



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Entwicklung und Anpassung von in vitro Verfahren für die
Identifizierung und Charakterisierung von Kinaseinhibitoren**

Autor: Jessica Perrin
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule Mannheim
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

Fehlregulierte Kinaseaktivität ist mit schwerwiegenden Erkrankungen wie Krebs, entzündlichen und neurodegenerativen Krankheiten verbunden. Niedermolekulare Inhibitoren können verwendet werden, um unerwünschte Kinaseaktivität zu hemmen. Etwa zwanzig Kinaseinhibitoren sind als Wirkstoffe zugelassen, hauptsächlich für onkologische Indikationen. Der Mangel an Selektivität von Kinaseinhibitoren sowie die geringe Aussagekraft von rekombinanten Kinasetests für die zelluläre Aktivität oder die Wirksamkeit im lebenden Organismus stellen allerdings kritische Engpässe in der Medikamentenentwicklung dar, insbesondere bei chronischen Indikationen.

In dieser Doktorarbeit wurden Methoden entwickelt, um neuartige Inhibitoren gegen verschiedene Kinasen zu identifizieren. Die Selektivität dieser Moleküle und deren Interaktion mit dem exprimierten Proteom wurden in Zelllysaten und in intakten Zellen detailliert untersucht. Darüber hinaus wurden Methoden entwickelt, die eine schnelle Bewertung der Zellpermeabilität von Substanzen in beliebigen Zelltypen, einschliesslich primärer Zellen, erlauben. Dies ermöglicht eine bessere Korrelation zwischen Inhibitoraffinität und deren Wirkung auf zelluläre Phenotypen.

Ein zentrales Thema dieser Doktorarbeit war die Kinase TBK1, die eine wichtige Rolle in vielen entzündungsrelevanten Signalwegen spielt. In dieser Arbeit wurden chemoproteomische Methoden weiterentwickelt, um das Screening von Substanzen gegen TBK1 und detaillierte Studien über die Interaktion einer Substanz mit deren Zielprotein zu ermöglichen. Zum einen wurden neue TBK1 Inhibitoren durch ein Auswahlverfahren aus über 39,000 Substanzen identifiziert. Dies geschah mit Hilfe eines chemoproteomischen Testsystems in Zelllysat mittels einer kinasebindenden Matrix. Der Vorteil dieser Methode im Vergleich zu häufig verwendeten aktivitätsbasierenden Testverfahren ist die Bestimmung der Substanzaffinität für endogene Kinasen. Zudem bleiben unter den angewandten Bedingungen posttranslationale Modifikationen und Proteinkomplexe erhalten. Mittels des chemoproteomischen Verfahrens wurden über 200 neue TBK1 Inhibitoren mit unterschiedlichen Strukturen und Wirkungsgraden identifiziert.

Zum anderen wurden kinasebindende Matrizen eingesetzt, um TBK1 in Abhängigkeit vom Aktivierungszustand zu untersuchen. Der Aktivierungszustand von Kinasen wird oft über Autophosphorylierung oder durch vorgeschaltete Kinasen reguliert. Die resultierende Konformationsänderung kann die Bindungsaffinität von kleinen Molekülen für die Kinasen beeinflussen. Der Einsatz von neuentwickelten Testverfahren führte zu der Identifizierung von TBK1-Inhibitoren, die vorzugsweise an TBK1 aus aktivierten oder unbehandelten Zellen binden.

Eine weitere Innovation dieser Doktorarbeit war die Entwicklung einer chemoproteomischen Methode, um die Zellpermeabilität von Kinaseinhibitoren zu messen. Abweichungen zwischen biochemischen und zellbasierten Substanzaktivitäten sind gewöhnlich schwer nachzuvollziehen. Ein möglicher Grund dafür ist, dass die Fähigkeit einer Substanz, in die Zelle einzudringen und dort mit ihrem Zielprotein zu interagieren, selten direkt untersucht wird. Der klinische Inhibitor NVP-BEZ235 soll laut wissenschaftlicher Literatur die Kinase PI3K γ und andere Lipidkinasen hemmen. Allerdings war NVP-BEZ235 in PI3K γ -abhängigen zellulären Tests inaktiv. Die entwickelte Methode zur Messung der Zellpermeabilität lieferte den Beweis, daß NVP-BEZ235 in die Zelle eindringt, allerdings wurden andere Lipidkinasen mit höherer Affinität gebunden als PI3K γ . Diese Zellpermeabilitätsmethode wurde auch verwendet, um zwei neuentdeckte LRRK2 Inhibitoren zu untersuchen. Dabei wurde gezeigt, dass diese Inhibitoren in die Zellen eindringen können, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß.

Des Weiteren wurde ein chemoproteomisches Testverfahren auf isolierten Zellen aus humanem Blut entwickelt. Da die Physiologie von Primärzellen und die inhärente individuelle Variabilität von Mensch zu Mensch sich nicht in Tumorzellen widerspiegeln, ist es wichtig, native Testsysteme zu verwenden, um neue Medikamente zu entwickeln. Diese Tests ermöglichten die Messung von Inhibitoraffinitäten für PI3K δ und PI3K γ in Blutzellen von individuellen Spendern.

Zusammengefasst wurde in dieser Arbeit die Entwicklung und Durchführung von *in vitro* Tests zur Evaluierung von Kinaseinhibitoren unter nahezu physiologischen Bedingungen beschrieben. Diese Methoden reichen von Screeningverfahren mit hohem Durchsatz bis zur Untersuchung von Inhibitoren in primären Zellen, einschließlich detaillierter Studien des Verhältnisses zwischen Struktur und Affinität von Inhibitoren bei verschiedenen Aktivierungszuständen einer Kinase. Insgesamt ermöglichen diese Methoden eine bessere Prognose der Wirksamkeit von Inhibitoren, von der Hit-Identifizierung bis hin zur chemischen Optimierung und klinischen Untersuchungen.