

**Identifizierung von Inhibitoren des Hsp90-  
Aha1 Chaperonkomplexes zur Korrektur  
des Faltungsdefektes von CFTR $\Delta$ F508 bei  
Mukoviszidose**

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften der  
Fakultät für Chemie und Biochemie der Ruhr-Universität  
Bochum

vorgelegt von

Verena Ihrig

2016

Dekan:

Prof. Dr. Nils Metzler-Nolte

Erster Gutachter:

PD Dr. Wolfgang M. J. Obermann

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Raphael Stoll



# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	ZYSTISCHE FIBROSE .....	1
1.2	FUNKTION UND STRUKTUR DES CFTR .....	2
1.3	MUTATIONSKLASSEN .....	4
1.4	KORREKTOREN UND POTENZIATOREN .....	5
1.5	PROTEINQUALITÄTSKONTROLLE AM ER UND MOLEKULARE CHAPERONE.....	7
1.6	DAS CHAPERON HSP90 UND SEIN KOCHAPERON AHA1.....	9
1.7	QUALITÄTSKONTROLLE UND PROZESSIERUNG DES CFTR .....	11
1.8	ZIELSETZUNG.....	14
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>16</b>
2.1	MATERIAL.....	16
2.1.1	<i>Bakterienstämme</i> .....	16
2.1.2	<i>Zelllinien</i> .....	16
2.1.3	<i>Enzyme</i> .....	16
2.1.4	<i>Nährmedien und Antibiotika</i> .....	17
2.1.5	<i>Puffer und Lösungen</i> .....	18
2.1.6	<i>Chemikalien</i> .....	21
2.1.7	<i>Kits</i> .....	23
2.1.8	<i>Antikörper für Immunzytochemie</i> .....	23
2.1.9	<i>DNA- und Protein-Standards</i> .....	23
2.1.10	<i>Verbrauchsmaterialien</i> .....	24
2.1.11	<i>Gelfiltrations- und Ionenaustauscher-Säulen</i> .....	24
2.1.12	<i>Laborgeräte</i> .....	25
2.2	METHODEN.....	27
2.2.1	<i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	27
2.2.2	<i>Zellbiologische Methoden</i> .....	32
2.2.3	<i>Biochemische Methoden</i> .....	33
2.2.4	<i>Verwendete Programme und Statistik</i> .....	48
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>49</b>
3.1	DIE HUMANEN QUALITÄTSKONTROLLPROTEINE HSP90 UND AHA1 BILDEN EINEN STABILEN CHAPERONKOMPLEX .....	49
3.1.1	<i>Nachweis der Interaktion von rekombinantem Hsp90 und Aha1 mittels Gelfiltration</i> .....	49
3.1.2	<i>Nachweis der Hsp90-Aha1-Interaktion mit der Alpha-Technologie</i> .....	55
3.2	DER ALPHA-SCREEN IDENTIFIZIERTE 30 SUBSTANZEN, DIE DEN HSP90-AHA1-KOMPLEX EFFEKTIV INHIBIERTEN.....	56
3.2.1	<i>Zwei Substanzkandidaten interferierten mit Komponenten des Alpha- Screens</i> .....	59
3.2.2	<i>Drei Substanzen zeigten ein zytotoxisches Verhalten auf BHK-Zellen</i> .....	59
3.2.3	<i>Acht Hsp90-Aha1 Inhibitoren wurden für den Iodidefflux-Assay ausgewählt</i> .....	60

3.3	ZWEI HSP90-AHA1-INHIBITOREN STEIGERTEN DIE FUNKTIONALITÄT DES CFTR $\Delta$ F508 PROTEINS SIGNIFIKANT .....	62
3.3.1	<i>Im Gegensatz zum CFTR WT zeigte das <math>\Delta</math>F508-Protein eine kaum messbare Aktivität .</i>	62
3.3.2	<i>VX-809 und geringe Temperaturen steigerten die Aktivität des <math>\Delta</math>F508-Kanals .....</i>	63
3.3.3	<i>Die Hsp90-Aha1-Inhibitoren A12 und A16 steigerten die Aktivität des CFTR<math>\Delta</math>F508 Proteins um das 2,5 fache .....</i>	64
3.3.4	<i>VX-809 und A12 bzw. A16 wirkten synergistisch auf den CFTR<math>\Delta</math>F508.....</i>	65
3.3.5	<i>Der Potenziator VX-770 war nicht wirksamer als Genistein.....</i>	66
3.3.6	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Iodidefflux-Assay .....</i>	67
3.4	EXPRESSIONSANALYSE VON CFTR NACH BEHANDLUNG VON $\Delta$ F508 MIT VERSCHIEDENEN KORREKTORSUBSTANZEN.....	68
3.4.1	<i>Behandlung mit VX-809 in Kombination mit 26°C führte zu einer Reifung der <math>\Delta</math>F508-Variante .....</i>	70
3.4.2	<i>Die kombinierte Behandlung von <math>\Delta</math>F508-Zellen mit A12 + VX-809 ließ mutiertes CFTR verstärkt reifen. ....</i>	71
3.4.3	<i>Der Hsp90-Aha1 Inhibitor A16 beeinflusste kaum die Reifung von CFTR<math>\Delta</math>F508 .....</i>	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>74</b>
4.1	INTERAKTION VON AHA1 UND HSP90.....	74
4.2	IDENTIFIKATION VON 28 HSP90-AHA1 INHIBITOREN .....	75
4.3	IODIDEFFLUX-ASSAY UND IMMUNZYTOCHEMIE ZUM NACHWEIS DES CFTR-TRAFFICKINGS ZUR PLASMAMEMBRAN .....	76
4.3.1	<i>VX-809, 26°C sowie deren Kombination fördern die CFTR<math>\Delta</math>F508-Reifung.....</i>	77
4.3.2	<i>Die Hsp90-Aha1 Inhibitoren A12 und A16 steigern die Funktionalität von CFTR<math>\Delta</math>F508 signifikant und zeigen zusammen mit VX-809 eine synergistische Wirkungsweise .....</i>	80
4.3.3	<i>Der Potenziator VX-770 führt zu keiner weiteren Steigerung der Kanalfunktionalität.....</i>	83
4.4	SIGNIFIKANZ UND THERAPEUTISCHE ANWENDBARKEIT DER ERGEBNISSE .....	83
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>90</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>127</b>
<b>10</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>129</b>
<b>11</b>	<b>ABKÜRZUNGEN UND WORTERKLÄRUNGEN.....</b>	<b>130</b>
<b>12</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>132</b>
<b>13</b>	<b>KONGRESSBEITRÄGE.....</b>	<b>133</b>
13.1	VORTRÄGE .....	133
13.2	POSTER.....	133

14 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG ..... 134

# 1 Einleitung

## 1.1 Zystische Fibrose

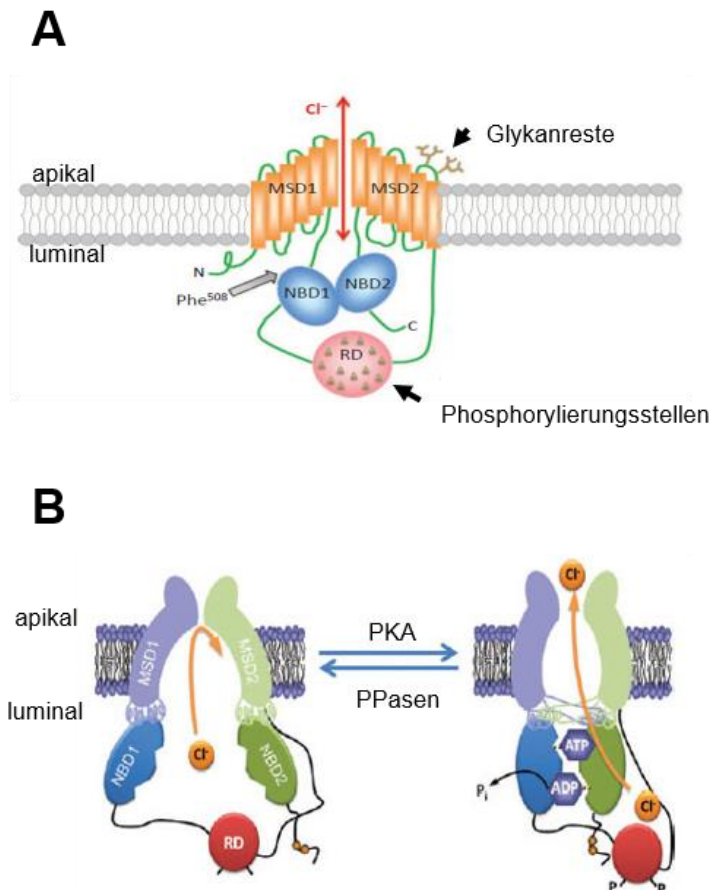
Bei der zystischen Fibrose (engl. Cystic Fibrosis, CF) handelt es sich mit einer Inzidenz von 1:2500 um eine seltene Krankheit innerhalb der kaukasischen Bevölkerungsgruppe. Diese Erkrankung weist dabei einen autosomal-rezessiven Erbgang auf. Die Krankheit ist bis heute nicht heilbar und lässt sich daher nur symptomatisch behandeln. Aufgrund der verbesserten Diagnostik und Therapiemöglichkeiten liegt die Lebenserwartung heute bei 40 Jahren und älter (Sens & Stern, 2012). Allgemein ist die Erkrankung durch eine Fehlfunktion von Chloridkanälen in den exokrinen Drüsen im gesamten Organismus charakterisiert. Dementsprechend erhöht sich bei Betroffenen die Viskosität vieler Körpersekrete enorm, die wiederum anschließend die Funktionalität vieler Organe beeinträchtigen. CF-Patienten leiden daher häufig unter schwerer Atemnot und wiederkehrenden Infektionen der Lunge, Verdauungsstörungen bei Beteiligung des Pankreas und des Dünndarms sowie unter Infertilität (meist bei Männern). Des Weiteren weist der Schweiß der Erkrankten erhöhte Salzkonzentrationen auf. Die Ausprägung der Symptome sowie der Zeitpunkt des Auftretens erster Symptome sind zwischen einzelnen Patienten sehr verschieden. Ausschlaggebend sind hier sowohl die Art der zugrundeliegenden Mutation(en) im sogenannten *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR)-Gen als auch Umweltfaktoren (McKone et al, 2006). Das CFTR-Gen wurde nach jahrelangen aufwendigen genetischen Kartierungen im Jahr 1989 entdeckt. Mehrere Forschergruppen identifizierten das CFTR-Gen schließlich auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (7q31) (Riordan et al, 1989; Rommens et al, 1989). Bis heute sind über 2000 verschiedene Mutationen im CFTR-Gen identifiziert worden (<http://www.genet.sickkids.on.ca/StatisticsPage.html>, Abfragezeitpunkt: 04.11.15). Die mit über 80 % häufigste Mutation im CFTR-Gen erkrankter Patienten in Europa ist die Deletion von drei Basenpaaren im Exon 11, die zum Verlust eines Phenylalanins an Position 508 ( $\Delta F508$ ) der Polypeptidkette führt (Kerem et al, 1989; Boeck et al, 2014). Bei diesen Patienten resultiert die Deletion des Phenylalanins in einer Fehlfaltung und dem anschließenden Abbau des CFTR-Proteins durch die mit dem endoplasmatischen Retikulum assoziierte Degradationsmaschinerie (ERAD), bevor es zur Zellmembran transportiert werden kann (Cheng et al, 1990; Sun et al, 2008).

## 1.2 Funktion und Struktur des CFTR

Gen-Analysen Anfang der 90er Jahren zeigten, dass das CFTR-Gen eine Länge von ca. 250 kbp aufweist und aus 27 Exons besteht. Das Genprodukt, der CFTR-Kanal, besteht aus 1480 Aminosäuren. Das CFTR-Protein lässt sich strukturell der *adenine nucleotide-binding cassette* (ABC-) Proteinfamilie zuordnen (Zielenski et al, 1991). Im Gegensatz zu allen weiteren Mitgliedern dieser Proteinfamilie aus Transport-ATPasen, fungiert das CFTR als Ionenkanal. Bereits kurz nach seiner Identifizierung schlugen Riordan et al. aufgrund der ihnen vorliegenden Aminosäuresequenz und durch Vergleiche mit anderen ABC-Proteinen ein bis heute weitestgehend gültiges Strukturmodell für CFTR vor. Demnach besteht das CFTR-Protein aus insgesamt fünf Domänen: zwei die Plasmamembran durchspannenden Untereinheiten (MSD1, MSD2), zwei globulären zytoplasmatischen nukleotidbindenden Domänen (NBD1, NBD2) sowie eine ebenfalls ins Zytoplasma ragende regulatorische Untereinheit (R-Domäne) (siehe Abb. 1). Die R-Domäne enthält zahlreiche geladene Aminosäurereste und Phosphorylierungsstellen. Die beiden MSD-Motive sind aus jeweils sechs transmembranen  $\alpha$ -Helices aufgebaut. Extrazellulär finden sich zusätzlich verschiedene Glykosylierungsstellen. Der Amino- sowie Carboxy-Terminus des Proteins ragen jeweils ins Zytoplasma (Riordan et al, 1989; Akabas, 2000). Die Aktivität des CFTR-Kanals wird durch die Proteinkinasen A und C (PKA, PKC) gesteuert, welche mehrere Serin- und Threoninresten in der R-Domäne phosphorylieren (Chappe et al, 2003; Ostedgaard et al, 2001). Die Öffnungsrate des CFTR-Kanals wird auf diese Weise erhöht, so dass die Phosphorylierung eine Voraussetzung für die nachfolgende Kanalöffnung durch ATP darstellt (Wang et al, 2000). Die Bindung von ATP an seine zwei Bindungsstellen in der NBD1 und NBD2 führt zu einer Dimerisierung der beiden Domänen. Zusätzlich resultiert diese Interaktion in einer Konformationsänderung der MSDs, so dass Chlorid-Ionen den Kanal passieren können (Vergani et al, 2005). Als Gegenspieler der Kinasen, dephosphorylieren Phosphatasen die Serin- und Threoninreste wieder und die CFTR-Kanalpore schließt sich (Hwang & Sheppard, 2009). Das CFTR-Protein fungiert als ein, durch zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aktivierter Chloridkanal an apikalen Zellmembranen verschiedener Epithelien (Gadsby et al, 2006). Dort übernimmt der Kanal die transmembrane Sekretion und Absorption von Salzen. Beim Gesunden wird durch den Export von Chlorid-Ionen an der apikalen Plasmamembran ein Konzentrationsgefälle aufgebaut, was eine höhere Salzkonzentration in den Körpersekreten außerhalb der Zelle zur Folge hat. Aufgrund des osmotischen Gradienten folgen Wassermoleküle passiv in den Extrazellularraum nach. Auf diese Weise kommt es zu einer Verdünnung des Mukus in Lunge und Verdauungsorganen. Bei an CF erkrankten Personen ist dieser Chloridtransport stark eingeschränkt, so dass die Sekrete immer zähflüssiger werden. Eine gewisse residuale Funktionalität konnte jedoch auch für den CFTR $\Delta$ F508 nachgewiesen werden (Welsh & Smith, 1993; Cheng et al, 1990; Lukacs



et al, 1993). Der reduzierte Chloridtransport resultiert in einer Beeinträchtigung der mukoziliären Reinigungsmechanismen der oberen und unteren Atemwege, was häufig zu einer Ansiedlung von Mikroorganismen in der ansonsten keimfreien Lunge führt. Schwere Infektionen und die chronisch fortschreitende Zerstörung der Lunge machen im fortgeschrittenen Stadium der CF eine Lungentransplantation meist unumgänglich (Chmiel et al, 2002).



**Abb. 1: Struktur und Aktivierung des CFTR-Kanals.**

**A** Der Chlorid (Cl<sup>-</sup>) leitende CFTR-Kanal ist aus zwei membrandurchspannenden (MSD1, MSD2) sowie zwei nukleotidbindenden Domänen (NBD1, NBD2) aufgebaut. Getrennt werden die beiden NBD-Untereinheiten durch eine zyttoplasmatische regulatorische Domäne (RD), welche zahlreiche Phosphorylierungsstellen aufweist. Die häufigste Mutation im CFTR (Phe<sup>508</sup>) liegt in der NBD1-Domäne (verändert nach (Farinha et al, 2013b)). **B** In der nicht aktiven Konformation (links) interagieren nur die MSD1 und MSD2 miteinander. Eine Phosphorylierung der R-Domäne durch die Phosphokinase A (PKA) ist Voraussetzung für die Aktivierung des CFTR. Die Bindung von Adenosintriphosphat (ATP) an seine Bindungsstellen in der NBD1 und NBD2 resultiert in einer Dimerisierung der NBDs und einer Konformationsänderung in den MSDs, so dass Anionen den Kanal passieren können. Phosphatasen (PPasen) als Gegenspieler der Kinasen dephosphorylieren den Kanal wieder. Verändert nach (Hwang & Sheppard, 2009).

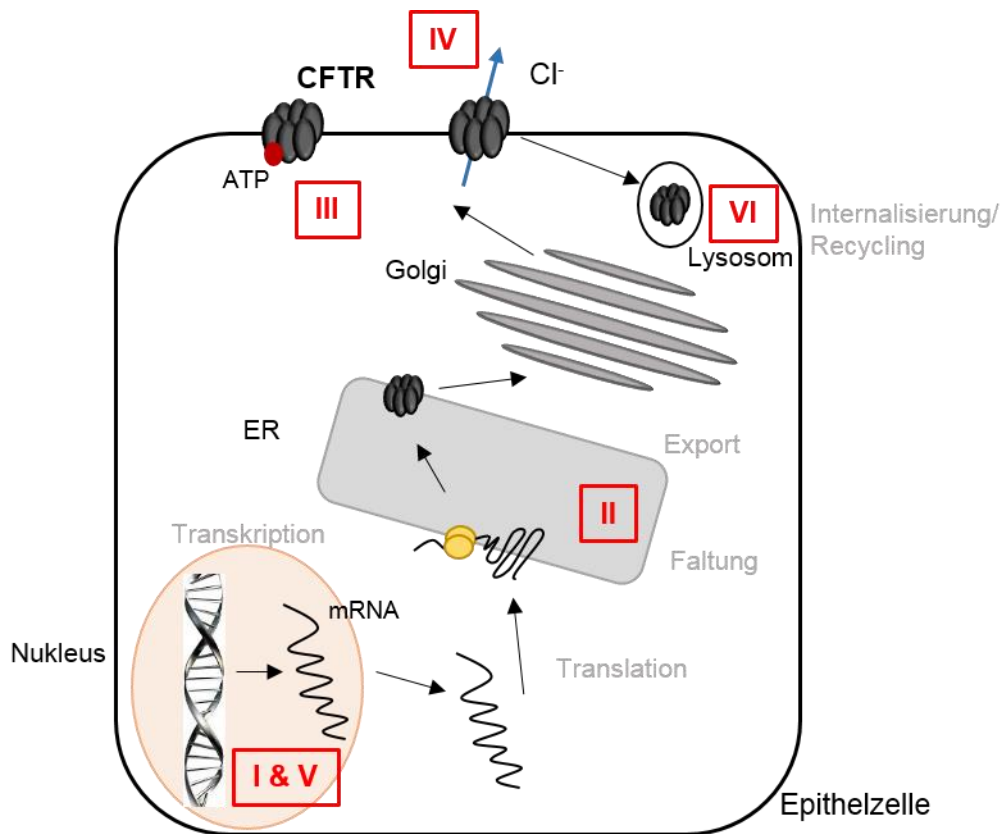
Die Zerstörung der Lungenfunktion sowie schwere Lungenentzündungen gehören zu den Haupttodesursachen von CF Patienten (Davis et al, 1996). Im Verdauungstrakt führt der hochviskose Mukus zu einem erschwerten Nahrungsaufschluss. Wachstumsstörungen sowie

Unter- bzw. Mangelernährung gehört daher häufig zu weiteren charakteristischen Symptomen von Patienten.

Obwohl meist als Chloridkanal beschrieben, weist der CFTR jedoch nur eine geringe Selektivität zwischen kleinen monovalenten Anionen auf. So leitet der CFTR neben Cl<sup>-</sup>-Ionen auch HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Ionen (Devor, D. C. et al., 1999; Reddy & Quinton, 2001) und Halogenide (z.B. I<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup>) (Kirk & Dawson, 2003).

### 1.3 Mutationsklassen

Wie bereits beschrieben, ließ sich bislang eine Vielzahl verschiedener Mutationen im CFTR-Gen identifizieren. Abhängig von ihrer Auswirkung auf das CFTR-Protein, lassen sich diese Mutationen in verschiedene Klassen unterteilen (siehe Abb. 2). Mutationen vom **Typ I** führen häufig zu Stop-Codons oder Leserasterverschiebungen innerhalb der mRNA des CFTR, so dass ein verkürztes oder funktionsloses Protein entsteht (z.B. 1717-1G → A). Auch umfangreichere Deletionen und Insertionen können hier zugrunde liegen. CFTR-Proteine, die Mutationen vom **Typ II** tragen, weisen Faltungsdefekte auf, die von den zellinternen Qualitätskontrollmechanismen am ER erkannt werden. Die Proteine können das ER nicht verlassen und werden infolgedessen von den zytoplasmatischen Degradationseinheiten, den Proteasomen, abgebaut. Auch die häufigste Mutation  $\Delta F508$  lässt sich den Typ II-Mutationen zuordnen. Im Gegensatz dazu werden Proteine mit Mutationen vom **Typ III** korrekt gefaltet und zur Plasmamembran transportiert, weisen jedoch eine verminderte Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals auf (Gating-Defekt). Häufigste Mutation innerhalb dieser Klasse ist der Austausch von Glycin zu Asparaginsäure an Position 551 (G551D). Mutationen in den MSDs, die eine verminderte Leitfähigkeit des CFTR für Chlorid-Ionen verursachen, jedoch nicht das Trafficking beeinflussen, werden der **Klasse IV** zugeordnet (z.B. R117H). Des Weiteren gibt es auch Mutationen (**Typ V**), die das posttranskriptionelle Spleißen der CFTR mRNA beeinflussen und so zu einem stark reduzierten Gehalt von CFTR an der Plasmamembran führen. Einige Wissenschaftler erweiterten das Modell um einen weiteren Mutationstyp (**Typ VI**), dem alle Mutationen zugeordnet werden, die zu einem instabilen Protein in der Plasmamembran und somit zu einer raschen Internalisierung führen (Tsui, 1992; Welsh & Smith, 1993).



**Abb. 2: Mutationsklassen im CFTR-Gen.**

Mutationen vom **Typ I** wie z.B. Leseraster- oder Nonsense-Mutationen führen zu einem verkürzten, funktionslosen Protein. CFTR-Proteine mit **Typ II**-Mutationen, zu denen auch die  $\Delta F508$ -Variante gehört, weisen in der Regel Faltungsdefekte auf und werden frühzeitig von der Proteinqualitätskontrolle am/im endoplasmatischen Retikulum (ER) abgebaut. **Typ III**-Mutationen beeinträchtigen weder die Faltung noch das Trafficking des Proteins, sondern weisen einen Gating-Defekt auf. Bei CFTR-Proteinen, die in ihrer Leitfähigkeit vermindert sind, liegen meist Mutationen vom **Typ IV** zugrunde. Mutationen vom **Typ VI** führen zu einer erhöhten Instabilität des CFTR an der Plasmamembran.

## 1.4 Korrektoren und Potenziatoren

In den Jahren nach der Identifizierung des CF verursachenden Gens wurden erste Substanzen, sogenannte chemische Chaperone gefunden, die die Ionenkanalfunktion verschiedener mutierter CFTR-Varianten korrigierten. Man ging davon aus, dass diese Substanzen unspezifisch die Protein-Konformation stabilisierten und den Prozess der Proteinfaltung am ER unterstützten. Glycerol war eine der ersten Substanzen, die nachweislich CFTR $\Delta F508$  stabilisierten und die Reifung des Proteins förderten (Sato et al, 1996). Weitere Substanzen, die ebenfalls unspezifisch die Expression und Funktionalität erhöhten, waren u.a. Thapsigargin ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Inhibitor des sarkoplasmatischen Retikulums) (Egan et al, 2002) und 4-Phenylbutyrat (Rubenstein et al, 1997). Heute werden Substanzen, die die Funktionalität oder Reifung des CFTR positiv beeinflussen, meist in sogenannte Potenziatoren und Korrektoren unterschieden.

**Potenziatoren** sind in der Lage, die Kanalaktivität des CFTR an der Plasmamembran zu steigern, indem sie die Öffnungswahrscheinlichkeit des Kanals erhöhen. Folglich sind

derartige Substanzen für den therapeutischen Einsatz bei CFTR Mutationen vom Typ III und IV geeignet, da hier ausreichend Protein zur Plasmamembran gelangt. Einer der bekanntesten Potenziatoren ist das Flavonoidderivat Genistein, das an die NBD2-Domäne bindet und dort die ATP-Hydrolyse unterbindet. In der Folge verbleibt der Kanal länger in seiner offenen Konformation (Hwang and Sheppard, 1999). Bei weiteren identifizierten Potenziatoren handelt es sich u.a. um Phosphodiesterase-Hemmer (Kelley et al, 1997) sowie verschiedene, von Vertex Pharmaceuticals entwickelte, Substanzen (VRT-532, VX-770) (van Goor, 2006; van Goor et al, 2009). VX-770 erreichte im Jahr 2012 nach erfolgreichen klinischen Studien mit Patienten, die die G551D-Variante des CFTR tragen (Accurso et al, 2010), schließlich unter dem Namen "Ivacaftor" die Marktreife.

Im Vergleich zu den Potenziatoren gestaltet sich die Entwicklung von **Korrektoren** komplizierter, da hier komplexe Mechanismen der Proteinqualitätskontrolle modifiziert und die zum Teil fehlende Stabilität der Proteine an der Plasmamembran überwunden werden müssen (Rowe & Verkman, 2013). Dies gilt auch für die mutierte CFTR-Variante, die, sofern sie zur Zellmembran gelangt, thermisch instabil ist und eine reduzierte Öffnungswahrscheinlichkeit aufweist (Sharma et al, 2001; Cholon et al, 2010; Jurkuvenaite et al, 2010). Innerhalb der Gruppe der Korrektoren wird häufig zusätzlich zwischen pharmakologischen Chaperonen und Proteostase-Regulatoren unterschieden. Pharmakologische Chaperone interagieren meist direkt mit CFTR $\Delta$ F508 und unterstützen seine Faltung und weitere Prozessierung. Proteostase-Regulatoren modulieren hingegen Komponenten der zellulären Proteinqualitätskontrolle wie z.B. beteiligte Chaperone (Mu et al, 2008; Powers et al, 2009).

Zu bislang identifizierten pharmakologischen Chaperonen des CFTR $\Delta$ F508 gehören z.B. Substanzen wie Kurkumin (Egan et al, 2004), der Viagra-Wirkstoff Sildenafil (Robert et al, 2008) oder Phenylbutyrat (Zeitlin et al, 2002; Rubenstein et al, 1997). Der Erfolg blieb jedoch in den meisten Fällen auf die *in-vitro* Situation beschränkt. Erste größere Hochdurchsatz-Screenings identifizierten des Weiteren die Korrektorsubstanzen Corr-4a (Pedemonte et al, 2005), VRT-235 (van Goor et al, 2006) (van Goor, 2006) sowie VX-809 (Lumacaftor) (van Goor et al, 2011), bei dem es sich um den bislang erfolgreichsten  $\Delta$ F508-Korrektor handelt. In humanen  $\Delta$ F508 Bronchialepithelzellen ließ sich nach Behandlung der Zellen 34 % mehr CFTR $\Delta$ F508 an der Zelloberfläche im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen nachweisen. Des Weiteren stieg die Kanalaktivität in den mutierten Zellen auf bis zu 15 % des Werts von gesunden Lungenzellen (van Goor et al, 2011). Die genaue Wirkungsweise von VX-809 ist dabei noch nicht abschließend geklärt. Studien konnten bislang zeigen, dass VX-809 direkt mit der MSD1 des CFTR $\Delta$ F508 interagiert und diese offensichtlich stabilisiert (Loo et al, 2013; Ren et al, 2013). Nachdem VX-809 die Reifung des mutierten CFTR *in-vitro* erfolgreich förderte, wurde diese Substanz anschließend in einer klinischen Studie getestet.  $\Delta$ F508-

Patienten, die mit VX-809 behandelt wurden, wiesen jedoch nur einen reduzierten Salzgehalt in den Schweißdrüsen im Vergleich zu Placebo Behandelten auf. Eine verbesserte Lungenfunktion, die einen tatsächlichen Vorteil für Erkrankte darstellen würde und eine CFTR Reifung in Rektalbiopsien, waren nicht festzustellen (Clancy et al, 2012). Heute geht man davon aus, dass eine effektive Behandlung von  $\Delta F508$  Patienten mit nur einem Korrektor nicht ausreichend ist. Tatsächlich waren die Ergebnisse einer randomisierten Phase 3-Studie vielversprechender, in der eine Kombinationstherapie mit dem Korrektor VX-809 und dem Potenziator VX-770 an homozygoten  $\Delta F508$ -Patienten getestet wurde. In dieser 24-wöchigen Studie ließen sich sowohl eine Verbesserung der Lungenfunktion (gemessen als Einsekundenkapazität FEV<sub>1</sub>) als auch eine Abnahme von pulmonalen Exazerbationen bei behandelten Patienten feststellen (Wainwright et al, 2015).

Neben den vorgestellten pharmakologischen Chaperonen, die die Faltung und Prozessierung von mutiertem CFTR unterstützen, existiert des Weiteren das Konzept der sogenannten Proteostase-Regulatoren. Das Proteostase-Netzwerk balanciert die Synthese, Faltung, Aggregation und den Abbau von Proteinen (Rodon & Höhfeld, 2010). Regulatoren dieser Maschinerie greifen modulierend in die zelluläre Proteinqualitätskontrolle ein, indem sie die Aktivität von zentralen Signalwegen innerhalb des Proteostase-Netzwerks, wie z.B. das Hsp70- oder Hsp90-System inklusive seiner Kochaperone verändern (Powers et al, 2009). Dieser Effekt konnte bereits für Inhibitoren von Histon-Deacetylasen (HDAC) gezeigt werden, da das Maß der Acetylierung nachweislich die Aktivität von Transkriptionsfaktoren, wie dem Hitzeschockfaktor 1 (HSF-1) (Hutt et al, 2010), und Proteinen der Qualitätskontrolle, wie Hsp90 reguliert (Sadoul et al, 2008; Valenzuela-Fernández et al, 2008). Im Fall von CFTR wurden bereits erhöhte Expressionslevel der  $\Delta F508$ -Variante beobachtet, wenn die Aktivität spezifischer Kochaperone reguliert wurde. So wurde z.B. bei einem Knockdown von Hsc70 bzw. der Behandlung von  $\Delta F508$ -exprimierenden Zellen mit Hsc70-Inhibitoren eine verstärkte Reifung von mutiertem CFTR beobachtet (Rubenstein & Zeitlin, 2000; Basile et al, 2012). Wang und Kollegen zeigten im Jahr 2006 ebenfalls, dass ein Knockdown des Aktivator der Hsp90 ATPase 1 (Aha1) zu einer erfolgreichen Prozessierung und apikalen Lokalisation von  $\Delta F508$  führte (Wang et al, 2006).

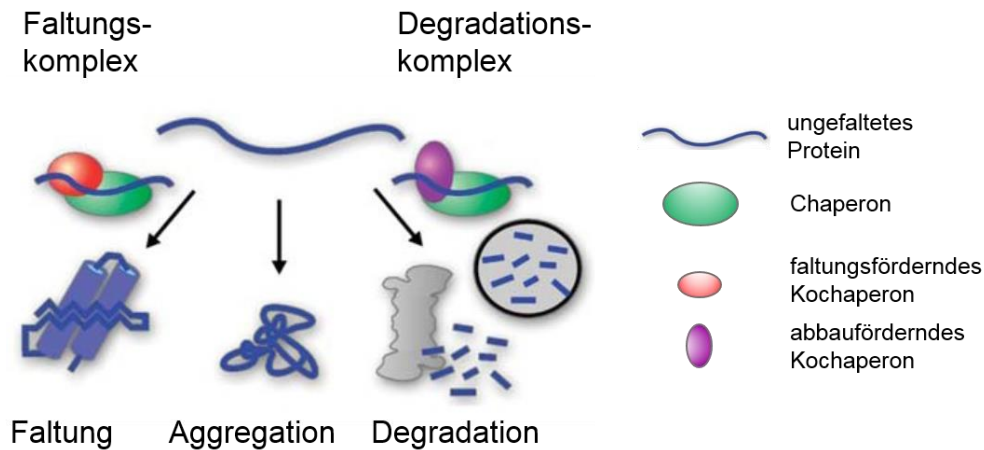
## 1.5 Proteinqualitätskontrolle am ER und molekulare Chaperone

In der Zelle existieren zahlreiche Kontrollinstanzen, die die einzelnen Schritte in der Synthese von DNA, RNA und Proteinen engmaschig überwachen. Auf diese Weise reduziert die Zelle die Rate von fehlerhaften Syntheseprodukten, was lebenswichtig für die Aufrechterhaltung ihrer Funktionen ist. Die Fehlfunktion einiger solcher Kontrollmechanismen führt beispielsweise zur Entstehung von Krebs oder der Ansammlung toxischer Proteinaggregate wie es beim Morbus Parkinson der Fall ist. Die Qualitätskontrolle von Proteinen startet bereits

während der Transkription und setzt sich über die Translation am ER, die Faltung und die korrekte Zusammenlagerung ihrer Untereinheiten (Assembly) fort. Ziel aller Kontrollinstanzen ist es, nur diejenigen Proteine passieren zu lassen, die ihre native Konformation, bei der es sich in der Regel um die energetisch günstigste Konformation handelt, erreicht haben. Wird dieses Ziel nicht erreicht, sorgen verschiedene Degradationswege für die Entsorgung fehlerhafter Proteine, zumeist über das Ubiquitin-Proteasom-System (Arndt et al, 2007; Kettern et al, 2010).

Moleküle, die Proteine stabilisieren und in ihrer Faltung sowie ihrer korrekten Zusammenlagerung unterstützen, ohne dass sie selbst Komponenten des Endprodukts werden, werden Chaperone genannt. Sie stellen die Hauptakteure der Proteinqualitätskontrolle am ER dar. Einige dieser Faltungshelfer gehören zusätzlich zu den Stress- oder **Hitzeschock**proteinen (Hsp), die bei zellulärem Stress hochreguliert werden (z.B. Hsp70, Hsp90) (Powers et al, 2009). Denn gerade unter diesen Bedingungen ist die Wahrscheinlichkeit für Fehlfaltungen oder die Aggregation von Proteinen besonders hoch (Ellis, 2006; Hartl, 1996). Neben ihrer Aufgabe als Faltungshelfer, sind Chaperone auch für den Abbau von Proteinen verantwortlich, die trotz Unterstützung nicht ihre native Konformation einnehmen können. Entscheidend hierbei ist das Zusammenspiel mit spezifischen Kochaperonen. Ein und dasselbe Chaperone kann demnach, in Abhängigkeit vom assistierenden Kochaperon, sowohl die Faltung als auch den Abbau eines Proteins vermitteln (Hartl et al, 2011; Kettern et al, 2010) (siehe Abb. 3). Der Abbau von fehlgefalteten Proteinen und Aggregaten ist für die Zelle von großer Bedeutung, da eine Ansammlung dieser "molekularen Abfälle" im ER oder Zytosol schwerwiegende Konsequenzen für die Zelle nach sich zöge. In eukaryotischen Zellen existieren verschiedene Klassen von Chaperonen, die zumeist nach ihrem Molekulargewicht benannt sind (z.B. Hsp40, Hsp60 (Chaperonine), Hsp70, Hsp90 oder Hsp100). Bei zwei der wichtigsten Chaperonsysteme handelt es sich um das Hsp70- und Hsp90-System, zwei molekulare Maschinen, die von einer Vielzahl weiterer Kofaktoren reguliert werden. Hsp70 und Hsp90 unterstützen die Faltung oder Degradation ihrer Klientenproteine, indem die Klienten, zum Teil mehrfach, einen durch ATP und Kofaktoren regulierten Zyklus durchlaufen. Die Chaperone erkennen dabei ihre noch nicht korrekt gefalteten Klientenproteine anhand von exponierten hydrophoben Seitenketten (Hartl et al, 2011; Taipale et al, 2010). Die Verbindung zwischen dem Chaperon- und Degradationsnetzwerk wird u.a. durch das **C**arboxyl-terminus of **H**sc70-interacting **p**rotein (CHIP) vermittelt, da CHIP über seine **t**etratricopeptid-**r**epeat (TPR)-Domäne sowohl mit Hsp/Hsc70 als auch mit Hsp90 interagiert (Ballinger et al, 1999; Connell et al, 2001). Als E3-Ligase ubiquityliert CHIP Klientenproteine, die fehlgefaltet sind und dem Proteasom zum Abbau zugeführt werden sollen (Connell et al, 2001; Murata et al, 2001). Die Proteinqualitätskontrolle mit ihren verschiedenen, ineinander verzahnten Kontrollsystemen hat

demnach die Aufgabe, die feine Balance zwischen Proteinfaltung und Degradation (Proteostase) aufrechtzuerhalten und die Zelle vor Schäden durch aggregierende Proteine zu bewahren.



### Abb. 3: Wirkungsweise von molekularen Chaperonen im Proteostase-Netzwerk.

Die Wirkungsweise ein und desselben Chaperons hängt häufig davon ab, mit welchen Kochaperonen es zusammenarbeitet. Ein ungefaltetes Klientenprotein kann demnach entweder korrekt gefaltet oder z.B. im Lysosom degradiert werden, je nachdem welches Kochaperon dem Chaperon assistiert. Erfolgt keine Bindung des ungefalteten Proteins an Chaperone aggregiert das Protein möglicherweise. Verändert nach (Kettern et al, 2010).

## 1.6 Das Chaperon Hsp90 und sein Kochaperon Aha1

Hsp90 besitzt mit 1 - 2 % einen der höchsten Anteile am Gesamtproteingehalt einer Zelle (Borkovich et al, 1989). Die Bedeutung dieses Chaperons für zelluläre Funktionen wird ebenfalls dadurch unterstrichen, dass Hsp90 sowohl in Bakterien als auch in allen Eukaryoten hochkonserviert ist. Einzig die Gruppe der Archea besitzt kein entsprechendes Homolog. Für alle Eukaryoten gilt, dass funktionales Hsp90 im Zytoplasma absolut notwendig für das Überleben ihrer Zellen ist (Borkovich et al, 1989). Zusätzlich finden sich noch weitere Organellespezifische Hsp90-Isoformen, z.B. im ER oder den Mitochondrien. Im Zytoplasma von Säugern existieren zwei Hsp90-Isoformen: Bei Hsp90 $\alpha$  handelt es sich um die stressinduzierte Form, während Hsp90 $\beta$  konstitutiv exprimiert wird (Sreedhar et al, 2004). Strukturell liegt Hsp90 als Homodimer vor, wobei jedes Protomer aus einer N-terminalen (N-), mittleren (M-) und C-terminalen (C-) Domäne aufgebaut ist. Während die N-Domäne ATP-Bindestellen aufweist, scheint die M-Domäne eine Rolle bei der Unterscheidung von Substratproteinen zu spielen (Hawle et al, 2006; Prodromou et al, 1997). Die C-terminale Dimerisierungsdomäne weist ein sogenanntes MEEVD-Motiv auf, welches Kochaperone mit TPR-Domänen, wie das Hsp70-Hsp90 organisierende Protein (Hop/Sti1) oder Cyp40, binden kann (Young et al, 1998; Prodromou et al, 1999). Bislang wurde eine Vielzahl verschiedenster Klientenproteine von Hsp90 identifiziert. Dazu gehören u.a. Proteinkinasen oder Hormonrezeptoren (Dittmar et al,

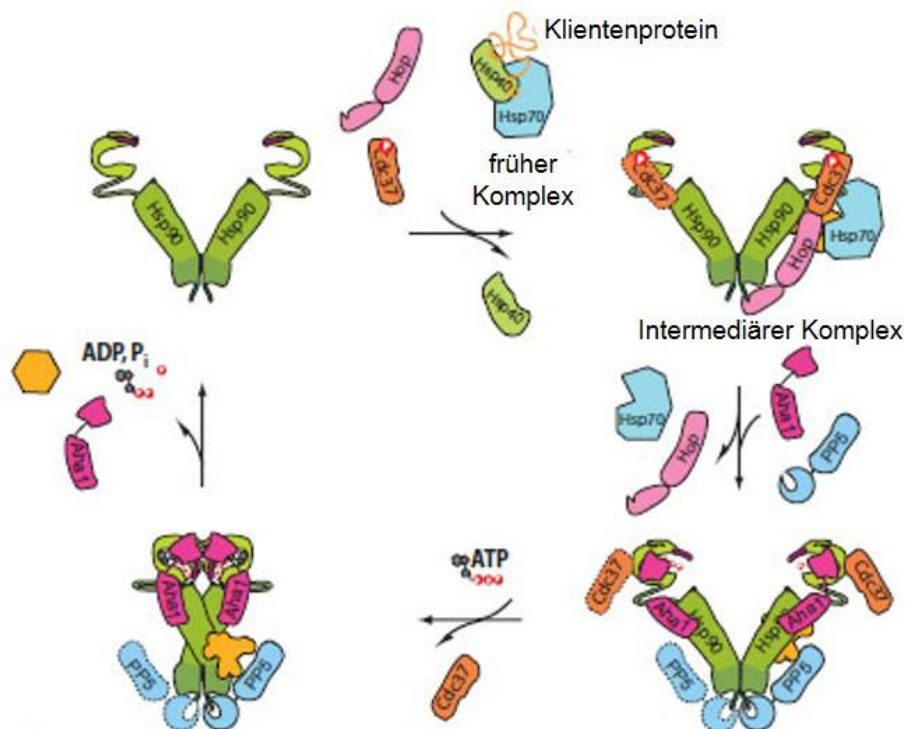
1997; Sanchez et al, 1985; Nathan & Lindquist, 1995). Wie bereits in Kapitel 1.5 erwähnt, durchlaufen Hsp90-Klientenproteine einen Zyklus, der essentiell von der ATP-Hydrolyse und verschiedenen Kochaperonen abhängig ist (Obermann et al, 1998). Zu den mehr als 20 Kochaperonen, die den Hsp90-Zyklus regulieren, gehören u.a. das Cyclophilin Cyp 40, Cdc37 (p50), p23 und Aha1 (Panaretou et al, 2002; Lotz, 2003; Lotz et al, 2003; Young et al, 1998; Stepanova et al, 1996; Young & Hartl, 2000; Lotz et al, 2003). Einige dieser Chaperone wie Hop, Cdc37 oder p23, verlangsamen diesen Zyklus indem sie die ATPase Aktivität von Hsp90 hemmen (Young & Hartl, 2000; Siligardi et al, 2002; Prodromou et al, 1999) während Aha1 die ATPase Aktivität stimuliert (Panaretou et al, 2002; Lotz, 2003; Lotz et al, 2003).

In Hefen existieren zwei Isoformen dieses Proteins, Aha1 und der **high copy Hsp90 suppressor** (Hch1). Hch1 wurde Ende der 90er Jahre in Temperatur-sensitiven Hsp90-Mutanten von *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert (Nathan et al, 1999). Hch1 weist eine hohe Sequenzübereinstimmung mit dem N-terminalen Part von Aha1 auf, das jedoch aus 197 zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus aufgebaut ist (Panaretou et al, 2002). Während Hch1 nur in niederen Eukaryoten nachweisbar ist, existieren Aha1-Homologe auch in höheren Eukaryoten (Panaretou et al, 2002; Lotz, 2003; Lotz et al, 2003). Erste Studien zeigten, dass Aha1 bei der Aktivierung des Hsp90-Substrates v-Src, einer Tyrosinkinase, sowie von Glukokortikoid-Rezeptoren beteiligt ist (Panaretou et al, 2002; Holmes et al, 2008; Lotz et al, 2003). Eine Studie von Wang und Kollegen identifizierte Aha1 als eine neue, bedeutende Komponente der CFTR-Qualitätskontrolle (Wang et al, 2006). Aha1 gilt bislang als einziger bekannter Aktivator der Hsp90-ATPase Aktivität und steigert die Rate der ATP-Hydrolyse um eine Größenordnung (Hawle et al, 2006; Lotz et al, 2003; Panaretou et al, 2002). Weitergehende Untersuchungen konnten zeigen, dass Aha1 für eine effiziente Stimulation der ATPase Aktivität sowohl an die Mitteldomäne als auch die katalytische N-Domäne von Hsp90 binden muss (Lotz, 2003; Koulov et al, 2010; Lotz et al, 2003). Bemerkenswert ist dabei, dass nur ein Aha1-Molekül pro Hsp90-Dimer für eine maximale Hsp90-Aktivierung notwendig ist (Retzlaff et al, 2010). Die Affinität von Aha1 für Hsp90 ist scheinbar konformationsabhängig. So bindet Aha1 offensichtlich bevorzugt an Hsp90 in seiner geschlossenen, dimerisierten Form (Li et al, 2013).

Der Ablauf des Hsp90-Zyklus und die Beteiligung verschiedener Kochaperone sind im Folgenden zusammenfassend am Beispiel der Kinasen dargestellt (Abb. 4). Neu synthetisierte Kinasen binden in einem frühen Komplex zuerst an Hsp70/Hsp40. Mithilfe des Adaptorproteins Hop wird das Klientenprotein anschließend auf Hsp90 übertragen. Hop sowie das Kinase-spezifische Chaperon Cdc37 stabilisieren die offene Konformation von Hsp90 (intermediärer Komplex). Die nachfolgende Anlagerung von Aha1 und der Proteinphosphatase 5 (PP5) begünstigt die Ablösung von Hop und forciert die Progression der offenen zur geschlossenen Hsp90-Konformation. Des Weiteren führt Aha1 im Folgenden zusammen mit Nukleotiden



(ATP) zur Dissoziation von Cdc37. Nach erfolgter Hydrolyse des ATP wird das aktivierte Klientenprotein schließlich aus dem Zyklus entlassen (Li und Buchner, 2013).



**Abb. 4 Schematischer Ablauf des Hsp90-Chaperonzyklus für Kinasen.**

Das Klientenprotein bildet zusammen mit Hsp70/Hsp40 einen frühen Komplex. Über Hop wird die Kinase auf Hsp90 übertragen, wobei sich Cdc37 zusätzlich stabilisierend auf die offene Hsp90-Konformation des intermediären Komplexes auswirkt. Die Bindung von Aha1 und PP5 führt zu einer Dissoziation von Hop und zu einem Übergang von Hsp90 in die geschlossene Konformation. Nach der Ablösung von Cdc37 sowie der Hydrolyse von ATP, wird das Klientenprotein aus dem Komplex entlassen. Verändert nach (Li und Buchner, 2013).

## 1.7 Qualitätskontrolle und Prozessierung des CFTR

Die Faltung und Prozessierung großer Multidomänen-Proteine in einer hoch verdichteten Umgebung wie dem Zytoplasma, deren Proteinkonzentration mehr als 300 mg/ml erreichen kann, stellt Zellen vor eine enorme Herausforderung (Ellis & Minton, 2006; Zimmerman & Trach, 1991). Die Synthese der CFTR-Polypeptidkette beginnt an den im Zytoplasma liegenden Ribosomen. Bereits während der Translation bindet die wachsende Polypeptidkette an einen sogenannten Signalerkennungspartikel (engl. *signal recognition particle*, SRP), der den Ribosomen-Polypeptidkomplex zur ER-Membran leitet. Dort bindet der SRP an seinen spezifischen SRP-Rezeptor während das Ribosom und die naszierende Polypeptidkette mit dem tunnelbildenden Sec61-Translokon interagieren (Skach, 2000; Lu et al, 1998). Das wachsende Polypeptid wird somit bereits ko-translational in die ER-Membran inseriert. An allen weiteren Prozessen, wie Faltung, Proteinqualitätskontrolle und Prozessierung des CFTR

sind mehr als 200 Proteine beteiligt, die Wang et al. identifizierten und als "CFTR-Interaktom" bezeichnen (Wang et al, 2006). Beruhend auf bisherigen Erkenntnissen, schlugen Farinha und Amaral ein Modell für die Proteinqualitätskontrolle des CFTR vor, das mehrere Kontrollinstanzen vorsieht (Farinha & Amaral, 2005). Im Folgenden wird hauptsächlich der erste Kontrollpunkt näher erläutert, da dieser für das CFTR $\Delta$ F508 kritisch ist.

Demnach wird die erste Kontrolle der CFTR-Faltung durch das zytoplasmatische Hsc70 vermittelt, welches nachweislich mit dem CFTR-Protein interagiert (Yang et al, 1993; Meacham et al, 1999). Während das WT-Protein die Kontrolle passieren kann, erkennt der Hsp/Hsc70-Komplex im Fall der  $\Delta$ F508-Variante exponierte hydrophobe Reste und bindet daraufhin mit hoher Affinität an das mutierte Protein. Weitere Chaperone, die bei der Qualitätskontrolle des CFTR eine Rolle spielen, sind Hsp40 und Hsp90. Die verlängerte Interaktion des mutierten CFTR mit diesen drei Chaperonen resultiert schließlich, durch Rekrutierung weiterer Kochaperone, in der Ubiquitinierung des Proteins. Daher wird die starke Assoziation des CFTR $\Delta$ F508 mit diesem Chaperon-Triumvirat auch als Chaperon-Falle (*chaperone trap*) bezeichnet (Coppinger et al, 2012). Ebenfalls von zentraler Bedeutung für die Degradation des mutierten CFTR scheint das Hsp90-Kochaperon Aha1 zu sein (siehe Kap. 1.4). Studien wiesen nach, dass ein Knockdown von Aha1 durch siRNA den vorzeitigen Abbau von CFTR $\Delta$ F508 durch ERAD inhibierte und so die Expression des mutierten Proteins an der Plasmamembran erhöhte (Wang et al, 2006). Ein ähnlicher Effekt wurde in einer anderen Studie durch die Einführung von Mutationen im Aha1-Gen erzielt, die die Bindung an Hsp90 störten bzw. die ATPase stimulierende Wirkung von Aha1 auf Hsp90 reduzierten (Koulov et al, 2010). Da der Komplex aus Hsp90 und Aha1 scheinbar bevorzugt mit dem fehlgefalteten CFTR $\Delta$ F508 interagiert (Wang et al, 2006), vermuten die Autoren, dass die Unterbindung der Hsp90-Aha1 Interaktion zu einer reduzierten ATP-Hydrolyserate und damit zu einer Entschleunigung des Hsp90-Chaperonzyklus führt. Die Verweildauer des  $\Delta$ F508-Klientenproteins im Hsp90-Zyklus würde dadurch vermutlich dahingehend verlängert, dass das Protein eine für den weiteren Export günstigere Konformation annehmen kann (Koulov et al, 2010; Wang et al, 2006). Neueste Erkenntnisse sprechen Aha1 sogar eine weitergehende Funktion als eigenständiges Holdase-Chaperon zu. Tripathi et al. konnten zeigen, dass Aha1 durch Hitze denaturierte Luziferase vor der Aggregation bewahrt und nachfolgend dem Ubiquitin-Proteasom-System zur Verfügung stellt. Im Fall des  $\Delta$ F508-Proteins vermuten Tripathi et al., dass Aha1 eigenständig fehlgefaltetes Klientenproteine (z.B. CFTR) erkennen und binden kann, um es nachfolgend durch die Interaktion mit CHIP der Degradation zuzuführen (Tripathi et al, 2014). Als E3-Ligase unterstützt CHIP die Ubiquitinierung des fehlgefalteten CFTR-Proteins (Meacham et al, 2001), so dass dieses nachfolgend vom Proteasom abgebaut wird (Meacham et al, 2001; Jensen et al, 1995; Ward et al, 1995).

Der zweite Kontrollpunkt in der Qualitätskontrolle des CFTR, der vor allem das WT-Protein betrifft, involviert die Kern- oder N-Glykosylierung sowie den Calnexin-Zyklus (Farinha & Amaral, 2005). Die N-Glykosylierung der Polypeptidkette ist von großer Bedeutung für die Interaktion mit weiteren Proteinen der ER-Proteinqualitätskontrolle, wie z.B. dem membranständigen ER-Chaperon Calnexin, das noch nicht gefaltete Glykoproteine in ihrer Faltung unterstützt (Pind et al, 1994; Amaral, 2005). Noch nicht gefaltete Proteine durchlaufen den Calnexin-Zyklus teilweise mehrfach bis sie ihre korrekte Konformation erreicht haben. Da auch die Faltung des CFTR WT äußerst ineffizient ist (Ward & Kopito, 1994), wird weiterhin fehlgefaltetes Protein über die **Glykoprotein ER assoziierte Degradation** (GERAD) entsorgt (Farinha & Amaral, 2005).

Ein dritter Kontrollpunkt findet sich an der ER-Austrittsseite. Dort findet der Export des CFTR in Mantel-Protein II (engl. *coat protein II*, COPII)- Vesikeln in Richtung Golgi-Apparat statt. Ein wichtiges Cargosignal, welches das CFTR für den Transport zum Golgi aufweisen muss, ist das sogenannte *di-acidic* Signal (DAD-Motiv) (Nishimura, 1997). CFTR-Protein, welches das ER nicht verlassen kann, zeigt eine sogenannte N- oder Kernglykosylierung und weist ein Molekulargewicht von ca. 140 kDa auf. Diese unreife CFTR-Variante wird im Westernblot als Bande B sichtbar.

Nach dem Export aus dem ER erfährt das CFTR im Golgi weitere Glykosylierungen, die ein größeres Molekulargewicht bedingen. Dieses "reife" CFTR entspricht nun dem C-Banden CFTR (ca. 180 kDa) (Amaral, 2005). Nachfolgend wird das reife CFTR vom Golgi zur Plasmamembran transportiert.

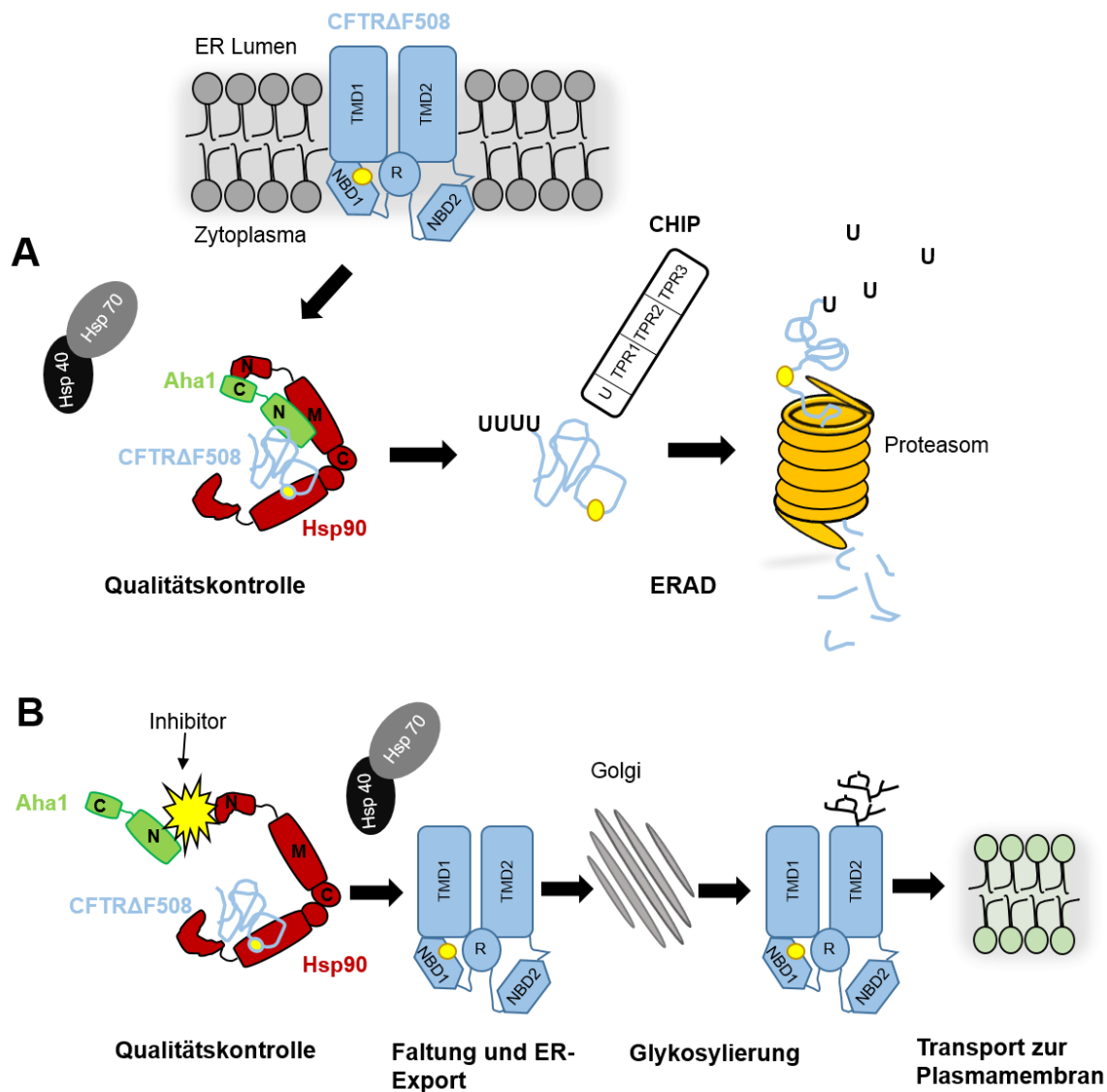
## 1.8 Zielsetzung

Die häufigste krankheitsauslösende Mutation der Zystischen Fibrose,  $\Delta F508$ , führt zu einer Fehlfaltung des CFTR-Proteins, das von der Proteinqualitätskontrolle im und am ER erkannt wird. Anstatt seinen Bestimmungsort, die Plasmamembran zu erreichen, wird der Kanal in der Folge vom Proteasom-Ubiquitin-System abgebaut, obwohl er eine gewisse Restfunktionalität aufweist (Abb. 5A) (Cheng et al, 1990; Lukacs et al, 1993; Welsh & Smith, 1993).

Die Bedeutung des Hsp90-Kochaperons Aha1 bei der Erkennung des fehlgefalteten Proteins wurde in den letzten Jahren in verschiedenen Studien gezeigt. So führte ein Knockdown von Aha1 in  $\Delta F508$  exprimierenden Bronchialepithelzellen zu einem verstärkten Trafficking des Proteins zur Plasmamembran (Wang et al, 2006). Die Einführung von Mutationen im Aha1-Gen, die die Bindung an Hsp90 und damit die ATPase stimulierende Wirkung von Aha1 reduzierten, bewahrten die Mutante ebenfalls vor der Degradation durch das ERAD-System (Koulov et al, 2010). Zusammengenommen schreiben diese beiden Studien dem Hsp90-Aha1 Komplex eine bedeutende Rolle bei der Erkennung und Degradation des mutierten CFTR-Proteins zu. Aha1 eignet sich insbesondere als neuer therapeutischer Ansatzpunkt (*drug target*), da dieses Protein keine strukturellen Ähnlichkeiten zu anderen humanen Proteinen aufweist. Aha1 bindet als bislang einziges bekanntes Protein an die Mitteldomäne von Hsp90. Daher ergibt sich eine einzigartige Komplexstruktur, die als spezifisches *drug target* genutzt werden soll.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher spezifische Inhibitoren des Hsp90-Aha1-Komplexes aus einer Substanzbibliothek mithilfe der Alpha-Technologie identifiziert werden (Abb. 5B). Die Effektivität derartiger Substanzen, den Kanal in  $\Delta F508$  exprimierenden Zellen wieder reifen zu lassen, um damit den Chloridstrom wiederherzustellen, soll anschließend im Iodidefflux-Assay getestet werden.

Ziel dieser Arbeit ist, mit der Identifizierung von Hsp90-Aha1 Inhibitoren zur Entwicklung von neuartigen Modulatoren des Chaperonnetzwerks (Proteostase-Regulatoren) beizutragen. Solche Modulatoren sollen eine Umgebung schaffen, die es dem mutierten Kanal erlaubt, sich langsam in seine korrekte Konformation zu falten und zur Plasmamembran zu gelangen. Dieser neue Ansatz, den fundamentalen Faltungsdefekt der CFTR $\Delta F508$  Variante zu beheben, könnte die Basis für die zukünftige Entwicklung neuartiger Medikamente im Kampf gegen die Zystische Fibrose darstellen.



**Abb. 5 Hsp90-Aha1 Inhibitoren verhindern die Degradation des fehlgefalteten CFTR $\Delta$ F508.**  
**A** Die  $\Delta$ F508-Mutation (gelber Punkt) in der NBD1-Domäne führt zu einer Fehlfaltung des CFTR-Proteins, die vermutlich durch den Hsp90-Aha1 Chaperonkomplex während der Proteinqualitätskontrolle am endoplasmatischen Retikulum (ER) erkannt wird. Ebenfalls beteiligt sind hier der Hsp40/Hsp70-Komplex. Daraufhin wird das fehlgefaltete Protein mittels der E3-Ligase CHIP ubiquitiniert (U) und über das Proteasomsystem abgebaut. **B** Der Einsatz spezifischer Hsp90-Aha1 Inhibitoren soll die Erkennung des fehlgefalteten CFTR-Proteins verhindern und dessen Faltung und Export aus dem ER über das Golgi-Netzwerk zur Plasmamembran initiieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Alle Bakterienstämme, die in dieser Arbeit für Transformationen verwendet wurden, sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

**Tab. 1: Bakterienstämme zur Transformation**

Bakterienstamm	Referenz
BL21(DE3)pLysS	
XL1-Blue	Stratagene

#### 2.1.2 Zelllinien

Zelllinien, die in dieser Arbeit für Iodidefflux-Assays verwendet wurden, sind in Tabelle 2 aufgelistet.

**Tab. 2: Verwendete Zelllinien und ihre Herkunft**

Zelllinie	Herkunftsgewebe	Referenz
BHK-21 CFTR wt	Embryonale Nierenzellen aus dem Goldhamster	M. Amaral (Universität Lissabon)
BHK-21 CFTR $\Delta$ F508	Embryonale Nierenzellen aus dem Goldhamster	M. Amaral (Universität Lissabon)

#### 2.1.3 Enzyme

Alle Enzyme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in den nachfolgenden Tabellen 3-7 zusammengefasst.

**Tab. 3: Restriktionsenzyme und ihre Erkennungssequenzen**

Restriktionsenzyme	Erkennungssequenz (5' → 3')	Firma
EcoRI	GAATTC	New England Biolabs
NarI	GGCGCC	New England Biolabs
XhoI	CTCGAG	New England Biolabs

Tab. 4: Nukleasen

Nukleasen	Konzentration	Firma
Benzonase Nuklease	250 U/μl	Sigma

Tab. 5: Ligasen

Polymerase und Ligasen	Konzentration	Firma
Expand High Fidelity PCR System	125 U/ml	Roche
T4 DNA Ligase	1 U/μl	Invitrogen

Tab. 6: Glykosidasen

Glykosidasen	Konzentration	Firma
Lysozym	70.000 U/mg	Fluka Analyticals

Tab. 7: Phosphatasen

Phosphatasen	Konzentration	Firma
Alkalische Phosphatase ( <i>Calf Intestine Phosphatase</i> , CIP)	10 U/μl	New England Biolabs

## 2.1.4 Nährmedien und Antibiotika

### 2.1.4.1 Nährmedien

#### 1 l Luria-Broth-Medium (LB)

5 g NaCl

5 g Hefeextrakt

10 g Trypton/Pepton

#### Kulturmedium für BHK-Zellen

Ham's F12-Nährmedium (Gibco)

5 % FCS

500 mM Methotrexat (MTX)

### 2.1.4.2 Antibiotika

Antibiotika, die in dieser Arbeit als Zusatz für Bakterienkulturen verwendet wurden, sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tab. 8: Verwendete Antibiotika**

Antibiotikum	Konzentration	Firma
Ampicillin	100 mg·ml <sup>-1</sup> in <i>A. dest.</i>	Roth
Kanamycin	50 mg·ml <sup>-1</sup> in <i>A. dest.</i>	AppliChem
Chloramphenicol	34 mg·ml <sup>-1</sup> in Ethanol	Roth

### 2.1.5 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

**Tab. 9: Puffer und Lösungen in alphabetischer Reihenfolge**

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
1x Ni-NTA-Puffer	50 mM KP <sub>i</sub> pH 8,0 500 mM KCl 0,2 % Tween-20 10 mM Imidazol
4x Laemmli-Puffer	50 mM Tris pH 8,4 1 mM EDTA 10 % SDS 30 % Glycerol 15 % β-Mercaptoethanol 0,2 % Bromphenolblau
5x Ni-NTA-Puffer	0,25 M KP <sub>i</sub> pH 8,0 2,5 M KCl 1 % Tween-20
5x TBE-Puffer	450 mM Tris 450 mM Borsäure 10 mM EDTA
10x DNA-Probenpuffer	95 % (w/v) Glycerin



	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol FF in TAE-Puffer (1x)
10x Tris-Buffered Saline + Tween-20 (TBS-T)	200 mM Tris-HCl pH 7,3 1,5 M NaCl 0,05 % Tween-20
Coomassie-Färbelösung	0,25 % Coomassie BrilliantBlue R-250 40 % Methanol 10 % Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	20 % Methanol 10 % Essigsäure
Efflux-Puffer (Iodidefflux-Assay)	20 mM HEPES, pH 7,4 136 mM NaNO <sub>3</sub> 3 mM KNO <sub>3</sub> 2 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 11 mM Glucose
Elutionspuffer für Proteine mit GST-Tag	100 mM Tris pH 7,4 200 mM NaCl 250 mM Glutathion 1 mM DTT
Elutionspuffer für Proteine mit His-Tag	1x Ni-NTA-Puffer pH 8,0 500 mM Imidazol
GST-Aha Elutionspuffer	50 mM KP <sub>i</sub> pH 8,0 150 mM KCl 50 mM Glutathion 0,2 % Tween 1 mM DTT
GST-Aha1 Lysis- und Waschpuffer	50 mM KP <sub>i</sub> pH 8,0 150 mM KCl 0,2 % Tween 1 mM DTT

Hochsalzpuffer (Anionenaustausch)	40 mM HEPES pH 7,4 500 mM KCl 2 mM MgCl <sub>2</sub>
Ladepuffer (Iodidefflux-Assay)	20 mM HEPES (pH 7,4) 136 mM NaI 3 mM KNO <sub>3</sub> 2 mM Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 11 mM Glucose
Lysis- und Waschpuffer für Proteine mit GST-Tag	50 mM Tris pH 7,4 200 mM NaCl 1 mM DTT
Natriumdodecylsulfat (SDS)-Laufpuffer	50 mM Tris 0,1 % SDS 400 mM Glycin
Niedrigsalzpuffer	40 mM HEPES pH 7,4 50 mM KCl 2 mM MgCl <sub>2</sub>
Sammelgelpuffer	500 mM Tris pH 6,8 0,4 % SDS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8

## 2.1.6 Chemikalien

Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tab. 10: Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
2-Mercaptoethanol	Roth
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem
30% Acrylamid/Bis Lösung 29:1	Bio-Rad
Agarose	Roth
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ampicillin	Roth
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad
Borsäure	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol
Bromphenolblau	Serva
Calciumchlorid	Applichem
Calciumnitrat-Tetrahydrat	Sigma
Chloroform	J.T. Baker
D(+)-Glucose Monohydrat	AppliChem
Dithiothreitol (DTT)	Merck
Essigsäure	Diagonal
Ethanol	Sigma
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma
Forskolin	Sigma
Genistein	Sigma
Glutathion	Sigma
Glutathion Sepahrose™	GE Healthcare
Glyzerol	J.T. Baker
Glycin	AppliChem

HALT™ Protease & Phosphatase Inhibitor single-use Cocktail (100x)	Thermo Scientific
Imidazol	AppliChem
Isopropanol	J.T. Baker
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roth
Kaliumchlorid	J.T. Baker
Kaliumdihydrogenphosphat	J.T. Baker
Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	AppliChem
Kaliumnitrat	Sigma
Kanamycin	AppliChem
Magnesiumchlorid	AppliChem
Methanol	Diagonal
Methotrexathydrat (MTX)	AppliChem; Sigma
Mowiol	Roth
Natriumchlorid	J.T. Baker
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumhydroxid	J.T. Baker
Natriumiodid	Sigma
Ni-NTA Agarose	Qiagen
Paraformaldehyd (PFA)	Applichem
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Salzsäure	Waldeck
Serva Blue R	Serva
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	AppliChem
Trizma base	Sigma
Triton X-100	AppliChem
Trypan Blau	Biochrom AG
Trypsin-EDTA (0,05%)	Gibco

Tween 20	AppliChem
VX-770 (Ivacaftor)	Selleckchem
VX-809 (Lumacaftor)	Selleckchem

## 2.1.7 Kits

### 2.1.7.1 DNA

QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAprep Spin Gel Extraction Kit	Qiagen

## 2.1.8 Antikörper für Immunzytochemie

Primäre und sekundäre Antikörper sowie die jeweilige einzusetzende Verdünnung, die in dieser Arbeit verwendet wurde, sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

**Tab. 11: Verwendete Antikörper und Farbstoffe für Zellfärbungen**

	Organismus	Firma	Verdünnung
<b>Primärantikörper</b>			
Anti-CFTR (R-domain) 570	mouse	Cystic Fibrosis Foundation	1:900
<b>Sekundärantikörper</b>			
Anti-HRP Cy2	mouse	Dianova	1:200
<b>Farbstoffe</b>			
4',6-Diamidin-2-phenyl- indol (DAPI)	-	Cell Signaling	1:10.000

## 2.1.9 DNA- und Protein-Standards

### 2.1.9.1 DNA-Standards

O'Gene Ruler1 kb DNA Leiter	NEB
O'Gene Ruler 100 bp Plus DNA Leiter	NEB

### 2.1.9.2 Protein-Standards

Low Molecular Weight Marker	Invitrogen
Molecular Weight Marker (MW 14.000-66.000 )	Sigma

### 2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien, die regelmäßig verwendet wurden, sind in Tabelle 12 aufgelistet.

**Tab. 12: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

Produkt	Firma
Amersham Protran 0,2 µM NC Nitrocellulose Blotting Membran	GE
1,5 ml Reaktionsgefäße	Chemikalienlager Ruhr-Universität Bochum
Mikrotiterplatten: AlphaPlate 384 OptiPlate 384	Perkin Elmer
Poly-Propylen-Röhrchen 15 ml 50 mL	Greiner bio-one
PD-10 Entsalzungssäulen	GE
Pipettenspitzen	Starlab
Poly-Prep Chromatographie-Säulen	Bio-Rad
Serologische Pipetten (versch. Volumina)	Sarstedt
Vivaspin 2 Konzentratoren	Sartorius
Zellkulturschalen (versch. Größen)	CytoOne
Zellschaber	Sarstedt

### 2.1.11 Gelfiltrations- und Ionenaustauscher-Säulen

Anionenaustauscher und Gelfiltrationssäulen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 13 aufgelistet.

**Tab. 13: Verwendete Chromatographiesäulen für Anionenaustausch und Gelfiltration**

Chromatographiesäulen	Firma
<b>Anionentauscher</b>	
Resource Q & MonoQ 5/50 GL	GE
<b>Gelfiltrationssäulen</b>	
Superdex™ 200 HR 10/30 (analytisch) Superose™ 12 100/300 GL (präperativ)	GE

### 2.1.12 Laborgeräte

Laborgeräte, die in dieser Arbeit eingesetzt wurden, sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

**Tab. 14: Geräte im Labor**

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
Bakterienschüttler Ampere Chart Multitron II	Infors
DNA-Gelelektrophorese Apparatur	BioRad
Elektroelutionskammer	Biometra
EnSpire™ Multimode Reader	Perkin Elmer; Software: EnSpire
Gel-Dokumentationsanlage Quantum ST4	Vilber Lourmat Software: Quantum Capture
FPLC-System Äkta purifier (UPC-900; P-900)	GE; Software: Unicorn
Inkubatoren: Zellkultur: Heracell 150 ICU Bakterien: Incu-Line	Thermo Fisher/ VWR VWR
iodidselektive Elektrode Ionplus sure-flow mit pH/ion-Meter InoLab pH/ION 740	Mettler Toledo WTW
LAS-4000 Image Reader	Fuji, Software: Multi Gauge V3.2
Magnetrührer: MR Hei-Mix L VMS-C4	Heidolph VWR
Mikroskope: Lichtmikroskop Axiovert 135 Konfokales Laserscanning Mikroskop Eclipse Ti	Zeiss Nikon, Software: NIS Elements AR
PCR Geräte (Gradienten Cycler) T Professional Basic Gradient	Biometra

pH-Meter Five Easy mit Elektrode LE409 pH	Mettler Toledo
Pipetten (versch. Volumina)	Gilson
Manuelles Pipettiersystem Liquidator™ 96	Mettler Toledo
Rolltaumler/Mixer SRT6	Stuart
Schüttler: Duomax 1030 Nutating Mixer SM30	Heidolph VWR Edmund Bühler GmbH
SDS-Gelelektrophorese Apparatur Mini-PROTEAN® Tetra System	Bio-Rad
Spektrophotometer Ultrospec 5300 pro	Amersham
Spannungsgeber SDS-Gele: EPS 301 DNA-Gele: Standard Power Pack P25	GE  Biometra
Sterilbank Hera Safe KS	Thermo Scientific
Thermoblock: Thermomixer comfort Accu Block™ Digital Dry Bath	Eppendorf Labnet
Ultraschallgerät Sonoplus	Bandelin
Vortexer Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad Eco Silver	Lauda
Waagen: TE412 Feinwaage TE64	Sartorius Sartorius



Zentrifugen: Sorvall RC 6+ Heraeus Pico 17 Eppendorf 5702 R	Sorvall Thermo Fisher Eppendorf
--	---------------------------------------

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Verwendete Konstrukte für die Proteinexpression

Für die Identifikation von Inhibitoren des Hsp90-Aha1-Komplexes wurde ein Aha1 Protein mit einem GST-Tag verwendet. Aha1 wurde daher aus dem pProExHta-Vektor über die Schnittstellen EcoR und NarI in den pGEX4T1-Vektor umklontiert. Zur Kontrolle des Alpha-Screens wurde des Weiteren ein His<sub>6</sub>-GST-Konstrukt verwendet. GST wurde dazu durch Verwendung geeigneter Primer (siehe Tab. 15) an pGEX4T1 amplifiziert und anschließend über die Schnittstellen NarI und EcoRI in pProExHta kloniert. Alle verwendeten Primer wurden von Metabion International (Martinsried) bezogen. Alle in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte sind in Tabelle 15 aufgelistet.

**Tab. 15: In dieser Arbeit verwendete Konstrukte.**

Name	Vektor	Schnittstellen	Primersequenz
<b>Klonierte Konstrukte</b>			
GST-Aha1	pGEX4T1	EcoRI/ XhoI	
His <sub>6</sub> -GST	pProExHta	NarI/EcoRI	TTTTTTGGCGCCATGTCCCCTATACTA GGTTATTGGAAA (sense) TTTTTTGAATTCTCAACGCGGAACCAG ATCCGATTTTGG (antisense)
<b>Weitere verwendete Konstrukte (in der AG Obermann bereits vorhanden)</b>			
GST	pGEX4T1		
His <sub>6</sub> -Aha1	pProExHta		
His <sub>6</sub> - Hsp90α	pProExHta		

### 2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode zur Amplifikation bestimmter Nukleinsäuresequenzen mit Hilfe von thermostabilen Polymerasen. Die zu vermehrende Sequenz wird dabei durch zwei Oligonukleotide, sogenannte Vorwärts- und Rückwärts-Primer (fw/rv) begrenzt. In dieser Arbeit wurde die PCR zur *in vitro*-Amplifizierung von GST an pGEX4T1 eingesetzt, das anschließend in den Expressionsvektor pProExHta kloniert werden sollte. Der PCR-Ansatz enthielt dabei:

etwa 10 ng *Template*-DNA

je 0,2 mM Deoxynukleosidtriphosphate (dNTPs) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

je 25 pM der beiden Primer (vorwärts, rückwärts)

12,5 U/μl Polymerase

Folgendes standardisiertes PCR-Programm wurde für die Amplifikation verwendet:

Phase	Zeit (min)	Temperatur (°C)	
Initiale Denaturierung	3:00	94	
Denaturierung	0:20	94	} 35 x
Annealing	0:30	50	
Elongation	2:00	68	
	10:00	68	
Lagerung	∞	4	

### 2.2.1.3 Sequenzierung von PCR-Produkten

Die Sequenzierung der generierten Konstrukte wurde vom universitätseigenen Sequenzierservice mittels einer modifizierten Sanger-Sequenzierung in der Fakultät für Biochemie durchgeführt.

### 2.2.1.4 DNA-Gelelektrophorese

Die DNA-Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht u.a. die Auftrennung von Nukleinsäuren nach ihrer Größe. In dieser Arbeit wurden dazu 1 %ige Agarose-Gele (in TBE-Puffer) verwendet. Die Proben sowie ein definierter Längenstandard wurden bei 100 mV für 20 bis 30 min aufgetrennt. Zur Auswertung und Dokumentation wurden die Gele in einer UV-Kammer mit UV-Licht bestrahlt und mithilfe der Software *Quantum Capture* fotografiert. Das UV-Licht regt dabei das im Gel enthaltene Ethidiumbromid (5 μl/100 ml) an, welches in der DNA interkaliert und diese so dass im Gel sichtbar wird.



5 µl Plasmid  
5 U Restriktionsenzym  
10x Reaktionspuffer  
ad 10 µl *A. dest.*

Für die Einklonierung eines Inserts in einen Vektor ist es wichtig, dass beide Komponenten miteinander kompatible Enden aufweisen. Durch einen präoperativen Verdau mit spezifischen Restriktionsenzymen wurden Plasmide und Inserts generiert, die sogenannte „sticky ends“ aufwiesen und sich später ligieren ließen. Ein präoperativer Restriktionsansatz wurde nach folgendem Schema angesetzt:

5 µg Plasmid-DNA oder 50 µl PCR-Produkt  
5 U Restriktionsenzym  
10x Reaktionspuffer  
ad 50 µl *A. dest.*

Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Erfolg einer analytischen Restriktion ließ sich nachfolgend auf einem Agarosegel prüfen.

#### **2.2.1.8 Dephosphorylierung**

Der geschnittene Vektor wurde mithilfe der alkalischen Phosphatase CIP (*calf intestine phosphatase*) dephosphoryliert, um eine Religation der freien Enden zu verhindern. Dazu wurde zuerst ein CIP-Mix angesetzt, aus dem dann ein Teil dem Restriktionsansatz zugesetzt wurde.

##### CIP-Mix

CIP-Enzym: 2 µl  
10x Reaktionspuffer  
ad 20 µl *A. dest.*

##### Dephosphorylierungsansatz

50 µl Restriktionsansatz  
2 µl CIP-Mix

Der Ansatz wurde anschließend für 1 h bei 37°C inkubiert.

#### **2.2.1.9 Ligation**

Während der Ligation wird ein gewünschtes DNA-Fragment in einen geeigneten Vektor integriert. Dies geschieht mithilfe des Enzyms T4-Ligase, welches die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen einer freien 5'-Phosphat-Gruppe und 3'-Hydroxylgruppe zweier doppelsträngiger DNA-Fragmente katalysiert. Das Verhältnis der Konzentration von Vektor und Insert wurde vor der Ligation auf einem 1 %igen Agarosegel analysiert und abgeschätzt. In der Regel wurde dann ein Überschuss an Insert eingesetzt. Ein 10 µl-Ansatz wurde nach folgendem Schema angesetzt:

x µl Plasmid-DNA  
x µl Insert  
2 µl Ligationspuffer  
1 U/µl T4-Ligase  
ad 10 µl *A. dest.*

Zusätzlich wurde immer eine Negativkontrolle mitgeführt, die kein Insert enthält. Die Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16°C inkubiert.

#### **2.2.1.10 Transformation**

Als Transformation wird der Prozess der Aufnahme freier DNA durch Bakterien aus ihrer Umgebung bezeichnet. Hier wurde Plasmid-DNA zur weiteren Vervielfältigung in kompetente Zellen transformiert. Dazu wurden 30 µl kompetente Zellen mit 1 µl Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 50 s bei 42°C. Nach einer zweiminütigen Ruhephase auf Eis, wurde der Ansatz mit 500 µl LB-Medium versetzt, das mit Magnesiumchlorid (100 mM) und Glukose (0,4 %), angereichert war. Die transformierten Bakterien wurden für 1 h bei 37°C im Rotationsschüttler inkubiert und anschließend entweder auf LB-Agar-Platten ausgestrichen oder in größere LB-Kulturen überimpft. Nach ca. 12-16 h bei 37°C waren in der Regel einzelne Kolonien auf den Agar-Platten gewachsen.

#### **2.2.1.11 Minipräparation von Plasmid-DNA**

Einzelne Bakterienkolonien wurden mit einer Pipettenspitze abgenommen und in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum angeimpft. Nach mindestens 12 h bei 37°C und 180 rpm erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA im kleinen Maßstab mithilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits. Die Aufreinigung der DNA beruht dabei auf dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doyle (Birnboim & Doly, 1979). Nach Lyse der Bakterien wird die DNA unter Hochsalz-Bedingungen an Silica-Membranen gebunden und schließlich unter Niedrigsalz-Bedingungen wieder eluiert. Ca. 3 ml der Bakterienkultur wurden dazu bei 8000 rpm für 3 min abzentrifugiert, anschließend wurde weiter nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Die Elution der DNA erfolgte jedoch abweichend in 30 µl *A. dest.*

#### **2.2.1.12 Midipräparation von Plasmid-DNA**

Für die Isolation größerer Mengen an DNA wurde ein einzelner Bakterienklon in ca. 200 ml LB-Medium mit dem geeigneten Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37°C angezogen. Am nächsten Tag erfolgte die Aufreinigung der DNA mithilfe des QIAGEN Plasmid Midi Kits nach Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doyle (Birnboim & Doly, 1979). Nach Lyse der Bakterien, bindet die DNA unter spezifischen Niedrigsalz- und pH-Bedingungen selektiv an Anionentauscher-Säulchen. Verunreinigungen wie RNA oder niedermolekulare Substanzen werden durch mehrere

Waschschritte entfernt. Abschließend erfolgt eine Aufkonzentrierung und Entsalzung der DNA durch Fällung der Nukleinsäuren mit Isopropanol. Das DNA-Pellet wurde dabei in einem Endvolumen von 150 – 200 µl *A. dest.* gelöst.

### 2.2.1.13 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration ( $c$ ) einer DNA-Lösung wurde photometrisch bei 260 nm ( $OD_{260}$ ) in einer Quarzküvette gemessen. Üblicherweise wurde die DNA dazu in *A. dest.* vorverdünnt. Mithilfe der folgenden Formel ließ sich anschließend die Konzentration errechnen:

$$c \text{ (}\mu\text{g ml}^{-1}\text{)} = OD_{260} * \text{Verdünnungsfaktor} * \text{Multiplikationsfaktor} \quad (1)$$

Der Multiplikationsfaktor von doppelsträngiger DNA beträgt dabei 50.

## 2.2.2 Zellbiologische Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Zellkulturmethoden wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank (Hera Safe KS, Thermo Scientific) durchgeführt. Die für die Versuche benötigten Medien und Lösungen (siehe Kap. 2.1.5.1) wurden durch steriles Abfüllen keimfrei gehalten. Um die Zellen möglichst schonend zu behandeln, wurden die Medien vorher im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die verwendete Zelllinie wurde in CO<sub>2</sub>-Inkubatoren bei 37°C und einer relativen Luftfeuchte von 100 %, sowie einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % in entsprechenden Kulturschalen kultiviert. Zur Desinfektion der Arbeitsflächen wurde 70 %iges Ethanol verwendet.

### 2.2.2.1 Allgemeine Kultivierung von Zelllinien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien (s. Tab. 2) wurden zweimal pro Woche mit Trypsin-EDTA 1:10-1:15 passagiert. Die BHK-21 Zelllinie wurde 1961 von I. A. Macpherson and M. G. P. Stoker aus den Nieren von 5 Goldhamstern etabliert. Die in dieser Arbeit verwendeten BHK-Zellen exprimieren stabil das CFTR-Protein (BHK wt) bzw. das mutierte CFTR $\Delta$ F508-Protein (BHK $\Delta$ F508) und stammen aus dem Labor von Margarida Amaral (Universität Lissabon). Das Medium für die beiden BHK-Zelllinien enthielt Methothrexat (MTX), das als Selektionsmarker dient. Die stabil CFTR-exprimierenden BHK-Zellen wurden für Iodidefflux Messungen und Zellfärbungen verwendet.

## 2.2.3 Biochemische Methoden

### 2.2.3.1 Expression rekombinanter Proteine

Für die Expression rekombinanter Proteine wurde zuerst ein entsprechender Vektor in *E. coli* BL21-Zellen transformiert und als Vorkultur über Nacht bei 37°C angezogen. Alternativ wurde die Vorkultur durch Zugabe des gewünschten bakteriellen Glycerinstocks gestartet. Selektiert wurde über ein - je nach Vektor - geeignetes Antibiotikum (siehe Tab. 8). Am nächsten Morgen wurden ca. 50 ml der Vorkultur in die 2,5 l LB-Hauptkultur überführt. Die Bakterien wurden bei 180 rpm und 37°C bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,4 - 0,6 herangezogen. Anschließend wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 0,25 mM Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) gestartet. Nach 4 - 5 h bei 18°C wurde die Bakterienkultur durch Zentrifugation (10 min, 8000 rpm, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde entweder direkt weiter verwendet oder bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

### 2.2.3.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine

#### a) Aufreinigung von His<sub>6</sub>-Fusionsproteinen

Das Bakterienpellet (aus einer 2,5 l Kultur) wurde in ca. 12 ml 1x Ni-NTA-Puffer, versetzt mit 0,2 mM PMSF und einem Proteaseinhibitormix (Roche, 1:100), resuspendiert. Anschließend wurden dem Pellet 250 U Benzonase und 10 mg ml<sup>-1</sup> Lysozym zugesetzt. Bei Benzonase handelt es sich um eine Endonuklease, welche Nukleinsäuren abbaut und somit die Viskosität der Suspension herabsetzt. Lysozym hingegen ist in der Lage, Peptidoglykanzellwände von gram-positiven Bakterien zu spalten. Der Zellaufschluss erfolgte anschließend für 3 min mit Ultraschallwellen. Die rekombinanten Proteine sollten sich nun in Lösung befinden, daher wurden zelluläre Bestandteile des Homogenats durch Zentrifugation für 40 min bei 18.500 rpm und 4°C abgetrennt. Anschließend wurde der Überstand in 50 ml-Röhrchen überführt. Die weitere Aufreinigung der His-Fusionsproteine erfolgte über eine Ni-NTA-Sepharose Matrix. Dazu wurde der Überstand mit 10 ml 1x Ni-NTA-Puffer sowie 2 - 4 ml Ni-NTA Matrix versetzt und für 20 min bei 4°C gemischt. Während der Inkubation binden die rekombinanten Proteine über ihren His<sub>6</sub>-Tag mit hoher Affinität an die mit Nickel-Ionen-geladene Sepharose. Um nicht gebundene Proteine und weitere Verunreinigungen zu entfernen, wurde die Nickel-Matrix gewaschen. Dazu wurde die Matrix für drei min bei 1000 rpm und 4°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 25 ml frischen 1x Ni-NTA-Puffer aufgenommen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Nickel-Matrix in Mini-Chromatographie-Säulchen überführt und noch einmal mit 1 ml 1x Ni-NTA-Puffer gewaschen. Die Elution der Fusionsproteine von der Nickel-Matrix erfolgte durch Verdrängung der Proteine mit einer hohen Konzentration an Imidazol (500 mM). Dazu wurden 1 - 3 ml Elutionspuffer auf die Matrix gegeben und das Eluat aufgefangen.

### b) Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mit einem GST-Tag folgte größtenteils dem gleichen Protokoll wie bereits in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben. Derlei markierte Proteine weisen eine hohe Affinität für Glutathion auf. Daher wird bei dieser Form der Aufreinigung eine Glutathion-Sepharose-Matrix eingesetzt. GST-Fusionsproteine binden spezifisch an die Glutathion-Liganden während alle unmarkierten Proteine ausgewaschen werden. Abweichend vom vorherigen Protokoll wurde das Bakterienpellet in 12 ml GST-Wasch- und Lysispuffer, der ebenfalls mit Proteaseinhibitoren und 0,2 mM PMSF versetzt war, resuspendiert. Nach Zellaufschluss und Abtrennung von Zelltrümmern, wurde der Überstand mit 600-800 µl GSH-Sepharose-Matrix, die zuvor dreimal in Lysis- und Waschpuffer gewaschen wurde, für 20 min bei 4°C unter konstanter Bewegung gemischt. Anschließend wurden nicht gebundene Proteine durch viermaliges Waschen mit GST-Wasch- und Lysispuffer entfernt. Die Elution erfolgte hier ebenfalls über Chromatographie-Säulchen in 1 - 3 ml GST-Elutionspuffer. Dieser enthält Glutathion, welches die gebundenen Proteine von der GSH-Matrix verdrängt.

Für die Aufreinigung von GST-Aha1 wurden jedoch spezielle Lysis- und Elutionspuffer verwendet (siehe Tab. 9). Abgesehen davon, wurde nach dem üblichen Protokoll verfahren.

Abschließend wurden aufgereinigte Proteine zusätzlich über PD-10-Säulen entsalzt bzw. in einen physiologischen HEPES-Puffer (Niedrigsalzpuffer, siehe. Tab. 9) umgepuffert. Die Konzentration der Proteine wurde entweder mithilfe des Bradford-Assays oder über die Absorption bei 280 nm bestimmt. Die Lagerung der Proteine erfolgte bei -80°C. Um möglichst reine Proteine für die weiteren Versuche zu erhalten, wurden diese nachfolgend zusätzlich über eine Gelfiltrations- und/oder Ionenaustauschchromatographie aufgereinigt.

#### **2.2.3.3 Entsalzung und Umpuffern von Proteinen**

Die Dextran-Matrix der PD-10 Entsalzungssäulen erlaubt eine schnelle Trennung von Makromolekülen (Proteinen) und niedermolekularen Substanzen. Die PD-10-Säule wurde zuerst mit 25 ml HEPES-Puffer äquilibriert bevor das Protein-Eluat auf die Säule gegeben wurde. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, erfolgte die Elution in 2 - 4 ml HEPES-Puffer.

#### **2.2.3.4 Aufkonzentrierung von Proteinen**

In den Fällen, in denen die Konzentration der aufgereinigten Proteine zu niedrig für nachfolgende Versuche war, erfolgte eine Ankonzentrierung der Proteine durch Zentrifugal-Filtration. Dies geschah mithilfe eines Mikrokonzentratoren (Vivaspin 2, Sartorius). In dem Konzentrator befindet sich eine Membran mit einer definierten Porengröße (*molecular weight cut off*, MWCO), welche Moleküle zurückhält, die oberhalb der MWCO liegen. Auf diese Weise lassen sich bestimmte Moleküle an der Membran anreichern, während der Durchfluss nur das Lösungsmittel und kleinere Moleküle enthält und verworfen werden kann. 2 ml einer



Proteinlösungen wurden in den Konzentrator überführt und bei 4°C und 2000 g so lange zentrifugiert bis ein Großteil der Lösung die Membran passiert hatte. Anschließend wurde mit neuer Proteinlösung aufgefüllt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde so lange wiederholt bis die Proteinlösung auf das gewünschte Volumen eingeeengt worden war. Für die Ankonzentrierung von Aha1 wurden Konzentratoren mit einem MWCO von 30.000 verwendet. Für das größere Hsp90 wurden hingegen Membranen mit einem MWCO von 50.000 eingesetzt.

### 2.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Protein mittels Bradford-Assay

Der Bradford-Assay (Bradford, 1976) ermöglicht die photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Der Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau bildet dabei in saurer Lösung mit Proteinen Komplexe. Dies führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 470 nm zu 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist daher ein Maß für die Konzentration einer Proteinlösung. Für die Messung wurden 200 µl Bradford-Reagenz mit 800 µl *A. dest.* gemischt. Anschließend wurde 1 - 5 µl Proteinlösung zugegeben. Hohe Proteinkonzentrationen waren direkt als blauer Farbumschlag für das Auge sichtbar. Die Absorption wurde schließlich im Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Über die Steigung einer BSA-Standardgerade ließ sich dann die Konzentration der Proteinlösung bestimmen. Zur Bestimmung des Leerwerts wurde die verdünnte Bradford-Lösung ohne Zugabe von Protein gemessen.

### 2.2.3.6 Konzentrationsbestimmung von Proteinen über die UV-Absorption

Als weitere Methode zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen, erfolgte die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm. Für die Absorption bei dieser Wellenlänge sind vor allem aromatische Aminosäuren in Proteinen verantwortlich. Die Proteinlösung wurde dazu 1:10 – 1:100 in *A. dest.* verdünnt. Anschließend wurde die Absorption in einer Quarzküvette bei 280 nm ( $OD_{280}$ ) gemessen. Die Proteinkonzentration wurde schließlich über den spezifischen Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon$ ) des Proteins berechnet. Dieser kann über die Webseite des Schweizer Instituts für Bioinformatik ([www.expasy.org](http://www.expasy.org), ProtParam Tool) kalkuliert werden. Für Aha1 wurde ein theoretischer Extinktionskoeffizient von 1,7 und für Hsp90 ein Wert von 0,7 ermittelt. Mithilfe folgender Formel ließ sich die Proteinkonzentration (c) berechnen:

$$c \left( \frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) = \frac{OD(280) \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\epsilon} \quad (2)$$

### 2.2.3.7 Anionenaustauschchromatographie

Die Ionenaustauschchromatographie ist eine Form der Flüssigkeitschromatographie und ermöglicht die Trennung von Stoffen anhand ihrer Ladung. Eine stationäre Phase (Säulenmaterial) trägt dabei kovalent gebundene ionisierbare Gruppen, an diese sind

reversibel Ionen mit entsprechender Gegenladung gebunden. Wird eine Säule mit einer Proteinlösung beladen, können die Proteine entsprechend ihrer Ladung an die stationäre Phase binden. Die Elution der Proteine wird zumeist durch eine ansteigende Ionenstärke im Puffer (Salzgradient) erreicht.

In dieser Arbeit erfolgte die Aufreinigung von Proteinen nur über Anionentauschersäulen (MonoQ oder ResourceQ, GE) mithilfe eines Äkta *purifier* Systems. Damit das aufzureinigende Protein an die positiv geladene Säule bindet, wurde der pH-Wert so gewählt, dass er oberhalb des isoelektrischen Punkts des Proteins lag. Die Säule wurde zuerst mit einem Startpuffer äquilibriert (Niedrigsalzpuffer, Tab. 9). Anschließend wurde die Proteinlösung über eine 1 ml-Probenschleife auf die Säule gegeben. Proteine, die nicht an das Säulenmaterial gebunden haben, wurden dabei sofort ausgewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte durch gleichmäßiges Zumischen eines Puffers mit 500 mM KCl (Hochsalzpuffer, siehe Tab. 9). Die zunehmende Ionenstärke unterband Wechselwirkungen zwischen den Proteinen und der Matrix, so dass sich Proteine lösten. Schwach gebundene Proteine eluierten dabei zuerst, wohingegen stärker gebundene Proteine erst mit höherer Salzkonzentration eluierten. Die Fraktionierung erfolgte in 0,5 ml-Schritten über ein Gesamtvolumen von 25 ml. Die Proteinkonzentration wurde über eine UV-Messzelle gemessen und aufgezeichnet. So ergab sich für jedes Protein ein typisches Chromatogramm. Als Flussrate wurde eine Geschwindigkeit von 1 ml/min gewählt. Aliquots von Fraktionen, die das zu reinigende Protein enthielten, wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, erhitzt und auf einem 10 - 12% igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Dieses wurde anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt.

#### **2.2.3.8 Gelfiltration**

Die Gelfiltration oder Größenausschluss-Chromatographie ist ebenfalls eine Form der Flüssigkeitschromatographie, die Proteine anhand ihres Molekulargewichts auftrennt. Wird eine entsprechende Säule mit einer Proteinlösung beladen, befinden sich große Proteine im Ausschlussvolumen der Säule und eluieren früh. Kleinere Proteine und niedermolekulare Substanzen hingegen können in das feinporige Säulenmaterial eindringen, durchfließen die Säule langsamer und eluieren daher später.

In dieser Arbeit wurde die Gelfiltration sowohl für analytische Interaktionsversuche als auch zur weiteren präparativen Aufreinigung von Proteinen verwendet.

##### Analytische Gelfiltration

Eine Superdex 200 HR 10/30-Säule wurde vorbereitend mit einem physiologischen HEPES-Puffer (Niedrigsalzpuffer, siehe Tab. 9) mit dem zweifachen Bettvolumen der Säule äquilibriert. Proteine wurden sowohl einzeln, als auch in Kombination mit einem Interaktionsprotein mithilfe der Gelfiltration analysiert. Die Proteine wurden dazu auf 10  $\mu$ M in einem Volumen von 500  $\mu$ l

Niedrigsalzpuffer verdünnt und über eine 500 µl-Probenschleife auf die Säule injiziert. Für die Prüfung einer Interaktion zwischen zwei Proteinen, wurden je 10 µM Protein A und Protein B in einem Volumen von 500 µl gemischt und zuerst für 10 min bei 30°C und nachfolgend für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Probengemisch ebenfalls über eine 500 µl-Schleife auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte in 500 µl-Schritten für insgesamt 13 ml. Die Fraktionen 4 - 17 wurden anschließend mithilfe von Chloroform und Methanol gefällt und über ein SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert.

#### Präperative Gelfiltration

Für die präperative Aufreinigung und Entsalzung von Proteinen wurde die Superose 12 100/300 GL verwendet. Die Säule wurde ebenfalls mit Niedrigsalzpuffer äquilibriert und anschließend wurden 500 µl Proteinlösung auf die Säule gegeben. Die Elution erfolgte entsprechend dem Vorgehen bei der analytischen Gelfiltration. Aliquots der Fraktionen 5 - 18 wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt, erhitzt und anschließend über ein Polyacrylamid-Gel analysiert. Protein-enhaltende Fraktionen wurden anschließend vereinigt und das Volumen bei Bedarf mithilfe von Vivaspin-Konzentratoren weiter eingeeengt.

#### **2.2.3.9 Chloroform-Methanol-Fällung von Proteinen**

In dieser Arbeit wurde die denaturierende Fällung von Proteinen mithilfe von Chloroform und Methanol durchgeführt (Wessel & Flügge, 1984). Diese Methode führt zu einer nahezu vollständigen Fällung von Proteinen, auch aus Proben mit geringem Proteingehalt.

Für die Fällung wurden 500 µl Proteinlösung mit je 500 µl Methanol und 120 µl Chloroform gut gemischt. Anschließend wurde der Ansatz bei 14.000 rpm und 4°C für 5 min zentrifugiert. Denaturierte Proteine befanden sich nun in der Interphase zwischen dem dichteren Chloroform und dem Methanol im Überstand. Der Methanol-Überstand wurde bis auf ca. 50 µl vorsichtig abgenommen und verworfen. Anschließend wurden erneut 360 µl Methanol hinzugefügt und der Ansatz gut gemischt. Nach erneuter Zentrifugation bei 14.000 rpm für 5 min wurde das Methanol möglichst komplett abgenommen. Die Proteinsedimente im Reaktionsgefäß wurden bei 30°C getrocknet und anschließend in 50 µl 1 x SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 90°C für 5 min inkubiert.

#### **2.2.3.10 Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Proteine wurden durch bakterielle Expression und anschließende Aufreinigung gewonnen und mit SDS-Probenpuffer versetzt. Vor Beladung des SDS-Gels wurden die Proteine in SDS-Puffer für 5 min auf 90°C erhitzt. Die hohe Temperatur zerstört dabei Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine.

### 2.2.3.11 SDS-PAGE

Um Proteine effektiv anhand ihres Molekulargewichts aufzutrennen, wurde die denaturierende SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Für die SDS-PAGE wurden - je nach Größe der aufzutrennenden Proteine - 6 – 15 %ige Acrylamid-Gele verwendet. Neben den Proteinproben, wurde immer ein Standard mit Proteinen definierter Größe aufgetragen, um eine sichere Größenzuordnung zu ermöglichen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte im elektrischen Feld bei 90 – 120 V. Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde das Gel mithilfe des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt.

### 2.2.3.12 Coomassie-Brilliant-Blau Färbung

Die Visualisierung von Proteinen nach einer SDS-PAGE erfolgte durch Färbung mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau (bzw. Serva Blue-R). Dazu wurde das SDS-Gel in ein Behältnis mit Färbelösung (siehe Tab. 9) gelegt und in der Mikrowelle bei 780 W für ca. 30 s erhitzt. Nach ca. 30 minütiger Inkubation auf einem Rotationsschüttler wurde das Gel in eine Schale mit Entfärbelösung gelegt (siehe Tab. 9) und erneut bei 780 W für 30 s in der Mikrowelle erwärmt. Schließlich wurde das Gel für einige Stunden bzw. bis zum gewünschten Grad entfärbt. Das Gel wurde anschließend mit einem Kamerasystem und der Software *Quantum Capture* fotografiert.

### 2.2.3.13 Iodidefflux-Assay

Der zelluläre Chlorid-Transport in CFTR-exprimierenden Zellen wurde mithilfe einer Iodid ( $I^-$ -sensitiven Elektrode gemessen. Da der CFTR-Kanal neben Chlorid-Ionen auch Halogenide wie Iodid-Ionen leitet (Kirk & Dawson, 2003), kann ein Austausch der Chlorid-Ionen im Zellinneren gegen Iodid-Ionen vorgenommen werden. Der Assay wurde nach den Vorgaben von Long und Walsh (Long and Walsh, 1997) durchgeführt. Die verwendeten Puffer enthielten kein Chlorid. Dieses wurde im Ladepuffer durch Iodid und im Effluxpuffer durch  $NaNO_3$  ersetzt.

Für den Assay wurden BHK CFTR WT bzw.  $\Delta F508$ -Zellen 48 h vor Versuchsbeginn in 6 cm-Schalen in MTX-haltigem Medium ausgesät. MTX diente hierbei als Selektionsmarker für die Expression des CFTR-Proteins. Am nächsten Tag erfolgten ein Mediumwechsel und die Behandlung der Zellen mit den im ALPHA-Assay identifizierten Hsp90-Aha1 Inhibitoren sowie VX-809. Diese wurden in einer Konzentration von 5  $\mu M$  eingesetzt. Negativkontrollen erhielten die entsprechende Menge des Lösungsmittels DMSO (0,01 – 0,05 %). Die Inkubationsdauer betrug 24 h bei 37°C, da dies die Zeitspanne ist, die neu synthetisiertes CFTR $\Delta F508$  benötigt, um ein *steady-state* Level an der Plasmamembran zu erreichen (Lukacs et al, 1993). Teilweise erfolgte anstelle der Behandlung mit den Inhibitoren, oder auch zusätzlich, eine Inkubation der Zellen bei 26°C, um die Reifung des mutierten CFTR-Proteins zu fördern (Denning et al. 1992). Dazu wurden die Zellen nach Mediumwechsel und Behandlung für ca. 3 h bei 37°C inkubiert und anschließend für 20 - 24 h in einen 26°C-Brutschrank transferiert (siehe Abb. 7). Je nach

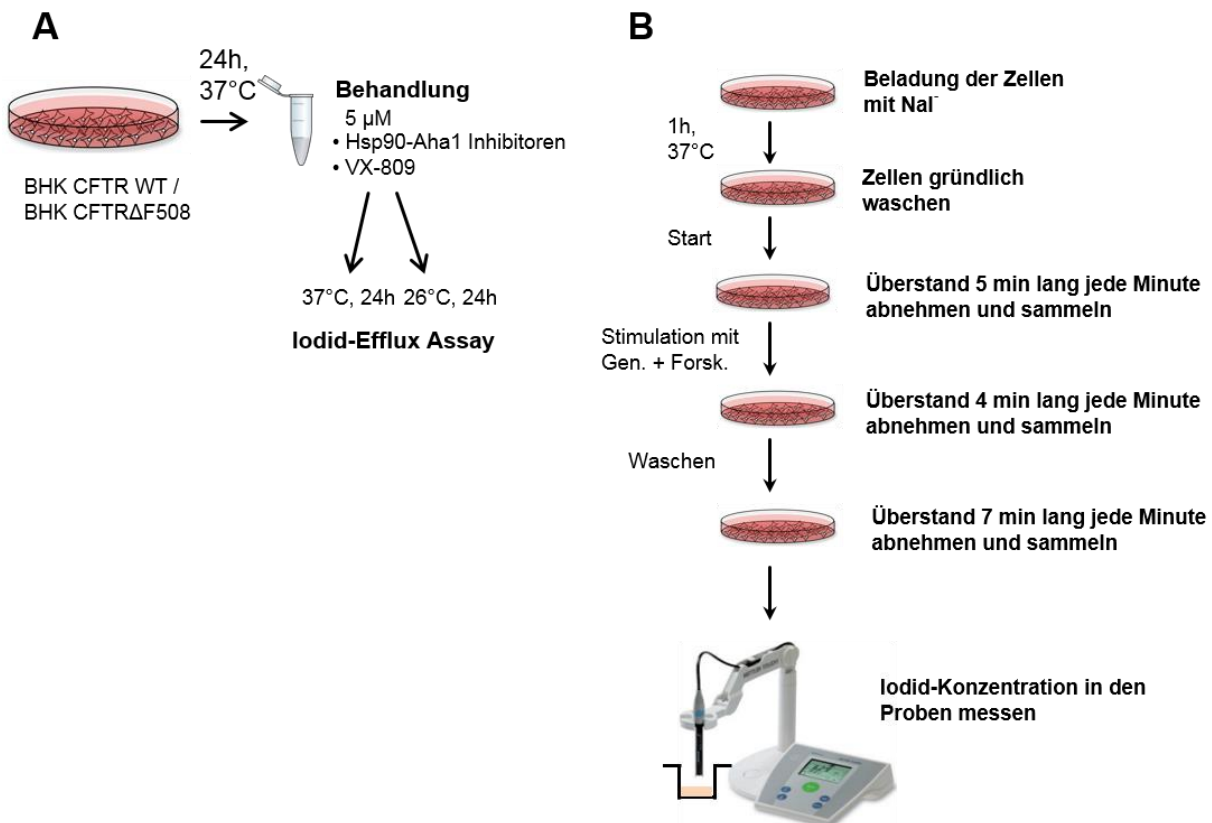
Zelltyp (WT oder  $\Delta F$ ) und abhängig von der Temperatur der Behandlung, mussten unterschiedliche Zellzahlen zu Beginn eines Versuchs ausgesät werden. Diese sind in Tabelle 16 aufgeführt.

**Tab. 16: Benötigte Zellzahlen zur Durchführung des Iodidefflux-Assays**

Zellen	Inkubationstemperatur	Zellzahl in 6 cm-Schale
BHK WT	37°C	$1,1 \cdot 10^6$
	26°C	$1,6 \cdot 10^6$
BHK $\Delta F$ 508	37°C	$1,3 \cdot 10^6$
	26°C	$1,8 \cdot 10^6$

Am Anfang jeder Messwoche wurden Lade- und Effluxpuffer frisch angesetzt, sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert. Des Weiteren wurden Aliquots à 1,5 g NaI in 15 ml-Röhrchen abgewogen und abgedunkelt gelagert (z.B. durch Umwicklung mit Alufolie). Der eigentliche Iodidefflux-Assay wurde stets bei Raumtemperatur durchgeführt. Vorbereitend wurden am Messtag der Lade- und Effluxpuffer (siehe Tab. 9) im Wasserbad auf 37°C angewärmt und der pH auf 7,4 eingestellt. Zwei 6 cm-Schalen, deren Konfluenz idealerweise 100 % betrug, konnten zeitgleich den Assay durchlaufen. Zuerst erfolgte die Beladung der Zellen mit Natriumiodid. Dazu wurde ein 1,5 g NaI-Aliquot frisch mit 10 ml A. dest. versetzt, um eine 1 M Stocklösung zu erhalten. Für zwei 6 cm-Schalen wurden 21,6 ml Ladepuffer mit 3,4 ml der frisch angesetzten 1M NaI-Stocklösung (136 mM NaI Endkonzentration) versetzt. Diese Lösung wurde ebenfalls vor Sonnenlicht geschützt. Das Kulturmedium der Zellen wurde verworfen und die Zellen viermal vorsichtig mit jeweils 2,5 ml Ladepuffer gewaschen. Für die Beladung der Zellen wurden erneut 2,5 ml Ladepuffer auf die Zellen gegeben und für 1 h im Zell-Inkubator bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ladepuffer verworfen und die Zellen gründlich 10 x mit 2,5 ml NaI-freiem Effluxpuffer gewaschen. Zur Äquilibration wurden die Zellen für 1 min mit 2,5 ml Effluxpuffer inkubiert. Währenddessen wurde ein 50 ml-Röhrchen mit 20 ml Effluxpuffer vorbereitet, das den CFTR-Potenziator Genistein (Endkonzentration 50  $\mu$ M) und den CFTR-Aktivator Forskolin (Endkonzentration 10  $\mu$ M) enthält. Genistein bindet an die NBD2-Domäne des CFTR-Proteins und verhindert dadurch die ATP-Hydrolyse, die essentiell zum Schließen des Kanals ist (Hwang and Sheppard, 1999). Forskolin wiederum erhöht als Stimulator der Adenylylase das intrazelluläre Level an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), welches u.a. die Phosphokinase A (PKA) aktiviert. Diese kann den CFTR-Kanal an der R-Domäne phosphorylieren und damit aktivieren (Gadsby & Nairn, 1999). Im Anschluss an die Äquilibration wurde das Assay zum Zeitpunkt minus 4 (min) gestartet, indem 2,5 ml frischer Effluxpuffer auf die Zellen gegeben wurde. Der Puffer wurde jede Minute abgenommen und gesondert in den Vertiefungen einer 6-Well-Schale gesammelt.

Anschließend wurde neuer Effluxpuffer auf die Zellen gegeben. Dies diente der Einschätzung des residualen Iodid-Ausstroms aus den CFTR-Kanälen. Von Zeitpunkt 0 bis 4 (min) wurden 2,5 ml Effluxpuffer verwendet, der den Aktivator-Cocktail Forskolin und Genistein enthielt. Anschließend wurden von Zeitpunkt 4 bis 10 (min) erneut 2,5 ml Agonisten-freier Effluxpuffer verwendet. Die Iodidkonzentration der insgesamt 15 Proben wurde abschließend mithilfe einer iodidselektiven Elektrode (Mettler Toledo) und einer Standardreihe gemessen. Eine schematische Übersicht über den Ablauf des Iodidefflux-Assays ist in Abb. 7 dargestellt.



#### Abb. 7: Schematische Darstellung eines Iodidefflux-Assays.

**A)** 48 h vor Durchführung des Assays wurden BHK WT bzw. ΔF508-Zellen ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Behandlung der Zellen mit einem CFTR-Korrektor (VX-809) oder den Hsp90-Aha1-Inhibitoren. Anschließend wurden die Zellen erneut für 24 h bei 37°C oder 26°C inkubiert. **B)** Für das eigentliche Assay wurden Zellen mit NaI beladen und anschließend gründlich mit NaI-freiem Efflux-Puffer gewaschen. Anschließend wurde jede Minute der Überstand abgenommen und gesammelt. Nach 5 min wurden die CFTR-Kanäle durch Zugabe von Genistein (Gen., 50 μM) und Forskolin (Forsk., 10 μM) über einen Zeitraum von 4 min stimuliert. Die Überstände wurden weiterhin jede Minute abgenommen. Abschließend wurde erneut mit Efflux-Puffer gewaschen und die Überstände für die Konzentrationsmessung gesammelt. Die Iodid-Konzentration in den einzelnen Proben wurde mithilfe einer iodidselektiven Elektrode gemessen.

#### 2.2.3.14 Auswertung des Iodidefflux-Assays

Für die Berechnung der Iodid-Konzentration in den einzelnen Proben war es notwendig an jedem Messtag eine Standardgerade zu erstellen. Auf diese Weise konnte eine gemessene Spannung (mV) einer ganz bestimmten Iodidkonzentration zugeordnet werden. Für die Standardreihe wurde Effluxpuffer verwendet, dem stets frisch 1, 10, 50 und 100 μM NaI

zugesetzt wurde. Die Iodidkonzentration ( $c$ ) pro Probenvolumen (2,5 ml) wurde anschließend als nmol/l berechnet:

$$n = c * V$$

$$M = \frac{\mu\text{mol}}{l} = \frac{\text{nmol}}{\text{ml}}$$

$$c [\text{Iodid}] = x \frac{\text{nmol}}{\text{ml}} * 2,5 \text{ ml} \quad (3)$$

Anhand der ermittelten Werte konnte der Iodidefflux als Kurve über die Zeit dargestellt werden. Da sich häufig die Baseline zwischen verschiedenen Kurven deutlich unterschied, war es nötig einen vergleichbaren Parameter festzulegen. In dieser Arbeit wurde dazu die „Fläche unter der Kurve“ (*area under the curve*, AUC) verwendet. Diese Art der Auswertung ist z.B. unabhängig vom Verlauf des Iodid-Ausstroms. So reagierten BHK $\Delta$ F508-Zellen - bei Behandlung - mit einem später einsetzenden und länger anhaltenden Iodid-Ausstrom, während der CFTR WT einen kurzen, aber starken Ausstrom zeigte. Um den Gesamtausstrom an Iodid zwischen behandelten und unbehandelten Zellen vergleichen zu können, wurde daher die AUC nach der linearen Trapezregel berechnet. Entscheidend war dabei die Zeitspanne ( $t_i$ ), in der - nach Stimulation der Zellen - der Iodidefflux pro Minute (nmol/min) die Baseline (niedrigster Efflux vor Stimulation) überschritt. In Abbildung 6 ist diese Form der Auswertung für die Berechnung eines einzelnen Trapezes dargestellt. Durch eine anschließende Summation der Flächen der Trapeze wurde die AUC approximiert:

$$\text{AUC} \approx \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n-1} (t_{i+1} - t_i) (c_i + c_{i+1}) \quad (4)$$

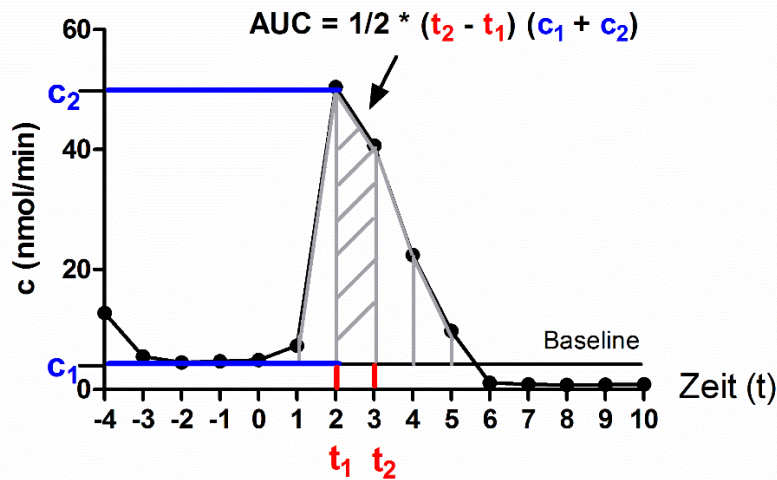
Da die Zeitabstände des Probennehmens während des Assays immer 1 min betragen, ergibt sich vereinfacht die Formel:

$$\text{AUC} \approx \frac{1}{2} \sum_{i=1}^{n-1} (c_i + c_{i+1}) \quad (5)$$

Die schrittweise Berechnung der AUC anhand des Beispiels in Abbildung 8 ist in Tabelle 17 dargestellt. Nach Durchführung des Assays wurde der Iodidefflux in jeder der 15 Proben gemessen (nmol/min). Anschließend wurde der niedrigste Efflux vor der Stimulation der Zellen („Baseline“, in Tab. 17 ist der entsprechende Wert grün unterlegt) von allen nachfolgenden Werten abgezogen. Mithilfe der Gleichung (5) wurde die Fläche der sich ergebenden Einzeltrapeze berechnet, wobei nur positive Efflux-Werte nach Abzug der Baseline berücksichtigt wurden. Die Flächen des ersten und zweiten Trapezes berechnen sich daher mit:

1.  $\frac{1}{2} (0,0 + 0,2) = 0,1$
2.  $\frac{1}{2} (0,2 + 2,6) = 1,4$ .

Um die Fläche des gesamten Peaks zu erfassen, wurden schließlich die Flächen der Einzeltrapeze addiert. In dem hier vorgestellten Beispiel ergab sich dabei eine AUC von 105,5.



**Abb. 8: Schematische Darstellung der Berechnung der AUC einer Iodidefflux Kurve.**

Nach der Trapezregel wird die Fläche unter der NaI-Efflux ( $c$ )-Zeit ( $t$ )-Kurve durch die Summation einzelner Flächen von Trapezen approximiert. Der residuale Iodid-Ausstrom (Baseline) wurde vorher vom Peak abgezogen.

**Tab. 17: Berechnung der AUC anhand des in Abbildung X gezeigten Kurvenbeispiels.**

Nach Start des Assays wurde der Zellüberstand jede Minute (-4 bis 10) abgenommen und der Ausstrom an Natriumiodid pro Minute (nmol/min) bestimmt. Für die weitere Auswertung wurde der niedrigste NaI-Efflux vor Stimulation (grün unterlegt) von allen nachfolgenden Werten abgezogen. Dabei wurde nur mit positiven Werten weiter gerechnet. Anschließend erfolgte die Berechnung der Fläche der Einzeltrapeze (siehe Gleichung (5)). Die Fläche der Einzeltrapeze wurde schließlich addiert, so dass sich eine AUC für den gesamten Peak ergab. Der Stimulationszeitraum ist rot unterlegt.

Assayminuten	Kurvendaten (nmol NaI/min)	nmol NaI/ min nach Abzug der Baseline (grün markiert)	Berechnung der Fläche der Einzeltrapeze	Summation der Einzeltrapeze (AUC)
-4	12,8			105,5
-3	5,5			
-2	4,5			
-1	4,7	0,0		
0	4,9	0,2	0,1	
1	7,3	2,6	1,4	
2	50,4	45,7	24,2	
3	40,7	36,0	40,9	
4	22,4	17,7	26,9	
5	9,8	5,1	11,4	



6	1,1		
7	0,9		
8	0,8		
9	0,8		
10	0,9		

### 2.2.3.15 Immunzytochemische Färbung von BHK-Zellen

48 h vor Fixierung der Zellen wurden BHK WT und BHK $\Delta$ F508-Zellen in einer 24-Well-Platte in MTX-haltigem Medium auf Glasplättchen ausgesät. Die verwendeten Ausgangszellzahlen variierten je nach Zelltyp und gewünschter Inkubationstemperatur und sind in Tabelle 18 aufgelistet.

**Tab. 18: Benötigte Zellzahlen für die Immunfluoreszenzfärbung**

Zellen	Inkubationstemperatur	Zellzahl in 24-Well-Schale
BHK WT	37°C	3,0 * 10 <sup>4</sup>
BHK $\Delta$ F508	37°C	3,5 * 10 <sup>4</sup>
	26°C	7,0 * 10 <sup>4</sup>

Die Behandlung der Zellen mit Hsp90-Aha1-Inhibitoren, dem Korrektor VX-809 und Niedrigtemperatur (26°C) erfolgte ca. 24 h nach Aussaat der Zellen. Die Substanzen wurden in einer Konzentration von 5  $\mu$ M über einen Zeitraum von 24 h eingesetzt. Negativkontrollen erhielten nur das Lösungsmittel DMSO. Zellen, die einem Temperaturwechsel unterzogen werden sollten, erhielten nur einen Medienwechsel und wurden für 24 h bei 26°C inkubiert. Am Tag der Fixierung betrug die Konfluenz der Zellen ca. 70 – 80 %. Die Fixierung und Färbung der Zellen wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Nährmedium wurde entfernt und die Zellen vorsichtig mit 0,5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 15 min in 0,5 ml 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Das PFA wurde nachfolgend durch dreimaliges Waschen mit 1 ml PBS für je 10 min gründlich entfernt. Um die Zellen zu permeabilisieren wurden diese für 15 min mit 1 ml Triton-Lösung (0,2 % in PBS) behandelt. Auf die Permeabilisierung folgte eine 10 minütige Inkubation mit 500  $\mu$ l Glycin (100 mM in PBS) und eine zweistündige Blockierung mit 1 ml einer BSA-Tween-Lösung (5 % BSA, 0,1 % Tween20 in PBS). Der Erstantikörper wurde ebenfalls in einer BSA-Tween-Lösung (0,5 % BSA, 0,1 % Tween) angesetzt (Die Konzentration der eingesetzten Erst- und Zweitantikörper ist Tab. 11 aufgelistet). Die Zellen wurden mit ca. 200  $\mu$ l Antikörperlösung bedeckt und über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT inkubiert. Um anschließend Erstantikörperreste vollständig

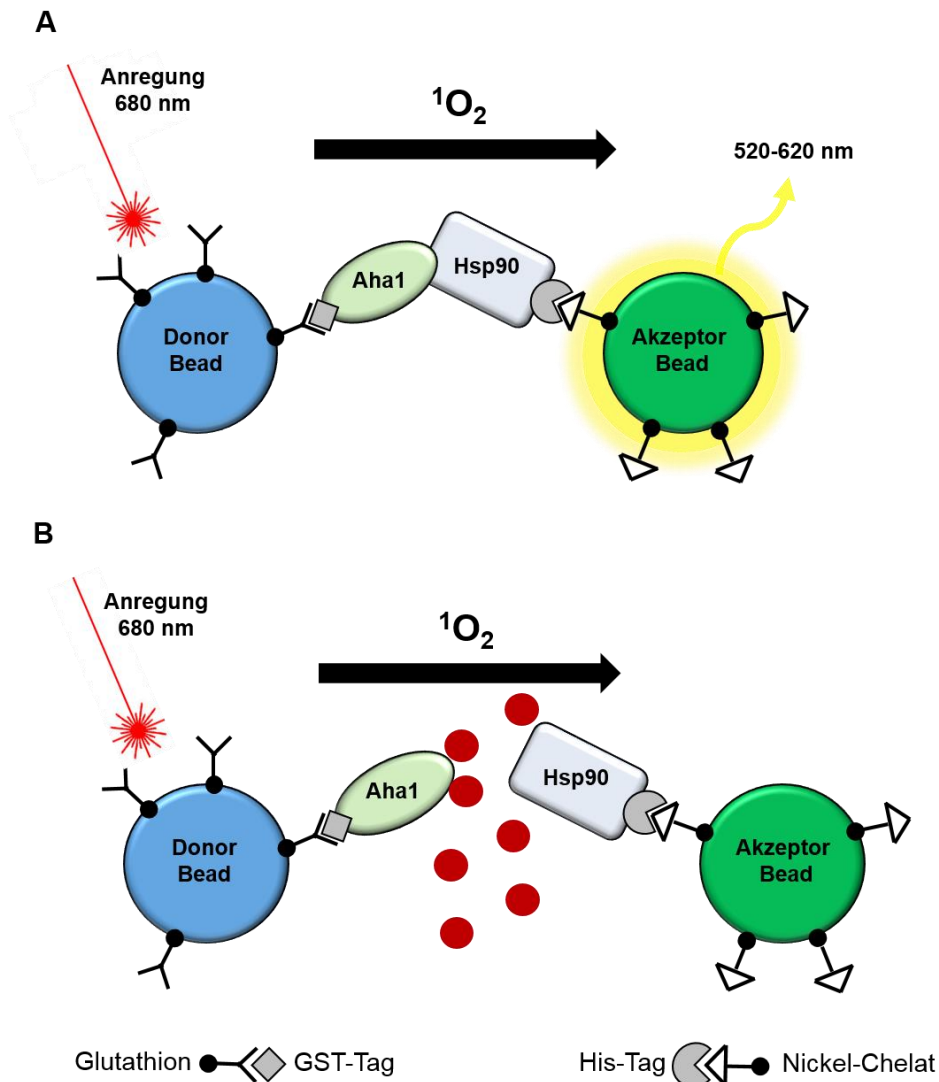
zu entfernen, wurden die Zellen dreimal mit 0,5 ml BSA-Tween-Lösung (0,5 % BSA, 0,1 % Tween 20 in PBS) für je 10 min gewaschen. Der Zweitantikörper wurde ebenfalls in dieser Lösung angesetzt und die Zellen mit 200 µl Lösung für 1 h bei RT inkubiert. Da der Zweitantikörper mit einem Fluorophor gekoppelt ist, erfolgte die Inkubation in einer lichtdichten Kammer. Nachfolgend wurden die Zellen zweimal mit je 500 µl 0,1 % Tween-Lösung in PBS für je 10 min gewaschen. Für das Anfärben der Zellkerne wurde der DNA-bindende Farbstoff DAPI in einer Verdünnung von 1:10.000 verwendet. 200 µl der DAPI-Lösung wurden dazu auf die Zellen gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit PBS für 10 min (je 1 ml) gewaschen. Vor dem Eindeckeln der Proben mit Mowiol wurden die Zellen noch einmal kurz in *A. dest* gespült. Sobald die Proben getrocknet waren, wurden sie lichtdicht auf einem ebenen Untergrund bei 4°C gelagert. Die Analyse der gefärbten Zellen erfolgte an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (LSM) der Firma Zeiss mithilfe des Programms NIS Elements AR.

### **2.2.3.16 Alpha (amplified luminescent proximity homogeneous assay)-Technologie**

Die Alpha-Technologie wurde in dieser Arbeit für den Nachweis der Interaktion zwischen Hsp90 und Aha1 verwendet. Diese Technologie wurde bereits in anderen Studien erfolgreich für den Nachweis von Interaktionen zwischen Proteinen oder anderen zellulären Komponenten in einem zellfreien System verwendet (D'Agostino et al, 2013; Sierecki et al, 2014), jedoch noch nicht für die quantitative Erfassung des Hsp90-Aha1 Komplexes. Ein Vorteil dieses Assays ist seine Durchführbarkeit in Lösung, wodurch Proteine ihre native Konformation annehmen können. Des Weiteren ist diese Methode äußerst ressourcenschonend, da nur nanomolare Mengen der einzelnen Assaykomponenten benötigt werden.

Des Weiteren stellte diese Technik die Basis des Hsp90-Aha1-Inhibitor-Screens dar. Das Prinzip des Assays, z.B. für den Nachweis der Hsp90-Aha1-Interaktion, ist in Abbildung 9A dargestellt. Die potenziellen Interaktionspartner wurden dabei über ihre spezifischen Tags (in dieser Arbeit GST und His<sub>6</sub>) an zwei verschiedene entsprechend beschichtete Beadtypen (Glutathion und Nickel-Chelat) gekoppelt. Die sogenannten Donorbeads beinhalten einen Photosensibilisator, der bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 680 nm, Umgebungssauerstoff in reaktiven Singulett-Sauerstoff umwandelt. Der Singulett-Sauerstoff kann in einer Lösung ca. 200 nm weit diffundieren. Befindet sich der sogenannte Akzeptorbead durch Interaktion von Hsp90 und Aha1 in räumlicher Nähe ( $\leq 200$  nm) zum Donorbead, aktiviert der Singulett-Sauerstoff Thioxenderivate im Akzeptorbead. Dieser Energieübertrag resultiert in der Entwicklung von Lumineszenz bei einer Wellenlänge von 520-620 nm und kann mit einem Luminometer detektiert werden (Abb. 9A). Für die Suche nach Molekülen, die den Hsp90-Aha1-Komplex inhibierten, war daher das Ausbleiben der Lumineszenzentwicklung entscheidend (Abb. 9B). Inhibitormoleküle würden die Proteininteraktion unterbinden, wodurch Donor- und Akzeptorbead nicht mehr in räumliche Nähe zueinander gelangen könnten. Der

bei Anregung entstandene Singulett-Sauerstoff fiele dann in seinen Grundzustand zurück und es würde kein Lichtsignal generiert. Sogenannte „Hit-Moleküle“ zeichneten sich also durch das Ausbleiben der Lumineszenz aus.



**Abb. 9: Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Alpha-Technologie.**

Die Alpha-Technologie beruht auf einem Bead-basierten System, in dem die Interaktionspartner über Proteintags an sogenannte Donor- bzw. Akzeptorbeads gekoppelt werden. **A** Bei erfolgreicher Interaktion nähern sich Donor- und Akzeptorbeads räumlich an, wodurch eine photochemische Reaktion gestartet wird. Singulett-Sauerstoff aktiviert in Folge dessen Akzeptorbeads und Lumineszenz wird generiert. **B** Das Prinzip des Inhibitor-Screens beruht auf dem Ausbleiben der Lumineszenz, da Hsp90-Aha1-Inhibitoren (in Rot) die Interaktion stören würden, so dass keine photochemische Reaktion ausgelöst werden kann.

### 2.2.3.17 Substanzbibliothek für den Screen nach Hsp90-Aha1-Inhibitoren

Für die Suche nach Molekülen, die den Hsp90-Aha1-Komplex inhibieren, wurde eine Substanzbibliothek (HitFinder Library, Maybridge) verwendet, die 14.400 verschiedene Substanzen enthält. Diese Substanzen erfüllten alle die 5er-Regel nach Lipinski (Lipinski's

Rule of 5), die Hinweise auf die orale Bioverfügbarkeit von Substanzen bzw. späteren Arzneimitteln gibt (Lipinski et al, 2012). Demnach weist eine Substanz eine gute orale Bioverfügbarkeit auf wenn sie folgende Kriterien erfüllt:

Die Substanz weist

- nicht mehr als 5 Donatoren von Wasserstoffbrückenbindungen (OH-, NH-Gruppen),
- nicht mehr als 10 Akzeptoren von Wasserstoffbrückenbindungen (Sauerstoff- und Stickstoffatome),
- eine Molekülmasse von maximal 500 g/mol und
- einen Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von 5

auf.

Die Substanzen wurden im 384-Well Format als Trockenfilm geliefert und mit DMSO auf eine Konzentration von 50 mM eingestellt. Für das Assay wurden die Substanzen jedoch vorher mit *A. dest.* auf eine Konzentration von 50 µM eingestellt. Die Lagerung der gelösten und verdünnten Substanzen erfolgte bei -20°C.

#### **2.2.3.18 Durchführung des Inhibitorscreenings**

Das Inhibitorscreening basierend auf der Alpha-Technologie wurde im 384-Well Format (Alpha Plate 384, Perkin Elmer) durchgeführt. Pro Durchlauf wurden auf diese Weise 320 verschiedene Substanzen auf ihr Inhibitionsvermögen hin getestet. Vertiefungen in den vier Ecken der 384-Well-Platte wurden für Positiv- und Negativkontrollen verwendet, die verbliebenen Vertiefungen der beiden äußeren Reihen wurden nicht genutzt.

Für den Assay wurde zunächst der Komplex aus je 1,5 µM GST-Aha1 und His<sub>6</sub>-Hsp90α in einem physiologischen HEPES-Puffer (Niedrigsalzpuffer, siehe Tab. 9) angesetzt. Mithilfe eines manuellen Pipettiersystems wurden 10 µl des Proteinkomplexes in die Vertiefungen der 384-Well-Platte vorgelegt. Nachfolgend wurden 5 µl der möglichen Inhibitorsubstanzen aus der 50 µM-Verdünnung hinzupipettiert. Dieser Ansatz wurde mithilfe der Rotationsschüttlerfunktion des Luminometers durchmischt und anschließend für 10 min bei 30°C, gefolgt von 10 min bei 4°C inkubiert. Vor Ablauf der Inkubationszeit wurden Glutathion-Donor- und Nickel-Chelat-Akzeptorbeads in Niedrigsalzpuffer, versetzt mit 0,5 % BSA, verdünnt. Jedem Ansatz (Proteinkomplex + Substanz) wurden schließlich 10 µl Donor- und Akzeptorbead-Lösung hinzugefügt. Nach einer erneuten Inkubation (30 min, RT) wurde die Platte im Lumineszenzmessgerät ausgelesen. Die Durchführung des gesamten Assays erfolgte aufgrund der Lichtsensitivität der beteiligten Komponenten unter abgedunkelten Verhältnissen. Während der Inkubationszeiten wurde die Platte in eine lichtdichte Box gestellt.

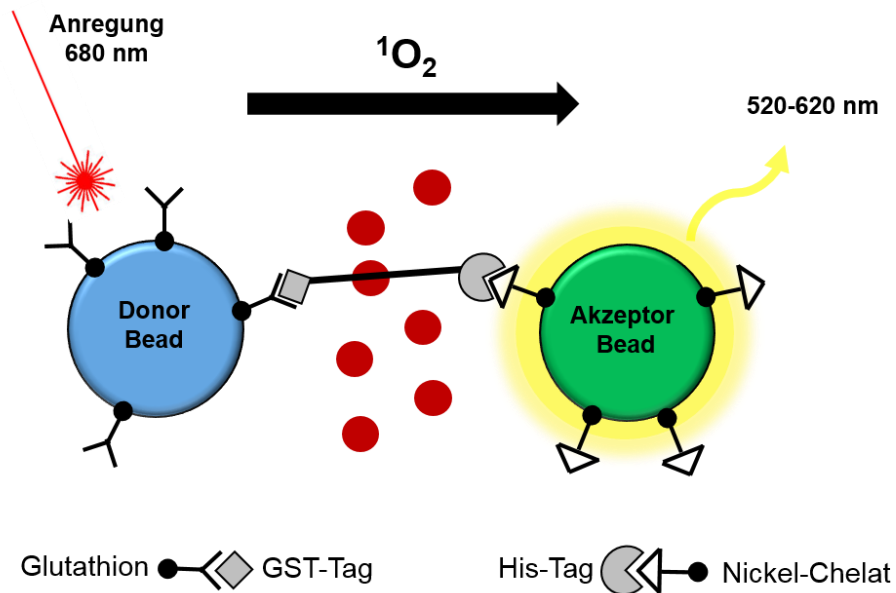
Tabelle 19 stellt noch einmal zusammenfassend dar, welche Konzentrationen von Proteinen, Substanz und Beads pro Well eingesetzt wurden. Wells, die kein Lumineszenzsignal zeigten, enthielten einen potenziellen Hsp90-Aha1-Inhibitor.

**Tab. 19: Komponenten des Alpha-Screens und ihre Konzentration**

<b>Komponente</b>	<b>Endkonzentration/ Well</b>
GST-Aha1	300 nM
His <sub>6</sub> -Hsp90 $\alpha$	300 nM
Substanzen	10 $\mu$ M
Glutathion-Donorbeads	1,5 ng/nl
Nickel-Chelat-Akzeptorbeads	1,5 ng/nl
DMSO	0,2 %

### 2.2.3.19 Counterscreen mittels Alpha-Technologie

Um die Möglichkeit falsch-positiver Hsp90-Aha1 Inhibitoren zu reduzieren, wurde im Anschluss an das Inhibitorscreening ein sogenanntes Counterscreening durchgeführt. Mit diesem Kontrollexperiment konnten diejenigen Substanzen identifiziert werden, die nicht die Hsp90-Aha1 Interaktion inhibiert hatten, sondern die Lumineszenz, z.B. durch Quenching gestört hatten. Dazu wurde anstelle des Hsp90-Aha1-Komplexes ein His-getaggtes GST verwendet. Infolgedessen sollten sowohl Donor- als auch Akzeptorbeads dieses Protein binden können. Die daraus resultierende Lumineszenz sollte sich nicht durch echte Hsp90-Aha1 Inhibitoren unterbinden lassen (siehe Abb. 10). Es wurden daher 1,5  $\mu$ M His<sub>6</sub>-GST in die Vertiefungen einer 384-Well-Platte vorgelegt und anschließend 10  $\mu$ M der identifizierten Inhibitoren hinzupipettiert. Die Inkubation erfolgte für 10 min bei 30°C sowie 10 min bei 4°C unter Lichtabschluss. Im Anschluss wurde die Donor- und Akzeptorbead-Mischung hinzugegeben und die Platte für 30 min bei RT inkubiert. Die Auslesung des Lumineszenzsignals erfolgte im Luminometer.



**Abb. 10: Counterscreen zum Ausschluss von falsch-positiven Hsp90-Aha1-Inhibitoren.**

Die identifizierten Hitsubstanzen wurden zusammen mit einem His<sub>6</sub>-GST-Konstrukt im Assay eingesetzt. Da beide Bead-Typen an das Protein binden können, sollten echte Hits (in Rot) keinen Einfluss auf die Lumineszenz haben.

#### 2.2.4 Verwendete Programme und Statistik

Die statistische und grafische Auswertung der Versuche erfolgte mithilfe der Programme Excel (Microsoft) und Prism 5 (GraphPad). Normalverteilte Daten wurden paarweise auf eine signifikante Abweichung hin überprüft (*student's t-test*). Das Signifikanzniveau  $p$  für  $\alpha$  wurde mit 0,05 festgesetzt. Abweichungen vom Mittelwert wurden stets als Standardabweichung dargestellt. Signifikante Abweichungen wurden dabei folgendermaßen dargestellt: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Bearbeitung aller in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen wurde mithilfe der Programme Photoshop (Adobe) und Power Point (Microsoft) durchgeführt.

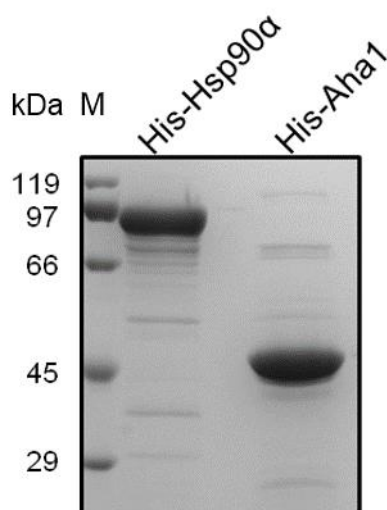
## 3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Identifikation von Substanzen, die den Hsp90-Aha1-Chaperonkomplex hemmen bzw. auflösen. Bevor das Screening nach derartigen Substanzen durchgeführt werden konnte, musste die Interaktion von humanem Hsp90 und Aha1 verifiziert werden. Der Nachweis erfolgte mittels analytischer Gelfiltration sowie der Alpha-Technologie. Identifizierte Substanzen wurden nachfolgend auf zytotoxische Effekte hin geprüft. Die Wirkung der Inhibitoren auf die Reifung von CFTR $\Delta$ F508 wurde im Iodidefflux-Assay sowie mittels Immunfluoreszenz-Analyse untersucht.

### 3.1 Die humanen Qualitätskontrollproteine Hsp90 und Aha1 bilden einen stabilen Chaperonkomplex

#### 3.1.1 Nachweis der Interaktion von rekombinantem Hsp90 und Aha1 mittels Gelfiltration

Humanes Hsp90 $\alpha$  und Aha1 wurden in einen pcDNA3.1-Vektor kloniert, in *E. coli* BL21 Zellen transformiert und als His<sub>6</sub>-Fusionsproteine exprimiert. Die Aufreinigung erfolgte durch Nickel-Affinitätschromatographie und eine nachfolgende Anionenaustauschchromatographie. In Abbildung 11 ist die erfolgreiche Aufreinigung der Proteine dargestellt. 10  $\mu$ g Hsp90- bzw. Aha1-Protein wurden mittels 10 %iger SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung nachgewiesen. Hsp90 wies ein charakteristisches Molekulargewicht von 90 kDa auf, Aha1 von 45 kDa. Das zusätzliche geringe Molekulargewicht des His-Tags war zu vernachlässigen.



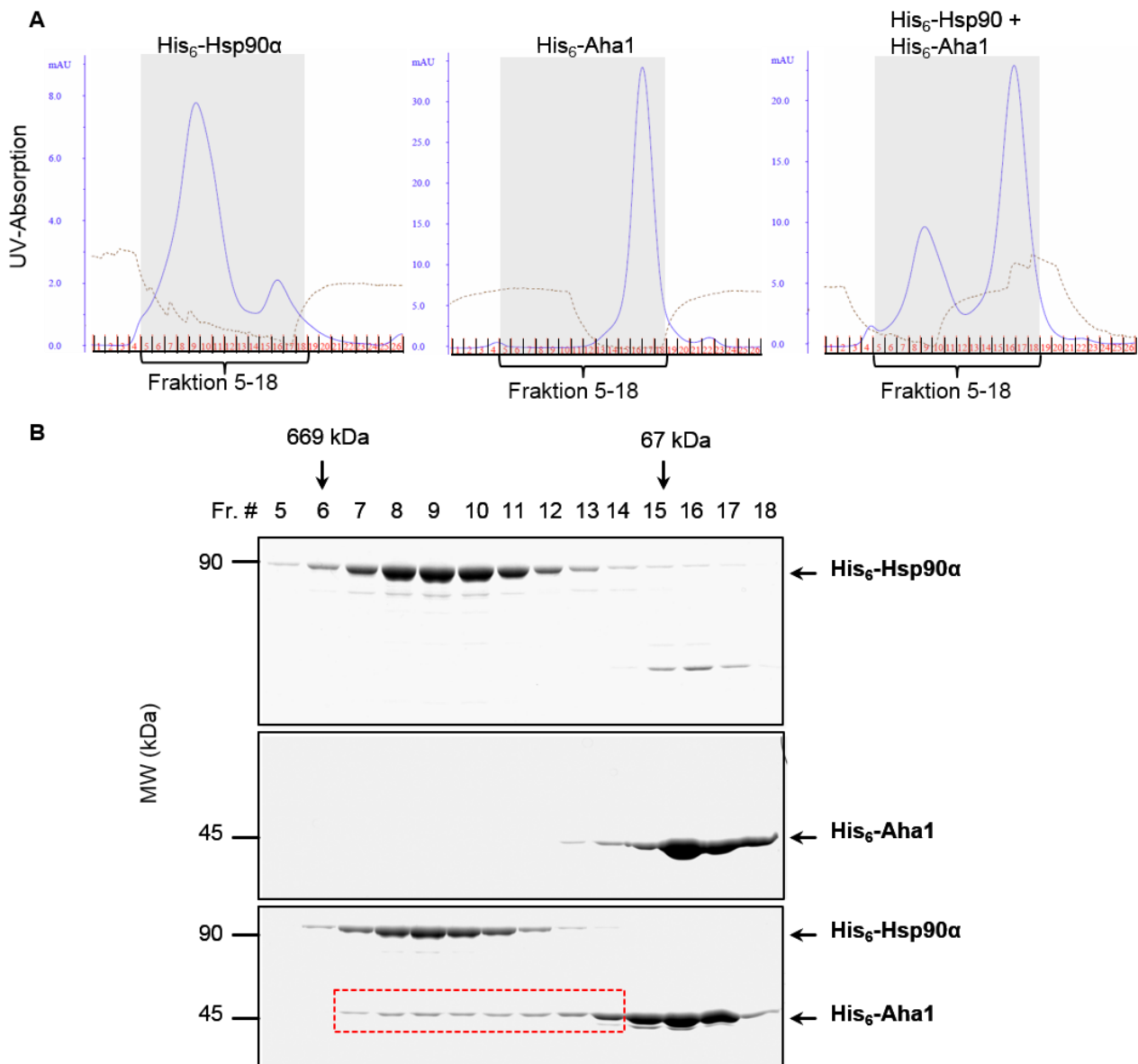
**Abb. 11: Expression und Aufreinigung von His-Hsp90 $\alpha$  und His-Aha1.**

10  $\mu$ g Hsp90 und Aha1 wurden auf einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Färbung des Gels mit Coomassie bestätigte die Molekulargewichte von Hsp90 (90 kDa) und Aha1 (45 kDa). kDa: Kilodalton, M: Marker.

Für den Nachweis der Interaktion zwischen His-Hsp90 und His-Aha1 wurden die Proteine mithilfe der Gelfiltrationchromatographie analysiert. Dazu wurden Elutionsprofile der beiden Proteine alleine sowie in Kombination (jeweils 10  $\mu$ M) auf einer Superdex 200-Säule aufgetrennt (Abb. 12A) und die Fraktionen 5 bis 18 mittels SDS-PAGE analysiert (Abb. 12B).

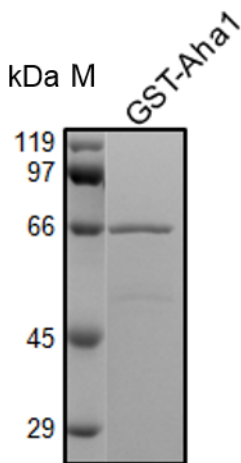
Im Chromatogramm der Gelfiltration zeigte Hsp90 einen klaren Peak von Fraktion 6 bis 13 sowie einen zweiten, kleineren Peak von Fraktion 15 bis 17. Die SDS-PAGE der Fraktionen 5 bis 18 bestätigte, dass es sich bei dem Protein in den Fraktionen 6 bis 13 um das 90 kDa schwere Hsp90 handelte. Der zweite Peak zeigte ein Protein geringeren Molekulargewichts, möglicherweise ein Abbauprodukt von Hsp90. Aha1 wies einen Peak in den späteren Fraktionen 15 bis 18 auf, da dieses Protein mit seinem geringeren Molekulargewicht von 45 kDa später von der Säule eluierte. Im Coomassie-gefärbten SDS-Gel zeigten sich ebenfalls klare Proteinbanden, die dem Molekulargewicht von Aha1 entsprachen. Da sich die Molekulargewichte von Hsp90 und Aha1 deutlich unterscheiden, konnten im Chromatogramm, bei Kombination von Hsp90 und Aha1, immer noch die zwei charakteristischen Peaks nachgewiesen werden. Die Analyse der Fraktionen auf einem SDS-Gel zeigte nun jedoch eine deutliche Verschiebung von Aha1 hin zu früheren Fraktionen, was auf eine Ko-Elution mit Hsp90 hindeutet (Abb. 12B, rote Umrandung). Diese Beobachtung bestätigte, dass ein Teil des vorhandenen Aha1 an Hsp90 band. Für den späteren Interaktionsnachweis zwischen Hsp90 und Aha1 mit der Alpha-Technologie, war es notwendig, dass beiden Interaktionspartner unterschiedliche Tags aufwiesen. Daher wurden His-Hsp90 und GST-Aha1 ebenfalls im Vorfeld auf ihr Interaktionsvermögen hin überprüft. Aha1 wurde dazu als GST-Aha1-Fusionsprotein (in pGEX4T1) exprimiert. Das Molekulargewicht von Aha1 erhöht sich durch den GST-Tag (25 kDa) auf ca. 60 kDa (s. Abb. 13). Die Aufreinigung des GST-Fusionsproteins erfolgte ebenfalls über Affinitätschromatographie und eine zusätzliche Anionenaustauschchromatographie.





**Abb. 12: Die Proteine His-Hsp90 und His-Aha1 bildeten einen stabilen Chaperonkomplex.**

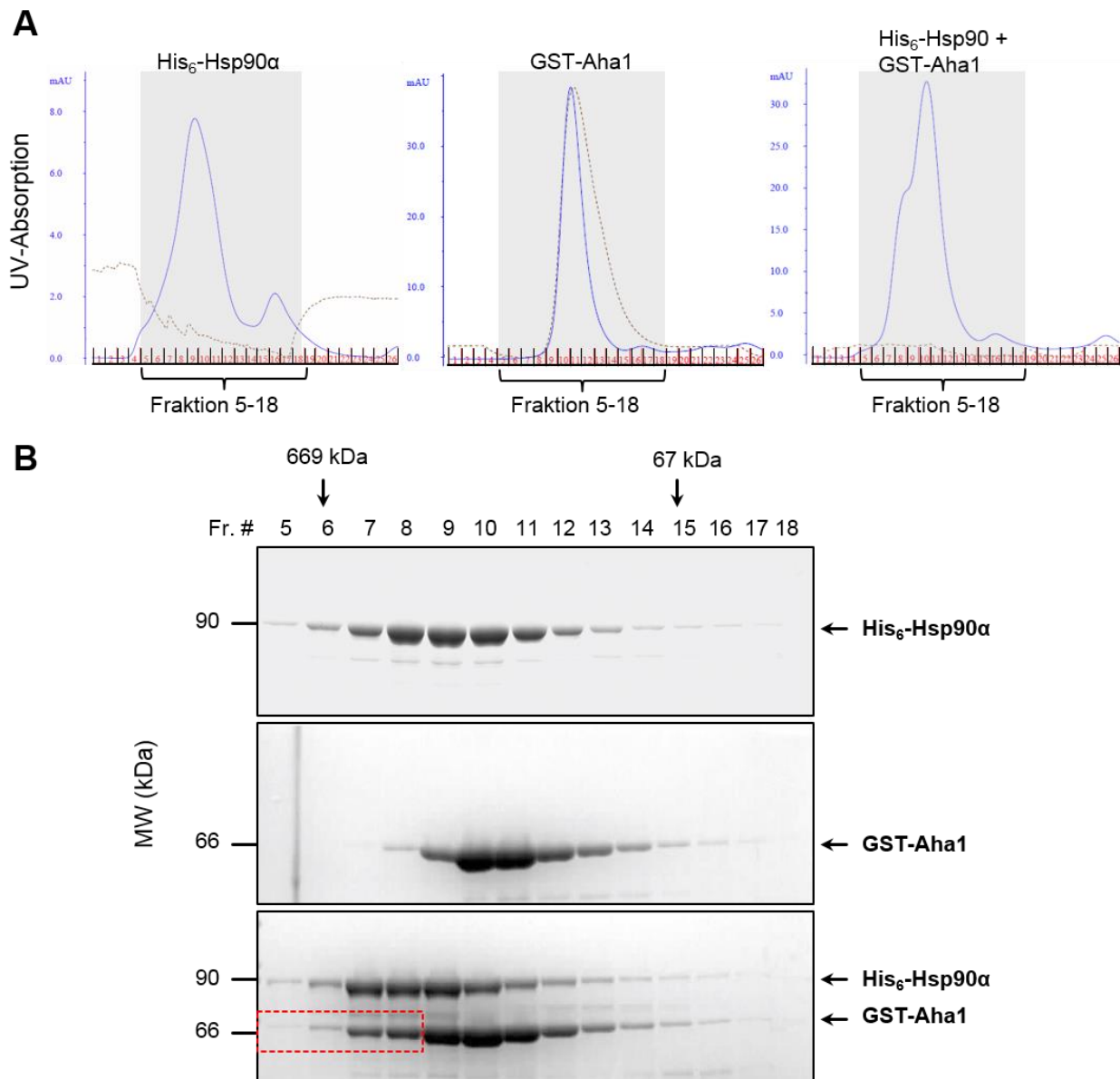
**A** Hsp90, Aha1 und die Kombination aus Hsp90 und Aha1 (je 10  $\mu$ M) wurden über eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Die Elutionsprofile für Hsp90 und Aha1 unterschieden sich deutlich voneinander, so dass die jeweiligen Protein-Peaks auch noch in der Kombination der Proteine erkennbar waren. Die Fraktionen, die auf einem SDS-Gel analysiert wurden, sind grau unterlegt. **B** Die Fraktionen 5 bis 18 wurden jeweils auf 10 %ige SDS-Gele aufgetragen und mit Coomassie gefärbt. Markerproteine sind oberhalb der Abbildung dargestellt (Thyroglobulin 667 kDa, BSA 67 kDa). Die sichtbaren Proteinbanden entsprechen dabei den Peaks in den Chromatogrammen. Bei Kombination von Hsp90 und Aha1 zeigte sich eine Verschiebung des Aha1-Elutionsprofils hin zu früheren Fraktionen (rote Umrandung), was eine Ko-Elution mit Hsp90 und damit eine Interaktion anzeigte. kDa: Kilodalton, MW: molecular weight (Molekulargewicht).



**Abb. 13: Expression und Aufreinigung von GST-Aha1.**

5  $\mu$ g Aha1 wurden auf einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Coomassie-Färbung bestätigte das durch GST erhöhte Molekulargewicht von Aha1 (66 kDa). kDa: Kilodalton, M: Marker.

Nachfolgend wurde die Interaktion von His-Hsp90 und GST-Aha1 mithilfe der Gelfiltrationschromatographie geprüft. Dazu wurden je 10  $\mu$ M His-Hsp90 und GST-Aha1, separat sowie in Kombination, auf eine Superdex 200-Säule aufgetragen. Die Elutionsprofile wurden anschließend unter Verwendung der Fraktionen 5 bis 18 mittels SDS-PAGE analysiert. Abbildung 14A zeigt die Elutionsprofile der injizierten Proben. Hsp90 eluierte, wie schon beschrieben, in den frühen Fraktionen 7 bis 11. Das nun größere GST-Aha1 eluierte dementsprechend etwas früher als His-Aha1 in den Fraktionen 10 und 11. Durch das nun ähnliche Molekulargewicht ließen sich die Einzelpeaks bei kombinierter Auftragung von His-Hsp90 und GST-Aha1 nicht mehr deutlich voneinander trennen (Abb. 14A). Abbildung 14B zeigt jedoch deutlich, dass auch ein erheblicher Anteil von GST-Aha1 zusammen mit His-Hsp90 koeluierte, da hier ebenso eine Verschiebung des Aha1-Elutionsprofils zu beobachten war.

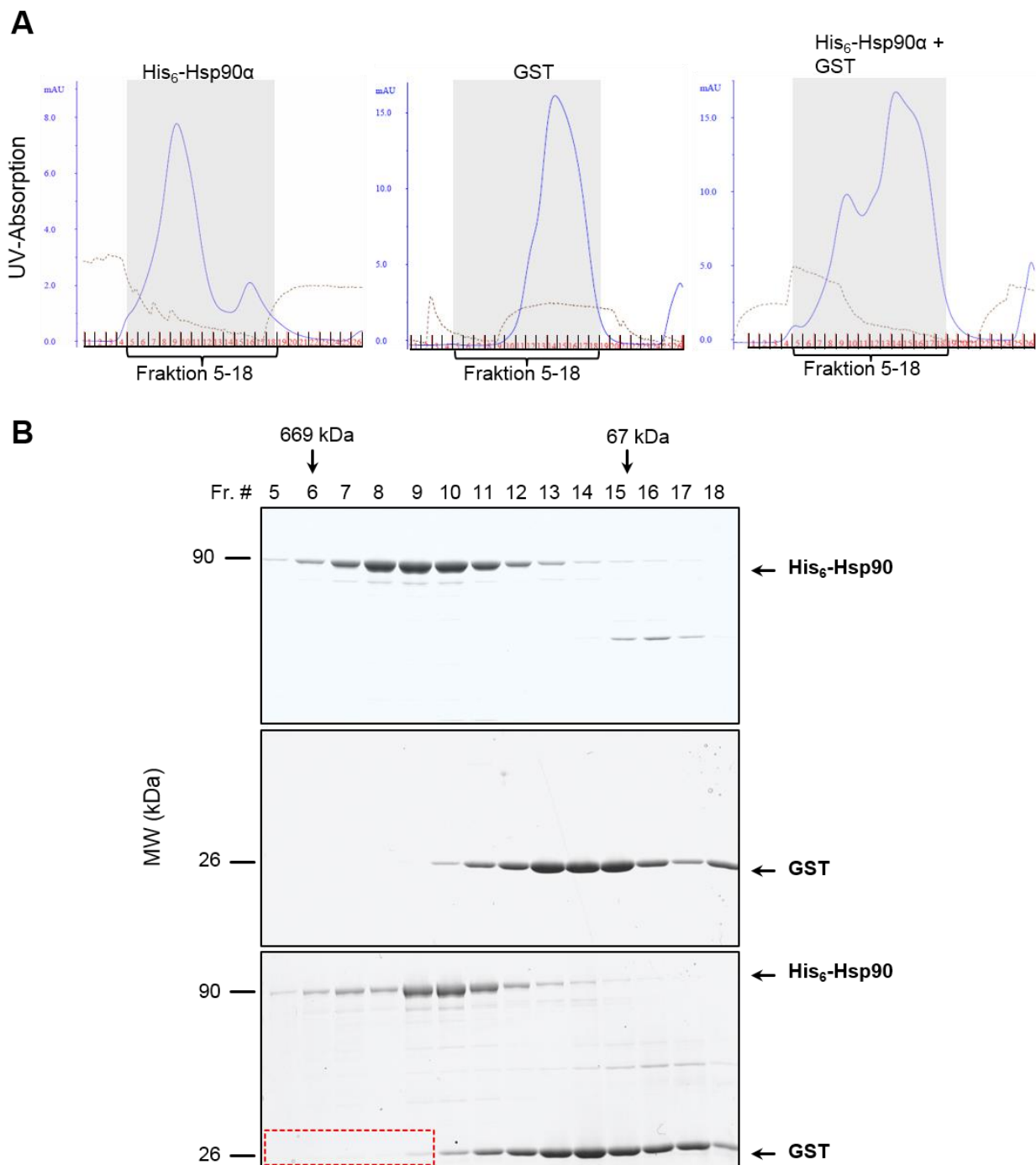


**Abb. 14: His-Hsp90 und GST-Aha1 interagieren miteinander.**

**A** Hsp90, Aha1 und ein Mix aus Hsp90 und Aha1 (je 10  $\mu$ M) wurden über eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. His-Hsp90 eluierte von Fraktion 7 bis 11, während das etwas kleinere GST-Aha1 in den Fraktionen 9 bis 12 eluierte. Die Fraktionen, die auf einem SDS-Gel analysiert wurden, sind grau unterlegt. **B** Die Fraktionen 5 bis 18 wurden jeweils auf 10 %ige SDS-Gele aufgetragen und die Proteine mit Coomassie angefärbt. Markerproteine sind oberhalb der Abbildung dargestellt (Thyroglobulin 667 kDa, BSA 67 kDa). Die sichtbaren Proteinbanden entsprachen dabei den Peaks in den Chromatogrammen. Bei Kombination beider Proteine koeluierte GST-Aha1 mit His-Hsp90, was anhand der Verschiebung des Elutionsprofils von Aha1 deutlich wurde (rote Umrandung). kDa: Kilodalton, MW: molecular weight (Molekulargewicht).

Als Negativkontrolle wurden ebenfalls Interaktionsversuche mit Hsp90 und GST (10  $\mu$ M) mittels der Gelfiltration durchgeführt. Die Elutionsprofile für Hsp90, GST und die Kombination der beiden Proteine sind in Abbildung 15A dargestellt. GST eluierte hauptsächlich in den Fraktionen 13 bis 16, so dass auch bei Kombination beider Proteine noch die zwei einzelnen Peaks gut erkennbar waren. Die Analyse der Fraktionen 5 bis 18 mittels SDS-PAGE (Abb.

15B) bestätigte eindeutig, dass GST nicht mit His-Hsp90 koeluiert. Die Interaktion zwischen His-Hsp90 und GST-Aha1 wurde damit verifiziert.



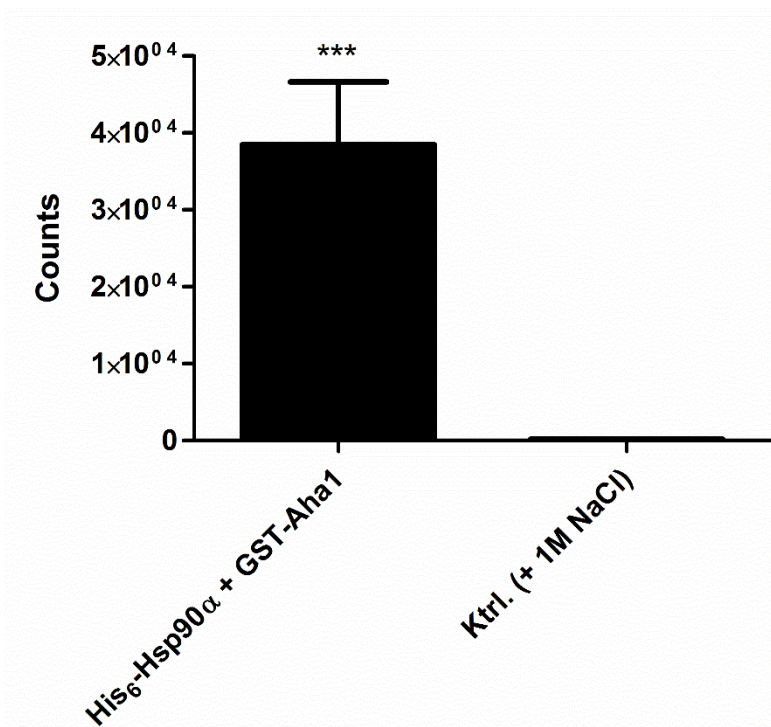
**Abb. 15: Es ist keine Interaktion zwischen His-Hsp90 und GST nachweisbar.**

**A** Hsp90, GST und die Kombination aus Hsp90 und GST (je 10  $\mu$ M) wurden über eine Superdex 200-Gelfiltrationssäule aufgetrennt. Hsp90 eluierte in den Fraktionen 7 bis 11 während das kleinere GST in den Fraktionen 13 bis 16 eluierte. Die mittels SDS-PAGE analysierten Fraktionen sind grau unterlegt.

**B** Die Fraktionen 5 bis 18 wurden jeweils auf 10 %ige SDS-Gele aufgetragen und die Proteine mit Coomassie gefärbt. Markerproteine sind oberhalb der Abbildung dargestellt (Thyroglobulin 667 kDa, BSA 67 kDa). Die sichtbaren Proteinbanden entsprachen dabei den Peaks in den Chromatogrammen. Da keine Verschiebung im Elutionsprofil des GST sichtbar ist, ist eine Interaktion zwischen Hsp90 und dem Tag alleine auszuschließen. kDa: Kilodalton, MW: molecular weight (Molekulargewicht).

### 3.1.2 Nachweis der Hsp90-Aha1-Interaktion mit der Alpha-Technologie

Für diese Form des Interaktionsnachweises wurden die Interaktionspartner über ihre Tags an Donor- und Akzeptorbeads gekoppelt. Das His-Hsp90 wurde dabei in einem physiologischen Puffer an Nickel-Chelat-Beads und das GST-Aha1 an Glutathion-Beads gebunden. Die räumliche Annäherung der Beads resultierte in einer photochemischen Reaktion in Folge derer ein Lichtsignal generiert und gemessen werden konnte. Abbildung 16 zeigt die Auswertung von 20 unabhängigen Interaktionsmessungen mit der Alpha-Technologie. Durch die Interaktion von Hsp90 und Aha1 wurde mit  $38.493 (\pm 8.133)$  Counts ein starkes Lichtsignal generiert, das sich fast vollständig durch Zugabe einer hohen Salzkonzentration (1M NaCl) reduzieren ließ ( $187,8 (\pm 75,06)$ ). Der Unterschied zwischen den Signalen für die Hsp90-Aha1 Interaktion und der Negativkontrolle war höchst signifikant ( $p < 0,0001$ ). Die Salzkontrolle bestätigte, dass es sich bei dem untersuchten Komplex tatsächlich um eine echte Protein-Protein-Interaktion handelte und nicht um unspezifische Interaktionen zwischen Proteinen und Beads.



**Abb. 16: Die Interaktion von His-Hsp90 und GST-Aha1 generierte Chemilumineszenz.**

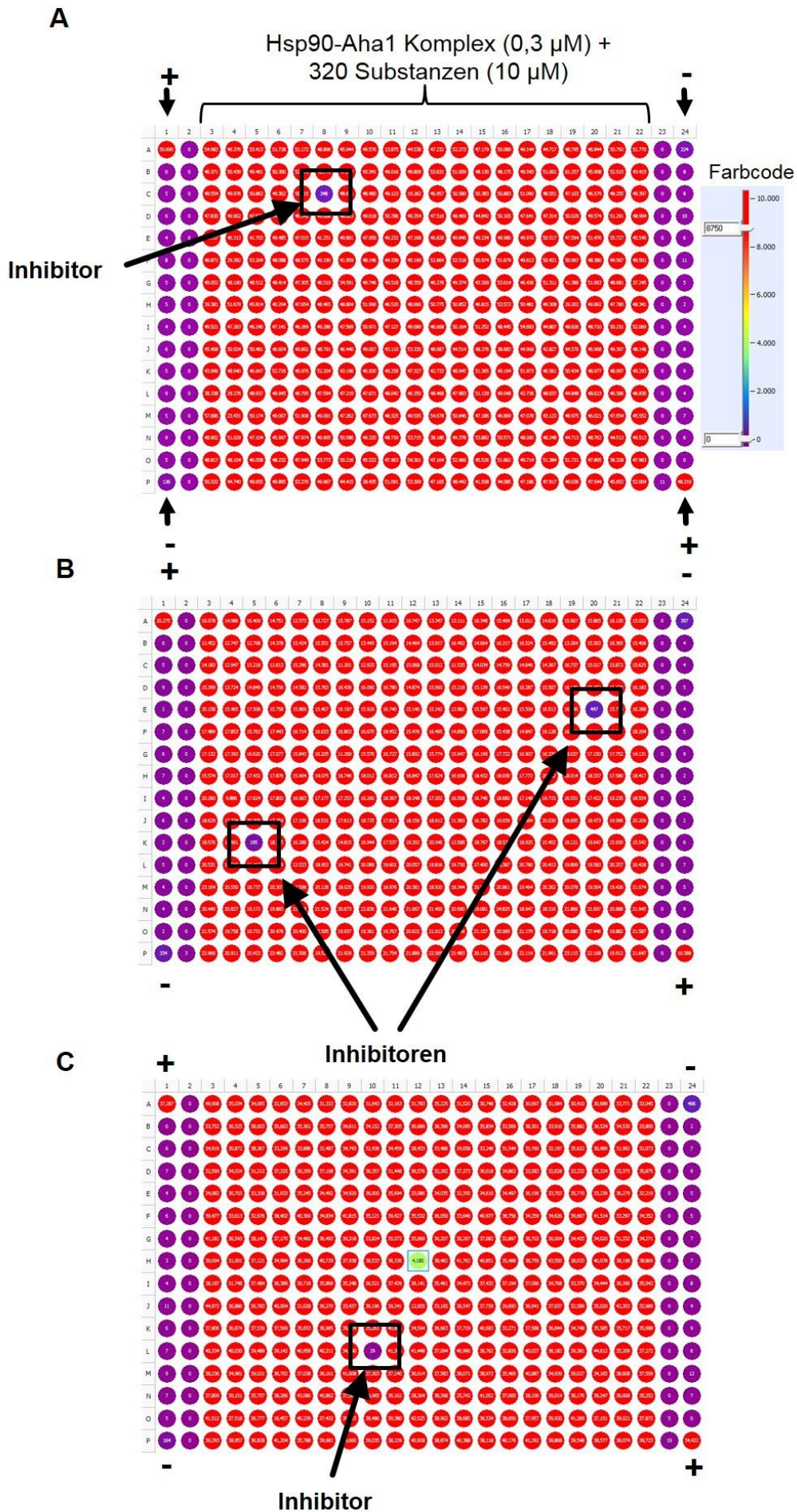
Hsp90 und Aha1 interagierten miteinander und erzeugten so ein starkes Lichtsignal. In der Kontrolle wurde dem Proteinkomplex eine hohe Konzentration an Salz (1M NaCl) zugesetzt, um die Protein-Protein-Interaktion zu lösen. In diesem Fall wurde auch die Generation eines Signals unterbunden. Abweichungen vom Mittelwert sind als Standardabweichung dargestellt ( $n = 20$ ). \*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 3.2 Der Alpha-Screen identifizierte 30 Substanzen, die den Hsp90-Aha1-Komplex effektiv inhibierten

Die Alpha-Technologie stellte die Basis für die Suche nach Molekülen dar, die den Hsp90-Aha1 Komplex effektiv inhibierten. Mithilfe einer Substanzbibliothek bestehend aus 14.400 (45 384-Well-Platte) verschiedenen Molekülen sollten solche Inhibitoren des Hsp90-Aha1 Komplexes identifiziert werden. Die Substanzen wurden dabei in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Jede der insgesamt 45 Platten wurde daher im Alpha-Assay auf das Ausbleiben von Lumineszenz aufgrund der Inhibition des Hsp90-Aha1 Komplexes hin untersucht. Sogenannte „Hit-Moleküle“ wurden des Weiteren wurden als solche klassifiziert, wenn sie die Lumineszenzentwicklung um mehr als 90 % hemmten. Die Funktionalität des Assays wurde stets durch Positiv- und Negativkontrollen überprüft. Positivkontrollen enthielten nur den Proteinkomplex sowie Donor- und Akzeptorbeads wohingegen den Negativkontrollen zusätzlich eine hohe NaCl-Konzentration (1 M) zugesetzt wurde, die die Komplexbildung stören sollte.

In Abbildung 17 sind beispielhaft drei 384-Well-Platte mit je 320 überprüften Substanzen dargestellt. Für die Auswertung codiert das Luminometer die Höhe des Signals mit einem Farbcode (siehe Skala auf der rechten Seite von Abb. 17A). Rot eingefärbte Wells spiegeln ein hohes Signal wider, welches durch die Interaktion von His-Hsp90 und GST-Aha1 erzeugt wurde. So wurden z.B. alle Wells rot eingefärbt, deren Lumineszenzsignal höher als 8000 war. Violett gefärbte Wells hingegen zeigten in diesen Beispielen an, dass die Lumineszenzentwicklung geringer als ca. 500 Counts war und damit die Proteininteraktion inhibiert wurde. Da pro Durchlauf 320 Substanzen getestet wurden, enthielten die beiden äußeren Reihen der 384-Well-Platte keine Substanzen. Dementsprechend ließ sich hier auch kein bzw. nur ein geringes Hintergrundsignal detektieren. Lediglich in den oberen und unteren Ecken wurden zusätzliche Positiv- (+ : Hsp90 + Aha1 + Beads) und Negativkontrollen (- : Hsp90 + Aha1 + 1M NaCl) mitgeführt. Einige Platten wiesen sehr starke Inhibitorsubstanzen auf, da hier die Lumineszenz im Vergleich zur Positivkontrolle stark inhibiert war. Dies galt z.B. für die Platten in Abbildung 17A und 17B Im Gegensatz zu den anderen 319 Substanzen, die Signale von ca. 50.000 Counts aufwiesen, inhibierte die Substanz in Feld C8 die Lumineszenz auf etwa 350 Counts. Die Beispielplatte B wies sogar 2 eindeutige Substanzen auf, die die Entwicklung von Lumineszenz hemmten. Des Weiteren gab es jedoch auch Platten, in denen Substanzen das Signal nur mittelmäßig hemmten. In Abbildung 17C z.B. ist eine Platte gezeigt, die einen deutlichen Hit zeigt sowie eine weitere Substanz, die den Hsp90-Aha1 Komplex zwar zu inhibieren scheint, jedoch in geringerem Ausmaß. Diese Substanz wurde nicht als Hit klassifiziert.

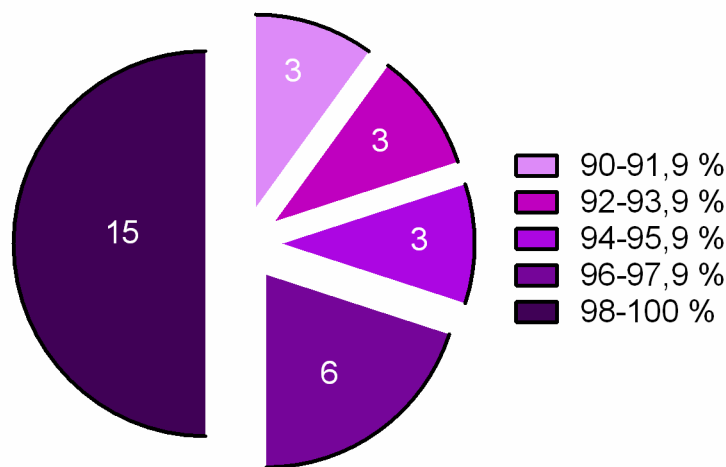




**Abb. 17: Identifikation von Hsp90-Aha1 Inhibitoren mittels Alpha-Technologie.**

320 Substanzen (10 µM) wurden in einer 384-Well Platte gegen den His-Hsp90-GST-Aha1 Komplex getestet. Positivkontrollen (+) enthielten nur den Proteinkomplex sowie die Donor- und Akzeptorbeads während die Negativkontrollen (-) zusätzlich 1 M NaCl erhielten. Abgesehen von den Kontrollen wurden die beiden äußeren Reihen (violett) nicht genutzt. Die Stärke des Lumineszenzsignals in den Wells wurde durch einen Farbcode wiedergegeben. Rot eingefärbte Wells zeigten ein starkes Lumineszenzsignal an, während violett gefärbte Wells für eine geringe Signalstärke sprachen. Es gab Platten, in denen sowohl ein Hit (**A**, **C**) als auch zwei Hits (**B**) identifiziert wurden. Des Weiteren hemmten einige Substanzen den Hsp90-Aha1 nur unvollständig, so dass das Well in Grün markiert war (**C**).

Um den Grad der Inhibition des Hsp90-Aha1 Komplexes durch die identifizierten Hitsubstanzen einzuschätzen, wurden die jeweiligen erreichten Counts der Substanzen anschließend in das Verhältnis zu den erreichten Werten der Positivkontrolle gesetzt. Von den insgesamt 14.400 Substanzen aus der Bibliothek wurden 30 Substanzen als His-Hsp90-GST-Aha1 Inhibitoren identifiziert. Diese 30 Moleküle hemmten den Hsp90-Aha1 Proteinkomplex in unterschiedlichem Ausmaß (Abb. 18). Bei der Hälfte der Substanzen handelte es sich um Moleküle, die die Entwicklung von Lumineszenz äußerst effektiv um 98 - 100 % hemmten. Sechs der 30 Substanzen führten zu einer Inhibition des Signals um 96 bis 97,9 %. Jeweils drei Substanzen ließen die Lumineszenz um 94 - 94,9 %, 92 - 93,9 % und 90 - 91,9 % zurückgehen. Die Substanzen wurden entsprechend der Reihenfolge ihrer Identifizierung mit A1 bis A30 benannt.



**Gesamtzahl Hits = 30**

**Abb. 18: 30 Substanzen wurden als Inhibitoren des Hsp90-Aha1 Komplexes identifiziert.**

15 der 30 Substanzen inhibierten das Messsignal besonders stark um 98 - 100 %. Weitere sechs Substanzen zeigten ebenfalls einen starken Abfall der Lumineszenz um 96 - 97,9 %. Eine mittlere Inhibitionsrate von 94 - 95,9 % wiesen drei Substanzen auf. Jeweils drei weitere Moleküle ließen sich in Kategorien von 92 - 93,9 % bzw. 90-91,9 % Inhibition einteilen.



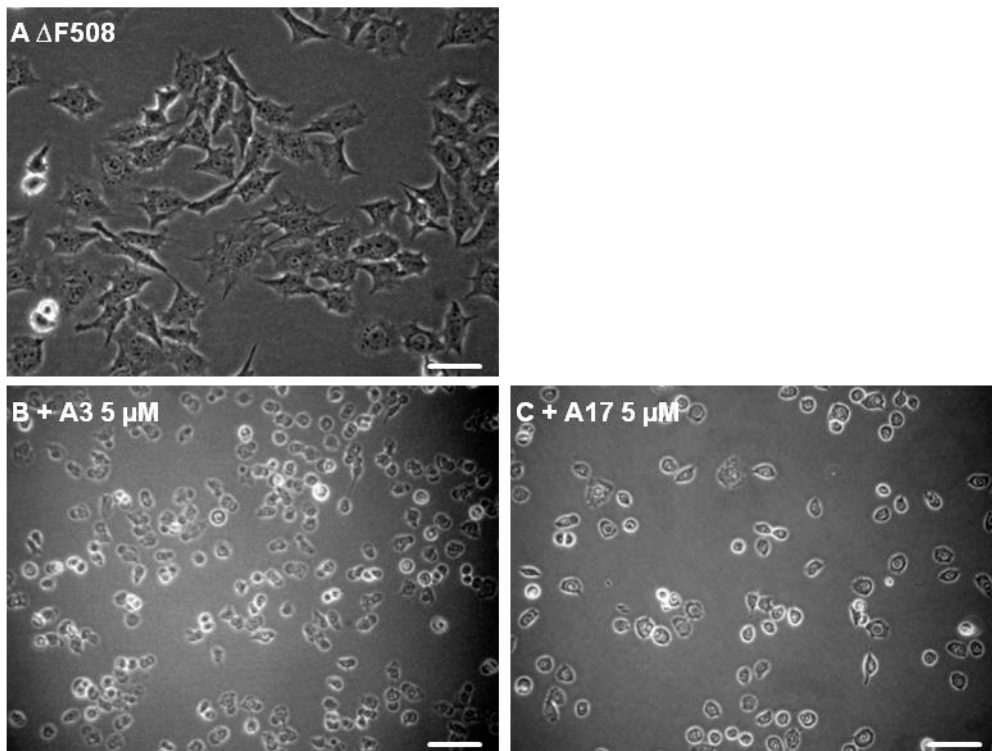
### 3.2.1 Zwei Substanzkandidaten interferierten mit Komponenten des Alpha-Screens

Um auszuschließen, dass der Signalabfall nicht durch eine echte Hemmung des Hsp90-Aha1-Komplexes, sondern durch eine unerwünschte Interaktion der Substanzen mit den Assay-Komponenten zustande kam (z.B. durch Quenching), wurden die identifizierten Hits einem weiteren Test unterzogen. Beim sogenannten Counterscreen wurden die identifizierten Inhibitoren erneut mit einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  im Assay eingesetzt. In diesem Kontrollversuch wurde jedoch kein Hsp90-Aha1 Komplex zugesetzt, sondern ein His<sub>6</sub>-GST-Konstrukt (0,3  $\mu\text{M}$ ). Dieses Protein sollte über seinen His- und GST-Anteil beide Beadtypen gleichzeitig binden können und ein Signal generieren, unabhängig davon, ob Inhibitoren zugesetzt wurden oder nicht.

Zwei der 30 identifizierten Substanzen hemmten jedoch auch in diesem Versuch die Entwicklung der Lumineszenz drastisch. Daher wurden die beiden Substanzen A1 und A7 von weiteren Versuchen ausgeschlossen. Die verbliebenen 28 Kandidatensubstanzen wurden nachfolgend auf zytotoxische Eigenschaften getestet.

### 3.2.2 Drei Substanzen zeigten ein zytotoxisches Verhalten auf BHK-Zellen

Für den Einsatz der Hsp90-Aha1 Inhibitoren im Iodidefflux-Assay durften diese keine zytotoxischen Effekte aufweisen. Dazu wurden BHK-Zellen, die konstitutiv das CFTR $\Delta$ F508-Protein exprimieren, für 24 h mit den 28 identifizierten Substanzen behandelt. Direkt vor der Behandlung waren die BHK $\Delta$ F508-Zellen adhärent und zeigten eine typisch flächig trapezförmige Morphologie (Abb. 19A). Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen mit den Substanzen in einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$ . Bereits nach 3 h wurden für die Substanzen A3, A17 und A21 starke zytotoxische Effekte beobachtet. Dies ist beispielhaft für A3 und A17 in Abbildung 19 gezeigt. Von mit A21 behandelten Zellen liegt kein Bild vor. Die vormals flächigen Zellen kugelten sich jedoch auch hier ab und lösten sich teilweise vom Boden der Zellkulturschale.



**Abb. 19: Die Substanzen A3 und A17 zeigten einen starken zytotoxischen Effekt auf BHK-Zellen.** **A** BHK $\Delta$ F508 direkt vor der Behandlung. Die anschließende Behandlung erfolgte mit je 5  $\mu$ M A3 (**B**) und A17 (**C**). Bereits nach 3 h waren deutlich zytotoxische Effekte zu beobachten. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m.

Die Substanzen A3, A17 und A21 wurden aufgrund ihrer Toxizität daher von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

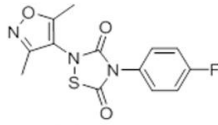
### 3.2.3 Acht Hsp90-Aha1 Inhibitoren wurden für den Iodidefflux-Assay ausgewählt

Nachdem der Alpha-Screen 30 Hsp90-Aha1-Inhibitoren identifizieren konnte, wurden durch den nachfolgenden Counterscreen und den Toxizitätstest die fünf Substanzen A1, A7, A3, A17 und A21 von weiteren Versuchen ausgeschlossen. Im Folgenden werden die acht Substanzen vorgestellt, die den Hsp90-Aha1 Komplex am effektivsten inhibierten und nachfolgend im Iodidefflux-Assay verwendet wurden (Abb. 20). Eine tabellarische Auflistung aller 25 Hsp90-Aha1 Inhibitoren sowie deren IUPAC-Namen sind im Anhang (Tab. 20) einsehbar. Fünf der acht im Iodidefflux-Assay eingesetzten Substanzen inhibierten die Lumineszenzentwicklung im Alpha-Screen um 98 - 100 %. Die Substanzen A2 und A11 zeigen beide ein Thiadiazolidin-3,5-Dion Grundgerüst. A10 und A12 sind durch einen Pyridin-2-yl substituierten und stickstoffhaltigen Heterozyklus gekennzeichnet. Der Inhibitor A28 weist ebenfalls einen stickstoffhaltigen Kernheterozyklus auf. Zwei weitere Substanzen gehörten zu der Gruppe von Inhibitoren, die das Lumineszenzsignal im Alpha-Screen um 96 bis 97,9 % hemmten. Bei A24 handelt es sich um ein Phenyl-Chlorobenzoat während A25 ein Pyridin-Gerüst mit einer Sulfonylgruppe aufweist. Die Substanz A16 war in der Lage, die Lumineszenzentwicklung um

90 - 91,9 % zu unterdrücken. Es handelt sich bei dieser Substanz um ein Hydrazon aus 4-Diethylaminophenylhydrazin und 1,2-Naphthochinon.

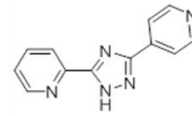
**98-100 %**

**A2**



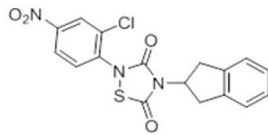
'2-(3,5-dimethylisoxazol-4-yl)-4-(4-fluorophenyl)-1,2,4-thiadiazolan-3,5-dion

**A10**



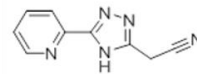
'2-[3-(4-pyridyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl]pyridin

**A11**



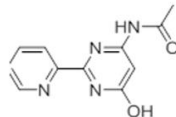
'2-(2-chloro-4-nitrophenyl)-4-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)-1,2,4-thiadiazolan-3,5-dion

**A12**



'2-[5-(2-pyridyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl]acetonitril

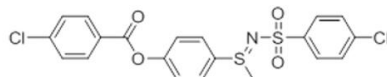
**A28**



'N1-[6-hydroxy-2-(2-pyridyl)pyrimidin-4-yl]acetamid

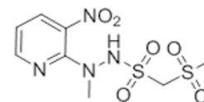
**96-97,9 %**

**A24**



'4-(1-([2-cyano-3-oxo-3-(2-thienyl)prop-1-enyl]imino)-1-methyl-1-oxo-lambda~6~-sulfanyl)phenyl-4-chlorobenzoat

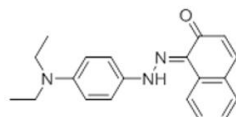
**A25**



'N'-methyl-N'-(3-nitro-2-pyridyl)methylsulfonyl)methan-sulfonohydrazid

**90-91,9 %**

**A16**



'1-[2-[4-(diethylamino)phenyl]hydrazono]-1,2-dihydronaphthalen-2-on

**Abb. 20: Acht Hsp90-Aha1 Inhibitoren wurden für das Iodidefflux-Assay ausgewählt.**

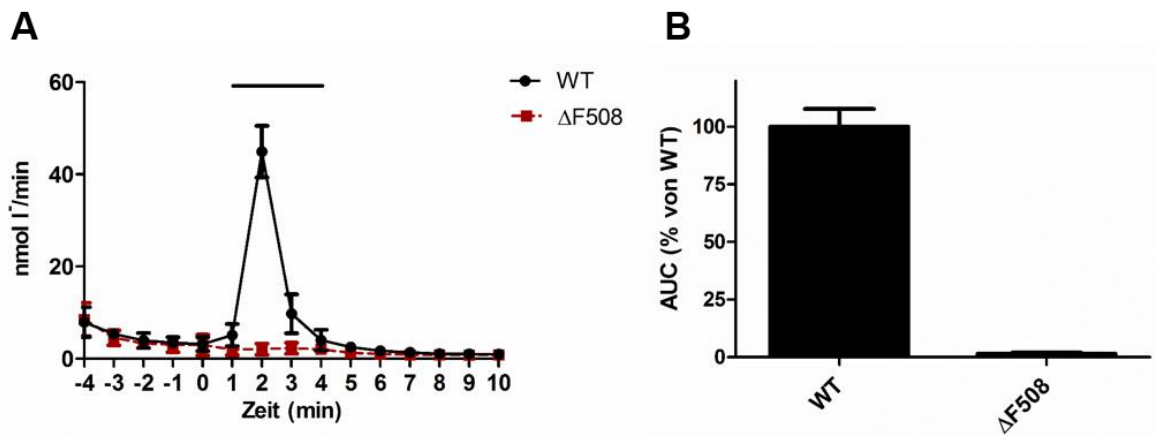
Die Substanzen A2, A10, A11, A12 und A28 inhibierten den Hsp90-Aha1 Komplex im Screen um 98 - 100 % während A24 und A25 den zu einer Inhibition von 96 - 97,9 % führten. Die Substanz A16 hemmte die Lumineszenzentwicklung um 90 - 91,9 %.

### **3.3 Zwei Hsp90-Aha1-Inhibitoren steigerten die Funktionalität des CFTR $\Delta$ F508 Proteins signifikant**

Da die Anzahl von CFTR-Kanälen an der apikalen Zellmembran mit dem Ausstrom von Chlorid-Ionen korreliert, kann der Ionenausstrom als Maß für die Funktionalität des CFTR-Kanals verwendet werden. Eine Möglichkeit diesen Ausstrom zu messen ist die Iodidefflux Technik, bei der Chlorid-Ionen im Zellinneren durch Iodid-Ionen ersetzt werden. Mithilfe dieses Versuchs ließ sich der Einfluss der Hsp90-Aha1 Inhibitoren auf den Ausstrom von Iodid-Ionen einschätzen. Stabil CFTR-exprimierende BHK-Zellen ( $\Delta$ F508) wurden dazu für 24 h mit Hsp90-Aha1 Inhibitoren (5  $\mu$ M) sowie Niedrigtemperatur (26°C) und dem CFTR-Korrektor VX-809 (5  $\mu$ M) als Positivkontrollen behandelt. Anschließend wurde der Iodidefflux, nach Stimulation des Kanals mit Genistein (50  $\mu$ M) und Forskolin (10  $\mu$ M), gemessen.

#### **3.3.1 Im Gegensatz zum CFTR WT zeigte das $\Delta$ F508-Protein eine kaum messbare Aktivität**

In einem ersten Versuch wurde das charakteristische Verhalten des Wildtyp- sowie des mutierten  $\Delta$ F508-Kanals untersucht. In Abbildung 21A ist der gemittelte Iodidefflux (nmol/min) über die Zeit des Assays für den WT und den  $\Delta$ F508-Kanal dargestellt. Beide CFTR-Kanäle zeigten in der anfänglichen Waschphase von Minute -4 bis Minute 0 nur einen geringen, residualen Ausstrom von Iodid-Ionen. Auf die nachfolgende Aktivierung der Kanäle mit Forskolin und Genistein von Minute 1 bis 4 reagierte jedoch nur der WT-Kanal mit einem schnellen, starken Ionenausstrom. Der maximale Iodidausstrom betrug beim WT ca. 45 ( $\pm$  5,6) nmol/min während es beim mutierten Kanal nur 2,3 ( $\pm$  1,2) nmol/min waren. Der maximale Peak ist beim WT bereits 1 min nach Beginn der Stimulation erreicht. Die vergleichende Auswertung der Kurven erfolgte über die Berechnung der *area under curve* (AUC) nach Abzug des residualen Iodid-Ausstoms vor der Stimulation und die Normierung der Daten auf den WT (Abb. 21B). Im Vergleich zum WT (100  $\pm$  7,72 %) erreichte die  $\Delta$ F508-Variante eine mittlere AUC von 1,45 % ( $\pm$  0,45).



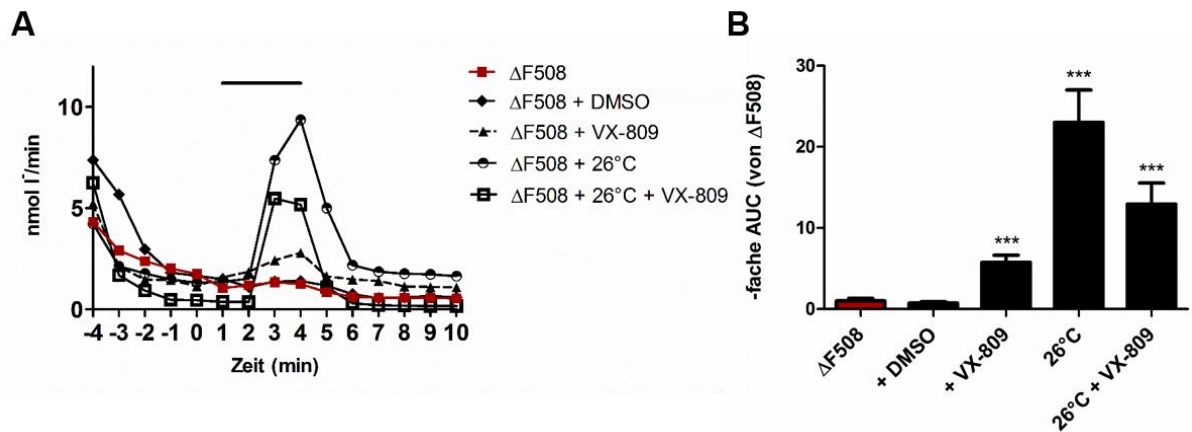
**Abb. 21: Forskolin und Genistein stimulierten den mutierten CFTR-Kanal nur geringfügig.**

**A** Der CFTR Wildtyp-Kanal (WT) reagierte auf die Aktivierung des Kanals mit einem starkem und raschen Ausstrom von Iodid-Ionen während der mutierte  $\Delta F508$ -Kanal ( $\Delta F508$ ) nur einen residualen Ausstrom zeigte. Der Stimulationszeitraum ist durch einen Balken über den Kurven markiert. **B** Die Auswertung der Fläche unter der Kurve (*area under curve*, AUC) bestätigte den gravierenden Aktivitätsunterschied. ( $n$  (WT) = 5;  $n$  ( $\Delta F508$ ) = 3). Abweichungen vom Mittelwert sind als Standardabweichung dargestellt.

### 3.3.2 VX-809 und geringe Temperaturen steigerten die Aktivität des $\Delta F508$ -Kanals

Das Aktivitätsverhalten des mutierten CFTR-Kanals wurde des Weiteren durch Inkubation der BHK $\Delta F508$ -Zellen mit zusätzlichen aktivitätssteigernden Behandlungen untersucht. Zum einen wurden die Zellen mit dem bislang effektivsten CFTR-Korrektor VX-809 (5  $\mu M$ ) und zum anderen mit Niedrigtemperatur (26°C) behandelt. Ebenso wurde eine Kombination aus Niedrigtemperatur und VX-809 auf die Aktivität des Kanals erprobt. Zum Vergleich wurden unbehandelte BHK $\Delta F508$ -Zellen verwendet sowie Zellen, die mit dem Lösungsmittel DMSO (0,05 %) inkubiert worden waren. In Abbildung 22A sind repräsentative Effluxkurven von Einzelmessungen dargestellt. Deutlich sichtbar ist, dass unbehandelte sowie mit DMSO behandelte BHK $\Delta F508$ -Zellen nur einen sehr geringen Iodidausstrom auf die Stimulation mit Genistein und Forskolin zeigten. Wurden die Zellen jedoch mit der Korrektorsubstanz VX-809 behandelt, reagierten die Zellen bereits mit einem verstärkten Ausstrom von Iodid-Ionen. Ein besonders starker Effekt war zu beobachten wenn die Zellen 20 h vor Durchführung des Assays bei 26°C inkubiert wurden. Eine kombinierte Behandlung der Zellen mit VX-809 und 26°C führte jedoch zu keiner weiteren Steigerung des Iodideffluxes, sondern zu einem etwas geringer ausgeprägten Effekt als die alleinige Inkubation bei 26°C. Die vergleichende Auswertung der AUC in Abbildung 22B bestätigte die Beobachtung anhand der Effluxkurven. Die Behandlung der Zellen mit VX-809 bewirkte einen fast 6-fachen ( $5,8 \pm 0,9$ ) Anstieg der AUC im Vergleich zu unbehandelten  $\Delta F508$ -Zellen ( $1,0 \pm 0,31$ ). Der Einfluss einer niedrigen Umgebungstemperatur (26°C) während des Wachstums auf die Aktivität des mutierten CFTR-Kanals erwies sich mit einer fast 25-fachen Steigerung der AUC als stärkster Stimulus der

Kanalfunktionalität ( $23,0 \pm 9,4$ ). Die Kombination von VX-809 und Niedrigtemperatur hingegen führte zu keiner weiteren Steigerung der AUC ( $12,9 \pm 5,5$ ). Die Effekte durch Behandlung mit VX-809, 26°C sowie 26°C + VX-809 waren mit  $p < 0,0001$  signifikant. Die Behandlung der Zellen mit dem Lösungsmittel DMSO, in dem die Korrektorsubstanzen gelöst waren, trug nachweislich nicht zu einer Steigerung des Iodideffluxes bei ( $0,73 \pm 0,17$ ).



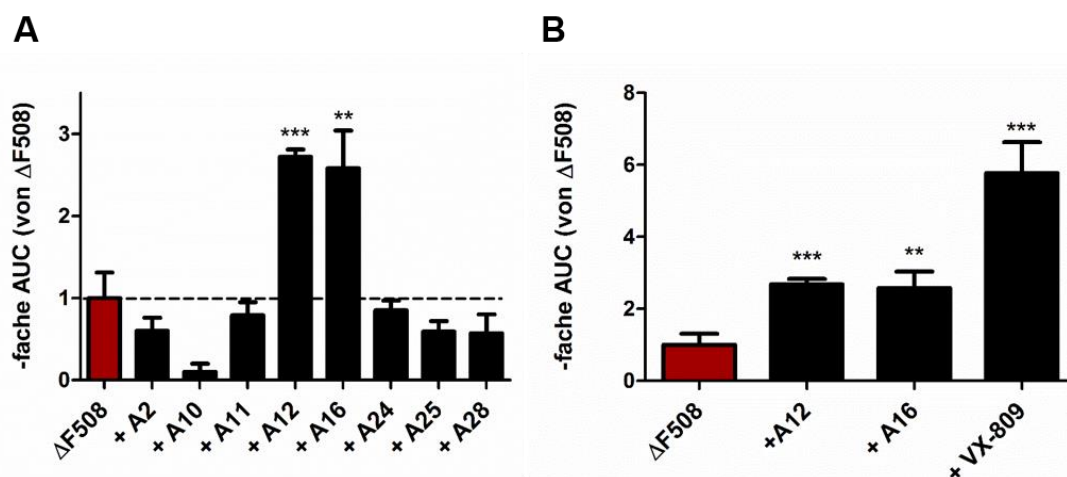
**Abb. 22: Die Behandlung von BHK $\Delta$ F508 mit VX-809 und Niedrigtemperatur ließen den Iodid-Ausstrom ansteigen.**

**A** Repräsentative Effluxkurven von unbehandelten  $\Delta$ F508-Zellen, sowie mit Zellen, die mit DMSO (0,05 %), VX-809 (5  $\mu$ M), 26°C sowie einer Kombination behandelt wurden. **B**. Der stärkste Anstieg der *area under curve* (AUC) ließ sich bei Behandlung mit 26°C beobachten. Jedoch auch die Kombination von VX-809 mit 26°C sowie eine Behandlung mit VX-809 alleine steigerten die AUC signifikant im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Abweichungen vom Mittelwert sind als Standardabweichung dargestellt.  $n$  ( $\Delta$ F508, 26°C, 26°C + VX-809) = 3;  $n$  (DMSO) = 6;  $n$  (VX-809) = 4. \*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 3.3.3 Die Hsp90-Aha1-Inhibitoren A12 und A16 steigerten die Aktivität des CFTR $\Delta$ F508 Proteins um das 2,5 fache

Da die ersten Versuche gezeigt hatten, dass sich die CFTR $\Delta$ F508 exprimierenden BHK-Zellen wie zu erwarten verhielten, wurden nun die acht ausgewählten Hsp90-Aha1 Inhibitoren im Iodidefflux-Assay getestet. Die Substanzen A2, A10, A11, A12, A16, A24, A25 und A28 wurden in einer Konzentration von 5  $\mu$ M bei einer Inkubationsdauer von 24 h eingesetzt. Als Kontrolle dienten unbehandelte BHK CFTR $\Delta$ F508-Zellen, da ein aktivitätssteigernder Effekt durch das Lösungsmittel DMSO bereits in den vorangegangenen Versuchen (s. Abb. 22) ausgeschlossen werden konnte. In Abbildung 23A ist die Auswertung der AUC (normiert auf unbehandelte Zellen) dargestellt. Überraschenderweise führte die Behandlung der Zellen mit den Substanzen A2, A10, A11, A24, A25 und A28 sogar zu einer weiteren Verringerung der Aktivität des CFTR $\Delta$ F508 Proteins. Bezogen auf die unbehandelten  $\Delta$ F508-Zellen erniedrigte sich die AUC bei Behandlung mit A2 auf das 0,6 fache ( $\pm 0,2$ ) und bei A10 sogar auf das 0,1 fache ( $\pm 0,1$ ). Bei Behandlung mit A11 und A24 reduzierte sich die AUC auf das 0,8 fache ( $\pm 0,2$ ) und 0,9 fache ( $\pm 0,1$ ) der Kontrolle. Eine Inkubation der Zellen mit A25 und A28

resultierte ebenfalls in einer Reduktion der AUC auf das 0,6 fache ( $\pm 0,1$ ) bzw. 0,6 fache ( $\pm 0,2$ ). Die Behandlung der Zellen mit verbliebenen zwei Hsp90-Aha1 Inhibitoren führte jedoch zu einer Aktivitätssteigerung des  $\Delta F508$ -Kanals. Es zeigten sich deutliche Effekte auf die AUC nach Behandlung der  $\Delta F508$ -Zellen mit A12 und A16. Die Inkubation der Zellen mit A12 führte zu einem Aktivitätsanstieg auf das 2,7-fache ( $\pm 0,1$ ) der Kontrollmessung. Ein ähnlich starker Effekt ließ sich auch bei Behandlung mit A16 nachweisen. Die AUC betrug hier das 2,6-fache ( $\pm 0,5$ ) der AUC der Kontrolle. Die Effekte durch Behandlung der Zellen mit A12 und A16 waren mit  $p < 0,0001$  bzw.  $p < 0,001$  signifikant. In Abbildung 23B sind die beiden aktivitätssteigernden Hsp90-Aha1 Inhibitoren A12 und A16 noch einmal im Vergleich zum bislang bekanntesten und effektivsten Korrektor VX-809 gezeigt. A12 und A16 zeigen eine etwa 50 %ige Wirksamkeit im Vergleich zum CFTR-Korrektor VX-809.



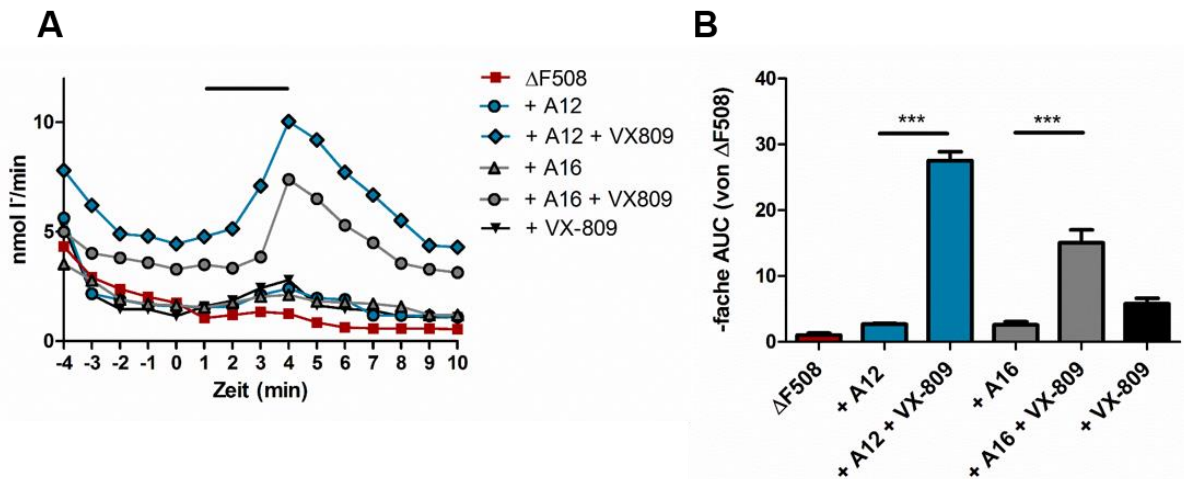
**Abb. 23: Die Substanzen A12 und A16 steigerten den Iodidefflux um das 2,5-fache.**

**A** BHK $\Delta F508$  wurden für 24 h mit Hsp90-Aha1 Inhibitoren (5  $\mu M$ ) behandelt. Nur eine Behandlung der BHK $\Delta F508$  Zellen mit den Substanzen A12 und A16 führte zu einem signifikanten Anstieg der AUC im Vergleich zu unbehandelten  $\Delta F508$ -Zellen. Die übrigen Substanzen erniedrigten die AUC im Vergleich zur Kontrolle sogar.  $n = 3$ . **B** Im Detail wird deutlich, dass A12 und A16 eine ca. 50 %ige Effektivität im Vergleich zur Korrektorsubstanz VX-809 aufwiesen. Abweichungen vom Mittelwert sind als Standardabweichung dargestellt. \*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 3.3.4 VX-809 und A12 bzw. A16 wirkten synergistisch auf den CFTR $\Delta F508$

Aufgrund der vielversprechenden Auswirkungen der Substanzen A12, A16 und VX-809 auf die Kanalaktivität des mutierten CFTR, stellte sich die Frage, ob sich durch Kombination dieser Substanzen miteinander additive oder synergistische Effekte erzielen ließen. Daher wurden die BHK $\Delta F508$ -Zellen mit je 5  $\mu M$  VX-809 + A12 oder 5  $\mu M$  VX-809 + A16 für 24 h behandelt. In Abbildung 24A sind exemplarische Effluxkurven der so behandelten Zellen gezeigt. Auffällig war, dass die Zellen nach der kombinierten Behandlung deutlich später auf die Stimulation mit Forskolin und Genistein reagierten als die mit VX-809 behandelten Zellen. Zu beobachten war jedoch, dass der Effekt, der durch Kombination von VX-809 + A12 bzw. VX-809 + A16 erzielt wurde, um ein Vielfaches größer war als beispielsweise der Effekt durch alleinige Behandlung mit VX-809, A12 oder A16. Dieser subjektive Eindruck wurde durch Auswertung der AUC

bestätigt (Abb. 24B). Im Vergleich zu unbehandelten BHK $\Delta$ F508-Zellen steigerte sich die AUC bei Behandlung mit A12 + VX-809 um fast das 30-fache ( $27,5 \pm 1,4$ ). Ähnliches galt für die Kombination aus VX-809 und A16. Diese Behandlung ließ die AUC um das 15-fache ( $\pm 2,0$ ) im Vergleich zur Kontrolle ansteigen. Damit übertrafen die Ergebnisse der kombinierten Behandlung mit  $p < 0,0001$  signifikant die Effekte durch die alleinige Anwendung der Substanzen A12 ( $2,7 \pm 0,2$ ), A16 ( $2,6 \pm 0,5$ ) und VX-809 ( $5,8 \pm 0,9$ ). Da der Gesamteffekt in der Kombination der Substanzen deutlich höher lag als die Summe der Einzeleffekte, muss hier ein synergistischer Wirkungsmechanismus zugrundeliegen.



**Abb. 24: VX-809 und A12 bzw. A16 wirkten synergistisch auf den CFTR $\Delta$ F508.**

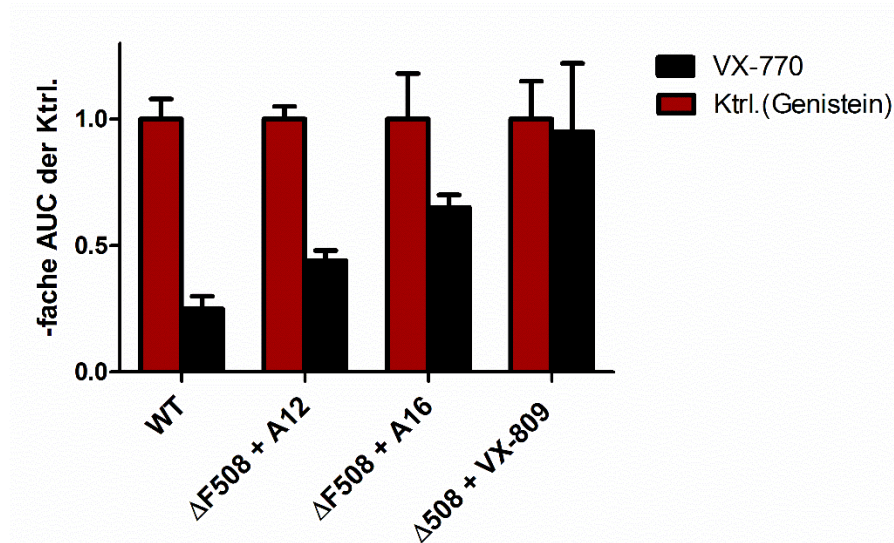
**A** Exemplarische Effluxkurven von unbehandelten BHK $\Delta$ F508 Zellen (rot) sowie von Zellen, die mit 5  $\mu$ M VX-809 (schwarz), A12 (türkis), A16 (grau) oder einer Kombination aus diesen Substanzen behandelt wurden. **B** Die AUC stieg bei kombinierter Behandlung (VX-809 + A12 bzw. VX-809 + A16) stärker an als bei Behandlung mit den Einzelsubstanzen.  $n = 3$ . \*\*\*  $p < 0,0001$ .

### 3.3.5 Der Potenziator VX-770 war nicht wirksamer als Genistein

Während der Iodidefflux-Assays wurde eine Kombination aus Forskolin und Genistein zur Aktivierung des CFTR-Kanals eingesetzt. Als bislang wirksamster Potenziator des CFTR-Kanals gilt die Substanz VX-770. In den letzten Jahren vermuteten zahlreiche Gruppen bereits, dass eine effektive Behandlung der  $\Delta$ F508-Mutation sowohl eine Korrektorsubstanz als auch einen Potenziator involvieren muss. Daher sollte in einem Folgeexperiment untersucht werden, ob sich der gesteigerte Ionenausstrom durch Behandlung von Zellen mit VX-809, A12 + VX-809 und A16 + VX-809 durch eine akute Gabe VX-770 (20  $\mu$ M) zusammen mit Forskolin weiter steigern ließe. Als Kontrolle dienten Vergleichsmessungen mit Forskolin und Genistein. Abbildung 25 verdeutlicht, dass VX-770 einen deutlich schwächeren Effekt erzielte als Genistein. Dies wurde besonders bei der Behandlung des WT's deutlich. Im Vergleich zur Kontrolle erreichten die mit VX-770 und Forskolin aktivierten CFTR-Kanäle nur ca. ein Viertel der AUC der Kontrolle ( $0,25 \pm 0,05$ ). Bei den mit der Substanz A12 behandelten Zellen reduzierte sich die AUC auf etwa die Hälfte der Kontrolle nach akuter Gabe von VX-770 ( $0,44$



$\pm 0,04$ ). Im Falle der mit A16 behandelten Zellen wurde durch den Zusatz von VX-770 ca. 65 % AUC der Kontrolle erreicht. Als fast ebenso effektiv wie Genistein erwies sich VX-770 nur bei den mit VX-809 behandelten Zellen ( $0,95 \pm 0,27$ ).

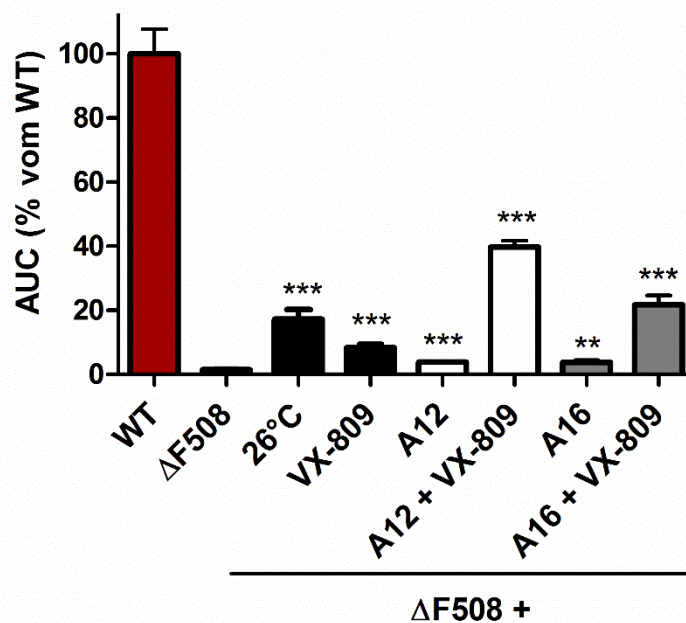


**Abb. 25: Der Potenziator Genistein weist eine höhere Wirksamkeit auf als VX-770.**

Der Vergleich der beiden Potenziatoren Genistein (rot) und VX-770 (schwarz) zeigte deutlich, dass Genistein sowohl im WT als auch in BHK $\Delta F508$ -Zellen, die mit A12, A16 und VX-809 behandelt wurden, wirksamer war. Abweichungen vom Mittelwert sind als Standardabweichung dargestellt.  $n = 3$ .

### 3.3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Iodidefflux-Assay

Die wichtigsten Ergebnisse aus dem Iodidefflux-Assay wurden noch einmal in Bezug auf den WT ausgewertet und zusammengefasst (Abb. 26). Im Vergleich zum CFTR WT ( $100 \pm 7,7 \%$ ) erreichte die  $\Delta F508$ -Variante eine AUC von  $1,5 \%$  ( $\pm 0,5$ ), d.h. der mutierte Kanal zeigte nur eine äußerst geringe Kanalaktivität. Die Behandlung von CFTR $\Delta F508$  mit Niedrigtemperatur ( $26^\circ\text{C}$ ) erwies sich als sehr effektiv und steigerte die AUC auf  $33,3 \%$  ( $\pm 5,8$ ) des WTS. Der bislang effektivste CFTR-Korrektor, VX-809, steigerte die Funktionalität der mutierten Variante auf bis zu  $8,4 \%$  ( $\pm 1,3$ ) des WTs. Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten Hsp90-Aha1 Inhibitor Screen erwiesen sich die Substanzen A12 und A16 als diejenigen mit dem größten Effekt auf die Kanalaktivität des CFTR $\Delta F508$ . Die Behandlung mit A12 führte zu einem Anstieg der AUC auf fast  $4 \%$  ( $3,9 \pm 0,1 \%$ ) des WT-Niveaus. Als fast ebenso effektiv erwies sich der Inhibitor A16, durch dessen Behandlung sich die Funktionalität des Kanals auf  $3,7 \%$  ( $\pm 0,6$ ) steigern ließ. Eine kombinierte Behandlung der  $\Delta F508$  exprimierenden Zellen mit A12 und VX-809 führte zu einer deutlichen Steigerung der AUC auf fast  $40 \%$  ( $39,8 \pm 2,0 \%$ ) bezogen auf den WT. Der Effekt durch Behandlung der Zellen mit A16 und VX-809 war mit knapp  $20 \%$  ( $22,1 \pm 3,3 \%$ ) etwa halb so stark wie die Kombination aus A12 und VX-809.



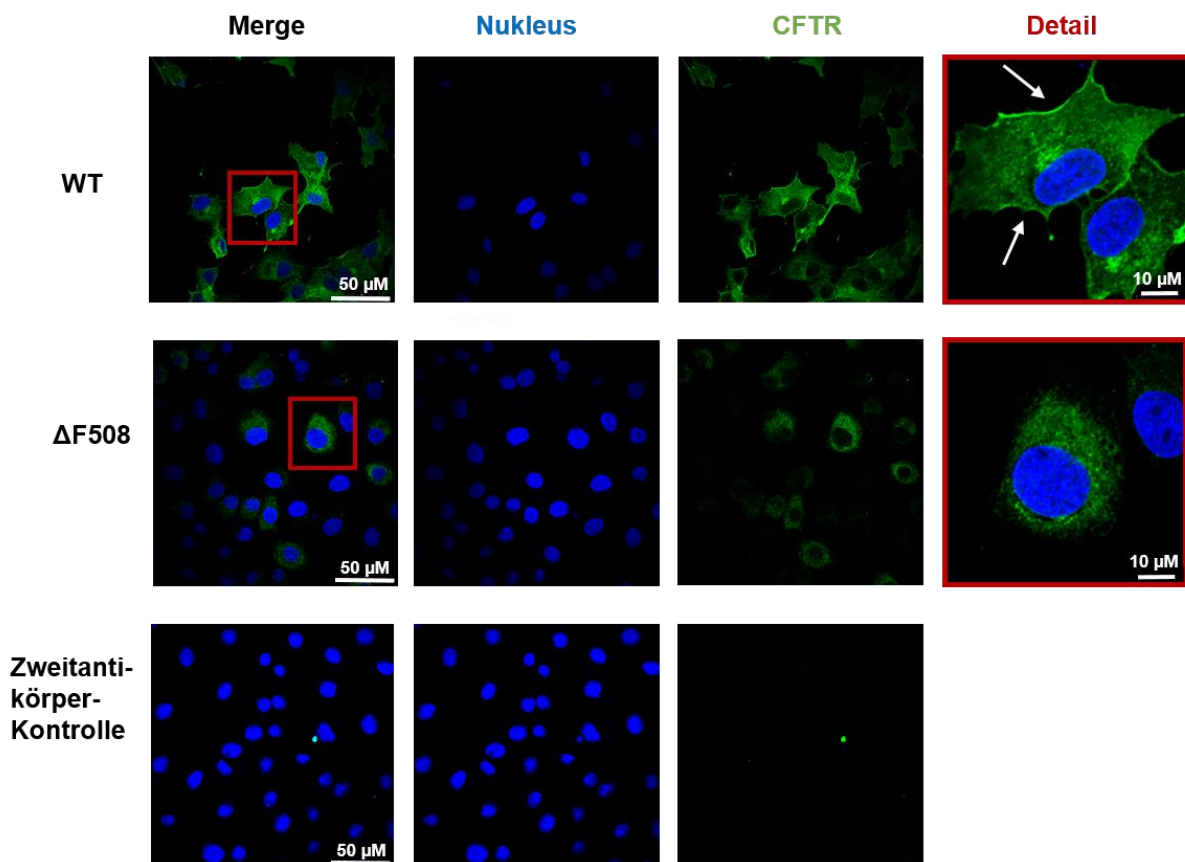
**Abb. 26:** Durch Behandlung mit A12 + VX-809 erreichte  $\Delta F508$  fast 40 % der Aktivität des Wildtyps.

Eine Behandlung von BHK $\Delta F508$ -Zellen mit Niedrigtemperatur (26°C) und den Substanzen VX-809, A12, A16 sowie einer Kombination aus diesen, führte zu einer Aktivitätssteigerung des mutierten Kanals. Der Effekt war mit fast 40 % am stärksten bei kombinierter Behandlung der Zellen mit A12 und VX-809. Abweichungen vom Mittelwert sind als Standardabweichung dargestellt. n = 3. \*\* p < 0,001, \*\*\* p < 0,0001.

### 3.4 Expressionsanalyse von CFTR nach Behandlung von $\Delta F508$ mit verschiedenen Korrektorsubstanzen

Für die Analyse der Expression wurden CFTR WT und  $\Delta F508$  exprimierende BHK-Zellen ausgesät, bei einer Konfluenz von ca. 70 % fixiert und mit einem CFTR-Antikörper (570) inkubiert. Die Färbung erfolgte durch einen Cy2-gekoppelten HRP-konjugierten Zweitantikörper. Zur besseren Übersicht wurde der Zellkern mit DAPI gefärbt. Die Färbungen wurden nur einmalig durchgeführt, da es sich hier um eine qualitative Einschätzung der CFTR-Expression handelt und keine quantitative Erfassung stattfindet. Für jede Versuchsbedingung wurden dabei mehrere Aufnahmen gemacht. Um die Übersichtlichkeit zu gewährleisten, wird in den folgenden Abbildungen nur jeweils eine Aufnahme als Übersicht sowie im Detail gezeigt. Weitere Abbildungen der behandelten Zellen sind im Anhang gezeigt (s. Abb. 31-33, S. 125-127). Auffällig war, dass sowohl in den BHK CFTR WT als auch  $\Delta F508$ -Zellen das Expressionslevel von CFTR zwischen einzelnen Zellen sehr unterschiedlich ausfiel. Dies ist anhand der verschiedenen Übersichtsbilder (s. Anhang) sowie auch innerhalb der Einzelbilder gut zu erkennen.

In Abbildung 27 ist das charakteristische Expressionsmuster des CFTR-Proteins im WT sowie in der  $\Delta F508$ -Mutante dargestellt. Der WT zeigte eine gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilte Lokalisation von CFTR (grüne Färbung). Eine besonders starke Färbung war vor allem perinukleär und apikal in der äußeren Zellmembran vorhanden. Die Zellumrisse waren daher gut im WT zu erkennen. Im Gegensatz dazu waren in der  $\Delta F508$ -Variante nur eine perinukleäre CFTR-Lokalisation und damit keine Zellumrisse zu beobachten. Für die Zweitantikörperkontrolle wurden  $\Delta F508$ -Zellen nur mit dem Cy2-HRP-konjugierten Zweitantikörper behandelt. Wie aus Abbildung 27 ersichtlich wird, wies der verwendete Zweitantikörper nur eine äußerst geringe Eigenfluoreszenz auf. Damit wird die Validität der Ergebnisse unterstützt.

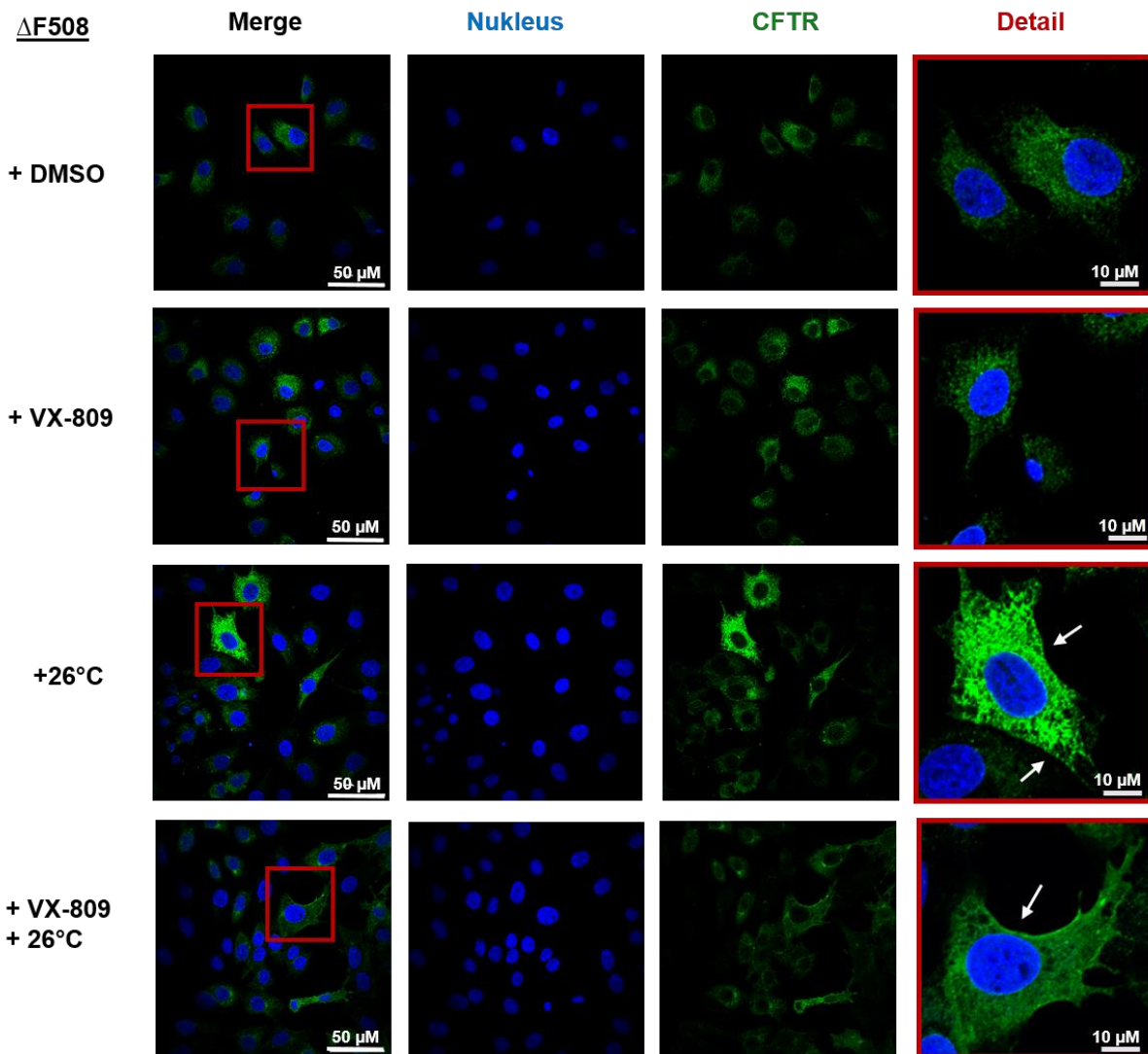


**Abb. 27: CFTR ist im Wildtyp (WT) jedoch nicht in  $\Delta F508$  exprimierenden BHK-Zellen in der apikalen Zellmembran lokalisiert.**

BHK-Zellen wurden fixiert, mit dem CFTR-Antikörper 570 inkubiert und mit einem Cy2-konjugierten HRP-Zweitantikörper gefärbt (grün). Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) sichtbar gemacht. Pfeile deuten auf membranständiges CFTR hin. Gezeigt sind Übersichtsbilder sowie jeweils eine Detailaufnahme (rot umrandet). Im WT zeigte sich insbesondere eine CFTR-Anreicherung an der apikalen Zellmembran während in der  $\Delta F508$ -Variante nur eine perinukleäre Expression vorlag. Die Zweitantikörperkontrolle auf  $\Delta F508$ -Zellen wies nur ein geringes Hintergrundsignal auf. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu\text{m}$  (Übersicht) bzw. 10  $\mu\text{m}$  (Detail).  $n = 1$ .

### 3.4.1 Behandlung mit VX-809 in Kombination mit 26°C führte zu einer Reifung der $\Delta F508$ -Variante

Ähnlich wie im Iodidefflux-Assay wurden BHK- $\Delta F508$  Zellen zuerst mit bereits bekannten „Rescue-Mechanismen“ behandelt, die als Positivkontrollen fungierten (Abb. 28). Die Zellen wurden dazu für 24 h mit 10  $\mu\text{m}$  VX-809, Niedrigtemperatur (26°C) oder der Kombination behandelt. Als Negativkontrolle wurden Zellen nur mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %) inkubiert. Die Negativkontrolle wies nur eine perinukleäre CFTR-Expression auf, wie bereits in Kap. 3.4.1 für unbehandelte BHK $\Delta F508$ -Zellen gezeigt. Die mit VX-809 behandelten Zellen offenbarten nur geringe Unterschiede im Expressionsmuster im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Jedoch schien sich CFTR-Protein in erste Zellausläufer ausgebreitet zu haben. Ein deutlich stärkerer Effekt zeigte sich nach Inkubation der Zellen bei 26°C. Die CFTR-Lokalisation beschränkte sich in einigen Zellen nun nicht mehr nur auf den kernnahen Raum, sondern durchzog das gesamte Zytoplasma bis in die Ausläufer dieser Zellen. CFTR gelangte in einigen Zellen offensichtlich auch an die apikale Zellmembran. Das Expressionsmuster näherte sich bei einigen Zellen noch stärker dem des WTs an, wenn die Zellen mit VX-809 behandelt und zusätzlich bei 26°C inkubiert wurden. CFTR war in diesem Fall über die gesamte Zellfläche lokalisiert. Eine Anreicherung ist ebenfalls eindeutig an der Plasmamembran zu erkennen. Wie bereits angesprochen, reagiert jedoch scheinbar nur ein Teil der Zellen auf die Behandlung mit 26°C bzw. 26°C + VX-809. Andere Zellen innerhalb derselben Schale wiesen weiterhin das  $\Delta F508$ -typisch perinukleäre CFTR-Lokalisationsmuster auf.



**Abb. 28: Apikale Lokalisation von  $\Delta$ F508 nach Behandlung mit VX-809 und 26°C.**

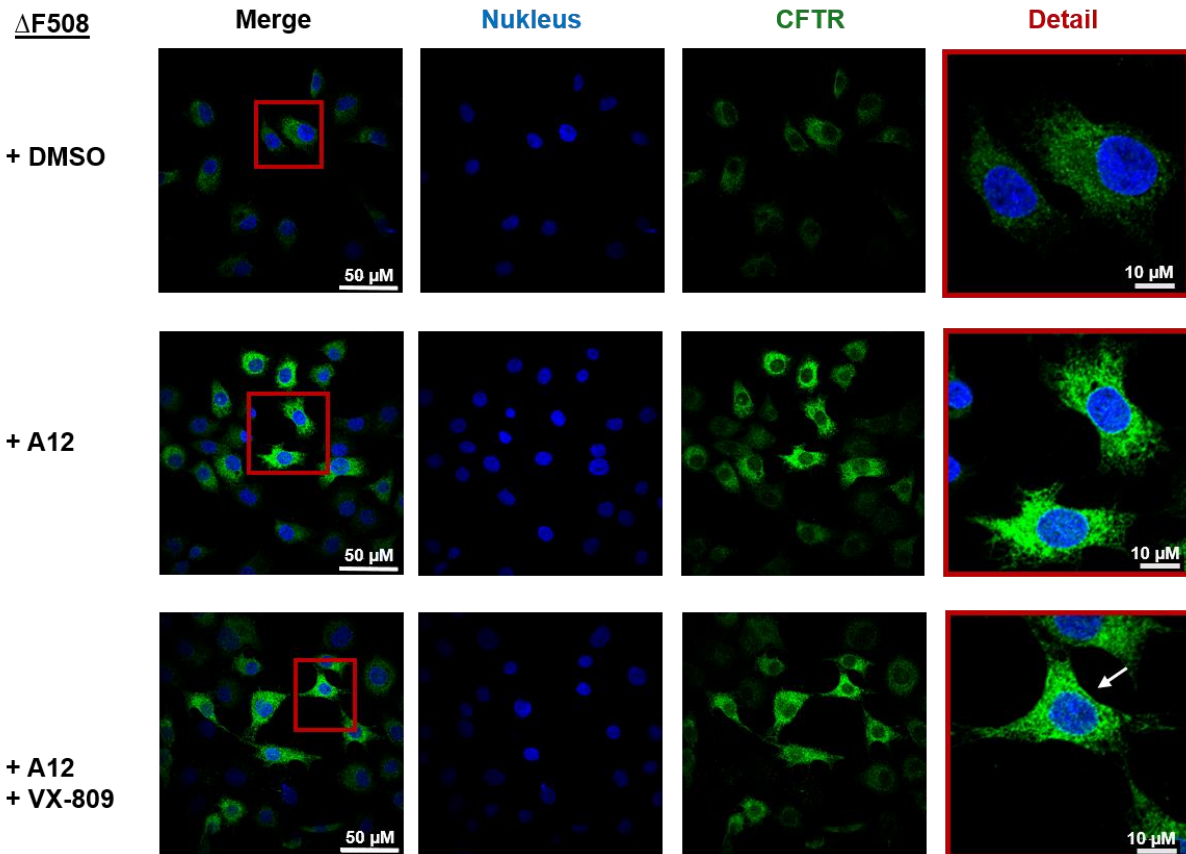
BHK $\Delta$ F508-Zellen wurden ausgesät und entweder mit VX-809 (10  $\mu$ M), 26°C oder einer Kombination für 24 h inkubiert. Eine Kontrolle wurde nur mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %) behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit dem CFTR-Antikörper 570 inkubiert und mit einem Cy2-konjugierten HRP-Zweitantikörper gefärbt (grün). Pfeile deuten auf membranständiges CFTR hin. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) sichtbar gemacht. Gezeigt sind Übersichtsbilder sowie jeweils eine Detailaufnahme (rot umrahmt). Insbesondere die kombinierte Behandlung mit VX-809 und Inkubation bei 26°C resultierte in einer membranständigen CFTR-Lokalisation. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ m (Übersicht) bzw. 10  $\mu$ m (Detail). n = 1.

### 3.4.2 Die kombinierte Behandlung von $\Delta$ F508-Zellen mit A12 + VX-809 ließ mutiertes CFTR verstärkt reifen.

Im Iodidefflux-Assay hatte sich der Hsp90-Aha1 Inhibitor A12 als potenter Verstärker der  $\Delta$ F508-Funktionalität erwiesen. Dies galt insbesondere dann, wenn er mit der Korrektorsubstanz VX-809 kombiniert wurde. Die Immunfluoreszenzanalyse bestätigte, dass die Behandlung mit A12 (10  $\mu$ M) eine deutlich positive Auswirkung auf die Expression des mutierten CFTR-Proteins ausübte (Abb. 29). Im Vergleich zu mit DMSO behandelten Zellen, lassen sich nun unter anderem Zellen beobachten, die CFTR nicht mehr nur rund um den Nukleus, sondern auch verstärkt in ihren Ausläufern exprimierten. Diese Tendenz verstärkte



sich, wenn A12 zusammen mit dem VX-809 eingesetzt wurde. Deutlich sichtbar waren nun eine apikale Lokalisation des mutierten CFTR-Proteins sowie eine gleichmäßige, flächige Expression über die gesamte Zellfläche hinweg. Auch hier wird deutlich, dass die Behandlung offensichtlich nicht für alle Zellen gleich effektiv ist. Innerhalb der behandelten Zellpopulation zeigen viele Zellen nach wie vor ein perinukleäres CFTR-Verteilungsmuster.



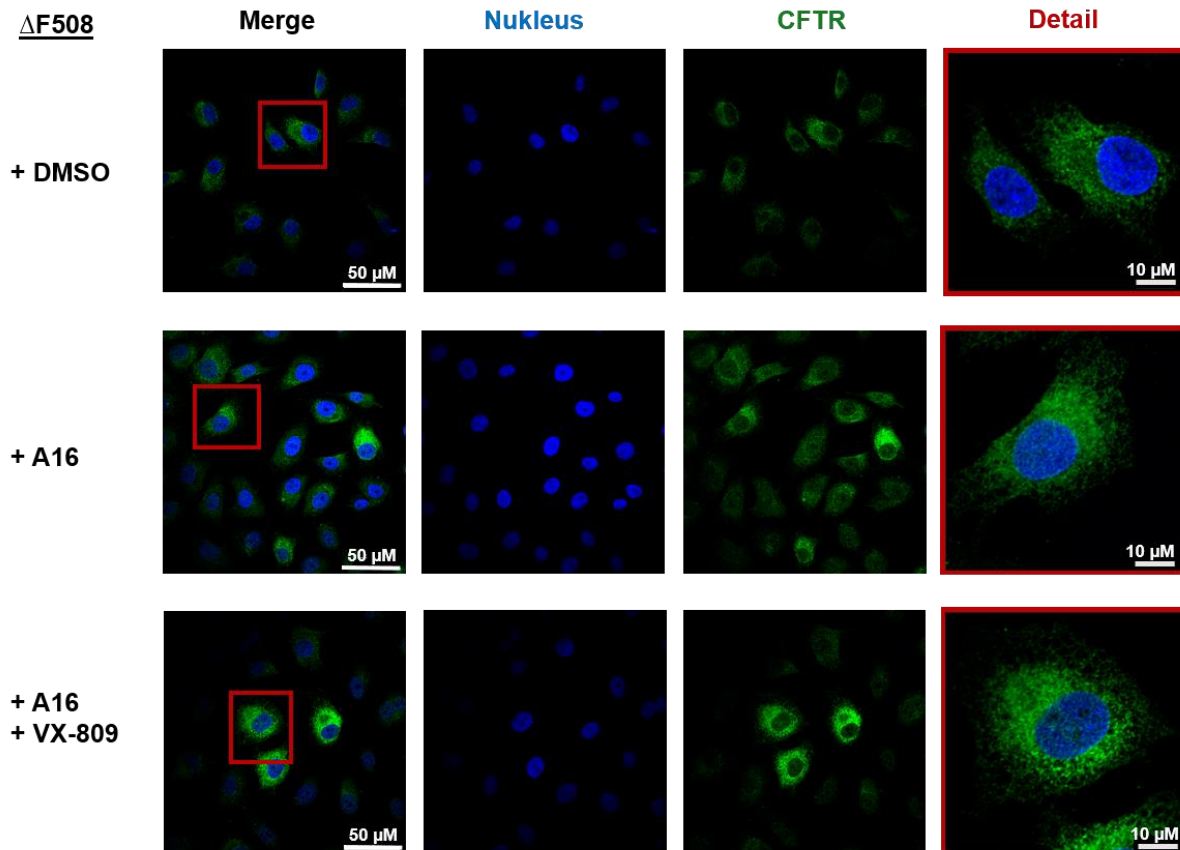
**Abb. 29: Eine Behandlung von BHK $\Delta$ F508 Zellen mit A12 + VX-809 führte zu einer apikalen  $\Delta$ F508-Lokalisation.**

BHK $\Delta$ F508-Zellen wurden ausgesät und entweder mit A12 (10  $\mu\text{M}$ ) oder A12 + VX-809 (je 10  $\mu\text{M}$ ) für 24 h inkubiert. Eine Kontrolle wurde nur mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %) behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit dem CFTR-Antikörper 570 inkubiert und mit einem Cy2-konjugierten HRP-Zweitantikörper gefärbt (grün). Pfeile deuten auf membranständiges CFTR hin. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) sichtbar gemacht. Gezeigt sind Übersichtsbilder sowie jeweils eine Detailaufnahme (rot umrahmt). Insbesondere die kombinierte Behandlung von A12 mit VX-809 resultierte in einer apikalen CFTR-Lokalisation. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu\text{M}$  (Übersicht) bzw. 10  $\mu\text{M}$  (Detail). n = 1.

### 3.4.3 Der Hsp90-Aha1 Inhibitor A16 beeinflusste kaum die Reifung von CFTR $\Delta$ F508

Der im Funktionsassay, nach A12, erfolgreichste Hsp90-Aha1-Inhibitor war A16. Diese Substanz wurde nun ebenfalls für die Behandlung von BHK CFTR $\Delta$ F508-Zellen in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Zusätzlich wurden die Zellen auch in diesem Fall mit einer Kombination aus je 10  $\mu\text{M}$  A16 und VX-809 behandelt (Abb. 30). Im Gegensatz zu A12 schien die Behandlung mit A16 keinen ausgeprägten Effekt auf die Expression des mutierten

CFTR-Proteins zu haben. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erschien die CFTR-Expression in mit A16 behandelten Zellen weiterhin perinukleär. Eine flächigere oder sogar apikale Lokalisation konnte in keiner Zelle beobachtet werden. Ein ähnliches Bild zeichnete sich bei Behandlung mit A16 und VX-809 zusammen ab. Auch hier blieb die CFTR-Lokalisation auf den kernnahen Raum beschränkt.



**Abb. 30: A16 und A16 + VX-809 verstärken nicht die Reifung des CFTR $\Delta$ F508.**

BHK-Zellen wurden ausgesät und entweder mit A16 (10  $\mu$ M) oder A16 + VX-809 (je 10  $\mu$ M) für 24 h inkubiert. Eine Kontrolle wurde nur mit dem Lösungsmittel DMSO (0,1 %) behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert, mit dem CFTR-Antikörper 570 inkubiert und mit einem Cy2-konjugierten HRP-Zweitantikörper gefärbt (grün). Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) sichtbar gemacht. Gezeigt sind Übersichtsbilder sowie jeweils eine Detailaufnahme (rot umrahmt). Die Behandlung mit A16 oder A16 + VX-809 führte zu keinem ausgeprägten Effekt auf die CFTR-Expression und -Lokalisation. Der Maßstabsbalken entspricht 50  $\mu$ M (Übersicht) bzw. 10  $\mu$ m (Detail). n = 1.

## 4 Diskussion

Studien konnten in der Vergangenheit zeigen, dass die Spezifität von Hsp90 für verschiedene Klientenproteine, zu einem großen Teil von seinen Kochaperonen mitbestimmt wird (Riggs et al, 2004). Inhibitorscreens, die daher auf die Interaktion von Hsp90 und spezifischen Kochchaperonen abzielen, könnten in Zukunft zur Entwicklung spezifischer und risikoarmer Behandlungen für verschiedene Krankheiten beitragen. Solche Screens identifizierten bislang erfolgreich Inhibitoren der Hsp90-Hop (TPRA Domäne) Interaktion (Yi et al, 2009) sowie des Hsp90-Cdc37 Komplexes (Zhang et al, 2009b), die von Bedeutung für die Entwicklung neuer Krebstherapien sein könnten.

Im Falle der Proteinfaltungskrankheit CF wiesen Studien dem Hsp90-Kochaperon Aha1 eine zentrale Bedeutung bei der Degradation des mutierten CFTR $\Delta$ F508 zu (Koulov et al, 2010; Wang et al, 2006). Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung spezifischer Inhibitoren des Hsp90-Aha1 Komplexes mithilfe einer Substanzbibliothek, die verschiedene chemische Molekülklassen repräsentiert. Anschließend soll die Fähigkeit derartiger Substanzen getestet werden, den Kanal in CFTR  $\Delta$ F508 exprimierenden Zellen reifen zu lassen und damit den transmembranen Chloridstrom wiederherzustellen. Dieser Ansatz erscheint vielversprechend, da die  $\Delta$ F508-Mutation die Chloridleitfähigkeit des Kanals nicht vollständig zum Erliegen bringt (Lukacs et al, 1993; Cheng et al, 1990; Welsh & Smith, 1993). Die Identifikation solcher Inhibitoren könnte daher die Basis für die Entwicklung neuartiger spezifischer Medikamente für die Behandlung von CF-Patienten darstellen.

Im Folgenden werden die molekulare Basis des Inhibitorscreens und die Vorgehensweise sowie die Ergebnisse des Screens kritisch beleuchtet. Des Weiteren wird ein Ausblick auf die Zukunft dieser Inhibitormoleküle in der CF-Therapie gegeben.

### 4.1 Interaktion von Aha1 und Hsp90

Vor Beginn des Inhibitorscreens wurde die Interaktion von rekombinant aufgereinigtem, humanem Hsp90 und Aha1 geprüft. Hsp90 agiert als Teil eines Multichaperonkomplexes zusammen mit Hsp70 und Hsp40 im Zytosol von Eukaryoten und spielt bei der Aktivierung verschiedener Substratproteine eine zentrale Rolle (Pratt & Toft, 2003). Mithilfe verschiedener biochemischer Methoden wurde das Kochaperon Aha1 als Hsp90-Interaktionspartner und Stimulator der endogenen Hsp90-ATPase Aktivität identifiziert. Der Nachweis erfolgte sowohl für *Saccharomyces cerevisiae* (yHsp90, yAha1) als auch für die entsprechenden humanen Proteinhomologe (Panaretou et al, 2002; Lotz et al, 2003; Tripathi & Obermann, Wolfgang M J, 2013). Der Hsp90-Aha1 Komplex scheint für die optimale Aktivierung von Klientenproteinen bedeutend zu sein (Harst et al, 2005; Holmes et al, 2008; Panaretou et al, 2002). Die



Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) des Hsp90-Aha1 Komplexes liegt bei ca. 0,6  $\mu\text{M}$  (Koulov et al, 2010; Meyer, 2004).

Die Interaktion von humanem Aha1 und Hsp90 wurde in dieser Arbeit mittels der Gelfiltration bestätigt. Da für die Durchführung des Inhibitorscreenings mithilfe der Alpha-Technologie His<sub>6</sub>-Hsp90 mit GST-Aha1 kombiniert wurde, wurde auch die Interaktion dieser Kombination mittels der Gelfiltration gezeigt. Das Anhängen großer Protein-Tags, wie des GST, kann in einigen Fällen zu einer Behinderung von Proteininteraktionen führen. Die Kombination von GST-Aha1 und His<sub>6</sub>-Hsp90 führt dabei zu einem starken Lumineszenzsignal, das in der Kontrolle durch Zugabe von NaCl um mehr als 99 % inhibiert wurde. Damit wurde nachgewiesen, dass die Interaktion zwischen His<sub>6</sub>-Hsp90 und Aha1 nicht negativ durch einen zusätzlichen GST-Tag am Aha1-Protein beeinflusst wird und für das Inhibitorscreening mittels der Alpha-Technologie geeignet ist.

## 4.2 Identifikation von 28 Hsp90-Aha1 Inhibitoren

Das im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Inhibitorscreening wurde auf Basis der Alpha-Technologie durchgeführt. Da die Interaktion von Hsp90 und Aha1 zur Entwicklung eines starken Lumineszenzsignals führt, war bei dem Einsatz von wirksamen Inhibitoren des Komplexes eine Abschwächung oder sogar ein Ausbleiben des Signals zu erwarten. Auf diese Weise wurden 14.400 Komponenten einer Substanzbibliothek gegen den Hsp90-Aha Komplex getestet. Die Substanzen wurden dazu mit der in Hochdurchsatzscreenings üblichen Startkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt (van Goor et al, 2006; Pedemonte et al, 2005). 30 dieser Substanzen wurden als Inhibitoren identifiziert, da sie zu einem Abfall des Signals um 90 % oder mehr führen. Zur Validierung von Inhibitorsubstanzen von Proteinkomplexen ist es bei solchen Screenings üblich, ein Counterscreening durchzuführen, in dem falsch-positive Hits frühzeitig identifiziert werden (Mackie & Roman, 2011; Wagstaff et al, 2011; Yi et al, 2009). In dieser Arbeit wurde dazu ein GST-His<sub>6</sub> Konstrukt eingesetzt, das sowohl an die mit Glutathion beschichteten als auch die mit Nickel-beschichteten Beads bindet. Zwei der 30 identifizierten Hsp90-Aha1 Inhibitoren (A1, A7) reduzierten die Lumineszenz jedoch auch im Counterscreening und wurden daher von nachfolgenden Versuchen ausgeschlossen. Es ist möglich, dass diese Substanzen die Erzeugung des Lumineszenzsignals stören (Fluoreszenz-Quencher oder Singulett-Sauerstoff-Quencher), oder aber die Bindung der Proteine an die Beads behindern. Dies ist z.B. bei Imidazol-ähnlichen Strukturen der Fall, da diese mit dem His<sub>6</sub>-Protein um die Bindung an die Nickel-Chelat Beads konkurrieren. Des Weiteren absorbieren einige Substanzen auch bei der Anregungswellenlänge der Donorbeads (680 nm) und stören auf diese Weise die Signalentwicklung. Der Counterscreen alleine kann dabei nicht alle unspezifisch wirksamen Substanzen identifizieren, stellt jedoch eine wirksame Methode dar, die Zahl der Hitsubstanzen nach dem Primärscreen einzugrenzen.

Eine Frage, die das Alpha-Assay nicht klären kann, ist, auf welche Art und Weise die identifizierten Hits den Hsp90-Aha1 Komplex inhibieren. Die Substanzen könnten direkt an Hsp90 oder Aha1 binden und so die jeweilige/n Bindestelle/n für den Interaktionspartner blockieren. Um diese Fragestellung zu untersuchen, sind daher weitergehende Experimente nötig. Eine dafür geeignete Methode stellt die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) dar, bei der thermodynamische Parameter biochemischer Bindungsprozesse ermittelt werden können. ITC-Daten können Auskunft über die Bindungsaffinität, -enthalpie und -stöchiometrie zwischen den Hitsubstanzen und dem Zielprotein liefern (Wiseman et al, 1989). Hiermit ließe sich überprüfen, ob die in dieser Arbeit identifizierten Substanzen an Hsp90 oder Aha1 binden. Des Weiteren wird die ITC häufig für die Optimierung der Affinität von Leitsubstanzen im Anschluss an ein Hochdurchsatzscreening eingesetzt (Ward & Holdgate, 2001; Freire, 2009). Es bleibt zu erwähnen, dass an Aha1 bindende Substanzen generell vorzuziehen sind, da Hsp90 an einer Vielzahl von Signalwegen beteiligt ist, was das Risiko von Nebenwirkungen bei Hsp90-Inhibitoren steigen lässt.

Um zytotoxische Effekte auszuschließen, wurden die verbliebenen 28 Inhibitoren mit einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  auf BHK  $\Delta\text{F508}$ -Zellen getestet. Drei Substanzen (A3, A17, A21) führten zu einem Absterben der BHK-Zellen und wurden daher von weiteren Versuchen ausgeschlossen. Möglicherweise binden diese Substanzen an Hsp90 oder seine Nukleotidbindestelle, so dass das Chaperon in seiner Funktion beeinträchtigt wird. Alternativ kann das chemische Gerüst dieser Substanzen toxische Gruppen aufweisen, die die Zellen in ihrem Stoffwechsel oder bei der DNA-, RNA- oder Proteinsynthese stark beeinträchtigen. Acht der, nach dem Counterscreening und Toxizitätstest, verbliebenen 25 Substanzen wurden schließlich für den nachfolgenden Funktionalitätstest eingesetzt.

### **4.3 Iodidefflux-Assay und Immunzytochemie zum Nachweis des CFTR-Traffickings zur Plasmamembran**

Die acht ausgewählten Substanzen wiesen zum einen eine hohe Effektivität bei der Inhibition des Hsp90-Aha1 Komplexes auf und zeigten gleichzeitig keine zytotoxischen Eigenschaften. Ein strukturelles Leitmotiv, welches diese Gruppe von Inhibitoren miteinander verbindet, ließ sich nicht feststellen.

In dieser Arbeit stand die Identifizierung von Substanzen im Vordergrund, die durch Inhibition des Hsp90-Aha1 Komplexes die vorzeitige Degradation der CFTR $\Delta\text{F508}$ -Variante verhindern und so den transepithelialen Chloridefflux wiederherstellen sollten. Von großer Bedeutung war daher die Testung der Inhibitoren in einem funktionalen Assay, der Auskunft über den Chloridausstrom von CFTR-exprimierenden Zellen gab. Als zelluläres Modellsystem wurden BHK-Zellen verwendet, die konstitutiv CFTR WT oder  $\Delta\text{F508}$  exprimieren. Für den Nachweis

der CFTR-Funktionalität wurde der Iodidefflux-Assay verwendet, der bereits in zahlreichen CFTR-Studien, auch zusammen mit den BHK-Zellen, angewandt wurde (Carlile et al, 2012; Carlile et al, 2015; Farinha et al, 2013b). Anstelle von Chlorid wird in diesem Assay der Ausstrom von Iodidionen detektiert, mit denen die Zellen vorher beladen wurden. Da der Iodidefflux proportional zur Menge an funktionalem CFTR an der Plasmamembran ist, ist dieses Assay für den Nachweis des Traffickings und Einbaus des CFTR-Kanals in die Plasmamembran geeignet. Des Weiteren lassen sich bereits nanomolare Konzentrationen von Iodidionen nachweisen (Molinski et al, 2012). Zusätzlich wurden CFTR WT und  $\Delta F508$ -Zellen vor und nach Behandlung fixiert und mit einem CFTR-Erstantikörper (570) und einem Cy2-gekoppelten Zweitantikörper gefärbt. Auf diese Weise kann der Einfluss der Inhibitoren auf das Trafficking bzw. die zelluläre Lokalisation des CFTR-Proteins untersucht werden.

#### **4.3.1 VX-809, 26°C sowie deren Kombination fördern die CFTR $\Delta F508$ -Reifung**

Um das charakteristische Verhalten der BHK-Zellen (WT und  $\Delta F508$ ) vor dem Einsatz der identifizierten Inhibitorsubstanzen zu überprüfen, wurden diese zuerst unbehandelt untersucht. Anschließend wurde der Effekt bereits bekannter Rescue-Methoden auf die CFTR $\Delta F508$  Zellen analysiert. Immunfluoreszenzfärbungen der BHK WT Zellen zeigten eine ubiquitäre zytoplasmatische Lokalisation von CFTR-Proteinen auf. Eine besonders starke Akkumulation von CFTR fand sich an der Plasmamembran der Zellen. Im Gegensatz dazu zeigten CFTR $\Delta F508$  Zellen ausschließlich eine perinukleäre Lokalisation des mutierten Proteins (Abb. 27). Dieses Lokalisationsmuster bestätigt die Ergebnisse anderer Immunfluoreszenzstudien, in denen CFTR $\Delta F508$  ebenfalls nur zellkernnah lokalisiert wurde (van Meegen et al, 2013; Robert et al, 2010; Carvalho-Oliveira et al, 2004). Im Iodidefflux-Assay reagierte der CFTR WT auf die Stimulation mit Genistein und Forskolin mit einem starken Ausstrom von Iodidionen, während der mutierte Kanal fast keine Reaktion ( $< 1,5$  % vom WT) zeigte (Abb. 21). Diese Messungen bestätigen, dass die  $\Delta F508$ -Variante, neben ihrem Prozessierungs- und Traffickingdefekt (Cheng et al, 1990), zusätzlich funktionelle Defizite aufweist: Im Vergleich zum WT Protein ist die Halbwertszeit von CFTR $\Delta F508$  in der Membran zum einen deutlich reduziert (Lukacs et al, 1993; Sharma et al, 2001), zum anderen weist der mutierte Kanal eine 15-fach verringerte Öffnungswahrscheinlichkeit auf (Jurkuvenaite et al, 2010; Cholon et al, 2010).

Die Kultivierung der  $\Delta F508$ -Zellen bei 26°C führte jedoch zu einem mehr als 10-fachen Anstieg des Iodidausstroms im Vergleich zu unbehandelten  $\Delta F508$ -Zellen (Abb. 22). Dies entspricht etwa 30 % des WT Niveaus (Abb. 26). Bereits in den 90er Jahren wurde beobachtet, dass niedrigere Temperaturen (26 - 30°C) den mutierten Kanal vor der Degradation am ER bewahren können und funktionales Protein zu einem gewissen Anteil zur Plasmamembran transportiert wird (Denning et al, 1992). Die niedrige Temperatur bietet dem fehlgefalteten CFTR einen kinetischen Faltungsvorteil und reduziert zusätzlich seine Degradation durch die

Proteasom-Maschinerie (Farinha et al, 2013a). Da die Temperaturrettung nicht in allen Zelltypen zu beobachten ist, scheint insbesondere die lokale Faltungsumgebung, bestehend aus verschiedenen Chaperonen und Kofaktoren, eine zentrale Rolle zu spielen. CFTR $\Delta$ F508 benötigt dabei eine spezialisierte Faltungsumgebung, die einige Zelltypen bei einer erniedrigten Temperatur aufweisen, andere jedoch nicht (Wang et al, 2008). Weitere Studien wiesen nach, dass auf diese Weise "gerettetes" CFTR $\Delta$ F508 an der Plasmamembran thermisch instabil ist und deutlich schneller als das WT-Protein wieder internalisiert wird (Gentsch et al, 2004; Lukacs et al, 1993; Sharma et al, 2001; Swiatecka-Urban et al, 2005). Während das CFTR WT Protein anschließend wieder effizient zurück zur Plasmamembran recycelt wird (Okiyoneda & Lukacs, 2007), wird die  $\Delta$ F508-Mutante im Lysosom degradiert (Sharma et al, 2004; Gentsch et al, 2004). Andere Studien konnten ebenfalls einen starken Anstieg des durch cAMP stimulierten Ionenausstroms von bei Niedrigtemperatur kultivierten  $\Delta$ F508-Zellen im Iodidefflux-Assay feststellen. Tatsächlich übertraf der Efflux von derart behandelten Zellen jeweils den Efflux der mit Korrektorsubstanzen, wie z.B. VRT-325, behandelten Zellen (Robert et al, 2010; Farinha et al, 2013a). Da jedoch sowohl die Assaydurchführung als auch die Auswertung der Effluxkurven voneinander abweicht, ist ein direkter Vergleich mit den hier gezeigten Ergebnissen schwierig. Die Immunfluoreszenzanalyse der bei 26°C inkubierten  $\Delta$ F508-Zellen zeigt eine Revision des für CFTR $\Delta$ F508 typischen perinukleären Lokalisationsmusters (Abb. 28). CFTR $\Delta$ F508 breitete sich durch die Kultivierung bei Niedrigtemperatur verstärkt in die Zellperipherie aus und akkumulierte auch an der Plasmamembran. Dieses Ergebnis bestätigt eindeutig die Beobachtung aus dem Iodidefflux-Assay, der einen starken Anstieg des Iodideffluxes in entsprechend behandelten BHK-Zellen gezeigt hatte.

Neben der Inkubation der  $\Delta$ F508-Zellen bei 26°C wurden die Zellen als weitere Positivkontrolle mit der bis dato erfolgreichsten Korrektorsubstanz VX-809 (van Goor et al, 2011) behandelt. Die Inkubation der Zellen mit 5  $\mu$ M VX-809 führte zu einem Anstieg des Iodidausstroms auf das 6-fache des Niveaus von unbehandelten  $\Delta$ F508-Zellen (Abb. 22). Bezogen auf den WT entspricht dies einer Aktivitätssteigerung von 1,5 % auf 8,4 % (Abb. 26). Damit war der Effekt durch VX-809 um etwa ein Drittel geringer als der Einfluss von Niedrigtemperatur. Diese Beobachtung wird durch eine Studie von Odolczyk et al. gestützt. Diese zeigte, dass der Iodidefflux in mit CFTR $\Delta$ F508 transfizierten HeLa-Zellen, die mit 10  $\mu$ M VX-809 behandelt wurden, nur ca. 50 % des Effluxes von bei 27°C kultivierten Zellen betrug (Odolczyk et al, 2013).

Auch die Immunfluoreszenzanalyse von mit VX-809 behandelten BHK $\Delta$ F508-Zellen bestätigte den schwächeren Effekt von VX-809 auf das CFTR-Trafficking im Vergleich zur Niedrigtemperatur (Abb. 28). Mutiertes CFTR-Protein breitete sich in deutlich geringerem

Ausmaß in die Peripherie der Zellen aus als in den mit 26°C behandelten Zellen. Außerdem ließ sich keine eindeutige Plasmamembranlokalisation des CFTR feststellen. Botelho et al. analysierten kürzlich ebenfalls den Effekt von VX-809 (3 µM) in CFBE-Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie. Auch hier war der Effekt wenig ausgeprägt, jedoch verwendete diese Gruppe eine spezielle Auswertungsmethode, die es ermöglichte die Traffickingrate des mutierten CFTR zu berechnen. Dazu generierten sie eine neue CFBE-Zelllinie, die stabil CFTR $\Delta$ F508 mit einer N-terminalen mCherry-Sequenz sowie einem Flag-Tag in einem extrazellulären Loop exprimiert. Mithilfe eines mCherry-Antikörpers ließ sich die Gesamtmenge des CFTRs in der Zelle anfärben, während der anti-Flag-Tag Antikörper spezifisch apikal lokalisiertes CFTR nachwies. Auf diese Weise konnte ein signifikanter Anstieg des CFTR $\Delta$ F508 an der Plasmamembran nach Behandlung mit VX-809 gezeigt werden. Diese Methode wurde des Weiteren besonders für Hochdurchsatzscreenings von neuen CFTR-Korrektoren optimiert (Botelho et al, 2015). Dieser Umstand verdeutlicht, dass oft sensitivere Methoden vonnöten sind, um kleinere Effekte korrekt zu interpretieren.

Die Wirkungsweise von VX-809 ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Studien mit rekombinant aufgereinigten einzelnen CFTR-Domänen konnten zeigen, dass VX-809 die MSD1 stabilisiert und so die Interaktion zwischen der MSD1, NBD1 und MSD2 verstärkt (Ren et al, 2013; Loo et al, 2013). He et al. konnten zudem die Bindung von VX-809 an die Interaktionsfläche von NBD1 und dem vierten intrazellulären Loop (ICL4) nachweisen (He et al, 2013).

In dieser Arbeit wurde ebenfalls die kombinierte Auswirkung aus VX-809 und einer erniedrigten Inkubationstemperatur (26°C) auf die CFTR-Reifung getestet, welche beide einzeln einen verstärkenden Einfluss besitzen (s.o.). In Kombination wurde der Iodidefflux durch diese Behandlung auf fast 20 % des WT-Effluxes gesteigert. Hierbei wurde jedoch kein sich gegenseitig verstärkender Effekt der beiden Einflüsse gefunden. Einerseits zeigte die Kombination aus VX-809 und einer erniedrigten Temperatur einen deutlich stärkeren Ausstrom als der durch VX-809 alleine erzielte Strom. Andererseits kann der Efflux nach Inkubation bei einer erniedrigten Temperatur ohne die Zugabe von VX-809 stärker erhöht werden als bei einer Kombination aus VX-809 und 26°C.

In der Immunfluoreszenzanalyse führte die kombinierte Behandlung aus VX-809 und 26°C, übereinstimmend mit den Ergebnissen des Iodidefflux-Assays, zu einem Phänotyp, der mit dem der BHK CFTR WT-Zellen fast identisch war. Das CFTR $\Delta$ F508 war homogen über die gesamte Zellfläche verteilt und akkumulierte deutlich an der Plasmamembran. Bestätigt wird diese Beobachtung durch andere Studien: Diese stellten ebenfalls fest, dass die Behandlung von CFTR $\Delta$ F508 exprimierenden BHK-Zellen mit Niedrigtemperatur und VX-809, zu einer stärkeren Reifung des mutierten CFTR im Western-Blot (Erscheinen der Bande C) führte als durch Behandlung mit VX-809 alleine (He et al, 2013; Farinha et al, 2013a). Die Reifung des mutierten CFTR konnte so auf bis zu 80 % des WT-Niveaus gesteigert werden (Farinha et al,

2013a). Die Ergebnisse deuten daraufhin, dass VX-809 an sich nicht die Thermoinstabilität der  $\Delta F508$ -Variante beheben kann, da die Lebenszeit des Kanals an der Plasmamembran nach erneuter Erhöhung der Temperatur von 27°C auf 37°C, nicht verlängert wird. Für eine effektive Wirkungsweise des VX-809 muss CFTR $\Delta F508$  offensichtlich zuerst thermodynamisch, beispielsweise durch Niedrigtemperatur, stabilisiert worden sein (He et al, 2013). Da eine Körperkerntemperatur von unter 35°C für den Menschen bereits eine Unterkühlung bedeutet, ist diese Methode allerdings für die praktische Therapie der Zystischen Fibrose nicht geeignet. Desweiteren muss einschränkend angemerkt werden, dass offensichtlich nur jeweils ein gewisser Prozentsatz der Zellen auf die Behandlungen reagiert. Natürlich befinden sich nicht alle Zellen innerhalb einer Versuchseinheit in der gleichen Phase des Zellzyklus. So weisen Zellen, die sich z.B. gerade teilen eine andere Zusammensetzung ihres Proteoms auf und reagieren daher möglicherweise auch anders auf eine Behandlung als Zellen in der G-Phase. Zudem zeigte sich, dass die CFTR-Expression bereits in unbehandelten Zellen deutlich variiert. Zellen, die bereits eine höhere CFTR-Expression aufweisen, reagieren möglicherweise verstärkt auf eine Behandlung wohingegen Zellen mit wenig CFTR-Protein nicht oder kaum von einer Behandlung profitieren.

#### **4.3.2 Die Hsp90-Aha1 Inhibitoren A12 und A16 steigern die Funktionalität von CFTR $\Delta F508$ signifikant und zeigen zusammen mit VX-809 eine synergistische Wirkungsweise**

Im Anschluss an die Charakterisierung der BHK-Zellen mit VX-809 und Niedrigtemperatur, wurden diese mit je 5  $\mu\text{M}$  der acht identifizierten Hsp90-Aha1 Inhibitoren für 24 h bei 37°C behandelt. Überraschenderweise führte die Behandlung mit sechs Substanzen (A2, A10, A11, A24, A25 und A28) zu einem weiteren Abfall des Iodidausstroms im Vergleich zu unbehandelten oder mit der Trägersubstanz DMSO behandelten Zellen. Odolczyk et al. beobachteten ebenfalls in einem Screening nach neuen CFTR-Korrektoren, Substanzen, die den Iodid-Peak Efflux unter das Level von unbehandelten Zellen sinken ließ (Odolczyk et al, 2013).

Diese Substanzen weisen möglicherweise, neben ihrer Hsp90-Aha1 Komplex hemmenden Funktion, weitere Wechselwirkungen mit anderen Proteinen auf. Da Expression, Faltung, Trafficking sowie die Regulation der Funktion des CFTR-Kanals einer Vielzahl verschiedener Kontrollinstanzen unterliegen, sind zahlreiche Interventionspunkte denkbar, die sich negativ auf die CFTR-Expression auswirken. Dies ließe sich durch ein, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, reduziertes *steady-state* Level an CFTR $\Delta F508$ -Protein (Bande B) im Western Blot nachweisen. Der ausbleibende den Iodidausstrom fördernde Effekt einiger in dieser Arbeit identifizierter Hsp90-Aha1 Inhibitoren mag nicht primär bedingt sein, sondern Ausdruck sekundärer Wechselwirkungen mit anderen, die CFTR-Synthese oder –funktion hemmenden Molekülen.

Des Weiteren könnten diese Substanzen weitere Interaktionen zwischen Hsp90 und anderen Kochaperonen unterbinden. Die Kochaperone Cdc37, p23 und Hop verlangsamten beispielsweise den Hsp90-Zyklus (Young & Hartl, 2000; Siligardi et al, 2002; Prodromou et al, 1999), so dass ihre Hemmung zu einem beschleunigten Hsp90-Klienten Zyklus und damit zu einer ungünstigen Faltungsumgebung für das mutierte CFTR führen könnte. Diese sechs Substanzen, die zu einem weiteren Abfall des Iodidausstroms führen, sollten daher auch auf ihre Hemmung anderer Hsp90-Kochaperon Interaktionen untersucht werden (z.B. mittels Alpha-Technologie).

Zwei der acht Hsp90-Aha1 Inhibitoren, A12 und A16, steigerten den Iodidefflux und damit die Funktionalität des CFTR $\Delta$ F508-Kanals signifikant auf 4 % bzw. 3,7 % des WT-Niveaus (Abb. 24). In der immunzytochemischen Analyse war dieser Effekt für A12 deutlich erkennbar, jedoch nicht für A16. Die CFTR-Lokalisation schien bei Behandlung der Zellen mit A12 nicht mehr nur auf den zellkernnahen Raum beschränkt zu sein, sondern sich weiter ins Zytosol ausgebreitet zu haben. Eine direkte Akkumulation von CFTR an der Plasmamembran war mittels der Immunzytochemie nicht nachweisbar (Abb. 29). Im Fall von A16 war überhaupt keine Verbesserung der intrazellulären Lokalisation zu erkennen (Abb. 30). Generell ist der Iodidefflux-Assay jedoch als deutlich sensitiver in der Beurteilung des CFTR-Traffickings anzusehen. Die beobachteten Effekte aus dem Iodidefflux-Assay müssen sich daher nicht unbedingt in der Immunfluoreszenz widerspiegeln. Sensitivere Fluoreszenzfärbungen wie das bereits erwähnte Traffickingassay von Botelho et al. (Botelho et al., 2015) wären daher für eine umfassendere Interpretation der Ergebnisse sinnvoll.

Die Untersuchung neuer CFTR-Korrektoren führte in den letzten Jahren immer mehr zu der Auffassung, dass ein Korrektor alleine wahrscheinlich nicht ausreicht, die verschiedenen Defizite des CFTR $\Delta$ 508 zu beheben (Farinha et al, 2013a; Molinski et al, 2012). Aus diesem Grund wurden BHK CFTR $\Delta$ F508 Zellen anschließend mit verschiedenen Kombinationen von Substanzen behandelt. Die Kombination der Substanzen A12 und A16 verbesserte weder den Iodidefflux noch die intrazelluläre Lokalisation des CFTR-Proteins (Daten nicht gezeigt). Wurden A12 und A16 jedoch jeweils mit VX-809 kombiniert, führte dies zu einem sehr starken Anstieg des Iodideffluxes auf ca. 40 % bzw. 22 % der Aktivität des WTs (Abb. 26). Da es sich hierbei nicht um eine Addition der Effekte durch alleinige Behandlung mit A12, A16 und VX-809 handelt, ist von einer synergistischen Wirkungsweise auszugehen. Als Hsp90-Aha1 Inhibitoren scheinen A12 und A16 den mutierten CFTR-Kanal vor einer frühzeitigen Degradation durch das ERAD zu bewahren. Da Aha1 nachweislich den Hsp90-Klienten-Zyklus beschleunigt (Hawle et al, 2006; Lotz et al, 2003; Panaretou et al, 2002), führt eine Inhibition des Komplexes zu einer Verlangsamung dieses Zyklus. Dies würde dem fehlgefalteten

CFTR $\Delta$ F508 die nötige Zeit verschaffen, die es benötigt um seine korrekte Konformation einzunehmen (Wang et al., 2006). In der Folge könnte CFTR $\Delta$ F508, das nun nicht mehr zum größten Teil frühzeitig am ER degradiert wird, dann durch VX-809 eine weitere Stabilisierung seiner Konformation erfahren und zur Plasmamembran transportiert werden (He et al, 2013; Loo et al, 2013; Ren et al, 2013). Synergistische Effekte von CFTR-Korrektoren und VX-809 ließen sich bereits in anderen Studien beobachten. So führte das 2-Aminothiazol D-01 zusammen mit VX-809 zu stärkeren Chloridströmen in CFBE-Zellen als dies durch VX-809 alleine der Fall war (Phuan et al, 2014).

Neben der gesteigerten Kanalfunktionalität, ließ sich auch in der Immunfluoreszenzanalyse ein deutlicher Effekt durch A12 und VX-809 auf die CFTR-Lokalisation nachweisen. Hier konnte eine über die gesamte Zelle verteilte CFTR $\Delta$ F508-Lokalisation sowie Protein an der apikalen Membran beobachtet werden (Abb. 29). Überraschenderweise spiegelte sich die ebenfalls deutliche Verbesserung des Iodideffluxes bei Behandlung der Zellen mit A16 und VX-809 nicht in der Zellfärbung wieder. Die Lokalisation von CFTR $\Delta$ F508 war nach wie vor auf den perinukleären Raum beschränkt (Abb. 30). Obwohl die Versuche bislang nur einmal durchgeführt wurden, sind die Ergebnisse durchaus aussagekräftig im Hinblick auf eine qualitative Einschätzung der Effekte der Inhibitormoleküle auf die CFTR-Lokalisation. Die durchgeführten Positiv- sowie Negativkontrollen bestätigen, dass die Durchführung der Färbungen korrekt verlief. Um den Effekt der hier identifizierten Inhibitoren auf die Menge von CFTR an der Plasmamembran quantitativ einordnen zu können, sind allerdings weitere Versuchswiederholungen mit zusätzlichen Färbeverfahren anzuwenden. Neben der bereits beschriebenen Methode nach Botelho et al. an (Botelho et al, 2015), kann Weizenkeimagglutinin genutzt werden, um CFTR an der Zelloberfläche nachzuweisen. Dieses Lectin bindet an N-Acetyl-D-Glukosamine und Sialinsäurereste von Glykoproteinen- und -lipiden der Plasmamembran. Reifes CFTR an der Plasmamembran kolokalisiert dann mit dem Färbemuster des Weizenkeimagglutinins (Da Paula, Ana Carina et al, 2010). Des Weiteren wäre die Analyse von behandelten  $\Delta$ F508-Zellen mittels Durchflusszytometrie denkbar. Weiterführende Arbeiten sollten ebenfalls Westernblot-Analysen beinhalten, um den Effekt der Inhibitoren auf die Menge an unreifem kernglykosyliertem (Bande B) und reifem, komplex glykosyliertem CFTR (Bande C) zu untersuchen. Diese Methode wird routinemäßig zur Einschätzung der Effektivität von CFTR-Korrektoren verwendet (Carlile et al, 2015; Wang et al, 2006; Pedemonte et al, 2005). Um das Potential der beiden erfolgreichsten Hsp90-Aha1 Inhibitoren A12 und A16 weiter zu beurteilen, können diese in Kombination mit weiteren "CFTR-rettenden" Maßnahmen wie Niedrigtemperatur oder den Korrektorsubstanzen Corr-4a und VX-661 getestet werden. Für eine quantitative Analyse der Effektivität der in dieser Arbeit vorgestellten Inhibitoren ist eine Differenzierung zwischen intrazellulärem, unreifem CFTR und apikalem, reifem CFTR unerlässlich.



### 4.3.3 Der Potenziator VX-770 führt zu keiner weiteren Steigerung der Kanalfunktionalität

Im Gegensatz zu vorausgegangenen *in-vitro* Versuchen, erwies sich der bislang erfolgreichste CFTR $\Delta$ F508-Korrektor VX-809 in klinischen Studien als wenig erfolgreich. Der Korrektor führte zu keiner Verbesserung der Lungenfunktion von homozygoten CFTR $\Delta$ F508-Trägern (Clancy et al, 2012). Erst eine weitere Studie, in der Patienten mit einer Kombination aus VX-809 und dem Potenziator VX-770 behandelt wurden, führte zu einem leichten Anstieg der Lungenfunktion um ca. 5 % (Vertex Pharmaceuticals, 2014).

Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob sich die Ergebnisse des Iodidefflux-Assays, nach Behandlung der  $\Delta$ F508-Zellen mit A12, A16 sowie in Kombination mit VX-809, durch VX-770 (20  $\mu$ M) weiter steigern ließen. Erstaunlicherweise konnte VX-770 in dieser Arbeit den Iodidausstrom bei keiner Korrektorbehandlung weiter potenzieren. Diese Ergebnisse widersprechen anderen Studien, in denen eine akute Gabe von VX-770 sowohl die Funktionalität des CFTR WTs als auch die von CFTR $\Delta$ F508, das vorher mit VX-809 behandelt worden war, steigerte (van Goor et al, 2011; Cholon et al, 2014; Kopeikin et al, 2014).

## 4.4 Signifikanz und therapeutische Anwendbarkeit der Ergebnisse

In den letzten Jahrzehnten konzentrierten sich viele Gruppen auf die Suche nach neuen Behandlungsmöglichkeiten, um den ursächlichen Defekt bei der Entstehung von CF zu beheben. Neuesten Erkenntnissen zufolge, bestünde die ideale CF-Therapie in der Einnahme einer Substanz, die den Faltungsdefekt der CFTR $\Delta$ F508 Variante behebt, das Trafficking unterstützt, die Stabilität an der Plasmamembran steigert und zusätzlich die Funktionalität des Kanals positiv beeinflusst (Riordan, 2008). Da die meisten bisher identifizierten Korrektorsubstanzen nur einen der Defekte beheben oder mildern können, ist der Effekt auf die Funktionalität des Kanals bereits in *in-vitro* Versuchen so gering, dass diese Substanzen in der Regel nicht für klinische Studien in Frage kommen. Auch der bislang erfolgreichste Korrektor VX-809 verschafft Patienten nur in Kombination mit dem Potenziator VX-770 einen geringen klinischen Vorteil (Vertex Pharmaceuticals, 2014). Über die Wirkungsweise von Korrektoren wie VX-809, VRT-325 und Corr-4a ist bislang nicht viel bekannt. Sie interagieren meist direkt mit dem mutierten CFTR und tragen so zu seiner Stabilisierung bei (van Goor et al, 2006; van Goor et al, 2011; Pedemonte et al, 2005). Des Weiteren wurden auch Substanzen als Korrektoren identifiziert, die bislang bei anderen Indikationen Anwendung fanden und nicht direkt an CFTR binden. Dazu gehören Ibuprofen, Glafenin, 4-Phenylbutyrat, Miglustat und Sildenafil (Viagra) (Carlile et al, 2015; Dormer, 2005; Robert et al, 2010; Rubenstein & Zeitlin, 2000; Norez et al, 2006). Neuere Ansätze fokussieren sich auf die Suche nach Substanzen, die mehrere Defekte bei CFTR zugleich beheben und somit Korrektor- und Potenziatorfunktion aufweisen (Knapp et al, 2012; Pedemonte et al, 2011; Phuan et al, 2011).

Einem neuen Konzept zufolge benötigt das CFTR $\Delta$ F508 eine vom WT abweichende Komposition und Balance von verschiedenen Chaperonen, um seine korrekte strukturelle Konformation zu erreichen (Wang et al, 2008). Bei den in dieser Arbeit identifizierten Substanzen A12 und A16 handelt es sich um solche Proteostaseregulatoren, die modulierend auf die Faltungsumgebung des mutierten CFTR-Proteins wirken. Die Inhibition des Hsp90-Aha1 Komplexes führt zu einem "Nicht-Erkennen" des fehlgefalteten Proteins am ER und fördert den Export von CFTR $\Delta$ F508 vom ER zum Golgi und schließlich zur Plasmamembran. Weitergehende Untersuchungen der genauen Wirkungsweise der Hsp90-Aha1 Inhibitoren sind hierbei unerlässlich. Eine wichtige Komponente stellen dabei *in-vivo* Versuche dar. Bei toxischer Unbedenklichkeit können beispielsweise Mausmodelle eingesetzt werden, die die CFTR $\Delta$ F508 Variante aufweisen, um die Wirkung von CFTR-Korrektoren zu testen. Aufschluss über die Wirksamkeit der eingesetzten Substanzen gibt u.a. die Menge an sekretiertem Speichel infolge der Behandlung (Robert et al, 2010). Da die Substanzen A12 und A16 nach Lipinskis 5-er Regel bereits als *drug-like* eingestuft sind, ist die Wahrscheinlichkeit einer oralen Bioverfügbarkeit hoch. Humane Bronchialepithelzellen (CFBE) sowie intestinale *Organoids* von CF-Patienten wären des Weiteren geeignete Modellsysteme, um die Wiederherstellung der Chloridleitfähigkeit zu untersuchen. Im Fall der *Organoids* gibt die Schwellung dieser Strukturen infolge einer Behandlung mit Korrektorsubstanzen und Aktivierung des CFTR-Kanals Aufschluss über die Wirksamkeit der Substanzen (Dekkers et al, 2013). Weitere Untersuchungen sollten zudem die Spezifität von A12 und A16 für den CFTR-Kanal sicherstellen. Eine hohe Spezifität reduziert in der Weiterentwicklung der Substanzen das Risiko von möglichen Nebenwirkungen erheblich. Geeignete Modelle wären im ER arretierte Proteinvarianten des hERG- (*human ether-à-go-go related gene*) K<sup>+</sup>-Kanals sowie das CFTR-Schwesterprotein p-Glykoprotein (P-gp) (van Goor et al, 2011; van Goor et al, 2006)

Es wurde bereits in der Vergangenheit viel über die Frage diskutiert, wie viel funktionales CFTR an der Plasmamembran notwendig ist, um eine Linderung der Beschwerden bei Patienten hervorzurufen. Die meisten Autoren gehen davon aus, dass Korrektoren für eine signifikante Verbesserung der pulmonalen Symptome einen Anstieg der CFTR-Funktion auf 10 - 25 % des WTs bewirken müssen (Amaral, 2005; Zhang et al, 2009a; van Goor et al, 2006). Als äußerst vielversprechend sind daher die Ergebnisse der Substanzen A12 und A16 in Kombination mit VX-809 einzuschätzen, da diese im Iodidefflux-Assay eine Verbesserung der  $\Delta$ F508-Funktion auf ca. 40 % bzw. 22 % des WT Niveaus erreichen. Jede Substanz für sich allein genommen würde die  $\Delta$ F508-Defizite nicht genügend aufheben können. In der Literatur wurde bis dato keine so effiziente Wirkstoffkombination wie A12 + VX-809 beschrieben, daher

scheint dieser kombinatorische Ansatz ein großes Potential für die mögliche Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten bei CF zu bieten.

## 5 Zusammenfassung

Bei Zystischer Fibrose (engl. *cystic fibrosis*, CF) handelt es sich um eine genetisch bedingte, schwerwiegende Proteinfaltungskrankheit, die bei einem Großteil der Patienten innerhalb weniger Jahrzehnte zum Tod durch Lungenversagen führt. Auf molekularer Ebene wird die Erkrankung durch die Fehlfaltung des *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (CFTR)-Proteins, eines epithelialen Chlorid-Kanals, ausgelöst. Etwa 80 % aller Betroffenen weisen die Deletion eines Phenylalanins ( $\Delta F508$ ) in der nukleotidbindenden Domäne 1 (NBD1) auf, was zu einem frühzeitigen Abbau des Proteins durch die Qualitätskontrolle am endoplasmatischen Retikulum (ER) führt (Boeck et al, 2014; Sun et al, 2008). Das Fehlen des Chlorid-Kanals in der Plasmamembran führt zur Ansammlung zähflüssigen Mukus, der verschiedene Organe in ihrer Funktion beeinträchtigt. Neue Substanzen, sogenannte Korrektoren, sollen dabei helfen, den zugrunde liegenden Defekt der Erkrankung zu beheben. Im Gegensatz zu vielen bisherigen Ansätzen, die sich mit der Identifizierung von CFTR-bindenden Korrektoren befassen, deuten neuere Ergebnisse daraufhin, dass CFTR $\Delta F508$  eine besondere, vom Wildtyp (WT) abweichende, Chaperonumgebung für eine korrekte Faltung benötigt. Nach dieser Hypothese kann diese Faltungsumgebung durch Substanzen, sogenannte Proteostaseregulatoren, moduliert werden (Wang et al, 2008). Da bei der Erkennung des mutierten CFTR-Proteins eine Vielzahl verschiedener Proteine beteiligt ist, sind verschiedene Ansatzpunkte denkbar. SiRNA-Studien konnten zeigen, dass das Chaperon Hitzeschockprotein (Hsp) 90 und sein Kochaperon *activator of Hsp90 ATPase 1* (Aha1) eine zentrale Rolle bei der Erkennung des fehlgefalteten CFTR $\Delta F508$  Proteins spielen. Ein Knockdown führt zu einem verstärkten Transport des Kanals zur Plasmamembran sowie zu einer Wiederherstellung der Chloridleitfähigkeit (Wang et al, 2006).

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung neuartiger Inhibitoren des für die CFTR Proteinqualitätskontrolle wichtigen Hsp90-Aha1 Komplexes. Mithilfe der Alpha-Technologie wurden mehr als 14.000 verschiedene Substanzen auf ihre inhibitorische Wirkung untersucht und anschließend in einem funktionalen Assay mit CFTR exprimierenden *baby hamster kidney* (BHK)-Zellen auf ihre Effektivität hin überprüft. Die zwei Inhibitoren A12 und A16 steigerten die Funktionalität der  $\Delta F508$ -Variante, gemessen als Iodidefflux, auf bis zu 4 % der Aktivität des WTs. Interessanterweise ließ sich bei Kombination von A12 und A16 mit dem CFTR-Korrektor VX-809 ein synergistischer Effekt auf den CFTR-Kanal feststellen. Diese Kombinationen resultierten in einem drastischen Anstieg der Kanalaktivität auf 40 % bzw. 22 % der Aktivität des WTs. Die Ergebnisse des Iodidefflux-Assays wurden größtenteils in immunzytochemischen Färbungen verifiziert. Die hier identifizierten Hsp90-Aha1 Inhibitoren könnten in Zukunft einen Beitrag zur weiteren Erforschung der komplexen Beziehungen zwischen Chaperonen, Kochaperonen und ihrem Klientenprotein genutzt werden. Ihre genaue Wirkungsweise wird dabei sicherlich detailliert aufgeklärt werden können. Diese Substanzen

unterbinden die Beschleunigung des Hsp90-Zyklus durch Aha1 und ermöglichen es so dem CFTR-Kanal, den Hsp90-Zyklus langsamer zu durchlaufen, um seine korrekte Konformation für die weitere Prozessierung im ER einzunehmen (Wang et al, 2006).

Diese Arbeit zeigt deutlich, dass eine Modulation der Chaperonumwelt durch Einsatz von Hsp90-Aha1 Inhibitoren die Faltungsumgebung für das mutierte CFTR $\Delta$ F508 günstig beeinflusst. Solche Inhibitormoleküle werden in Zukunft zur Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten der Zystischen Fibrose (und weiteren Proteinfaltungskrankheiten) beitragen. Aufgrund der aktuellen Forschungslage ist dabei davon auszugehen, dass der Fokus zunehmend auf der Entwicklung von kombinierten Therapien liegt, da im Fall der CFTR $\Delta$ F508 Variante mehrere Defizite zu korrigieren sind. Dies könnte durch die Kombination von mehreren Korrektoren, wie A12 und VX-809, oder eines Korrektors mit einem Potenziator realisiert werden.

## 6 Abstract

Cystic fibrosis (CF) is a rare fatal genetic protein folding disease amongst Caucasian people. The disease primarily affects the lungs which often makes transplantation in the end-stage condition of the disease inevitable. On the molecular level, CF is caused by different mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. The deletion of phenylalanine ( $\Delta F508$ ) within the nucleotide binding domain 1 (NBD1) is exhibited by 80 % of patients (Sun et al, 2008; Boeck et al, 2014). This deletion leads to a misfolded CFTR chloride channel which is prematurely degraded by the protein quality control at the endoplasmic reticulum (ER) (Sun et al, 2008). Hence, secretory cells produce highly viscous mucus accumulating in and impairing the function of several organs. So called corrector substances should overcome the fundamental processing defect of the mutant CFTR protein, allowing an increased trafficking rate to the plasma membrane. Recent findings suggest that CFTR $\Delta F508$  might need a specialized chaperone environment for proper folding which is different from the wildtype's (WT) needs. Substances that change the chaperone pool, so called proteostasis regulators, are thought to modulate the cellular chaperone pool in order to augment the folding and promote the rescue of CFTR $\Delta F508$  (Wang et al, 2008). Since there are a lot of proteins involved in the recognition of the mutant CFTR protein, several intervention points are possible. Changing the level of the Hsp90 activator, Aha1, was found to stabilize CFTR $\Delta F508$  and promote its trafficking to the plasma membrane. Furthermore, decreasing the Aha1 level resulted in the partial recovery of the channel function (Wang et al, 2006).

This work focuses on the identification of innovative inhibitors of the Hsp90-Aha1 complex to modulate the protein quality control of CFTR $\Delta F508$ . Using the Alpha technology, more than 14,000 small molecules were screened for their potential to inhibit the interaction between Hsp90 and Aha1. *In-vitro* function and efficiency of identified substances were validated in an iodide-efflux assay with CFTR expressing baby hamster kidney cells (BHK). Two inhibitors, A12 and A16, increased the channel function by about 4 % of the WT's level. The channel's activity could be increased even further to 40 % and 22 % respectively by combining A12 and A16 with the corrector VX-809. Immunostainings of the treated CFTR $\Delta F508$  expressing BHK cells mostly verified the positive impact of the two inhibitors on the trafficking of the mutant protein. The finding of these novel Hsp90-Aha1 inhibitors provide a basis to shed new light on the complex interactions between chaperones, co-chaperones and their client proteins. Future experiments will therefore include the investigation of the detailed mode of action of these drug like molecules. Potentially, these inhibitors impair the acceleration of the Hsp90 cycle by Aha1, allowing the protein to fold properly and traffic to the plasma membrane (Wang et al, 2006).

In this work, the initial hypothesis has been proven: Changing the composition of the chaperones of the ER protein quality control by Hsp90-Aha1 inhibitors can positively influence

the folding environment of CFTR $\Delta$ F508. In future, such inhibitory molecules might pave the way for the development of new rational therapeutic drugs to cure the underlying defect of CFTR $\Delta$ F508 in cystic fibrosis. However, recent findings suggest that combination therapies of several drug-like molecules might be needed to effectively overcome the processing, trafficking, and gating defect as well as the shortened lifetime of the channel at the plasma membrane. Thus, A12 in combination with VX-809 or another corrector (or potentiator) might be a rational therapy for treatment of CF.

## 7 Literaturverzeichnis

Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, Sagel SD, Hornick DB, Konstan MW, Donaldson SH, Moss RB, Pilewski JM, Rubenstein RC, Uluer AZ, Aitken ML, Freedman SD, Rose LM, Mayer-Hamblett N, Dong Q, Zha J, Stone AJ, Olson ER, Ordoñez CL, Campell PW, Ashlock MA, Ramsey BW (2010) Effect of VX-770 in Patients with Cystic Fibrosis and the G551D-CFTR Mutation. *N Engl J Med* **363**: 1991-2003

Akabas MH (2000) Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator: Structure and Function of an Epithelial Chloride Channel. *J Biol Chem* **275**: 3729–3732

Amaral MD (2005) Processing of CFTR: Traversing the cellular maze—How much CFTR needs to go through to avoid cystic fibrosis? *Pediatr Pulm* **39**: 479–491

Arndt V, Rogon C & Höhfeld J (2007) To be, or not to be--molecular chaperones in protein degradation. *Cell Mol Life Sci* **64**: 2525–2541

Ballinger CA, Connell P, Wu Y, Hu Z, Thompson LJ, Yin LY & Patterson C (1999) Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. *Mol Cell Biol* **19**: 4535–4545

Basile A, Pascale M, Franceschelli S, Nieddu E, Mazzei MT, Fossa P, Turco MC & Mazzei M (2012) Matriline modulates HSC70 levels and rescues  $\Delta$ F508-CFTR. *J Cell Physiol* **227**: 3317–3323

Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513–1523

Boeck K de, Zolin A, Cuppens H, Olesen HV & Viviani L (2014) The relative frequency of CFTR mutation classes in European patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **13**: 403–409

Borkovich KA, Farrelly FW, Finkelstein DB, Taulien J & Lindquist S (1989) hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol* **9**: 3919–3930

Botelho HM, Uliyakina I, Awatade NT, Proença MC, Tischer C, Sirianant L, Kunzelmann K, Pepperkok R & Amaral MD (2015) Protein traffic disorders: an effective high-throughput fluorescence microscopy pipeline for drug discovery. *Sci Rep* **5**: 9038

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254

Carlile GW, Keyzers RA, Teske KA, Robert R, Williams DE, Linington RG, Gray CA, Centko RM, Yan L, Anjos SM, Sampson HM, Zhang D, Liao J, Hanrahan JW, Andersen RJ & Thomas



DY (2012) Correction of F508del-CFTR trafficking by the sponge alkaloid latonduine is modulated by interaction with PARP. *Chem Biol* **19**: 1288–1299

Carlile GW, Robert R, Goepp J, Matthes E, Liao J, Kus B, Macknight SD, Rotin D, Hanrahan JW & Thomas DY (2015) Ibuprofen rescues mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking. *J Cyst Fibros* **14**: 16–25

Carvalho-Oliveira I, Efthymiadou A, Malho R, Nogueira P, Tzetis M, Kanavakis E, Amaral MD & Penque D (2004) CFTR Localization in Native Airway Cells and Cell Lines Expressing Wild-type or F508del-CFTR by a Panel of Different Antibodies. *J Histochem Cytochem* **52**: 193–203

Chappe V, Hinkson DA, Zhu T, Chang X, Riordan JR & Hanrahan JW (2003) Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *J Physiol* **548**: 39–52

Cheng SH, Gregory RJ, Marshall J, Paul S, Souza DW, White GA & O'Riordan, C. R. and Smith, A. E. (1990) Defective Intracellular Transport and Processing of CFTR Is the Molecular Basis of Most Cystic Fibrosis. *Cell* **63**: 827–834

Chmiel JF, Berger M & Konstan MW (2002) The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clin Rev Allerg Immu* **23**: 5–27

Cholon DM, O'Neal WK, Randell SH, Riordan JR & Gentsch M (2010) Modulation of endocytic trafficking and apical stability of CFTR in primary human airway epithelial cultures. *AJP: Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **298**: L304-L314

Cholon DM, Quinney NL, Fulcher ML, Esther CR, Das J, Dokholyan NV, Randell SH, Boucher RC & Gentsch M (2014) Potentiator ivacaftor abrogates pharmacological correction of  $\Delta F508$  CFTR in cystic fibrosis. *Sci Transl Med* **6**: 246ra96

Clancy JP, Rowe SM, Accurso FJ, Aitken ML, Amin RS, Ashlock MA, Ballmann M, Boyle MP, Bronsveld I, Campbell PW, Boeck K de, Donaldson SH, Dorkin HL, Dunitz JM, Durie PR, Jain M, Leonard A, McCoy KS, Moss RB & Pilewski JM et al (2012) Results of a phase IIa study of VX-809, an investigational CFTR corrector compound, in subjects with cystic fibrosis homozygous for the F508del-CFTR mutation. *Thorax* **67**: 12–18

Connell P, Ballinger CA, Jiang J, Wu Y, Thompson LJ, Höhfeld J & Patterson C (2001) The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. *Nat Cell Biol* **3**: 93–96

Coppinger JA, Hutt DM, Razvi A, Koulov AV, Pankow S, Yates JR & Balch WE (2012) A chaperone trap contributes to the onset of cystic fibrosis. *PLoS ONE* **7**: e37682

- Da Paula, Ana Carina, Sousa M, Xu Z, Dawson ES, Boyd AC, Sheppard DN & Amaral MD (2010) Folding and rescue of a cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking mutant identified using human-murine chimeric proteins. *J Biol Chem* **285**: 27033–27044
- D'Agostino VG, Adami V & Provenzani A (2013) A novel high throughput biochemical assay to evaluate the HuR protein-RNA complex formation. *PLoS ONE* **8**: e72426
- Davis PB, Drumm M & Konstan MW (1996) Cystic fibrosis. *Am J Resp Crit Care* **154**: 1229–1256
- Dekkers JF, Wiegerinck CL, de Jonge, Hugo R, Bronsveld I, Janssens HM, de Winter-de Groot, Karin M, Brandsma AM, de Jong, Nienke W M, Bijvelds, Marcel J C, Scholte BJ, Nieuwenhuis, Edward E S, van den Brink, Stieneke, Clevers H, van der Ent, Cornelis K, Middendorp S & Beekman JM (2013) A functional CFTR assay using primary cystic fibrosis intestinal organoids. *Nat Med* **19**: 939–945
- Denning GM, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE & Welsh MJ (1992) Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature* **358**: 761–764
- Devor, D. C. et al. (1999) Bicarbonate and Chloride Secretion in Calu-3 Human Airway Epithelial Cells. *J Gen Physiol* **113**: 743–760
- Dittmar KD, Demady DR, Stancato LF, Krishna P & Pratt WB (1997) Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery. The role of p23 is to stabilize receptor.hsp90 heterocomplexes formed by hsp90.p60.hsp70. *J Biol Chem* **272**: 21213–21220
- Dormer RL (2005) Sildenafil (Viagra) corrects F508-CFTR location in nasal epithelial cells from patients with cystic fibrosis. *Thorax* **60**: 55–59
- Egan ME, Glöckner-Pagel J, Ambrose C, Cahill PA, Pappoe L, Balamuth N, Cho E, Canny S, Wagner CA, Geibel J & Caplan MJ (2002) Calcium-pump inhibitors induce functional surface expression of Delta F508-CFTR protein in cystic fibrosis epithelial cells. *Nat Med* **8**: 485–492
- Egan ME, Pearson M, Weiner SA, Rajendran V, Rubin D, Glöckner-Pagel J, Canny S, Du K, Lukacs GL & Caplan MJ (2004) Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* **304**: 600–602
- Ellis RJ (2006) Molecular chaperones: assisting assembly in addition to folding. *Trends Biochem Sci* **31**: 395–401
- Ellis RJ & Minton AP (2006) Protein aggregation in crowded environments. *Biol Chem* **387**: 485–497

Farinha CM & Amaral MD (2005) Most F508del-CFTR is targeted to degradation at an early folding checkpoint and independently of calnexin. *Mol Cell Biol* **25**: 5242–5252

Farinha CM, King-Underwood J, Sousa M, Correia AR, Henriques BJ, Roxo-Rosa M, Da Paula, Ana Carina, Williams J, Hirst S, Gomes CM & Amaral MD (2013a) Revertants, low temperature, and correctors reveal the mechanism of F508del-CFTR rescue by VX-809 and suggest multiple agents for full correction. *Chem Biol* **20**: 943–955

Farinha CM, Matos P & Amaral MD (2013b) Control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator membrane trafficking: not just from the endoplasmic reticulum to the Golgi. *FEBS J* **280**: 4396–4406

Freire E (2009) A thermodynamic approach to the affinity optimization of drug candidates. *Chem Biol Drug Des* **4**: 468–472

Gadsby DC & Nairn AC (1999) Control of CFTR channel gating by phosphorylation and nucleotide hydrolysis. *Physiol Rev* **79**: S77-S107

Gadsby DC, Vergani P & Csanády L (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **440**: 477–483

Gentsch M, Chang X, Cui L, Wu Y, Ozols VV, Choudhury A, Pagano RE & Riordan JR (2004) Endocytic trafficking routes of wild type and DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Mol Biol Cell* **15**: 2684–2696

Harst A, Lin H & Obermann, Wolfgang M J (2005) Aha1 competes with Hop, p50 and p23 for binding to the molecular chaperone Hsp90 and contributes to kinase and hormone receptor activation. *Biochem J* **387**: 789–796

Hartl FU (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**: 571–579

Hartl FU, Bracher A & Hayer-Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**: 324–332

Hawle P, Siepmann M, Harst A, Siderius M, Reusch HP & Obermann, W. M. J. (2006) The Middle Domain of Hsp90 Acts as a Discriminator between Different Types of Client Proteins. *Mol Cell Biol* **26**: 8385–8395

He L, Kota P, Aleksandrov AA, Cui L, Jensen T, Dokholyan NV & Riordan JR (2013) Correctors of  $\Delta F508$  CFTR restore global conformational maturation without thermally stabilizing the mutant protein. *FASEB J* **27**: 536–545

Holmes JL, Sharp SY, Hobbs S & Workman P (2008) Silencing of HSP90 Cochaperone AHA1 Expression Decreases Client Protein Activation and Increases Cellular Sensitivity to the HSP90 Inhibitor 17-Allylamino-17-Demethoxygeldanamycin. *Cancer Res* **68**: 1188–1197

- Hutt DM, Herman D, Rodrigues, Ana P C, Noel S, Pilewski JM, Matteson J, Hoch B, Kellner W, Kelly JW, Schmidt A, Thomas PJ, Matsumura Y, Skach WR, Gentzsch M, Riordan JR, Sorscher EJ, Okiyoneda T, Yates JR, Lukacs GL & Frizzell RA et al (2010) Reduced histone deacetylase 7 activity restores function to misfolded CFTR in cystic fibrosis. *Nat Chem Biol* **6**: 25–33
- Hwang T & Sheppard DN (2009) Gating of the CFTR Cl<sup>-</sup> channel by ATP-driven nucleotide-binding domain dimerisation. *J Physiol* **587**: 2151–2161
- Hwang and Sheppard (1999) Molecular pharmacology of the CFTR Cl<sup>-</sup> channel. *Trends Pharmacol Sci* **20**: 448–452
- Jensen TJ, Loo MA, Pind S, Williams DB, Goldberg AL & Riordan, JR (1995) Multiple Proteolytic Systems, Including the Proteasome, Contribute to CFTR Processing. *Cell* **83**: 129–135
- Jurkuvenaite A, Chen L, Bartoszewski R, Goldstein R, Bebok Z, Matalon S & Collawn JF (2010) Functional stability of rescued delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in airway epithelial cells. *Am J Resp Cell Mol* **42**: 363–372
- Kelley TJ, Thomas K, Milgram LJ & Drumm ML (1997) In vivo activation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutant deltaF508 in murine nasal epithelium. *P Natl Acad Sci USA* **94**: 2604–2608
- Kerem B, Rommens J, Buchanan J, Markiewicz D, Cox T, Chakravarti A, Buchwald M & Tsui L (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**: 1073–1080
- Kettern N, Dreiseidler M, Tawo R & Höfeld J (2010) Chaperone-assisted degradation: multiple paths to destruction. *Biol Chem* **391**
- Kirk KL & Dawson DC (2003) *The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Landes Bioscience / Eureka.com; Kluwer Academic / Plenum Pub., Georgetown, Tex, New York, N.Y
- Knapp JM, Wood AB, Phuan P, Lodewyk MW, Tantillo DJ, Verkman AS & Kurth MJ (2012) Structure-activity relationships of cyanoquinolines with corrector-potentiator activity in  $\Delta$ F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein. *J Med Chem* **55**: 1242–1251
- Kopeikin Z, Yuksek Z, Yang H & Bompadre SG (2014) Combined effects of VX-770 and VX-809 on several functional abnormalities of F508del-CFTR channels. *J Cyst Fibros*
- Koulov AV, LaPointe P & Lu, Bingwen, Razvi, Abbas, Coppinger, Judith, Dong, Meng-Qiu, Matteson, Jeanne, Laister, Rob, Arrowsmith, Cheryl, Yates, John R. and Balch, William E. (2010) Biological and Structural Basis for Aha1 Regulation of Hsp90 ATPase Activity in Maintaining Proteostasis in the Human Disease Cystic Fibrosis. *Mol Biol Cell*: 871–884

- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685
- Li J, Richter K, Reinstein J & Buchner J (2013) Integration of the accelerator Aha1 in the Hsp90 co-chaperone cycle. *Nat Struct Mol Biol* **20**: 326–331
- Li und Buchner (2013) Structure, Function, and Regulation of the Hsp90 machinery. *Biomed J* 106–117
- Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW & Feeney PJ (2012) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliver Rev* **64**: 4–17
- Long and Walsh (1997) Iodide efflux measurements with an iodide-selective electrode: A non-radioactive procedure for monitoring cellular chloride transport. *Methods Cell Sci*: 207–212
- Loo TW, Bartlett MC & Clarke DM (2013) Corrector VX-809 stabilizes the first transmembrane domain of CFTR. *Biochem Pharmacol* **86**: 612–619
- Lotz GP (2003) Aha1 Binds to the Middle Domain of Hsp90, Contributes to Client Protein Activation, and Stimulates the ATPase Activity of the Molecular Chaperone. *J Biol Chem* **278**: 17228–17235
- Lotz GP, Lin H, Harst A & Obermann, Wolfgang M J (2003) Aha1 binds to the middle domain of Hsp90, contributes to client protein activation, and stimulates the ATPase activity of the molecular chaperone. *J Biol Chem* **278**: 17228–17235
- Lu Y, Xiong X, Helm A, Kimani K, Bragin A & Skach WR (1998) Co- and Posttranslational Translocation Mechanisms Direct Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator N Terminus Transmembrane Assembly. *J Biol Chem* **273**: 568–576
- Lukacs GL, Chang X, Bear C, Kartner N, Mohamedj A, Riordan JR & Grinstein S (1993) The AF508 Mutation Decreases the Stability of Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator in the Plasma Membrane. *J Biol Chem*: 21592–21598
- Mackie DI & Roman DL (2011) Development of a Novel High-Throughput Screen and Identification of Small-Molecule Inhibitors of the G $\beta$ -RGS17 Protein-Protein Interaction Using AlphaScreen. *J Biomol Screen* **16**: 869–877
- McKone EF, Goss CH & Aitken ML (2006) CFTR genotype as a predictor of prognosis in cystic fibrosis. *Chest* **130**: 1441–1447
- Meacham GC, Lu Z, King, S., Sorscher, E., Tousson A & Cyr DC (1999) The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis. *The EMBO Journal* **18**: 1492–1505

- Meacham GC, Patterson C, Zhang W, Younger JM & Cyr DM (2001) The Hsc70 co-chaperone CHIP targets immature CFTR for proteasomal degradation. *Nat Cell Biol* **3**: 100–105
- Meyer P (2004) Structural basis for recruitment of the ATPase activator Aha1 to the Hsp90 chaperone machinery. *The EMBO Journal* **23**: 1402–1410
- Molinski S, Eckford, Paul D W, Pasyk S, Ahmadi S, Chin S & Bear CE (2012) Functional Rescue of F508del-CFTR Using Small Molecule Correctors. *Front Pharmacol* **3**: 160
- Mu T, Ong, Derrick Sek Tong, Wang Y, Balch WE, Yates JR, Segatori L & Kelly JW (2008) Chemical and biological approaches synergize to ameliorate protein-folding diseases. *Cell* **134**: 769–781
- Murata S, Minami Y, Minami M, Chiba T & Tanaka K (2001) CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO reports* **2**: 1133–1138
- Nathan DF & Lindquist S (1995) Mutational analysis of Hsp90 function: interactions with a steroid receptor and a protein kinase. *Mol Cell Biol* **15**: 3917–3925
- Nathan DF, Vos MH & Lindquist S (1999) Identification of SSF1, CNS1, and HCH1 as multicopy suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* Hsp90 loss-of-function mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1409–1414
- Nishimura N (1997) A Di-Acidic Signal Required for Selective Export from the Endoplasmic Reticulum. *Science* **277**: 556–558
- Norez C, Noel S, Wilke M, Bijvelds M, Jorna H, Melin P, DeJonge H & Becq F (2006) Rescue of functional delF508-CFTR channels in cystic fibrosis epithelial cells by the alpha-glucosidase inhibitor miglustat. *FEBS Lett* **580**: 2081–2086
- Obermann WM, Sondermann H, Russo AA, Pavletich NP & Hartl FU (1998) In vivo function of Hsp90 is dependent on ATP binding and ATP hydrolysis. *J Cell Biol* **143**: 901–910
- Odolczyk N, Fritsch J, Norez C, Servel N, da Cunha, Melanie Faria, Bitam S, Kupniewska A, Wiszniewski L, Colas J, Tarnowski K, Tondelier D, Roldan A, Sausseureau EL, Melin-Heschel P, Wieczorek G, Lukacs GL, Dadlez M, Faure G, Herrmann H & Ollero M et al (2013) Discovery of novel potent  $\Delta$ F508-CFTR correctors that target the nucleotide binding domain. *EMBO Mol Med* **5**: 1484–1501
- Okiyoneda T & Lukacs GL (2007) Cell surface dynamics of CFTR: the ins and outs. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 476–479
- Ostedgaard LS, Baldursson O & Welsh MJ (2001) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> channel by its R domain. *J Biol Chem* **276**: 7689–7692

- Panaretou B, Sillgardi G, Meyer P, Maloney A, Sullivan JK, Singh S, Millson SH, Clarke PA, Naaby-Hansen S, Stein R, Cramer R, Mollapour M, Workman P, Piper PW, Pearl LH & Prodromou C (2002) Activation of the ATPase Activity of Hsp90 by the Stress-Regulated Cochaperone Aha1. *Mol Cell* **10**: 1307–1318
- Pedemonte N, Lukacs GL, Du K, Caci E, Zegarra-Moran O, Galiotta, Luis J V & Verkman AS (2005) Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest* **115**: 2564–2571
- Pedemonte N, Tomati V, Sondo E, Caci E, Millo E, Armirotti A, Damonte G, Zegarra-Moran O & Galiotta, Luis J V (2011) Dual activity of aminoarylthiazoles on the trafficking and gating defects of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel caused by cystic fibrosis mutations. *J Biol Chem* **286**: 15215–15226
- Phuan P, Veit G, Tan J, Roldan A, Finkbeiner WE, Lukacs GL & Verkman AS (2014) Synergy-based small-molecule screen using a human lung epithelial cell line yields  $\Delta$ F508-CFTR correctors that augment VX-809 maximal efficacy. *Mol Pharmacol* **86**: 42–51
- Phuan P, Yang B, Knapp JM, Wood AB, Lukacs GL, Kurth MJ & Verkman AS (2011) Cyanoquinolines with independent corrector and potentiator activities restore  $\Delta$ Phe508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel function in cystic fibrosis. *Mol Pharmacol* **80**: 683–693
- Pind S, Riordan JR & Williams DB (1994) Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem* **269**: 12784–12788
- Powers ET, Morimoto RI, Dillin A, Kelly JW & Balch WE (2009) Biological and chemical approaches to diseases of proteostasis deficiency. *Annu Rev Biochem* **78**: 959–991
- Pratt WB & Toft DO (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med* **228**: 111–133
- Prodromou C, Roe SM, O'Brien R, Ladbury JE, Piper PW & Pearl LH (1997) Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* **90**: 65–75
- Prodromou C, Siligardi G, O'Brien R, Woolfson DN, Regan L, Panaretou B, Ladbury JE, Piper PW & Pearl LH (1999) Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones. *EMBO J* **18**: 754–762
- Reddy MM & Quinton PM (2001) Selective activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> conductances. *JOP* **2**: 212–218

- Ren HY, Grove DE, De La Rosa, Oxana, Houck SA, Sopha P, van Goor F, Hoffman BJ & Cyr DM (2013) VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1. *Mol Biol Cell* **24**: 3016–3024
- Retzlaff M, Hagn F, Mitschke L, Hessling M, Gugel F, Kessler H, Richter K & Buchner J (2010) Asymmetric Activation of the Hsp90 Dimer by Its Cochaperone Aha1. *Mol Cell* **37**: 344–354
- Riggs DL, Cox MB, Cheung-Flynn J, Prapapanich V, Carrigan PE & Smith DF (2004) Functional specificity of co-chaperone interactions with Hsp90 client proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **39**: 279–295
- Riordan JR (2008) CFTR Function and Prospects for Therapy. *Annu Rev Biochem.* **77**: 701–726
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N & Chou JL (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**: 1066–1073
- Robert R, Carlile GW, Liao J, Balghi H, Lesimple P, Liu N, Kus B, Rotin D, Wilke M, de Jonge, H. R., Scholte BJ, Thomas DY & Hanrahan JW (2010) Correction of the Phe508 Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Trafficking Defect by the Bioavailable Compound Glafenine. *Mol Pharmacol* **77**: 922–930
- Robert R, Carlile GW, Pavel C, Liu N, Anjos SM, Liao J, Luo Y, Zhang D, Thomas DY & Hanrahan JW (2008) Structural analog of sildenafil identified as a novel corrector of the F508del-CFTR trafficking defect. *Mol Pharmacol* **73**: 478–489
- Rodon C & Höhfeld J (2010) Proteostase – Chaperone als Begleiter von der Wiege bis zum Grabe. *Biospektrum* **16**: 413–417
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D & Hidaka N (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**: 1059–1065
- Rowe SM & Verkman AS (2013) Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Correctors and Potentiators. *Cold Spring Harb Perspect Med* **3**: a009761
- Rubenstein RC, Egan ME & Zeitlin PL (1997) In vitro pharmacologic restoration of CFTR-mediated chloride transport with sodium 4-phenylbutyrate in cystic fibrosis epithelial cells containing delta F508-CFTR. *J Clin Invest* **100**: 2457–2465
- Rubenstein RC & Zeitlin PL (2000) Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**: C259-67



- Sadoul K, Boyault C, Pabion M & Khochbin S (2008) Regulation of protein turnover by acetyltransferases and deacetylases. *Biochimie* **90**: 306–312
- Sanchez ER, Toft DO, Schlesinger MJ & Pratt WB (1985) Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. *J Biol Chem* **260**: 12398–12401
- Sato S, Ward CL, Krouse ME, Wine JJ & Kopito RR (1996) Glycerol Reverses the Misfolding Phenotype of the Most Common Cystic Fibrosis Mutation. *J Biol Chem* **271**: 635–638
- Sens B & Stern M (2012) *Berichtsband: Qualitätssicherung Mukoviszidose 2011*. Hippocampus Verlag, Bad Honnef
- Sharma M, Benharouga M, Hu W & Lukacs GL (2001) Conformational and temperature-sensitive stability defects of the delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in post-endoplasmic reticulum compartments. *J Biol Chem* **276**: 8942–8950
- Sharma M, Pampinella F, Nemes C, Benharouga M, So J, Du K, Bache KG, Papsin B, Zerangue N, Stenmark H & Lukacs GL (2004) Misfolding diverts CFTR from recycling to degradation: quality control at early endosomes. *J Cell Biol* **164**: 923–933
- Sierecki E, Stevers LM, Giles N, Polinkovsky ME, Moustaqil M, Mureev S, Johnston WA, Dahmer-Heath M, Skalamera D, Gonda TJ, Gabrielli B, Collins BM, Alexandrov K & Gambin Y (2014) Rapid mapping of interactions between Human SNX-BAR proteins measured in vitro by AlphaScreen and single-molecule spectroscopy. *Mol Cell Proteomics* **13**: 2233–2245
- Siligardi G, Panaretou B, Meyer P, Singh S, Woolfson DN, Piper PW, Pearl LH & Prodromou C (2002) Regulation of Hsp90 ATPase activity by the co-chaperone Cdc37p/p50cdc37. *J Biol Chem* **277**: 20151–20159
- Skach WR (2000) Defects in processing and trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Kidney Int* **57**: 825–831
- Sreedhar AS, Kalmár E, Csermely P & Shen Y (2004) Hsp90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *FEBS Lett* **562**: 11–15
- Stepanova L, Leng X, Parker SB & Harper JW (1996) Mammalian p50Cdc37 is a protein kinase-targeting subunit of Hsp90 that binds and stabilizes Cdk4. *Genes Dev* **10**: 1491–1502
- Sun F, Mi Z, Condliffe SB, Bertrand CA, Gong X, Lu X, Zhang R, Latoche JD, Pilewski JM, Robbins PD & Frizzell RA (2008) Chaperone displacement from mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator restores its function in human airway epithelia. *FASEB J* **22**: 3255–3263
- Swiatecka-Urban A, Brown A, Moreau-Marquis S, Renuka J, Coutermarsh B, Barnaby R, Karlson KH, Flotte TR, Fukuda M, Langford GM & Stanton BA (2005) The short apical

membrane half-life of rescued {Delta}F508-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) results from accelerated endocytosis of {Delta}F508-CFTR in polarized human airway epithelial cells. *J Biol Chem* **280**: 36762–36772

Taipale M, Jarosz DF & Lindquist S (2010) HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nature reviews. Mol Cell Biol* **11**: 515–528

Tripathi V, Darnauer S, Hartwig NR & Obermann, Wolfgang M J (2014) Aha1 can act as an autonomous chaperone to prevent aggregation of stressed proteins. *J Biol Chem* **289**: 36220–36228

Tripathi V & Obermann, Wolfgang M J (2013) A primate specific extra domain in the molecular chaperone Hsp90. *PLoS ONE* **8**: e71856

Tsui LC (1992) The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet* **8**: 392–398

(2014) *Two 24-Week Phase 3 Studies of Lumacaftor in Combination with Ivacaftor Met Primary Endpoint with Statistically Significant Improvements in Lung Function (FEV1) in People with Cystic Fibrosis who have Two Copies of the F508del Mutation*, Cambridge, Mass.

Valenzuela-Fernández A, Cabrero JR, Serrador JM & Sánchez-Madrid F (2008) HDAC6: a key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. *Trends Cell Biol* **18**: 291–297

van Goor F (2006) Rescue of F508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**: L1117-L1130

van Goor F, Hadida S, Grootenhuis, P. D. J., Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M & Negulescu PA (2011) Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 18843–18848

van Goor F, Hadida S, Grootenhuis, Peter D J, Burton B, Cao D, Neuberger T, Turnbull A, Singh A, Joubran J, Hazlewood A, Zhou J, McCartney J, Arumugam V, Decker C, Yang J, Young C, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA & Ashlock M et al (2009) Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci* **106**: 18825–18830

van Goor F, Straley KS, Cao D, Gonzalez J, Hadida S, Hazlewood A, Joubran J, Knapp T, Makings LR, Miller M, Neuberger T, Olson E, Panchenko V, Rader J, Singh A, Stack JH, Tung R, Grootenhuis, Peter D J & Negulescu P (2006) Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**: L1117-30

- van Meegen MA, Terheggen S, Koymans KJ, Vijftigschild L, Dekkers JF, van der Ent, C.K. & Beekman JM (2013) CFTR-mutation specific applications of CFTR-directed monoclonal antibodies. *J Cyst Fibros* **12**: 487–496
- Vergani P, Lockless SW, Nairn AC & Gadsby DC (2005) CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature* **433**: 876–880
- Wagstaff KM, Rawlinson SM, Hearps AC & Jans DA (2011) An AlphaScreen(R)-Based Assay for High-Throughput Screening for Specific Inhibitors of Nuclear Import. *J Biomol Screen* **16**: 192–200
- Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, Colombo C, Davies JC, De Boeck K, Flume PA, Konstan MW, Mc Colley SA, McCoy K, McKone EF, Munck A, Ratjen F, Rowe SM, Waltz D, Boyle MP (2015) Lumacaftor-Ivacaftor in Patients with Cystic Fibrosis Homozygous for Phe508del *CFTR*. *N Engl J Med* **373**: 220-231
- Wang F, Zeltwanger S, Hu S & Hwang T (2000) Deletion of phenylalanine 508 causes attenuated phosphorylation-dependent activation of CFTR chloride channels. *J Physiol* **524**: 637–648
- Wang X, Koulov AV, Kellner WA, Riordan JR & Balch WE (2008) Chemical and biological folding contribute to temperature-sensitive DeltaF508 CFTR trafficking. *Traffic* **9**: 1878–1893
- Wang X, Venable J, LaPointe P, Hutt DM, Koulov AV, Coppinger J, Gurkan C, Kellner W, Matteson J & Plutner H (2006) Hsp90 Cochaperone Aha1 Downregulation Rescues Misfolding of CFTR in Cystic Fibrosis. *Cell* **127**: 803–815
- Ward CL & Kopito RR (1994) Intracellular turnover of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. Inefficient processing and rapid degradation of wild-type and mutant proteins. *J Biol Chem* **269**: 25710–25718
- Ward CL, Omura S & Kopito RR (1995) Degradation of CFTR by the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Cell* **83**: 121–127
- Ward WH & Holdgate GA (2001) Isothermal titration calorimetry in drug discovery. *Prog Med Chem* **38**: 309–376
- Welsh MJ & Smith AE (1993) Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* **73**: 1251–1254
- Wessel D & Flügge UI (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* **138**: 141–143
- Wiseman T, Williston S, Brandts JF & Lin LN (1989) Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* **179**: 131–137

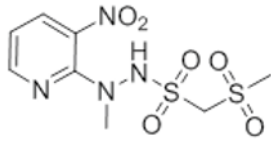
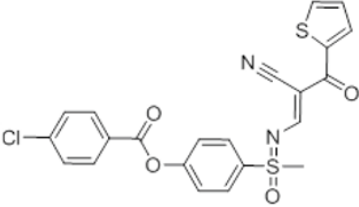
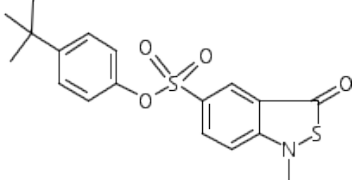
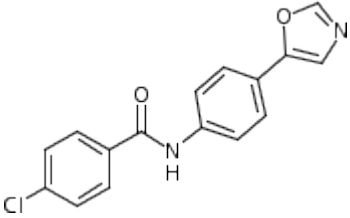
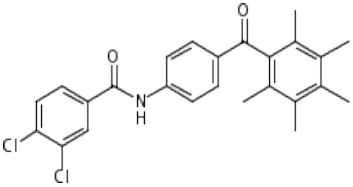
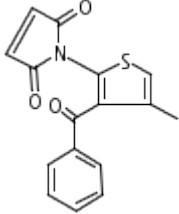
- Yang Y, Janich S, Cohn JA & Wilson JM (1993) The common variant of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is recognized by hsp70 and degraded in a pre-Golgi nonlysosomal compartment. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 9480–9484
- Yi F, Zhu P, Southall N, Inglese J, Austin CP, Zheng W & Regan L (2009) An AlphaScreen-based high-throughput screen to identify inhibitors of Hsp90-cochaperone interaction. *J Biomol Screen* **14**: 273–281
- Young JC & Hartl FU (2000) Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23. *EMBO J* **19**: 5930–5940
- Young JC, Obermann WM & Hartl FU (1998) Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90. *J Biol Chem* **273**: 18007–18010
- Zeitlin PL, Diener-West M, Rubenstein RC, Boyle MP, Lee, Carlton K K & Brass-Ernst L (2002) Evidence of CFTR function in cystic fibrosis after systemic administration of 4-phenylbutyrate. *Mol Ther* **6**: 119–126
- Zhang L, Button B, Gabriel SE, Burkett S, Yan Y, Skiadopoulou MH, Dang YL, Vogel LN, McKay T, Mengos A, Boucher RC, Collins PL & Pickles RJ (2009a) CFTR delivery to 25% of surface epithelial cells restores normal rates of mucus transport to human cystic fibrosis airway epithelium. *PLoS Biol* **7**: e1000155
- Zhang T, Li Y, Yu Y, Zou P, Jiang Y & Sun D (2009b) Characterization of celastrol to inhibit hsp90 and cdc37 interaction. *J Biol Chem* **284**: 35381–35389
- Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczak Z, Riordan JR, Rommens J & Tsui L (1991) Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Genomics* **10**: 214–228
- Zimmerman SB & Trach SO (1991) Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of Escherichia coli. *J Mol Biol* **222**: 599–620

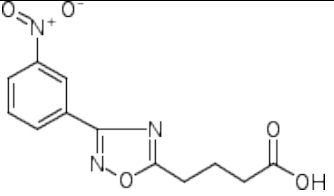
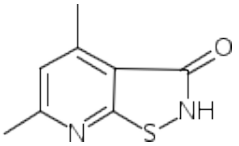
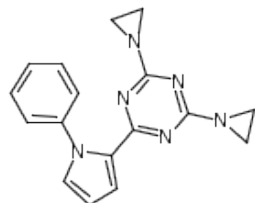
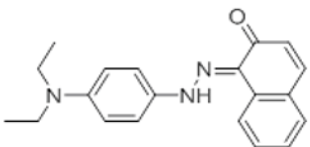
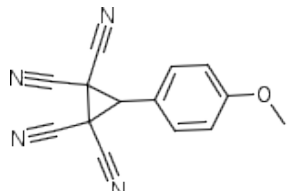
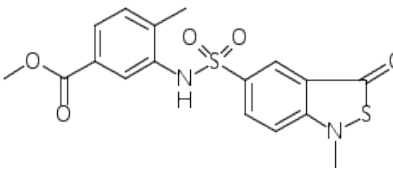
## 8 Anhang

Tab. 20: Die 25 im Alpha-Screen identifizierten Hsp90-Aha1 Inhibitoren geordnet nach ihrer Effektivität den Proteinkomplex zu inhibieren.

Inhibition des Hsp90-Aha1-Komplexes	Pseudonym	IUPAC-Name	Struktur
98-100 %	A2	'2-(3,5-dimethylisoxazol-4-yl)-4-(4-fluorophenyl)-1,2,4-thiadiazolane-3,5-dione (C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> F N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S)	
	A5	'N-[4-(3-chloro-4-methylphenyl)-5-methyl-1,3-thiazol-2-yl]-2-(2,4-dichlorophenoxy)acetamide (C <sub>19</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S)	
	A8	'2-(4-chlorophenoxy)-N-(6-quinoxalanyl)nicotinamide (C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> Cl N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	
	A9	'4-fluoro-N-[2-([1,3]thiazolo[5,4-b]pyridin-2-ylsulfanyl)-3-pyridinyl]benzamide (C <sub>18</sub> H <sub>11</sub> F N <sub>4</sub> O S <sub>2</sub> )	
	A10	'2-[3-(4-pyridyl)-1H-1,2,4-triazol-5-yl]pyridine (C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> N <sub>5</sub> )	
	A11	'2-(2-chloro-4-nitrophenyl)-4-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)-1,2,4-thiadiazolane-3,5-dione (C <sub>17</sub> H <sub>12</sub> Cl N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S)	

	A12	'2-[5-(2-pyridyl)-4H-1,2,4-triazol-3-yl]acetonitrile (C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub> )	
	A23	'2-chloro-3-(ethylthio)-1,4-dihydronaphthalene-1,4-dione (C <sub>12</sub> H <sub>9</sub> Cl O <sub>2</sub> S)	
	A26	'2-{1-[2-(2-fluoro-4-iodoanilino)-2-oxoethyl]cyclohexyl} acetic acid (C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> F I N O <sub>3</sub> )	
	A28	'N1-[6-hydroxy-2-(2-pyridyl)pyrimidin-4-yl]acetamide (C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> )	
96-97,9 %	A6	'1-[(4,5-dibromo-2-thienyl)sulfonyl]-4-[2-(2,5-dimethyl-1H-pyrrol-1-yl)ethyl]piperazine (C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> Br <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> )	
	A22	'2-(2-furylcarbonyl)-3-(5-nitro-2-thienyl)acrylonitrile (C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	
	A24	'4-(1-[(2-chlorophenyl)sulfonyl]imino)-1-methyl-lambda-4-sulfanyl)phenyl 4-chlorobenzoate (C <sub>20</sub> H <sub>15</sub> Cl <sub>2</sub> N O <sub>4</sub> S <sub>2</sub> )	

	A25	'N'-methyl-N'-(3-nitro-2-pyridyl)-methylsulfonyl methanesulfonohydrazide (C <sub>8</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> )	
	A29	'4-(1-([2-cyano-3-oxo-3-(2-thienyl)prop-1-enyl]imino)-1-methyl-1-oxo-lambda~6--sulfanyl)phenyl-4-chlorobenzoate (C <sub>22</sub> H <sub>15</sub> Cl N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub> )	
	A30	'4-(tert-butyl)phenyl-1-methyl-3-oxo-1,3-dihydrobenzo[c]isothiazole-5-sulfonate (C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> N O <sub>4</sub> S <sub>2</sub> )	
94-95,9 %	A13	'N1-[4-(1,3-oxazol-5-yl)phenyl]-4-chlorobenzamide (C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> Cl N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	
	A14	'N1-[4-(2,3,4,5,6-pentamethylbenzoyl)phenyl]-3,4-dichlorobenzamide (C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> Cl <sub>2</sub> N O <sub>2</sub> )	
	A20	'1-(3-benzoyl-4-methyl-2-thienyl)-1H-pyrrole-2,5-dione (C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N O <sub>3</sub> S)	

92-93,9 %	A4	'4-[3-(3-nitrophenyl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl]butanoic acid (C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> )	
	A15	'4,6-dimethylisothiazolo[5,4-b]pyridin-3(2H)-one (C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O S)	
	A19	'2,4-diaziran-1-yl-6-(1-phenyl-1H-pyrrol-2-yl)-1,3,5-triazine (C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> )	
90-91,9 %	A16	'1-{2-[4-(diethylamino)phenyl]hydrazono}-1,2-dihydronaphthalen-2-one (C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O)	
	A18	'3-(4-methoxyphenyl)cyclopropane-1,1,2,2-tetracarbonitrile (C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O)	
	A27	'methyl 4-methyl-3-[(1-methyl-3-oxo-1,3-dihydrobenzo[c]isothiazol-5-yl)sulfonyl]amino} Benzoate (C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> )	



**Tab. 21: Originaldaten und weiterführende Auswertung der Iodidefflux-Messungen für den CFTR-Kanal.** Gezeigt sind jeweils die Daten für den WT,  $\Delta F508$  sowie  $\Delta F508$ , der mit DMSO, VX-809, 26°C, A2, A10, A11, A12, A16, A24, A25, A28, VX-809 + A12 sowie VX-809 + A16 behandelt wurden. Der jeweilige niedrigste Werte vor dem Stimulationszeitraum (min 0 – min 4) ist dunkelgrau unterlegt.

Nal nmol/min					
BHK CFTR WT					
min	08.08.2014	13.08.2014	27.08.2014	15.10.2014	11.11.2014
-4	12,77	7,06	3,83	8,46	7,57
-3	5,52	5,05	3,75	6,87	5,69
-2	4,55	3,07	1,66	5,85	4,66
-1	4,73	3,15	1,67	4,36	3,58
0	4,92	3,32	0,83	3,75	3,02
1	7,31	6,82	1,55	6,19	3,78
2	50,44	50,56	42,88	37,34	43,38
3	11,69	8,59	3,03	13,96	11,55
4	2,44	2,84	1,95	5,74	7,04
5	1,75	1,80	1,68	3,22	4,09
6	1,13	1,73	0,92	2,06	2,67
7	0,89	1,65	0,64	1,51	2,06
8	0,77	1,22	0,46	1,35	1,65
9	0,82	1,16	0,32	1,26	1,51
10	0,88	1,13	0,30	1,27	1,37
	<b>Efflux abzüglich Baseline</b>				
min					
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	2,39	3,50	0,73	2,44	0,76
2	45,52	47,23	42,05	33,59	40,36
3	6,77	5,26	2,20	10,21	8,53
4	-2,48	-0,48	1,12	1,99	4,02
5			0,85	-0,53	1,08
6			0,09		-0,35
7			-0,19		
	<b>Fläche Einzeltrapeze</b>				
	1,20	1,75	0,36	1,22	0,38
	23,96	25,36	21,39	18,02	20,56
	26,15	26,25	22,12	21,90	24,45
	2,15	2,39	1,66	6,10	6,28
	-1,24	-0,24	0,98	0,73	2,55
		0,00	0,47	-0,26	0,36
			-0,05		-0,18

	Summe der Einzeltrapeze (AUC)					Mittelwert	Stabw
		53,45	55,75	46,99	47,97	54,57	51,75

## Nal nmol/min

BHK CFTRΔF508			
min	08.08.2014	18.09.2014	18.09.2014
-4	10,68	10,52	4,32
-3	6,17	4,58	2,92
-2	3,71	3,92	2,39
-1	4,91	2,19	2,03
0	5,57	1,58	1,75
1	3,28	1,52	1,06
2	3,45	1,63	1,20
3	3,61	1,87	1,34
4	3,14	1,70	1,25
5	1,88	1,15	0,85
6	1,41	1,07	0,63
7	1,11	0,97	0,59
8	1,04	0,94	0,58
9	0,85	0,94	0,57
10	0,95	0,91	0,55
	<b>Efflux abzüglich Baseline</b>		
min			
0	0,00	0,00	0,00
1	0,17	0,11	0,14
2	0,33	0,36	0,28
3	-0,14	0,18	0,19
4	-1,40	-0,37	-0,20
5			
6			
7			
	<b>Fläche Einzeltrapeze</b>		
	0,09	0,05	0,07
	0,25	0,23	0,21
	0,10	0,27	0,24
	-0,77	-0,09	-0,01

	<b>Summe der Einzeltrapeze (AUC)</b>				<b>Mittelwert</b>	<b>Stabw</b>
	0,44	0,56	0,52		0,51	0,06

## Nal nmol/min

<b>ΔF508 + DMSO</b>						
min	29.08.2014	02.09.2014	04.09.2014	18.09.2014	23.09.2014	
-4	5,81	6,25	4,55	5,96	2,62	
-3	3,20	2,42	3,62	2,71	2,30	
-2	2,27	1,69	2,26	2,35	1,89	
-1	1,69	1,25	2,05	1,55	1,67	
0	1,85	1,16	1,98	1,31	1,54	
1	1,81	0,59	1,30	1,00	1,60	
2	1,32	0,73	1,35	1,38	1,87	
3	1,44	0,90	1,61	1,23	1,64	
4	1,62	0,88	1,52	1,06	1,43	
5	1,35	0,59	0,93	0,72	1,25	
6	1,21	0,55	1,07	0,64	1,21	
7	0,88	0,50	0,78	0,62	0,69	
8	0,86	0,50	0,76	0,61	0,67	
9	0,83	0,49	0,74	0,61	0,67	
10	0,82	0,48	0,74	0,57	0,65	
	<b>Efflux abzüglich Baseline</b>					
min						
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
1	0,12	0,14	0,05	0,38	0,07	
2	0,30	0,31	0,32	0,22	0,34	
3	0,03	0,28	0,22	0,06	0,10	
4	-0,11	0,00	-0,37	-0,29	-0,11	
5						
6						
7						
	<b>Fläche Einzeltrapeze</b>					
	0,06	0,07	0,03	0,19	0,03	
	0,21	0,22	0,18	0,30	0,20	
	0,17	0,30	0,27	0,14	0,22	
	-0,04	0,14	-0,07	-0,11	0,00	
		0,00				
	<b>Summe der Einzeltrapeze (AUC)</b>					
						<b>Mittelwert Stabw</b>

0,44      0,73      0,48      0,63

0,45 | 0,55 | 0,13

## Nal nmol/min

**ΔF508 + VX-809 (5 μM)**

min	08.08.2014	29.08.2014	02.09.2014	04.09.2014
-4	7,38	1,22	5,31	5,22
-3	3,75	1,35	3,20	2,12
-2	3,00	0,56	2,13	1,46
-1	3,70	0,54	1,63	1,46
0	4,62	0,54	1,52	1,15
1	4,76	0,52	0,94	1,59
2	3,74	0,61	1,08	1,86
3	6,40	1,02	2,91	2,42
4	6,23	1,33	2,50	2,80
5	5,79	1,33	1,69	1,63
6	4,25	1,32	0,96	1,48
7	1,73	1,03	0,63	1,40
8	1,08	0,76	0,56	1,13
9	0,82	0,71	0,49	1,11
10	0,71	0,69	0,48	1,09

**Efflux  
abzüglich  
Baseline**

min	08.08.2014	29.08.2014	02.09.2014	04.09.2014
0	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,14	0,09	0,15	0,44
2	-0,88	0,50	1,97	0,71
3	1,79	0,81	1,56	1,28
4	1,61	0,81	0,76	1,65
5	1,18	0,80	0,03	0,49
6	-0,36	0,51	-0,31	0,33
7		0,24		0,26
		0,19		-0,01
		0,17		
		-0,52		

**Fläche  
Einzeltrapeze**

	0,07	0,05	0,07	0,22
	-0,37	0,29	1,06	0,58
	0,45	0,65	1,77	1,00
	1,70	0,81	1,16	1,47
	1,39	0,81	0,39	1,07
	0,41	0,65	-0,14	0,41
	-0,18	0,37		0,30
		0,21		0,12
		0,18		-0,01
		-0,17		

**Summe der  
Einzeltrapeze  
(AUC)**

	3,65	4,03	4,45	5,16
--	------	------	------	------

Mittelwert	Stabw
4,32	0,65

<b>Nal nmol/min</b>			
<b>ΔF508 + 26°C</b>			
<b>min</b>	<b>23.09.2014</b>	<b>23.09.2014</b>	<b>29.10.2014</b>
-4	4,22	4,83	7,44
-3	2,13	2,22	5,38
-2	1,78	1,86	4,47
-1	1,49	1,30	3,94
0	1,32	1,25	3,59
1	1,37	1,30	3,50
2	1,53	1,45	4,27
3	7,37	5,39	6,59
4	9,37	6,88	9,58
5	5,00	4,75	8,23
6	2,19	2,02	5,20
7	1,86	1,69	3,70
8	1,77	1,22	3,13
9	1,74	1,21	2,91
10	1,65	1,17	2,82
	<b>Efflux abzüglich Baseline</b>		
min			
0	0,00	0,00	0,00
1	0,05	0,04	0,77
2	0,21	0,20	3,08
3	6,06	4,14	6,07
4	8,05	5,62	4,73
5	3,69	3,50	1,70
6	0,87	0,77	0,20
7	0,55	0,44	-0,38
8	0,45	-0,03	
9	0,42		
10	0,33		
11	-1,32		
	<b>Fläche Einzeltrapeze</b>		
	0,03	0,02	0,38
	0,13	0,12	1,92

	3,13	2,17	4,58		
	7,05	4,88	5,40		
	5,87	4,56	3,21		
	2,28	2,13	0,95		
	0,71	0,60	-0,09		
	0,50	0,20			
	0,44	-0,02			
	0,38				
	-0,49				
	<b>Summe der Einzeltrapeze (AUC)</b>			<b>Mittelwert</b>	<b>Stabw</b>
	20,52	14,69	16,45	17,22	2,99

## Nal nmol/min

<b>ΔF508 + A2 (5 μM)</b>			
min	22.10.2014	22.10.2014	22.10.2014
-4	15,04	12,75	15,82
-3	6,86	7,80	5,98
-2	4,07	3,34	3,68
-1	3,29	2,83	2,85
0	2,76	2,21	2,19
1	3,05	2,61	2,57
2	2,81	2,36	2,34
3	2,26	1,52	2,26
4	1,87	1,40	1,73
5	1,55	1,32	1,48
6	1,42	1,16	1,37
7	1,38	1,09	1,28
8	1,33	1,05	1,30
9	1,23	0,94	1,23
10		0,89	1,13
	<b>Efflux abzüglich Baseline</b>		
min			
0	0,00	0,00	0,00
1	0,29	0,40	0,38
2	0,05	0,15	0,15
3	-0,49	-0,69	0,07
4			-0,46

5				
6				
7				
	<b>Fläche Einzeltrapeze</b>			
	0,15	0,20	0,19	
	0,17	0,27	0,26	
	-0,22	-0,27	0,11	
			-0,20	
	<b>Summe der Einzeltrapeze (AUC)</b>			
	0,32	0,47	0,56	
				<b>Mittelwert</b>
				<b>Stabw</b>
				0,45
				0,12

## Nal nmol/min

<b>ΔF508 + A10 (5 μM)</b>			
min	15.10.2014	15.10.2014	15.10.2014
-4	9,53	13,91	10,51
-3	2,51	3,96	3,61
-2	1,73	2,07	1,40
-1	1,30	1,57	0,96
0	1,06	1,27	0,94
1	1,08	1,38	1,12
2	0,98	1,02	0,89
3	0,83	0,85	0,82
4	0,68	0,52	0,74
5	0,63	0,41	0,65
6	0,52	0,34	0,58
7	0,48	0,32	0,56
8	0,47	0,29	0,49
9	0,46	0,28	0,47
10	0,46	0,24	0,45
	<b>Efflux abzüglich Baseline</b>		
min			
0	0,00	0,00	0,00
1	0,02	0,12	0,18
2	-0,08	-0,25	-0,05
3			

		<b>Fläche Einzeltrapeze</b>				
		0,01	0,06	0,09		
		-0,03	-0,07	0,06		
				-0,02		
		<b>Summe der Einzeltrapeze (AUC)</b>			<b>Mittelwert</b>	<b>Stabw</b>
		0,01	0,06	0,15	0,07	0,07

**Nal nmol/min**

<b>ΔF508 + A11 (5 μM)</b>			
<b>min</b>	<b>22.10.2014</b>	<b>22.10.2014</b>	<b>22.10.2014</b>
-4	27,81	6,75	1,90
-3	10,00	2,98	1,97
-2	6,26	2,48	1,83
-1	4,28	2,35	1,67
0	4,05	2,32	1,65
1	3,16	2,73	1,87
2	2,57	2,57	1,89
3	3,09	2,33	1,63
4	2,71	2,11	1,54
5	2,57	1,84	1,20
6	1,77	1,79	1,02
7	1,69	1,76	1,01
8	1,56	1,65	0,98
9	1,48	1,59	0,94
10	1,48	1,56	0,00
<b>Efflux abzüglich Baseline</b>			
min			
0	0,00	0,00	0,00
1	0,52	0,42	0,22
2	0,13	0,25	0,24
3	0,00	0,01	-0,02
4		-0,20	-0,11
5			





7	<b>Fläche Einzeltrapeze</b>				
	0,41	0,02	0,10		
	0,95	0,31	0,57		
	0,60	0,72	0,77		
	0,09	0,64	0,44		
	-0,05	0,40	0,08		
		0,01	-0,05		
		-0,18			
	<b>Summe der Einzeltrapeze (AUC)</b>			<b>Mittelwert</b>	<b>Stabw</b>
	2,05	2,09	1,96	2,03	0,07

## Nal nmol/min

ΔF508 + A16 (5 μM)			
min	02.09.2014	02.09.2014	08.10.2014
-4	3,52	5,89	1,71
-3	2,78	3,56	1,38
-2	1,90	3,30	1,26
-1	1,70	2,66	1,03
0	1,64	1,97	0,97
1	1,54	1,57	0,89
2	1,76	1,77	1,00
3	2,04	2,44	1,49
4	2,11	2,25	1,74
5	1,81	2,07	0,94
6	1,77	1,55	0,70
7	1,71	1,51	0,56
8	1,57	1,43	0,54
9	1,20	1,46	0,53
10	1,19	1,48	0,51
	<b>Efflux abzüglich Baseline</b>		
min			
0	0,00	0,00	0,00
1	0,22	0,21	0,11
2	0,49	0,87	0,60

3	0,57	0,69	0,85		
4	0,27	0,51	0,05		
5	0,23	-0,02	-0,19		
6	0,16				
7	0,03				
	-0,34				
	<b>Fläche Einzeltrapeze</b>				
	0,11	0,10	0,05		
	0,35	0,54	0,35		
	0,53	0,78	0,72		
	0,42	0,60	0,45		
	0,25	0,25	-0,07		
	0,20	-0,01	-0,10		
	0,10				
	-0,15				
	<b>Summe der Einzeltrapeze (AUC)</b>			<b>Mittelwert</b>	<b>Stabw</b>
	1,96	2,27	1,58	1,93	0,35

## Nal nmol/min

<b>ΔF508 + A24 (5 μM)</b>			
<b>min</b>	<b>04.09.2014</b>	<b>04.09.2014</b>	<b>08.10.2014</b>
-4	5,58	2,04	5,05
-3	2,03	1,61	3,15
-2	1,43	1,15	2,75
-1	1,40	1,07	2,45
0	1,30	1,05	2,14
1	1,64	1,38	2,59
2	1,46	1,33	2,31
3	1,39	1,15	2,14
4	1,15	1,06	2,09
5	0,82	1,03	1,79
6	0,86	0,98	1,59
7	0,61	0,94	1,24
8	0,61	0,93	1,15
9	0,60	0,92	1,14
10	0,59	0,93	1,10



	<b>Efflux abzüglich Baseline</b>				
<b>min</b>					
<b>0</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>1</b>	0,11	0,27	0,19		
<b>2</b>	0,21	0,19	0,30		
<b>3</b>	0,01	0,01	0,02		
<b>4</b>	-0,13	-0,28	0,01		
<b>5</b>			-0,27		
<b>6</b>					
	<b>Fläche Einzeltrapeze</b>				
	0,06	0,14	0,10		
	0,16	0,23	0,25		
	0,11	0,10	0,16		
	-0,06	-0,14	0,01		
			-0,13		
	<b>Summe der Einzeltrapeze (AUC)</b>			<b>Mittelwert</b>	<b>Stabw</b>
	0,33	0,46	0,52	0,44	0,10

**Nal nmol/min**

<b>ΔF508 + A28 (5 μM)</b>			
<b>min</b>	<b>15.10.2014</b>	<b>15.10.2014</b>	<b>15.10.2014</b>
-4	2,54	11,55	3,80
-3	2,59	5,63	3,18
-2	2,14	3,61	2,88
-1	1,90	3,15	2,77
<b>0</b>	<b>1,53</b>	<b>3,43</b>	<b>2,67</b>
<b>1</b>	<b>1,78</b>	<b>3,75</b>	<b>2,92</b>
<b>2</b>	<b>1,59</b>	<b>2,63</b>	<b>2,86</b>
<b>3</b>	<b>1,38</b>	<b>1,68</b>	<b>2,52</b>
<b>4</b>	<b>1,12</b>	<b>1,53</b>	<b>2,38</b>
<b>5</b>	<b>1,02</b>	<b>1,21</b>	<b>2,26</b>
<b>6</b>	<b>0,98</b>	<b>1,09</b>	<b>2,07</b>
<b>7</b>	<b>0,96</b>	<b>1,06</b>	<b>2,05</b>

8	0,92	1,04	1,96		
9	0,88	1,02	1,91		
10	0,87	0,98	1,83		
	<b>Efflux abzüglich Baseline</b>				
min					
0	0,00	0,00	0,00		
1	0,24	0,28	0,25		
2	0,05	0,60	0,20		
3		-0,52	-0,15		
4					
	<b>Fläche Einzeltrapeze</b>				
	0,12	0,14	0,13		
	0,15	0,44	0,22		
	0,03	0,04	0,02		
	0,00	-0,26	-0,07		
	<b>Summe der Einzeltrapeze (AUC)</b>			<b>Mittelwert</b>	<b>Stabw</b>
	0,29	0,62	0,37	0,43	0,17

## Nal nmol/min

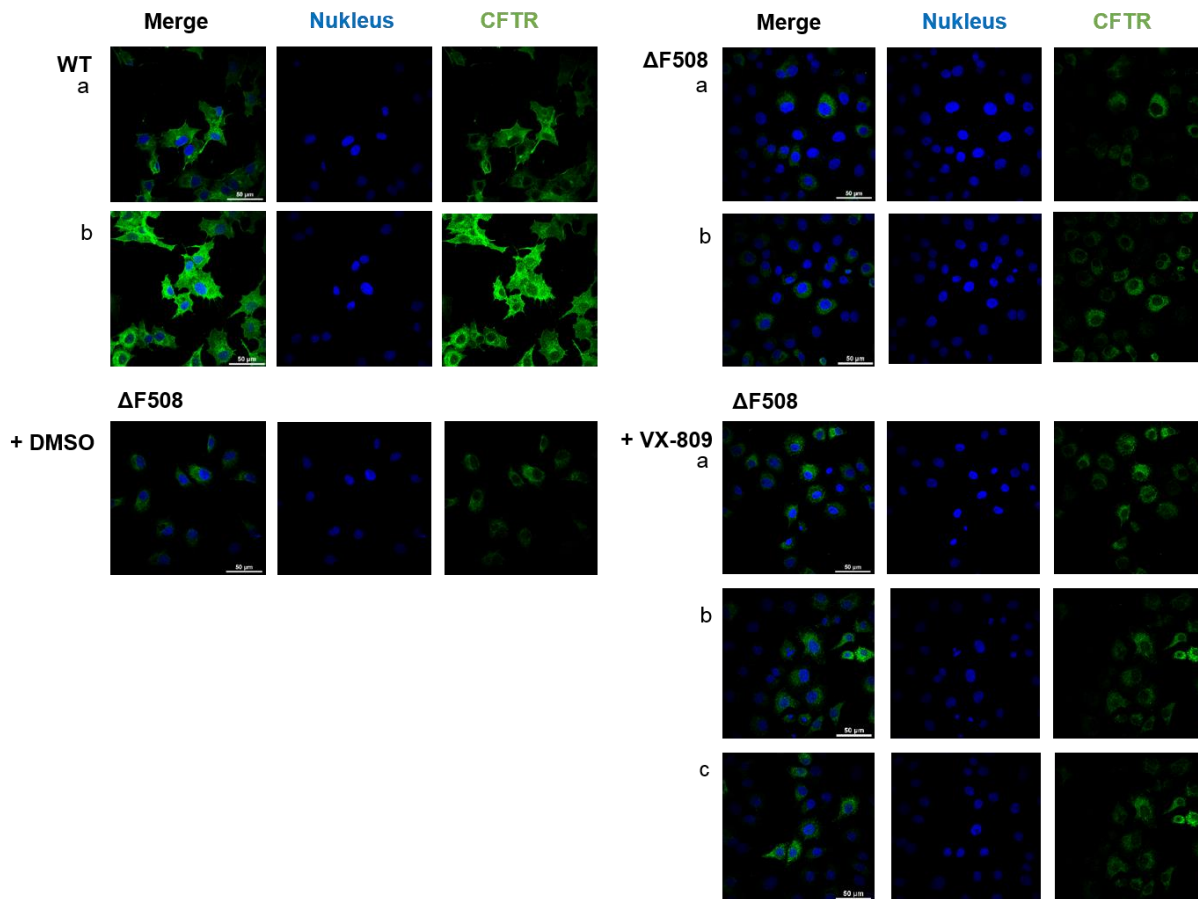
<b>ΔF508 + A12 + VX-809 (5 μM)</b>			
min	04.11.2014	04.11.2014	04.11.2014
-4	6,11	7,80	7,37
-3	5,07	6,21	6,86
-2	4,87	4,90	6,83
-1	4,63	4,79	6,52
0	4,34	4,44	5,95
1	3,93	4,77	6,43
2	3,99	5,13	6,93
3	4,49	7,09	7,51
4	10,00	10,03	11,86

<b>5</b>	9,33	9,19	10,58		
<b>6</b>	8,20	7,71	9,16		
<b>7</b>	7,12	6,67	7,80		
<b>8</b>	5,82	5,52	6,65		
<b>9</b>	4,23	4,37	6,23		
<b>10</b>	3,74	4,29	5,91		
	<b>Efflux abzüglich Baseline</b>				
<b>min</b>					
<b>0</b>	0,00	0,00	0,00		
<b>1</b>	0,06	0,33	0,47		
<b>2</b>	0,56	0,69	0,98		
<b>3</b>	6,07	2,65	1,56		
<b>4</b>	5,40	5,59	5,91		
<b>5</b>	4,27	4,75	4,63		
<b>6</b>	3,19	3,27	3,20		
<b>7</b>	1,89	2,23	1,85		
<b>8</b>	0,30	1,08	0,70		
<b>9</b>	-0,19	-0,07	0,28		
<b>10</b>		-0,15	-0,05		
	<b>Fläche Einzeltrapeze</b>				
	0,03	0,17	0,24		
	0,31	0,51	0,73		
	3,31	1,67	1,27		
	5,73	4,12	3,73		
	4,84	5,17	5,27		
	3,73	4,01	3,92		
	2,54	2,75	2,53		
	1,09	1,66	1,27		
	0,05	0,50	0,49		
	-0,09	-0,11	0,12		
			-0,02		
	<b>Summe der Einzeltrapeze (AUC)</b>			<b>Mittelwert</b>	<b>Stabw</b>
	21,64	20,58	19,55	20,59	1,04

Nal nmol/min			
<b>ΔF508 + A16 + VX-809 (5 μM)</b>			
min	04.11.2014	04.11.2014	04.11.2014
-4	11,00	3,96	4,99
-3	5,83	3,35	4,01
-2	4,89	3,07	3,80
-1	4,67	2,83	3,58
0	4,26	2,80	3,28
1	3,98	2,86	3,49
2	4,24	2,70	3,34
3	4,48	3,74	3,85
4	8,30	8,03	7,38
5	6,79	6,48	6,51
6	5,62	4,85	5,30
7	4,27	3,48	4,50
8	3,61	2,69	3,55
9	3,05	2,54	3,28
10	2,75	2,47	3,13
	<b>Efflux abzüglich Baseline</b>		
min			
0	0,00	0,00	0,00
1	0,26	1,03	0,21
2	0,50	5,33	0,06
3	4,32	3,78	0,57
4	2,81	2,15	4,10
5	1,64	0,78	3,23
6	0,29	-0,01	2,02
7	-0,37		1,22
8			0,27
9			0,00
10			-0,15
	<b>Fläche Einzeltrapeze</b>		
	0,13	0,52	0,11
	0,38	3,18	0,13
	2,41	4,55	0,31
	3,57	2,96	2,33
	2,22	1,46	3,66

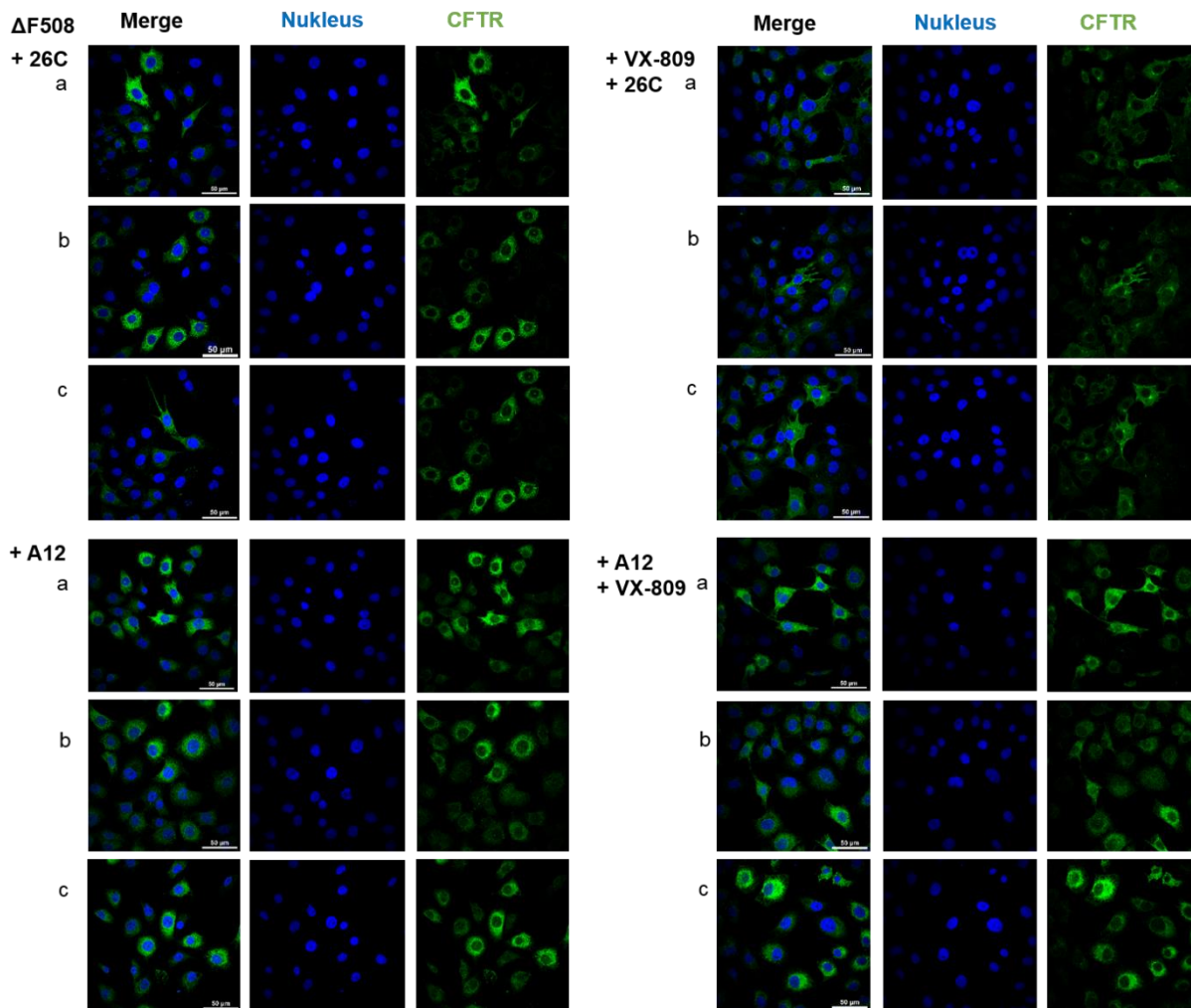


	0,97	0,38	2,62		
	-0,04	-0,01	1,62		
			0,74		
			0,14		
			-0,07		
	<b>Summe der Einzeltrapeze (AUC)</b>			<b>Mittelwert</b>	<b>Stabw</b>
	9,67	13,05	11,67	11,46	1,70



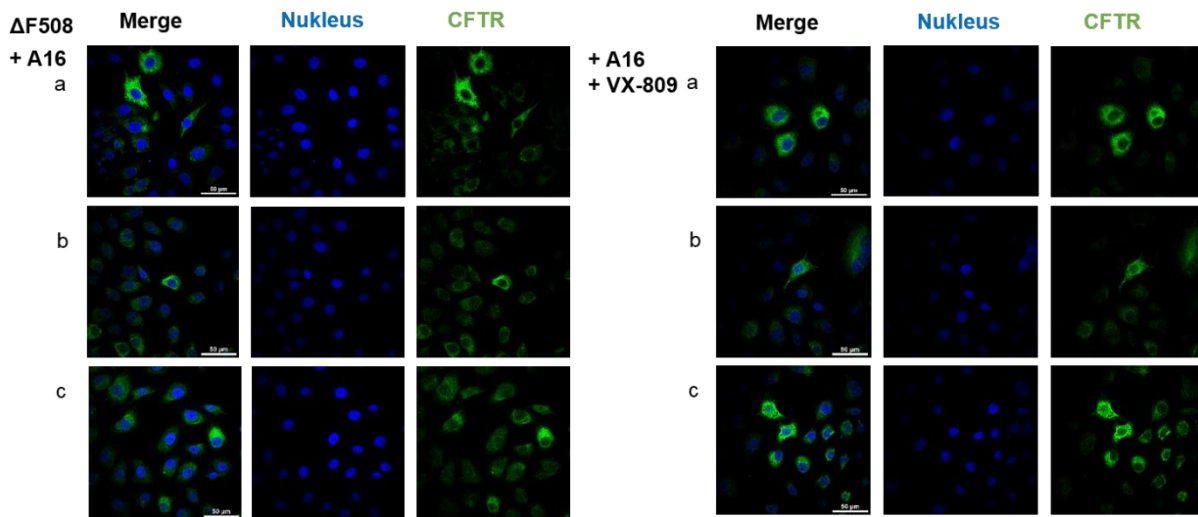
**Abb. 31 Übersicht aller Immunfluoreszenzbilder für unbehandelte BHK CFTR WT- und  $\Delta$ F508-Zellen sowie BHK $\Delta$ F508-Zellen, die mit der Trägersubstanz DMSO und mit VX-809 behandelt wurden.**

Für die verschiedenen Bedingungen sind jeweils mehrere Bilder aus einer Schale abgebildet (a-c). Deutlich zu sehen ist die Variationsbreite der CFTR-Expression in den Zellen einer Schale. Der Maßstab beträgt 50  $\mu$ M. n = 1.



**Abb. 32 Übersicht aller Immunfluoreszenzbilder für BHK CFTR $\Delta$ F508-Zellen, die mit Niedrigtemperatur (26°C), VX-809 + 26°C, dem Hsp90-Aha1 Inhibitor A12 sowie A12 + VX-809 behandelt wurden.**

Für die verschiedenen Bedingungen sind jeweils mehrere Bilder aus einer Schale abgebildet (a-c). Deutlich zu sehen ist die Variationsbreite der CFTR-Expression in den Zellen einer Schale. Der Maßstab beträgt 50  $\mu$ M. n = 1.



**Abb. 33 Übersicht aller Immunfluoreszenzbilder für BHK CFTR $\Delta$ F508-Zellen, die mit dem Hsp90-Aha1 Inhibitor A16 sowie A16 + VX-809 behandelt wurden.**

Für die verschiedenen Bedingungen sind jeweils mehrere Bilder aus einer Schale abgebildet (a-c). Deutlich zu sehen ist die Variationsbreite der CFTR-Expression in den Zellen einer Schale. Der Maßstab beträgt 50  $\mu$ M. n = 1.

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
1	Struktur und Aktivierung des CFTR-Kanals.	3
2	Mutationsklassen im CFTR-Gen.	5
3	Wirkungsweise von molekularen Chaperonen im Proteostase-Netzwerk.	9
4	Schematische Darstellung des Hsp90-Zyklus von Kinasen	11
5	Schematische Darstellung der Erkennung und Degradation von fehlgefaltetem CFTR $\Delta$ F508.	15
6	In dieser Arbeit verwendete Vektoren.	29
7	Schematische Darstellung eines Iodidefflux-Assays.	40
8	Schematische Darstellung der Berechnung der AUC einer Iodidefflux-Kurve.	42
9	Schematische Darstellung des Funktionsprinzips der Alpha-Technologie.	45
10	Counterscreen zum Ausschluss von falsch-positiven Hsp90-Aha1-Inhibitoren.	48
11	Expression und Aufreinigung von His-Hsp90 $\alpha$ und His-Aha1.	49
12	Die Proteine His-Hsp90 und His-Aha1 bildeten einen stabilen Chaperonkomplex.	51
13	Expression und Aufreinigung von GST-Aha1.	52
14	His-Hsp90 und GST-Aha1 interagieren miteinander.	53
15	Es ist keine Interaktion zwischen His-Hsp90 und GST nachweisbar.	54
16	Die Interaktion von His-Hsp90 und GST-Aha1 generierte Chemilumineszenz.	55
17	Identifikation von Hsp90-Aha1 Inhibitoren mittels Alpha-Technologie.	57
18	30 Substanzen wurden als Inhibitoren des Hsp90-Aha1 Komplexes identifiziert.	58
19	Die Substanzen A3 und A17 zeigten einen starken zytotoxischen Effekt auf BHK-Zellen.	60
20	8 Hsp90-Aha1-Inhibitoren wurden für das Iodidefflux-Assay ausgewählt.	61
21	Forskolin und Genistein stimulierten den mutierten CFTR-Kanal nur geringfügig.	63
22	Die Behandlung von BHK $\Delta$ F508 mit VX-809 und Niedrigtemperatur ließen den Iodid-Ausstrom ansteigen.	64
23	Die Substanzen A12 und A16 steigerten den Iodidefflux um das 2,5-fache.	65

24	VX-809 und A12 bzw. A16 wirkten synergistisch auf den CFTR $\Delta$ F508.	66
25	Der Potenziator Genistein weist eine höhere Wirksamkeit auf als VX-770.	67
26	Durch Behandlung mit A12 + VX-809 erreichte $\Delta$ F508 fast 40 % der Aktivität des Wildtyps	68
27	CFTR wird im Wildtyp (WT) jedoch nicht in $\Delta$ F508 exprimierenden BHK-Zellen in der apikalen Zellmembran exprimiert.	69
28	Apikale Expression von $\Delta$ F508 nach Behandlung mit VX-809 und 26°C.	70
29	Eine Behandlung von BHK $\Delta$ F508 Zellen mit A12 + VX-809 führte zu einer apikalen $\Delta$ F508-Expression.	71
30	A16 und A16 + VX-809 verstärken nicht die Reifung des CFTR $\Delta$ F508.	72
31	Übersicht aller Immunfluoreszenzbilder für unbehandelte BHK CFTR WT- und $\Delta$ F508-Zellen sowie BHK $\Delta$ F508-Zellen, die mit der Trägersubstanz DMSO und mit VX-809 behandelt wurden.	125
32	Übersicht aller Immunfluoreszenzbilder für BHK CFTR $\Delta$ F508-Zellen, die mit Niedrigtempertur (26°C), VX-809 + 26°C, dem	126
33	Übersicht aller Immunfluoreszenzbilder für BHK CFTR $\Delta$ F508-Zellen, die mit dem Hsp90-Aha1 Inhibitor A16 sowie A16 + VX-809	127

# 10 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle</b>	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
1	Bakterienstämme zur Transformation	16
2	Verwendete Zelllinien und ihre Herkunft	16
3	Restriktionsenzyme und ihre Erkennungssequenzen	16
4	Nukleasen	17
5	Ligasen	17
6	Glucosidasen	17
7	Phosphatasen	18
8	Verwendete Antibiotika	18
9	Puffer und Lösungen in alphabetischer Reihenfolge	18
10	Verwendete Chemikalien in alphabetischer Reihenfolge	21
11	Verwendete Antikörper und Farbstoffe für Zellfärbungen	23
12	Verwendete Verbrauchsmaterialien in alphabetischer Reihenfolge	24
13	Verwendete Chromatographiesäulen für Anionenaustausch und Gelfiltration	24
14	Geräte im Labor in alphabetischer Reihenfolge	25
15	In dieser Arbeit verwendete Konstrukte	27
16	Benötigte Zellzahlen zur Durchführung des Iodidefflux-Assays	38
17	Berechnung der AUC anhand des in Abbildung X gezeigten Kurvenbeispiels	42
18	Benötigte Zellzahlen für die Immunfluoreszenzfärbung	43
19	Komponenten des Alpha-Screens und ihre Konzentration	47
20	Die 25 im Alpha-Screen identifizierten Hsp90-Aha1 Inhibitoren geordnet nach ihrer Effektivität den Proteinkomplex zu inhibieren	104
21	Originaldaten und weitere Auswertung der Iodidefflux-Messungen für den CFTR-Kanal	108

# 11 Abkürzungen und Worterklärungen

°C	Grad Celsius
μ	Mikro
Abb.	Abbildung
Aha1	<b>Activator of Hsp90 ATPase 1</b>
APS	<b>Ammoniumpersulfat</b>
ATP	<b>Adenosintriphosphat</b>
bp	<b>Basenpaare</b>
BSA	<b>Bovine Serum Albumin</b>
c	centi
Ca <sup>2+</sup>	<b>Calcium</b>
cAMP	cyclisches <b>Adenosinmonophosphat</b>
CFTR	<b>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</b>
CHIP	<b>C-terminus of Hsc70-interacting protein</b>
C-Term	<b>Carboxy-Terminus</b>
Cy2	<b>Cyanin-2</b>
DAPI	<b>4',6-Diamidin-2-phenyl-indol</b>
DMSO	<b>Dimethylsulfoxid</b>
DNA	<b>Desoxyribonukleinsäure</b>
dNTP	<b>2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat</b>
DTT	<b>Dithiothreitol</b>
<i>E.coli</i>	<b><i>Escherichia coli</i></b>
ER	<b>Endoplasmatisches Retikulum</b>
ERAD	<b><i>Endoplasmic reticulum-associated degradation</i></b>
et al.	et alii (und andere)
g	Gramm
GERAD	<b><i>Glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation</i></b>
GST	<b>Glutathion S-Transferase</b>
h	hora (Stunde)
Hch-1	<b><i>high copy Hsp90 suppressor 1</i></b>
HEPES	<b>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</b>
hERG	<b><i>human ether-à-go-go related gene</i></b>
His <sub>6</sub>	6x-Polyhistidin Anhang
HOP	<b>Hsp70-Hsp90 organizing protein</b>
HRP	<b><i>Horseradish peroxidase</i></b>
Hsc70	<b><i>Heat shock cognate 70</i></b>
Hsp70	<b>Hitzeschockprotein 70</b>
Hsp90	<b>Hitzeschockprotein 90</b>
I <sup>-</sup>	Iodid-Ion
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	<b>Kilobasen</b>
kDa	<b>Kilodalton</b>
l	Liter
LB	Luria-Broth Medium
M	Mol
m	Milli
min	Minute



n	<i>number</i> (Anzahl der durchgeführten Experimente)
Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>
N-Term	Amino-Terminus
OD	optische <b>D</b> ichte
PAGE	<b>P</b> olyacrylamid- <b>G</b> eleelektrophorese
PBS	<b>P</b> hosphate- <b>b</b> uffered <b>s</b> aline
PCR	<b>P</b> olymerase <b>c</b> hain <b>r</b> eaction
PFA	<b>P</b> araformaldehyd
P-gp	<b>P</b> - <b>G</b> lykoprotein
PMSF	<b>P</b> henylmethansulfonylfluorid
PP5	<b>P</b> roteinphosphatase 5
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	<b>R</b> aumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<b>S</b> odium <b>d</b> odecyl <b>s</b> ulfate
Tab.	Tabelle
TBST	<b>T</b> ris <b>B</b> uffered <b>S</b> aline + <b>T</b> ween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
UV	<b>U</b> ltraviolett
üN	<b>ü</b> ber <b>N</b> acht
V	Volt
WT	<b>W</b> ildtyp

## 12 Danksagung

Ich danke insbesondere PD Dr. Wolfgang Obermann für die Möglichkeit, an diesem interessanten und anspruchsvollen Thema unter seiner Führung gearbeitet haben zu dürfen. Sein wissenschaftlicher Rat und seine Hilfestellungen waren stets willkommen.

Des Weiteren danke ich Prof. Dr. Wolfgang Linke für die Bereitstellung aller notwendigen Räumlichkeiten und steter Unterstützung dieses Projekts seinerseits.

Ein riesiger Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Kardiovaskuläre Physiologie, ohne die die Meisterung einer solchen Arbeit sicher nicht möglich gewesen wäre. Vielen Dank für die tolle Integration ins Team und all die großen und kleinen Hilfen, die ihr in den drei Jahren geleistet habt. Hervorzuheben sind dabei besonders Nadine Hartwig, Dr. Vishwadeepak Tripathi, Stefanie Darnauer, Claudia Groll, Holger Alheite und Dr. Judith Krysiak.

Ebenfalls möchte ich besonders Michelle Duparc danken, die Tag und Nacht ein offenes Ohr für die großen und kleinen Probleme jeglicher Natur hatte und immer sofort geholfen hat wo sie konnte!

Selbstverständlich bedanke ich mich herzlichst bei der Mukoviszidose Institut GmbH für die jahrelange Forschungsförderung.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei den fleißigen Helfern bedanken, die unzählige Male auf Inhalt, Punkt und Komma Korrektur gelesen haben: Daniela Ihrig, Nadine Hartwig, Dr. Judith Krysiak, Dr. Anika Hunfeld und Dr. Johannes Möller. Zudem wäre die Abgabe der Arbeit ohne die logistische, internationale Hilfe von Anika Hunfeld nur schwer möglich gewesen. Danke euch allen!

# 13 Kongressbeiträge

## 13.1 Vorträge

**Ihrig, V. & Obermann, W.:** “*Modulation of the Hsp90-Aha1 chaperone system to correct the folding deficiency of the CFTR  $\Delta F508$  protein in Cystic Fibrosis*”; 7<sup>th</sup> European CF Young Investigator Meeting, Paris, France, 2013

**Ihrig, V. & Obermann, W.:** “*Modulation of the Hsp90-Aha1 chaperone system to correct the folding deficiency of the CFTR  $\Delta F508$  protein in Cystic Fibrosis*”; 12<sup>th</sup> Scientific Meeting of Mukoviszidose e.V., Schloss Waldthausen, Germany, 2012

## 13.2 Poster

**Ihrig, V. & Obermann, W.:** “*Modulation of the Hsp90-Aha1 chaperone system to correct the folding defect of the CFTR  $\Delta F508$  protein in Cystic Fibrosis*” Research Day, Bochum, Germany, 2013

**Ihrig, V. & Obermann, W.:** “*Identification of drug-like molecules that modulate the Hsp90-Aha1 chaperone system to correct the folding defect of the CFTR  $\Delta F508$  protein in Cystic Fibrosis*”; EMBO “The biology of molecular chaperones: From molecules, organelles and cells to misfolding diseases”, Santa Margherita di Pula, Italy; 2013

**Ihrig, V. & Obermann, W.:** “*Identification of drug-like molecules that modulate the Hsp90-Aha1 chaperone system to correct the folding defect of the CFTR  $\Delta F508$  protein in Cystic Fibrosis*”, 7<sup>th</sup> European CF Young Investigator Meeting, Paris; France; 2013

## 14 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides Statt durch meine Unterschrift, dass ich die vorliegende Arbeit ausschließlich unter Anleitung meines wissenschaftlichen Betreuers und ohne unerlaubte Hilfe durchgeführt und verfasst habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt sowie wörtliche und sinngemäße Zitate kenntlich gemacht. Weiterhin erkläre ich, dass digitale Abbildungen nur die originalen Daten enthalten und in keinem Fall inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen wurde. Diese Arbeit wurde so oder in ähnlicher Form an noch keiner anderen Hochschule eingereicht. Es handelt sich bei der heute von mir eingereichten Arbeit um fünf in Wort und Schrift identische Exemplare.

Erstgutachter ist: PD Dr. W. Obermann

Als Zweitgutachter schlage ich vor: Prof. Dr. R. Stoll

Ort, Datum

Unterschrift

