

Biochemische Charakterisierung und Identifizierung neuer Inhibitoren der humanen Myt1-Kinase

Dissertation

zur Erlangung des
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der
Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –
der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg



vorgelegt

von

Frau Charlott Platzer
geb. am 20.05.1989 in Halle (Saale)

Halle (Saale) 2016

Durchgeführt am Institut für Pharmazie, Abteilung Medizinische Chemie,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Gutachter: Herr Prof. Dr. Wolfgang Sippl
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Mike Schutkowski
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Drittgutachter: Herr Prof. Dr. Gerd Bendas
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Verteidigt am 20.10.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis	XI
Formelverzeichnis.....	XIII
Abkürzungsverzeichnis.....	XV
1 Einleitung.....	1
2 Grundlagen	3
2.1 Kinasen	3
2.1.1 Aufbau von Kinasen	4
2.1.2 Kinaseregulation	6
2.1.3 Kinaseinhibition.....	7
2.1.3.1 Selektivität von Kinaseinhibitoren	12
2.1.3.2 Resistenzen gegen Kinaseinhibitoren.....	14
2.2 Wee-Familie.....	15
2.2.1 Strukturelle Merkmale	15
2.2.2 Die physiologische Rolle der Myt1 in der Zelle.....	16
2.2.2.1 Der Zellzyklus und die Regulation durch Checkpoints.....	16
2.2.2.2 Der G ₂ /M Übergang.....	18
2.2.2.3 Die Regulation des Eintrittes in die Mitose durch Myt1	19
2.2.2.4 Intrazelluläre Membrandynamik und Mitoseaustritt	20
2.2.2.5 Wiedereintritt in den Zellzyklus nach G ₂ -Arrest.....	21
2.2.3 Myt1 als Target-Struktur in der Krebsforschung.....	22
2.3 Grundlagen der <i>in silico</i> Forschung.....	24
2.3.1 Target-basiertes Wirkstoffdesign.....	24

2.3.2	Protein-Liganden-Docking	24
2.3.2.1	GOLD 5.1	25
2.3.3	Virtuelles Screening	26
3	Ziel der Arbeit	29
4	Materialien und Methoden.....	31
4.1	Geräte	31
4.2	Verbrauchsmaterial	31
4.3	Reagenzien	32
4.4	Verwendete Lösungen und Puffer	35
4.5	Myt1-Präparation	37
4.5.1	Myt1-Volllänge.....	37
4.5.1.1	Affinitätschromatographische Proteinreinigung mittels His-Select Spin-Säulen	37
4.5.2	Myt1-Kinasedomäne.....	38
4.5.2.1	Affinitätschromatographische Proteinreinigung mittels HisTrap FF crude Säulen	39
4.6	SDS-PAGE	39
4.7	Western Blot	41
4.8	BCA-Assay	41
4.9	Allgemeine und statistische Datenanalyse.....	42
4.10	Fluoreszenzpolarisation: theoretischer Hintergrund und Datenanalyse	44
4.11	DasAFITC-Assay.....	46
4.11.1	Datenanalyse Anisotropie	47
4.12	Fluoreszenzpolarisation-Immunoassay II (FPIA-II).....	47
4.13	Fluoreszenzpolarisation-Immunoassay III (FPIA-III)	48

4.14	Microscale Thermophorese (MST).....	48
4.14.1	Theoretischer Hintergrund.....	48
4.14.2	MST-Untersuchungen mit der Myt1-Domäne.....	50
4.15	Protein-Liganden-Docking mit GOLD 5.1	51
4.15.1	Goldscore	51
4.16	Virtuelles Screening.....	51
4.16.1	LigandScout 4.0	52
5	Ergebnisse und Diskussion.....	53
5.1	Expression und Aufreinigung der Myt1-Kinase	53
5.1.1	Präparation von Myt1-Domäne.....	53
5.1.2	Präparation von Myt1-Volllänge	55
5.2	Aktivitätsassay-Entwicklung und Kinasereaktion-Charakterisierung für Myt1	58
5.2.1	Identifizierung von Myt1-Peptidsubstraten	59
5.2.2	Bestimmung der Sensitivität des FPIA-III.....	61
5.2.3	Optimierung der Reaktionsbedingungen	62
5.2.3.1	Einfluss des Puffersystems	63
5.2.3.2	Bestimmung pH-Optimum	64
5.2.3.3	Einfluss der Ionenstärke.....	64
5.2.3.4	Einfluss der Triton X-100 Konzentration	65
5.2.3.5	Einfluss der Inkubationstemperatur.....	66
5.2.3.6	Stabilität des Assays bei verschiedenen DMSO Konzentrationen	66
5.2.3.7	Bestimmung der optimalen Kinasekonzentration.....	67
5.2.4	Kinetische Charakterisierung der Myt1-Kinasereaktion	69
5.2.5	Bestimmung der Assayqualität	72
5.2.6	Validierung des FPIA-III mit Myt1-Inhibitoren	73

5.2.7	Microscale Thermophorese Untersuchungen an der Myt1-Domäne	77
5.2.7.1	Myt1-Domäne mit DasAFITC.....	77
5.2.7.2	Fluoreszenzmarkierte Myt1-Domäne	79
5.3	Identifizierung neuer Myt1-Inhibitoren	81
5.3.1	<i>In silico</i> Untersuchungen an der Myt1-Domäne	81
5.3.1.1	Virtuelles Screening mit Pharmakophor-Filter.....	82
5.3.1.2	Virtuelles Screening mit anderen Filtern.....	84
5.3.1.3	Virtuelles Screening ohne Filter	86
5.3.2	Kinase-Sirtuin Homologie	91
5.3.3	Testung von Kinaseinhibitoren von GlaxoSmithKline (PKIS I und II)	92
5.3.3.1	SAR von Aza-Stilbenen.....	96
5.3.3.2	SAR von 4-Amino-Chinolinen.....	98
5.3.3.3	SAR von Verbindungen mit Amino-Pyrimidin-Grundgerüst	101
5.3.3.4	Testung ausgewählter GSK Verbindungen mit Cdk1	106
5.3.4	MK-1775 als moderater Myt1-Inhibitor	110
6	Zusammenfassung und Ausblick.....	111
7	Quellen.....	113
8	Anhang.....	129
9	Abstract/ Zusammenfassung.....	141
10	Danksagung.....	143
11	Publikationen	145
12	Lebenslauf.....	147
13	Eigenständigkeitserklärung.....	149

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Allgemeiner räumlicher Aufbau einer Kinase und der ATP-Bindungstasche.	5
Abbildung 2.2: Vergleich der aktiven und inaktiven Kinasekonformation.....	7
Abbildung 2.3: Bindungsmuster von Typ I und II Inhibitoren in der ATP-Bindungstasche..	9
Abbildung 2.4: Vergleich der hydrophoben „back pockets“	10
Abbildung 2.5: Überblick über die Regulation des Cdk1/Cyclin B1 Komplexes	20
Abbildung 4.1: Darstellung der Photo Selektion, modifiziert von Jameson	44
Abbildung 4.2: Aufbau der MST-Messapparatur und Phasen des MST-Signals	49
Abbildung 4.3: MST-Bindungskurven und Bestimmung von K_d -Werten.....	50
Abbildung 5.1: Aktivitätsmessung der Kinasepräparation mittels FPIA-II.....	56
Abbildung 5.2: Assayprinzip des Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays (FPIA)	58
Abbildung 5.3: Verdrängungskurven der Sonde durch pY-EFS ²⁴⁷⁻²⁵⁹	61
Abbildung 5.4: Effekt der EFS ²⁴⁷⁻²⁵⁹ -Konzentration auf die Myt1-Reaktion.....	62
Abbildung 5.5: Einfluss des Puffers auf die Kinasereaktion	63
Abbildung 5.6: Einfluss der Ionenstärke auf das FPIA-III	65
Abbildung 5.7: Einfluss Detergenzien und Temperatur auf die Kinasereaktion.....	66
Abbildung 5.8: Einfluss der DMSO Konzentration auf die Kinasereaktion.	67
Abbildung 5.9: Verlauf der Kinasereaktion bei verschiedenen Myt1-Konzentrationen	68
Abbildung 5.10: Bestimmung von $K_{m, ATP}$	70
Abbildung 5.11: Bestimmung von K_m	70
Abbildung 5.12: Bestimmung der Z' -Faktors	73
Abbildung 5.13: Bestimmung des IC_{50} -Wertes verschiedener Inhibitoren.	74
Abbildung 5.14. Vergleich der IC_{50} Daten vom FP-Bindungs Assay und FPIA-III	76

Abbildung 5.15: K_d -Bestimmung von DasAFITC und Myt1-Domäne mit MST	78
Abbildung 5.16: MST-Kurven zur Bestimmung der DasAFITC-Verdrängung.....	79
Abbildung 5.17: MST-Kurven von 6,2 nM Myt1_dye mit Dasatinib	80
Abbildung 5.18: PD-Modell mit PD-0166285 als Ligand.....	82
Abbildung 5.19: Struktur von ZINC 3464302 als Ergebnis der ABL1-These	84
Abbildung 5.20: Ausgewählte Strukturen der Ähnlichkeitssuche basierend auf Dasatinib ...	86
Abbildung 5.21: Auswahl einiger Verbindungen des Dockings der Princeton Datenbank....	87
Abbildung 5.22: Strukturen der Kinaseinhibitoren, die an Myt1 getestet wurden	89
Abbildung 5.23: Strukturen der VS-Hits aus der GSK-PKIS I Datenbank	90
Abbildung 5.24: Strukturen der identifizierten Myt1-Inhibitoren der GSK Datenbank.....	93
Abbildung 5.25: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von ausgewählten GSK-Verbindungen	95
Abbildung 5.26: GOLD-Docking Ergebnis von GW 435821X	97
Abbildung 5.27: GOLD-Docking Ergebnisse von GW 494601A und GW 559768X	100
Abbildung 5.28: GOLD-Docking Ergebnis von GSK-1576028A.....	102
Abbildung 5.29: Schematische Darstellung der Interaktionen eines Amino-Pyrimidin- Inhibitors mit den Aminosäuren der JAK2.....	106
Abbildung 5.30: Western-Blot Ergebnisses der Untersuchung von GSK-Inhibitoren an der Myt1-FL.....	107
Abbildung 5.31: Western Blot Ergebnisse der Untersuchung von GSK-Inhibitoren an der Wee1.....	108
Abbildung 5.32: Struktur und Ergebnisse von MK-1775.....	110
Abbildung 8.1: UV-Vis Spekturm von Myt1_dye.....	129

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht der Kinase-Subgruppen und Anzahl deren Familien	4
Tabelle 2.2: Zusammenfassung der Eigenschaften ATP kompetitiver Inhibitoren.....	11
Tabelle 4.1: Zusammensetzung eines 12 % Trenngels und 4 % Sammelgels.....	40
Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Präparation verschiedener Myt1-Fragmente	54
Tabelle 5.2: Bestimmung von $K_{m, app}$ der Peptidsubstrate an der Myt1 mit FPIA-II.....	60
Tabelle 5.3: EC_{50} -Werte der Antikörper-Verdrängung von Phosphotyrosin-Peptiden.	61
Tabelle 5.4: Übersicht über die kinetischen Parameter der Myt1-Kinase	71
Tabelle 5.5: Vergleich des Inhibitionsprofils der Myt1-Kinase	75
Tabelle 5.6: Übersicht der verwendeten Pharmakophor-Modelle und deren Ergebnisse.....	83
Tabelle 5.7: Übersicht verwendeter Filtermethoden für das VS.....	85
Tabelle 5.8: Übersicht der ungefilterten Datenbanken	88
Tabelle 5.9: IC_{50} - und K_i -Werte der 10 gefundenen Myt1-Inhibitoren	94
Tabelle 5.10: Übersicht der getesteten Aza-Stilbene	96
Tabelle 5.11: Übersicht der 4-Amino-Chinoline	98
Tabelle 5.12: Übersicht einer Auswahl von Amino-Pyrimidine	103
Tabelle 5.13: Übersicht weiterer Amino-Pyrimidine.....	104

Formelverzeichnis

Formel 4.1: Berechnung der Standardabweichung SD.....	42
Formel 4.2: Berechnung des statistischen Fehlers Δy	43
Formel 4.3: Ermittlung der IC_{50} durch nicht-lineare Regression mit variablen Hill Slope	43
Formel 4.4: Ermittlung von K_d mittels nicht-linearer Regression	43
Formel 4.5: Berechnung der Z'-Wertes.....	43
Formel 4.6: Berechnung der totalen Intensität I_{total}	45
Formel 4.7: Berechnung des Korrekturfaktors K'	45
Formel 4.8: Berechnung der Polarisation P	46
Formel 4.9: Berechnung der Anisotropie r bzw. Umrechnung der Polarisation P in r	46
Formel 4.10: Berechnung der Inhibitionskonstante K_i mittels nicht-linearer Regression	47
Formel 4.11: Berechnung Goldscore	51
Formel 5.1: Cheng-Prusoff-Gleichung abgewandelt auf ATP kompetitive Inhibitoren.....	74

Abkürzungsverzeichnis

ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AK	Antikörper
APC/C	Anaphase-promoting-Complex/Cyclosome
APE	Ala-Pro-Glu
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuren
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated Serin-Proteinkinase
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein
BCA	Bicinchoninsäure
B-Myb	oncogene encoding B-Myb (Transkriptionsfaktor)
BSA	bovines Serumalbumin
CAK	Cyclin-activating-kinase
cAMP	cyclisches Adenosin Monophosphat
cAPK	cyclin AMP dependent protein kinase
CAPS	N-cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure
CDC25	cell division control protein 25
Cdk	Cyclin-dependent kinase
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonium]-1-propansulfonat
Chk	Checkpoint kinase
c-Kit	mast-stem cell growth factor receptor kinase
CMC	critical micelle concentration
c-MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
CML	chronische myeloische Leukämie
DFG	Asp-Phe-Gly
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSF	Differential Scanning Fluorimetrie

DTT	Dithiothreitol
DYRK1A	Dual-specificity tyrosine (Y) regulated kinase 1A
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	Konzentration, die 50 % des maximalen Effektes hervorruft
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFR	epidermal growth factor receptor
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERBB2	erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FL	full length
Fox-M1	Forkhead box protein M1
FP	Fluoreszenzpolarisation
FPIA	Fluoreszenzpolarisation-Immunoassay
FRET	Förster Resonanz Energietransfer
GBSA	generalized born surface area
GOLD	genetic optimisation for ligand docking
GS	Goldscore
GSK	GlaxoSmithKline
GSK3β	glycogen synthase kinase 3β
GST	Glutathion S-Transferase
HEK	human embryonic kidney
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinylethansulfonsäure
His	Histidin
Hsp90	Heat shock protein 90
HTS	High-Throughput-Screening
IC ₅₀	Konzentration, die 50 % der maximalen Inhibition hervorruft
IKK	IκB Kinase
IMAC	immobilisierte Metallchelataffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot

IRK	Insulin-Rezeptor-Kinase
JAK	Januskinase
KBB	Kinasebindungspuffer B
k_{cat}	katalytische Konstante
K_d	Dissoziationskonstante
K_i	Inhibitionskonstante
K_m	Michaelis-Menten Konstante
LCK	lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
LOK	Serin Threonin Kinase-10
logP	Logarithmus des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizient
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MBD	Membranbindungsdomäne
MEK	MAP Kinase Kinase 1
MLCK	myosin light chain kinase
MLU	Martin-Luther-Universität
MPF	mitose-promoting-factor
MST	Microscale Thermophorese
MW	Molekulargewicht
Myt1	membranassoziierte Tyrosin- und Threonin-spezifische, Cdk1 inhibierende Kinase 1
NAD	Nicotinamadenindinukleotid
NF-Y	nuclear factor Y
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK3	p21-activated kinase 3
PDB	Proteindatenbank
PDGFR	platelet-derived growth factor receptor
Pin1	Peptidylprolyl cis/trans isomerase 1
PKC	Proteinkinase C
PKIS	Proteinkinase-Inhibitor Set
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase

QM/MM-GBSA	Quantum Mechanics/Molecular Mechanics GBSA
r	Anisotropie
RET	Rearranged during Transfection
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RXL	Arg-X-Lys
SAR	Struktur-Wirkungsbeziehungen (structure-activity relationship)
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of mean
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SH	Src homology
SIRT2	Sirtuin 2
Src	Tyrosinkinase pp60src
TBS	Tris-gepufferte Lösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TGS	Tris-Glycin-SDS Puffer
TPSA	Topological polar surface area
TR-FRET	Time-resolved FRET
Tris	2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
TRKC	Tropomyosin receptor kinase C
VS	Virtual Screening
WB	Wasserstoffbrücke
WBB	Wasserstoffbrückenbindungen
Wee1	Wee1A protein kinase
WW	Wechselwirkung

1 Einleitung

Kanzerogene Gewebsveränderungen sind mit ca. 500.000 Neuerkrankungen und 200.000 Todesfällen jährlich in Deutschland eines der wichtigsten Therapiegebiete^{1, 2}. Hervorgerufen werden sie durch verschiedene zelluläre Modifikationen oder Mutationen, die in einem unkontrollierten Zellwachstum resultieren. Um diese Erkrankungen zu behandeln, werden standardgemäß Chemotherapeutika eingesetzt oder eine Strahlentherapie durchgeführt. Jedoch weisen diese Therapieformen ein erhebliches Nebenwirkungsprofil auf und können nur über einen begrenzten Zeitraum angewendet werden. Eine Erweiterung des Therapiespektrums besteht in der Hemmung der am Krankheitsgeschehen beteiligter Enzyme, den Kinasen. Mit Imatinib (Glivec®) kam 2001 der erste selektive ABL1-Kinaseinhibitor zur Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie (CML) auf den Markt^{3, 4}. Eingesetzt werden Kinaseinhibitoren meist in Kombination mit reduzierten Mengen verschiedener Chemotherapeutika, wodurch deren Nebenwirkungen verringert werden. Eine Strategie in der Krebstherapie besteht in der Aufhebung des G₂/M Checkpoints p53 defizienter Zellen. Die daraus resultierende mitotische Katastrophe führt zur Apoptose der kanzerogenen Zellen.

Die Wee-Kinase Familie, mit der Wee1 und Myt1-Kinase, spielen eine wichtige Rolle bei der Aufhebung des G₂/M Checkpoints und stellen somit interessante Targets in der Krebstherapie dar. Mit MK-1775 wurde 2009 der erste selektiver Wee1 Kinaseinhibitor identifiziert⁵, der sich derzeit in klinischen Phase II Studien befindet⁶.

Neuere Studien an verschiedenen Krebszelllinien haben gezeigt, dass Myt1 das geeignetere Target darstellt^{7, 8}. Der Mangel an einem selektiven Inhibitor und eingeschränkte Testmöglichkeiten haben die Myt1-Kinase jedoch nicht in dem wissenschaftlichen Fokus rücken lassen. Mit dieser Arbeit soll ein Beitrag dazu geleistet werden, diesen Mangel zu beheben und genauere Untersuchungen an der Myt1-Kinase zu ermöglichen.

2 Grundlagen

Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über Kinasen, deren Aufbau, Regulation und Inhibition im Allgemeinen und genauer der Myt1-Kinase geben. Dabei wird die Rolle der Myt1 im Zellzyklus betrachtet, um ihre Eignung als Target-Struktur für die Arzneimittelforschung hervorzuheben. Abschließend wird eine kurze Zusammenfassung der *in silico* Grundlagen gegeben.

2.1 Kinasen

Posttranslationale Modifikationen von Proteinen, ermöglicht durch Prozesse der Methylierung, Acetylierung, Ubiquitierung und Phosphorylierung, beeinflussen eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. Kinasen und andere an diesen Prozessen regulatorisch wirkende Enzyme stellen dabei interessante Targets für die Arzneimittelforschung dar ⁹. Die Aufgabe von Kinasen besteht in der Übertragung eines durch Adenosintriphosphat (ATP) zur Verfügung gestellten γ -Phosphatrestes auf eine als Akzeptorgruppe bezeichnete Region des Zielproteins. Im Hinblick auf die nukleophile Substitution dienen dabei die Hydroxylgruppen von Tyrosin-, Serin- oder Threoninresten sowie die Stickstoffatome von Histidinresten als Akzeptoren. Aus dem Aufbau und der Beschaffenheit dieser Region innerhalb eines Proteins ergibt sich eine erste Möglichkeit zur Kategorisierung der gegenwärtig 539 bekannten Kinasen ⁹ in Tyrosinkinase und Serin- bzw. Threoninkinase. Allerdings ist eine weitere Klassifizierung in acht Subgruppen ¹⁰ auf Grund ihrer strukturellen und sequenziellen Ähnlichkeit zwingend notwendig (siehe Tabelle 2.1). Abzugrenzen sind von den oben genannten Proteinkinase-Subgruppen die atypischen Proteinkinase, welche keine oder nur eine geringe sequenzielle Analogie aufweisen. Mit 539 Mitgliedern zählen die Kinasen zu einer der größten Enzymklassen im menschlichen Körper ¹¹.

Tabelle 2.1: Übersicht der Kinase-Subgruppen und Anzahl deren Familien ¹⁰

Abkürzung	Subgruppe	Anzahl an humanen Kinasen
AGC	PKA, PKG und PKC-Familie	63
CAMK	Calcium/Calmodulin abhängige Kinase	74
CK	Casein Kinase	12
CMGC	CDK, MAPK, GSK3, CLK-families	61
STE	Homologs of yeast Steril 7/11/20 Kinase	47
TK	Tyrosinkinase	90
TKL	Tyrosinkinase like	43
Other	Kinasen, die den anderen Familien nicht zugeordnet werden können	88

Durch den Kinase-Gegenspieler, die Phosphatase, ist der Prozess der Phosphorylierung und die damit einhergehende Regulation von Proteinen vollständig reversibel ¹². Diese wechselnde Proteinmodifikation ist in viele ineinandergreifende Rückkopplungsmechanismen involviert. Auf diese Weise kann ein Organismus stets und ständig kontrolliert ablaufende Zellreaktionen gewährleisten ¹³.

2.1.1 Aufbau von Kinasen

Basierend auf der hohen sequenziellen Ähnlichkeit und der gleichen katalytischen Funktion verfügen alle Kinasen über einen ähnlichen Aufbau (siehe Abbildung 2.1). Die Hauptbestandteile sind eine *N*-terminale Domäne, bestehend aus fünf β -Faltblättern, und eine *C*-terminale Domäne, die aus ∇ -Helices aufgebaut ist. Die beiden Domänen sind über eine Scharnierregion, auch Hinge-Region genannt, miteinander verbunden. Eine zusätzlich enthaltene flexible Aktivierungsschleife im *C*-Terminus ist für die Regulation der Enzymfunktion essentiell. Sie ist in der Nähe des katalytischen Zentrums lokalisiert und enthält das DFG-Motive sowie das APE-Motiv ¹⁴. Weitere wichtige Bestandteile der Kinasedomäne sind die glycinreiche Schleife („G-rich loop“), der Gatekeeper und ein konservierter Lysinrest ¹⁰. Im *N*-terminalen Teil der Kinase sind zwei regulatorische Abschnitte enthalten, die als „P-Loop“ und „C-Loop“ bezeichnet werden ¹⁰.

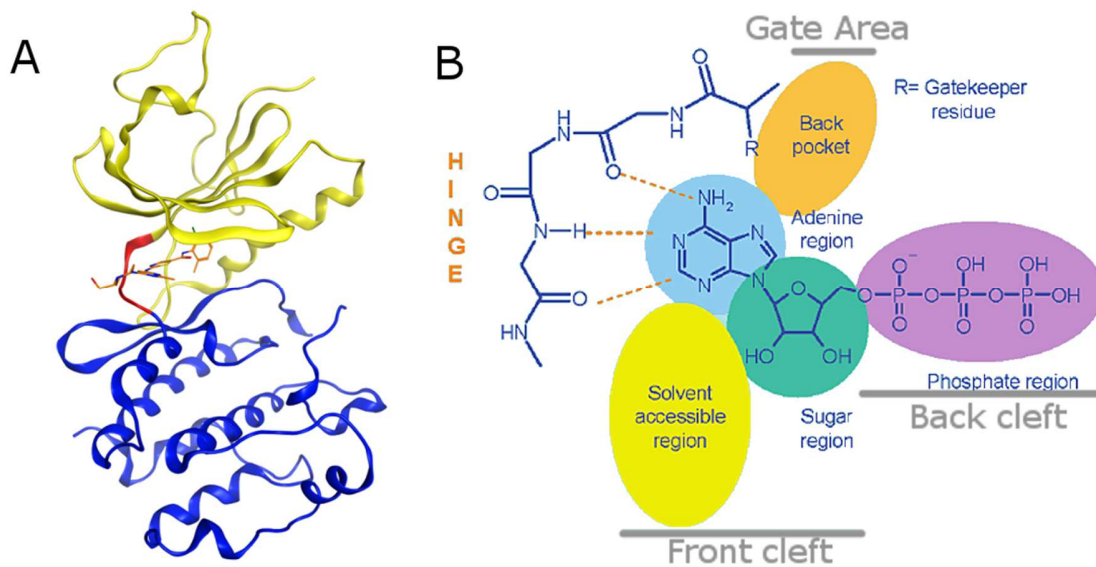


Abbildung 2.1: Allgemeiner räumlicher Aufbau einer Kinase und der ATP-Bindungstasche. **A** Aufbau der Myt1-Kinase, *N*-Terminus (gelb), Hinge-Region (rot) und *C*-Terminus (blau). **B** Schematischer Aufbau der ATP-Bindungstasche mit Interaktionsbereichen, Wasser exponierter Bereich (gelb), Ribose-Bindungstasche (grün), Adenosin-Bindetasche (blau), hydrophobe Tasche neben Gatekeeper (orange) und die Phosphat-bindende Region (violett). Des Weiteren sind die Bereiche des „front“ und „back clefts“ und der „gate area“ dargestellt. Bild abgeleitet von ¹⁵.

Zwischen dem *N*- und *C*-Terminus befindet sich die Co-Substrate-Bindungstasche. Begrenzt wird diese Struktur durch die Hinge-Region. Sie enthält das ATP-Bindungsmotiv und steht im Fokus der Kinaseinhibitor-Entwicklung. Die Bindung des Co-Substrates wird durch zwei Wasserstoffbrückenbindungen (WBB) zum „backbone“-Sauerstoff und -Stickstoff ermöglicht. Weitere Stabilisierung erfährt das ATP durch van der Waalsche Wechselwirkungen mit hydrophoben Aminosäuren, die *N*- und *C*-terminal die Bindungstasche begrenzen. Zusätzlich dient ein konserviertes Magnesium- bzw. Mangan-Ion ¹⁶ zur Stabilisierung und Positionierung des Triphosphates sowie zur Kompensation dessen negativer Ladung ¹⁴. Mit dem konservierten Lysinrest stabilisiert das Magnesium-Ion den trigonal-bipyramidalen Zwischenzustand bei der nukleophilen Substitution. Die Bindungstasche wird allgemein in drei Bereiche eingeteilt, den vorderen („front cleft“), hinteren Taschenbereich („back cleft“) und den Bereich um den Gatekeeper („gate area“) ¹⁰. „Front“ und „back cleft“ werden in weitere Taschen differenziert, welche der genauen Lagecharakterisierung eines Liganden dienen und zur Optimierung der Selektivität herangezogen werden können. Die Methoden zur Verbesserung der Selektivität eines Inhibitors werden im Folgenden genauer beschrieben.

C-terminal der ATP-Bindungstasche befinden sich weitere funktionelle Einheiten der Kinase, darunter die Substratbindungsstelle und, wie im Fall der human Myt1-Kinase, die Membranbindungsdomäne (MBD) ¹⁷.

2.1.2 *Kinaseregulation*

Auf Grund der Beteiligung von Kinasen an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen muss es dem menschlichen Organismus möglich sein, deren Funktion zu regulieren. Dazu stehen ihm mannigfaltige Möglichkeiten zur Verfügung, unter anderem die Modifikation der Enzymexpression, wie sie für die DYRK1A Kinase (Dual-specificity tyrosine (Y) regulated kinase 1A) ¹⁸ beschrieben wird. Des Weiteren kann die Regulation der Kinasefunktion über folgende Mechanismen justiert werden ¹⁹:

- Regulation über second Messenger wie z.B. cAMP (z.B. cyclin AMP dependent protein kinase – cAPK), Ca²⁺/ Calmodulin Komplex (z.B. calmodulin dependent protein kinase) oder Ca²⁺ (z.B. Proteinkinase C (PKC)).
- Addition von Proteindomänen, welche die subzelluläre Lokalisation der Kinase beeinflussen (z.B. SH2 und SH3 Domäne an der Src Kinase)
- Kontrolle durch Autoregulation der Kinase (z.B. myosin light chain kinase – MLCK)
- Regulation durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung durch andere Kinasen

Die Aktivierung durch die Phosphorylierung einer Kinase ist die häufigste Art der Regulation und wird durch andere Kinasen innerhalb einer Kaskade oder durch autonome Prozesse (Autophosphorylierung) ermöglicht. Sie kann N- bzw. C-terminal entfernt von der Kinasedomäne erfolgen. Es hat sich jedoch gezeigt, dass die Zielaminosäuren der Phosphorylierung meist zentral in der Kinasedomäne zu finden sind. Der Bereich, in dem diese Aminosäuren enthalten sind, wird als Aktivierungsschleife bezeichnet ¹⁹. Durch Substitution eines oder mehrerer Phosphatreste an der Aktivierungsschleife kommt es zur Konformationsänderung auf Grund einer Potentialänderung. Dabei bewegt sich die Aktivierungsschleife von ihrer einwärts gerichteten Orientierung, unter Freilegung der ATP-Bindungstasche, nach außen (siehe Abbildung 2.2). Eine Bindung von ATP kann somit problemlos erfolgen. In der Aktivierungsschleife befindet sich das oben erwähnte DFG-Motiv. DFG-in und DFG-out geben die beiden Orientierungen der Schleife an und werden zur Definition der Kinasekonformation verwendet ¹⁰.

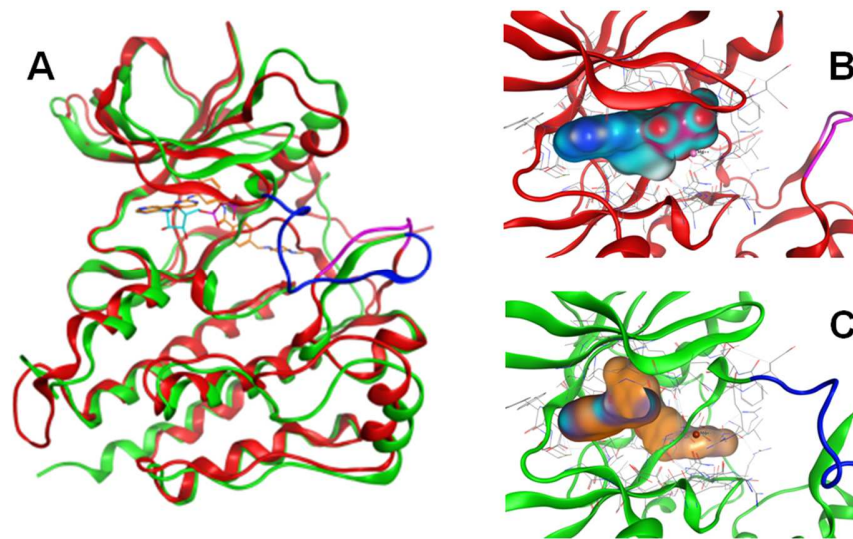


Abbildung 2.2: Vergleich der aktiven (PDB: 1PKG (rot)) und inaktiven (PDB: 1T46 (grün)) Kinasekonformation **A** am Beispiel der Kristallstruktur der c-Kit. In blau, nach innen gerichtete Aktivierungsschleife (DFG-out) und in pink nach außen gerichtete Aktivierungsschleife (DFG-in). **B** Größe der ATP-Bindungstasche bei DFG-in Konformation und **C** DFG-out Konformation. Erkennbar ist eine Vergrößerung des Volumens der ATP-Bindungstasche der inaktiven Kinase.

2.1.3 Kinaseinhibition

Mit Imatinib kam 2001 der erste Kinaseinhibitor zur Behandlung der chronisch myeloischen Leukämie (CML) auf den Markt. Derzeit sind 20 sogenannte „small molecule“ Kinaseinhibitoren durch die Behörden zum therapeutischen Gebrauch zugelassen. Generell existieren drei Möglichkeiten der Kinasehemmung.

Die erste Variante besteht in der Blockade der Substratbindungsstelle, um den Protein-Protein-Kontakt zu verhindern. Die Peptidsubstrate zeigen dabei naturgemäß ein mannigfaltiges Bindungsmuster, welches für kleinere Moleküle schwer nachzuahmen ist. Obwohl in der Literatur erfolgreich von Liganden berichtet wird²⁰, die mit der Substratbindungsstelle interagieren, findet diese Variante der Kinaseinhibition nur selten Anwendung. Die beschriebenen Verbindungen zeigen lediglich eine mikromolare Aktivität, welche aber in einer hohen *in vivo* Wirksamkeit resultieren kann. In diesem Fall liegt das Substrat, mit dem der Ligand konkurrieren muss, nur in geringen Mengen vor¹⁶.

Die zweite und häufigste Methode der Kinaseinhibition basiert auf der Verdrängung von ATP aus der Bindungstasche. Der großen Homologie der ATP-Bindungstasche geschuldet, vermindert sich jedoch die zwingend notwendige Selektivität dieser potentiellen Inhibitoren.

Die dritte Inhibitionsvariante ist die allosterische Hemmung über zusätzliche Bindungsstellen im Enzym. Bisher werden in der Literatur nur wenige Beispiele beschrieben, bei denen Kinasen allosterisch gehemmt werden, obwohl man die Entwicklung dieser Variante zur Ermittlung potentiell aktiver und selektiver Inhibitoren intensiv verfolgt ¹⁶.

Abgesehen von den obigen drei Möglichkeiten besteht ebenso durch den Einsatz von monoklonalen Antikörpern (AK) die Aussicht auf eine zielgerichtete Hemmung der Kinaseaktivität. Beispielhaft hierfür sind Cetuximab und Bevacizumab anzuführen, die zur Behandlung von Kolonkarzinom, in Kombination mit Chemotherapie, Anwendung finden ²¹.

Die größte Gruppe der „small molecule“ Kinaseinhibitoren stellen die ATP kompetitiven Inhibitoren dar. Eine detailliertere Differenzierung in Untergruppen basiert auf der Art der ATP Verdrängung. Eingeteilt werden sie dabei nach der Kinasekonformation, an der die Bindung stattfindet. Eine Übersicht der Eigenschaften der drei Typen von ATP-kompetitiven Inhibitoren gibt Tabelle 2.2 am Ende dieses Abschnitts. Die erste Generation von ATP-kompetitiven Inhibitoren wird als Typ I bezeichnet und wurde dazu entwickelt, an der aktivierten Kinase zu binden. Die offene Konformation entspricht der DFG-in Orientierung der drei konservierten Aminosäuren Asparaginsäure, Phenylalanin und Glycin. Typ I Inhibitoren imitieren das Bindungsmuster von ATP, vor allem die WBB zur Hinge-Region und die Ringstruktur des Adenins ¹⁵. Abbildung 2.3 A zeigt die Bindung der Typ I Inhibitoren am Beispiel von Dasatinib. Auf Grund der Verwendung von Kinasen in offener Konformation bei der Entwicklung der ersten Hemmstoffe, ist die Mehrzahl der heute bekannten Inhibitoren dem Typ I zuzuordnen. 2006 wurde mit Sunitinib der erste Multikinaseinhibitor vom Typ I von der FDA zugelassen. Einsatz findet dieser in der Therapie von gastrointestinalen Tumoren und fortgeschrittenen Nierenkarzinomen ²². Als unselektiver Inhibitor weist Sunitinib ein mannigfaltiges Nebenwirkungsprofil auf. Die hohe Cross-Aktivität lässt sich durch die Strukturhomologie der ATP-Bindungstasche bei aktivierten Kinasen begründen. Mit Erlotinib, einem „epidermal growth factor receptor“ (EGFR)-Inhibitor der Firma Roche-Gentech-Osi, gelang hingegen die Markteinführung eines selektiven Typ I Inhibitors zur Behandlung von nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen ²³.

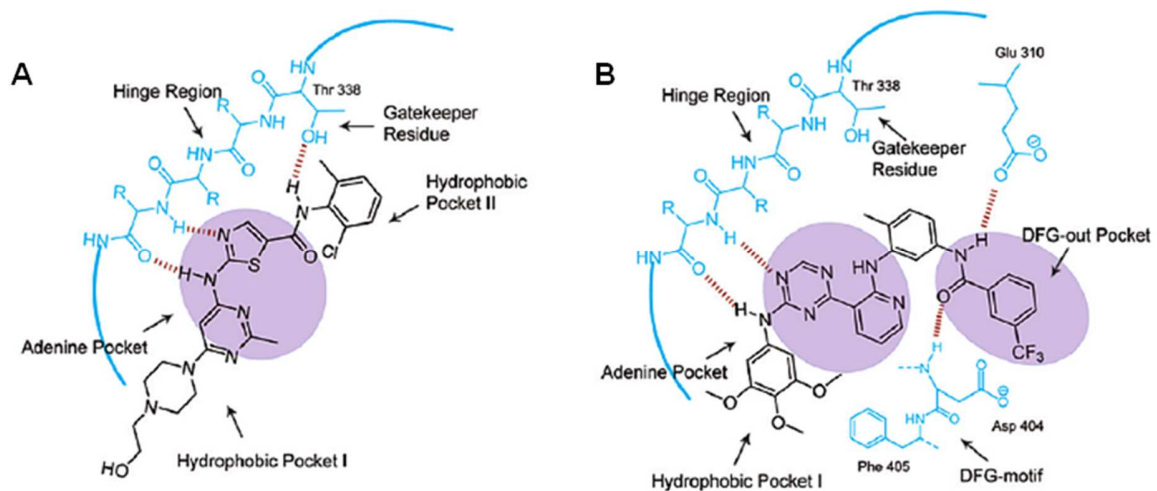


Abbildung 2.3: Bindungsmuster von Typ I und II Inhibitoren in der ATP-Bindungstasche. **A** Schematische Darstellung von Dasatinib, als Typ I Inhibitor in der Tyrosinkinase Src. Typ I Inhibitoren besetzen die Adenosin-Tasche und bilden 1-3 WBB zum Rückgrat der Hinge-Region aus. Dasatinib bildet zusätzlich eine WBB zum Gatekeeper Threonin aus. **B** Schematische Darstellung eines Typ II Inhibitors ebenfalls in der Tyrosinkinase Src. Typ II Inhibitoren bilden neben den WBB zur Hinge-Region noch weitere WBB zu konservierten Aminosäuren aus, wie Glutamat in der VC-Helix und Asparaginsäure im DFG-Motive²⁴.

Die konsequente Weiterentwicklung der Typ I Inhibitoren zugunsten einer erhöhten Selektivität und verlängerten Wirksamkeit mündete in der Entwicklung von Typ II Inhibitoren. Erstmals erfolgreich wurde ein solches Optimierungsprogramm, unter Zuhilfenahme von Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR), mit Imatinib abgeschlossen. Imatinib ist ein klassischer Vertreter der Typ II Kinaseinhibitoren³. Typ II Inhibitoren zeichnen sich durch ein erweitertes Interaktionsmuster aus und binden an der inaktiven Kinase, die durch eine einwärts gerichtete Aktivierungsschleife charakterisiert wird. Die damit einhergehende DFG-out Orientierung legt neue Interaktionsbereiche frei und ermöglicht so weitere Bindungen, die den Typ I Inhibitoren nicht zur Verfügung stehen¹⁵. So existiert z.B. eine zweite hydrophobe Tasche im vorderen Bereich der ATP-Bindungstasche, die durch zusätzlich eingefügte aromatische Ringsysteme besetzt werden kann.

Abbildung 2.3 **B** zeigt die schematische Darstellung der Interaktionen eines Typ II Inhibitors in der Tyrosinkinase Src. Neben den WBB zur Hinge-Region und den hydrophoben Wechselwirkungen mit der Adenosin-Tasche werden zwei weitere WBB zum Glutamat im hinteren Taschenbereich und zur Asparaginsäure im DFG-Motive ausgebildet. Zur weiteren Stabilisierung dienen hydrophobe Wechselwirkungen mit der zweiten hydrophoben Tasche

im „front cleft“¹⁰. Typ II Inhibitoren weisen häufig eine gesteigerte Wirksamkeit im Vergleich zu ihren zuvor entwickelten Typ I Partnern auf. Die Interaktion mit den zusätzlichen Bindungsbereichen führt jedoch zu einem größeren Molekulargewicht der Verbindungen und damit einhergehend einer reduzierten zellulären Penetration, die eine höhere Dosis notwendig macht²⁵. Die Entwicklung von Typ II Inhibitoren ist nicht für alle Kinasen möglich, da nur ein begrenzter Teil der im Kinom vorhandenen Kinasen auch eine zugängliche DFG-out Konformation aufweist. Erstmals beschrieben wurde dieses Phänomen für die Insulin-Rezeptor-Kinase (IRK)¹⁵ und später für eine Vielzahl anderer Kinasen über alle Subklassen verteilt. Die neueste Generation von Kinaseinhibitoren sind Hybride der schon beschriebenen Verbindungen. Sie werden als Typ I $\frac{1}{2}$ bezeichnet und vereinen die Charakteristika der Typ I und II Inhibitoren. Sie sind in der Lage, sowohl mit der aktiven als auch inaktiven Kinase zu interagieren. Dabei bilden sie die bekannten WBB zur Hinge-Region aus und besetzen ebenfalls die Adenosin-Tasche. Hinzu kommen Interaktionen mit der hydrophoben „gate area“, die naturgemäß nicht von ATP adressiert wird. Die Größe dieser Tasche wird vorwiegend vom Gatekeeper selbst bestimmt, wie in Abbildung 2.4 dargestellt. Ein kleiner Gatekeeper, wie beispielsweise Threonin, resultiert in einer großen hydrophoben Tasche und bildet die Basis für zahlreiche Wechselwirkungen zwischen Ligand und Protein. Auf diese Art und Weise sind eine Vielzahl von Interaktionen möglich. Die größere Tasche resultiert in einer gesteigerten Wirksamkeit und Selektivität dieser Verbindungen, ein Effekt, der bei kleineren Taschen nicht so ausgeprägt ist. Verkleinert wird hingegen das Taschenvolumen durch große Gatekeeper wie Phenylalanin¹⁰. Ein Beispiel für einen Typ I $\frac{1}{2}$ Inhibitor ist die Verbindung AP23646, welche die Src Kinase mit picomolarer Affinität adressiert²⁶.

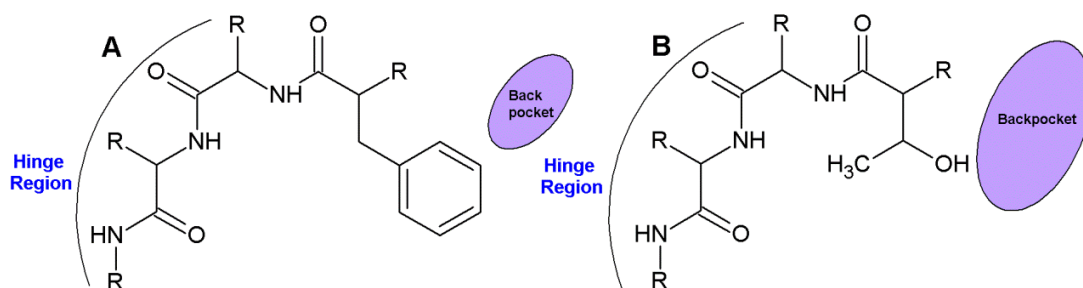


Abbildung 2.4: Vergleich der hydrophoben „back pockets“ entsprechend der Aminosäure des Gatekeepers. **A** Phenylalanin als Gatekeeper resultiert in eine kleine „back pocket“, der wenig Raum für Interaktionen eröffnet. **B** Threonin als Gatekeeper führt zu einem vergrößertem „back pocket“ und damit einhergehend mannigfaltige Interaktionsmöglichkeiten. Bild abgeleitet von¹⁵.

Neben den klassischen ATP-kompetitiven Inhibitoren kann ATP auch anderweitig an seiner Bindung in der Tasche be- bzw. gehindert werden. Beispielsweise resultiert ein Austausch des stabilisierenden Magnesium- bzw. Mangan-Ions der Bindungstasche durch Lithium in einer Enzymhemmung durch Verlust des ATP Bindungsvermögens. Beschrieben wurde dieser Effekt für die Kinase GSK3 β ²⁷.

Eine weitere, jedoch selten eingesetzte Möglichkeit ATP zu verdrängen, ist die Verwendung von kovalenten Kinaseinhibitoren, die eine Bindung zum in der Tasche vorhandenen Cystein ausbilden. Damit wird die Kinase dauerhaft blockiert und muss von der Zelle neu gebildet werden. Zwei Inhibitoren mit diesem Mechanismus befinden sich in der klinischen Testung zur Therapie von Lungenkarzinomen. Ihre Zielstruktur ist dabei der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) ²⁸.

Tabelle 2.2: Zusammenfassung der Eigenschaften ATP kompetitiver Inhibitoren von Typ I, I 1/2 und II ¹⁵

	Typ I	Typ I 1/2	Typ II
Kinasekonformation	aktiv/inaktive	aktiv/inaktive	inaktive
DFG-Konformation	in/out	in	out
Gültigkeit für jede Kinase	Ja	Nur mit kleinem oder mittelgroßen Gatekeeper	Nur mit kleinem oder mittelgroßen Gatekeeper
Bindungsstelle	ATP	ATP und Gatekeeper-„back pocket“	ATP und weiter „back pockets“
Bindung Hinge-Region	Ja	Ja	Ja
Selektivität	gering	Ja über Bindung in „back pocket“ möglich	Ja über Bindung in allosterischen Bereichen oder anderen Räumen der ATP-Bindungstasche
Resistenzentwicklung	Ja, Mutationen der ATP-Bindungstasche	Ja, Mutationen der ATP-Bindungstasche und des Gatekeepers	Ja, Mutationen der ATP-Bindungstasche und anderer Taschen

2.1.3.1 Selektivität von Kinaseinhibitoren

Eines der Hauptprobleme bei der Entwicklung von Kinaseinhibitoren ist deren geringe Selektivität, die in der klinischen Anwendung zu einer Vielzahl von Nebenwirkungen führen kann. Aus diesem Grund ist es das Ziel, selektive Kinaseinhibitoren zu entwickeln. Unter dem Terminus der Selektivität versteht man die Eigenschaft eines Inhibitors, nur einen kleinen Teil der bekannten Kinasen zu hemmen. Um die Selektivität anzugeben, verwendet man allgemein das Verhältnis der Inhibitionskonstanten (K_i) von verschiedenen Kinasen ²⁹. Zur besseren Vergleichbarkeit und Darstellung wird der Selektivitätsscore $S(x\mu M)$ angewendet, der das Verhältnis zwischen der Anzahl an gehemmten Kinasen, bei definierten Inhibitorkonzentrationen ($x\mu M$) und allen getesteten Kinasen angibt ³⁰. Der Wertebereich liegt zwischen 0 und 1, wobei ein hoher Score von 0,87 für einen unselektiven Inhibitor wie Staurosporin erhalten wird, hingegen für den selektiven EGFR/ERBB2 Inhibitor Lapatinib ein Score von 0,01 erzielt werden kann ³⁰. Mit dem Gini-Koeffizient besteht eine weitere Möglichkeit, die Selektivität eines Inhibitors anzugeben. Er bezieht sich auf die Summe der Inhibitoren aller Kinasen und kann von einem kleinen Testdatensatz auf das gesamte Kinom übertragen werden. Dabei ist er allein von der Inhibitorkonzentration abhängig. Analog zum Selektivitätsscore ergeben sich Werte zwischen 0 und 1, wobei z.B. Staurosporin einen Wert von 0,15 erhält und der selektive MAPKK1-Inhibitor PD184352 einen Wert von 0,90 ²⁹. Im Folgenden soll ein Überblick über die Möglichkeiten geben werden, die Selektivität von Kinaseinhibitoren zu erhöhen.

- I. **Interaktion mit der inaktiven Kinasekonformation:** In der DFG-out Konformation liegen verschiedene Taschen im „back cleft“ frei, in denen eine Verbindung interagieren kann. Dabei sind sowohl WBB mit NH-Atomen des Rückgrats und des konservierten Lysins möglich, als auch hydrophobe Wechselwirkungen oder B-B Interaktionen zwischen Aromaten ¹⁰. Diese Interaktionen mit heterogenen „back pockets“ können die Selektivität zuverlässig erhöhen und wurden z.B. für Foretinib, einen c-MET Inhibitor ³¹, und für Rebastinib, einen ABL1 Inhibitor, beschrieben ³².
- II. **Interaktion mit anderen Bereichen der ATP-Bindungstasche:** Die meisten Kinasen liegen jedoch nur in der DFG-in Konformation vor ¹⁵. Diese wird durch eine einwärtsgerichtete Orientierung von Asp und Phe charakterisiert. Diese 180° Drehung der Aminosäuren führt zu einer Besetzung des „back clefts“ ¹⁰. In dieser Konformation liegen kinasespezifische Taschen im „front cleft“ frei, die vor allem

- durch hydrophobe Eigenschaften charakterisiert werden. Ein Adressieren dieser Taschen durch den Inhibitor kann die Selektivität und Wirksamkeit erhöhen. Das Beispiel Tofacitinib, ein JAK3 Kinaseinhibitor, zeigt, dass die Besetzung der „front pockets“ zu einem selektiven Wirkstoff führt^{30, 33}. Alternativ können Interaktionen mit dem Gatekeeper bzw. das Besetzten der „gate area“ die Selektivität einer Verbindung erhöhen. Wie oben beschrieben ist der Gatekeeper von Kinase zu Kinase verschieden und damit einhergehend die Größe und chemischen Eigenschaften der dahinter liegenden Tasche¹⁵. Eine Verbindung, die sowohl eine WBB zum Gatekeeper Threonin ausbildet, als auch die hydrophobe Tasche besetzt, ist der selektive ABL1 Inhibitor der zweiten Generation Dasatinib³⁴.
- III. **Hinge-Flip:** Das seltene Phänomen der strukturellen Umlagerung der Hinge-Region, auch als Hinge-Flip bezeichnet, ermöglicht eine zusätzliche WBB zur Hinge-Region. Dabei kommt es zu einer 180° Drehung eines Glycins in der Hinge-Region, was in einer einwärts gerichteten NH-Gruppe resultiert. Der anstelle eines Carbonyl-Sauerstoffs vorhandene Wasserstoff dient dadurch als zusätzlicher WBB-Donator. Nur 46 Kinasen enthalten die Aminosäure Glycin in der Hinge-Region und sind zu einem Hinge-Flip fähig¹⁰. Für p38 wurden Inhibitoren entwickelt, die diese Phänomen ausnutzen, um an der Kinase zu binden³⁵.
- IV. **Interaktion mit konservierten Wassermolekülen:** In sehr ähnlichen Bindungstaschen können konservierte Wassermoleküle eine Schlüsselrolle in der Optimierung der Selektivität übernehmen. Dabei vermitteln sie essentielle WBB mit taschenfernen Aminosäuren. Für die Kinasepaare ABL1/c-Kit und CDK2/4 konnten die enthaltenen Wassermoleküle als Ursache für die experimentellen Selektivitätsunterschiede identifiziert werden^{36, 37}.
- V. **Elektrostatische Komplementarität:** Die Interaktion von geladenen Gruppen mit anderen neutralen Gruppen oder Wasser verstärkt die Bindungsaffinität der Moleküle und kann zur Erhöhung der Selektivität verwendet werden. Erfolgreich wurde dieses Prinzip für die Protein-Tyrosin-Phosphatasen (PTP) angewandt³⁸.
- VI. **Allosterische Hemmung:** Für einige Kinasen konnten in den letzten Jahren neue Interaktionsbereiche identifiziert werden, die außerhalb des ATP bindenden Bereiches lokalisiert sind. Mit PD098059 wurde der erste nicht-kompetitive MEK1 Inhibitor synthetisiert³⁹. Die beschriebenen allosterischen Taschen sind innerhalb der

Kinasen sehr inhomogen aufgebaut und ermöglichen so die Entwicklung von sehr selektiven Inhibitoren, wie der Gini-Score von PD184352 (0,90) verdeutlicht ²⁹. Das Adressieren von allosterischen Taschen stellt derzeit eines der erfolgversprechendsten Tools zur Kinaseinhibitor-Entwicklung dar, jedoch ist es schwer, solche Taschen zu identifizieren und mit Hilfe von *in silico* Methoden neue Hemmstoffe dafür zu entwickeln ³⁶.

2.1.3.2 Resistenzen gegen Kinaseinhibitoren

In der klinischen Anwendung bekannter Kinaseinhibitoren hat sich gezeigt, dass neben dem Problem der Selektivität die Entstehung von Resistenzen und der damit einhergehende Wirkverlust die Einsatzmöglichkeiten der Wirkstoffe reduzieren. Die Resistenzen basieren in fast allen Fällen auf Punktmutationen einzelner Aminosäuren in der Kinasedomäne und sind das Resultat des hohen Selektivitätsdrucks auf die adressierte Kinase. Dabei ist das mögliche Spektrum an Mutationen begrenzt, weil die katalytische Funktionalität in jedem Fall gewährleistet werden muss. Erstmals wurden Mutationen an der Kinasedomäne von ABL1 beobachtet, welche das Target von Imatinib darstellt. Derzeit sind 50 Mutationen im Zusammenhang mit der Imatinib-Resistenz bekannt ²⁴. Einige der Mutationen betreffen den „P-Loop“ und unterbinden die WBB von Imatinib mit dem Asparagin322 im „C-Loop“ bzw. die aromatischen Wechselwirkungen mit Tyrosin253 ⁴⁰. Neben Mutationen, die direkt die Interaktionen des Wirkstoffs unterbinden, wurden auch Mutationen beschrieben, welche die inaktiven DFG-out Konformationen destabilisieren und das Binden von Typ II Inhibitoren verhindern ⁴¹. Das Resultat einer Glu255 Mutation ist eine stabilisierte aktive DFG-in Konformation, die das Target von Dasatinib darstellt, ein ABL1-Inhibitor der zweiten Generation. Ebenfalls zur zweiten Generation gehört Nilotinib, welches die Tyr253 und Glu255 „P-Loop“ Mutanten adressiert ⁴². Allgemein kann nachgewiesen werden, dass die inaktive Kinasekonformation anfälliger für Mutationen ist, da ein Verlust der katalytischen Wirkung der Kinase selten daraus resultiert. Man kann in diesem Zusammenhang von einer besseren Verträglichkeit der Mutation sprechen, die für die aktive Konformation nicht vorliegt ¹⁵.

Eine weitere beschriebene Mutation der ABL1 Kinase ist der Austausch der Gatekeeper Aminosäure, die in 15 % der Fälle Ursache der Imatinib-Resistenz ist ⁴³. Diese resultiert in dem Verlust der WBB mit dem Threonin315 und führt zum sterischen Zusammenstoß von

Imatinib mit dem Gatekeeper⁴⁴. Bekannt ist diese Mutationen auch für andere Kinasen und deren Inhibitoren, wie z.B. für die EGFR Kinase und Gefitinib⁴⁵ bzw. Aurora A Kinase und VX-680⁴⁶. Die Entstehung von Resistenzen ist eine fortlaufende Herausforderung der Wirkstoffentwicklung und wird zukünftig auch in der Kinaseforschung eine zentrale Rolle einnehmen. Ziel dabei wird es sein, Mutanten-selektive Inhibitoren zu identifizieren, um der zunehmenden Resistenzentwicklung entgegen zu treten.

2.2 Wee-Familie

Die Wee-Kinase Familie besteht aus drei Mitgliedern, Wee1, Wee1b und Myt1, wobei sich die beiden Wee1 Kinasen in ihrer zeitlichen und räumlichen Expression unterscheiden. Es hat sich gezeigt, dass nur die Wee1 Kinase in somatischen Zellen relevant ist⁴⁷, deswegen wird Wee1b in den folgenden Betrachtungen ausgeklammert und nur auf Wee1 und Myt1 eingegangen. Die Wee-Familie kann keiner der sieben Proteinkinase-Subgruppen zugeordnet werden und wird deswegen unter „Other“ geführt⁴⁸. Die Zielstruktur dieser Arbeit stellt die Myt1-Kinase dar. Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über die strukturellen Merkmale der humanen Myt1-Kinase und deren Funktion geben. Dabei soll im Besonderen die Eignung der Myt1 als Target-Struktur in der Krebsforschung hervorgehoben werden.

2.2.1 Strukturelle Merkmale

Die membranassoziierte Tyrosin- und Threonin-spezifische, Cdk1 inhibierende Kinase 1 (Myt1), wurde 1995 erstmals von Müller et al. beschrieben. Identifiziert wurde sie durch die Analyse von cDNA aus *Xenopus* Oozyten⁴⁹. Durch Genanalytik konnte eine Zugehörigkeit zur zuvor in *Schizosaccharomyces pombe* identifizierten Wee1 Kinase⁵⁰ hergestellt werden⁵¹. Die Myt1 besteht aus 499 Aminosäuren (AS), wobei sich die eigentliche Kinasedomäne über einen 211 AS langen Bereich von AS 110 bis 321 erstreckt. Der Aufbau der Kinasedomäne entspricht dem in Abbildung 2.1 A dargestellten allgemeinen Kinaseaufbau. C-terminal der Kinasedomäne befindet sich die 20 AS lange Membran-Bindungs-Domäne (AS: 379-398), die für die Verankerung der Kinase im endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi Komplex verantwortlich ist. Die MBD bildet eine ∇ -Helix-artige Struktur in der Lipiddoppelschicht¹⁷. Die 20 AS dieser Domäne sind vermutlich zu kurz, um vollständig die Membran zu durchdringen. Deswegen wird davon ausgegangen, dass die AS 362 bis 402 in der Membran lokalisiert sind¹⁷. C-terminal folgend befindet sich die substratbindende Domäne (AS 436-499), welche das RXL Motiv enthält. Im Falle der Myt1-

Kinase besteht dieses Motiv aus den Aminosäuren Arginin 486, Asparagin 487 und Lysine 488 und ist für die Substraterkennung von Cyclin B1 essentiell⁵². Aus diesem Aufbau ergibt sich, dass die Kinasedomäne und die Substratbindungsdomäne vom Cytoplasma umgeben werden und die MBD im endoplasmatischem Retikulum lokalisiert ist. Vergleicht man die humane Myt1-Kinasedomäne mit der humanen Wee1 Domäne sind 32 % der AS identisch^{17, 53}. Ein Abgleich der Aminosäuresequenz der Kinasedomäne der Wee1 mit anderen Kinasen zeigt einen Serin-Threonin-Charakter⁵¹ und eine Verwandtschaft zur Aurora Kinase⁵⁴ sowie Chk1 Kinase (Checkpoint Kinase)⁵⁵. Die Wee1 ist eine 646 Aminosäuren lange, lösliche Kinase⁵⁶, die im Nukleus lokalisiert ist⁵⁷. Sie zeigt eine ausgeprägte N-terminale Domäne, die für die Regulation der Kinasefunktion verantwortlich⁵⁶, aber für eine *in vivo* Funktionalität nicht essentiell ist⁵⁸. C-terminal der Kinasedomäne ist ein weiterer regulatorischer Abschnitt lokalisiert, der mit 14-3-3 Proteinen interagiert⁵⁹ oder durch Phosphorylierung modifiziert wird^{56, 60}.

2.2.2 Die physiologische Rolle der Myt1 in der Zelle

Um die Funktion der Wee-Kinasen und im besonderen der Myt1 besser verständlich zu machen, soll in diesem Abschnitt der Zellzyklus und dessen Regulation kurz erläutert werden. Das Hauptaugenmerk soll dabei auf dem G2/M Checkpoint liegen, an dessen Regulation die Myt1-Kinase beteiligt ist.

Die Regulation der Myt1-Kinasefunktion ist nach dem derzeitigen Stand der Wissenschaft noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass die Myt1-Kinase ein direktes Target der Plk1 Kinase (Polo like kinase 1) darstellt und durch Phosphorylierung inhibiert wird⁶¹. Des Weiteren unterliegt die Myt1-Kinase einem internen „Feedback-Loop“ durch Cdk1/Cyclin B1 und wird durch dessen aktiven Komplex inhibiert⁶². Es ist weiterhin bekannt, dass die Myt1 mit der Pin1 interagiert⁶³ und ein indirektes Target der MEK1 ist⁶⁴. Außerdem wird eine Stabilisation der Myt1 durch HSP90 beschrieben⁶⁵. Die Kinasefunktion wird jedoch nicht, wie bei der Wee1, durch Degradation reguliert⁶⁶. All diese Erkenntnisse über die Regulation der Myt1-Kinase sind erst der Beginn einer vollständigen Aufklärung der Zusammenhänge und stehen derzeit noch für sich allein.

2.2.2.1 Der Zellzyklus und die Regulation durch Checkpoints

Bei der Zellreplikation durchläuft jede Zelle mehrere Phasen. Der Zellzyklus wird in zwei Teile gegliedert, die M-Phase, in der die Mitose stattfindet und die Interphase, die durch

Zellwachstum und der Vorbereitung der nächsten Mitose bestimmt wird. Die Interphase wird wiederum in drei Phasen unterteilt und beginnt nach erfolgreicher Mitose mit der G₁-Phase. Diese Phase ist hauptsächlich durch Zellwachstum und der Neubildung fehlender Zellbestandteile gekennzeichnet. Neben der Neubildung benötigten Enzyme und Proteine, werden in der G₁-Phase DNA-Schäden repariert und mRNA synthetisiert. In dieser Phase liegt der diploide Chromosomensatz als Ein-Chromatid vor. Der G₁-Phase ist die S-Phase angeschlossen, in der die DNA-Synthese stattfindet und jedes Chromatid verdoppelt wird. Am Ende dieser Phase liegt ein vollständiger doppelter Chromosomensatz vor. Anschließend geht die Zelle in die G₂-Phase über. Charakterisiert ist diese Phase durch die Vorbereitung auf die anstehende Mitose. Dabei werden die in der G₁-Phase produzierten Enzyme und Proteine modifiziert und der Zell-Zell-Kontakt gelöst, zellteilungsspezifische Proteine vorbereitet und die replizierte DNA auf Schäden kontrolliert. Dem folgend geht die Zelle in die M-Phase über, in der die Chromosomen auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt werden. Dieser Phase schließt sich eine erneute G₁-Phase an, in der entweder eine neue Zellteilung vorbereitet wird oder die Zelle in die G₀-Phase übergeht und sich differenziert⁶⁷.

Um sicherzustellen, dass alle Prozesse während des Zellzyklus vollständig und korrekt abgelaufen sind, wird der Übergang von einer Phase in die Folgende kontrolliert. Diese Kontrollpunkte werden als Checkpoints bezeichnet und stoppen die Zelle in ihrem Zyklus, unter anderem um entstandene DNA-Schäden zu beheben. Damit schützt sich die Zelle vor genomischer Instabilität. Unterschieden werden sie in DNA- und Spindel-Checkpoints⁶⁷.

Liegt ein DNA-Schaden vor, wird am G₁/S Checkpoint die Zelle daran gehindert, zu früh in die S-Phase überzugehen und schadhafte DNA zu replizieren. Dabei wird der Schaden durch die „upstream“ Kinase ATM erkannt, welche die Chk2 aktiviert und dadurch die Phosphorylierung von CDC25A induziert^{68,69}. Diese Phosphorylierung inaktiviert CDC25A und blockiert somit den Zellzyklus⁷⁰. Analog dazu kann diese Phosphorylierung auch durch p53 vermittelt werden⁷¹. Der S/G₂ Checkpoint dient der Behebung von DNA Replikationsfehlern und Schäden, die während der S-Phase entstanden sind. Der Schaden wird ebenfalls von ATM oder einer weiteren „upstream“ Kinase (ATR) erkannt⁷² und führt ebenfalls zur Inaktivierung des Cdk2/Cyclin E(A) Komplex^{73,74}.

In der Vorbereitung auf die Mitose werden in der G₂-Phase DNA-Schäden repariert, die während der anderen Phasen und Arreste nicht behoben werden konnten⁷⁰. Der G₂/M Checkpoint stellt sicher, dass nur vollständige und korrekt replizierte Chromosomen auf die

Tochterzellen verteilt werden. Die Kinasen der Wee-Familie nehmen eine Schlüsselrolle in der Regulation des G₂/M Checkpoints ein. Daher wird im folgenden Abschnitt detailliert auf die Prozesse am G₂/M Checkpoint eingegangen. In der Mitose wird an einem weiteren Checkpoint sichergestellt, dass die Spindelbildung korrekt verlaufen ist und die Chromatide fehlerfrei auf die Tochterzellen verteilt werden können. Dieser Checkpoint wird als Metaphase-Checkpoint bezeichnet und gilt als Spindel-Checkpoint ⁶⁷.

2.2.2.2 Der G₂/M Übergang

Die zentrale Rolle am G₂/M Checkpoint übernimmt der Cdk1/Cyclin B1-Komplex, welcher auch als Maturation-Promoting-Factor oder Mitose-Promoting-Factor (MPF) bezeichnet wird ⁷⁵. Reguliert wird er durch die Bindung von Cyclin B1 an Cdk1 und durch Phosphorylierung von Cdk1 selbst. Die Anlagerung von Cyclin B1 ist von der zellulären Konzentration abhängig und muss einen Schwellenwert überschreiten ⁷⁶. Die höchsten Konzentrationen sind während der G₂-Phase und der frühen M-Phase zu beobachten. Induziert wird die Bindung von Cyclin B1 durch verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie NF-Y ⁷⁷, FoxM1 ⁷⁸ und B-Myb ⁷⁹. Die zytosolische Konzentration wird zusätzlich durch einen erhöhten nukleären Export von Cyclin B1 gesteigert ⁸⁰. Der Abbau von Cyclin B1 beginnt in der Mitose und wird durch den Anaphase-promoting-Complex/Cyclosom (APC/C) reguliert ⁸¹. Um die Funktionalität des MPF zu ermöglichen, muss die gebundenen Cdk1 aktiviert sein. Die Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung von Thr161, vermittelt von CAK (Cyclin-activating-kinase) ⁸². Eine weitere Phosphorylierung von Thr14 und Tyr15 durch Wee1 und Myt1 inhibiert die Cdk1. Die Wee1 Kinase ist dabei nur zur Phosphorylierung von Tyr15 befähigt ⁵⁶, wohingegen die Myt1-Kinase eine dual-spezifische Funktion aufweist und sowohl Tyr15, als auch Thr14 phosphorylieren kann ⁴⁹. Die Inaktivierung ist durch Dephosphorylierung von Thr14 und Tyr15 reversibel. Vermittelt wird diese Dephosphorylierung durch die CDC25 Phosphatasen ¹³. Inaktiviert werden die CDC25 Phosphatasen durch Chk1 und 2, die ihrerseits durch ATR und ATM aktiviert werden ^{83, 84, 85}. DNA-Schäden werden wie oben erwähnt durch die Kinasen ATR und ATM erkannt ⁷⁰, wobei ATR bei Schäden durch Replikationsstress oder UV-Strahlung aktiviert wird und selbst eine Kaskade über Chk1 vermittelt. ATM dagegen wird durch einen γ -Strahlen induzierten Schaden aktiviert und vermittelt die Kaskade über Chk2 ⁸⁶.

2.2.2.3 Die Regulation des Eintrittes in die Mitose durch Myt1

Um den Eintritt in die Mitose auszulösen, muss die gesamte Menge an Cdk1/Cyclin B1-Komplex schlagartig aktiviert werden⁸⁷. Die Aktivierung ist dabei von der abrupten Dephosphorylierung durch CDC25 abhängig^{88, 89}. Voraussetzung dafür ist eine Bindung von Cyclin B1 an Cdk1 und die Phosphorylierung von Thr161 der Cdk1⁹⁰. Die Bindung der beiden Proteine stellt dabei den ersten Schritt zum aktiven Komplex dar. Der Komplex ist hauptsächlich im Zytosol lokalisiert, kann aber auch in den Nukleus transportiert werden. Nach der Anlagerung von Cyclin B1 an die Cdk1 vermitteln Wee1⁵⁶ und Myt1 die Phosphorylierung an Thr14 und/oder Tyr15⁶². Der einfach bzw. zweifach phosphorylierte Komplex ist instabil und kann in seine Bestandteile zerfallen. Die anschließende Phosphorylierung an Thr161 durch die nukleäre CAK⁸² resultiert in einem stabilen Komplex, der durch die CDC25 vermittelte Dephosphorylierung aktiviert wird (siehe Abbildung 2.5). Die Untersuchungen von Coulonval et al. haben gezeigt, dass die Myt1-Kinase eine separate Rolle beim Import des Cdk1/Cyclin B1-Komplexes in den Zellkern übernimmt⁸⁸. Man nimmt an, dass die Interaktion des Komplexes mit der Myt1, hervorgerufen durch die Interaktion von Cyclin B1 mit dem C-terminalem RXL-Motiv der Myt1⁵², den Transport in den Nukleus ermöglicht. Es hat sich gezeigt, dass die Phosphorylierung durch CAK von der Myt1-Expression, aber nicht von der Thr14 Phosphorylierung der Cdk1 abhängig ist⁸⁸. Der inhibierte Komplex steht zur Aktivierung bereit. Das Signal dafür wird nach kompletter Reparatur der DNA durch Chk1/2 vermittelt⁷⁰. Die Myt1-Kinase spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation des Mitoseeintritts, hat aber keinen Einfluss auf den Zeitpunkt des Eintritts⁶⁶.

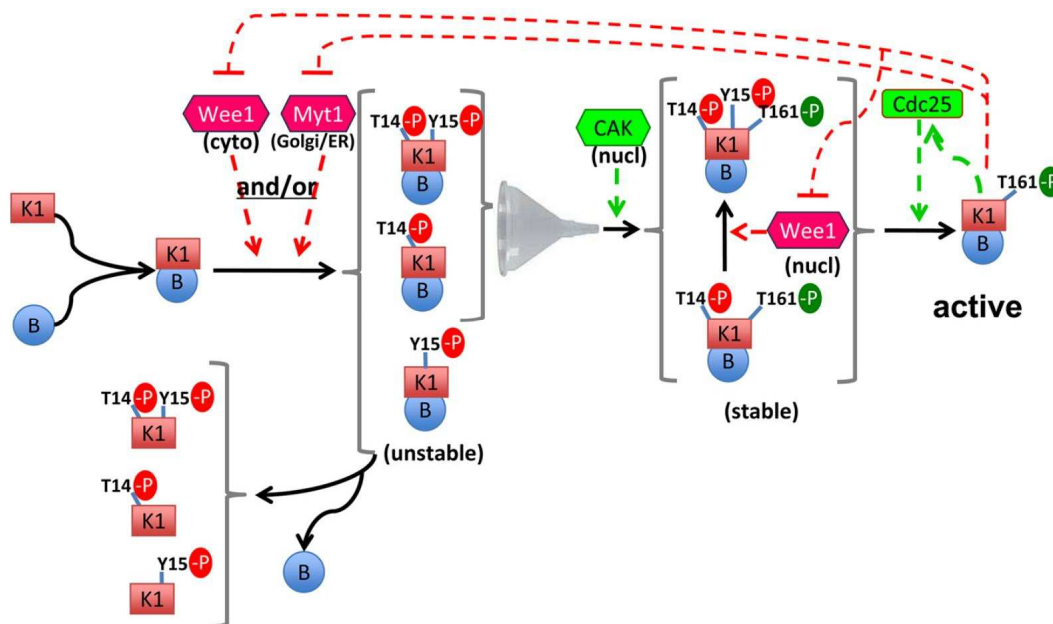


Abbildung 2.5: Überblick über die Regulation des Cdk1/Cyclin B1 Komplexes übernommen von ⁸⁸. K1 steht für Cdk1 und B ist Cyclin B1. Die genau ablaufenden Prozesse sind unter 2.2.2.3 beschrieben.

2.2.2.4 Intrazelluläre Membrandynamik und Mitoseaustritt

Nachdem die Zelle in die Mitose eingetreten ist, liegt Myt1 in der inaktiven, hyperphosphorylierten Form vor ⁶¹. Am Ende der Mitose übernimmt sie jedoch wieder eine essentielle Rolle. So beschreiben Nakajima et al., dass die Myt1-Kinase beim Aufbau des Golgi Apparates und des Endoplasmatischen Retikulums (ER) beteiligt ist. Es wurde gezeigt, dass der Wiederaufbau des Golgi Apparates während der Telophase und des ER während des Mitoseaustritts von der Myt1-Aktivität abhängig ist. Die Myt1 beeinflusst jedoch nicht die Biogenese und die Aufrechterhaltung der Strukturen in der Interphase. Vermittelt wird die Funktion durch die Cdk1/Cyclin B1 und B2 Aktivität ⁹¹. Die Myt1 ist demnach erforderlich für die Kontrolle der intrazellulären Membrandynamik beim Mitoseaustritt. Um zudem einen korrekten Ablauf der G₁-Phase sicherzustellen und die richtige Länge der Reversibilitätsperiode des G₁ zu gewährleisten, muss Cdk1 inaktiviert werden. Dazu müssen die in der Mitose inaktiven Wee1 und Myt1 aktiviert werden und CDC25 inaktiviert. Dieser Vorgang findet kurz nach dem Mitoseaustritt statt. Eine korrekte Funktion der Wee1 und Myt1 ist notwendig, um eine zu frühe Reaktivierung der Cdk1 in der späten G₁-Phase zu verhindern, die sonst im Zelltod resultieren würde ⁹².

2.2.2.5 Wiedereintritt in den Zellzyklus nach G₂-Arrest

Der Zellzyklusarrest am G₂/M Checkpoint dient der Reparatur von DNA-Schäden, die zuvor nicht repariert werden konnten oder in den vorgestellten Phasen entstanden sind. Sind alle Schäden behoben erhält die Zelle das Signal, wieder in den normalen Zellzyklus einzutreten. Diese Wiederherstellung nach dem G₂/M-Arrest wird auch als Checkpoint-„recovery“ bezeichnet. Bei der Regeneration der Zelle findet eine schrittweise Erhöhung der Cyclin B1 assoziierten Kinaseaktivität statt und eine Reduktion der Cdk1-Tyr15 Phosphorylierung ist zu beobachten⁹³. In diesen Zellen kann auch eine erhöhte Plk1 Aktivität nachgewiesen werden. Die Tyr15 Phosphorylierung der Cdk1 ist die Schlüsselstelle bei der Kontrolle des Zellzyklus-Neustarts und wird vorwiegend durch Wee1 ermöglicht⁵⁶. Die Plk1 ist ein Negativ-Regulator der Wee1 und Myt1 und vermittelt die Degradation der Wee1 Kinase⁹⁴, damit hemmt es deren Aktivität und führt zur Reduktion der Tyr15 Phosphorylierung. Die neueren Ergebnisse von Chow und Poon haben ergeben, dass die Myt1-Kinase eine wichtige Rolle beim Checkpoint-„recovery“ übernimmt und unabhängig von Wee1 ist. Sie haben des Weiteren gezeigt, dass die Myt1 eine untergeordnete Rolle für den Ablauf des normalen Zellzyklus in gesunden Zellen spielt. Zusätzlich wurde am Maus-Modell gezeigt, dass eine Hemmung von Myt1, in Kombination mit der Existenz eines DNA-Schadens, das Tumorwachstum reduziert⁶⁶. Der Zusammenhang von Myt1-Aktivität und Checkpoint-„recovery“ wurde auch *in silico* untersucht und in einem mathematischem Modell bestätigt⁹⁵.

2.2.3 *Myt1 als Target-Struktur in der Krebsforschung*

Ein Großteil der derzeit bekannten Krebsarten weist eine Mutation von p53 auf. p53 übernimmt eine essentielle Rolle am G₁/S Checkpoint. Ist es in seiner Funktion auf Grund der Mutation gestört, kann kein G₁/S-Arrest eingeleitet werden⁹⁶ und eine Reparatur von entstandenen DNA-Schäden kann nur noch am G₂/M Checkpoint erfolgen⁹⁷. Diese Abhängigkeit der Krebszellen vom G₂/M Checkpoint lässt sich in der Therapie ausnutzen. In dem der G₂/M Checkpoint gehemmt wird, meist in Kombination mit einem DNA-schädigenden Agens⁹⁸ oder radioaktiver Strahlung⁹⁹, kommt es zur vermehrten Apoptose der Zellen. Da gesunde Zellen auf ihren p53 vermittelten G₁/S Checkpoint zurückgreifen können, werden so nur p53 defiziente Krebszellen adressiert^{85, 100}. Um sich diese selektive Methode der Krebsbekämpfung zu Nutze zu machen, stehen verschiedene Möglichkeiten der G₂/M Checkpoint Aufhebung zur Verfügung⁷⁰. Würde der G₂/M Checkpoint aufgehoben, könnten keine DNA-Schäden mehr repariert werden und die Zelle würde permanent in die Mitose eintreten. Eine mitotische Katastrophe wäre die Folge^{101, 102}. Aus ihr resultiert der apoptotische bzw. der nicht-apoptotische Zelltod¹⁰³.

Targets, die bei der G₂/M Checkpoint Aufhebung eine Rolle spielen, sind Wee1^{85, 99, 104}, Myt1¹⁰⁰, Chk1^{70, 105} und Hsp90¹⁰⁶. Mit der Entdeckung des selektiven Wee1 Inhibitors MK-1775 konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Cdk1 inaktivierenden Kinasen erfolgreich zur G₂/M Checkpoint Aufhebung verwendet werden kann⁵. MK-1775 allein zeigt nur einen geringen Effekt auf das Tumorwachstum, aber in Kombination mit verschiedenen Chemotherapeutika wie Gemcitabin, Carboplatin oder Cisplatin konnten vielversprechende Ergebnisse erzielt werden⁵. Unter Verwendung von MK-1775 kann eine Reduzierung der Chemotherapeutika und damit einhergehend eine Verminderung von „off“-Target-Effekten ermöglicht werden. In darauf folgenden Untersuchungen konnte auch die Erhöhung der Effizienz von 5-Fluorouracil nachgewiesen werden¹⁰⁷. MK-1775 wurde im Rahmen unterschiedlicher Testung an der Chronisch myeloischen Leukämie¹⁰⁸ untersucht. Verwandte Verbindungen zeigten auch einen Effekt auf Lungenkarzinomzelllinien¹⁰⁹. Derzeit befindet sich MK-1775 in der klinischen Phase II Testung und wird an verschiedenen Krebsarten, wie dem Gebärmutterhalskrebs (NCT01076400), dem Ovarialkarzinom (NCT01164995) oder dem Lungenkarzinom (NCT02087176) getestet⁶.

Versuche mit Myt1-, „knockdown“ Zellen haben gezeigt, dass die Zellen zu früh in die Mitose eintreten⁶⁴ oder der G₂/M Checkpoint vollständig aufgehoben wird¹¹⁰. Eine Hemmung oder Downregulation der Myt1-Aktivität verkürzt die Zeit zwischen Aufhebung des G₂/M Checkpoints und dem Eintritt in die Mitose und führt zu einem vermehrten Zelltod der betroffenen Zellen. Die Myt1-Kinase ist für den normalen Zellzyklus gesunder Zellen nur von geringer Bedeutung, übernimmt aber in Krebszellen eine wichtige Rolle. Auf Grund dieser gesteigerten Abhängigkeit der Krebszellen von Myt1 ist sie besonders als Target bei der Krebstherapie von Interesse⁶⁶.

Neue Untersuchungen von Tibes et al. hinsichtlich der Sensivität des Chemotherapeutikums Cytarabin (Ara-C) gegen myelomische Leukämie identifizierten die Myt1 und CHEK1 als erfolgversprechendste Targets. Der Mangel an einem selektiven Myt1-Inhibitor führte jedoch dazu, dass die verwante Wee1 in den Fokus der Untersuchungen rückte und MK-1775 eingesetzt wurde, um die Kombination mit Ara-C zu analysieren. Es konnte dabei eine Verstärkung der Ara-C induzierten Apoptose an verschiedenen Zelllinien gezeigt werden⁷. Ähnliche Untersuchungen erfolgten kürzlich am Glioblastoma-Zellen durch Toledo et al. Es konnte ebenfalls Myt1 als vielversprechendes Target identifiziert werden, aber für tiefergehende Tests wurde analog zu Tibes et al. MK-1775 verwendet⁸. Diese Ergebnisse zeigen, wie relevant die Entwicklung neuer Myt1-Inhibitoren ist.

Aus den positiven Resultaten von MK-1775 und der Rolle der Myt1 im Zellzyklus ergibt sich die besondere Eignung der Myt1-Kinase als Target in der Krebstherapie, wobei ein selektiver Myt1-Inhibitor das Potential für einen potenten Wirkstoff ausweisen kann. Einsatzmöglichkeiten wären alle Krebsarten, die eine p53-Mutation aufweisen und ausschließlich auf den G₂/M Checkpoint angewiesen sind. Dazu zählen die oben genannten Beispiele.

2.3 Grundlagen der *in silico* Forschung

Seit einiger Zeit besteht, neben den bekannten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen, auch die Möglichkeit der *in silico* Forschung zur Verfügung. Darunter versteht man die Erforschung eines Targets am Computer. Dieser facettenreiche Teil der Arzneimittelforschung bietet die Option, mit relativ geringem Materialaufwand eine ganze Reihe neuer Erkenntnisse über das Zielprotein zu erlangen und daraus neue Arzneistoffe abzuleiten.

2.3.1 Target-basiertes Wirkstoffdesign

Unter dem Terminus des Target-basierten Wirkstoffdesigns, auch bekannt als strukturbasiertes Wirkstoffdesign, versteht man die Suche, den Entwurf und die Optimierung kleinerer Moleküle, mit dem Ziel, sie in eine Proteinbindungstasche einzupassen¹¹¹. Voraussetzung hierfür ist die genaue Analyse des Zielproteins. Für eine solche Analyse stehen unterschiedliche Herangehensweisen zur Verfügung. Liegt eine Kristallstruktur des Proteins vor, kann mit diversen Computerprogrammen die Bindungstasche detailliert untersucht werden. So besteht die Möglichkeit, die Tasche nach Interaktionsbereichen abzusuchen und deren Größe zu charakterisieren. Mit diesen Daten können passende interagierende Gruppen in einen Liganden integriert werden, mit dem Ziel die Affinität zum Target zu erhöhen. Eine Kristallstruktur ermöglicht zudem umfangreiche Docking-Studien und virtuelle Screenings, welche im Folgenden genauer erläutert werden. Wurde die Struktur des Zielproteins noch nicht aufgeklärt, kann basierend auf der Aminosäuresequenz von verwandten, schon untersuchten Proteinen, ein Homologiemodell erstellt werden, welches ähnlich einer Kristallstruktur Verwendung findet. Aber auch bekannte Inhibitoren können die Grundlage eines strukturbasierten Wirkstoffdesigns sein¹¹¹. Für diese Arbeit lag die Kristallstruktur der Myt1-Domäne AS 79-362 vor (PDB: 3P1A). In der ATP-Bindungstasche war kein Ligand co-kristallisiert.

2.3.2 Protein-Liganden-Docking

Liegt die Tertiärstruktur eines Proteins in dreidimensionaler Form vor, wie es für die Myt1-Domäne der Fall ist, kann ein Docking durchgeführt werden. Laut Definition versteht man unter einem Docking den Versuch, einen potentiellen Proteinliganden virtuell in eine Bindungstasche einzupassen¹¹¹. Dabei ist es das Ziel, den Bindungsmodus eines Liganden in der Bindungstasche zu prognostizieren und anschließend zu bewerten. Zu Beginn entnimmt das Docking-Programm ein Molekül aus einer bereitgestellten Datenbank und generiert

dessen 3D-Struktur. Diese Struktur wird dann in die Tasche eingepasst. Für flexible Moleküle werden beim Docking verschiedene Konformere generiert. Während des Dockings werden u. a. die Größe des Moleküls, elektrostatische Interaktionen und die Orientierung des Liganden berücksichtigt. Bei daraus resultierenden Missverhältnissen werden die Verbindungen eliminiert. Beim eigentlichen Docking werden verschiedene Lösungen erstellt, die nach der Bindungsgeometrie und der Interaktion mit der Tasche vom Programm bewertet werden. Die so erzielten Ergebnisse werden in einem dem Programm zugrunde liegenden Score zusammengefasst. Dieser wird meist als Vergleichsparameter verwendet und gibt Auskunft über die Affinität des Liganden zur Bindungstasche. In dieser Arbeit kam das Docking-Programm GOLD 5.1¹¹² zur Anwendung.

2.3.2.1 GOLD 5.1

Die Abkürzung GOLD steht für „genetic optimisation for ligand docking“ und ist ein Docking-Programm. Es erhält beim Docking die vollständige Flexibilität azyklischer Liganden sowie die partielle Flexibilität zyklischer Liganden und Proteinseitenketten in der Nähe eines aktiven Zentrums aufrecht. Das Docking mit diesem Programm basiert auf einem genetischen Algorithmus¹¹³, mit dem evolutionsgenetische Prozesse* nachgeahmt werden. Diese Imitation dient dem Einpassen des Liganden in die Bindungstasche. Dabei werden Chromosomen benötigt, die bestimmte molekulare Merkmale eines Protein-Liganden-Komplex verschlüsseln. Dazu gehören der Torsionswinkel oder die räumliche Lage funktioneller Gruppen. Jede mögliche Lösung für das Docking wird von einem Chromosomen dargestellt und vom Programm bewertet. Diese Bewertung gibt die Fortpflanzungswahrscheinlichkeit des jeweiligen Chromosoms an und wird auch Fitnessscore genannt. Beim eigentlichen GOLD-Docking wird eine Eltern-Chromosomen-Population zufällig generiert und ihre Größe festgelegt („Population Size“). Dieser Population wird ein bestimmter Score zugeordnet. Für weitere Berechnungen benutzt GOLD ein sogenanntes Inselmodell. Das bedeutet, dass es keine große Gesamtpopulation sondern mehrere isolierte Subpopulationen (Inseln) gibt.

* Die im Zusammenhang mit *in silico* Arbeiten verwendeten biochemischen Begriffe wie Chromosomen und Genetik entsprechen der Literatur¹¹³ und stellen virtuelle Prozesse dar.

Die Individuen einer Population sind befähigt, die Inseln zu wechseln. Dieser Prozess wird Migration genannt. Zusätzlich dazu werden Nischen generiert, deren Größe ebenfalls definiert ist („Nische Size“). Der Berechnungsalgorithmus beurteilt, ob ein neues Individuum einer Population besser in eine Nische passt als das Vorhergehende. Anschließend erfolgt ein Abgleich mit der Gesamtpopulation. Neben der Migration können auch andere genetische Operationen, wie ein Crossover oder Mutation, stattfinden und einen Einfluss auf die Population haben. So werden Schritt für Schritt Folgegenerationen eines Individuums generiert, wobei nur eine Weiterbetrachtung erfolgt, wenn das Neue besser bewertet ist als die vorhergehende Generation. Ziel dabei ist es, die Lösung so zu optimieren, dass das betrachtete Molekül bestmöglich in die Bindungstasche passt ¹¹⁴. Neben einer Reihe von Parametern, die für die Berechnung definiert werden können, besteht in GOLD die Möglichkeit, „constraints“ festzulegen. Dabei versteht man unter „constraints“ die Festlegung von Interaktionen zwischen Protein und Ligand. So werden z.B. bereits bekannte Wasserstoffbrücken (WB) zwischen Aminosäuren der Bindungstasche und dem Liganden sichergestellt. Diese Festlegungen lenken das Ergebnis zu einer bestimmten Eigenschaft, die notwendig aber nicht essentiell ist. In GOLD 5.1 sind drei Scoring-Funktionen implementiert, von denen ausschließlich der Goldscore in dieser Arbeit Anwendung fand.

2.3.3 Virtuelles Screening

Bei der Suche nach neuen Leitstrukturen für Arzneistoffe stellt das High-Throughput-Screening (HTS) eine gängige Methode dar. Darunter versteht man die direkte Testung tausender Verbindungen am Target. Vorhandene Datenbanken, die auf Grund von Kombinatorik und Synthese ständig an Größe zunehmen, stellen diese Verbindungen zur Verfügung. Daraus ergibt sich das Problem, dass die Leistungsgrenze vieler biologischer Testsysteme erreicht ist. Um die Anzahl an Verbindungen zu reduzieren, verwendet man heutzutage computergestützte Screening-Methoden, auch virtuelles Screening (VS) genannt, und trifft so meist eine Vorauswahl an zu testenden Verbindungen. Unter VS versteht man definitionsgemäß das Durchsuchen großer Datenbanken auf dem Computer durch Einpassen (Docking) kleinerer Moleküle in eine vorgegebene Bindungstasche ¹¹¹. Voraussetzung dafür ist die bekannte Tertiärstruktur des Targets. Sie gibt den Raum an, der einem potentiellen Liganden zur Interaktion zu Verfügung steht und zu dem der Ligand komplementär sein muss, um erfolgreich zu binden. Zudem gibt die Tertiärstruktur vor, welche funktionellen

Gruppen am Liganden notwendig für eine Interaktion sind. Neben der Struktur ist auch ein umfangreiches Wissen über die Funktion und das dynamische Verhalten des Zielproteins Grundlage für eine Datenbanksuche. Um dabei ein zeitsparendes Arbeiten zu gewährleisten, finden beim VS häufig Filter Anwendung. Dazu gehören:

- Eine vorgeschaltete oder kombinierte Pharmakophorsuche
- Die Ermittlung molekularer Deskriptoren wie Molekulargewicht, logP, TPSA und Anzahl von Wasserstoffbrücken-Akzeptoren bzw. -Donatoren und deren Abgleich mit zuvor definierten Bereichen
- Die Anwendung der Lipinski „Rule-of-Five“, welche die Eignung als Arzneistoff gewährleisten^{115, 116}
- Eine Suche nach Strukturen, die Ähnlichkeit zu schon vorhandenen aktiven Verbindungen aufweisen („similarity search“)
- Eine Suche nach speziellen, funktionellen Gruppen oder Molekülteilen (Grundgerüste), die aus bekannten Liganden abgeleitet wurden („scaffold search“)

Ziel eines VS ist es dann, Verbindungen aus Datenbanken zu extrahieren, die nach weiteren Docking-Studien als Vorschläge zur biologischen Testung dienen und zu höheren Trefferquoten führen, als dies beim HTS der Fall ist.

3 Ziel der Arbeit

Wie eingangs erklärt stellt die Myt1-Kinase ein interessantes Target in der Krebstherapie dar, welches nur wenig untersucht ist. Zu Beginn dieser Arbeit waren 11 Myt1-Inhibitoren bekannt und zwei Bindungsassays etabliert. Um die Lücke in der Myt1-Forschung zu schließen, sollten in dieser Arbeit zuvor identifizierte Peptidsubstrate auf ihre Eignung zur Entwicklung eines Aktivitätsassays untersucht werden. Mit Hilfe des geeignetsten Peptides sollte daraufhin ein auf Fluoreszenzpolarisation basiertes Assay entwickelt werden.

Da die Myt1-Kinase mit nur 11 bekannten Inhibitoren zu den nur schwierig hemmbaren Kinasen zählt⁴⁸, war es ebenfalls ein Ziel dieser Arbeit, unter Verwendung verschiedener *in silico* Methoden und der *in vitro* Testung größerer Datenbanken neue Inhibitoren zu identifizieren. Die so erhaltenen Daten sollten der Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen dienen und ferner die Entwicklung neuer Synthesevorschläge ermöglichen.

Das übergeordnete Ziel bestand in einer Verbesserung des Verständnisses des *in vitro* Verhaltens der Myt1-Kinase. Darauf aufbauend sollte es zukünftigen Arbeiten ermöglicht werden, *in vivo* Fragestellungen besser zu beantworten.

4 Materialien und Methoden

4.1 Geräte

SDS-PAGE und Western Blot

Spannungsquelle	Bio Max	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Elektrophoresekammer	Mighty Small II SF 250	Hoefer (Holliston, MA, USA)
Gelgießstand	Amersham Bioscience	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
Transferzelle	Trans-Blot SD semi dry transfer cell	Bio Rad (München, Deutschland)
Photofilm- Entwicklerkassette	Hypercasette	Amersham Lifesciences (Little Chalfont, UK)

Diverses

Analysenwaage	Analytic AC 120S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Inkubatorschüttler	444-0274	VWR (Dresden, Deutschland)
Inkubatorschüttler	Thermoshake	Gerhardt (Königswinter, Deutschland)
Microplattenreader	Polarstar OMEGA	BMG Labtech (Heidelberg, Deutschland)
pH-Meter	HI 9025 microcomputer	HANNA Instruments (Woonsocket, RI, USA)
Pipetten (einkanalgig)	Biopette 10, 20, 200 1000 Ergonomic High- Performance 100	Labnet (Woodbridge, NJ, USA) VWR (Dresden, Deutschland)
Sicherheitswerkbank	Technoflow	Integra Biosciences (Fernwald, Deutschland)
Spektrophotometer	Nano Vue	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
Thermoblock	Accu Block	Labnet (Woodbridge, NJ, USA)
Tischzentrifuge		Kisker Biotech (Steinfurt, Deutschland)
Ultraschallbad	Transsonic T460/H	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Vortexer	REAX 2000	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Wasseraufbereitungsanlage	xCAD	TKA (Niederelbert, Deutschland)
Wippschüttler	Duomax 1030	Heidolph (Schwabach, Deutschland)
Zentrifuge	Avanti 30 Centrifuge	Beckmann (Krefeld, Deutschland)

4.2 Verbrauchsmaterial

96-Well Platte F-Boden schwarz, half-area, non binding Oberfläche	#3686	Corning (Corning, NY, USA)
---	-------	----------------------------

96-Well Platte F-Boden transparent	#650101	Greiner Bio-One (Frickenhäusen, Deutschland)
IMAC Spinsäule	His-select Spin	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
Kanülen	Sterican (Größe)	B.Braun (Melsungen, Deutschland)
Pipettenspitzen	0,1-10; 2-200; 100-1000	VWR (Dresden, Deutschland)
Reaktionsgefäße	1,5ml braun 0,5; 1,5; 2,0 farblos 1,5 Protein LoBind Safe-Lock	Brand (Wertheim, Deutschland) VWR (Dresden, Deutschland) Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Verdunstungsschutz folie	EASY seal #676001	Greiner Bio-One (Frickenhäusen, Deutschland)
Blotting Papier	Blotting Pad 707	VWR (Dresden, Deutschland)
Nitrocellulosemembran	Amersham Hy-Bond-ECL	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
Stereologische Pipetten	5ml, 10ml, 25ml	VWR (Dresden, Deutschland)
Sterilfilter	Spritzenvorsatzfilter 0,2µm	VWR (Dresden, Deutschland)
IMAC-Säule	HisTrap FF Crude	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
Zentrifugenröhrchen	15ml; 50ml	VWR (Dresden, Deutschland)
Pipettenspitzen	0,1-10; 2-200; 100-1000	VWR (Dresden, Deutschland)
MST-Epis	200µl	NanoTemper (München, Deutschland)
MST-Kapillare	Monolith™ NST 115 Series Standard Treated	NanoTemper (München, Deutschland)

4.3 Reagenzien

Alle nicht gesondert aufgeführten Reagenzien wurden aus der Chemikalienausgabe des Institutes für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg entnommen und wiesen mindestens analytische Qualität auf. Die Strukturformel aller getesteten Verbindungen sind im Anhang abgebildet.

Antikörper

anti-Myt1	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
anti-pTyr15-Cdk1	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
anti-pTyr P100	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
anti-Wee1	Cell Signaling (Danvers, MA, USA)
HRP-conj. Affinipure anti-Rabbit	Jackson Immuno Research Laboratories (Westgrove, PA, USA)

Chemikalien

Acrylamid/bisacrylamid (37,5:1) 40 % (m/V)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
Bicinchoninsäure (BCA)	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
BSA als Blocker (RIA/EIA-grade)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
BSA als Proteinstandard	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
CAPS	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
CHAPS	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
Coomassie Brilliant Blau G250	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
DasAFITC	AG Schmidt MLU (Halle-Wittenberg, Deutschland)
DMSO (Hybri-Max)	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
EDTA	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
Fluorescein Natrium	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
HEPES	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Magnesiumchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol für Molekular Biol. > 99 %	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
Iodacetamid	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
Laemmli Puffer 2x	Bio Rad (München, Deutschland)
β-Mercaptoethanol	Roth (Dautphetal-Buchenau, Deutschland)
Ponceau S (C.I.27195)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Proteaseinhibitormix (Complete®EDTA-frei)	Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland)
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamine)	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
TGS-Puffer 10x	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Tris Base (Trizma®)	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
Triton® X-100	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
Tween®20	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
Natriumchlorid	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
Natriummolybdat	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Photo-Entwickler	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Photo-Fixierer	Kodak (Stuttgart, Deutschland)
Proteinmarker für SDS-PAGE (Proteinmarker III)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Proteinmarker für Western Blot (Proteinmarker II, gefärbt)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Trichloressigsäure (TCA)	Applichem (Darmstadt, Deutschland)
Imidazol	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
IPTG	Roth (Dautphetal-Buchenau, Deutschland)
Kits	
Chemoluminescence Western Blot Analyse Kit	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
Monolith™ NHS-Labeling Kit Blue	NanoTemper (München, Deutschland)

Enzyme

Cdk1	ProQinase (Freiburg, Deutschland) Dr. Frank Erdmann (MLU Halle-Wittenberg, Deutschland)
Myt-Domäne	eigene Arbeit (siehe 4.5)
Myt-Volllänge	eigene Arbeit (siehe 4.5)
Wee1	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)

Peptide

FPIA-II Sonde ((6-FAM)KI(pY)VV)	IKFZ (Leipzig, Deutschland)
pY-PDGRFA	biomol (Hamburg, Deutschland)
pY-NTRK1	biomol (Hamburg, Deutschland)
pY-Cdk1 ⁸⁻²⁰ (QKIGEGT(pY)GVVYKC)	ProBiodrug (Halle, Deutschland)

Folgende Peptide wurden in der AG von Dr. M. Schmidt des Institutes für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt ¹¹⁷ und mir für Testzwecke zur Verfügung gestellt.

EAA1 ⁷¹⁹⁻⁷³¹	AFLLESTMNEYR
EFS ²⁴⁷⁻²⁵⁹	GTDEGIYDVPLLG
p-EFS ²⁴⁷⁻²⁵⁹	GTDEGIpYDVPLLG
INR1 ⁴⁷⁵⁻⁴⁸⁷	SSSIDEYFSEQPL
INSR ¹¹⁷⁹⁻¹¹⁹¹	GMTRDIYETDYR
MAPK11 ¹⁷⁶⁻¹⁸⁸	DEEMTGYVATRKY
MAPK14 ¹⁷⁶⁻¹⁸⁸	DDEMTGYVATRKY
MMD ²²⁴⁻²³⁶	WKYLYRSPTDFMR
PDGFRB ⁵⁷⁵⁻⁵⁸⁷	DGHEYIYVDPMQL
RET ¹⁰⁹⁰⁻¹¹⁰²	YPNDSVYANWMLS
SC4A ³⁸¹⁻³⁹³	NPNYGYTSYDTFS
TRKA ⁶⁷⁰⁻⁶⁸²	GMSRDIYSTDYR

Inhibitoren

Axitinib	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
AZD4547	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
Bosutinib	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
Canertinib	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
CEP-701	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
Crizotinib	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
Dasatinib	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
Erlotinib	ChemieTek (Indianapolis, IN, USA)
Gefitinib	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
Lapatinib	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)

MK-1775	Selleckchem (Houston, TX, USA)
Neratinib	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
PD-0166285	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
PD-173952	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
PD-173074	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
PD-180970	Sigma (Schnelldorf, Deutschland)
Saracatinib	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
Staurosporin	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
Tozasertib	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
Tyrphostin AG1478	LC Laboratories (Woburn, MA, USA)
GSK-Substanzbibliothek (Namen siehe Anhang)	Glaxo Smith Kline LCC (Research Triangle Park, NC USA)
Princeton Verbindungen (Namen siehe Anhang)	Princeton (Princeton, NJ, USA)

4.4 Verwendete Lösungen und Puffer

Alle in dieser Arbeit eingesetzten Lösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt, im Folgenden nur noch Wasser genannt. Das Wasser entstammt der Wasseraufbereitungsanlage xCAD (TKA).

Affinitätschromatografie

His-Select Äquilibrierungspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,8; 150 mM NaCl; 3 mM MgCl ₂ ; 20 % Glycerol; 0,5 % Triton X-100
His-Select Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,8; 150 mM NaCl; 5 mM Imidazol pH 7,5; 3 mM MgCl ₂ ; 20 % Glycerol; 0,5 % Triton X-100
His-Select Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 250 mM Imidazol pH 7,5; 3 mM MgCl ₂ ; 20 % Glycerol; 0,5 % Triton X-100
HisTrap Bindungspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 3 mM MgCl ₂ ; 20 % Glycerol
HisTrap Spülpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 3 mM MgCl ₂ ; 5 mM Imidazol pH 7,5; 1 mM DTT; 20 % Glycerol
HisTrap Waschpuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 3 mM MgCl ₂ ; 10 mM Imidazol pH 7,5; 1 mM DTT; 20 % Glycerol
HisTrap Elutionspuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 3 mM MgCl ₂ ; 50-250 mM Imidazol pH 7,5; 1 mM DTT; 20 % Glycerol

BCA-Assay

BCA-Reagenz A	1 % BCA-Dinatriumsalz; 2 % Natriumcarbonat (Monohydrat); 0,16 % Natriumtartrat; 0,4 % Natriumhydroxid;
BCA-Reagenz B	0,95 % Natriumhydrogencarbonat; pH 11,25 4 % Kupfer(II)sulfat (Pentahydrat)

Kinaseassay

Kinasebindungspuffer B (KBB)	50 mM HEPES-NaOH pH 7,5; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 0,03 % CHAPS
Fluoreszein-Stammlösung	1 mM Fluoreszein; 20 mM CAPS pH 9,6
Standardkinasepuffer A (SKB-A)	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 40 mM NaCl; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 2 mM Ammoniummolybdat;
Standardkinasepuffer B (SKB-B)	0,04 % Triton X-100; 1x Complete®EDTA-frei 50 mM HEPES-NaOH pH 7,5; 40 mM NaCl; 10 mM MgCl ₂ ; 1 mM DTT; 2 mM Ammoniummolybdat;
Stopplösung A	0,025 % Triton X-100; 1x Complete®EDTA-frei 100 mM EDTA in 50 mM Tris-HCl pH 7,5
Stopplösung B	100 mM EDTA in 50 mM HEPES-NaOH pH 7,5

SDS-PAGE und Western Blot

Fixierlösung	40 % Methanol; 10 % Essigsäure
Färbelösung A	5 % Coomassie Brilliant Blau G250
Färbelösung B	20 g/l ortho-Phosphorsäure; 100 g/l Ammoniumsulfat
Laufpuffer	192 mM Glycin; 20 mM Tris-HCl pH 8,3; 0,1 % (m/V) SDS
Ponceau Färbelösung	0,2 g/l Ponceau S (2,6 mM); 30 g/l TCA
Sammelgelpuffer	0,5 mM Tris-HCl pH 6,8
TBS-T	25 mM Tris-HCl pH 7,2; 137 mM NaCl; 0,1 % Tween 20
Transferpuffer	191 mM Glycin; 25 mM Tris-HCl; 20 % (V/V) Methanol
Trenngelpuffer	1,5 mM Tris-HCl pH 8,8

Zellaufschluss

Domänen-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5; 1mg/ml Lysozym
Vollängen-Lysepuffer	25 mM Tris-HCl pH 7,8; 150 mM NaCl; 10 mM MgCl ₂ ; 1 % Triton X-100; 1x Complete®EDTA-frei

4.5 Myt1-Präparation

Bei einem membranassoziierten Enzym, wie der humanen Myt1-Kinase, gibt es zwei mögliche Präparationswege. Zum einen kann die Kinase in ihrer vollständigen Form mit Membranbindungsdomäne exprimiert und mit Hilfe eines Detergenz in Lösung gebracht werden¹¹⁸. Zum anderen besteht die Möglichkeit, eine lösliche, gekürzte Form der Kinase zu verwenden, die Kinasedomäne, um somit auftretende Solubilisierungsprobleme zu umgehen¹¹⁹. Beide Varianten der Kinasepräparation fanden in dieser Arbeit Anwendung. Alle mikro- und molekularbiologischen bzw. Zellkultur-Arbeiten wurde von Dr. F. Erdmann (Abteilung Pharmakologie, Institut für Pharmazie, MLU Halle-Wittenberg) durchgeführt. Die Optimierung der Expressionsbedingungen in *Escherichia coli* (*E.coli*) wurden von Lina Humbeck durchgeführt und sind detailliert in ihrer Diplomarbeit beschrieben¹²⁰.

4.5.1 Myt1-Volllänge

Die Myt1-Kinase wurde sowohl im eukaryotischen Expressionssystem unter Verwendung von „human embryonic kidney“ (HEK) Zellen, als auch im klassischem Expressionssystem mit *E.coli* generiert. Die erhaltenen Zellpellets nach Induktion mit 0,5 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), 12 mM MgCl₂ und 1 M Sorbitol (*E.coli*) bzw. Induktion mit Doxycyclin (HEK), wurden bei -20 °C bis zum Zellaufschluss und anschließender Affinitätschromatografischer Reinigung gelagert. Die Gewinnung der Myt1-Kinase in Volllänge aus HEK293 Zellen erfolgte gemäß in der Arbeitsgruppe etablierter Protokolle¹²¹. Der Zellaufschluss der prokaryotischen Zellen erfolgte mittels Ultraschall. Dazu wurde das Zellpellet im Volllängen-Lysepuffer resuspendiert und für 1 min mit Ultraschall behandelt. Die Extraktion und Solubilisierung der Myt1 erfolgte analog zur humanen Zellsuspension¹²¹.

4.5.1.1 Affinitätschromatographische Proteinreinigung mittels His-Select Spin-Säulen

Die immobilisierte Metallchelatchromatographie (IMAC) stellt eine Variante der Affinitätschromatographie dar und ist speziell für Proteine und Peptide geeignet. Dabei wird die Affinität von oberflächenangeordneten Aminosäuren zu Übergangsmetallen, die an den Koordinationsstellen der stationären Phase immobilisiert sind, genutzt¹²². Aufgrund der maximalen Selektivität und hohen Affinität der His-markierten Myt1-Kinase zu stationär gebundenen Ni²⁺-Ionen ist die IMAC anderen Chromatographiemethoden vorzuziehen. Für die Aufreinigung der Myt1-Volllänge kamen His-Select Spin-Säulen von Sigma zum Einsatz, entsprechend dem in der Arbeitsgruppe vorliegenden Protokoll¹²¹. Die Säulen

wurden mittels einfachem Säulenvolumen an His-Select Äquilibrationpuffer dem Ionenniveau des Zelllysats angepasst. Die Auftragung des Lysats erfolgte bei 4 °C durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 2 min. Der erhaltene Durchfluss wurde mehrmals aufgegeben, um die Kapazität der Säule vollumfassend auszunutzen. Nicht gebundene Zellbestandteile wurden durch Zugabe von 500 µl His-Select Waschpuffer (Äquilibrationpuffer +5 mM Imidazol) und erneute Zentrifugation, unter den oben genannten Bedingungen, abgetrennt. Die Elution der Myt1-Volllänge wurde durch Auftragung des einfachen Säulenvolumens an Elutionspuffer (Äquilibrationpuffer +250 mM Imidazol) ermöglicht. Dabei diente das zugesetzte Imidazol zur Aufhebung der Bindung der Histidinreste zu den Nickel²⁺-Ionen. Geeignete Mengen jeder erhaltenen Fraktion wurden sodann für die analytische SDS-PAGE vorbereitet (siehe Abschnitt 4.6). Die Identifikation der Myt1 erfolgte mit anti-Myt1-Antikörper. Die Reinheit der Elutionsfraktion wurde durch Anfärbung der Proteine, mittels Coomassie® Brilliant Blau G250, nach SDS-PAGE kontrolliert. Der Proteingehalt wurde mittels BCA-Assay bestimmt (siehe Abschnitt 4.8).

4.5.2 Myt1-Kinasedomäne

Die Gewinnung der Kinasedomäne wurde von zuvor verwendeten Protokollen^{121, 123} abgeleitet. Dazu wurde der korrespondierende Genabschnitt in das pET28 Plasmid geklont und mittels Elektroporation in den *E.coli*-Stamm BL21(DE3) transformiert. Die Induktion der Enzymproduktion erfolgte mittels 0,5 mM IPTG. Das erhaltenen Zellpellet wurde analog der Myt1-Volllänge bei -20 °C gelagert.

Der Zellaufschluss der prokaryotischen Zellen erfolgte nach hydrolytischer Spaltung der glycosidischen Bindung der Zellwand durch Lysozym mittels Ultraschall. Dazu wurde das Zellpellet im Domänen-Lysepuffer resuspendiert und 1 h bei 37 °C geschüttelt, um die Hydrolyse zu ermöglichen. Die vorbehandelten Zellen wurden, nach Zugabe von Complete®EDTA-frei und 1 mM DTT, 1 min mit Ultraschall behandelt und anschließend auf Eis 15 min extrahiert. Die Abtrennung der unlöslichen Zellbestandteile erfolgte unter den oben genannten Bedingungen und der Überstand wurde mit HisTrap FF crude Säulen gereinigt.

4.5.2.1 Affinitätschromatographische Proteinreinigung mittels HisTrap FF crude Säulen

Die Affinität der Histidinreste zu Nickel²⁺ Ionen, wie sie für die Proteinreinigung der Myt1-Volllänge beschrieben wurde, wird auch bei der Reinigung der Myt1-Kinasedomäne angewendet. Aufgrund der erhöhten Ladekapazität wurden HisTrap FF crude Säulen (GE Healthcare Life Sciences) eingesetzt. Analog zu den His-Select Säulen wurde das Säulenmaterial durch manuelles Auftragen des zehnfachen Säulenvolumens an HisTrap Bindungspuffers äquilibriert. Anschließend wurde das Zelllysate aufgegeben. Die darauffolgenden Schritte erfolgten alle unter Eiskühlung, um eine Denaturierung zu vermeiden. Eine Abtrennung von ungebundenen Zellbestandteilen wurde in zwei Schritten durchgeführt. Begonnen wurde mit einem Spülschritt mit zweifachem Säulenvolumen an HisTrap Spülpuffer, welcher 5 mM Imidazol enthielt und somit erste unspezifische Bindungen löste. Die zweite Abtrennung bestand in einem Waschschrift, der mit dem sechsfachen Säulenvolumen an HisTrap Waschpuffer (Bindungspuffer +10 mM Imidazol) weitere Zellbestandteile und Verunreinigungen entfernte. Die Elution der Kinase erfolgte mit HisTrap Elutionspuffer (Bindungspuffer + 50-250 mM Imidazol) in fünf Fraktionen, entsprechend dem einfachen Säulenvolumen. Geeignete Mengen aller acht erhaltenen Fraktionen wurden anschließend für die analytische SDS-PAGE vorbereitet (siehe Abschnitt 4.6). Identität, Reinheit und Gehalt wurden analog zur Myt1-Volllänge bestimmt.

Alle frisch präparierten Kinaselösungen wurden mittels flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Anwendung gelagert.

4.6 SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde das diskontinuierliche SDS-Gelelektrophoreseverfahren nach Lämmli verwendet ¹²⁴. Dabei überschichtet ein 4 % Acrylamidgel (pH 6,8) ein größeres 12 % Trenngel (pH 8,8). Die Zusammensetzungen der Gele sind in Tabelle 4.1 dargestellt. Die Zugabe von N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) zur Sammelgelvormischung erfolgte kurz vor dem Auftragen auf das zuvor polymerisierte Trenngel.

Tabelle 4.1: Zusammensetzung eines 12 % Trenngels und 4 % Sammelgels für SDS-Gelelektrophorese

Bestandteil (2 Gele)	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Bis 40 %	4500 μ l	975 μ l
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	3750 μ l	--
0,5 M Tris-HCl pH 6,8	--	1875 μ l
mQ Wasser	6510 μ l	4500 μ l
SDS 10 % (m/V)	150 μ l	75 μ l
APS 10 % (m/m)	75 μ l	37,5 μ l
TEMED	15 μ l	15 μ l

Während der 20-minütigen Polymerisation des Trenngels wird die Oberfläche mit Isopropanol überschichtet und danach entfernt. Dem schließt sich ein zweimaliges Waschen mit Wasser an. Dem folgend wird das Sammelgel überschichtet und polymerisiert 45 min. Die erhaltenen Gele sind feuchtgehalten mindestens 1 Woche bei 4 °C lagerstabil. Vorbereitend zur eigentlichen Proteintrennung wird die Probe 1:2 mit Ladepuffer gemischt und bei 95 °C, für 5 min inkubiert. Nach Auftragen der gewünschten Menge an Probe erfolgt die Elektrophorese bei 80 V (Sammelgel) und bei 160 V (Trenngel), bis die blaue Lauffront das Gel verlassen hat. War das erhaltene Gel die Vorbereitung für einen anschließenden Western Blot, kam der gefärbte Proteinmarker II zum Einsatz. Im Falle einer anschließenden Coomassiefärbung, zur Analyse der Reinheit, wurde der ungefärbte Proteinmarker III verwendet. Dafür wurde dieses Gel nach Elektrophorese 1 h in Fixierlösung (40 % Methanol, 10 % Essigsäure) geschüttelt und anschließend über Nacht mit kolloidalem Coomassie gefärbt. Die Färbelösung bestand dabei aus 0,5 ml Färbelösung A (5 % Coomassie Brilliant Blau G250) und 24,5 ml Färbelösung B (20 g/l ortho-Phosphorsäure, 100 g/l Ammoniumsulfat). Am nächsten Tag wurde das Gel mit Wasser gewaschen und mittels Gelanalyser 2010a densitometrisch ausgewertet.

4.7 Western Blot

Nach der SDS-Gelelektrophorese wurde das erhaltene Gel 20 min mit Transferpuffer äquilibriert. Das Blotting auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte in einer Trans-Blot SD semi dry Transfer Zelle (HyBond) bei 25 V für 90 min (einzelnes Gel). Darauf folgte eine Kontrolle des Blottens durch Anfärben der Proteinbanden mit Ponceau S. Die Färbung wurde danach vollständig durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T Puffer entfernt. Im nächsten Schritt wurden ungebundene Bereiche der Nitrocellulosemembran mit 5 % (m/V) BSA-Lösung (in TBS-T), 1 h unter Schütteln bei Raumtemperatur (RT), geblockt. Die darauf folgende Inkubation mit dem Primärantikörper (in TBS-T (5 % BSA) Blockinglösung) fand über Nacht bei 4 °C statt. Nach zweimaligem Spülen und dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels Chemolumineszenz, unter Verwendung des Chemoluminescence Western Blot Analyse Kits (GE Healthcare Life Sciences) nach erneuten Spül- und Waschschritten.

4.8 BCA-Assay

Bei biochemischen Arbeiten ist eine exakte Bestimmung des Proteingehalts essentiell. Das dafür verwendete Verfahren muss dabei in einem angemessenem Zeitrahmen stattfinden und robust gegenüber äußeren Störungen, wie z.B. Matrixeinflüssen, sein. Etablierte Bestimmungsmethoden für den Proteingehalt sind der BCA-Test sowie die Proteinbestimmungen nach Bradford ¹²⁵ und Lowry ¹²⁶, wobei Letztgenannte empfindlich gegenüber Detergenzien sind. Da für eine erfolgreiche Myt1-Präparation die Verwendung des Detergenz Triton X-100 notwendig ist, findet ausschließlich die BCA-Methode in dieser Arbeit Anwendung, jedoch modifiziert nach Smith et al. ¹²⁷. Sie basiert auf der Reduzierung von Kupfer(II)-Ionen zu Kupfer(I)-Ionen, in Anwesenheit eines Proteins. Die anschließende Komplexbildung mit Bichinchoninsäure (BCA) resultiert in einer violetten Färbung. Mit einer Nachweisgrenze von 0,5 µg/ml gehört der BCA-Assay zu den sensitiven Bestimmungsmethoden, ist aber empfindlich gegenüber reduzierenden Agenzien, die mit den Kupfer(II)-Ionen reagieren können. Deswegen musste darauf geachtet werden, dass vor der Supplementierung von DTT zur Kinasepräparation ein aliquoter Teil zur Analytik abgenommen wurde. War dies, bedingt durch die Präparation nicht möglich, wurde die Probe vorbereitend mit Iodacetamid versetzt und inkubiert. Während des Inkubationsvorgangs kam es zur Zerstörung von DTT, ohne dabei die Proteinmenge zu beeinflussen bzw. später die

eigentliche Reaktion zu stören. Zur Bestimmung des Proteingehalts wurde bedarfsgerecht eine frische Mischung von 50 Volumenteilen BCA-Reagenz A und einem Volumenteil BCA-Reagenz B hergestellt. 200 µl dieser Lösung wurden mit 10 µl Probe und Matrixausgleich in einer 96 Well Platte (Greiner #655101) für 20 min bei 60 °C und 400 rpm inkubiert. Nach Abkühlen auf RT wurde die Absorption bei 570 nm mit dem BMG PolarStar OMEGA Plattenlesegerät gemessen. Als Proteinstandard fand bovines Serumalbumin (BSA) Verwendung, welches für die Kalibrierung zu sechs äquidistanten Konzentrationen zwischen 50 und 500 µg/µl verdünnt wurde. Als Duplikate aufgenommen zeigt dieser Bereich eine gute Linearität.

4.9 Allgemeine und statistische Datenanalyse

Die grundlegenden Aspekte und Formeln der in dieser Arbeit angewendeten Datenanalyse sollen folgend kurz dargestellt werden. Verwendet wurden dazu Linux LibreOffice Calc und GraphPad Prism 5.01 ¹²⁸.

Alle Experimente wurden, wenn nicht anders angegeben, in drei Replikaten durchgeführt. Die Ergebnisse entsprechen dem arithmetischen Mittelwert der drei Hintergrund-korrigierten Messungen. Die angegebene Standardabweichung wurde nach Formel 4.1. mit LibreOffice Calc berechnet.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(a - \bar{a})^2}{n - 1}}$$

Formel 4.1: Berechnung der Standardabweichung SD, a: Stichprobe, \bar{a} : Stichprobenmittelwert, n: Stichprobenumfang

Um die Qualität der Daten sicherzustellen, wurden die gemessenen Rohdaten auf Ausreißer untersucht. Bei Datensätzen mit weniger als 30 Werten kam der Dixon-Test zur Anwendung ¹²⁹, bei mehr als 30 Werten wurde der Grubbs-Test verwendet ¹³⁰ (P = 95 %). Die als Ausreißer identifizierten Werte wurden in der anschließenden Analyse nicht berücksichtigt.

Bei Berechnungen von Differenzen eines Parameters (z.B. Δr) wurde der statistische Fehler entsprechend der Gauß'schen Fehlerfortpflanzung ermittelt (siehe Formel 4.2).

$$\Delta y = \sqrt{|\Delta y_1|^2 + |\Delta y_2|^2}$$

Formel 4.2: Berechnung des statistischen Fehlers Δy mittels Gauß'scher Fehlerfortpflanzung

Die Bestimmung von IC_{50} , K_i und K_d erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5.01 durch nicht-lineare Regression der Daten mit variablem Kurvenanstieg („hill slope“), entsprechen der Formel 4.3 und Formel 4.4.

$$y = y_{bottom} + \frac{y_{top} - y_{bottom}}{1 + 10^{\log(IC_{50}-x) * Hill\ Slope}}$$

Formel 4.3: Ermittlung der IC_{50} durch nicht-lineare Regression mit variablen „hill slope“

$$y = \frac{y_{max} * x}{K_d + x}$$

Formel 4.4: Ermittlung von K_d mittels nicht-linearer Regression

Als Qualitätsparameter des entwickelten Assays wurde der Z' Faktor nach Formel 4.5 berechnet. Er gibt die Distanz der Mittelwerte der Anisotropie zwischen positiv und negativ Kontrolle an (μ^+ und μ^-), inklusive der dreifachen Standardabweichung (σ^+ und σ^-).

$$Z' = \frac{\mu^- + \mu^+ - 3 * (\sigma^- + \sigma^+)}{\mu^- + \mu^+}$$

Formel 4.5: Berechnung der Z' Wertes ¹³¹

4.10 Fluoreszenzpolarisation: theoretischer Hintergrund und Datenanalyse

Die Fluoreszenzpolarisation (FP) wurde erstmals vor ca. 60 Jahren in der Biochemie durch Gregorio Weber angewendet, als er bovines Serumalbumin und Ovalbumin untersuchte ¹³². Beschrieben wurde das Phänomen der Fluoreszenzpolarisation zum ersten Mal 1926 von Perrin ¹³³ und basiert auf dem Effekt der Photoselektion. Darunter versteht man die Anregung der in Lösung befindlichen Fluorophore, durch linear polarisiertes Licht. Es werden dabei jedoch nur jene Moleküle angeregt, deren Dipolmoment sich in geeigneter Ausrichtung zum eingestrahlten Licht befindet (siehe Abbildung 4.1).

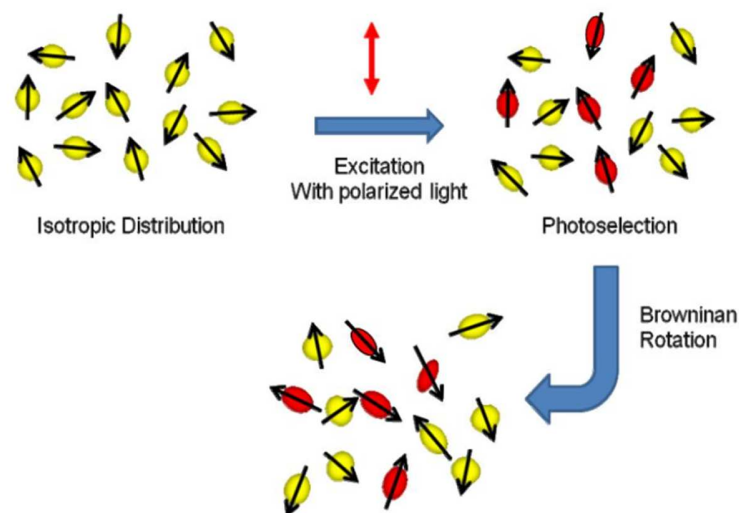


Abbildung 4.1: Darstellung der Photoselektion, modifiziert von Jameson ¹³⁴

Auf Grund der Brown'schen Molekularbewegung aller Moleküle in Lösung, kommt es während der Lichteinstrahlung zur Änderung der Orientierungsebene des Dipolmoments. Bei Molekülen mit einem hohen Molekulargewicht findet nur eine langsame Rotation statt, daraus resultiert eine geringe Änderung der Orientierung des Dipols und damit einhergehend eine starke Polarisation des emittierten Lichts. Das gegenteilige Phänomen tritt bei Molekülen mit kleinem Molekulargewicht auf, die naturgemäß eine schnelle Molekülrotation aufweisen und damit zu einer kompletten Isotopenverteilung der Orientierungsebene führen. Damit verbundenen ist die annähernd vollständige Depolarisation des Lichts.

Ermittelt wird die Fluoreszenzpolarisierung durch Messung der Fluoreszenzintensität zweier zueinander senkrecht stehenden Polarisierungsebenen I_{\parallel} und I_{\perp} ¹³⁵. Die Gesamtintensität I_{total} der emittierten Strahlung berechnet sich nach Formel 4.6 und wird als Parameter verwendet, um falsch positive Ergebnisse zu identifizieren.

$$I_{total} = I_{\parallel} + 2 * I_{\perp}$$

Formel 4.6: Berechnung der totalen Intensität I_{total} ¹³⁶

Normalisiert man die Differenz beider Kanäle ($\Delta I = I_{\parallel} - I_{\perp}$) mit deren Summe oder der Gesamtintensität erhält man die Polarisation P bzw. Anisotropie r . Beide Parameter sind dimensionslos und bedeutungsäquivalent. Entsprechend der Gleichung von Perrin ist die FP von äußeren Einflüssen abhängig ¹³³. Dabei ist die Rotationsgeschwindigkeit eines Moleküls proportional zur absoluten Temperatur T und antiproportional zur Viskosität η der Lösung und dem molekularen Volumen des Moleküls. Das molekulare Volumen eines Moleküls lässt sich durch dessen Molekulargewicht M , dem spezifischem Volumen Λ und dem Hydratisierungsgrad h beschreiben. Daraus resultiert zusammenfassend, dass die FP als Funktion des Molekulargewichts eines Fluorophors angesehen werden kann. Unter definierten Bedingungen ist die FP konzentrationsunabhängig und kann als Naturgröße angesehen werden ¹³⁴.

Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte mittels BMG PolarStar OMEGA Plattenreader bei 520 nm nach Anregung der Probe mit 485 nm linear polarisiertem Licht, entsprechend etablierter Protokolle der Arbeitsgruppe ^{121, 137}. Zur Ermittlung des Gerätekorrekturfaktors K' wurde eine 30 nM Fluoreszein-Lösung eingesetzt, deren Polarisation 35 mP gleichgesetzt wird. Bestimmt wird der Korrekturfaktor nach Formel 4.7.

$$K' = \frac{I_{\parallel} - P_{Fluoreszein} * I_{\parallel}}{P_{Fluoreszein} * I_{\perp} + I_{\perp}}$$

Formel 4.7: Berechnung des Korrekturfaktors K' ¹²¹

Unter Einbeziehung des Korrekturfaktors K' und mittels Formel 4.8 kann die Polarisation P aus den Hintergrund-korrigierten Fluoreszenzintensitäten der beiden Ebenen berechnet werden.

$$P = \frac{I_{\parallel} - K * I_{\perp}}{I_{\parallel} + K * I_{\perp}}$$

Formel 4.8: Berechnung der Polarisation P ^{134, 138}

Mangels Additivität der Polarisation wird die Anisotropie verwendet ¹³⁵, die sich entweder direkt aus den Fluoreszenzintensitäten oder indirekt über die Polarisation berechnen lässt (Formel 4.9).

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2 * I_{\perp}}$$

$$r = \frac{2 * P}{3 - P}$$

Formel 4.9: Berechnung der Anisotropie r bzw. Umrechnung der Polarisation P in r ¹³⁶

4.11 DasAFITC-Assay

Inhibitortests wurden mit dem FP basierten Kinasebindungsassay (DasAFITC-Assay) durchgeführt ^{121, 139}. Es verwendet ein fluoreszenzmarkiertes Dasatinibmolekül als Fluorophor (DasAFITC), welches an die Myt1-Domäne bindet. Für den Assay wurden schwarze 96 Well half-area Platten (Corning) verwendet und die Fluoreszenz Anisotropie mit BMG PolarStar OMEGA gemessen. Dabei wurden Filter für 485 nm zur Anregung und 520 nm zur Emissionsmessung eingesetzt.

Für den Assay wird steril filtrierter Kinasebindungspuffer B (KBB) verwendet. Eine finale Assaykonzentration von 1 % DMSO war zu jeder Zeit gewährleistet. Die zu testenden Inhibitoren wurden mit DMSO zum 100-fachen der gewünschten Assaykonzentration verdünnt und anschließend 1:33 mit KBB gemischt. Die so erhaltene Lösung ist dreifach höher konzentriert als im Assay gewünscht und enthält 3 % DMSO. 9 µl der hergestellten Inhibitorverdünnung und 9 µl DasAFITC (Tracer) sowie 9 µl Kinasepräparation ergaben ein Assay-Gesamtvolumen von 27 µl. So ergab sich eine finale Assaykonzentration von 5 nM für den Tracer und 100 nM für die Myt1-Domäne. Nach einer Inkubationszeit von 120 min konnte die FP gemessen werden. Um die Testverbindungen in allen Platten vergleichen zu können, wurden die Ergebnisse gegen 10 µM Dasatinib als Positivkontrolle (100 % Verdrängung) und 1 % DMSO (Vehikel) als Negativkontrolle (0 % Verdrängung) normalisiert.

4.11.1 Datenanalyse Anisotropie

Die Analyse der Daten aus dem DasAFITC-Assay erfolgte wie in Abschnitt 4.10 beschrieben. Zur Bestimmung von K_i aus den Fluoreszenzpolarisationswerten des Bindungsassays wurden die Verdrängungskurven, entsprechend dem genauen Modell der kompetitiven Bindung von Zhang et al. und Wang^{140, 141}, gefittet (siehe Formel 4.10).

$$r = \frac{r_f + \frac{[Myt1]}{K_d} * g * r_b}{1 + \frac{[Myt1]}{K_d} * g}, \text{ wobei}$$

$$[Myt1] = -\frac{a}{3} + \frac{2}{3} * \sqrt{(a^2 - 3b) * \cos \frac{\theta}{3}}, \text{ mit}$$

$$a = K_d + K_i + [Tracer]_0 - [I]_0 - [Myt1]_0$$

$$b = K_i * ([Tracer]_0 - [Myt1]_0) + K_d([I]_0 - [Myt1]_0) + K_d * K_i$$

$$c = -K_d * K_i + [Myt1]_0$$

$$\theta = ar \cos \frac{-2a^3 + 9ab - 27c}{2 * \sqrt{(a^2 - 3b)^3}}$$

Formel 4.10: Berechnung der Inhibitionskonstante K_i mittels nicht-linearer Regression der Anisotropie r nach dem Modell von Wang¹⁴¹

K_d ist die Dissoziationskonstante des Liganden-Enzym-Komplexes, K_i ist die Dissoziationskonstante des Komplexes aus kompetitivem Inhibitor und Enzym. r_b und r_f sind die Anisotropiewerte des gebundenen und freien, markierten Liganden (DasAFITC). g stellt den Quantenausbeute-Verstärkungsfaktor dar und $[I]_0$ ist die Inhibitorkonzentration. $[Tracer]_0$ und $[Myt1]_0$ ist die eingesetzte Konzentration an DasAFITC und Kinase.

4.12 Fluoreszenzpolarisation-Immunoassay II (FPIA-II)

Um kurzkettige Peptide auf ihre Eignung als Substrat für die Myt1 zu untersuchen, wurde ein FP basiertes pTyr-Assay verwendet^{121, 137}. Zum Einsatz kamen schwarze 96 Well half-area Platten (Corning), in die 40 μ l Kinasereaktionsmischung pipettiert wurden. Die Peptide wurden in Konzentrationen von 1-200 μ M untersucht, gelöst in SKP-A mit 2 % DMSO. Der Co-Faktor ATP wurde in einer finalen Assaykonzentration von 500 μ M zugegeben und die Reaktion durch Addition von 40 nM Myt1-Volllänge gestartet. Nach 120 min schütteln bei 30 °C wurde die Reaktion durch Zugabe von 10 μ l Stopplösung A beendet. Zur Bestimmung

des Inhibitionsprofils wurden die Verbindungen mit einer finalen Assaykonzentration von 5 μM dem Reaktionsgemisch zugegeben. Das Assay wurde mit 0,5 % DMSO durchgeführt. Zur Detektion der Phosphorylierung des Tyrosins wurden 10 μl Detektionslösung, bestehend aus anti-pTyr-Antikörper (p-Tyr-P-100) und (6-FAM)KI(pY)VV (Sonde) zugegeben. Die Zugabe resultierte in einer Endkonzentration von 45 nM Antikörper und 2,5 nM Sonde. Nach 1 h Inkubation bei RT, unter Schütteln, wurde die FP wie in Abschnitt 4.11 beschrieben gemessen. Der FPIA-I ¹²¹ fand in dieser Arbeit keine Anwendung.

4.13 Fluoreszenzpolarisation-Immunoassay III (FPIA-III)

Die biochemische Charakterisierung der Myt1-Kinase wurde mit einer optimierten Form des FPIA-II durchgeführt. Die Kinasereaktion mit EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ und 500 μM ATP erfolgte im SKB-B und wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert. Danach erfolgte analog zum FPIA-II die Zugabe von 10 μl Stopplösung B und anschließend 10 μl Detektionslösung wie unter 4.12 beschrieben. Die Messung der FP nach 1 h Inkubation bei RT war identisch den Abläufen unter Abschnitt 4.12.

4.14 Microscale Thermophorese (MST)

4.14.1 Theoretischer Hintergrund

Zur Bestimmung der Bindungsaffinität zweier Biomoleküle steht seit einigen Jahren die Microscale Thermophorese-Technologie zu Verfügung. MST ist eine biophysikalische Technologie zur Analyse molekularer Interaktionen, bei der die Bewegung von fluoreszenzmarkierten Molekülen in einem Temperaturgradienten beobachtet wird. Die Bewegungsgeschwindigkeit innerhalb des Gradienten ist dabei von der Molekülgröße, dessen Ladung und Hydrathülle abhängig ¹⁴². Bei der MST-Messung wird innerhalb einer Kapillare ein Temperaturgradient durch einen IR-Laser aufgebaut, der die Molekülbewegung induziert. Über ein Objektiv wird dann die Fluoreszenz an diesem Punkt detektiert (Aufbau siehe Abbildung 4.2).

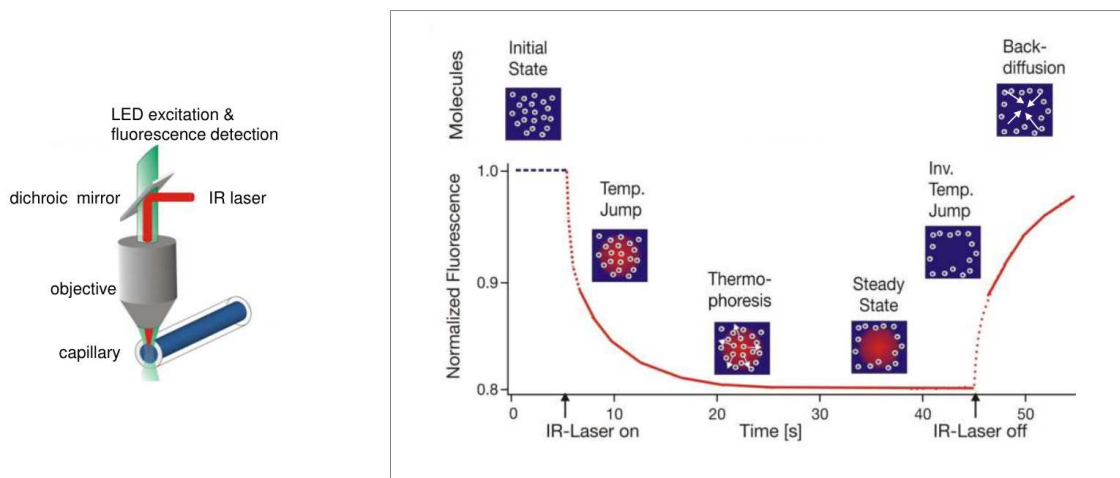


Abbildung 4.2: Aufbau der MST-Messapparatur (links) und Phasen des MST-Signals (rechts) ¹⁴³

Das Signal der MST-Messung kann in sechs Phasen unterteilt werden, die in Abbildung 4.2 dargestellt sind. In der Initialphase entspricht die gemessene Fluoreszenz die der markierten Moleküle im Messpunkt. Durch Anschalten des IR-Lasers kommt es zur Änderung der Fluoreszenzintensität, basierend auf der temperaturbedingten Änderung der Absorption, Fluoreszenz-Lebensdauer, Quantenausbeute und Spektralshifts des Fluoreszenzfarbstoffs. Diese deutliche Reduzierung der Fluoreszenzintensität wird auch als T-Jump bezeichnet. In dieser Phase findet noch keine Thermophorese der Moleküle statt. Diese beginnt erst eine Sekunde nach Indizierung des Temperaturgradienten und endet in einem Gleichgewichtszustand. Nach Abschaltung des IR-Lasers kommt es zum inversen T-Jump, bei dem die Fluoreszenzintensität wieder zunimmt. Die letzte Phase der MST-Signals wird durch die Rückdiffusion der Moleküle beeinflusst. Da bei der Thermophorese ein lokaler Konzentrationsgradient entsteht, treibt dieser die Diffusionsprozesse an. Auf Grund der Abhängigkeit der Thermophorese von den oben genannten Parametern können mittels MST verschiedene molekulare Prozesse untersucht werden. Dazu zählen neben Bindungsstudien von Molekülen mit Proteinen bzw. von mehreren Proteinen miteinander auch Konformationsänderungen und Membraninteraktionen ¹⁴³.

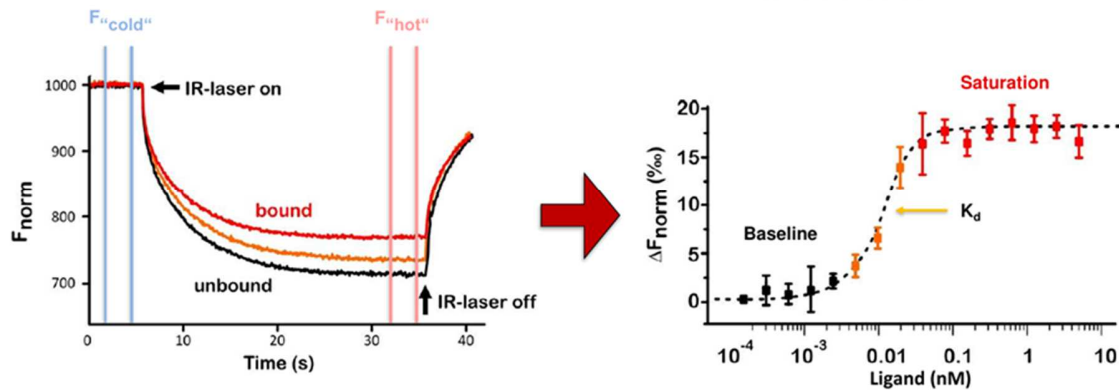


Abbildung 4.3: MST-Bindungskurven und Bestimmung von K_d -Werten (Bild zur Verfügung gestellt von NanoTemper Technologies GmbH (München, Deutschland)).

Wie in Abbildung 4.3 dargestellt ist, verläuft die MST-Kurve je nach Bindungszustand unterschiedlich. Berechnet man die Differenz zwischen Initialfluoreszenz und Thermophorese-Gleichgewicht, können die erhaltenen Daten zur K_d -Bestimmung verwendet werden. Analog dazu sind Inhibitorstudien mit MST möglich ¹⁴⁴.

4.14.2 MST-Untersuchungen mit der Myt1-Domäne

Die MST-Studien der Myt1-Domäne erfolgten im KBB mit 1 mM DTT. Untersucht wurden die Interaktionen von Myt1-Domäne mit 100 nM DasAFITC mit und ohne Dasatinib. Zur K_d -Bestimmung wurden 500 bis 0,015 nM Myt1-Domäne verwendet. Analog dazu wurde die Interaktion von fluoreszenzmarkierter Myt1-Domäne mit Dasatinib analysiert. Das Labeling der Kinase, wurde mit Monolith™ NHS-Labeling Kit Blue (NanoTemper (München, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Die Lagerung der Myt1-Domäne in 50 mM Tris-HCl pH 7,5 in Gegenwart von 1 mM DTT und 200 mM Imidazol machte ein Umpuffern in den beiliegenden Labeling-Puffer notwendig. Um die Kinasestabilität sicherzustellen, wurden 10 mM $MgCl_2$ und 0,05 % Tween 20 hinzugegeben und die Labeling-Zeit auf 15 min halbiert. Um eine ausreichende Labeling-Effizienz zu gewährleisten, wurde der Fluoreszenzfarbstoff im fünffachen Überschuss zugegeben. Alle Messungen erfolgten mittels Monolith NT.115 (NanoTemper (München, Deutschland), zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. D. Hinderberger (Institut für Chemie, MLU Halle-Wittenberg).

4.15 Protein-Liganden-Docking mit GOLD 5.1

Die vorbereitete Kristallstruktur der Myt1-Kinasedomäne (AS: 79-362 (PDB: 3P1A)) wurde in GOLD 5.1 importiert und Cys190 als Zentrum des Bindungsbereichs definiert. In einem Radius von 20 Å wurden die energieminierten Liganden, entsprechend dem GOLD-Algorithmus, eingepasst. Dafür wurden die Verbindungen als .mol2-Datei vorbereitet und die Flexibilitätseinstellungen standardgemäß beibehalten. Das Docking fand ohne Wassermoleküle statt. Die Ergebnisse wurden als .sdf-Datei ausgegeben und mit dem Goldscore bewertet. Als „constraints“ wurden die von Dasatinib bekannten WBB zum Sauerstoff des Cys190 und vom Stickstoff des Cys190 definiert.

4.15.1 Goldscore

Der Goldscore dient in dieser Arbeit als Vergleichsparameter zum Ermitteln neuer Myt1-Inhibitoren und ging mit dem GBSA-Wert (entspricht der freien Bindungsenthalpie des Protein-Liganden-Komplexes) in den so genannten Konsensuscore ein. Der Goldscore ist die Summe aller molekülmechanischen Beiträge des generierten Protein-Liganden-Komplexes und besteht aus:

- WBB zwischen Protein und Ligand (S_{hb_ext})
- Van-der-Waals-Interaktionen zwischen Protein und Ligand (S_{vdw_ext})
- intramolekularen WBB (S_{hb_int})
- intramolekularen Van-der-Waals-Interaktionen (S_{vdw_int})¹⁴⁵

$$GS \text{ Fitness} = S_{hb_ext} + 1,375 \cdot S_{vdw_ext} + S_{hb_int} + S_{vdw_int}$$

Formel 4.11: Berechnung Goldscore¹⁴⁵

4.16 Virtuelles Screening

In dieser Arbeit kamen verschieden Screening-Methoden zum Einsatz, welche der Identifizierung neuer Myt1-Inhibitoren dienen sollen. Zum einen wurden ungefiltert die Asinex- (> 480.000 Verbindungen) und die Princeton-Datenbank (> 790.000 Verbindungen) sowie die kleineren KinaCore/KinaSet- (> 16.000 Verbindungen), das GSK-PKIS I und II (ca. 900 Verbindungen) und die Selleckchem-Datenbank (273 Verbindungen) gescreent. Zum anderen wurden Filtermethoden angewendet, um größere Datenmengen aus der binding-Datenbank (> 519000 Verbindungen), Princeton- und ZINC-Datenbank (ca. 29,6

Millionen Verbindungen) zu selektieren. Als Filter wurden Pharmakophormodelle, Wissensbasierte Methoden und Strukturmerkmale (sowohl für „similarity“- als auch für „scaffold search“) verwendet. Für „similarity“- und „scaffold search“ wurden die „smiles“-Codes der Grundgerüste, der bekannten Myt1-Inhibitoren Dasatinib und PD-0166285, sowie der Verbindung ZINC 34643022 eingesetzt. Pharmakophormodelle wurden mit LigandScout 4.0 generiert^{146, 147}. Das erste Filtern einer Datenbank fand vor dem Docking statt, das zweite Filtern danach. Die Selektion der VS-Hits wurde entsprechend der Bewertung des Docking-Ergebnisses vorgenommen.

4.16.1 LigandScout 4.0

LigandScout 4.0 ist ein Programm zur Generierung eines 3D-Pharmakophormodells aus einem Protein-Liganden-Komplex. Die Komplexe aller bekannten Myt1-Inhibitoren und der Domäne wurden durch Docking erstellt und als .pdb-Datei importiert. Daraus konstruiert LigandScout die „features“ unter Betrachtung folgender Interaktionen:

- Wasserstoffbrückenbindungen
- Charge-Transfer-Komplexe
- Elektrostatische Wechselwirkungen
- Hydrophobe Wechselwirkungen

Zusätzlich werden Volumen-„constraints“ ermittelt, die eine Kollision des Liganden mit der Bindungstasche verhindern sollen¹⁴⁶. Für Modell 1 (PD-Modell) wurden Dasatinib, PD-0166285, PD-173952, PD-173955 und PD-180970 verwendet. Modell 2 (Tyr-Modell) wurde von Tyrphostin AG1478, Bosutinib, Pelitinib und Saracatinib abgeleitet. Zur Optimierung der Modelle wurde eine Datenbank aus 52 inaktiven, strukturähnlichen Verbindungen und den bekannten Inhibitoren generiert.

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Expression und Aufreinigung der Myt1-Kinase

Da die Myt1-Kinase nicht kommerziell verfügbar war (seit Jan. 2016 verfügbar, Proquinase, Freiburg), wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Kinaselösungen selbst präpariert. In vorhergehenden Arbeiten wurden das HEK- Expressionssystem für die Kinase-FL¹⁴⁸ und das *E.coli* basierende Expressionssystem für die Kinasedomäne etabliert¹³⁹. Ziel dieser Arbeit sollte es unter anderem sein, die bekannten Systeme hinsichtlich Reinheit und Ausbeute zu optimieren bzw. neue Expressionssysteme zu etablieren.

5.1.1 Präparation von Myt1-Domäne

Die Gewinnung der Myt1-Domäne erfolgte wie unter Abschnitt 4.5.2 beschrieben. Um den Einfluss der Aminosäuresequenz auf die Eigenschaften der Kinasedomäne zu untersuchen, wurden vier verschiedenen Konstrukte generiert. Zu diesen Konstrukten zählt der standardmäßig verwendete Abschnitt (AS: 75-362) in zwei Varianten, einmal im Plasmid pET28 und einmal im Plasmid pNIC28-Bsa4 (zur Verfügung gestellt von Prof. S. Knapp, SGC Universität Oxford). Des Weiteren wurde ein *N*-terminal verlängertes Fragment der Myt1 untersucht (AS: 1-362). Als vierte Variante wurde ein *C*-terminal verlängertes Fragment betrachtet (AS: 75-499). Im *C*-terminalen Abschnitt der Myt1 befindet sich die Membran-Bindungs-Domäne (MBD) (AS: 378-399) und die Substrat-Bindungs-Stelle (AS: 436-499)^{17, 52}, die zusätzlich regulatorische Aminosäuren enthält⁶¹. Damit die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet ist, wurden alle transformierten *E.coli* parallel kultiviert und induziert. Der anschließende Zellaufschluss und die folgende affinitätschromatographische Aufreinigung wurden ebenfalls für alle Zellpellets identisch durchgeführt. Für die erhaltenen Kinasefragmente wurden die Reinheit und Ausbeute bestimmt und anschließend die Bindungsaffinität zur DasAFITC-Sonde ermittelt (siehe Tabelle 5.1). Dazu wurde die Anisotropie des Kinase-Sonden-Komplexes, in Gegenwart von 1 % DMSO (0 % Verdrängung) oder 10 μ M Dasatinib (100 % Verdrängung), gemessen. Untersucht wurden 0-500 nM Kinase mit 5 nM DasAFITC nach zweistündiger Inkubation bei RT. Die daraus erhaltenen Δr -Werte wurden gegen die Kinasekonzentration aufgetragen, um den K_d -Wert mittels nicht-linearer Regression zu ermitteln (siehe Abschnitt 4.9).

Tabelle 5.1: Zusammenfassung der Ergebnisse der Präparation verschiedener Myt1-Fragmente

Bezeichnung	AS-Sequenz	Reinheit [%]	Ausbeute [mg/l]	K _d [nM] zu DasAFITC
Kinasedomäne	75-362	45-90	1,43	138
N-terminal	1-362	25-50	0,48	133
C-terminal	75-499	<15	0,16	-
Kinasedomäne (Prof. S. Knapp)	75-362	25-50	1,47	203

Die Ergebnisse der Präparation verschiedener Kinase-Fragmente lassen erkennen, dass die Aminosäure-Sequenz einen geringen Einfluss auf die Bindungsaffinität zur Sonde hat. Da in allen Fragmenten die ATP-Bindungstasche enthalten ist, wurde dieser Effekt erwartet. Betrachtet man Reinheit und Ausbeute, ist eine deutlich Verschlechterung der Parameter für die verlängerten Myt1-Fragmente erkennbar. Für das C-terminal verlängerte Fragment entsprechen diese Verschlechterungen den Erwartungen, da die enthaltenen MBD die Verwendung von Detergenzien erforderlich macht. Da die affinitätschromatografische Aufreinigung im Triton X-100-freien Tris-Puffer erfolgte, sind die geringen Proteinkonzentrationen und Ausbeuten auf Solubilisierungsprobleme zurückzuführen. Die geringe Menge an Myt1 resultierte, bei gleichbleibender Menge an löslichen Proteinen, in einer reduzierten Reinheit und machte eine K_d-Bestimmung impraktikabel. Im Falle des N-terminal verlängerten Fragments lassen die reduzierte Reinheit und Ausbeute auf eine vermehrte Produktion von anderen löslichen Proteinen schließen.

Vergleicht man die beiden Plasmide, ist eine verminderte Reinheit für das pNIC28-Bsa4 Plasmid erkennbar. Bei annähernd gleicher Ausbeute lassen sich diese Ergebnisse auf eine allgemein gesteigerte Proteinproduktion zurückführen. Da die höchsten Reinheiten und eine akzeptable Ausbeute unter den etablierten Bedingungen erzielt wurden, erfolgte keine Änderung der Kinasepräparationsbedingungen für die Myt1-Domäne vorgenommen.

5.1.2 Präparation von Myt1-Volllänge

Das etablierte HEK-Expressionssystem zur Generierung von Myt1-Volllänge (FL) führte lediglich zu Kinaselösungen mit nicht optimaler Reinheit ¹⁴⁹. Die geringe Ausbeute und die zeit- und materialaufwendige Kultivierung der HEK-Zellen machten eine Optimierung der Myt1-FL Expression empfehlenswert. Größere Mengen Biomasse können mit dem klassischen Expressionssystem, basierend auf *E.coli*, gewonnen werden. Deswegen wurde im Rahmen der Diplomarbeit von Dipl.-Pharm. Lina Humbeck die Eignung dieses Expressionssystems zur Myt1-FL Generierung untersucht ¹²⁰. Dabei wurde ein vielversprechender *E.coli*-Stamm ausgewählt und die Expressionsbedingungen hinsichtlich Inkubationszeit und -temperatur optimiert. Zusätzlich wurden verschiedene Induktionszusätze, einzeln und in Kombination untersucht. Die höchste Ausbeute an Myt1 wurde nach 15-stündiger Inkubation mit 0,5 mM IPTG, 1 M Sorbitol und 12 mM MgCl₂, bei 25 °C erhalten. Der anschließende Zellaufschluss und die Aufreinigung erfolgte analog der Myt1-Domäne mit HisTrap Säulen, unter Verwendung von 0,5 % Triton X-100. Als zusätzliche Modifikation der Aufreinigung wurde eine GSTrap FF Säule verwendet ¹²⁰, da die exprimierte Myt1 neben dem HisTag noch einen zusätzlichen GST-Tag (Glutathion S-Transferase) auswies. Die erhaltenen Kinaselösungen wurden dieser Arbeit zur Verfügung gestellt, um die Kinaseaktivität zu bestimmen. Dazu wurde der FPIA-II mit 200 µM PDGFRB⁵⁷⁵⁻⁵⁸⁷ verwendet. Nach Zugabe von 40 nM Kinase wurde die Lösung für 2 h bei 30 °C inkubiert. Als Positivkontrolle diente die Myt1-FL aus HEK-Zellen und als Negativkontrolle wurde eine Reaktion ohne Peptid verwendet. Die gemessenen Anisotropien sind in Abbildung 5.1 A dargestellt. Alle Kinasepräparationen aus *E.coli* wiesen Werte um 0,1 auf, was einer Abwesenheit von Phosphopeptiden entspricht. Somit konnte keine Kinaseaktivität für die Proben nachgewiesen werden.

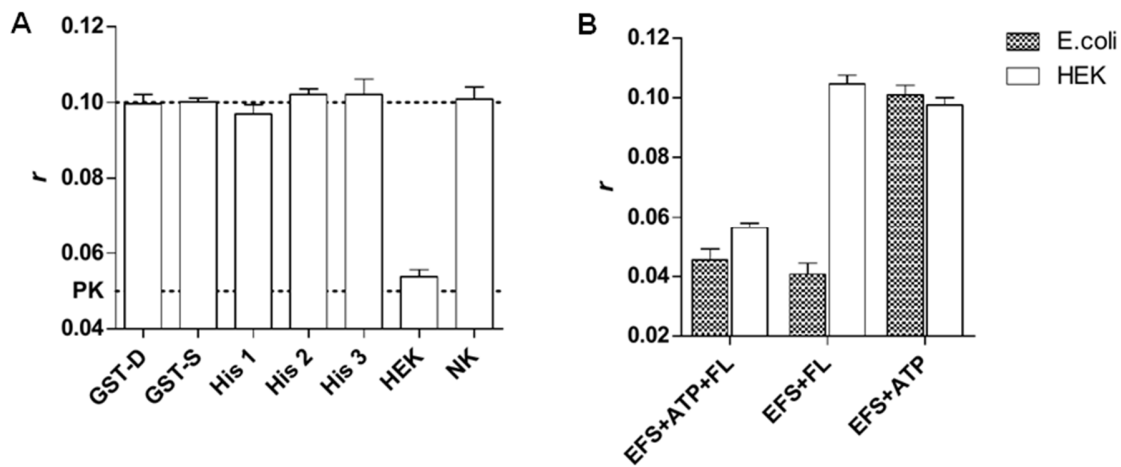


Abbildung 5.1: Aktivitätsmessung der Kinasepräparation mittels FPIA-II. **A** FL exprimiert aus *E.coli* und aufgereinigt mit HisTrap bzw. GSTTrap Säulen. Als Positivkontrolle dient FL aus HEK und die Negativkontrolle stellt die Reaktion ohne Peptid dar. **B** Vergleich von HEK und *E.coli* Expressionssystem. FL mit His-Select Spin-Säulen aufgereinigt. Die Daten geben Mittelwert \pm SEM (n=3) an.

Um sicherzustellen, dass die Inaktivität der Myt1-FL nicht durch die Aufreinigungsmethode induziert war, wurde erneut Kinase generiert und mit His-Select Spin-Säulen entsprechend Abschnitt 4.5.1.1 gereinigt. Die erhaltenen Lösungen wurden ebenfalls, mit 200 μ M des geeigneteren Peptides EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹, getestet. Als Vergleich diente Myt1-FL aus HEK-Zellen. Als Negativkontrollen dienten die Reaktionen in Abwesenheit von ATP oder Myt1, um sicherzustellen, dass die beobachtete Verdrängung der Sonde nicht durch Kinasepräparation selbst verursacht wurden. Die gemessenen Anisotropie-Werte sind in Abbildung 5.1 **B** dargestellt. Es ist eine deutliche Reduktion der Anisotropie-Werte der Kinasereaktion sowohl für FL aus HEK, als auch aus *E.coli*, zu erkennen. Keine Verdrängung der Sonde findet hingegen in Abwesenheit von Kinase statt. Im Fall der Myt1-FL aus *E.coli* ist auch eine Sondenverdrängung in Abwesenheit von ATP zu erkennen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die beobachteten Verdrängungen der Sonde nicht eindeutig durch Phosphorylierung von EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ hervorgerufen wurden, sondern die Kinasepräparation selbst diesen Effekt auslöste und somit vermutlich keine aktive Kinase vorlag. Die verwendete Aufreinigungsmethode mit His-Select Spin-Säulen wurde so optimiert, dass keine Kinaseaktivität verloren gehen sollte. Da die exprimierte Myt1-FL aus *E.coli* keine eindeutig nachweisbare Aktivität aufwies, scheint dieses Expressionssystem, unter den derzeit gewählten Bedingungen, ungeeignet zur Myt1-FL-Generierung zu sein. Das Problem der Produktion inaktiver Enzyme durch *E.coli*

wurde häufiger beschrieben und kann sowohl auf Fehler in der Proteinfaltung¹⁵⁰ als auch auf abweichende posttranslationale Modifikationen (z.B. N-Glykosylierung) zurückgeführt werden¹⁵¹. Was die Ursache der Inaktivierung für die hier verwendete Expression ist, kann nicht sicher festgestellt werden. Aus früheren Experimenten ist bekannt, dass ein vermehrter proteolytischer Abbau der Myt1 in *E.coli* stattfindet¹⁵². Das lässt auf Probleme bei der Proteinfaltung schließen, da fehlgefaltete Enzyme besonders proteolyselabil sind. Auf Grund der fehlgeschlagenen Expression in *E.coli*, wurde im Folgenden weiter das HEK-Expressionssystem zur Myt1-FL Generierung verwendet.

5.2 Aktivitätsassay-Entwicklung und Kinasereaktion-Charakterisierung für Myt1

Ziel der Arzneimittelforschung ist es, die Funktion von Enzymen zu beeinflussen und somit in ein Krankheitsgeschehen einzugreifen. Um dies jedoch zu ermöglichen, ist es erforderlich, die Funktionalität des Enzyms exakt zu kennen und dessen Aktivität zu messen. Dazu verwendet man in der biologischen und pharmazeutischen Forschung einen Assay. Definitionsgemäß versteht man darunter eine Methode zur Charakterisierung eines Objekts bzw. Systems, die ein definiertes Messverfahren und deren Auswertung beinhaltet ¹⁵³. Nachdem es in unserer AG gelungen war, ein fluoreszenzpolarisationsbasiertes Bindungsassay für die Myt1-Kinase zu etablieren ¹³⁹, bestand das Ziel dieser Arbeit, ein auf dem gleichem Messprinzip basierenden Aktivitätsassay zu entwickeln. Gemessen wird dabei die FP einer fluoreszenzmarkierten Sonde, die einen Phosphotyrosin-Rest enthält und nur eine geringe FP aufweist. In Gegenwart eines Phosphotyrosin-Antikörpers erhöht sich die FP aufgrund der Komplexbildung und der damit verbundenen Vergrößerung des Molekulargewichtes. Beim Vorliegen eines phosphorylierten Produktes wird der Antikörper von der Sonde verdrängt. Die freie Sonde weist dadurch wieder eine niedrige FP auf und ermöglicht so die Detektion der Kinasereaktion (Assayprinzip siehe Abbildung 5.2).

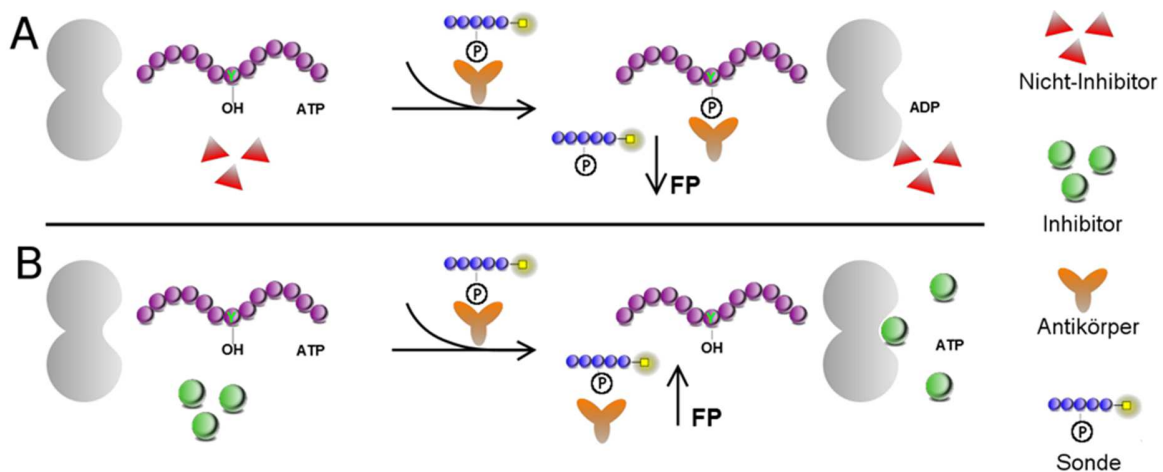


Abbildung 5.2: Assayprinzip des Fluoreszenzpolarisationsimmunoassays (FPIA). Die Kinase (grau) phosphoryliert das Peptid (pink) und ermöglicht damit die Verdrängung der Sonde (blau) vom Antikörper (orange), in Gegenwart eines nicht-Inhibitors (rot). Wenn ein Inhibitor (grün) vorhanden ist kann keine Phosphorylierung stattfinden und eine hohe FP wird gemessen.

Bis zum Beginn dieser Arbeit standen zwei Bindungsassays zur Untersuchung der Myt1-Kinase zu Verfügung, die von unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurden. Dabei wurden sowohl die Myt1-FL¹⁴⁸ als auch die Myt1-Domäne verwendet¹³⁹. Des Weiteren wurden Untersuchungen am natürlichen Substrat Cdk1 mit der Myt1-FL durchgeführt und mittels Western-Blot detektiert¹²³. Die Untersuchungen an der Cdk1 stellten die ersten Aktivitätsmessungen der Myt1 dar und konnten Aufschluss über die Substraterkennung der Kinase liefern. Der zu entwickelnde fluoreszenzpolarisationsbasierte Aktivitätsassay sollte die Lücke bei der Myt1-Testung schließen und die erste biochemische Charakterisierung der Kinase ermöglichen.

5.2.1 Identifizierung von Myt1-Peptidsubstraten

Ein essentieller Bestandteil eines Aktivitätsassay ist das Substrat, welches von der Kinase erkannt werden muss. Das Hauptkriterium bei der Wahl des Substrates ist die Spezifität der Kinase. Somit ist das natürliche Substrat zu bevorzugen^{154, 155, 156}. Da Cdk1 als Protein ungeeignet ist, um ein Medium-Throughput-Assay zu entwickeln, sollte ein kurzkettiges Peptidsubstrat gefunden werden. Erste Untersuchungen mit Cdk1-abgeleiteten Peptiden zeigten keine Phosphorylierung durch Myt1¹²³. Zur Identifizierung eines geeigneten Substrats wurde von Dr. A. Rohe ein Peptid-Microarray genutzt, welches 2304 Peptide beinhaltet. Die Peptide bestanden aus 13 Aminosäuren und enthielten mindestens ein Tyrosin. Sie wurden von humanen Phosphorylierungsstellen abgeleitet. Extrahiert wurden die Peptide aus den Datenbanken SwissProt und Phosphobase¹⁵⁷. Die Detektion der Phosphorylierung erfolgte mit Hilfe des anti-pTyr-Antikörpers (P-100), welcher auch im zu entwickelnden Assay Verwendung fand. Mit Hilfe dieses Microarrays wurden 11 Peptide ermittelt, die von der Myt1-Kinase phosphoryliert werden konnten (Aminosäuresequenz siehe Tabelle 5.2). Um sie als Substrat der Kinase zu validieren, wurden die Peptide mittels Festphasenpeptidsynthese hergestellt¹¹⁷ und mit FPIA-II getestet. Erste Testungen, der in Standardkinasepuffer A (SKP-A) gelösten Peptide, wurden mit 200 µM Assaykonzentration durchgeführt. Als Negativkontrollen dienten die Reaktionen in Abwesenheit von ATP oder Myt1. So wurde sichergestellt, dass die beobachtete Verdrängung der Sonde nicht durch das Peptid selbst verursacht wurde. Aus dieser Testung wurden die in Tabelle 5.2 angegebenen Verdrängungen ermittelt. Peptide, die demnach eine signifikante Verdrängung (> 50 %) aufwiesen, wurden zur Bestimmung der apparativen K_m ausgewählt. Dazu wurden

Verdünnungen von 1-200 μM hergestellt und für 30 min bei 30 °C in Gegenwart von 500 μM ATP inkubiert. Die reduzierte Inkubationszeit stellte eine lineare Phase der Produktbildung sicher. Mittels nicht-linearer Regression der Ergebnisse wurden für alle getesteten Peptide $K_{m, \text{app}}$ im mikromolaren Bereich detektiert (Tabelle 5.2). Das Peptid EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ mit einem $K_{m, \text{app}}$ von $6,8 \pm 1,4 \mu\text{M}$ stellt das affinste Substrat dar und wurde für die folgende Assayentwicklung herangezogen. Die Verifizierung der Phosphorylierungsstellen fand mittels Massenspektrometrie statt ¹⁵⁷.

Tabelle 5.2: Bestimmung von $K_{m, \text{app}}$ der Peptidsubstrate an der Myt1 mit FPIA-II

Peptide	Sequenz	Verdrängung der Sonde bei 200 μM Peptidkonzentration [%]	$K_{m, \text{app}}$ [μM]
EAA1 ⁷¹⁹⁻⁷³¹	AFLLESTMNEYR	5 ^a	Nicht bestimmt
EFS ²⁴⁷⁻²⁵⁹	GTDEGIYDVPLLG	> 95	$6,8 \pm 1,4$
INR1 ⁴⁷⁵⁻⁴⁸⁷	SSSIDEYFSEQPL	21	Nicht bestimmt
INSR ¹¹⁷⁹⁻¹¹⁹¹	GMTRDIYETDYR	> 95	$11,9 \pm 3,6$
MAPK11 ¹⁷⁶⁻¹⁸⁸	DEEMTGYVATRKY	5 ^b	Nicht bestimmt
MAPK14 ¹⁷⁶⁻¹⁸⁸	DDEMTGYVATRKY	14 ^c	Nicht bestimmt
MMD ²²⁴⁻²³⁶	WKYLYRSPTDFMR	40	Nicht bestimmt
PDGFRB ⁵⁷⁵⁻⁵⁸⁷	DGHEYIYVDOMQL	84	$46,0 \pm 5,7$
RET ¹⁰⁹⁰⁻¹¹⁰²	YPNDSVYANWMLS	93	$8,7 \pm 2,0$
SC4A ³⁸¹⁻³⁹³	NPNYGYTSYDTFS	> 95	$44,3 \pm 8,4$
TRKA ⁶⁷⁰⁻⁶⁸²	GMSRDIYSTDYR	> 95	$18,3 \pm 3,4$

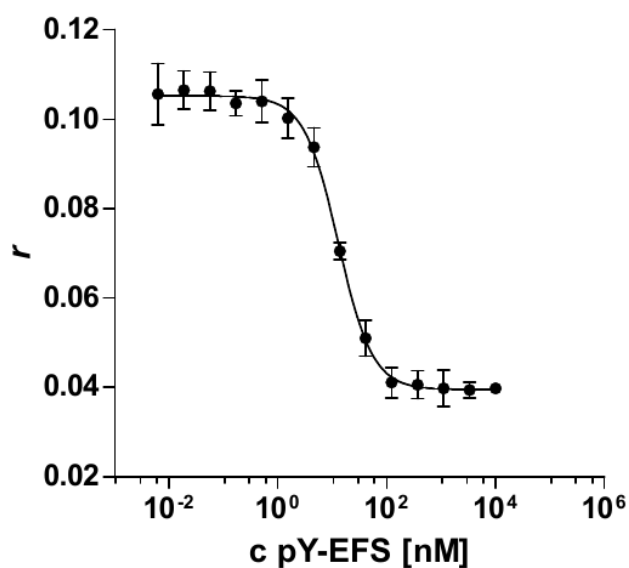
^a Peptidkonzentration auf 100 μM reduziert (Löslichkeitsprobleme)

^b Peptidkonzentration auf 150 μM reduziert (Löslichkeitsprobleme)

^c Peptidkonzentration auf 50 μM reduziert (Löslichkeitsprobleme)

5.2.2 Bestimmung der Sensitivität des FPIA-III

Nach der Identifizierung von EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ als geeignetes Peptid für die Entwicklung des FPIA-III sollte die Sensitivität dieses Assays ermittelt werden. Dazu wurde pY-EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ hergestellt und eine Verdrängungskurve des Antikörper-Sonden-Komplexes, in Gegenwart von 10 μ M bis 6,3 pM, aufgenommen (Abbildung 5.3). Mittels nicht-linearer Regression der Kurve ergab sich ein EC₅₀-Wert von 13 ± 1 nM, somit verdrängt pY-EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ den Antikörper effektiv von der Sonde.



Peptid	EC ₅₀ [nM]
pY-Cdk1 ⁸⁻²⁰	125 \pm 6 ¹²¹
pY-EFS ²⁴⁷⁻²⁵⁹	13 \pm 1
pY-NTRK1	43 \pm 3 ¹²¹
pY-PDGFR α	272 \pm 18 ¹²¹

Abbildung 5.3: Verdrängungskurven der Sonde durch pY-EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹. Die abgebildeten Daten entsprechen Mittelwert \pm SEM (n=5).

Tabelle 5.3: EC₅₀-Werte der Antikörper-Verdrängung von Phosphotyrosin-Peptiden.

Vergleicht man den erhaltenen EC₅₀-Wert von pY-EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ mit den von Dr. A. Rohe bestimmten Werten für zwei Modellpeptide (pY-NTRK1, pY-PDGFR α) sowie pY-Cdk1⁸⁻²⁰ (Abbildung 5.3) ¹²¹ ist zu erkennen, dass pY-EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ den Antikörper am effektivsten verdrängt. Es können mit diesem Peptid subnanomolare Substratumsätze detektiert werden. Damit ergibt sich, dass ein Assay basierend auf EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ um das Zehnfache sensitiver ist als ein Assay basierend auf Cdk1⁸⁻²⁰. Bei diesem Vergleich ist jedoch zu beachten, dass Myt1 das vom natürlichen Substrat abgeleitete Cdk1⁸⁻²⁰-Derivat nicht als Substrat erkennt ^{123, 158}. Das verwendete pY-EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ diente als Referenz, später gemessene Anisotropien in eine Peptidkonzentration umzurechnen.

5.2.3 Optimierung der Reaktionsbedingungen

Zu Beginn der Assayentwicklung sollte eine EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ Konzentration festgelegt werden, mit der die Reaktionsbedingungen optimiert werden. Um die Verbräuche des Substrates dabei so niedrig wie möglich zu halten, wurden 20 und 50 μM EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ ausgewählt und die Reaktion mit 40 nM Myt1-FL und 500 μM ATP durchgeführt. Dabei wurden Reaktionszeiten von 1 min bis 90 min betrachtet. Die erhaltenen Δr -Werte dieser Messungen sind in Abbildung 5.4 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass mit 50 μM EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ die Linearität der Reaktion nach 30 min beendet ist und ein Wert von 0,05 erreicht wurde. Die maximal mögliche Differenz zwischen freier Sonde und gebundener Sonde liegt bei 0,08¹⁵⁷. Bei 20 μM EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ wurde ein Δr -Werte von 0,05 erst nach 90 min erhalten. 50 μM EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ wurden folglich ausgewählt, um die Optimierung der Kinasereaktion durchzuführen, da damit sowohl Verbesserungen als auch Verschlechterungen der Bedingungen detektierbar waren.

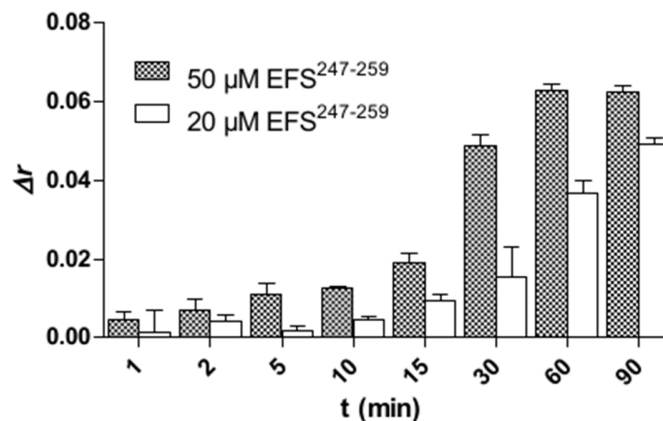


Abbildung 5.4: Effekt der EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹-Konzentration auf die Myt1-Reaktion. Dargestellt sind Δr -Werte für 20 und 50 μM EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ nach 1 bis 90 min Inkubation. Angegeben sind Mittelwert \pm SEM (n=3).

Die Reaktionsgeschwindigkeit einer Enzymreaktion ist von verschiedenen äußeren Einflüssen abhängig. Dazu zählen neben der Temperatur auch der pH-Wert des Puffers und enthaltene Pufferbestandteile wie z.B. Detergenzien und Lösungsmittel. Im Mittelpunkt dieser Betrachtung steht vor allem die Proteinstabilität, allerdings darf auch die Sensitivität gegen Inhibitoren nicht vernachlässigt werden. Die Optimierung der Kinaseaktivität resultiert in der Konzentrationsreduktion der eingesetzten Kinase. Im Falle der Myt1 ist die Reduktion der einzusetzenden Testmenge die Kinase betreffend von enormer Bedeutung, da Myt1 nicht

kommerziell erhältlich ist. Für die Myt1 wurden zuvor noch keine Untersuchungen hinsichtlich externer Parameter durchgeführt. Damit stellt die folgende Arbeit mit den durchgeführten Experimenten die erste biochemische Charakterisierung der Myt1-Kinase dar.

5.2.3.1 Einfluss des Puffersystems

Alle zuvor erfolgten Untersuchungen fanden im Tris-HCl Puffer pH 7,5 statt^{158, 159}. Um den Effekt des verwendeten Puffersystems zu ermitteln, wurden drei weitere Puffer ausgewählt und auf pH 7,5 eingestellt. Dazu zählten der HEPES-, MOPS- und Phosphatpuffer. In allen Puffern wurde 50 μ M EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ mit 40 nM Myt1-FL inkubiert. Abbildung 5.5 **A** zeigt eine Vergrößerung des Δr -Wertes für den HEPES- und MOPS-Puffer auf $\approx 0,06$. Im Phosphatpuffer hingegen sinkt der Wert auf 0,01 ab. Die Reduktion der Reaktionsgeschwindigkeit ist im Falle des Phosphatpuffers auf die Produkthemmung durch das Phosphat selbst zurückzuführen¹⁶⁰. Für die anschließende Bestimmung des pH-Optimums wurde der HEPES Puffer ausgewählt, da in ihm die größte Myt1-Aktivität messbar war und er im TR-FRET- und DasAFITC-Assay Anwendung findet. Damit wird eine bessere Vergleichbarkeit der späteren Ergebnisse sichergestellt.

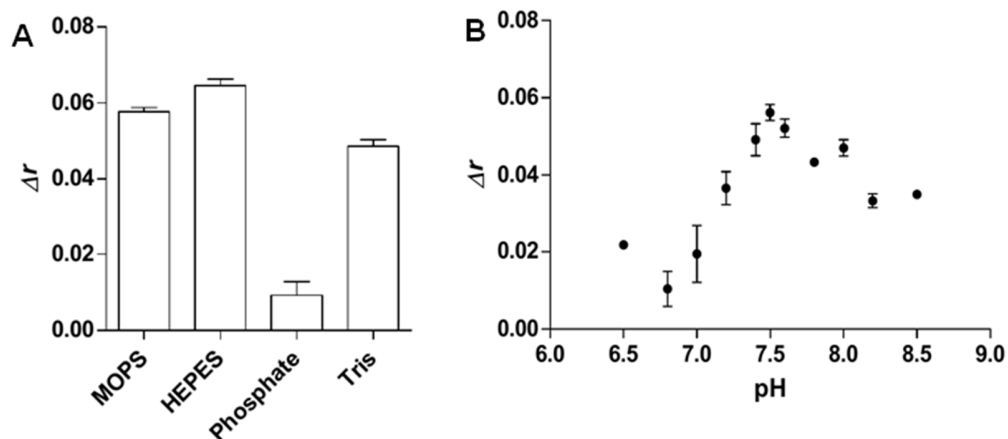


Abbildung 5.5: Einfluss des Puffers auf die Kinasereaktion **A** Einfluss der verwendeten Puffersysteme (pH 7,5) von MOPS-, HEPES-, Phosphat- und Tris-Puffer. **B** Bestimmung des pH-Optimums der Myt1-Kinasereaktion in HEPES. pH-Bereich 6,5-8,5. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM (n=3).

5.2.3.2 Bestimmung pH-Optimum

Ausgehend von HEPES pH 7,5 sollte im nächsten Schritt das pH-Optimum der Myt1-Reaktion bestimmt werden. Der pH-Wert während der Enzymreaktion beeinflusst die Reaktionsgeschwindigkeit sowohl durch die H^+ und OH^- Konzentration als auch durch die Änderung der Bruttoladung des Enzyms sowie dessen Aminosäuren. Dadurch wird die Konformation des Enzyms und damit einhergehend die Bindung und Umsetzung des Substrats beeinflusst¹⁶¹. Mit einem pK_a von 7,5 kann HEPES einen Bereich von 6,5 bis 8,5 effektiv puffern. Bei pH 6,5; 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 7,5; 7,6; 7,8; 8,0; 8,2 und 8,5 wurde die Kinasereaktion gemessen und Δr ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.5 **B** dargestellt. Die Punkte zeigen einen Kurvenverlauf, dessen Maximum bei pH 7,5 liegt. Das Optimum der Myt1-Reaktion konnte damit für diesen pH festgestellt werden. Es ist weiterhin zu erkennen, dass niedrigere pH-Werte schlechter toleriert werden als höhere. Da alle zuvor erfolgten Untersuchungen am pH-Optimum stattfanden, konnte mit der Optimierung der Reaktionsbedingungen fortgefahren werden.

5.2.3.3 Einfluss der Ionenstärke

Analog zum pH-Wert kann auch die Ionenstärke die Enzymreaktion beeinflussen. Optimalerweise werden Ionenstärken zwischen 100 und 200 mM zur Messung der Enzymaktivität eingesetzt¹⁶², den physiologischen Bedingungen entsprechend. In den vorhergehenden Untersuchungen betrug die Ionenstärke des Puffers 159 mM. Um den Einfluss der Ionenstärke zu ermitteln, wurde die Kinasereaktion in Gegenwart von 0-300 mM NaCl gemessen, was in Ionenstärken zwischen 119 und 419 mM resultierte. Der Verwendung von HEPES als Puffersubstanz und $MgCl_2$ als Zusatz geschuldet können keine Ionenstärken von 0 mM untersucht werden. Abbildung 5.6 **A** zeigt, dass die Werte für die Kinasereaktion annähernd gleichbleibend bei 0,08 liegen. Die Anisotropie des AK-Sonden-Komplexes hingegen sinkt deutlich mit steigender NaCl Konzentration was in einer Verkleinerung des Assayfensters resultiert (siehe Abbildung 5.6 **B**). Daraus lässt sich ableiten, dass die Bindung von Antikörper und Sonde von NaCl bzw. steigenden Ionenstärken beeinflusst wird. Ähnliche Effekte konnten für die Polyarginin Bindung an gelabelten Peptiden nachgewiesen werden^{163, 164}. In der Lagerform des Antikörpers sind 150 mM NaCl enthalten, um dessen Stabilität zu gewährleisten. Um somit einen Kompromiss zwischen Antikörperstabilität und Bindungsaffinität zu finden und da alle

vorhergehenden Untersuchungen des AK-Sonden-Komplexes, wie K_d - und CV-Bestimmung, bei 40 mM NaCl stattfanden, wurde folgend weiter mit dieser Konzentration gearbeitet.

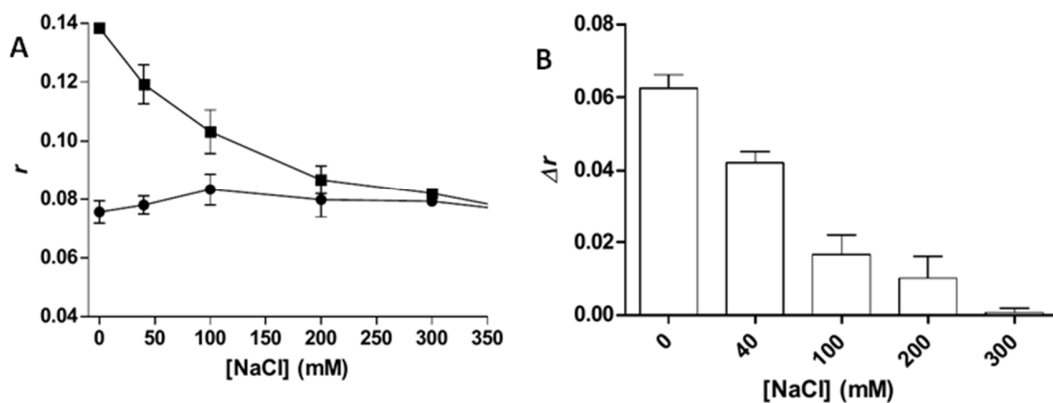


Abbildung 5.6: Einfluss der Ionenstärke auf das FPIA-III **A** Anisotropie-Werte der Kinasereaktion (●) und keiner Reaktion (■) bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen **B** resultierendes Assayfenster bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen. Die abgebildeten Daten repräsentieren Mittelwert \pm SEM (n=3).

5.2.3.4 Einfluss der Triton X-100 Konzentration

Für die Extraktion der membrangebundenen Myt1-Kinase wird Triton X-100 verwendet. Eine Konzentration über der CMC („critical micelle concentration“) von 0,0069 %¹²¹ (0,22 mM in Wasser¹⁶⁵) ist dabei notwendig, um die Kinase in Lösung zu bringen. Es ist allgemein bekannt, dass Detergenzien sowohl die Enzymaktivität als auch die Potenz (IC_{50}) und Affinität (K_d) von Verbindungen dramatisch beeinflussen können^{166, 167}. Um den Einfluss auf die Myt1-Aktivität zu bestimmen, wurden Triton X-100 Konzentrationen von 0,0075 – 0,04 % (m/V) getestet. Nach anfänglicher Steigerung der Aktivität bei erhöhter Triton X-100 Konzentration fällt die Aktivität bei Werten über 0,025 % (m/V) ab (siehe Abbildung 5.7 A). Vorab durchgeführte Experimente fanden bei einer Triton X-100 Konzentration von 0,04 % (m/V) statt. Basierend auf den erhaltenen Test-Ergebnissen wurde die Konzentration in den weiteren Experimenten auf 0,025 % (m/V) reduziert.

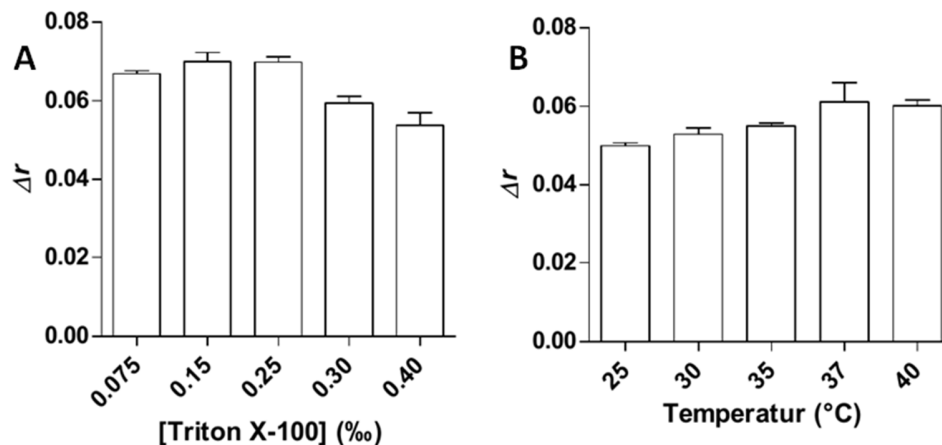


Abbildung 5.7: Einfluss Detergenzien und Temperatur auf die Kinasereaktion **A** Einfluss der Triton X-100 Konzentrationen von 0,0075 bis 0,04 (m/V) und **B** Einfluss der Temperatur auf die Kinasereaktion. Getestet wurden Temperaturen von 25°C bis 40°C. Die dargestellten Ergebnissen entsprechen Mittelwert \pm SEM (n=3).

5.2.3.5 Einfluss der Inkubationstemperatur

Aus dem Arrhenius-Gesetz kann abgeleitet werden, dass eine Erhöhung der Temperatur um 10 K in etwa zu einer Verdopplung der Reaktionsgeschwindigkeit führt. Diese Regel kann, trotz der Komplexität, auch auf Enzymreaktionen übertragen werden¹⁶¹. Ähnlich dem pH-Wert existiert ein optimaler Wert für die Inkubationstemperatur der Kinasereaktion, da höhere Temperaturen zu einer Denaturierung der Proteins führen. Dabei ist zwischen reversibler und irreversibler Denaturierung zu unterscheiden, wobei bei der reversiblen Denaturierung der Verlust von WBB eine besondere Rolle spielt¹⁶⁸. Untersucht wurden im Rahmen dieser Arbeit Inkubationstemperaturen von 25 °C bis 40 °C. Aus den resultierenden Δr -Werten, die in Abbildung 5.7 **B** dargestellt sind, lässt sich erkennen, dass von 25 °C bis 37 °C ein Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit stattfindet. Bei einer Inkubationstemperatur von 40 °C hingegen fällt die Kinaseaktivität ab. Das Temperaturoptimum der Myt1-Reaktion kann daraufhin auf 37 °C festgelegt werden. Ähnlich dem pH-Optimum von 7,5 entspricht auch das Temperaturoptimum von 37 °C den physiologischen Bedingungen, ein Resultat, das für die humane Myt1 zu erwarten war.

5.2.3.6 Stabilität des Assays bei verschiedenen DMSO Konzentrationen

Das Ziel eines Aktivitätsassays besteht unter anderem in der Testung von Inhibitoren, welche vorwiegend in DMSO gelöst vorliegen. Es muss bei der Entwicklung eines Assays darauf

geachtet werden, dass die Enzymstabilität bei verschiedenen DMSO Konzentrationen sichergestellt ist. Enzymatische oder biomolekulare Assays tolerieren dabei meist höhere Konzentrationen, bis 5 % oder 10 % (V/V), anders jedoch als zelluläre Assays¹⁶⁹. Der FPIA-III wurde hinsichtlich seiner Stabilität in einem Bereich von 0,5 % - 10 % (V/V) DMSO untersucht. Dabei sind die erhaltenen Δr -Werte, wie in Abbildung 5.8 zu erkennen, annähernd gleich, was einer Stabilität über den gesamten Bereich entspricht. Die meisten High-Throughput-Assays verwenden eine finale DMSO Konzentration von 0,5 - 1,5 % (V/V)¹⁵⁴. Für den FPIA-III wurde eine finale DMSO Konzentration von 1,0 % (V/V) festgelegt, die identisch mit der Konzentration im DasAFITC-Assay ist^{139, 148}.

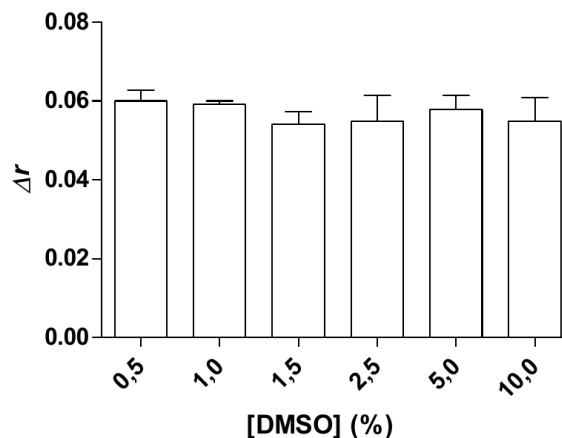


Abbildung 5.8: Einfluss der DMSO Konzentration auf die Kinasereaktion. Die Δr -Werte sind über einen Konzentrationsbereich von 0,5-10,0 % (V/V) stabil. Dargestellt sind Mittelwert \pm SEM (n=3).

5.2.3.7 Bestimmung der optimalen Kinasekonzentration

Während der Optimierung der Reaktionsbedingungen wurde die verwendete Myt1-Menge von 40 nM auf 20 nM reduziert, damit auch weitere Verbesserungen sichtbar blieben. Im letzten Schritt sollte die Kinasekonzentration ermittelt werden, bei welcher die Reaktion über 30 min linear verläuft und ein maximales Signal erhalten wird. Dazu wurde die Reaktion mit Myt1-Konzentrationen von 1 nM bis 35 nM über die Zeit im optimierten Reaktionspuffer gemessen. Die Reaktion weist eine initiale Lag-Phase von 2 min auf, der eine lineare Produktbildung folgt (siehe Abbildung 5.9 A). Im Bereich von 1 nM bis 25 nM verläuft die Reaktion über 30 min linear. Für die folgenden kinetischen Untersuchungen wurden 25 nM

Myt1 verwendet, da ein Δr von $\approx 0,07$ erhalten wurde, was annähernd dem maximalem Wert von 0,08 entspricht.

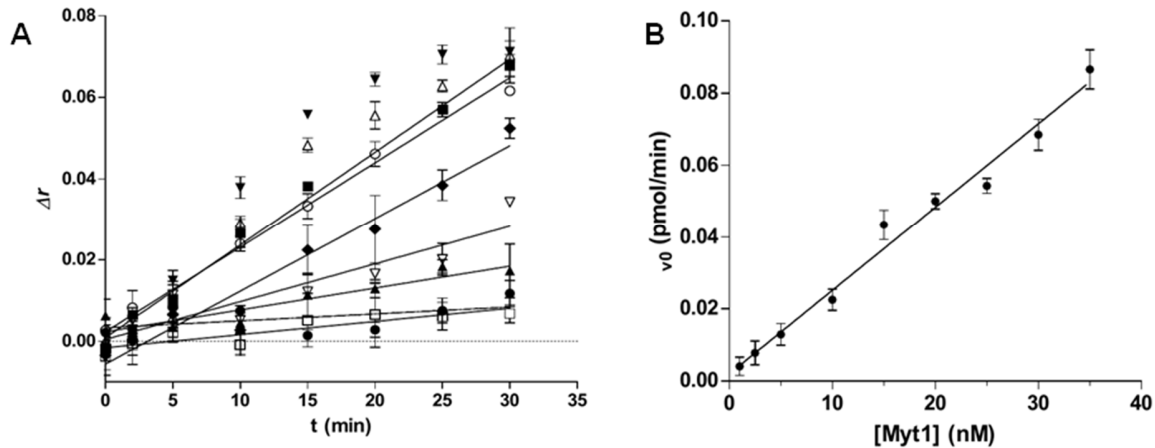


Abbildung 5.9: Verlauf der Kinasereaktion bei verschiedenen Myt1-Konzentrationen **A** Linearität der Reaktion über die Zeit für 1 nM (●), 2,5 nM (□), 5 nM (▲), 10 nM (▽), 15 nM (◆), 20 nM (○), 25 nM (■), 30 nM (△) und 35 nM (▼). **B** Initiale Geschwindigkeit bei unterschiedlichen Myt1-Konzentrationen $r^2 = 0,98$. Die gezeigten Daten stellen Mittelwert \pm SEM ($n=3$) dar.

Ermittelt man aus dem Verlauf der Kinasereaktion die Initialgeschwindigkeit und trägt sie gegen die Myt1-Konzentration auf, erhält man die in Abbildung 5.9 **B** dargestellte Gerade. Entsprechend den Untersuchungen von Michaelis und Menten ist $v_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot [E_t]$. Damit ist die Maximalgeschwindigkeit von der totalen Enzymkonzentration $[E_t]$ abhängig¹⁷⁰. Dem folgend ist auch die Initialgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration abhängig und zeigt bei konstanter Substratkonzentration einen linearen Verlauf. Erhaltene Abweichungen von der erwarteten Linearität ergeben sich entweder durch die Anwesenheit eines reversiblen Inhibitors oder der signifikanten Abnahme der Substratkonzentration. Im letztgenannten Fall führt eine Erhöhung der Enzymkonzentration nicht zur weiteren Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit. Um die wahre Initialgeschwindigkeiten exakt messen zu können, muss die verwendete Enzymkonzentration im linearem Bereich liegen¹⁶². Basierend auf den erhaltenen Ergebnissen wurde unter Verwendung von 25 nM Myt1 im linearen Bereich gearbeitet und die im Folgenden gemessenen Initialgeschwindigkeiten entsprechen der realen Initialgeschwindigkeit.

5.2.4 Kinetische Charakterisierung der Myt1-Kinasereaktion

Nach der Optimierung der Myt1-Reaktion und der damit verbundenen Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit war es das Ziel dieser Arbeit, die kinetischen Parameter der Reaktion zu bestimmen. Die kinetische Charakterisierung ermöglicht ein tiefergehendes Verständnis der Reaktion, welches eine genauere Regulation der Enzymfunktion sowie die Entwicklung potenter Inhibitoren ermöglicht.

Bestimmt wurde die maximale Geschwindigkeit der Reaktion (v_{\max}) in Abhängigkeit der Substrat- und Co-Substratkonzentration sowie die Bindungsaffinität der Substrate zum Enzym, beschrieben durch die Michaelis-Menten-Konstante (K_m). Setzt man v_{\max} ins Verhältnis zur eingesetzten Enzymkonzentration, ergibt sich die katalytische Konstante k_{cat} , welche die Effizienz der Kinase vermittelten Phosphorylierung widerspiegelt. Da jedoch bei diesem Wert die Affinität des Substrates zum Enzym nicht berücksichtigt wird und somit keine Aussage über die Eignung des Substrates für die Enzymreaktion gemacht wird, gibt man das Verhältnis von k_{cat} zu K_m an (k_{cat}/K_m), welches das Substrat-Enzym Paar evaluiert¹⁷¹.

Mit 25 nM Myt1 und 50 μM EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ wurde die FP der Kinasereaktion in Gegenwart von 4 mM bis 31,25 μM ATP über einen Zeitraum von 30 min gemessen. Die Δr -Werte wurden gegen die Zeit aufgetragen und mittels linearer Regression die Initialgeschwindigkeit bestimmt. In Abbildung 5.10 A sind die Ergebnisse der Linearisierung dargestellt. Mit zunehmender ATP Konzentration steigt auch die Initialgeschwindigkeit (v_0), was sich im Anstieg der Geraden widerspiegelt. Ab einer ATP Konzentration von 2 mM ist die Steigung rückläufig. Diese Reduktion der Kinaseaktivität wird auf die Absenkung des pH-Wertes durch ATP zurückgeführt. Zur Berechnung des K_m -Wertes wurden deswegen nur die Daten bis 1 mM ATP berücksichtigt. Dazu wurden die Δr -Werte in Stoffmengen umgerechnet (basierend auf den Daten aus Abschnitt 5.2.2) und die erhaltenen v_0 -Werte gegen die ATP Konzentration aufgetragen (siehe Abbildung 5.10 B). Mittels nicht-linearer Regression, basierend auf dem Modell von Michaelis und Menten¹⁷⁰, ergab sich ein $K_{m, \text{ATP}}$ von $52,4 \pm 6,5 \mu\text{M}$ und ein v_{\max} von $65,7 \cdot 10^{-2} \pm 0,17 \cdot 10^{-2} \text{ pmol/min}$. Aus diesen Daten wurde ebenfalls k_{cat} und k_{cat}/K_m berechnet (siehe Tabelle 5.4).

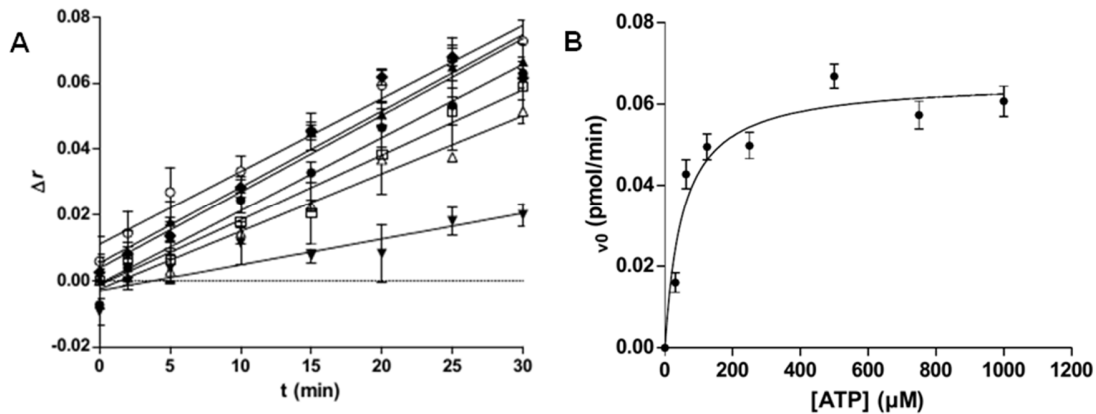


Abbildung 5.10: Bestimmung von $K_{m, ATP}$ **A** Lineare Regression von Δr gegen t (min) bei ATP Konzentrationen von 1 mM (\blacktriangle), 750 μM (\circ), 500 μM (\blacklozenge), 250 μM (\bullet), 125 μM (\square), 62,5 μM (\triangle) und 31,25 μM (\blacktriangledown) **B** Michaelis-Menton Kurve der Myt1 vermittelten Phosphorylierung. Dargestellt ist die Initialgeschwindigkeit (v_0) bei steigender ATP Konzentration. Die abgebildeten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM ($n=3$).

Damit eine Reaktion zweiter Ordnung nach einer Kinetik erster Ordnung verläuft, muss einer der geschwindigkeitsregulierenden Bestandteile im Überschuss zugesetzt sein. Im Falle der Myt1-Reaktion mit EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ und zur Bestimmung von K_m wurden 500 μM ATP (10x $K_{m, ATP}$) eingesetzt. Analog zur $K_{m, ATP}$ Bestimmung wurde die FP über einen Zeitraum von 30 min mit 150 μM bis 1,56 μM EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ gemessen. Mittels nicht-linearer Regression wurde aus den ermittelten Initialgeschwindigkeiten und der Substratkonzentration ein K_m von $23,4 \pm 6,8 \mu M$ und ein v_{max} von $57,8 \cdot 10^{-2} \pm 0,51 \cdot 10^{-2}$ pmol/min erhalten. (k_{cat} und k_{cat}/K_m siehe Tabelle 5.4). Der Kurvenverlauf ist in Abbildung 5.11 dargestellt.

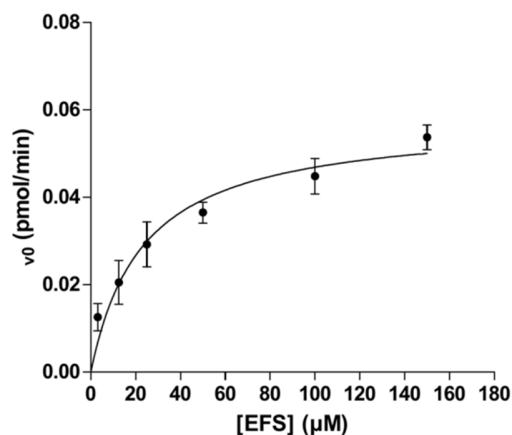


Abbildung 5.11: Bestimmung von K_m mittels nicht-linearer Regression der Initialgeschwindigkeiten bei verschiedenen EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹-Konzentrationen. Die Daten spiegeln den Mittelwert \pm SD ($n=8$) wieder.

Tabelle 5.4: Übersicht über die kinetischen Parameter der Myt1-Kinase für das Substrat EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ und das Co-Substrat ATP

Parameter	EFS ²⁴⁷⁻²⁵⁹	ATP
v_{max} (pmol/min)	$57,8 \cdot 10^{-2} \pm 0,51 \cdot 10^{-2}$	$65,7 \cdot 10^{-2} \pm 0,17 \cdot 10^{-2}$
K_m (μM)	$23,4 \pm 6,8$	$52,4 \pm 6,5$
k_{cat} (s⁻¹)	$9,6 \cdot 10^{-4} \pm 8,5 \cdot 10^{-5}$	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 2,8 \cdot 10^{-5}$
k_{cat}/K_m (M⁻¹·s⁻¹)	$41,2 \cdot 10^{-3}$	$20,9 \cdot 10^{-3}$

Im finalen FPIA-III wurden, basierend auf den bestimmten kinetischen Parametern, 500 μM ATP und 50 μM EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zum ersten Mal die kinetischen Parameter der Myt1-Kinasereaktion bestimmt. Vergleicht man diese Daten mit denen anderer Kinasen, zeigt sich eine gute Korrelation. So haben die meisten Kinasen einen K_{m, ATP} zwischen 10 und 100 μM¹⁶, das Mittel der K_{m, ATP}-Werte von 281 Wildtyp-Kinasen liegt bei 58 μM¹⁷². Der für die Myt1-Kinase bestimmte K_{m, ATP} von $52,4 \pm 6,5$ μM liegt somit annähernd im Kinasemittel. Durch Dr. A. Rohe wurde zuvor ein K_{m, ATP} mit Hilfe des DasAFTIC Assays von $1,2 \pm 0,2$ mM ermittelt¹²¹. Der deutlich höhere Wert für die Bindung des ATPs an der Myt1-Kinasedomäne lässt darauf schließen, dass die Affinität von ATP von der Anwesenheit eines Substrates abhängig ist. Dies korreliert auch mit den Untersuchungen von Wells et al., die die C-terminal liegende Substratbindungsstelle als essentiell für die Funktion der Myt1 beschreiben¹⁷³. Neben der Charakterisierung der Kinase dient der K_{m, ATP} auch der Einschätzung der Inhibition von ATP-kompetitiven Hemmstoffen. Die intrazelluläre ATP Konzentration liegt zwischen 1 und 10 mM^{172,174}. Die *in vivo* Effizienz eines Inhibitors liegt meist deutlich unter dem *in vitro* bestimmten IC₅₀, da eine kompetitive Verdrängung durch ATP stattfindet¹⁷². In der Zelle werden die Kinasen mit einem hohen K_{m, ATP} besser gehemmt als Kinasen mit einem niedrigem K_{m, ATP}, wenn der K_i des Inhibitors identisch ist¹⁶. Betrachtet man den K_m der Myt1-Kinase mit $23,4 \pm 6,8$ μM und vergleicht ihn mit denen anderer Kinasen aus der SET Subfamilie, zeigt sich analog zum ATP eine gute Korrelation. Für die MEK und die MAPKAPK2 werden Werte von 0,42 μM¹⁷⁵ und 55,3 μM¹⁷⁶ beschrieben. Beide Kinasen sind entfernt verwandt mit der Wee-Familie und

wurden zum Vergleich herangezogen, weil keine kinetischen Parameter für die Wee1 Kinase bekannt sind. Aus den ermittelten K_m -Werten kann eine gute Affinität von Substrat und Co-Substrat zur Myt1 nachgewiesen werden.

Da für das FPIA-III 25 nM Myt1 benötigt werden, ergeben sich aus den gemessenen v_{max} -Werten niedrige k_{cat} -Werte von $9,6 \cdot 10^{-4} \pm 8,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹) und $1,1 \cdot 10^{-3} \pm 2,8 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (ATP). Damit liegt die katalytische Effizienz der Myt1-Kinase deutlich unter der anderer Kinasen, wie z.B. PKC¹⁷⁷, JNK1 β ¹⁷⁸ und p38 γ ¹⁷⁹. Daraus resultieren ebenfalls niedrige k_{cat}/K_m -Werte von $41,2 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹) und $20,9 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (ATP). Üblicherweise erreichen andere Kinasen Werte bis $10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, wie die genannten Beispiele zeigen. Die identifizierte geringe Effizienz der Kinase kann natürlich vorkommend oder das Resultat zellulärer Regulationsmechanismen sein. Derzeit ist lediglich die Regulation der Myt1-Kinase durch Interaktion des C-Terminus mit Pin1¹⁷³ und durch Phosphorylierung mittels Plk1⁶¹ beschrieben. Eine Hyperphosphorylierung resultiert dabei in inaktiver Myt1 während der Mitose. Ob die hier verwendete Kinase hyperphosphoryliert vorliegt, kann nicht ausgeschlossen, aber bezweifelt werden, da ausschließlich ein Vorhandensein von mitotischen Zellen zum Zeitpunkt der Gewinnung Voraussetzung wäre. Daher wird angenommen, dass die schwache katalytische Effizienz in dieser Form natürlich vorliegt. Da der hier entwickelte Assay sehr sensitiv pY-EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ detektiert, können diese kleinen Substratumsätze gemessen werden und der Assay bleibt auch in diesem Bereich durchführbar.

5.2.5 Bestimmung der Assayqualität

Eine der essentiellen Anforderungen an einen Assay ist die genaue und reproduzierbare Unterscheidung von aktiven Verbindungen und Negativkontrollen. Ausschlaggebend ist hierbei die Größe des Messfensters und die Standardabweichung der Werte. Diese Parameter spiegeln die Assayqualität wieder und gehen in den Z' -Faktor ein. Der Z' -Faktor kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen und wird nach Formel 4.5 berechnet. Er gibt die Distanz zwischen dem Mittelwert der Positiv- und Negativkontrolle unter Berücksichtigung der dreifachen Standardabweichung an. Liegt der Z' -Faktor eines Assays zwischen 0 und 0,5, gilt es als durchführbar. Werte über 0,5 stehen für exzellente Assays¹³¹.

Um den Z' -Faktor für den FPIA-III zu bestimmen, wurde eine 96-Well Platte mit je 44 Positiv- und Negativkontrollen belegt. Dabei entspricht die mit 10 μM Dasatinib gehemmte

Reaktion der Positivkontrolle und die 1 % DMSO enthaltene Reaktion der Negativkontrolle. In Abbildung 5.12 ist das Ergebnis einer repräsentativen Platte dargestellt.

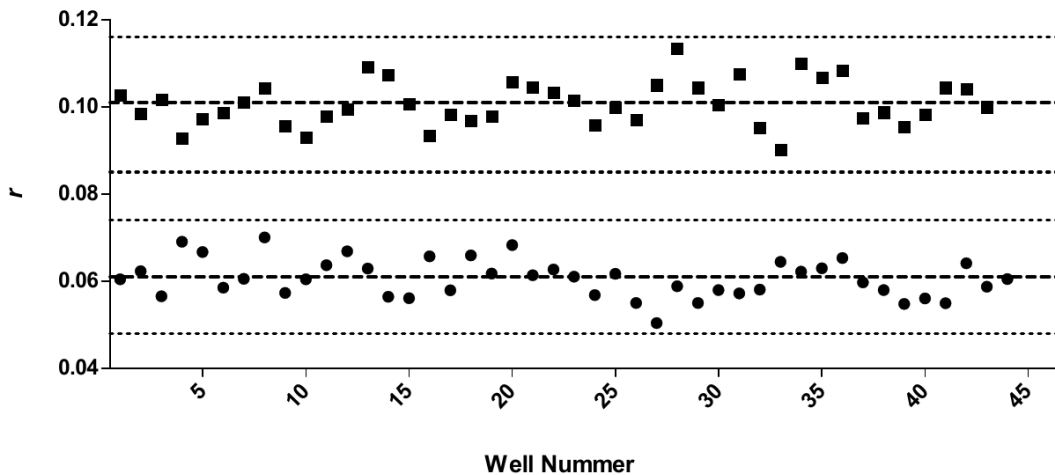


Abbildung 5.12: Bestimmung der Z'-Faktors. Ein repräsentatives Ergebnis einer Platte mit Positivkontrolle (■) ($\mu_{(+)}$, $n=44$) und Negativkontrolle (●) ($\mu_{(-)}$, $n=44$). Die gepunkteten Linien entsprechen der dreifachen Standardabweichung um den Mittelwert (gestrichelte Linie).

Für den FPIA-III wurde ein Z'-Faktor von 0,3 erhalten, damit gilt der Assay vorerst als durchführbar und kann nicht als exzellent bezeichnet werden. Jedoch ist dabei zu berücksichtigen, dass das FPIA-III aus zwei Bestandteilen besteht. Zum einen aus der eigentlichen Kinasereaktion, die nach 30 min mit EDTA gestoppt wird, und zum anderen aus der Detektion, bei welcher der Antikörper von der Sonde verdrängt werden muss. Somit fließen deutlich mehr Faktoren in den Z'-Faktor ein, als bei dem DasAFITC-Assay, der einen Wert von 0,52 erreicht¹³⁹. Der Wert von 0,3 für den FPIA-III ermöglicht eine deutliche Differenzierung von positiven und negativen Ergebnissen und spricht damit für eine akzeptable Qualität des entwickelten Assays.

5.2.6 Validierung des FPIA-III mit Myt1-Inhibitoren

Zur Validierung des entwickelten Assays wurden bekannte Myt1-Inhibitoren und eine Auswahl von Verbindungen, die keinen Effekt auf die Myt1-Domäne ausweisen, getestet. Zur Bestimmung des IC_{50} -Wertes wurden die Inhibitoren einer 1:3 Serienverdünnung im SKB-B unterzogen und bei finalen Assaykonzentrationen $\leq 10 \mu\text{M}$ untersucht.

Mittels nicht-linearer Regression wurden Kurven, wie in Abbildung 5.13 dargestellt, erhalten und IC_{50} -Werte bestimmt (siehe Tabelle 5.5).

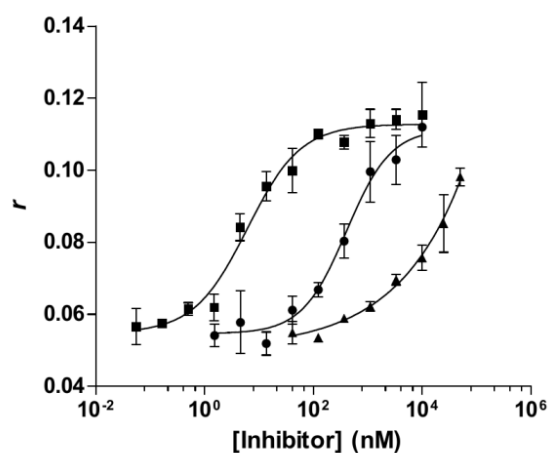


Abbildung 5.13: Bestimmung des IC_{50} -Wertes am Beispiel von (■) Dasatinib (hochpotent), (●) Saracatinib (mittelpotent) und (▲) Tyrphostin AG1478 (niederpotent). Die dargestellten Daten repräsentieren Mittelwert \pm SEM ($n=3$).

Für die hochpotenten Myt1-Inhibitoren Dasatinib, PD-0166285 und PD-173952 wurden IC_{50} -Werte im niederen nanomolaren Bereich ermittelt. Tyrphostin AG1478 mit einem IC_{50} -Wert von $19,6 \mu\text{M}$ stellt dabei den schwächsten Myt1-Inhibitor dar. Unter Verwendung der Cheng-Prusoff-Gleichung (Formel 5.1) wurden aus den ermittelten IC_{50} -Werten K_i -Werte berechnet¹⁸⁰.

$$IC_{50} = \frac{1 + \frac{[ATP]}{K_{m,ATP}}}{K_i}$$

Formel 5.1: Cheng-Prusoff-Gleichung abgewandelt auf ATP kompetitive Inhibitoren¹⁸⁰

Die erhaltenen Daten sind in Tabelle 5.5 zusammengefasst. Dabei erreichen fast alle getesteten Myt1-Inhibitoren einen K_i -Werte im unteren nanomolaren Bereich. Grund hierfür ist die Verwendung von $500 \mu\text{M}$ ATP (entsprechend $10 \times K_{m,ATP}$), welches zu einer starken Konkurrenz der Inhibitoren führt. Daraus resultiert, dass mit dem FPIA-III hauptsächlich potente Myt1-Inhibitoren untersucht werden können, deren Bindungsaffinität zur Myt1 über der des ATPs liegt.

Tabelle 5.5: Vergleich des Inhibitionsprofils der Myt1-Kinase

Inhibitor	IC ₅₀ [nM]	K _i [nM]	IC ₅₀ [nM]	K _i [nM]
	FPIA-III	FPIA-III	DasAFITC-Assay	DasAFITC-Assay
Bosutinib	133	12,7	704 ¹³⁹	304 ¹³⁹
Dasatinib	6	0,5	202 ¹³⁹	73 ¹³⁹
PD-0166285	8	0,8	31,1 ¹³⁹	2,0 ¹³⁹
PD-173952	24	2,3	55 ¹²¹	8,1 ^{121, 181}
PD-180970	109	10,4	2700 ¹²¹	1350 ^{121, 181}
Saracatinib	418	39,8	10000 ¹²¹	5200 ^{121, 181}
Tyrphostin AG1478	19600	1870	55000 ¹³⁹	26000 ¹³⁹
CEP-701	68 % ^a	-	kein Effekt ^{c 121}	-
Erlotinib	39 % ^a	-	kein Effekt ^{c 139}	-
Gefitinib	kein Effekt ^b	-	kein Effekt ^{c 139}	-
Lapatinib	25 % ^a	-	kein Effekt ^{c 139}	-
Neratinib	37 % ^a	-	kein Effekt ^{c 139}	-
Staurosporin	62 % ^a	-	kein Effekt ^{c 139}	-

^a Mittel der Inhibition bei 10 μ M

^b Mittel der Inhibition < 10 % bei 10 μ M

^c Mittel der Verdrängung < 10 % bei 10 μ M

Es lässt sich aus den Daten schlussfolgern, dass die Verbindungen, die an der Myt1-Kinasedomäne keine Bindung zeigten, auch keinen oder nur einen geringen Effekt auf die Myt1-FL-Aktivität aufweisen. Ausgenommen sind hiervon der Inhibitor Staurosporin und dessen Derivat CEP-701. Hier zeigt sich eine Hemmung von 62 % bzw. 68 % bei einer Konzentration von 10 μ M. In diesem Fall ist es denkbar, dass die Bindungsaffinität beider Verbindungen über der des ATPs liegt und somit erst ein Effekt in Gegenwart von ATP sichtbar wäre, der zuvor im Bindungsassay nicht erkennbar war. Diesen schwachen Effekt des Staurosporins auf die Myt1-FL wurde schon zuvor von Kristjánsdóttir und Rudolph beschrieben (IC₅₀ = 9,2 \pm 3,6 μ M)¹⁵⁸, konnte in den Bindungsstudien von Davis et al. an der

Myt1-Domäne jedoch nicht bestätigt werden¹⁸². Somit entsprechen die erhaltenen Daten, soweit vergleichbar, den bekannten Resultaten aus der Literatur. Vergleicht man die IC₅₀-Werte des FPIA-III mit den Daten aus dem DasAFITC-Assay¹³⁹, um eine Aussage über die Reproduzierbarkeit des FPIA-III zu erhalten, ist eine gute Korrelation mit einem r²-Wert von 0,835 erkennbar (siehe Abbildung 5.14). Wie zuvor berichtet, ist eine gute Übereinstimmung von Aktivitäts- und Bindungsdaten nicht selbstverständlich, wie das Beispiel Sunitinib an der TRKC deutlich macht. Sunitinib im Bindungsassay zeigt einen K_d-Wert von 5,1 µM und eine Inhibition der Kinase von 97,7 % bei einer Konzentration von 500 nM¹⁸³.

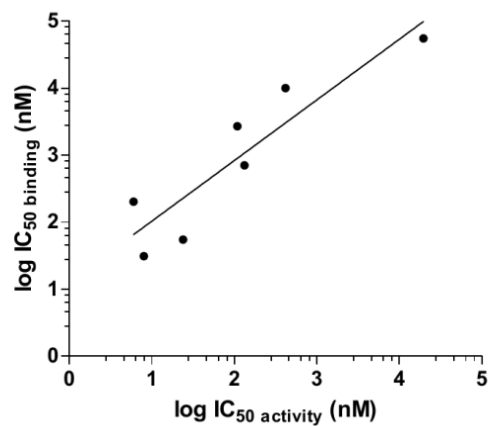


Abbildung 5.14. Vergleich der IC₅₀ Daten vom FP-Bindungs Assay und FPIA-III

Der entwickelte FPIA-III stellt den ersten optimierten Aktivitätsassay für die Myt1-Kinase dar, der für Medium-Throughput-Screenings geeignet ist. Er ermöglicht die Charakterisierung und Identifizierung von neuen Myt1-Inhibitoren. Damit stellt er eine alternative Methode zu den zuvor verwendeten Bindungsassays dar und kann ferner als Werkzeug im Validierungsprozess von Inhibitoren eingesetzt werden. Der minimierte Einsatz von Substrat und Kinase sowie die kurze Inkubationszeit ermöglichen eine schnelle und sparsame Testung von potentiellen Myt1-Inhibitoren. Der reduzierte Zeitaufwand erlaubt nun endlich auch die Testung größerer Datenbanken, was die Identifizierung neuer Inhibitoren deutlich verbessert. Als indirekter Assay sind jedoch keine online-Messungen während der Reaktion möglich, da vor der Detektion die Verdrängung des Antikörpers von der Sonde erfolgen muss.

Es konnte mit der Entwicklung des FPIA-III und der damit verbundenen biochemischen Charakterisierung der Myt1-Kinase ein großer Schritt in der Myt1-Forschung gemacht werden. Es wurden erstmals kinetischen Parameter wie K_m und k_{cat} für das Substrat EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ und das Co-Substrat ATP ermittelt. Außerdem wurden die optimalen Reaktionsbedingungen für die Myt1-Phosphorylierung definiert. Die damit geschlossene wissenschaftliche Lücke in der Myt1-Forschung kann tiefere Untersuchungen an diesem interessanten Target folgen lassen.

5.2.7 Microscale Thermophorese Untersuchungen an der Myt1-Domäne

5.2.7.1 Myt1-Domäne mit DasAFITC

Um das Assay-Spektrum der Myt1-Kinase zu erweitern, sollte analysiert werden, ob die MST-Technologie für Bindungsstudien an der Myt1-Domäne geeignet ist. Abgeleitet von dem etablierten DasAFITC-Assay, wurde diese Sonde für erste Untersuchungen ausgewählt. Um eine Vergleichbarkeit der späteren Ergebnisse sicherzustellen, fanden die Testungen im KBB statt. Nach ersten Voruntersuchungen an DasAFITC wurden 100 nM als optimale Konzentration für die weiteren Arbeiten ausgewählt. Mit dieser Konzentration wurden Fluoreszenzintensitäten über 100 gemessen, was im empfohlenen Messbereich liegt. Im ersten Schritt sollte die Bindungsaffinität zwischen DasAFITC und Myt1 bestimmt werden. Dazu wurden 100 nM DasAFITC mit 500 bis 0,015 nM Myt1-Domäne bei RT für zwei Stunden inkubiert. Die anschließende MST-Messung ergab die in Abbildung 5.15 A dargestellten Kurven. Es ist erkennbar, dass die Messungen bis 250 nM Myt1 einheitlich verlaufen. Bei 500 nM Myt1 sind deutliche Aggregationen am schwankenden Kurvenverlauf erkennbar.

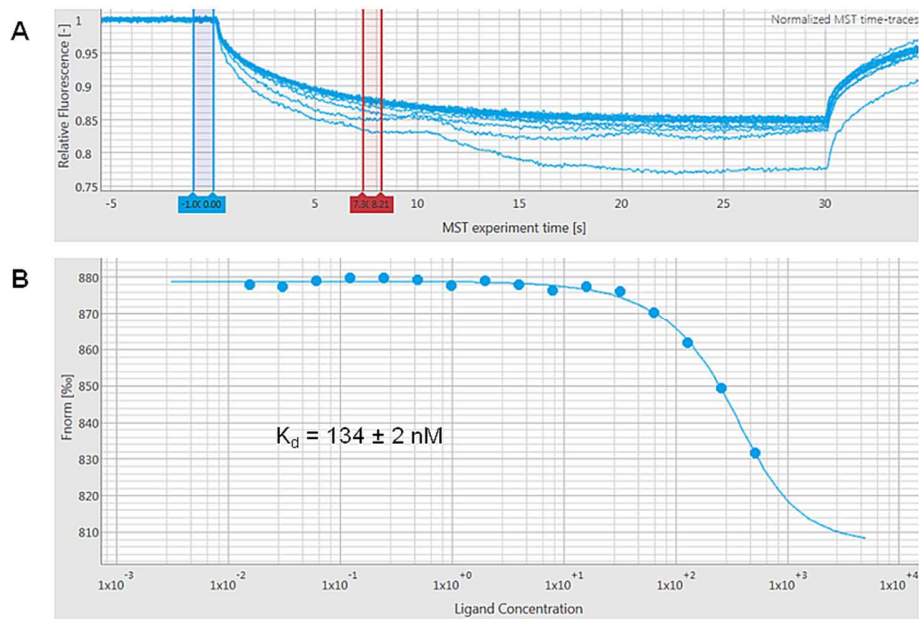


Abbildung 5.15: K_d -Bestimmung von DasAFITC und Myt1-Domäne mit MST. **A** MST-Kurven von 100 nM DasAFITC mit 500 bis 0,015 nM Myt1-Domäne. **B** K_d -Kurve entsprechend der nicht-linearen Regression der F_{norm} [%]-Werten aus **A**.

Zur Bestimmung des K_d -Wertes wurde die Differenz der normalisierten Fluoreszenzintensität zwischen Initialphase und beginnender Thermophorese (F_{norm} [%]) berechnet. Dabei wurde bewusst nicht das Thermophorese-Gleichgewicht zur Berechnung verwendet, um die durch Aggregation hervorgerufenen Abweichungen auszuschließen. Aus den so erhaltenen Daten wurde mittels nicht-linearer Regression der K_d -Wert bei 134 ± 2 nM bestimmt (siehe Abbildung 5.15 **B**). Dieser Wert war in einem zweiten, unabhängigen Versuch reproduzierbar. Vergleicht man diesen mit dem K_d aus dem DasAFITC-Assay (138 nM¹³⁹), ist eine gute Übereinstimmung erkennbar. Auf Grund der beginnenden Aggregation bei 500 nM Kinase, konnten keine höheren Konzentration untersucht werden, wodurch das K_d -Fitting keine Messwerte im Plateau aufweist.

Im folgenden Schritt wurde untersucht, ob eine Anwendung der MST zur Inhibitorentestung möglich ist. Dazu wurde der DasAFITC-Myt1-Komplex in Abwesenheit und Gegenwart von 10 μ M Dasatinib analysiert. Als Vergleich diente 100 nM DasAFITC. Zur Komplexbildung wurden 250 nM Myt1-Domäne verwendet. Die erhaltenen Kurven sind in Abbildung 5.16 dargestellt.

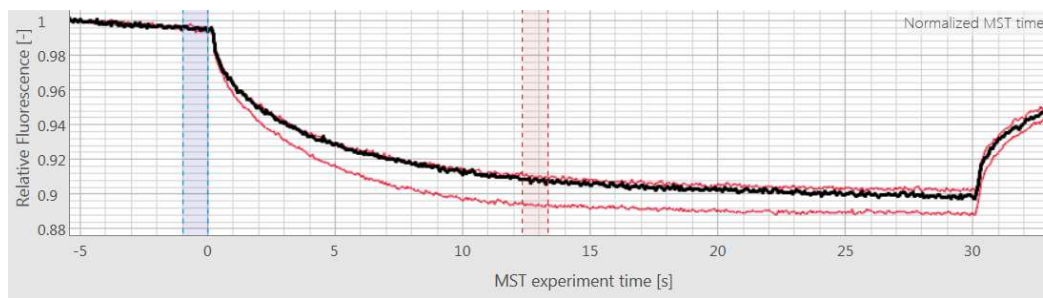


Abbildung 5.16: MST-Kurven zur Bestimmung der DasAFITC-Verdrängung durch Dasatinib. Die rote Kurve oben entspricht 100 nM DasAFITC, die rote Kurve unten 100 nM DasAFITC mit 250 nM Myt1-Domäne und die schwarze Kurve DasAFITC-Myt1-Komplex in Gegenwart von 10 µM Dasatinib.

Die obere rote Kurve entspricht dem freiem DasAFITC, die untere rote Kurve dem Myt1-Komplex und in schwarz ist der Komplex in Gegenwart von 10 µM Dasatinib dargestellt. Es ist deutlich zu sehen, dass die Sonde vollständig von Dasatinib verdrängt und somit das gleiche Signal wie vom freiem DasAFITC erhalten wird. Der Abstand zwischen gebundenem und freiem DasAFITC ist dabei ausreichend groß, um eine Anwendung zur Inhibitortestung zu ermöglichen. Damit dieses Anwendungsgebiet jedoch vollständig genutzt werden kann, sind zuvor weitere Optimierungen hinsichtlich der Aggregationsbildung empfehlenswert und sollen fortführenden Arbeiten vorbehalten sein. In diesem Zusammenhang könnten Änderungen der Puffers und/oder Variationen des Pufferzusätze die Aggregation verhindern. Das dadurch stabilere Signal, ermöglicht eine genauere Untersuchung der Myt1-Inhibitor Interaktionen.

5.2.7.2 Fluoreszenzmarkierte Myt1-Domäne

Analog zu den Untersuchungen von DasAFITC mit der Myt1-Domäne, sollte die Interaktion von fluoreszenzmarkierter Myt1-Domäne mit Dasatinib analysiert werden. Dazu wurde im ersten Schritt 90 % reine Myt1-Domäne mit einem blauen Farbstoff gekoppelt (siehe Abschnitt 4.14.2). Die fluoreszenzmarkierte Kinase wird im Folgenden als Myt1_dye bezeichnet. Bei der Fluoreszenz-Kopplung findet eine nukleophile Substitution des *N*-Hydroxysuccinimid (NHS)-Esters mit einem Lysin-Rest in der Kinase statt. Ziel beim Labeling ist es, genau ein Farbstoffmolekül pro Protein zu koppeln. Die von NanoTemper zu Verfügung stehenden Labeling-Kits sind hinsichtlich dieses Ziels optimiert. Nach erfolgter Markierung der Kinase wurde die Fluoreszenzintensität der Myt1_dye Lösung getestet. Da

ein ausreichend starkes Signal messbar war, wurde Myt1_dye mit Dasatinib in Konzentrationen von 10 μ M bis 78,13 nM zwei Stunden bei RT inkubiert. Die anschließende MST-Messung ergab die in Abbildung 5.17 dargestellten Kurven. Alle Kurven zeigen deutliche Signalschwankungen und somit starke Aggregatbildung. Eine Auswertung dieses Signals war daraufhin nicht möglich und so kann nicht festgestellt werden, ob Myt1_dye in einer bindungsfähigen Konformation vorliegt.

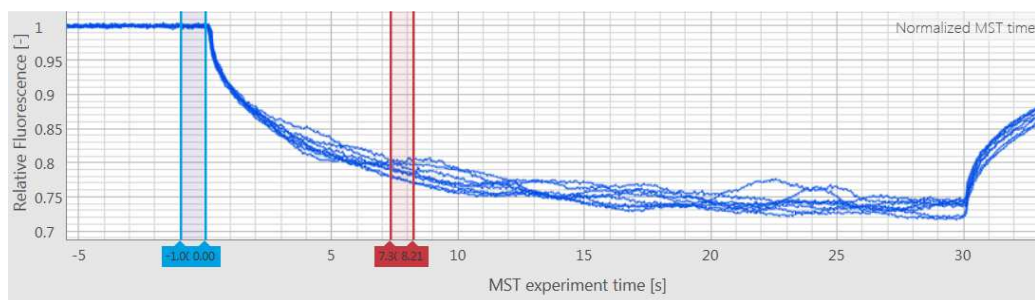


Abbildung 5.17: MST-Kurven von 6,2 nM Myt1_dye mit Dasatinib in Konzentrationen von 10 μ M bis 78,13 nM.

Zusätzlich zur MST-Messung wurde ein Absorptionsspektrum von Myt1_dye aufgenommen und damit die Labeling-Effizienz auf 15 % bestimmt. In diesem Zusammenhang wurde eine Myt1_dye Konzentration von 6,2 nM ermittelt (UV-Vis Spektrum siehe Anhang Abbildung 8.1). Um ein MST-Assay mit Myt1_dye entwickeln zu können, sind noch erhebliche Optimierungen des Labelings erforderlich. Vor allem eine Erhöhung der Labeling-Effizienz ist notwendig. Ermöglicht werden kann dies durch z.B. Verlängerung der Labeling-Dauer oder Änderung des Labeling-Puffers. Beim Ausbleiben einer Effizienzsteigerung kann über eine Variation des eingesetzten Farbstoffs nachgedacht werden. Zusätzlich muss die vermehrte Aggregatbildung nach dem Labeln verhindert werden. Hier empfiehlt sich eine Modifikation des Reaktionspuffers. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine problemlose Adaption des DasAFITC-Assays auf die MST-Technologie nicht möglich ist. Jedoch kann ein MST-Assay, basierend auf DasAFITC als Sonde, mit moderatem Aufwand entwickelt werden. Ob sich Myt1_dye als signalgebendes Protein für ein MST-Assay eignet sollte in fortführenden Arbeiten genauer untersucht werden.

5.3 Identifizierung neuer Myt1-Inhibitoren

Die Determiniertheit der p53 defekten Zellen vom G₂/M Checkpoint rückt die beteiligten Kinasen in den Fokus der Krebsforschung. Wie eingehend beschrieben, resultiert eine Hemmung der Myt1-Kinase in der Apoptose der Zellen. Diese Inhibition soll dabei durch niedermolekulare Verbindungen ermöglicht werden. Zu Beginn dieser Arbeit waren 9 Inhibitoren der Myt1-Kinase durch unsere Arbeitsgruppe identifiziert^{30, 48, 139, 148, 181} und zwei weitere Verbindungen durch Bamborough et al. beschrieben worden¹⁸⁴. Zu den aktiven Verbindungen zählen die sich auf dem Markt befindlichen Tyrosinkinase-Inhibitoren Dasatinib und Bosutinib⁴⁸ sowie die Pyridopyrimidine PD-0166285¹⁴⁸, PD-173952¹⁸¹, PD-173955⁴⁸ und PD-180970¹⁸¹. Des Weiteren zeigen die Verbindungen Pelitinib³⁰, Saracatinib¹⁸¹ und Tyrphostin AG1478¹⁴⁸ eine schwache Inhibition der Myt1-Kinase. Vergleicht man die Anzahl und Stärke der Inhibitoren von Myt1 mit anderen Kinasen, so ist deren Restriktivität und schwere Hemmbarkeit zu erkennen. Besonders deutlich wird dies durch den Selektivitätsscore für die Myt1-Kinase, den Davis et al. mit 0,0417 bei 3 µM Inhibitorkonzentration angeben. Damit binden nur 4,17 % der getesteten Inhibitoren an der Myt1-Kinase. Ein Fakt, der nur für 2 % der getesteten Kinasen zutrifft⁴⁸.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit sollte es daher sein, neue Inhibitoren zu identifizieren, Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) zu definieren und damit wiederum Strukturvorschläge für neue Inhibitoren zu liefern.

5.3.1 *In silico* Untersuchungen an der Myt1-Domäne

Neben biologischen und biochemischen Screening-Methoden besteht die Möglichkeit, neue Inhibitoren in der Verwendung von verschiedenen *in silico* Methoden zu entwickeln. Zu diesen zählen Docking-Studien und virtuelles Screening, die dazu dienen, potentielle Inhibitoren zu identifizieren. Grundlage für die Validierung der Docking-Einstellungen für die Myt1-Kinasedomäne war die Verwendung der Kristallstrukturen 3P1A (PDB) und des Bindungsmusters von Dasatinib, abgeleitet von dessen Kristallstruktur mit ABL1 (PDB: 2GQG) und Src (PDB: 3G5D). Die Myt1-Domäne weist eine DFG-in Konformation auf, wodurch die hydrophoben Taschen des „back clefts“ nicht durch einen Inhibitor besetzt werden können. Zur Docking-Validierung wurden die Programme GOLD 5.1¹¹² und GLIDE¹⁸⁵ verwendet. Dabei wurde untersucht, welches Programm mit welcher Bewertungsmethode und welcher Definition von „constraints“ am besten geeignet ist, die

Position von Dasatinib wieder zu finden. Darüber hinaus wurden alle 9 bekannten Myt1-Inhibitoren untersucht und die Scoring-Funktion bzw. Bewertungsmethode gesucht, mit der am besten die Inhibitoren entsprechend ihrer Aktivität bewertet werden können. Ziel war es dabei auch, eine schnellere Bewertungsmethode zu identifizieren, die neben der in unserer Arbeitsgruppe etablierten QM/MM-GBSA Berechnung¹⁸¹ genutzt werden kann. Aus diesen Untersuchungen resultierte ein finales Myt1 Docking mit GOLD 5.1 unter Verwendung von zwei WBB „constraints“ zu Cys190 (Stickstoff und Sauerstoff) und dem Goldscore als Bewertungsmethode. Für die erhaltenen Docking-Posen wurden zusätzlich ein GB-SA-Wert mit MOE¹⁸⁶ kalkuliert und mit dem Goldscore ein Konsensuscore berechnet. Diese Methode diente fortan dazu, die erhaltenen Daten zu analysieren und VS-Hits zu identifizieren.

5.3.1.1 Virtuelles Screening mit Pharmakophor-Filter

Für das erste VS wurde die Princeton Datenbank ausgewählt. Um die zu dockende Datenmenge zu reduzieren, sollte ein Pharmakophor-Filter verwendet werden. Die damit selektierten Verbindungen sollten die gleichen Interaktionen mit der Myt1 eingehen können, wie die bekannten Inhibitoren. Zur Erstellung der Pharmakophor-Modelle wurden die Protein-Liganden-Komplexe aus den Top-Docking-Lösungen der 9 Myt1-Inhibitoren und das Programm LigandScout 4.0¹⁴⁷ genutzt. Die wichtigsten Interaktionsbereiche („features“), wie die WBB zu Cys190 und Thr187 sowie die aromatischen und hydrophoben Wechselwirkungen (WW), wurden

erwartungsgemäß von LigandScout erkannt¹⁴⁶. In Abbildung 5.18 ist eines der erstellten Modelle (PD-Modell) am Beispiel von PD-0166285 zu sehen. Es enthält fünf essentielle und zwei variable „features“. Zur Validierung der Modelle diente eine Datenbank mit 63 Verbindungen, wovon 54 inaktive Moleküle enthalten waren. Modell 1 (PD-Modell) wurde dabei so validiert, dass es in der Lage war, die PD-Verbindungen und Dasatinib zu erkennen.

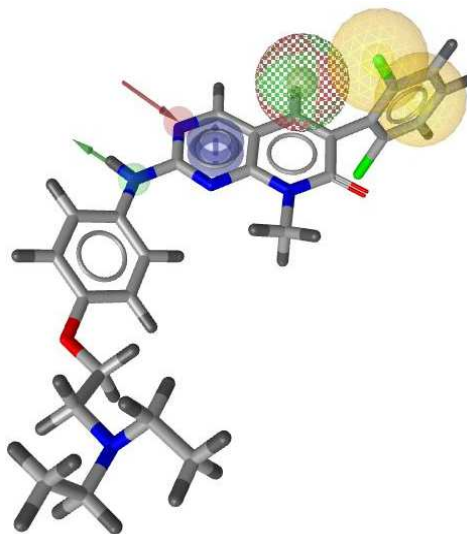


Abbildung 5.18: PD-Modell mit PD-0166285 als Ligand. WB-Akzeptor (rot), WB-Donator (grün), Aromat (blau) und hydrophobe WW (gelb).

Modell 2 dagegen basiert auf den Interaktionen der anderen Inhibitoren. Tabelle 5.6 gibt eine Übersicht über die verwendeten Pharmakophor-Modelle und deren Ergebnisse beim Filtern verschiedener Datenbanken (Princeton und ZINC_druglike (ca. 13,2 Millionen Verbindungen)). Die Modelle 3 bis 6 sind Erweiterungen des PD-Modells. Sie wurden generiert, um zusätzliche Eigenschaften zu finden, bzw. Interaktionsbereiche zu erweitern. Damit konnten weitere Verbindungen selektiert werden, die folgend an der Myt1-Kinase gedockt wurden. Zudem dienten die Modelle als Filter für die deutlich umfangreichere ZINC_druglike Datenbank. Das Modell 2 wurde nicht weiter verfolgt, da die erhaltenen Ergebnisse vor allem große, hydrophobe Moleküle darstellten. Diese weisen nur ein unzureichendes Interaktionsmuster mit der Myt1-Bindungstasche aus und entsprachen somit nicht den Erwartungen.

Tabelle 5.6: Übersicht der verwendeten Pharmakophor-Modelle und deren Ergebnisse an verschiedenen Datenbanken

Modell	Bestandteile	Datenbank	1.Filtern	2.Filtern	VS-Hits
1 (PD)	1 Aromat 2 hydrophobe Bereiche 2 WB-Akzeptoren 2 WB-Donatoren	Princeton	4490	274	13
1 (PD)		ZINC_druglike	10040	1667	8
2 (Tyr)	3 Aromaten 2 WB-Akzeptoren 1 WB-Donator	Princeton	14231	1557	0
3 (WB-D)	Modell 1 + 1 WB-Donatore	ZINC_druglike	65	-	3
4 (groß)	Modell 1 mit vergrößertem WB-Akzeptor und Donator	ZINC_druglike	22136	2894	7
5 (ionisch)	Modell 1 + 1 ionischer Bereich	ZINC_druglike	22	-	3
6 (ionisch groß)	Modell 5 mit vergrößertem ionischen Bereich	ZINC_druglike	204143	1847	8

Mit Hilfe des VS unter Verwendung eines Pharmakophor-Filters konnten einige neue Verbindungen identifiziert werden, die potentielle Myt1-Inhibitoren darstellen und neue Grundgerüste aufweisen. Jedoch waren diese Verbindungen kommerziell nicht verfügbar oder zu kostenintensiv, weswegen weitere VS mit anderen Filtermethoden durchgeführt wurden.

5.3.1.2 Virtuelles Screening mit anderen Filtern

Auf Grund der unzureichenden Ergebnisse des pharmakophorgefilterten VS sollten andere Filtermethoden hinsichtlich ihrer Eignung für ein VS an der Myt1-Kinase untersucht werden. Begonnen wurde mit einem Wissens-basierten Filter, der im weiterführenden Text als ABL1 These bezeichnet wird. Es wurde angenommen, dass bekannte Inhibitoren der ABL1 Kinase und der Src bzw. LCK Kinase auch Myt1-Inhibitoren darstellen können. Dieser These liegt die Tatsache zu Grunde, dass Bosutinib, Dasatinib, PD-0166285, PD-173955 und PD-180970 als ABL1 Inhibitoren entwickelt wurden oder bekannt sind^{187, 188, 189}. Außerdem hemmen diese Verbindungen auch Src und/oder LCK^{187, 190, 191}. Basierend auf dieser These wurde die Binding-Datenbank nach ABL1, Src und LCK Inhibitoren selektiert und die verbleibenden Daten fusioniert. Nur jene Verbindungen, die in beiden Datensätzen enthalten waren, wurden zum Docking an der Myt1 ausgewählt. Für das Paar ABL1-Src ergab das 447 und für ABL1-LCK 89 Verbindungen (Ergebnisse siehe Tabelle 5.7). Als beste Verbindung aus beiden Paaren wurde ZINC 34643022 identifiziert (Struktur siehe Abbildung 5.19).

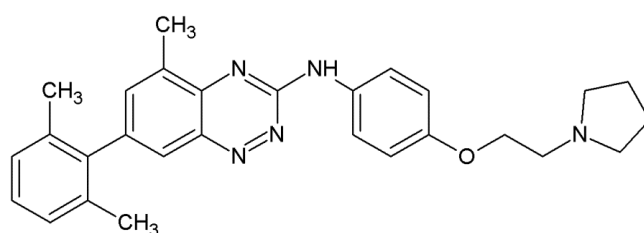


Abbildung 5.19: Struktur von ZINC 3464302 als Ergebnis der ABL1-These

ZINC 34643022 wurde ursprünglich als Src Inhibitor entwickelt und hemmt die Kinase mit einem IC_{50} -Wert von 7 nM¹⁹². Zusätzlich ist bekannt, dass die Verbindung die ABL1 Kinase mit einem K_i von 11 nM inhibiert¹⁹³, jedoch ist ZINC 34643022 nicht kommerziell verfügbar und konnte nicht an der Myt1 getestet werden. Die Verbindung wurde allerdings als Template für die folgende Ähnlichkeitssuche („similarity“- und „scaffold“-basierte Suche) nach neuen Myt1-Inhibitoren genutzt.

Unter Verwendung von Dasatinib, PD-0166285 und ZINC 34643022 wurde weiterführend eine Ähnlichkeitssuche („similarity search“) der ZINC_druglike Datenbank durchgeführt. Dabei werden jene Verbindungen aus der Datenbank selektiert, die eine definierte strukturelle Ähnlichkeit zur Referenzverbindung aufweisen. Grundlage für den Vergleich stellte der Fingerprint BIT_MACCS dar. Verwendet wurde zur Selektion das Programm MOE ¹⁸⁶. So konnten für Dasatinib 7660 Verbindungen selektiert werden, die eine Ähnlichkeit von mindestens 80 % aufweisen. Diese wurden im Anschluss in die Myt1-Bindungstasche gedockt und bewertet. Die erhaltenen Ergebnisse wiesen jedoch nur relative kleine GBSA-Werte auf und stellten somit keine potentiellen Myt1-Inhibitoren dar. Sie wurden daher auch nicht für eine Testung an der Kinase ausgewählt.

Basierend auf der Suche nach bestimmten Moleküleigenschaften wurde anschließend eine „scaffold search“ durchgeführt. Dabei dient ein definierter Bereich der Referenzverbindung als Selektionsmerkmal. Analog zur Ähnlichkeitssuche wurden Dasatinib, PD-0166285 und ZINC 34643022 verwendet und charakteristische Teile des Grundgerüsts ausgewählt, nach denen die ZINC_all Datenbank (ca. 16,4 Millionen Verbindungen) gefiltert wurde. Die Ergebnisse beider Filtermethoden sind in Tabelle 5.7 zusammengefasst.

Tabelle 5.7: Übersicht verwendeter Filtermethoden für das VS verschiedener Datenbanken und deren Ergebnisse

Filter	Beschreibung	Datenbank	1.Filtern	2.Filtern	VS-Hits
ABL1-These	ABL1-Src	binding-DB	447	22	9
	ABL1-LCK	binding-DB	89	5	1
„similarity search“	Dasatinib (80 %)	ZINC_druglike	7660	11	1
	PD-0166285 (75 %)	ZINC_druglike	2671	10	1
	ZINC 34643022 (78 %)	ZINC_druglike	2626	3	1
„scaffold search“	Dasatinib	ZINC_all	2515	50	29
	PD-0166285	ZINC_all	7683	12	2
	ZINC 34643022	ZINC_all	13	-	2

Das VS mit dem „scaffold“-Filter von Dasatinib ergab 50 interessante Verbindungen, wovon 29 als VS-Hits definiert wurden. Von diesen Verbindungen waren drei bei Princeton verfügbar und wurden für eine Testung an der Myt1-Kinase ausgewählt. Die Strukturen sind in Abbildung 5.20 dargestellt.

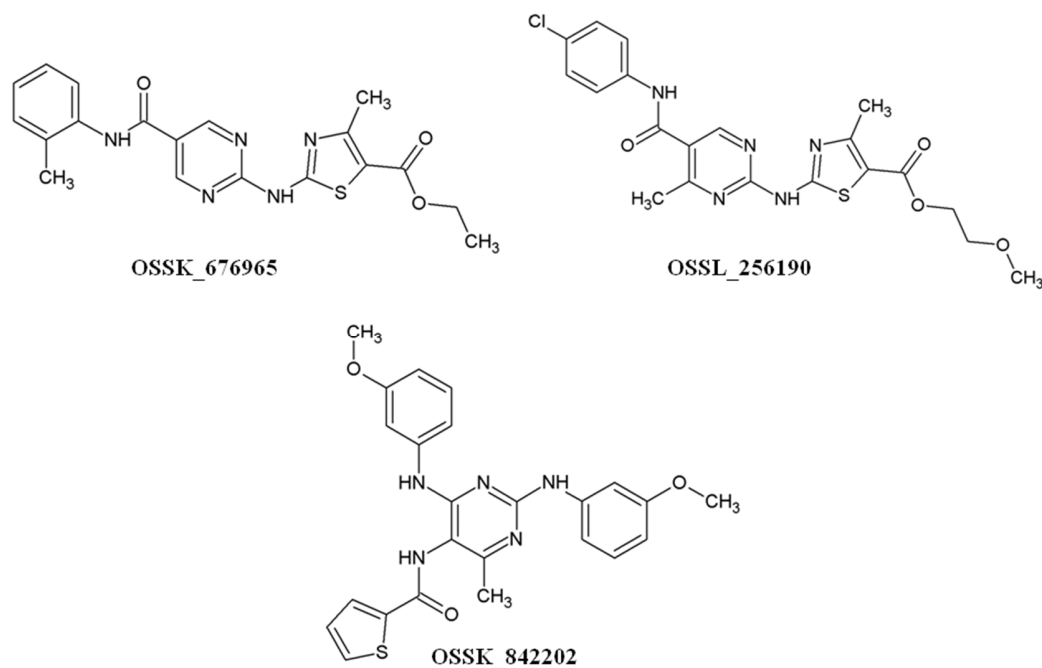


Abbildung 5.20: Ausgewählte Strukturen der Ähnlichkeitssuche basierend auf Dasatinib

Die Testung der Verbindungen erfolgte mit Hilfe des DasAFITC-Assays in drei Replikaten bei 50 und 20 μM . Keine der Verbindungen zeigte eine Verdrängung der Sonde von Myt1 und somit auch keine Bindung an der Kinasedomäne.

5.3.1.3 Virtuelles Screening ohne Filter

Einige der VS-Hits aus dem VS mit Pharmakophorfilter waren bei Asinex verfügbar jedoch zu hochpreisig. Deswegen sollten die Asinex und Princeton Datenbank ungefiltert gedockt werden. Eine Selektion der Verbindungen erfolgte in diesem Fall ausschließlich nach dem Goldscore und im letzten Schritt nach dem GBSA-Wert. Dieses VS resultierte in 24 Verbindungen, die über Princeton bezogen wurden (Auswahl der erfolgversprechendsten

Moleküle ist in Abbildung 5.21 dargestellt). Eine Übersicht über die erhaltenen Ergebnisse des Dockings der Asinex und Princeton Datenbank ist in Tabelle 5.8 enthalten. Drei der 24 Verbindungen entsprechen den Treffern aus der „scaffold search“ von Dasatinib. Alle wurden analog dazu mit dem DasAFITC-Assay getestet, zeigten aber ebenfalls keine Bindung an der Myt1-Domäne.

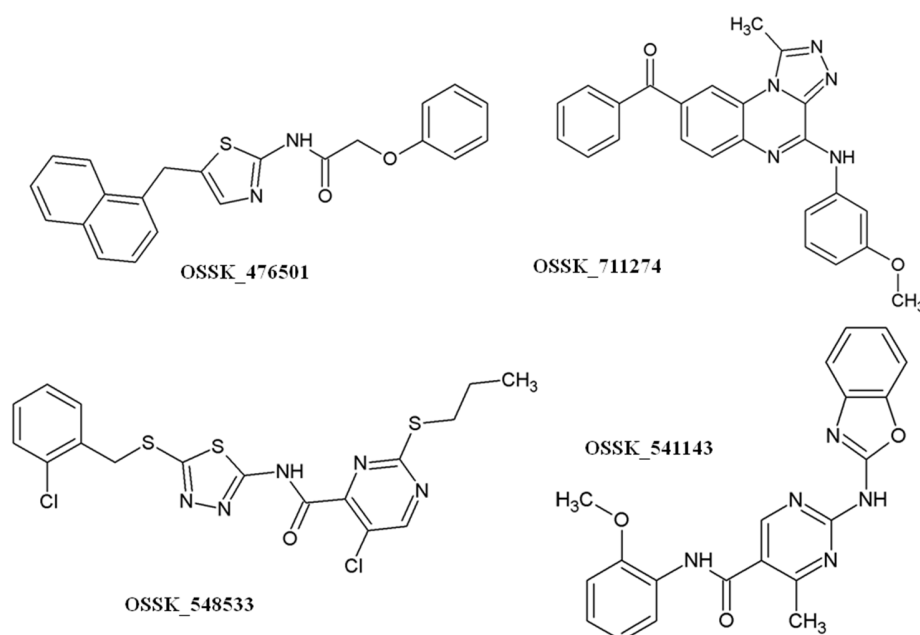


Abbildung 5.21: Auswahl einiger Verbindungen des Dockings der Princeton Datenbank

Da keine der getesteten Verbindungen einen Effekt auf die Myt1-Kinase ausübte, wurde dazu übergegangen, Datenbanken zu untersuchen, die ausschließlich Kinaseinhibitoren enthalten. Durch die Verwendung dieser Datenbanken sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, einen Myt1-Kinaseinhibitor zu finden. Zu diesen Datenbanken gehörten die Kinaseinhibitor Auswahl von Selleckchem, das Proteinkinase-Inhibitor Set I (PKIS I) (364 Verbindungen) von GlaxoSmithKline sowie die Datenbanken KinaCore (4455 Verbindungen) und KinaSet (12279 Verbindungen). Alle Moleküle wurden direkt in die Myt1-Kinasedomäne gedockt und bewertet (Ergebnisse siehe Tabelle 5.8).

Tabelle 5.8: Übersicht der ungefilterten Datenbanken und deren Ergebnisse

Datenbank	Verbindungen	1. Auswahl	2. Auswahl	VS-Hits
Asinex	343259	603	31	0
Princeton	469866	4649	33	29
Selleckchem	273	27	-	8
GSK-PKIS I	367	18	-	12
KinaCore	4455	67	49	29
KinaSet	12279	150	61	11

Die Resultate aus KinaCore und KinaSet wiesen eine hohe Ähnlichkeit zu den Verbindungen der Princeton Datenbank auf und wurden deswegen nicht weiter betrachtet. Beim VS der Verbindungen von Selleckchem wurden hingegen einige Inhibitoren gefunden, die potentiell für die Myt1-Kinase geeignet waren. Drei dieser acht VS-Hits waren bei LC Laboratories erhältlich (Abbildung 5.22 A) und wurden zur Testung ausgewählt. In diesem Zusammenhang wurden weitere drei Standardkinaseinhibitoren bestellt (Strukturen s. Abbildung 5.22 B). Die ausgewählten Kinaseinhibitoren wurden ebenfalls, wie oben erwähnt, an der Myt1-Kinase getestet, zeigten aber keine Bindung an der Kinase.

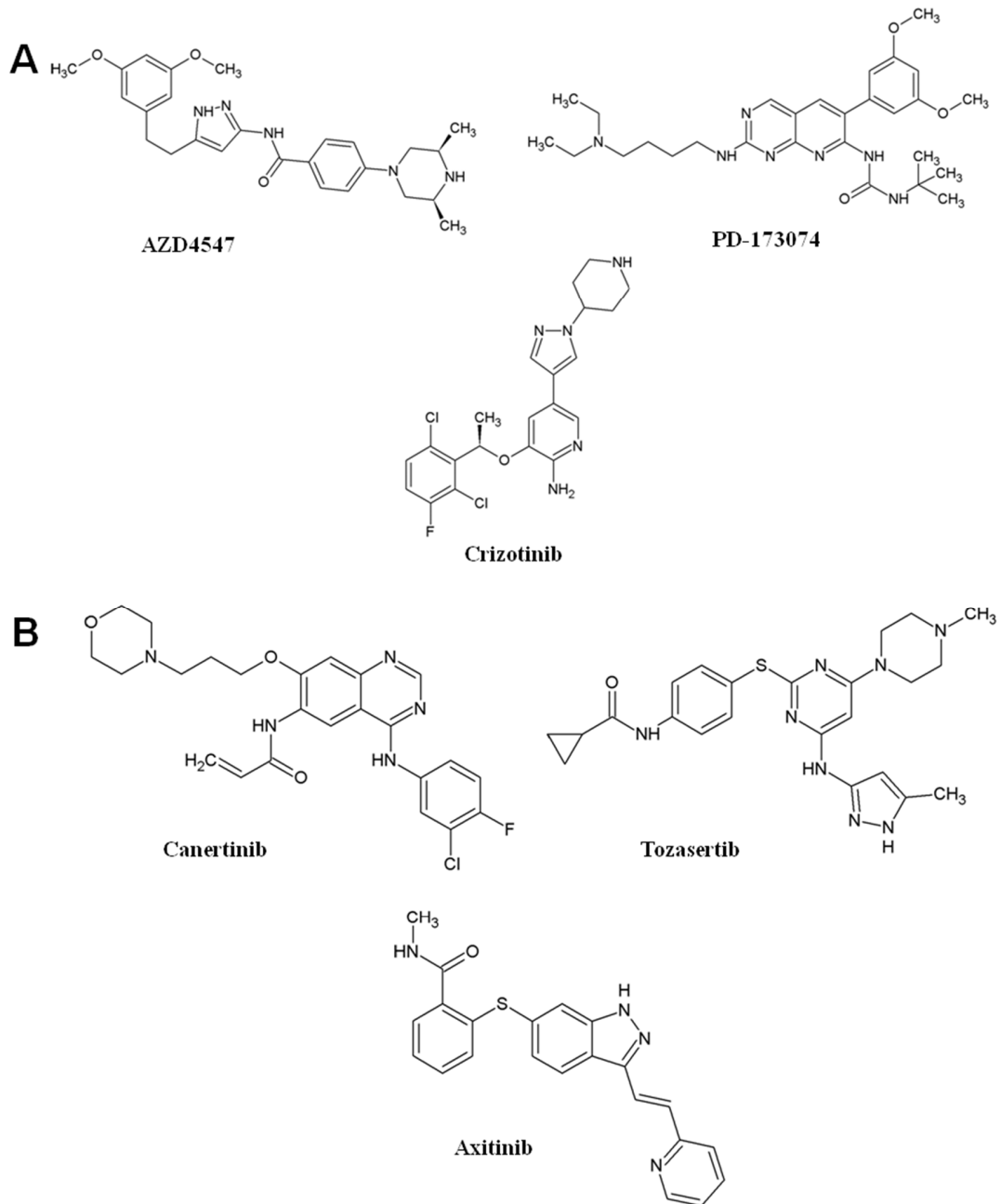


Abbildung 5.22: Strukturen der Kinaseinhibitoren, die an Myt1 getestet wurden. **A** Verbindungen von Selleckchem-Datenbank **B** Weitere Standardkinaseinhibitoren

Da im Verlauf der Arbeit die GSK-PKIS I Datenbank zur Verfügung stand, konnten die zuvor ermittelten 12 VS-Hits nachträglich untersucht werden. Die Strukturen dieser Verbindungen sind in Abbildung 5.23 dargestellt. Sieben der Verbindungen enthalten ein Amino-Pyrimidin-Grundgerüst, mit dem Interaktionen zur Hinge-Region möglich sind. Ein Teil dieser Verbindungen wurde 2004 als GSK3-Inhibitoren identifiziert und zeigt zusätzlich eine Wasserstoffbrücke zu Lysin in der ATP-Bindungstasche ¹⁹⁴.

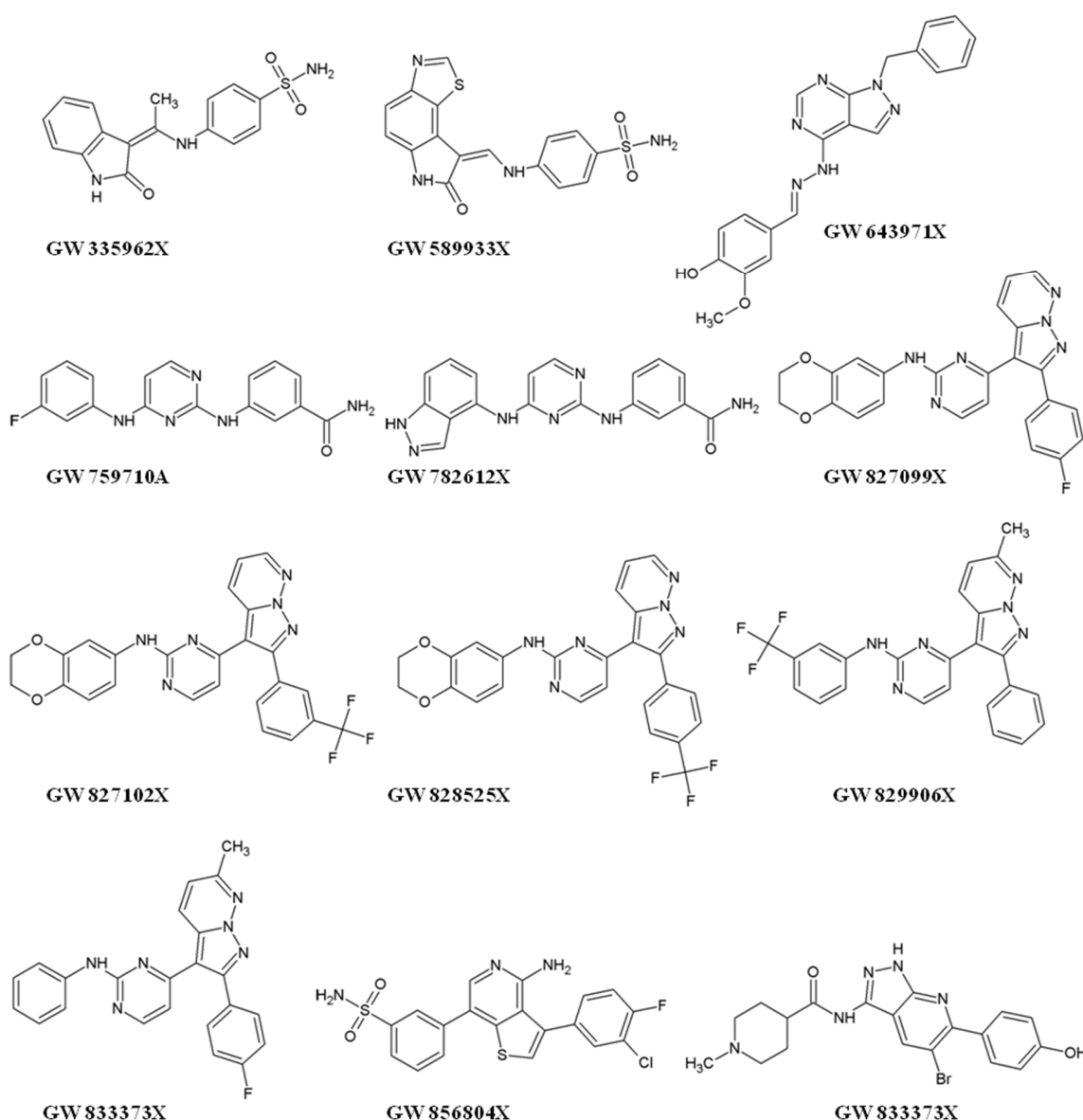


Abbildung 5.23: Strukturen der VS-Hits aus der GSK-PKIS I Datenbank

In der Lieferung waren neun der 12 Verbindungen enthalten (nicht zur Verfügung standen GW 827099X, GW 829906X und GW 833373X). Sie wurden im DasAFITC-Assay bei 20 μ M getestet. Zwei der Verbindungen zeigten eine Bindung an der Myt1-Domäne. GW 759710A verdrängte 37 % der Sonde und GW 782612X > 90 %. Für GW 782612X konnte ein IC₅₀-Wert 2,44 μ M (DasAFITC-Assay) und ein IC₅₀-Wert von 509 nM (FPIA-III) bestimmt werden. Die nachträgliche Bestätigung der Verbindungen als Myt1 Inhibitoren zeigt, dass die in der Arbeit angewendeten *in silico* Methoden prinzipiell geeignet sind neue Inhibitoren zu identifizieren. Die Tatsache, dass keine der 30 aus anderen Datenbanken gefundenen Verbindungen, eine Bindung an der Domäne aufwies, beweist, dass diese Methoden noch nicht optimal bzw. die untersuchten Datenbanken nicht für die Myt1-Kinase geeignet sind. Grund dafür könnte die Verwendung der Kristallstruktur sein, die ohne einen Inhibitor co-kristallisiert wurde und somit eine andere Konformation aufweist, die mit Liganden nicht vorliegen würde. Da derzeit keine weitere Myt1-Kristallstruktur mit Liganden zu erwarten ist, wäre die Erstellung eines Homologie-Modells basierend auf Myt1 verwandten Kinasen, wie die Wee1 oder anderen Serin-Threonin Kinasen, sinnvoll. Optional könnten auch die Kristallstrukturen von ABL1, Src oder LCK mit einem Myt1-Inhibitor verwendet werden. Diese Entwicklung soll aber weiterführenden Arbeiten vorbehalten sein. Ein weiterer Grund für den geringen Erfolg der *in silico* Methoden für die Myt1 könnte die geringe Anzahl an bekannten Inhibitoren sein, mit denen das Docking validiert wurde. Neue Inhibitoren könnten diesen Mangel beheben und zu einer verbesserten Validierung der Methoden führen. Um jedoch dies zu ermöglichen, sollte im Folgenden eine Wissensbasierte Methode und ein *in vitro* Screening genutzt werden, um weitere Myt1-Inhibitoren zu identifizieren.

5.3.2 Kinase-Sirtuin Homologie

Durch Trapp et al. wurde 2006 beschrieben, dass Kinaseinhibitoren auch eine hemmende Wirkung auf Sirtuine aufweisen¹⁹⁵. Sirtuine sind NAD⁺ abhängige Histondeacetylasen, die Acetylreste von Lysinen auf NAD⁺ übertragen¹⁹⁶. Trapp et al. stellten die These auf, dass Kinaseinhibitoren auch Sirtuininhibitoren sein können, basierend auf der Analogie des Kinase Co-Faktors ATP mit dem NAD⁺. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibitoren der Proteinkinase C (PKC), die Bisindolylmaleimide, die SIRT2 hemmen¹⁹⁵. Da 96

Verbindungen aus der Princeton Datenbank, die potentielle Sirtuin Inhibitoren darstellten, zu Verfügung standen, wurden diese an der Myt1 getestet. Man ging davon aus, dass diese Verbindungen einen Effekt an der Myt1 zeigen könnten, basierend auf der Homologie von ATP und NAD⁺ und damit einhergehend der gleichartige Aufbau der Co-Substratbindungstasche. Die Verbindungen wurden mit dem DasAFITC-Assay in drei Replikaten bei 20 µM untersucht. Auch in diesem Fall konnte keine Bindung an der Myt1-Kinase gemessen werden.

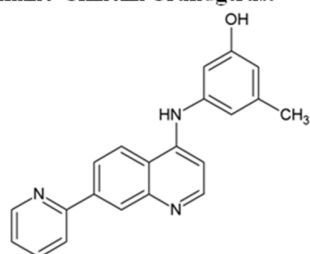
5.3.3 *Testung von Kinaseinhibitoren von GlaxoSmithKline (PKIS I und II)*

Um die Eignung der etablierten Myt1-Assays für Medium-Throughput-Screenings zu bestätigen und um neue Myt1-Inhibitoren zu identifizieren wurde ein *in vitro* Screening an der Myt1 durchgeführt. Das Screening konnte ermöglicht werden, weil GlaxoSmithKline eine Kollektion von Kinaseinhibitoren (PKIS I und II) zur Verfügung stellte. Das PKIS I beinhaltet 367 ATP-kompetitive Kinaseinhibitoren mit einer Reinheit > 98 %. Die Strukturen umspannen 31 Chemotypen und adressieren 24 Kinasen. Ein Großteil der Verbindungen weist ein Molekulargewicht (MW) < 500 Da und einen berechneten logP (clogP) < 5 auf. Zusätzlich sind einige Verbindungen enthalten, die höhere MW- und logP-Werte aufweisen¹⁹⁷. Zur speziellen Untersuchung einiger Kinasen sind auch eine Auswahl von bekannte Typ II Inhibitoren in der Datenbank enthalten. Das PKIS II verhält sich komplementär dazu und enthält 539 Inhibitoren. Alle enthaltenen Inhibitoren sind hinreichend charakterisiert. Es sind sowohl Struktur-Wirkungsbeziehungen (SAR) zur Primärkinase als auch Selektivitäten zu anderen Kinasen und zelluläre Aktivitäten bekannt. GlaxoSmithKline hat diese Inhibitorbibliothek zusammengestellt, um durch deren Testung weiter Information über Kinaseinhibitionen zu erhalten. Die Ergebnisse sollen das Wissen über Kinasen erweitern, denn derzeit sind nur 5 % des humanen Kinoms hinreichend untersucht¹⁹⁸. Ziel soll es sein, durch die Testung von bekannten Kinaseinhibitoren an wenig untersuchten Kinasen, Aufschluss über deren Inhibitorprofil zu erhalten und deren Funktion genauer aufzuklären.

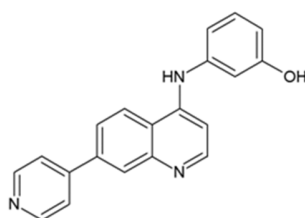
In dieser Arbeit wurden 800 Verbindungen des PKIS I und II mit dem DasAFITC-Assay in drei Replikaten bei 20 µM untersucht (die restlichen 106 Verbindungen waren nicht Bestandteil der Lieferung und konnten auch auf Nachfrage nicht zur Verfügung gestellt

werden). 10 μM Dasatinib diente als Referenz und entspricht 100 % Verdrängung der Sonde, 1 % DMSO als Vehikelkontrolle entsprechen 0 %. Die Verbindungen mit einer Sondenverdrängung > 60 % wurden ein weiteres Mal in drei Replikaten bei 20 und 5 μM getestet. Für jene Inhibitoren, die eine ausreichende Bindung bei 5 μM zeigten, wurde der IC_{50} -Werte bestimmt. Es konnten 10 neue Myt1-Inhibitoren identifiziert werden, deren Bindungsaffinitäten im mikromolaren und oberen nanomolaren Bereich liegen. Eine Übersicht der Strukturen ist in Abbildung 5.24 dargestellt. Die neuen Myt1-Inhibitoren weisen drei Grundgerüste auf, die zuvor nicht für Myt1-Inhibitoren beschrieben waren.

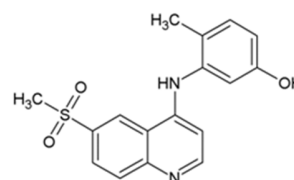
4-Amino-Chinolin Grundgerüst



GSK-3206866A

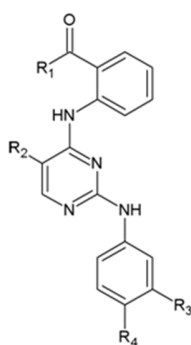


GW 494601A

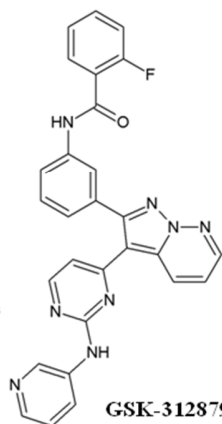


GW 559768X

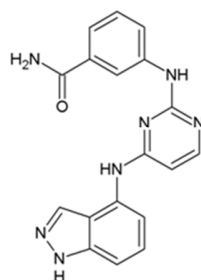
Amino-Pyrimidin Grundgerüst



GSK-312879A

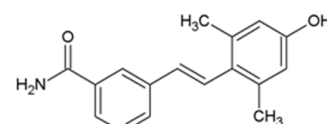


GW 782612X

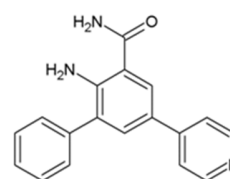


GW 435821X

Aza-Stilben Grundgerüst



Sonstige



GSK-625137A

Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
GSK-1558669A	NH ₂	CN	OCH ₃	N-Methylpiperazin
GSK-1520489A	NHCH ₃	CH ₃	CH ₂ SO ₂ CH ₃	H
GSK-1576028A	NHCH ₃	Cl	H	Morpholin

Abbildung 5.24: Strukturen der identifizierten Myt1-Inhibitoren der GSK Datenbank, nach Grundgerüsten sortiert

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden die IC₅₀-Werte im FPIA-III ermittelt, dabei dienten analog dem DasAFITC-Assay 10 µM Dasatinib und 1 % DMSO als Kontrollen. Zusätzlich wurden für jede Verbindung K_i-Werte mit Hilfe der Cheng-Prusoff-Gleichung berechnet. Alle Werte sind in Tabelle 5.9 zusammengefasst. Am Beispiel von drei Verbindungen, die je eines der neuen Grundgerüste representieren, sind die erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven des DasAFITC-Assays und des FPIA-III in Abbildung 5.25 dargestellt.

Tabelle 5.9: IC₅₀- und K_i-Werte der 10 gefundenen Myt1-Inhibitoren bestimmt mit DasAFITC-Assay und FPIA-III.

Verbindung	IC ₅₀ DasAFITC-Assay [µM]	K _i DasAFITC-Assay [nM]	IC ₅₀ FPIA-III [µM]	K _i FPIA-III [nM]
GSK-1520489	0,151	104,3	0,115	10,94
GSK-1558669A	0,787	461,9	0,340	32,4
GSK-1576028A	0,352	179,9	0,270	25,68
GSK-312879A	18,88	14740	7,56	720,2
GSK-3206866A	9,43	6150	0,543	51,73
GSK-625137A	11,43	5810	57,99	5520
GW 435821X	0,876	521,5	14,51	1380
GW 494601A	0,332	200,9	0,706	67,19
GW 559768X	0,775	588,0	0,177	16,85
GW 782612X	2,44	1600	0,509	48,47

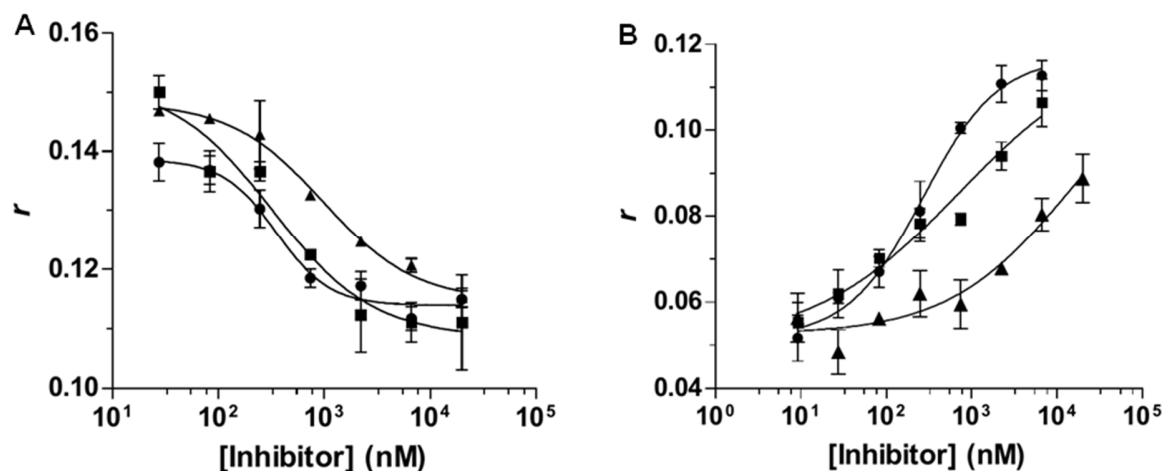


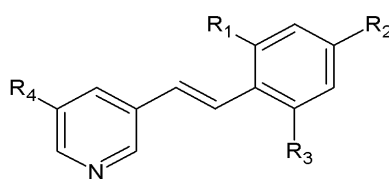
Abbildung 5.25: Konzentrations-Wirkungs-Kurven von ausgewählten GSK-Verbindungen, die Myt1 inhibieren ■ GW 494601A, ● GSK-1576028A und ▲ GW 435821X repräsentieren die drei neuen Grundgerüste. **A** DasAFITC-Assay **B** FPIA-III. Die abgebildeten Daten repräsentieren Mittelwert \pm SEM (n=3).

Mit GW 435821X konnte ein Aza-Stilben als Myt1-Inhibitor beschrieben werden. Es inhibiert die Kinase nur schwach mit $K_i = 1,38 \mu\text{M}$ (Struktur siehe Abbildung 5.24). Ebenso als schwacher Myt1-Inhibitor wurde GSK-625137A ermittelt, die einzige Verbindung, die keinem der drei Grundgerüste zugeordnet werden kann. GSK-625137A ist ein moderater IKK Inhibitor, der 2007 im Rahmen der Synthese von 2-Amino-3,5-diarylbenzamidin entdeckt wurde ¹⁹⁹. Die zweite Gruppe der neuen Myt1-Inhibitoren stellen 4-Amino-Chinoline dar, deren drei Vertreter (GSK-3206866A, GW 494601A und GW 559768X) K_i -Werte im niederen nanomolaren Bereich aufweisen. In dem PKIS-I und II sind eine Vielzahl von 4-Amino-Chinolinen und Aza-Stilbenen enthalten, was die Erstellung von SARs ermöglicht (siehe unten). Die meisten Verbindungen, die als Myt1-Inhibitoren identifiziert wurden, enthalten ein Amino-Pyrimidin-Grundgerüst (siehe Abbildung 5.24). GW 782612X mit einem $K_i = 48,47 \text{ nM}$ wurde 2007 als LCK Inhibitor entwickelt ²⁰⁰. Die unselektive Ausgangsverbindung dieser Wirkstoffentwicklung wurde 2008 durch Bamborough et al. selbst an der Myt1 getestet und zeigt eine hohe Bindungsaffinität zur Kinase. In der selben Untersuchung wurde eine selektivere, 10-fach schwächer bindende Verbindung mit 1,6-Naphthyridin Grundgerüst beschrieben ¹⁸⁴.

5.3.3.1 SAR von Aza-Stilbenen

Die Ergebnisse der Testung der GSK Verbindungen ermöglichte es zum ersten Mal, eine Struktur-Wirkungsbeziehung für die Myt1-Kinase zu erstellen. In dem PKIS I und II sind 12 Verbindungen enthalten, die ein Aza-Stilben Grundgerüst aufweisen und unterschiedlich starke Bindungen mit der Myt1 eingehen (siehe Tabelle 5.10).

Tabelle 5.10: Übersicht der getesteten Aza-Stilbene aus dem PKIS I und II und deren Test-Ergebnisse mit dem DasAFITC-Assay (Verdrängung der Sonde in %)



Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Verdrängung [%]
GW 406731X	CH ₃	OH	CH ₃	C=OOCH ₃	kein Effekt ^a
GW 427984X	CH ₃	OH	CH ₃	C=ONH(CH ₃) ₂	26,0
GW 432441X	CH ₃	OC=ONHCH ₃	CH ₃	C=ONHCH ₃	kein Effekt ^a
GW 435821X	CH ₃	OH	CH ₃	C=ONH ₂	> 90 (IC ₅₀ = 0,876 μM)
GW 439255X	CH ₃	OH	CH ₃	C=OO <i>t</i> -Bu	kein Effekt ^a
GW 441806A	CH ₃	OH	CH ₃	Tetrazol	73,3
GW 445012X	CH ₃	H	CH ₃	C=ONHCH ₃	70,9
GW 445015X	H	H	CH ₃	C=ONHCH ₃	68,3
GW 445017X	H	H	Cl	C=ONHCH ₃	24,1
GW 450241X	CH ₂ CH ₃	H	CH ₂ CH ₃	C=ONHCH ₃	kein Effekt ^a
GW 458344A	CH ₃	Furan	CH ₃	Tetrazol	kein Effekt ^a
GW 459057A	CH ₃	Pyridin	CH ₃	Tetrazol	kein Effekt ^a

^a Verdrängung < 10 %

Abgeleitet von diesen Verbindungen führt ein Austausch von einer Methyl-Gruppe gegen ein Chloratom an Position R₃ zu einer Reduktion der Bindungsaffinität der Aza-Stilbene zu Myt1. Zu einer Stabilisierung der Kinaseinhibitor-Komplexe hingegen führt die Einführung von hydrophilen und/oder gut protonierbaren Resten an R₄, die WBB mit dem Umgebungswasser ermöglichen. Führt man indes größere Substituenten an R₂ ein, so kommt es zum Verlust der Bindung auf Grund der Kollision des Inhibitors mit dem „back pocket“. Wählt man aber eine Hydroxyl-Gruppe an dieser Position, stabilisiert man den Komplex durch eine weitere WBB mit Glu157. Zur Verdeutlichung der Interaktionen von Myt1 mit GW 435821X dient die Abbildung 5.26. Es ist zu erkennen, dass der Pyridin-Ring zwei WBB mit der Hinge-Region ausbilden kann. Die WBB zu Glu157 und zwei weitere WBB von der Säureamid-Gruppe stabilisieren den Komplex zusätzlich. Die Aza-Stilbene wurden erstmals als c-RAF Kinaseinhibitoren beschrieben²⁰¹, zeigen aber an der Myt1-Kinase nur eine schwache Inhibition mit $K_i = 1,38 \mu\text{M}$. Die Interaktionen mit der Myt1 beschränken sich dabei auf den hochkonservierten adenosinbindenden Bereich, was eine geringe Selektivität erwarten lässt. Derzeit ist bekannt, dass Aza-Stilbene unter anderem mit ABL1, BRK und SIK1 interagieren¹⁹⁷.

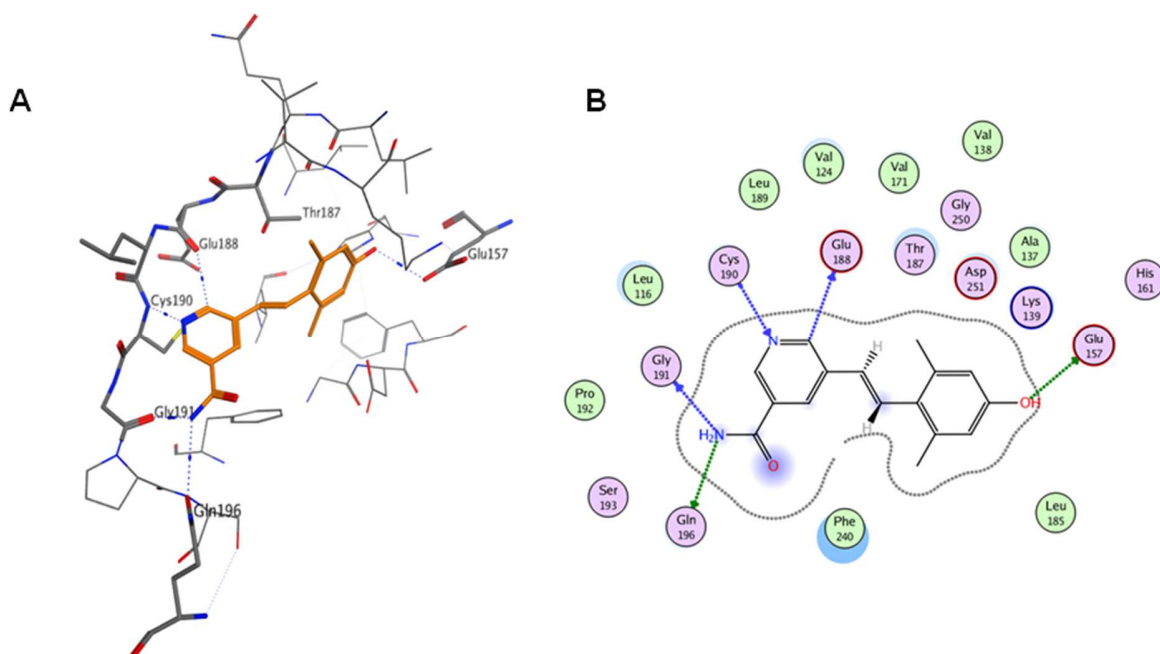
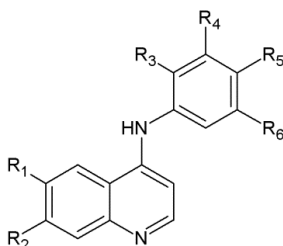


Abbildung 5.26: A GOLD-Docking Ergebnis von GW 435821X (orange) in der ATP-Bindungstasche von Myt1. Erkennbar sind fünf WBB zur Myt1-Kinase. Drei davon zur Hinge-Region, eine mit Glu157 im „back pocket“ und eine zum Gln196 im vorderen Teil der Tasche B Schematische Darstellung der Interaktion von GW 435821X mit den Aminosäuren von Myt1

5.3.3.2 SAR von 4-Amino-Chinolinen

Drei der neuen Myt1-Inhibitoren enthalten ein 4-Amino-Chinolin Grundgerüst. Im PKIS I und II sind 12 weitere Verbindungen mit diesem Grundgerüst enthalten. Ein Teil der Verbindungen zeigt keine oder nur eine schwache Bindung mit der Myt1-Kinase, wie die Verdrängungswerte in Tabelle 5.11 zeigen.

Tabelle 5.11: Übersicht der 4-Amino-Chinoline aus dem PKIS I und II und deren Test-Ergebnisse mit dem DasAFITC-Assay (Verdrängung der Sonde in %)



Verbindung	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	Verdrängung [%]
GSK-3206866A	H	2-Pyridin	H	OH	H	CH ₃	> 90 (IC ₅₀ = 9,43 μM)
GW 440137	H	2-Pyridin	H	H	Pyrazol		kein Effekt ^a
GW 440138	H	2-Pyridin	H	H	Pyrrol		25,3
GW 440146	H	2-Pyridin	H	OH	4-Methylbenzamid	H	kein Effekt ^a
GW 440148	H	2-Pyridin	H	H	4-Benzoyloxyacetamid	H	kein Effekt ^a
GW 482059	<i>t</i> -Bu	H	Iso-propyl	H	H	OH	kein Effekt ^a
GW 494601A	H	4-Pyridin	H	H	H	OH	> 90 (IC ₅₀ = 0,332 μM)
GW 494610A	H	4-Pyridin	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	72,9
GW 494702	H	Thiazol	H	OH	4-Methylbenzamid	H	kein Effekt ^a
GW 525701	H	Thiazol	H	H	H	3-N-Methylpyrazol	kein Effekt ^a
GW 551191	H	I	F	H	Cl	H	25,1
GW 552771	H	I	H	H	F	OH	37,4
GW 559768X	SO ₂ CH ₃	H	CH ₃	H	H	OH	> 90 (IC ₅₀ = 0,775 μM)
GW 856795	<i>t</i> -Bu	H	H	OH	H	H	33,1
GW 856805	<i>t</i> -Bu	H	CH ₃	H	H	OH	kein Effekt ^a

^a Verdrängung <10 %

Aus den 4-Amino-Chinolin-Verbindungen konnte eine weitere Struktur-Wirkungsbeziehung abgeleitet werden. Es ist erkennbar, dass eine Vergrößerung der Reste R₃-R₆ zu einer Reduktion bzw. einem Verlust der Bindung mit der Myt1 führt. Grund dafür ist das reduzierte Platzangebot neben dem Gatekeeper in der „gate area“. Zu große Substituenten, wie der 4-Benzoyloxyacetamid- oder der 4-Methylbenzamid-Rest in GW 440148 und GW 494702, führen zu einer Kollision des Inhibitors mit der Bindungstasche und somit zu einem Verlust der Bindung selbst. Dieser Zusammenhang konnte auch schon von den Aza-Stilbenen abgeleitet werden und zeigt den Einfluss der Taschengröße der „gate area“ auf die Bindungsaffinität eines Inhibitors, wie eingangs beschrieben. Die Reste R₁ und R₂ der 4-Amino-Chinoline dienen der Interaktion mit den Aminosäuren der „front pocket“ sowie dem Außenbereich und können den Komplex zusätzlich stabilisieren. In Abbildung 5.27 ist das GOLD-Docking Ergebnis für GW 494601A und GW 559768X dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass eine Substitution an R₁ in Richtung der „front pocket“ orientiert ist. Die Substitution an R₂ dagegen ermöglicht Interaktionen mit umgebenden Wassermolekülen und orientiert sich zum Außenbereich der ATP-Bindungstasche. Die Myt1-Kinase wird durch GW 559768X, welches eine methylierte Sulfon-Gruppe trägt, stark inhibiert. Der K_i aus dem FPIA-III liegt bei 16,85 nM. Ersetzt man diese Gruppe mit einem tertiären Butylrest, kommt es zum Verlust der Bindung bzw. zu einer deutlichen Reduktion der Affinität. Betrachtet man die Position R₂ lässt sich erkennen, dass die Bindung zu Myt1 in folgender Reihenfolge abnimmt 4-Pyridin > 2-Pyridin > I > Thiazol. Basierend auf den Inhibitionsdaten ist zu bemerken, dass eine methylierte Sulfon-Gruppe an Position R₁ den Pyridinen an R₂ vorgezogen wird. Jedoch stellt GW 559768X einen Pan-Kinaseinhibitor mit geringer Selektivität dar¹⁹⁷, was die Pyridin-substituierten Verbindungen für einen neuen Syntheseweg interessant macht.

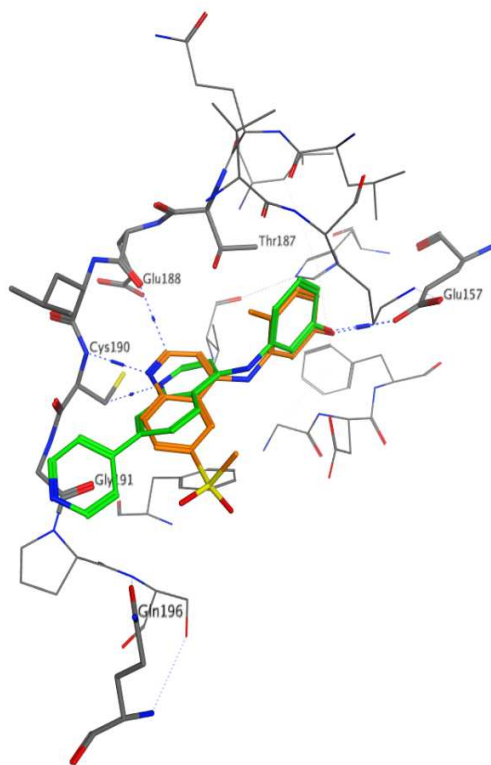


Abbildung 5.27: GOLD-Docking Ergebnisse von GW 494601A (grün) und GW 559768X (orange). Erkennbar sind die WBB des Chinolin-Grundgerüsts mit der Hinge-Region und die WBB des Glu157 mit der Hydroxyl-Gruppe an Position R₆

Beschrieben wurde GW 559768X erstmals als potenter RET Kinaseinhibitor mit einem IC₅₀-Wert von 3 nM ²⁰². In diesem Zusammenhang sind auch GW 494601A- und GSK-3206866A-ähnliche Verbindungen als RET Inhibitoren beschrieben worden. Die beiden Verbindungen selbst sind jedoch nicht ausreichend untersucht. Auch durch Elkins et al. fand keine Testung von GSK-3206866A an verschiedenen Kinasen statt ¹⁹⁷. Somit eröffnet das 4-Amino-Chinolin Grundgerüst die Möglichkeit der Synthese neuer Myt1-Inhibitoren, deren Selektivität und inhibitorische Effektivität durch gezielte Modifikation des Grundgerüsts verbessert werden kann. Die niedernanomolaren Inhibitionskonstanten aus dem FPIA-III stellen dafür einen guten Ausgangspunkt dar.

5.3.3.3 SAR von Verbindungen mit Amino-Pyrimidin-Grundgerüst

Neben den Struktur-Wirkungsbeziehungen der Aza-Stilbene und 4-Amino-Chinoline bietet das Amino-Pyrimidin-Grundgerüst ebenfalls die Möglichkeit, allgemeinere Aussagen über die SAR der Myt1-Inhibitoren zu treffen. Im PKIS I und II waren insgesamt 18 Amino-Pyrimidine enthalten, von denen drei als potente Myt1-Inhibitoren identifiziert wurden. Diese drei Inhibitoren (GSK-1558669A, GSK-1520489A und GSK-1576028A) sind als Aurorakinase-Inhibitoren patentiert (WO2008092049²⁰³). Lediglich für GSK-1576028A sind zusätzliche Inhibitionsdaten bekannt. Es zeigt potente Inhibitionen bei niedrigen nanomolaren Konzentrationen an der FAK, Flt3, JAK2 und Src Kinase²⁰⁴. Kaum untersucht ist GSK-312879A, welches 2010 bei einem Malaria-Screening beschrieben wurde²⁰⁵. Alle Verbindungen, die ein Amino-Pyrimidin-Grundgerüst und ein Carboxamid-Rest an R₁ aufweisen, sind in der Lage, die Myt1 potent zu hemmen und zeigen K_i-Werte im unteren nanomolaren Bereich. Es kann daraus geschlossen werden, dass das Amino-Pyrimidin-Grundgerüst einen stabilen Komplex mit der ATP-Bindungstasche formen kann (alle anderen Verbindungen in Tabelle 5.12 sind inaktiv). Basierend auf dem GOLD-Docking Ergebnis der Verbindung GSK-1576028A und im Einklang mit dem Bindungsmodus von GW 782612X mit der LCK²⁰⁰, werden zwei WBB zur Hinge-Region vom Amino-Pyrimidin-Grundgerüst ausgebildet (siehe Abbildung 5.28). Bei diesen Inhibitoren findet jedoch keine Besetzung der „gate area“ statt. Zusätzlich werden jedoch Taschen des „front clefts“ adressiert. Daraus resultiert, dass die Substituenten der Aromaten im äußeren Taschenrand lokalisiert sind, wie der enthaltene Morpholin-Rest von GSK-1576028A. Diese Orientierung verhält sich analog zu PD-173952¹⁸¹. Der Bindungsmodus der Amino-Pyrimidine ist nicht mit den Aza-Silbenen und 4-Amino-Chinolinen vergleichbar.

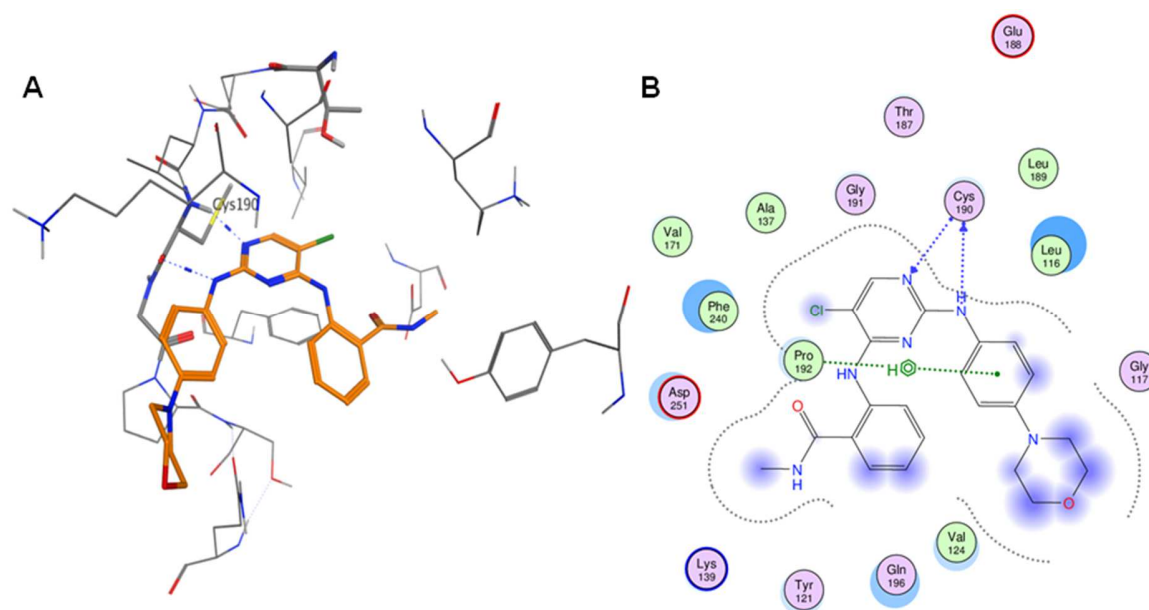
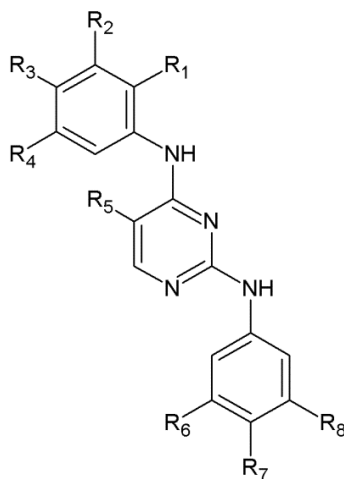


Abbildung 5.28: **A** GOLD-Docking Ergebnis von GSK-1576028A (orange) in der ATP-Bindungstasche von Myt1. Dargestellt sind zwei WBB zur Hinge-Region, die vom Pyrimidin-Grundgerüst und der Aminofunktion ausgebildet werden. **B** Schematische Darstellung der Interaktionen von GSK-1576028A mit den Aminosäuren von Myt1.

Tabelle 5.12 gibt eine Übersicht der getesteten Amino-Pyrimidine und deren Test-Ergebnisse im DasAFTIC-Assay bei 20 μ M Inhibitorkonzentration. Die hydrophilen Reste an R₁, R₆ und R₇ sind nach außen orientiert und können mit den dort vorhandenen Aminosäuren oder dem Umgebungswasser interagieren. Die Carboxamid-Gruppe an R₁ ist essentiell, fehlt sie geht auch die Bindungsaffinität zur Myt1-Kinase verloren. Ebenfalls negativ auf die Bindung wirken sich hydrophobe Gruppen an R₃ aus. Zu einer Stabilisierung des Kinase-Inhibitor-Komplexes kommt es, wenn R₅ substituiert ist. R₅ ist Richtung „gate area“ bzw. den „back pockets“ gerichtet, wodurch weitere Interaktionen mit der ATP-Bindungstasche möglich sind. Alle drei aktiven Inhibitoren mit Amino-Pyrimidin-Grundgerüst sind an R₅ substituiert. So trägt GSK-1520489A dort eine Methyl-Gruppe. Im Falle von GSK-1558669A dient die enthaltene Nitril-Gruppe als möglicher WB-Akzeptor, der entweder direkt mit einer Aminosäure interagieren kann oder indirekt über konservierte Wassermoleküle wechselwirkt, wie die Kristallstruktur von Cdk2 mit einem Amino-Pyrimidin-Inhibitor (PDB: 4BCQ) verdeutlicht. Neben WBB können auch Halogenbindungen oder hydrophobe Wechselwirkungen den Inhibitor in der Bindungstasche stabilisieren, wie die Test-Ergebnisse von GSK-1576028A vermuten lassen. Alle anderen Amino-Pyrimidine sind nicht an R₁ und

R₅ substituiert und binden deutlich schwächer oder gar nicht an der Myt1-Kinase, was die Bedeutsamkeit dieser beiden Substitutionen unterstreicht.

Tabelle 5.12: Übersicht einer Auswahl von Amino-Pyrimidine aus dem PKIS I und II deren Test-Ergebnisse mit dem DasAFITC-Assay (Verdrängung der Sonde in %)

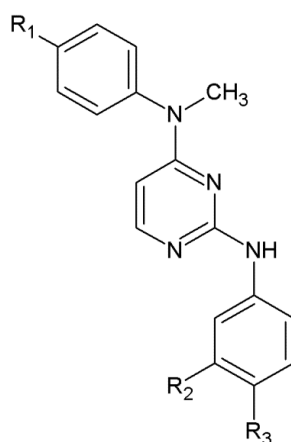


Name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	Verdrängung [%]
GSK-1520489A	CONHCH ₃	H	H	H	CH ₃	CH ₂ SO ₂ CH ₃	H	H	> 90 (IC ₅₀ = 0,151 μM)
GSK-1558669A	CONH ₂	H	H	H	CN	N-Methyl piperazin	O CH ₃	H	> 90 (IC ₅₀ = 0,787 μM)
GSK-1576028A	CONHCH ₃	H	H	H	Cl	H	Morpholin	H	> 90 (IC ₅₀ = 0,352 μM)
GSK-175726A	H	Cl	H	Cl	H	Cl	H	Cl	kein Effekt ^a
GW 575808A	H	OH	CH ₃	H	H	CONH ₂	H	H	33
GW 582868A	H	OH	CH ₃	H	H	F	CH ₃	H	kein Effekt ^a
GW 639905A	H	H	Phenoxy	H	H	H	CH ₂ CN	H	kein Effekt ^a
GW 659008A	H	Cl	3-Chloro phenoxy	H	H	CONH ₂	H	H	kein Effekt ^a
GW 659009A	H	Cl	2,6-Dichloro phenoxy	H	H	CONH ₂	H	H	kein Effekt ^a
GW 663929X	H	H	Phenoxy	H	H	N-[3-(morpholin-4-yl)propyl]formamid	H	H	19
GW 759710A	H	F	H	H	H	CONH ₂	H	H	37

^aVerdrängung <10 %

Eine besondere Gruppe von Amino-Pyrimidinen sind in Tabelle 5.13 aufgelistet. Sie wurden ursprünglich als VEGFR2-Inhibitoren entwickelt ²⁰⁶ zeigen aber auch einen inhibitorischen Effekt an der ABL1-, Aurora-Kinase und am platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) ¹⁹⁷.

Tabelle 5.13: Übersicht weiterer Amino-Pyrimidine aus dem PKIS I und II deren Test-Ergebnisse mit dem DasAFITC-Assay (Verdrängung der Sonde in %)



Name	R ₁	R ₂	R ₃	Verdrängung [%]
GW 809893X	3-[2-Fluoro-5-(trifluoromethyl)phenyl]urea	H	SO ₂ NH ₂	kein Effekt ^a
GW 809897X	3-(2,6-Dichlorophenyl)urea	CH ₂ SO ₂ CH ₃	H	kein Effekt ^a
GW 827654A	3-{4-[(4-Methylpiperazin-1-yl)methyl]phenyl}urea	H	CH ₂ SO ₂ CH ₃	kein Effekt ^a
GW 830263A	3-[4-(4-Methylpiperazin-1-carbonyl)phenyl]urea	H	CH ₂ SO ₂ CH ₃	53
GW 830365A	3-[2-(Morpholin-4yl) ethyl]urea	H	CH ₂ SO ₂ CH ₃	kein Effekt ^a
GW 830899A	4-[2-(Morpholin-4-yl)ethyl] piperazine-1-carboxamid	H	CH ₂ SO ₂ CH ₃	kein Effekt ^a
GW 830900A	3-[2-(Dimethylamino) ethyl]uera	H	CH ₂ SO ₂ CH ₃	kein Effekt ^a

^a Verdrängung <10 %

Diese Amino-Pyrimidine weisen alle sehr große Substituenten an R₁ auf, die in der Regel hydrophil und gut protonierbar sind. Sie können der Klasse der Typ II Inhibitoren zugeordnet werden und interagieren mit polaren AS über den enthaltenen Harnstoffrest, was eine Öffnung des „back clefts“ ermöglicht (siehe Kristallstruktur der humanen Serin Threonin Kinase 10 (LOK) mit GW 830263A (PDB: 4AOT)). Ausgehend von den oben beschriebenen Zusammenhängen sollten diese Verbindungen nicht in der Lage sein, an der Myt1-Kinase zu binden, da sie auch keinen Substituenten am Pyrimidin tragen, der mit der „gate area“ oder den „back pocketes“ interagieren kann. Jedoch zeigt GW 830263A eine Sondenverdrängung von 53 % und somit eine moderate Bindungsaffinität zur Myt1-Kinase. Von einer Übereinstimmung der Bindungsmodus, wie in der LOK zu erkennen, kann jedoch nicht ausgegangen werden, da die Myt1-Bindungstasche deutlich flacher ist. Diese Form zwingt den Amidrest der Inhibitoren in eine coplanare Lage, was in einer Vergrößerung der planaren aromatischen Fläche resultiert. Stabilisiert wird diese Anordnung durch eine intramolekulare WBB des Amids zum Amin. Bekannt ist diese planare Lage z.B. aus den Kristallstrukturen der JAK2 mit verschiedenen Amino-Pyrimidin-Inhibitoren (PDB: 4BBE und 4BBF, siehe Abbildung 5.29).

Basierend auf diesem Bindungsmodus orientiert sich R₁ dieser Verbindungen nach außen und kann mit den „front pockets“ und den AS am Taschenrand bzw. dem Umgebungswasser interagieren. Außer GW 830263A zeigt keine der getesteten Verbindungen einen Effekt an der Myt1-Kinase. Sie unterscheidet sich zu den anderen Verbindungen durch eine zusätzliche Carbonyl-Gruppe in R₁. Die Test-Ergebnisse lassen vermuten, dass diese Gruppe sich stabilisierend auf den Kinase-Inhibitor-Komplex auswirkt. Ausgehend von der exponierten Lage der Carbonyl-Gruppe außerhalb der ATP-Bindungstasche, ist eine WW mit den dort vorhandenen AS wahrscheinlich. Dabei kann die Carbonyl-Gruppe als WB-Akzeptor fungieren. Wie die moderate Bindungsaffinität von GW 830263A zeigt, ist dieser Effekt nur schwach ausgeprägt und für die Struktur-Aktivitäts-Optimierung von Myt1-Inhibitoren von geringer Relevanz.

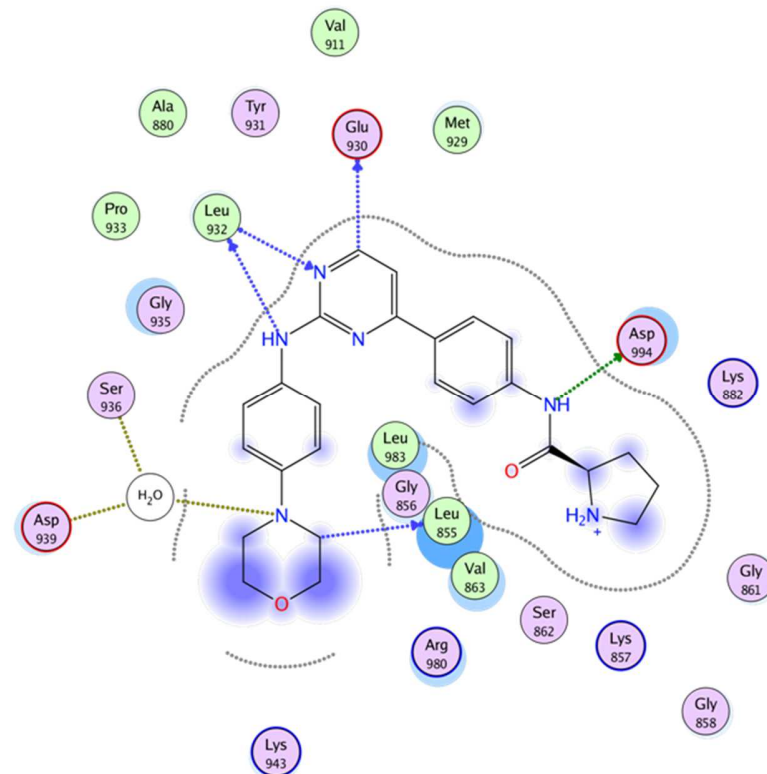


Abbildung 5.29: Schematische Darstellung der Interaktionen eines Amino-Pyrimidin-Inhibitors mit den Aminosäuren der JAK2 (PBD:4BBF).

5.3.3.4 Testung ausgewählter GSK Verbindungen mit Cdk1

Zur Verifizierung der erhaltenen Ergebnisse wurden die neuen Myt1-Inhibitoren hinsichtlich der Myt1-Hemmung in Anwesenheit der humanen Cdk1 untersucht. Dazu wurden 125 nM Cdk1 im SKP-B mit 500 μ M ATP und 80 nM Myt1-FL eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Inhibitoren wurden bei 20 und 5 μ M getestet. Als Vehikelkontrolle (PK) diente analog des Assays 1 % DMSO, in dessen Gegenwart Myt1 Cdk1 ungehemmt phosphoryliert. Zur Inhibitionskontrolle wurden Dasatinib und PD-0166285 verwendet. Zum Stoppen der Reaktion wurde 100 mM EDTA zugegeben. Anschließend wurden die Proben für den Western-Blot vorbereitet (siehe Abschnitt 4.6). Detektiert wurde die Tyr15 Phosphorylierung der Cdk1 mittels anti-pY15-Cdk1 Antikörper. Als Ladekontrolle diente die Myt1 unter Verwendung des anti-Myt1 Antikörpers, um Proteinverlust während des Blottens auszuschließen. In Abbildung 5.30 sind die Ergebnisse der Western-Blots dargestellt.

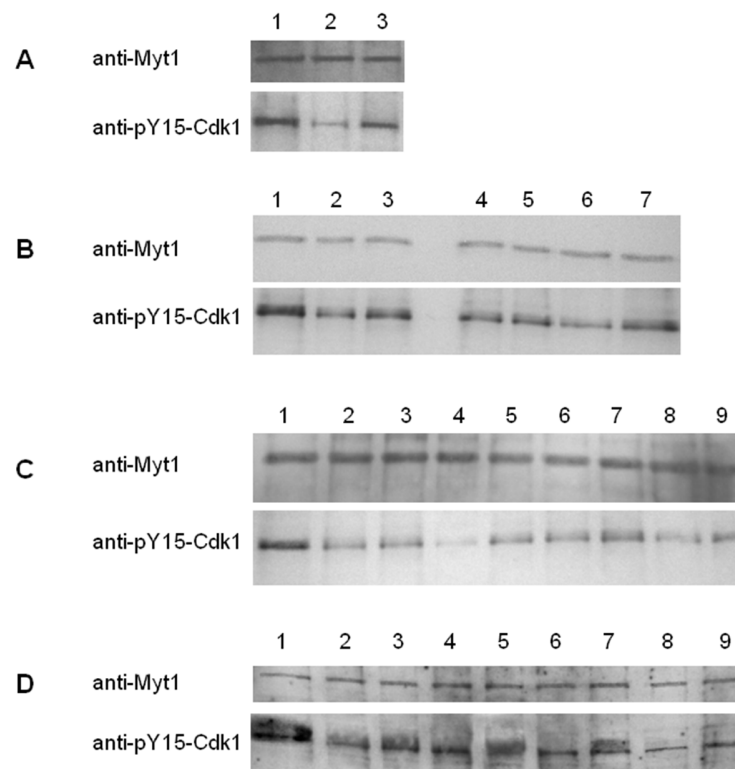


Abbildung 5.30: Western-Blot Ergebnisses der Untersuchung von GSK-Inhibitoren an der Myt1-FL. Bande (1) entspricht der Vehikelkontrolle. Es wurden jeweils 20 und 5 μ M der Verbindungen getestet. **A** Dasatinib (2 und 3). **B** GW 782612X (2 und 3), GW 435821X (4 und 5), GSK-625137A (6 und 7). **C** GSK-312879A (2 und 3), GSK-1558669A (4 und 5), GSK-1520489A (6 und 7), GSK-1576028A (8 und 9). **D** GW 494601A (2 und 3), GSK-3206866A (4 und 5), GW 559768X (6 und 7), PD-0166285 (8 und 9).

Wie die Myt1-Bande erkennen lässt, sind die Bahnen mit äquivalenten Mengen Protein beladen. Deswegen sind die detektierbaren Unterschiede in der Tyr15 Phosphorylierung der Cdk1 ausschließlich das Resultat der Myt1-Reaktion. Es ist zu erkennen, dass jede der Verbindungen die detektierbare Menge an pY15-Cdk1 im Vergleich zur Vehikelkontrolle reduziert. Somit zeigen alle einen inhibitorischen Effekt an der Myt1-FL und bestätigen die Ergebnisse der Assayuntersuchungen. Besonders deutlich ist die Inhibition von GW 559768X, GSK-1558669A, GSK-1576028A und GSK-1520489A erkennbar, entsprechend den IC_{50} -Werte zwischen 115 und 340 nM. Bei den schwächeren Myt1-Inhibitoren, deren IC_{50} -Werte im mikromolaren Bereich liegen wurde deutlich mehr Cdk1 phosphoryliert, jedoch weniger als in der Vehikelkontrolle. Damit konnte eine gute Korrelation der Inhibitionsdaten aus dem FPIA-III und der *in vitro* Phosphorylierung der

Cdk1 bestätigt werden, was zusätzlich die Qualität des zuvor entwickelten Aktivitätsassays unterstreicht.

Analog der Myt1-Inhibition wurde die Cdk1 mit 40 nM Wee1 inkubiert. Als Inhibitionskontrolle wurden MK-1775 und PD-0166285 verwendet, als Ladekontrolle wurde hier Wee1 gewählt und mit anti-Wee1 Antikörper detektiert. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte analog der Myt1. Ziel dieser Untersuchung war es, eine Aussage über die Selektivität der GSK-Inhibitoren gegenüber der Myt1 verwandten Wee1 Kinase zu treffen.

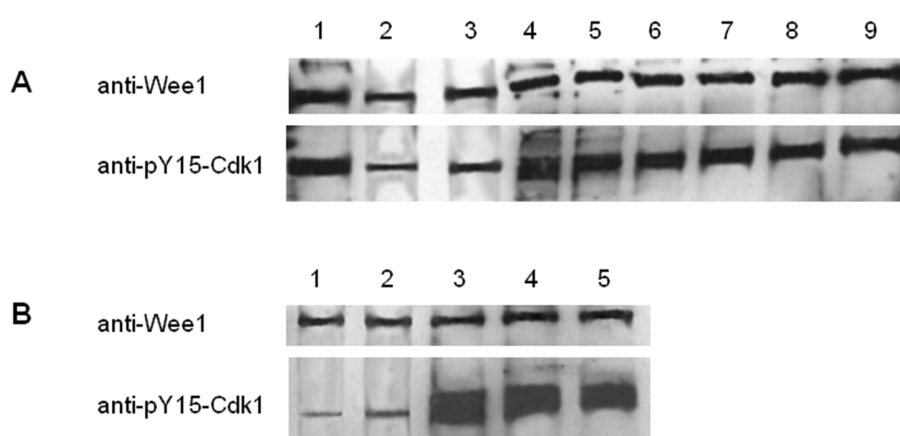


Abbildung 5.31: Western Blot Ergebnisse der Untersuchung von GSK-Inhibitoren an der Wee1. Analog zur Myt1-Testung wurden jeweils 20 und 5 μ M der Verbindungen untersucht **A** Bande (1) entspricht der Vehikelkontrolle. MK-1775 (2 und 3), GW 494601A (4 und 5), GSK-3206866A (6 und 7), GW 559768X 20 μ M (8 und 9). **B** PD-0166285 (1 und 2), Vehikelkontrolle (3), GW 435821X (4 und 5).

Auch für diese Blots ist eine einheitliche Ladekontrolle von Wee1 erkennbar, was die detektierte pTyr15 Cdk1 vergleichbar macht (siehe Abbildung 5.31). Es ist auffällig, dass die potenten Wee1 Inhibitoren MK-1775 ($IC_{50} = 5,2 \text{ nM}^5$) und PD-0166285 ($IC_{50} = 24 \text{ nM}^{99}$) die Cdk1 Phosphorylierung fast vollständig hemmen. Die 4-Amino-Chinoline und das Aza-Stilben GW 435821X zeigen keinen Effekt auf die Wee1. Aus den Phosphorylierungsgraden der Cdk1 durch Myt1 und Wee1 lässt sich folgern, dass die Inhibitoren eine Prävalenz zur Myt1 aufweisen. Da kanzerogene Zellen eine höhere Abhängigkeit von Myt1 zeigen, sind die neuen Inhibitoren für einen zytotoxischen Einsatz zu bevorzugen.

Allgemein kann man die Selektivität der GSK-Verbindungen als moderat einschätzen, weil ausschließlich bekannte Kinaseinhibitoren vorliegen, die an einigen Kinasen IC_{50} -Werte im

nanomolaren Bereich aufweisen. Bei einem Screening des PKIS-I an 224 Kinasen konnten 10 unselektive Verbindungen identifiziert werden, unter anderem GW 559768X und GW 440139A¹⁹⁷. (GW 440139A stellt ein 4-Amino-Chinolin-Derivat dar, welches nicht bei den 800 Verbindungen enthalten war.) Das gleiche Screening bestätigte aber auch die hohe Selektivität einiger GSK3 β -Inhibitoren wie SB-686709A und SB-698596A. Da das Problem der Selektivität von Kinaseinhibitoren ubiquitär vorkommt, wird derzeit eine Selektivität von > 30-fach gegenüber anderen Kinasen angestrebt. In den 224 getesteten Kinasen war auch die Myt1 enthalten. Sie wurde mit Hilfe der Differential Scanning Fluorimetrie (DSF) untersucht. Dabei bestimmt man die Änderung der Schmelztemperatur (T_m) zwischen freier Kinase und Kinaseinhibitor-Komplex. Je größer ΔT_m , umso besser bindet der Inhibitor an der Kinase²⁰⁷. Verwendet wurden 10 μ M Inhibitor, 2 μ M Myt1 und ein 10 mM HEPES-NaOH Puffer pH 7,5 mit 500 mM NaCl. Drei Verbindungen wiesen einen ΔT_m -Wert > 2,2 auf und binden somit schwach an Myt1. Zu diesen Verbindungen zählen GW 406108X, GW 280670X und GW 806742X. Die zuletzt genannte Verbindung war in dieser Arbeit nicht verfügbar, die anderen zeigten keine (GW 406108X) bzw. eine schwache Sondenverdrängung von 48 % (GW 280670X) im DasAFITC-Assay. Die in dieser Arbeit identifizierten neuen Myt1-Inhibitoren GSK-625137A, GW 559768X, GSK-3206866A, GW 782612X, GW 435821X wurden entweder nicht untersucht (GSK-625137A und GSK-3206866A) oder zeigten keine Bindungsaffinität zur Myt1. Die Unterschiede im Bindungsmuster der Myt1-Kinase lassen sich auf den eingesetzten Puffer zurückführen. Die enthaltenen 500 mM NaCl stören die Bindung erheblich, wie auch die Untersuchungen des Ionenstärke-Einflusses im FPIA-III bestätigen (siehe Abschnitt 5.2.3.3). Die für die Myt1 entwickelten Bindungsassays enthalten kein NaCl, jedoch 10 mM MgCl₂, welches einen stabilisierenden Effekt auf die ATP-Bindungstasche hat und bei der DSF nicht verwendet wird. Es lässt sich also sagen, dass die für das DSF gewählten Bedingungen schlecht geeignet sind, eine Myt1-Inhibitorbindung zu messen.

5.3.4 MK-1775 als moderater Myt1-Inhibitor

Mit der Entdeckung des selektiven Wee1 Inhibitors MK-1775 rückte die Wee1 Kinase in den Fokus der Krebsforschung. MK-1775 ist ein kompetitiver Inhibitor und wurde nach einem High-Throughput-Screening einer kleineren Datenbank synthetisiert. Er inhibiert die Wee1 mit einem IC_{50} -Wert von $5,2 \text{ nM}$ ⁵ und weist eine hohe Selektivität gegen andere Kinasen auf. Bei einem Screening von 223 Kinase wurden lediglich acht von MK-1775 $> 80 \%$ gehemmt bei $1 \mu\text{M}$ Inhibitorkonzentration. Zur Myt1-Kinase wird eine > 100 -fache Selektivität angegeben⁵. Die kommerzielle Verfügbarkeit von MK-1775 hat es erlaubt, diesen selektiven Wee1 Inhibitor an der Myt1 zu testen und die Selektivität zu bestätigen. Im DasAFITC-Assay erreicht MK-1775 einen IC_{50} -Wert von $1,34 \mu\text{M}$ und einen K_i von $600,9 \text{ nM}$, weist somit also eine moderate Bindungsaffinität auf. Die Inhibitionsstärke im FPIA-III liegt in ähnlichen Bereichen mit einem IC_{50} -Wert von $4,94 \mu\text{M}$ und einem K_i -Wert von 470 nM (siehe Abbildung 5.32). Folglich hemmt MK-1775 die Myt1-Kinase 1000-fach schwächer als die Wee1, womit die deutliche Selektivität bestätigt werden konnte.

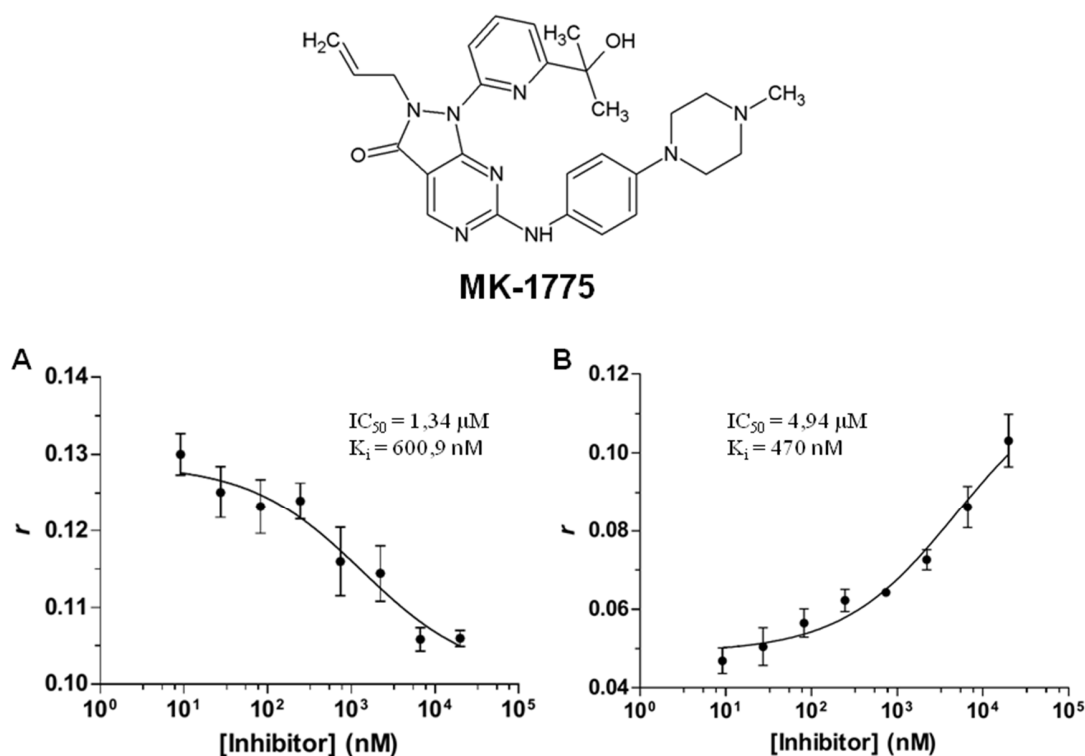


Abbildung 5.32: Struktur und Ergebnisse von MK-1775. IC_{50} und K_i -Werte aus dem Dosis-Wirkungs-Kurven mit **A** DasAFITC-Assay und **B** FPIA-III. Die dargestellten Daten entsprechen dem Mittelwert \pm SEM ($n=3$).

6 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit fanden anfänglich Untersuchungen zur Optimierung der Expression der Myt1-FL und der Myt1-Kinasedomäne statt. Dabei wurden verschiedene Präparationen der Myt1-FL aus *E.coli* hinsichtlich ihrer Phosphorylierungs-Fähigkeit von Tyrosinen untersucht, zeigten aber keine Kinaseaktivität. Als neue Möglichkeit, die Myt1-FL zu gewinnen, werden derzeit Sf9-Zellen als Expressionssystem erprobt. Diese Insektenzellen fanden auch schon durch Liu et al. zur Myt1-Gewinnung Anwendung⁵² und ermöglichen eine Sekretion des gebildeten Proteins in das umgebende Medium. Des Weiteren sind Insektenzellen virusstabil und zu posttranslationalen Modifikationen in der Lage¹⁵¹. Die Aussicht auf hohe Ausbeuten bei akzeptablen Kosten macht dieses Expressionssystem für die Myt1-FL-Generierung zusätzlich interessant und sollte in weiterführenden Arbeiten tiefgehend untersucht werden.

Da auch bei der Generierung der isolierten Myt1-Kinasedomäne keine Verbesserungen erzielt wurden, fand keine Änderung der etablierten Expressionsbedingungen statt.

Mit der HEK-exprimierten Myt1-FL erfolgten erste Aktivitätsmessungen an kurzkettigen Peptiden. Die vorangegangene Identifizierung von EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ als geeignetes Myt1-Substrat¹⁵⁷ ermöglichte die Entwicklung des ersten optimierten fluoreszenzpolarisationsbasierten Aktivitätsassays für die Myt1-Kinase. Bei der Optimierung des Assays fand erstmals eine biochemische Charakterisierung der Kinase statt. In diesen Zusammenhang wurden verschiedene externe Einflussfaktoren optimiert und auch das pH-Optimum von 7,5 festgestellt. Das Temperaturoptimum der kinasevermittelten Phosphorylierung liegt bei 37 °C. Im Verlauf der Assayentwicklung erfolgte die Bestimmung der kinetischen Parameter K_m , k_{cat} , k_{cat}/K_m und v_{max} für das Substrat EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ sowie das Co-Substrat ATP. Der Vergleich der Inhibitionsdaten ausgewählter Myt1-Inhibitoren mit Daten aus dem DasAFITC-Assay zeigten eine gute Korrelation von Bindungsaffinität und Inhibition. Der entwickelte FPIA-III ist für Medium-Throughput-Screenings geeignet und ermöglicht die Charakterisierung sowie Identifizierung von neuen Myt1-Inhibitoren. Er stellt eine alternative Methode zu den zuvor etablierten Bindungsassays dar und kann als weiteres Werkzeug im Validierungsprozess von Inhibitoren Anwendung finden.

Weiterführend wurden zum ersten Mal Untersuchungen von DasAFITC mit der Myt1-Domäne unter Verwendung der MicroScale Thermophorese Technologie durchgeführt. Die

Ergebnisse bestätigen die Anwendbarkeit der Technologie für die Myt1. Um sie jedoch routinemäßig einsetzen zu können, sind weiterführende Arbeiten erforderlich.

Zur Identifizierung neuer Myt1-Inhibitoren wurden insgesamt 932 Verbindungen mit dem DasAFITC-Assay hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität zur Kinasedomäne getestet. Dabei konnten zehn neue Inhibitoren gefunden werden, die zusätzlich im zuvor entwickelten FPIA-III untersucht wurden. Ein Teil dieser Verbindungen hemmt die Myt1 im niederen nanomolaren Bereich. Zur Verifizierung der Ergebnisse dienten weitere Experimente an der humanen Cdk1 als Substrat, die alle Verbindungen als Myt1-Inhibitoren bestätigten. Die ermittelten Phosphorylierungen der Cdk1 wurden entsprechend der zuvor bestimmten IC₅₀-Werte des FPIA-III gehemmt. Somit konnte auch eine gute Übereinstimmung der Daten aus dem FPIA-III und *in vitro* Daten an Cdk1 bestätigt werden. Im Zusammenhang mit dem Screening des PKIS I und II konnten die ersten Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Myt1-Kinase erstellt werden. Die Ergebnisse ermöglichen zudem die Erstellung neuer Syntheserouten und stellen den Ausgangspunkt für strukturbasierte Optimierungen dar.

Insofern leistet diese Arbeit konstruktive Beiträge für die grundlegende Erforschung der humanen Myt1-Kinase und der Entwicklung selektiver Myt1-Inhibitoren.

7 Quellen

1. Gröhe, H. *Krebsbekämpfung bleibt gesundheitspolitische Herausforderung ersten Ranges*. 1–2 (2015).
2. Epidemiologisches Bulletin. *Robert Koch Inst.* **6**, 41–46 (2015).
3. Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J. & Matter, A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 493–502 (2002).
4. Deininger, M., Buchdunger, E. & Druker, B. J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood* **105**, 2640–2653 (2005).
5. Hirai, H. *et al.* Small-molecule inhibition of Wee1 kinase by MK-1775 selectively sensitizes p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 2992–3000 (2009).
6. <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=MK-1775&Search=Search>.
7. Tibes, R. *et al.* RNAi screening of the kinome with cytarabine in leukemias. *Blood* **119**, 2863–2872 (2012).
8. Toledo, C. M. *et al.* Genome-wide CRISPR-Cas9 Screens Reveal Loss of Redundancy between PKMYT1 and WEE1 in Glioblastoma Stem-like Cells. *Cell Rep.* **13**, 2425–2439 (2015).
9. Brognard, J. & Hunter, T. Protein kinase signaling networks in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 4–11 (2011).
10. Van Linden, O. P. J., Kooistra, A. J., Leurs, R., de Esch, I. J. P. & de Graaf, C. KLIFS: a knowledge-based structural database to navigate kinase-ligand interaction space. *J. Med. Chem.* **57**, 249–277 (2014).
11. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T. & Sudarsanam, S. The Protein Kinase Complement of the Human Genome. *Science*. **298**, 1912–1934 (2002).
12. Domingo-Sananes, M. R., Kapuy, O., Hunt, T. & Novak, B. Switches and latches: a biochemical tug-of-war between the kinases and phosphatases that control mitosis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **366**, 3584–3594 (2011).
13. Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V. & Medema, R. H. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J. Cell Biol.* **185**, 193–202 (2009).

14. Klebe, G. *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen (German Edition)*. 427–458 (Spektrum Akademischer Verlag, 2009). at
15. Zuccotto, F., Ardini, E., Casale, E. & Angiolini, M. Through the “gatekeeper door”: exploiting the active kinase conformation. *J. Med. Chem.* **53**, 2681–2694 (2010).
16. Knight, Z. A. & Shokat, K. M. Features of selective kinase inhibitors. *Chem. Biol.* **12**, 621–637 (2005).
17. Liu, F., Stanton, J. J., Wu, Z. & Piwnicka-Worms, H. The human Myt1 kinase preferentially phosphorylates Cdc2 on threonine 14 and localizes to the endoplasmic reticulum and Golgi complex. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 571–583 (1997).
18. Becker, W. & Sippl, W. Activation, regulation, and inhibition of DYRK1A. *FEBS J.* **278**, 246–56 (2011).
19. Johnson, L. N., Noble, M. E. & Owen, D. J. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**, 149–158 (1996).
20. Niu, L. *et al.* Kinetic Characterization of Human JNK2 α 2 Reaction Mechanism Using Substrate Competitive Inhibitors. *Biochemistry* **46**, 4775–4784 (2007).
21. Schrag, D. The Price Tag on Progress — Chemotherapy for Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* **351**, 317–319 (2004).
22. Sun, L. *et al.* Discovery of 5-[5-Fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic Acid (2-Diethylaminoethyl)amide, a Novel Tyrosine Kinase Inhibitor Targeting Vascular Endothelial and Platelet-Derived Growth Fac. *J. Med. Chem.* **46**, 1116–1119 (2003).
23. Sequist, L. V & Lynch, T. J. EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer: an evolving story. *Annu. Rev. Med.* **59**, 429–442 (2008).
24. Krishnamurty, R. & Maly, D. J. Biochemical Mechanisms of Resistance to Small-Molecule Protein Kinase Inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **5**, 121–138 (2010).
25. Weiss, M. M. *et al.* Evaluation of a series of naphthamides as potent, orally active vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **51**, 1668–1680 (2008).
26. Dalgarno, D. *et al.* Structural basis of Src tyrosine kinase inhibition with a new class of potent and selective trisubstituted purine-based compounds. *Chem. Biol. Drug Des.* **67**, 46–57 (2006).
27. Klein, P. S. & Melton, D. A. A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 8455–8459 (1996).

28. Kwak, E. L. *et al.* Irreversible inhibitors of the EGF receptor may circumvent acquired resistance to gefitinib. *PNAS* **102**, 7665–7670 (2005).
29. Graczyk, P. P. Gini coefficient: a new way to express selectivity of kinase inhibitors against a family of kinases. *J. Med. Chem.* **50**, 5773–5779 (2007).
30. Karaman, M. W. *et al.* A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **26**, 127–132 (2008).
31. Liu, L. *et al.* Synergistic effects of foretinib with HER-targeted agents in MET and HER1- or HER2-coactivated tumor cells. *Mol. Cancer Ther.* **10**, 518–530 (2011).
32. Chan, W. W. *et al.* Conformational control inhibition of the BCR-ABL1 tyrosine kinase, including the gatekeeper T315I mutant, by the switch-control inhibitor DCC-2036. *Cancer Cell* **19**, 556–568 (2011).
33. Chrencik, J. E. *et al.* Structural and thermodynamic characterization of the TYK2 and JAK3 kinase domains in complex with CP-690550 and CMP-6. *J. Mol. Biol.* **400**, 413–433 (2010).
34. Tokarski, J. S. *et al.* The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res.* **66**, 5790–5797 (2006).
35. Martz, K. E. *et al.* Targeting the Hinge Glycine Flip and the Activation Loop: Novel Approach to Potent p38 α Inhibitors. *J. Med. Chem.* **55**, 7862–7874 (2012).
36. Huggins, D. J., Sherman, W. & Tidor, B. Rational approaches to improving selectivity in drug design. *J. Med. Chem.* **55**, 1424–1444 (2012).
37. Robinson, D. D., Sherman, W. & Farid, R. Understanding Kinase Selectivity through Energetic Analysis of Binding Site Waters. *ChemMedChem* **5**, 618–627 (2010).
38. Iversen, L. F. *et al.* Structure-based Design of a Low Molecular Weight , Nonphosphorus , Nonpeptide , and Highly Selective Inhibitor of Protein-tyrosine Phosphatase 1B. *J. Biol. Chem.* **275**, 10300–10307 (2000).
39. Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridgest, A. J. & Saltiel, A. R. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 7686–7689 (1995).
40. Hare, T. O. *et al.* In vitro Activity of Bcr-Abl Inhibitors AMN107 and BMS-354825 against Clinically Relevant Imatinib-Resistant Abl Kinase Domain Mutants. *Cancer Res.* **65**, 4500–4505 (2005).
41. Seeliger, M. A. *et al.* Equally potent inhibition of c-Src and Abl by compounds that recognize inactive kinase conformations. *Cancer Res.* **69**, 2384–2392 (2009).

42. Vajpai, N. *et al.* Solution conformations and dynamics of ABL kinase-inhibitor complexes determined by NMR substantiate the different binding modes of imatinib/nilotinib and dasatinib. *J. Biol. Chem.* **283**, 18292–18302 (2008).
43. Shah, N. P. *et al.* Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* **2**, 117–125 (2002).
44. Azam, M., Seeliger, M. A., Gray, N. S., Kuriyan, J. & Daley, G. Q. Activation of tyrosine kinases by mutation of the gatekeeper threonine. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 1109–1118 (2008).
45. Yun, C.-H. *et al.* The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 2070–2075 (2008).
46. Scutt, P. J. *et al.* Discovery and exploitation of inhibitor-resistant aurora and polo kinase mutants for the analysis of mitotic networks. *J. Biol. Chem.* **284**, 15880–15893 (2009).
47. Nakanishi, M. *et al.* Identification and characterization of human Wee1B , a new member of the Wee1 family of Cdk-inhibitory kinases. *Genes to Cells* **5**, 839–847 (2000).
48. Davis, M. I. *et al.* Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **29**, 1046–51 (2011).
49. Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A. & Dunphy, W. G. Myt 1: A membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science.* **270**, 86–90 (1995).
50. Russell, P. & Nurse, P. Negative Regulation of Mitosis by *wee1+*, a Gene Encoding a Protein Kinase Homolog. *Cell* **49**, 559–567 (1987).
51. Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402 (1997).
52. Liu, F., Rothblum-Oviatt, C., Ryan, C. E. & Piwnicka-Worms, H. Overproduction of human Myt1 kinase induces a G2 cell cycle delay by interfering with the intracellular trafficking of Cdc2-cyclin B1 complexes. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5113–5123 (1999).
53. Igarashi, M., Nagata, A., Jinno, S., Suto, K. & Okayama, H. Wee1-like gene in human cells. *Nature* **353**, 80–83 (1991).
54. Nowakowski, J. *et al.* Structures of the Cancer-Related Aurora-A , FAK , and EphA2 Protein Kinases from Nanovolume Crystallography. *Structure* **10**, 1659–1667 (2002).

55. Chen, P. *et al.* The 1.7 Å Crystal Structure of Human Cell Cycle Checkpoint Kinase Chk1: Implications for Chk1 Regulation. *Cell* **100**, 681–692 (2000).
56. Watanabe, N., Broome, M. & Hunter, T. Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle. *EMBO J.* **14**, 1878–1891 (1995).
57. Baldin, V. & Ducommun, B. Subcellular localisation of human wee1 kinase is regulated during the cell cycle. *J. Cell Sci.* **108**, 2425–2432 (1995).
58. McGowan, C. H. & Russell, P. Cell cycle regulation of human WEE1. *EMBO J.* **14**, 2166–2175 (1995).
59. Lee, J., Kumagai, A. & Dunphy, W. G. Positive Regulation of Wee1 by Chk1 and 14-3-3 Proteins. *Mol. Biol. Cell* **12**, 551–563 (2001).
60. Squire, C. J., Dickson, J. M., Ivanovic, I. & Baker, E. N. Structure and inhibition of the human cell cycle checkpoint kinase, Wee1A kinase: an atypical tyrosine kinase with a key role in CDK1 regulation. *Structure* **13**, 541–550 (2005).
61. Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. & Nishida, E. Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J. Biol. Chem.* **278**, 25277–25280 (2003).
62. Booher, R. N., Holman, P. S. & Fattaey, A. Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 22300–22306 (1997).
63. Shen, M., Stukenberg, P. T., Kirschner, M. W. & Lu, K. P. The essential mitotic peptidyl-prolyl isomerase Pin1 binds and regulates mitosis-specific phosphoproteins. *Genes Dev.* **12**, 706–720 (1998).
64. Villeneuve, J., Scarpa, M., Ortega-Bellido, M. & Malhotra, V. MEK1 inactivates Myt1 to regulate Golgi membrane fragmentation and mitotic entry in mammalian cells. *EMBO J.* **32**, 72–85 (2013).
65. Schwock, J., Pham, N.-A., Cao, M. P. & Hedley, D. W. Efficacy of Hsp90 inhibition for induction of apoptosis and inhibition of growth in cervical carcinoma cells in vitro and in vivo. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **61**, 669–681 (2008).
66. Chow, J. P. H. & Poon, R. Y. C. The CDK1 inhibitory kinase MYT1 in DNA damage checkpoint recovery. *Oncogene* **32**, 4778–4788 (2013).
67. Schmitz, S. *Der Experimentator Zellkultur*. 13–38 (Spektrum Akademischer Verlag, 2011).
68. Massague, J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* **432**, 298–306 (2004).

69. Mailand, N. *et al.* Rapid Destruction of Human Cdc25A in Response to DNA Damage. *Science*. **288**, 1425–1429 (2000).
70. Bucher, N. & Britten, C. D. G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer. *Br. J. Cancer* **98**, 523–528 (2008).
71. Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. & Elledge, S. J. The p21 Cdk-Interacting Protein Cip1 is a Potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases. *Cell* **75**, 805–816 (1993).
72. Falck, J., Petrini, J. H. J., Williams, B. R., Lukas, J. & Bartek, J. The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways. *Nat. Genet.* **30**, 290–294 (2002).
73. Bartek, J., Lukas, C. & Lukas, J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 792–804 (2004).
74. Xiao, Z. *et al.* Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents. *J. Biol. Chem.* **278**, 21767–21773 (2003).
75. Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P. & Maller, J. Purified Maturation-Promoting Factor Contains the Product of a *Xenopus* Homolog of the Fission Yeast Cell Cycle Control Gene *cdc2* +. *Cell* **54**, 433–439 (1988).
76. Solomon, M. J., Glotzer, M., Lee, T. H., Philippe, M. & Kirschner, M. W. Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* **63**, 1013–1024 (1990).
77. Chae, H.-D., Yun, J., Bang, Y.-J. & Shin, D. Y. Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor is essential for the expression of the cell cycle-regulatory genes and cell cycle G1/S and G2/M transitions. *Oncogene* **23**, 4084–4088 (2004).
78. Laoukili, J. *et al.* FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat. Cell Biol.* **7**, 126–136 (2005).
79. Fung, T. K. & Poon, R. Y. C. A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**, 335–342 (2005).
80. Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M. & Nishida, E. Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *EMBO J.* **17**, 2728–2735 (1998).
81. Acquaviva, C. & Pines, J. The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. *J. Cell Sci.* **119**, 2401–2404 (2006).
82. Solomon, M. J. The function(s) of CAK, the p34cdc2-activating kinase. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 496–500 (1994).

-
83. Russell, P. Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem. Sci.* **23**, 399–402 (1998).
 84. Boutros, R., Dozier, C. & Ducommun, B. The when and wheres of CDC25 phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 185–191 (2006).
 85. Kawabe, T. G2 checkpoint abrogators as anticancer drugs. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 513–519 (2004).
 86. Abraham, R. T. Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* **15**, 2177–2196 (2001).
 87. Gavet, O. & Pines, J. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis. *Dev. Cell* **18**, 533–543 (2010).
 88. Coulonval, K., Kooken, H. & Roger, P. P. Coupling of T161 and T14 phosphorylations protects cyclin B-CDK1 from premature activation. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3971–3985 (2011).
 89. Nilsson, I. & Hoffmann, I. Cell cycle regulation by the Cdc25 phosphatase family. *Prog. Cell Cycle Res.* **4**, 107–114 (2000).
 90. Solomon, M. J., Lee, T. & Kirschner, M. W. Role of Phosphorylation in p34cdc2 Activation: Identification of an Activating Kinase. *Mol. Biol. Cell* **3**, 13–27 (1992).
 91. Nakajima, H. *et al.* Myt1 protein kinase is essential for Golgi and ER assembly during mitotic exit. *J. Cell Biol.* **181**, 89–103 (2008).
 92. Potapova, T. A., Daum, J. R., Byrd, K. S. & Gorbsky, G. J. Fine tuning the cell cycle: activation of the Cdk1 inhibitory phosphorylation pathway during mitotic exit. *Mol. Biol. Cell* **20**, 1737–1748 (2009).
 93. Van Vugt, M. A., Bras, A. & Medema, R. H. Polo-like Kinase-1 Controls Recovery from a G2 DNA Damage-Induced Arrest in Mammalian Cells. *Mol. Cell* **15**, 799–811 (2004).
 94. Watanabe, N. *et al.* M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCF β -TrCP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 4419–4424 (2004).
 95. Kessler, K. J., Blinov, M. L., Elston, T. C., Kaufmann, W. K. & Simpson, D. A. A predictive mathematical model of the DNA damage G2 checkpoint. *J. Theor. Biol.* **320**, 159–169 (2013).
 96. Levine, A. J. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* **88**, 323–331 (1997).

97. Dixon, H. & Norbury, C. J. Therapeutic exploitation of checkpoint defects in cancer cells lacking p53 function. *Cell cycle* **1**, 362–368 (2002).
98. Zhou, B.-B. S. & Bartek, J. Targeting the checkpoint kinases: chemosensitization versus chemoprotection. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 216–225 (2004).
99. Wang, Y. *et al.* Radiosensitization of p53 mutant cells by PD0166285, a novel G(2) checkpoint abrogator. *Cancer Res.* **61**, 8211–8217 (2001).
100. De Witt Hamer, P. C., Mir, S. E., Noske, D., Van Noorden, C. J. F. & Würdinger, T. WEE1 kinase targeting combined with DNA-damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe. *Clin. cancer Res.* **17**, 4200–4207 (2011).
101. Castedo, M. *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. *Oncogene* **23**, 2825–2837 (2004).
102. Castedo, M. *et al.* The cell cycle checkpoint kinase Chk2 is a negative regulator of mitotic catastrophe. *Oncogene* **23**, 4353–4361 (2004).
103. Blagosklonny, M. V. Mitotic arrest and cell fate: Why and how mitotic inhibition of transcription drives mutually exclusive events. *Cell cycle* **6**, 70–74 (2007).
104. Hashimoto, O. *et al.* Cell cycle regulation by the Wee1 inhibitor PD0166285, pyrido [2,3-d] pyrimidine, in the B16 mouse melanoma cell line. *BMC Cancer* **6**, 292 (2006).
105. Tse, A. N., Carvajal, R. & Schwartz, G. K. Targeting checkpoint kinase 1 in cancer therapeutics. *Clin. cancer Res.* **13**, 1955–1960 (2007).
106. Tse, A. N., Sheikh, T. N., Alan, H., Chou, T.-C. & Schwartz, G. K. 90-kDa heat shock protein inhibition abrogates the topoisomerase I poison-induced G2/M checkpoint in p53-null tumor cells by depleting Chk1 and Wee1. *Mol. Pharmacol.* **75**, 124–133 (2009).
107. Hirai, H. *et al.* MK-1775, a small molecule Wee1 inhibitor, enhances antitumor efficacy of various DNA-damaging agents, including 5-fluorouracil. *Cancer Biol. & Therapy* **9**, 514–522 (2010).
108. Caldwell, J. T., Edwards, H., Buck, S. A., Ge, Y. & Taub, J. W. Targeting the Wee1 Kinase for Treatment of Pediatric Down Syndrome Acute Myeloid Leukemia. *Pediatr. Blood Cancer* **61**, 1767–1773 (2014).
109. Tong, Y. *et al.* Pyrimidine-Based Tricyclic Molecules as Potent and Orally Efficacious Inhibitors of Wee1 Kinase. *ACS Med. Chem.* **6**, 58–62 (2014).
110. Wang, Y., Decker, S. J. & Sebolt-Leopold, J. Knockdown of Chk1, Wee1 and Myt1 by RNA interference abrogates G2 checkpoint and induces apoptosis. *Cancer Biol. Ther.* **3**, 305–313 (2004).

111. Klebe, G. *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen (German Edition)*. 88– 150 (Spektrum Akademischer Verlag, 2009).
112. GOLD 5.1. The Cambridge Crystallographic Data Centre. (2013).
113. Jones, G., Willett, P. & Glen, R. C. A genetic algorithm for flexible molecular overlay and pharmacophore elucidation. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **9**, 532–549 (1995).
114. Jones, G., Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R. & Taylor, R. Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *J. Mol. Biol.* **267**, 727–748 (1997).
115. Lipinski, C. A. Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **44**, 235–249 (2001).
116. Lipinski, C. & Hopkins, A. Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature* **432**, 855–861 (2004).
117. Coin, I., Beyermann, M. & Bienert, M. Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nat. Protoc.* **2**, 3247–3256 (2007).
118. Bembenek, M. E. *et al.* A Homogeneous Scintillation Proximity Format for Monitoring the Activity of Recombinant Human Long-Chain-Fatty-Acyl-CoA Synthetase 5. *Assay Drug Dev. Technol.* **2**, 300–307 (2004).
119. Vickers, C. *et al.* Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* **277**, 14838–14843 (2002).
120. Humbeck, L. Optimierung der Expression und Aufreinigung der humanen Myt1-Kinase in Volllänge im E. coli -Expressionssystem. 1– 59 (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2014).
121. Rohe, A. Investigations on the Human Myt1 Kinase: Substrate Studies , Assay Development and Inhibitor Screening Alexander Rohe. (Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, 2013).
122. Lottspeich, F. *Bioanalytik*. 243– 268 (Springer-Verlag, 2012).
123. Rohe, A. *et al.* In vitro and in silico studies on substrate recognition and acceptance of human PKMYT1, a Cdk1 inhibitory kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 1219–1223 (2012).
124. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).

125. Bradford, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
126. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent by. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
127. Smith, P. K. . *et al.* Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76–85 (1985).
128. GraphPad Prism 5.01. GraphPad Software. (2007).
129. Dean, R. B. & Dixon, W. J. Simplified Statistics for Small Numbers of Observations. *Anal. Chem.* **23**, 636–638 (1951).
130. Grubbs, F. E. & Beck, G. Extension of sample sizes and percentage points for significance test of outlying observations. *Technometrics* **14**, 847–854 (1972).
131. Iversen, P. W., Eastwood, B. J., Sittampalam, G. S. & Cox, K. L. A comparison of assay performance measures in screening assays: signal window, Z' factor, and assay variability ratio. *J. Biomol. Screen.* **11**, 247–252 (2006).
132. Weber, G. Polarization of the Fluorescence of Macromolecules. 2. Fluorescent conjugates of ovalbumin and bovine serum albumin. *Biochem. J.* **51**, 155– 167 (1952).
133. Perrin, F. Polarisation de la lumière de fluorescence. Vie moyenne de molécules dans l'état excité. *J. Phys Radium* **7**, 390–401 (1926).
134. Jameson, D. M. & Ross, J. A. Fluorescence Polarisation/Anisotropy in Diagnostics and Imaging. *Chem Rev* **110**, 2685–2708 (2010).
135. Wu, G. *Assay Development - Fundamentals and Practices*. 27– 68 (John Wiley & Sons, Inc., 2010).
136. Lokowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 364 (Springer-Verlag, 2006).
137. Henze, C. Entwicklung biochemischer Assays auf Grundlage der Fluoreszenzpolarisation am Beispiel der humanen Myt1-Kinase. (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2013).
138. Azumi, T. & McGlynn, S. P. Polarization of the Luminescence of Phenanthrene. *J. Chem. Phys.* **37**, 2413–2420 (1962).
139. Rohe, A., Henze, C., Erdmann, F., Sippl, W. & Schmidt, M. A fluorescence anisotropy-based Myt1 kinase binding assay. *Assay Drug Dev. Technol.* **12**, 136–144 (2014).

140. Zhang, R. *et al.* Fluorescence polarization assay and inhibitor design for MDM2/p53 interaction. *Anal. Biochem.* **331**, 138–146 (2004).
141. Wang, Z.-X. An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule. *FEBS Lett.* **360**, 111–114 (1995).
142. Duhr, S. & Braun, D. Why molecules move along a temperature gradient. *PNAS* **103**, 19678–19682 (2006).
143. Jerabeck-Willemsen, M., Wienken, C. J., Braun, D., Baaske, P. & Duhr, S. Molecular Interaction Studies Using Microscale Thermophoresis. *Assay Drug Dev. Technol.* **9**, 342–353 (2011).
144. Wienken, C. J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D. & Duhr, S. Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat. Commun.* **1**, 1–7 (2010).
145. Verdonk, M. L. *et al.* Virtual Screening Using Protein - Ligand Docking: Avoiding Artificial Enrichment. *J chem inf Comput sci* **44**, 793–806 (2004).
146. Wolber, G. & Langer, T. LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **45**, 160–169 (2005).
147. LigandScout 4.0. Inte:Ligand, Software-Entwicklungs und Consulting GmbH. (2014).
148. Rohe, A. *et al.* Evaluation of potential Myt1 kinase inhibitors by TR-FRET based binding assay. *Eur. J. Med. Chem.* **61**, 41–48 (2013).
149. Rohe, A. Untersuchungen zur humanen Myt1-Kinase - Assayentwicklung und Enzympräparation. (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, 2011).
150. Thomas, J. G., Ayling, A. & Baneyx, F. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **66**, 197–238 (1997).
151. Sodoyer, R. Expression Systems for the Production of Recombinant Pharmaceutical. *BioDrugs* **18**, 51–62 (2004).
152. Bäßler, C. Etablierung der humanen Myt1 Kinase als Zielstruktur der modernen Arzneistoffentwicklung: Beiträge zu Expression und Assayentwicklung. (Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, 2011).
153. Wu, G. *Assay Development - Fundamentals and Practices*. 1–7 (John Wiley & Sons, Inc., 2010).

154. Von Ahsen, O. & Bömer, U. High-throughput screening for kinase inhibitors. *Chembiochem* **6**, 481–490 (2005).
155. Copeland, R. A. Mechanistic considerations in high-throughput screening. *Anal. Biochem.* **320**, 1–12 (2003).
156. Wu, G. *Assay Development - Fundamentals and Practices*. 181–212 (John Wiley & Sons, Inc., 2010).
157. Rohe, A. *et al.* Identification of peptidic substrates for the human kinase Myt1 using peptide microarrays. *Bioorg. Med. Chem.* **23**, 4936–4942 (2015).
158. Kristjánisdóttir, K. & Rudolph, J. A fluorescence polarization assay for native protein substrates of kinases. *Anal. Biochem.* **316**, 41–49 (2003).
159. Rohe, A., Goellner, C., Erdmann, F., Sippl, W. & Schmidt, M. The glycoacylphospholipid 1,2-dipalmitoyl-3-(N-palmitoyl-6'-amino-6'-deoxy- α -D-glucosyl)-sn-glycerol is no inhibitor of the human Myt1 kinase. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **30**, 514–517 (2015).
160. Bisswanger, H. *Practical Enzymology*. 5–91 (Wiley-VCH, 2011).
161. Lottspeich, F. & Engels, J. W. *Bioanalytik*. 47–57 (Springer-Verlag, 2012).
162. Copeland, R. A. *Enzymes - a practical introduction to structure, mechanism and data analysis*. 121–185 (VCH Verlagsgesellschaft, 1996).
163. Simeonov, A., Bi, X. & Nikiforov, T. T. Enzyme assays by fluorescence polarization in the presence of polyarginine: study of kinase, phosphatase, and protease reactions. *Anal. Biochem.* **304**, 193–199 (2002).
164. Coffin, J., Latev, M., Bi, X. & Nikiforov, T. T. Detection of phosphopeptides by fluorescence polarization in the presence of cationic polyamino acids: application to kinase assays. *Anal. Biochem.* **278**, 206–212 (2000).
165. Tiller, G. E., Mueller, T. J., Dockter, M. E. & Struve, W. G. Hydrogenation of Triton X-100 Eliminates Its Fluorescence and Ultraviolet Light Absorption while Preserving Its Detergent Properties. *Anal. Biochem.* **141**, 262–266 (1984).
166. Li, H. *et al.* The effect of triton concentration on the activity of undecaprenyl pyrophosphate synthase inhibitors. *J. Biomol. Screen.* **8**, 712–715 (2003).
167. Simard, J. R., Plant, M., Emkey, R. & Yu, V. Development and implementation of a high-throughput AlphaLISA assay for identifying inhibitors of EZH2 methyltransferase. *Assay Drug Dev. Technol.* **11**, 152–162 (2013).
168. Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*. 273–280 (Wiley-VCH, 2012).

169. Glickman, J. F. Assay Development for Protein Kinase Enzymes. *Pract. Guid. to Assay Dev. High-Throughput Screen. Drug Discov.* 1–24 (2010).
170. Michaelis, L. . & Menten, M. L. Kinetics of Invertase Action. *Biochem. Z.* **49**, 333–369 (1913).
171. Wu, G. *Assay Development - Fundamentals and Practices.* 69–104 (John Wiley & Sons, Inc., 2010).
172. Kitagawa, D. *et al.* Activity-based kinase profiling of approved tyrosine kinase inhibitors. *Genes to cells* **18**, 110–22 (2013).
173. Wells, N. J. *et al.* The C-terminal domain of the Cdc2 inhibitory kinase Myt1 interacts with Cdc2 complexes and is required for inhibition of G(2)/M progression. *J. Cell Sci.* **112**, 3361–3371 (1999).
174. Imamura, H. *et al.* Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15651–15656 (2009).
175. Horiuchi, K. Y., Scherle, P. A., Trzaskos, J. M. & Copeland, R. A. Competitive Inhibition of MAP Kinase Activation by a Peptide Representing the a C Helix of ERK. *Biochemistry* **37**, 8879–8885 (1998).
176. Schindler, J. F. *et al.* Examination of the kinetic mechanism of mitogen-activated protein kinase activated protein kinase-2. *Biochim. Biophys. Acta* **1598**, 88–97 (2002).
177. Gandy, S., Czernik, A. J. & Greengard, P. Phosphorylation of Alzheimer disease amyloid precursor peptide by protein kinase C and Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 6218–6221 (1988).
178. Figuera-Losada, M. & LoGrasso, P. V. Enzyme kinetics and interaction studies for human JNK1 β 1 and substrates activating transcription factor 2 (ATF2) and c-Jun N-terminal kinase (c-Jun). *J. Biol. Chem.* **287**, 13291–13302 (2012).
179. Zhang, Y.-Y., Mei, Z.-Q., Wu, J.-W. & Wang, Z.-X. Enzymatic activity and substrate specificity of mitogen-activated protein kinase p38 α in different phosphorylation states. *J. Biol. Chem.* **283**, 26591–26601 (2008).
180. Cheng, Yung-Chi , Prusoff, W. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099–3108 (1973).
181. Wichapong, K. *et al.* Application of docking and QM/MM-GBSA rescoring to screen for novel Myt1 kinase inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 881–893 (2014).

182. Davis, M. I. *et al.* Comprehensive analysis of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **29**, 1046–1051 (2011).
183. Zhang, C., Habets, G. & Bollag, G. Interrogating the kinome. *Nat. Biotechnol.* **29**, 981–983 (2011).
184. Bamborough, P., Drewry, D., Harper, G., Smith, G. K. & Schneider, K. Assessment of chemical coverage of kinome space and its implications for kinase drug discovery. *J. Med. Chem.* **51**, 7898–7914 (2008).
185. Friesner, R. A., Banks, J. L. & Murphy, R. B. Glide 5.5. Schrödinger, LLC. (2004).
186. MOE 2014. Chemical Computing Group. (2014).
187. Anastassiadis, T., Deacon, S. W., Devarajan, K., Ma, H. & Peterson, J. R. Comprehensive assay of kinase catalytic activity reveals features of kinase inhibitor selectivity. *Nat. Biotechnol.* **29**, 1039–1045 (2011).
188. Wu, D. *et al.* A solid-phase Bcr-Abl kinase assay in 96-well hydrogel plates. *Anal. Biochem.* **375**, 18–26 (2008).
189. Wang, Y. *et al.* PubChem's BioAssay Database. *Nucleic Acids Res.* **40**, D400–412 (2012).
190. Klutchko, S. R. *et al.* 2-Substituted Aminopyrido[2,3-d]pyrimidin-7(8H)-ones. Structure-Activity Relationships Against Selected Tyrosine Kinases and in Vitro and in Vivo Anticancer Activity. *J. Med. Chem.* **41**, 3276–3292 (1998).
191. Kraker, A. J. *et al.* Biochemical and cellular effects of c-Src kinase-selective pyrido[2,3-d]pyrimidine tyrosine kinase inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* **60**, 885–898 (2000).
192. Noronha, G. *et al.* Discovery of [7-(2,6-dichlorophenyl)-5-methylbenzo [1,2,4]triazin-3-yl]-[4-(2-pyrrolidin-1-ylethoxy)phenyl]amine-a potent, orally active Src kinase inhibitor with anti-tumor activity in preclinical assays. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 602–608 (2007).
193. Cao, J. *et al.* The design and preliminary structure-activity relationship studies of benzotriazines as potent inhibitors of Abl and Abl-T315I enzymes. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 5812–5818 (2007).
194. Tavares, F. X. *et al.* N -Phenyl-4-pyrazolo [1,5-b] pyridazin-3-ylpyrimidin-2-amines as Potent and Selective Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase 3 with Good Cellular Efficacy. *J. Med. Chem.* **47**, 4716–4730 (2004).

195. Trapp, J. *et al.* Adenosine Mimetics as Inhibitors of NAD⁺-Dependent Histone Deacetylases, from Kinase to Sirtuin Inhibition. *J. Med. Chem.* **49**, 7307–7316 (2006).
196. North, B. J. & Verdin, E. Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol.* **5**, 224 (2004).
197. Elkins, J. M. *et al.* Comprehensive characterization of the Published Kinase Inhibitor Set. *Nat. Biotechnol.* (2015). doi:10.1038/nbt.3374
198. Fedorov, O., Müller, S. & Knapp, S. The (un)targeted cancer kinome. *Nat. Chem. Biol.* **6**, 166–169 (2010).
199. Christopher, J. A. *et al.* The discovery of 2-amino-3,5-diarylbenzamide inhibitors of IKK-alpha and IKK-beta kinases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 3972–3977 (2007).
200. Bamborough, P. *et al.* N-4-Pyrimidinyl-1H-indazol-4-amine inhibitors of Lck: indazoles as phenol isosteres with improved pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 4363–4368 (2007).
201. McDonald, O. *et al.* Aza-stilbenes as potent and selective c-RAF inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **16**, 5378–5383 (2006).
202. Graham Robinett, R., Freemerman, A. J., Skinner, M. A., Shewchuk, L. & Lackey, K. The discovery of substituted 4-(3-hydroxyanilino)-quinolines as potent RET kinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 5886–5893 (2007).
203. Jeffrey, M. *et al.* Anthranilamide inhibitors of aurora kinase and their preparation, pharmaceutical compositions and use in the treatment of cancer. (2008).
204. Zhang, L. *et al.* Characterization of the Novel Broad-Spectrum Kinase Inhibitor CTx-0294885 As an Affinity Reagent for Mass Spectrometry-Based Kinome Profiling. *J. Proteome Res.* **12**, 3104–3116 (2013).
205. Gamo, F.-J. *et al.* Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* **465**, 305–310 (2010).
206. Sammond, D. M. *et al.* Discovery of a novel and potent series of dianilinopyrimidineurea and urea isostere inhibitors of VEGFR2 tyrosine kinase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 3519–3523 (2005).
207. Fedorov, O., Niesen, F. H. & Knapp, S. Kinase Inhibitor Selectivity Profiling using Differential Scanning Fluorimetry. *Methods Mol. Biol.* **795**, 109–118 (2012).

8 Anhang

Übersicht der getesteten Verbindungen

Myt1_dye

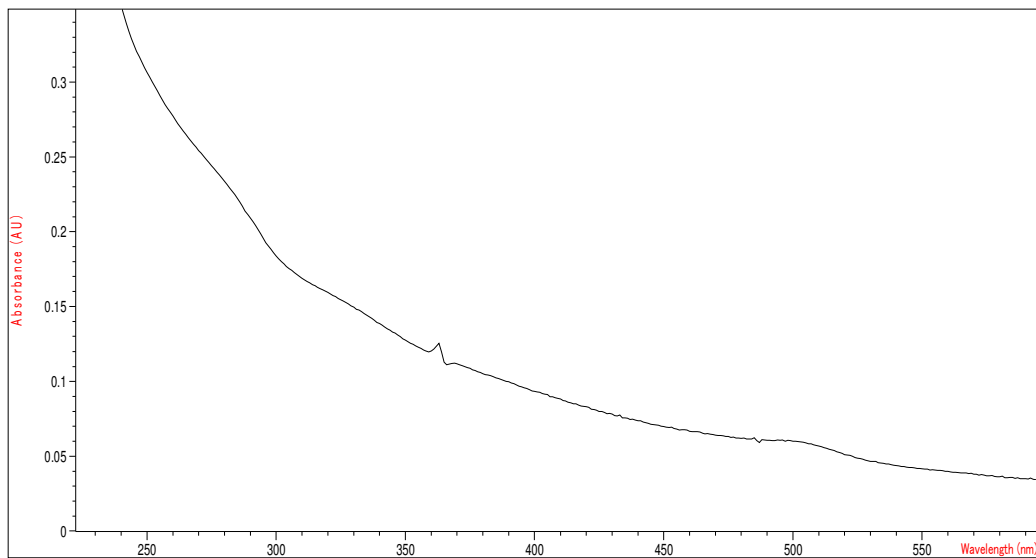


Abbildung 8.1: UV-Vis Spekturm von Myt1_dye

PKIS-I

GI261520A	GSK1220512A	GSK204925A
GI98581X	GSK1392956A	GSK2110236A
GR105659X	GSK1511931A	GSK2186269A
GR269666A	GSK1713088A	GSK2213727A
GSK1007102A	GSK1751853A	GSK2219385A
GSK1023156A	GSK180736A	GSK2220400A
GSK1030058A	GSK1819799A	GSK237700A
GSK1030059A	GSK182497A	GSK237701A
GSK1030061A	GSK192082A	GSK238583A
GSK1030062A	GSK200398A	GSK248233B

GSK269962B	GW280670X	GW445012X
GSK270822A	GW282449A	GW445015X
GSK299115A	GW282536X	GW445017X
GSK300014A	GW282974X	GW450241X
GSK312948A	GW284372X	GW458344A
GSK317354A	GW284408X	GW458787B
GSK3206866A	GW290597X	GW459057A
GSK326090A	GW296115X	GW461104B
GSK466314A	GW297361X	GW513184X
GSK466317A	GW300653X	GW549034X
GSK561866B	GW300657X	GW549390X
GSK571989A	GW300660X	GW559768X
GSK579289A	GW301784X	GW561436X
GSK586581A	GW301789X	GW566221B
GSK605714A	GW301888X	GW567808A
GSK614526A	GW305074X	GW568326X
GSK619487A	GW305178X	GW568377B
GSK620503A	GW335962X	GW569293E
GSK625137A	GW352430A	GW569530A
GSK711701A	GW405841X	GW572401X
GSK718429A	GW406108X	GW572738X
GSK938890A	GW406731X	GW574782A
GSK943949A	GW407323A	GW574783B
GSK949675A	GW416469X	GW575533A
GSK953913A	GW416981X	GW575808A
GSK969786A	GW427984X	GW576609B
GSK978744A	GW429374A	GW576924A
GSK980961A	GW432441X	GW577921A
GSK994854A	GW434756X	GW578748X
GW275616X	GW435821X	GW580496A
GW275944X	GW439255X	GW580509X
GW276655X	GW441756X	GW581744X
GW278681X	GW441806A	GW583373A
GW279320X	GW442130X	GW589933X

GW589961A	GW684626B	GW785974X
GW607049A	GW693481X	GW786460X
GW607117X	GW693917X	GW795486X
GW612286X	GW694234A	GW796920X
GW615311X	GW694590A	GW796921X
GW616030X	GW695874X	GW799251X
GW618013X	GW700494A	GW801372X
GW620972X	GW701427A	GW804482X
GW621431X	GW703087X	GW805758X
GW621823A	GW708336X	GW806290X
GW621970X	GW708893X	GW806776X
GW622055X	GW709042A	GW807982X
GW627834B	GW711782X	GW809885X
GW631581B	GW743024X	GW809897X
GW632046X	GW759710A	GW810372X
GW632580X	GW768505X	GW810576X
GW641155B	GW769076X	GW811168X
GW642125X	GW770220A	GW811761X
GW642138X	GW770249A	GW813360X
GW643971X	GW771127A	GW814408X
GW644007X	GW775608X	GW817394X
GW651576X	GW778894X	GW817396X
GW654652X	GW779439X	GW819077X
GW659386A	GW780056X	GW819230X
GW659893X	GW780159X	GW820759X
GW673715X	GW781673X	GW824645A
GW678313X	GW782612X	GW827102X
GW679410X	GW782907X	GW827105X
GW680191X	GW782912X	GW827106X
GW680908A	GW784307A	GW827396X
GW680975X	GW784684X	GW828525X
GW682841X	GW784752X	GW829055X
GW683134A	GW785404X	GW829874X
GW683768X	GW785804X	GW829877X

GW830263A	SB-254169	SB-732941
GW830365A	SB-264865	SB-734117
GW830900A	SB-264866	SB-735465
GW831090X	SB-278538	SB-735467
GW831091X	SB-278539	SB-736290
GW832467X	SB-284847-BT	SB-736302
GW837331X	SB-285234-W	SB-737198
GW843682X	SB-333612	SB-738482
GW846105X	SB-347804	SB-738561
GW852849X	SB-358518	SB-739245-AC
GW853606X	SB-360741	SB-739452
GW853609X	SB-361058	SB-741905
GW856804X	SB-376719	SB-742864
GW869810X	SB-390523	SB-742865
GW876790X	SB-390527	SB-743899
SB-210313	SB-400868-A	SB-744941
SB-216385	SB-409513	SB-750140
SB-220025-R	SB-409514	SB-751148
SB-220455	SB-431533	SB-751399
SB-221466	SB-431542-A	SB-759335-B
SB-223133	SB-437013	SB-772077-B
SB-226879	SB-476429-A	SB-814597
SB-236687	SB-590885-AAE	SKF-62604
SB-239272	SB-610251-B	SKF-86002
SB-242717	SB-614067-R	SKF-86055
SB-242718	SB-633825	
SB-242719	SB-675259-M	
SB-242721	SB-682330-A	
SB-245392	SB-686709-A	
SB-250715	SB-693162	
SB-251505	SB-698596-AC	
SB-251527	SB-707548-A	
SB-253226	SB-711237	
SB-253228	SB-732881	

PKIS-II

AH2635	GSK1379720A	GSK1379874A
AH5015X	GSK1379721A	GSK1379878A
GI230329A	GSK1379722A	GSK1379879A
GI261590A	GSK1379723A	GSK1379880A
GI261656A	GSK1379724A	GSK1379882A
GI262866A	GSK1379725A	GSK1379883A
GI98581X	GSK1379727A	GSK1379896A
GSK1014915A	GSK1379729A	GSK1379899A
GSK1024304A	GSK1379730A	GSK1379901A
GSK1024306A	GSK1379732A	GSK1379944A
GSK1033723A	GSK1379735A	GSK1383280A
GSK1034945A	GSK1379737A	GSK1383281A
GSK1122999D	GSK1379738A	GSK1398460A
GSK1229496A	GSK1379741A	GSK1398463A
GSK1229782A	GSK1379742A	GSK1398467A
GSK1229959A	GSK1379745A	GSK1398468A
GSK1269851A	GSK1379746A	GSK1398470A
GSK1287544A	GSK1379748A	GSK1398471A
GSK1307810A	GSK1379751A	GSK1398472A
GSK1321561A	GSK1379753A	GSK1398473A
GSK1321565A	GSK1379754A	GSK1398474A
GSK1323434A	GSK1379757A	GSK1398475A
GSK1325775A	GSK1379760A	GSK1398477A
GSK1326180A	GSK1379761A	GSK1440913A
GSK1379706A	GSK1379763A	GSK1487252A
GSK1379708A	GSK1379765A	GSK1520489A
GSK1379710A	GSK1379766A	GSK1535721A
GSK1379712A	GSK1379767A	GSK1558669A
GSK1379713A	GSK1379788A	GSK1576028A
GSK1379714A	GSK1379800A	GSK1581427A
GSK1379715A	GSK1379812A	GSK1581428A
GSK1379716A	GSK1379825A	GSK1627798A
GSK1379717A	GSK1379860A	GSK1645872A

GSK1645895A	GSK2258759A	GSK2592465A
GSK1649598A	GSK2269905A	GSK2593067A
GSK1653537A	GSK2283293A	GSK2593074A
GSK1653539A	GSK2286062A	GSK260205C
GSK1660437A	GSK2286096A	GSK2603346A
GSK1669917A	GSK2286295A	GSK2603358A
GSK1669921A	GSK2286775B	GSK2606414A
GSK1723980B	GSK2288359A	GSK2606590A
GSK175726A	GSK2289044A	GSK2608885A
GSK1804250A	GSK2291363A	GSK2608899A
GSK189015A	GSK2297099A	GSK2634140A
GSK190937A	GSK2297428A	GSK2634758A
GSK1917008A	GSK2297430A	GSK2635225A
GSK198271A	GSK2297542A	GSK2645446A
GSK2008607A	GSK2297543A	GSK292658A
GSK204559A	GSK2298859A	GSK299495A
GSK204607A	GSK2299009A	GSK301329A
GSK204919A	GSK2306394A	GSK301362A
GSK205189A	GSK2333389A	GSK312879A
GSK2137462A	GSK2334006A	GSK323521A
GSK2177277A	GSK2336394A	GSK323543A
GSK2181306A	GSK2342769A	GSK326180A
GSK2188764A	GSK2344444A	GSK327238A
GSK2189892A	GSK2347225A	GSK336313A
GSK2192730A	GSK2358994A	GSK336735A
GSK2193613A	GSK2363608B	GSK346294A
GSK2197149A	GSK2373690A	GSK357952A
GSK2206003A	GSK2373693A	GSK361061A
GSK2219329A	GSK2373723A	GSK361065A
GSK2221681A	GSK2375584A	GSK364507A
GSK2224810A	GSK2376236A	GSK398099A
GSK2225749A	GSK2576924A	GSK429286A
GSK2228768A	GSK257997A	GSK448459A
GSK223675A	GSK2587663A	GSK479719A

GSK483724A	GW457859A	GW595885X
GSK507274A	GW461484A	GW599550X
GSK507358A	GW461487A	GW608005X
GSK534911A	GW468513X	GW621581X
GSK534913A	GW475620X	GW622475X
GSK562689A	GW482059X	GW630813X
GSK580432A	GW493036X	GW635815X
GSK581271A	GW494601A	GW639905A
GSK641502A	GW494610A	GW654607A
GSK683281A	GW494702A	GW659008A
GSK846226A	GW497681X	GW659009A
GSK902056A	GW514784X	GW659386A
GSK955403A	GW515532X	GW663929X
GSK977617A	GW525701A	GW664114X
GSK977620A	GW551191X	GW679395X
GSK986310C	GW552771X	GW679396X
GSK993273A	GW554060X	GW679662X
GW271431X	GW557777X	GW680061X
GW272142A	GW560106X	GW680338X
GW273749A	GW560109X	GW680903X
GW275568A	GW560116X	GW681170A
GW281179X	GW560459X	GW681251X
GW282450A	GW567142A	GW682569X
GW284543A	GW567143X	GW683134A
GW320571X	GW567145X	GW684083X
GW345098X	GW567148X	GW684374X
GW407034X	GW569716A	GW684941X
GW412617A	GW574783B	GW689066X
GW424170A	GW576604X	GW692089A
GW440132A	GW578342X	GW693542X
GW440137A	GW579362A	GW694077X
GW440138A	GW582764A	GW696155X
GW440146A	GW582868A	GW697465A
GW440148A	GW583340C	GW697999A

GW701424A	GW839464X	SB-236560
GW702865X	GW854278X	SB-238039
GW709213X	GW855857X	SB-245391
GW767488X	GW856795X	SB-249175
GW768504A	GW856805X	SB-282852
GW775604X	GW857175X	SB-282975-A
GW775610X	GW867253X	SB-284851-BT
GW777257X	GW867587X	SB-284852-BT
GW779439X	GW867588X	SB-317651
GW781483X	GW868318X	SB-317658
GW787226A	GW869516X	SB-317661
GW789449X	GW869640X	SB-326892
GW792479X	GW869641X	SB-331032
GW809893X	GW869979X	SB-333613
GW810083X	GW872411X	SB-334860
GW810445X	GW873004X	SB-334865
GW810578X	GW876019X	SB-341528
GW812171X	GW876731X	SB-342409
GW813244A	SB-202620	SB-342411
GW813349X	SB-210486	SB-360737
GW818933X	SB-211742	SB-373598
GW818941X	SB-211743	SB-376715
GW819776X	SB-213663	SB-381891
GW823670X	SB-217146-A	SB-381904
GW824645A	SB-217360	SB-386023-A
GW827654A	SB-217780	SB-390526
GW828205X	SB-219952	SB-390530
GW828206X	SB-219980	SB-390532
GW829058X	SB-222516	SB-390534
GW829116X	SB-222517	SB-390766
GW829350X	SB-222903	SB-390767
GW829351X	SB-223132	SB-390769
GW830707A	SB-226605	SB-390770
GW830899A	SB-229482	SB-390771

SB-404290	SB-711239	SB-743341
SB-404321	SB-711805	SB-747651-A
SB-405367	SB-711880	SKF-104365
SB-408010	SB-731254-M	SKF-105561
SB-428218-A	SB-731579	SKF-105942
SB-477794-R	SB-732932	SKF-106164-A2
SB-517081	SB-733371	SKF-12778
SB-517389	SB-733416	SKF-18267
SB-589132	SB-733887	SKF-18355
SB-601273	SB-733894	SKF-31736
SB-610250	SB-734909	SKF-96418
SB-625086-M	SB-735297	SKF-97184
SB-627772-A	SB-735464	SKF-97236
SB-642057	SB-736398	SKF-97255
SB-642124-AAA	SB-736715	SKF-97263
SB-660566	SB-737447	SKF-97293
SB-684387-B	SB-737856	SKF-97359
SB-693578	SB-738004	SKF-97416
SB-707548-A	SB-738481	SKF-97510
SB-708998	SB-742034-AC	SKF-97560
SB-708999	SB-742251	SKF-97620
SB-710363	SB-742352-AC	SKF-97623
SB-710397-B	SB-742609	

Princeton Verbindungen

OSSK_014373	OSSK_310299	OSSK_363499
OSSK_017079	OSSK_310519	OSSK_365038
OSSK_117187	OSSK_312542	OSSK_373794
OSSK_206176	OSSK_321995	OSSK_382260
OSSK_221646	OSSK_337337	OSSK_401049
OSSK_222160	OSSK_342532	OSSK_411357
OSSK_280440	OSSK_348280	OSSK_444680
OSSK_285614	OSSK_359892	OSSK_444962
OSSK_309393	OSSK_362013	OSSK_461874

OSSK_462171	OSSK_676965	OSSK_986895
OSSK_471247	OSSK_701030	OSSK_987000
OSSK_476501	OSSK_705736	OSSK_990343
OSSK_478639	OSSK_705741	OSSK_998596
OSSK_511579	OSSK_705764	OSSK_999387
OSSK_514818	OSSK_705953	OSSK_999416
OSSK_515461	OSSK_706267	OSSL_001450
OSSK_515470	OSSK_711203	OSSL_001504
OSSK_531891	OSSK_711274	OSSL_005411
OSSK_537984	OSSK_715319	OSSL_009878
OSSK_538452	OSSK_715600	OSSL_041990
OSSK_540886	OSSK_763561	OSSL_075801
OSSK_541143	OSSK_763562	OSSL_105797
OSSK_544893	OSSK_763564	OSSL_107889
OSSK_548533	OSSK_763565	OSSL_112932
OSSK_567109	OSSK_763567	OSSL_117187
OSSK_587192	OSSK_766725	OSSL_117188
OSSK_587243	OSSK_766798	OSSL_117189
OSSK_595686	OSSK_766799	OSSL_117344
OSSK_627999	OSSK_766801	OSSL_125753
OSSK_628043	OSSK_766803	OSSL_256190
OSSK_628968	OSSK_776865	OSSL_259882
OSSK_629133	OSSK_776970	OSSL_261287
OSSK_641660	OSSK_785363	OSSL_266012
OSSK_642165	OSSK_818973	OSSL_266644
OSSK_660153	OSSK_842202	OSSL_280987
OSSK_660579	OSSK_854972	OSSL_294309
OSSK_671324	OSSK_921836	OSSL_308099
OSSK_671345	OSSK_978369	OSSL_309945
OSSK_671780	OSSK_980849	OSSL_318655
OSSK_671785	OSSK_980909	
OSSK_671862	OSSK_984008	
OSSK_675962	OSSK_986871	
OSSK_675976	OSSK_986894	

Standardkinaseinhibitoren

Axitinib

AZD4547

Canertinib

Crizotinib

MK-1775

PD173074

Tozasertib

9 Abstract/ Zusammenfassung

Abstract

As a member of the Wee-kinase family Myt1 kinase is involved in G₂/M checkpoint regulation of the cell cycle. Recently, a peptide microarray approach led to the identification of a short-chain peptide EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ as substrate of Myt1 kinase, which allowed for subsequent development of a fluorescence polarization based activity assay. The developed Myt1 activity assay was used to investigate the influence of external factors and to characterize the Myt1 catalyzed phosphorylation of EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹. For the first time the kinetic parameters K_m , $K_{m,ATP}$ and v_{max} were determined. Additionally 932 compounds from different databases and the published protein kinase inhibitor sets (PKIS I and II), a set of small molecule ATP-competitive kinase inhibitors, were screened. So ten new Myt1 inhibitors were identified, providing three new scaffolds and allowed the first definition of structure-activity relationships for Myt1 inhibitors. The derived results provide the basis for further investigating the molecular mechanism of Myt1, the characterization of new enzyme inhibitors and lead structure optimization.

Zusammenfassung

Als ein Mitglied der Wee-Kinasefamilie ist die Myt1-Kinase bei der Regulation des G₂/M Checkpoints im Zellzyklus beteiligt. Zu Beginn dieser Arbeit wurde mit Hilfe eines Microarrays das kurzkettige Peptid EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ als Myt1-Substrat identifiziert, welches die Entwicklung eines fluoreszenzpolarisationsbasiertem Aktivitätsassays ermöglichte. Während der Entwicklung wurde der Einfluss von verschiedenen externen Faktoren untersucht und die Myt1 vermittelte Phosphorylierung von EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ charakterisiert. Zum erstem Mal konnten die kinetischen Parameter K_m , $K_{m,ATP}$ und v_{max} bestimmt werden. Außerdem wurden 932 Verbindungen aus verschiedenen Datenbanken und dem PKIS I und II, welches ATP-kompetitive Kinaseinhibitoren beinhaltet, an der Myt1 getestet. So konnten zehn neue Myt1-Inhibitoren identifiziert werden, die drei neue Grundgerüste aufweisen und die erste Definition von Struktur-Wirkungsbeziehungen ermöglichten. Die erhaltenen Ergebnisse liefern die Basis für zukünftige Untersuchungen von molekularen Mechanismen der Myt1-Kinase, der Charakterisierung von neuen Inhibitoren und der Optimierung von Leitstrukturen.

10 Danksagung

„Verschiebe die Dankbarkeit nie“, ein wunderbarer Gedanke des Dichters Friedrich von Schiller. Ich möchte diese letzten Seiten nutzen um genau jenes zu tun, Danke sagen. Ein kurzes Praktikum im 3. Studienjahr hat mich in die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Sippl eingeführt und mein Interesse an dessen Arbeit geweckt. Dass ich dann auch die Möglichkeit erhalten habe unter seiner Leitung zu promovieren, war Basis für diese Arbeit. Aber erst die Unterstützung durch die ganze Arbeitsgruppe sowohl menschlich als auch fachlich, hat diese Promotionsarbeit ermöglicht. An dieser Stelle möchte ich mich daher bei all jenen bedanken, die mich während meiner Promotionszeit im Rahmen der universitären Arbeit so tatkräftig unterstützt haben.

Neben Herrn Professor Sippl als Institutsdirektor gilt mein besonderer Dank im Einzelnen Herrn Dr. Matthias Schmidt für die direkte Betreuung dieser Arbeit. Die zahlreichen geführten fachlichen Diskussionen und Hinweise haben mir oft neue Perspektiven und Denkanstöße geliefert. Das angenehme Arbeitsklima innerhalb der Arbeitsgruppe hat dazu beigetragen, dass ein manchmal trüb beginnender Arbeitstag zufrieden endete.

Weiterhin gilt mein aufrichtiger Dank Dr. Frank Erdmann, der mich bei meiner biochemische Arbeit tatkräftig unterstützt hat. Die Generierung von Myt1-haltigen Zellpellets, die Grundlage für viele meiner praktischen Arbeitsschritte waren, wäre ohne seine Unterstützung nicht so ohne Weiteres möglich gewesen.

Den Arbeitsgruppen von Frau Prof Dr. Sinz und Herrn Prof. Dr. Imming sowie Herrn Prof. Dr. Hinderberger möchte ich für die Unterstützung hinsichtlich ihres Beitrags zur Datenauswertung meiner experimentellen Ergebnisse und der freundlichen Kooperation bezüglich der Nutzung von mir benötigter Laborgeräte danken.

Neben der universitären und fachlichen Unterstützung durch Mentoren und Kollegen ist auch die Unterstützung durch meine Familie und Freunde ein wichtiger Grundpfeiler auf dem diese Arbeit basiert. Allen voran meinen Eltern und meinem Ehemann, die mir den Rücken

gestärkt haben. Ebenso gilt meine Dankbarkeit dem Lektorenkollektiv Dr. Alexander Rohe, Maria Bachmann und Nico Fiebig für Ihre fachlichen Anmerkungen und Verbesserungsvorschläge.

Auch ein großer Dank an all diejenigen, die zwar keine namentliche Erwähnung finden, trotzdem für das Gelingen dieser Arbeit unverzichtbar waren.

Danke!

11 Publikationen

Veröffentlichungen mit Fachbegutachtung (peer-review):

K. Wichapong, A. Rohe, C. Platzer, I. Slyngo, F. Erdmann, M. Schmidt, W. Sippl
Application of Docking and QM/MM-GBSA Rescoring to Identify Novel Myt1 Kinase Inhibitors. *J. Chem. Inf. Model.* 54, 881-893, 2014

A. Rohe, C. Platzer, A. Masch, S. Greiner, C. Henze, C. Ihling, F. Erdmann, M. Schutkowski, W. Sippl, M. Schmidt. Identification of peptidic substrates for the human kinase Myt1 using peptide microarrays. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 4936-4942, 2015.

Weiter Originalarbeiten sind in Vorbereitung.

Poster auf wissenschaftlichen Konferenzen:

A. Rohe, C. Henze, C. Platzer, F. Erdmann, W. Sippl, M. Schmidt. A fluorescence anisotropy based Myt1 kinase binding assay. *DPhG Annual Meeting 2013*, 9.–11.10.2013, Freiburg.

C. Platzer, A. Rohe, M. Schutkowski, W. Sippl, M. Schmidt. A fluorescence polarisation based phospho-Tyrosin Myt1 kinase activity assay. *DPhG Annual Meeting 2014*, 24. – 26.09.2014, Frankfurt (Main).

M. Schmidt, A. Rohe, C. Platzer, I. Slyngo, K. Wichapong, F. Erdmann, M. Schutkowski, W. Sippl. Biological characterization of human protein kinase Myt1 and its role as modifying regulator of cyclinB/Cdk1 kinase system and histon H1 chromatin system- substrate recognition and inhibitor development. *Treffen des Wissenschaftlichen Beirats des Landesforschungsschwerpunkts Molekulare Biowissenschaften 10.03.2014*, Halle (Saale).

C. Platzer, C. Decker, M. Gershovich, F. Erdmann, W. Sippl, M. Schmidt. Identification of aza-stilbenes as inhibitors of the cellular checkpoint kinase Myt1. DPhG Annual Meeting 2015, 23. – 25.09.2015, Düsseldorf.

12 Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Charlott Platzer
Geburtstag: 20.05.1989
Geburtsort: Halle (Saale)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet

Angaben zur Ausbildung:

2002 – 2007: Burg-Gymnasium Wettin
07/2007 Allgemeine Hochschulreife
10/2007 – 10/2011 Studium der Pharmazie,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/2009 Erster Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
10/2011 Zweiter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
Abschluss: Staatsexamen
10/2011 – 03/2012 Diplom-Student in der AG Medizinische Chemie des
Institutes für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Leitung Prof. Sippl,
Abschluss: Diplom-Pharmazeut
04/2012 – 09/2012 Praktikum nach AppO, Rats-Apotheke Wanzleben
11/2012 Dritter Abschnitt der pharmazeutischen Prüfung
Im Anschluss: Erteilung der Approbation als Apotheker
10/2012 – 03/2016 Promotionsstudent in der AG Medizinische Chemie des
Institutes für Pharmazie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Leitung Prof. Sippl,
Seit 12/2012 Apothekerin in der Linden-Apotheke Hohnstedt

13 Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften anderer entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Außerdem erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation zum ersten mal um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe. Die hier vorliegende Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Halle (Saale), den

Charlott Platzer