerhalb der Glycin-reichen Schleife liegt Spebrutinib zugewandt vor und trägt zum hydrophoben Netzwerk bei, obwohl der allosterische Inhibitor gebunden ist (Abbildung 25). Diese Besonderheit ist aber durch den geringeren sterischen Anspruch von Spebrutinib in der ATP-Bindungstasche zu erklären.

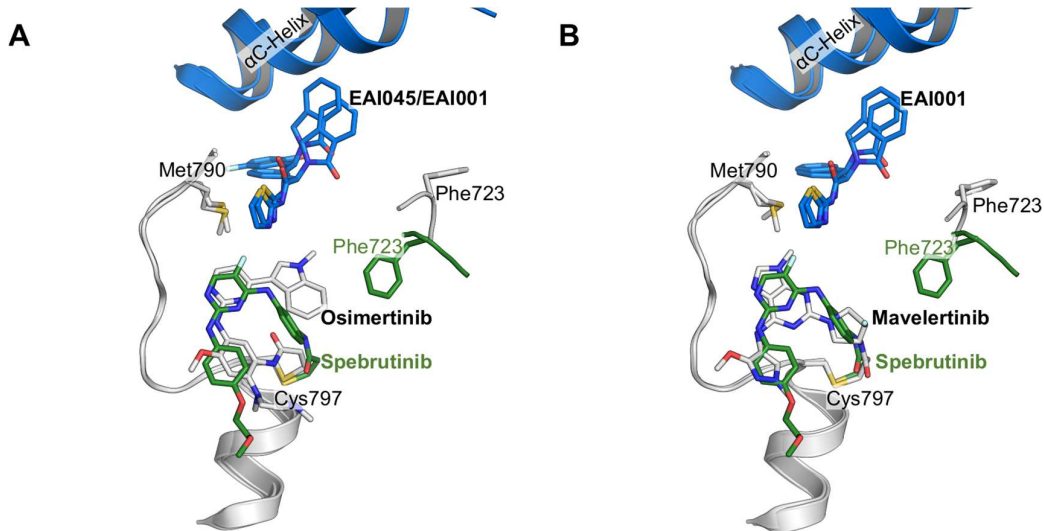


Abbildung 25: Überlagerung der drei generierten simultanen Kristallstrukturen von Osimertinib und EAI045, Mavelertinib und EAI001 sowie Spebrutinib und EAI001 gebunden in EGFR-T790M/V948R. **A:** Überlagerung der Kristallstrukturen von Osimertinib und EAI045 gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6Z4B) und Spebrutinib und EAI001 gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 7A2A). Zudem sind die Orientierungen der Seitenketten von Phe723 beider Strukturen dargestellt. **B:** Überlagerung der Kristallstrukturen von Mavelertinib und EAI001 gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6Z4D) und Spebrutinib und EAI001 gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 7A2A). Zudem sind die Orientierungen der Seitenketten von Phe723 beider Strukturen dargestellt.^[92]

In dieser Struktur sind polare Kontakte zwischen EAI001 und dem katalytischen Lys745 ausgebildet und interessanterweise über eine wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung zu Thr854 und Asp855. Darüber hinaus ist eine zweite wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Aminothiazol-Ring von EAI001 und dem sekundären Amin von Spebrutinib erkennbar. Hydrophobe Wechselwirkungen von EAI001 werden mit den Aminosäuren Leu747, Ile759, Ala763, Met766, Leu777, Leu788, Met790 und Leu858 gebildet (Abbildung A13B im Anhang).

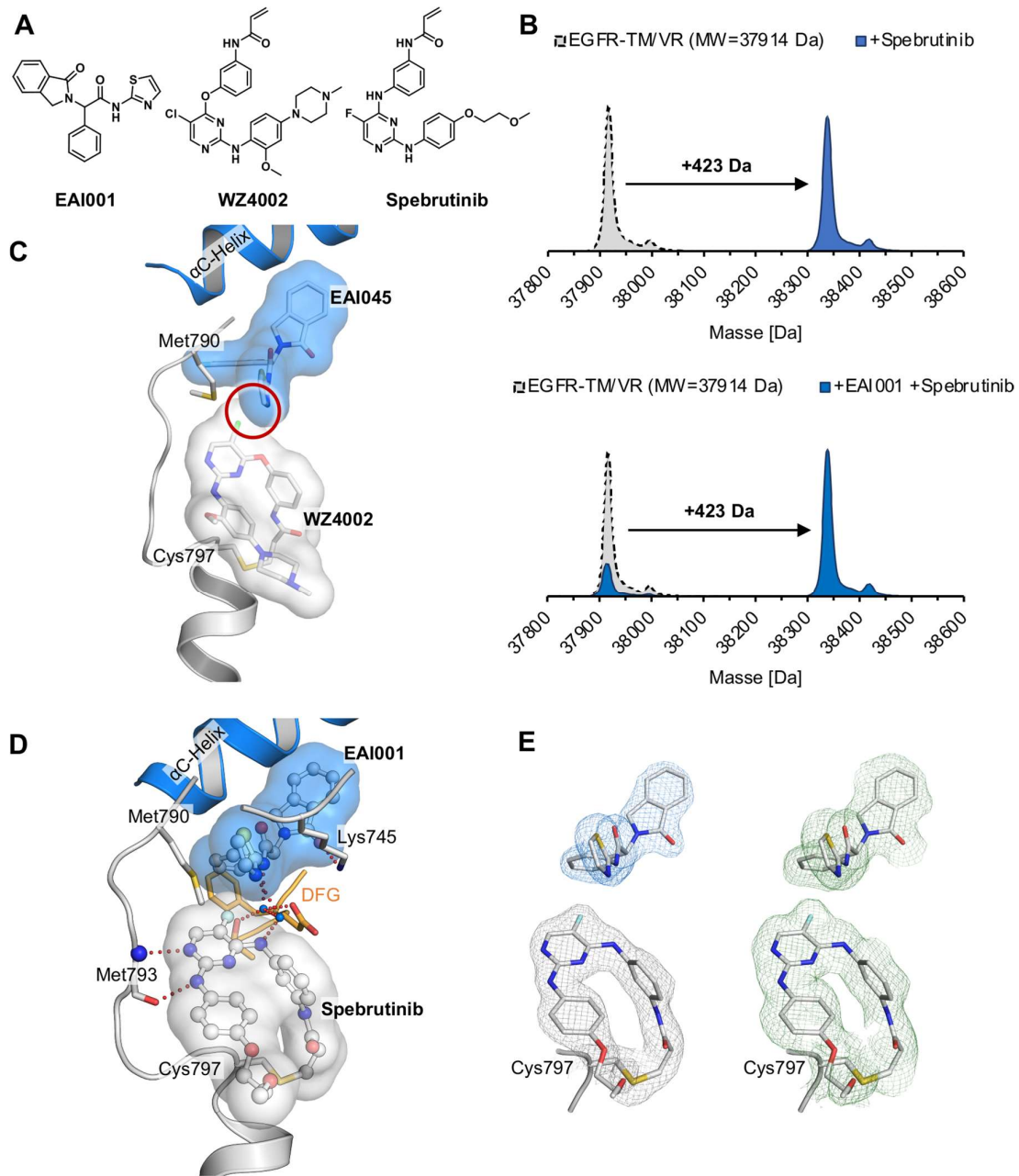


Abbildung 26: Chemische Strukturen, strukturelles Alignment, Massenspektren, Komplexkristallstrukturen und Elektronendichtekarten beider Inhibitor-Typen in EGFR-T790M/V948R. **A:** Chemische Strukturen von WZ4002, Spebrutinib und EAI001; **B:** Massenspektren von Apo-EGFR-T790M/V948R (grau) und EGFR-T790M/V948R inkubiert mit Spebrutinib (blau) in An- und Abwesenheit von EAI001. **C:** Strukturelles Alignment von EAI045 gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6P1L) zusammen mit WZ4002 (PDB-ID: 3IKA). Der sterische Konflikt ist rot markiert. **D:** Komplexkristallstruktur von Spebrutinib (grau) und EAI001 (blau) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 7A2A) mit einer Auflösung von 1,9 Å. **E:** 2FoFc- Elektronendichtekarte von Spebrutinib (grau) und EAI001 (blau) konturiert bei einem r.m.s.d. von 1 und FoFc-*simulated annealing omit*- Elektronendichtekarte von Spebrutinib und EAI001 (grün) konturiert bei einem r.m.s.d. von 2,8.^[92]

3.2.2. Zusammenfassung

Studien von TO *et al.* zeigten eine simultane Bindung des allosterischen Inhibitors JBJ-04-125-02 und Osimertinib in EGFR, die in weiteren Experimenten eine Erhöhung der Wirksamkeit im Vergleich zur Monotherapie erzielten.^[88] Da jedoch die strukturellen Einblicke fehlten, wurde im Rahmen dieses Projekts die simultane Co-Kristallisation von allosterischen Inhibitoren mit Osimertinib vorgenommen, mit dem Ziel die Bindemodi beider Inhibitor-Typen nebeneinander aufzulösen. Neben der gelösten Struktur des allosterischen Inhibitors EAI045 und Osimertinib zusammen in EGFR-T790M/V948R konnten, basierend auf strukturellen Alignments, weitere potentielle Kombinationspaare von allosterischen und ATP-kompetitiven Inhibitoren gefunden werden. Dies führte zu zwei weiteren gut aufgelösten Kristallstrukturen, bestehend aus dem EGFR-Inhibitor Mavelertinib und dem allosterischen Inhibitor EAI001 sowie dem BTK-Inhibitor Spebrutinib und EAI001 simultan gebunden in mutiertem EGFR. Diese Strukturen zeigen, dass allosterische Inhibitoren mit ausgewählten ATP-kompetitiven Inhibitoren gleichzeitig an EGFR binden können und ermöglichten dadurch weitere strukturelle Einblicke in EGFR.

Zusammengefasst konnten somit drei Co-Kristallstrukturen von EGFR-T790M/V948R gelöst werden, die sowohl einen allosterischen- und einen ATP-kompetitiven Inhibitor gebunden enthielten. Diese drei Strukturen bilden die Grundlage für strukturbasierte Designansätze neuartiger Inhibitoren, die in Kombination eingesetzt werden können, auch im Hinblick auf die Überwindung der Resistenzmutation C797S. Die Administration von zwei unabhängigen Inhibitoren könnte einen vielversprechenden Ansatz in Bezug auf die individuellen pharmakokinetische Eigenschaften der Inhibitoren darstellen. Zudem kann das Resistenzspektrum der Kombinationsbehandlung im Gegensatz zur Monotherapie unterschiedlich sein. Daher stellt die Kombination der zwei Inhibitor-Typen einen möglichen therapeutischen Ansatz für EGFR-positive NSCLC-Patienten dar. Außerdem können die gelösten komplexen Strukturen den Grundstein für Hybrid-Inhibitoren als Tyrosinkinase-Inhibitoren der nächsten Generation legen.

3.3. Entwicklung von Inhibitoren der Osimertinib-resistenten EGFR-T790M/C797S-Mutante

Osimertinib ist ein zur Behandlung von T790M-positiven Patienten zugelassener Pyrimidin-basierte Inhibitor.^[46-48] Doch auch dieser Inhibitor verliert an Effizienz durch die im Verlauf der Behandlung auftretende Resistenzmutation des für die kovalente Bindung essentiellen Cysteins (C797S), da die Effizienz des Inhibitors hauptsächlich auf der kovalenten Bindungsbildung basiert. Allerdings sind für die Hemmung der Cystein-Mutante reversible Wechselwirkungen innerhalb der Bindungsstelle erforderlich.^[50,51,84,99]

3.3.1. Pyrrolopyrimidin-basierte EGFR-Inhibitoren

Ein strukturbasierter Ansatz zur Entwicklung neuer Inhibitoren zur Adressierung der Doppelmutante EGFR-L858R/T790M wurde von LATEGAHN *et al.* verfolgt.^[77,95,100-104] Die entworfenen Inhibitoren ^r basieren, ebenso wie der EGFR/VEGFR-Dualinhibitor AEE788^[105,106] (Abbildung 27A), auf einem Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst. Da die inhibitorische Aktivität von AEE788 jedoch maßgeblich durch das Auftreten der T790M-Resistenzmutation aufgrund eines sterischen Zusammenstoßes der Seitenkette von Met790 und des Phenylethylamin-Rests von AEE788 abnimmt, wurde das Substitutionsmuster der entworfenen Inhibitoren mit Augenmerk auf die Aktivität gegenüber der T790M-Mutante optimiert. Außerdem konnte durch Einführung eines Phenylacrylamids in 5-Position für die Alkylierung des Cys797 und durch eine Löslichkeits-vermittelnde Gruppe in 6-Position die Aktivität maßgeblich verbessert werden. Unter Berücksichtigung dieser genannten Faktoren konnten durch die Mitsunobu-Reaktion zwei Inhibitor-Serien (*N*-substituierte Pyrrolopyrimidin-4-one und *O*-substituierte Pyrrolopyrimidine) erhalten werden. Die Charakterisierung der Inhibitoren wurde sowohl in biochemischen^s sowie in zellulären ^t Systemen durchgeführt. Besonderes Interesse galt der strukturellen Charakterisierung^u diverser Verbindungen, um die Bindemodi unterschiedlich substituiert Inhibitoren zu identifizieren. Da es nicht gelang Komplexkristallstrukturen mit dem klinisch-relevanten EGFR-T790M-Konstrukt zu erhalten, wurde auf das Modellsystem cSrc-T338M/S345C zurückgegriffen, das bereits in der Vergangenheit erfolgreich eingesetzt wurde.^[43,107] Somit konnten zwei komplexe Kristallstrukturen mit je einem *O*-substituierten Pyrrolopyrimidin (**1**)^v und

^r Synthese der Verbindungen: Dr. J. Lategahn im Rahmen seiner Promotion, P. Klövekorn im Rahmen seiner Master-Arbeit und M. Flaßhoff im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit.

^s Biochemische Charakterisierung: S. Eppmann und A. Arndt (AG Rauh, TU Dortmund), Dr. M. Keul im Rahmen ihrer Promotion und K. Jeyakumar im Rahmen seiner Promotion.

^t Zelluläre Charakterisierung: Dr. J. Lategahn im Rahmen seiner Promotion, H.L. Tumbrink im Rahmen ihrer Master-Arbeit und K. Jeyakumar im Rahmen seiner Promotion.

^u Generierung der Kristallstrukturen in cSrc: Dr. M. Keul im Rahmen ihrer Promotion.

^v Synthese: T. Grabe im Rahmen seiner Master-Arbeit.

einem *N*-substituierten Pyrrollopyrimidin-4-on (**2b**) generiert werden. Die Strukturen zeigten verschiedene Ausrichtungen der Türsteher-Aminosäure Met338 (Met790 in EGFR). Dabei ist ersichtlich, dass bereits der kleine *N*-Ethyl-Rest des Inhibitors **2b** in 3-Position des Pyrrollopyrimidin-4-on-Grundgerüsts die Türsteher-Aminosäure Met338 verdrängt und somit eine andere Orientierung der Aminosäure induziert (Abbildung 27C). Dieses Ergebnis wird auch durch die biochemische Charakterisierung bestätigt, die bei Inhibitoren mit größeren und sterisch anspruchsvolleren Substituenten an der 3-Position einen Aktivitätsverlust gegenüber der Doppelmutante EGFR-L858R/T790M aufzeigt (Tabelle 3). Dieses Ergebnis ist auf einen ungünstigen Bindemodus der Inhibitoren und die Kollision mit der Türsteher-Aminosäure zurückzuführen. Die Struktur des *O*-substituierten Pyrrollopyrimidins **1** zeigt hingegen, dass die Substitution in 4-Position einen geringeren Einfluss auf das Met338 hat und somit größere Substituenten in dieser Position toleriert werden ohne die Türsteher-Aminosäure in ihrer Ausrichtung zu beeinflussen (Abbildung 27B).

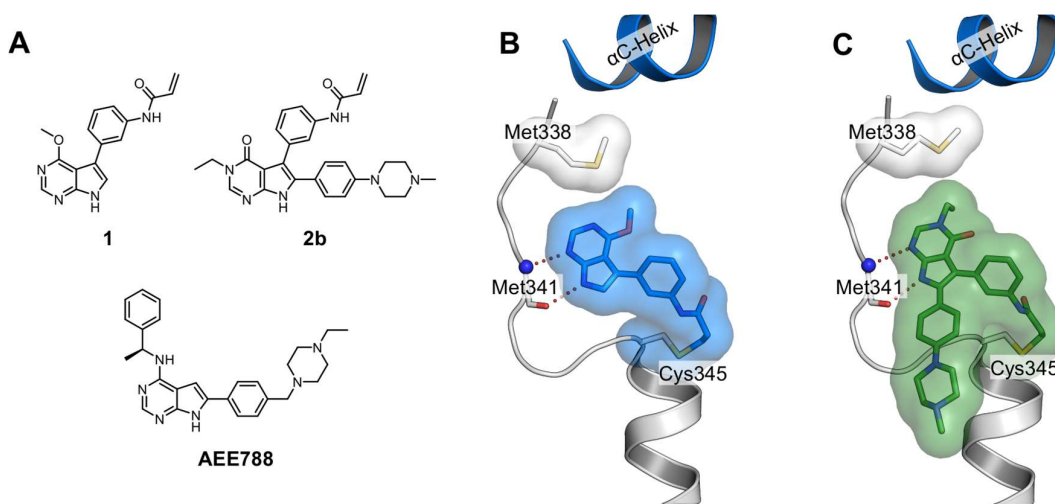
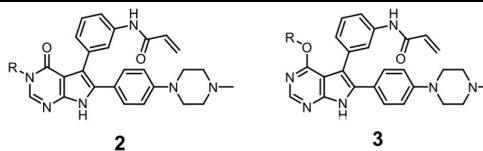


Abbildung 27: Chemische Strukturen und Kristallstrukturen eines *O*-substituierten Pyrrollopyrimidin- und eines *N*-substituierten Pyrrollopyrimidin-4-on-basierten Inhibitors in cSrc-T338M/S345C. **A:** Chemische Strukturen eines *O*-substituierten Pyrrollopyrimidin- (**1**) und eines *N*-substituierten Pyrrollopyrimidin-4-on-basierten Inhibitors (**2b**) und von AEE788. **B:** Komplexe Kristallstruktur eines *O*-substituierten Pyrrollopyrimidins (**1**, blau) in cSrc-T338M/S345C (PDB-ID: 6HVE) mit einer Auflösung von 1,9 Å. **C:** Komplexe Kristallstruktur eines *N*-substituierten Pyrrollopyrimidin-4-ons (**2b**, grün) in cSrc-T338M/S345C (PDB-ID: 6HVF) mit einer Auflösung von 2,1 Å.^[100]

Tabelle 3: Biochemische Evaluation von ausgewählten O-substituierten Pyrrolopyrimidin- und N-substituierten Pyrrolopyrimidin-4-on-basierten Inhibitoren.

Verbindung	R	EGFR HTRF IC ₅₀ [nM]			
		WT	L858R	L858R/T790M	L858R/T790M/ C797S
2a	Me	1,2 ± 0,1	0,5 ± 0,0	0,5 ± 0,0	354 ± 110
2b	Et	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,5 ± 0,0	406 ± 139
2c	CH ₂ C≡CH	5,1 ± 0,1	4,0 ± 2,7	4,9 ± 1,3	110 ± 36
2d	Bu	0,2 ± 0,0	0,3 ± 0,3	4,5 ± 0,8	803 ± 434
2e	(CH ₂) ₂ SMe	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1	768 ± 10
2f	(CH ₂) ₃ SMe	4,6 ± 1,1	1,7 ± 0,5	20 ± 6	>20000
2g	<i>i</i> -Pr	1,0 ± 0,1	0,4 ± 0,0	1,0 ± 0,3	555 ± 139
2h	<i>i</i> -Bu	0,8 ± 0,2	0,2 ± 0,1	3,4 ± 1,4	356 ± 79
2i	<i>c</i> -Pen	1,0 ± 0,0	<0,1	1,2 ± 0,1	249 ± 67
2j	<i>c</i> -Hex	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	22 ± 17
2k	CH ₂ (<i>c</i> -Pr)	1,1 ± 0,8	0,9 ± 0,6	7,7 ± 3,9	243 ± 132
2l	Bn	1,0 ± 0,2	1,5 ± 0,8	21 ± 1	2343 ± 952
3a	Me	0,4 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,0	50 ± 19
3c	Et	0,2 ± 0,1	<0,1	0,1 ± 0,1	21 ± 7
3d	Bu	<0,1	<0,1	<0,1	9,4 ± 1,5
3e	(CH ₂) ₃ SMe	0,2 ± 0,0	<0,1	0,1 ± 0,1	49 ± 3,5
3f	<i>c</i> -Pen	0,2 ± 0,0	<0,1	<0,1	19 ± 11
3g	<i>i</i> -Pr	0,1 ± 0,0	<0,1	0,1 ± 0,0	8,6 ± 3,2
3h	<i>i</i> -Bu	0,2 ± 0,2	<0,1	<0,1	8,5 ± 3,7
3i	H	12 ± 4	12 ± 4	24 ± 12	2061 ± 359
Gefitinib		0,2 ± 0,1	<0,1	185 ± 98	250 ± 23
Afatinib		<0,1	<0,1	0,3 ± 0,1	25 ± 17
WZ4002		9,6 ± 7,0	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,1	452 ± 189
Osimertinib		1,0 ± 1	0,7 ± 0,6	0,3 ± 0,0	116 ± 15

Durch die kinetische Charakterisierung^w der kovalenten Bindungsbildung^[108] repräsentativer Verbindungen beider Serien, konnte ein intensiv reversibler Charakter der Inhibitoren gezeigt werden. Aus diesem Grund wurden die Verbindungen ebenfalls gegenüber der Tripelmutante EGFR-L858R/T790M/C797S biochemisch charakterisiert (Tabelle 3). Dabei zeigten die *N*-alkylierten Inhibitoren (**2**) moderate Aktivitäten bis 110 nM (Ausnahme die *N*6-Cyclohexyl-Verbindung **2j** mit 22 nM). Die *O*-substituierten Inhibitoren weisen hingegen für die wirksamsten beiden Verbindungen **3g** und **3h** Aktivitäten von 9 nM auf. Somit zeigen die entwickelten Verbindungen eine überlegene Potenz im Vergleich zu den Inhibitoren der dritten Generation sowie den Aminoquinazolin-basierten Inhibitoren der ersten und zweiten Generation. Um einen Einblick in die Bindemodi der Inhibitoren in der C797S-Mutante zu erlangen, wurden weitere Kristallisationsexperimente durchgeführt.

3.3.2. Strukturbiologische Analyse der wirksamsten Verbindungen in EGFR-T790M/C797S

Die beiden wirksamsten Verbindungen **3h** und **3g** konnten erfolgreich in Komplex mit der EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A-Mutante basierend auf den etablierten Kristallisationsbedingungen kristallisiert werden. Die erhaltenen Kristalle wurden erfolgreich am SLS in Beugungsexperimenten vermessen und lieferten zwei finale Kristallstrukturen (Abbildung 28A und 28D, Datenstatistik in Tabelle A7 im Anhang) mit den Auflösungen 2,7 Å für Verbindung **3g** (PDB-ID: 6S89) und 2,6 Å für Verbindung **3h** (PDB-ID: 6S8A). Die Bindemodi beider Inhibitoren konnten anhand der Elektronendichten eindeutig bestimmt werden und das Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst weist den gleichen Bindemodus wie bei AEE788 (PDB-ID: 2ITT) in EGFR-L858R sowie bei den Verbindungen **1** und **2b** im cSrc-Modellsystem auf (Abbildung 28C und 28F). Außerdem sind die zwei typischen Wasserstoffbrückenbindungen des Pyrrolopyrimidin-Grundgerüsts zum Peptidrückgrat von Met793 der Scharnierregion zu erkennen. Beide Inhibitoren sind an hydrophoben Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Leu718, Gly719, Val726, Ala743, Leu792, Gly796 und Leu844 beteiligt (Abbildung 28B und 28E).

^w Kinetische Messungen: Dr. M. Keul im Rahmen ihrer Promotion.

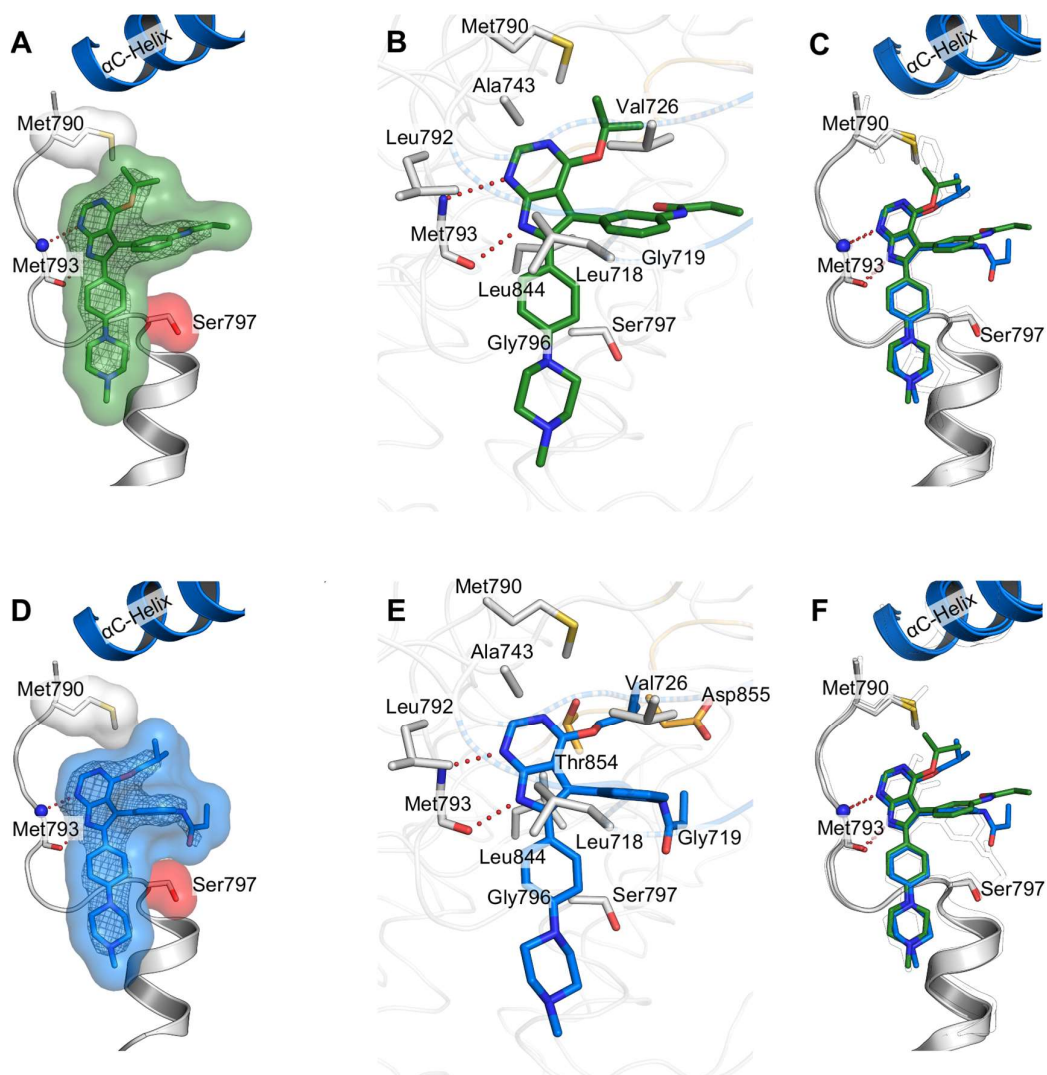


Abbildung 28: Komplexe Kristallstrukturen der wirksamsten O-substituierten Pyrrollopyrimidin-Inhibitoren **3h** und **3g** in EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A. **A:** Komplexe Kristallstruktur der Verbindung **3g** (PDB-ID: 6S89, grün) in EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A mit einer Auflösung von 2,7 Å. **B:** Interaktionen der Verbindung **3g** in EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A. **C:** Überlagerung der Kristallstrukturen der Verbindungen **3g** (grün) und **3h** (blau) in EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A mit der Kristallstruktur von AEE788 in EGFR-L858R (PDB-ID: 2ITT, schwarz umrandet). **D:** Komplexe Kristallstruktur der Verbindung **3h** (PDB-ID: 6S8A, blau) in EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A mit einer Auflösung von 2,6 Å. **E:** Interaktionen der Verbindung **3h** in EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A. **F:** Überlagerung der Kristallstrukturen der Verbindungen **3g** (grün) und **3h** (blau) in EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A mit der Kristallstruktur der Verbindung **2b** in cSrc-T338M/S345C (PDB-ID: 6HVF, schwarz umrandet). Dargestellte 2FoFc-Elektronendichtekarte konturiert bei einem r.m.s.d. von 1.^[100]

Die Iso-Propoxy- und Iso-Butoxy-Substituenten in 4-Position der Inhibitoren bilden große Interaktionsflächen mit dem Türsteher-Methionin aus, ohne eine sterische Beeinträchtigung der Methionin-Seitenkette zu induzieren (Abbildung 28A und 28D), wie es für N-substituierte Pyrrollopyrimidin-4-one bereits durch die cSrc-Kristallstruktur gezeigt wurde. Diese Interaktionen könnten der Grund für die hohe Potenz gegenüber EGFR-L858R/T790M/C797S sowie die ausgeprägte reversible Bindungseffizienz sein. Durch die C797S-Mutation nehmen die Acrylamid-Linker

beider Inhibitoren eine vom Ser797 abgewandte Position ein, sodass kein Proteinkontakt mehr besteht.

Durch die hohe Flexibilität des Acrylamids ist keine komplette Auflösung der Linker anhand der Elektronendichten möglich, allerdings konnte die Orientierung innerhalb der Bindetasche trotzdem identifiziert werden (Abbildung 28A und 28D). Dabei fällt auf, dass der räumlich anspruchsvollere Iso-Butoxy-Rest der Verbindung **3h** zum einen in räumliche Nähe des DFG-Motivs gebracht wird und zum anderen den Linker weiter in Richtung der Seitenkette von Ser797 schiebt als der kleinere Iso-Propoxy-Rest der Verbindung **3g** (Abbildung 28F). Diese identifizierten Verschiebungen des Linkers weisen darauf hin, dass durch Vergrößerung der Substituenten in 4-Position eine Liganden-Konformation erreicht werden könnte, bei der das Acrylamid in einer nicht C797S-mutierten EGFR-Variante in räumliche Nähe des Cys797 gebracht wird, sodass die kovalente Bindungsbildung stattfinden kann. Diese Verbindungen könnten möglicherweise, so wie die Inhibitoren der dritten Generation, wirksamer gegenüber EGFR-L858R/T790M sein.

3.3.3. Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projekts sind zwei Pyrrolopyrimidin-basierte Inhibitor-Serien zur Adressierung der EGFR-L858R/T790M-Mutante entwickelt worden. Die Aktivität der Inhibitoren gegenüber EGFR-L858R/T790M konnte durch Einführung eines Phenylacrylamids in 5-Position sowie einer Löslichkeits-vermittelnden Gruppe in 6-Position maßgeblich verbessert werden. Zudem wurde der Einfluss auf die Aktivität bei Veränderung des Substitutionsmusters in 4-Position der *O*-substituierten Pyrrolopyrimidine bzw. in 3-Position der *N*-substituierten Pyrrolopyrimidin-4-one untersucht. Dabei konnte durch strukturelle Untersuchungen im cSrc-Modellsystem festgestellt werden, dass die *N*-alkylierten Verbindungen einen sterischen Einfluss auf die Türsteher-Aminosäure Met338 (in EGFR Met790) haben, der auch im Verlust der Aktivität gegenüber EGFR-L858R/T790M erkennbar ist. Im Gegensatz dazu umgehen die *O*-alkylierten Verbindungen den sterischen Konflikt mit dem Methionin und zeigen eine hohe Aktivität gegenüber allen EGFR-Varianten. Außerdem konnte der ausgeprägte reversible Bindungscharakter der Inhibitoren nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daraufhin die zwei potentesten *O*-alkylierten Verbindungen in EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A kristallisiert. Dadurch konnte eine große Interaktionsfläche zwischen Met790 und den Substituenten in 4-Position nachgewiesen werden, die möglicherweise den Grund für die hohe Potenz gegenüber EGFR-L858R/T790M/C797S darstellt. Außerdem deuten die Strukturen darauf hin, dass bei Vergrößerung des Substituten der Linker in Richtung des Ser797 gedrängt wird. In einer nicht C797S-mutierten EGFR-Variante wird das Acrylamid damit in räumliche Nähe des Cys797 gebracht und die kovalente Bindungsbildung kann begünstigt ablaufen.

3.4. Potenzielle Wirkstoffkandidaten zur Adressierung von Exon20-Insertionsmutationen

Neben den klassischen aktivierenden EGFR-Mutationen, die mit Inhibitoren der ersten Generation Erlotinib oder Gefitinib behandelt werden, treten *in-frame* Insertionsmutationen in Exon20 von EGFR aber auch Her2 bei NSCLC-Patienten auf.^[14] Hierbei werden in der Nähe der regulatorischen α C-Helix eine bis vier Aminosäuren eingefügt, sodass die aktive Kinase-Konformation stabilisiert wird und eine gesteigerte Aktivität daraus resultiert.^[14,33,34] Patienten mit diesen Insertionsmutationen weisen Wirkstoffresistenzen gegenüber allen bisher zugelassenen EGFR-Inhibitoren sowie Her2/EGFR-Dualinhibitoren auf.^[14,33,71-74,109] Es werden derzeit mehre potentielle Wirkstoffe untersucht, darunter Poziotinib^[35,110,111] und Mobocertinib/TAK-788^[112,113] (Abbildung 29).

3.4.1. Strukturbiologische Analyse

Durch Proteinkristallisationen im etablierten Kristallisationssystem EGFR-T790M/V948R sowie durch *Soaking*-Experimente mit EGFR-WT konnten Kristallstrukturen der zwei potentiellen Wirkstoffkandidaten Poziotinib^x und TAK-788^{y, z} (Abbildung 30) erhalten werden.^[77,85]

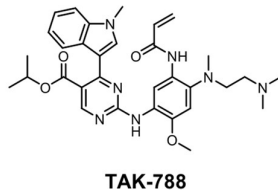
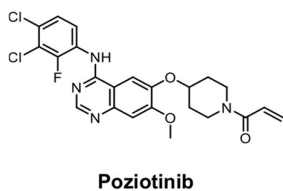


Abbildung 29: Chemische Strukturen der potenziellen Wirkstoffkandidaten Poziotinib und TAK-788.

^x Kristallisation von Poziotinib: In Zusammenarbeit mit Dr. M. Keul im Rahmen ihrer Promotion.

^y Synthese: T. Grabe im Rahmen seiner Promotion.

^z Kristallisation von TAK-788 in EGFR-WT und EGFR-T790M/V948R: In Zusammenarbeit mit L. Heyden im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

3.4.1.1. Poziotinib in EGFR-T790M/V948R

Da der Inhibitor Poziotinib, der ursprünglich zur Überwindung der Resistenzmutation EGFR-T790M entworfen wurde, hohe Aktivitäten im Kontext von EGFR-Exon20-mutiertem NSCLC zeigt,^[35,110,111,114] sollte der Bindemodus des Inhibitors näher betrachtet werden. Da bisher kein Kristallisationssystem für eine der Exon20-Insertionsmutanten etabliert werden konnte, wurden die Kristallisationen mit EGFR-T790M/V948R durchgeführt. Erhaltene Proteinkristalle wurden am SLS vermessen und führten zu einer finalen Struktur (PDB-ID: 7A6J) mit einer Auflösung von 2,1 Å (Abbildung 30A, Datenstatistik in Tabelle A8 im Anhang).^[77]

Der Bindemodus sowie die kovalente Bindung des Inhibitors an das Cys797 konnten anhand der Elektronendichte eindeutig gezeigt werden. Dabei ist ersichtlich, dass das Quinazolin-basierte Grundgerüst, wie bereits von Inhibitoren der ersten und zweiten Generation bekannt ist, eine Wasserstoffbrückenbindung zum Peptidrückgrad von Met793 ausbildet. Außerdem besetzt der 4-Anilin-Substituent die Tasche zwischen Met790 und Lys745. Dabei ist besonders die Positionierung dieser beiden Aminosäuren interessant, da der halogenierte Substituent von beiden Aminosäuren eingerahmt wird. Allerdings führt die Bindung des Substituenten auch zur Einschränkung der konformationellen Freiheit von Met790. In der Struktur sind zwei Konformationen des Met790 zu erkennen, die jedoch beide grundsätzlich eher energetisch ungünstig sind. Allerdings scheint die optimale Lage des Rings und die daraus resultierenden starken hydrophoben Interaktionen dies zu kompensieren. Der Inhibitor ist außerdem an weiteren hydrophoben Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Leu718, Gly719, Val726, Ala743, Leu792, Gly796 und Leu844 sowie Ile744, Met766, Leu777, Leu778 und Leu788 beteiligt. Außerdem sind wasservermittelte Interaktionen der Ether-Einheiten des Inhibitors zum Peptidrückgrad von Cys797 und zur Seitenkette von Asp800 sowie vom Anilin-NH des Inhibitors zum Lys745 erkennbar (Abbildung A15 im Anhang).

Beim Vergleich der Bindemodi von Poziotinib und Afatinib (Abbildung 30D) wird deutlich, dass die Ausrichtung des Grundgerüsts nahezu identisch ist. Allerdings weist der halogenierte Substituent von Afatinib eine leichte Drehung auf, die vermutlich durch das Met790 induziert wird. Außerdem fällt auf, dass der Substituent von Afatinib nicht zwischen Met790 und Lys745 eingerahmt liegt, sondern dass das Lys745 eine andere Konformation einnimmt, die die Drehung des Substituenten ebenfalls begünstigt.

3.4.1.2. TAK-788 in EGFR-T790M/V948R und EGFR-WT

Der Inhibitor TAK-788, ist ein potenter und selektiver niedermolekularer TKI, der speziell zur Adressierung von EGFR- und Her2-Insertionsmutationen entwickelt wurde. Er basiert auf dem Inhibitor Osimertinib, besitzt aber einen zusätzlichen Iso-Propylester in 5-Position. Um den Bindemodus des Inhibitors näher zu betrachten wurde die Co-Kristallisation mit EGFR-T790M/V948R sowie *Soaking*-Experimente mit EGFR-WT durchgeführt. Durch die Vermessung der generierten Proteinkristalle am Synchrotron konnte eine finale Struktur in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 7A6K) mit einer Auflösung von 2,0 Å (Abbildung 30B, Datenstatistik in Tabelle A8 im Anhang) sowie eine finale Struktur in EGFR-WT (PDB-ID: 7B85) mit einer Auflösung von 2,5 Å (Abbildung 30C, Datenstatistik in Tabelle A8 im Anhang) erhalten werden.^[85]

In der komplexen Kristallstruktur von EGFR-T790M/V948R konnte anhand der gut definierten Elektronendichte der Bindemodus des Inhibitors bestimmt und die kovalente Bindung des Inhibitors an das Cys797 bestätigt werden. Außerdem sind die zwei typischen Wasserstoffbrückenbindungen des Aminopyrimidin-Grundgerüsts zum Met793 erkennbar. Der Iso-Propylester in 5-Position besetzt die Selektivitätstasche, die vor allem durch Met790, Lys745 und Thr854 aufgespannt wird. Zusätzlich zu den unpolaren Interaktionen mit Met790 und Lys745 aber auch Ile744, Leu788 und Ile789 zeigt der Ester eine polare Interaktion zum Thr854 ebenso wie eine wasservermittelte Interaktion zum Peptidrückgrat-Carbonyl von Gln791. Außerdem ist TAK-788 an hydrophoben Interaktionen zu Leu718, Gly719, Phe723, Val726, Ala743, Leu792, Gly796 und Leu844 sowie einer weiteren wasservermittelten Interaktion zum Arg841-Carbonyl beteiligt (Abbildung A16A im Anhang).

Der Vergleich mit der Komplexstruktur von TAK-788 in EGFR-WT^[85] zeigt einen ähnlichen Bindemodus des Inhibitors (Abbildung 30E). Dabei ist jedoch eine Neuorientierung des Thr854 erkennbar, durch die keine polare Wechselwirkung mit dem Liganden stattfindet. Gleichzeitig ist der Ester-Rest leicht geneigt, um eine alternative polare Interaktion mit der Seitenkette der Türsteher-Aminosäure Thr790, die auch in den Exon20-Insertionsmutanten vorhanden ist, zu ermöglichen (Abbildung A16B im Anhang).

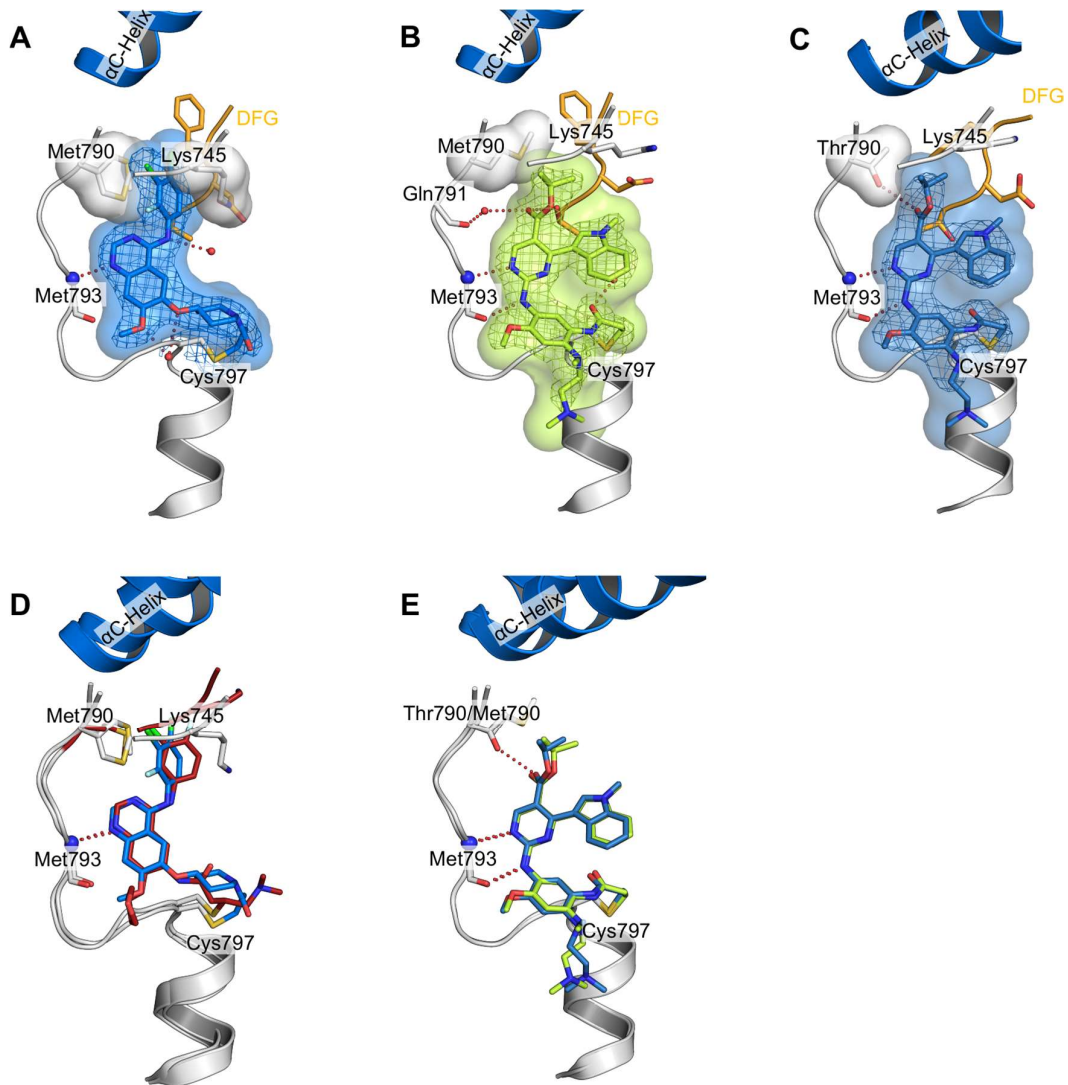


Abbildung 30: Komplexkristallstrukturen von Poziotinib und TAK-788 in EGFR-T790M/V948R und EGFR-WT. **A:** Poziotinib in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 7A6J; Auflösung = 2,1 Å). **B:** TAK-788 in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 7A6K; Auflösung = 2,0 Å). **C:** TAK-788 in EGFR-WT (PDB-ID: 7B85; Auflösung = 2,5 Å). **D:** Überlagerung der Kristallstrukturen von Poziotinib in EGFR-T790M/V948R (blau) und Afatinib in EGFR-T790M (PDB-ID: 4G5P, rot). **E:** Überlagerung der Kristallstrukturen von TAK-788 in EGFR-T790M/V948R (grün) und EGFR-WT (blau). 2FoFc-Elektronendichtekarten wurden konturiert bei einem r.m.s.d. von 1.

3.4.2. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sind komplexe Kristallstrukturen der Wirkstoffkandidaten Poziotinib und TAK-788 in EGFR-T790M/V948R sowie von TAK-788 in EGFR-WT entstanden.

Anhand der komplexen Kristallstruktur von Poziotinib in EGFR-T790M/V948R konnte die interessante Orientierung des halogenierten Rings des Inhibitors und der Aminosäuren Met790 und Lys745 festgestellt werden. Es ist zu vermuten, dass die eigentlich energetisch ungünstige Konformation des Met790, durch die optimale Länge des Rings und die daraus resultierenden starken hydrophoben Interaktionen kompensiert wird.

Durch die Kristallstrukturen von TAK-788 in EGFR-T790M/V948R sowie EGFR-WT konnte, die Wichtigkeit der Besetzung der Selektivitätstasche zwischen Met790/Thr790, Lys745 und Thr854 herausgearbeitet werden. Durch den Iso-Propylester konnten weitere hydrophobe und polare Interaktionen identifiziert werden, die zu Selektivität des Inhibitors für die Exon20-Insertionsmutanten führten.

3.5. Kovalente Inhibitoren zur Adressierung von Her2-A775_G776insYVMA

Neben den Insertionsmutationen in Exon20 von EGFR, weisen NSCLC-Patienten auch Insertionsmutationen in Exon20 von Her2 auf. Hierbei ist die Mutation A775_G776insYVMA die am häufigsten auftretende Insertionsmutation, die zur erhöhten Aktivität der Kinase führt.^[12,26,38,39,115] Tyrosinkinase-Inhibitoren, wie Afatinib, Poziotinib und Dacomitinib sowie die Typ-II-Inhibitoren Neratinib^[116-118] und Lapatinib^[119] (Abbildung 31) werden als Her2-Inhibitoren getestet, allerdings weisen diese Inhibitoren bei Patienten mit Her2-mutiertem NSCLC nur eine begrenzte Aktivität auf.^[34,35,38] Bisher ist kein TKI zur Behandlung von Her2-mutiertem NSCLC zugelassen, daher besteht die Notwendigkeit der Entwicklung neuartiger Inhibitoren, die effektiv gegenüber aberrantem Her2 sind.

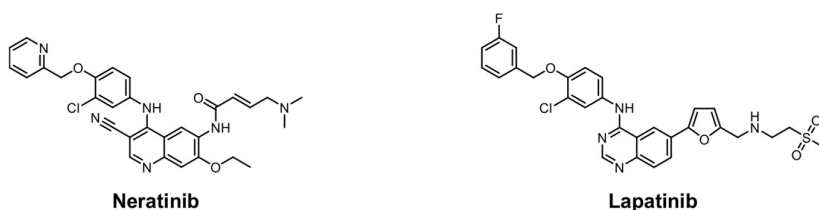


Abbildung 31: Chemische Strukturen von Neratinib und Lapatinib.

3.5.1. Pyrrolopyrimidin-basierte Her2-Inhibitoren

Die Entwicklung neuer Inhibitoren zur Adressierung der A775_G776insYVMA-Mutante von Her2 wurde von LATEGAHN, HARDICK, GRABE und NIGGENABER *et al.* verfolgt.^[77,95,101,102,104,120,121] Hierbei wurden kovalente Inhibitoren basierend auf dem bereits vorgestellten Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst in mehreren Entwicklungszyklen synthetisiert^{aa} und basierend auf den Ergebnissen der biochemischen^{bb} und zellulären^{cc} Charakterisierung sowie der strukturbasierten^{dd} und massenspektrometrischen Analysen^{ee} optimiert.

Als Ausgangspunkt wurden die Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren **2** und **3** (siehe Abschnitt 3.3.1) genutzt, die eine hohe Wirksamkeit gegenüber klinisch-relevanten

^{aa} Synthese der Verbindungen: Dr. J. Lategahn im Rahmen seiner Promotion, J. Hardick im Rahmen ihrer Promotion, T. Grabe im Rahmen seiner Master-Arbeit, P. Klövekorn im Rahmen seiner Master-Arbeit T. Kirschner im Rahmen ihrer Bachelor-Arbeit und L. Hodson (AG van Otterlo, Universität Stellenbosch, Südafrika) im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes (AG Rauh, TU Dortmund).

^{bb} Biochemische Charakterisierung: K. Jeyakumar im Rahmen seiner Promotion und Dr. M. Keul im Rahmen ihrer Promotion.

^{cc} Zelluläre Charakterisierung: K. Jeyakumar im Rahmen seiner Promotion, M. Keul im Rahmen ihrer Promotion und H.L. Tumbrink im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

^{dd} Co-Kristallisation von Verbindung **7** in EGFR-T790M/V948R und strukturelle Analyse dieser Struktur: In Zusammenarbeit mit Dr. M. Keul im Rahmen ihrer Promotion.

^{ee} Massenspektrometrische Analysen: In Zusammenarbeit mit K. Walbrunn im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

EGFR-Varianten besitzen.^[100] Diese Inhibitoren besitzen ein reaktives Acrylamid zur kovalenten Bindungsbildung mit dem Cys797 in EGFR. Auch Her2 besitzt in der iso-strukturellen Position das Cys805, von dem angenommen wird, dass es ebenfalls durch die Inhibitoren kovalent adressiert wird. Angesichts der hohen Ähnlichkeit von Her2 und EGFR wurden repräsentativ einige Verbindungen der beiden Inhibitor-Serien biochemisch gegenüber dem Her2-WT und der A775_G776insYVMA-Mutante vermessen. Hierbei zeigten besonders die Verbindungen **3a**, **3c**, **3g** und **3h** Aktivitäten zwischen 3 nM und 18 nM gegenüber der Her2-Insertionsmutante (Tabelle 4). Im Weiteren wurden die Verbindungen zellulär in der Krebszelllinie H1781, sowie in Ba/F3-Zellen mit eingeführter A775_G776insYVMA-Mutation vermessen, wobei jedoch nur moderate Aktivitäten festgestellt wurden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Biochemische und zelluläre Evaluation von ausgewählten O-substituierten Pyrrolopyrimidin- und N-substituierten Pyrrolopyrimidin-4-on-basierten Inhibitoren.

Verbindung	R	Her2 HTRF IC ₅₀ [nM]		Her2 CTG EC ₅₀ [nM]	
		WT	insYVMA	H1781 (GdelinsVC)	Ba/F3 (insYVMA)
2a	Me	146 ± 84	36 ± 8	1231 ± 81	3302 ± 547
2b	Et	84 ± 21	59 ± 22	2339 ± 292	2813 ± 1035
2g	<i>i</i> -Pr	592 ± 99	418 ± 82	2048 ± 214	3602 ± 1061
2h	<i>i</i> -Bu	321 ± 138	33 ± 5	988 ± 44	2416 ± 386
3a	Me	50 ± 3	11 ± 2	357 ± 92	910 ± 71
3c	Et	14 ± 1	9,2*	417 ± 60	327 ± 160
3g	<i>i</i> -Pr	21 ± 3	18 ± 7	1175 ± 436	1445 ± 430
3h	<i>i</i> -Bu	26 ± 14	3,5 ± 0,6	2310 ± 654	1117 ± 288
Neratinib		9,7 ± 0,3	20 ± 6	148 ± 30	<14
Lapatinib		2,8 ± 0,3	5,4 ± 14	3941 ± 505	2761 ± 348
Afatinib		7,7 ± 4,5	2,1 ± 0,2	151 ± 46	58 ± 16
Pozotinib		12 ± 1	0,3 ± 0,2	105 ± 62	<14
Gefitinib		97 ± 10	15 ± 4	1794 ± 698	2882 ± 1230
Osimertinib		4,8 ± 0,1	45 ± 5	808 ± 151	1389 ± 452

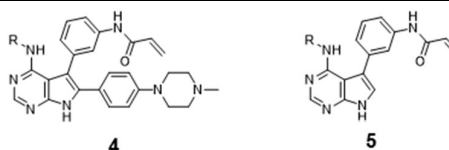
* Einfachmessung

Um neue Ansatzpunkte für die Entwicklung von Her2-Inhibitoren mit verbesserter Aktivität auf zellulärer Ebene zu identifizieren, wurde eine Screening-Kampagne^{[75],ff} mit 1635 Verbindungen durchgeführt, in der die Verbindungen in einem biochemischen Assay bei Konzentrationen von 1 μ M und 10 μ M gegen Her2-WT und Her2-insYVMA getestet wurden. Hierbei wurden mehrere Verbindungen identifiziert, die hydrophobe Einheiten besitzen, die die allosterische Bindetasche der inaktiven Kinase der ErbB-Mitglieder besetzen. Auf Grundlage der bisherigen Ergebnisse wurden daher kovalente Typ-II-Inhibitoren mit einem Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst synthetisiert, die verschiedene hydrophobe Strukturelemente in 4-Position zur Adressierung der allosterischen Tasche besitzen.

Die neue Inhibitor-Serie **4** wurde ebenfalls biochemisch und zellulär charakterisiert. Allerdings zeigten die erhaltenen Ergebnisse, dass die Einführung von hydrophoben Strukturelementen in 4-Position zwar gut vertragen wurde, aber die Aktivitäten im Vergleich zu den ursprünglichen Verbindungen **3a**, **3c**, **3g** und **3h** nur teilweise und moderat erhöht wurden. Außerdem zeigten heteroatomreiche Verbindungen wie **4b** und **4d** tendenziell höhere Aktivitäten im Vergleich zu den jeweiligen lipophilen Pendants **4a** und **4c**. Dieser Trend konnte auch zellulär in der Krebszelllinie H1781 sowie in den Ba/F3-Zellen beobachtet werden (Tabelle 5). Außerdem war anzunehmen, dass das hohe molekulare Gewicht der Verbindungen **4** von 670-800 Da vermutlich zur schlechten Permeabilität durch die Zellmembran führte.

Für die nächste Inhibitor-Serie **5** wurde daraufhin die sperrige Löslichkeitsgruppe in 6-Position entfernt, was zu einem reduzierten molekularen Gewichten von 450-620 Da führte. Diese Verbindungen zeigten zwar biochemisch höhere Aktivitäten gegenüber Her2-WT im Vergleich zur Her2-insYVMA-Mutante, allerdings konnte eine Zunahme der zellulären Potenz beobachtet werden. Dabei zeigten die Verbindungen **5b** und **5d** sowohl in der Krebszelllinie H1781 als auch in den Ba/F3-Zellen EC_{50} -Werte unter 200 nM (Tabelle 5). Durch die Entfernung des Piperazin-Restes in 6-Position und somit die Verringerung des Molekulargewichts konnte daher eine Erhöhung der Zellpermeabilität erreicht werden. Auch die positive Wirkung von Heteroatomen konnte im zellulären System bestätigt werden (siehe Verbindungen **5a** und **5b** oder **5c** und **5d**). Unpolare Verbindungen (**5f-g** und **5j**) hingegen zeigten eine geringere Aktivität (Tabelle 5). Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Polarität und die Löslichkeit Schlüsselparameter in der Entwicklung der Her2-Inhibitoren darstellen. Somit konnten die Verbindungen **5b** und **5d** als potenteste Inhibitoren dieser Serie identifiziert werden.

^{ff} Screening-Kampagne: Dr. C. Becker im Rahmen seiner Promotion und Simone Eppmann (AG Rauh, TU Dortmund) sowie Auswertung durch Dr. J. Lategahn im Rahmen seiner Promotion.



Verbindung	R	Her2 HTRF IC ₅₀ [nM]		Her2 CTG EC ₅₀ [nM]	
		WT	insYVMA	H1781 (GdelinsVC)	Ba/F3 (insYVMA)
5e		3,5 ± 1,7	405 ± 55	193 ± 25	349 ± 19
5f		29 ± 6	1442 ± 265	>3000	754 ± 103
5g		13 ± 3	>2000	>3000	>3000
5h		11 ± 6	79 ± 48	419 ± 167	381 ± 144
5i		4,5 ± 0,6	171 ± 46	383 ± 145	562 ± 145
5j		26 ± 11	716 ± 330	6390 ± 1860	497 ± 67

3.5.2. Strukturbiologische Analyse der Verbindung 5d

Daraufhin sollten Kristallstrukturen der potentesten Inhibitoren im Komplex mit Her2 generiert werden. Die Versuche blieben jedoch erfolglos (siehe Abschnitt 3.6.4), sodass das bereits etablierte Kristallisationssystem EGFR-T790M/V948R genutzt wurde. EGFR ist ein naher Verwandter von Her2 innerhalb der ErbB Rezeptor-Tyrosinkinase-Familie und besitzt eine hohe Homologie innerhalb der ATP-Bindetasche. Zudem liegt die Kinase durch die eingeführte V948R-Mutation in der inaktiven Kinase-Konformation vor, sodass die essenzielle allosterische Tasche, die von den Typ-II-Inhibitoren adressiert wird, durch die nach außen verlagerte α C-Helix zugänglich ist. Es konnten Kristalle von EGFR-T790M/V948R in Komplex mit Verbindung **5d** erhalten werden, die erfolgreich in Beugungsexperimenten am SLS vermessen wurden und zu einer Kristallstruktur mit einer Auflösung von 2,0 Å (PDB-ID: 6TFU) führten (Abbildung 32A, Datenstatistik in Tabelle 9 im Anhang). Der Bindemodus konnte durch gut definierte Elektronendichte aufgelöst werden (Abbildung 32A). Das Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst bildet, wie bereits ins Abschnitt 3.3.2 für die Verbindungen **3g** und **3h** in einer anderen EGFR-Variante

beschrieben, zwei typische Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat von Met793 innerhalb der Scharnierregion aus.

Außerdem liegt die kovalente Bindung des Acrylamids und des Cys797 innerhalb der ATP-Bindetasche vor, die ebenfalls durch massenspektrometrische Analyse bestätigt werden konnte (Abbildung 32B). Der *N*-Benzyl-Indazol-Rest in 4-Position des Inhibitors besetzt die allosterische Tasche zwischen Türsteher-Methionin 790, dem katalytischen Lys745, dem DFG-Motiv und der nach außen verlagerten α C-Helix. Der Inhibitor ist an hydrophoben Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Leu718, Gly719, Val726, Ala743, Leu792, Gly796 und Leu844 sowie Ile744, Met766, Leu777 und Leu788 beteiligt. Zusätzlich liegt ein wasservermitteltes Netzwerk um den Michael-Akzeptor des Inhibitors mit den Aminosäuren Asp800 und Lys745 sowie ein wasservermittelter Kontakt mit dem Anilin-NH des hydrophoben Strukturelements in 4-Position vor (Abbildung A17A im Anhang). Der Bindemodus des Inhibitors in EGFR kann aufgrund der hohen Homologie zwischen EGFR und Her2 auch für Her2 angenommen werden. Zusätzlich konnte durch weitere massenspektrometrische Analysen mit Her2-WT die vollständige kovalente Modifikation des Proteins durch den Inhibitor festgestellt werden (Abbildung 32C). Interessant ist, dass sowohl im Spektrum des Apo-Proteins als auch im Spektrum des Inhibitor-Protein-Komplexes zwei Peaks zu erkennen sind. Darauf wird in Abschnitt 3.6.4 näher eingegangen.

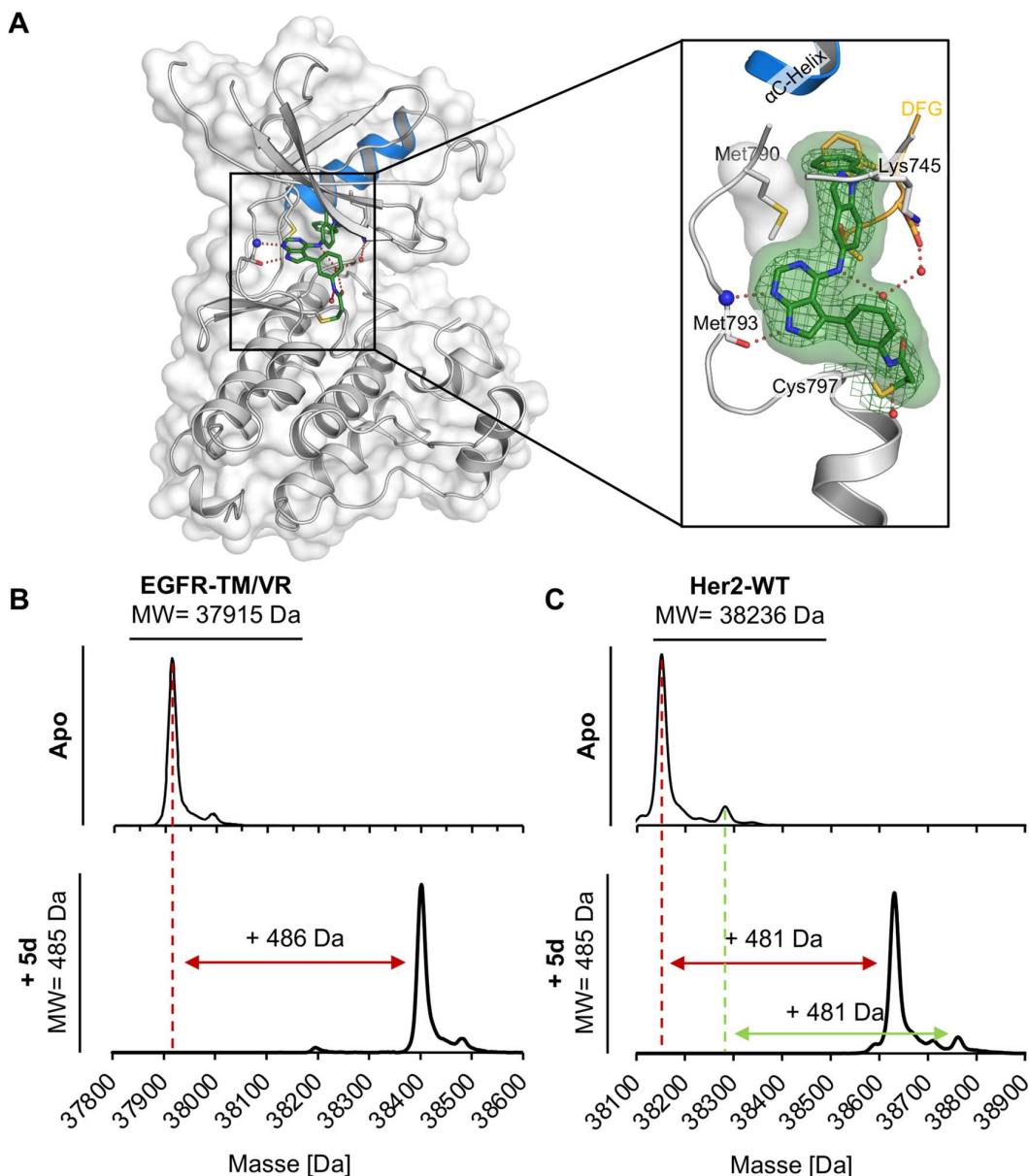


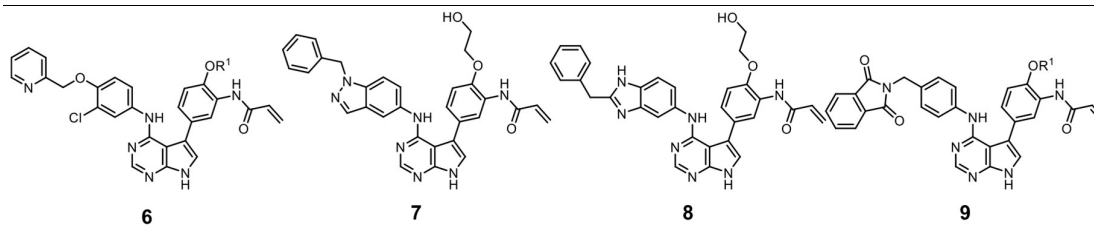
Abbildung 32: Komplexe Kristallstruktur und massenspektroskopische Analysen der Verbindung **5d** der zweiten Inhibitor-Serie. **A:** Komplexe Kristallstruktur der Verbindung **5d** (PDB-ID: 6TFU) in EGFR-T790M/V948R mit einer Auflösung von 2,0 Å mit dargestellter 2FoFc- Elektronendichtekarte konturiert bei einem r.m.s.d. von 1. **B:** Massenspektren vom Apo-EGFR-T790M/V948R und EGFR-T790M/V948R inkubiert mit Verbindung **5d**. **C:** Massenspektren vom Apo-Her2-WT und Her2-WT inkubiert mit Verbindung **5d**.^[120]

3.5.3. Strukturbasierte Optimierung der Inhibitoren

Im Weiteren wurde die Löslichkeit der Inhibitoren optimiert. Mithilfe der komplexen Kristallstruktur der Verbindung **5d** in EGFR-T790M/V948R konnte der lösungsmittlexponierte Phenyl-Linker zwischen Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst und Acrylamid als geeignete Stelle für die Einführung kleinerer Löslichkeitsgruppen identifiziert werden. Hierzu wurden in *ortho*-Position zum Acrylamid kleine Alkylketten mit Alkohol- Amin- oder Ether-Funktionalitäten eingeführt, sodass die Verbindungen **6-9** erhalten wurden.

Durch die biochemische und zelluläre Charakterisierung konnte die Verbindungen **6**, die das hydrophobe Strukturelement von Neratinib in 4-Position besitzen, als potenteste Verbindungen der dritten Inhibitor-Serie identifiziert werden. Dabei zeigten die Inhibitoren **6b** und **6c**, die Alkylketten mit endständigen Hydroxygruppen als Löslichkeitsgruppen besitzen, biochemischen Aktivitäten unter 10 nM und zelluläre Potenz unter 270 nM bzw. 85 nM in den verwendeten Zelllinien. Auch die Verbindung **6d**, ausgestattet mit einem tertiären Amin-Rest, zeigt ähnliche biochemische Aktivitäten sowie zelluläre Aktivitäten von 164 nM und 120 nM. Lediglich die Verbindung **6a** mit einem Metyler-Rest zeigte eine verringerte Aktivität sowohl in biochemischen als auch zellulären Systemen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Biochemische und zelluläre Evaluation der Her2-gerichteten Verbindungen **6-9**.



Verbindung	R ¹	Her2 HTRF IC ₅₀ [nM]		Her2 CTG EC ₅₀ [nM]	
		WT	insYVMA	H1781 (GdelinsVC)	Ba/F3 (insYVMA)
6a	CH(Me)CH ₂ OMe	14 ± 0	45 ± 13	459 ± 269	259 ± 101
6b	(CH ₂) ₂ OH	1,9 ± 0,2	7,9 ± 0,5	201 ± 53	84 ± 28
6c	(CH ₂) ₃ OH	9,3 ± 1,7	10 ± 1	271 ± 56	41 ± 11
6d	(CH ₂) ₂ NMe ₂	15 ± 4	7,4 ± 1,2	164 ± 56	120 ± 18
7	-	14 ± 1	46 ± 2	508 ± 80	159 ± 30
8	-	188 ± 39	1266 ± 196	>3000	>3000
9a	(CH ₂) ₂ OH	15 ± 2	230 ± 13	1610 ± 382	675 ± 338
9b	(CH ₂) ₂ NMe ₂	23 ± 4	153 ± 66	1200 ± 282	621 ± 12

3.5.4. Strukturbiologische Analyse der optimierten Inhibitoren

Mithilfe des etablierten Kristallisationssystems EGFR-T790M/V948R konnten sechs weitere hochaufgelöste Komplexkristallstrukturen (1,5-2,0 Å) mit den Inhibitoren **6b**, **6c**, **6d**, **7**, **9a** und **9b** (PDB-IDs: 6TFV, 6TFY, 6TFW, 6TFZ, 6TG0 und 6TG1) der dritten Inhibitor-Serie durch die Vermessung der generierten Proteinkristalle am SLS erhalten werden (Abbildung 33, Datenstatistiken in den Tabellen 9-11 im Anhang).

Der Bindemodus des Pyrrolopyrimidin-Grundgerüsts aller Inhibitoren entspricht dem bereits für Verbindung **5d** beschriebenen mit den zwei typischen Wasserstoffbrückenbindungen zum Peptidrückgrat von Met793. Außerdem ist die kovalente Bindung der Inhibitoren an das Cys797 eindeutig durch die Elektronendichte aufgelöst (Abbildung 33). Die verschiedenen hydrophoben Strukturelemente in 4-Position liegen alle in der zugänglichen allosterischen Bindetasche der inaktiven Kinase. Der Inhibitor-Teil innerhalb der ATP-Bindetasche ist an den typischen hydrophoben Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Leu718, Gly719, Val726, Ala743, Leu792, Gly796 und Leu844 beteiligt (Abbildung A17-A20 im Anhang). Bei den Verbindungen **6b** und **6c** ist durch das zum Inhibitor gedrehte Phe723 eine weitere hydrophobe Interaktion zwischen dem Phenylalanin und den Alkylketten am Phenyllinker erkennbar (Abbildung A17B und A18A im Anhang). Die hydrophoben Strukturelemente in der allosterischen Tasche sind an Interaktionen mit den Aminosäuren Met766, Leu777, Leu788 und Ile789 beteiligt (Abbildung A17-A20 im Anhang). Durch das Chlor am hydrophoben Strukturelement der Verbindungen **6b**, **6c** und **6d** sowie durch die zwei möglichen Konformationen des Benzylimidazol-Strukturelements der Verbindung **7** liegt bei diesen vier Verbindungen eine weitere hydrophobe Interaktion zum Ile744 vor (Abbildung A17B, A18A, A18B und A19A im Anhang). Zusätzlich ist eine weitere Interaktion des hydrophoben Strukturelements der Verbindungen **6c** und **6d** zum Leu858 zu erkennen (Abbildung A18 im Anhang). Diese Interaktion ist auch für **6b** anzunehmen, allerdings ist die Seitenkette von Leu858 in der Struktur nicht aufgelöst. Durch die beiden möglichen Konformationen des hydrophoben Strukturelements der Verbindung **6c** ist eine weitere Interaktion zu Leu747 möglich (Abbildung A18A im Anhang). Des Weiteren ist interessant, dass die Verbindungen **7** und **9a** eine Interaktion zu Ala859 aufzeigen (Abbildung A19 im Anhang). Grund hierfür ist, dass der Beginn der Aktivierungsschleife nach dem DFG-Motiv eine andere Konformation besitzt, als in den übrigen Kristallstrukturen. Dies ermöglicht die hydrophobe Interaktion mit Ala859 anstatt mit Leu858.

Aufgrund der hohen Auflösungen (1,5-2,0 Å) der komplexen Strukturen sind eine Vielzahl an direkten aber auch wasservermittelten Wasserstoffbrückenbindungen ersichtlich. Die Kristallstrukturen mit den Verbindungen **6b**, **6c** und **9b** zeigen ein wasservermitteltes Netzwerk zwischen Michael-Akzeptor und Protein. Hierbei sind wasservermittelte Interaktionen zwischen Carbonyl des Michael-Akzeptors und

Asp855 und zum Teil mit Lys745 aufgelöst. Außerdem ist eine wasservermittelte oder teilweise direkte Interaktion zwischen dem Carbonyl des Acrylamids und Arg841 sowie eine wasservermittelte Interaktion des NH-Acrylamids und Asp800 bzw. eine Interaktion des NH-Acrylamids mit einem Etylenglycol-Molekül (nur Verbindung **6b**) erkennbar. Interessant ist auch der wasservermittelte Kontakt des Carbonyls des Michael-Akzeptors und des Anilin-NHs des hydrophoben Strukturelements (1,5 Å, 1,7 Å und 1,6 Å, Abbildung A17B, A18A und A20 im Anhang).

Des Weiteren wurde bei den hydrophoben Strukturelementen in 4-Position der Verbindungen **6c** und **7** eine alternative Konformation identifiziert. Hierbei zeigt das Neratinib-abgeleitete Strukturelement der Verbindung **6c** eine alternative Konformation, die eine direkte Wasserstoffbrückenbindung zum katalytischen Lys745 ermöglicht. Beide Konformationen zusammengenommen ähneln dabei dem angenommen Bindemodus der Verbindung **5j**. Außerdem liegen zwei Wasserstoffbrückenbindungen des Heteroatoms des hydrophoben Neratinib-Strukturelements zur Seitenkette von Thr845 und zum Peptidrückgrat von Asp855 innerhalb des DFG-Motivs vor (Abbildung A18A im Anhang). Das Isoindolin-dion-Strukturelement der Verbindungen **9a** und **9b** zeigt neben den Wasserstoffbrückenbindungen zur Seitenkette von Thr854 und zum Peptidrückgrat von Asp855 eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung zum Peptidrückgrat von Phe856 des DFG-Motivs auf (Abbildung A19B und A20 im Anhang)).

Die Löslichkeitsvermittelnden Gruppen auf Glykolbasis, die am Phenyllinker eingefügt wurden, zeigen tendenziell, wie bei der Struktur mit der Verbindung **6b** (Abbildung A17B im Anhang), eine wasservermittelte Wasserstoffbrückenbindung innerhalb der Kette zwischen dem Sauerstoff des Ethers und dem terminalen Heteroatom. Dies führt zur Einschränkung der sonst sehr flexiblen Ketten, wodurch die nahezu vollständige Auflösung der Ketten in der Elektronendichte erklärbar ist. Zusätzlich ist in den Strukturen der Verbindungen **6b** und **6c** eine wasservermittelte Interaktion des Sauerstoffs der terminalen Hydroxylgruppe mit dem Peptidrückgrat von Arg841 zu sehen (Abbildung A17B und A18A im Anhang). In den Strukturen der Verbindungen **7** und **9a** hingegen liegt eine direkte Wasserstoffbrücke des Sauerstoffs und der Seitenkette von Arg841 vor (Abbildung A19 im Anhang).

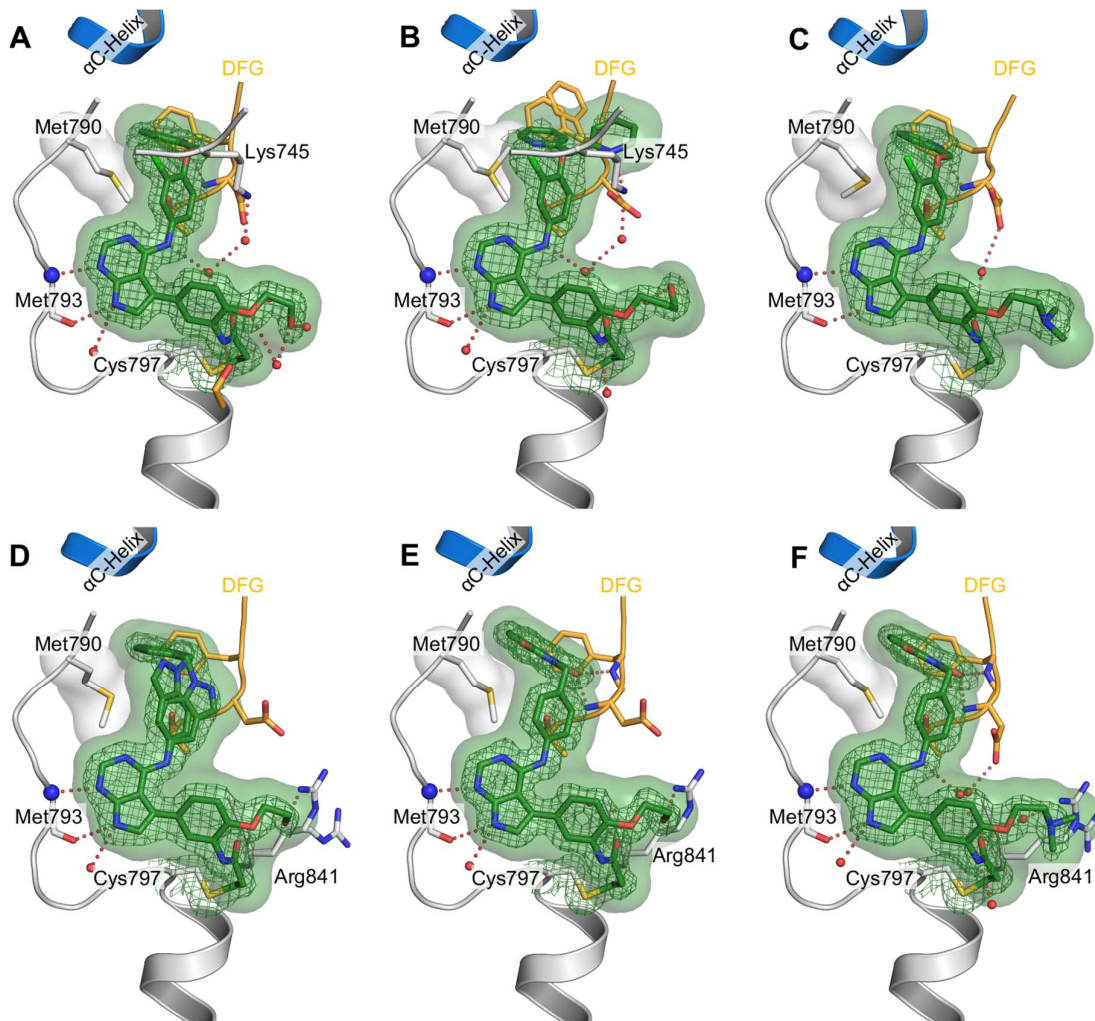


Abbildung 33: Komplexkristallstrukturen der Inhibitoren **6b**, **6c**, **6d**, **7**, **9a** und **9b** in EGFR-T790M/V948R. **A:** Verbindung **6b** in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6TFV; Auflösung = 1,5 Å). **B:** Verbindung **6c** in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6TFY; Auflösung = 1,7 Å). **C:** Verbindung **6d** in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6TFW; Auflösung = 2,0 Å). **D:** Verbindung **7** in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6TFZ; Auflösung = 1,8 Å). **E:** Verbindung **9a** in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6TG0; Auflösung = 1,5 Å). **F:** Verbindung **9b** in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6TG1; Auflösung = 1,6 Å). 2FoFc-Elektronendichtekarte wurden konturiert bei einem r.m.s.d. von 1.^[120]

Die Kristallstrukturen der biochemisch und zellulär aktivsten Verbindungen **6b**, **6c** und **6d** zeigen eine identische Ausrichtung des Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst sowie des halogenierten Rings des hydrophoben Strukturelements in 4-Position. Jedoch zeigt die komplexe Struktur der Verbindung **6c**, wie bereits beschrieben, eine zweite Konformation des hydrophoben Strukturelements mit einer alternativen Orientierung des Pyrimidin-Rests auf (Abbildung 34A). Beim Vergleich dieser Struktur mit der publizierten komplexen Kristallstruktur von Neratinib in inaktivem EGFR (PDB-ID: 2JIV), fällt auf, dass das hydrophobe Strukturelement von Neratinib trotz genereller Verschiebung des Inhibitors innerhalb der Kinase ebenfalls mit gleicher Ausrichtung wie die Verbindungen **6b**, **6c** und **6d**, in die allosterische Bindetasche bindet (Abbildung 34B). Die publizierte Kristallstruktur von Neratinib in aktivem EGFR (PDB-ID: 3W2Q) hingegen weist eine von beiden Konformationen

der Verbindung **6c** abweichende Ausrichtung des Pyrimidin-Rests auf, da durch die aktive Konformation der Kinase die allosterische Tasche für das hydrophobe Strukturelement nicht zugänglich ist (Abbildung 34C).

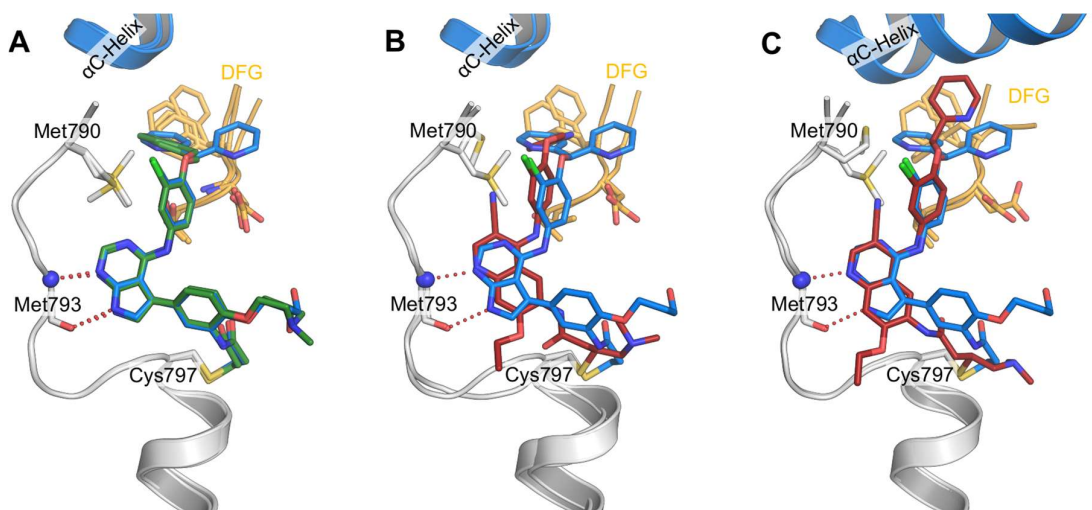


Abbildung 34: Überlagerung der Kristallstrukturen der Verbindungen **6b**, **6c** und **6d** in EGFR-T790M/V98R sowie der beiden publizierten Kristallstrukturen von Neratinib in EGFR. **A:** Überlagerung der Kristallstrukturen der Verbindungen **6b** (PDB-ID: 6TFV, grün), **6c** (PDB-ID: 6TFY, blau) und **6d** (PDB-ID: 6TFW, grün) in EGFR-T790M/V98R. **B:** Überlagerung der Kristallstruktur der Verbindung **6c** (PDB-ID: 6TFY, blau) in EGFR-T790M/V98R und der publizierten Kristallstruktur von Neratinib in inaktivem EGFR (PDB-ID: 2JIV, rot). **C:** Überlagerung der Kristallstruktur der Verbindung **6c** (PDB-ID: 6TFY, blau) in EGFR-T790M/V98R und der publizierten Kristallstruktur von Neratinib in aktivem EGFR (PDB-ID: 3W2Q, rot).^[120]

3.5.5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projekts sind Inhibitoren zur Adressierung der A775_G776insYVMA-Mutante von Her2 basierend auf einem Pyrrolopyrimidin-Grundgerüst in mehreren Entwicklungszyklen entstanden. Basierend auf den Ergebnissen einer Screening-Kampagne wurden Typ-II-Inhibitoren mit verschiedenen hydrophoben Strukturelementen in 4-Position, die die allosterische Tasche von inaktivem Her2 besetzen, synthetisiert. Die Einführung der hydrophoben Strukturelemente der ersten Inhibitor-Serie wurde in biochemischen und zellulären Systemen gut toleriert, allerdings konnte die Aktivität der Verbindungen im Vergleich zu den Ausgangsverbindungen **3g** und **3h** nicht verbessert werden. Zudem war anzunehmen, dass das hohe molekulare Gewicht der Verbindungen von 670-800 Da zur schlechten Permeabilität durch die Zellmembran führt. Daher wurde in der zweiten Inhibitor-Serie auf die löslichkeitsvermittelnde Piperazin-Gruppe verzichtet und somit das molekulare Gewicht verringert. Zudem konnte für die potente Verbindungen **5d** dieser Serie im Rahmen dieser Arbeit eine Kristallstruktur in EGFR-T790M/V948R als Modellsystem generiert werden. Aufgrund der hohen Homologie zwischen EGFR und Her2 kann der so identifizierte Bindemodus der Verbindung auch in Her2 angenommen werden. Außerdem konnte die kovalente Bindung der Verbindung durch massenspektroskopische Analysen in EGFR-

T790M/V948R und Her2-WT bestätigt werden. Anhand der im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Kristallstruktur konnte die *ortho*-Position (bezogen auf das Acrylamid) am Phenyllinker zur Einführung kleiner Löslichkeitsgruppen identifiziert werden. Somit wurden in der dritten Inhibitor-Serie kleinere Glykol-basierte löslichkeitsvermittelnde Gruppen eingeführt, um die verringerte Löslichkeit der Inhibitoren zu verbessern. In dieser Serie konnten die Verbindungen **6b**, **6c** und **6d**, die zum einen das hydrophobe Strukturelement von Neratinib in 4-Position und zum anderen unterschiedlich lange Alkylketten mit endständiger Hydroxylgruppe bzw. tertiären Amin als Löslichkeitsgruppen enthalten, als potenteste Verbindungen identifiziert werden. Von diesen drei Verbindungen konnten ebenso wie von drei weiteren Verbindungen **7**, **9a** und **9b** dieser Inhibitor-Serie Kristallstrukturen in EGFR-T790M/V948R generiert werden. Die Strukturen lieferten Einblicke in die Bindemodi der Verbindungen, sodass die typischen hydrophoben Interaktionen innerhalb der ATP-Bindetasche und ebenso in der allosterischen Tasche identifiziert werden konnten. Zusätzlich konnten eine Vielzahl an zum Teil auch wasservermittelten Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Inhibitoren und Protein gefunden werden.

Basierend auf den generierten Kristallstrukturen der Verbindungen **6-9** können zwei weitere Optimierungsmöglichkeiten angenommen werden: Zum einen sollten die hydrophoben Strukturelemente mit zusätzlichen Heteroatomen ausgestattet werden, da, wie bereits durch die Kristallstrukturen der Verbindungen **6b**, **6c** und **6d** gezeigt werden konnte, dadurch zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zu den Aminosäuren des DFG-Motivs ausgebildet werden können. Diese Erkenntnis wird zusätzlich durch die höheren Aktivitäten der Verbindungen in biochemischen und zellulären Systemen unterstützt. Zum anderen sollten zukünftig die am Phenyllinker eingeführten Löslichkeitsgruppen keine Ether enthalten, um die Interaktionen der Heteroatome innerhalb der Kette zu vermeiden und dadurch die Kontakte zum Protein zu fördern.

3.6. Proteinkristallisation klinisch-relevanter Her2-Mutanten

Neben der strukturellen Analyse klinisch-relevanter EGFR-Mutationen ist auch die Strukturaufklärung vom strukturell nah verwandtem Her2 von großem Interesse der Wirkstoffforschung, besonders vor dem Hintergrund, dass bisher kein TKI zur Behandlung von Her2-mutiertem NSCLC zugelassen ist. Allerdings scheint die Proteinkristallisation von Her2 eine enorme Herausforderung darzustellen, da bisher nur zwei Kristallstrukturen der Kinase-Domäne des Rezeptors in der *Protein Data Bank* publiziert wurden.

Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag zunächst auf der Optimierung der Proteinreinigungsstrategie des Her2-WT-Konstrukts, um ausreichend reines Protein für die anschließende Identifizierung geeigneter Kristallisationsbedingungen zur Verfügung zu haben.

3.6.1. Konstruktdesign der Her2-Kristallisationskonstrukte

Die Her2-Konstrukte, die für die Proteinkristallisation genutzt wurden codieren die Aminosäuren 712-1029 der humanen Her2 Kinase-Domäne (Uniproteintrag P04626). Die Konstrukte wurden bereits in der Vergangenheit basierend auf dem Konstrukt der zwei publizierten Kristallstrukturen (PDB-ID: 3PP0, 3RCD)^[39,40] generiert und besitzen, anders als die EGFR-Konstrukte, einen C-terminalen His₆-Affinitätstag, der im Laufe der Proteinreinigung nicht abgespalten wird.^{[75],99} Neben dem Her2-WT-Konstrukt (pCB05) wurde auch ein Konstrukt der klinisch-relevanten Exon20-Insertionsmutation A775_G776insYVMA (pCB06) basierend auf dem Her2-WT-Konstrukt generiert (Abbildung 35). Beide Konstrukte sind für die Expression in Insektenzellen codonoptimiert.

In Tabelle 7 sind die generierten Her2-Kristallisationskonstrukte aufgeführt. Die Aminosäuresequenzen aller Konstrukte sind im Anhang (Abbildung A12) aufgeführt.

Tabelle 7. Übersicht über die generierten Her2-Kristallisationskonstrukte dieser Arbeit.

Bezeichnung	Interne Abkürzung	Konstrukt	Mutation
Her2-WT	pCB05	pLEX/Bac3 AS 712-1029	-
Her2- A775_G776insYVMA	pCB06	pLEX/Bac3 AS 712-1029	A775_G776insYVMA

⁹⁹ Design der Her2-Kristallisationskonstrukte: Dr. C. Becker im Rahmen seiner Promotion.

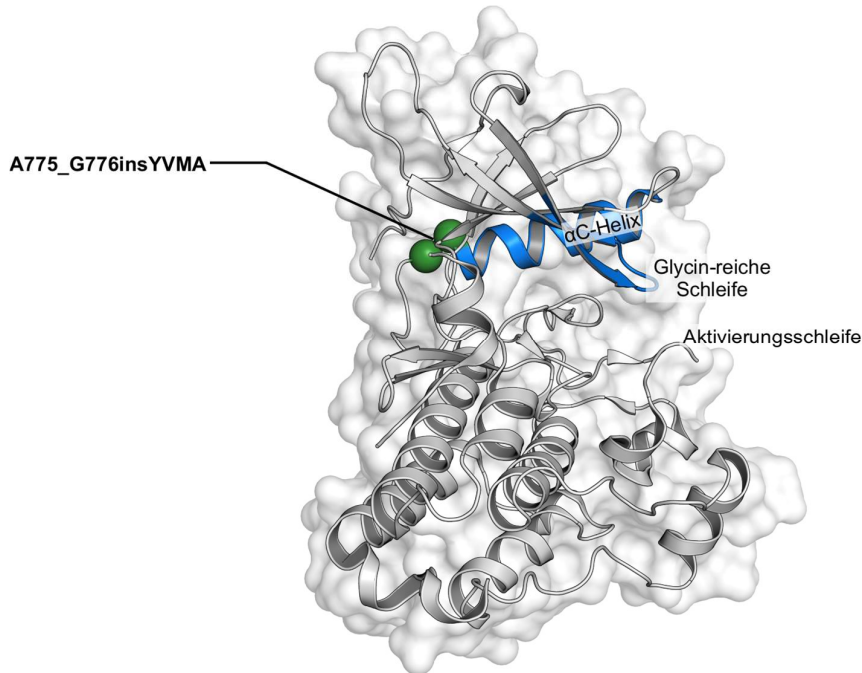


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Kinase-Domäne von Her2-WT sowie Markierung der Position der Insertionsmutation A775_G776insYVMA.

3.6.2. Proteinexpression in Insektenzellen

Wie bereits in Abschnitt 3.1.2 beschrieben, konnte durch den Mediumwechsel (Sf-900 III SFM Medium (Gibco)) die Überexpression in *Sf9*-Zellen auch für den Her2-WT (pCB05) erreicht werden. Durch vorab durchgeführte Testexpressionen des Her2-WT-Konstrukts (pCB05) konnte der optimale Zeitpunkt für die Ernte der Expression im präparativen Maßstab nach 72 h festgestellt werden. Für das Her2-A775_G776insYVMA-Konstrukt (pCB06) muss der Erntezeitpunkt zukünftig noch bestimmt werden.

3.6.3. Etablierung und Optimierung der Proteinreinigungsstrategie

Nachdem die Proteinexpression in *Sf9*-Zellen für das Her2-WT-Konstrukt optimiert werden konnte, wurde ebenfalls die bisher im Arbeitskreis genutzte Proteinreinigungsstrategie verbessert. In der Vergangenheit wurde ein Reinigungsprotokoll bestehend aus Nickel-Affinitätschromatographie, Anionenaustauschchromatographie und finaler Größenausschlusschromatographie eingesetzt.^{[75,81],hh} Da bereits für mehrere EGFR-Konstrukte ein Reinigungsprotokoll etabliert werden konnte, das ohne die Auftrennung der Phosphospezies mittels Anionenaustauschchromatographie zu erfolgreichem

^{hh} Bisheriges Reinigungsprotokoll der Her2-Kristallisationskonstrukte: Dr. C. Becker im Rahmen seiner Promotion. Ebenfalls verwendet durch J. Niggenaber im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

Kristallwachstum führte, sollte dieser Schritt zukünftig ebenfalls für Her2-WT vermieden werden. Aus diesem Grund wurde die von AERTGEERTS *et al.* etablierte Reinigungsstrategie^[39] getestet und optimiert.^{[82], ii} In Abbildung 36 ist der Ablauf der Reinigung nach AERTGEERTS *et al.* im Vergleich zur vorherigen Reinigung dargestellt. Ein Vergleich der Pufferzusammensetzung ist in Tabelle A5 im Anhang aufgeführt.

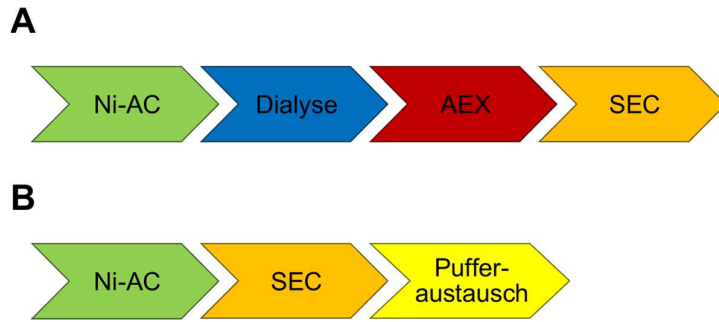


Abbildung 36: In der Vergangenheit in der AG Rauh etablierte Reinigungsstrategie für Her2 und das Reinigungsprotokoll nach AERTGEERTS *et al.*. **A:** Die Reinigungsstrategie für die Her2-Kristallisationskonstrukte besteht aus einer Nickel-Affinitätschromatographie, gefolgt von einer Dialyse über Nacht gefolgt von einer Anionenaustauschchromatographie. Abschließend wurde eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. **B:** Darstellung der Reinigungsstrategie nach AERTGEERTS *et al.*, die ebenfalls mit einer Nickel-Affinitätschromatographie beginnt. Darauf folgen eine Größenausschlusschromatographie und ein finaler Pufferaustausch zur Überführung in den finalen Puffer.

Im folgenden Abschnitt wird die Reinigungsstrategie nach AERTGEERTS *et al.* am Beispiel des Kristallisationskonstrukts Her2-WT (pCB05) gezeigt. Basierend auf der etablierten Proteinreinigung der EGFR-Konstrukte wurde für das optimierte Reinigungsprotokoll der Her2-Konstrukte das Reduktionsmittel DTT in allen Puffern durch das mildere Reduktionsmittel TCEP ersetzt. Ob die Strategie auch für das Her2-A775_G776insYVMA-Konstrukt geeignet ist, muss zukünftig noch getestet werden. Alle Reinigungsschritte erfolgten bei 4 °C unter Verwendung des FPLC-Systems ÄKTA pure (GE Healthcare) und wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

Mit dem lysierten und geklärten Protein wurde zu Beginn eine Nickel-Affinitätschromatographie durchgeführt. Hierbei hat das Protein zunächst mit dem C-Terminalen His₆-Tag an das Säulenmaterial gebunden und konnte anschließend mit einem linearen Imidazol-Gradienten von der Säule eluiert werden. Mittels SDS-PAGE (Abbildung 37) konnte visualisiert werden, dass dieser erste Schritt der Reinigung bereits die Abtrennung vieler Proteinverunreinigungen ermöglichte.

ⁱⁱ Optimierung der Proteinreinigung von Her2-WT: In Zusammenarbeit mit K. Walbrunn im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

Allerdings war durch die Bande bei ca. 40 kDa erkennbar, dass ein Teil des Proteins unlöslich im Zellpellet verblieb. Die Fraktionen 1-6 des ersten Elutionspeaks weisen, neben einigen größeren Verunreinigungen, das Zielprotein auf (Abbildung 37), sodass alle Fraktionen vereinigt und für die anschließende Größenausschlusschromatographie konzentriert wurden.

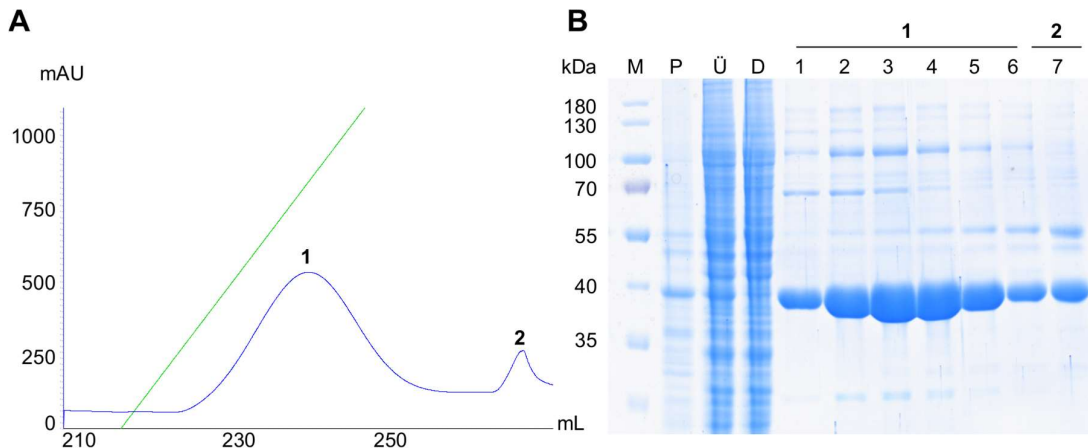


Abbildung 37: Nickel-Affinitätschromatographie als erster Schritt der Proteinreinigung. **A:** Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie des Kristallisationskonstrukts Her2-WT (pCB05). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Grün: linearer Elutionsgradient mit 200 mM Imidazol bei 100 %. **B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie. P: Pellet nach erfolgreicher Zellyse. Ü: Überstand nach erfolgreicher Zellyse. D: Durchfluss der Affinitätsäule. 1-7: verschiedene Fraktionen der Elutionspeaks 1. Das Zielprotein ist durch deutliche Banden auf der Höhe von 40 kDa erkennbar.

In der anschließenden Größenausschlusschromatographie wurden die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei ist auf der SDS-PAGE an der Bande bei ca. 40 kDa erkennbar, dass sowohl im Plateau zwischen den Elutionspeaks, aber auch im zweiten Elutionspeak große Mengen des Zielproteins mit hoher Reinheit enthalten waren (Abbildung 38). Außerdem ist ersichtlich, dass die noch verbliebenen größeren Verunreinigungen, sowie dimerisiertes Zielprotein im ersten Peak abgetrennt werden konnten. Für den letzten Schritt der Proteinreinigung wurden nur die Fraktionen des zweiten Elutionspeaks vereinigt und konzentriert. Die Fraktionen des Plateaus wurden verworfen.

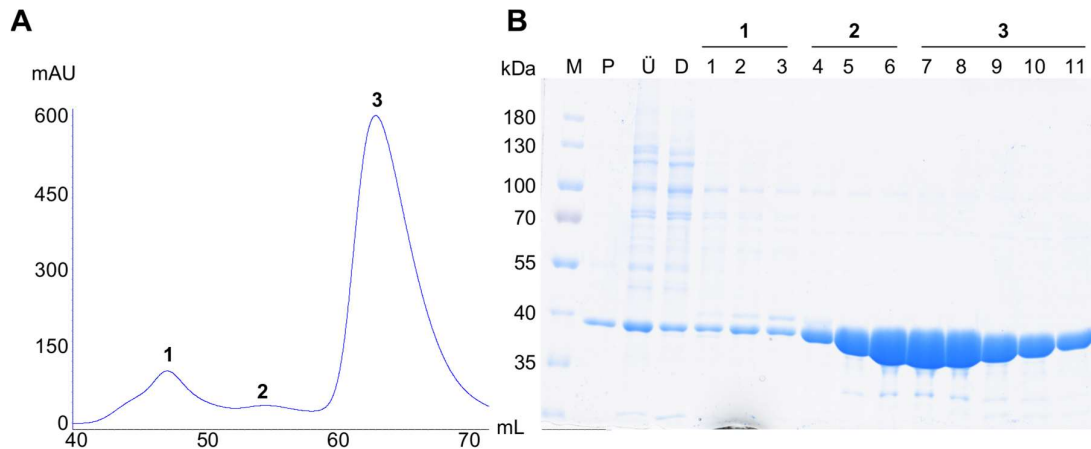


Abbildung 38: Größenausschlusschromatographie als zweiter Schritt der Proteinreinigung. **A:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie des Kristallisationskonstrukts Her2-WT (pCB05). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. **B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Größenausschlusschromatographie. 1-3: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks 1. 4-6: verschiedene Fraktionen des Plateaus zwischen den Elutionspeaks. 7-11: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks 3. Das Zielprotein ist durch deutliche Banden auf der Höhe von 38 kDa erkennbar.

Eine große Menge des konzentrierten Proteins ist jedoch über Nacht im Puffer der Größenausschlusschromatographie ausgefallen (Abbildung 39). Dies war bereits an der deutlichen Trübung, sowie am ausgeprägten Pellet nach der Zentrifugation zu erkennen. Aus diesem Grund wurde eine Hälfte des in Lösung verbliebende Zielprotein in der finalen Größenausschlusschromatographie eingesetzt und in den finalen Kristallisationspuffer überführt. Das finale SDS-Gel zeigt, dass das Zielprotein in hoher Reinheit und ausreichender Menge für die Proteinkristallisation erhalten werden konnte (Abbildung 39).

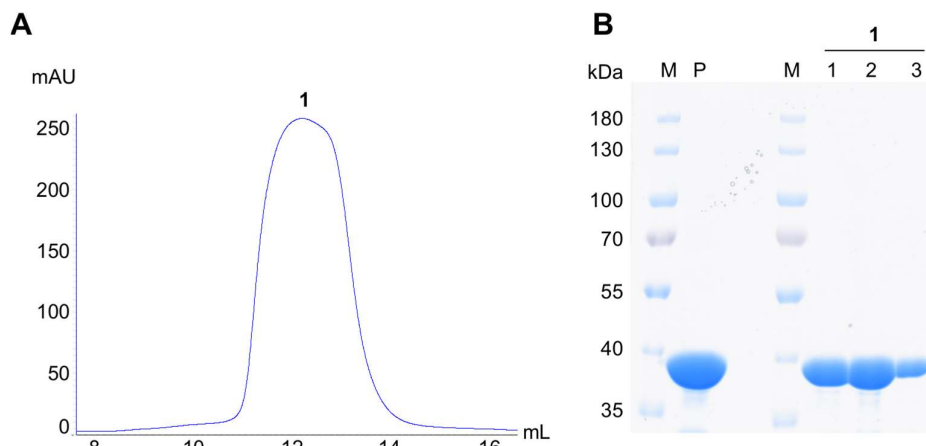


Abbildung 39: Größenausschlusschromatographie zur Überführung des Proteins in den finalen Kristallisationspuffer. **A:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie des Kristallisationskonstrukts Her2-WT (pCB05). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. **B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Größenausschlusschromatographie. P: Pellet des konzentrierten Proteins nach der ersten Größenausschlusschromatographie und Lagerung über Nacht bei 4 °C. 1-3: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks.

Da im Verlauf der Proteinreinigung eine erhebliche Menge des Proteins durch Präzipitation verloren ging, wurde die Stabilität des Proteins unter Verwendung verschiedener Salzkonzentrationen sowie Puffersystemen mit unterschiedlichen pH-Werten mittels Schmelztemperatur-Analyse untersucht.^{[82], ii} Die ermittelten Schmelztemperaturen (T_m) des Her2-WT zeigten, dass ein präferierter pH-Bereich zwischen 7,5-9,5 vorliegt. In Bezug auf die Salzkonzentration konnte in einem Bereich von 0-1 M NaCl jedoch keine eindeutige Präferenz beobachtet werden (Abbildung 40).

Da der optimale pH-Bereich bereits durch die verwendeten Puffer abgedeckt wurde, wurde im Weiteren für die zweite Hälfte des verbliebenen Proteins die Salzkonzentration des finalen Kristallisationspuffers auf 500 mM NaCl erhöht. Grund hierfür war, dass im Puffer der Nickel-Affinitätschromatographie nur eine geringe Menge des Proteins über Nacht ausgefallen war (Abbildung 37). Nach der Überführung in den höhersalzigen Puffer, konnte eine ausreichende Menge des reinen Proteins erhalten werden, das in der anschließenden Kristallisationsvorbereitung eine bessere Stabilität aufwies, als das Protein im niedrigsalzigen Puffer.

Puffersysteme	NaCl [M]							
	0	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,5	1,0
Ohne (H ₂ O)	32,6	37,5	40,0	39,0	37,2	32,8	38,8	33,2
Na-Acetat, pH 4,5	35,5	38,1	39,8	37,8	38,5	36,9	35,5	34,8
Na-Citrat, pH 5,0	36,5	37,0	37,3	34,0	33,5	35,5	33,2	34,8
Bernsteinsäure, pH 5,5	37,4	36,3	36,3	34,7	35,5	35,0	33,5	35,8
MES, pH 6,0	38,1	37,1	36,4	35,3	35,2	35,1	35,7	34,2
BIS-Tris, pH 6,5	39,9	39,5	39,3	39,1	38,9	38,7	39,4	36,7
Imidazol, pH 7,0	41,9	42,0	42,0	41,8	41,7	41,6	41,9	42,9
HEPES, pH 7,5	45,6	45,3	45,2	45,0	44,6	43,8	42,5	43,3
Tris, pH 8,0	44,7	45,0	44,4	44,2	43,9	43,6	43,8	43,8
BIS-TRIS-Propan, pH 8,5	42,8	44,1	43,9	43,7	43,3	43,5	44,0	43,8
AMPD, pH 9,0	42,3	43,4	43,5	43,4	42,6	41,9	43,0	44,5
Glycin, pH 9,5	44,1	43,6	43,3	43,0	42,4	43,1	42,6	44,05



Abbildung 40: Ergebnis des Pufferstabilitätstest von Her2-WT. Der optimale pH-Bereich liegt zwischen 7,5-9,5 (rot markiert). Eine eindeutige Präferenz in Bezug auf die NaCl-Konzentration ist nicht zu erkennen.

Basierend auf diesen Ergebnissen, sollte die NaCl-Konzentration des Puffers der ersten Größenausschlusschromatographie zukünftig auf 500 mM erhöht werden, sodass im Weiteren auf die zweite Größenausschlusschromatographie zur Überführung in den Kristallisationspuffer verzichtet werden kann. Da die geringere Stabilität des Proteins ein zentraler Punkt während der Proteinreinigung zu sein

ii Pufferstabilitätstest mit Her2-WT: K. Walbrunn im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

scheint, kann durch die Einsparung der dritten Säule die finale Proteinausbeute erhöht werden.

3.6.4. Etablierung von Co-Kristallisationssystemen

Wie bereits erwähnt, scheint die Proteinkristallisation der Kinase-Domäne von Her2 eine große Herausforderung darzustellen. Vermutlich erschwert die verminderte Stabilität des Proteins die Kristallisation. Da bereits von verschiedenen EGFR-Varianten bekannt ist, dass die Co-Kristallisation mit diversen Inhibitoren das Kristallwachstum fördert, sollte auch Her2-WT zunächst schwerpunktmäßig in der Co-Kristallisation eingesetzt werden. Zuvor sollte jedoch der Einfluss der Inhibitoren auf die Stabilität des Zielproteins näher untersucht werden. Zudem wurde auch eine EGFR-Variante parallel beobachtet.^{[82], kk} Dabei wurden sowohl die Schmelztemperaturen beider Apo-Proteine, also auch beider Proteine nach Inkubation mit Afatinib und dem Typ-II-Inhibitor **6d** (siehe Abschnitt 3.5) ermittelt. Eine höhere Schmelztemperatur deutet dabei auf eine höhere Stabilität des Proteins hin. Dabei ist zu erkennen, dass Afatinib keinen positiven Einfluss auf die Schmelztemperatur von Her2-WT und somit auf die Stabilität des Proteins besitzt. Im Gegensatz dazu kann durch die Zunahme der Schmelztemperatur um 10 °C nach Inkubation von Her2-WT mit dem Typ-II-Inhibitor **6d** eine gesteigerte Stabilität identifiziert werden (Tabelle 8).

Im Vergleich dazu zeigen die Ergebnisse von EGFR-T790M/V948R im Allgemeinen eine um 10 °C höhere Schmelztemperatur als Her2-WT, wodurch die wesentlich höhere Stabilität von EGFR bestätigt wurde. Außerdem wird deutlich, dass sowohl die Inkubation mit Afatinib aber auch mit Verbindung **6d** eine Erhöhung der Schmelztemperatur zur Folge hat, wobei ein größerer Einfluss durch die Verbindung **6d** zu erkennen ist (Tabelle 8). Dieses Ergebnis lässt sich jedoch durch das verwendete EGFR-Konstrukt selbst erklären. Durch die enthaltene Punktmutation V948R liegt die Kinase in der inaktiven Konformation vor, sodass die allosterische Tasche durch das hydrophobe Strukturelement des Typ-II-Inhibitors besetzt werden kann und, wie bereits in Abschnitt 3.5 beschrieben, zusätzliche Wasserstoffbrückenbindungen zum DFG-Motiv des Proteins ermöglicht.

^{kk} Pufferstabilitätstest mit Her2-WT und EGFR-T790M/V948R: K. Walbrunn im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

Tabelle 8: Übersicht über die experimentell ermittelten Schmelztemperaturen von Her2-WT und EGFR-T790M/V948R sowie der Schmelztemperaturen beider Proteine nach Inkubation mit Afatinib und der Verbindung **6d**.

Zielprotein	Inhibitor	Schmelztemperatur T_m [°C]
Her2-WT	-	43,7 ± 0,8
	Afatinib	42,3 ± 0,8
	6d	53,3 ± 1,0
EGFR-T790M/V948R	-	53,3 ± 1,0
	Afatinib	58,8 ± 0,8
	6d	60,1 ± 0,8

Da ein positiver Einfluss speziell von Typ-II-Inhibitoren auf Her2-WT beobachtet werden konnte, sollten im Weiteren geeignete Kristallisationsbedingungen für die Co-Kristallisation gefunden werden. Generell wurde das Zielprotein hierfür mit 3-fachem molarem Überschuss der verschiedenen Verbindungen für 1-2 h auf Eis inkubiert. Hierbei konnte nach Zugabe der 10 mM Stammlösungen der Verbindungen in DMSO die erneute Präzipitation des Proteins beobachtet werden. Allerdings zeigte die erhöhte Salzkonzentration des finalen Puffers hierbei einen positiven Effekt, da deutlich weniger Protein ausfiel. Zukünftig sollte jedoch der Feststoff der jeweiligen Verbindung zu Protein hinzugeben werden, um die Präzipitation des Proteins durch das DMSO zu vermeiden.

Da hauptsächlich kovalente Inhibitoren zur Adressierung des Cys805 der ATP-Bindetasche eingesetzt wurden, wurde die kovalente Bindungsbildung durch massenspektrometrische Analysen untersucht.^{[82],^{II}} Hierbei konnte in der Regel die vollständige Bindungsbildung durch die Massenverschiebung des Proteins entsprechend der molekularen Masse der Verbindung festgestellt werden (Abbildung 41).

^{II} Massenspektrometrische Analysen von Her2-WT mit diversen kovalenten Verbindungen: In Zusammenarbeit mit K. Walbrunn im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

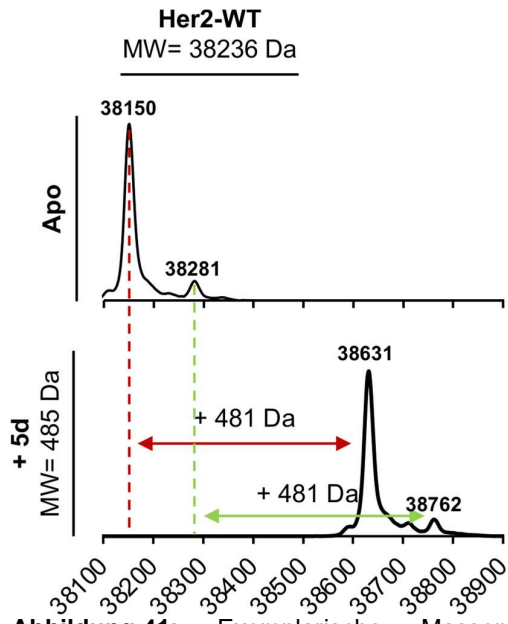


Abbildung 41: Exemplarische Massenspektren von Apo-Her2-WT und Her2-WT inkubiert mit Verbindung **5d**. Hierbei weichen die experimentell gemessenen Massen von der theoretischen Masse ab. Die kovalente Modifikation des Proteins kann durch die Massenzunahme um das molekulare Gewicht der Verbindung **5d** nachgewiesen werden.

Tabelle 9: Gegenüberstellung der theoretischen und gemessenen Masse von Her2-WT.

Her2-WT	Theoretische Masse [Da]	Gemessene Massen [Da]
-	38236	-
-Met	38104	-
+NAc	38279	38281
+NAc +5d	38764	38762
-Met +NAc	38147	38150
-Met +NAc +5d	38632	38631

Allerdings entspricht die experimentell ermittelte Proteinmasse nicht der theoretischen Masse des Proteins (Tabelle 9). Außerdem zeigt das Spektrum neben dem prominenten Peak noch einen weiteren Peak (Abbildung 41). Die Differenzen beider detektierten Massen zur theoretischen Masse deuten darauf hin, dass das gesamte Protein durch posttranslationale Modifikationen während der Expression *N*-acetyliert (+42,5 Da) wurde. Ebenso ist beim größten Teil des Proteins die Abspaltung des Startmethionins (-132 Da) zu vermuten. Beide Annahmen würden die Massendifferenzen erklären. In zukünftigen MS/MS-Messungen werden diese Annahmen überprüft werden.

3.6.5. Identifizierung geeigneter-Kristallisationsbedingungen für Her2-WT (pCB05)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Schwerpunkt zunächst auf die Identifizierung geeigneter Co-Kristallisationsbedingungen für Her2-WT (pCB05) gelegt. Hierzu wurden neben den literaturbekannten Bedingungen^[39,40] ebenfalls kommerziell erhältliche Kristallisations-Kits in Screening-Experimenten bei verschiedenen Temperaturen getestet.^{[82],mm}

3.6.5.1. Testung der literaturbekannten Bedingungen

Die zwei im Jahr 2011 veröffentlichten komplexen Co-Kristallstrukturen (PDB-ID: 3PP0 und 3RCD) basieren auf einer zweiseitigen Kristallisation.^[39,40] Hierbei wurden im ersten Schritt der Kristallisation kleine Kristalle generiert, die im zweiten Schritt für *Seeding*-Experimente eingesetzt wurden (Tabelle 10).

Tabelle 10: Literaturbekannte Kristallisationsbedingungen der Kristallisation von Her2-WT.

Kristallisationsschritt	Kristallisationsbedingungen	Kristallwachstum
1	20 % PEG 3350, 200 mM Na ₂ -Tartrat, 100 mM PIPES, pH 6,5 (20 °C)	Kleine Kristalle
2	20 % PEG 3350, 150 mM Na ₂ -Tartrat, 50 mM (NH ₄) ₂ -Tartrat, 100 mM Bis-Tris/PIPES, pH 6,5-7,0 (20 °C)	Große Kristalle, die zur Strukturaufklärung eingesetzt wurden

In den durchgeführten *Fine*-Screens, basierend auf den bekannten Bedingungen, wurden die PEG3350-Konzentration (12,5-25 %), der pH-Wert des eingesetzten Bis-Tris-Puffersystems bzw. PIPES-Puffersystems (6,0-7,0), die Natrium-Tartrat-Konzentration (100-200 mM) und die Ammoniumtartrat-Konzentration (50-150 mM) variiert. Außerdem wurden Proteinkonzentrationen von 3-7 mg/mL, sowie die Temperaturen 4, 12 und 20 °C getestet. Dabei konnte bei geringerer Proteinkonzentrationen von 4-5 mg/mL das Wachstum kleinerer plattenartiger sowie stäbchenförmiger Kristalle beobachtet werden (Abbildung 42A-42B). Hierbei war auffällig, dass unter Verwendung des PIPES-Puffersystems mit einem pH-Wert von 6,5 das Kristallwachstum bereits nach einigen Tagen beobachtet wurde. Bei der Verwendung des Bis-Tris-Puffersystems wurde zunächst nur kristalliner Niederschlag oder die Bildung von amorphen Strukturen beobachtet. Erst nach zwei Monaten konnten auch in diesen Bedingungen kleine Kristalle beobachtet werden (Abbildung 42C). Außerdem wurde eine Gesamtsalzkonzentration von über

^{mm} Optimierung der Co-Kristallisation von Her2-WT: In Zusammenarbeit mit K. Walbrunn im Rahmen ihrer Master-Arbeit.

200 mM als tendenziell störend für das Wachstum der Kristalle beobachtet. Ebenso wurden PEG3350-Konzentrationen bis 20 % als wachstumsfördernd identifiziert. Zusätzlich konnte durch Verringerung der Inkubationstemperatur die Verlangsamung der Proteinkonzentration und somit auch die Verringerung der Präzipitatbildung beobachtet werden. Auch das Kristallwachstum wurde dadurch verlangsamt, allerdings nicht unterbunden.

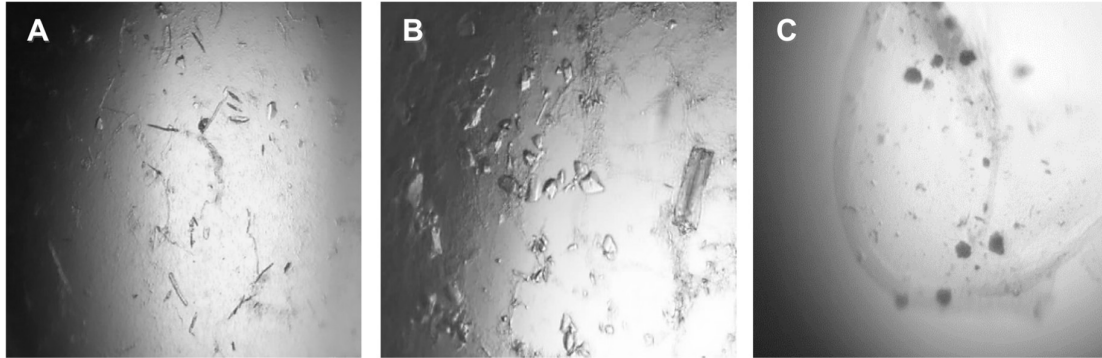


Abbildung 42: Beispielhafte Mikroskopie-Aufnahmen der Kristalle von Her2-WT nach 2 Tagen Inkubationszeit. **A:** 15 % PEG3350, 150 mM Natrium-Tartrat, 50 mM Ammonium-Tartrat mit 100 mM PIPES pH 6,5, $c(\text{Protein}) = 4 \text{ mg/mL}$. **B:** 20 % PEG3350, 100 mM Natrium-Tartrat, 50 mM Ammonium-Tartrat mit 100 mM PIPES pH 6,5, $c(\text{Protein}) = 4 \text{ mg/mL}$. **C:** 20 % PEG3350, 100 mM Natrium-Tartrat, 25 mM Ammonium-Tartrat mit 100 mM Bis-Tris pH 6,5, $c(\text{Protein}) = 4 \text{ mg/mL}$.

Einzelne Kristalle wurden in Beugungsexperimenten am hauseigenen Röntgengenerator sowie am SLS vermessen. Jedoch konnte keine Proteindiffraktion beobachtet werden. Positiv zu bewerten war jedoch, dass ebenfalls keine salztypische Diffraktion der Kristalle beobachtet wurde, sodass davon ausgegangen werden kann, dass Proteinkristalle vorlagen.

In nachfolgenden *Seeding*-Experimenten sollte durch die Zugabe bereits vorliegender Kristallkeime zum Kristallisationstropfen, das Kristallwachstum größerer Kristalle begünstigt werden. Bei den in diesem Experiment gewachsenen Kristallen konnte jedoch kein positiver Einfluss auf die Größe und die morphologische Beschaffenheit erreicht werden. Zudem wurden stark verwachsene Kristalle beobachtet.

Zukünftig sollten weitere Optimierungen der Kristallisationsbedingungen vorgenommen werden. Hierbei sollen die bereits gewonnen Erkenntnisse in Bezug auf die Proteinkonzentration, das Puffersystem, die Gesamtsalzkonzentration und die Inkubationstemperatur berücksichtigt werden.

3.6.5.2. Identifizierung neuer Kristallisationsbedingungen

Zur Identifizierung neuer Kristallisationsbedingungen wurde eine Vielzahl an Screening-Experimenten bei 4 °C und 20 °C durchgeführt. Hierzu wurden die kommerziell erhältlichen Kristallisations-Kits von Qiagen (JCSG Core I-IV, PEG I+II, PACT, Classic I+II Ammoniumsulfat und ProComplex) sowie Proteinkonzentrationen von 4-7 mg/mL eingesetzt. Dabei konnten in zwei Bedingungen ein Wachstum sehr kleiner Kristalle bei 20 °C (Abbildung 43: A: 30 % PEG6000, 100 mM Bicin pH 8,5, c(Protein) = 4 mg/mL. B: 15 % PEG20000, 100 mM MES pH 6,5, c(Protein) = 4 mg/mL), identifiziert werden. Außerdem konnte in vier weiteren Konditionen (Abbildung 43: C: 2 M Ammoniumsulfat, 100 mM Phosphat-Citrat, pH 4,2, c(Protein) = 7,6 mg/mL. D: 2 M Ammoniumsulfat, 200 mM NaCl, 100 mM Natriumcacodylat, pH 6,5, c(Protein) = 7,6 mg/mL. E: 2 M Ammoniumsulfat, 200 mM Lithiumsulfat, 1 M Tris, pH 7, c(Protein) = 7,6 mg/mL. F: 10 % PEG8000, 200 mM Calciumacetat, 100 mM Imidazol, pH 8, c(Protein) = 5 mg/mL) ein Wachstum amorpher Strukturen bei 4 °C gefunden werden.

Für die nachfolgenden *Fine*-Screens wurden zunächst die beiden bei 20 °C identifizierten Kristallisationsbedingungen eingesetzt. Auffällig ist, dass beide Bedingungen Polyethylenglycol als Fällungsmittel enthalten ebenso wie die bereits literaturbekannten Bedingungen, die im vorherigen Abschnitt vorgestellt wurden. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass bei 20 °C die Verwendung von PEG als Fällungsmittel die Kristallisation von Her2-WT begünstigen kann. Außerdem konnte im Screen bei 4 °C beim Einsatz von PEG8000 nur ein Wachstum sehr kleiner amorpher Strukturen beobachtet werden.

Zur Optimierung des Kristallwachstums wurden in den *Fine*-Screens zum einen PEG6000-Konzentrationen zwischen 20-40 % und ein Bicin-basierter pH-Wert zwischen 8 und 9 sowie PEG20000-Konzentrationen zwischen 10-20 % und pH-Werte der 100 mM MES-Lösung zwischen 6 und 7 bei Proteinkonzentrationen zwischen 5-7 mg/mL getestet. Dabei konnte in beiden Ansätzen ein Wachstum kleiner Proteinnadeln beobachtet werden (Abbildung 44A-44B), die jedoch keine Diffraktion in Beugungsexperimenten am SLS zeigten. Allerdings konnte das im Screening beobachtete Kristallwachstum in den *Fine*-Screens reproduziert werden, sodass zukünftig weitere Optimierungen der Bedingungen für das Wachstum geeigneter Proteinkristalle durchgeführt werden sollten.

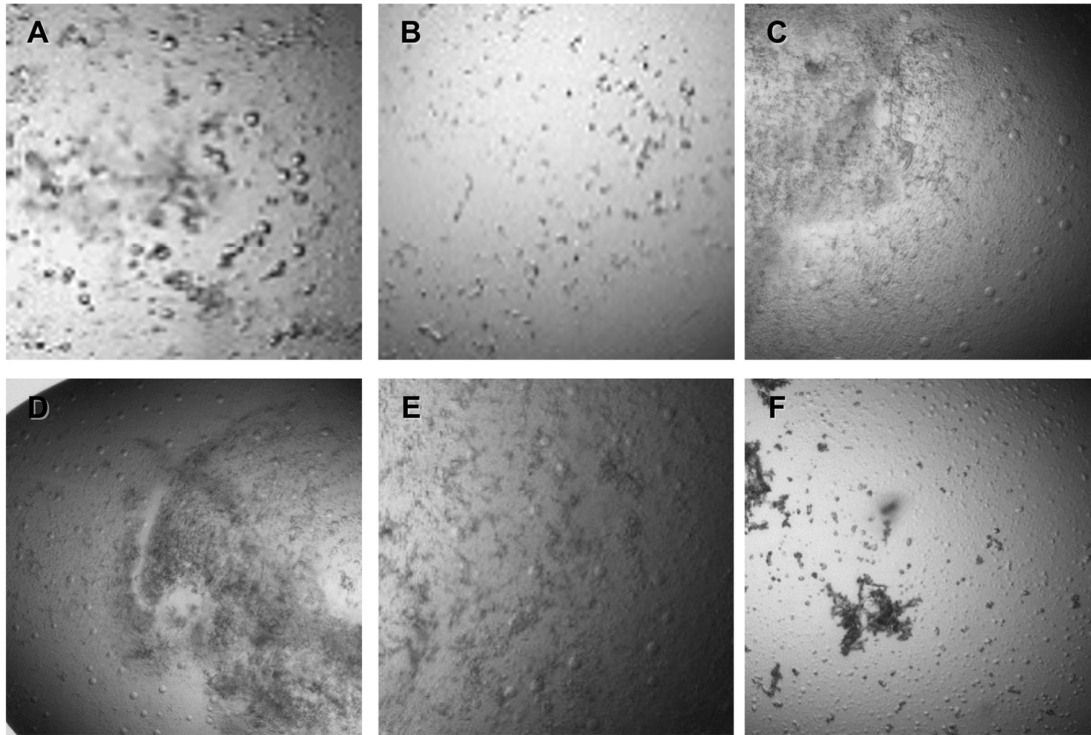


Abbildung 43: Beispielhafte Mikroskopie-Aufnahmen der Kristalle von Her2-WT aus den Screening-Experimenten. **A:** 30 % PEG6000, 100 mM Bicin pH 8,5, c(Protein) = 4 mg/mL. **B:** 15 % PEG20000, 100 mM MES pH 6,5, c(Protein) = 4 mg/mL. **C:** 2 M Ammoniumsulfat, 100 mM Phosphat-Citrat, pH 4,2, c(Protein) = 7,6 mg/mL. **D:** 2 M Ammoniumsulfat, 200 mM NaCl, 100 mM Natriumcacodylat, pH 6,5, c(Protein) = 7,6 mg/mL. **E:** 2 M Ammoniumsulfat, 200 mM Lithiumsulfat, 1 M Tris, pH 7, c(Protein) = 7,6 mg/mL. **F:** 10 % PEG8000, 200 mM Calciumacetat, 100 mM Imidazol, pH 8, c(Protein) = 5 mg/mL.

In weiteren *Fine-Screens* bei 4 °C wurde zunächst eine der drei Ammoniumsulfat-basierten Bedingungen näher untersucht. Aus diesem Grund wurden Konzentrationen von 50-100 mM Phosphat-Citrat sowie pH-Werte zwischen 4-5 und Ammoniumsulfat-Konzentrationen zwischen 1-3 M getestet. Hierbei konnte, wie bereits im Screening, das Wachstum von amorphen Strukturen beobachtet werden. Die Strukturen waren vermehrt in einem Bereich zwischen 1,6-2,7 M Ammoniumsulfat und einem pH-Wert von 4,5 der 100 mM Phosphat-Citrat-Lösung zu finden. Daher wurde im nächsten Schritt ein Additiv-Screen (*Additive-Screen* sowie *Silver bullet* Screen von Hampton Research) mit Proteinkonzentrationen von 4-6 mg/mL durchgeführt, um Zusätze zu identifizieren, die das Kristallwachstum positiv beeinflussen. Dabei konnte das Wachstum von kleinen Kristallen (Abbildung 44C) nach Zusatz von SB76G4, einer komplexen Lösung aus diversen Säuren und Puffersystemen, beobachtet werden, die ein deutliche UV-Aktivität besaßen (Abbildung 44D). Beim Übertragen der gefundenen Bedingungen in *Fine-Screens* konnte das Kristallwachstum bisher nicht reproduziert werden. Jedoch sollten diese gefunden Kristallisationsbedingungen zukünftig weiter optimiert werden, um ein Wachstum von Proteinkristallen zu induzieren und gegebenenfalls weiter zu optimieren.

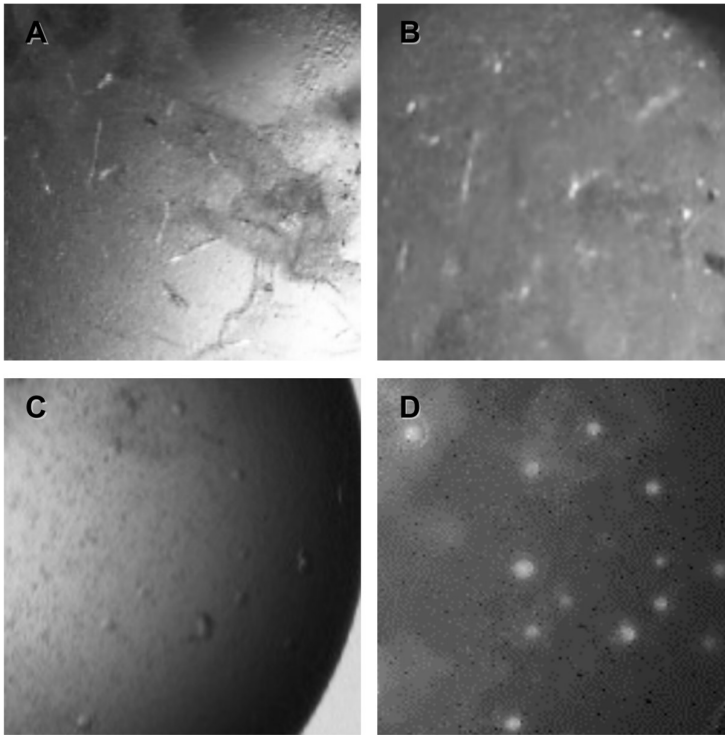


Abbildung 44: Beispielhafte Mikroskopie-Aufnahmen der Kristalle von Her2-WT. **A:** 35 % PEG6000, 100 mM Bicin, pH 7,5, c(Protein) = 5 mg/mL, 20 °C. **B:** 15 % PEG20000, 100 mM MES, pH 5,5, c(Protein) = 5 mg/mL, 20 °C. **C:** 2,09 M Ammoniumsulfat, 100 mM Phosphat-Citrat, pH 4,5, c(Protein) = 5 mg/mL, 4 °C. **D:** UV-Licht-Aufnahme der Kristalle des Bildes **C**.

3.6.6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Proteinreinigungsstrategie für Her2-WT optimiert werden. Außerdem konnten sowohl durch die Verwendung literaturbekannter Kristallisationsbedingungen sowie verschiedener neu-identifizierter Bedingungen das Wachstum kleiner Proteinkristalle erreicht werden. Zukünftig sollten die Bedingungen weiter optimiert werden, um das Wachstum großer Kristalle zu induzieren, die in Beugungsexperimenten Diffraktion zeigen und somit die Strukturaufklärung ermöglichen. Außerdem sollten sowohl die Proteinreinigungsstrategie als auch die Kristallisationsbedingungen für das Her2-A775_G776insYVMA-Konstrukt getestet und gegebenenfalls optimiert werden.

4. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

NSCLC-Patienten mit aktivierenden Mutationen innerhalb der Kinase-Domäne von EGFR können erfolgreich mit Inhibitoren der ersten und zweiten Generation behandelt werden.^[17-23] Allerdings weisen etwa 60 % der Patienten innerhalb des ersten Jahres der Behandlung die Resistenzmutation T790M auf.^[41,42] Daher wurden Inhibitoren der dritten Generation entwickelt, um diese Limitationen zu überwinden.^[45] Im Laufe der Behandlung mit Osimertinib, einem Inhibitor der dritten Generation, treten jedoch weitere Resistenzmutationen auf, wobei die häufigste Mutation die des nukleophilen Cysteins in der ATP-Bindetasche (C797S) ist.^[50,51] Aus diesem Grund ist die Entwicklung einer vierten Inhibitor-Generation zur Adressierung von (mutli-)mutiertem EGFR notwendig. Weitere Wirkstoff-resistente Mutationen betreffen den Beginn der regulatorischen α C-Helix in Exon20 von EGFR und Her2.^[14,34,39,40] Allerdings sind bisher keine TKIs für die Behandlung von NSCLC-Patienten zugelassen. Daher ist ein detailliertes Verständnis der Mutanten sowie der Interaktionen zwischen Protein und Inhibitor auf molekularer Ebene für die Entwicklung neuartiger Verbindungen erforderlich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Kristallisationssysteme klinisch-relevanter EGFR-Varianten etabliert, mit deren Hilfe ein verlässliches Wachstum qualitativ hochwertiger Proteinkristalle in Komplex mit niedermolekularen Verbindungen für die Strukturaufklärung ermöglicht werden konnte. Hierzu wurde zunächst die Proteinreinigung optimiert, um die Zielproteine in ausreichender Reinheit für die Kristallisationsexperimente zu erhalten. Anschließend konnten geeignete Kristallisationsbedingungen für die EGFR-Konstrukte EGFR-WT, EGFR-T790M, EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A und EGFR-T790M/V948R identifiziert werden.

Für einen Teil der Arbeit konnte das EGFR-T790M/V948R-Konstrukt für die simultane Co-Kristallisation von allosterischen Inhibitoren und ausgewählten ATP-kompetitiven Inhibitoren der dritten Generation erfolgreich eingesetzt werden. Die generierten Komplexkristallstrukturen zeigten die Bindung beider Inhibitor-Typen nebeneinander in den Bindetaschen von EGFR und bilden die Grundlage für zukünftige strukturbasierte Designansätze neuartiger Inhibitoren mit individuellen pharmakokinetischen Eigenschaften sowie Hybrid-Inhibitoren.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die strukturelle Charakterisierung von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren, die für die Adressierung der Doppelmutante EGFR-L858R/T790M entwickelt wurden, aber auch eine inhibitorische Potenz gegenüber der Tripelmutante EGFR-L858R/T790M/C797S besitzen. Durch die gelösten Strukturen in EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A konnte eine große Interaktionsfläche zwischen Met790 und dem Substituenten in 4-Position der Inhibitoren festgestellt werden, die möglicherweise den Grund für die hohe Potenz gegenüber EGFR-L858R/T790M/C797S darstellt.

Des Weiteren wurde das EGFR-T790M/V948R-Konstrukt sowie das EGFR-WT-Konstrukt erfolgreich für strukturelle Analysen der Wirkstoffe Poziotinib, und TAK-788 eingesetzt. Hierbei konnte bei der Bindung von Poziotinib eine auffällige Orientierung des halogenierten Substituenten zwischen Türsteher-Methionin sowie dem katalytischen Lys745 identifiziert werden. Außerdem lässt die komplexe Kristallstruktur von TAK-788 darauf schließen, dass die Besetzung der Selektivitätstasche zwischen Met790/Thr790, Lys745 und Thr854 von besonderer Wichtigkeit bei der Adressierung der Exon20-Insertionsmutanten in EGFR und Her2 ist.

In einem weiteren Teil dieser Arbeit konnte das EGFR-T790M/V948R-Konstrukt ebenfalls erfolgreich für die Co-Kristallisation von Pyrrolopyrimidin-basierten Inhibitoren eingesetzt werden, die zur Adressierung der A775_G776insYVMA-Mutante von Her2 entwickelt wurden. Da EGFR und Her2 eine hohe Homologie innerhalb der ATP-Bindetasche besitzen, ist EGFR-T790M/V948R ein verwendbares Modellsystem, das durch die eingeführte Punktmutation V948R in der inaktiven Kinase-Konformation vorliegt, sodass die entworfenen Typ-II-Inhibitoren die aufgespannte allosterische Tasche besetzen konnten. Durch die Analyse der ersten gelösten Kristallstruktur eines Inhibitors im EGFR-Modellsystem, konnte die Position zur Einführung einer Löslichkeitsvermittelnden Gruppe identifiziert werden. Weitere sechs Kristallstrukturen mit Verbindungen der nächsten Inhibitor-Serie konnten weitere strukturelle Einblicke für die Optimierungen liefern. Hierzu zählt unter anderem die Einführung von Heteroatomen im hydrophoben Strukturelement der Verbindungen, die zusätzliche Wasserstoffbrücken zum DFG-Motiv des Proteins ausbilden. Zukünftig sollte zusätzlich die Proteinkristallisation von Her2-WT sowie der Her2-Insertionsmutante basierend auf den vorgestellten Ansätzen weiter optimiert werden, um strukturelle Analysen ohne Verwendung eines Modellsystems durchführen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten insgesamt 47 finale Kristallstrukturen der vorgestellten EGFR-Mutationsvarianten generiert werden, von denen bisher zwölf in der *Protein Data Bank* publiziert wurden.

5. SUMMARY AND OUTLOOK

NSCLC patients with activating mutations within the kinase domain of EGFR can be successfully treated with first- and second-generation inhibitors.^[17-23] However, within the first year of treatment the emergence of the resistance mutation T790M occurs in 60 % of patients.^[41,42] Therefore, third-generation inhibitors were developed to overcome this limitation.^[45] Further resistance mutations emerge during treatment with third-generation inhibitor osimertinib, most commonly affecting the nucleophilic cysteine in the ATP binding pocket (C797S).^[50,51] For this reason, the development of a fourth-generation inhibitor to address (multi-)mutated EGFR is needed. Further drug-resistant mutations concern the beginning of the regulatory α C-helix in exon20 of EGFR and Her2, but currently no TKIs are approved for the treatment.^[14,34,39,40] Therefore, a detailed understanding of the mutants and the protein-inhibitor interactions at the molecular level is necessary for the development of novel compounds.

Several crystallization systems of clinically relevant EGFR variants were established during the present work, enabling reliable growth of high-quality protein crystals in complex with small molecules for structure determinations. For this reason, the protein purification was optimized to obtain the target proteins in sufficient purity for the crystallization experiments. Afterward, suitable crystallization conditions for the EGFR-constructs EGFR-WT, EGFR-T790M, EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A, and the EGFR-T790M/V948R were identified.

For one part of this work, the EGFR-T790M/V948R construct was successfully used for simultaneous co-crystallization of allosteric and selected ATP-competitive third-generation inhibitors. The generated complex crystal structures verified the binding of both inhibitor types simultaneously in the binding pockets of EGFR. They provide the basis for structure-based design approaches of novel inhibitors with individual pharmacokinetic properties as well as hybrid inhibitors.

Another focus of this work was the structural characterization of pyrrolopyrimidine-based inhibitors, which were developed to inhibit the double mutant EGFR-L858R/T790M, but also possessed high inhibitory potency against the triple mutant EGFR-L858R/T790M/C797S. Due to the solved structures in EGFR-T790M/C797S/E865A/E866A/K867A, a considerable interaction area between Met790 and the substituent in 4-position of the inhibitors was detected, which may be the reason for the high potency against EGFR-L858R/T790M/C797S.

In addition, the structural characterization of the inhibitors poziotinib and TAK-788 was performed in EGFR-T790M/V948R and EGFR-WT. Due to inspection of the generated structure of poziotinib, a conspicuous orientation of the halogenated substituent between the gatekeeper methionine and the catalytic Lys745 was identified. Furthermore, the complex crystal structure of TAK-788 suggests that the

occupation of the selectivity pocket between Met790/Thr790, Lys745, and Thr854 is of particular importance in addressing the insertion mutants in EGFR and Her2.

In another part of this work, the EGFR-T790M/V948R construct was also successfully used to co-crystallize pyrrolopyrimidine-based inhibitors, which were developed for addressing the A775_G776insYVMA mutant of Her2. Since EGFR and Her2 have a high homology within the ATP binding pocket, EGFR-T790M/V948R is a valid model system. Due to the introduced point mutation V948R it exhibits the inactive kinase conformation and, therefore, the designed type II inhibitors could occupy the allosteric pocket. By analyzing the first solved crystal structure of an inhibitor in the EGFR model system, the position for introducing a solubilizing group could be identified. Another six crystal structures with compounds of the next inhibitor series provide further structural insights for future optimization efforts. These include the introduction of heteroatoms in the compounds' hydrophobic element, which form additional hydrogen bonds to the protein's DFG motif. In the future, the protein crystallization of Her2-WT, as well as the Her2 insertion mutant, should be further optimized based on the presented approaches to perform structural analyses without the use of a model system.

Within this work, 47 final crystal structures of the presented EGFR mutation variants could be generated. Twelve of them are already published in the Protein Data Bank.

6. MATERIAL UND METHODEN

6.1. Allgemeine Anmerkungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien wurde von den Firmen Sigma-Aldrich, VWR, Roth, FLUKA oder Merck i analytischer Reinheit bezogen.

6.1.1. Verbrauchsmaterialien

Tabelle M1: Übersicht der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Artikel und Herstellerangaben
15-Well Kristallisationsplatten	EasyXtal 15-Well Plates, Qiagen
96-Well Kristallisationsplatten	96-Well sitting drop iQ plate, TTP Lapttech
Additiv-Screens	Additive Screen, Silver bullet, Hampton Research
Cryo-Loops	Mounted CryoLoop, Hampton Research
Dialyseschlauch	Spectra/Por MWCO 12–14 kDa, Spectrum Labs
FPLC-Säulen	Ni-NTA Superflow Cartridge, Qiagen HiLoad 16/600 Superdex 75, GE Healthcare HiLoad 16/600 Superdex 200, GE Healthcare Superdex 75 10/300 GL, GE Healthcare Superdex 75 10/300 GL Increase, GE Healthcare Mono Q 5/50 GL, GE Healthcare
Objektträger	Countess cell counting chamber slides, Invitrogen
Pipettenspitzen	Verschiedene Größen, Starlab
Pufferstabilitätstest	Solubility und Stability Screen 2, Hampton Research
Pufferstabilitätstest-Platten	LightCycler 96-Well Plates, Sarstedt
Reservoir-Lösungen	JCSG Core I-IV, PEG-I-II, PACT, Ammoniumsulfate, Classics I-II, ProComplex, Qiagen
Serologische Pipetten	Verschiedene Größen, Starlab
Sterifilter	Filtropur S, 0,2 µm, Sarstedt Filtropur S, 0,45 µm, Sarstedt
Zentrifugenfilter	Vivaspin6/20 MWCO10000, Sartorius

6.1.2. Verwendete Geräte

Tabelle M2: Übersicht der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Artikel und Herstellerangaben
Dispergierer	T18 basic Ultra-Turrax, IKA
FPLC-System	ÄKTA pure, GE Healthcare
Gelelektrophoresesystem	Mini-PROTEAN 3 Cell, Bio-Rad, Hercules
Hochdruckhomogenisator	M-110L Microfluidizer Materials Processor, Microfluidics
HPLC-System	Dionex UltiMate 3000, Thermo Scientific
Inkubatoren	Incubator Shaker Series I26, New Brunswick Scientific
Kristalldetektor	Crystal Detect 2.1.5.9619, JANSiUVEX
Kristallplatten-Imager	Rock Imager 3.8.3.1, Formulatrix
Kühlzentrifuge	Sorvall Evolution RC, Thermo Scientific Sorvall LYNX, Thermo Scientific
Kühlzentrifugen–Rotoren	SA-600, SA-800, SLC-6000, FiberLite F8-6x1000y, Thermo Fisher Scientific
Massenspektrometer	VelosPro, Thermo Fisher Scientific
PCR-Analysesystem	LightCycler480, Roche
Pipettierroboter	Dragonfly, TTP Labtech
Pipettierroboter	Mosquito Crystal, TTP Labtech
Plattenschüttler	MixMate, Eppendorf
Röntgengenerator	Microstar, Bruker, Detektor: mar345dt, marXperts GmbH
	D8 Venture Bruker, Detektor: erst Photon II, später Photon III, Bruker
Spektralphotometer	NanoDrop 2000, Thermo Scientific
Sterilbank	Sterilbank Herasafe, Thermo Scientific
Thermoblock	ThermoMixer C, Eppendorf
Thermocycler	Mastercycler Pro, Eppendorf
Vakuumkonzentrator	Concentrator Plus, Eppendorf
Zentrifugen und Rotoren	Zentrifuge 5804R, Eppendorf Zentrifuge 5415R, Eppendorf
Zellzähler	Countess II, Life Technologies

6.1.3. Verwendete Proteine, Reagenzien, Medien und Kits

Tabelle M3: Übersicht über verwendete Proteine, Reagenzien, Medien und Kits.

Bezeichnung	Artikel und Herstellerangaben
cComplete ULTRA Tablets, Protease Inhibitor	Roche
Fluorophor	Sypro Tangerine, Lonza
LB-Agarplatten mit Ampicillin (0,1 mg/mL)	Arbeitskreis intern angesetzt
LB-Medium	Arbeitskreis intern angesetzt
Sf-900 III SFM Medium	Gibco
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Phusion HF DNA-Polymerase	New England BioLabs
Phusion HF Reaction buffer	New England BioLabs
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
Thrombin	SERVA
Restriktionsenzym (<i>DpnI</i>)	New England BioLabs
Trypanblau (0,4 %)	Invitrogen

6.1.4. Verwendete Bakterienstämme und Insektenzelllinien

Tabelle M4: Übersicht über verwendete Bakterienstämme und Insektenzelllinien.

Bezeichnung	Hersteller
Escherichia coli XL10 Gold	Stratagene
Spodoptera frugiperda (Sf9-Zellen)	Thermo Fisher

6.1.5. Allgemeine Lösungen und Puffer

Tabelle M5: Übersicht über verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
PBS-Puffer (10-fach)	1,4 M NaCl 27 mM KCl 100 mM Na ₂ HPO ₄ 18 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4 mit HCl
Färbelösung für SDS-PAGE	44 % (v/v) Ethanol 12 % (v/v) Essigsäure 0,15 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
Laufpuffer für SDS-PAGE	25 mM Tris 190 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
Probenpuffer für SDS-PAGE (4-fach)	200 mM Tris pH 6.8 8 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerol 0,4 % Bromphenolblau 10 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Sammelgelpuffer für SDS-PAGE	0,5 M Tris pH 6.8 0,4 % (w/v) SDS
Trenngelpuffer für SDS-PAGE	1,5 M Tris pH 8.8 0,4 % (w/v) SDS

6.2. Molekularbiologische Methoden

6.2.1. Plasmide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene EGFR-Konstrukte (siehe Abschnitt 3.1.1) durch zielgerichtete Mutagenese in ein bereits bestehendes Konstrukt eingebracht. Alle verwendeten Konstrukte sind für die Expression in *Spodoptera frugiperda* codonoptimiert und die Gene wurden in der Vergangenheit bei GeneArt (Thermo Fisher) oder MWG (Eurofins) synthetisiert. Alle EGFR-Konstrukte basieren auf dem Uniprot-Eintrag P00533 und umfassen die Aminosäuren 696 bis 1022. Alle Her2-Konstrukte (Abschnitt 3.6.1) basieren auf dem Uniprot-Eintrag P04626 und umfassen die Aminosäuren 712-1029. Die Gene wurden für die Expression in Insektenzellen in den pLEX/Ba3 Transfervektor kloniert und für die Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie zusätzlich mit einem N-terminalen bzw. C-terminalen His₆-Tag modifiziert.

6.2.2. Mutagenese-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *Polymerase chain reaction*, PCR) wurde für Mutagenesen unter Verwendung geeigneter Mutagenese-Primer eingesetzt.

Tabelle M6: Zusammensetzung der PCR-Ansätze zur Einführung von gezielten Mutationen und das zugehörige Reaktionsprogramm.

Zusammensetzung	Volumen [µL]	Reaktionsprogramm		
100 ng DNA		1 Denaturierung	98 °C	5 min
Primer I	0,2	2 Denaturierung	98 °C	30 s
Primer II	0,2	3 Annealing	55 °C	30 s
DMSO	0,5	4 Elongation	72 °C	1 min
5xPhusion® HF Reaction Buffer	5	5 Elongation	72 °C	5 min
Phusion®-DNA-Polymerase	0,25	6 Pause	4 °C	
ddNTPs	0,5			
ddH ₂ O	13,05			

Anschließend wurde die parentale Vektor-DNA mit 0,5 µL des Restriktionsenzym *DpnI* (2000 U/mL) über Nacht bei 37 °C verdaut und danach mittels PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt.

6.2.3. Transformation von chemisch kompetenten Zellen

Im Rahmen der Mutagenese aber auch zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde die Transformation chemisch kompetenter *E. coli* XL10 Gold-Zellen mittels Hitzeschock durchgeführt. Hierzu wurden 50 µL *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und 1 µL Plasmid-DNA hinzugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Dann erfolgte der Hitzeschock für 1 min bei 42 °C. Anschließend wurden nach weiteren 5 min auf Eis 200 µL LB-Medium hinzugegeben. Der Ansatz wurde dann bei 37 °C und 300 rpm für eine Stunde inkubiert und anschließend 100 µL der Zellen auf LB-Agarplatten mit Ampicillin-Selektionsmarker ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

6.2.4. Plasmid-Amplifikation und Sequenzierung

Zur Amplifikation der Plasmid-DNA wurde Material einer einzelnen *E. coli*-Kolonie der LB-Agarplatten entnommen und in 5 mL Ampicillin-haltiges LB-Medium transferiert und über Nacht bei 37 °C und 120 rpm inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mittels QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) aus dem Zellpellet

isoliert. Die Sequenzierungen wurden von Eurofins durchgeführt, dafür wurde die Plasmid-DNA nach Herstellerangaben vorbereitet und eingeschickt.

6.3. Proteinexpression in Insektenzellen

6.3.1. Zellkultur

Alle Arbeiten mit Insektenzellen wurde unter sterilen Bedingungen in einer Sterilbank durchgeführt. Die Sf9-Zellen wurden in Sf-900 III SFM- Medium (Gibco) bei 27 °C und 110 rpm kultiviert. Nach zwei bis drei Tagen wurden die Zelldichte und die Zellviabilität mittels Trypanblau-Färbung überprüft. Dazu wurden 10 µL der Zellsuspension mit 10 µL der Trypanblau-Lösung gemischt und auf einen Objektträger überführt. Für die Zellzählung wurde der Countess II-Zellzähler genutzt. Es wurde daraufhin nur mit Zellpassagen weitergearbeitet, die eine Zellviabilität von über 90 % besaßen. Die Zellen wurden anschließend auf eine Zelldichte von $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ verdünnt. Durch die kontinuierliche Zellkultivierung wurde die permanente Verfügbarkeit der Zellen für Expressionen und Virusamplifikationen gewährleistet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Passagennummer der Zellen nach dem Auftauen nicht zu hoch wurde, um die optimale Proteinexpression gewährleisten zu können.

6.3.2. Transfektion in Sf9-Zellen

Die Plasmide der EGFR- und Her2- Kristallisationskonstrukte wurden von der *Dortmund Protein Facility* (DPF) nach dem flashBac-Protokoll (Oxford-Technologies) oder dem BacMagic-Protokoll (Novagen) in Sf9-Zellen transfiziert und bis zur zweiten Generation des Baculovirus (P2-Virus) prozessiert. Der weitere Virusamplifikation, die Bestimmung des Erntezeitpunkts sowie die Expressionen im präparativen Maßstab wurden dann in unserem Labor durchgeführt.

6.3.3. Virusamplifikation

Zur Erhöhung des Virustiters wurden die erhaltenen P2-Viren weiter in Sf9-Zellen amplifiziert. Hierfür wurden 50 mL Sf9-Zellen mit einer Zelldichte von $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ mit 25 µL des P2-Virus versetzt und bei 27 °C und 110 rpm inkubiert. Der so erhaltene P3-Virus wurde nach 3-6 Tagen geerntet. Der Zeitpunkt der Ernte hing hierbei von der Viabilität der Zellen ab. Diese sollte zwischen 60-80 % liegen. Zur Ernte der Zellen wurden diese 5 min bei 3000 g zentrifugiert und der Überstand durch sterile Spritzenfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm (Sarstedt) filtriert. Der P3-Virus wurde anschließend bei 4 °C und dunkel gelagert.

6.3.4. Testexpression und Bestimmung des Erntezeitpunktes

Für die Testexpressionen jedes Kristallisationskonstrukts wurden 25 mL *Sf9*-Zellen mit einer Zelldichte von $3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ mit 750 μL des jeweiligen P3-Virus angeimpft und bei 37 °C und 110 rpm für 4 Tage inkubiert. Jeden Tag wurde eine 1 mL Probe entnommen, um die Zelldichte sowie die Viabilität der Zellen zu bestimmen. Außerdem wurde die Proben mittels SDS-PAGE analysiert und der optimale Zeitpunkt für die Zellernte anhand der Expressionslevel der Zielproteine bestimmt.

6.3.5. Heterologe Expression im präparativen Maßstab

Die Proteinexpression wurde in 5 L Erlenmeyerkolben durchgeführt. Hierzu wurden 1,5 L Kulturen mit einer Zelldichte von $3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ angesetzt. Anschließend wurden 50 mL des P3-Virus hinzugefügt und die Kultur bei 27 °C und 110 rpm für 3 Tage inkubiert. Zum Ernten der Zellen wurden die Kulturen 20 min bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit PBS-Lösung gewaschen und 15 min bei 4 °C und 4500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet bei -80 °C eingefroren.

6.4. Proteinreinigung der EGFR-Konstrukte

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte mit dem FPLC-System ÄKTA pure (GE Healthcare). Alle Puffer und Lösungen wurden vor der Verwendung steril filtriert und auf 4 °C heruntergekühlt.

6.4.1. Zellyse

Das Zellpellet wurde in drei- bis vierfachem Volumen des Lysepuffers resuspendiert und mit einer Protease-Inhibitor-Tablette (cOmplete, EDTA-freie Protease-Inhibitor-Tablette, Roche) versetzt. Das Zellpellet wurde bis zur vollständigen Resuspension 30-60 min bei 4 °C gerührt und anschließend mittels Hochdruckhomogenisator in 4-6 Zyklen aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde anschließend mit 1 g CHAPS versetzt und 1 h bei 4 °C gerührt und danach für eine Stunde bei 4 °C bei 17000-20500 rpm zentrifugiert und der Überstand mit Spritzenvorsatzfiltern (Sarstedt) der Porengröße 0,45 μm filtriert. Für die Analyse des Erfolgs wurden vom Überstand und dem Pellet Proben für die SDS-PAGE entnommen.

Lysepuffer: 600 mM NaCl, 50 mM Tris, 15 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 7,5 bei 4 °C

6.4.2. Erste Nickel-Affinitätschromatographie und Dialyse

Die verwendete Säule (Ni-NTA Superflow Catridge, 5 mL (Qiagen)) wurde mit Ni-NTA-Waschpuffer äquilibriert und mit einer Flussrate von 2 mL/min mit dem geklärten Zellysat beladen. Um die unspezifisch gebundenen Proteine von der Säule zu entfernen, wurde die Säule nach dem Beladen mit Ni-NTA-Waschpuffer mit einer Flussrate von 2 mL/min bis zum Erreichen von konstanten UV- und Leitfähigkeitssignalen gewaschen. Anschließend erfolgte die Elution der gebundenen Proteine mit einem linearen Gradienten von 0–50 % des Ni-NTA-Elutionspuffers über einen Zeitraum von 30 min mit einer Flussrate von 1 mL/min. Die gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert und jene Fraktionen, die das Zielprotein enthielten, wurden vereinigt. Zur Abspaltung des His₆-Tags wurde die Proteinlösung mit Thrombin versetzt und über Nacht bei 4 °C gegen den Dialysepuffer dialysiert.

Waschpuffer: 500 mM NaCl, 25 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 8,0 bei 4 °C

Elutionspuffer: 500 mM NaCl, 25 mM Tris, 250 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 8,0 bei 4 °C

Dialysepuffer: 250 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 8,0 bei 4 °C

6.4.3. Zweite Nickel-Affinitätschromatographie

Die verwendete Säule (Ni-NTA Superflow Catridge , 5 mL (Qiagen)) wurde mit Ni-NTA-Waschpuffer äquilibriert und das dialysierte Protein wurde 10 min bei 4 °C und 3000 g zentrifugiert, anschließend mithilfe eine Spritzenvorsatzfilters (Sarstedt) der Porengröße 0,2 µm filtriert und mit einer Flussrate von 2 mL/min auf die Säule geladen. Durch Abspaltung des His₆-Tags im vorherigen Schritt, war das Zielprotein im Durchfluss der Säule enthalten. Nach Erreichen von konstanten UV- und Leitfähigkeitssignalen nach dem Beladen der Säule, wurde die Elution der unspezifisch-gebundenen Proteine und des ungespaltenen Proteins mit einem linearen Gradienten von 0–100 % des Ni-NTA-Elutionspuffers über einen Zeitraum von 10 min mit einer Flussrate von 1 mL/min eingeleitet. Die gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert und die Zielprotein enthaltene Fraktionen vereinigt und mit einem Zentrifugenfilter (MWCO 10 kDa) bei 4 °C und 4000 g aufkonzentriert.

6.4.4. Größenausschlusschromatographie

Die Säule (HiLoad 16/600 Superdex 75 pg oder HiLoad 16/600 Superdex 200 pg (GE Healthcare)) wurde zunächst mit SEC-Puffer äquilibriert. Danach wurde die Säule mit der Proteinlösung mit einer Flussrate von 1 mL/min beladen, nachdem

das Protein zuvor 10 min bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert wurde. Die Elutionsfraktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert und die Zielprotein enthaltenden Fraktionen vereinigt und in einem Zentrifugenfilter (MWCO 10 kDa) bei 4 °C und 4000 g konzentriert.

SEC-Puffer: 100 mM NaCl, 25 mM Tris, 1 mM TCEP, pH 8,0 bei 4 °C

6.5. Proteinreinigung von Her2-WT

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte mit dem FPLC-System ÄKTA pure (GE Healthcare). Alle Puffer und Lösungen wurden vor der Verwendung steril filtriert und auf 4 °C heruntergekühlt.

6.5.1. Zellyse

Die Zellyse wurde ebenfalls wie in Abschnitt 6.4.1 beschrieben durchgeführt.

Lysepuffer: 200 mM NaCl, 50 mM Tris, 20 mM Imidazol, 0,25 mM TCEP, pH 7,5 bei 4 °C

6.5.2. Nickel-Affinitätschromatographie

Die Säule wurde wie in Abschnitt 6.4.2 beschrieben vorbereitet und dann mit einer Flussrate von 2 mL/min mit dem geklärten Zelllysate beladen. Die Elution der am Säulenmaterial gebundenen Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-50 % des Ni-NTA-Elutionspuffers über einen Zeitraum von 45 min mit einer Flussrate von 1 mL/min. Die gesammelten Fraktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert und die Fraktionen des Zielproteins vereinigt und mittels Zentrifugenfilter (MWCO 10 kDa) bei 4 °C und 4000 g aufkonzentriert.

Waschpuffer: 500 mM NaCl, 25 mM Tris, 2 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 7,9 bei 4 °C

Elutionspuffer: 200 mM NaCl, 25 mM Tris, 200 mM Imidazol, 2 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 7,9 bei 4 °C

6.5.3. Größenausschlusschromatographie

Die Säule wurde wie in Abschnitt 6.4.4. beschrieben vorbereitet. Das Zielprotein wurde 10 min bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert und dann mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die Säule geladen. Die Elutionsfraktionen wurden gelelektrophoretisch analysiert und die Zielprotein enthaltenden Fraktionen vereinigt und in einem Zentrifugenfilter (MWCO 10 kDa) bei 4 °C und 4000 g konzentriert.

SEC-Puffer (bisher): 150 mM NaCl, 25 mM Tris, 2 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 7,9 bei 4 °C

SEC-Puffer (zukünftig): 500 mM NaCl, 25 mM Tris, 2 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 7,9 bei 4 °C

6.5.4. Finale Größenausschlusschromatographie

Im letzten Schritt wurde das Zielprotein durch eine weitere Größenausschlusschromatographie in den finalen Kristallisationspuffer überführt. Hierzu wurde die Säule (Superdex 75 10/300 GL oder Superdex 75 10/300 GL Increase, GE Healthcare) mit dem finalen SEC-Puffer äquilibriert. Die Probe wurde mit einem Fluss von 0,4-0,5 mL/min auf die Säule aufgetragen und die proteinhaltigen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE analysiert, aufkonzentriert und für Kristallisationsansätze verwendet.

Finaler SEC-Puffer (bisher): 75 mM NaCl, 20 mM Tris, 2 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, 2 mM Benzamidin, pH 7,9 bei 4 °C

6.6. Analysemethoden

6.6.1. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Analyse der Proteine erfolgte über die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectrophoresis*, SDS-PAGE). Die Auftrennung der Proteine wurde auf 12 %-igen diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen durch Anlegen einer konstanten Stromstärke von 40 mA pro Gel eingeleitet. Anschließend wurden die Gele mit Coomassie-Färbelösung angefärbt und visualisiert. Als Größenstandard wurden der PageRuler Prestained oder Prestained Plus (Thermo Scientific) verwendet.

6.6.2. Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung

Zur Charakterisierung der gereinigten Proteine wurden diese mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) analysiert. Für die Analyse wurden 10-15 µL des jeweiligen Proteins auf 1 mg/mL verdünnt und für zehn Minuten bei 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein LC-MS-Gefäß überführt und 1-2 µL des Überstands wurden unter Verwendung eines Dionex UltiMate 3000 HPLC-Systems gekoppelt an ein VelosPro Massenspektrometer analysiert. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Xcalibur 2.2 SP1.48 (Thermo Scientific) und MagTran 1.02 Software (Amgen Inc.).

6.6.3. Pufferstabilitätstest

Für den Pufferstabilitätstest wurde der *Solubility und Stability Screen 2* (Hampton Research) verwendet. Hierfür wurden 5 µL der Pufferlösungen mit je 11 µL Wasser in einer LightCycler 96-Well Platte (Sarstedt) verdünnt. Anschließend wurden 2 µL Proteinlösung (1 mg/mL) bzw. Proteinlösung nach Inkubation mit den Inhibitoren und 2 µL des Fluorophors Sypro Tangerine hinzugegeben. Die Platte wurde 30 Sekunden zentrifugiert und danach versiegelt. Die Messung der Fluoreszenz wurde im PCR-Analysesystem LightCycler480 (Roche) durchgeführt. Hierbei wurden die Proben über einen Zeitraum von 40 min von 20-85 °C erwärmt. Die Daten wurden mithilfe des Programms Origin (OriginLab) ausgewertet.

6.7. Strukturbiologische Untersuchungen

6.7.1. Proteinvorbereitung

Für die Proteinkristallisation der verschiedenen EGFR-Konstrukte sowie des Her2-WT-Konstrukts mit kleinmolekularen Verbindungen wurde das jeweilige Protein direkt nach der letzten Größenausschlusschromatographie der Proteinreinigung eingesetzt. Da durch die optimierte Proteinexpression teilweise große Mengen der Zielproteine generiert werden konnten, wurden Teile davon bei -80 °C gelagert. Vor der Nutzung für die Proteinkristallisation wurde daher eine erneute Größenausschlusschromatographie zur Abtrennung oligomerer Spezies durchgeführt. Das monomere Zielprotein wurde daraufhin mittels Zentrifugenfilter auf die gewünschten Proteinkonzentrationen (3-7 mg/mL) aufkonzentriert. Für die Co-Kristallisationsansätze wurde das Zielprotein in der Regel mit dreifachem Überschuss der Inhibitoren für 1-4 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proben für 10 min bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Bei Verwendung von kovalenten Inhibitoren wurde die kovalente Bindungsbildung mittels Massenspektroskopie (Abschnitt 6.2.2) nach der

Inkubation überprüft. Das Protein konnte dann für initiale Kristallisations-Screenings (Abschnitt 6.7.2) oder Kristallisation-*Fine-Screens* (Abschnitt 6.7.3) oder Additiv-Screenings (Abschnitt 6.7.4) oder *Seeding*-Experimente (Abschnitt 6.7.5) eingesetzt werden. Für *Soaking*-Experimente (Abschnitt 6.7.6) wurde das Apoprotein eingesetzt. Sämtliche Kristallisationspuffer wurden vor der Verwendung steril filtriert (0,22 µm Porengröße).

6.7.2. Kristallisations-Screening

Zur Identifizierung initialer Kristallisationsbedingungen wurde auf kommerziell erhältliche Kristallisations-Kits (JCSG Core I-IV, PEG I+II, PACT, Classic I+II Ammoniumsulfate und ProComplex) zurückgegriffen. Für die Kristallisation wurde die *sitting drop*-Methode angewendet. Hierzu wurden 100 nL der vorbereiteten Proteinlösung mittels Pipettierroboter Mosquito Crystal (TTP Labtech) mit 100 nL Reservoir-Lösung in die Wells der verwendeten Kristallisationsplatten (96-well sitting drop iQ plate (TTP Labtech)) pipettiert. Zuvor wurden 70 µL der jeweiligen Reservoir-Lösungen der Kristallisations-Kits in die Vertiefungen der Platten vorgelegt. Abschließend wurden die Platten versiegelt, bei 4 °C oder 20 °C im Kristallisationsplatten-Imager (Rock Imager 3.8.3.1 (Formulatrix)) inkubiert und regelmäßig visualisiert. Zur Betrachtung der Bilder wurde die Software Rock Maker genutzt.

6.7.3. Kristallisations-*Fine-Screen*

Für die Kristallisation-*Fine-Screens* wurde die *hanging drop*-Methode angewandt. Hierzu wurden 500 µL Reservoir-Lösung in die Wells der Kristallisationsplatten (EasyXtal 15-well Tool X-Seal (Qiagen)) vorgelegt. Für die Kristallisation wurde 1 µL der Reservoir-Lösung mit 1 µL der Proteinlösung auf dem Deckel der Kristallisationsplatte pipettiert und vermischt. Der Deckel wurde fest auf das entsprechende Well gedreht und die Platten bei 4 °C, 12 °C oder 20 °C inkubiert. Die Kristallisationstropfen wurden regelmäßig mikroskopisch beobachtet.

6.7.4. Additiv-Screen

Zur Optimierung einiger Kristallisationsbedingungen wurden Additiv-Screens mittels *sitting-drop*-Methode durchgeführt. Hierfür wurden 63 µL der zu optimierenden Kristallisationsbedingung (1,1-fache Konzentration der Stammlösung) in den 96-Well-Platten vorgelegt. Danach wurden 7 µL der Additive (*Additive-Screen* und *silver bullet-Screen*, Hampton Research) hinzugegeben. Anschließend wurden 100 nL der Proteinlösung vorgelegt und mittels Pipettierroboter Mosquito Crystal (TTP Labtech) mit 100 nL Reservoir-Lösung vermischt. Nach Versiegelung der

Platten wurden diese bei 4 °C oder 20 °C für 21 Tage im Kristallisationsplatten-Imager (Rock Imager 3.8.3.1 (Formulatrix)) inkubiert und regelmäßig visualisiert.

6.7.5. *Seeding*-Experiment

Zu Beginn wurde eine *Seeding*-Lösung hergestellt. Hierfür wurde 1 µL eines Kristallisationstropfens mit enthaltenen Proteinkristallen mit 30 µL der entsprechenden Reservoir-Lösung gemischt. Durch mehrmaliges pipettieren und vortexten wurden die enthaltenen Kristalle zerkleinert. Die Lösung wurde daraufhin 10 min bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und 100-fach verdünnt. Für das Experiment wurde ebenfalls die *sitting-drop*-Methode verwendet. Mithilfe des Pipettierroboter Mosquito Crystal (TTP Labtech) wurden 200 nL der Proteinlösung, 200 nL der Reservoir-Lösung und 50 µL der *Seeding*-Lösung in die Wells der verwendeten Kristallisationsplatte pipettiert. Zuvor wurden 70 µL der entsprechenden Reservoir-Lösung in die Wells der Platte vorgelegt. Die Platte wurde versiegelt, bei 4 °C oder 20 °C im Kristallisationsplatten-Imager (Rock Imager 3.8.3.1 (Formulatrix)) inkubiert und regelmäßig visualisiert.

6.7.6. *Soaking*-Experiment

Für das *Soaking*-Experiment wurden zunächst Proteinkristalle des Apoproteins in *Fine*-Screens (Abschnitt 6.7.3) generiert. Außerdem wurde das DMSO der 10 mM Stammlösungen der jeweiligen Verbindungen mittels Vakuumzentrifugation vollständig verdampft, sodass der Feststoff wieder im gleichen Volumen des finalen SEC-Puffers aufgenommen werden konnte. Von dieser Lösung wurden 0,2 µL zu einem Kristallisationstropfen mit gewachsenen Proteinkristallen hinzugegeben. Die Platten wurden daraufhin mindestens über Nacht bis hin zu 72 h bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Die Beschaffenheit der Kristalle wurde während dieser Zeit mehrmals mikroskopisch beobachtet.

6.7.7. Fischen der Proteinkristalle

Die Proteinkristalle wurden mithilfe von Cryo-Loops unter dem Mikroskop gefischt und umgehend in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend gelagert.

6.7.8. Datensammlung

Die in Stickstoff eingefrorenen Kristalle wurden zunächst mithilfe eines Röntgenerators (zu Beginn mit dem Microstar (Bruker) später mit dem D8 Venture (Bruker)) auf Diffraction getestet. Bei sehr guter Streuung der Kristalle unterhalb von 3 Å wurden auch Datensätze aufgenommen. Dafür wurde der Kristall mit Röntgenstrahlen beschossen und währenddessen um 360 ° gedreht. Dabei

wurde alle $0,5^\circ$ ein Bild aufgenommen. Die Belichtungszeit lag hierbei bei 30-60 s pro Bild. In der Regel wurden alle Kristalle an der Röntgenquelle X10SA der *Swiss Light Source* am Paul-Scherrer-Institut in Villingen (Schweiz) vermessen und bei Diffraktion der Kristalle ein Datensatz aufgenommen.

6.7.9. Datenprozessierung

Die Prozessierung der erhaltenen Datensätze erfolgte im ersten Schritt mittels XDS. Dadurch wurden die gemessenen Reflexe indexiert, integriert und skaliert. Die Komplexstrukturen wurden mit Hilfe des molekularen Ersatzes mit PHASER gelöst. Dafür wurde die in unserem Arbeitskreis gelöste EGFR-Kristallstruktur (PDB-ID: 5J9Z) als Modell verwendet. Durch mehrere Zyklen des manuellen Modellbaus mithilfe des Programms WinCoot und Verfeinerungen mittels des Programms PHENIX konnten die Komplexstrukturen gelöst werden. Die Generierung der Topologien der Liganden für den korrekten Einbau des Liganden erfolgte mithilfe des Dundee PRODRG-Servers und des Programms eLBOW. Die finalen Strukturen wurden im Anschluss mit dem PDB-Server validiert. Zur Visualisierung und zur Strukturanalyse, sowie für die Erstellung von Abbildungen wurde in dieser Arbeit die Software PyMOL verwendet.

7. ANHANG

7.1. Kristallisationskonstrukte klinisch-relevanter Exon20-Insertionsmutationen von EGFR

Tabelle A1: Übersicht der im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Kristallisationskonstrukte von Exon20-Insertionsmutationen von EGFR.

Bezeichnung	Interne Abkürzung	Konstrukt	Mutation
EGFR- H773_V774insH	pJN01	pLEX/Bac3 AS 696-1023	H773_V774insH
EGFR- H773_V774insPH	pJN02	pLEX/Bac3 AS 696-1024	H773_V774insPH
EGFR- H773_V774insNPH	pJN03	pLEX/Bac3 AS 696-1025	H773_V774insNPH
EGFR- D770_N771insN	pJN04	pLEX/Bac3 AS 696-1023	D770_N771insN
EGFR- D770_N771insNP	pJN05	pLEX/Bac3 AS 696-1024	D770_N771insNP
EGFR- D770_N771insNPG	pJN06	pLEX/Bac3 AS 696-1025	D770_N771ins NPG
EGFR- V769_D770insA	pJN09	pLEX/Bac3 AS 696-1023	V769_D770insA
EGFR- V769_D770insAS	pJN10	pLEX/Bac3 AS 696-1024	V769_D770insAS
EGFR- V769_D770insASV	pJN07	pLEX/Bac3 AS 696-1025	V769_D770insASV
EGFR- D770_N771insS	pJN11	pLEX/Bac3 AS 696-1023	D770_N771insS
EGFR- D770_N771insSV	pJN12	pLEX/Bac3 AS 696-1024	D770_N771insSV
EGFR- D770_N771insSVD	pJN08	pLEX/Bac3 AS 696-1025	D770_N771insSVD

7.2. Sequenzen EGFR-Kristallisationskonstrukte

pCB02	MG HHHHHH VDLVPRGSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pCB17	MG HHHHHH VDLVPRGSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pMK25	MG HHHHHH VDLVPRGSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pMK29	MG HHHHHH VDLVPRGSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pMK33	MG HHHHHH VDLVPRGSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pCB02	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLGICLTSTVQLITQLMPF	120
pCB17	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLGICLTSTVQLI M QLMPF	120
pMK25	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLGICLTSTVQLI M QLMPF	120
pMK29	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLGICLTSTVQLI M QLMPF	120
pMK33	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLGICLTSTVQLI M QLMPF	120
pCB02	GCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITD	180
pCB17	GCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITD	180
pMK25	GCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITD	180
pMK29	G SLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITD	180
pMK33	GCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTPQHVKITD	180
pCB02	FGLAKLLGAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTWELMTFGSKPY	240
pCB17	FGLAKLLGAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTWELMTFGSKPY	240
pMK25	FGLAKLLGA AAAEY HAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTWELMTFGSKPY	240
pMK29	FGLAKLLGA AAAEY HAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTWELMTFGSKPY	240
pMK33	FGLAKLLGAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTWELMTFGSKPY	240
pCB02	DGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDP	300
pCB17	DGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDP	300
pMK25	DGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDP	300
pMK29	DGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDP	300
pMK33	DGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIM R KCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDP	300
pCB02	QRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDAD EYLIPQQG 347	
pCB17	QRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDAD EYLIPQQG 347	
pMK25	QRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDAD EYLIPQQG 347	
pMK29	QRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDAD EYLIPQQG 347	
pMK33	QRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDAD EYLIPQQG 347	

Abbildung A1: Sequenzalignment der EGFR-Kristallisationskonstrukte pCB02 (EGFR-WT), pCB17, pMK25, pMK29 und pMK33. Die Aminosäuren des His₆-Tags sind grün markiert, die der Thrombin-Schnittstelle grau, die der klinisch-relevanten eingebrachten Punktmutationen blau, die der eingebrachten Oberflächenmutationen orange und die der kristallisationsfördernden Punktmutation rot.

pCB02	MG HHHHHH V DLVPRGS HMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pJN04	MG HHHHHH V DLVPRGS HMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pJN05	MG HHHHHH V DLVPRGS HMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pJN06	MG HHHHHH V DLVPRGS HMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pCB02	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVD---NPHVCRLLGICLTSTVQLITQL	117
pJN04	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVD DN ---NPHVCRLLGICLTSTVQLITQL	118
pJN05	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVD NP ---NPHVCRLLGICLTSTVQLITQL	119
pJN06	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVD NPGN PHVCRLLGICLTSTVQLITQL	120
pCB02	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKT PQHVK	177
pJN04	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKT PQHVK	178
pJN05	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKT PQHVK	179
pJN06	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKT PQHVK	180
pCB02	ITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	237
pJN04	ITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	238
pJN05	ITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	239
pJN06	ITDFGLAKLLGAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	240
pCB02	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	297
pJN04	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	298
pJN05	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	299
pJN06	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	300
pCB02	RDPQRYLVIQ GDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVDDADEYLIPQQG	347
pJN04	RDPQRYLVIQ GDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVDDADEYLIPQQG	348
pJN05	RDPQRYLVIQ GDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVDDADEYLIPQQG	349
pJN06	RDPQRYLVIQ GDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVDDADEYLIPQQG	350

Abbildung A2: Sequenzalignment der EGFR-Kristallisationskonstrukte pCB02 (EGFR-WT), pJN04, pJN05 und pJN06. Die Aminosäuren des His₆-Tags sind grün markiert, die der Thrombin-Schnittstelle grau und die der eingebrachten Insertionsmutationen lila.

pCB02	MG HHHHHH VDLVPRGSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pJN01	MG HHHHHH VDLVPRGSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pJN02	MG HHHHHH VDLVPRGSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pJN03	MG HHHHHH VDLVPRGSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pCB02	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPH---VCRLLGICLTSTVQLITQL	117
pJN01	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPH-- H VCRLLGICLTSTVQLITQL	118
pJN02	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPH- PH VCRLLGICLTSTVQLITQL	119
pJN03	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPH NP HVCRLLGICLTSTVQLITQL	120
pCB02	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTTPQHVK	177
pJN01	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTTPQHVK	178
pJN02	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTTPQHVK	179
pJN03	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTTPQHVK	180
pCB02	ITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVPKWMALLESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	237
pJN01	ITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVPKWMALLESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	238
pJN02	ITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVPKWMALLESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	239
pJN03	ITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVPKWMALLESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	240
pCB02	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	297
pJN01	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	298
pJN02	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	299
pJN03	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	300
pCB02	RDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADYLI PQQG	347
pJN01	RDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADYLI PQQG	348
pJN02	RDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADYLI PQQG	349
pJN03	RDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADYLI PQQG	350

Abbildung A3: Sequenzalignment der EGFR-Kristallisationskonstrukte pCB02 (EGFR-WT), pJN01, pJN02 und pJN03. Die Aminosäuren des His₆-Tags sind grün markiert, die der Thrombin-Schnittstelle grau und die der eingebrachten Insertionsmutationen lila.

pCB02	MG HHHHHH V DLVPRGS HMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pJN09	MG HHHHHH V DLVPRGS HMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pJN10	MG HHHHHH V DLVPRGS HMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pJN07	MG HHHHHH V DLVPRGS HMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pCB02	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASV---DNPHVCRLLGICLTSTVQLITQL	117
pJN09	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASV A --DNPHVCRLLGICLTSTVQLITQL	118
pJN10	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASV AS -DNPHVCRLLGICLTSTVQLITQL	119
pJN07	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASV ASV DNPHVCRLLGICLTSTVQLITQL	120
pCB02	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKT PQHVK	177
pJN09	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKT PQHVK	178
pJN10	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKT PQHVK	179
pJN07	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKT PQHVK	180
pCB02	ITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	237
pJN09	ITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	238
pJN10	ITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	239
pJN07	ITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVP IKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	240
pCB02	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	297
pJN09	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	298
pJN10	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	299
pJN07	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	300
pCB02	RDPQRYLVIQ GDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVD ADEYLIPQ QG	347
pJN09	RDPQRYLVIQ GDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVD ADEYLIPQ QG	348
pJN10	RDPQRYLVIQ GDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVD ADEYLIPQ QG	349
pJN07	RDPQRYLVIQ GDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVD ADEYLIPQ QG	350

Abbildung A4: Sequenzalignment der EGFR-Kristallisationskonstrukte pCB02 (EGFR-WT), pJN07, pJN09 und pJN10. Die Aminosäuren des His₆-Tags sind grün markiert, die der Thrombin-Schnittstelle grau und die der eingebrachten Insertionsmutationen lila.

pCB02	MG HHHHHH VDLVPRGSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pJN11	MG HHHHHH VDLVPRGSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pJN12	MG HHHHHH VDLVPRGSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pJN08	MG HHHHHH VDLVPRGSHMASGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPEG	60
pCB02	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVD---NPHVCRLLGICLTSTVQLITQL	117
pJN11	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDS--NPHVCRLLGICLTSTVQLITQL	118
pJN12	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDSV-NPHVCRLLGICLTSTVQLITQL	119
pJN08	EKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDSVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQL	120
pCB02	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTQHVK	177
pJN11	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTQHVK	178
pJN12	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTQHVK	179
pJN08	MPFGCLLDYVREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRRLVHRDLAARNVLVKTQHVK	180
pCB02	ITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVPKWMALLESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	237
pJN11	ITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVPKWMALLESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	238
pJN12	ITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVPKWMALLESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	239
pJN08	ITDFGLAKLLGAAEKEYHAEGGKVPKWMALLESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGS	240
pCB02	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	297
pJN11	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	298
pJN12	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	299
pJN08	KPYDGIPASEISSILEKGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMA	300
pCB02	RDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADYLI PQQG	347
pJN11	RDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADYLI PQQG	348
pJN12	RDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADYLI PQQG	349
pJN08	RDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYRALMDEEDMDDVVDADYLI PQQG	350

Abbildung A5: Sequenzalignment der EGFR-Kristallisationskonstrukte pCB02 (EGFR-WT), pJN08, pJN11 und pJN12. Die Aminosäuren des His₆-Tags sind grün markiert, die der Thrombin-Schnittstelle grau und die der eingebrachten Insertionsmutationen lila.

7.3. Proteinreinigungsparameter der EGFR-Kristallisationskonstrukte

Tabelle A2: Übersicht der relevanten Parameter für die Proteinreinigung der bisher eingesetzten EGFR-Kristallisationskonstrukte.

Bezeichnung	Länge [AS]	Molekulargewicht [Da]	pI	Extinktionskoeffizient bei 280 nm [$M^{-1} \text{cm}^{-1}$]
pCB02 (EGFR-WT)				
ungespalten	347	39518,7	6,02	52370
gespalten	333	37827,8	5,67	52370
pCB17 (EGFR-T790M)				
ungespalten	347	39548,8	6,02	52370
gespalten	333	37857,9	5,67	52370
pMK25 (EGFR-T790M/ E865A/E866A/K867A)				
ungespalten	347	39375,6	6,11	52370
gespalten	333	37684,7	5,77	52370
pMK29 (EGFR-T790M/C797S/ E865A/E866A/K867A)				
ungespalten	347	39359,6	6,11	52370
gespalten	333	37668,6	5,77	52370
pMK33 (EGFR-T790M/V948R)				
ungespalten	347	39605,8	6,11	52370
gespalten	333	37914,9	5,79	52370
pJN06 (EGFR- D770_N771insNPG)				
ungespalten	350	39787,0	6,02	52370
gespalten	336	38096,1	5,67	52370

7.4. Vergleich der Pufferzusammensetzung der Proteinreinigung der EGFR-Konstrukte

Tabelle A3: Vergleich der Pufferzusammensetzung der alten Reinigungsstrategie von EGFR und der Reinigungsstrategie nach HANAN *et al.* sowie des optimierten Reinigungsprotokolls. Die Pufferzusammensetzung des optimierten Reinigungsprotokolls entspricht den Puffern nach HANAN *et al.*. Lediglich der Puffer der finalen Größenausschlusschromatographie wurde leicht verändert.

Reinigungsschritt	Pufferzusammensetzung Alt	Pufferzusammensetzung HANAN <i>et al.</i>	Pufferzusammensetzung des optimierten Reinigungsprotokolls
Zellyse	Kein extra Puffer vorhanden. Es wurde der Ni-AC-Puffer genutzt.	600 mM NaCl 50 mM Tris, 15 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 7,5 bei 4 °C	600 mM NaCl 50 mM Tris, 15 % (v/v) Glycerol, 1 mM TCEP, pH 7,5 bei 4 °C
Nickel-Affinitätschromatographie	500 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8,0 bei 4 °C → 500 mM Imidazol	500 mM NaCl, 25 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TECP, pH 8,0 bei 4 °C → 250 mM Imidazol	500 mM NaCl, 25 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TECP, pH 8,0 bei 4 °C → 250 mM Imidazol
Dialyse	10 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8,0 bei 4 °C	250 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TECP, pH 8,0 bei 4 °C	250 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TECP, pH 8,0 bei 4 °C
Anionenaustauschchromatographie	20 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8,0 bei 4 °C → 1 M NaCl	50 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TECP, pH 8,0 bei 4 °C → 300 mM NaCl	
Größenausschlusschromatographie	250 mM NaCl, 25 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 8,0 bei 4 °C	500 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM TECP, pH 8,0 bei 4 °C	
Finale Größenausschlusschromatographie		100 mM NaCl, 25 mM Tris, 2 mM DTT, 2 mM TECP, pH 8,0 bei 4 °C	100 mM NaCl, 25 mM Tris, 1 mM TECP, pH 8,0 bei 4 °C

7.5. Proteinreinigung von EGFR-T790M/V948R (pMK33)

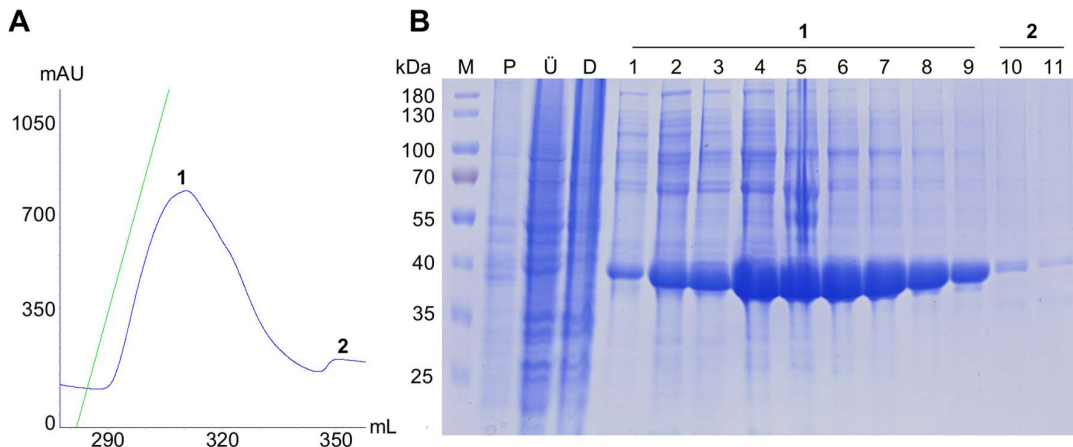


Abbildung A6: Nickel-Affinitätschromatographie als erster Schritt der Proteinreinigung. **A:** Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie des Kristallisationskonstrukts EGFR-T790M/V948R (pMK33). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Grün: linearer Elutionsgradient mit 250 mM Imidazol bei 100 %. **B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie. P: Pellet nach erfolgreicher Zellyse. Ü: Überstand nach erfolgreicher Zellyse. D: Durchfluss der Affinitätssäule. 1-9: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks 1. 10-11: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks 2. Das Zielprotein ist durch deutliche Banden auf der Höhe von 40 kDa erkennbar.

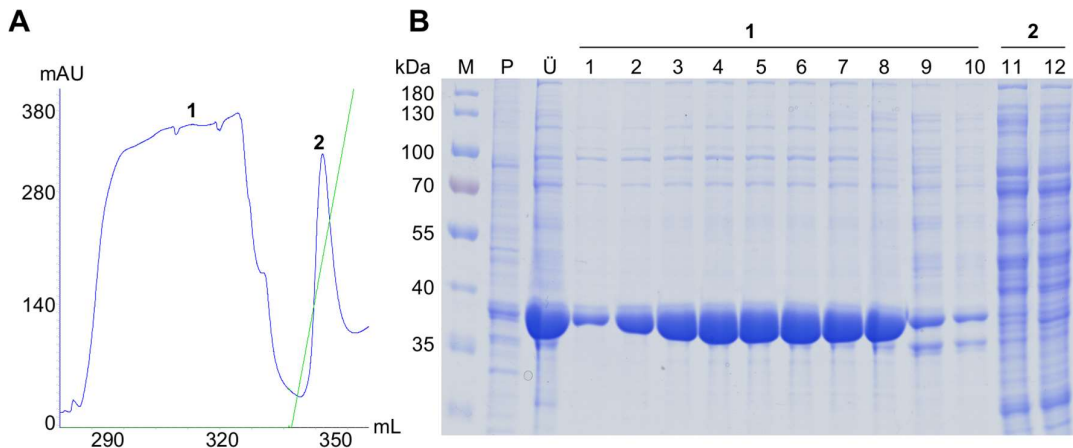


Abbildung A7: Nickel-Affinitätschromatographie als zweiter Schritt der Proteinreinigung. **A:** Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie des Kristallisationskonstrukts EGFR-T790M/V948R (pMK33). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Grün: linearer Elutionsgradient mit 250 mM Imidazol bei 100 %. **B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie. P: Pellet nach Dialyse. Ü: Überstand nach Dialyse. 1-10: verschiedene Fraktionen des Durchflusses. 11-12: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks. Das Zielprotein ist durch deutliche Banden auf der Höhe von 37 kDa erkennbar.

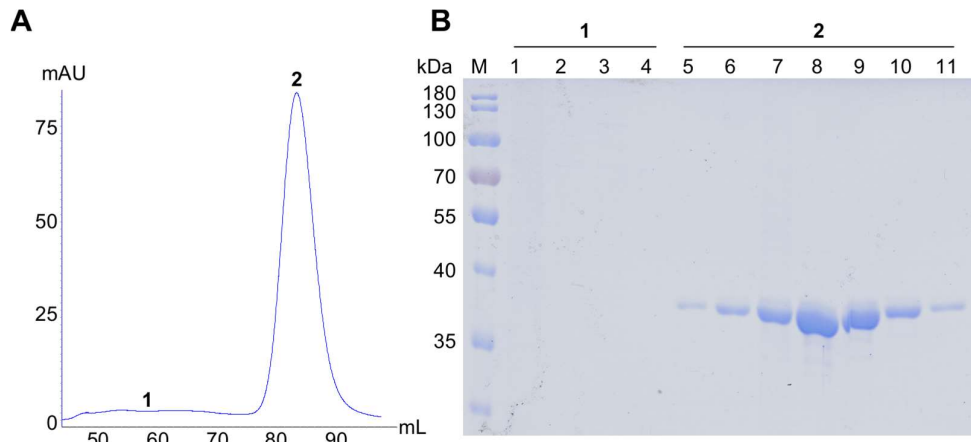


Abbildung A8: Größenausschlusschromatographie als dritter und letzter Schritt der Proteinreinigung. **A:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie des Kristallisationskonstrukts EGFR-T790M/V948R (pMK33). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. **B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Größenausschlusschromatographie. 1-4: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks 1. 5-11: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks 2. Das Zielprotein ist durch deutliche Banden auf der Höhe von 37 kDa erkennbar.

7.6. Proteinreinigung von EGFR-D770_N771insNPG (pJN06)

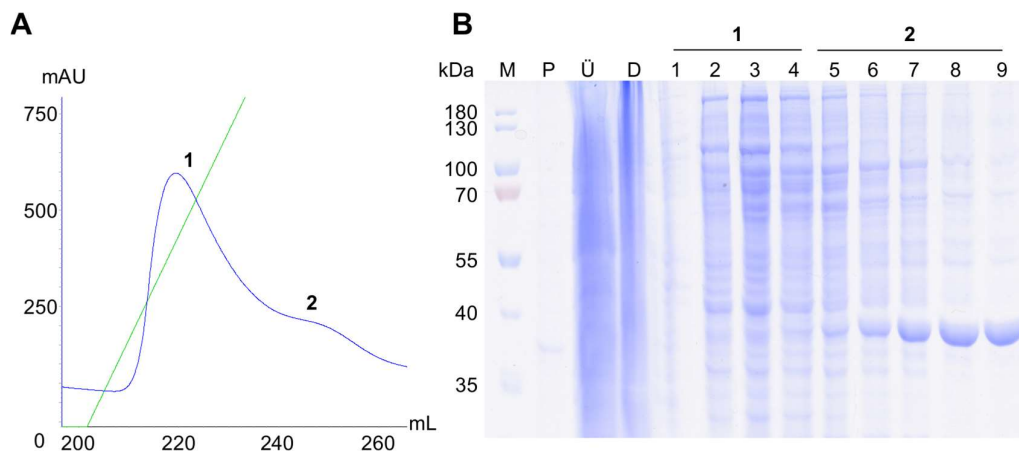


Abbildung A9: Nickel-Affinitätschromatographie als erster Schritt der Proteinreinigung. **A:** Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie des Kristallisationskonstrukts EGFR-D770_N771insNPG (pJN06). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Grün: linearer Elutionsgradient mit 250 mM Imidazol bei 100 %. **B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie. P: Pellet nach erfolgreicher Zellyse. Ü: Überstand nach erfolgreicher Zellyse. D: Durchfluss der Affinitätssäule. 1-4: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks 1. 5-9: verschiedene Fraktionen der Elutionsschulter 2. Das Zielprotein ist durch deutliche Banden auf der Höhe von 40 kDa erkennbar.

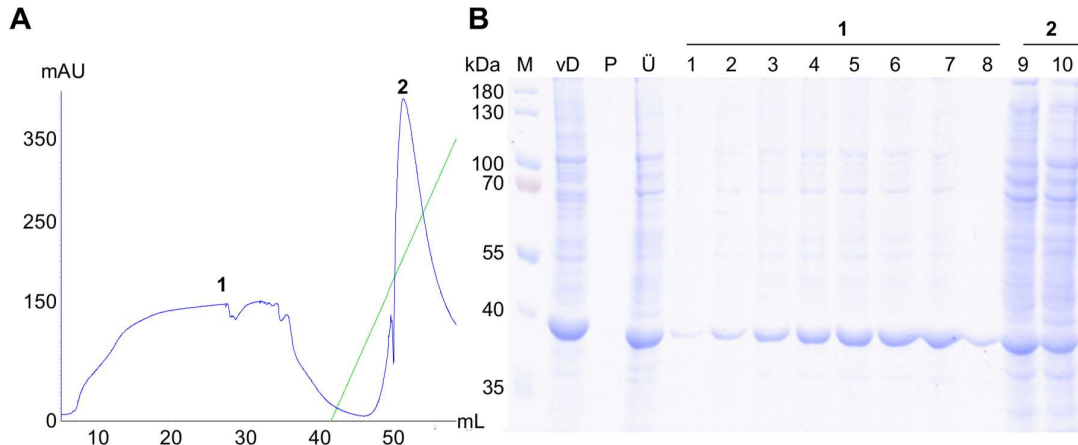


Abbildung A10: Nickel-Affinitätschromatographie als zweiter Schritt der Proteinreinigung. **A:** Chromatogramm der Nickel-Affinitätschromatographie des Kristallisationskonstrukts EGFR-D770_N771insNPG (pJN06). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. Grün: linearer Elutionsgradient mit 250 mM Imidazol bei 100 %. **B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Nickel-Affinitätschromatographie. vD: Protein vor der Dialyse. P: Pellet nach Dialyse. Ü: Überstand nach Dialyse. 1-8: verschiedene Fraktionen des Durchflusses 1; 9-10: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks 2. Das Zielprotein ist durch deutliche Banden auf der Höhe von 38 kDa erkennbar.

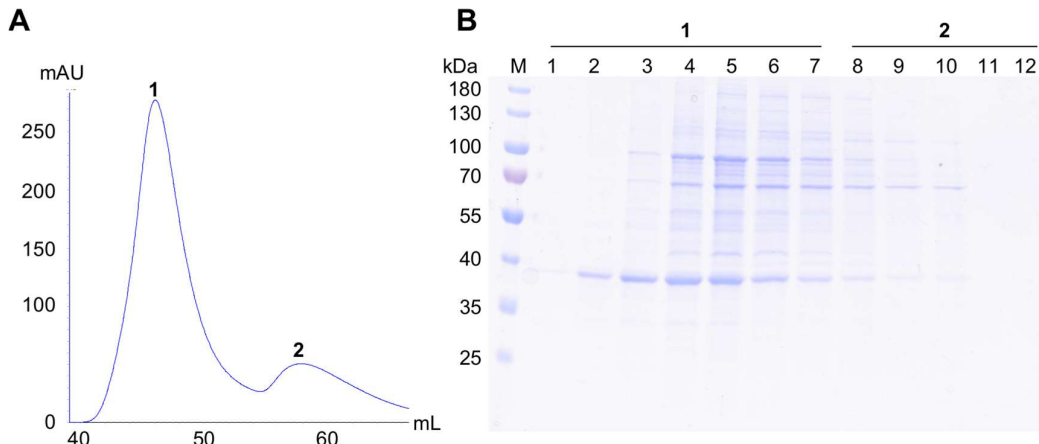


Abbildung A11: Größenausschlusschromatographie als dritter und letzter Schritt der Proteinreinigung. **A:** Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie des Kristallisationskonstrukts EGFR-D770_N771insNPG (pJN06). Blau: UV-Absorption bei 280 nm. **B:** Coomassie-gefärbte SDS-PAGE einzelner Fraktionen der Größenausschlusschromatographie. 1-7: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks 1. 8-12: verschiedene Fraktionen des Elutionspeaks 2. Das Zielprotein ist durch deutliche Banden auf der Höhe von 38 kDa erkennbar.

7.7. Sequenzen Her2-Kristallisationskonstrukte

pCB05	MGSGAAPNQALLRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLENTS	60
pCB06	MGSGAAPNQALLRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLENTS	60
pCB05	PKANKEILDEAYVMA----GVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGR	116
pCB06	PKANKEILDEAYVMA YVMA GVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRRGR	120
pCB05	LGSQDLLNWCMQIAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETE	176
pCB06	LGSQDLLNWCMQIAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDIDETE	180
pCB05	YHADGGKVPKWMMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLE	236
pCB06	YHADGGKVPKWMMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLE	240
pCB05	KGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSFESRMARDPQRFVVIQNE DLGP	296
pCB06	KGERLPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSFESRMARDPQRFVVIQNE DLGP	300
pCB05	ASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAAEYLVPQQGAAAS HHHHHH	339
pCB06	ASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAAEYLVPQQGAAAS HHHHHH	343

Abbildung A12: Sequenzalignment der Her2-Kristallisationskonstrukte pCB05 (Her2-WT) und pCB06. Die Aminosäuren des His₆-Tags sind grün markiert und die der eingebrachten Insertionsmutationen lila.

7.8. Proteinreinigungsparameter der Her2-Kristallisationskonstrukte

Tabelle A4: Übersicht der relevanten Parameter für die Proteinreinigung der Her2-Kristallisationskonstrukte.

Bezeichnung	Länge [AS]	Molekulargewicht [Da]	pI	Extinktionskoeffizient bei 280 nm [M ⁻¹ cm ⁻¹]
pCB05 (Her2-WT)	339	38236,1	6,02	49390
pCB06 (Her2-A775_G766insYVMA)	343	38700,7	6,02	50880

7.9. Vergleich der Pufferzusammensetzung der Proteinreinigung der Her2-Konstrukte

Tabelle A5: Vergleich der Pufferzusammensetzung der alten Reinigungsstrategie und der Reinigungsstrategie nach AERTGEERTS *et al.* sowie des optimierten Reinigungsprotokolls.

Reinigungsschritt	Pufferzusammensetzung Alt	Pufferzusammensetzung AERTGEERTS et al.	Pufferzusammensetzung des optimierten Reinigungsprotokolls
Zellyse	Kein extra Puffer vorhanden. Es wurde der Ni-AC-Puffer genutzt.	200 mM NaCl 50 mM Tris, 20 mM Imidazol 0,25 mM TCEP, pH 7,5 bei 4 °C	200 mM NaCl 50 mM Tris, 20 mM Imidazol, 0,25 mM TCEP, pH 7,5 bei 4 °C
Nickel-Affinitätschromatographie	500 mM NaCl, 50 mM Tris, 10 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7,9 bei 4 °C	500 mM NaCl, 25 mM Tris, 20 mM Imidazol, 2 % (v/v) Glycerol, pH 7,9 bei 4 °C	500 mM NaCl, 25 mM Tris, 20 mM Imidazol, 2 % (v/v) Glycerol, 1 mM TECP, pH 7,9 bei 4 °C
	Elution: 500 mM NaCl, 50 mM Tris, 500 mM Imidazol, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7,9 bei 4 °C	Elution: 200 mM NaCl, 200 mM Imidazol	Elution: 200 mM NaCl, 25 mM Tris, 200 mM Imidazol, 2 % (v/v) Glycerol, 1 mM TECP, pH 7,9 bei 4 °C
Dialyse	75 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7,9 bei 4 °C		
Anionenaustauschchromatographie	75 mM NaCl, 20 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7,9 bei 4 °C		
	Elution: 1 M NaCl, 20 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7,9 bei 4 °C		
Größenausschlusschromatographie	300 mM NaCl, 30 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerol, 1 mM DTT, pH 7,9 bei 4 °C	150 mM NaCl, 25 mM Tris, 2 % (v/v) Glycerol, pH 7,9 bei 4 °C	

Reinigungsschritt	Pufferzusammensetzung Alt	Pufferzusammensetzung AERTGEERTS et al.	Pufferzusammensetzung des optimierten Reinigungsprotokolls
Finale Größenausschluss- chromatographie		75 mM NaCl, 20 mM Tris, 2 % (v/v) Glycerol 2 mM DTT, 2 mM Benzamidin, pH 7,9 bei 4 °C	500 mM NaCl, 25 mM Tris, 2 % (v/v) Glycerol, 1 mM TECP, pH 7,9 bei 4 °C

7.10. Datenstatistiken der komplexen EGFR-Kristallstrukturen

7.10.1. EGFR-T790M/V948R-Kristallstrukturen im Komplex mit Osimertinib und EAI045, Mavelertinib und EAI001 und Spebrutinib und EAI001

Tabelle A6: Datenstatistiken der EGFR-T790/V948R-Kristallstrukturen, die im Komplex mit Osimertinib und EAI045, Mavelertinib und EAI001 und Spebrutinib und EAI001 erhalten werden konnten. Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit Osimertinib und EAI045	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit Mavelertinib und EAI001	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit Spebrutinib und EAI001
	PDB-ID: 6Z4B	PDB-ID: 6Z4D	PDB-ID: 7A2A
Datensammlung			
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)
Zelldimensionen			
a, b, c (Å)	76,20, 79,70, 89,20	76,61, 83,90, 89,27	75,18, 83,73, 92,34
α , β , γ [°]	90,00, 90,00, 90,00	90,00, 90,00, 90,00	90,00, 90,00, 90,00
Auflösung (Å)	44,60-2,50 (2,60-2,50)	47,79-2,00 (2,10-2,00)	47,84-1,90 (2,00-1,90)
R _{meas} (%)	10,9 (108,5)	9,1 (164,8)	6,3 (169,8)
I/ σ	11,15 (1,92)	16,12 (1,80)	21,34 (2,09)
CC _{1/2}	99,8 (69,5)	99,9 (78,0)	99,9 (74,6)
Vollständigkeit (%)	100,0 (99,9)	100,0 (100,0)	100,0 (100,0)
Redundanz	6.57 (6.49)	13.44 (13.75)	13.27 (14.16)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	44,60-2,50 (2,60-2,50)	47,79-2,00 (2,10-2,00)	47,84-1,90 (2,00-1,90)
Anzahl der Reflexe	19371	39566	46627
R _{work} /R _{free}	22,07/25,13 (30,57/31,45)	19,31 22,14 (31,38/37,50)	19,43/21,71 (30,45/30,27)
Anzahl der Atome			
Protein	4122 (Kette A = 2093; Kette B = 2029)	4216 (Kette A = 2127; Kette B = 2089)	4136 (Kette A = 2055; Kette B = 2081)
Kovalenter Ligand	74 (Kette A = 37;	60 (Kette A = 30;	62 (Kette A = 31;

	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit Osimertinib und EAI045	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit Mavelertinib und EAI001	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit Spebrutinib und EAI001
	PDB-ID: 6Z4B	PDB-ID: 6Z4D	PDB-ID: 7A2A
	Kette B = 37)	Kette B = 30)	Kette B = 31)
Allosterischer Ligand	54 (Kette A = 27; Kette B = 27)	25 (Kette B = 25)	50 (Kette A = 25; Kette B = 25)
Ionen	50	25	20
Wasser	25	174	116
B-Faktoren			
Protein	59,09 (Kette A = 55,12; Kette B = 63,05)	52,12 (Kette A = 48,82; Kette B = 55,41)	57,98 (Kette A = 53,39; Kette B = 62,57)
Kovalenter Ligand	51,07 (Kette A = 47,29; Kette B = 54,85)	43,56 (Kette A = 46,09; Kette B = 41,03)	53,78 (Kette A = 55,38; Kette B = 52,18)
Allosterischer Ligand	52,15 (Kette A = 49,46; Kette B = 54,84)	50,91 (Kette B = 50,91)	46,54 (Kette A = 48,53; Kette B = 44,54)
Ionen	105,96	98,74	85,42
Wasser	51,14	51,77	55,16
Standardabweichungen			
Bindungslänge (Å)	0,004	0,003	0,006
Bindungswinkel (°)	0,806	0,609	0,855

7.10.2. EGFR-T790M/C797S-Kristallstrukturen im Komplex mit den Verbindungen 3g und 3h

Tabelle A7: Datenstatistiken der EGFR-T790/C797S-Kristallstrukturen, die im Komplex mit den Verbindungen **3g** und **3h** erhalten werden konnten. Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	EGFR-T790M/C797S in Komplex mit Verbindung 3g	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit Verbindung 3h
	PDB-ID: 6S89	PDB-ID: 6S8A
Datensammlung		
Raumgruppe	I 2 3 (197)	I 2 3 (197)
Zelldimensionen		
a, b, c (Å)	143,8, 143,8, 143,8	142,0 142,0 142,0
α , β , γ [°]	90,00, 90,00, 90,00	90,00, 90,00, 90,00
Auflösung (Å)	41,52-2,70 (2,80-2,70)	44,90-2,60 (2,70-2,60)
R _{meas} (%)	11,9 (208,9)	7,9 (180,2)
I/ σ I	14,64 (1,17)	25,86 (2,04)
CC _{1/2}	99,9 (47,5)	100,0 (73,8)
Vollständigkeit (%)	100,0 (99,9)	100,0 (100,0)
Redundanz	10,01 (9,59)	19,95 (21,13)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	41,52-2,70 (2,80-2,70)	44,90-2,60 (2,70-2,60)
Anzahl der Reflexe	13756	14819
R _{work} /R _{free}	18,82/23,37 (35,06/41,38)	18,55/20,74 (31,47/40,90)
Anzahl der Atome		
Protein	2395	2425
Ligand/Ionen	49	50
Wasser	0	2
B-Faktoren		
Protein	79,32	83,45
Ligand/Ionen	97,64	115,64

	EGFR-T790M/C797S in Komplex mit Verbindung 3g	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit Verbindung 3h
	PDB-ID: 6S89	PDB-ID: 6S8A
Wasser	0	81,73
Standardabweichungen		
Bindungslänge (Å)	0,007	0,004
Bindungswinkel (°)	0,989	0,745

7.10.3. EGFR-T790M/V948R-Kristallstrukturen im Komplex mit Poziotinib und TAK-788 und die EGFR-WT-Kristallstruktur im Komplex mit TAK-788

Tabelle A8: Datenstatistiken der EGFR-T790/V948R-Kristallstrukturen, die im Komplex mit Poziotinib und TAK-788 erhalten werden konnten, sowie der EGFR-WT-Kristallstruktur in Komplex mit TAK-788. Die Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit Poziotinib	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit TAK-788	EGFR-WT in Komplex TAK-788
	PDB-ID: 7A6J	PDB-ID: 7A6K	PDB-ID: 7B85
Datensammlung			
Raumgruppe	P 2(1) 2(1) 2(1) (19)	P 1 2(1) 1 (4)	I 2 3 (197)
Zelldimensionen			
a, b, c (Å)	76,33, 81,76, 89,85	74,95, 82,01, 89,68	144,28, 144,28, 144,28
α , β , γ [°]	90,00, 90,00, 90,00	90,00, 91,00, 90,00	90,00, 90,00, 90,00
Auflösung (Å)	44,93-2,10 (2,20-2,10)	47,49-2,00 (2,10-2,00)	46,63-2,50 (2,60-2,50)
R _{meas} (%)	8,1 (85,8)	7,8 (96,1)	9,6 (163,6)
I/ σ	21,22 (3,10)	13,50 (2,20)	14,93 (2,01)
CC _{1/2}	99,9 (91,8)	99,9 (75,1)	99,8 (63,5)
Vollständigkeit (%)	99,8 (100,0)	99,9 (100,0)	100,0 (99,9)
Redundanz	13,15 (13,86)	6,81 (6,94)	10,34 (10,35)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	44,93-2,10 (2,20-2,10)	47,49-2,00 (2,10-2,00)	46,63-2,50 (2,60-2,50)
Anzahl der Reflexe	33404	74112	17435
R _{work} /R _{free}	18,14/21,81 (22,90/33,11)	19,19/22,02 (30,74/31,35)	21,47/24,40 (30,68/32,63)
Anzahl der Atome			
Protein	4214 (Kette A = 2116; Kette B = 2098)	8114 (Kette A = 2086; Kette B = 2026; Kette C = 2030; Kette D = 1972)	2415
Ligand	66 (Kette A = 35; Kette B = 31)	172 (Kette A = 43; Kette B = 43;	43

	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit Poziotinib	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit TAK-788	EGFR-WT in Komplex TAK-788
	PDB-ID: 7A6J	PDB-ID: 7A6K	PDB-ID: 7B85
		Kette C = 43; Kette D = 43)	
Ionen	20	35	0
Ligand 2 (EDO)	40	0	12
Wasser	120	137	6
B-Faktoren			
Protein	48,23 (Kette A = 45,22; Kette B = 51,24)	51,82 (Kette A = 49,19; Kette B = 50,08; Kette C = 50,19; Kette D = 57,81)	82,61
Ligand	39,85 (Kette A = 39,85; Kette B = 39,84)	43,40 (Kette A = 44,27; Kette B = 40,75; Kette C = 40,69; Kette D = 47,88)	83,76
Ionen	64,29	71,23	0
Ligand 2 (EDO)	68,46	0	117,84
Wasser	47,35	46,65	86,24
Standardabweichungen			
Bindungslänge (Å)	0,007	0,002	0,002
Bindungswinkel (°)	0,843	0,532	0,485

7.10.4. EGFR-T790M/V948R-Kristallstrukturen im Komplex mit den Verbindungen 5d, 6b, 6c, 6d, 7, 9a und 9b

Tabelle A9: Datenstatistiken der EGFR-T790/V948R-Kristallstrukturen, die im Komplex mit den Verbindungen **5d**, **6b** und **6c** erhalten werden konnten. Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 5d	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 6b	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 6c
	PDB-ID: 6TFU	PDB-ID: 6TFV	PDB-ID: 6TFY
Datensammlung			
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)
Zelldimensionen			
a, b, c (Å)	76,4, 81,2, 89,9	76,4, 82,6, 89,9	76,2, 82,8, 89,9
α , β , γ [°]	90,00, 90,00, 90,00	90,00, 90,00, 90,00	90,00, 90,00, 90,00
Auflösung (Å)	49,96-2,00 (2,10-2,00)	47,59-1,50 (1,60-1,50)	47,58-1,70 (1,80-1,70)
R _{meas} (%)	6,8 (117,1)	6,0 (72,5)	5,4 (111,1)
I/ σ	19,70 (2,82)	15,91 (2,43)	15,99 (1,49)
CC _{1/2}	99,9 (88,1)	99,9 (84,3)	99,9 (72,8)
Vollständigkeit (%)	100,0 (100,0)	100,0 (100,0)	99,9 (100,0)
Redundanz	12,71 (13,49)	6,60 (6,66)	6,63 (6,70)
Verfeinerung			
Auflösung (Å)	49,96-2,00 (2,10-2,00)	47,59-1,50 (1,60-1,50)	47,58-1,70 (1,80-1,70)
Anzahl der Reflexe	38499	91517	63146
R _{work} /R _{free}	19,77/23,09 (29,37/33,39)	18,27/20,28 (25,97/28,41)	19,23/21,19 (36,00/40,31)
Anzahl der Atome			
Protein	4036 (Kette A = 2040; Kette B = 1996)	4285 (Kette A = 2162; Kette B = 2123)	4235 (Kette A = 2125; Kette B = 2110)
Ligand	94	113	88
Ionen	20	33	25
Wasser	69	251	210

	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 5d	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 6b	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 6c
	PDB-ID: 6TFU	PDB-ID: 6TFV	PDB-ID: 6TFY
B-Faktoren			
Protein	56,1 (Kette A = 54,34; Kette B = 57,86)	28,45 (Kette A = 25,50; Kette B = 31,39)	42,19 (Kette A = 38,84; Kette B = 45,54)
Ligand	48,80 (Kette A = 46,71; Kette B = 50,90)	21,94 (Kette A = 19,85; Kette B = 24,03)	34,06 (Kette A = 32,97; Kette B = 35,15)
Ionen	83,80	31,85	68,34
Wasser	56,56	34,42	45,30
Standardabweichungen			
Bindungslänge (Å)	0,005	0,011	0,006
Bindungswinkel (°)	0,720	1,235	0,952

Tabelle A10: Datenstatistiken der EGFR-T790/V948R-Kristallstrukturen, die im Komplex mit den Verbindungen **6d** und **7** erhalten werden konnten. Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 6d	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 7
	PDB-ID: 6TFW	PDB-ID: 6TFZ
Datensammlung		
Raumgruppe	P 2(1) 2(1) 2(1) (19)	P 2(1) 2(1) 2(1) (19)
Zelldimensionen		
a, b, c (Å)	76,1, 81,2, 90,3	76,6, 82,5, 90,3
α , β , γ [°]	90,00, 90,00, 90,00	90,00, 90,00, 90,00
Auflösung (Å)	47,30-2,00 (2,10-2,00)	45,10-1,80 (1,90-1,80)
R _{meas} (%)	5,5 (133,5)	7,3 (105,5)
I/ σ	17,84 (1,63)	20,25 (2,51)
CC _{1/2}	100,0 (73,4)	100,0 (85,0)
Vollständigkeit (%)	99,9 (100,0)	99,0 (98,3)
Redundanz	6,48 (6,83)	13,29 (14,02)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	47,30-2,00 (2,10-2,00)	45,10-1,80 (1,90-1,80)
Anzahl der Reflexe	38452	53043
R _{work} /R _{free}	22,29/24,47 (35,06/40,16)	17,41/20,65 (25,17/29,49)
Anzahl der Atome		
Protein	4097 (Kette A = 2065; Kette B = 2032)	4238 (Kette A = 2124; Kette B = 2114)
Ligand	84	98
Ionen	29	39
Wasser	55	218
B-Faktoren		
Protein	58,46 (Kette A = 55,27; Kette B = 62,64)	34,47 (Kette A = 31,63; Kette B = 37,31)

	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 6d	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 7
	PDB-ID: 6TFW	PDB-ID: 6TFZ
Ligand	55,45 (Kette A = 52,09; Kette B = 58,80)	26,96 (Kette A = 29,62; Kette B = 24,29)
Ionen	81,05	55,30
Wasser	59,01	40,47
Standardabweichungen		
Bindungslänge (Å)	0,002	0,012
Bindungswinkel (°)	0,563	1,171

Tabelle A11: Datenstatistiken der EGFR-T790/V948R-Kristallstrukturen, die im Komplex mit den Verbindungen **9a** und **9b** erhalten werden konnten. Werte in Klammern beziehen sich auf die höchste Auflösungs-Schale.

	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 9a	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 9b
	PDB-ID: 6TG0	PDB-ID: 6TG1
Datensammlung		
Raumgruppe	P 2(1) 2(1) 2(1) (19)	P 2(1) 2(1) 2(1) (19)
Zelldimensionen		
a, b, c (Å)	76,8, 82,0, 90,2	78,0, 82,8, 91,6
α , β , γ [°]	90,00, 90,00, 90,00	90,00, 90,00, 90,00
Auflösung (Å)	47,61-1,50 (1,60-1,50)	48,26-1,60 (1,70-1,60)
R _{meas} (%)	7,3 (84,1)	5,2 (110,4)
I/ σ I	14,66 (2,00)	16,22 (1,42)
CC _{1/2}	99,9 (75,7)	100,0 (69,0)
Vollständigkeit (%)	100,0 (100,0)	99,7 (99,4)
Redundanz	6,60 (6,44)	6,61 (6,55)
Verfeinerung		
Auflösung (Å)	47,61-1,50 (1,60-1,50)	48,26-1,60 (1,70-1,60)
Anzahl der Reflexe	91647	78626
R _{work} /R _{free}	17,37/18,75 (23,70/27,42)	18,15/19,72 (32,19/37,95)
Anzahl der Atome		
Protein	4307 (Kette A = 2124; Kette B = 2183)	4217 (Kette A = 2108; Kette B = 2109)
Ligand	86	90
Ionen	32	44
Wasser	349	225
B-Faktoren		
Protein	23,87 (Kette A = 22,19; Kette B = 25,56)	39,60 (Kette A = 38,05; Kette B = 41,15)

	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 9a	EGFR-T790M/V948R in Komplex mit der Verbindung 9b
	PDB-ID: 6TG0	PDB-ID: 6TG1
Ligand	18,27 (Kette A = 18,91; Kette B = 17,63)	33,32 (Kette A = 34,31; Kette B = 32,33)
Ionen	27,21	55,75
Wasser	33,24	46,21
Standardabweichungen		
Bindungslänge (Å)	0,010	0,008
Bindungswinkel (°)	1,184	1,040

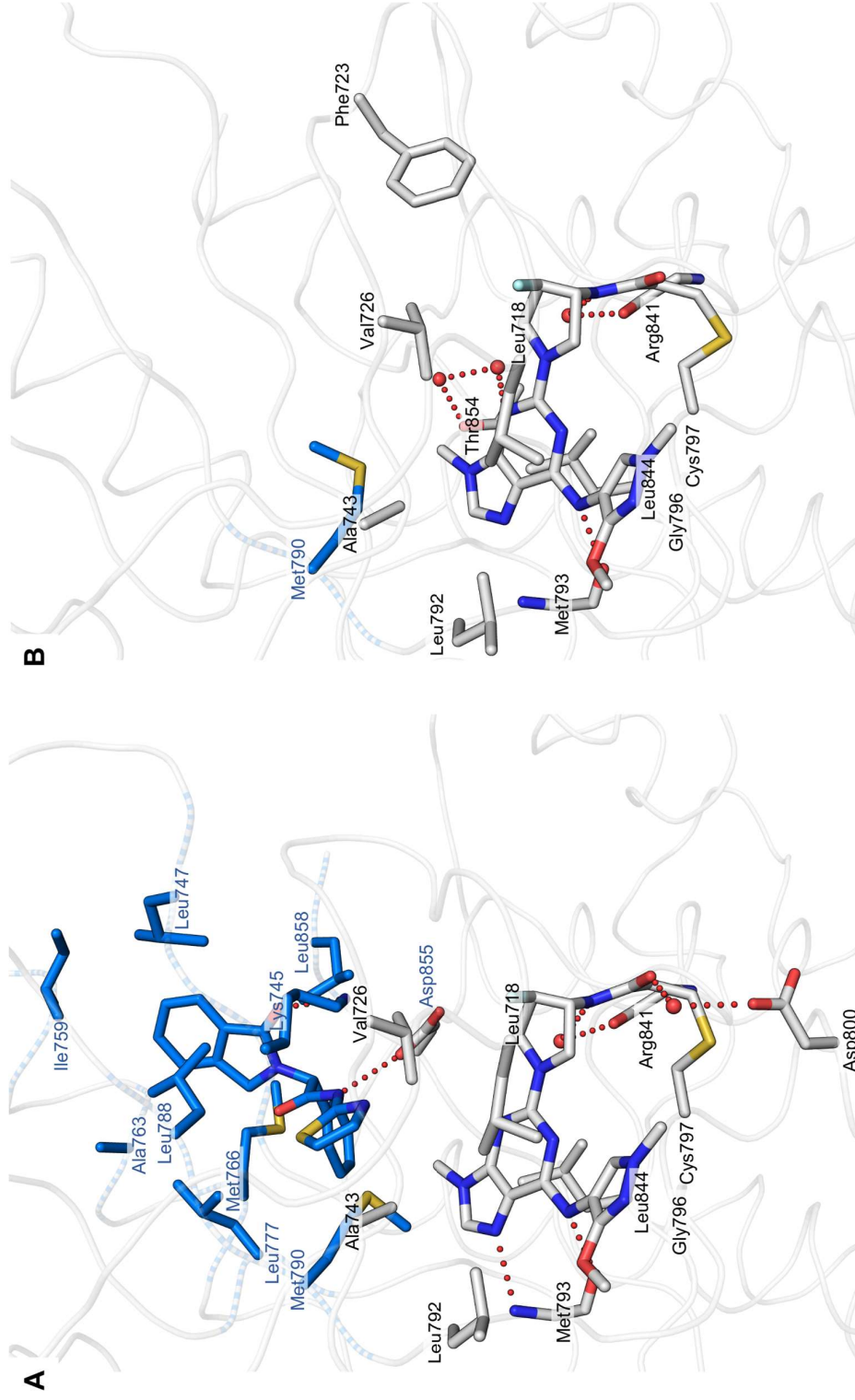


Abbildung A 14: Detaillierter Überblick der komplexen Kristallstruktur von Mavelertinib und EAI001 simultan gebunden in EGFR-T790M/V948R. **A:** Detaillierte Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (rot) von Mavelertinib (blau) und EAI001 (grau) simultan gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6Z4D) in einer der beiden Proteinketten der Struktur. **B:** Detaillierte Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (rot) von Mavelertinib (grau) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6Z4D) in der anderen Proteinkette der Struktur.

Detaillierte Darstellungen der Interaktionen zwischen den Inhibitoren und den EGFR-Mutanten

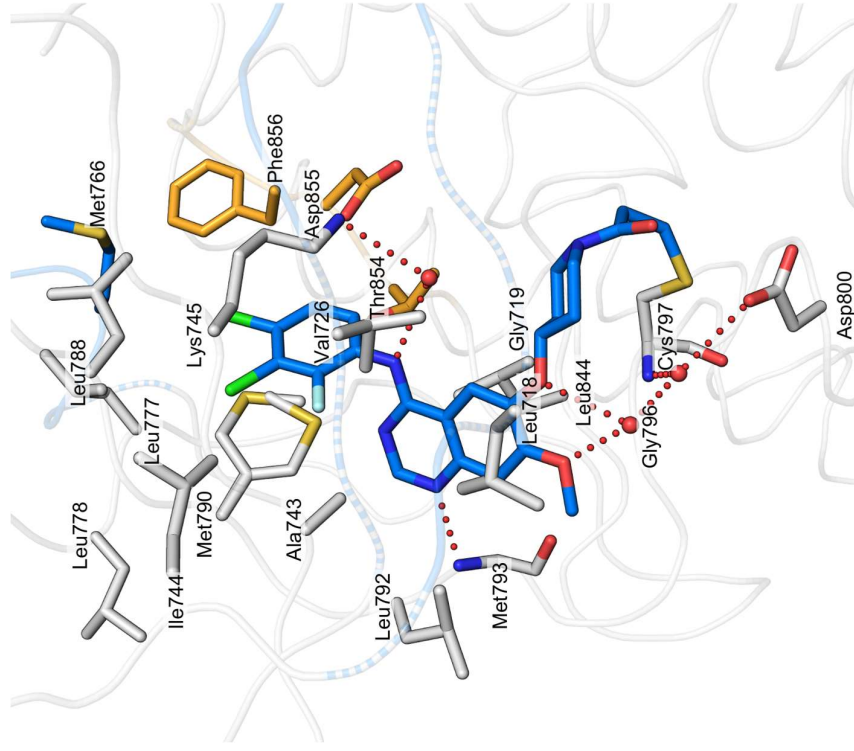


Abbildung A15: Detaillierte Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (rot) von Poziotinib (blau) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 7A6J).

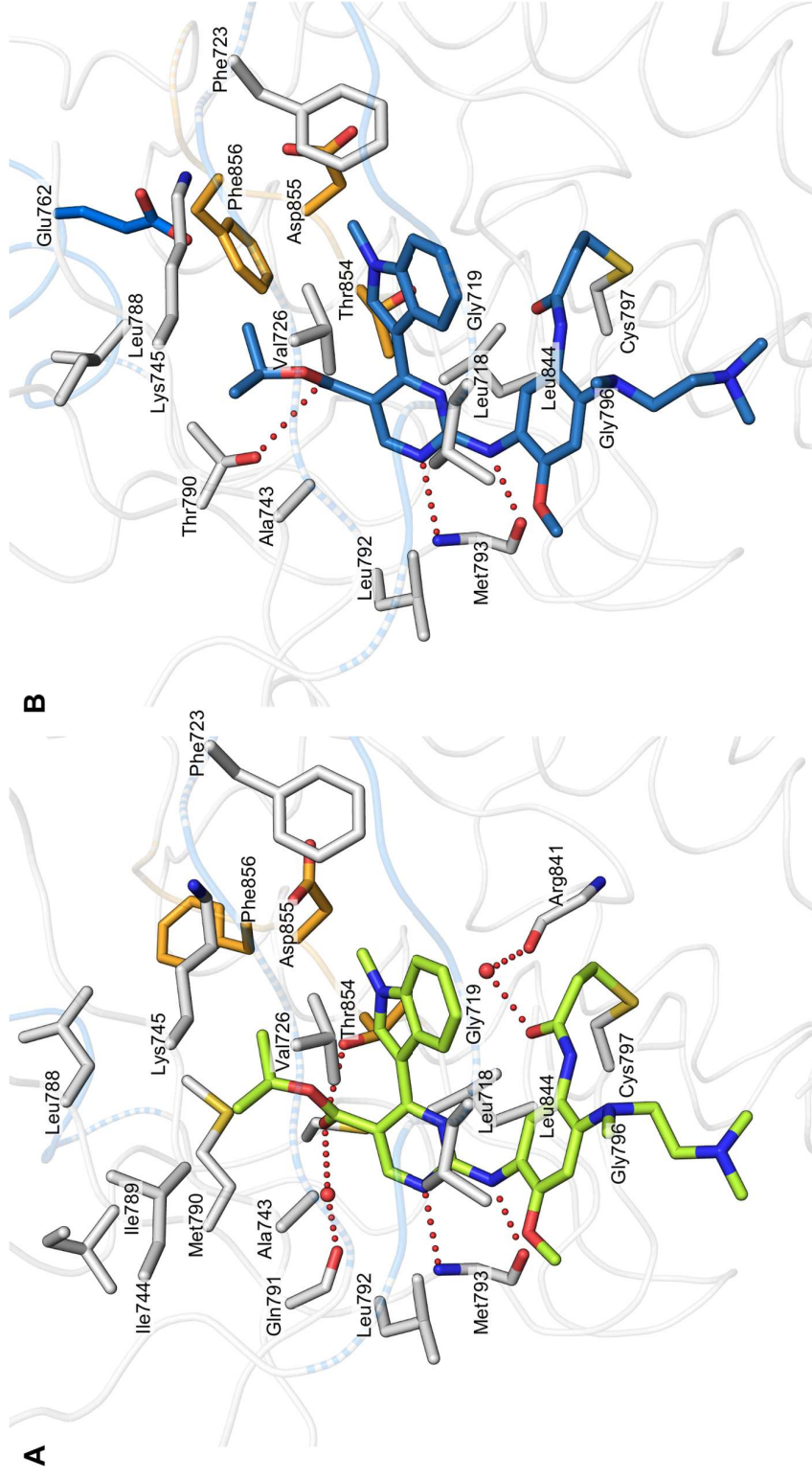


Abbildung A16: Detaillierter Überblick der komplexen Kristallstrukturen von TAK-788 gebunden in EGFR-T790M/V948R und EGFR-WT. **A:** Detaillierte Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (rot) von TAK-788 (grün) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 7A6K). **B:** Detaillierte Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (rot) von TAK-788 (blau) gebunden in EGFR-WT (PDB-ID: 7B85).

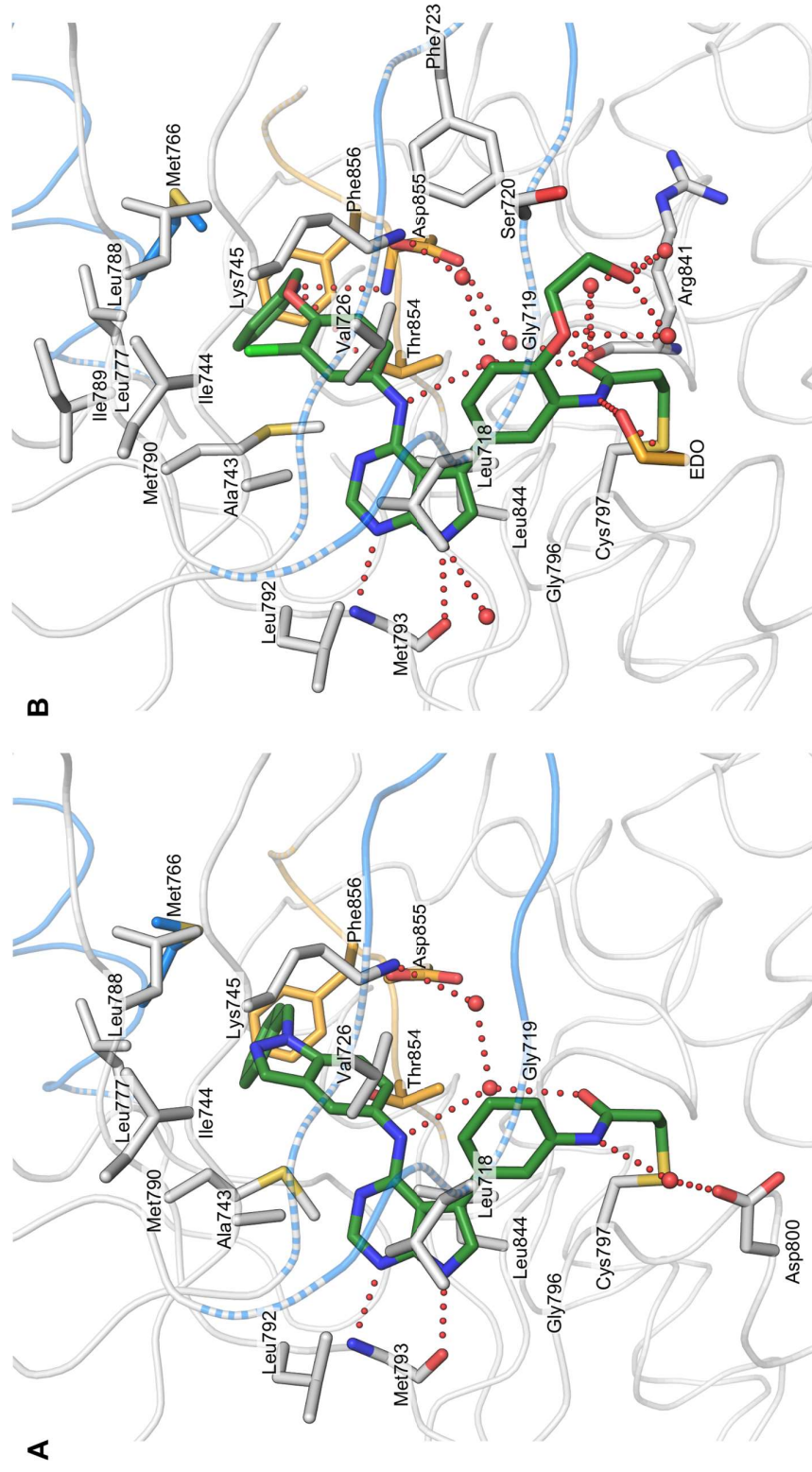


Abbildung A17: Detaillierter Überblick der komplexen Kristallstrukturen von Verbindung **5d** und **6b** gebunden in EGFR-T790M/V948R. **A:** Detaillierte Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (rot) von Verbindung **5d** (grün) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6TFU). **B:** Detaillierte Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (rot) von Verbindung **6b** (grün) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6TFV).

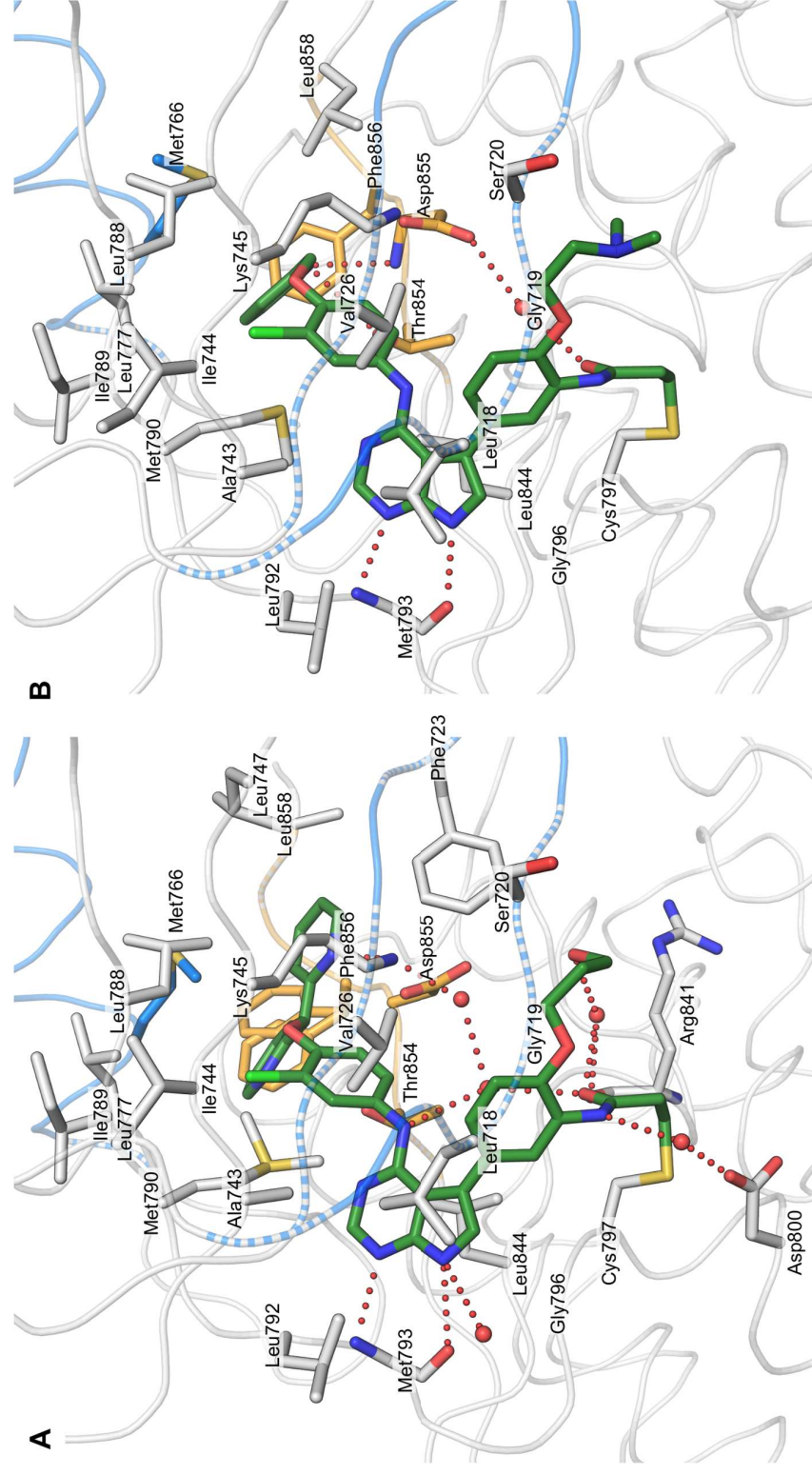


Abbildung A18: Detaillierter Überblick der komplexen Kristallstrukturen von Verbindung **6c** und **6d** gebunden in EGFR-T790M/V948R. **A:** Detaillierte Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (rot) von Verbindung **6c** (grün) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6TFY). **B:** Detaillierte Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (rot) von Verbindung **6d** (grün) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6TFW).

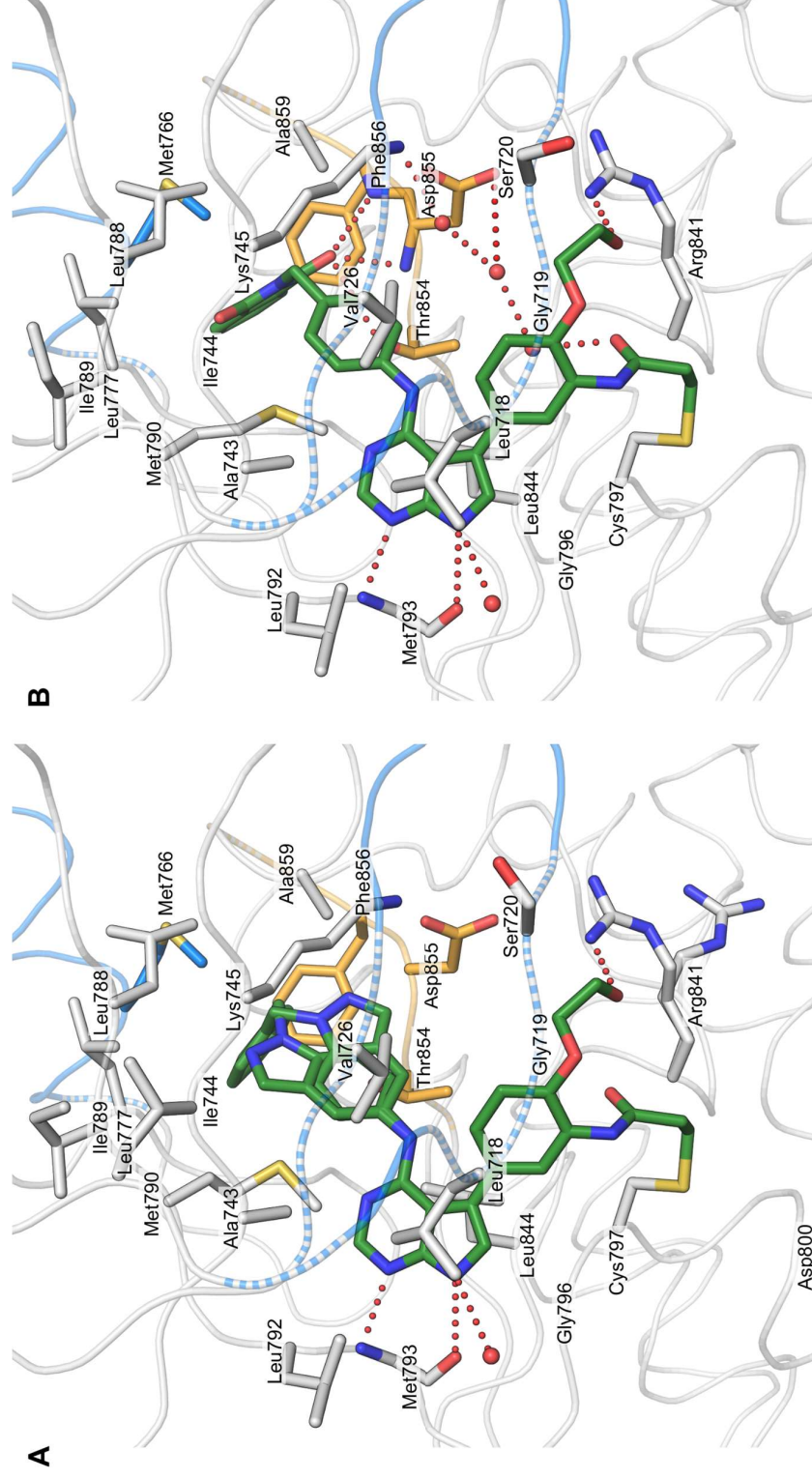


Abbildung A19: Detaillierter Überblick der komplexen Kristallstrukturen von Verbindung **7** und **9a** gebunden in EGFR-T790M/V948R. **A:** Detaillierte Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (rot) von Verbindung **7** (grün) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6TFZ). **B:** Detaillierte Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (rot) von Verbindung **9a** (grün) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6TG0).

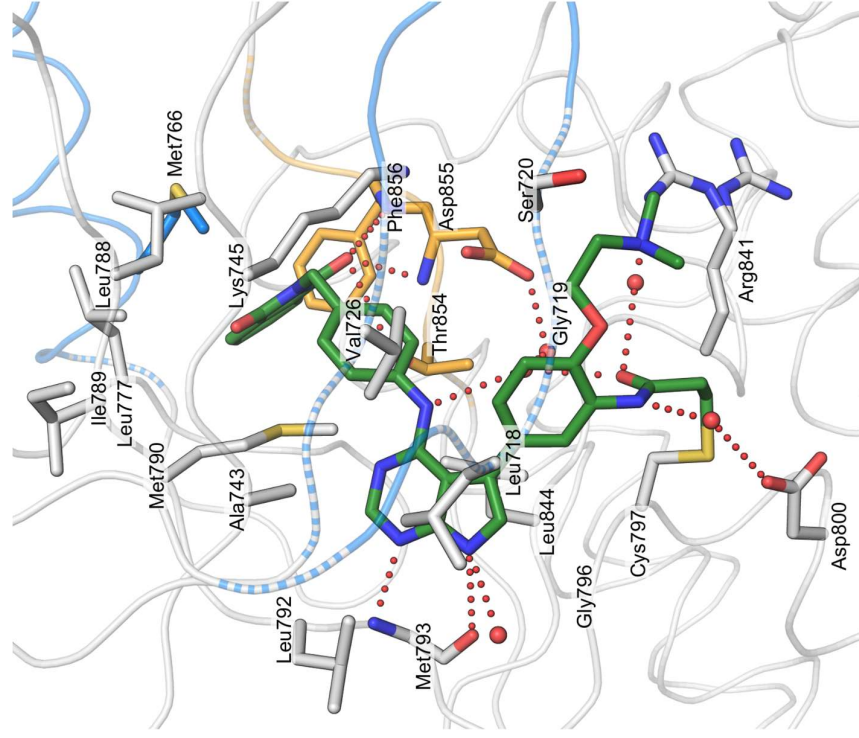


Abbildung A20: Detaillierte Interaktionen sowie Wasserstoffbrückenbindungen (rot) von Verbindung **9b** (grün) gebunden in EGFR-T790M/V948R (PDB-ID: 6TG1).

8. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, A. Jemal. Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *Ca: Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 394-424.
- [2] J. R. Molina, P. Yang, S. D. Cassivi, S. E. Schild, A. A. Adjei. Non-Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship. *Mayo Clin. Proc.* **2008**, *83*, 584-594.
- [3] A. Thomas, S. V. Liu, D. S. Subramaniam, G. Giaccone. Refining the Treatment of NSCLC According to Histological and Molecular Subtypes. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2015**, *12*, 511-526.
- [4] S. O. Dolly, D. C. Collins, R. Sundar, S. Popat, T. A. Yap. Advances in the Development of Molecularly Targeted Agents in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Drugs* **2017**, *77*, 813-827.
- [5] S. V. Sharma, D. W. Bell, J. Settleman, D. A. Haber. Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 169-181.
- [6] J. Mendelsohn, J. Baselga. The EGF Receptor Family as Targets for Cancer Therapy. *Oncogene* **2000**, *19*, 6550-6565.
- [7] N. Jura, N. F. Endres, K. Engel, S. Deindl, R. Das, M. H. Lamers, D. E. Wemmer, X. Zhang, J. Kuriyan. Mechanism for Activation of the EGF Receptor Catalytic Domain by the Juxtamembrane segment. *Cell* **2009**, *137*, 1293-1307.
- [8] M. A. Lemmon. Ligand-Induced ErbB Receptor Dimerization. *Exp. Cell. Res.* **2009**, *315*, 638-648.
- [9] I. Chung, R. Akita, R. Vandlen, D. Toomre, J. Schlessinger, I. Mellman. Spatial Control of EGF Receptor Activation by Reversible Dimerization on Living Cells. *Nature* **2010**, *464*, 783-787.
- [10] X. Zhang, J. Gureasko, K. Shen, P. A. Cole, J. Kuriyan. An Allosteric Mechanism for Activation of the Kinase Domain of Epidermal Growth Factor Receptor. *Cell* **2006**, *125*, 1137-1149.
- [11] M. Rabiller, M. Getlik, S. Klüter, A. Richters, S. Tuckmantel, J. R. Simard, D. Rauh. Proteus in the World of Proteins: Conformational Changes in Protein Kinases. *Arch. Pharm.* **2010**, *343*, 193-206.
- [12] J. Lategahn, M. Keul, D. Rauh. Lessons To Be Learned: The Molecular Basis of Kinase-Targeted Therapies and Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2018**, *57*, 2307-2313.
- [13] R. Sordella, D. W. Bell, D. A. Haber, J. Settleman. Gefitinib-Sensitizing EGFR Mutations in Lung Cancer Activate Anti-Apoptotic Pathways. *Science* **2004**, *305*, 1163-1167.
- [14] M. E. Arcila, K. Nafa, J. E. Chaft, N. Rekhtman, C. Lau, B. A. Reva, M. F. Zakowski, M. G. Kris, M. Ladanyi. EGFR Exon 20 Insertion Mutations in

- Lung Adenocarcinomas: Prevalence, Molecular Heterogeneity, and Clinicopathologic Characteristics. *Mol. Cancer Ther.* **2013**, *12*, 220-229.
- [15] C. H. Yun, T. J. Boggon, Y. Li, M. S. Woo, H. Greulich, M. Meyerson, M. J. Eck. Structures of Lung Cancer-Derived EGFR Mutants and Inhibitor Complexes: Mechanism of Activation and Insights into Differential Inhibitor Sensitivity. *Cancer Cell* **2007**, *11*, 217-227.
- [16] C. Leduc, J. P. Merlio, B. Besse, H. Blons, D. Debieuvre, P. P. Bringuier, I. Monnet, I. Rouquette, S. Fraboulet-Moreau, A. Lemoine, D. Pouessel, J. Mosser, F. Vaylet, A. Langlais, P. Missy, F. Morin, D. Moro-Sibilot, J. Cadranel, F. Barlesi, M. Beau-Faller, French Cooperative Thoracic Intergroup. Clinical and Molecular Characteristics of Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Harboring EGFR Mutation: Results of the Nationwide French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT) Program. *Ann. Oncol.* **2017**, *28*, 2715-2724.
- [17] A. J. Barker, K. H. Gibson, W. Grundy, A. A. Godfrey, J. J. Barlow, M. P. Healy, J. R. Woodburn, S. E. Ashton, B. J. Curry, L. Scarlett, L. Henthorn, L. Richards. Studies Leading to the Identification of ZD1839 (IRESSA): An Orally Active, Selective Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Targeted to the Treatment of Cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, *11*, 1911-1914.
- [18] A. E. Wakeling, S. P. Guy, J. R. Woodburn, S. E. Ashton, B. J. Curry, A. J. Barker, K. H. Gibson. ZD1839 (Iressa): An Orally Active Inhibitor of Epidermal Growth Factor Signaling with Potential for Cancer Therapy. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 5749-5754.
- [19] J. D. Moyer, E. G. Barbacci, K. K. Iwata, L. Arnold, B. Boman, A. Cunningham, C. DiOrio, J. Doty, M. J. Morin, M. P. Moyer, M. Neveu, V. A. Pollack, L. R. Pustilnik, M. M. Reynolds, D. Sloan, A. Theleman, P. Miller. Induction of Apoptosis and Cell Cycle Arrest by CP-358,774, an Inhibitor of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4838-4848.
- [20] D. Li, L. Ambrogio, T. Shimamura, S. Kubo, M. Takahashi, L. R. Chirieac, R. F. Padera, G. I. Shapiro, A. Baum, F. Himmelsbach, W. J. Rettig, M. Meyerson, F. Solca, H. Greulich, K. K. Wong. BIBW2992, an Irreversible EGFR/HER2 Inhibitor Highly Effective in Preclinical Lung Cancer Models. *Oncogene* **2008**, *27*, 4702-4711.
- [21] R. T. Dunto, G. M. Keating. Afatinib: First Global Approval. *Drugs* **2013**, *73*, 1503-1515.
- [22] A. J. Gonzales, K. E. Hook, I. W. Althaus, P. A. Ellis, E. Trachet, A. M. Delaney, P. J. Harvey, T. A. Ellis, D. M. Amato, J. M. Nelson, D. W. Fry, T. Zhu, C. M. Loi, S. A. Fakhoury, K. M. Schlosser, K. E. Sexton, R. T. Winters, J. E. Reed, A. J. Bridges, D. J. Lettiere, D. A. Baker, J. Yang, H. T. Lee, H. Teclé, P. W. Vincent. Antitumor Activity and Pharmacokinetic Properties of PF-00299804, a Second-Generation Irreversible Pan-ErbB Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 1880-1889.
- [23] J. B. Smaill, A. J. Gonzales, J. A. Spicer, H. Lee, J. E. Reed, K. Sexton, I. W. Althaus, T. Zhu, S. L. Black, A. Blaser, W. A. Denny, P. A. Ellis, S.

-
- Fakhoury, P. J. Harvey, K. Hook, F. O. McCarthy, B. D. Palmer, F. Rivault, K. Schlosser, T. Ellis, A. M. Thompson, E. Trachet, R. T. Winters, H. Tecle, A. Bridges. Tyrosine Kinase Inhibitors. 20. Optimization of Substituted Quinazoline and Pyrido[3,4-d]pyrimidine Derivatives as Orally Active, Irreversible Inhibitors of the Epidermal Growth Factor Receptor Family. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 8103-8124.
- [24] V. A. Miller, V. Hirsh, J. Cadranel, Y. M. Chen, K. Park, S. W. Kim, C. Zhou, W. C. Su, M. Wang, Y. Sun, D. S. Heo, L. Crino, E. H. Tan, T. Y. Chao, M. Shahidi, X. J. Cong, R. M. Lorence, J. C. Yang. Afatinib Versus Placebo for Patients with Advanced, Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer After Failure of Erlotinib, Gefitinib, or Both, and One or Two Lines of Chemotherapy (LUX-Lung 1): A Phase 2b/3 Randomised Trial. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, 528-538.
- [25] N. Katakami, S. Atagi, K. Goto, T. Hida, T. Horai, A. Inoue, Y. Ichinose, K. Koboyashi, K. Takeda, K. Kiura, K. Nishio, Y. Seki, R. Ebisawa, M. Shahidi, N. Yamamoto. LUX-Lung 4: A Phase II Trial of Afatinib in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer Who Progressed During Prior Treatment with Erlotinib, Gefitinib, or Both. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 3335-3341.
- [26] J. Niggenaber, J. Hardick, J. Lategahn, D. Rauh. Structure Defines Function: Clinically Relevant Mutations in ErbB Kinases. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 40-51.
- [27] W. Pao, V. Miller, M. Zakowski, J. Doherty, K. Politi, I. Sarkaria, B. Singh, R. Heelan, V. Rusch, L. Fulton, E. Mardis, D. Kupfer, R. Wilson, M. Kris, H. Varmus. EGF Receptor Gene Mutations Are Common in Lung Cancers from "Never Smokers" and Are Associated with Sensitivity of Tumors to Gefitinib and Erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2004**, *101*, 13306-13311.
- [28] J. G. Paez, P. A. Jänne, J. C. Lee, S. Tracy, H. Greulich, S. Gabriel, P. Herman, F. J. Kaye, N. Lindeman, T. J. Boggon, K. Naoki, H. Sasaki, Y. Fujii, M. J. Eck, W. R. Sellers, B. E. Johnson, M. Meyerson. EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science* **2004**, *304*, 1497-1500.
- [29] C.-H. Yun, K. E. Mengwasser, A. V. Toms, M. S. Woo, H. Greulich, K.-K. Wong, M. Meyerson, M. J. Eck. The T790M Mutation in EGFR Kinase Causes Drug Resistance by Increasing the Affinity for ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2008**, *105*, 2070-2075.
- [30] S. A. Foster, D. M. Whalen, A. Ozen, M. J. Wongchenko, J. Yin, I. Yen, G. Schaefer, J. D. Mayfield, J. Chmielecki, P. J. Stephens, L. A. Albacker, Y. Yan, K. Song, G. Hatzivassiliou, C. Eigenbrot, C. Yu, A. S. Shaw, G. Manning, N. J. Skelton, S. G. Hymowitz, S. Malek. Activation Mechanism of Oncogenic Deletion Mutations in BRAF, EGFR, and HER2. *Cancer Cell* **2016**, *29*, 477-493.
- [31] Y. Shan, M. P. Eastwood, X. Zhang, E. T. Kim, A. Arkhipov, R. O. Dror, J. Jumper, J. Kuriyan, D. E. Shaw. Oncogenic Mutations Counteract Intrinsic Disorder in the EGFR Kinase and Promote Receptor Dimerization. *Cell* **2012**, *149*, 860-870.

- [32] J. Fassunke, F. Müller, M. Keul, S. Michels, M. A. Dammert, A. Schmitt, D. Plenker, J. Lategahn, C. Heydt, J. Brägelmann, H. L. Tumbrink, Y. Alber, S. Klein, A. Heimsoeth, I. Dahmen, R. N. Fischer, M. Scheffler, M. A. Ihle, V. Priesner, A. H. Scheel, S. Wagener, A. Kron, K. Frank, K. Garbert, T. Persigehl, M. Püsken, S. Haneder, B. Schaaf, E. Rodermann, W. Engel-Riedel, E. Felip, E. F. Smit, S. Merkelbach-Bruse, H. C. Reinhardt, S. M. Kast, J. Wolf, D. Rauh, R. Büttner, M. L. Sos. Overcoming EGFRG724S-Mediated Osimertinib Resistance through Unique Binding Characteristics of Second-Generation EGFR Inhibitors. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4655.
- [33] H. Yasuda, E. Park, C. H. Yun, N. J. Sng, A. R. Lucena-Araujo, W. L. Yeo, M. S. Huberman, D. W. Cohen, S. Nakayama, K. Ishioka, N. Yamaguchi, M. Hanna, G. R. Oxnard, C. S. Lathan, T. Moran, L. V. Sequist, J. E. Chaft, G. J. Riely, M. E. Arcila, R. A. Soo, M. Meyerson, M. J. Eck, S. S. Kobayashi, D. B. Costa. Structural, Biochemical, and Clinical Characterization of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Exon 20 Insertion Mutations in Lung Cancer. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 216ra177.
- [34] T. Kosaka, J. Tanizaki, R. M. Paranal, H. Endoh, C. Lydon, M. Capelletti, C. E. Repellin, J. Choi, A. Ogino, A. Calles, D. Ercan, A. J. Redig, M. Bahcall, G. R. Oxnard, M. J. Eck, P. A. Jänne. Response Heterogeneity of EGFR and HER2 Exon 20 Insertions to Covalent EGFR and HER2 Inhibitors. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2712-2721.
- [35] J. P. Robichaux, Y. Y. Elamin, Z. Tan, B. W. Carter, S. Zhang, S. Liu, S. Li, T. Chen, A. Poteete, A. Estrada-Bernal, A. T. Le, A. Truini, M. B. Nilsson, H. Sun, E. Roarty, S. B. Goldberg, J. R. Brahmer, M. Altan, C. Lu, V. Papadimitrakopoulou, K. Politi, R. C. Doebele, K. K. Wong, J. V. Heymach. Mechanisms and Clinical Activity of an EGFR and HER2 Exon 20-Selective Kinase Inhibitor in Non-Small Cell Lung Cancer. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 638-646.
- [36] D. W. Fry, A. J. Bridges, W. A. Denny, A. Doherty, K. D. Greis, J. L. Hicks, K. E. Hook, P. R. Keller, W. R. Leopold, J. A. Loo, D. J. McNamara, J. M. Nelson, V. Sherwood, J. B. Smaill, S. Trumpp-Kallmeyer, E. M. Dobrusin. Specific, Irreversible Inactivation of the Epidermal Growth Factor Receptor and ErbB2, by a New Class of Tyrosine Kinase Inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 12022-12027.
- [37] T. Hirano, H. Yasuda, J. Hamamoto, S. Nukaga, K. Masuzawa, I. Kawada, K. Naoki, T. Niimi, S. Mimasu, H. Sakagami, K. Soejima, T. Betsuyaku. Pharmacological and Structural Characterizations of Naquotinib, a Novel Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor, in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *Mol. Cancer Ther.* **2018**, *17*, 740-750.
- [38] M. E. Arcila, J. E. Chaft, K. Nafa, S. Roy-Chowdhuri, C. Lau, M. Zaidinski, P. K. Paik, M. F. Zakowski, M. G. Kris, M. Ladanyi. Prevalence, Clinicopathologic Associations, and Molecular Spectrum of ErbB2 (HER2) Tyrosine Kinase Mutations in Lung Adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 4910-4918.
- [39] K. Aertgeerts, R. Skene, J. Yano, B. C. Sang, H. Zou, G. Snell, A. Jennings, K. Iwamoto, N. Habuka, A. Hirokawa, T. Ishikawa, T. Tanaka, H. Miki, Y. Ohta, S. Sogabe. Structural Analysis of the Mechanism of Inhibition and

-
- Allosteric Activation of the Kinase Domain of HER2 Protein. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 18756-18765.
- [40] T. Ishikawa, M. Seto, H. Banno, Y. Kawakita, M. Oorui, T. Taniguchi, Y. Ohta, T. Tamura, A. Nakayama, H. Miki, H. Kamiguchi, T. Tanaka, N. Habuka, S. Sogabe, J. Yano, K. Aertgeerts, K. Kamiyama. Design and Synthesis of Novel Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)/Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Dual Inhibitors Bearing a Pyrrolo[3,2-d]pyrimidine Scaffold. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 8030-8050.
- [41] W. Pao, V. A. Miller, K. A. Politi, G. J. Riely, R. Somwar, M. F. Zakowski, M. G. Kris, H. Varmus. Acquired Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib is Associated with a Second Mutation in the EGFR Kinase Domain. *PLoS Med.* **2005**, *2*, e73.
- [42] H. A. Yu, M. E. Arcila, N. Rekhtman, C. S. Sima, M. F. Zakowski, W. Pao, M. G. Kris, V. A. Miller, M. Ladanyi, G. J. Riely. Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR-TKI Therapy in 155 Patients with EGFR-Mutant Lung Cancers. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 2240-2247.
- [43] A. Michalczyk, S. Klüter, H. B. Rode, J. R. Simard, C. Grütter, M. Rabiller, D. Rauh. Structural Insights into How Irreversible Inhibitors Can Overcome Drug Resistance in EGFR. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 3482-3488.
- [44] M. L. Sos, H. B. Rode, S. Heynck, M. Peifer, F. Fischer, S. Klüter, V. G. Pawar, C. Reuter, J. M. Heuckmann, J. Weiss, L. Ruddigkeit, M. Rabiller, M. Koker, J. R. Simard, M. Getlik, Y. Yuza, T. H. Chen, H. Greulich, R. K. Thomas, D. Rauh. Chemogenomic Profiling Provides Insights into the Limited Activity of Irreversible EGFR Inhibitors in Tumor Cells Expressing the T790M EGFR Resistance Mutation. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 868-874.
- [45] J. Engel, J. Lategahn, D. Rauh. Hope and Disappointment: Covalent Inhibitors to Overcome Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *ACS Med. Chem. Lett.* **2016**, *7*, 2-5.
- [46] D. A. Cross, S. E. Ashton, S. Ghiorghiu, C. Eberlein, C. A. Nebhan, P. J. Spitzler, J. P. Orme, M. R. Finlay, R. A. Ward, M. J. Mellor, G. Hughes, A. Rahi, V. N. Jacobs, M. Red Brewer, E. Ichihara, J. Sun, H. Jin, P. Ballard, K. Al-Kadhimi, R. Rowlinson, T. Klinowska, G. H. Richmond, M. Cantarini, D. W. Kim, M. R. Ranson, W. Pao. AZD9291, an Irreversible EGFR TKI, Overcomes T790M-Mediated Resistance to EGFR Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Discov.* **2014**, *4*, 1046-1061.
- [47] M. R. Finlay, M. Anderton, S. Ashton, P. Ballard, P. A. Bethel, M. R. Box, R. H. Bradbury, S. J. Brown, S. Butterworth, A. Campbell, C. Chorley, N. Colclough, D. A. Cross, G. S. Currie, M. Grist, L. Hassall, G. B. Hill, D. James, M. James, P. Kemmitt, T. Klinowska, G. Lamont, S. G. Lamont, N. Martin, H. L. McFarland, M. J. Mellor, J. P. Orme, D. Perkins, P. Perkins, G. Richmond, P. Smith, R. A. Ward, M. J. Waring, D. Whittaker, S. Wells, G. L. Wrigley. Discovery of a Potent and Selective EGFR Inhibitor (AZD9291) of Both Sensitizing and T790M Resistance Mutations that Spares the Wild Type Form of The Receptor. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 8249-8267.

- [48] R. A. Ward, M. J. Anderton, S. Ashton, P. A. Bethel, M. Box, S. Butterworth, N. Colclough, C. G. Chorley, C. Chuaqui, D. A. Cross, L. A. Dakin, J. E. Debreczeni, C. Eberlein, M. R. Finlay, G. B. Hill, M. Grist, T. C. Klinowska, C. Lane, S. Martin, J. P. Orme, P. Smith, F. Wang, M. J. Waring. Structure- and Reactivity-Based Development of Covalent Inhibitors of the Activating and Gatekeeper Mutant Forms of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7025-7048.
- [49] E. S. Kim. Olmutinib: First Global Approval. *Drugs* **2016**, *76*, 1153-1157.
- [50] G. R. Oxnard, K. Thress, C. Paweletz, D. Stetson, B. Dougherty, Z. Lai, A. Markovets, E. Felip, A. Vivancos, Y. Kuang, L. Sholl, A. J. Redig, M. Cantarini, J. C. Barrett, R. N. Pillai, B. C. Cho, L. Lacroix, D. Planchard, J. C. Soria, P. A. Jänne. Mechanisms of Acquired Resistance to AZD9291 in EGFR T790M Positive Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **2015**, *10* (Suppl. 2): ORAL17.07.
- [51] K. S. Thress, C. P. Paweletz, E. Felip, B. C. Cho, D. Stetson, B. Dougherty, Z. Lai, A. Markovets, A. Vivancos, Y. Kuang, D. Ercan, S. E. Matthews, M. Cantarini, J. C. Barrett, P. A. Jänne, G. R. Oxnard. Acquired EGFR C797S Mutation Mediates Resistance to AZD9291 in Non-Small Cell Lung Cancer Harboring EGFR T790M. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 560-562.
- [52] Y. Jia, C. H. Yun, E. Park, D. Ercan, M. Manuia, J. Juarez, C. Xu, K. Rhee, T. Chen, H. Zhang, S. Palakurthi, J. Jang, G. Lelais, M. DiDonato, B. Bursulaya, P. Y. Michellys, R. Eppele, T. H. Marsilje, M. McNeill, W. Lu, J. Harris, S. Bender, K. K. Wong, P. A. Jänne, M. J. Eck. Overcoming EGFR(T790M) and EGFR(C797S) Resistance with Mutant-Selective Allosteric Inhibitors. *Nature* **2016**, *534*, 129-132.
- [53] Z. Yang, N. Yang, Q. Ou, Y. Xiang, T. Jiang, X. Wu, H. Bao, X. Tong, X. Wang, Y. W. Shao, Y. Liu, Y. Wang, C. Zhou. Investigating Novel Resistance Mechanisms to Third-Generation EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Osimertinib in Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 3097-3107.
- [54] S. I. Ou, J. Cui, A. B. Schrock, M. E. Goldberg, V. W. Zhu, L. Albacker, P. J. Stephens, V. A. Miller, S. M. Ali. Emergence of Novel and Dominant Acquired EGFR Solvent-Front Mutations at Gly796 (G796S/R) Together with C797S/R and L792F/H Mutations in One EGFR (L858R/T790M) NSCLC Patient Who Progressed on Osimertinib. *Lung Cancer* **2017**, *108*, 228-231.
- [55] D. Zheng, M. Hu, Y. Bai, X. Zhu, X. Lu, C. Wu, J. Wang, L. Liu, Z. Wang, J. Ni, Z. Yang, J. Xu. EGFR G796D Mutation Mediates Resistance to Osimertinib. *Oncotarget* **2017**, *8*, 49671-49679.
- [56] S. J. Klempner, P. Mehta, A. B. Schrock, S. M. Ali, S. I. Ou. Cis-Oriented Solvent-Front EGFR G796S Mutation in Tissue and ctDNA in a Patient Progressing on Osimertinib: A Case Report and Review of the Literature. *Lung Cancer: Targets Ther.* **2017**, *8*, 241-247.
- [57] A. O. Walter, R. T. Sjin, H. J. Haringsma, K. Ohashi, J. Sun, K. Lee, A. Dubrovskiy, M. Labenski, Z. Zhu, Z. Wang, M. Sheets, T. St Martin, R. Karp, D. van Kalken, P. Chaturvedi, D. Niu, M. Nacht, R. C. Petter, W. Westlin, K.

-
- Lin, S. Jaw-Tsai, M. Raponi, T. Van Dyke, J. Etter, Z. Weaver, W. Pao, J. Singh, A. D. Simmons, T. C. Harding, A. Allen. Discovery of a Mutant-Selective Covalent Inhibitor of EGFR that Overcomes T790M-Mediated Resistance in NSCLC. *Cancer Discov.* **2013**, *3*, 1404-1415.
- [58] M. Bersanelli, R. Minari, P. Bordi, L. Gnetti, C. Bozzetti, A. Squadrilli, C. A. M. Lagrasta, L. Bottarelli, G. Osipova, E. Capelletto, M. Mor, M. Tiseo. L718Q Mutation as New Mechanism of Acquired Resistance to AZD9291 in EGFR -Mutated NSCLC. *J. Thorac. Oncol.* **2016**, *11*, e121-e123.
- [59] X. Le, S. Puri, M. V. Negrao, M. B. Nilsson, J. Robichaux, T. Boyle, J. K. Hicks, K. L. Lovinger, E. Roarty, W. Rinsurongkawong, M. Tang, H. Sun, Y. Elamin, L. C. Lacerda, J. Lewis, J. A. Roth, S. G. Swisher, J. J. Lee, W. N. William, Jr., B. S. Glisson, J. Zhang, V. A. Papadimitrakopoulou, J. E. Gray, J. V. Heymach. Landscape of EGFR-Dependent and -Independent Resistance Mechanisms to Osimertinib and Continuation Therapy Beyond Progression in EGFR-Mutant NSCLC. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 6195-6203.
- [60] J. Lee, J. H. Shim, W. Y. Park, H. K. Kim, J. M. Sun, S. H. Lee, J. S. Ahn, K. Park, M. J. Ahn. Rare Mechanism of Acquired Resistance to Osimertinib in Korean Patients with EGFR-mutated Non-small Cell Lung Cancer. *Cancer Res. Treat.* **2019**, *51*, 408-412.
- [61] S.-J. Zhu, P. Zhao, J. Yang, R. M.-E. Yan, S.-Y. Yang, J.-W. Yang, C.-H. Yun. Structural Insights Into Drug Development Strategy Targeting EGFR T790M/C797S. *Oncotarget* **2018**.
- [62] W. Hemmer, M. McGlone, I. Tsigelny, S. S. Taylor. Role of the Glycine Triad in the ATP-Binding Site of cAMP-Dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 16946-16954.
- [63] J. R. Simard, M. Getlik, C. Grutter, R. Schneider, S. Wulfert, D. Rauh. Fluorophore Labeling of the Glycine-Rich Loop as a Method of Identifying Inhibitors that Bind to Active and Inactive Kinase Conformations. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4152-4160.
- [64] J. Jiang, H. Greulich, P. A. Jänne, W. R. Sellers, M. Meyerson, J. D. Griffin. Epidermal Growth Factor-Independent Transformation of Ba/F3 Cells with Cancer-Derived Epidermal Growth Factor Receptor Mutants Induces Gefitinib-Sensitive Cell Cycle Progression. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 8968-8974.
- [65] S. K. Chan, W. J. Gullick, M. E. Hill. Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor in Non-Small Cell Lung Cancer - Search and Destroy. *Eur. J. Cancer.* **2006**, *42*, 17-23.
- [66] S. Yoshikawa, M. Kukimoto-Niino, L. Parker, N. Handa, T. Terada, T. Fujimoto, Y. Terazawa, M. Wakiyama, M. Sato, S. Sano, T. Kobayashi, T. Tanaka, L. Chen, Z. J. Liu, B. C. Wang, M. Shirouzu, S. Kawa, K. Semba, T. Yamamoto, S. Yokoyama. Structural Basis for the Altered Drug Sensitivities of Non-Small Cell Lung Cancer-Associated Mutants of Human Epidermal Growth Factor Receptor. *Oncogene* **2013**, *32*, 27-38.

- [67] Y. Liu, Y. Li, Q. Ou, X. Wu, X. Wang, Y. W. Shao, J. Ying. Acquired EGFR L718V Mutation Mediates Resistance to Osimertinib in Non-Small Cell Lung Cancer but Retains Sensitivity to Afatinib. *Lung Cancer* **2018**, *118*, 1-5.
- [68] A. Oztan, S. Fischer, A. B. Schrock, R. L. Erlich, C. M. Lovly, P. J. Stephens, J. S. Ross, V. Miller, S. M. Ali, S. I. Ou, L. E. Raez. Emergence of EGFR G724S Mutation in EGFR-Mutant Lung Adenocarcinoma Post Progression on Osimertinib. *Lung Cancer* **2017**, *111*, 84-87.
- [69] Y. Zhang, B. He, D. Zhou, M. Li, C. Hu. Newly Emergent Acquired EGFR Exon 18 G724S Mutation After Resistance of a T790M Specific EGFR Inhibitor Osimertinib in Non-Small-Cell Lung Cancer: A Case Report. *Oncol. Targets Ther.* **2019**, *12*, 51-56.
- [70] B. P. Brown, Y. K. Zhang, D. Westover, Y. Yan, H. Qiao, V. Huang, Z. Du, J. A. Smith, J. S. Ross, V. A. Miller, S. Ali, L. Bazhenova, A. B. Schrock, J. Meiler, C. M. Lovly. On-Target Resistance to the Mutant-Selective EGFR Inhibitor Osimertinib Can Develop in an Allele-Specific Manner Dependent on the Original EGFR-Activating Mutation. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 3341-3351.
- [71] T. Mitsudomi, Y. Yatabe. Mutations of the Epidermal Growth Factor Receptor Gene and Related Genes as Determinants of Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors Sensitivity in Lung Cancer. *Cancer Sci.* **2007**, *98*, 1817-1824.
- [72] G. R. Oxnard, P. C. Lo, M. Nishino, S. E. Dahlberg, N. I. Lindeman, M. Butaney, D. M. Jackman, B. E. Johnson, P. A. Jänne. Natural History and Molecular Characteristics of Lung Cancers Harboring EGFR Exon 20 Insertions. *J. Thorac. Oncol.* **2013**, *8*, 179-184.
- [73] H. Yasuda, S. Kobayashi, D. B. Costa. EGFR Exon 20 Insertion Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: Preclinical Data and Clinical Implications. *Lancet Oncol.* **2012**, *13*, e23-e31.
- [74] Y. Kobayashi, T. Mitsudomi. Not All Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer Are Created Equal: Perspectives for Individualized Treatment Strategy. *Cancer Sci.* **2016**, *107*, 1179-1186.
- [75] C. Becker. Charakterisierung von Rezeptortyrosinkinasen in Tumorzellen. *Dissertation, TU Dortmund* **2016**.
- [76] L. Goldschmidt, D. R. Cooper, Z. S. Derewenda, D. Eisenberg. Toward Rational Protein Crystallization: A Web Server for the Design of Crystallizable Protein Variants. *Protein Sci.* **2007**, *16*, 1569-1576.
- [77] M. Keul. Etablierung von biochemischen und strukturbasierten Systemen zur Charakterisierung wirkstoffresistenter EGFR-Mutanten. *Dissertation, TU Dortmund* **2019**.
- [78] L. Goldschmidt, D. Eisenberg, Z. S. Derewenda. Salvage or Recovery of Failed Targets by Mutagenesis to Reduce Surface Entropy. *Methods Mol. Biol.* **2014**, *1140*, 201-209.
- [79] Z. S. Derewenda. Rational Protein Crystallization by Mutational Surface Engineering. *Structure* **2004**, *12*, 529-535.

-
- [80] Z. S. Derewenda, P. G. Vekilov. Entropy and Surface Engineering in Protein Crystallization. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **2006**, *62*, 116-124.
- [81] J. Niggenaber. Klonierung, Expression, Aufreinigung und Kristallisation krebsrelevanter EGFR- und HER2-Mutanten. *Master-Arbeit, TU Dortmund* **2017**.
- [82] K. Walbrunn. Klonierung, Expression, Aufreinigung und Kristallisation krebsrelevanter Her2- und EGFR-Mutanten. *Master-Arbeit, TU Dortmund* **2019**.
- [83] E. J. Hanan, C. Eigenbrot, M. C. Bryan, D. J. Burdick, B. K. Chan, Y. Chen, J. Dotson, R. A. Heald, P. S. Jackson, H. La, M. D. Lainchbury, S. Malek, H. E. Purkey, G. Schaefer, S. Schmidt, E. M. Seward, S. Sideris, C. Tam, S. Wang, S. K. Yeap, I. Yen, J. Yin, C. Yu, I. Zilberleyb, T. P. Heffron. Discovery of Selective and Noncovalent Diaminopyrimidine-Based Inhibitors of Epidermal Growth Factor Receptor Containing the T790M Resistance Mutation. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10176-10191.
- [84] J. Engel, C. Becker, J. Lategahn, M. Keul, J. Ketzer, T. Mühlenberg, L. Kollipara, C. Schultz-Fademrecht, R. P. Zahedi, S. Bauer, D. Rauh. Insight into the Inhibition of Drug-Resistant Mutants of the Receptor Tyrosine Kinase EGFR. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 10909-10912.
- [85] L. Heyden. Expression, Aufreinigung und Kristallisation krebsrelevanter EGFR-Mutanten. *Master-Arbeit, TU Dortmund* **2020**.
- [86] I. Landel. Aufreinigung und Kristallisation der Rezeptor-Tyrosin-Kinase EGFR. *Bachelor-Arbeit, TU Dortmund* **2014**.
- [87] P. Zhao, M. Y. Yao, S. J. Zhu, J. Y. Chen, C. H. Yun. Crystal Structure of EGFR T790M/C797S/V948R in Complex with EAI045. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *502*, 332-337.
- [88] C. To, J. Jang, T. Chen, E. Park, M. Mushajiang, D. J. H. De Clercq, M. Xu, S. Wang, M. D. Cameron, D. E. Heppner, B. H. Shin, T. W. Gero, A. Yang, S. E. Dahlberg, K. K. Wong, M. J. Eck, N. S. Gray, P. A. Jänne. Single and Dual Targeting of Mutant EGFR with an Allosteric Inhibitor. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 926-943.
- [89] D. J. H. De Clercq, D. E. Heppner, C. To, J. Jang, E. Park, C. H. Yun, M. Mushajiang, B. H. Shin, T. W. Gero, D. A. Scott, P. A. Jänne, M. J. Eck, N. S. Gray. Discovery and Optimization of Dibenzodiazepinones as Allosteric Mutant-Selective EGFR Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2019**, *10*, 1549-1553.
- [90] S. Li, K. R. Schmitz, P. D. Jeffrey, J. J. Wiltzius, P. Kussie, K. M. Ferguson. Structural Basis for Inhibition of the Epidermal Growth Factor Receptor by Cetuximab. *Cancer Cell* **2005**, *7*, 301-311.
- [91] N. I. Goldstein, M. Prewett, K. Zuklys, P. Rockwell, J. Mendelsohn. Biological Efficacy of a Chimeric Antibody to the Epidermal Growth Factor Receptor in a Human Tumor Xenograft Model. *Clin. Cancer Res.* **1995**, *1*, 1311-1318.

- [92] J. Niggenaber, L. Heyden, T. Grabe, M. P. Müller, J. Lategahn, D. Rauh. Complex Crystal Structures of EGFR with Third-Generation Kinase Inhibitors and Simultaneously Bound Allosteric Ligands. *ACS Med. Chem. Lett.* **2020**, *11*, 2484-2490.
- [93] X. E. Yan, P. Ayaz, S. J. Zhu, P. Zhao, L. Liang, C. H. Zhang, Y. C. Wu, J. L. Li, H. G. Choi, X. Huang, Y. Shan, D. E. Shaw, C. H. Yun. Structural Basis of AZD9291 Selectivity for EGFR T790M. *J. Med. Chem.* **2020**.
- [94] S. Planken, D. C. Behenna, S. K. Nair, T. O. Johnson, A. Nagata, C. Almaden, S. Bailey, T. E. Ballard, L. Bernier, H. Cheng, S. Cho-Schultz, D. Dalvie, J. G. Deal, D. M. Dinh, M. P. Edwards, R. A. Ferre, K. S. Gajiwala, M. Hemkens, R. S. Kania, J. C. Kath, J. Matthews, B. W. Murray, S. Niessen, S. T. M. Orr, M. Pairish, N. W. Sach, H. Shen, M. Shi, J. Solowiej, K. Tran, E. Tseng, P. Vicini, Y. Wang, S. L. Weinrich, R. Zhou, M. Zientek, L. Liu, Y. Luo, S. Xin, C. Zhang, J. Lafontaine. Discovery of N-((3R,4R)-4-fluoro-1-(6-((3-methoxy-1-methyl-1H-pyrazol-4-yl)amino)-9-methyl-9H-purin-2-yl)pyrrolidine-3-yl)acrylamide (PF-06747775) through Structure-Based Drug Design: A High Affinity Irreversible Inhibitor Targeting Oncogenic EGFR Mutants with Selectivity Over Wild-Type EGFR. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 3002-3019.
- [95] T. Grabe. Synthese kovalenter Inhibitoren für mutierte Kinasen der ErbB-Familie. *Master-Arbeit, TU Dortmund* **2017**.
- [96] W. Zhou, D. Ercan, L. Chen, C. H. Yun, D. Li, M. Capelletti, A. B. Cortot, L. Chirieac, R. E. Iacob, R. Padera, J. R. Engen, K. K. Wong, M. J. Eck, N. S. Gray, P. A. Jänne. Novel Mutant-Selective EGFR Kinase Inhibitors Against EGFR T790M. *Nature* **2009**, *462*, 1070-1074.
- [97] W. Zhou, D. Ercan, P. A. Jänne, N. S. Gray. Discovery of Selective Irreversible Inhibitors for EGFR-T790M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 638-643.
- [98] E. K. Evans, R. Tester, S. Aslanian, R. Karp, M. Sheets, M. T. Labenski, S. R. Witowski, H. Lounsbury, P. Chaturvedi, H. Mazdiasni, Z. Zhu, M. Nacht, M. I. Freed, R. C. Petter, A. Dubrovskiy, J. Singh, W. F. Westlin. Inhibition of BTK with CC-292 Provides Early Pharmacodynamic Assessment of Activity in Mice and Humans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2013**, *346*, 219-228.
- [99] D. Ercan, H. G. Choi, C. H. Yun, M. Capelletti, T. Xie, M. J. Eck, N. S. Gray, P. A. Jänne. EGFR Mutations and Resistance to Irreversible Pyrimidine-Based EGFR Inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 3913-3923.
- [100] J. Lategahn, M. Keul, P. Klövekorn, H. L. Tumbrink, J. Niggenaber, M. P. Müller, L. Hodson, M. Flasshoff, J. Hardick, T. Grabe, J. Engel, C. Schultz-Fademrecht, M. Baumann, J. Ketzer, T. Mühlenberg, W. Hiller, G. Günther, A. Unger, H. Müller, A. Heimsoeth, C. Golz, B. Blank-Landeshammer, L. Kollipara, R. P. Zahedi, C. Strohmam, J. G. Hengstler, W. A. L. van Otterlo, S. Bauer, D. Rauh. Inhibition of Osimertinib-Resistant Epidermal Growth Factor Receptor EGFR-T790M/C797S. *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 10789-10801.
- [101] P. Klövekorn. Synthese optimierter Inhibitoren für Mutanten der ErbB-Familie basierend auf dem Pyrrolopyrimidin- und Pyrrolopyrimidin-4-on-Grundgerüst. *Master-Arbeit, TU Dortmund* **2015**.

-
- [102] H. Tumbrink. Zelluläre Charakterisierung von Inhibitoren der ErbB-Familie. *Master-Arbeit, TU Dortmund* **2016**.
- [103] M. Flaßhoff. Synthese kovalenter Inhibitoren des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors mit verbesserter Löslichkeit. *Bachelor-Arbeit, TU Dortmund* **2014**.
- [104] J. Lategahn. Design, Synthese und zelluläre Charakterisierung von Inhibitoren onkogener und Wirkstoff-resistenter Mutanten der ErbB-Familie. *Dissertation, TU Dortmund* **2018**.
- [105] S. J. Kaspersen, C. Sorum, V. Willassen, E. Fuglseth, E. Kjobli, G. Bjorkoy, E. Sundby, B. H. Hoff. Synthesis and In Vitro EGFR (ErbB1) Tyrosine Kinase Inhibitory Activity of 4-N-substituted 6-aryl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine-4-amines. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 6002-6014.
- [106] P. Traxler, P. R. Allegrini, R. Brandt, J. Brueggen, R. Cozens, D. Fabbro, K. Grosios, H. A. Lane, P. McSheehy, J. Mestan, T. Meyer, C. Tang, M. Wartmann, J. Wood, G. Caravatti. AEE788: A Dual Family Epidermal Growth Factor Receptor/ErbB2 and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor with Antitumor and Antiangiogenic Activity. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 4931-4941.
- [107] J. A. Blair, D. Rauh, C. Kung, C. H. Yun, Q. W. Fan, H. Rode, C. Zhang, M. J. Eck, W. A. Weiss, K. M. Shokat. Structure-Guided Development of Affinity Probes for Tyrosine Kinases Using Chemical Genetics. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 229-238.
- [108] J. Singh, R. C. Petter, T. A. Baillie, A. Whitty. The Resurgence of Covalent Drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10*, 307-317.
- [109] J. Naidoo, C. S. Sima, K. Rodriguez, N. Busby, K. Nafa, M. Ladanyi, G. J. Riely, M. G. Kris, M. E. Arcila, H. A. Yu. Epidermal Growth Factor Receptor Exon 20 Insertions in advanced Lung Adenocarcinomas: Clinical Outcomes and Response to Erlotinib. *Cancer* **2015**, *121*, 3212-3220.
- [110] M. Y. Cha, K. O. Lee, M. Kim, J. Y. Song, K. H. Lee, J. Park, Y. J. Chae, Y. H. Kim, K. H. Suh, G. S. Lee, S. B. Park, M. S. Kim. Antitumor Activity of HM781-36B, a Highly Effective Pan-HER Inhibitor in Erlotinib-Resistant NSCLC and Other EGFR-Dependent Cancer Models. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 2445-2454.
- [111] J. P. Robichaux, Y. Y. Elamin, R. S. K. Vijayan, M. B. Nilsson, L. Hu, J. He, F. Zhang, M. Pisegna, A. Poteete, H. Sun, S. Li, T. Chen, H. Han, M. V. Negrao, J. R. Ahnert, L. Diao, J. Wang, X. Le, F. Meric-Bernstam, M. Routbort, B. Roeck, Z. Yang, V. M. Raymond, R. B. Lanman, G. M. Frampton, V. A. Miller, A. B. Schrock, L. A. Albacker, K. K. Wong, J. B. Cross, J. V. Heymach. Pan-Cancer Landscape and Analysis of ERBB2 Mutations Identifies Pozotinib as a Clinically Active Inhibitor and Enhancer of T-DM1 Activity. *Cancer Cell* **2019**, *36*, 444-457 e447.
- [112] P. A. Jänne, J. W. Neal, D. R. Camidge, A. I. Spira, Z. Piotrowska, L. Horn, D. B. Costa, A. S. Tsao, J. D. Patel, S. M. Gadgeel, L. Bazhenova, V. W. Zhu, H. West, S. Vincent, J. Zhu, S. Li, G. J. Riely. Antitumor Activity of

- TAK-788 in NSCLC with EGFR Exon 20 Insertions. *J. Clin. Oncol.* **2019**, *37*, 9007-9007.
- [113] W.-S. Huang, Y. Gong, F. Li, N. E. Bencfvenga, D. C. Dalgarno, A. Kohlmann, W. C. Shakespeare, R. M. Thomas, X. Zhu, A. V. West, W. Youngsaye, Y. Zhang, T. Zhou. Heteroaryl Compounds for Kinase Inhibition. *WO2015/195228A1* **2015**.
- [114] J. Heymach, M. Negrao, J. Robichaux, B. Carter, A. Patel, M. Altan, D. Gibbons, F. Fossella, G. Simon, V. Lam, G. Blumenschein, A. Tsao, J. Kurie, F. Mott, D. Jenkins, D. Mack, L. Feng, B. Roeck, Z. Yang, V. Papadimitrakopoulou, Y. Elamin. OA02.06 A Phase II Trial of Poziotinib in EGFR and HER2 Exon 20 Mutant Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *J. Thorac. Oncol.* **2018**, *13*, S323-S324.
- [115] R. N. Pillai, M. Behera, L. D. Berry, M. R. Rossi, M. G. Kris, B. E. Johnson, P. A. Bunn, S. S. Ramalingam, F. R. Khuri. HER2 Mutations in Lung Adenocarcinomas: A Report from the Lung Cancer Mutation Consortium. *Cancer* **2017**, *123*, 4099-4105.
- [116] S. K. Rabindran, C. M. Discafani, E. C. Rosfjord, M. Baxter, M. B. Floyd, J. Golas, W. A. Hallett, B. D. Johnson, R. Nilakantan, E. Overbeek, M. F. Reich, R. Shen, X. Shi, H. R. Tsou, Y. F. Wang, A. Wissner. Antitumor Activity of HKI-272, an Orally Active, Irreversible Inhibitor of the HER-2 Tyrosine Kinase. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3958-3965.
- [117] H. R. Tsou, E. G. Overbeek-Klumpers, W. A. Hallett, M. F. Reich, M. B. Floyd, B. D. Johnson, R. S. Michalak, R. Nilakantan, C. Discafani, J. Golas, S. K. Rabindran, R. Shen, X. Shi, Y. F. Wang, J. Upešlaciš, A. Wissner. Optimization of 6,7-disubstituted-4-(arylamino)quinoline-3-carbonitriles as Orally Active, Irreversible Inhibitors of Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Kinase Activity. *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 1107-1131.
- [118] A. Wissner, E. Overbeek, M. F. Reich, M. B. Floyd, B. D. Johnson, N. Mamuya, E. C. Rosfjord, C. Discafani, R. Davis, X. Shi, S. K. Rabindran, B. C. Gruber, F. Ye, W. A. Hallett, R. Nilakantan, R. Shen, Y. F. Wang, L. M. Greenberger, H. R. Tsou. Synthesis and Structure-Activity Relationships of 6,7-disubstituted 4-anilinoquinoline-3-carbonitriles. The Design of an Orally Active, Irreversible Inhibitor of the Tyrosine Kinase Activity of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and the Human epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER-2). *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 49-63.
- [119] W. Xia, R. J. Mullin, B. R. Keith, L. H. Liu, H. Ma, D. W. Rusnak, G. Owens, K. J. Alligood, N. L. Spector. Anti-tumor activity of GW572016: A Dual Tyrosine Kinase Inhibitor Blocks EGF Activation of EGFR/ErbB2 and Downstream Erk1/2 and AKT Pathways. *Oncogene* **2002**, *21*, 6255-6263.
- [120] J. Lategahn, J. Hardick, T. Grabe, J. Niggenaber, K. Jeyakumar, M. Keul, H. L. Tumbrink, C. Becker, L. Hodson, T. Kirschner, P. Klövekorn, J. Ketzer, M. Baumann, S. Terheyden, A. Unger, J. Weisner, M. P. Müller, W. A. L. van Otterlo, S. Bauer, D. Rauh. Targeting Her2-insYVMA with Covalent Inhibitors-A Focused Compound Screening and Structure-Based Design Approach. *J. Med. Chem.* **2020**, *63*, 11725-11755.

[121] T. Kirschner. Synthese kovalenter Inhibitoren der ErbB-Familie. *Bachelor-Arbeit, TU Dortmund* **2018**.

9. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Eidesstattliche Versicherung (Affidavit)

Niggenaber, Janina

Name, Vorname
(Surname, first name)

157295

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):

Kristallisation und strukturelle Charakterisierung klinisch-relevanter

Mutationsvarianten der Rezeptor-Tyrosinkinasen EGFR und Her2

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)