

*NEUE ANSÄTZE ZUR ERGÄNZUNG DER KONVENTIONELLEN
CHEMOTHERAPIE MALIGNER TUMORE:*

- *SYNTHESE UND BIOCHEMISCHE TESTUNG POTENTIELLER INHIBITOREN DES P-GLYKOPROTEINS ZUR ÜBERWINDUNG DER MULTIDRUG RESISTANCE*
- *TARGET-BASIERTE ENTWICKLUNG UND BIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG NEUARTIGER INHIBITOREN DER HUMANEN MYT1-KINASE*

Kumulative Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habitatus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Herrn Apotheker Dr. rer. nat. Matthias Schmidt
geb. am: 30.05.1970 in Leipzig

Gutachter:

1. Prof. Dr. habil. Wolfgang Sippl, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
2. Prof. Dr. habil. Manfred Jung, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
3. Prof. Dr. habil. Franz Bracher, Ludwig-Maximilians-Universität München

Einreichung: 04.01.2016

Verteidigung: 08.12.2016

Probevorlesung: 01.02.2017

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung und Zielstellung der Arbeit	1
2 Synthese und biochemische Testung potentieller Inhibitoren des P-Glykoproteins zur Überwindung der Multidrug Resistance	3
2.1 <i>Resistenzentstehung und Multidrug Resistance</i>	3
2.2 <i>P-Glykoprotein</i>	4
2.3 <i>MDR-Modulatoren</i>	6
2.4 <i>P-Glykoprotein als Zielstruktur möglicher Inhibitoren</i>	8
2.5 <i>Ergebnisse der Inhibitorenentwicklung</i>	9
2.5.1 Untersuchungen zu 1,3-Dioxolan- und 1,3-Dioxanderivaten	10
2.5.2 Untersuchungen zu substituierten Phenothiazinderivaten	11
2.6 <i>Zusammenfassung I</i>	12
3 Target-basierte Entwicklung und biologische Charakterisierung neuartiger Inhibitoren der humanen Myt1-Kinase	13
3.1 <i>Proteinkinasen als Zielstruktur einer modernen Arzneimitteltherapie Maligner Tumore</i>	13
3.2 <i>Cyclin-abhängige Kinasen als Regulatoren des Zellzyklus</i>	13
3.3 <i>Inhibition von Kinasen der Wee-Familie</i>	16
3.4 <i>Molekularer Aufbau und Funktion der Myt1 Kinase</i>	18
3.5 <i>Kinaseinhibitoren</i>	19
3.6 <i>Ergebnisse der Forschungsarbeiten</i>	21
3.6.1 Neosynthese von 1,2-Dipalmitoyl-3-(N-palmitoyl-6'-amino-6'-deoxy-α-D-glucosyl)-sn-glycerol und Derivatisierung	21
3.6.2 Untersuchungen zur Substraterkennung und -akzeptanz von humaner Myt1 Kinase	22
3.6.3 Entwicklung eines TR-FRET basierenden Bindungsassays	23
3.6.4 Entwicklung eines Fluoreszenzanisotropie basierenden Bindungsassays	24
3.6.5 Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Glykoglycerolipiden	25
3.6.6 Liganden Docking in Kombination mit QM/MM-GBSA, MM-GBSA und MM-PBSA Methoden zum Struktur-basierten Drugdesign	26
3.6.7 Identifizierung von Peptid-Substraten mittels Peptid-Microarray als Grundlage zur Entwicklung eines Aktivitätsassays	27
3.7 <i>Zusammenfassung II und Ausblick</i>	29
Publikationsverzeichnis	32
Danksagung	34
Curriculum vitae/Tabellarischer Lebenslauf	36
Eigenständigkeitserklärung	37
Literaturverzeichnis	38

Abbildungsverzeichnis

(Abbildungen, die nicht Gegenstand der Publikationen sind)

- Abbildung 1: Minderung der intrazellulären Zytostatikakonzentration durch Effluxpumpen (Multidrug Resistance)* 3
- Abbildung 2: Schematische Struktur von P-Glykoprotein in einem Membranbilayer nach Gottesman et al.⁸ (a) Maus P-gp (PDB: 3G60) nach Aller et al.¹⁵ Die N-terminale TMD (rot) und NBD (gelb), bzw. die C-terminale TMD (cyan) und NBD (magenta) mit Inhibitor QZ59-SSS (schwarz) gebunden in der transmembranären Region. Die NBDs sind 'Nukleotid-frei' mit entsprechendem Abstand zueinander. Der Kreis symbolisiert eine mögliche Stelle für den Eintritt des Substrates oder des Modulators direkt aus der Membrane. (b) P-gp Model basierend auf S. aureus SAV1866 (PDB: 2HYD)¹¹. Zwei ADP-Moleküle (Schwarz) gebunden an NBD und Konformationsänderung des Transporters.* 4
- Abbildung 3: Strukturklassen bekannter MDR-Modulatoren nach Baumert und Hilgeroth²⁹* 6
- Abbildung 4: Strukturelle Darstellung von bekannten MDR-Modulatoren* 7
- Abbildung 5: Kristallstruktur der katalytischen Domäne der Myt1 (PDB: 31P1A)⁹⁴* 15
- Abbildung 6: Rolle der Myt1-Kinase im Zellzyklus verändert nach Aarts et al.¹²⁸* 18
- Abbildung 7: Assaysprinzip der Identifikation von Peptidsubstraten der humanen Myt1 Kinase* 27

Abkürzungsverzeichnis

ABC	<i>ATP binding cassette</i> *
ABCB1	<i>ATP-binding cassette sub-family B member 1</i>
ABCG2	<i>ATP-binding cassette sub-family G member 2</i>
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ara-C	Cytarabin
AML	akute myeloische Leukämie
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
CaCo	<i>colon carcinoma</i>
Cak	<i>Cdk-activating kinase</i>
Cdc	<i>Cell division control protein</i>
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
Chk	<i>Checkpoint Kinases</i>
CML	chronische myeloische Leukämie
CoMFA	<i>Comparative Molecular Field Analysis</i>
CoMSIA	<i>Comparative Moleculare Similarity Indices Analysis</i>
Cyc	Cyclin
CycA	Cyclin A
CycB	Cyclin B
DNA	<i>Deoxyriboneucleic acid</i>
EC ₅₀	Konzentration bei 50% Effekt
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EIA	<i>Enzym immunoassay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Fl	<i>fulllength</i>
FP	Fluoreszenzpolarisation
FPIA	Fluoreszenzpolarisationsimmunoassay
FRET	Förster Resonanzenergietransfer
5-FU	5-Fluorouracil
G-Phase	Gap Phase
GGL	Glycoglycerolipid
GK	<i>Gatekeeper</i>
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
HTS	<i>High throughput screening</i>
IC ₅₀	Konzentration bei 50% Inhibition

* Eigennamen, englische Bezeichnungen und Begriffe in dieser Schrift *kursiv*

K _d	Kinasedomäne
K _d	Dissoziationskonstante
K _i	Inhibitionskonstante
K _m	Michaelis Konstante
LLC-MDR1	Nierenepithelzelle vom Schwein, die humanes P-gp exprimiert
LLC-PK1	Nierenepithelzelle vom Schwein
M-phase	Mitose Phase
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCF-7/DOX	Doxycyclin-resistente Michigan Cancer Foundation-7 Brustkrebs-Zelllinie
MD	Moleküldynamik
MDR	<i>Multidrug Resistance</i> oder <i>Multiple Drug Resistance</i>
MLU	Martin-Luther-Universität
MPF	<i>Maturation promoting factor / M-Phase promoting factor</i>
MRP1	<i>Multidrug resistance-associated protein 1</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
Myt1	<i>Membrane-associated tyrosine- and threonine-specific Cdc2-inhibitory kinases</i>
NBD	nukleotidbindende Domäne
PDB	<i>Protein data bank</i>
PDGFR	<i>Platelet-derived growth factor receptor</i>
P-gp	P-Glykoprotein
PKMYT1	Proteinkinase Myt1
Pin1	<i>Peptidylprolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 PKA Protein kinase A</i>
Plk1	<i>Polo-like Kinases 1</i>
PTM	Posttranslationale Modifikation
QM/MM-GBSA	<i>Quantum Mechanics/ Molecular Mechanics Generalized Born Surface Area</i>
QSAR	<i>Quantitative structure–activity relationship</i>
Rb	<i>Retinoblastoma-associated protein</i>
RIA	<i>Radio immunoassay</i>
RMSD	<i>Root mean square deviation</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
S-phase	Synthese-Phase
TMD	transmembranäre Domäne
VS	<i>Virtual screening</i>
Wee1	Wee1A Proteinkinase

1 Einleitung und Zielstellung der Arbeit

Die Behandlung maligner Tumore beruhte bisher in nahezu allen Fällen der Therapie auf den drei klassischen Säulen *Chirurgie - Bestrahlung - Chemotherapie*. Dabei wird die kurative Entfernung von Tumorgewebe oft mit einer adjuvanten Zytostatika- und/oder Strahlentherapie kombiniert, um dadurch bei der Operation teilweise nicht entfernte Krebszellen zu zerstören. Längst haben aber auch andere Therapieansätze die Behandlungsbreite bei Tumorerkrankungen erweitert. So spielt die Stammzelltransplantation z.B. bei Leukämien und Lymphomen mittlerweile eine tragende Rolle. Aber auch alternative Methoden wie die Hyperthermie-Behandlung oder die Komplementäre Medizin erweitern das Spektrum bis hin zum wichtigen Bereich der Palliativmedizin.¹

Die klinische Praxis begründet allerdings einen Großteil von Komplikationen bzw. das Scheitern von mit Chemotherapeutika kombinierten Therapieschemata neben pharmakokinetischen, -dynamischen und patientenindividuellen Problemen mit der fehlenden Selektivität des eingesetzten Zytostatikums, die sich in einer Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen äußert, und mit der Resistenzentwicklung von Tumoren (z.B. *Multidrug Resistance*), was zu einem letztendlichen Scheitern der Therapie führen kann. Selektivitätsprobleme können durch die zielgerichtete und selektive Anreicherung oder Freisetzung eines Arzneistoffs am gewünschten Wirkort nach einer systemischen Applikation des Arzneimittels (*drug targeting*) gelöst werden. Auf diese Weise wird die Effektivität der Wirkung erhöht und gleichzeitig systemische Nebenwirkungen verringert. Bei den Resistenzerscheinungen gilt neben den Mutationen und posttranslationalen bzw. posttranskriptionalen Modifikationen die *Multidrug Resistance* (MDR) als wichtigste Form der sekundären, zellulären Zytostatikaresistenz. Sie wird definiert als Resistenz maligner Zellen gegen strukturell unterschiedliche Zytostatika, die auf ihrem energieabhängigen Export aus den Zellen durch Effluxpumpen-Transportproteine (z.B. P-Glykoprotein) beruht, wodurch die erforderliche chemotherapeutische Konzentration des Arzneistoffs in der Zelle nicht mehr erreicht wird.²

Das für einen Pharmazeuten interessante Prinzip der medikamentösen Behandlung lässt sich mittlerweile nicht mehr nur auf die antineoplastische Chemotherapie (z.B. Alkylantien, Antimetabolite) beschränken. Aktuelle Erkenntnisse zu molekularen Mechanismen der Tumorentstehung, der Wachstumskontrolle, der Angiogenese, von Transportvorgängen und von Zellerkennungsprozessen lassen moderne und weiterführende Ansätze bei der Behandlung von Tumorerkrankungen zu. Das Interesse der medizinischen Krebsforschung richtet sich derzeit zunehmend auf die Entwicklung von Therapien, die spezifisch gegen Krebs wirken, weil sie auf die molekularen Eigenschaften von Krebszellen abzielen, die nur diesen, nicht oder kaum jedoch gesunden Körperzellen eigen sind. Diese neuen molekularbiologischen Therapien werden deshalb auch als zielgerichtete Therapien (*targeted therapies*) bezeichnet. Mit ihnen verbindet sich die Hoffnung, einerseits die Krebszellen wirkungsvoll aufhalten zu können und andererseits weniger Nebenwirkungen anderer Therapieformen in Kauf nehmen zu müssen. Alle Zellwachstums- und Zellteilungsprozesse werden über komplizierte biochemische Reaktionswege (Pathways) an

den Zellkern weitergeleitet (Signaltransduktion). Bei diesen aufeinander folgenden Prozessen (Signalkaskaden) sind eine Vielzahl an Botenstoffen (Liganden), Enzymen (z.B. Tyrosinkinase) und Rezeptoren beteiligt. Auf der Basis dieses Wissens wurden moderne molekularbiologische Therapieansätze entwickelt, die mittlerweile auch Einzug in die Therapie maligner Tumore gehalten haben. So blockieren monoklonale Antikörper (z.B. Bevacizumab, Trastuzumab und viele andere) Wachstumsrezeptoren auf der Zelloberfläche und markieren die Zelle gleichzeitig für das körpereigene Immunsystem. Tyrosinkinasehemmer (z.B. Imatinib, Sunitinib und viele andere) entfalten ihre Wirkung am Rezeptor außerhalb und auch innerhalb der Zellen. Hemmstoffe z.B. des mTOR-Signalweges (z. B. Everolimus, Temsirolimus) richten sich gegen Kaskaden innerhalb der Zelle.

Gegenstand dieser Habilitationsschrift sind zwei verschiedenartige Ansätze, die eine Ergänzung zur konventionellen Chemotherapie darstellen können. Zum einen wurden durch Ableitung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen bekannter MDR-Modulatoren neue, potentielle Inhibitoren synthetisiert die durch biochemische *in vitro*-Untersuchungen an verschiedenen Krebszelllinien bezüglich ihres inhibitorischen Potentials an P-Glykoprotein, eine der bedeutendsten Effluxpumpen im Zusammenhang mit *Multidrug Resistance*, getestet wurden. Durch die Kombination eines konventionellen Zytostatikums mit einem MDR-modulierenden Effluxpumpeninhibitors würde so die erforderliche, zelluläre Zytostatikakonzentration durch Hemmung des Transporters nicht mehr unterschritten werden. Zum anderen wurde die Proteinkinase Myt1 (PKMYT1) als wichtiger Regulator des Cdk1/CyclinB Kinase Systems biologisch charakterisiert. Die Myt1-katalysierte Phosphorylierung von Cdk1 bewirkt eine Inhibition des Proteins, die den Eintritt in die Mitosephase verhindert und somit den Zellzyklus reguliert. Eine Hemmung der Myt1-Kinase durch geeignete Inhibitoren führt somit zur vorzeitigen Aktivierung der Cdk1 und damit zur mitotischen Katastrophe – ein Wirkprinzip was speziell für viele maligne Zelltypen zur Apoptose führen würde.

2 Synthese und biochemische Testung potentieller Inhibitoren des P-Glykoproteins zur Überwindung der Multidrug Resistance

2.1 Resistenzentstehung und Multidrug Resistance

Bei der Ursache von Resistenzen bei der Therapie maligner Erkrankungen muss man zwischen pharmakologischen und zellulären Mechanismen unterscheiden³. Faktoren, die bei den pharmakologischen Mechanismen bedeutende Auswirkungen auf den Plasmaspiegel des Arzneistoffs haben sind dabei die Metabolisierung von Prodrugs, die Beeinflussung der Pharmakokinetik durch Metabolisierung und Ausscheidung, die Vaskularisation des Tumors und die Beeinflussung der Bioverfügbarkeit durch Barrieren (z.B. Blut-Hirn-Schranke). Bei den zellulären Mechanismen stehen als Ursachen im Vordergrund die Veränderungen in Signalwegen und dem Mechanismus des Zelltods, die Reparatur von DNA Schäden und schließlich die Expression membranständiger ABC(ATP binding cassette)-Transporter.

Antineoplastische Arzneimittel können neben dem primären, intrinsischen Effekt auf Zellen auch Veränderungen im Zellzyklus verursachen, was als sekundärer Effekt bezeichnet wird und im Laufe der Therapie zu einer verminderten Wirkung des Chemotherapeutikums führen kann. Beispiele hierfür sind induzierte Reparaturmechanismen nach Primärschäden aber auch Änderungen in den Signalkaskaden für die Apoptose. Ist zelluläre DNA der Angriffspunkt von Arzneistoffen (z.B. Alkylantien) kann es verstärkt zu einer Aktivierung von DNA-Reparaturkaskaden kommen, was in einer Minderung der zytotoxischen Wirkung resultiert⁴.

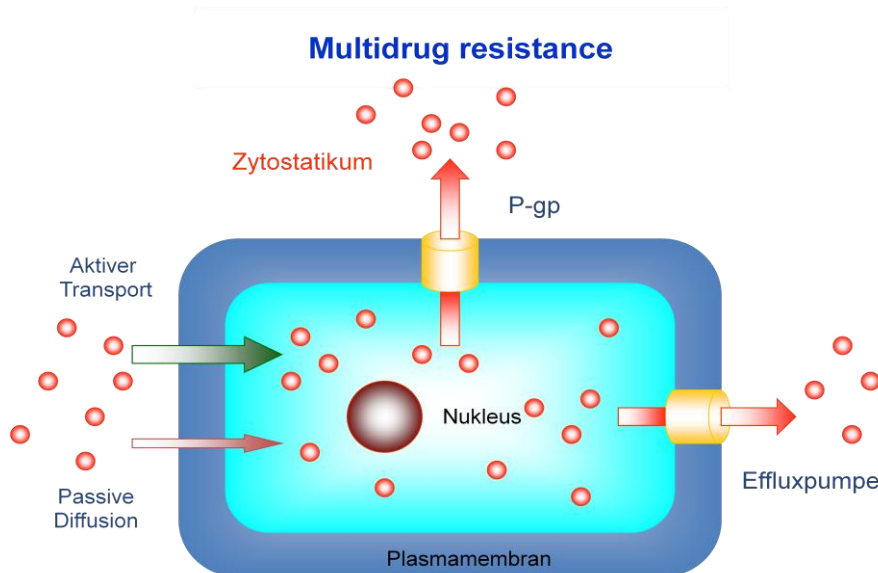


Abb.1: Minderung der intrazellulären Zytostatikakonzentration durch Effluxpumpen (Multidrug Resistance)

Die seit längerem bekannte Familie der ABC-Transporter umfasst bisher 15 verschiedene Vertreter, von denen das P-Glykoprotein (P-gp, ABCB1), *multidrug resistance-associated protein 1* und 2 (MRP1 und MRP2), sowie das *breast cancer resistant protein* (BCRP, ABCG2) zu den Bedeutendsten gehören. Die Expression dieser Transporter führt durch einen

aktivierten Auswärtstransport (Effluxpumpe) zu einer Minderung der intrazellulären Zytostatikakonzentration und damit zu einer Reduktion der toxischen Wirkung auf die Zelle. Sind von dieser Resistenz eine Vielzahl Struktur-unterschiedlicher Zytostatika betroffen, spricht man von Multidrug Resistance (auch Multiple Drug Resistance/(MDR)⁵.

2.2 P-Glykoprotein

Der transmembranäre Transport der meisten kleinen Moleküle und Ionen wird überwiegend durch spezialisierte Membranproteine (Transporter) realisiert. Eine der größten und wichtigsten Transporterklassen stellen die ABC-Transporter dar. Die Namensgebung beruht auf einem hochkonservierten Bereich aller Transporter, der ATP-Bindungsdomäne, auch als nukleotidbindende Domäne (NBD) bezeichnet. Durch die Bindung und Hydrolyse von ATP können eine Vielzahl von Substanzen aktiv durch die Zellmembran transportiert werden. Bislang sind 49 humane Gene, welche für ABC-Transporter codieren, identifiziert und aufgrund phylogenetischer Eigenschaften in 7 Klassen eingeteilt worden⁶. Der wichtigste Vertreter der ABC-Transporter ist das P-Glykoprotein (P-gp). Es wurde als erster Transporter der ABC-Familie 1976 von *Juliano* und *Ling* beschrieben⁷. Das P-Glykoprotein besteht wie die meisten ABC-Transporter aus zwei homologen Hälften mit jeweils sechs α -helikalen transmembranären Domänen (TMD) und einer nukleotidbindenden Domäne (NBD).

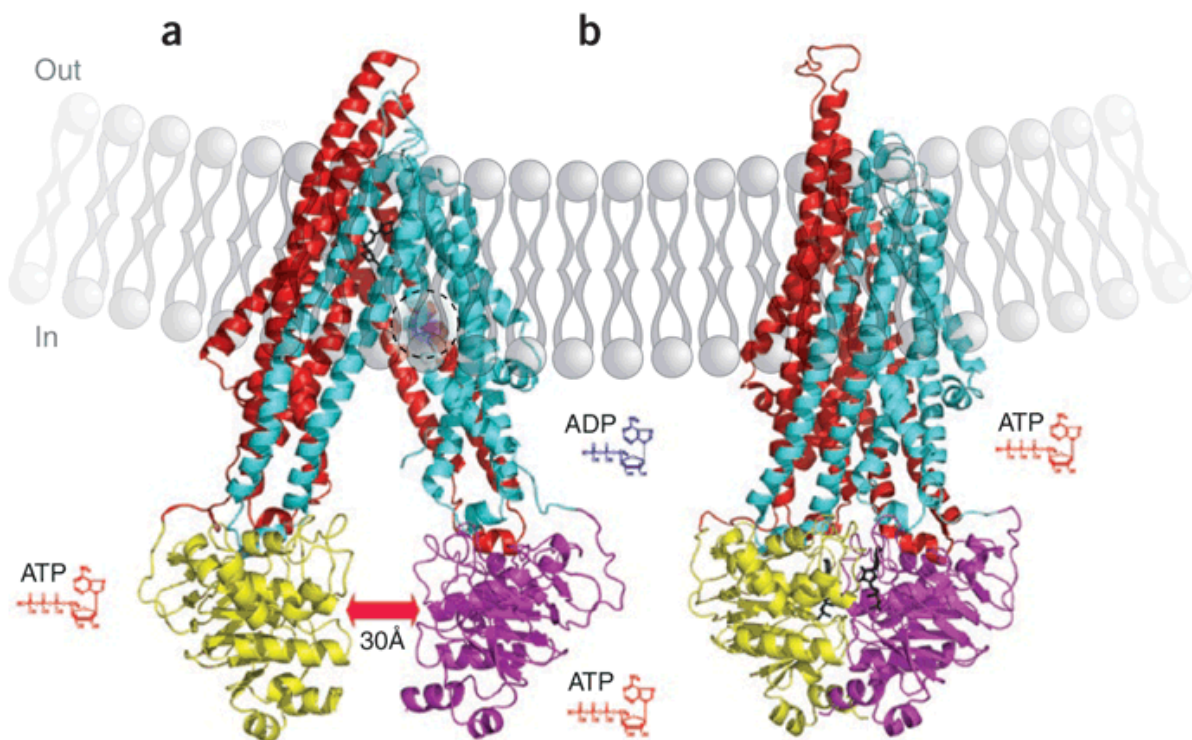


Abb. 2: Schematische Struktur von P-Glykoprotein in einem Membranbilayer nach Gottesman et al.⁸. (a) Maus P-gp (PDB: 3G60) nach Aller et al.¹⁵. Die N-terminale TMD (rot) und NBD (gelb), bzw. die C-terminale TMD (cyan) und NBD (magenta) mit Inhibitor QZ59-SSS (schwarz) gebunden in der transmembranären Region. Die NBDs sind 'Nukleotid-frei' mit entsprechendem Abstand zueinander. Der Kreis symbolisiert eine mögliche Stelle für den Eintritt des Substrates oder des Modulators direkt aus der Membrane. (b) P-gp Model basierend auf *S. aureus* SAV1866 (PDB: 2HYD)¹¹. Zwei ADP-Moleküle (Schwarz) gebunden an NBD und Konformationsänderung des Transporters.

Es ist aus 1280 Aminosäuren aufgebaut, wird vom humanen MDR1 Gen codiert und hat in glykosylierter Form ein Molekulargewicht von 170 kDa. Die beiden homologen Hälften besitzen eine Sequenzübereinstimmung von 43 % und sind durch eine 60 Aminosäuren lange Linkerregion miteinander verbunden⁹. Erste Röntgenstrukturen von bakteriellen ABC-Transportern konnten bereits 2001 von *Chang et al.* veröffentlicht werden, allerdings zeigen sich beachtliche Unterschiede zu eukaryotischen Transportern der gleichen Familie¹⁰. 3D-Strukturmodelle der Homologen des humane P-gp abgeleitet von verschiedenen Bakterienspecies^{11,12,13} bzw. *Caenorhabditis elegans*¹⁴ und *Mus musculus*^{15,16} sind bekannt. Allerdings fehlen zur Strukturaufklärung bis heute hochaufgelöste Strukturdaten des humanen P-gp. Funktionell erklärt man die Öffnung der TMDs zum Extrazellularraum hin mit einer Konformationsänderung bedingt durch die Bindung zweier ADP Moleküle an die NBDs unter Ausbildung eines Dimers. Im Gegensatz dazu zeigt die Nukleotid-freie Konformation eine Distanzierung der NBDs voneinander, was in einer Konformationsänderung des Proteins unter Öffnung der TMDs zum Intrazellularraum hin resultiert.

Im gesunden Organismus tritt P-Glykoprotein in vielen metabolisch aktiven Geweben wie Leber, Niere, Darm aber auch an der Blut-Hirn-Schranke auf und ist für die Entfernung von Xenobiotika und toxischen Substanzen aus dem Zellinneren für den Organismus essentiell¹⁷. Die Charakterisierung von Substraten des P-gp gestaltet sich schwierig, da eine Vielzahl von strukturell sehr unterschiedlichen Verbindungen durch das Protein transportiert wird. Dazu gehören unter anderem Steroidhormone und eine Reihe von Arzneimitteln, darunter auch zahlreiche Chemotherapeutika¹⁸. Gerade in der Therapie maligner Tumore kann sich so die Expression von P-gp nachteilig auf den Therapieverlauf auswirken. Durch die Effluxaktivität des Proteins kann keine ausreichende Arzneistoffkonzentration mehr erreicht werden. Ein Therapieversagen durch Ausbildung einer Resistenz (MDR) besteht. P-gp-Substrate sollten ein Molekulargewicht von 200 – 1900 Da aufweisen und eine amphiphile Grundstruktur besitzen^{19,20}. Aufgrund der strukturellen Vielfalt der Verbindungen wird davon ausgegangen, dass innerhalb der Proteinstruktur mehrere Bindungsstellen existieren. *Shapiro et al.* konnte durch Studien mit den P-gp Substraten Hoechst 33342 und Rhodamin 123 auf zwei Bindungsstellen schließen, welche als „H-Seite“ und „R-Seite“ bezeichnet wurden²¹. Wenig später konnte von der gleichen Arbeitsgruppe eine zusätzliche Bindungsstelle für Prazosin und Progesteron nachgewiesen werden²². Die Bindung dieser Substanzen führte zu einem gesteigerten Transport von Rhodamin 123 nach Bindung an der R-Seite und Hoechst 33342 an der H-Seite und kann damit als positiv allosterischer Effekt in Bezug auf andere Bindungsstellen gesehen werden. Weitere Untersuchungen von *Martin et al.* ergaben sogar den Hinweis für vier und mehr Bindungsstellen, welche aufgrund der nachgewiesenen Wechselwirkungen namentlich nach den Substanzen Vinblastin, Hoechst 33342, Paclitaxel und Nifedipin eingeteilt wurden²³. Zusammenfassend muss allerdings festgestellt werden, dass bis heute keine exakte Aussage zur Anzahl und Gestalt der Bindungsstellen im P-gp getroffen werden kann²⁴.

2.3 MDR-Modulatoren

Die Entwicklung von Strategien, die dem Mechanismus der Multidrug Resistance gezielt entgegenwirken, gestaltete sich von Anfang an als schwierig. Eine Reihe von Methoden, wie z.B. die Veränderung der physikochemischen Eigenschaften (Permeabilität und Fluidität) der Biomembranen durch Modulatoren, was unter anderem den Zytostatikazutritt in die Zelle verbessern sollte²⁵, der Einsatz von P-gp Antikörpern (UIC2)²⁶ und die Blockade der Biosynthese der Transportproteine über eine *antisense* Strategie durch Targeting der MDR1 m-RNA²⁷, konnten trotz vielversprechender Ansätze nicht etabliert werden.

Das Hauptaugenmerk der Forschung richtete sich deshalb auf die Entwicklung von neuen Substanzen (MDR-Modulatoren), die auf molekularer Ebene in der Lage sind, die Bindungsstellen der Transportproteine kompetitiv oder allosterisch zu besetzen und somit den aktiven Ausstrom der Zytostatika zu unterbinden. Ein optimaler Chemosensitizer dieser Art, der zur Überwindung der Multidrug Resistance eingesetzt werden soll, sollte das P-gp bzw. die anderen auftretenden Transportproteine hemmen, ohne einen nachteiligen Einfluss auf die normalen Gewebe auszuüben, die diese Membranpumpen ebenfalls exprimieren. Des Weiteren sollte dieser MDR-Modulator in wirksamen Konzentrationen eine möglichst geringe Zytotoxizität aufweisen, so dass eine effektive Begleittherapie zum Zytostatikaeinsatz erfolgen kann²⁸. Bisher konnte allerdings keine Verbindung diese Anforderungen in ausreichendem Umfang erfüllen, so dass es eine klinische Anwendung von MDR-Modulatoren in Kombination mit Zytostatika derzeit nicht gibt.

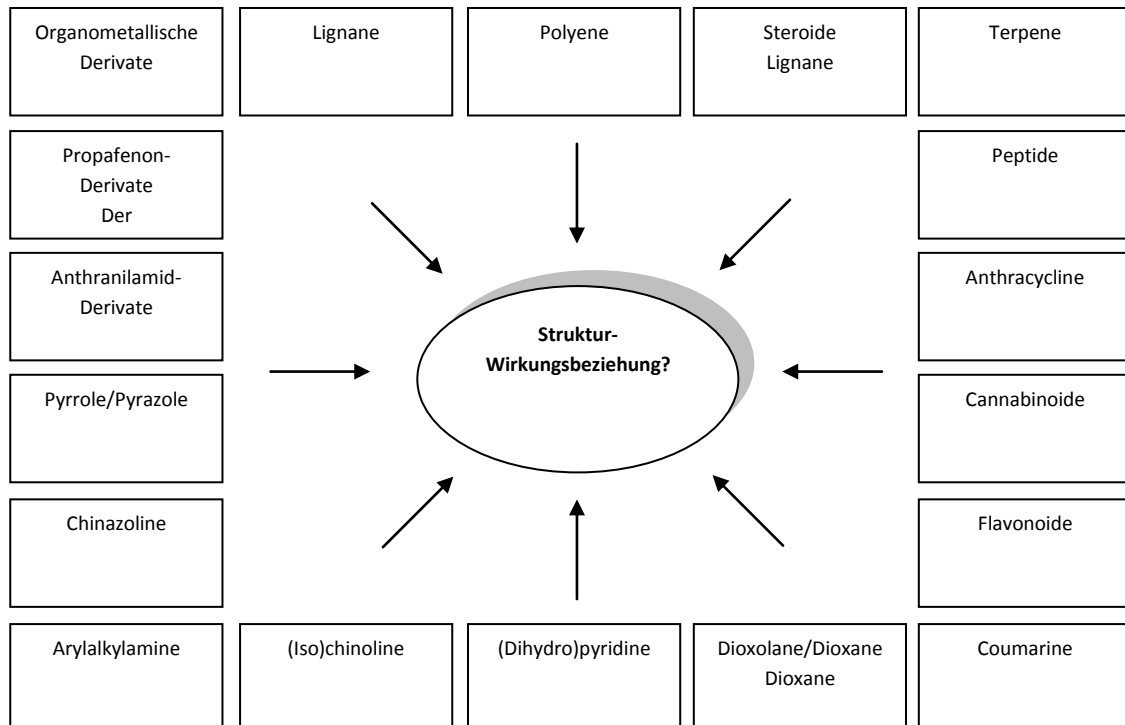


Abb. 3: Strukturklassen bekannter MDR-Modulatoren nach Baumert und Hilgeroth²⁹

Dennoch wurde in den vergangenen Jahren eine Vielzahl von Substanzen untersucht und synthetisiert, die *in vitro* gute bis sehr gute Modulationseigenschaften bei geringer Zytotoxizität zeigen und somit als potentielle MDR-Modulatoren in Frage kommen.

Die ersten Verbindungen, die dahingehend untersucht wurden, waren Substanzen, deren ursprünglicher klinischer Einsatz unter einer anderen Indikationsstellung erfolgte. Sie werden auch als MDR-Modulatoren der ersten Generation bezeichnet. Zu diesen gehören zum Beispiel der Kalziumkanalblocker Verapamil oder das Immunsuppressivum Cyclosporin A. Allerdings besitzen diese Verbindungen bei einem Einsatz als Chemosensitizer in wirksamer Dosierung eine hohe intrinsische Toxizität, die in der ursprünglichen pharmakologischen Hauptwirkung, welche nun als unerwünschte Nebenwirkung auftritt, begründet ist. Die direkte Verwendung dieser Verbindungen als MDR-Modulator schließt sich somit aus.

Bei der zweiten Generation von MDR-Modulatoren handelt es sich meist um Analoga der Substanzen aus der ersten Generation, die durch strukturelle Modifikationen nicht deren unerwünschte Nebenwirkungen besitzen. Ein bekannter Vertreter dieser Generation ist zum Beispiel das Dextroverapamil, eines der zwei Enantiomere des Verapamils. Es besitzt im Gegensatz zum Verapamil einen deutlich geringeren kardiovaskulären Effekt³⁰. PSC-833 (Valspodar[®]), ein nicht immunsuppressives Analogon des Cyclosporin A, ist ein weiterer Vertreter der zweiten Generation von MDR-Modulatoren. Die modulatorische Wirksamkeit dieser Verbindung konnte in klinischen Phase-III-Studien für Patienten, deren Zell-Efflux *in vitro* durch PSC-833 moduliert wird, nachgewiesen werden³¹.

Die dritte Generation an MDR-Modulatoren beinhaltet Substanzen mit Strukturen, die auf der Basis von bekannten Struktureigenschaften von MDR-Modulatoren synthetisiert wurden. Die Entwicklung dieser Substanzen erfolgt mit dem Ziel, wirksamere und dabei weniger toxische MDR-Modulatoren zu erhalten. Zu den bekannten Vertretern dieser Generation zählen zum Beispiel das Difluorcyclopropyldibenzosuberan-Derivat LY-335979 (Zosuquidar[®]) und das Anthranilsäurederivat XR9576 (Tariquidar[®]).

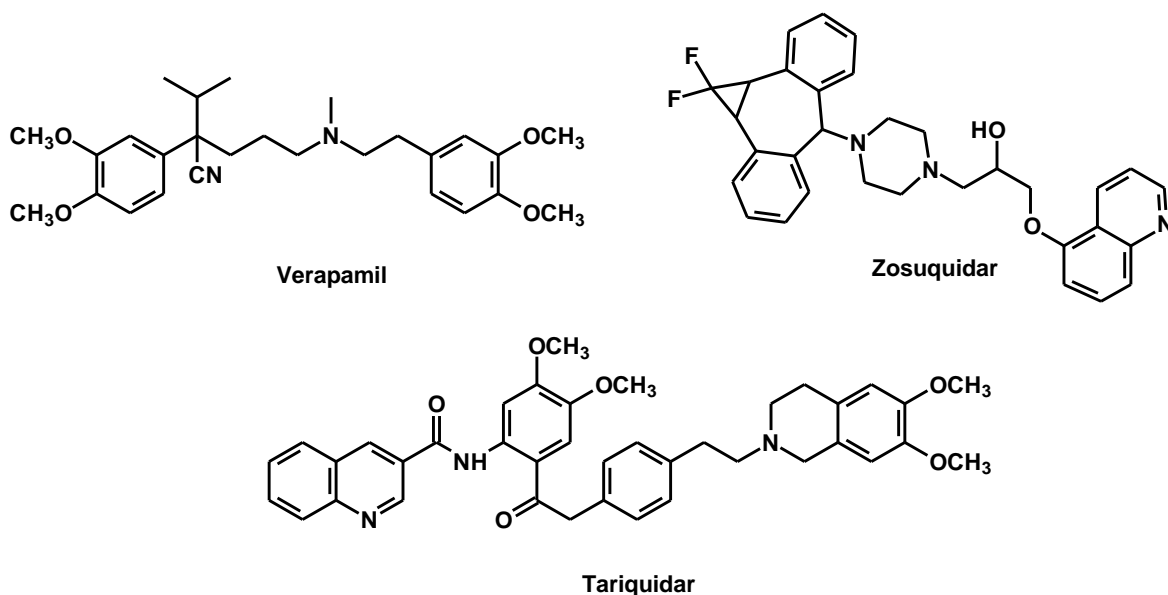


Abb. 4: Strukturelle Darstellung von bekannten MDR-Modulatoren

Einige dieser Verbindungen zeigten *in vitro* sehr gute modulatorische Eigenschaften und wurden in Phase-III-Studien hinsichtlich ihrer Wirksamkeit getestet. Bei vielen Substanzen dieser Generation wurde die Hemmung weiterer Membrantransporter beobachtet. So hemmen Tariquidar, Elacridar und Biricodar neben dem P-gp auch das BCRP. Dieses duale Wirkprinzip schien auch für eine mögliche klinische Anwendung von Vorteil zu sein, da Resistenzentwicklungen häufig mit der Expression von mehreren Transportern einhergehen. Bei Modulatoren, wie Biricodar wurden sogar hemmende Effekte auf alle drei wichtigen ABC-Transporter P-gp, BCRP und MRP1 nachgewiesen³². Dennoch konnte kein Modulator einen positiven Benefit in nachfolgenden klinischen Studien zeigen. Trotz geringerer Nebenwirkungsraten wurden insbesondere pharmakokinetische Interaktionen beobachtet. Durch eine geringere Clearance und Metabolisierung der eingesetzten Zytostatika resultierten zu hohe Plasmaspiegel, was zu toxischen Effekten und einer damit verbundenen Dosisreduzierung mit geringerer Ansprechrate führte³³.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass vor allem die neueren P-gp Modulatoren *in vitro* sehr gute Hemmwirkungen zeigten, aber in klinischen Studien kein Vorteil in der Kombinationstherapie festgestellt werden konnte³⁴.

2.4 P-Glykoprotein als Zielstruktur möglicher Inhibitoren

Das bei weitem am besten untersuchte MDR-spezifische Transportprotein ist P-gp. Da vom P-gp als integrales Membranprotein keine Kristallstruktur existiert (s. Kapitel 2.2), sind die Kenntnisse über die 3D-Struktur sehr gering. Das strukturell weite Spektrum an Substraten und Modulatoren des P-gp lässt auch unterschiedliche Bindungsstellen vermuten. Allgemein wird dabei von einer Vielzahl von Substratbindungsstellen ausgegangen. Es ist dabei allerdings nicht klar, ob sich diese Bindungsstellen alle in einer großen Bindungstasche mit verschiedenen substanzspezifischen Domänen befinden oder ob die verschiedenen Bindungsstellen auf der gesamten Proteinoberfläche lokalisiert sind. Auch wenn die bekannten MDR-Modulatoren vorwiegend durch Interaktion mit den lipophilen Bindungsstellen des P-gp als mit der hydrophilen nukleotid-bindenden Domäne (NBD) ihre Wirkung entfalten, würde sich ein modulatorischer Angriff an der ATP-bindenden Domäne ebenfalls anbieten, da ein erwiesener Zusammenhang zwischen Substanzbindung / –transport und ATP-Hydrolyse beim P-Glykoprotein besteht. Obwohl Substanzen mit partieller ATPase-Aktivität beschrieben wurden, sind die Erkenntnisse über diesen Angriffspunkt am P-gp, im Gegensatz zum Angriff an den lipophilen Bindungsstellen, gering³⁵.

Eine eindeutige Zuordnung von Substrat und Bindungsstelle kann nicht zwingend vorgenommen werden. So können große Moleküle mehrere Bindungsstellen gleichzeitig besetzen und konkurrieren so mit den anderen Substraten um diese Bereiche, während kleinere Moleküle gleichzeitig und unabhängig voneinander mit ihren jeweiligen Bindungsstellen koppeln können³⁶. Die genaue Kenntnis über die Bindungsdomänen am P-gp kann somit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Protein-Substrat-Bindung und somit zur Entwicklung neuer MDR-Modulatoren liefern. Allerdings sind die derzeitigen Kenntnisse über die Funktion und die Substratspezifität der verschiedenen Bindungsstellen am P-gp

noch unvollständig, was nicht zuletzt an deren Vielzahl und am Fehlen einer Kristallstruktur liegt. Durch strukturelle Eigenschaften von Substraten können allerdings Rückschlüsse auf das Aussehen dieser Bindungsstellen gezogen werden. Struktur-Aktivitäts-Untersuchungen können deshalb einen wichtigen Beitrag zum Wissen über die Struktur und Funktion von MDR-spezifischen Bindungsstellen an den Transportproteinen liefern.

2.5 Ergebnisse der Inhibitorenentwicklung

Auch wenn für einige MDR-Modulatoren neben P-gp verschiedene andere Angriffspunkte vermutet werden, beschränken sich derzeit die Kenntnisse über Struktur-Wirkungsbeziehungen bekannter Chemosensitizer auf den Angriff am P-Glykoprotein. Trotz der Vielfalt dieser Moleküle konnten in den vergangenen Jahren strukturelle Voraussetzungen charakterisiert werden, die für eine Inhibierung des P-Glykoprotein notwendig sind.

Bekannt ist, dass es sich bei P-gp-Modulatoren um sehr lipophile Moleküle, mit zwei oder mehr aromatischen Ringen handelt. Ebenso besitzen sie alle eine positive Ladung bei physiologischen pH-Wert, das heißt einen basischen Molekülteil, wodurch sich ein amphiphiler Charakter ergibt. Dabei zeigen tertiäre Aminstrukturen in diesem basischen Molekülteil Wirkungsvorteile gegenüber primären und sekundären. Auch der Einbau dieser tertiären Amine in zyklische Strukturen, wie Piperazin- und Piperidin-Derivate, erweist sich hinsichtlich der Wirksamkeit als vorteilhaft³⁷. Zwei aromatische Domänen und ein basischer Stickstoff, verbunden durch einen aliphatischen Linker, werden als essentielles Strukturmerkmal von MDR-Modulatoren vorgeschlagen. Neben der grundsätzlichen Präsenz von mehreren aromatischen Ringen als Bestandteil der lipophilen Molekülstruktur stellten *Suzuki et al.* fest, dass die räumliche Anordnung dieser Aromaten einen entscheidenden Einfluss auf die modulatorischen Fähigkeiten ausübt. Bei ihren Untersuchungen von Modulatoren mit Chinolin-Grundkörper erwies sich ein Winkel von 90-105 ° als besonders geeignet. Auch für die Entfernung zwischen dem protonierbaren Stickstoff und dem Zentrum des hydrophoben Molekülteils wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Abstand von mindestens 5 Å als ideal beschrieben³⁸.

2.5.1 Untersuchungen zu 1,3-Dioxolan- und 1,3-Dioxanderivaten

Als Konsequenz auf die bis *dato* bekannten strukturellen Anforderungen an potentielle Modulatoren wurden durch systematische Variation von drei Moleküldomänen (lipophiler, aromatischer Bereich – aliphatischer Linker – basischer Teil) verschiedene Derivate der 2,2-Diphenyl-1,3-dioxolane, 2,2-Diphenyl-1,3-dioxane und 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolane synthetisiert. 26 verschiedene, in der Literatur bisher nicht beschriebene Endverbindungen wurden vergleichend gegen die Standardverbindungen Trifluoperazin und Verapamil vermessen. Die *in vitro* Testungen erfolgten durch einem MTT-Assay, indem die Lebensfähigkeit von Zellen ermittelt wurde. Er wurde an einer humanen CaCo-Zelllinie, welche eine Resistenz gegen das Zytostatikum Vinblastin aufweist, durchgeführt. Hierzu wurden humane CaCo-Zellen jeweils mit Zytostatikum, Zytostatikum + Standardsubstanz und Zytostatikum + Testsubstanz versetzt und inkubiert. Mit der Bestimmung des jeweiligen antiproliferativen Effektes konnte somit eine Aussage über die modulatorische Potenz der jeweiligen Testsubstanz getroffen werden. Gleichzeitig wurde die Zytotoxizität der Testsubstanzen ermittelt, indem man die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert und dort ebenfalls die Anzahl der überlebenden Zellen bestimmte. In Auswertung der Struktur-Wirkungsbeziehungen konnte resultierend festgestellt werden, dass generell die Basizität der Verbindungen entscheidenden Einfluss auf das modulatorische Potential hat. Im vorliegenden Fall erwiesen sich Strukturen mit zwei protonierbaren Stickstoff-Atomen (Piperazin) und zwei hydrophoben Phenylringen als optimal. Bezüglich der Untersuchungen zur Linker-Länge zwischen aromatischer Core-Struktur und basischer Moleküldomäne erwies sich eine Propylkette als am besten geeignet. Das *SS*-Isomer des 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolans mit dem entsprechenden, strukturoptimierten Substitutionsmuster wies schließlich bessere MDR-modulatorische Eigenschaften auf als Trifluoperazin als Vergleichssubstanz.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden publiziert in: *New 1,3-dioxolane and 1,3-dioxane derivatives as effective modulators to overcome multidrug resistance; Matthias Schmidt, Johannes Ungvári, Julia Glöde, Bodo Dobner, Andreas Langner; Bioorg. & Medicinal Chemistry (2007), 6, 2283-2297.*

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.024>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089607000429>

2.5.2 Untersuchungen zu substituierten Phenothiazinderivaten

Hait und Aftab publizierten bereits 1992 eine Phenothiazinbindungsstelle am P-gp in resistenten MCF-7/DOX-Brustkrebszellen³⁹. In ihrem Modell, das sich auf die bekannte Bindung der Phenothiazine an Calmodulin stützt, interagiert über π -Elektronenwechselwirkungen das lipophile, aromatische PhenothiazinGrundgerüst mit zwei Phenylalaninresten im Bereich der Bindungsstelle des P-gp, während der stickstoffhaltige, protonierbare Molekülteil mit einer hydrophilen Bindungsdomäne, dargestellt durch drei Glutaminsäurereste, Wechselwirkungen eingeht. Das Ziel der hier vorliegenden Studie war es, Phenothiazine in den drei Moleküldomänen, PhenothiazinGrundgerüst - Linker - basischer Bereich, systematisch zu modifizieren und hinsichtlich einer MDR-modulierenden Wirkung zu charakterisieren. Neben den umfangreichen synthetischen Arbeiten wurden die erhaltenen Endverbindungen, 50 verschiedenen Phenothiazinderivate und 10 strukturverwandte trizyklische Verbindungen, *in vitro* mittels eines Kristallviolettassays an LLC-PK1/MDR1 Zellen getestet. Dabei wurden IC₅₀ Werte der modulatorischen Aktivität, der Toxizität und der modulatorische Quotient ermittelt. Speziell der Einfluss von Substituenten in Position 2, 3 und 7 des Phenothiazin-Grundgerüsts wurde untersucht mit dem Resultat, dass der 2-Benzoyl-Rest die einflussreichste Gruppe ist. Untersuchungen zu verschiedenen, die beiden restlichen Moleküldomänen verbindenden Linkerlängen zeigten, dass die Butyl-Kette die optimale Linkerlänge darstellt. Bezüglich der verschiedenen basischen Reste war das Diphenylpentylpiperazine-Derivat die vielversprechendste Gruppe.

Die im Rahmen dieses Projektes generierten Daten wurden publiziert in: *Synthesis and biochemical characterization of new phenothiazines and related drugs as MDR reversal agents*; Matthias Schmidt, Marlen Teitge, Mariana E. Castillo, Tobias Brandt, Bodo Dobner, Andreas Langner; *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* (2008), 341, 624 – 638.

<http://doi/10.1002/ardp.200800115>

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ardp.200800115/abstract>

Zu weiterführenden Arbeiten im Kontext *Multidrug Resistance* und Phenothiazin-Derivate im Zeitraum 2008 -2015 siehe ^{40,41} und ⁴².

2.6 Zusammenfassung I

Die Multiple Drug Resistance (MDR) stellt eines der Hauptprobleme einer erfolgreichen Zytostatika-Therapie dar. Zur Überwindung dieses Phänomens der multiplen Resistenzerscheinung maligner Tumore gegenüber Arzneistoffen durch Überexpression von Transportproteinen (Multidrug Resistance) wurde der Einfluss neuartiger Inhibitoren auf P-Glykoprotein als wichtigsten Vertreter von Effluxpumpen aus der Familie der ABC-Transporter untersucht. Das Wissen über die strukturellen Voraussetzungen dieser inhibitorischen Substanzen ist allerdings gering. Auf der Basis bekannter Struktur-Wirkungs-Beziehungen wurde eine Reihe neuartiger Verbindungen synthetisiert und charakterisiert, die sich in drei Moleküldomänen unterscheiden und systematische Strukturvariationen aufweisen. Als aromatische Grundstruktur wurden die Stoffklassen der Phenothiazine, Dibenzazepin-, Carbazol- und Diphenylhydantoin-Derivate und neuartige 2,2-Diphenyl-1,3-dioxolane, 2,2-Diphenyl-1,3-dioxane, 4,5-Diphenyl-1,3-dioxolane synthetisiert. Ebenso unterscheiden sich die dargestellten Verbindungen durch systematische Variation der Linkerlänge und -charakteristik sowie des basischen Molekülrestes im Sinne eines Wasserstoffbrückenakzeptors um somit ein breites Spektrum an potentiellen MDR-Modulatoren zu erhalten. Zur biochemischen Charakterisierung wurden *in vitro* an humanen CaCo-, LLC-PK1- und LLC-MDR1-Zellen das modulatorische Potential und die Zytotoxizität ermittelt. Als Assay kamen der Kristallviolett- und der MTT-Test zur Anwendung. Es konnte gezeigt werden, dass bereits in geringen Konzentrationen viele Verbindungen einen modulatorischen Effekt zeigen, wobei einige Substanzen ein höheres modulatorisches Potential als bekannte Modulatoren wie Verapamil und Trifluoperazin aufweisen. In Auswertung der Aktivitätswerte der Verbindungen konnte resümiert werden, dass ausgeprägte hydrophobe Moleküleigenschaften für eine Interaktion mit P-gp notwendig sind. Wasserstoffbrückenakzeptoreigenschaften in einer definierten räumlichen Entfernung zum aromatischen Grundgerüst erhöhen die Hemmwirkung dabei. Die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen wurden durch Ergebnisse von 3D-QSAR Verfahren (CoMFA und CoMSIA) gestützt⁴⁸.

Bezüglich der in Kapitel 2.2 und 2.4 angesprochenen Problematik der möglichen Unterscheidung der Bindung der Modulatoren an eine transmembranäre Domäne (TMD) oder eine nukleotidbindende Domäne (NBD) wurden einige Verbindungen in Kooperation mit der AG Prof. Dr. Pia Vogel (Southern Methodist University, Dallas, Texas) für parallele *in silico* Liganden-Dockingstudien und experimentellen, auf Elektronenspin-Resonanzspektroskopie basierenden ATP-Hydrolyse-Untersuchungen verwendet. Die nur moderate ATPase Aktivität lies auf keine Interaktion der Verbindungen mit NBD schließen und deutet somit auf eine Interaktion mit TMD hin⁴³.

Neben den beschriebenen Publikationen (siehe Kapitel 2.5.1 und 2.5.2) fanden die Ergebnisse dieser Arbeit Eingang in zwei Diplomarbeiten⁴⁴,⁴⁵ sowie drei Promotionsarbeiten⁴⁶,⁴⁷,⁴⁸. Die praktischen Arbeiten zum Thema „Synthese und biochemische Testung potentieller Inhibitoren des P-Glykoproteins zur Überwindung der Multiplen Drug Resistance“ wurden im Zeitraum 2003-2007 angefertigt.

3 Target-basierte Entwicklung und biologische Charakterisierung neuartiger Inhibitoren der humanen Myt1-Kinase

3.1 *Proteinkinasen als Zielstruktur einer modernen Arzneimitteltherapie maligner Tumore*

Die Störung der durch Kinasen vermittelten Signaltransduktion fundamentaler Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Genexpression führt zu massiven pathophysiologischen Veränderungen. Derartige Dysfunktionen von Kinasen werden mit verschiedenen Krankheiten assoziiert. Dass Proteinkinasen für eine gezielte Arzneimitteltherapie vielversprechende Zielstrukturen sind, zeigen erste Erfolge bei der Entwicklung selektiver *small molecule inhibitors*. Allerdings sind derzeit nur ca. 5% des humanen Kinoms für Therapien von z.B. malignen Tumoren, metabolischen Störungen und Entzündungen erreichbar^{49,50,51,52}. So ist beispielsweise die chromosomale Mutation [(T9; 22) (q34; q11)], bekannt als Philadelphia-Chromosom, die Ursache für die Bildung des Fusiononkoproteins Bcr-Abl^{53,54,55}. Die dysregulierte Tyrosinkinase-Aktivität von Bcr-Abl ist das biochemische Merkmal der chronischen myeloischen Leukämie (CML)^{56,57,58}. Im Jahre 2001 wurde mit der Genehmigung des selektiven Inhibitors Imatinib (Glivec, Gleevec®) erstmalig ein derartiger Inhibitor gegen CML auf dem Arzneimittelmarkt eingeführt^{59,60}. Insofern eröffnet die pharmakologische Evaluation therapeutisch vielversprechender Kinasen zukünftig weiter neue, vielversprechende Anwendungsmöglichkeiten.

Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk), die an einer Vielzahl regulatorischer Vorgänge des Zellzyklus beteiligt sind, stellen attraktive Targets für neuartige Antitumor-Wirkstoffe dar. Die Wee-Kinase-Familie, insbesondere Wee1 und die im Rahmen dieser Arbeit im Fokus stehende Myt1, sind von entscheidender Bedeutung bei der Regulation des Zellzyklus und wurden wiederholt als mögliche Angriffspunkte für eine Arzneimitteltherapie vorgeschlagen^{61,62,63}. Beide Kinasen sind wichtige Regulatoren des Cdk1/CyclinB Kinase Systems. Die Kinase-katalysierte Phosphorylierung von Cdk1 bewirkt eine Inhibition des Proteins, die den Eintritt in die Mitosephase verhindert und somit den Zellzyklus reguliert. Eine Hemmung der Wee-Kinasefamilie führt somit zur vorzeitigen Aktivierung der Cdk1 und damit zur mitotischen Katastrophe. Demnach sind derartige Inhibitoren in der Lage, schnell proliferative Zellen abzutöten und den Zellzyklus zu beeinflussen.

3.2 *Cyclin-abhängige Kinasen als Regulatoren des Zellzyklus*

Die Wee-Kinase-Familie des Menschen besteht aus drei Kinasen: Myt1 und zwei Wee1 Kinasen (Wee1, Wee1B). Beide Wee1 Kinasen unterscheiden sich in ihrer zeitlichen und räumlichen Expression, in somatischen Zellen scheint nur Wee1 relevant zu sein⁶⁴.

Die Myt1 Kinase wurde im Jahr 1995 als Membran-assoziierte Kinase entdeckt und ist verantwortlich für eine inhibitorische Cdk1 Phosphorylierungen⁶⁵. Die Kinase-Aktivität an Thr14 und Tyr15 des Cdk1 Proteins ist in der Interphase hoch und sinkt durch Hyperphosphorylierung in der M-Phase⁶⁶. Im Gegensatz zu Wee1 weist Myt1 eine höhere Substratspezifität auf, wodurch ausschließlich Cdk1- aber nicht Cdk2-Komplexe phosphoryliert werden⁶⁷. Die direkte Cdk1/CycB Regulierung besteht aus zwei unabhängigen

Mechanismen, zum einen die inhibitorische Phosphorylierung an Thr14 und Tyr15 und andererseits die aktivierende Phosphorylierung von Cdk1/CycB an Thr161 der Cdk-Untereinheit durch Cak^{68,69,70}.

Cdk1/CycB pendelt kontinuierlich zwischen Zytoplasma und Kern, aufgrund des aktiveren Kernexports ist der Komplex vorrangig zytosolisch anzutreffen^{71,72}. Nach der Bindung des CycB an unphosphorylierte Cdk1 kann unmittelbar Tyr15 durch Wee1 (meistens im Kern lokalisiert aber auch geringfügig im Zytoplasma) bzw. Thr14 und/oder Tyr15 durch Myt1 phosphoryliert werden^{73,74}. Essentiell ist dabei die Phosphorylierung von Cdk1/CycB an Thr161 der Cdk-Untereinheit durch Cak als Voraussetzung für die Aktivierung des Cdk1/CycB-Komplex. Die Phosphorylierung von Thr161 ist eng an die Phosphorylierung von Thr14 gekoppelt. Im unphosphorylierten Zustand von Thr161 ist der Cdk1/CycB Komplex instabil weshalb monomere Cdk1 abdiffundieren kann⁷⁵.

Die eigentliche Aktivierung wird dann durch nukleäre Cdc25 vermittelt, eine Phosphatase, die die inhibitorischen Phosphorylierungen an Thr14 und Tyr15 hydrolysiert, während die aktivierende Thr161 Modifikation erhalten bleibt.

Als zweiten Mechanismus zur Regulation der Cdk1/CycB fungiert die C-terminale Domäne der Myt1, die mit den Cdk1 Komplexen zusammenwirkt⁷⁶. Im Gegensatz zu der meist im Kern lokalisierten Wee1 ist Myt1 im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi Apparat membranständig lokalisiert⁷⁷. Bindung von Myt1 an den Cdk1/CycB Komplex findet ausschließlich im Zytoplasma statt, wodurch ein vorzeitiger Eintritt des Komplexes in den Zellkern und damit ein Voranschreiten des Zellzyklus vermieden wird.

In einem mathematischen Vorhersagemodell des G2-Checkpoints führte eine Myt1-Minderung zu einer Anreicherung von Cdk1/CycB im Nukleus⁷⁸. Die Überexpression von Myt1 verhinderte den Eintritt in die Mitose. Diese Ergebnisse unterstreichen die Notwendigkeit an selektiven Inhibitoren zur Verifizierung derartiger Modelle^{79,80,81}.

Myt1 hat darüber hinaus auch Einfluss auf die intrazelluläre Membrandynamik⁸². Es gibt Hinweise, dass Myt1 eine zentrale Rolle bei der Regulierung derartiger Prozesse spielt. Myt1-Minderung durch RNA-Interferenz in somatischen Säugertierzellen (HeLa) resultierte in einer dramatisch veränderten Morphologie des Golgi-Apparates in Form von nicht-ribbonsondern membranartigen Strukturen in der Nähe des Zellkerns. Diese Zellen zeigten eine verzögerte Proliferationsrate und starben innerhalb von 10 Tagen. Auch wurden Auswirkungen auf die Golgi Rekonstruktion beobachtet, wenn der bekannte Wee1- und Myt1-Kinase-Inhibitor PD166285 zu derartigen Zellen gegeben wurde⁸³.

In Säugerzellen kommt es während der Prometaphase zur Fragmentierung des Golgi-Apparates in Tausende von Vesikeln und Tubuli, während in der Telophase diese wieder schnell zusammengefügt werden müssen⁸⁴. Diese Golgi Fragmentierung dient zur gleichmäßigen Aufteilung der Golgi Membranen zwischen den beiden Tochterzellen bei der Zellteilung und ist ein bedeutender Schritt für die mitotische Progression^{85,86}. Während der Interphase ist Myt1 nicht direkt am Aufbau der Golgi-Struktur beteiligt, allerdings wird sie für die Fragmentierung in G2 und die Golgi Rekonstruktion während der Telophase benötigt. Der Golgi-Apparat ist eng mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) verbunden⁸⁷. Myt1 ist somit auch von großer Bedeutung für die Rekonstruktion des ER, speziell beim M/G1-

Übergang, eine Minderung hier führt zu einer Störung der ER-Struktur. Die mitotische Golgi Fragmentierung hängt in Säugerzellen von Cdk1 und der vollständige Suppression der Cdk1/CycB-Aktivität durch inhibitorische Phosphorylierung am Ende der Mitose Phase ab, Myt1 unterstützt die Golgi- und ER-Rekonstruktion^{88,89}.

Die beobachtete inhibitorische Cdk1 Phosphorylierung am Ende der Mitose-Phase ist auch ein Teil eines alternativen mitotischen Ausstiegsmechanismus im Falle eines gestörten CycB-Abbaus (M/G1-Übergang)^{90,91}. Da in G1 die Phosphorylierungen von Cdk1 diese im inaktiven Zustand hält führt ein Wegfall dieser inhibitorischen Phosphorylierung zwangsläufig zu einem schnelleren G1/S Übergang oder einem direktem G1-M-Phasenübergang⁹².

Bemerkenswert ist, dass die Myt1-vermittelten Effekte auf die Golgi-Fragmentierung und G1-Regulation unabhängig von Cdk1 verlaufen. Myt1 wird in der Mitose-Phase durch Hyperphosphorylierung inaktiviert, wird aber kurz nach dem mitotischen Ausgang aktiviert. Für Myt1 müssen neben den Cdk1/Cyc-Komplexen zukünftig noch andere spezifische *in vivo* Targets identifiziert werden, die eine direkte G1- und Membrandynamik-Regulierung ermöglichen.

Im Falle von DNA-Schäden in einer Zelle in der G2-Phase kommt es zum Zellarrest durch posttranslationale Modifikationen. Sobald die beschädigte DNA repariert wurde kann die Zelle den Zellzyklus wieder aufnehmen - ein Prozess, der als *checkpoint recovery* bezeichnet wird⁹³.

Beim ungestörten Zellzyklus spielt Myt1 eine eher geringfügige Rolle wogegen sie eine wesentliche Rolle beim *G2-checkpoint recovery* spielt. Diese Funktion von Myt1 ist komplett unabhängig von Wee1. Es wird vermutet, dass beim G2-Checkpoint Cdk1 durch eine verstärkte Wee- und reduzierte Cdc25-Phosphatase-Aktivität in einem Thr14- und Tyr15-phosphorylierten, inaktiven Zustand vorliegt. Plk1 ist ein wichtiger Regulator der G2 Checkpoint-Wiederherstellung indem sie die Aktivierung von Cdc25 und Inaktivierung von Wee1 vermittelt. Myt1 wird von Plk1 durch direkte Phosphorylierung negativ reguliert. Die Downregulation von Myt1 forciert somit die *checkpoint recovery* und den Mitoseeintritt.

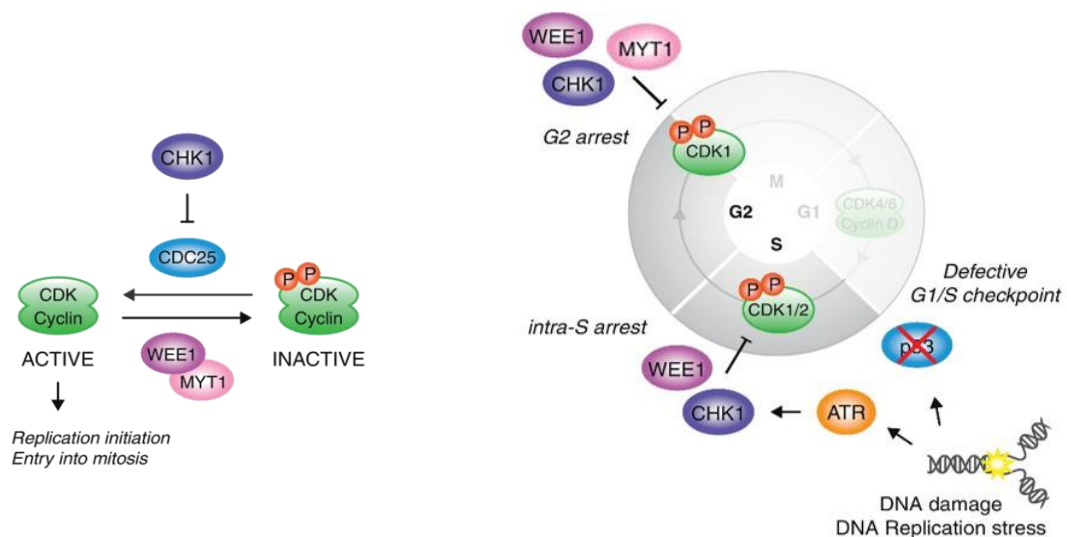


Abb. 5: Rolle der Myt1-Kinase im Zellzyklus verändert nach Aarts et al. (2013)⁹⁴

In mehr als der Hälfte aller Fälle menschlicher Onkogenese werden Mutationen von p53, einem Protein von großer Bedeutung für den G1-Kontrollpunkt, beobachtet⁹⁵. Aufgrund dieser Mutationen des p53-Netzwerks weisen viele Krebszellen im Vergleich zu normalen Zellen defekte G1 Checkpoint Mechanismen auf, die dann zu erhöhten DNA-Schäden am G2-Kontrollpunkt führen können⁹⁶. Die selektive G2-Checkpoint Aufhebung, bei dem der Signalweg nicht durch p53 gestört wird, sollte demnach normale Zellen nicht schädigen, da sie einen anderen, p53-abhängigen Weg haben, den Zellzyklus zu diesem Zeitpunkt zu stoppen.

Deshalb ist eine neue Strategie der selektiven Sensibilisierung entwickelt worden, welche die Checkpoint Aufhebung mit DNA-schädigenden Mitteln oder Bestrahlung kombiniert^{97,98}. Die Aufhebung des G2-Kontrollpunktes zwingt Zellen mit nicht reparierten DNA-Schäden in die vorzeitige M-Phase. Diese Checkpoint-Aufhebung kann durch pharmakologische Manipulation induziert werden, was zur mitotischen Katastrophe und Apoptose führt, wenn das Ausmaß der nicht reparierten DNA-Schäden einen gewissen Schwellenwert überschreitet^{99,100,101}. Die Kontrollpunkt-Aufhebung ist Voraussetzung für die mitotische Katastrophe, die sowohl in den apoptotischen als auch nicht-apoptotischen Zelltod führt^{102,103}.

Zellen mit intaktem G1 Checkpoint Arrest, wie normale Zellen oder Krebszellen mit intaktem p53-Signalweg, sind weniger abhängig vom G2-Checkpoint und daher auch nicht so empfindlich gegenüber einer G2-Kontrollpunkt Aufhebung¹⁰⁴. Vorgeschlagene bzw. bestätigte Targets für eine G2-Kontrollpunktaufhebung und damit Einleitung der mitotischen Katastrophe sind Wee1, Myt1, Chk1 und Hsp90^{105,106}.

3.3 Inhibition von Kinasen der Wee-Familie

Wie in Kapitel 3.1 und 3.2 beschrieben führt eine Hemmung der Wee-Kinasefamilie zu einer vorzeitigen Aktivierung der Cdk1 und damit zur mitotischen Katastrophe. Geeignete Inhibitoren wären somit in der Lage, schnell proliferative Zellen abzutöten und den Zellzyklus zu beeinflussen. Die Einführung des ersten selektiven Wee1-Inhibitors MK-1775 im Jahre 2009 ermöglichte die Überprüfung dieses Konzepts¹⁰⁷. Mittlerweile ist MK-1775 in 23 klinische Phase-I und II Studien und alle experimentellen biologischen und medizinischen Forschungsergebnisse belegen bisher eine Verifizierung besagter Hypothese^{108,109,110,111,112,113,114}. So waren mit MK-1775 behandelte Zellen, die shRNA gegen p53 exprimieren, gegen Gemcitabin, Carboplatin oder Cisplatin deutlich empfindlicher¹¹⁵. Dagegen war die Wirkung der Monotherapie mit MK-1775 eher moderat. Auch verbesserte sich mit MK-1775 die zytotoxische Wirkung von 5-Fluorouracil (5-FU) in p53-defizienten Dickdarm- und Pankreaskrebszellen¹¹⁶. Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten für Kombinationen mit Gemcitabin, Doxorubicin, Carboplatin und Cisplatin¹¹⁷. In vorklinischen Untersuchungen konnte die Kombination der Radiotherapie mit MK-1775 bei Fällen pädiatrischer Hirntumore deutliche Vorteile gegenüber einer Monotherapie zeigen¹¹⁸. Weitere Beispiele, wie die Kombination des Chk1-Inhibitors Panobinostat mit MK-1775 bei der Behandlung von Tumoren der Bauchspeicheldrüse oder die Kombination von MK-1775 mit dem Chk1/2 Inhibitor AZD7762 bei der Behandlung des malignen Melanoms,

verdeutlichen die synergistischen Effekte der Kombination etablierter Therapien mit neuartigen Ansätzen^{119,120}.

Ähnlich wie beim Wee1-Knockdown wird durch Myt1-Knockdown der G2/M-Übergang beeinflusst indem der verfrühte Eintritt in die Mitose oder die gesamte Checkpoint-Aufhebung gefördert wird^{121,122}. Auch in HeLa-Zellen wurde der Doxorubicin-induzierten G2-Arrest aufgehoben wenn Myt1 inhibiert wurde. Die Downregulation der Myt1 verkürzt die Zeit zwischen Checkpoint und Mitose-Eintritt, wodurch sich auch die sich anschließenden Zelltodrate erhöht. Deshalb stellt Myt1 ein nützliches Target in der Tumorthherapie da, zumal sie eine relative geringe Bedeutung für die normale Zellzyklus-Progression hat¹²³. Die Inhibition von Zellzyklusabschnitten, die für den normalen Ablauf des Zellzyklus wichtig sind, dürfte somit zu toxisch für normale Zellen sein und ist damit für eine Therapie ungeeignet.

Im Jahre 2012 wurde die Entwicklung eines HTS siRNA für myeloische Leukämiezellen beschrieben¹²⁴. Mittels RNA Interferenz Screening wurde die Beteiligung von 572 Kinasen bei der Behandlung verschiedener myeloischer Zelllinien *ex vivo* mit Cytarabin (Ara-C) im Sinne eines *loss-of-function* Prinzips der jeweiligen Kinase-mRNA untersucht. Dabei wurden Myt1, Chk1 und ATR als klinisch relevante Hits identifiziert, deren gezielte Inhibition in Kombination mit Ara-C eine Möglichkeit für eine rationale Therapie von myeloischen und lymphoischen Leukämieformen darstellt.

Allein aufgrund der Tatsache, dass für Myt1 kein selektiver Inhibitor existiert, wurde der strukturähnlichste und familiär verwandteste Vertreter Wee1, für den bekanntlich MK-1775 als selektiver Inhibitor existiert, in die Untersuchungen mit einbezogen. Die Behandlung von 8 akuten myeloischen Leukämie- (AML), akuten lymphoblastischen Leukämie-(ALL) und chronischen myeloischen Leukämie-(CML) Zelllinien mit MK-1775 bestätigte die Steigerung der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Ara-C um bis zu dem 97-fachen, *ex vivo*. Die Viabilität in 13 von 14 Patientenproben mit AML, CML und myelodysplastischen Syndrom wurde drastisch gesenkt im Vergleich zu einer Ara-C Monotherapie. Ein Fakt, der hohe Erwartungen hinsichtlich Myt1-Inhibition bei zukünftigen Krebstherapieschemen erweckt.

Im Gegensatz zu Wee1 sind derzeit also für den zweiten Vertreter der Wee-Kinasefamilie, der Myt1, keine selektiven Inhibitoren bekannt. Im Jahre 2005 wurde von *Zhou et al.* ein hochselektiver und wirksamer Inhibitor für Myt1 in Form eines nativen Glycoglycerolipids aus marinen Algen, dem 1,2-Dipalmitoyl-3-(N-palmitoyl-6'-amino-6'-deoxy- α -D-glucosyl)-sn-glycerol, publiziert, der einen starken inhibitorischen Effekt auf Myt1 (IC_{50} 0.12 μ g/ml) haben sollte und zusätzlich eine hohe Selektivität gegenüber anderen Kinasen wie Akt and Chk1 aufweist¹²⁵. Allerdings waren weitere Ergebnisse von Arbeiten zu einigen bekannten ATP-kompetitiven Kinase-Inhibitoren an Myt1 eher widersprüchlich^{126,127}.

Die rationale Entwicklung eines selektiven Inhibitors erfordert ein profundes Wissen auf molekularer Ebene. Die Identifizierung der chemischen Struktur des Target-Proteins ist ein wichtiger Schritt, um Einblicke in die molekularen Mechanismen zu bekommen, was dann wieder um Voraussetzung für die Entwicklung von Substanzen mit sowohl hoher Wirksamkeit als auch Selektivität ist. Insofern sind Inhibitoren unverzichtbar für die Beurteilung der tatsächlichen biologischen Rolle und *druggability* eines gegebenen Zielproteins.

Um diesen Ansprüchen gerecht zu werden musste das bis *dato* nicht kommerziell erhältliche Zielprotein Myt1 in ausreichender Menge vorliegen. Dies erforderte sowohl die Expression und Aufreinigung der Kinase in Volllänge und Kinase-Domäne als auch die biochemische und kinetische Charakterisierung und Optimierung. Voraussetzung für ein Inhibitorscreening ist des Weiteren die Entwicklung und Validierung geeigneter Assays. Computergestützte Methoden zur Inhibitorfindung sollten die Generierung von Pharmakophormodellen und Docking Komplexen ermöglichen, die für das virtuelle Screening verschiedener Datenbanken eingesetzt werden können. Die als Ergebnis dieser *in silico* Arbeiten erhaltenen putativen Inhibitoren sollten durch pharmazeutische Wirkstoffsynthese optimiert werden.

3.4. Molekularer Aufbau und Funktion einer Proteinkinase am Beispiel der Myt1

Der Aufbau einer Kinase ist grundlegend für das Verständnis der Kinasefunktion. Über 90 % aller bisher bekannten Proteinkinasen sind durch eine hohe strukturelle Übereinstimmung der katalytischen Domäne des Enzyms charakterisiert. Funktionell ist diese für die Übertragung eines γ -Phosphatrestes des ATP auf die Hydroxyl-Funktion eines Serins, Threonins oder Tyrosins eines peptidischen Substrates verantwortlich. Strukturell ist die katalytische Domäne in drei Regionen unterteilt: die N-terminale und C-terminale Region, sowie die verbindende Scharnierregion, auch bezeichnet als *Hinge*-Region. Die kleinere N-terminale Region besteht vorwiegend aus antiparallelen β -Faltblättern, während die größere C-terminale Region von α -Helices dominiert wird und bei der Substratbindung, sowie Katalyse beteiligt ist. Diese Einteilung ist in Abbildung 6 am Beispiel der Kristallstruktur der Myt1-Kinase (PDB: 31P1A) ersichtlich.

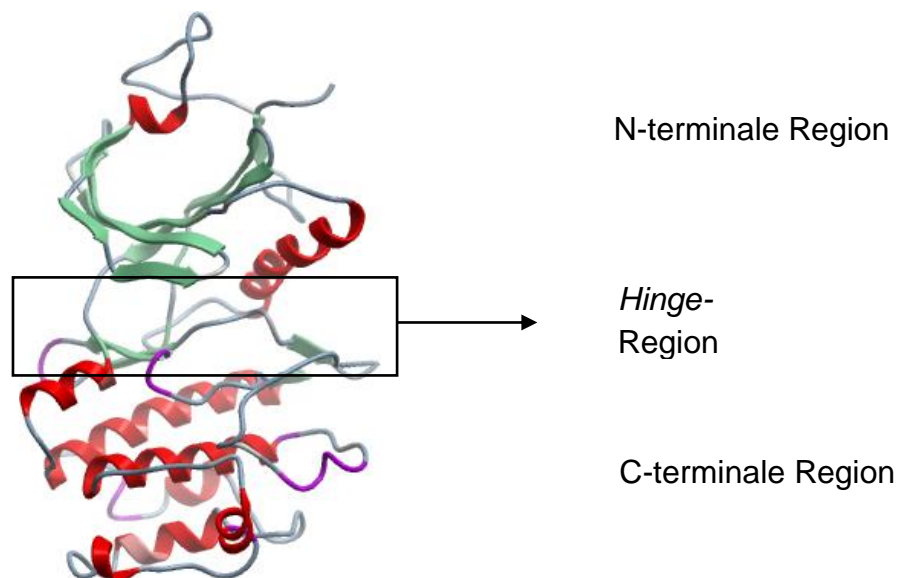


Abb. 6: Kristallstruktur der katalytischen Domäne der Myt1 (PDB: 31P1A)¹²⁸

In der ATP-Bindungstasche wird ATP als Phosphat-Donor mit Magnesiumionen komplexartig gebunden, das Peptidsubstrat wird fixiert und ausgerichtet und schließlich das besagte γ -Phosphat auf die Hydroxylgruppe des Akzeptors übertragen. Innerhalb der ATP-

Bindungstasche unterscheidet man zwischen der Adenin-Region, der Zucker-Region, der Phosphat-Region, einer hydrophoben und einer hydrophilen Region. In der Adenin-Region bindet das Adenin-Ringsystem des ATP über Wasserstoffbrückenbindungen an das Grundgerüst der *Hinge*-Region des Enzyms. Zusätzlich stabilisieren hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem aromatischen Ringsystem und Domänen der N- und C-terminalen Region die Position des ATP in der Bindungstasche. Die Adenin-Bindungsregion gilt als hoch konserviert. In der polaren Zucker-Region kommt es zur Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit einer Hydroxylfunktion der Riboseeinheit des ATPs. Die Phosphat-Region ist eine hoch konservierte, polare Domäne, die sich in die Glycin-reiche Schleife und eine α -Helix unterteilt. Die Glycin-reiche Schleife ist konformationell flexibel, wogegen die α -Helix für die Koordination und räumliche Ausrichtung der Phosphatgruppe sorgt. Das konservierte DFG-Motif ist von entscheidender Wichtigkeit für den katalytischen Mechanismus. Der Aspartat-Rest des DFG-Motifs koordiniert das Magnesiumion, was wiederum die Phosphatgruppe des ATPs fixiert. Hier erfolgen der nukleophile Angriff der Hydroxylfunktion des Substrates und die Übertragung des γ -Phosphatrestes über einen trigonalen Übergangszustand. Die hohe Flexibilität dieser Region ermöglicht die Unterscheidung zweier Konformationen, DFG-in und DFG-out (*Gatekeeper*), die zur Unterscheidung der aktiven und inaktiven Konformation einer Kinase führt. Diese unterschiedlichen Konformationen ermöglichen den Zugang zur sogenannten hydrophoben Tasche. Die hydrophobe Region stellt eine große Kavität an der Rückseite der ATP-Bindungsstelle dar. Ihre Sequenzdiversität ermöglicht eine Selektion der sonst konstitutionell sehr ähnlichen Kinasen. Die hydrophile Region ermöglicht die Solvatisierung mit Wassermolekülen¹²⁹.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die ATP-Bindungsstelle eines Großteils der Kinasen hoch konserviert ist und somit eine Unterscheidung über die Funktionalität im Sinne einer Selektivität eine Herausforderung darstellt.

3.5 Kinaseinhibitoren

Prinzipiell kann man bei der Inhibition einer Proteinkinase zwischen einer reversiblen oder einer irreversiblen Hemmung unterscheiden. Bei der irreversiblen Hemmung bindet der Inhibitor kovalent an das Enzym und führt entweder zu einem nicht mehr veränderbaren Aktivitätsverlust oder einem komplett inaktiven Zustand. Bei der reversiblen Hemmung findet keine kovalente Bindung statt, weshalb diese wieder aufgehoben und so die Funktionstüchtigkeit wieder hergestellt werden kann. Desweiteren unterscheidet man zwischen dem jeweiligen Bindungsort des Inhibitors. Der Inhibitor kann entweder im aktiven Zentrum oder außerhalb angreifen. Erfolgt die Anlagerung außerhalb des aktiven Zentrums, spricht man von allosterischer Hemmung. Hier unterscheidet man zwischen einer reversiblen, sowie einer irreversiblen Form. Bei der Anlagerung im aktiven Zentrum spricht man auch von kompetitiver Hemmung, da der Inhibitor entweder mit dem Substrat oder dem Cosubstrat konkurriert.

Auf der Suche nach geeigneten Kinaseinhibitoren trifft man auf verschiedene Herausforderungen. Bei Inhibitoren, die auf der Konkurrenz mit dem Substrat an der

Substratbindetasche basieren, muss man die Größe des Substrates sowie deren Bindungsfläche berücksichtigen. Da die Substrate meist andere, große Proteine sind, ist es schwierig, einen geeigneten Inhibitor zu finden, weil die Komplexität mit der Größe der Bindungsfläche steigt. Durch eine hohe Bindungsfläche wird allerdings eine hohe Selektivität gewährleistet.

Die allosterische Hemmung hat hingegen den Vorteil der kleineren Inhibitoren. Deren Bindungsstelle ist vom aktiven Zentrum entfernt und hat dadurch den weiteren Vorteil, dass der Inhibitor nicht mit anderen Substraten konkurrieren muss. Außerdem unterscheiden sich derartige Bindungsstellen strukturell oft deutlich, womit eine Selektion zwischen strukturell sonst ähnlichen Kinasen möglich ist. Allerdings gestaltet sich die Suche nach allosterischen Inhibitoren als schwierig. Ein literaturbekanntes Beispiel für einen allosterischen Inhibitor ist BIRB796 für die p38 MAP Kinase¹³⁰.

Somit bleibt die Möglichkeit der Inhibition durch Konkurrenz mit dem Cosubstrat. Dieses Prinzip hat ebenfalls den Vorteil der kleinen Bindungsstelle, was wider um die Entwicklung sogenannter *small molecule inhibitors* ermöglicht. Da allerdings alle Proteinkinasen ATP als Cosubstrat verwenden, ist es schwierig, eine ausreichend hohe Selektivität zu erreichen. Diese wird jedoch benötigt, um im späteren klinischen Anwendungsbereich Nebenwirkungen zu reduzieren. Eine Spezifikation bzw. Selektion kann somit nur erreicht werden, in dem die Affinität des möglichen Inhibitors zu nicht konservierten Domänen der ATP-Bindungsstelle (siehe Kapitel 3.4) erhöht wird.

Bei Kinaseinhibitoren unterscheidet man zwischen Typ I, II, III, IV und V Inhibitoren¹³¹. Typ I Inhibitoren binden in der aktiven Kinasekonformation (DFG-in) kompetitiv an der ATP-Bindungsstelle und nutzen die Adeninbindungstasche aus. Ein Beispiel hierfür ist Dasatinib¹³². Typ II Inhibitoren wurden mit der Entdeckung von Imatinib definiert¹³³. Imatinib bindet ebenfalls in der Adeninbindungstasche, bekommt jedoch seine Selektivität durch eine zusätzliche Bindung mit einer hydrophoben Bindungstasche. Diese ist erst in der inaktiven Konformation zugänglich, ermöglicht durch die Drehung einer Einfachbindung des Phenylalanins des DFG-Motives der Bindungsdomäne (DFG-out)¹³⁴. Inhibitoren, die in der DFG-in Konformation binden, aber auf Grund der räumlichen Limitierung des Gatekeepers, z.B. durch Austausch von Threonin gegen Phenylalanin, gleichzeitig die hydrophobe Domäne adressieren können, werden als Typ I $\frac{1}{2}$ bezeichnet¹³⁵. Typ III Inhibitoren binden außerhalb der ATP-Bindungsstelle nur an der hydrophoben Bindungstasche in der DFG-out Konformation. Somit üben diese Inhibitoren eine nicht-kompetitive Hemmung aus¹³⁶. Ein Beispiel für solch einen Inhibitor ist das erstmals für cSrc publizierte Molekül RL37. Typ IV Inhibitoren binden an einer allosterischen Bindungstasche außerhalb der katalytischen Domäne, zum Beispiel einer regulatorischen Domäne¹³⁷. Typ V Inhibitoren sind bivalente Inhibitoren, die also zwei Liganden binden. Einer der Liganden kann beispielsweise kompetitiv an die Adeninbindungstasche, der zweite daraufhin in kovalent gebundener Reichweite binden¹³⁸. Typ V Inhibitoren sind äußerst vielversprechend, da sie sehr selektiv sind und somit viele Nebenwirkungen vermieden werden können.

3.6 Ergebnisse der Forschungsarbeiten

3.6.1 Neosynthese von 1,2-Dipalmitoyl-3-(N-palmitoyl-6'-amino-6'-deoxy- α -D-glucosyl)-sn-glycerol und Derivatisierung

Wie in Kapitel 3.3 beschrieben wurde im Jahre 2005 das native, aus marinen Algen isolierte 1,2-Dipalmitoyl-3-(N-palmitoyl-6'-amino-6'-deoxy- α -D-glucosyl)-sn-glycerol als erster hochselektiver und wirksamer Inhibitor von humaner Myt1 Kinase zunächst zur Leitstruktur für nachfolgende Strukturmodifikationen. In Aussicht auf eine mögliche Referenzsubstanz wurde für die Neosynthese ein 13-stufiges Synthesekonzept erarbeitet. Unter retrosynthetischen Gesichtspunkten wurde die Synthese in drei wichtige Abschnitte untergliedert. Der erste Abschnitt erforderte die Darstellung eines partiell geschützten 6-Glucosaminderivats, der zweite Schritt umfasste das Glycosylierungsverfahren unter stereochemischer Kontrolle. Im dritten Teil erfolgte die Einführung der Fettsäurereste zum Glycoglycerolipid.

Die Ergebnisse zu diesen Arbeiten wurden publiziert in: *First total synthesis of 1,2-dipalmitoyl-3-(N-palmitoyl-6'-amino-6'-deoxy- α -D-glucosyl)-sn-glycerol – a glyco-glycerolipid of a marine alga with a high inhibitor activity against human Myt1-kinases; Christiane Göllner, Claudia Philipp, Bodo Dobner, Wolfgang Sippl and Matthias Schmidt; Carbohydrate Research (2009), 344, 1628–1631.*

<http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.022>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621509002444>

Die erarbeitete Strategie erlaubte in weiterführenden Arbeiten die selektive Modifikation definierter Strukturen im Molekül, mit dem Ziel, innerhalb des Moleküls die Substitutionen des Kohlenhydratbausteins, der Kettenlänge und die Darstellung der Anomeren vorzunehmen¹³⁹ (siehe Ergebnisse Kapitel 3.6.3). Mit Hilfe von Modelling-Studien wurde neue Strukturen entwickelt, die eine Glycopyranose als Kernstruktur enthalten, die über verschiedene Abstandshalter über die Position C-1 mit einem N-haltigen Heterozyklus verknüpft ist¹⁴⁰. Ebenso auf Computer-gestützten Methoden basierend wurden neuartige Glycotriazol-Derivate entwickelt, die über die Position C-1 oder C-6 mit dem Zucker verknüpft sind¹⁴¹.

3.6.2 Untersuchungen zur Substraterkennung und –akzeptanz von humaner Myt1 Kinase

Für die biologische Evaluierung dieser Verbindungen war zunächst die erfolgreiche Präparation der humanen Myt1-Kinase erforderlich. Es wurden zwei Methoden zur Kinase-Präparation erarbeitet, da, wie bereits erwähnt, aktive, humane Myt1 Kinase derzeit kommerziell nicht verfügbar war. Allgemein gibt es bei der Arbeit mit membranassoziierten Enzymen die Möglichkeit der Isolation von Kinase in Volllänge (*fulllength-fl*) und Solubilisierung mit geeigneten Detergenzien einerseits oder andererseits das Arbeiten mit einem auf die Kinasedomäne reduzierten Enzymfragments.

Die Myt1-Kinase in Form ihrer Volllänge (*flMyt1*) wurde in unserer AG durch Expression in humanen Zellen (HEK293), mittels transienter Expression als His6-Fusionsprotein, realisiert. Weiterhin wurde ein Myt1-Fragment bestehend aus der Kinase-Domäne (*kdMyt*¹⁷⁵⁻³⁶²) etabliert, das ebenfalls am N-Terminus einen His6-tag enthält. Die Domäne wurde in einem Vektor (pET28 Plasmid) kloniert und mittels Elektroporation in *E.coli* BL12 transformiert.

Zur Etablierung eines geeigneten Assays wurden *in vitro* und *in silico* Untersuchungen hinsichtlich Substraterkennung durch humane Myt1 durchgeführt. Zunächst wurde die Aktivität der Kinase am natürlichen Substrat Cdk1/CycB1 (M-Phase promoting factor=MPF) und an Cdk1 alleine nachgewiesen. Phosphorylierungsreaktionen an Thr14 und Tyr15 wurden mittels *western blot* Analyse mittels anti-pThr14-Cdk1- und anti-pTyr15-Cdk1-Antikörpern für beide Substrate detektiert¹⁴².

In Hinblick auf die Entwicklung eines Aktivitätsassays wurden verschieden kurzkettige Peptidsequenzen, die sich vom natürlichen Substrat Cdk1 ableiteten, auf Verwendung als mögliches Modellsubstrat untersucht. Weiterhin wurden rigidere Strukturen, wie das Polypeptide Poly-AEKY (30 kDa), untersucht. Allerdings konnte für keines der untersuchten Peptide eine Phosphorylierung durch flMyt1 detektiert werden. Daraufhin wurde die Kinasedomäne (Myt¹⁷⁵⁻³⁶²) hinsichtlich Aktivität an besagten Modellpeptiden untersucht. Die C-terminale Region (AS 437 – 499) gilt als verantwortliche Region für die Erkennung des nativen Cdk1/CycB1 Komplex. Insofern sollte ein Fehlen dieser Sequenz einen Substraterkennungsprozess verhindern. Tatsächlich zeigte die Kinasedomäne keine detektierbare Aktivität gegenüber Thr14 oder Tyr15, was zu dem Schluss führte, dass die Erkennung von Substraten durch Volllänge-Kinase (flMyt1) von hoher Komplexität sein muss. Die humane Myt1 Kinase ist bezüglich Substratakteptanz äußerst restriktiv.

Die Ergebnisse zu diesen Arbeiten wurden publiziert in: *In vitro and in silico studies on substrate recognition and acceptance of human PKMYT1, a Cdk1 inhibitory kinase*, Alexander Rohe, Frank Erdmann, Claudia Bäßler, Kanin Wichapong, Wolfgang Sippl, Matthias Schmidt; *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*(2012), 22, 1219–1223.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2011.11.064>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X11016088>

3.6.3 Entwicklung eines TR-FRET basierenden Bindungsassays

Da zunächst, wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, die restriktive Substratakzeptanz der humanen Myt1 die Entwicklung eines Aktivitätsassays verhinderte, wurde an Stelle dessen zunächst ein Bindungsassay eingesetzt. Dabei handelte es sich um einen *LanthaScreen*[®] Eu Kinase Bindungsassay der Firma *Invitrogen*. Das Prinzip dieses Assays beruht auf der Bindung des Tracers Alexa Fluor[®] an die Kinase, welche durch Zugabe eines Eu-gelabelten anti-His-tag Antikörpers detektiert wird. Die Bindung des Tracers und des Antikörpers an die Kinase resultiert in einem Anstieg des FRET-Signals, wogegen die Verdrängung des Tracers von der Kinase mit einem geeigneten Inhibitor durch den Abfall des FRET-Signals angezeigt wird. Da bis zu diesem Zeitpunkt keine Daten zu bekannten Inhibitoren der humanen Myt1 vorlagen untersuchten wir zunächst sowohl bekannte Pan-Kinaseinhibitoren, wie Staurosporin, als auch selektivere, verfügbare Verbindungen wie Lapatinib und Imatinib, um ein erstes Inhibitionsprofil zu erhalten. Erstaunlicherweise hemmte Staurosporin und Derivate (z.B. K252a) bis zu einer Konzentration von 10 μ M die Kinase nicht. Auch andere bekannte Kinaseinhibitoren (Sunitinib) zeigten keinen Effekt. Lediglich Tyrphostin AG1478 und U0126 zeigten eine schwache Verdrängung des Tracers, wogegen PD0166285 (IC₅₀ 7.2 nM) und Dasatinib (IC₅₀ 63nM) einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf Myt1 aufwiesen. Die in Kapitel 3.6.1 beschriebenen Derivate des Glycoglycerolipids zeigten im Bindungsassay keine Verdrängung des Tracers was zunächst auf eine allosterische Bindung abseits der ATP-Bindungsstelle im Sinne eines Typ III oder IV-Inhibitors schließen lässt.

Die Ergebnisse zu diesen Arbeiten wurden publiziert in: *Evaluation of potential Myt1 kinase inhibitors by TR-FRET based binding assay; Alexander Rohe, Christiane Göllner, Kanin Wichapong, Frank Erdmann, Ghassab Al-Mazaideh, Wolfgang Sippl, Matthias Schmidt; Eur. J. Med. Chem. (2013), 61, 41-48.*

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.007>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0223523412003595>

3.6.4 Entwicklung eines Fluoreszenzanisotropie basierenden Bindungsassays

Der von uns entwickelte TR-FRET-Bindungsassay erschien auf Grund des Eu-gelabelten Antikörpers und der undefinierten chemischen Struktur des kommerziellen Tracers limitiert. Deshalb wurde nach einer alternativen Assaymethode gesucht. Für Bindungsmessungen ist Fluoreszenzanisotropie eine geeignete Technik. Dabei wird ein bekannter ATP-kompetitiver Inhibitor mittels eines Fluorophors chemisch modifiziert. Die so erhaltene Sonde hat ein niedriges Fluoreszenzanisotropie-Signal, welches durch Bindung an die Kinase deutlich ansteigt. Eine Verdrängung dieser Sonde von der ATP-Bindungsstelle mittels eines geeigneten Inhibitors verringert das Signal wiederum, dessen Änderung mit der Inhibitionsstärke somit korreliert. Ausgangspunkt bei der Adaption dieses Assayprinzips an unsere Problematik war der bekannte Kinaseinhibitor Dasatinib, der wie beschrieben in vorangegangenen Untersuchungen mit einem IC_{50} von 63 nM als Inhibitor der humanen Myt1 identifiziert wurde. *Molecular docking* Studien und verfügbare Röntgenstrukturen von Dasatinib ließen den Schluss zu, dass die Hydroxyethyl-Gruppe von Dasatinib als hydrophile Struktur bei der Bindung an Myt1 Solvenz-exponiert ist und somit kein größerer, negativer Effekt auf die Bindungseigenschaften von Dasatinib zu erwarten wären, wenn man besagte Struktur kovalent mit einem geeigneten Fluorophor derivatisiert. Der sodann Fluoreszenzgelabelte Tracer schuf mit einem K_d von 130nM die Basis für die Entwicklung des ersten Fluoreszenzanisotropie-basierten Bindungsassays für humane Myt1 (Kinasedomäne). Die Validierung des Assayprinzips mit bekannten Inhibitoren und die exzellente Übereinstimmung dieser Daten für Myt1-Kinasedomäne mit denen der Volllänge belegten die grundsätzliche Anwendbarkeit des Verfahrens für derartige Screening-Vorhaben.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden publiziert in: *A Fluorescence Anisotropy-Based Myt1 Kinase Binding Assay*; Alexander Rohe, Claudia Henze, Frank Erdmann, Wolfgang Sippl, Matthias Schmidt; *Assay and Drug Development Technologies* (2014), 12, 136–144.

<http://doi:10.1089/adt.2013.534>

<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/adt.2013.534>

3.6.5 Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von Glykoglycerolipiden

Somit lagen vom Methodenspektrum her zwei Bindungsassays für sowohl Volllänge- als auch Kinasedomäne-Myt1 basierend auf unterschiedlichen analytischen Prinzipien vor. Dieses Spektrum wurde durch einen funktionellen Assay erweitert, indem die Aktivität von flMyt1 durch Phosphorylierung des natürlichen Substrates Cdk1 mittels *SDS-page* und *Western blot* Analyse detektiert wurde. Hierbei kamen sowohl ein anti-Cdk1 Antikörper als auch ein anti-phospho-Cdk1(Tyr15) Antikörper zur Anwendung. Durch Kombination dieser Methoden wurde das bis *dato* von unserer Arbeitsgruppe neu synthetisierte, aber noch nicht als aktiv getestete Glykoglycerolipid von *Zhou et al.*¹²² hinsichtlich seiner Aktivität gegenüber humaner Myt1 analysiert. Bedauerlicherweise musste festgestellt werden, dass 1,2-Dipalmitoyl-3-(N-palmitoyl-6'-amino-6'-deoxy- α -D-glucosyl)-sn-glycerol doch kein Inhibitor der humanen Myt1 Kinase ist.

Die Ergebnisse zu diesen Arbeiten wurden publiziert in: *The glyco glycerolipid 1,2-dipalmitoyl-3-(N-palmitoyl-6'-amino-6'-deoxy- α -D-glucosyl)-sn-glycerol is no inhibitor of the human Myt1 kinase; Alexander Rohe, Christiane Göllner, Frank Erdmann, Wolfgang Sippl, Matthias Schmidt; J. Enzyme Inhib. Med. Chem.(2015), 30, 514-517.*

<http://doi:10.3109/14756366.2014.926343>

<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/14756366.2014.926343>

3.6.6 Liganden Docking in Kombination mit QM/MM-GBSA, MM-GBSA und MM-PBSA Methoden zum Struktur-basierten Drugdesign

Das weiterhin vorherrschende Defizit an geeigneten Inhibitoren der humane Myt1 war Anlass, weiteren Fragenstellungen des Struktur-basierten Drugdesigns nachzugehen. So wurde ein Liganden Docking in Kombination mit QM/MM-GBSA, MM-GBSA und MM-PBSA Methoden genutzt, um aktive von inaktiven Myt1 Kinaseinhibitoren zu unterscheiden. Die Ergebnisse zeigten, dass die QM/MM-GBSA Methode als am besten geeignet erschien. Drei Verbindungen des durchgeführten virtuellen Screenings zeigten eine signifikante Inhibition von Myt1. PD-173952 unterstrich mit einem K_i -Wert von 8.1 nM die Anwendbarkeit des Protokolls. Weiterhin zeigten zwei Verbindungen, PD-180970 und Saracatinib, eine Inhibition im niedrigen mikromolaren Bereich. Die durchgeführten computergestützten *in silico* Untersuchungen erweitern das Methodenspektrum und bilden die Grundlage für ein rationales Design weiterer Leitstrukturen.

Die Ergebnisse zu diesen Arbeiten wurden publiziert in: *Application of Docking and QM/MM-GBSA Rescoring to Screen for Novel Myt1 Kinase Inhibitors*; Kanin Wichapong, Alexander Rohe, Charlott Platzer, Inna Slynko, Frank Erdmann, Matthias Schmidt, Wolfgang Sippl; *J. Chem. Inf. Mod.* (2014), 54, 881-893.

<http://doi/abs/10.1021/ci4007326>

<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ci4007326>

3.6.7 Identifizierung von Peptid-Substraten mittels Peptid-Microarray als Grundlage zur Entwicklung eines Aktivitätsassays

Für die Identifizierung potentieller Inhibitoren der humanen Myt1 Kinase standen bisher zwei Bindungsassays für sowohl Volllänge- als auch Kinasedomäne-Myt1 basierend auf unterschiedlichen analytischen Prinzipien vor (siehe Kapitel 3.6.3 und 3.6.4). Ergänzt wurde das Methodenspektrum durch den funktionellen Assay, bei dem die Aktivität von flMyt1 durch Phosphorylierung des natürlichen Substrates Cdk1 mittels *SDS-page* und *Western blot* Analyse unter Verwendung sowohl eines anti-Cdk1- bzw. eines anti-phospho-Cdk1(Tyr15)-Antikörpers detektiert wurde (Kapitel 3.6.5). Grundlage eines zu entwickelnden Aktivitätsassays sind Kenntnisse über die Substratspezifität der Myt1. Ausgehend vom natürlichen Substrat Cdk1 wurden, wie berichtet, verschiedene Modellpeptide untersucht (Kapitel 3.6.2). Die Ergebnisse hierzu unterstrichen zunächst die Restriktivität der Kinase, da keine Aktivität mit mehreren vom natürlichen Substrat abgeleiteten kurzkettigen Peptiden, aber sehr wohl mit den natürlichen Proteinsubstraten nachgewiesen werden konnte. So wurden weiterführende Untersuchungen zur Substraterkennung mit Hilfe eines Peptid-Microarrays durchgeführt. Dabei wurden 2304 Peptide, derivatisiert aus bekannten humanen Phosphorylierungsstellen – darunter 855 Peptide mit Tyrosin-Resten, untersucht. Zur Visualisierung des Phosphorylierungsstatus wurde ein immunologischer Ansatz unter Verwendung eines phospho-Tyr-Antikörpers gewählt. Die erhaltenen Ergebnisse wurden durch einen radioaktiven Readout verifiziert. So konnten 11 potentielle neue Substrate der Myt1-Kinase identifiziert werden. Für Wee1, welche vergleichend ebenso untersucht wurde, konnten 21 mögliche Substrate identifiziert werden. Beide Substratgruppen hatten eine Schnittmenge von 4 Peptiden. Interessanterweise wurde die native Phosphorylierungsstelle beider Kinasen, der N-terminalen Region von Cdk1, nur von Wee1 erkannt. Diese Ergebnisse bestätigten somit unsere vorangegangenen Erkenntnisse bezüglich Substraterkennung.

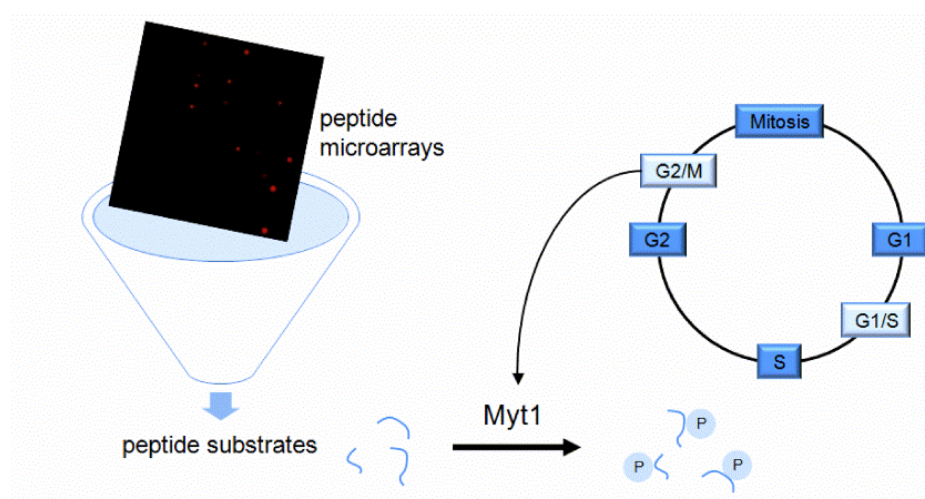


Abb.7: Assaysprinzip der Identifikation von Peptidsubstraten der humanen Myt1 Kinase

Zur Verifizierung der Ergebnisse des Microarrays sollte ein *in solution* Assay durchgeführt werden. Für dieses Vorhaben wurden die 11 identifizierten Modellpeptide mittels Festphasenpeptidsynthese synthetisiert. Die Phosphorylierung der Substrate durch Myt1 wurde mit einem homogenen Fluoreszenzpolarisation-basierenden Immunoassay (FPIA) bestimmt. Dabei wird ein Tracer vom phospho-Tyr-Antikörper kompetitiv durch das phosphorylierte Modellpeptid verdrängt. Alle im Microarray gefundenen Peptide konnten mit dieser Methode als Substrat der humanen Myt1 bestätigt werden. Die Ergebnisse wurden zusätzlich durch massenspektrometrische Methoden bestätigt. Wir validierten diese Ergebnisse wiederum durch Erstellung eines neuen Inhibitionsprofils mit CEP-701 (Lestaurtinib), Dasatinib und PD173952. Basierend auf Daten von 442 Kinasen gibt es außer Myt1 keine Tyrosinkinase, die durch die geeignete Kombination dieser Inhibitoren ein derartiges Profil aufweist.

Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden publiziert in: *Identification of peptidic substrates for the human kinase Myt1 using peptide microarrays*; Alexander Rohe, Charlott Platzer, Antonia Masch, Sandra Greiner, Claudia Henze, Christian Ihling, Frank Erdmann, Mike Schutkowski, Wolfgang Sippl, Matthias Schmidt; *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2015), 23, 4936-4942.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2015.05.021>

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089615004216>

3.7 Zusammenfassung II und Ausblick

Die Störung der durch Kinasen vermittelten Signaltransduktion fundamentaler Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Apoptose und Genexpression führt zu massiven pathophysiologischen Veränderungen. So stellen Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk), die an einer Vielzahl regulatorischer Vorgänge des Zellzyklus beteiligt sind, attraktive Targets für neuartige Antitumor-Wirkstoffe dar. Die Kinase Myt1 ist ein wichtiger Regulator des Cdk1/CyclinB Kinase Systems. Die Myt1-katalysierte Phosphorylierung von Cdk1 bewirkt eine Inhibition des Proteins, die den Eintritt in die Mitosephase verhindert und somit den Zellzyklus reguliert. Eine Hemmung der Myt1-Kinase führt somit zur vorzeitigen Aktivierung der Cdk1 und damit zur mitotischen Katastrophe. Demnach sind Inhibitoren der Myt1 Kinase in der Lage, schnell proliferative Zellen abzutöten und den Zellzyklus zu beeinflussen. Als erste Leitstruktur für nachfolgende Strukturmodifikationen wurde das literaturbekannte, hochselektive und wirksame 1,2-Dipalmitoyl-3-(N-palmitoyl-6'-amino-6'-deoxy- α -D-glucosyl)-sn-glycerol, ein natives Glycoglycerolipid aus marinen Algen, ausgewählt. Hierfür wurde ein 13-stufiges Synthesekonzept erarbeitet. Unter retrosynthetischen Gesichtspunkten wurde die Synthese in drei wichtige Abschnitte untergliedert. Der erste Abschnitt erforderte die Darstellung eines partiell geschützten 6-Glucosaminderivats, der zweite Schritt umfasste das Glycosylierungsverfahren unter stereochemischer Kontrolle. Im dritten Teil erfolgte die Einführung der Fettsäurereste zum Glycoglycerolipid. Die erarbeitete Strategie erlaubte die selektive Modifikation definierter Strukturen im Molekül, mit dem Ziel innerhalb des Moleküls die Substitutionen des Kohlenhydratbausteins, der Kettenlänge und die Darstellung der Anomeren vorzunehmen. Mit Hilfe von Modelling-Studien wurde neue Strukturen entwickelt, die eine Glycopyranose als Kernstruktur enthalten, die über verschiedene Abstandshalter über die Position C-1 mit einem N-haltigen Heterozyklus verknüpft ist. Ebenso auf Computer-gestützten Methoden basierend wurden neuartige Glycotriazol-Derivate entwickelt, die über die Position C-1 oder C-6 mit dem Zucker verknüpft sind. Für die biologische Evaluierung dieser Verbindungen war zunächst die erfolgreiche Präparation der humanen Myt1-Kinase erforderlich. Hierzu wurden in biotechnologisch/biochemischen Upstream- als auch Downstream-Prozessen die Expression der Myt1 Kinase in *E. coli* als auch in Insektenzellen getestet. Letztendlich konnte gezeigt werden, dass zur erfolgreichen Präparation der nativen Myt1-Kinase in Volllänge (fl) ein Expression in humanen HEK293 Zellen und eine Solubilisierung mit Triton® X-100 und NP-40 unumgänglich ist. Als empfindliche und spezifische Methoden zur Bestimmung des inhibitorischen Potentials mittels *in silico screening* erwählter oder synthetisierter Verbindungen wurden zwei leistungsfähige Bindungsassays etabliert. Der auf Fluoreszenzpolarisation beruhende Assay ist durch den chemisch mittels Fluorophor modifizierten ATP-kompetitiven Inhibitor Dasatinib charakterisiert. Der TR-FRET Bindungsassay basiert auf einer Eu-gelabelten anti-His-tag Antikörperreaktion. Beide Tests bedienen sich eines Substrat-freien Prinzips unter Verwendung einer rekombinanten Kinasedomäne von Myt1 (kd). Für bioanalytische Untersuchungen am diesem membranständigen Enzym in Volllänge ist das Verständnis der inhibitorischen Phosphorylierung an Thr14 und/oder Tyr15 des natürlichen Substrates, dem Cdk1/CyclinB

Komplex, von großem Interesse. Untersuchungen zur Substraterkennung zeigten die Restriktivität von Myt1 (fl) bezüglich ihrer Substratauswahl. Bislang waren lediglich Cdk1 und die entsprechenden Cyclin-Komplexe als Substrat der Myt1 Kinase (fl) bekannt. Dieser Fakt stellte insbesondere für die Assayentwicklung (Aktivitätsassay) im Sinne einer Inhibitorentestung ein großes Hindernis dar. Mit Hilfe eines Peptid-Microarrays konnten weitere Informationen bezüglich Substraterkennung gesammelt werden. Bei diesen Untersuchungen zu peptidmodifizierenden Mechanismen wurden aus ca. 2800 Substraten 11 potentielle peptidische Strukturen erkannt. Als Resultat dieser Ergebnisse wurde eine Aktivitätsassay in Form eines homogenen Fluoreszenzpolarisation-basierenden Immunoassays (FPIA) etabliert. Dabei wird ein Tracer vom phospho-Tyr-Antikörper kompetitiv durch das phosphorylierte Modellpeptid verdrängt. Ein Prinzip, dass zur Quantifizierung des inhibitorischen Potentials möglicher Inhibitoren geeignet ist. Die durchgeführten computergestützten *in silico* Untersuchungen bezüglich der Wechselwirkung zwischen Myt1 Kinase (kd) und möglichen peptidischen Substraten als auch synthetisierten potentiellen Inhibitoren erweitern das Methodenspektrum und bilden die Grundlage für ein rationales Design weiterer Leitstrukturen. Insbesondere die QM/MM-GBSA Methode selektierte eine Reihe potentieller Testverbindungen, aus denen erste Vertreter erfolgreich an rekombinanter Myt1 Kinase (kd) getestet wurden.

Somit zeigen die Ergebnisse, dass die bisherigen Arbeiten die sichere Expression von humaner Myt1 Kinase in Volllänge und als Domäne (Myt1⁷⁵⁻³⁶⁵) ermöglichen. Eine effiziente Inhibitorenentwicklung und -testung erfordert unabhängig voneinander arbeitende Assaysysteme. Zu diesem Zwecke wurde vier analytische Methoden, zwei Bindungsassays, eine *SDS-page* und *Western blot* Analyse mit dem natürlichen Substrat Cdk1 und ein Aktivitätsassay durch Phosphorylierung eines identifizierten Modellpeptids, entwickelt. Diese ermöglichen die Testung sowohl in der Arbeitsgruppe synthetisierter Verbindungen als auch durch *virtuelles screening* erhaltene potentielle Inhibitoren. Daraus ergeben sich folgende Schwerpunkte für weiterführende Arbeiten:

- Die Optimierung der Reaktionsbedingungen der Kinasereaktion durch Optimierung des am besten geeignetsten Puffersystems, Optimierung von Temperatur und pH-Wert, als auch Wahl des geeignetsten Detergenz. Nach Optimierung der erforderlichen Kinasekonzentration sollte ebenso die Bestimmung der K_m -Werte für ATP und EFS²⁴⁷⁻²⁵⁹ möglich sein. Mit der Validierung dieses Aktivitätsassays steht dann eine weitere analytische Möglichkeit für ein Medium, Random oder High Throughput Screening zur Verfügung.
- Das für derartige Screeningvorhaben benötigte Substanzreservoir unserer Arbeitsgruppe beziffert sich derzeit auf ca. 960 Verbindungen. Neben verschiedenen *in house* Substanzbibliotheken generiert sich das Reservoir auch aus *small molecule* Kinaseinhibitoren, die über 30 verschiedene Chemotypen umfassen. Diese Substanzdatenbank wird von der Firma *GlaxoSmithKline* zur Verfügung gestellt und bietet die Möglichkeit umfangreiche Informationen aus den zu erwartenden Struktur-Wirkungsbeziehungen abzuleiten. Die Ergebnisse dieser Assays sollen im virtuellen

Screening durch Kombination von Docking und Freien-Energie Berechnungen neue Leitstrukturen verifizieren, deren synthetische Weiterentwicklung im Sinne klassischer medizinischer und pharmazeutischer Chemie zu Inhibitoren mit K_i -Werten im einstelligen nanomolaren Bereich führt.

- Zu grundlegenden Arbeiten auf dem Gebiet der Biochemie und Pharmakologie zählt die Weiterentwicklung der sicheren und stabilen Expression von humaner Myt1 in Volllänge und als Kinasedomäne. Darüber hinaus ist die Expression des natürlichen Substrates Cdk1 (bisher kommerziell erworben) für den beschriebenen funktionellen Assay (Myt1 fl, Cdk1, *SDS-Page* und *Western Blot*) vorgesehen. Um den Einfluss potentieller Inhibitoren auf die Progression des Zellzyklus in humanen Primärzellen und Zelllinien zu untersuchen wird die Entwicklung eines Durchflusszytometrie-basierenden Assays angestrebt. Die Verifizierung dieser so gewonnenen Ergebnisse soll durch einen RNAi-induzierten „knock-down“ von humaner Myt1 bzw. anderer relevanter Kinasen, wie z.B. Cdk1, erfolgen. Die Quantifizierung der durch Inhibition verursachten Änderungen in Proliferation und Differenzierung von humanen Zellen soll die Etablierung eines zellulären Assays ermöglichen. Desweiteren sind Studien zur subzellulären Lokalisation der humanen Myt1 geplant. Für den potentesten Vertreter sollen Selektivitätsstudien an Kinasen durchgeführt werden.
- Bei der Durchführung des Peptid Microarrays wurden neben den im Kapitel 3.6.7 erwähnten Peptiden auch Histon H1 als mögliches Substrat für Myt1 Kinase identifiziert. Dieses Ergebnis verspricht grundlegende Erkenntnisse über die Substraterkennung und Histonphosphorylierung von Myt1 (fl) und anderen Kinasen (Wee1). Es sind weiterführende Experimente zur Identifizierung von Histon-Substraten mit einem Histon-Peptid-Microarray geplant. Dazu sollen mehrere tausend Peptide synthetisiert und auf Glasoberflächen immobilisiert werden. Diese Peptide sind von den verschiedenen humanen Histonen abgeleitet und sind chemisch mit verschiedenen Modifikationen versehen, die posttranslationale Modifikationen (PTM) simulieren sollen. Zur Validierung des Verfahrens soll unter Nutzung der Kinase Wee1 in Anwesenheit von radioisotop-markiertem ATP die bekannte Tyrosin-Phosphorylierung innerhalb von Histonen nachgewiesen werden. Weiterhin soll der Einfluss benachbarter PTMs auf die Phosphorylierbarkeit des Substrates (*cross talk*) systematisch analysiert werden. Dafür steht das Microarraysystem für die umfassende Analyse der Substratspezifität von Myt1 zur Verfügung

Publikationsverzeichnis

Synthesis of polyfunctional pentaerythritol-derivatives using a novel protective group strategy for the preparation of cluster-glycolipids

Matthias Schmidt, Bodo Dobner, Peter Nuhn

Synlett (2000), 8, 1157-1159.

Synthesis of glycolipid clusters with pentaerythritol cores and different ethyleneoxy-spaced mannose residues as terminal carbohydrates,

Matthias Schmidt, Bodo Dobner, Peter Nuhn,

Eur. J. Org. Chem. (2002), 4, 669-674.

New modified single chained glycolipids. Part 1: Synthesis of deoxy and partially O-methylated glycolipids with or without a sulfur containing spacer,

Matthias Schmidt, Swaptan K. Chatterjee, Bodo Dobner, Peter Nuhn,

Chemistry and Physics of Lipids (2002), 114, 139-147.

New 1,3-dioxolane and 1,3-dioxane derivatives as effective modulators to overcome multidrug resistance

Matthias Schmidt, Johannes Ungvári, Julia Glöde, Bodo Dobner, Andreas Langner

Bioorg. & Medicinal Chemistry (2007), 6, 2283-2297.

Synthesis and Biochemical Characterization of New Phenothiazines and Related Drugs as MDR Reversal Agents

Matthias Schmidt, Marlen Teitge, Marianela E. Castillo, Tobias Brandt, Bodo Dobner, Andreas Langner,

Arch. Pharm. Chem. Life Sci. (2008), 341, 624 – 638.

First total synthesis of 1,2-dipalmitoyl-3-(N-palmitoyl-6'-amino-6'-deoxy- α -D-glucosyl)-sn-glycerol – a glycolipid of a marine alga with a high inhibitor activity against human Myt1-kinase

Christiane Göllner, Claudia Philipp, Bodo Dobner, Wolfgang Sippl, Matthias Schmidt

Carbohydrate Research (2009), 344, 1628–1631.

In vitro and in silico studies on substrate recognition and acceptance of human PKMYT1, a Cdk1 inhibitory kinase

Alexander Rohe, Frank Erdmann, Claudia Bäßler, Kanin Wichapong, Wolfgang Sippl,

Matthias Schmidt,

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2012), 22, 1219–1223.

Evaluation of potential Myt1 kinase inhibitors by TR-FRET based binding assay

Alexander Rohe, Christiane Göllner, Kanin Wichapong, Frank Erdmann, Ghassab Al-Mazaideh, Wolfgang Sippl, Matthias Schmidt

Eur. J. Med. Chem. (2013), 61, 41-48.

A Fluorescence Anisotropy–Based Myt1 Kinases Binding Assay

Alexander Rohe, Claudia Henze, Frank Erdmann, Wolfgang Sippl, Matthias Schmidt

Assay and Drug Development Technologies (2014), 12, 136–144.

Application of Docking and QM/MM-GBSA Rescoring to Identify Novel Myt1 Kinase Inhibitors

Kanin Wichapong, Alexander Rohe, Charlott Platzer, Inna Slynko, Frank Erdmann, Matthias Schmidt, Wolfgang Sippl

J. Chem. Inf. Mod. (2014), 54, 881-893.

The glycolipid 1,2-Dipalmitoyl-3-(N-palmitoyl-6'-amino-6'-deoxy- α -D-glucosyl)-sn-glycerol is no inhibitor of the human Myt1 kinase

Alexander Rohe, Christiane Göllner, Frank Erdmann, Wolfgang Sippl, Matthias Schmidt

J. Enz. Inh. Med. Chem. (2015), 30, 514-517.

Identification of peptidic substrates for the human kinase Myt1 using peptide microarrays

Alexander Rohe, Charlott Platzer, Antonia Masch, Sandra Greiner, Claudia Henze, Christian Ihling, Frank Erdmann, Mike Schutkowski, Wolfgang Sippl, Matthias Schmidt

Bioorganic & Medicinal Chemistry (2015), 23, 4936-4942.

Structure-Based Design and Synthesis of Novel Inhibitors targeting HDAC8 from *Schistosoma mansoni* for the Treatment of Schistosomiasis

Tino Heimburg, Alokta Chakrabarti, Julien Lancelot, Martin Marek, Jelena Melesina, Alexander-Thomas Hauser, Tajith B. Shaik, Sylvie Duclaud, Dina Robaa, Frank Erdmann, Matthias Schmidt, Christophe Romier, Raymond J. Pierce, Manfred Jung, Wolfgang Sippl

JMC (2015), under revision.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, Spiraprilhydrochlorid-Monohydrat, Arzneibuchkommentar

Schmidt, Matthias

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, Natriumvalproat, Arzneibuchkommentar

Schmidt, Matthias

EUROPEAN PHARMACOPOEIA, Valproinsaeure, Arzneibuchkommentar

Schmidt, Matthias

Danksagung

Bedingt durch den tragischen Tod von Prof. Dr. Axel Büge traten 2012 Prof. Dr. Peter Nuhn, mein Doktorvater, sowie Prof. Dr. Andreas Langner und Prof. Dr. Bodo Dobner mit der Frage an mich heran, ob ich mir die Weiterführung von wissenschaftlichen Projekten von Prof. Büge zutrauen würde. Für das Vertrauen und die Unterstützung in der darauf folgenden Zeit bin ich den Genannten aufrichtig dankbar. Die Einarbeitung in eine völlig neue Thematik stellte eine neue Herausforderung dar, für die ich allerdings durch meine Arbeitsgruppe in Form einer unermüdlich agierenden Frau Karin Relius, meinen beiden Diplomandinnen Marlen Teitge und Julia Glöde, sowie meinem Doktoranden Johannes Ungvari tatkräftige Unterstützung erhielt. Der Beziehung zu seinem ersten Doktoranden sagt man ja immer etwas Besonderes nach – das bewahrheitete sich wahrhaftig.

Die Zusammenarbeit mit der AG Prof. Langner fruchtete so langsam, was vor allem der guten Seele Frau Angela Munk zu verdanken war, die Zellkultur um Zellkultur und auch manch anderes am Leben hielt. Dass ich an dieser Universität dann längerfristig forschen und lehren durfte verdanke ich vor allem Andreas Langner, der somit meiner Familie, meiner Frau, meinen Kinder und mir hier an der Universität in Halle eine Perspektive bot.

Der Wechsel in die AG von Prof. Dr. Wolfgang Sippl stellte einen neuen Abschnitt dar. Auch wissenschaftlich bot sich mit dieser Umstrukturierung im Institut für mich die Möglichkeit, wieder andere Forschungsgebiete zu beschreiten. Für diese Ermunterung und die vielen Ideen dazu bin ich vor allem Prof. Dobner dankbar. Mit der Neosynthese der Glycoglycerolipide brachte er einen Stein ins Rollen, der zum jetzigen Myt1-Thema führte. Damit „dieser Stein rollen“ konnte, fand ich in Prof. Sippl einen steten Förderer. Wolfgang Sippl bot mir die Möglichkeit, in seinem Arbeitskreis ein völlig eigenständiges Thema zu bearbeiten und er unterstützte dieses oft unwägbare Projekt uneigennützig und nicht nur finanziell. So etwas ist heute in unserer Hochschullandschaft nicht unbedingt üblich weshalb ich hier dafür aufrichtig danken will.

Das „unwägbare“ an dem neuen Myt1-Kinase-Projekt mussten vor allem Christiane Göllner und Claudia Philipp erfahren. Ich weiß sehr wohl, dass ihre Promotionszeit nicht die einfachste war. Umso dankbarer bin ich beiden für die geleistete Aufbauarbeit. Mit Alexander Rohe erfuhr unsere kleine Gruppe völlig neue Impulse. Sein unstillbarer Wissensdurst und sein wissenschaftlicher Enthusiasmus brachten neuen Schwung in das oft stockende Projekt. Mit Dr. Frank Erdmann bekamen wir fundierte biochemische Unterstützung nicht nur bei der Kinasepräparation. Ausdrücklich danke ich hier Lina Humbeck, Claudia Henze, Sandra Greiner, Anne Wagler, Christin Decker und auch Ghassab Al-Mazaideh für ihre Mitarbeit. Neue Ideen entstehen nur durch Kommunikation und Diskussion und dafür sorgten im Labor Charlott Platzer, Theresa Bayer, Tino Heimbürg und Benjamin Sauer. Vergessen möchte ich dabei auch nicht das leicht chaotische „Bachelor-Trio“ um Dima, Miron und Robert.

Für alle anderen sachlichen, fachlichen und auch sonstigen Unterstützungen und Zusammenarbeiten bedanke ich mich bei der AG Prof. Sippl, hier speziell bei Frau Barbara Elsner, bei der gesamten AG Langner, auch hier speziell bei Bodo Dobner für seine stete

Diskussionsbereitschaft, bei der AG Prof. Schutkowski, bei der AG Prof. Sinz, speziell Prof. Rüttinger, Dr. Ihling, Frau Mannd und Frau Herbrich-Peters für unzählige Messungen, bei der AG Prof. Pietzsch, speziell Dr. Hertel für die „ersten Schritte“ bei der Kinasepräparation, den AGs um Dr. Ströhl, Prof. Neubert und Prof. Imming. Ganz besonderen Dank natürlich an die Menschen, auf die ich mich „sonst“ am Institut immer verlassen kann in wertungsfreier Reihenfolge: Petra Frohberg, Dina Robaa, Simone Kniesa, Frau Tannhäuser u.v.m.

Eine Universität lebt von ihren Studenten – und genau diesen möchte ich ganz zum Schluss danken. Immer wieder junge, meist wissbegierige Menschen um sich haben weckt in einem den Ansporn, selber sich immer weiterentwickeln zu wollen, manchmal auch zu müssen. Aber nicht nur die Motivation schöpfe ich daraus sondern auch viel Unterstützung, konkrete Hilfe und Kraft für zukünftige Projekte.

Lehren und Forschen an einer Universität – das war immer mein Traum und Danke an alle, die es mir ermöglichten und jeden Tag wieder ermöglichen, diesen Traum zu leben.

Curriculum vitae/Tabellarischer Lebenslauf

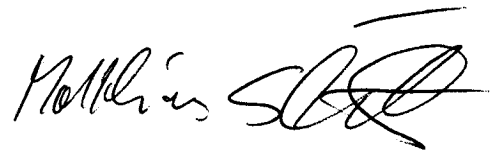
Name: Schmidt, Dr. rer. nat.
 Vorname: Matthias
 geb.: 30.05.1970
 Geburtsort: Leipzig
 Familienstand: verheiratet mit Beate Schmidt, *Apothekerin*
 Kinder: Carline Beate Schmidt (geb. 23.05.1999)
 Marlene Beate Schmidt (geb. 08.03.2003)

Zeitraum	Ausbildungsstätte / Arbeitsstätte	Abschluss / Tätigkeit
09/76 - 08/80	POS „Karl Marx“ Schmalkalden	<i>Schüler</i>
09/80 – 08/86	POS „J. G. Seume“ Schmalkalden	Realschulabschluss
09/86 - 08/88	EOS „G. Dimitroff“ Schmalkalden	Abitur
09/88 – 08/90	<i>NVA, Jagdgeschwader 1, Holzdorf</i>	<i>Wehrdienst</i>
09/90 - 09/94	MLU Halle-Wittenberg Studium der Pharmazie	1. Staatsexamen 09/ 92 2. Staatsexamen 09/ 94
10/94 - 03/95	Institut für Pharmazeutische Chemie der MLU Halle (Prof. Dr. B. Dobner)	Diplompharmazeut <i>„Untersuchungen zur Synthese von enantiomerenreinen Phospholipidvorstufen“</i>
04/95 - 09/95	Steintor-Apotheke Halle	Pharmaziepraktikant
10/95	Landesverwaltungsamt Halle	3. Staatsexamen Approbation als Apotheker
11/95 - 04/96	<i>Reil-Apotheke Halle</i>	<i>Apotheker</i>
05/96 - 04/00	Institut für Pharmazeutische Chemie der MLU Halle-Wittenberg (Prof. Dr. P. Nuhn)	<i>Promotion (Dr. rer. nat.) „Synthese von Glykosiden mit Lipidanker zur Untersuchung biolog. Erkennungsprozesse“</i>
05/00 - 04/01	Institut für Angewandte Dermatopharmazie an der MLU Halle-Wittenberg (Prof. Dr. R. Neubert)	<i>Postdoc</i>
05/01- 04/07	Institut für Pharmazeutische Chemie der MLU Halle-Wittenberg (Prof. Dr. A. Langner)	<i>Wissenschaftlicher Assistent (C1)</i>
seit 05/07	Institut für Pharmazie, Abteilung Medizinische Chemie der MLU Halle-Wittenberg (Prof. Dr. W. Sippl)	<i>Wissenschaftlicher Mitarbeiter</i>

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht.

Ferner erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Habilitation erstmals um die Erlangung dieses Titels bewerbe. Die vorliegende Arbeit ist weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Habilitation oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt worden.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Matthias Schmidt', with a stylized flourish at the end.

Halle (Saale), 04.01.2016

Dr. Matthias Schmidt

Literaturverzeichnis

- ¹ <http://www.krebsgesellschaft.de/basis-informationen-krebs/therapieformen.html>; 18.08.2015.
- ² Schmoll, H.J., Höffken, K., Possinger, K.; Kompendium Internistischer Onkologie, Springer-Verlag, 4. Auflage (2006), 828-834.
- ³ Lage, H.; Cell. Mol. Life Sci. (2008), 65, 3145-3167.
- ⁴ Buchholz, T. A., Davis, D. W., McConkey, D. J., Symmans, W. F., Valero, V., Jhingran, A., Tucker, S. L., Pusztai, L., Cristofanilli, M., Esteva, F. J., Hortobagyi, G.N., Sahin, A. A.; Cancer J. (2003), 9, 33-41.
- ⁵ Gottesman, M. M., Ling, V.; FEBS Lett. (2006), 580, 998-1009.
- ⁶ Dean, M. Annilo, T.; Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. (2005), 6, 123-142.
- ⁷ Juliano, R. L., Ling, V.; Biochim. Biophys. Acta (1976), 455, 152-162.
- ⁸ Gottesman, M.M., Ambudkar, S.V., Xia, D.; Nature Biotechnology (2009), 27, 546 – 547.
- ⁹ Chen, C. J., Chin, J. E., Ueda, K., Clark, D. P., Pastan, I., Gottesman, M. M., Roninson, I. B.; Cell (1986), 47, 381-389.
- ¹⁰ Chang, G., Roth, C. B.; Science (2001), 293, 1793-1800.
- ¹¹ Dawson, R.J.P., Locher, K.P.; Nature (2006), 443, 180–185.
- ¹² Dawson, R.J.P., Locher, K.P.; FEBS Lett. (2007), 581, 935–938.
- ¹³ Ward, A., Reyes, C.L., Yu, J., Roth, C.B., Chang, G.; Proc Natl. Acad. Sci .USA (2007), 104, 19005–19010.
- ¹⁴ Jin, M.S., Oldham, M.L., Zhang, Q., Chen, J.; Nature (2012), 490, 566–569.
- ¹⁵ Aller, S.G., Yu, J., Ward, A., Weng, Y., Chittaboina, S., Zhuo, R., Harrell, P.M., Trinh, Y.T., Zhang, Q., Urbatsch, I.L.; Science (2009), 323, 1718–1722.
- ¹⁶ Li, J., Jaimes, K.F., Aller, S.G., Protein Sci. (2014), 23, 34–46.
- ¹⁷ Gottesmann, M.M., Pastan, I.; Annu. Rev. Biochem. (1993), 62, 385.
- ¹⁸ Ambudkar, S. V., Dey, S., Hrycyna, C. A., Ramachandra, M., Pastan, I., Gottesman, M. M.; Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. (1999), 39, 361-398.
- ¹⁹ Sarkadi, B., Homolya, L., Szakacs, G. & Varadi, A.; Physiol. Rev. (2006), 86, 1179-1236.
- ²⁰ Schinkel, A. H., Jonker, J. W.; Adv. Drug Deliv. Rev. (2003), 55, 3-29.
- ²¹ Shapiro, A. B., Ling, V.; Acta Physiol. Scand. Suppl. (1998), 643, 227-234.
- ²² Shapiro, A. B., Fox, K., Lam, P. & Ling, V.; Eur. J. Biochem. (1999), 259, 841-850.
- ²³ Martin, C., Berridge, G., Higgins, C. F., Mistry, P., Charlton, P., Callaghan, R.; Mol. Pharmacol. (2000), 58, 624-632.
- ²⁴ Cole, S.P.C; Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. (2014), 54, 95–117.
- ²⁵ Wadkins, R., Houghton, P.; Biochim. Phys. Acta (1993), 225, 1153.

-
- ²⁶ Pierre, A., Dunn, T., Kraus-Berthier, L., Leonce, S., Saint-Dizier, D., Regnier, G.; *Invest. New Drugs* (1992), 10, 137-148.
- ²⁷ Alahari, S., Dean, N., Fisher, M., Delong, R., Manoharan, M., Tivel, K.; *Mol. Pharmacol.* (1996), 50, 808-819.
- ²⁸ Robert, J., Jarry, C.; *J. Med. Chem.* (2003), 23, 4805-4817.
- ²⁹ Baumert, C., Hilgeroth, A.; *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* (2009), 9, 415-436.
- ³⁰ Warner, E., Hedley, D., Andrulis, I., Myers, R., Trudeau, M., Warr, D.; *Clin. Cancer Res.* (1998), 4, 1451-1457.
- ³¹ Twentyman, P., Bleehen, N.; *Eur. J. Cancer* (1991), 27, 1639-1642.
- ³² Minderman, H., O'Loughlin, K. L., Pendyala, L., Baer, M. R.; *Clin. Cancer Res.* (2004), 10, 1826-1834.
- ³³ Kannan, P., John, C., Zoghbi, S. S., Halldin, C., Gottesman, M. M., Innis, R. B., Hall, M. D.; *Clin. Pharmacol. Ther.* (2009), 86, 368-377.
- ³⁴ Binkhathlan, Z., Lavasanifar, A.; *Curr. Cancer Drug Targets* (2013), 13, 326-346.
- ³⁵ Litman, T., Zeuthen, T., Skovsgaard, T., Stein, W.; *Biochim. Biophys. Acta* (1997), 1361, 159-168.
- ³⁶ Martin, C., Berridge, G., Higgins, C., Mistry, P., Charlton, P., Callaghan, R.; *Mol. Pharmacol.* (2000), 58, 624-632.
- ³⁷ Wiese, M., Pajewa, I.K.; *Curr. Med. Chem.* (2001), 8, 685-713.
- ³⁸ Suzuki, T., Fukazawa, N., San-Nohe, K.; *J. Med. Chem.* (1997), 40, 2047-2052.
- ³⁹ Hait, W., Aftab, N.; *Biochem. Pharmacol.* (1992), 43, 103-107.
- ⁴⁰ Takacs, D., Csonka, A., Horvath, A., Windt, T., Gajdacs, M., Riedl, Z., Hajos, G., Amaral, L., Molnar, J., Spengler, G.; *Anticancer Research* (2015), 35, 3245-3252.
- ⁴¹ Wesolowska, O.; *Acta Biochimica Polonica* (2011), 58, 433-448.
- ⁴² Wesolowska, O., Molnar, J., Ocsosvzki, I., Michalak, K.; *In Vivo* (2009), 23, 943-947.
- ⁴³ Brewer, F.K., Follit, C.A., Vogel, P.D., Wise, J.G.; *Mol. Pharmacol.* (2014), 86, 716-726.
- ⁴⁴ Teitge, M.; Diplomarbeit „Synthese potentieller MDR-Modulatoren und SAR-Untersuchungen des hydrophoben Grundkörpers“ (2004), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- ⁴⁵ Glöde, J.; Diplomarbeit „Derivatisierung und weiterführende Untersuchungen von potentiellen MDR-Modulatoren“ (2006), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- ⁴⁶ Ungvari, J.; Dissertation „Synthese potentieller Modulatoren zur Überwindung der Multidrug Resistance“ (2005), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- ⁴⁷ Brandt, T.; Dissertation „Untersuchungen und Charakterisierung von Inhibitoren des P-Glykoproteins zur Überwindung der Multidrug Resistance“ (2007), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- ⁴⁸ Müller, H.; Dissertation „Funktionelle Untersuchungen des ABC-Transporters P-Glykoprotein“ (2007), Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

-
- ⁴⁹ Kim, S. Y., Gunasekaran, S., Olson, N. F.J.; *Dairy Sci.* (2004), 87, 274.
- ⁵⁰ Edwards, P. D., Albert, J. S., Sylvester, M., Aharony, D.; *J. Med. Chem.* (2007), 50, 5912.
- ⁵¹ Awad, S., Luthi-Peng, Q.-Q., Puhan, Z. J.; *Agric. Food. Chem.* (1999), 47, 3632.
- ⁵² Webb, R. L., Schiering, N., Sedrani, R., Maibaum, J. J.; *Med. Chem.* (2010), 53, 7490.
- ⁵³ Nowell, P.C, Hungerford, D.A.; *Science* (1960), 132, 1497.
- ⁵⁴ Nowell, P.C., Hungerford, D.A.; *J. Natl. Cancer Inst.* (1960), 85, 85-109.
- ⁵⁵ Rowley, J.D.; *Clin. Haematol.* (1980), 9, 55-86.
- ⁵⁶ Hantschel, O., Rix, U., Superti-Furga, G.; *Leuk. Lymphoma* (2008), 49, 615-619.
- ⁵⁷ Deininger, M., Buchdunger, E., Druker, B.J.; *Blood* (2005), 105, 2640-2653.
- ⁵⁸ Lugo, T.G., Pendergast, A.M., Muller, A.J., Witte, O.N.; *Science* (1990), 247, 1079-1082.
- ⁵⁹ Thiesing, J.T., Ohno-Jones, S., Kolibaba, K.S., Druker, B.J.; *Blood* (2000), 96, 3195-3199.
- ⁶⁰ Henderson, C.A.; *J. Med. Assoc. Ga.* (2003), 92, 22.
- ⁶¹ Kawabe, T.; *Mol. Cancer Ther.* (2004), 3, 513-519.
- ⁶² Suganuma, M., Kawabe, T. Hori, H. Funabiki, T. Okamoto, T.; *Cancer Res.* (1999), 59, 5887-5891.
- ⁶³ Chow, J.P.H., Poon, R.Y.C.; *Oncogene* (2013), 32, 4778-4788.
- ⁶⁴ Nakanishi, M., Ando, H., Watanabe, N., Kitamura, K., Ito, K., Okayama, H., Miyamoto, T., Agui, T., Sasaki, M.; *Genes Cells* (2000), 5, 839-47.
- ⁶⁵ Mueller, P.R., Coleman, T.R., Kumagai, A., Dunphy, W.G.; *Science* (1995), 270, 86-90.
- ⁶⁶ Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Nishida, E.; *J. Biol. Chem.* (2003), 278, 25277-25280.
- ⁶⁷ Booher, R.N., Holman, P.S., Fattaey, A.; *J. Biol. Chem.* (1997), 272, 22300-22306.
- ⁶⁸ Liu, F., Stanton, J.J., Wu, Z., Piwnica-Worms, H.; *Mol. Cell. Biol.* (1997). 17, 571-583.
- ⁶⁹ Tassan, J.P., Schultz, S. J., Bartek, J., Nigg, E.A.; *J. Cell. Biol.* (1994), 127, 467-478.
- ⁷⁰ Norbury, C., Blow, J., Nurse, P.; *EMBO J.* (1991), 10, 3321-3329.
- ⁷¹ Pines, J., Hunter, T.; *J. Cell. Biol.* (1991), 115, 1-17.
- ⁷² Coulonval, K., Kookan, H, Roger, P.P.; *Mol. Biol. Cell.* (2011), 22, 3971-3985.
- ⁷³ Tassan, J.P., Schultz, S. J., Bartek, J., Nigg, E.A.; *Cell. Biol.* (1994), 127, 467-478.
- ⁷⁴ McGowan, C.H., Russell, P.; *EMBO J.* (1995), 14, 2166-2175.
- ⁷⁵ Larochelle, S., Merrick, K.A., Terret, M.E., Wohlbold, L., Barboza, N.M., Zhang, C., Shokat, K.M., Jallepalli, P.V., Fisher, R.P.; *Mol. Cell.* (2007), 25, 839-850.
- ⁷⁶ Wells, N.J., Watanabe, N., Tokusumi, T., Jiang, W., Verdecia, M.A., Hunter, T.; *J. Cell Sci.* (1999), 112, 3361-3371.
- ⁷⁷ Liu, F., Stanton, J.J., Wu, Z., Piwnica-Worms, H.; *Mol. Cell. Biol.* (1997), 17, 571-583.
- ⁷⁸ Kessler, K.J., Blinov, M.L., Elston, T.C., Kaufmann, W.K., Simpson, D.A.; *J. Theor. Biol.* (2013), 320, 159-169.

-
- ⁷⁹ Nakajima, H., Yonemura, S., Murata, M., Nakamura, N., Piwnicka-Worms, H., Nishida, E.; *J. Cell. Biol.* (2008), 181, 89-103.
- ⁸⁰ Villeneuve, J., Scarpa, M., Ortega-Bellido, M., Malhotra, V.; *EMBO J.* (2013), 9, 72-85.
- ⁸¹ Wang, Y., Decker, S.J., Sebolt-Leopold, J.; *Cancer Biol. Ther.* (2004), 3, 305-313.
- ⁸² Rabouille, C., Kondylis, V.; *Cell Cycle* (2007), 6, 2723-2729.
- ⁸³ Potapova, T.A., Daum, J.R., Byrd, K.S., Gorbsky, G.J.; *Mol. Biol. Cell.* (2009), 20, 1737-1748.
- ⁸⁴ Shorter, J., Warren, G.; *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* (2002), 18, 379-420.
- ⁸⁵ Hidalgo Carcedo, C., Bonazzi, M., Spano, S., Turacchio, G., Colanzi, A., Luini, A., Corda, D.; *Science* (2004), 305, 93-96.
- ⁸⁶ Sutterlin, C., Hsu, P., Mallabiabarrena, A., Malhotra, V.; *Cell* (2002), 109, 359-369.
- ⁸⁷ Lippincott-Schwartz, J., Roberts, T.H., Hirschberg, K.; *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* (2000), 16, 557-589.
- ⁸⁸ Lowe, M., Rabouille, C., Nakamura, N., Watson, R., Jackman, M., Jamsa, E., Rahman, D., Pappin, D.J., Warren, G.; *Cell* (1998), 94, 783-793.
- ⁸⁹ Jin, P., Hardy, S., Morgan, D.O.; *J. Cell. Biol.* (1998), 141, 875-885.
- ⁹⁰ Glotzer, M., Murray, A.W., Kirschner, M.W.; *Nature* (1991), 349, 132-138.
- ⁹¹ Chow, J.P.H., Poon, R.Y.C., Ma, H.T.; *Exit. Mol. Cell. Biol.* (2011), 31, 1478-1491.
- ⁹² Pomerening, J.R., Ubersax, J.A., Ferrell, J.E.; *Mol. Biol. Cell* (2008), 19, 3426-3441.
- ⁹³ van Vugt, M.A., Bras, A., Medema, R.H.; *Mol. Cell* (2004), 15, 799-811.
- ⁹⁴ Aarts, M., Linardopoulos, S., Turner, N.C.; *Current Opinion in Pharmacology* (2013), 13, 1-7.
- ⁹⁵ Levine, A.J.; *Cell* (1997), 88, 323-331.
- ⁹⁶ Dixon, H., Norbury, C.J.; *Cell Cycle* (2002), 1, 362-368.
- ⁹⁷ Zhou, B.B., Bartek, J.; *Nat. Rev. Cancer* (2004), 4, 216-225.
- ⁹⁸ Wang, Y., Li, J., Booher, R.N., Kraker, A., Lawrence, T., Leopold, W.R., Sun, Y.; *Cancer Res.* (2001), 61, 8211-8217.
- ⁹⁹ Zhou, B.B., Bartek, J.; *Nat. Rev. Cancer* (2004), 4, 216-225.
- ¹⁰⁰ Vogelstein, B., Lane, D., Levine, A.J.; *Nature* (2000), 408, 307-310.
- ¹⁰¹ Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Andreau, K., Medema, R., Kroemer, G.; *Oncogene* (2004), 23, 2825-2837.
- ¹⁰² Castedo, M., Perfettini, J.L., Roumier, T., Yakushijin, K., Horne, D., Medema, R., Kroemer, G.; *Oncogene* (2004), 23, 4353-4361.
- ¹⁰³ Blagosklonny, M.V.; *Cell Cycle* (2007), 6, 70-74.
- ¹⁰⁴ De Witt Hamer, P.C., Mir, S.E., Noske, D., Van Noorden, C.J.F., Würdinger, T.; *Clin. Cancer Res.* (2011), 17, 4200-4207.
- ¹⁰⁵ Ashwell, S., Kelley, M.R.; Elsevier: Amsterdam. 211-234.
- ¹⁰⁶ Tse, A.N., Sheikh, T.N., Alan, H., Chou T.C., Schwartz, G.K.; *Mol. Pharmacol.* (2009), 75, 124-133.

- ¹⁰⁷ Hirai, H., Iwasawa, Y., Okada, M., Arai, T., Nishibata, T., Kobayashi, M., Kimura, T., Kaneko, N., Ohtani, J., Yamanaka, K., Itadani, H., Takahashi-Suzuki, I., Fukasawa, K., Oki, H., Nambu, T., Jiang, J., Sakai, T., Arakawa, H., Sakamoto, T., Sagara, T., Yoshizumi, T., Mizuarai, S., Kotani, H.; *Mol. Cancer Ther.* (2009), 8, 2992-3000.
- ¹⁰⁸ <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=MK1775&Search=Search>; 22.09.2015
- ¹⁰⁹ Davies, K.D., Cable, P.L., Garrus, J.E., Sullivan, F.X., von Carlowitz, I., Huerou, Y.L., Wallace, E., Woessner, R.D., Gross, S.; *Cancer Biol. Ther.* (2011), 12, 788-796.
- ¹¹⁰ Ovejero-Benito, M. C., Frade, J.M.; *PLoS ONE* (2013), 5, e64890.
- ¹¹¹ Hirai, H., Arai, T., Okada, M., Nishibata, T., Kobayashi, M., Sakai, N., Imagaki, K., Ohtani, J., Sakai, T., Yoshizumi, T., Mizuarai, S., Iwasawa, Y., Kotani, H.; *Cancer Biol. Ther.* (2010), 9, 514-522.
- ¹¹² Krehling, J.M., Gemmer, J.Y., Reed, D. Letson, D., Bui, M., Altioik, S.; *Mol. Cancer Ther.* (2012), 11, 174-182.
- ¹¹³ Rajeshkumar, N.V., De Oliveira, E., Ottenhof, N., Watters, J., Brooks, D., Demuth, T., Shumway, S.D., Mizuarai, S., Hirai, H., Maitra, A., Hidalgo, M.; *Clin. Cancer Res.* (2011), 17, 2799-2806.
- ¹¹⁴ Do, K., Wilsker, D., Ji, J., Zlott, J., Freshwater, T., Kinders, R.J., Collins, J., Chen, A.P., Doroshov, J.H., Kummur, S.; *Journal of clinical oncology* (2015), pii: JCO.2014.60.4009. [Epub ahead of print]
- ¹¹⁵ Hirai, H., Iwasawa, Y., Okada, M., Arai, T., Nishibata, T., Kobayashi, M., Kimura, T., Kaneko, N., Ohtani, J., Yamanaka, K., Itadani, H., Takahashi-Suzuki, I., Fukasawa, K., Oki, H., Nambu, T., Jiang, J., Sakai, T., Arakawa, H., Sakamoto, T., Sagara, T., Yoshizumi, T., Mizuarai, S., Kotani, H.; *Mol. Cancer Ther.* (2009), 8, 2992-3000.
- ¹¹⁶ Hirai, H., Arai, T., Okada, M., Nishibata, T., Kobayashi, M., Sakai, N., Imagaki, K., Ohtani, J., Sakai, T., Yoshizumi, T., Mizuarai, S., Iwasawa, Y., Kotani, H.; *Cancer Biol. Ther.* (2010), 9, 514-522.
- ¹¹⁷ Mizuarai, S., Yamanaka, K., Itadani, H., Arai, T., Nishibata, T., Hirai, H., Kotani, H.; *Mol. Cancer* (2009), 8, 34.
- ¹¹⁸ Mueller, S., Hashizume, R., Yang, X., Kolkowitz, I., Olow, A.K., Phillips, J., Smirnov, I., Tom, M.W., Prados, M.D., James, C.D., Berger, M.S., Gupta, N., Haas-Kogan, D.A.; *Neuro-Oncology* (2014), 14, 352-260.
- ¹¹⁹ Wang, G., Niu, X., Zhang, W., Caldwell, J.T., Edwards, H., Chen, W., Taub, J.W., Zhao, L., Ge, Y.; *Cancer Letters* (2015), 356, 656-668.
- ¹²⁰ Magnussen, G.I., Emilsen, E., Slipicevic, A., Florenes, V.A., Giller, F.K., Engesaeter, B., Nahse-Kumpf, V., Fjaer, R.; *BMC Cancer* (2015), 15, 462.
- ¹²¹ Wang, Y., Decker, S.J., Sebolt-Leopold, J.; *Cancer Biol. Ther.* (2004), 3, 305-313.
- ¹²² Villeneuve, J., Scarpa, M., Ortega-Bellido, M., Malhotra, V.; *EMBO J.* (2013), 9, 72-85.
- ¹²³ Chow, J.P.H., Poon, R.Y.C.; *Oncogene* (2013), 32, 4778-4788.

- ¹²⁴ Tibes, R., Bogenberger, J.M., Chaudhuri, L., Hagelstrom, R.T., Chow, D., Buechel, M.E., Gonzales, I.M., Demuth, T., Slack, J., Mesa, R.A., Braggio, E., Yin, H.H., Arora, S., Azorsa, D.O.; *Blood* (2012), 119, 2863-2872.
- ¹²⁵ Zhou, B.-N., Tang, S., Johnson, R.K., Mattern, M.P., Lazo, J.S., Sharlow, E.R., Harich, K., Kingston, D.G.I.; *Tetrahedron* (2005), 61, 883–887.
- ¹²⁶ Fabian, M.A., Biggs, W.H., Treiber, D.K., Atteridge, C.E., Azimioara, M.D., Benedetti, M.G., Carter, T.A., Ciceri, P., Edeen, P.T., Floyd, M., Ford, J.M., Galvin, M., Gerlach, J.L., Grotzfeld, R.M., Herrgard, S., Insko, D.E., Insko, M.A., Lai, A.G., Lelias, J.-M., Mehta, S.A., Milanov, Z.V., Velasco, A.M., Wodicka, L.M., Patel, H.K., Zarrinkar, P.P., Lockhart, D.J.; *Nat. Biotech.* (2005), 23, 329-336.
- ¹²⁷ Kristjánsdóttir, K., Rudolph, J.; *Anal. Biochem.* (2003), 316, 41-49.
- ¹²⁸ <http://www.thesgc.org/structures/3p1a>; 17.09.2015.
- ¹²⁹ Vulpetti, A., Bosotti, R.; *Il Farmaco* (2004), 59, 759–765.
- ¹³⁰ Pargellis, C., Tong, L., Churchill, L.; *Nat. Struct. Biol.* (2002), 9, 268–272.
- ¹³¹ Goodwin, N.C., Cianchetta, G., Burgoon, H.A.; *Med. Chem. Lett.* (2015), 6, 53–57.
- ¹³² Lombardo, L.J., Lee, F.Y., Chen, P.; *ACS J. Med. Chem.* (2004), 47, 6658–6661.
- ¹³³ Schindler, T., Bornmann, W., Pellicena, P.; *Science* (2000), 289, 1938–1942.
- ¹³⁴ Zhao, Z., Wu, H., Wang, L.; *ACS Chem. Biol.* (2014), 9, 1230–1241.
- ¹³⁵ Zuccotto, F., Ardini, E., Casale, E., Angiolini, M.; *ACS J. Med. Chem.* (2010), 53, 2681-2694.
- ¹³⁶ Garuti, L., Roberti, M., Bottegoni, G.; *Curr. Med. Chem.* (2010), 17, 2804–2821.
- ¹³⁷ Lamba, V., Ghosh, I.; *Curr. Pharm. Des.* (2012), 18, 2936–2945.
- ¹³⁸ Cox, K.J., Shomin, C.D., Ghosh, I.; *Future Med. Chem.* (2011), 3, 29–43.
- ¹³⁹ Göllner, C.; Dissertation „Neosynthese und Derivatisierung mariner Glycoglycerolipide als potentielle Inhibitoren der Myt1 Kinase“ (2012), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- ¹⁴⁰ Al-Mazaideh, G.; Dissertation “Development and synthesis of new potential ATP-Competitive Myt1 Kinase inhibitors” (2012), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- ¹⁴¹ Sauer, B.; Diplomarbeit „Etablierung einer neuen Klasse ATP-kompetitiver Hemmstoffe der PKMYT1“ (2012), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- ¹⁴² Rohe, A., Erdmann, F., Bäßler, C., Wichapong, K., Sippl, W., Schmidt, M.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* (2012), 22, 1219–1223.