

Untersuchung von Dihydroisochinolinonderivaten als mögliche Inhibitoren von Hsc70

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg



vorgelegt von
Christina Plank

2018

Angefertigt im Zeitraum von April 2014 bis Juni 2017 am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie in Kollaboration mit dem Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg.

Eingereicht am _____
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie, Universität Würzburg

Gutachter der schriftlichen Arbeit

1. Gutachter: _____

2. Gutachter: _____

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums

1. Prüfer: _____

2. Prüfer: _____

3. Prüfer: _____

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Das Multiple Myelom | 1 |
| 1.2 | Multiples Myelom und Hitzeschockproteine | 1 |
| 1.3 | Hitzeschockproteine 70 | 2 |
| 1.3.1 | Die Hsp70-Familie | 2 |
| 1.3.2 | Wichtige Mitglieder der Hsp70-Familie | 3 |
| 1.3.3 | Funktion, Struktur und Regulation von Hsc70 | 4 |
| 1.3.4 | Regulation von Hsc70 für die therapeutische Anwendung..... | 8 |
| 1.4 | Vorarbeiten und Zielsetzung | 11 |
| 2. | Ergebnisse und Diskussion | 13 |
| 2.1 | Optimierung der Aufreinigung von bHsc70 ED 1-554 | 13 |
| 2.1.1 | Aufreinigung über Ionenaustauscher..... | 13 |
| 2.1.2 | Aufreinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie | 15 |
| 2.1.3 | Aufreinigung als His ₆ -Fusionsprotein über Nickel-NTA-Beads | 16 |
| 2.1.4 | Optimierungsversuche zur Aufreinigung über Ionenaustauschersäulen..... | 18 |
| 2.2 | Aufreinigungsoptimierung verschiedener Proteine | 19 |
| 2.3 | Kristallisationsversuche | 21 |
| 2.3.1 | <i>Sitting Drop</i> -Kristallisation von pHsc70..... | 21 |
| 2.3.2 | Kristallisation von bHsc70 ED 1-554 unter Paraffinöl für <i>Soaking</i> -Versuche | 23 |
| 2.3.3 | Co-Kristallisation von bHsc70 ED 1-554 mit AH-Verbindungen unter Paraffinöl..... | 24 |
| 2.3.4 | <i>Soaking</i> -Versuche von bHsc70 ED 1-554 mit AH-Verbindungen und Ver-155008 | 24 |
| 2.4 | Tryptophan-Fluoreszenz | 26 |
| 2.5 | Mikrothermophorese | 28 |
| 2.6 | Luciferase-Rückfaltungsassays | 29 |
| 2.7 | Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration mittels NMR..... | 34 |
| 2.8 | Luciferase-Rückfaltungsversuche mit Tween 80 | 38 |
| 2.9 | Bestimmung von IC ₅₀ -Werten mittels Luciferase-Assay | 40 |
| 2.10 | Isothermale Titrationskalorimetrie | 45 |
| 3. | Ausblick | 48 |
| 4. | Zusammenfassung | 50 |
| 5. | Summary | 52 |
| 6. | Experimenteller Teil | 53 |
| 6.1 | Materialien | 53 |
| 6.1.1 | Antibiotika | 53 |

| | | |
|--------|--|----|
| 6.1.2 | Bakterienstämme | 53 |
| 6.1.3 | Protease-Inhibitoren | 53 |
| 6.1.4 | Verwendete Plasmide | 53 |
| 6.1.5 | Säulen für die Proteinaufreinigung | 54 |
| 6.1.6 | 12 % SDS-Gele | 54 |
| 6.1.7 | Primer und gebrauchsfertige Kits für die Klonierung | 54 |
| 6.2 | Methoden | 54 |
| 6.2.1 | Herstellung hitzekompetenter <i>E. coli</i> XL10 Gold Zellen | 54 |
| 6.2.2 | Transformation von <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock | 55 |
| 6.2.3 | Rekombinante Überexpression von Proteinen in <i>E. coli</i> | 55 |
| 6.2.4 | Aufschluss geernteter <i>E. coli</i> -Zellen mit Ultraschall | 55 |
| 6.2.5 | Aufreinigung von bovinem Hsc70 ED 1-554 über Ionenaustauscher | 56 |
| 6.2.6 | Klonierung von bHsc70 ED 1-554 in pETM-11 | 56 |
| 6.2.7 | Agarose-Gel | 57 |
| 6.2.8 | Aufreinigung von bovinem Hsc70 über Affinitätschromatographie | 57 |
| 6.2.9 | Aufreinigung von nativem Hsc70 aus Schweinehirn | 57 |
| 6.2.10 | Aufreinigung von hHsc70 über Affinitätschromatographie | 58 |
| 6.2.11 | Aufreinigung von SenP2 über Affinitätschromatographie | 58 |
| 6.2.12 | Aufreinigung von hApg2 und hHdj1 | 59 |
| 6.2.13 | Aufreinigung von N-His Luciferase über Affinitätschromatographie | 59 |
| 6.2.14 | Luciferase-Rückfaltungsversuch | 59 |
| 6.2.15 | SDS-PAGE | 60 |
| 6.2.16 | Ansetzen der Stocklösungen für die möglichen Inhibitoren | 60 |
| 6.2.17 | Kristallisation von bHsc70 ED 1-554 und pHsc70 | 60 |
| 6.2.18 | Fragment-basierter Ansatz | 61 |
| 6.2.19 | Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) | 61 |
| 6.2.20 | Nukleare Magnetresonanzspektroskopie (NMR) | 62 |
| 6.2.21 | Mikrothermophorese (MST) | 62 |
| 6.2.22 | Tryptophan Fluoreszenz | 62 |
| 6.2.23 | Kalibrierung von Gelfiltrationssäulen | 62 |
| 6.2.24 | Regeneration von ATP-Agarose-Beads | 63 |
| 6.2.25 | Regeneration von Nickel-Beads | 63 |
| 7. | Anhang | 64 |
| 8. | Literaturnachweis | 69 |

1. Einleitung

1.1 Das Multiple Myelom

Beim Multiplen Myelom handelt es sich um eine bösartige Proliferation von Plasmazellen im Knochenmark [1]. Etwa 1 % aller neoplastischen Krankheiten und 13 % aller Blutkrebserkrankungen werden durch das Multiple Myelom verursacht [2]. Das Durchschnittsalter bei Diagnose beträgt rund 70 Jahre. Das Multiple Myelom ist gekennzeichnet durch einen vermehrten Abbau der Knochensubstanz, Blutarmut, Hyperkalzämie und Niereninsuffizienz [3].

Trotz neuester Fortschritte in der Behandlung und verbesserter Chemotherapien erleidet ein Großteil der Patienten kurz nach Beginn einer zunächst erfolgversprechenden Behandlung einen Rückfall. Bis zum heutigen Tag gilt das Multiple Myelom als nicht heilbar, wobei die durchschnittliche Lebensdauer in etwa vier Jahre nach Bekanntgabe der Diagnose beträgt. Aus diesem Grund besteht ein erhöhtes Bedürfnis nach der Entwicklung besserer Therapien und neuer Medikamente [2].

1.2 Multiples Myelom und Hitzeschockproteine

Gerade Krebszellen weisen hohe Mengen an Hsp70 (siehe 1.3) auf, da diese auf Hsp70 angewiesen sind, um dem Zelltod zu entgehen. In mehreren Studien wurde gezeigt, dass Hsp70 eine wichtige Rolle in der Entstehung von Tumoren einnimmt. Eine erhöhte Expression von Hsp70 geht mit mehreren Problemen bei der Behandlung des Tumors einher: Eine gewisse therapeutische Resistenz gegenüber der Behandlung, Metastasenbildung und eine geringe klinische Effizienz. In Krebszellen führt Hsp70 in starkem Maße zu einer abnormal schnellen Proliferation, einer unterdrückten Seneszenz und einer Resistenz gegenüber einer stress-induzierten Apoptose, welche auch den Schutz vor Zytostatika und Bestrahlungsmethoden beinhaltet [4].

In den letzten Jahren haben sich deshalb Hitzeschockproteine als geeignete Angriffspunkte für die Behandlung des Multiplen Myeloms herausgestellt. Hitzeschockproteine spielen eine wichtige Rolle in der Zellhomöostase und verhindern unter anderem Apoptose [2, 5]. Eine besondere Rolle kommt hierbei Hsp90 und Hsp70 zu. In proliferierenden Myelomzellen lässt sich eine erhöhte Konzentration an Hsp90 im Vergleich zu normalen Zellen feststellen [5-7].

Bereits seit Längerem werden deshalb über rationales Design Hsp90-Inhibitoren entwickelt, um eine Verringerung der Hsp90-Aktivität zu erreichen und somit Myelomzellen am Wachstum zu stoppen [8]. Allerdings führt eine Inhibition von Hsp90 gleichzeitig zu einer vermehrten Expression von Hsp70, sodass Myelomzellen nicht wie erhofft in Apoptose gehen, sondern weiterhin proliferieren. Werden dagegen Hsp70 und Hsp90 gleichzeitig in ihrer Aktivität herunterreguliert, so werden Proteasom-abhängige Signalwege aktiviert, die Krebszellen in die Apoptose führen. Aus diesem Grund stellt eine

simultane Inhibition von Hsp70 und Hsp90 eine vielversprechende Therapiemöglichkeit des Multiplen Myeloms dar [6, 7].

Obwohl es bereits zahlreiche vielversprechende Hsp90-Inhibitoren gibt, von denen es über ein Dutzend bis in die klinische Phase geschafft haben, steckt die Entwicklung spezifischer und wirksamer Hsp70-Inhibitoren noch in den Kinderschuhen [4, 9].

Welche Möglichkeiten es gibt, Hsp70 zu inhibieren, welche Stellen im Protein sich hierfür anbieten und welche Schritte bereits in diese Richtung unternommen wurden, wird im nachfolgenden Kapitel näher erläutert.

1.3 Hitzeschockproteine 70

1.3.1 Die Hsp70-Familie

Hitzeschockproteine 70 (Hsp70) zählen evolutionsgeschichtlich betrachtet zu den am höchsten konservierten Proteinen. Angefangen bei Archäobakterien bis hin zu hochentwickelten Säugetieren finden sie sich in nahezu jedem Organismus wieder [10-12].

Hsp70 wird, wie der Name schon andeutet, nach Einwirkung von Hitzestress exprimiert [13]. Doch auch Ischämie, Schwermetalle, Nährstoffmangel, Strahlung, Infektionen, Entzündungen sowie organische wie auch oxidierende Substanzen führen zu einer vermehrten Produktion von Hsp70 [12]. Diese stress-induzierte Überexpression von Hsp70 schützt die Zelle vor Apoptose [4]. Hsp70 findet sich stets in einem Zusammenspiel mit anderen Cochaperonen, welche bis zu 3 % der gesamten Proteinmenge in der Zelle ausmachen [14]. Die Funktion von Hsp70 liegt in der ATP-getriebenen Entfaltungsmaschinerie. Missgefaltete Proteine werden von Hsp70 erkannt und so deren Aggregation verhindert [15-20].

Bei Hsp70 handelt es sich um monomere Proteine, welche sich in nahezu jedem Zellkompartiment finden [21-24]. Zusätzlich können sie auch in der Zellmembran und im extrazellulären Milieu vorkommen [19]. Die Konserviertheit zeigt sich vor allem an der nennenswert hohen Homologie der Hsp70-Proteine aus verschiedenen Organismen wie *Drosophila* und Maus. So weist die bakterielle Form DnaK eine 50 %ige Übereinstimmung mit der humanen Form bezüglich der Aminosäuresequenz auf. *In vitro* ist es sogar möglich, Hsp70 aus einem Organismus wie *Drosophila* zu isolieren und in einen fremden Organismus wie Nager oder Maus einzubringen, wo es dieselben Aufgaben übernimmt [25-27].

Während Einzeller lediglich ein für Hsp70 codierendes Gen besitzen, sind es bei Eukaryonten mehrere Gene [28]. Das humane Genom umfasst mindestens zwölf Gene, die für sechzehn Proteine aus der Hsp70-Familie codieren (Tabelle 1). Die meisten der Hsp70-Proteine finden sich im Zytosol und Zellkern. Zwei Vertreter sind spezifisch für die Mitochondrien (HSPA9, Mortalin) und das Endoplasmati-

sche Retikulum (HSPA5, BiP). Mehr als die Hälfte aller Vertreter der Hsp70-Familie weisen eine bemerkenswert hohe Identität von rund 80 % in ihrer Aminosäureabfolge auf.

Eine weitere Gemeinsamkeit ist der Aufbau, welcher aus zwei großen Domänen besteht, die durch einen flexiblen Linker verbunden sind. Bei einer dieser Domänen handelt es sich um die N-terminale Nukleotidbindedomäne (NBD), die aus einer hochkonservierten ATPase-Domäne besteht, die zudem für die meisten der Hsp70-Funktionen essenziell ist. Die Zweite der beiden zuvor genannten Domänen ist die C-terminale Substratbindedomäne (SBD), welche mit Proteinsubstraten interagiert. Charakteristisch für die SBD ist die bewegliche G/P-reiche C-terminale Region, welche die am wenigsten konservierte Stelle im Protein darstellt. Dies dürfte für die funktionale Flexibilität von Nutzen sein, genauso wie die Möglichkeit, mit unterschiedlichen Cochaperonen zu interagieren [29-31].

Tabelle 1: Übersicht der bis dato bekannten Hsp70-Mitglieder. In nahezu jedem Zellkompartiment findet sich ein Vertreter dieser Chaperonfamilie. Alle aufgezählten Formen weisen eine bemerkenswert hohe Sequenzidentität zu HSPA1A (*Referenz) auf. Die meisten Formen von Hsp70 werden konstitutiv in der Zelle exprimiert. Nur ein Bruchteil wird erst nach Hitzestress exprimiert. n.b. = nicht bekannt, ER = Endoplasmatisches Retikulum, EE = extrazelluläre Exosomen. Tabelle übernommen von [4, 32].

| Protein | Zelluläre Lokalisation | Länge [aa] | Stress-induziert | Identität* [%] |
|--------------------------------|------------------------------------|------------|------------------|----------------|
| HSPA1A (Hsp72) | Zytosol, Zellkern, Zellmembran, EE | 641 | ja | 100 |
| HSPA1B (Hsp72) | Zytosol, Zellkern, EE | 641 | ja | 100 |
| HSPA1L | Zytosol, Zellkern | 641 | nein | 89 |
| HSPA2 | Zytosol, Zellkern, Zellmembran, EE | 639 | nein | 83 |
| HSPA4 | na | 840 | n.b. | 32 |
| HSPA4L | na | 839 | n.b. | 29 |
| HSPA5 (Grp78, BiP) | ER, EE | 654 | nein | 64 |
| HSPA6 | Zytosol, EE | 643 | ja | 82 |
| HSPA7 | Blutmikropartikel, EE | 367 | ja | 84 |
| HSPA8 (Hsc70, Hsp73) | Zytosol, Zellkern, Zellmembran, EE | 646 | nein | 85 |
| HSPA8-2 | na | 493 | n.b. | 87 |
| HSPA9 (Grp75, Mortalin) | Mitochondrien, Zellkern | 679 | nein | 49 |
| HSPA12A | intrazelluläre Exosomen, EE | 675 | nein | na |
| HSPA12B | Endothelzellen, Blutplasma | 685 | nein | na |
| HSPA13 | ER, EE, Mikrosomen | 471 | nein | 39 |
| HSPA14 | Zytosol, Membran | 509 | ja | 35 |

1.3.2 Wichtige Mitglieder der Hsp70-Familie

Insgesamt gibt es sechzehn Vertreter der Hsp70-Familie, wovon im Nachfolgenden die wichtigsten Mitglieder kurz erläutert werden. Auf weniger wichtige Vertreter wird an dieser Stelle nicht näher eingegangen.

HSPA1A und HSPA1B, oft auch als Hsp72 bezeichnet, sind die bis dato am besten untersuchten Hsp70-Mitglieder. Beide Proteine sind nahezu gleich, da sie sich lediglich in zwei Aminosäuren voneinander unterscheiden. HSPA1A/HSPA1B stellen die Hauptproteine der Hsp70-Familie dar, welche

durch Stress induziert werden. Aufgrund dessen und ihrer Rolle, die sie in der Entstehung von Krebs einnehmen, sind sie die am häufigsten studierten Hsp70-Mitglieder.

HSPA1L wird anders als HSPA1A und HSPA1B konstitutiv exprimiert. Es findet sich vornehmlich in Testes; seine Rolle ist bis dato allerdings noch nicht klar [33]. HSPA2 wird ebenfalls in Testes exprimiert [34]. Daneben findet es sich noch in weiteren Geweben [35]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass HSPA2 an der Entstehung nicht-testikulärer Krebsarten beteiligt ist [36].

HSPA5, meist besser bekannt als BiP oder Grp78, wird anders als HSPA1A und HSPA1B konstitutiv exprimiert. Es ist ausschließlich im Endoplasmatischen Retikulum zu finden, wo es den Import und die Faltung neu-synthetisierter Peptide ermöglicht [37]. HSPA6 wird genau wie HSPA1A und HSPA1B stressinduziert und trägt zusammen mit Letzteren zum Zellschutz bei [38]. Die Funktion von HSPA7 ist bis jetzt noch ungeklärt. Es handelt sich dabei um ein nicht-funktionales, trunkiertes Konstrukt [39].

HSPA8, auch bekannt als Hsc70 oder Hsp73, auf das in dieser Arbeit genauer eingegangen wird, wird konstitutiv exprimiert. Es handelt sich hierbei um das wichtigste Haushaltsgen der Hsp70-Familie. Bis zu 1 % der gesamten Proteinmenge in der Zelle werden von Hsc70 ausgemacht. Aufgrund seiner vielseitigen Aufgaben ist es ein enorm wichtiges Protein [40, 41].

HSPA9, besser bekannt unter Grp75 oder Mortalin, wird ebenfalls konstitutiv exprimiert. Hauptsächlich kommt es in den Mitochondrien vor, wo es ähnlich zu HSPA5 im Endoplasmatischen Retikulum den Proteinimport und die Faltung unterstützt [42]. Daneben hat es weitere Aufgaben in der Zelle [43].

1.3.3 Funktion, Struktur und Regulation von Hsc70

Wie im vorangegangenen Kapitel bereits erwähnt, wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich mit der Isoform HSPA8, besser bekannt als Hsc70, gearbeitet. Aufgrund dessen wird der allgemeine Aufbau und die Funktion der Hsp70-Familie anhand des Beispiels Hsc70 erläutert, die jedoch für nahezu alle Mitglieder gleich sind.

Unter physiologischen Bedingungen fungiert Hsc70 als molekulares Chaperon. Es schützt die Zelle vor letalen Schäden, die durch diverse Arten von Stress verursacht werden. Zudem ist es an der Faltung und dem Transport neu-synthetisierter Proteine beteiligt und hilft außerdem bei der Zusammenlagerung von Multiproteinkomplexen [44]. Missgefaltete Proteine werden von Hsc70 im Komplex mit Hsp40 und diversen Nukleotidaustauschfaktoren (NEFs) erkannt. Durch wiederholte Zyklen aus Bindung, ATP-abhängiger Entfaltung und spontaner Rückfaltung werden die denaturierten Proteine in ihre richtige Konformation zurückgeführt [45]. Zahlreiche *in vivo* Studien zeigten, dass Hsc70 bevorzugt große Peptidketten über 20 kDa bindet, die 20 % aller neu-synthetisierten Proteine in der Zelle darstellen. Zusätzlich scheint die Rückfaltung in einem geschützten Bereich abzulaufen, der von Chaperonen und Cochaperonen gebildet wird, und direkt an die Translation angeschlossen ist [46].

ben neu-synthetisierten Proteinen bindet Hsc70 auch Proteinaggregate und verringert so deren Entstehung [47-51].

Hsc70 ist ein starker anti-apoptotischer Faktor, der den programmierten Zelltod verhindert. Dies geschieht auf verschiedenen Ebenen: Zum einen wird durch Hsc70 die mitochondriale Translokation verhindert und die Permeabilität in den Mitochondrien reduziert, sodass pro-apoptotische Faktoren nicht ins Zytosol freigesetzt werden [52, 53]. Zum anderen unterbindet Hsc70 die Zusammenlagerung des *death inducing signaling complex* (DISC), der den programmierten Zelltod einleitet [54]. Versuche an malignen Zellen zeigten, dass Hsc70 das Zellwachstum unterstützt, die Seneszenz verringert und die Resistenz gegenüber stress-induzierter Apoptose wie auch gegenüber Zytostatika und Bestrahlungstherapien erhöht [55].

Die mit 44 kDa größte Domäne im Protein stellt die gabelartig verzweigte N-terminale Nukleotidbindedomäne (NBD) dar, welche ATP bindet und dieses zu ADP hydrolysiert (Abbildung 1). Daran anschließend kommt eine Linkerregion, die die NBD mit der C-terminalen Substratbindedomäne (SBD) verbindet, an welcher die Interaktion mit hydrophoben Resten denaturierter Proteine stattfindet [56]. Die SBD selbst lässt sich in zwei Domänen einteilen: ein N-terminales β -Faltblatt und eine C-terminale α -Helix, die zusammen einen flexiblen Deckel formen [57, 58]. Eukaryontisches Hsp70 enthält darüber hinaus eine G/P-reiche C-terminale Region, die ein EEVD-Motiv aufweist, welche für die Interaktion mit Cochaperonen wichtig ist [44].

Hsc70 bindet unter ATP-Hydrolyse an kurze hydrophobe Aminosäuresequenzen neu-synthetisierter oder teilweise entfalteter Proteine. Der Rückfaltungszyklus lässt sich in drei Schritte einteilen. Im ATP-Zustand wird zunächst mit geringer Affinität aber hoher Austauschrate das Substrat gebunden. Mithilfe von Cochaperonen aus der Hsp40-Familie kommt es zur Hydrolyse von ATP zu ADP, woraus der durch eine hohe Affinität aber geringe Austauschrate gekennzeichnete ADP-Zustand entsteht. NEFs sorgen anschließend dafür, dass ADP durch ATP ausgetauscht wird. Im ATP-Zustand wird dann das gefaltete Substrat entlassen.

Der Reaktionsmechanismus von Hsc70 erfordert eine hohe Flexibilität des Proteins, die für die Konformationsänderungen während der Interaktion zwischen Nukleotid, Cochaperonen und Substraten nötig ist. Die 44 kDa große NBD besteht aus zwei Flügeln I und II, die jeweils wieder in zwei Subdomänen unterteilt werden können. Domäne Ia umfasst die Reste 1-39, 116-188 und 361-384, Domäne Ib die Reste 40-115. Domäne IIa erstreckt sich über die Reste 189-228 und 307-360 und Domäne IIb über die Reste 229-306. Die beiden Subdomänen Ia und IIa formen den Boden der Nukleotidbindetasche. Eine konservierte Aminosäureabfolge gewährleistet sowohl die Bindung des Nukleotids als auch eine katalytische Aktivität [56]. Der Wechsel zwischen ATP- und ADP-gebundener Form wird durch eine hohe Flexibilität zwischen diesen vier Subdomänen ermöglicht. Nichtsdestotrotz ist die Grundstruktur der NBD in allen humanen Isoformen hoch konserviert [59].

Auch die SBD setzt sich aus zwei Subdomänen zusammen: Einem 15 kDa großen β -Sandwich, das die Proteinsubstrate bindet und einer 10 kDa großen R-Helix, welche als Deckel über der Substratbindestelle fungiert. Im ADP-gebundenen Zustand besteht das β -Sandwich aus zwei antiparallelen β -Sheets, wovon jedes vier β -Stränge und vier hervorstehende Loops enthält [57]. Die SBD besteht aus zwei β -Sheets und Loops, die größtenteils hydrophobe Reste aufweisen. Das elektrostatische Potenzial um diese hydrophobe Furche ist jedoch überwiegend negativ, was demnach die Bindung kleiner hydrophober Aminosäureabschnitte begünstigt, welche von positiv geladenen Resten flankiert werden [57]. Das C-terminale Ende der SBD besteht aus fünf α -Helices, von denen man ausgeht, dass sie die SBD umspannen, was zu einer höheren Affinität und einer niedrigeren Peptidaustauschrates führt [60].

Das äußerste C-terminale Ende von Hsc70 weist das charakteristische EEVD-Motiv auf, welches mit Hsp40 und anderen Cochaperonen interagiert, die eine TTR-Domäne enthalten [31, 61-63].

Um den Rückfaltungszyklus zu ermöglichen, ist eine hohe intermolekulare Kommunikation zwischen und auch innerhalb der beiden Hauptdomänen im Hsc70 nötig, die durch die hohe Flexibilität gegeben ist. Diese hohe Beweglichkeit dürfte wohl auch der Grund dafür sein, dass es nach bisherigem Stand nicht möglich war, Hsc70 in seiner vollen Länge zu kristallisieren [32].

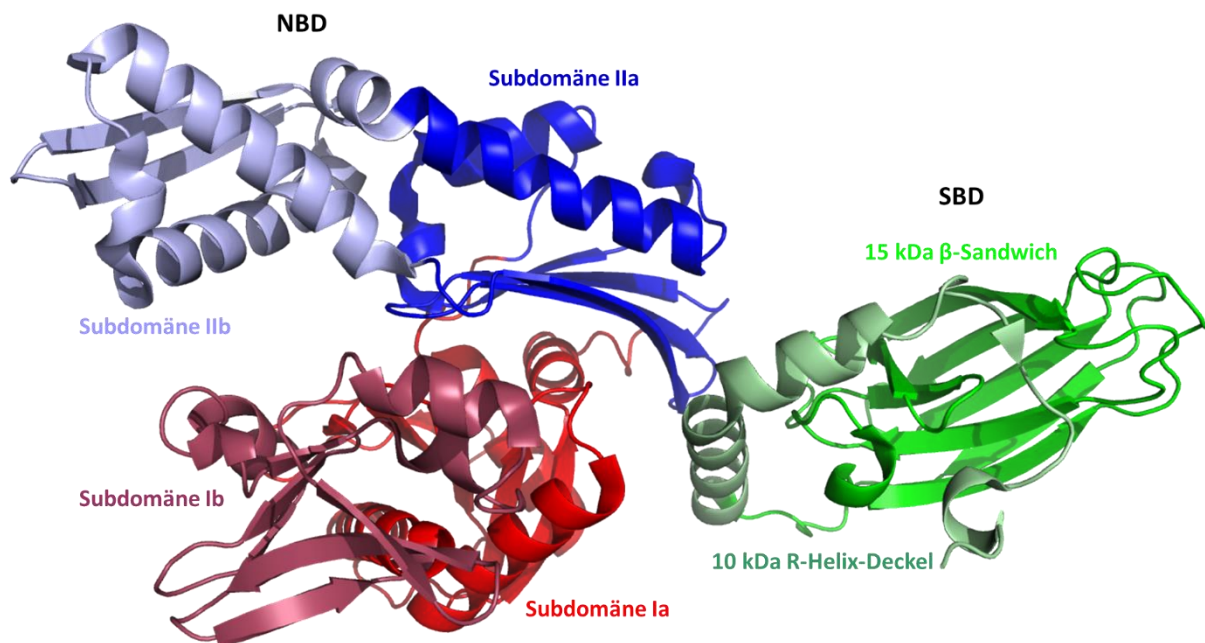


Abbildung 1: Aufbau von Hsp70 am Beispiel der Isoform HSPA8 (Hsc70). Hsp70 setzt sich aus zwei Hauptdomänen zusammen. Die N-terminale Nukleotidbindedomäne (NBD) dient zur Hydrolyse von ATP zu ADP, die C-terminale Substratbindedomäne (SBD) ermöglicht die Interaktion des Proteins mit missgefalteten Peptiden (PDB-Code 4FL9).

Erste funktionale Untersuchungen von Hsc70 wurden mit trunkiertem, aber funktional aktivem bovinem Hsc70 (bHsc70 ED 1-554) durchgeführt, das einen Teil des Deckels nicht besitzt [64]. In Abwesenheit der SBD vermag der Linker alleine die ATPase-Aktivität zu erhöhen [65-67]. Durch die Bindung von ATP kommt es zur Freilegung konservierter Aminosäurereste auf der Oberfläche der Bin-

dungsstelle, da sich die Subdomänen neu anordnen. Dies führt letztlich zu einer kooperativen Bindung des Linkers [68]. Nach Hydrolyse von ATP wird der Linker frei, sodass NBD und SBD in einer relativ unabhängigen und voneinander ausgebreiteten Konformation vorliegen [69, 70]. Durch einen vorübergehenden allosterischen aktiven Zustand dissoziieren die beiden Domänen voneinander weg, sodass die Kommunikation zwischen NBD und SBD ermöglicht wird [71]. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist die Hydrolyse von ATP (Abbildung 2). Diese läuft relativ langsam ab. In Anwesenheit von Hsp40 wird dieser Vorgang jedoch beschleunigt. Nach der Umsetzung von ATP kommt es zu einer Dissoziation von Hsc70 und Hsp40 [72, 73]. Nach der Bindung von Substrat und Hsp40 wird ATP hydrolysiert, wobei sich der C-terminale Deckel auf das β -Sandwich der SBD legt, was den getrennten ADP-Zustand von Hsc70 zur Folge hat. Durch das Schließen des Deckels wird es dem Protein erleichtert, effizient am Substrat festzuhalten. Eine Deletion des Deckels führt sowohl zu einer fünf-fach geringeren Substrataffinität als auch zu einer ATP-abhängigen Peptidfreisetzung um zwei Größenordnungen [74].

Nach der Hydrolyse von ATP dissoziiert das Cochaperon und die NBD und SBD können wieder assoziieren. Das ADP wird dabei in einer zweistufigen Reaktion freigesetzt, indem erst das anorganische Phosphat und dann das ADP-Gerüst vom Protein dissoziieren [64]. Magnesium ist das zentrale Ion, das für die Hydrolyse von ATP wichtig ist. Fehlt es, verringert sich die Affinität um die dreifache Größenordnung. Der Austausch von ADP zu ATP erfordert NEFs, die diesen Austausch ermöglichen. Anders als die Proteine aus der Hsp40-Familie, weisen NEFs keine Sequenzähnlichkeiten oder strukturellen Gemeinsamkeiten auf. Insgesamt werden vier verschiedene NEF-Typen unterschieden. Obgleich alle Typen an der NBD interagieren, um die Nukleotidbindung zu destabilisieren, verwenden sie dennoch verschiedene Mechanismen [32].

Hsc70 wird vornehmlich auf Transkriptionsebene durch Hitzeschockfaktoren (HSF) reguliert, wobei HSF-1 eine herausragende Rolle einnimmt [75]. Unter physiologischen Bedingungen liegt HSF-1 als inaktives Monomer in der Zelle vor. Daran gebunden sind Hsp70 und Hsp90 [76]. Nach Stresseinwirkung werden Hsp70 und Hsp90 freigesetzt, wodurch es zu einer Aktivierung von HSF-1 durch Bildung eines Homotrimers kommt. Dieses bindet an die Hitzeschockelemente (HSE), die auf der DNA codiert sind, sodass es zu einer vermehrten Transkription von Hsc70 kommt [77].

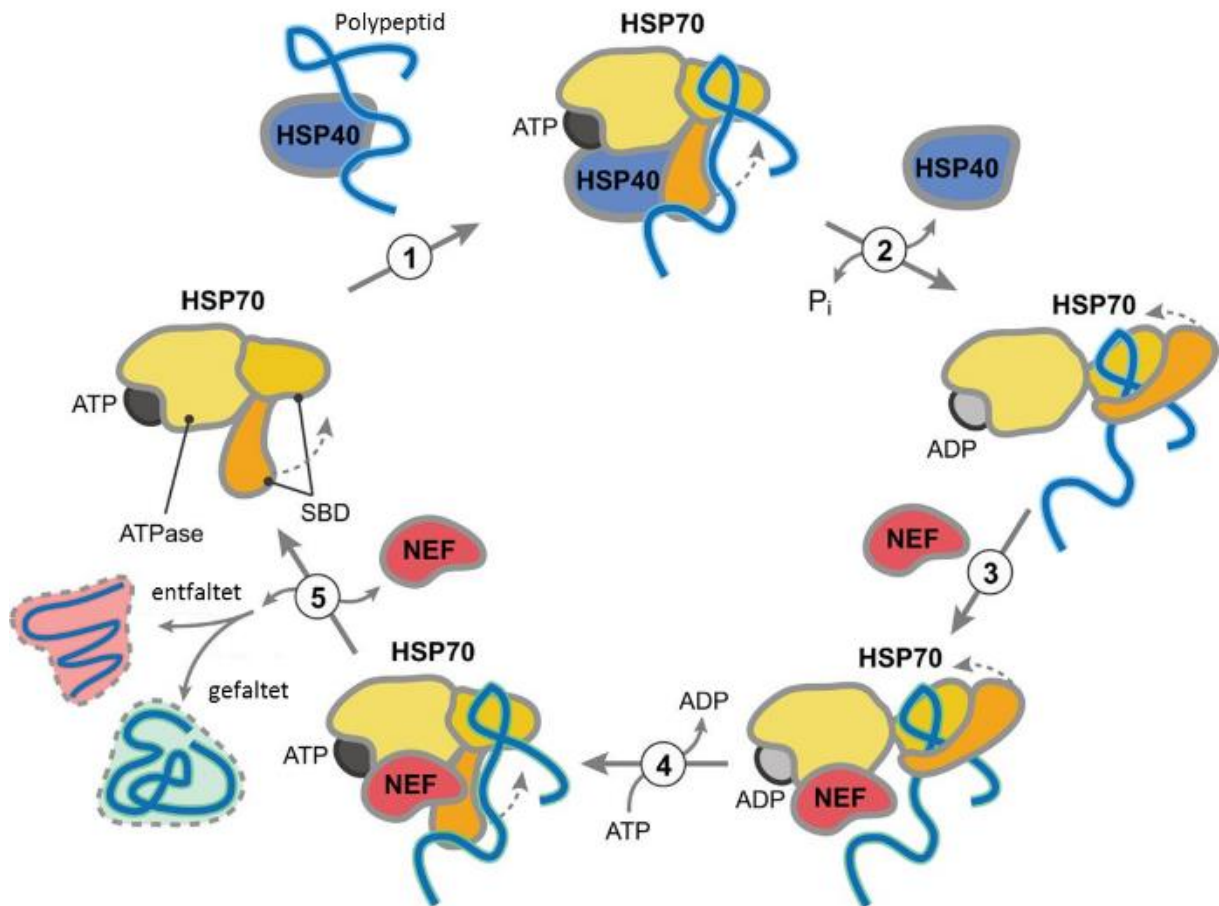


Abbildung 2: Ablauf des Rückfaltungszyklus von Hsp70. (1) Interaktion von Hsp70 mit Hsp40 nach Bindung eines entfalteten Proteins. (2) Die ATP-gebundene Form von Hsp70 interagiert über die SBD mit der Polypeptidkette. Infolge einer von Hsp40 stimulierten Hydrolyse von ATP wird eine stabile Zwischenstufe zwischen dem ADP-gebundenem Hsp70 und Polypeptid gebildet. (3) Nach der Bindung von NEFs an den Hsp70-Polypeptid-Komplex (4) kommt es zum Nukleotidaustausch von ADP gegen ATP. (5) Durch diesen Austausch werden sowohl das Polypeptid als auch der NEF freigesetzt. Der komplette Rückfaltungszyklus wird solange wiederholt bis das entfaltete Protein in seinen nativen Zustand zurückgekehrt ist. Abbildung modifiziert nach Brehme und Voisine [78].

1.3.4 Regulation von Hsc70 für die therapeutische Anwendung

Eine Überexpression von Hsp70 führt oft zu einer geringeren Heilungsrate bei einer Vielzahl von Krebserkrankungen wie Brustkrebs und bestimmten Leukämien [36, 79, 80]. Man geht davon aus, dass die Überexpression von Hsp70 zu einer verminderten Apoptose von Krebszellen führt, zumal Hsp70 mit zahlreichen Komponenten des Apoptose-Signalwegs interagiert [81-83]. Ebenfalls kann durch eine vermehrte Expression von Hsp70 eine gewisse Resistenz gegenüber Chemotherapeutika wie Imatinib beobachtet werden [84].

Obgleich der genaue Wirkungsmechanismus der beobachteten Resistenz noch nicht aufgeklärt wurde, wird davon ausgegangen, dass eine verminderte Aktivität von Apoptose-Faktoren wie NF- κ B dafür verantwortlich sein könnte [85]. Die protektiven Effekte von Hsp70 spielen besonders in der Behandlung mit Hsp90-Inhibitoren wie Geldanamycin eine herausragende Rolle [7]. Genau wie bei Hsp70 handelt es sich bei Hsp90 um ein ATP-abhängiges molekulares Chaperon, das mit vielen anti-apoptotischen Faktoren interagiert [86, 87]. Wird die Bindung von ATP an Hsp90 verhindert, werden

die anti-apoptotischen Faktoren im Proteasom abgebaut, sodass sich daraus ein anti-proliferativer Effekt beobachten lässt [88-90].

Bemerkenswerterweise führt eine Behandlung mit Hsp90-Inhibitoren zu einer Überexpression von Hsp70 [91]. Diese Kompensation hat dann wie oben erwähnt eine gewisse Resistenz bei der Behandlung mit Chemotherapeutika zur Folge [91, 92]. Aus dieser Beobachtung heraus erscheint eine duale Behandlung sowohl mit Hsp90- als auch Hsp70-Inhibitoren als vorteilhaft. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass RNAi-Knockdown von Hsp70 zu einer höheren Sensitivität gegenüber Hsp90-Inhibitoren führt [7, 93].

Aufgrund seiner herausragenden Rolle bietet sich Hsc70 als geeignetes Target zur Entwicklung verschiedener Substanzen zur Regulierung der Aktivität an. Bis jetzt gibt es zahlreiche Moleküle, die an verschiedenen Stellen von Hsc70 binden wie die NBD, SBD und das EEVD-Ende. Nur wenige dieser Verbindungen sind jedoch spezifisch und noch weniger von ihnen ermöglichen einen detaillierten strukturellen Einblick in den Wirkmechanismus [94, 95]. Im nachfolgenden Abschnitt werden die wichtigsten Inhibitoren kurz erläutert.

Eine der ersten bekannten Verbindungen, die Hsc70 inhibieren, ist 15-Deoxyspergualin (Abbildung 3A) [96, 97]. Dabei handelt es sich um ein Analogon einer antibiotischen und antitumoralen Verbindung, welche Anfang der 1980er Jahre aus *Bacillus laterosporus* extrahiert wurde. 15-Deoxyspergualin entfaltet seine Wirkung, indem es an das EEVD-Motiv in der SBD bindet, welches die Interaktion mit Cochaperonen ermöglicht. Wie es durch diese Interaktion letztlich zu einer um bis zu 40 % erhöhten ATPase-Funktion der NBD kommt, ist bis jetzt nicht geklärt [98-100]. Obwohl 15-Deoxyspergualin in Mäusen eine signifikante Antitumorwirkung zeigte, war es in Studie II-Phasen gegen Brustkrebsmetastasen im Vergleich zu direkter Chemotherapie ineffektiv [101, 102].

Wie bereits erwähnt wird die Chaperonfunktion von Hsc70 durch seine ATPase-Aktivität reguliert. In Analogie zu Hsp90-Inhibitoren, wo Verbindungen mit ATP-ähnlichen Eigenschaften die Degradation von Hsp90-Substraten induzieren, wurden die ersten gegen Hsc70 gerichteten ATP-Analoga synthetisiert [103]. Ver-155008 bindet kompetitiv an die NBD von Hsc70 und unterdrückt somit die allosterische Kontrolle zwischen SBD und NBD (Abbildung 3C) [104]. Neben Fluoreszenzpolarisation konnte mithilfe von Co-Kristallisation gezeigt werden, dass Ver-155008 eine submikromolare Affinität erreicht, während die Selektivität gegenüber Hsp90 gewahrt bleibt [103]. Ver-155008 stoppte die Proliferation von Dickdarmkrebszellen, konnte jedoch nicht die vorhergesagte pharmakologische Wirkung erzielen. Weiterhin wird Ver-155008 *in vivo* schnell degradiert, was zu seiner geringen Bioverfügbarkeit beiträgt [103].

Das Rhodocyanin MKT-077 bindet vor allem an die ADP-gebundene Form von Hsp70 (Abbildung 3D) [105, 106]. Obgleich eine Antitumorwirkung des allosterisch inhibierenden MKT-077 im Mausmodell nachgewiesen werden konnte, musste eine Phase I-Studie mit Krebspatienten vorzeitig abgebrochen

werden, da es zu schwerwiegenden Nierenschäden gekommen war [107, 108]. Zudem stellte sich heraus, dass MKT-077 sehr schnell metabolisiert wird, was seinen Einsatz als Therapeutikum stark einschränkt [109].

Ein weiterer Hsp70-Inhibitor ist 2-Phenylethinsulfonamid (PES), welches die Interaktion zwischen Hsp70 und seinen Cochaperonen stört und folglich zum Proteinabbau im Proteasom führt (Abbildung 3B) [110]. PES bindet dabei an den C-terminalen helikalen „Deckel“ von Hsp70 und führt so in Mäusen zu einer erhöhten Toxizität gegenüber Leukämiezelllinien [111-113]. An der Spezifität von PES bestehen mittlerweile jedoch Zweifel, da detaillierte Untersuchungen zu uneindeutigen Ergebnissen kamen [104].

Eine im Jahr 2008 als neuer Hsp70-Inhibitor propagierte Verbindung ist das Imidazolderivat Apoptozol (Abbildung 3E) [114]. Dieses bindet vermutlich an die NBD von Hsp70, wodurch die ATPase-Aktivität gestört wird und so zur Apoptose embryonaler Krebszellen führt [103, 115]. Sieben Jahre später konnte jedoch gezeigt werden, dass der beobachtete Inhibitionseffekt auf eine unspezifische Bindung von Apoptozolaggregaten an Hsp70 zurückzuführen ist [116].

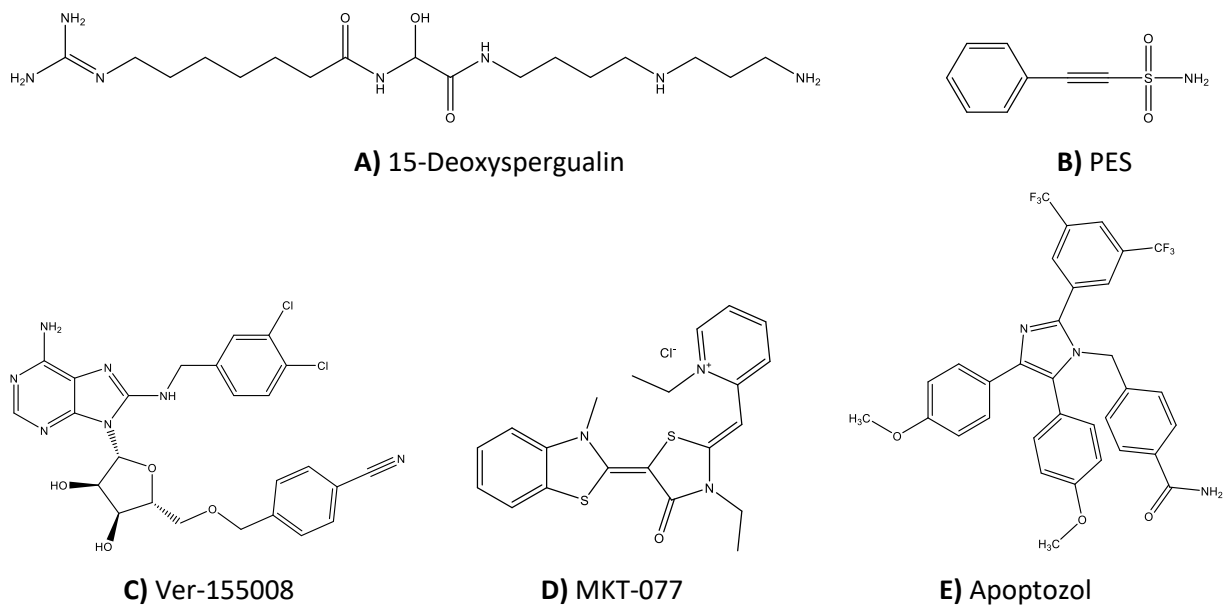


Abbildung 3: Ausgewählte Hsp70-Inhibitoren, die *in vitro* und teilweise auch *in vivo* signifikante antitumorale Wirkung zeigten und Hsp70 durch verschiedene Wirkmechanismen inhibieren. A) 15-Deoxyspergualin wurde 1981 als Derivat des instabilen Vorläufermoleküls Spergualin synthetisiert und bindet an das EEVD-Motiv in der SBD von Hsp70. B) PES bindet an den C-terminalen „Deckel“ von Hsp70, was die Interaktion mit den Cochaperonen verhindert und so den proteasomalen Abbau missgefalteter Proteinen begünstigt. C) Ver-155008 bindet aufgrund seiner ATP-ähnlichen Struktur an die NBD von Hsp70 und verringert somit die Interdomänenkommunikation zwischen SBD und NBD. D) MKT-077 bindet an die ADP-Form von Hsp70. Obwohl *in vitro*-Versuche vielversprechend waren, musste eine Phase I-Studie mit Krebspatienten aufgrund erheblicher Nebenwirkungen abgebrochen werden. E) Apoptozol bindet vermutlich an die NBD und stört auf diese Weise die ATPase-Aktivität von Hsp70. Mittlerweile bestehen jedoch Zweifel an der Spezifität von Apoptozol, da Versuche zeigten, dass möglicherweise Aggregate für die Inhibitionseffekte verantwortlich sind.

1.4 Vorarbeiten und Zielsetzung

Wie im vorhergehenden Abschnitt erläutert gibt es bereits eine Reihe von Hsc70-Inhibitoren, die entweder an die NBD oder SBD binden. Solche Verbindungen weisen jedoch oft Nachteile auf. Problematisch an ATP-Analoga wie Ver-155008 ist die fehlende Spezifität, zumal sich in der Zelle zahlreiche ATP-abhängige Proteine und Enzyme befinden, die ebenfalls inhibiert werden könnten. Verbindungen wie 15-Deoxyspergualin, die an das EEVD-Ende in der SBD binden, zeigen häufig nur geringe Affinitäten, da die SBD wenig konservierte Aminosäurereste aufweist, um die Interaktion mit vielen unterschiedlichen Peptiden zu ermöglichen. Dementsprechend gestaltet sich die Entwicklung hochaffiner Inhibitoren für diese Stelle als schwierig ist [4, 32].

Anstelle dieser beiden Angriffspunkte im Hsc70-Protein bot sich zu Beginn der Vorarbeiten im Jahr 2009 eine dritte vielversprechende Bindestelle an: Das Interdomäneninterface, welches sich zwischen der SBD und NBD befindet und für das zum damaligen Zeitpunkt noch keine Inhibitoren entwickelt worden waren. Vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass bereits Punktmutationen im Interdomäneninterface zu verringerten Aktivitäten führen [64]. Aus diesen Beobachtungen heraus entstand die Hypothese, dass Inhibitoren, welche an diese Stelle binden, die biologische Aktivität von Hsp70 regulieren könnten [117].

Die Vorarbeiten wurden von U. Peinz durchgeführt, der die Adressierbarkeit des Interdomäneninterfaces von Hsc70 untersuchte. Für die Analysen verwendete er die Kristallstruktur einer bovinen, trunkierten Hsc70-Mutante (554 Aminosäuren, Mutation an den Stellen E213A und D214A), welche die einzige vorhandene Zweidomänenstruktur aus der Hsp70-Familie darstellt, da die Kristallisation des Volllängen-Hsp70 bis dato nicht möglich war [117, 118]. Anhand dieser Kristallstruktur wurde ein virtuelles *Screening* durchgeführt, um potenzielle Inhibitoren zu identifizieren, welche an das Interdomäneninterface binden könnten. Aus einer 3 Millionen Substanzen umfassenden Bibliothek wurden die vielversprechendsten Moleküle *in vitro* in Myelomzellen näher untersucht. Dabei zeigte das Dihydroisochinolinon C066-757 den besten EC_{50} -Wert mit $0.70 \mu\text{M}$ (siehe Anhang Tabelle 9) [119, 120].

Basierend auf dieser Verbindung wurden nachfolgend von D. Zilian verschiedene Dihydroisochinolinonderivate *in silico* entwickelt, welche von A. Hartung sowie A. Lehmann synthetisiert und anschließend sowohl *in vitro* als auch *in vivo* getestet wurden (siehe Anhang Tabelle 9). Dabei zeigten sich eine vermehrte Apoptose der Myelomzellen sowie ein verringertes Tumorwachstum in der Maus. Darüber hinaus konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine verringerte Hsc70-Expression beobachtet werden, sodass sich die Hypothese zu bestätigen schien, dass die entwickelten Verbindungen an Hsc70 binden und dieses inhibieren [119, 120].

Basierend auf den oben genannten Beobachtungen lag die Vermutung nahe, dass die Apoptose von Myelomzellen eine Folge der direkten Inhibition von Hsc70 durch die *in silico* entwickelten Inhibito-

ren war. Aus diesem Grund sollte gezeigt werden, dass die verwendeten Dihydroisochinolinonderivate direkt an Hsc70 binden und dieses inhibieren. Grundsätzlich wäre auch denkbar gewesen, dass die entwickelten Inhibitoren an ein anderes Protein in der Zelle binden und es durch eine Signalkaskade zur Herunterregulierung von Hsc70 kommt. Die direkte Interaktion der Inhibitoren mit Hsc70 sollte in einem etablierten Protein-Ligand-Assay nachgewiesen werden. Gleichzeitig sollten an dieser Stelle auch biophysikalische Parameter der Bindung wie Inhibitionsstärke und Affinität bestimmt werden.

Da das virtuelle *Screening* nach neuartigen Hsp70-Inhibitoren anhand der Kristallstruktur einer verkürzten Doppelmutante durchgeführt worden war, sollte zusätzlich gezeigt werden, dass das verwendete Konstrukt funktional aktiv ist (PDB-Code 4FL9). Nach nachgewiesener direkter Interaktion zwischen Hsc70 und den Dihydroisochinolinonderivaten sollte über Kristallisationsversuche die genaue Bindestelle und der Bindemodus festgestellt werden. Ausgehend von diesen Daten sollten abschließend weitere Inhibitoren *in silico* entwickelt werden, um so zu höheren Affinitäten zu gelangen.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Optimierung der Aufreinigung von bHsc70 ED 1-554

Das virtuelle *Screening* nach neuartigen Hsp70-Inhibitoren wurde anhand der Kristallstruktur einer trunkierten (554 Aminosäuren) Doppelmutante (E213A, D214A) von bovinem Hsc70 (bHsc70 ED 1-554) durchgeführt (PDB-Code: 4FL9) [117, 119]. Zum aktuellen Zeitpunkt ist dieses mutierte Konstrukt die einzige Zweidomänenstruktur, die kristallisiert werden konnte. Für das Volllängenkonstrukt von Hsc70 war dies bis dato nicht möglich. Es steht die Vermutung im Raum, dass die hohe Flexibilität des Chaperons eine Kristallisation stark erschwert. Zudem handelt es sich bei Hsc70 mit einem Molekulargewicht von 70 kDa um ein größeres Protein, weshalb angenommen wird, dass die Menge der Freiheitsgrade ebenfalls einer erfolgreichen Kristallisation im Wege steht [118].

Dem für die Kristallisation und einige funktionale Assays verwendeten bHsc70 ED 1-554 fehlen insgesamt 10 kDa, die im Volllängenkonstrukt die C-terminale Domäne bilden, welche für die Interaktion zwischen Hsc70 und seinen Cochaperonen wichtig ist. Durch dieses fehlende Stück wird die heterogene Oligomerisierung des Proteins verhindert [121, 122]. Tatsächlich wurde gezeigt, dass Polydispersität eine erfolgreiche Kristallisation erschwert [123, 124]. Weiterhin weist bHsc70 ED 1-554 eine Doppelmutation an den Stellen E213A und D214A auf, welche zu einer Verringerung der Oberflächenentropie beiträgt und so die Kristallisation vereinfacht [118, 125]. Der Hintergedanke einer Reduzierung der Oberflächenentropie ist, Aminosäuren wie Glutamat und Aspartat mit ihrer hohen Konformationsentropie durch Aminosäuren wie Alanin, die eine geringe Änderung der Konformationsentropie aufweisen, auf der Proteinoberfläche zu ersetzen. Dadurch steigt auch die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Kristallbildung sowie einer ausreichend hohen Auflösung [125].

Der Sequenzunterschied zwischen bovinem und humanem Hsc70 beträgt $< 1\%$. Humanes Hsc70 umfasst 646 Aminosäuren, während bovines Hsc70 auf 650 Aminosäuren kommt (siehe Anhang Abbildung 23). Da das virtuelle *Screening* nach neuen Hsc70-Inhibitoren anhand der Kristallstruktur von bHsc70 ED 1-554 durchgeführt worden waren, sollten die funktionalen Assays und weitere Kristallisationsversuche ebenfalls mit diesem Konstrukt durchgeführt werden.

2.1.1 Aufreinigung über Ionenaustauscher

Zu Beginn des Projekts stand die Aufreinigung von bHsc70 ED 1-554. Das Plasmid dafür wurde von R. Sousa (Utah, USA) zur Verfügung gestellt. Das Aufreinigungsprotokoll sah nach dem Aufschluss der Bakterienzellen zunächst eine Fällung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Polyimin P vor. Durch diesen Schritt sollte Hsc70 ausgefällt und so bereits von anderen Proteinen getrennt werden. Danach folgte eine mehrstufige Aufreinigung über einen Anionen- und einen Kationenaustauscher sowie eine anschließende Gelfiltration [118]. Trotz mehrfacher Aufreinigungsversuche war es jedoch nicht möglich, bHsc70 ED

1-554 wie beschrieben aufzureinigen. Zum einen war die Reinheit sehr gering, da sich selbst nach der Gelfiltration noch zahlreiche Kontaminanten in der Probe befanden. Zum anderen war die Ausbeute mit weniger als 10 mg Protein aus einer 36 L-Kultur außerordentlich niedrig und bei Weitem nicht ausreichend, um damit Kristallisationsversuche und funktionale Assays durchzuführen. Für große Kulturen von 36 L würden nach der finalen Aufreinigung für Hitzeschockproteine wie Hsc70 Mengen von mehreren hundert Milligramm bis zu 1 g erwartet.

Das größte Hindernis stellte bei der Aufreinigung der Kationenaustauscher dar, an den das Protein nicht band und stattdessen im Durchlauf zu finden war. Zahlreiche Versuche, die Aufreinigung durch verschiedene Abwandlungen im Versuchsablauf doch noch zu ermöglichen, schlugen fehl. Neben der Variation des pH-Werts (pH 4.5 bis 10.0) und der Ionenstärke der verwendeten Laufpuffer (0.5 M und 1 M NaCl) wurde versucht, eine Aufreinigung ohne vorherige Fällung mit Polyimin P und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durchzuführen. Bei der Aufreinigung mit verschiedenen Säulenmaterialien und pH-Werten zeigte sich, dass bHsc70 ED 1-554 bei saurem pH so gut wie gar nicht an den verwendeten Kationenaustauscher band (Tabelle 2). Die verwendeten Säulen enthielten als funktionelle Gruppe eine Sulfopropylgruppe, welche als starker Kationenaustauscher dient. Während bei $\text{pH} \leq 5.5$ kein Protein an die Säule band, konnten bei einem pH von 6.5 immerhin 14 % eluiert werden. Weitaus bessere Ergebnisse lieferten die Anionenaustauscher, welche im basischen Bereich eingesetzt wurden. Hierbei konnten bis zu 50 % des gewünschten Proteins von der Säule eluiert werden. Die mit Abstand besten Ergebnisse lieferte ein starker Anionenaustauscher bei pH 10.0, womit 73 % des Proteins aufgereinigt werden konnten. Anders als die beiden schwachen Anionenaustauscher ANX und DEAE, welche als funktionelle Gruppen eine Diethylaminopropylgruppe bzw. eine Diethylaminoethylgruppe enthalten, handelt es sich bei Q-Sepharose um einen starken Anionenaustauscher mit einem positiv geladenen quartären Ammoniumion [126]. Der isoelektrische Punkt von bHsc70 ED 1-554 wurde mit ExPASy ProtParam berechnet und liegt theoretisch bei 6.04, was bedeutet, dass das Protein bei $\text{pH} < 6.04$ vollständig protoniert vorliegt und somit an negativ geladene Säulenmaterialien bindet. Anders dagegen bindet bHsc70 ED 1-554 bei $\text{pH} > 6.04$ an positiv geladenes Säulenmaterial.

Die Elution von der Säule erfolgt durch Zugabe von hohen Salzkonzentrationen. Dadurch wird die Interaktion zwischen Protein und Säule gestört, wodurch es zur Elution des Proteins kommt [126]. Obwohl mit einem starken Anionenaustauscher bereits sehr gute Ergebnisse bei der Ausbeute und der Reinheit erreicht wurden, ergab sich ein weiteres Problem: Durch den stark alkalischen pH von 10.0 degradierte bHsc70 ED 1-554 innerhalb kürzester Zeit (Abbildung 4). Deswegen war es nötig, weitere Aufreinigungsstrategien zu testen, darunter hydrophobe Interaktionschromatographie.

Tabelle 2: Übersicht aller für die Aufreinigung von bHsc70 ED 1-554 verwendeten Säulenmaterialien, Puffer und pH-Werte zur Aufreinigung mittels Ionenaustauschern. Weiterhin dargestellt sind die Mengen an Gesamtprotein, die überhaupt nicht an die Säule banden (Durchlauf), durch das Waschen von der Säule eluiert wurden (Wash) oder spezifisch an die Säule gebundenes Protein (Elution). Der isoelektrische Punkt von bHsc70 ED 1-554 beträgt 6.04 (bestimmt mit ExPASy ProtParam). SP = Sulfopropylgruppe, Q = quartäres Ammoniumion, ANX = Diethylaminopropylgruppe, DEAE = Diethyl-aminoethylgruppe, HP = High Performance, FF = Fast Flow.

| pH | Puffer | Säule | Durchlauf [%] | Wash [%] | Elution [%] |
|------|----------|-----------------|---------------|----------|-------------|
| 4.5 | Citrat | HiTrap™ SP HP | 98 | 2 | 0 |
| 5.5 | MES | HiTrap™ SP HP | 99 | 0 | 1 |
| 6.5 | Bis-Tris | HiTrap™ Q HP | 83 | 3 | 14 |
| 7.5 | Hepes | HiTrap™ ANX FF | 52 | 19 | 29 |
| 7.5 | Hepes | HiTrap™ DEAE FF | 63 | 20 | 17 |
| 7.5 | Hepes | HiTrap™ Q HP | 50 | 15 | 35 |
| 8.5 | Tris | HiTrap™ ANX FF | 43 | 22 | 35 |
| 8.5 | Tris | HiTrap™ DEAE FF | 50 | 23 | 27 |
| 8.5 | Tris | HiTrap™ Q HP | 44 | 21 | 35 |
| 9.5 | Glycin | HiTrap™ ANX FF | 45 | 20 | 35 |
| 9.5 | Glycin | HiTrap™ DEAE FF | 47 | 19 | 34 |
| 9.5 | Glycin | HiTrap™ Q HP | 17 | 29 | 54 |
| 10.0 | Glycin | HiTrap™ ANX FF | 45 | 23 | 32 |
| 10.0 | Glycin | HiTrap™ DEAE FF | 20 | 29 | 51 |
| 10.0 | Glycin | HiTrap™ Q HP | 17 | 10 | 73 |

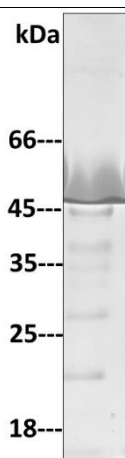


Abbildung 4: SDS-PAGE von bHsc70 ED 1-554 nach Aufreinigung über einen starken Anionenaustauscher (Q-Sepharose) bei pH 10.0. Obwohl die Reinheit bereits sehr gut war, degradierte bHsc70 ED 1-554 beim verwendeten pH, was an den zahlreichen Banden < 45 kDa zu erkennen ist.

2.1.2 Aufreinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie

Bei dieser Aufreinigungsstrategie wird beim Auftrag auf die Säule durch Zugabe einer hohen Salzkonzentration die Solvatisierung der Proteinprobe verringert. Dadurch sind hydrophobe Reste exponiert und werden vom hydrophoben Säulenmaterial gebunden. Generell ist für die Bindung überwiegend hydrophober Proteine eine niedrigere Salzkonzentration nötig. Die Elution erfolgt mit Niedrigsalzpuffer, welcher den eben beschriebenen Effekt umkehrt und so zu einer zunehmenden Hydrophilie führt [127, 128]. Daneben wurden die Auftragsdauer, die Flussrate und das Elutionsvolumen variiert, was

jedoch alles nicht zum gewünschten Erfolg führte. Stattdessen konnte nicht einmal die Hälfte der in der Probe enthaltenen Hsc70-Menge an die Säule gebunden und anschließend eluiert werden (Tabelle 3).

Tabelle 3: Übersicht der für die Aufreinigung von bHsc70 ED 1-554 verwendeten Säulen, pH-Werte und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen zur Aufreinigung mittels hydrophober Interaktionschromatographie. Außerdem dargestellt sind die prozentualen Mengen an Gesamtprotein, die entweder gar nicht an die Säule banden (Durchlauf) oder unspezifisch an die Säule gebunden hatten und durch das Waschen von der Säule gewaschen wurden (Wash) oder tatsächlich spezifisch von der Säule eluiert werden konnten. FF = Fast Flow.

| pH | $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Säule | Durchlauf [%] | Wash [%] | Elution [%] |
|-----|------------------------------|------------------|---------------|----------|-------------|
| 6.0 | 1.5 M | HiTrap™ Octyl FF | 48 | 41 | 11 |
| 6.0 | 2.5 M | HiTrap™ Octyl FF | 48 | 10 | 42 |
| 7.0 | 1.5 M | HiTrap™ Octyl FF | 38 | 40 | 22 |
| 7.0 | 2.5 M | HiTrap™ Octyl FF | 22 | 53 | 25 |
| 9.0 | 1.5 M | HiTrap™ Octyl FF | 25 | 60 | 15 |
| 9.0 | 2.5 M | HiTrap™ Octyl FF | 27 | 63 | 10 |

2.1.3 Aufreinigung als His₆-Fusionsprotein über Nickel-NTA-Beads

Infolge der nicht zufrieden stellenden Ergebnisse aus den Optimierungsversuchen wurde bHsc70 ED 1-554 in pETM-11 kloniert und so ein N-terminaler His-Tag erzeugt. Die weitere Aufreinigung erfolgte über Nickel-NTA-Beads. Bei dieser Methode wird an das Protein ein N- oder C-terminaler His₆-Tag angehängt. Histidin weist eine sehr hohe Affinität zu Übergangsmetallen wie Nickel auf, welche an einer Säule immobilisiert werden. Durch die im Imidazolring des Histidins enthaltenen Elektronendonorguppen werden sehr starke Wechselwirkungen zum Säulenmaterial eingegangen, wodurch das Zielprotein an die Säule gebunden wird, während alle anderen nicht-getaggen Proteine im Durchlauf bleiben. Durch das Waschen mit geringen Mengen an Imidazol können unspezifisch gebundene Proteine von der Säule eluiert werden. Proteine mit einem Polyhistidintag dagegen können erst durch hohe Konzentrationen an Imidazol eluiert werden. Diese Methode hat den großen Vorteil, dass bis zu 95 % der Proteinprobe aufgereinigt werden können [129]. Nach der gelungenen Aufreinigung wird die Proteinprobe mit TEV-Protease verdaut, um den Tag zu entfernen [130].

Anders als die Aufreinigung mittels Ionenaustauschern konnte mittels His-Tag eine sehr hohe Reinheit der Proteinprobe erlangt werden (Abbildung 5). Allerdings ergab sich an dieser Stelle das Problem, dass diese Protein-Batch nicht kristallisierte. Auch die wiederholte Überexpression und Aufreinigung weiterer Chargen führte trotz umfangreicher Screenings nicht zur Kristallisation. Gründe hierfür kann es viele geben. Das über Nickel-NTA-Beads aufgereinigte bHsc70 ED 1-554 könnte denaturiert gewesen sein, sodass eine erfolgreiche Kristallisation nicht möglich war. Diese Möglichkeit kann aber mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, zumal mehrere Chargen auf diese Art aufgereinigt wurden und die Bedingungen für die Aufreinigung über Nickel-NTA-Beads nicht zur Denaturierung der Proteine führen. Darüber hinaus könnte das Protein aggregiert oder oligomerisiert

vorgelegen haben, sodass auch hier keine Kristallisation möglich war. Diese beiden letzten Varianten, Denaturierung sowie Aggregation / Oligomerisierung, können aber ebenfalls ausgeschlossen werden, da nach der Aufreinigung über Nickel-NTA-Beads und dem Verdau mit TEV-Protease eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt worden war, sodass hier nur monomeres bHsc70 ED 1-554 gepoolt wurde. Zusätzlich wurde dieses bHsc70 ED 1-554 im Luciferase-Assay getestet. Es war eine Aktivität zu erkennen, auch wenn diese nur schwach mit etwa 30 % im Vergleich zu nativem Vollängen-Hsc70 ausgeprägt war (Abschnitt 2.6). Durch die Klonierung in pETM-11 und den abschließenden TEV-Verdau befanden sich vor dem Zielgen zwei zusätzliche Aminosäuren: Glycin und Alanin. Diese könnten einen Einfluss auf die Kristallisation gehabt haben, allerdings erscheint dies weniger wahrscheinlich, da es sich um kleine Reste handelt und der Anfang des Proteins nicht an der Vermittlung der Kristallisationspackung mitwirkt.

Weiterhin hätte auf Kristallisationsebene versucht werden können, eine andere Kristallisationsmethode als das *Batch*-Verfahren zu nutzen wie *Sitting* oder *Hanging Drop*. Auch hätten die Proteinkonzentration und die Kristallisationstemperatur variiert werden können. Problematisch an der Kristallisation ist, dass ab und zu an sich kristallisierbare Proteine aus nicht bekannten Gründen nicht kristallisiert werden können. Aus zeitlichen Gründen und infolge einer Phagen-Kontamination, die zur Lyse der Bakterienkultur führten, war es über einen längeren Zeitraum nicht möglich, ausreichend Protein für die Kristallisation zu produzieren.

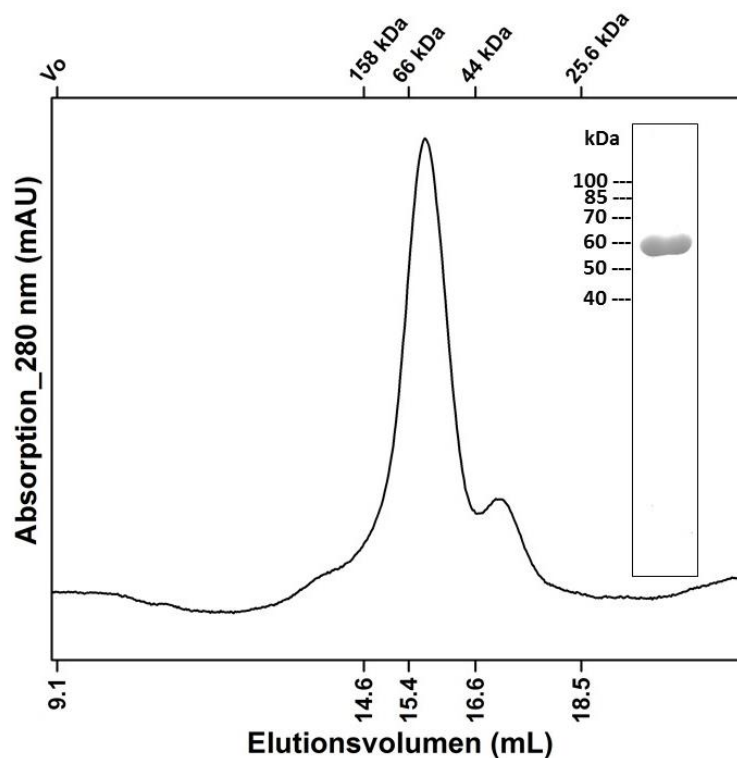


Abbildung 5: Gelfiltrationschromatogramm von bHsc70 ED 1-554 nach Aufreinigung mit N-terminalem His₆-Tag über Nickel-NTA-Beads. Das Chromatogramm wurde nach Entfernen des Tags mit TEV-Protease mit Superdex 200 10/300 GL aufgenommen. Die Reinheit der Probe wurde mittels SDS-PAGE verifiziert.

2.1.4 Optimierungsversuche zur Aufreinigung über Ionenaustauschersäulen

Da die im vorhergehenden Abschnitt erwähnten Kombinationsmöglichkeiten zur möglichen Kristallisation von über Nickel-Beads aufgereinigtem bHsc70 ED 1-554 sehr zeitaufwändig gewesen wären, wurde beschlossen, das ursprüngliche Protokoll nach Jiang *et al.* über die Aufreinigung mittels Ionenaustauscher stark zu modifizieren und gänzlich zu überarbeiten. Die besten Ergebnisse mit sehr hoher Reinheit wurden erzielt, indem direkt nach der Ernte der Zellen die Aufreinigung über einen Anionenaustauscher erfolgte ohne zuvor mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oder Polyimin P auszufällen. bHsc70 ED 1-554 eluierte vom Anionenaustauscher bei rund 10 mS/cm, was einer NaCl-Konzentration von etwa 0.1 M entsprach. Der Schritt über den Kationenaustauscher wurde übersprungen. Stattdessen erfolgte direkt die finale Aufreinigung über eine Gelfiltration. Bei einer Größenausschlusschromatographie wird die Proteinprobe auf eine Matrix bestimmter Porengröße aufgetragen. Proteine mit einem großen Molekulargewicht bzw. einem großen hydrodynamischen Radius eluieren schneller von der Säule als kleinere Proteine, welche sich immer wieder in den Poren der Matrix verfangen und somit länger brauchen, die Säule zu verlassen. Auf diese Weisen lassen sich zum einen Proteine verschiedener Größe voneinander trennen, andererseits können so auch Monomere von Oligomeren und Aggregaten getrennt werden, welche ihrer Größe entsprechend unterschiedlich lange brauchen, um durch die Säule zu wandern [131]. Durch einen Testlauf mit verschiedenen Proteinen bekannter Größe können die Gelfiltrationssäulen kalibriert werden. Wie erwartet eluierte monomeres bHsc70 ED 1-554 seiner Größe entsprechend bei 60 kDa mit einer sehr guten Reinheit, die mittels SDS-PAGE nachgewiesen wurde (Abbildung 6). Nach der erfolgreichen Optimierung des Aufreinigungsprotokolls wurden alle weiteren Chargen ebenfalls nach diesem Prozedere aufgereinigt. Anders als die über Nickel-Beads aufgereinigten *Batches* konnten die Chargen aus der Ionenaustauscheraufreinigung kristallisiert werden. Aus diesem Grund wurde für alle folgenden Kristallisationsversuche und funktionalen Assays bHsc70 ED 1-554 aus der Aufreinigung mit Ionenaustauschern verwendet.

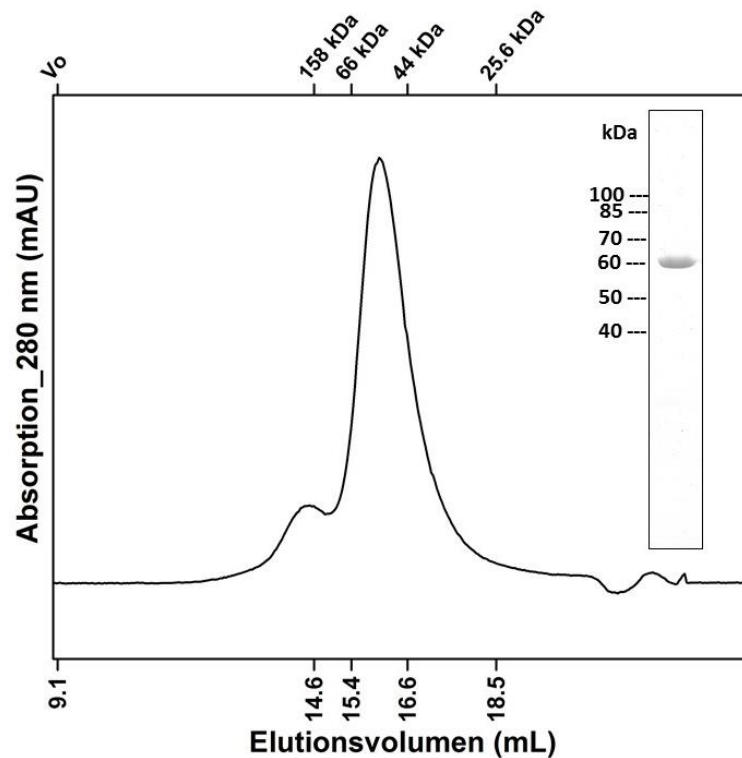


Abbildung 6: Größenausschlusschromatographie von monomerem bHsc70 ED 1-554 auf Superdex 200 10/300 GL. Seiner Größe entsprechend eluierte das Protein bei 60 kDa. Es wurde lediglich der monomere Hauptpeak gepoolt und für die weiteren Versuche verwendet. Die Reinheit der Probe wurde mittels SDS-PAGE nachgewiesen.

2.2 Aufreinigungsoptimierung verschiedener Proteine

Für die vorgesehenen Luciferase-Versuche wurde natives Hsc70 aus Schweinehirn (pHsc70) isoliert. Die Aufreinigung hierfür erfolgte über drei Schritte: Auftrag auf einen schwachen Anionenaustauscher (DEAE-Säule), weitere Aufreinigung über ATP-Agarose-Beads und Gelfiltration. pHsc70 eluierte von der DEAE-Säule bei etwa 10 mS/cm und zeigte eine hohe Reinheit (Kapitel 2.3.1).

Neben bHsc70 ED 1-554 wurden für die funktionalen Assays weitere Proteine benötigt. Neben dem Vollängenkonstrukt hHsc70 und den beiden Cochaperonen Hdj1 und Apg2 wurde auch Luciferase für die Rückfaltungsversuche aufgereinigt. Die Aufreinigung von Hdj1, Apg2 und *Firefly*-Luciferase erfolgte unter optimierten Bedingungen (siehe 6.2.12), da anders als in der ursprünglichen Publikation angegeben, nicht mit Protino-Beads, sondern Nickel-NTA-Beads aufgereinigt worden war [104]. Auch für die Proteine hHsc70, Hdj1, Apg2 und Luciferase konnte eine hohe Reinheit erhalten werden (Abbildung 7).

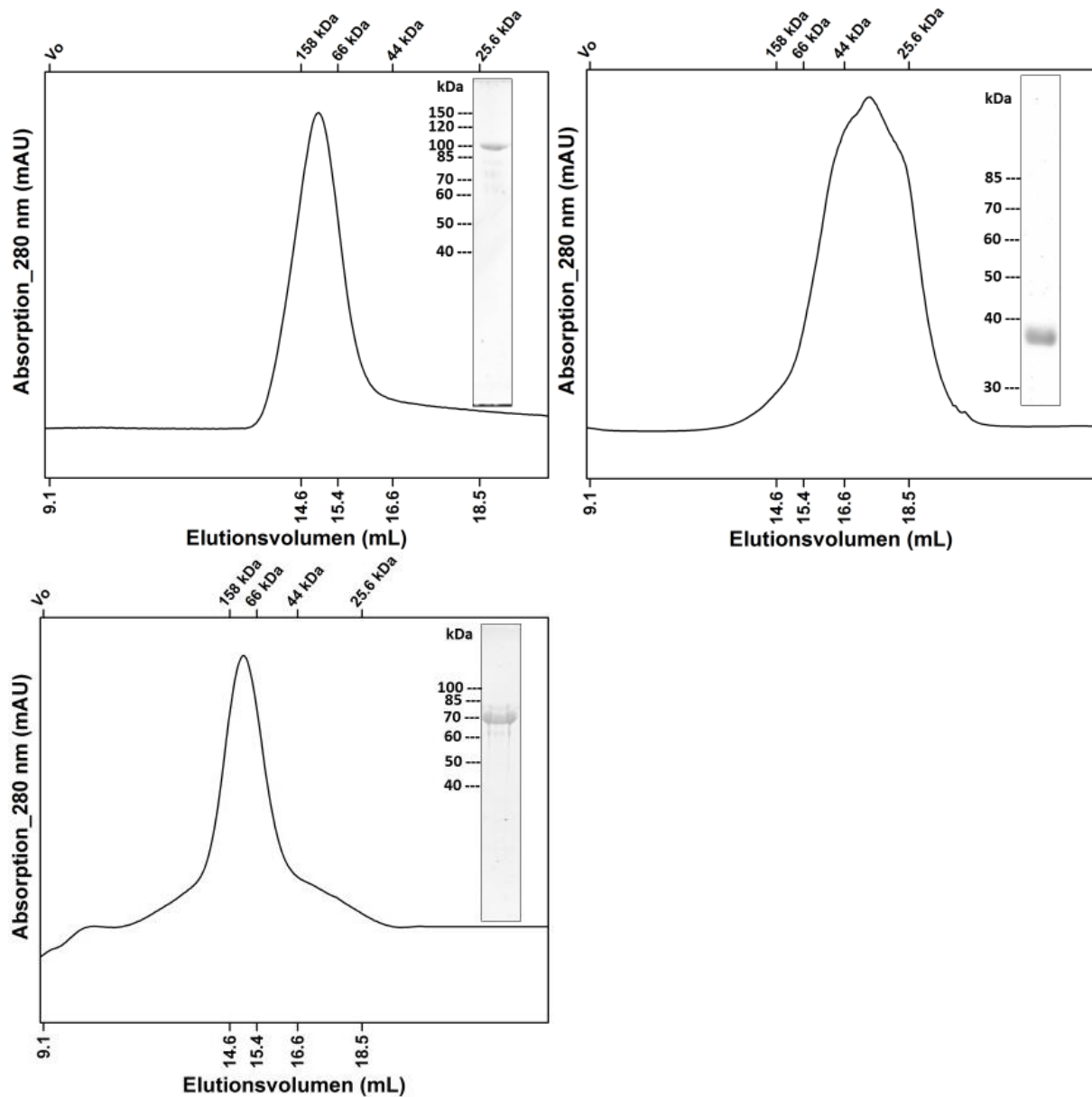


Abbildung 7: Gelfiltrationschromatogramme der Aufreinigung von Apg2 (oben links), Hdj1 (oben rechts) und hHsc70 (unten links). Dargestellt ist weiterhin das SDS-Gel zur Bestimmung der Proteinreinheit.

Zudem war für die Aufreinigung von hHsc70, Hdj1 und Apg2 die Isolation der Sumo-Protease SenP2 notwendig, um den N-terminalen His-Sumo-Tag von hHsc70 und den beiden Cochaperonen zu entfernen. Die Aufreinigung des Proteins erfolgte auch hier unter optimierten Bedingungen (siehe 6.2.11). Darüber hinaus wurde die Aktivität von SenP2 bestimmt. Hierbei wurden verschiedene Mengen an Testsubstrat His-Sumo-GFP mit SenP2 bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der Verdau mit Nickelmaterial inkubiert, um so die mit His-Sumo markierte SenP2 und den verdauten Tag an die Säule zu binden, während der Verdau mit GFP in den Durchlauf gelangte. Die Qualität der verdauten Substratmenge wurde mittels SDS-PAGE bestimmt (Abbildung 8). Hierbei zeigte sich eine sehr hohe Protease-Aktivität. So war ein Protease:Substrat-Verhältnis von 1:3000 ausreichend, um nach 1 h Inkubation einen vollständigen Verdau zu erzielen.

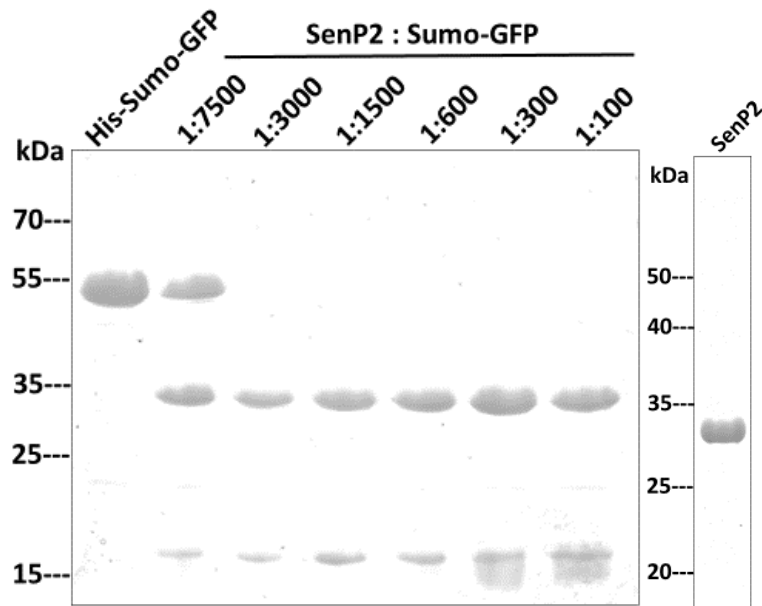


Abbildung 8: Aktivitätsbestimmung von SenP2 mit His-Sumo-GFP als Tests substrat. Für die Effizienz von SenP2 wurde die Protease mit verschiedenen Mengen Substrat für 1 h bei 4 °C in 1x PBS inkubiert und der Verdau anschließend über eine Nickelsäule aufgereinigt. His-Sumo-Protease und der verdaute *Tag* binden dabei an das Nickelmaterial, während GFP durchlief und danach auf ein SDS-Gel aufgetragen wurden. Bereits bei einem Verhältnis von 1:3000 (SenP2:His-Sumo-GFP) unter einer 1 h Inkubation bei 4 °C ist das Substrat komplett verdaut. GFP läuft bei rund 35 kDa, während der His-Sumo-*Tag* eine molekulare Größe von etwa 15 kDa aufweist.

2.3 Kristallisationsversuche

Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, einen Hsc70-Inhibitor-Komplex zu kristallisieren, um daraus Erkenntnisse über die Bindestelle im Protein und den Bindemodus zu erhalten. Die Kristallisationen wurden mit bHsc70 ED 1-554 unter Paraffinöl durchgeführt. Zusätzlich wurde versucht, natives Hsc70 aus Schweinehirn über *Sitting Drop* zu kristallisieren, da es – wie in der Einleitung bereits erwähnt – zum aktuellen Zeitpunkt keine Vollängenstruktur von Hsc70 gibt.

2.3.1 *Sitting Drop*-Kristallisation von pHsc70

In einem Seitenprojekt dieser Arbeit wurde versucht, Vollängen-Hsc70 zu kristallisieren, da bisher keinerlei Daten über ein 70 kDa großes Konstrukt vorliegen. Zu diesem Zweck wurde versucht, porcines Hsc70 (pHsc70) zu kristallisieren. Bei dem verwendeten Konstrukt handelte es sich um die Vollängenversion des nativen Hsc70, welches aus Schweinehirn extrahiert worden war [132]. Nach der Aufreinigung über einen schwachen Anionenaustauscher, ATP-Agarose-Beads und eine finale Gelfiltration konnte ein reines Protein erhalten werden (Abbildung 9). Für die Kristallisationsversuche wurde pHsc70 wie beschrieben aufgereinigt und mittels *Sitting Drop*-Methode versucht zu kristallisieren. Die *Sitting Drop*-Methode ist eine beliebte Art, Proteinkristalle zu erzeugen. Dabei wird ein Tropfen mit Protein und Präzipitans in eine Kristallisationsplatte gesetzt, sodass ein Gleichgewicht durch Dampfdiffusion mit einem flüssigen Reservoir desselben Präzipitans entsteht. In der Regel enthält der Proteintropfen eine niedrigere Präzipitanskonzentration als das Reservoir. Das Gleichgewicht entsteht dadurch, dass Wasser den Tropfen verlässt und im Reservoir landet. Durch das Verdampfen

des Wassers kommt es zu einer Erhöhung der relativen Übersättigung. Sowohl die Proben- als auch die Präzipitanskonzentration nehmen dabei durch die Verdampfung des Wassers zu. Das Gleichgewicht zwischen Reservoir und Tropfen ist dann erreicht, wenn die Präzipitanskonzentration in beiden Fällen in etwa gleich ist [133].

Trotz umfangreicher *Screening*-Versuche mit variierenden Tropfengrößen (*Screen*+Protein = 50 nL+50 nL, 50 nL+150 nL, 150 nL+50 nL) und Proteinkonzentrationen (8 µg/µL, 13 µg/µL, 20 µg/µL) sowie verschiedenen Inkubationstemperaturen (4 °C und 16 °C) blieb eine Kristallisation aus.

Die Kristallisation des kompletten 70 kDa großen Hsc70 gestaltete sich aufgrund zweier Eigenschaften dieses Proteins als schwierig. Zum einen tendieren große Proteine wie Hsc70 dazu, heterogen zu oligomerisieren, was für eine erfolgreiche Kristallisation kontraproduktiv ist. Zum anderen handelt es sich bei diesem Chaperon um ein äußerst flexibles Protein, wodurch der Verdacht im Raum steht, dass es zu Bewegungen im Interdomäneninterface kommt, sodass die Kristallisation nicht möglich ist [118]. Da es für das eigentliche Projekt keinen direkten Nutzen aus der Struktur des gesamten porcinen Hsc70 gab, wurden keine weiteren Kristallisationsversuche unternommen. Stattdessen wurde das Hauptaugenmerk auf die Kristallisation der Zweidomänenstruktur bHsc70 ED 1-554 gelegt, um damit *Soaking*-Versuche mit den AH-Verbindungen durchführen zu können.

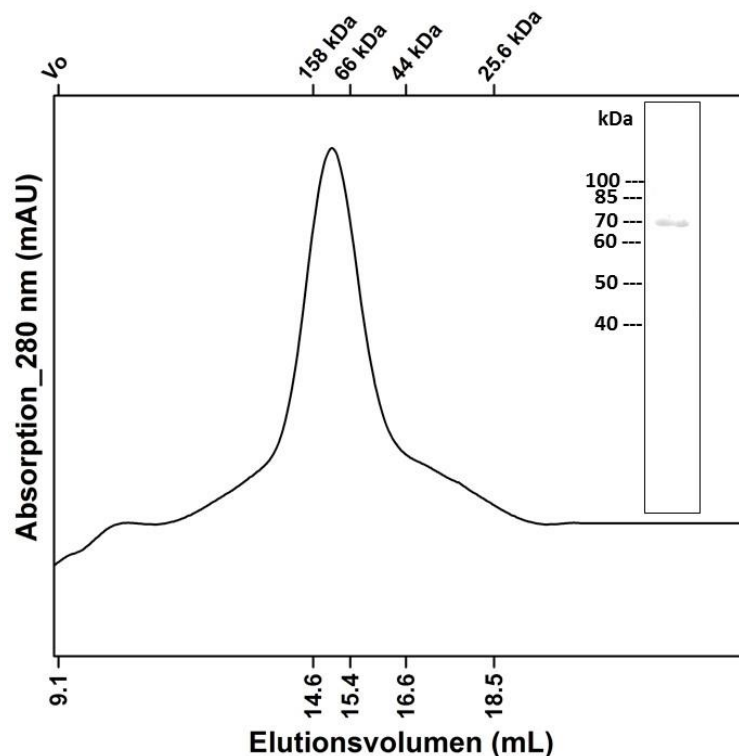


Abbildung 9: Größenausschlusschromatographie von pHsc70 auf Superdex 200 10/300 GL. Das native Volllängenprotein war aus Schweinehirn isoliert und über einen schwachen Anionenaustauscher sowie ATP-Agarose-*Beads* aufgereinigt worden. Die Reinheit der Probe wurde mittels SDS-PAGE verifiziert.

2.3.2 Kristallisation von bHsc70 ED 1-554 unter Paraffinöl für *Soaking*-Versuche

Ein Ziel dieser Arbeit war die Kristallisation eines Hsc70-Inhibitor-Komplexes, um die Bindestelle und den Bindemodus zu identifizieren. Hierfür sollte das Zweidomänenkonstrukt bHsc70 ED 1-554 verwendet werden, zumal hiermit alle vorangegangenen Docking-Studien durchgeführt worden waren und auch die Kristallisationsbedingungen bekannt sind [117-119]. Anders als es sonst oft der Fall ist, wurde bHs70 ED 1-554 nicht durch Dampfdiffusion, sondern unter Paraffinöl in der *Batch*-Methode kristallisiert. Dabei wird ein Tropfen Protein mit der Kristallisationslösung mit einer dünnen Schicht Paraffinöl überschichtet, was die Verdunstung von Wasser verhindert. Demzufolge bleibt die Konzentration des Proteins und der Kristallisationslösung konstant und verändert sich nicht wie in der *Sitting Drop*-Methode beschrieben. Vorteile der *Batch*-Methode sind die äußerst geringen Proteinmengen, die Automatisierung und die Möglichkeit, Proteine in hygroskopischen Puffersubstanzen zu kristallisieren [134].

Obleich die Zusammensetzung der Kristallisationsbedingung publiziert war, gelang es nicht, bHsc70 ED 1-554 unter den genannten Bedingungen zu kristallisieren [118]. Aus diesem Grund wurde zunächst mit verschiedenen Kristallisationslösungen und diversen Verhältnissen von Protein und *Screen* (50 nL+150 nL, 100 nL+100 nL, 150+50 nL) mittels *Batch*-Methode nach geeigneten Bedingungen für die Kristallisation gesucht. Da sich auf diese Art keine reproduzierbaren Kristalle ergaben, wurde dem Reaktionsansatz TMAO zugesetzt. TMAO gilt neben Glycerin als Struktur-stabilisierendes Reagenz, was das Wachstum qualitativ hochwertiger und streuender Kristalle fördert [118]. TMAO gilt als ausgesprochen potentes Reagenz, welches Proteinstrukturen stabilisiert und auch sonst ungeordnete Proteine in native Faltung drängen kann [135-137]. Aus dieser Beobachtung heraus entstand die Annahme, dass TMAO erheblich zur Strukturaufklärung gerade sehr flexibler Proteine beiträgt [137, 138]. Genau wie Glycerin, das häufig für die Kristallisation flexibler oder instabiler Proteine genutzt wird, dürfte TMAO dazu beitragen, kompaktere und kristallisierbare Konformationen eines Proteins zu stabilisieren [139]. Obwohl die Originalkristallisationsbedingung TMAO enthielt, war zunächst eine Kristallisation ohne Zugabe von TMAO unternommen worden, da sich in der Elektronendichte gezeigt hatte, dass TMAO an das Interdomäneninterface bindet [140]. Da die AH-Verbindungen mutmaßlich ebenfalls an diese Stelle binden würden und die TMAO-Konzentration mit 1 M sehr hoch war, stand die Vermutung im Raum, dass die Affinität der AH-Verbindungen wohl zu gering sein würde, um TMAO aus dem Interdomäneninterface zu verdrängen.

Grundsätzlich ergaben die *Screenings* mit einer Endkonzentration von 1 M TMAO bessere und vor allem reproduzierbare Kristalle. Versuche mit geringeren TMAO-Konzentrationen führten zu nicht-reproduzierbaren Kristallen. Die besten Kristalle ergaben sich unter der *Screen*-Bedingung WC B9 (100 mM HEPES-NaOH, pH 7.5 / 20 % PEG8,000) unter Zugabe von 1 M TMAO (Endkonzentration) und 12.5 % Glycerin (Endkonzentration) mit einer Proteinkonzentration von 13 µg/µL. Das Verhältnis

zwischen den Komponenten betrug dabei 1:2:1 (TMAO:Screen:Protein). Die ersten Kristalle zeigten sich nach 24 h - 48 h. Die Form der Kristalle war mit Fischschuppen vergleichbar, welche nach einem Wachstum von 3 – 6 Monaten bei 16 °C eine Länge von etwa 0.5 µm erreichten. Die Auflösung der Kristalle betrug 2.5 Å. Diese Kristalle wurden später für *Soaking*-Versuche mit ausgewählten AH-Verbindungen sowie Ver-155008 verwendet (Kapitel 2.3.4).

2.3.3 Co-Kristallisation von bHsc70 ED 1-554 mit AH-Verbindungen unter Paraffinöl

Neben der Kristallisation von *apo*-Kristallen für *Soaking*-Experimente wurden auch Co-Kristallisationen mit bHsc70 ED 1-554 und verschiedenen AH-Verbindungen sowie Ver-155008 durchgeführt. Dabei wurde bHsc70 ED 1-554 mit AHFG06, AH72tS, AH73tS, AH122t, AH313 und AH316 vorinkubiert und dann in die Kristallisationsplatten gesetzt. Die Auswahl der AH-Verbindungen erfolgte nach bestimmten Kriterien, die im nächsten Kapitel näher erläutert werden (Kapitel 2.3.4). Für gute Kristalle war es auch hier nötig, alle verfügbaren *Screens* auszutesten. Die Testungen erstreckten sich über variierende Tropfengrößen (300 nL bis 5 µL) und Inkubationstemperaturen (4 °C und 16 °C) bis hin zu Kristallen mit bzw. ohne TMAO. Wie schon im Falle der *apo*-Kristalle konnten die besten Kristalle unter Zugabe von TMAO bei einem Wachstum bei 16 °C erhalten werden.

Die Auswertung der in Grenoble gemessenen Datensätze ergab eine Auflösung von 2.5 Å - 3 Å, was jedoch zu gering war, um eine Dichte im Interdomäneninterface erkennen zu können, sodass keinerlei Aussagen über eine Bindung der AH-Verbindungen an bHsc70 ED 1-554 möglich war.

2.3.4 *Soaking*-Versuche von bHsc70 ED 1-554 mit AH-Verbindungen und Ver-155008

Da eine Co-Kristallisation keine eindeutigen Ergebnisse lieferte, wurden - ausgehend von den optimierten Kristallisationsbedingungen der *apo*-Kristalle – *Soaking*-Versuche unternommen (Kapitel 2.3.2). Hierfür wurde bHsc70 ED 1-554 unter den gefundenen optimalen Kristallisationsbedingungen (1:2:1 TMAO [4 M]:WC B9:bHsc70 ED 1-554 [13 µg/µL]) kristallisiert und nach dreimonatigem Wachstum mit verschiedenen AH-Verbindungen sowie Ver-155008 inkubiert.

Die Auswahl der AH-Verbindungen erfolgte aufgrund mehrerer Kriterien. Zum einen sollten die Verbindungen möglichst wasserlöslich sein, da nicht jeder Proteinkristall DMSO toleriert und stabil bleibt [141]. Aufgrund dessen fiel die Auswahl auf die beiden Verbindungen AH72tS und AH73tS. Letztere war bereits *in vivo* auf ihre Wirksamkeit getestet worden. Tatsächlich entwickelten Mäuse, welche mit AH73tS behandelt worden waren, das Multiple Myelom etwas später als die Kontrollgruppe [120]. Außerdem handelte es sich hierbei um die potentesten der wasserlöslichen Natriumsalze der AH-Verbindungen mit EC₅₀-Werten von rund 2 µM für AH73tS und 64 µM für AH72tS [120].

Zum anderen wurden Verbindungen bevorzugt, welche bereits ein Schweratom wie Iod oder Brom enthielten. Hierfür fiel die Wahl auf AHFG06, AH313 und AH316. AH81tIod stellte zwar eine interes-

sante Verbindung dar, allerdings fiel diese Substanz bei Zugabe zu den Kristallen sofort weiß aus, so dass keine Kristalle mehr unter dem Mikroskop erkannt werden konnten. Die Verbindungen mit den Schweratomen wurden gewählt, da Letztere aufgrund ihrer höheren Elektronenzahl stärker streuen und eine gute Dichte ergeben, was die Auswertung der Synchrotron-Daten erheblich erleichtert (Abschnitt 2.3.4) [142, 143].

Eine weitere vielversprechende Verbindung stellte AH458 dar, welche als funktionelle Gruppe ein N-Oxid enthält. Für die Kristallisation der *apo*-Kristalle wurde stets TMAO zugesetzt, welches erheblich zur Kristallisation beitrug. Versuche ohne TMAO-Zugabe ergaben entweder keine Kristalle oder aber waren nicht reproduzierbar. Bei TMAO handelt es sich um ein niedermolekulares Molekül, welches ebenfalls als funktionelle Gruppe ein N-Oxid aufweist. TMAO konnte bei der Lösung der *apo*-Struktur im Interdomäneninterface gefunden werden, was die Vermutung zu bestätigen schien, dass N-Oxide aufgrund der hydrophilen Umgebung bevorzugt gebunden werden [140].

Zuletzt wurde als Stellvertreter für einen Großteil der Substanzbibliothek der AH-Verbindungen das Amid AH122t für die *Soaking*-Experimente verwendet. Dieses zeigte hohe Aktivität in INA6-Zellen mit einem EC₅₀ von 0.2 µM [120].

Eine Kristallisation mit Ver-155008 war wünschenswert, da bis dato lediglich die Struktur der NBD von Hsc70 mit Ver-155008 vorliegt [104]. Deshalb sollte durch *Soaking*-Experimente die Zweidomänenstruktur von bHsc70 ED 1-554 mit Ver-155008 kristallisiert werden, um darüber Rückschlüsse auf die mögliche Konformationsänderung innerhalb des Proteins bei Binden des bekannten Inhibitors zu erhalten.

Die Datensätze der AH-Verbindungen wurden von C. Grimm (Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg) ausgewertet und die Struktur mittels *Molecular Replacement* der bereits in der PDB publizierten Struktur 4FL9 gelöst [140]. Die Auflösung lag im Bereich von 2 Å, allerdings konnte keine Bindung der AH-Verbindungen im Interdomäneninterface oder an einer anderen Stelle von bHsc70 ED 1-554 nachgewiesen werden.

Anders als mit den AH-Verbindungen waren *Soaking*-Versuche mit Ver-155008 erfolgreich. Hierbei konnte eine Auflösung von 1.9 Å erzielt werden (Abbildung 10). Auch hier erfolgte die Auswertung der Datensätze durch C. Grimm (Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg) mit Hilfe von *Molecular Replacement*. Ver-155008 bindet als ATP-Analogon bekanntermaßen an die NBD von Hsc70, wobei es das Protein in einer Konformation hält, die zwischen dem geschlossenen Nukleotidgebundenen Zustand und der offenen Konformation liegt [104]. Weiterhin handelt es sich bei Hsc70 um ein sehr flexibles Protein, was für die Rückfaltung denaturierter Proteine essenziell ist [32]. Aus diesem Grund gab es die Vermutung, dass die Bindung von Ver-155008 an die NBD eine Konformationsänderung im gesamten Protein bewirken würde. Tatsächlich änderte sich die Konformation des Proteins jedoch fast nicht, was an einem TM-Score von 0.99797 ersichtlich wurde, der durch Überla-

gerung der *apo*-Struktur mit der Ver-155008-gebundenen Struktur berechnet wurde. Der *TM-Score* ist ein Wert zwischen 0 und 1, der die strukturelle Ähnlichkeit zweier Proteinmodelle angibt, wobei ein Wert von 1 eine 100 %ige Strukturhomologie widerspiegelt [144]. Der RMSD-Wert betrug 0.34 Å, welcher ebenfalls eine nahezu unveränderte Konformation angibt. Der RMSD-Wert ist ein Maß für die durchschnittliche Distanz zwischen den C_{α} -Atomen des Proteinrückgrats der beiden optimal überlagerten Strukturen nach einem geeigneten Fitting [145].

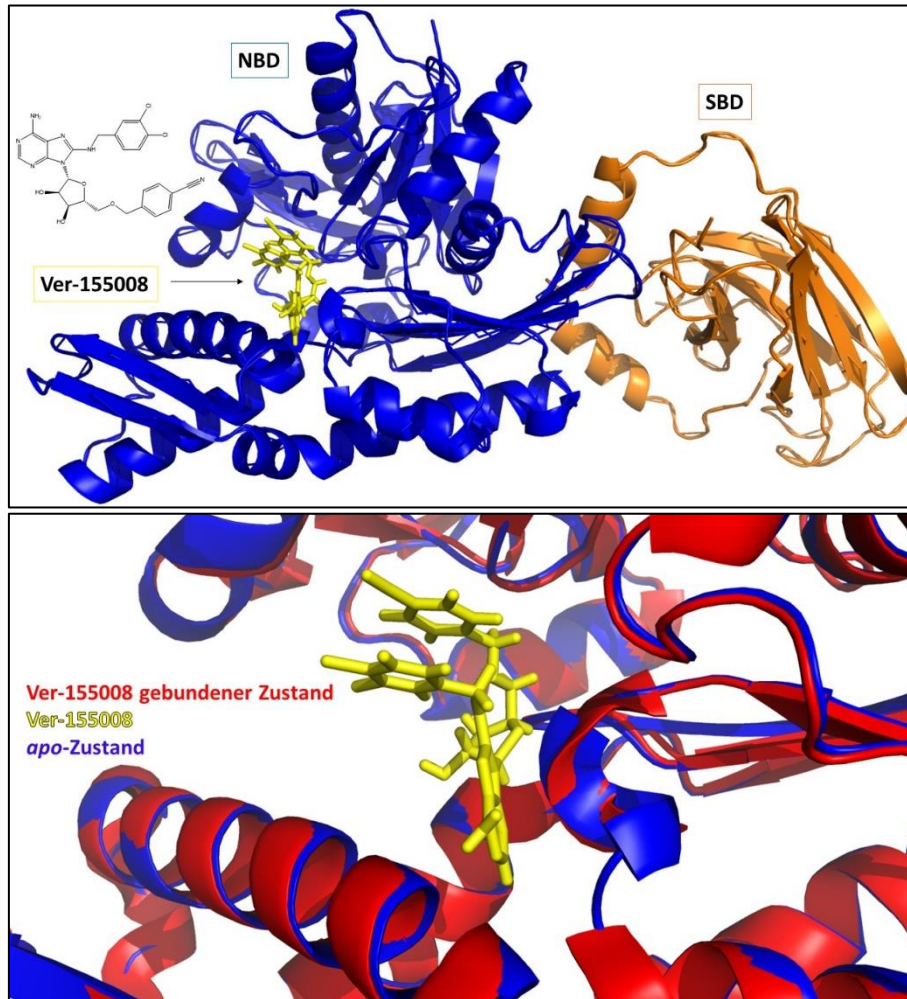


Abbildung 10: Zweidomänenstruktur von bHsc70 ED 1-554 mit gebundenem Ver-155008 bei einer Auflösung von 1.9 Å. (a) Das ATP-Analogon Ver-155008 bindet an die NBD von Hsc70. (b) Obgleich es sich bei dem Chaperon Hsc70 um ein hoch flexibles Protein handelt, kam es im Ver-155008 gebundenen Zustand zu nahezu keinerlei Konformationsänderung im Protein selber oder in der NBD. Der RMSD-Wert belief sich auf 0.34 Å, der *TM-Score* betrug 0.99797.

2.4 Tryptophan-Fluoreszenz

Parallel zu den Kristallisationsversuchen wurden biophysikalische Methoden genutzt, um die Bindung der AH-Verbindungen an pHsc70 zu quantifizieren. Hierfür wurden zunächst Vorversuche mittels Tryptophan-Fluoreszenz durchgeführt. pHsc70 weist zwei Tryptophane (W90 und W580) auf, welche als Indikator für intrinsische Molekülbewegungen genutzt werden können. Die Idee war, dass es bei Bindung der AH-Verbindungen an das Interdomäneninterface zu einer Konformationsänderung im gesamten Protein kommt, was durch die Verschiebung der Emissionswellenlänge beobachtet werden

kann. Als Vorversuch sollte gezeigt werden, dass es durch Zugabe von ATP zu einer Verschiebung der Wellenlänge zu kürzeren Werten kommt [64]. Durch die Bindung von ATP sollte sich die Konformation innerhalb der NBD ändern, sodass W90 in einer apolareren Umgebung zu finden sein sollte. Dabei verschiebt sich die Wellenlänge von 339 nm auf 334 nm. Zusätzlich kommt es zu einer Abnahme der Tryptophan-Fluoreszenz [146].

Jiang *et al.* führten die Tryptophan-Fluoreszenzversuche zwar mit Volllänge-Hsc70 aus Rinder- statt Schweinehirn durch, allerdings unterscheiden sich die beiden Spezies nur minimal in fünf von insgesamt 646 (porcin) bzw. 650 Aminosäuren voneinander (Abbildung 23) [64]. Aus diesem Grund waren vergleichbare Messergebnisse mit pHsc70 erwartet worden, was jedoch nicht der Fall war. Bei Zugabe von ATP kam es zwar in den meisten Fällen tatsächlich zu einer Abnahme der Tryptophan-Fluoreszenz, allerdings betrug diese oft nur 1 % – 2 %. Zudem war keine Blauverschiebung der Emissionswellenlänge zu beobachten. Auch konnte bei einer detaillierten Auswertung kein eindeutiger Effekt durch Zugabe von ATP erkannt werden (Abbildung 11). Trotz verschiedener Messtemperaturen (20, 25, 30, 36 °C), unterschiedlich langer Scandauer und diverser Replikate konnten die publizierten Ergebnisse nicht reproduziert werden.

Die Vermutung, dass sich in der Proteinprobe bereits vor Zugabe von ATP das selbige befunden haben könnte, kann ausgeschlossen werden, zumal nach der Aufreinigung des Proteins eine Gelfiltration gemacht wurde, um Nukleotide zu entfernen. Aufgrund der ungewissen Ergebnisse wurde es für nicht sinnvoll erachtet, ausgewählte AH-Verbindungen zu testen. Deshalb wurde eine andere Methode gewählt, um zuverlässig eine Bindung nachzuweisen und deren Stärke zu bestimmen.

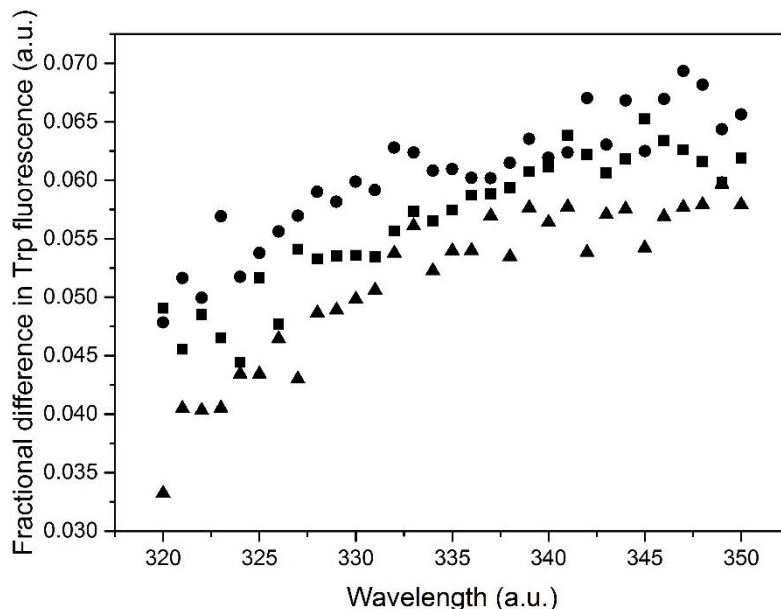


Abbildung 11: Tryptophan-Fluoreszenz von pHsc70 mit ATP als Vorversuch zur Testung verschiedener AH-Verbindungen. Durch Zugabe von ATP sollte es zu einem *Quenchen* der Fluoreszenzintensität sowie zu einer Blauverschiebung der Emissionswellenlänge kommen. Die Werte der y-Achse stellen die relative Abnahme der Tryptophan-Intensität im Vergleich zu den Messungen ohne ATP dar. Diese ergab sich aus $\frac{(\text{Fluoreszenz ohne ATP}) - (\text{Fluoreszenz mit ATP})}{(\text{Fluoreszenz ohne ATP})}$. Dargestellt sind drei repräsentative Läufe.

2.5 Mikrothermophorese

Für die Bestimmung von Bindungskonstanten bot sich Mikrothermophorese an, eine relativ neue Methode, welche sich zu Nutzen macht, dass Moleküle jeglicher Art eine bestimmte Bewegung entlang eines Temperaturgradienten aufweisen (sog. Thermophorese). Diese Bewegung hängt von drei Faktoren ab: Der Größe des Moleküls, seiner Ladung sowie des Hydratationszustands. Alle drei Parameter werden mit dem Soret-Koeffizienten zusammengefasst. Das Besondere ist nun, dass Moleküle, die einen Liganden gebunden haben, einen anderen Soret-Koeffizienten aufweisen als ungebundene, weshalb diese ein anderes Thermophorese-Verhalten zeigen. Dadurch können sowohl Affinitäten als auch Oligomerisierungszustände beschrieben werden [147].

Zu allererst wurden Versuche mit bHsc70 ED 1-554 und dem bekannten Hsc70-Inhibitor Ver-155008 durchgeführt. Nach der Optimierung des Versuchsaufbaus konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der DMSO-Messung und Ver-155008 festgestellt werden (Abbildung 12). Der Fit der Ver-155008-Kurve lieferte einen K_d von $8.3 \mu\text{M} \pm 0.8 \mu\text{M}$. Dieser Wert entspricht in etwa den Literaturwerten von Vollängen-Hsc70 mit Werten von $4 \mu\text{M}$ bis $20 \mu\text{M}$ [104]. Ein exakter Vergleich ist nicht möglich, da es sich bei der Mikrothermophorese um eine relativ neue Methode handelt, die bis jetzt noch nicht mit Hsc70 und Ver-155008 durchgeführt worden ist. Zudem sind die bestimmten K_d -Werte immer abhängig von der Methode, welche verwendet wird, so dass ausgesagt werden kann, dass der gemessene Wert in der richtigen Größenordnung liegt. Weiterhin konnte mit diesem Versuch bereits gezeigt werden, dass es sich bei dem verwendeten Zweidomänenkonstrukt um eine aktive Variante von Hsc70 handelt, welches dieselbe Affinität für Ver-155008 aufweist wie das Vollängenkonstrukt. Genaueres hierzu wird in den Kapiteln 2.3.4 und 2.6 erläutert.

Nach der Testung des bekannten Hsc70-Inhibitors Ver-155008 mit bHsc70 ED 1-554 wurden Versuche mit AH73tS durchgeführt. Diese Verbindung wurde gewählt, da sie bereits *in vivo* getestet worden war und tatsächlich zu einer Herunterregulierung von Hsp70 geführt hatte [120]. Versuche mit bHsc70 ED 1-554 und AH73tS ergaben unter den gewählten Messbedingungen keine eindeutige Bindungskurve, sodass ein geeigneter Fit nicht möglich war. Dass diese Methode an sich funktioniert, konnte durch die realistische Affinitätskonstante mit Ver-155008 gezeigt werden (Abbildung 12).

Um jedoch zu zeigen, dass es sich bei den Messungen mit AH73tS in den Mikrothermophorese-Versuchen nicht um falsch-negative Ergebnisse handelte, wurden funktionale Assays mit Luciferase durchgeführt. Luciferase-Rückfaltungsversuche bieten gegenüber den Mikrothermophorese-Versuchen den Vorteil, dass es sich hierbei um eine gängige Standardmethode handelt, welche häufig für die Bestimmung von Inhibitionsraten gerade mit Hsp70 und potenziellen Inhibitoren angewandt wird [148]. Mikrothermophorese-Versuche sind dagegen mitunter fehlerbehaftet, wodurch selbst bei bekannten Inhibitoren und Liganden keine Bindungsaffinitäten nachgewiesen werden und es zu falsch-negativen Ergebnissen kommen kann [149].

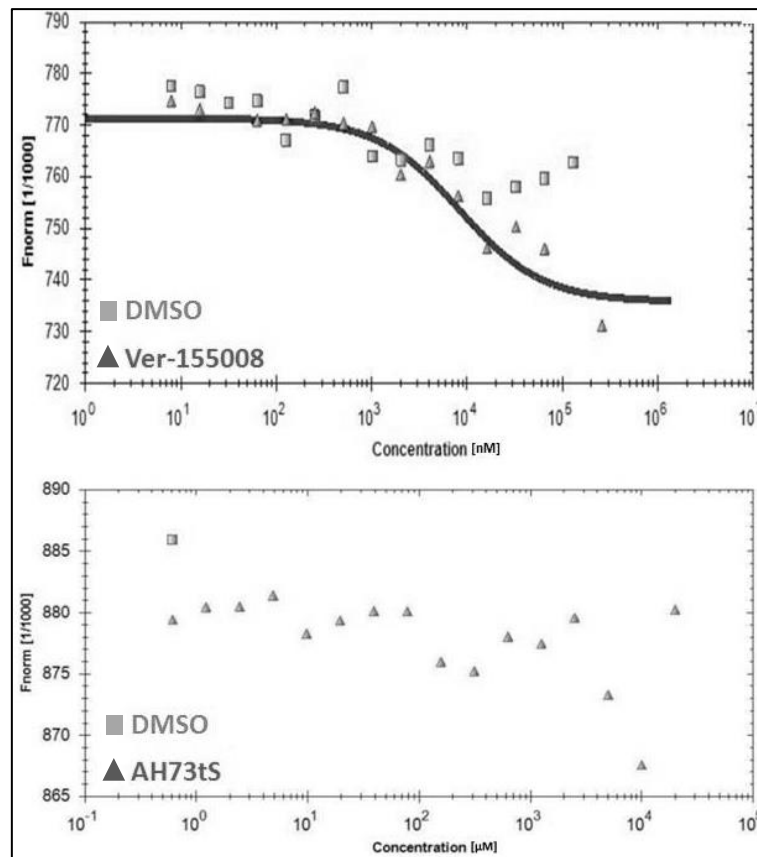


Abbildung 12: Mikrothermophorese zur Bestimmung einer Bindung von Ver-155008 an bHsc70 ED 1-554 (oben) und AH73tS (unten). An einen Liganden gebundenes Protein zeigt ein anderes Thermophorese-Verhalten als ein ungebundenes Protein. Aus dieser Beobachtung heraus lassen sich Rückschlüsse auf die Bindungskonstante ziehen. Ver-155008 bindet mit einer Affinität von rund 8 μM an das Zweidomänenkonstrukt (oben), während unter den gewählten Messbedingungen keine Bindung von AH73tS zu beobachten war (unten).

2.6 Luciferase-Rückfaltungsassays

Luciferase-Rückfaltungsversuche sind eine Standardmethode für die Quantifizierung von Inhibitionsraten, die bereits seit einigen Jahren Anwendung in der Hochdurchsatzuntersuchung von Inhibitoren gerade für Hitzeschockproteine finden [150-153]. Obgleich sich diese Methode gerade für die Identifizierung von Hsp70-Inhibitoren etabliert hat, besteht ein großer Nachteil dabei. Das Luciferase-Rückfaltungssystem ist enorm komplex und besteht aus zahlreichen Komponenten, durch die erst die eigentliche Messung ermöglicht wird. Zudem handelt es sich um eine indirekte Messmethode, mit der auf die Inhibition von Hsp70 rückgeschlossen wird. Den eigentlichen Messwert stellt die Lumineszenz des Reporterproteins Luciferase dar. Von dieser Größe ausgehend können Rückschlüsse auf die Aktivität von Luciferase geschlossen werden. Darauf wiederum aufbauend wird die Aktivität von Hsp70 abgeschätzt und so die Inhibitionsstärke der verwendeten Inhibitoren ermittelt.

Der eigentliche Reporter in diesem Versuch ist, wie eben erwähnt, Luciferase, welche für die Erzeugung von Lumineszenz mehrere Komponenten benötigt. Zum einen ist hier ihr natürliches Substrat D-Luciferin nötig. Weiterhin braucht es ATP und Sauerstoff, um eine Leuchtreaktion zu ermöglichen. In

einer Umlagerungsreaktion entsteht so aus D-Luciferin Oxyluciferin, welches bei 562 nm emittiert und dessen Intensität den Messwert darstellt.

Darüber hinaus ist es für diesen Versuch essenziell, Cochaperone zu verwenden, da Hsp70 an sich nur eine geringe Rückfaltungseffizienz zeigt. Um den Rückfaltungszyklus ausreichend schnell ablaufen zu lassen, braucht es J-Proteine und Nukleotidaustauschfaktoren [154]. In diesem Assay wurde Gebrauch von Hdj1 und Apg2 gemacht [104]. Bei Ersterem handelt es sich um ein Mitglied der Hsp40-Familie, welches die Hydrolyse von ATP zu ADP stimuliert. Durch Apg2, einen Nukleotidaustauschfaktor, wird der Austausch von ADP gegen ATP beschleunigt [154].

Der Ablauf eines Luciferase-Assays erstreckt sich über mehrere Stufen. Zu allererst wird Luciferase thermisch oder chemisch denaturiert, sodass sie ihre Aktivität und somit die Fähigkeit, Lumineszenz zu erzeugen, verliert. Die so gemessene Lumineszenzintensität legt den Nullwert fest. Durch Zugabe von Hsc70, welches als Hitzeschockprotein die Aufgabe hat, denaturierte Proteine zu renaturieren, faltet Luciferase zurück, sodass die Lumineszenz aufgrund der Aktivitätsgewinnung stark zunimmt. Wichtig hierbei ist, dass nie 100 % der ursprünglichen Lumineszenz aktiver Luciferase erreicht werden können. Stattdessen wird eine maximale Rückfaltung von 70 % erwartet, sofern sich Cochaperone im Ansatz befinden [104]. Wird nun Hsc70 mit einer potenziell inhibierenden Substanz inkubiert, so sollte die Rückfaltung von Luciferase < 70 % betragen, was sich durch eine verminderte Lumineszenz äußert, sofern diese Substanz tatsächlich an Hsc70 bindet und es inhibiert.

Die ersten Luciferase-Versuche wurden mit bHsc70 ED 1-554 durchgeführt. Dieses Konstrukt war Ausgangspunkt der Docking-Versuche gewesen, um geeignete Inhibitoren zu finden. Zudem war diese Mutante bereits für die Kristallisations- und Mikrothermophoreseversuche verwendet worden (Kapitel 2.2 und 2.5).

Für die Etablierung eines funktionalen Luciferase-Assays wurde zunächst Luciferase chemisch denaturiert [155]. Nach noch nicht publizierten Ergebnissen scheint sich diese Art der Denaturierung für bakterielles DnaK besser zu eignen, während sich für Säuger-Hsp70 die thermische Denaturierung eher anbietet und so zu zuverlässigen und reproduzierbaren Daten führt (M. Mayer, Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg; nicht publiziert). Zunächst wurde nahe angelehnt an eine publizierte Variante gearbeitet [104, 155].

Alle verfügbaren AH-Verbindungen wurden zunächst bei 100 µM und 10 % DMSO auf ihre mögliche Inhibition von Hsc70 untersucht. Grundsätzlich wurden alle AH-Verbindungen in DMSO gelöst, auch solche, welche die wasserlöslichen Natriumsalze darstellten. Hintergrund war, einen direkten Vergleich mit der Positivkontrolle Ver-155008 zu ermöglichen, welches ebenfalls in DMSO gelöst vorlag. Zudem sollten die verschiedenen Verbindungen untereinander unabhängig eines Lösemittelleffekts miteinander verglichen werden können.

Die ersten Rückfaltungsversuche wurden mit bHsc70 ED 1-554 unter chemischer Denaturierung durchgeführt. Dies resultierte jedoch in äußerst inhomogenen und nicht reproduzierbaren Ergebnissen, sodass infolgedessen auf die thermische Denaturierung zurückgegriffen wurde.

Anders als erwartet konnte mit bHsc70 ED 1-554 in Anwesenheit von Hdj1 und Apg2 eine nur 30 %ige Rückfaltung thermisch denaturierter Luciferase erreicht werden (Abbildung 13). Erwartet wurden jedoch bis zu 70 % [104]. Der Grund hierfür dürfte der fehlende C-Terminus des verwendeten Konstrukts sein, der als Interaktionsplattform mit den Cochaperonen dient [4]. Hdj1 besitzt dabei ATPase-Funktion, was zu einer effizienten Hydrolyse von ATP zu ADP führt. Apg2 dagegen trägt zu einem schnellen Nukleotidaustausch bei. Weiterhin dürfte das Fehlen des C-Terminus dazu beitragen, dass das Ende von Hsc70 direkt in die eigene Substratbindetasche bindet und sich somit selbst inaktiviert [32].

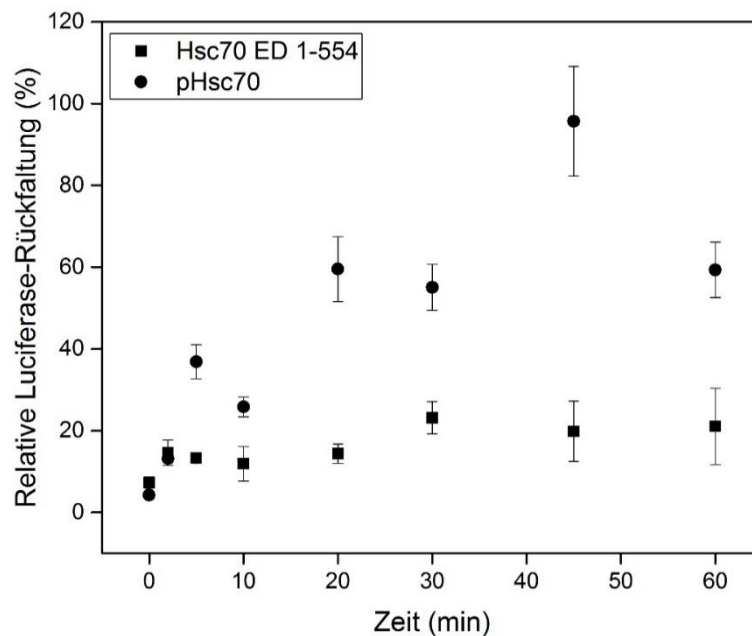


Abbildung 13: Vergleich der Rückfaltungseffizienz von bovinem trunkiertem Hsc70 (bHsc70 ED 1-554) und nativem porcinem Hsc70 (pHsc70). Während das Volllängenkonstrukt rund 60 % der denaturierten Luciferase rückfalten konnte, betrug die Effizienz für bHsc70 ED 1-554 lediglich knapp 25 % (n = 2).

Infolge der geringen Rückfaltungsrate von bHsc70 ED 1-554 und der damit einhergehenden Schwierigkeit, genau zwischen Inhibition und Nicht-Inhibition zu unterscheiden, wurde entschieden, die Luciferase-Versuche mit nativem, Volllängen-Hsc70 aus Schweinehirn durchzuführen.

In der Tat erhöhte sich mit dieser Hsc70-Variante die Rückfaltungskapazität von 25 % auf bis zu 60 % (Abbildung 13). Da jedoch zur selben Zeit Literatur zur Charakterisierung von Hsc70-Inhibitoren mittels Luciferase-Assay publiziert wurde, wurde beschlossen, genau nach dem publizierten Protokoll vorzugehen und dasselbe Konstrukt zu verwenden [104]. Aus diesem Grund wurde für alle weiteren Versuche bakteriell exprimiertes humanes Hsc70 (hHsc70) verwendet, welches eine Rückfaltungseffizienz von bis zu 70 % aufwies.

Zur Quantifizierung der Inhibitionsrate wurden alle AH-Verbindungen zunächst bei 100 μM getestet. Sollten die entsprechenden Verbindungen bei dieser relativ hohen Konzentration nicht oder nur marginal inhibieren, würden sie für eine weitere Untersuchung nicht mehr interessant sein. Für die Auswertung der Daten wurde die Lumineszenz gegen die Messzeit aufgetragen. Durch Anlegen einer Gerade durch die ersten Messpunkte ($t = 0$ min bis $t = 20$ min) konnte die Anfangssteigung bestimmt werden. Durch Normalisierung der Anfangssteigung gegen die Kontrolle mit DMSO konnten die Inhibitionsraten berechnet werden. Eine weitere Möglichkeit der Inhibitionsbestimmung stellte das Auslesen des Endplateaus ($t = 35$ min) dar. Ein Vergleich der beiden Analysemethoden ergab dabei nahezu identische Werte.

Bei den Vortestungen mit 100 μM der AH-Verbindungen konnten teils signifikante Inhibitionswerte von $> 95\%$ erzielt werden (AH76t, AH81tIod, AH99t, AH100t, AH107t) (Tabelle 4). Andererseits gab es auch Verbindungen, welche fast nicht oder in nur sehr geringem Maße das Luciferase-Rückfaltungssystem inhibierten (AHFG06, AH68c, AH73t, AH458).

Tabelle 4: Inhibitionswerte aller getesteten AH-Verbindungen im Luciferase-Rückfaltungsversuch mit hHsc70. Alle Verbindungen wurden mit einer Endkonzentration von 100 μM in 10 % DMSO gemessen. Als Kontrolle wurde das ATP-Analogon Ver-155008 verwendet. Obwohl sich die einzelnen Verbindungen teilweise nur marginal voneinander unterschieden, zeigten sich doch große Unterschiede in der Inhibitionsstärke ($n = 3$).

| Verbindung | Inhibitionsrate [%] | \pm [%] | Verbindung | Inhibitionsrate [%] | \pm [%] |
|------------|---------------------|-----------|------------|---------------------|-----------|
| AHFG06 | 30 | 15 | AH090t | 81 | 15 |
| AH068c | 18 | 14 | AH099t | 96 | 2 |
| AH068t | 32 | 9 | AH100t | 99 | 0 |
| AH071t | 42 | 4 | AH101t | 66 | 7 |
| AH072c | 44 | 8 | AH106t | 90 | 3 |
| AH072t | 35 | 5 | AH107t | 101 | 4 |
| AH073t | 20 | 8 | AH109t | 47 | 3 |
| AH073tS | 30 | 7 | AH122t | 46 | 4 |
| AH075t | 59 | 8 | AH123t | 51 | 10 |
| AH076t | 97 | 2 | AH124t | 92 | 3 |
| AH077t | 79 | 5 | AH313 | 82 | 3 |
| AH078t | 53 | 4 | AH316 | 62 | 10 |
| AH081t | 44 | 2 | AH423 | 62 | 23 |
| AH081tI | 98 | 1 | AH448 | 64 | 4 |
| AH082t | 46 | 8 | AH455 | 73 | 3 |
| AH083t | 62 | 2 | AH458 | 27 | 6 |
| AH089t | 41 | 5 | Ver-155008 | 71 | 4 |

Der Versuch, eine Beziehung zwischen der Struktur und der Wirkung herzustellen, gestaltete sich jedoch schwierig. Die potentesten Verbindungen weisen eine Amidfunktion auf, während den schwächsten Inhibitoren diese funktionelle Gruppe fehlt. Weiterhin fiel auf, dass es in der Substanz-

bibliothek noch weitere Amidverbindungen gab, die jedoch nur eine mittelmäßige Inhibition von < 50 % zeigten (AH71t, AH81t, AH122t). Des Weiteren streute die Bandbreite der Inhibitionsraten von nahezu keinerlei bzw. schwacher Inhibition (< 30 %) über eine mittelmäßige Inhibition (40 % < x 60 %) bis hin zu einer fast kompletten Inhibition (> 80 %).

Außerdem widersprachen sich die von M. Chatterjee (Universitätsklinikum, Würzburg) in INA6-Myelomzellen berechneten EC_{50} -Werte und die im Luciferase-Assay bestimmten Inhibitionsraten (Tabelle 5) [120, 156]. Oft waren *in vitro* getestete potente Inhibitoren im Zellassay schwach aktiv (AH90t, AH107t), während sich wiederum *in vivo* potente Verbindungen nicht sonderlich stark im Luciferase-Versuch hervorhoben (AHFG06, AH73t, AH458). Dieser Unterschied zu den Zellversuchen könnte durch die unterschiedliche Zellpermeabilität der Verbindungen erklärt werden. So zeigte die Verbindung AH107t eine komplette Inhibition des Luciferase-Rückfaltungssystems, während der in Myelomzellen bestimmte EC_{50} bei > 100 μ M lag [120]. Aufgrund des sterisch anspruchsvollen Gerüsts und der hydrophoben Seitenketten dürfte die Diffusion über die Zellmembran erschwert worden sein, sodass diese Verbindung nahezu keinerlei Effekt zeigte, während im Proteinassay eine direkte Zugabe zu Hsc70 erfolgte, sodass die Verbindung ohne vorheriges Überqueren der Zellmembran direkt an den vermeintlichen Zielort gelangen konnte. Zur Abschätzung der Bioverfügbarkeit pharmakologischer Substanzen hat sich die von Lipinski entwickelte *Rule of 5* etabliert [157]. Hierbei haben Verbindungen die höchste Bioverfügbarkeit, die mindestens drei der folgenden Kriterien erfüllen: Molekulargewicht < 500 Da, $clogP \leq 5$, ≤ 5 H-Brückendonoren (NH- und OH-Bindungen), ≤ 10 H-Brückenakzeptoren (N- und O-Atome). Am Beispiel von AH90t und AH107t lässt sich ableiten, dass diese beiden Verbindungen eine geringe Bioverfügbarkeit aufweisen, zumal ihr Molekulargewicht 532 Da bzw. 555 Da beträgt sowie ihr berechneter $clogP$ bei 6.7 und 6.8 liegt [120]. Damit ließe sich erklären, warum einige der getesteten AH-Verbindungen *in vitro* eine höhere Aktivität zeigten als in INA6-Zellen.

Obleich einige der untersuchten AH-Verbindungen eine über 90 %ige Inhibition des Luciferase-Rückfaltungssystems bei einer Endkonzentration von 100 μ M bewirkten und dies somit auf eine hohe Aktivität schließen ließ, bestand jedoch der Verdacht, dass die verwendeten Substanzen aufgrund ihrer Hydrophobizität dazu tendieren könnten, in wässrigem Milieu zu aggregieren. Diese Aggregate könnten demnach für den beobachteten Inhibitionseffekt verantwortlich sein, indem sie unspezifisch mit Hsc70 oder einer anderen Komponente des Luciferase-Systems interferierten. Aus diesem Grund wurden im Anschluss an die Luciferase-Versuche NMR-Messungen zur Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration durchgeführt.

Tabelle 5: EC₅₀-Werte aller AH-Verbindungen in INA6-Zellen. Die EC₅₀-Werte wurden von E. Müller und D. Brünert (Universitätsklinikum Würzburg) bestimmt, wobei nicht immer die Standardabweichung angegeben wurde (n ≥ 3). Die Verbindungen AHFG06 und AH81tl wurden nicht gemessen [120, 156].

| Verbindung | EC ₅₀ [μM] | ± [μM] | Verbindung | EC ₅₀ [μM] | ± [μM] |
|------------|-----------------------|--------|------------|-----------------------|--------|
| AHFG06 | -- | -- | AH083t | 2.3 | 0.6 |
| AH068c | 100 | -- | AH089t | 7.1 | 0.3 |
| AH68cS | 100 | -- | AH090t | 100 | -- |
| AH068t | 10.1 | 0.1 | AH099t | 0.95 | 0.09 |
| AH68tS | 7.9 | 0.8 | AH100t | 2.9 | 0.3 |
| AH071t | 0.68 | 0.04 | AH101t | 6.4 | 0.7 |
| AH072c | 100 | -- | AH106t | 43 | 12 |
| AH72cS | 100 | -- | AH107t | 100 | -- |
| AH072t | 57 | 15 | AH109t | 100 | -- |
| AH72tS | 64 | 19 | AH122t | 0.2 | 0.01 |
| AH073t | 1.3 | 0.2 | AH123t | 0.57 | 0.02 |
| AH073tS | 1.8 | 0.1 | AH124t | 0.34 | 0.04 |
| AH075t | 30 | 2 | AH313 | 0.79 | -- |
| AH076t | 0.88 | 0.1 | AH316 | 71.3 | -- |
| AH077t | 0.53 | 0.03 | AH423 | 10.8 | -- |
| AH078t | 50 | -- | AH448 | 0.47 | -- |
| AH081t | 0.41 | 0.03 | AH455 | 0.58 | -- |
| AH081tl | -- | -- | AH458 | 2 | -- |
| AH082t | 6.9 | 0.3 | Ver-155008 | 2.5 | -- |

2.7 Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration mittels NMR

Aufgrund des enorm hydrophoben Charakters einiger AH-Substanzen (clogP > 5) stand der Verdacht im Raum, dass die beobachteten Inhibitionseffekte im Luciferase-Rückfaltungssassay unter Umständen durch eine Aggregatbildung verursacht worden sein könnten. Zur Klärung dieses Verdachts wurden NMR-Messungen zur Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration (CAC) vorgenommen. Infolge der umfangreichen Substanzbibliothek und der beschränkten Kapazität konnten nicht alle AH-Verbindungen gemessen werden. Stattdessen wurden die im Luciferase-Assay potentesten Substanzen für die Bestimmung der CAC ausgewählt.

Die Bestimmung der CAC diente dazu, die Konzentration herauszufinden, ab welcher die Substanz Aggregate bildete, die womöglich für eine unspezifische Inhibition verantwortlich waren und so zu falsch-positiven Ergebnissen führten. Eine Aggregatbildung von hydrophoben Substanzen in wässrigem Milieu kann durch Aufnahme eines NMR-Spektrums detektiert werden, da es bei der Bildung von Aggregaten zu einer Verschiebung des ¹H-Signals nach Hochfeld kommt [158]. Die Messungen der CAC im NMR und deren Auswertung wurden von J. Wiest (Pharmazeutische Technologie, Universität Würzburg) durchgeführt.

Zu allererst sollte die CAC von AH73tS bestimmt werden, welches bereits *in vivo* Effekte auf das Wachstum des Multiplen Myeloms gezeigt hatte, indem es das Tumorwachstum in Mäusen verlangsamte und die Hsc70-Expression verminderte [120]. Erwartet wurde, dass AH73tS als Natriumsalz der freien Säure nicht aggregieren, sondern komplett in H₂O löslich sein sollte. Es wurde jedoch festgestellt, dass die CAC für AH73tS bei 25 µM – 50 µM lag, da es ab einer Konzentration von 25 µM zu einer Verschiebung des ¹H-Signals nach Hochfeld kam (Abbildung 14). Mit einer steigenden Konzentration an AH73tS wurde dieser *Shift* immer stärker. Dies legte den Verdacht nahe, dass die bei 100 µM gemessene Inhibition von 30 % ± 7 % unspezifisch durch Aggregatbildung verursacht worden sein könnte. Interessanterweise ließ sich der beobachtete Aggregationseffekt jedoch durch Zugabe von nur 0.01 % Tween 80, einem nicht-ionischen Detergenz, rückgängig machen. Im NMR-Spektrum konnte bei Zugabe von Tween 80 zu 200 µM AH73tS eine Rückverschiebung des ¹H-Signals an seine ursprüngliche Position beobachtet werden (Abbildung 15). Diese beiden Beobachtungen suggerierten, dass AH73tS womöglich bei Zugabe von Detergenz keinerlei Inhibition mehr zeigen würde, da die beobachtete Inhibition bei 100 µM auf eine Aggregatbildung zurückzuführen war. Diese Erkenntnis legte nahe, dass die weniger löslichen AH-Verbindungen bereits bei geringeren Konzentrationen Aggregate bildeten, wenn schon die wasserlösliche Form von AH73tS aggregierte, welches als löslicher Aggregator klassifiziert werden konnte.

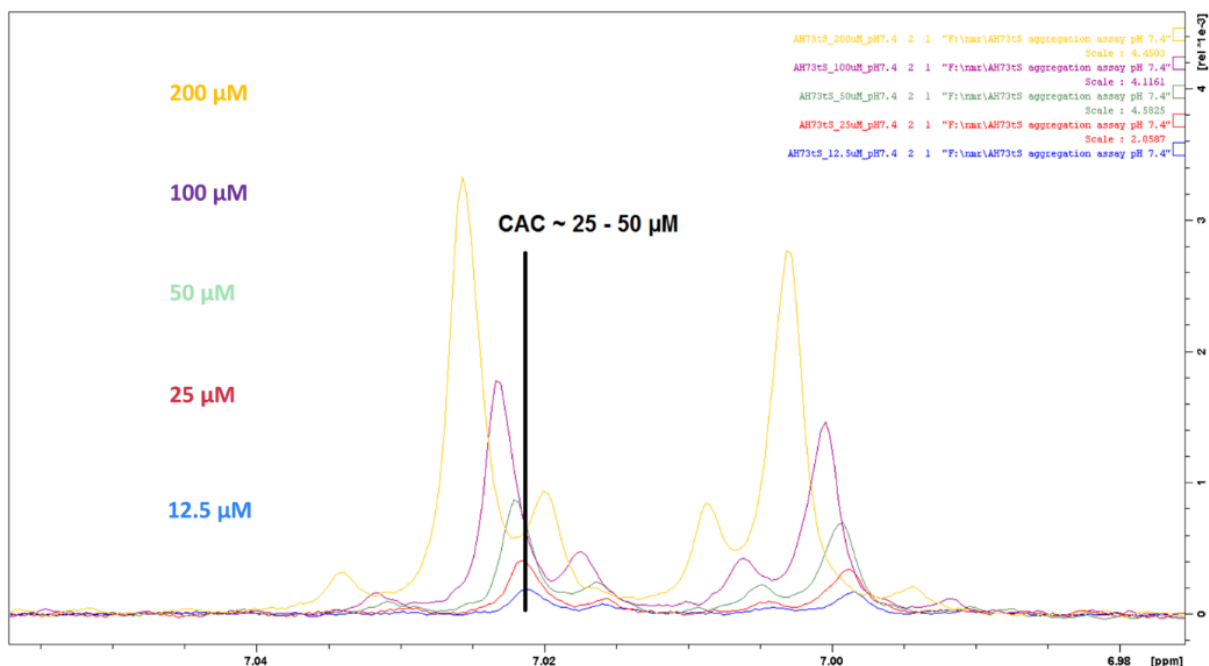


Abbildung 14: ¹H-NMR-Spektrum von AH73tS zur Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration (CAC). Mit einer zunehmenden Substanzkonzentration nimmt auch die Intensität des NMR-Signals zu. Zudem kommt es ab einer Konzentration von 25 µM zu einer Verschiebung des Signals nach Hochfeld, welches auf die Bildung von Aggregaten hindeutet. Die Messungen und deren Auswertung wurden von J. Wiest (Pharmazeutische Technologie, Universität Würzburg) durchgeführt.

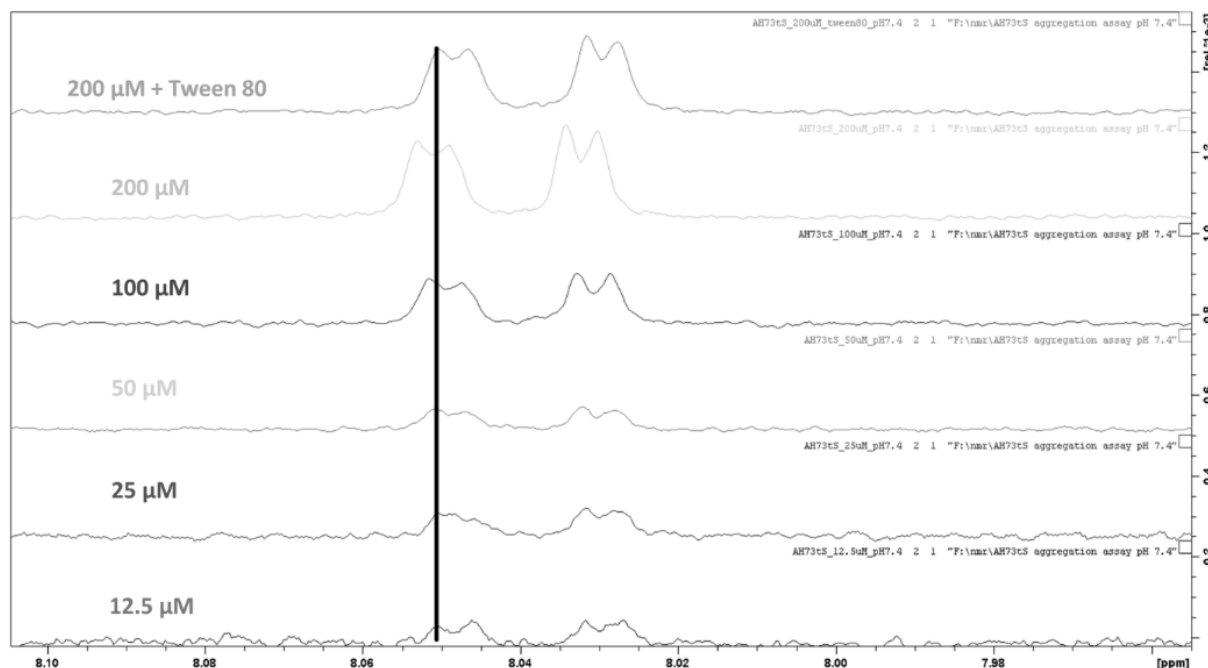


Abbildung 15: Zerstörung der gebildeten Aggregate von AH73tS durch Zugabe von 0.01 % Tween 80. Wie bereits in Abbildung 14 zu sehen, kommt es ab 25 μM AH73tS zu einer Verschiebung des NMR-Signals nach Hochfeld. Durch Zugabe von Detergenz zur höchsten verwendeten Konzentration wird das Signal wieder an seine ursprüngliche Position verschoben. Die Messungen und deren Auswertung wurden von J. Wiest (Pharmazeutische Technologie, Universität Würzburg) durchgeführt.

Aufgrund beschränkter Kapazitäten konnten nicht alle im Luciferase-Assay getesteten Verbindungen bezüglich ihrer CAC untersucht werden. Deshalb wurden nur die potentesten Verbindungen ausgewählt, die möglichst repräsentativ für die übrigen Substanzen stehen sollten. Für die weiteren NMR-Versuche wurden AH76t, AH101t und AH106t ausgewählt. Hierbei handelte es sich ausschließlich um Amide, welche auch den größten Teil der Substanzbibliothek ausmachten. Zudem waren alle drei Verbindungen sehr potent im Luciferase-Assay gewesen und führten zu einer Inhibition des Luciferase-Systems von 97 % ± 2 % (AH76t), 66 % ± 7 % (AH101t) und 90 % ± 3 % (AH106t).

Bei der Versuchsdurchführung zur Bestimmung der CAC konnte beobachtet werden, dass es sich bei AH76t, AH101t und AH106t um unlösliche Verbindungen in 50 mM Phosphat-Puffer (pH 7.4) handelte. Sobald die Stammlösungen der genannten Verbindungen (20 mM in DMSO) zu dem Puffer gegeben wurden, entstand ein feiner, weißer Niederschlag. AH76t und AH101t waren in reinem DMSO löslich, während sich AH106t in DMSO bei 20 mM nur teilweise löste.

Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand mit Tween 80 versetzt, um zu prüfen, ob die auftretenden Signale nach Detergenz-Zugabe ohne Zentrifugation nur auf induzierte Löslichkeit oder auch auf Aggregation zurückzuführen sind. Die Lösungen wurden anschließend in NMR-Röhrchen überführt und im NMR gemessen. Dabei konnte für alle drei Verbindungen kein ¹H-Signal erhalten werden (Abbildung 16). Dies deutete darauf hin, dass die komplette AH-Verbindung ausgefallen und durch die Zentrifugation entfernt worden war, sodass kein Signal im NMR detektiert werden konnte. Wurde dagegen die Lösung mit den Präzipitaten der Verbindungen AH76t und AH101t mit Tween 80

versetzt, so konnten Signale detektiert werden. Somit dürfte Tween 80 zu einer Detergenz-induzierten Löslichkeit beitragen. Insofern werden derartige Verbindungen nach LaPlante *et al.* als „unlösliche Nichtaggregatoren“ klassifiziert, wenn der gesamte Tween-Effekt nur durch induzierte Löslichkeit zustande kommt [158].

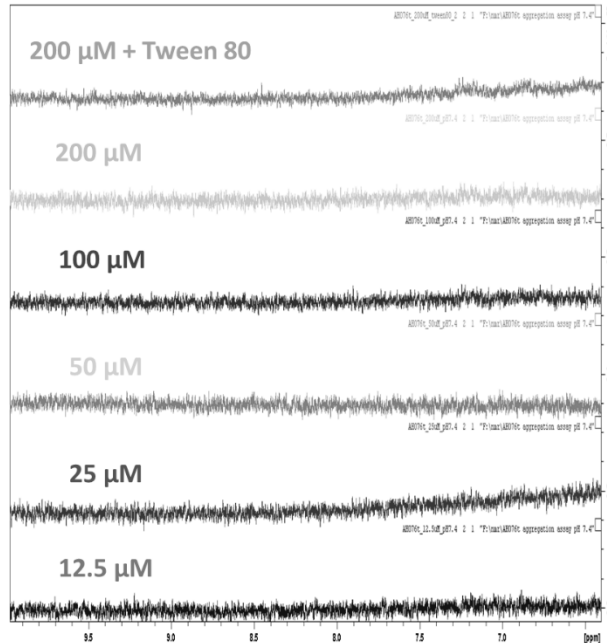


Abbildung 16: ^1H -NMR-Spektrum von AH76t zur Bestimmung der kritischen Aggregationskonzentration. Die Spektren für AH101t und AH106t sahen genauso aus. Die verwendeten Verbindungen präzipitierten nach Zugabe der DMSO-Stamm-lösung zu Phosphat-Puffer. Durch den Versuchsaufbau wurden die Präzipitate abgetrennt, sodass der Überstand kein NMR-Signal zeigte. Wurde dagegen die Lösung mit den Präzipitaten der Verbindungen AH76t und AH101t mit Tween 80 versetzt (AH106t war in DMSO bei 20 mM nur teilweise löslich), so konnten Signale detektiert werden. Somit dürfte Tween 80 zu einer Detergenz-induzierten Löslichkeit beitragen, weshalb die Verbindungen als unlösliche Nichtaggregatoren klassifiziert werden. Die Messungen und deren Auswertung wurden von J. Wiest (Pharmazeutische Technologie, Universität Würzburg) durchgeführt.

Einen besonderen Fall stellte AH106t dar, welches bei 20 mM nicht bzw. nur teilweise in DMSO-d_6 löslich war. Eine Versuchsdurchführung nach dem Standardprotokoll war damit streng genommen nicht mehr möglich [158]. Durch Zugabe von Tween 80 konnten allerdings keinerlei Effekte beobachtet werden, so dass im Wesentlichen von einer unlöslichen Verbindung ausgegangen werden muss.

Insgesamt führten die NMR-Versuche zu der Erkenntnis, dass AH76t und AH101t eine Tween 80-induzierte Löslichkeit zeigen, während AH106t offenbar so schlecht löslich ist, dass sich selbst in DMSO keine klare Lösung erhalten lässt und auch Tween 80 keinen Effekt auf die Löslichkeit hat.

Höhere Tween 80-Konzentrationen wären grundsätzlich denkbar gewesen, allerdings konnten Detergenz-abhängige Effekte auf das Luciferase-Rückfaltungssystem nicht ausgeschlossen werden. Aufgrund von Zeit- und Ressourcenmangel konnten so keine weiteren Versuche mit höheren Detergenz-Konzentrationen durchgeführt werden.

An dieser Stelle ist es wichtig zu erwähnen, dass die Durchführung der NMR-Versuche für die Verbindungen AH76t, AH101t und AH106t sowie die Wiederholung der Luciferase-Assays zeitgleich stattfanden, sodass im Vorhinein noch nicht klar war, dass es sich bei einem Großteil der Substanzbiblio-

thek um unlösliche Nichtaggregatoren handeln könnte. Infolgedessen wurden alle Luciferase-Versuche wiederholt, diesmal unter Zugabe von Tween 80, um falsch-positive Ergebnisse ausschließen zu können.

2.8 Luciferase-Rückfaltungsversuche mit Tween 80

NMR-Versuche zur Bestimmung der CAC hatten ergeben, dass die Natriumverbindung AH73tS ab einer Konzentration von 25 μM – 50 μM Aggregate in wässrigen Lösungen bildet, sodass die bis dahin in Luciferase-Rückfaltungsversuchen bei 100 μM erhaltenen Inhibitionsraten möglicherweise auf eine unspezifische Inhibition durch Aggregate zurückzuführen sind. Da die Bildung der Aggregate durch Zugabe von Tween 80 in den NMR-Versuchen unterbunden werden konnte, wurden alle AH-Verbindungen nochmals im Luciferase-Rückfaltungsassay bezüglich ihrer Inhibitionsstärke in Anwesenheit von Detergenz untersucht.

In den NMR-Versuchen wurde gezeigt, dass es sich bei einigen AH-Verbindungen um Aggregatoren handelt, deren Aggregation jedoch durch Zugabe von Detergenz verhindert werden kann. Bei der Wiederholung der Luciferase-Versuche mit Tween 80 verschwand der Inhibitionseffekt bei nahezu sämtlichen Substanzen bzw. wurde drastisch reduziert (Tabelle 6). Besonders deutlich zeigte sich der Detergenz-Effekt bei den vormals potentesten Substanzen AH76t, AH81tIod, AH99t, AH100t, AH107t sowie noch einigen weiteren Verbindungen, bei denen in Anwesenheit von Tween 80 die Inhibitionsrate um teilweise 55 % - 70 % auf lediglich rund 32 % \pm 6 % (AH76t) bzw. -3 % \pm 3 % (AH101t) abfiel. Die Kontrolle Ver-155008 zeigte dagegen keinerlei Effekt durch Zugabe von Detergenz und inhibierte nach wie vor zu 67 % \pm 6 % (71 % \pm 6 % ohne Tween 80) bei einer Konzentration von 100 μM . Somit konnte auch ein rein durch Tween 80 induzierter Abfall der Inhibitionsstärke ausgeschlossen werden. Die teilweise drastische Abnahme der Inhibitionsstärke bei Zugabe von Detergenz deutete darauf hin, dass die anfangs gemessenen Inhibitionen durch Aggregate hervorgerufen worden waren, die unspezifisch an Hsc70 oder eines seiner Cochaperone Apg2 und Hdj1 banden und diese inhibierten. Weiterhin kann nach den NMR-Ergebnissen die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Ergebnisse ohne Tween 80 im Falle von AH76t und AH101t durch Präzipitate verfälscht wurden. Durch Zugabe von Detergenz ließen sich diese auflösen, sodass keine nennenswerte Inhibition mehr gemessen wurde.

Eine Abnahme der Inhibitionsstärke durch Zugabe von Tween 80 traf jedoch nicht auf alle AH-Verbindungen zu. Verbindungen wie AHFG06, AH71t und AH458 inhibierten sowohl mit als auch ohne Tween 80 annähernd gleich stark (Tabelle 7). Diese Verbindungen eigneten sich jedoch nicht dafür, weitere Untersuchungen mit ihnen durchzuführen und diese als Startstruktur für die Entwicklung neuartiger Inhibitoren zu verwenden, zumal die Inhibitionsstärke deutlich weniger als die der Positiv-

kontrolle Ver-155008 ($67\% \pm 6\%$) betrug und somit keine sonderlich guten IC_{50} -Werte im submikromolaren Bereich zu erwarten waren.

Tabelle 6: Inhibitionsstärken aller AH-Verbindungen unter Zugabe von Tween 80 zur Verhinderung von Aggregation der AH-Verbindungen. Die Daten wurden mittels Luciferase-Rückfaltungssassay gemessen, bei dem denaturierte *Firefly*-Luciferase durch Zugabe von Hsc70 und seinen Cochaperonen Apg2 und Hdj1 rückgefaltet wird. Wird Hsc70 oder eines seiner Cochaperone durch die gewählten AH-Verbindungen inhibiert, verläuft die Rückfaltung von Luciferase langsamer als die DMSO-Kontrolle. Ver-155008 diente als interne Positivkontrolle ($n = 3$).

| Verbindung | Inhibitionsrate [%] | \pm [%] | Verbindung | Inhibitionsrate [%] | \pm [%] |
|------------|---------------------|-----------|------------|---------------------|-----------|
| AHFG06 | 33 | 3 | AH083t | 25 | 4 |
| AH068c | 17 | 7 | AH089t | 38 | 20 |
| AH68cS | 19 | 22 | AH090t | 57 | 21 |
| AH068t | 17 | 6 | AH099t | 38 | 14 |
| AH68tS | 52 | 40 | AH100t | 72 | 12 |
| AH071t | 35 | 8 | AH101t | -3 | 3 |
| AH072c | 19 | 7 | AH106t | 93 | 1 |
| AH72cS | 54 | 12 | AH107t | 46 | 8 |
| AH072t | 28 | 13 | AH109t | 17 | 7 |
| AH72tS | 27 | 9 | AH122t | 25 | 7 |
| AH073t | 2 | 6 | AH123t | 33 | 10 |
| AH073tS | 28 | 11 | AH124t | 54 | 2 |
| AH075t | 67 | 16 | AH313 | 39 | 7 |
| AH076t | 32 | 6 | AH316 | 69 | 5 |
| AH077t | 59 | 6 | AH423 | 34 | 5 |
| AH078t | 51 | 9 | AH448 | 49 | 4 |
| AH081t | 43 | 13 | AH455 | 66 | 2 |
| AH081tl | 41 | 5 | AH458 | 29 | 9 |
| AH082t | 0 | 14 | Ver-155008 | 67 | 6 |

Die einzige Ausnahme in der gesamten AH-Substanzbibliothek bildete erstaunlicherweise AH106t, das sowohl mit als auch ohne Tween 80 zu jeweils 90 % Inhibition zeigte (Tabelle 7). Dieses Ergebnis war insofern erstaunlich als dass so gut wie bei jeder anderen Verbindung Aggregatbildungen für die Inhibition verantwortlich schienen und zudem alle AH-Verbindungen relativ ähnlich untereinander waren, sodass es fraglich erschien, weshalb einzig AH106t nach wie vor eine enorme Inhibition zeigen sollte. Es ist zu erwähnen, dass die Messung der CAC und die Wiederholung der Luciferase-Assays unter Zugabe von Detergenz parallel durchgeführt wurden, sodass zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar war, dass es sich bei AH76t, AH101t und AH106t um unlösliche Nichtaggregatoren handelte, welche Präzipitate bildeten (siehe 2.7). Demzufolge waren im nächsten Schritt der IC_{50} von AH106t und anderen potenten AH-Verbindungen bestimmt worden, um diese Substanzen als Startstruktur für die Entwicklung weiterer potenter Hsc70-Inhibitoren zu verwenden.

Zusammen mit den NMR-Ergebnissen kann nun jedoch im Nachhinein geschlussfolgert werden, dass die Ergebnisse aus dem Luciferase-Versuch ohne Tween 80 auch bei AH106t durch Präzipitate verfälscht wurden. Durch Zugabe von Detergenz ließen sich diese allerdings nicht wie bei AH76t und AH101t auflösen, sodass die Ergebnisse weiterhin verfälscht wurden und eine Inhibition offenbar durch die Präzipitate vorgetäuscht worden war.

Tabelle 7: Vergleich der im Luciferase-Rückfaltungssassay bestimmten Inhibitionsraten ausgewählter AH-Verbindungen mit und ohne Zugabe von Tween 80. Die hier gezeigten Verbindungen ließen keinen Detergenz-abhängigen Aggregationseffekt erkennen (vgl. Tabelle 4, Tabelle 6).

| ohne Tween 80 | | | mit Tween 80 | | |
|---------------|---------------------|-------|--------------|---------------------|-------|
| Verbindung | Inhibitionsrate [%] | ± [%] | Verbindung | Inhibitionsrate [%] | ± [%] |
| AHFG06 | 30 | 15 | AHFG06 | 33 | 3 |
| AH071t | 42 | 4 | AH071t | 35 | 8 |
| AH075t | 59 | 8 | AH075t | 67 | 16 |
| AH100t | 99 | 0 | AH100t | 72 | 12 |
| AH106t | 90 | 3 | AH106t | 93 | 1 |
| AH316 | 62 | 10 | AH316 | 69 | 5 |
| AH455 | 73 | 3 | AH455 | 66 | 2 |
| Ver-155008 | 71 | 4 | Ver-155008 | 67 | 6 |

2.9 Bestimmung von IC₅₀-Werten mittels Luciferase-Assay

Die Verbindung AH106t zeigte sowohl mit als auch ohne Tween 80-Zugabe eine 90 %ige Inhibition des Luciferase-Systems. Dies ließ vermuten, dass AH106t nicht wie der Großteil der übrigen AH-Verbindungen Aggregate im wässrigen Milieu bildete. Wie erwähnt war zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar, dass es sich bei AH106t um einen unlöslichen Nichtaggregator handelte, welcher Präzipitate bildet, die sich jedoch nicht durch Detergenz auflösen lassen. Aus diesem Grund erschien diese Verbindung als sehr vielversprechend, sodass hier zunächst der IC₅₀ bestimmt werden sollte. Dafür wurde das Luciferase-System mit verschiedenen Konzentrationen AH106t unter Zugabe von Detergenz inkubiert und aus den Messkurven der IC₅₀ bestimmt. Hierfür wurde ebenfalls die Anfangssteigung als Indikator für die Inhibitionsstärke verwendet (siehe 2.6). Neben AH106t sollten weitere AH-Verbindungen bezüglich ihres IC₅₀-Werts analysiert werden. Aufgrund der eingeschränkten Kapazitäten wurden hierfür die vielversprechendsten Verbindungen AH75t und AH455 ausgewählt, da diese keinen Detergenz-abhängigen Aggregationseffekt gezeigt hatten (Tabelle 7).

Bei der Bestimmung der IC₅₀-Werte im Luciferase-Assay ergab sich für AH106t und AH455 ein IC₅₀ von jeweils 43 µM, während AH75t einen mehr als doppelt so hohen IC₅₀ von rund 102 µM aufwies (Abbildung 17). Eine Bestimmung des IC₅₀ von AH100t lag ohne Zugabe von Detergenz bei 35 µM, was wiederum darauf schließen ließ, dass es sich in diesem Fall um eine unspezifische Inhibition handelte, welche durch Aggregatbildung verursacht worden war (Abbildung 17). Zudem war dieser letzte Wert noch vor Durchführung der CAC-Bestimmung durchgeführt worden, als noch nicht bekannt

war, dass der Großteil der AH-Verbindungen unlösliche Aggregate bildete und teilweise selbst bei 1 mM in DMSO nicht komplett löslich war.

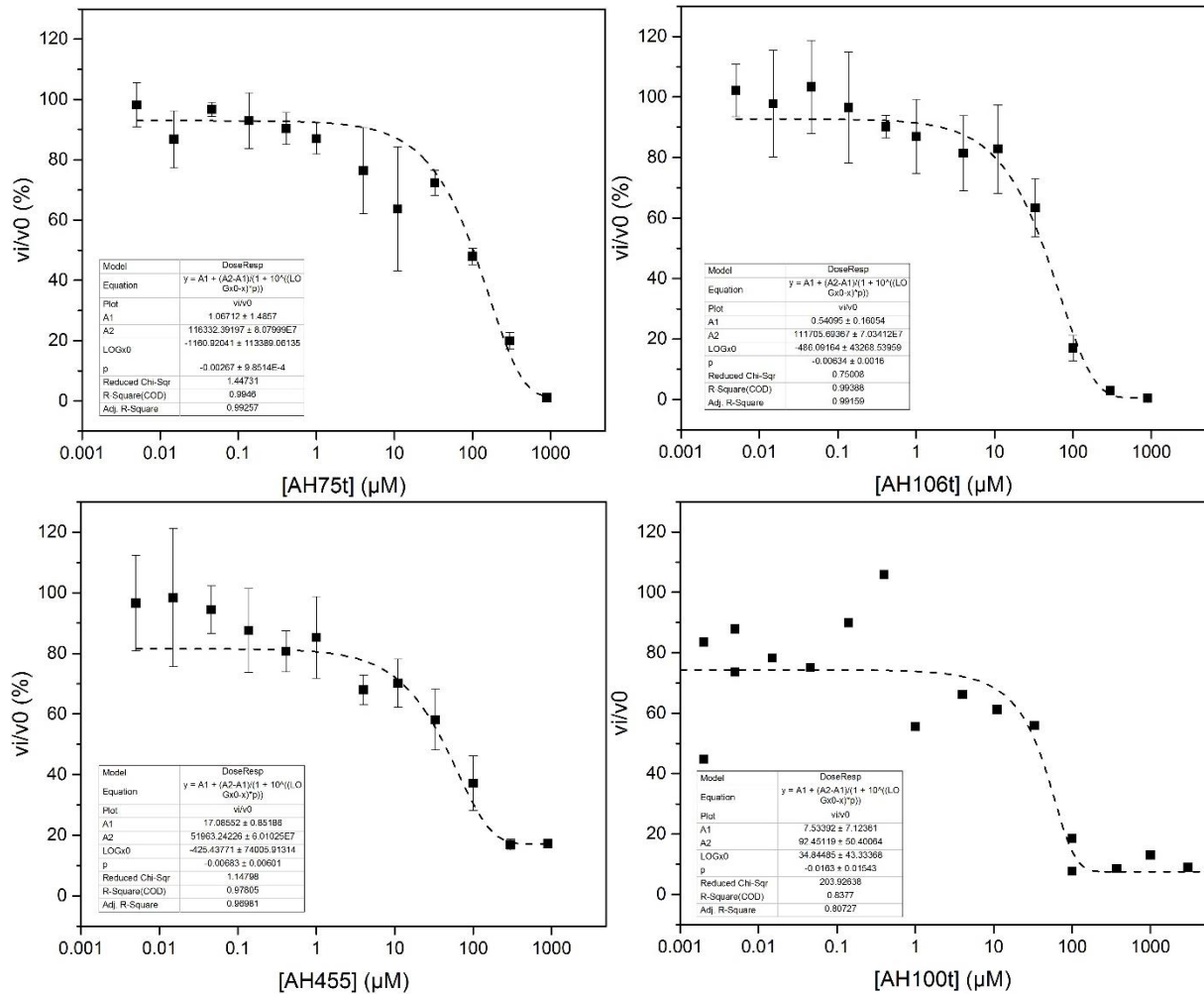


Abbildung 17: Bestimmung der IC_{50} -Werte ausgewählter AH-Verbindungen mittels Luciferase-Rückfaltungsassay. Hierbei wurde das Verhältnis der Anfangsgeschwindigkeit der Rückfaltungsreaktion mit AH-Verbindung zur Anfangsgeschwindigkeit der Rückfaltungsreaktion ohne AH-Verbindung (nur mit Lösemittel DMSO) berechnet und gegen die eingesetzten Konzentrationen aufgetragen ($n = 3$). Die IC_{50} -Werte wurden durch ein geeignetes Fitmodell mit OriginPro 2016 (Pharmacology, DoseResp) bestimmt. Mit Ausnahme von AH100t, welches ohne Zugabe von Detergenz gemessen worden war, wurden alle anderen Versuche mit 0.01 % Tween 80 versetzt, um eine unspezifische Inhibition durch Aggregatbildung zu verhindern.

Auch in diesem Versuchsteil konnte keine Übereinstimmung oder eine annähernde Ähnlichkeit mit den EC_{50} -Werten in Myelomzellen festgestellt werden (Abbildung 18). Die in Myelomzellen nötigen Konzentrationen, um 50 % der Zellen in Apoptose zu schicken, lag jeweils im submikromolaren Bereich, während die für die 50 %ige Inhibition von Hsc70 nötige Konzentration teilweise mehr als das 20-fache betrug. Die einzige Ausnahme hiervon bildete AH106t, dessen EC_{50} und IC_{50} jeweils bei rund $45 \mu\text{M}$ lagen. Dies dürfte jedoch auf einen Zufall zurückzuführen sein, da sich die übrigen Werte stark voneinander unterschieden.

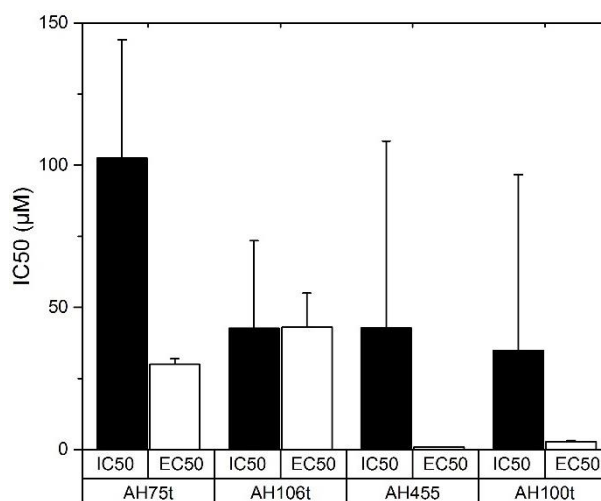


Abbildung 18: Vergleich der in Myelomzellen bestimmten EC₅₀-Werte mit den im Luciferase-Rückfaltungsversuch ermittelten IC₅₀-Werten (n= 3). Grundsätzlich ergaben sich sehr große Unterschiede zwischen beiden Fällen, wobei die IC₅₀-Werte oft deutlich größer waren als die EC₅₀-Werte. Die EC₅₀-Werte wurden von E. Müller und D. Brünert (Universitätsklinikum Würzburg) bestimmt [120, 156].

Aufgrund der bestimmten IC₅₀-Werte stellte sich nun die Frage, wieso der IC₅₀ für AH106t lediglich bei 45 µM lag, wo doch die Inhibition bei 100 µM rund 90 % betragen hatte und diese keine Folge von Aggregatbildung war, zumal kein Unterschied in der Inhibitionsstärke mit und ohne Tween 80 festgestellt worden war. Zumindest für die bis dahin vielversprechende Verbindung AH106t war ein weit besserer IC₅₀-Wert erwartet worden, besonders weil auch AH455 denselben IC₅₀-Wert aufwies, obwohl diese bei 100 µM nur zu 66 % ± 2 % inhibiert hatte.

Auffällig war bei der Auswertung der sigmoidalen Kurve für die Bestimmung des IC₅₀-Werts von AH106t, dass zwischen den Konzentrationen 33 µM und 100 µM ein Sprung zu beobachten war, welcher sonst bei allen anderen eingesetzten Konzentrationen nicht auftrat (Abbildung 17). Dies deutete bereits darauf hin, dass es sich möglicherweise um falsch-positive Ergebnisse handelte, welche durch eine Trübung der Lösung hervorgerufen wurden. Bei genauem Hinsehen wurde ersichtlich, dass der Reaktionsansatz mit 33 µM AH106t noch klar war, während er mit 100 µM AH106t eine leichte Trübung aufwies. Dies schien den Verdacht zu bestätigen, dass höchstwahrscheinlich eine Trübung des Reaktionsansatzes durch Präzipitatbildung zu einer geringen Lumineszenz geführt hatte, welche jedoch nicht durch die Inhibition von Hsc70 durch die AH-Verbindung verursacht worden war.

Um diesen Verdacht zu erhärten, wurden verschiedene ausreichend hohe Konzentrationen dieser Verbindung im Luminometer gemessen, bei denen eine deutliche Trübung der Lösung bei Zugabe von AH106t zu beobachten war. Problematisch stellte sich dieser Versuch insofern dar, als AH106t nicht unbegrenzt hoch konzentriert eingesetzt werden konnte, da es sich ab einer bestimmten Konzentration nicht mehr löste. Zudem war eine Trübung teilweise nicht mit bloßem Auge zu erkennen, weshalb zusätzlich die optische Dichte der Lösung bei 316 nm gemessen wurde. Eine deutliche Abweichung von der Referenz, in diesem Fall der Reaktionsansatz mit DMSO ohne AH106t, um mehr als 0.3 Einheiten deutete auf eine Trübung hin (Tabelle 8). Genau dies traf bei AH106t bei einer Konzen-

tration von 100 μM zu, sodass damit die Frage geklärt werden konnte, woher die geringe Lumineszenz kam. Diese war durch eine Trübung des Reaktionsansatzes infolge von Präzipitatbildung verursacht worden.

Tabelle 8: Bestimmung der optischen Dichte von AH106t bei $\lambda = 316 \text{ nm}$ zur Messung von Präzipitaten. Hydrophobe Substanzen tendieren dazu, Aggregate in wässrigen Lösungen zu bilden oder zu präzipitieren. Diese Präzipitate können nicht immer mit bloßem Auge erkannt werden, weshalb die Bestimmung der optischen Dichte bei $\lambda = 316 \text{ nm}$ eine geeignete Methode ist, um Präzipitatbildung anhand der Trübung des Reaktionsansatzes zu detektieren. Eine Abweichung von der Referenz (DMSO, H_2O ; $\lambda_{316} = 0.000$) um > 0.3 Einheiten deutet auf eine Trübung und somit auf eine Präzipitatbildung hin.

| | 300 μM AH106t | 100 μM AH106t | 33 μM AH106t |
|-----------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Messung 1 | 0.668 | 0.435 | 0.175 |
| Messung 2 | 0.557 | 0.401 | 0.180 |
| Messung 3 | 0.902 | 0.343 | 0.145 |
| Mean | 0.709 | 0.393 | 0.167 |

Da die NMR-Versuche parallel zu den Bestimmungen der IC_{50} -Werte durchgeführt worden waren, war zu diesem Zeitpunkt noch nicht klar gewesen, dass es sich bei AH106t und anderen Verbindungen um unlösliche Nichtaggregatoren handelte, welche zur Trübung der Lösungsansätze führten.

Insgesamt stellte sich somit heraus, dass es keine vielversprechenden Verbindungen gab, welche signifikant die Aktivität von Hsc70 inhibierten und einen IC_{50} im submikromolaren Bereich aufwiesen.

Mit den bisher geschilderten Versuchen war demnach gezeigt worden, dass die verwendeten AH-Verbindungen bei 100 μM zu einer teilweise sehr starken Inhibition des Luciferase-Systems beitragen. Diese Beobachtung wurde jedoch aufgehoben, sobald die Versuche mit Detergenz in Form von Tween 80 durchgeführt wurden, um eine mögliche unspezifische Inhibition durch Aggregatbildung zu unterbinden. Wurde Detergenz hinzugefügt, gab es nur noch wenige AH-Verbindungen, die eine Inhibition zeigten. Die Bestimmung von IC_{50} -Werten resultierte in 45 μM (AH106t und AH455) und rund 90 μM (AH75t), was jedoch für die Entwicklung hochaffiner und spezifischer Hsc70-Inhibitoren weit zu gering war. Die Verbindung AH106t wurde durch die Zugabe von Detergenz nicht beeinflusst und zeigte weiterhin eine nahezu vollständige Inhibition des Luciferase-Systems von 90 % bei einer Konzentration von 100 μM . Durch weitergehende Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, dass es sich um einen falsch-positiven Treffer handelte, welcher durch eine Trübung des Reaktionsansatzes durch Zugabe hoher Konzentrationen ($> 40 \mu\text{M}$) der Verbindung AH106t, einem unlöslichen Nichtaggregator, welcher im verwendeten Puffer präzipitierte, verursacht worden war und zu einer niedrigen Lumineszenz geführt hatte, die jedoch nicht das Resultat der Inhibition von Hsc70 war.

Neben der Quantifizierung der Inhibitionsstärke und der Bestimmung von IC_{50} -Werten wurde versucht, weiteres über den Reaktionsmechanismus der „aktiven“ Verbindungen herauszufinden. Hierfür wurde untersucht, ob die Inhibition abhängig von der Luciferase-Konzentration oder der ATP-Menge ist. In beiden Fällen konnte keine Korrelation zur Inhibitionsstärke festgestellt werden.

Ein großes Problem des Luciferase-Versuches ist die komplexe Zusammensetzung des Rückfaltungssystems. Wurde eine gewisse Inhibition beobachtet, so konnte nicht mit letzter Bestimmtheit gesagt werden, dass die Abnahme der Lumineszenz auf die Inhibition des Chaperons Hsc70 zurückzuführen war. Auch eine Inhibition der Cochaperone Apg2 und Hdj1 konnte nicht ausgeschlossen werden. Ein Weglassen eines oder gar beider Cochaperone führte zum sofortigen Einbruch der Lumineszenz und der Rückfaltungsquote, was eine präzise Unterscheidung zwischen Inhibition und Rauschen deutlich erschwerte. Somit konnten keinerlei Kontrollversuche durchgeführt werden, um eine Inhibition von Hdj1 und Apg2 ausschließen zu können.

Was definitiv ausgeschlossen werden kann, ist, dass Luciferase durch die AH-Verbindungen beeinflusst wurde. Versuche mit aktiver Luciferase allein und den AH-Verbindungen bei jeweils 100 μM zeigten keinerlei Veränderung in der Lumineszenz über den kompletten Messrahmen hinweg (Abbildung 19).

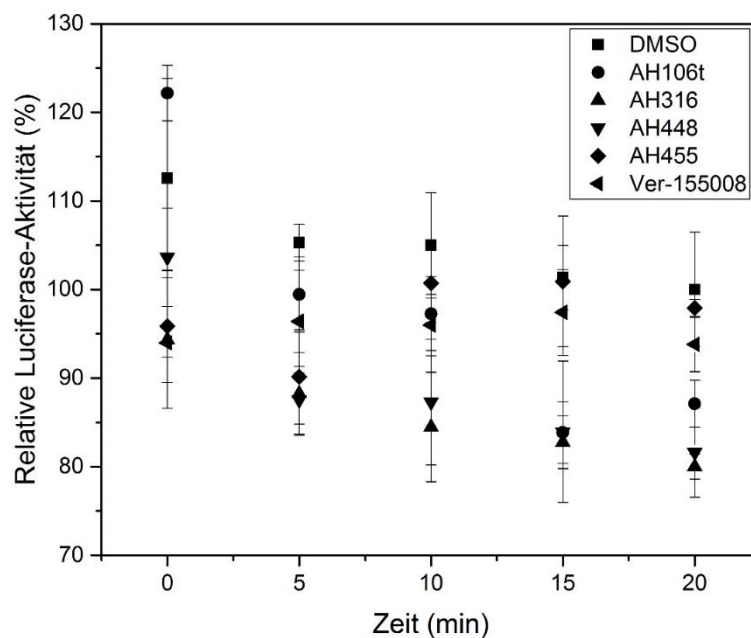


Abbildung 19: Aktive Luciferase wird nicht durch die verwendeten AH-Verbindungen beeinflusst. Um falsch-positive Ergebnisse ausschließen zu können, wurde aktive Luciferase mit 100 μM AH-Verbindung versetzt und die Luciferase-Aktivität über den gesamten Messrahmen aufgezeichnet. Als Kontrolle wurden 10 % DMSO verwendet. Die Messwerte schwanken zwar zwischen 80 % und 120 %, dies liegt jedoch im Rahmen der Messgenauigkeit im Luciferase-Rückfaltungsversuch. Dargestellt sind repräsentativ vier ausgewählte AH-Verbindungen mit der Kontrolle Ver-155008. Die Messkurven für die übrigen AH-Verbindungen sahen ähnlich aus ($n = 3$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Luciferase-Rückfaltungssystem eine geeignete Methode darstellt, um im Hochdurchsatzverfahren nach potenziellen Inhibitoren zu suchen. Bei einer zu beobachtenden Inhibition stellt sich jedoch die Frage, ob tatsächlich das Zielprotein inhibiert wurde oder eines der weiteren Komponenten im Assay. Um diese Frage zu beantworten, sind andere biophysikalische Methoden nötig. Hierfür würde sich anbieten, ITC-Experimente durchzuführen.

2.10 Isothermale Titrationskalorimetrie

Die isothermale Titrationskalorimetrie (ITC) ist eine weitverbreitete Standardmethode zur Untersuchung thermodynamischer Parameter. In einem klassischen ITC-Versuch wird durch Zugabe eines Liganden zu einem Protein die bei der Bindung freiwerdende Wärme gemessen und daraus die Entropie, die Stöchiometrie der Bindungspartner und die Affinität abgeleitet. Ein großer Vorteil von ITC ist, dass durch eine einzige Messung das komplette thermodynamische Profil der Bindung eines Liganden bestimmt werden kann. Zudem ist weder eine Immobilisierung noch eine Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen oder anderen Markern nötig. Weiterhin können Affinitäten von 10 nM bis 100 μ M determiniert werden; dies ist jedoch geräteabhängig und kann teilweise noch weit sensitiver erfolgen [159].

Für die Untersuchung der Bindungskonstante von Ver-155008 an bHsc70 ED 1-554 wurde als weitere Methode neben MST die ITC gewählt. Im MST-Versuch konnte ein K_d von rund 8 μ M bestimmt werden (siehe 2.5). Dieser Wert lag bereits sehr nahe an den mit dem Vollängenkonstrukt erhaltenen Ergebnissen [104].

Vor der Durchführung der ITC-Messungen mit dem trunkierten Hsc70-Konstrukt, wurde zunächst ein Messprotokoll mit hHsc70 und Ver-155008 etabliert. Hierbei wurde hHsc70 in der Messkammer des Kalorimeters vorgelegt und Ver-155008 schrittweise hinzutitriert, wobei die freiwerdende Bindungsenthalpie aufgezeichnet wurde (Abbildung 20). Daraus konnte der K_d -Wert der Bindung bestimmt werden. Der Literaturwert von hHsc70 mit Ver-155008 beträgt $4.38 \mu\text{M} \pm 0.31 \mu\text{M}$, wohingegen sich unsere auf fast das Doppelte beliefen (Abbildung 21) [104]. Anders als im publizierten Protokoll angegeben wurden die vorliegenden ITC-Versuche nicht mit 1 % DMSO, sondern 5 % DMSO durchgeführt, da es ansonsten zur Präzipitation von Ver-155008 kam [104]. Aus diesem Grund könnte es zu dem großen Unterschied zwischen dem Literaturwert und dem von uns bestimmten Wert mit hHsc70 und Ver-155008 gekommen sein.

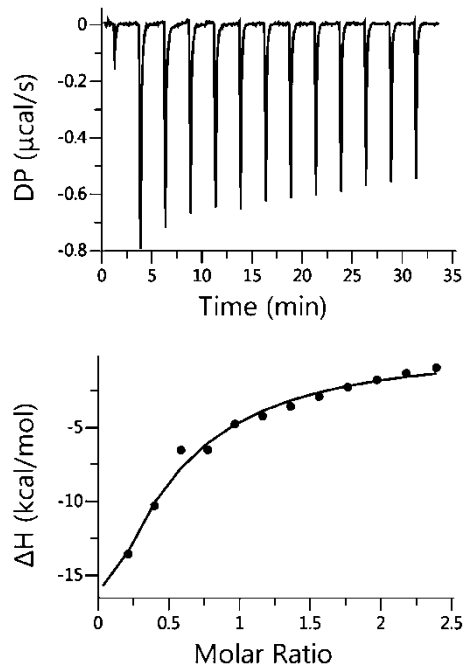


Abbildung 20: Repräsentative Darstellung eines Messdurchgangs von hHsc70 mit Ver-155008 im ITC. Bei der schrittweisen Zugabe des Liganden Ver-155008 zu hHsc70 wurde die Bindungsenthalpie aufgezeichnet und daraus resultierend auf den K_d von Ver-155008 an hHsc70 geschlossen.

Zum Vergleich bezüglich der Affinitäten von hHsc70 und bHsc70 ED 1-554 und Ver-155008 konnte festgestellt werden, dass die beiden K_d -Werte bei $10.2 \mu\text{M} \pm 4.56 \mu\text{M}$ (hHsc70) und $11.6 \mu\text{M} \pm 3.95 \mu\text{M}$ (bHsc70 ED 1-554) lagen. Dies zeigte, dass das verkürzte Konstrukt funktional ist, da es eine ähnliche Affinität für Ver-155008 aufwies. Das Ergebnis war wenig überraschend, zumal bHsc70 ED 1-554 zwar keine C-terminale Domäne enthält, aber bezüglich der NBD vollständig ist, sodass Ver-155008 als ATP-Analogon ungehindert an die NBD binden konnte.

Weiterhin zeigte dieser Versuch, dass die mit MST und ITC ermittelten Affinitäten für das verwendete Zweidomänenkonstrukt und Ver-155008 im Rahmen der Messgenauigkeit nahezu identisch waren. Im MST-Experiment konnte ein K_d von $8.320 \mu\text{M} \pm 0.756 \mu\text{M}$ bestimmt werden (siehe 2.5).

Messungen mit unseren AH-Substanzen und Hsc70 wären wünschenswert gewesen, allerdings aufgrund des enorm hydrophoben Charakters ausgeschlossen. ITC-Messungen können maximal mit 5 % DMSO durchgeführt werden, ohne Störsignale zu produzieren. Alle Substanzen waren jedoch nur in höheren Konzentrationen von 50 % DMSO löslich ohne sofort auszufallen. In der gesamten Substanzbibliothek gab es ein paar wasserlösliche Natriumverbindungen, mit denen ITC-Versuche grundsätzlich machbar gewesen wären. Hier war allerdings das Problem, dass die Substanzen zum Teil nur bis max. $600 \mu\text{M}$ in H_2O löslich waren und diese Konzentration für die Versuche weitaus zu gering gewesen waren. Zusätzlich bestand für die AH-Verbindungen die Gefahr der Aggregation. Diese kann zwar durch Zugabe von nur 0.01 % Tween 80 verhindert werden, allerdings führt die Zugabe von Detergenz zu Schaumbildung in der Messzelle, was stark verrauschte Signale zur Folge hat. Weiterhin hatten die Luciferase-Rückfaltungsassays ergeben, dass die potentesten Verbindungen wie AH75t und

AH455 nur einen schwachen IC_{50} von rund $90 \mu\text{M}$ bzw. $45 \mu\text{M}$ aufweisen (Abbildung 17). Solche Verbindungen können wie eben erwähnt aufgrund ihrer Hydrophobizität nicht im ITC gemessen werden. Die Natriumverbindungen dagegen, welche bei $100 \mu\text{M}$ teilweise nur 30 % des Luciferase-Systems inhibiert hatten, lassen viel höhere IC_{50} -Werte und damit K_d -Werte vermuten, welche zu hoch sind, um mit dem ITC-Gerät detektiert zu werden. Infolgedessen wurden keine AH-Verbindungen mehr im ITC vermessen.

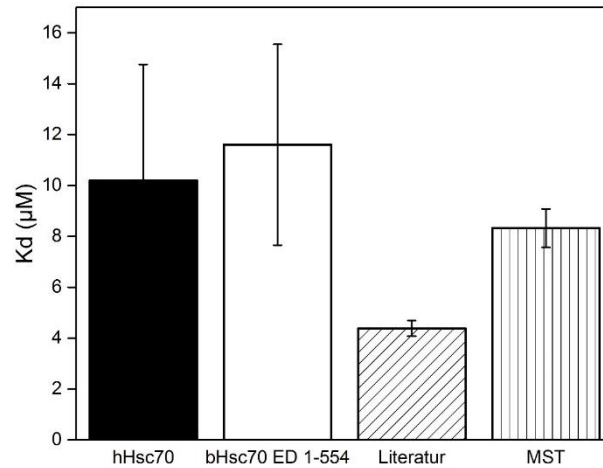


Abbildung 21: Mit ITC berechnete Affinität von Ver-155008 und bHsc70 ED 1-554 sowie hHsc70. Zum Vergleich wurde der Messwert aus den MST-Versuchen mit bHsc70 ED 1-554 und Ver-155008 (MST) dargestellt. Zwar unterscheidet sich der Literaturwert von den Ergebnissen, allerdings sind die Messungen mit hHsc70 und bHsc70 ED 1-554 untereinander sehr ähnlich und unterscheiden sich nur wenig von den Ergebnissen aus dem MST-Versuch ($n = 3$) [104].

3. Ausblick

In Anbetracht der Tatsache, dass mit den Protein-Ligand-Assays nur eine schwache Bindung der AH-Verbindungen gezeigt werden konnte, wurde als Abschluss des Projekts Fragment-basiertes *Screening* durchgeführt, um so neue Inhibitoren für das Interdomäneninterface von Hsc70 zu finden. Diese Inhibitoren sollen dann als Startpunkt für die Entwicklung neuartiger Hsc70-Inhibitoren dienen. Für den Fragment-basierten Ansatz wurden drei Substanzbibliotheken verwendet, welche eine große Vielfalt an verschiedensten Fragmenten umfassten [160-162]. Als Fragmente werden niedermolekulare (150 – 300 Da) organische Substanzen bezeichnet, welche bei der Suche nach geeigneten Liganden an Zielproteine in der Kristallographie eingesetzt werden, um geeignete Bindestellen in einem Protein zu finden [161, 163]. Ein großer Vorteil dieser niedermolekularen Substanzen besteht darin, dass mit einer kleinen Auswahl an Substanzen ein bemerkenswerter breiter Bereich an chemischen Substanzen abgedeckt werden kann [164, 165].

Die verwendeten Substanzbibliotheken enthielten bereits bekannte Ligand-Strukturen, welche u.a. für Kristallisationsversuche mit Hsp90 verwendet wurden. Neben Zuckern, Aminosäuren, Cofaktoren, Nukleotiden, peptid-ähnlichen Fragmenten, Wirkstoff-ähnlichen organischen Substanzen und Puffersubstanzen fanden sich weitere Moleküle, die wahrscheinlich an Proteine binden können. Aufgrund der Menge der möglichen Substanzen aus den gewählten Bibliotheken (> 500) wurden drei Ausschlusskriterien bestimmt, nach denen die möglichen Substanzen ausgewählt wurden. Zum einen sollten alle Fragmente < 250 Da sein und ≤ 15 Nicht-Wasserstoff-Atome besitzen, da die vielversprechendsten Liganden in diese Kategorien fallen [166]. Zuletzt sollte die Löslichkeit in H₂O > 2 mM für die Substanzbibliothek von J. Schiebel bzw. ≥ 200 mM für die Substanzbibliothek von F. Huschmann sein. Von der Bibliothek nach S. Draxler wurden alle Verbindungen ausgewählt. Substanzen, die besonders teuer oder zum gegebenen Zeitpunkt nicht lieferbar waren, wurden nicht in die Auswahl aufgenommen. So ergaben sich rund 60 Substanzen, welche für den Fragment-basierten Ansatz beschafft werden konnten (Tabelle 10). In einem ersten Versuch wurden am BESSY in Berlin einige Substanzen *gesoakt*, um die Methode zu testen (Tabelle 11). Dabei wurden mehrere Monate alte Kristalle von bHsc70 ED 1-554 mit in DMSO gelösten Fragmenten inkubiert und an *Beamline* 14 am BESSY (Berlin) analysiert. Bereits beim ersten Versuch konnte ein an bHsc70 ED 1-554 gebundenes Molekül gefunden werden. N-Acetyl-D-Glucosamin, ein Zuckerderivat, band in der β -Konformation an die NBD von bHsc70 ED 1-554 (Abbildung 22). Die Auflösung der Struktur betrug dabei 2.5 Å. N-Acetyl-D-Glucosamin band, wie bereits bei Ver-155008 der Fall, an die NBD von bHsc70 ED 1-554. Genau schon wie beim bekannten Hsc70-Inhibitor konnte auch bei der Bindung von N-Acetyl-D-Glucosamin so gut wie keine Konformationsänderung im Protein beobachtet werden. Der TM-Score betrug dabei 0.99756; der RMSD-Wert lag bei 0.41 Å mit der *apo*-Struktur als Referenz.

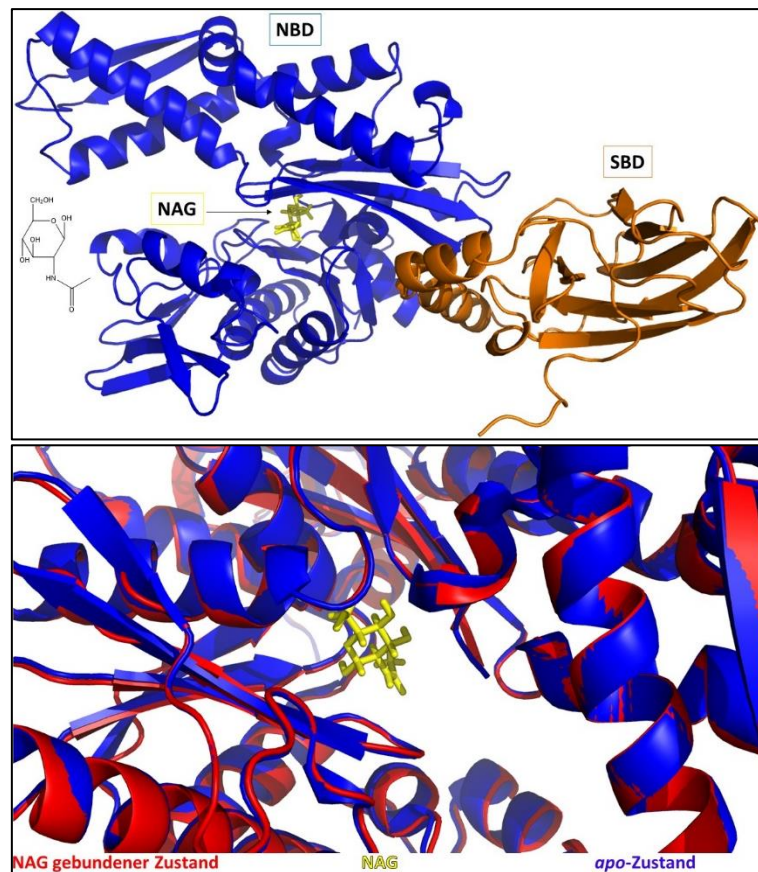


Abbildung 22: Ergebnis des Fragment-basierten *Screenings* mit N-Acetyl-D-Glucosamin (NAG) und bHsc70 ED 1-554. (a) Das Zuckerderivat NAG bindet in der β -Konformation an die Nukleotidbindedomäne (NBD) des Zielproteins. Es wurde eine Auflösung von 2.5 Å erreicht. (b) Obwohl es sich bei Hsc70 um ein flexibles Protein handelt, konnte bei der Bindung von NAG an die NBD nahezu keinerlei Konformationsänderung im Protein festgestellt werden, was in einem TM-Score von 0.99756 und einem RMSD-Wert von 0.41 Å resultierte.

Obleich eine Bindung an das Interdomäneninterface gewünscht war, zeigte dieser Versuch jedoch, dass der Ansatz im Grundsatz funktionierte. Weitere Versuche mit den bestellten Substanzen sind geplant, um Verbindungen zu identifizieren, welche an das Interdomäneninterface binden, um so als Startpunkt für die Entwicklung neuartiger Hsp70-Inhibitoren zu dienen.

In einem weitergeführten Projekt sollen später die bereits vorhandenen Hsc70-Kristalle mit den erwähnten Substanzen aus den Fragmentbibliotheken inkubiert werden, um mögliche Inhibitoren zu identifizieren, welche an das Interdomäneninterface des Zielproteins binden. Daraufhin könnten diese als Ausgangsstruktur für die Herstellung neuer Inhibitoren genutzt werden. Weiterhin ist geplant, bHsc70 ED 1-554 mit diversen ATP-Analoga und ADP zu *soaken* bzw. zu kristallisieren, um weitere Informationen über den Kristallisationszustand von bHsc70 ED 1-554 zu erfahren. Bis jetzt liegen keinerlei Daten einer Zweidomänenstruktur vor, welche Aufschluss über den Nukleotidstatus des Proteins bei Bindung an Ver-155008 geben könnten.

4. Zusammenfassung

Einhergehend mit einer steigenden Lebenserwartung nimmt auch die Zahl der am Multiplen Myelom Erkrankten zu. Bis dato gibt es nur wenige Therapieansätze dieser selten vorkommenden Blutkrebs-erkrankung. Im Zusammenhang mit der Entstehung des Multiplen Myeloms stehen vor allem zwei bedeutende Hitzeschockproteine: Hsp90 und Hsp70. Beide haben die Aufgabe, Zellen vor Apoptose zu schützen. In proliferierenden Plasmazellen ist eine Überexpression an Hsp90 zu beobachten. Entwickelte Inhibitoren führten zwar zu einer verminderten Hsp90-Aktivität, allerdings wurde diese durch eine vermehrte Expression von Hsp70 kompensiert, weshalb Myelomzellen weiterhin proliferierten. Aus diesem Grund bietet sich Hsp70 als weiterer Angriffspunkt in der Therapie des Multiplen Myeloms an. Die bislang entwickelten Inhibitoren binden entweder an die Nukleotid- oder Substratbindedomäne. Da beide Stellen unspezifisch sind, wurden durch virtuelles *Screening* potenzielle Inhibitoren für Hsp70 identifiziert, welche *in vitro* und *in vivo* tatsächlich Effekte hinsichtlich der Herunterregulierung von Hsp70 zeigten. Ob die entwickelten Substanzen jedoch direkt an Hsp70 binden, war die Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern die entwickelten Inhibitoren an Hsp70 binden und dieses inhibieren. Die humane Hsp70-Familie besitzt sechzehn Mitglieder, die alle ähnliche Aufgaben und Strukturmerkmale aufweisen. Für die durchgeführten Versuche wurde die Hsp70-Isoform Hsc70 verwendet. In einem Protein-Ligand-Assay konnte gezeigt werden, dass die meisten Verbindungen durch Aggregatbildung zu einer Inhibition von Hsc70 führten. Durch Zugabe von Detergenz konnten die gebildeten Aggregate aufgebrochen und so der Inhibitionseffekt aufgehoben bzw. deutlich reduziert werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die in Zell- und Mausversuchen beobachteten Effekte vermutlich nicht auf eine direkte Inhibition von Hsc70 zurückzuführen sind. Ob diese Effekte nun ebenfalls auf Aggregatbildung beruhen oder aber ein anderes Protein als das vermutete Hsc70 inhibiert wird, was über eine Signalkaskade zur Inhibition von Hsc70 führt, wäre eine interessante Fragestellung für weitere Untersuchungen.

Da sowohl in NMR-Versuchen als auch dem durchgeführten Protein-Ligand-Assay gezeigt werden konnte, dass die vormals als potenzielle Inhibitoren entwickelten Verbindungen nur schwach aktiv sind, wurde durch Fragment-basierte Ansätze eine andere Bindestelle für mögliche Inhibitoren identifiziert. Hierbei konnte N-Acetyl-D-Glucosamin in der Nukleotidbindedomäne von Hsc70 detektiert werden. Hieraus könnten sich neue Ansätze zur Entwicklung neuartiger *in silico* entwickelter Hsc70-Inhibitoren ergeben.

Ausgangspunkt für die Docking-Studien zur Entwicklung neuer Hsp70-Inhibitoren war die Kristallstruktur von bHsc70 ED 1-554, einer trunkierten Doppelmutante des nativen Hsc70. Bis dato ist diese 554 Aminosäuren umfassende Mutante die einzige Hsc70-Variante von der die Zweidomänenstruktur

kristallisiert werden konnte. Für dieses Konstrukt wurde zunächst ein optimiertes Aufreinigungsprotokoll entwickelt, um dann Kristallisationsversuche mit ausgewählten AH-Verbindungen, die in den Docking-Studien entwickelt wurden, durchzuführen. Hierbei konnte jedoch keine Bindung festgestellt werden. Die Kristallisation mit Ver-155008, einem bekannten Hsc70-Inhibitor, führte jedoch zur ersten Zweidomänenstruktur von Hsc70 mit gebundenem Ver-155008.

Neben der obigen Fragestellung wurde außerdem untersucht, wie funktional aktiv das trunkierte Hsc70-Konstrukt ist. Hier zeigte sich, dass aufgrund des fehlenden C-Terminus zwar eine geringe Aktivität von 30 % im Vergleich zur Volllänge zu beobachten war. Für eine nahezu vollständige Rückfaltungsaktivität ist aber der C-Terminus essentiell. Weiterhin konnte in ITC-Versuchen der K_d -Wert von Ver-155008 an die verwendete Mutante ermittelt werden, der dem bereits bekannten K_d von Ver-155008 an das native Hsc70 ähnlich ist.

5. Summary

Coming along with an increasing life span, the number of multiple myeloma incidences permanently increases. By now, there is no possibility to cure this rare blood cancer disease. In multiple myeloma, there are two major proteins playing a crucial role in its development: Hsp70 and Hsp90. Both prevent cells from apoptosis. In proliferating plasma cells, Hsp90 is overexpressed. Inhibitors for Hsp90, however, led to an overexpression of Hsp70. Therefore, Hsp70 seems to be an attractive target in multiple myeloma. Developed Hsp70 inhibitors are likely to bind either to the nucleotide or substrate binding domain. Since both domains are likely unspecific, new inhibitors were designed by virtual screening which indeed showed inhibition effects on Hsp70 *in vitro* and *in vivo*. Nevertheless, the question had to be answered whether these compounds directly bind to Hsp70 or if the expression of Hsp70 is downregulated through a signal cascade in the cell.

In this thesis, it was analyzed whether and how *in silico* designed and in cell-based assays active compounds inhibit Hsp70. The human Hsp70 family comprises 16 members which have similar structures and functions in the cell. For all conducted experiments, Hsp70 isoform 8, also known as Hsc70, was used. In a protein-ligand assay, it was shown that the compounds inhibit Hsc70 due to aggregate formation. Upon the addition of detergent, aggregates were broken down and the inhibition effect was reversed. Therefore the effects that have been observed in cell and mouse experiments are most likely not due to a direct inhibition of Hsc70. Whether these effects are due to aggregate formation or whether another protein was inhibited which then led to a downregulation of Hsc70 via a signal cascade, is a challenging question for further studies.

Since it was shown both in protein-ligand assays and NMR experiments that the favored compounds were only weakly active, fragment-based screening was used to find a new core structure for further design studies. N-acetyl-D-glucosamine was found to bind to the NBD of Hsc70 which now might serve as a starting point for the development of novel Hsp70 inhibitors.

For all docking studies that have been conducted to develop novel Hsc70 inhibitors, the crystal structure of bHsc70 ED 1-554 was used, which is a truncated and double-mutated version of the native Hsc70. This construct has been the only crystal structure so far of which the two-domain structure of Hsc70 has been determined. For this construct a purification protocol was optimized to use bHsc70 ED 1-554 for crystallization experiments to determine the binding of the *in silico* developed AH compounds. Although no binding of these compounds could be observed, the two-domain structure of bHsc70 ED 1-554 with bound Ver-155008, a known Hsc70 inhibitor, could be determined.

Besides, the activity of this truncated Hsc70 double-mutant was analyzed. Due to the lacking C terminus, which is important for the interaction with client proteins, a reduced activity of about 30 % was observed. Nevertheless, in ITC experiments the K_d value of the binding of Ver-155008 to bHsc70 ED 1-554 showed that the affinity is similar to that of native Hsc70.

6. Experimenteller Teil

6.1 Materialien

6.1.1 Antibiotika

| Antibiotikum | Arbeitskonzentration | Solvens |
|----------------------|----------------------|------------------|
| Ampicillin (Amp) | 100 µg/mL | H ₂ O |
| Chloramphenicol (Cm) | 30 µg/mL | EtOH |
| Kanamycin (Km) | 25 µg/mL | H ₂ O |
| Tetracyclin (Tc) | 12 µg/mL | EtOH |

6.1.2 Bakterienstämme

| Stamm | Resistenz | Protein | Herkunft |
|---------------------------------|-----------|------------------------------|----------|
| <i>E. coli</i> XL10 Gold | Tc, Cm | ffLuciferase | MM |
| <i>E. coli</i> BL21/DE3/Rosetta | Cm | hApg2, hHdj1, hHsc70, hSenP2 | NEB |
| <i>E. coli</i> BL21/DE3/pLysS | Cm | bHsc70 ED 1-554 | NEB |
| <i>E. coli</i> DH5α | - | Plasmid-Isolation | NEB |

ff = firefly, h = human, b = bovin

MM = M. Mayer, Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg

NEB = New England Biolabs, Frankfurt am Main

6.1.3 Protease-Inhibitoren

| Protease-Inhibitor | Arbeitskonzentration | Solvens |
|--|----------------------|------------------|
| AEBSF (4-(2-Aminoethyl)benzonsulfonylfluorid) | 100 µM | H ₂ O |
| Aprotinin | 1 µg/mL | H ₂ O |
| Leupeptin (N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-argininal) | 1 µg/mL | DMSO |
| Pepstatin | 1 µg/mL | H ₂ O |
| PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) | 200 µM | Isopropanol |

6.1.4 Verwendete Plasmide

| Plasmid | Backbone | Tag | Resistenz | Herkunft |
|------------------------|----------|------------|------------|----------|
| pApg2 | pCA528 | N-His-Sumo | Kanamycin | MM |
| pHdj1 | pCA528 | N-His-Sumo | Kanamycin | MM |
| pHsc70 | pCA528 | N-His-Sumo | Kanamycin | MM |
| pSenP2 | pET28b | N-His | Kanamycin | AB |
| pbHsc70 ED 1-554 | na | - | Ampicillin | RS |
| pbHsc70 ED 1-554 (His) | pETM-11 | N-His | Kanamycin | |
| pLuciferase | pRSET | N-His | Ampicillin | MM |

p = Plasmid, h = human, b = bovin

MM = M. Mayer, Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg

AB = A. Buchberger, Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg

RS = R. Sousa, University of Texas Health Science Center, San Antonio, USA

6.1.5 Säulen für die Proteinaufreinigung

| Säule | Typ | Hersteller |
|----------------|------------------------|-------------------------|
| DEAE-Sepharose | CL-6B XK50 | GE Healthcare, Freiburg |
| Q-Sepharose | FF XK50 | GE Healthcare, Freiburg |
| | HP XK16 | GE Healthcare, Freiburg |
| | HP XK26 | GE Healthcare, Freiburg |
| Gelfiltration | Superdex 200 10/300 GL | GE Healthcare, Freiburg |
| | Superdex 75 10/300 GL | GE Healthcare, Freiburg |
| | Superdex 26/600 200 pg | GE Healthcare, Freiburg |
| | Superdex 75 26/60 | GE Healthcare, Freiburg |

6.1.6 12 % SDS-Gele

| | Trenngel | Sammelgel |
|--------------------|----------|-----------|
| Rotiphorese Gel 30 | 2.40 mL | 400 µL |
| 1 M Tris, pH 8.8 | 2.25 mL | - |
| 1 M Tris, pH 6.8 | - | 650 µL |
| H ₂ O | 1.25 mL | 1.45 mL |
| 10 % SDS | 30 µL | 25 µL |
| 10 % APS | 30 µL | 12.5 µL |
| TEMED | 30 µL | 7.5 µL |

6.1.7 Primer und gebrauchsfertige Kits für die Klonierung

| Primer | Sequenz |
|-----------------|-----------------------------------|
| Vorwärtsprimer | 5'-GCATGAACATGTCTAAAGGACCTGC-3' |
| Rückwärtsprimer | 5'-GCATGACTCGAGTTACTCAACAGTAGC-3' |

6.2 Methoden

6.2.1 Herstellung hitzekompetenter *E. coli* XL10 Gold Zellen

Die Herstellung erfolgte nach einem internen Laborprotokoll von M. Mayer (Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg). Die Bakterienzellen wurden auf einer LB-Platte (1 % Casein-Hydrolysat / 0.5 % Hefe-Extrakt / 0.5 % NaCl / 0.1 % Glucose / 1.5 % BactoAgar) mit den entspre-

chenden Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 5 mL LB-Medium mit Antibiotika wurden am nächsten Tag angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln kultiviert. 2 mL der Vorkultur wurden in 200 mL vorgewärmtes LB-Medium mit Antibiotika überführt und dort bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 wachsen gelassen. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis mit kalten Lösungen durchgeführt. Sobald die gewünschte optische Dichte erreicht war, wurden die Zellen für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 2,320 rcf für 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 100 mL Transformationspuffer (0.1 M CaCl₂ / 10 % Glycerin) resuspendiert und erneut für 20 min auf Eis inkubiert, ehe sie bei 2,320 rcf für 10 min abzentrifugiert wurden. Das Pellet wurde schließlich in 5 mL Transformationspuffer aufgenommen, in 100 µL-Fraktionen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

6.2.2 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

100 µL *E. coli* wurden nach Zugabe von 60 ng Plasmid-DNA für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Inkubation bei 42 °C für 90 s wurden die Zellen für weitere 7 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 1 mL LB-Medium (1 % Casein-Hydrolysat / 0.5 % Hefe-Extrakt / 0.5 % NaCl / 0.1 % Glucose) ohne Antibiotika wurden die Zellen bei 37 °C für 1 h geschüttelt. Die Zellen wurden bei 3,000 rcf für 2 min abzentrifugiert; der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in wenig LB-Medium resuspendiert, auf einer LB-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6.2.3 Rekombinante Überexpression von Proteinen in *E. coli*

Transformierte, ausplattierte Zellen wurden von den LB-Platten mit vorgewärmtem TB-Medium (1.2 % Trypton / 2.4 % Hefe-Extrakt / 0.4 % Glycerin / 2 mM MgCl₂ / 17 mM KH₂PO₄ / 72 mM K₂HPO₄) gewaschen und in vorbereitete Erlenmeyer-Kolben mit vorgelegtem, warmen TB-Medium mit Antibiotika überführt. Die Zellen wuchsen bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0.6 und wurden anschließend in Hauptkulturen überführt. Die Hauptkultur wurde bei einer OD₆₀₀ von 1.2 mit 1 mM IPTG induziert. Die Überexpression erfolgte bei 18 °C über Nacht. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 5,00 rcf und 4 °C geerntet. Der Überstand wurde sorgfältig verworfen; die Zellpellets wurden in eiskaltem Puffer A resuspendiert, wobei 2 mL Puffer A pro 2 g Nasspellet verwendet wurden. Die Zellsuspension wurde bis zum weiteren Gebrauch in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -20 °C gelagert oder direkt für die weitere Aufreinigung verwendet.

6.2.4 Aufschluss geernteter *E. coli*-Zellen mit Ultraschall

In Puffer A resuspendierte Zellen wurden mittels Ultraschall mit einer flachen Sonifizierungsspitze aufgeschlossen (Output Control: 8, Duty Cycle: 80 %, Intervall: 4 min). Dabei wurden vor Aufschluss der Zellen Proteaseinhibitoren hinzugefügt. Die lysierten Zellen wurden bei 4 °C für 45 min bei 235,000 rcf vom Überstand getrennt. Das Pellet wurde verworfen; der Überstand wurde für die weiteren Aufreinigungsschritte verwendet.

6.2.5 Aufreinigung von bovinem Hsc70 ED 1-554 über Ionenaustauscher

Die Aufreinigung erfolgte angelehnt an Jiang *et al.* [118]. Nach dem Zellaufschluss wurde der Überstand auf eine Q-Sepharose-Säule aufgetragen. Es wurde mit 1 Säulenvolumen Puffer A (10 mM Tris, pH 8.0 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 5 % Glycerin) gewaschen. Die Elution erfolgte über einen 1.5 Säulenvolumen langen Gradienten Puffer B (10 mM Tris, pH 8.0 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 5 % Glycerin / 0.5 M NaCl). bHsc70 ED 1-554 eluierte zwischen 0.25 – 0.35 M NaCl (5.5 – 7.5 mS/cm). Fraktionen, die das Protein enthielten, wurden gesammelt, aufkonzentriert und auf eine Gelfiltrationssäule mit Laufpuffer C (10 mM Tris, pH 8.0 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT / 5 % Glycerin / 100 mM NaCl) aufgetragen. Fraktionen, welche monomeres bHsc70 ED 1-554 enthielten, wurden gesammelt und über Nacht gegen Puffer A dialysiert. Das Dialysat wurde aufkonzentriert und bei -80 °C gelagert.

6.2.6 Klonierung von bHsc70 ED 1-554 in pETM-11

Das Plasmid mit bHsc70 ED 1-554 wurde für 1 h bei 37 °C mit *Xho*I linearisiert (500 ng DNA / 2x TangoPuffer / 1 µL *Xho*I / ad 20 µL H₂O). Das Linearisierungsprodukt wurde mithilfe eines Kits nach Angabe des Herstellers (Macherey-Nagel, Weilmünster) aufgereinigt. Danach wurde eine PCR (95 °C 3 min / [98 °C - 20 s / 65 °C - 15 s / 72 °C - 100 s] x30 / 72 °C - 2 min) des Linearisierungsprodukts angefertigt (1 µL linearisiertes Templat / 1x HiFi-Puffer / 500 µM dNTPs / 10 µM Vorwärtsprimer / 10 µM Rückwärtsprimer / 1 µL HiFi-Polymerase / ad 50 µL H₂O). Die erfolgreiche Amplifizierung wurde über ein 0.7 % Agarosegel überprüft. Der PCR-Ansatz wurde mithilfe eines Kits nach Herstellerangaben (Macherey-Nagel, Weilmünster) aufgereinigt. Der Restriktionsverdau von pETM-11 (2 µg Vektor / 2x Tango-Puffer / 2 µL *Nco*I / 2 µL *Xho*I / ad 50 µL H₂O) und des PCR-Produkts (25 µL DNA / 1x NEBuffer 3.1 / 2 µL *Pci*I / 2 µL *Xho*I / ad 50 µL H₂O) wurde bei 37 °C für 4 h durchgeführt.

Der erfolgreiche Verdau wurde über ein 0.7 % Agarosegel nachgewiesen. Sowohl der verdaute Vektor als auch das PCR-Produkt wurden dabei aus dem Agarosegel ausgeschnitten und über ein Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Daraufhin wurde das Insert über Nacht bei 14 °C in den Zielvektor pETM-11 ligiert (1x Vektor / 3x Insert / 1x T4 Ligase-Puffer / 1 µL T4 DNA-Ligase / ad 20 µL H₂O).

Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* DH5α transformiert, um eine Mini-Präp der Plasmid-DNA anzufertigen. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mithilfe eines Kits nach Herstellerangaben (Macherey-Nagel, Weilmünster). Die erfolgreiche Klonierung wurde überprüft, indem das Ligationsprodukt mit *Xba*I und *Xho*I verdaut und über ein 0.7 % Agarosegel aufgetrennt wurde. Zusätzlich wurde das klonierte Produkt hinsichtlich seiner Nukleotidsequenz überprüft (Eurofins, Ebersberg). Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte am NanoVue plus (GE Healthcare, Freiburg).

6.2.7 Agarose-Gel

Zur Auftrennung von Plasmidfragmenten wurde ein Agarose-Gel angefertigt. Hierfür wurde die entsprechende DNA-Probe in 1x DNA-Ladepuffer (0.05 % Bromphenolblau / 0.05 % Xylenblau / 6 % Glycerin) aufgenommen und auf ein Agarosegel aufgetragen. Das Gel lief bei 100 mA in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, pH 8.0 / 20 mM HOAc / 1 mM EDTA). Da das Agarosegel bereits vor dem Lauf mit 670 ng/mL Ethidiumbromid versetzt worden war, konnte das Gel direkt im Anschluss unter einer UV-Lampe analysiert werden.

6.2.8 Aufreinigung von bovinem Hsc70 über Affinitätschromatographie

bHsc70 wurde in Puffer A (50 mM Hepes, pH 7.6 / 200 mM NaCl / 5 mM β -Mercaptoethanol / 20 mM Imidazol) mit Nickel-NTA-Beads nach Angabe des Herstellers (Qiagen, Hilden) für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Beads wurden mit 10 Bettvolumen Puffer A gewaschen. Die Elution erfolgte mittels Elutionspuffer (50 mM Hepes, pH 7.6 / 200 mM NaCl / 5 mM β -Mercaptoethanol / 250 mM Imidazol). Fraktionen, die bHsc70 enthielten, wurden gesammelt und mit 1 % (w/w) TEV-Protease versetzt, um den N-terminalen His-Tag zu entfernen. Dialyse und TEV-Verdau fanden über Nacht bei 4 °C in Dialysepuffer (50 mM Hepes, pH 7.6 / 200 mM NaCl / 5 mM β -Mercaptoethanol / 20 mM Imidazol) statt. Das Dialysat wurde nochmals auf Nickel-NTA-Beads aufgetragen, um die TEV-Protease aus dem Ansatz zu entfernen. Der Durchfluss, der bHsc70 enthielt, wurde gesammelt, aufkonzentriert und auf eine Gelfiltrationssäule aufgetragen. Fraktionen, die monomeres bHsc70 enthielten, wurden gesammelt, aufkonzentriert und eingefroren.

6.2.9 Aufreinigung von nativem Hsc70 aus Schweinehirn

Schweinehirn wurde mit Puffer A (20 mM Tris, pH 7.4 / 20 mM KCl / 1 mM EDTA / 1 mM DTT) überschichtet und in einem handelsüblichen Mixer mit 3 s-Intervallen lysiert, bis das ganze Gewebe homogen zerkleinert war. Das Homogenat wurde mittels Ultraschall aufgeschlossen und der Überstand weiterverwendet. Der Überstand wurde auf eine DEAE-Säule aufgetragen und mit 10 Säulenvolumen Niedrigsalzpuffer (20 mM Tris, pH 7.4 / 1 mM EDTA / 1 mM DTT) gewaschen. Die Elution erfolgte über einen 1.5 Säulenvolumen langen Hochsalzgradienten (20 mM Tris, pH 7.4 / 500 mM KCl / 1 mM EDTA / 1 mM DTT). Fraktionen, die Hsc70 enthielten (ca. 10 mS/cm), wurden gesammelt und weiter für die Inkubation mit ATP-Agarose-Beads verwendet.

Die gesammelten Fraktionen wurden durch einen Spritzenfilter (0.40 μ m) filtriert und für 4 h bei 4 °C mit den ATP-Agarose-Beads (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) inkubiert. Die Beads wurden mit 20 Bettvolumen Hochsalzpuffer (20 mM Tris, pH 6.9 / 5 mM MgCl₂ / 2 M NaCl) und 20 Bettvolumen Niedrigsalzpuffer (20 mM Tris, pH 6.9 / 5 mM MgCl₂ / 100 mM NaCl) gewaschen. Die Elution erfolgte mit ATP-Elutionspuffer (20 mM Tris, pH 6.9 / 5 mM MgCl₂ / 100 mM KCl / 10 % Glycerin / 50 mM ATP) nach einer 20 min Inkubation bei 4 °C. Fraktionen, die pHsc70 enthielten, wurden auf eine Gelfiltrati-

onssäule mit Puffer B (10 mM Tris, pH 7.6 / 5 mM DTT / 150 mM NaCl) aufgetragen. Fraktionen, die monomeres pHsc70 enthielten, wurden gesammelt, aufkonzentriert und bei -80 °C gelagert.

6.2.10 Aufreinigung von hHsc70 über Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung erfolgte ähnlich einem internen Laborprotokoll von M. Mayer (Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg). Der Überstand der geernteten Zellen wurde in Puffer A (20 mM Tris, pH 7.9 / 300 mM KCl / 2 mM MgCl₂ / 10 mM Imidazol / 5 mM β-Mercaptoethanol) mit Nickel-NTA-Beads nach Herstellerangaben für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Beads wurden mit 10 Bettvolumen Waschpuffer (20 mM Tris, pH 7.9 / 300 mM KCl / 2 mM MgCl₂ / 40 mM Imidazol / 5 mM β-Mercaptoethanol) gewaschen. Danach wurde nochmals für 30 min bei 4 °C mit ATP-Puffer (40 mM Tris-HCl, pH 7.9 / 300 mM KCl / 5 mM MgCl₂ / 5 mM ATP / 5 mM β-Mercaptoethanol) inkubiert. Die Elution erfolgte über 10 Bettvolumen mit Elutionspuffer (40 mM Hepes, pH 7.6 / 300 mM KCl / 5 mM β-Mercaptoethanol / 250 mM Imidazol). Fraktionen, die hHsc70 enthielten, wurden gesammelt und über Nacht bei 4 °C gegen Dialysepuffer (40 mM Hepes, pH 7.6 / 20 mM KCl / 5 mM MgCl₂ / 5 mM β-Mercaptoethanol) dialysiert. Dabei wurde unter Zusatz von SenP2 gleichzeitig der N-terminale His-Sumo-Tag entfernt. Das Dialysat wurde nochmals mit Nickel-NTA-Beads inkubiert. Der Durchlauf, der hHsc70 enthielt, wurde weiter über eine Gelfiltrationssäule mit Puffer B (40 mM Hepes, pH 7.6 / 150 mM KCl / 5 mM MgCl₂ / 5 mM β-Mercaptoethanol) aufgereinigt. Fraktionen, die monomeres hHsc70 enthielten, wurden gesammelt, aufkonzentriert und bei -20 °C gelagert.

6.2.11 Aufreinigung von SenP2 über Affinitätschromatographie

Der Versuch wurde nach einem Protokoll von A. Buchberger (Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg), ähnlich wie bereits bei Reverter *et al.* beschrieben, durchgeführt [167]. SenP2 wurde in Puffer A (50 mM Tris, pH 8.0 / 300 mM NaCl / 10 mM Imidazol / 1 mM β-Mercaptoethanol) für 1 h bei 4 °C nach Herstellerangaben mit Nickel-NTA-Beads inkubiert. Die Beads wurden mit 10 Bettvolumen Waschpuffer (50 mM Tris, pH 8.0 / 300 mM NaCl / 20 mM Imidazol / 1 mM β-Mercaptoethanol) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 10 Bettvolumen Elutionspuffer (50 mM Tris, pH 8.0 / 300 mM NaCl / 150 mM Imidazol / 1 mM β-Mercaptoethanol). Fraktionen, die SenP2 enthielten, wurden gesammelt und gegen Dialysepuffer (25 mM Tris, pH 8.0 / 200 mM NaCl / 10 % Glycerin / 1 mM β-Mercaptoethanol) über Nacht bei 4 °C dialysiert, aufkonzentriert und bei -80 °C gelagert.

Zur Bestimmung der benötigten Enzym-Menge für die Entfernung der Sumo-Tags von hHsc70, hAp2 und hHdj1 wurde SenP2 mit verschiedenen Substratkonzentrationen Sumo-GFP bei 4 °C für 1 h in Reaktionspuffer (50 mM Tris, pH 8.0 / 150 mM NaCl / 1 mM DTT) inkubiert. Der erfolgreiche Verdau wurde über SDS-PAGE nachgewiesen.

6.2.12 Aufreinigung von hApg2 und hHdj1

Die Aufreinigung erfolgte nach Schlecht *et al.* [104]. Der nach dem Zellaufschluss übrige Überstand wurde mit Nickel-NTA-Beads in Puffer A (40 mM Hepes, pH 7.6 / 150 mM KCl / 5 mM MgCl₂ / 5 % Glycerin / 10 mM β-Mercaptoethanol / 20 mM Imidazol) für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Beads wurden mit 10 Bettvolumen Puffer B (40 mM Hepes, pH 7.6 / 150 mM KCl / 5 mM MgCl₂ / 5 % Glycerin / 10 mM β-Mercaptoethanol / 40 mM Imidazol) gewaschen und mit Elutionspuffer (40 mM Hepes, pH 7.6 / 150 mM KCl / 5 mM MgCl₂ / 5 % Glycerin / 10 mM β-Mercaptoethanol / 250 mM Imidazol) eluiert.

Der N-terminale His-Sumo-Tag wurde durch Zugabe von SenP2 (Substrat : SenP2 = 1:1,500) entfernt. Dabei fand gleichzeitig ein Pufferaustausch gegen den Gelfiltrationspuffer (40 mM Hepes, pH 7.6 / 150 mM KCl / 5 mM MgCl₂ / 5 % Glycerin / 10 mM β-Mercaptoethanol) über Nacht bei 4 °C statt. Der Verdau wurde über Gelfiltration weiter aufgereinigt. Fraktionen, die monomeres hApg2 oder hHdj1 enthielten, wurden gesammelt und eingefroren.

6.2.13 Aufreinigung von N-His Luciferase über Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung erfolgte ähnlich einem Protokoll von M. Mayer (Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg). Der geklärte Überstand mit dem Zelllysat wurde mit Puffer A (50 mM Na_xH_yPO₄, pH 8.0 / 300 mM NaCl / 10 mM β-Mercaptoethanol / 20 mM Imidazol) und einer geeigneten Menge Nickel-NTA-Beads nach Herstellerangaben für 1 h bei 4 °C inkubiert. Der Inkubationsansatz wurden mit 10 Bettvolumen Waschpuffer 1 (50 mM Na_xH_yPO₄, pH 8.0 / 300 mM NaCl / 5 mM β-Mercaptoethanol / 40 mM Imidazol) und 10 Bettvolumen Waschpuffer 2 (50 mM Na_xH_yPO₄, pH 8.0 / 300 mM NaCl / 5 mM β-Mercaptoethanol / 60 mM Imidazol) gewaschen. Gebundenes Protein wurde mit Elutionspuffer (50 mM Na_xH_yPO₄, pH 8.0 / 300 mM NaCl / 5 mM β-Mercaptoethanol / 250 mM Imidazol) über 5 Bettvolumen eluiert. Fraktionen, die Luciferase enthielten, wurden gesammelt und über Nacht bei 4 °C gegen Dialysepuffer (50 mM Na_xH_yPO₄, pH 8.0 / 300 mM NaCl / 10 mM β-Mercaptoethanol / 10 % Glycerin) dialysiert und eingefroren.

6.2.14 Luciferase-Rückfaltungsversuch

Der Versuch erfolgte ähnlich einem internen Laborprotokoll von M. Mayer und R. Kityk (Zentrum für Molekulare Biologie, Universität Heidelberg). Ein Reaktionsansatz aus Hsc70 [2 μM], Hdj1 [1 μM] und Apg2 [0.2 μM] in HKM-Puffer (25 mM Hepes, pH 7.6 / 50 mM KOAc / 10 mM Mg(OAc)₂ / 2 mM ATP / 5 mM DTT) wurde mit verschiedenen Konzentrationen diverser AH-Verbindungen für 5 min bei 30 °C inkubiert. Nach Zugabe von Luciferase [80 nM] wurde der Ansatz für 10 min bei 42 °C thermisch denaturiert. Die Rückfaltung wurde durch Inkubation bei 30 °C gestartet. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden 2 μL des Reaktionsansatzes mit 123 μL Assay-Puffer (25 mM Glycylglycin, pH 7.4 / 100 mM K_xH_yPO₄ / 100 mM KOAc / 15 mM Mg(OAc)₂ / 5 mM ATP) versetzt. Die Luciferase-Reaktion wurde

durch Zugabe von 125 μL D-Luciferin [80 nM] gestartet. Die Lumineszenz wurde für 5 s mit einem LB9506 Biolumat (Berthold, Bad Wildbad) aufgezeichnet.

6.2.15 SDS-PAGE

Zur Identifizierung von Proteinen wurden SDS-PAGEs gesammelter Säulenfraktionen gefahren. Hierfür wurden die Proteinproben in 1x SDS-Ladepuffer (50 mM Tris, pH 6.8 / 2 % SDS / 10 % Glycerin / 20 mM DTT / 0.01 % Bromphenolblau) verdünnt und sofort nach Zugabe bei 95 °C für 5 min erhitzt. Es wurden 2 μg Protein auf ein SDS-Gel geladen. Das Gel lief bei 60 mA in 1x Laemmli-Puffer (25 mM Tris-Base / 192 mM Glycin / 1 % SDS). Das Gel wurde nach dem Lauf mit VE-H₂O gewaschen, mit Coomassie-Lösung (0.25 % Serva Blue R-250 / 25 % Isopropanol / 10 % HOAc) übergossen und bis zum Kochen in der Mikrowelle erhitzt. Nach 15 min Inkubation wurde die Färbelösung verworfen, das Gel mit VE-H₂O gewaschen und in Entfärbelösung (7.5 % EtOH / 7.5 % HOAc) gelegt. Das Gel wurde bis zum Kochen erhitzt und anschließend mit Papiertüchern bedeckt. Der Entfärbeprozess wurde wiederholt, bis Banden sichtbar wurden.

6.2.16 Ansetzen der Stocklösungen für die möglichen Inhibitoren

Alle verwendeten AH-Verbindungen waren von A. Hartung und A. Lehmann synthetisiert worden [120, 156]. Die Verbindungen wurden in DMSO bis zu einer Stocklösung von 100 mM gelöst, soweit dies möglich war. War die Löslichkeit zu gering, wurden geringere Konzentrationen eingestellt. Die Natriumsalze, welche für bestimmte AH-Verbindungen vorhanden waren, wurden sowohl in DMSO als auch in H₂O bis zur maximal möglichen Konzentration 600 μM bis 1 mM gelöst. Die Lagerung erfolgte dunkel bei Raumtemperatur.

Ver-155008 (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) wurde in DMSO zu einer Konzentration von 90 mM gelöst. Die Lagerung erfolgte auch hier dunkel bei Raumtemperatur.

6.2.17 Kristallisation von bHsc70 ED 1-554 und pHsc70

Bei der Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen für pHsc70 und bHsc70 ED 1-554 wurden die kommerziell verfügbaren *Screens* WC (Rigaku, Kent, UK), HCS, NX (Hampton Research, Aliso Viejo, USA) NPPT-1, NPPT-2, NPPT-3, NPPT-HTX, JCSG+ (Molecular Dimensions, Altamonte Springs, USA) und JJS (*in house*) verwendet.

Für die Kristallisation von pHsc70 wurde die *Sitting Drop*-Methode gewählt. Hierfür wurden 100 nL pHsc70 [8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] und 100 nL *Screen* in CrystalQuick-Platten (Greiner, Frickenhausen) mit dem Pipettierroboter gesetzt. Die Tropfen wurden mit Klebefolie abgedeckt und bei 16 °C gelagert.

Für die Kristallisation von bHsc70 ED 1-554 fand die *Microbatch*-Methode unter Paraffinöl Anwendung [118]. Die Tropfen wurden hierfür mit dem Pipettierroboter Mosquito (TTP Labtech, Melbourne, UK) in Imp@act Kristallisationsplatten (Greiner, Frickenhausen) gesetzt. Für den *Screen* wurden entweder 150 nL *Screen* und 150 nL Hsc70 [13 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$] gesetzt oder 100 nL TMAO [4 M], 200 nL *Screen*

und 100 nL Hsc70 [13 µg/µL]. Die gesetzten Tropfen wurden mit Paraffinöl überschichtet und bei 16 °C gelagert. Sobald nach wenigen Tagen Kristalle gewachsen waren, wurden die Originalbedingungen modifiziert und neue Kristallisationsansätze produziert. Diese Methode wurde sowohl für *apo*-Kristalle als auch für die Co-Kristallisation mit verschiedenen AH-Verbindungen und Ver-155008 verwendet. Sollten Co-Kristalle entstehen, so wurde bHsc70 ED 1-554 mit Konzentrationen von bis zu 5 mM AH-Verbindung oder Ver-155008 und maximal 40 % DMSO zusammengegeben und dieser Ansatz für die Kristallisation eingesetzt. Sobald geeignete Bedingungen gefunden worden waren, wurden größere Tropfen gesetzt. Hierfür wurden 5 µL TMAO [4 M], 10 µL *Screen* und 5 µL bHsc70 ED 1-554 [13 µg/µL] in eine herkömmliche 96-Wellrundbodenplatte manuell pipettiert, mit Paraffinöl überschichtet und bei 16 °C gelagert.

Neben der Co-Kristallisation wurde ferner versucht, verschiedene AH-Verbindungen und Ver-155008 direkt in die bHsc70-Kristalle zu *soaken*. Dafür wurde eine geeignete Menge einer möglichst konzentrierten Lösung durch das Paraffinöl hindurch direkt auf den Kristall gegeben. Die finale DMSO-Konzentration im Kristallisationsansatz betrug nicht mehr als 50 %. Nach etwa 4 h wurden Kristalle gepickt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Die Messung der Datensätze fand am ESRF (Grenoble, Frankreich) an *Beamline* ID30B statt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Coot 0.8.1 EL und Phenix 1.11.1 durch C. Grimm (Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg).

6.2.18 Fragment-basierter Ansatz

Auf der Suche nach neuen möglichen Inhibitoren für Hsc70 wurden strukturell sehr unterschiedliche Verbindungen in die vorhandenen Kristalle *gesoakt* [160-162]. Die Auswahl erfolgte nach den folgenden Gesichtspunkten: Alle Verbindungen aus der Draxler-Substanzbibliothek (SD), alle Verbindungen aus der Huschmann-Library (FH), mit ≤ 250 Da und einer Löslichkeit in H₂O von ≥ 200 mM sowie alle Verbindungen aus der Schiebel-Bibliothek, die eine Löslichkeit von ≥ 2 mM und ≤ 15 Nicht-Wasserstoff-Atome aufwiesen. Verbindungen, die nicht (mehr) kommerziell zu beziehen waren oder in einer höheren Preisklasse angesiedelt waren, wurden nicht in die Auswahl mitaufgenommen. Ausgewählte Verbindungen wurden in DMSO gelöst und für einige Stunden direkt auf die vorhandenen bHsc70-Kristalle gegeben. Die Messung der Datensätze erfolgte an *Beamline* 14 am BESSY II (Berlin). Die weitere Auswertung erfolgte mit Coot 0.8.7 EL und Phenix 1.11.1 durch C. Grimm (Lehrstuhl für Biochemie, Universität Würzburg).

6.2.19 Isothermale Titrationskalorimetrie (ITC)

Die Versuche wurden ähnlich wie bereits bei Schlecht *et al.* beschrieben durchgeführt [104]. Hsc70 wurde über Nacht bei 4 °C gegen ITC-Puffer ohne DMSO (30 mM Hepes, pH 7.5 / 2 mM Na_xH_yPO₄ / 1 mM MgCl₂ / 5 mM β-Mercaptoethanol / 100 mM KCl) dialysiert. Für die ITC-Messungen mit Ver-155008 wurde Hsc70 auf Raumtemperatur gebracht und auf 10 µM mit ITC-Puffer und 5 % DMSO

eingestellt. Ver-155008 wurde im selben Puffer auf 120 μM eingestellt. Die Messungen wurden an einem MicroCal™ ITC₂₀₀ System (GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt. Hsc70 wurde in die Zelle vorgelegt, Ver-155008 wurde schrittweise über 13 Injektionen á 3 μL unter Rühren bei 750 rpm hinzutitriert. Die Temperatur der Zelle wurde auf 25 °C eingestellt, die Basislinie auf 10 $\mu\text{cal}/\text{sec}$. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Geräteprogramm MicroCal, LLC ITC₂₀₀.

6.2.20 Nukleare Magnetresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Untersuchung der kritischen Aggregationskonzentration der verwendeten AH-Verbindungen wurden NMR-Versuche genau wie bei LaPlante beschrieben an einem Bruker Avance 400 MHz-Spektrometer (Karlsruhe) durchgeführt [158]. Es wurden 1,024 Scans bei einer Temperatur von 27 °C mit einer Erfassungszeit von 3.985 s und einer Relaxationszeit von 1.0 s aufgenommen. Sämtliche Versuche und Auswertungen wurden von J. Wiest (Pharmazeutische Technologie, Universität Würzburg) durchgeführt.

6.2.21 Mikrothermophorese (MST)

Für die Markierung des Proteins und die Durchführung des Versuches wurde das bekannte Herstellerprotokoll verwendet (NanoTemper, München). bHsc70 wurde mit dem Farbstoff NT-647 fluoreszenzmarkiert und in Standardkapillaren mit AH073tS und Ver-155008 als Ligand an einem NT.115 (NanoTemper, München) nach Herstellerangaben gemessen.

6.2.22 Tryptophan Fluoreszenz

Der Versuch wurde wie bei Jiang *et al.* beschrieben durchgeführt [64]. bHsc70 ED 1-554 wurde in Messpuffer (10 mM Tris, pH 8.0 / 50 mM KCl / 5 mM MgCl₂) auf 1 mg/mL eingestellt. Zum Reaktionsansatz wurden direkt 0.4 mM ATP gegeben. Die Messung wurde 1 min nach ATP-Zugabe gestartet. Die Anregungswellenlänge betrug 295 nm (2 nm *bandpass*). Die Emission wurde bei 300 nm - 400 nm (5 nm *bandpass*) mit einem F-4500 Fluoreszenz-Spektrophotometer (Hitachi, Düsseldorf) aufgezeichnet. Insgesamt wurden 3 Scans aufgenommen, wobei jeweils 2 min Abstand dazwischenlagen.

6.2.23 Kalibrierung von Gelfiltrationssäulen

Zur Bestimmung des Ausschlussvolumens und der Elutionsvolumina bei definierten Proteingrößen wurden alle verwendeten Gelfiltrationssäulen mit einem Kit (GE Healthcare, Freiburg) nach Herstellerangaben kalibriert. Dafür wurden zwei Standardmischungen verwendet: Ferritin, Aldolase, Chymotrypsin A sowie Catalase, BSA, Ribonuclease A. Anhand der Elutionsvolumina der gewählten Standardproteine erfolgte die Auswertung der Gelfiltrationschromatogramme für die Aufreinigungen der verschiedenen Proteine.

6.2.24 Regeneration von ATP-Agarose-Beads

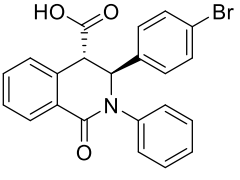
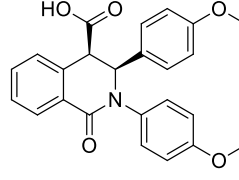
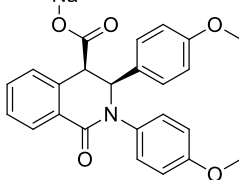
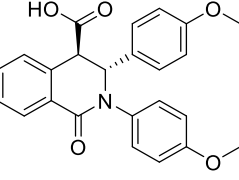
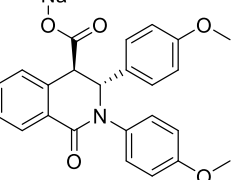
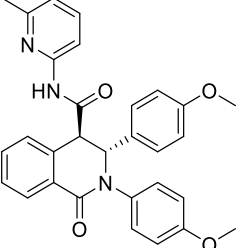
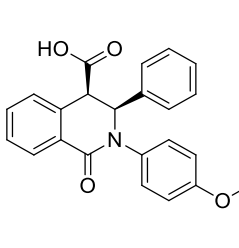
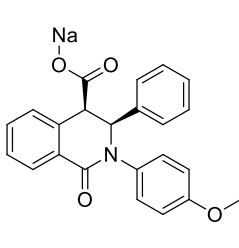
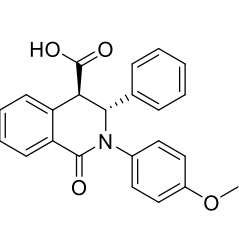
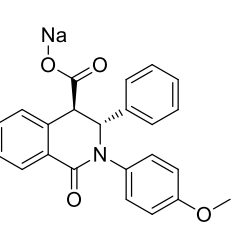
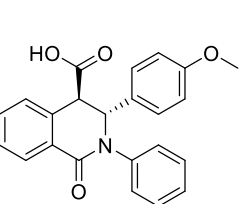
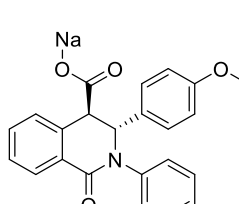
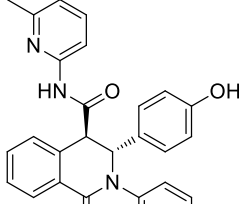
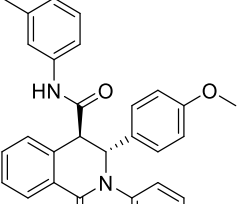
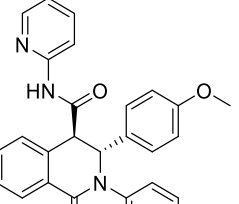
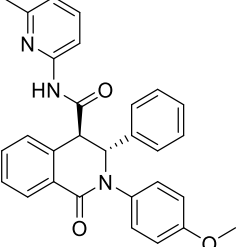
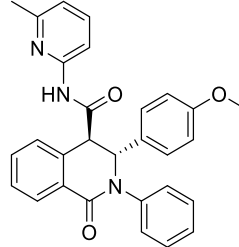
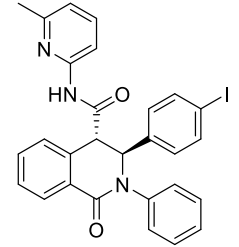
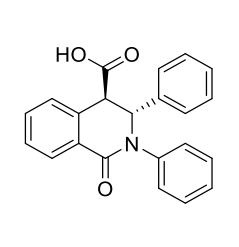
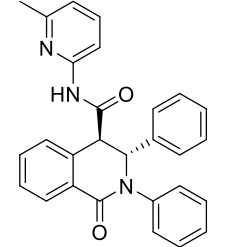
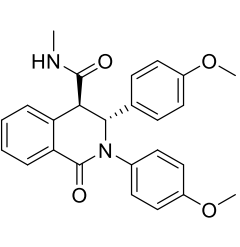
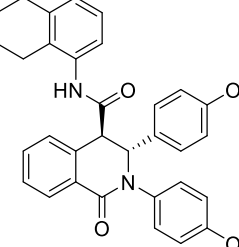
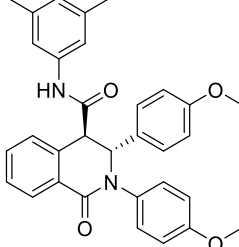
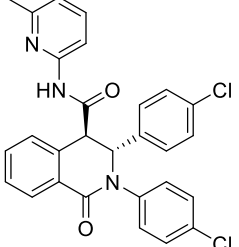
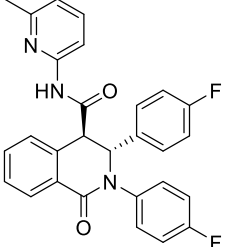
Zur Regeneration wurden die verwendeten ATP-Agarose-Beads nach Herstellerangabe (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) mit 20 Bettvolumen Waschpuffer (50 mM Tris, pH 8.2 / 0.2 mM EDTA / 100 mM KCl) gewaschen. Die Beads wurden dann über Nacht bei 4 °C in einem ATP-Regenerationsansatz (0.2 mM Phosphoenolpyruvat / 10 U/mL Beads Pyruvatkinase / 5 mM MgCl₂ / 0.2 mM EDTA / 100 mM KCl / in 50 mM Tris-HCl pH 8.2) inkubiert. Die Beads wurden mit 25 Bettvolumen Waschpuffer 2 (2 mM ATP in 2 M KCl) gewaschen und mit 25 Bettvolumen Probenpuffer äquilibriert.

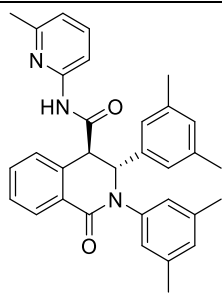
6.2.25 Regeneration von Nickel-Beads

Nickel-Beads wurden ähnlich der Herstellerangabe (Qiagen, Hilden) regeneriert: 20 Bettvolumen H₂O, 20 Bettvolumen 0.25 M EDTA, 20 Bettvolumen H₂O, 20 Bettvolumen 1 M NaOH, 20 Bettvolumen H₂O, 0.5 Bettvolumen 6 M GdHCl mit Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur, 20 Bettvolumen H₂O, 0.5 Säulenvolumen NiCl₂ mit Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h, 20 Bettvolumen H₂O, 20 Bettvolumen 1 M Imidazol, 20 Bettvolumen H₂O, 20 Bettvolumen 20 % EtOH. Die regenerierten Beads wurden bei 4 °C in 20 % EtOH gelagert.

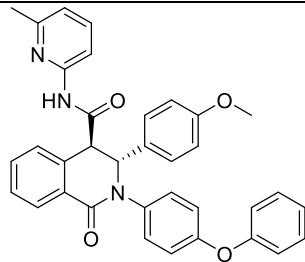
7. Anhang

Tabelle 9: Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten AH-Verbindungen sowie der Kontrollsubstanz Ver-155008.

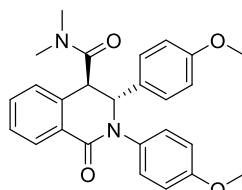
| | | | | |
|--|---|---|--|---|
|  |  |  |  |  |
| AHFG06 | AH68c | AH68cS | AH68t | AH68tS |
|  |  |  |  |  |
| AH71t = C066-0757 | AH72c | AH72cS | AH72t | AH72tS |
|  |  |  |  |  |
| AH73t | AH73tS | AH75t | AH76t | AH77t |
|  |  |  |  |  |
| AH78t | AH81t | AH81tI | AH82t | AH83t |
|  |  |  |  |  |
| AH89t | AH90t | AH99t | AH100t | AH101t |



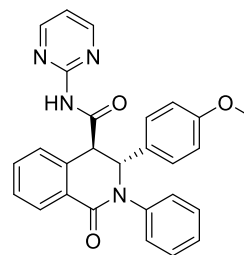
AH106t



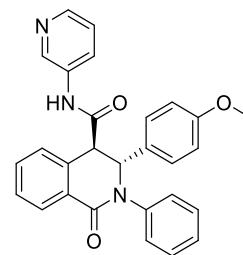
AH107t



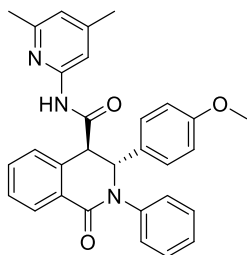
AH109t



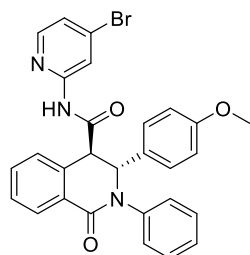
AH122t



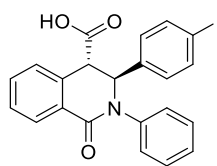
AH123t



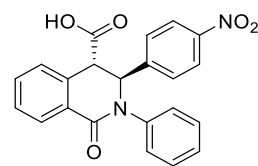
AH124t



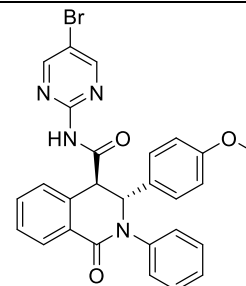
AH313



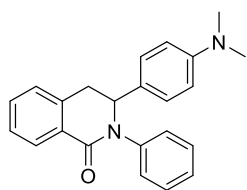
AH316



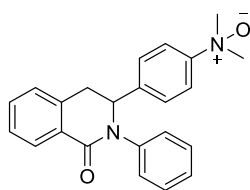
AH423



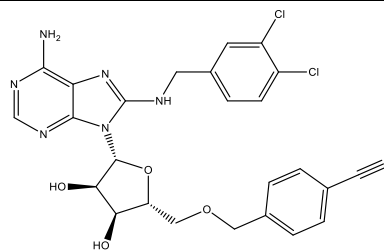
AH448



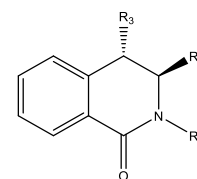
AH455



AH458



Ver-155008



AH-Grundgerüst

| | | |
|--------------|--|-----|
| bovine_1-554 | MSKGPVAVGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA | 60 |
| bovine | MSKGPVAVGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA | 60 |
| human | MSKGPVAVGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA | 60 |
| porcine | MSKGPVAVGIDLGTTYSVGVFQHGKVEIIANDQGNRTTPSYVAFTDTERLIGDAAKNQVA | 60 |
| ***** | | |
| bovine_1-554 | MNPTNTVFDKRLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPEEVS | 120 |
| bovine | MNPTNTVFDKRLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPEEVS | 120 |
| human | MNPTNTVFDKRLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPEEVS | 120 |
| porcine | MNPTNTVFDKRLIGRRFDDAVVQSDMKHWPFMVVNDAGRPKVQVEYKGETKSFYPEEVS | 120 |
| *****;***** | | |
| bovine_1-554 | SMVLTMKKEIAEAYLGKTVTNNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNLVRIINEPTAAA | 180 |
| bovine | SMVLTMKKEIAEAYLGKTVTNNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNLVRIINEPTAAA | 180 |
| human | SMVLTMKKEIAEAYLGKTVTNNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNLVRIINEPTAAA | 180 |
| porcine | SMVLTMKKEIAEAYLGKTVTNNAVVTVPAYFNDSQRQATKDAGTIAGLNLVRIINEPTAAA | 180 |
| ***** | | |
| bovine_1-554 | IAYGLDKKVGAEARNVLI FDLGGGTFDVSILTIAAGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNH | 240 |
| bovine | IAYGLDKKVGAEARNVLI FDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNH | 240 |
| human | IAYGLDKKVGAEARNVLI FDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNH | 240 |
| porcine | IAYGLDKKVGAEARNVLI FDLGGGTFDVSILTIEDGIFEVKSTAGDTHLGGEDFDNRMVNH | 240 |
| ***** | | |
| bovine_1-554 | FIAEFKRKHKKDI SENKRAVRLRTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRA | 300 |
| bovine | FIAEFKRKHKKDI SENKRAVRLRTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRA | 300 |
| human | FIAEFKRKHKKDI SENKRAVRLRTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRA | 300 |
| porcine | FIAEFKRKHKKDI SENKRAVRLRTACERAKRTLSSTQASIEIDSLYEGIDFYTSITRA | 300 |
| ***** | | |
| bovine_1-554 | RFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSQIHDI VLVGGSTRIPKIQKLLQDFNKGKELN | 360 |
| bovine | RFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSQIHDI VLVGGSTRIPKIQKLLQDFNKGKELN | 360 |
| human | RFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSQIHDI VLVGGSTRIPKIQKLLQDFNKGKELN | 360 |
| porcine | RFEELNADLFRGTLDPVEKALRDAKLDKSQIHDI VLVGGSTRIPKIQKLLQDFNKGKELN | 360 |
| ***** | | |
| bovine_1-554 | KSINPDEAVAYGAAVQAAI LSGDKSENVDLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTI | 420 |
| bovine | KSINPDEAVAYGAAVQAAI LSGDKSENVDLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTI | 420 |
| human | KSINPDEAVAYGAAVQAAI LSGDKSENVDLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTI | 420 |
| porcine | KSINPDEAVAYGAAVQAAI LSGDKSENVDLLLDVTPLSLGIETAGGVMTVLIKRNTTI | 420 |
| ***** | | |
| bovine_1-554 | PTKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNLLGKGFELTGIPAPRGVQPIEVTFDI | 480 |
| bovine | PTKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNLLGKGFELTGIPAPRGVQPIEVTFDI | 480 |
| human | PTKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNLLGKGFELTGIPAPRGVQPIEVTFDI | 480 |
| porcine | PTKQTQFTTYSNDQPGVLIQVYEGERAMTKDNLLGKGFELTGIPAPRGVQPIEVTFDI | 480 |
| ***** | | |
| bovine_1-554 | DANGILNVSADV KSTGKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKAEDEKQRDKVSSKN | 540 |
| bovine | DANGILNVSADV KSTGKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKAEDEKQRDKVSSKN | 540 |
| human | DANGILNVSADV KSTGKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKAEDEKQRDKVSSKN | 540 |
| porcine | DANGILNVSADV KSTGKENKITITNDKGRLSKEDIERMVQEAKEYKAEDEKQRDKVSSKN | 540 |
| ***** | | |
| bovine_1-554 | SLESYAFNMKATVE----- | 554 |
| bovine | SLESYAFNMKATVEDEKLQGKINDEDKQKILDKCNEIINWLDKNQTAEKEEFHQQKELE | 600 |
| human | SLESYAFNMKATVEDEKLQGKINDEDKQKILDKCNEIINWLDKNQTAEKEEFHQQKELE | 600 |
| porcine | SLESYAFNMKATVEDEKLQGKINDEDKQKILDKCNEIINWLDKNQTAEKEEFHQQKELE | 600 |
| ***** | | |
| bovine_1-554 | ----- | 554 |
| bovine | KVCNPIITKLYQSAGGMPGGMPGGMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTIEEVD | 650 |
| human | KVCNPIITKLYQSAGGMPG----GMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTIEEVD | 646 |
| porcine | KVCNPIITKLYQSAGGMPG----GMPGGFPGGGAPPSGGASSGPTIEEVD | 646 |

Abbildung 23: Sequenzvergleich der in dieser Arbeit verwendeten Hsc70-Isoformen. Alle Spezies weisen eine Homologie von 99 % auf. Die Analyse wurde mit Clustal Omega durchgeführt.

Tabelle 10: Übersicht der für die *Soaking*-Versuche vorgesehenen Verbindungen. Diese wurden aus drei Fragmentbibliotheken nach zuvor festgelegten Auswahlkriterien zusammengestellt [160-162]. FH = Huschmann, JS = Schiebel, SD = Draxler. Für manche Verbindungen konnte keine CAS-Nummer angegeben werden, weshalb zur eindeutigen Identifikation der SMILES-Code (*) verwendet wurde.

| Kürzel | Verbindung | CAS-Nummer (* = SMILES) |
|--------|--|----------------------------|
| FH002 | Hepes | 7365-45-9 |
| FH003 | MES | 1266615-59-1 |
| FH004 | CHES | 103-47-9 |
| FH006 | Citric acid trisodium salt dihydrate | 68-04-2 |
| FH007 | Bicine | 150-25-4 |
| FH009 | D-Glucose | 50-99-7 |
| FH013 | N-Acetyl-D-glucosamine | 7512-17-6 |
| FH014 | D-Xylitol | 87-99-0 |
| FH016 | Myo-Inositol | 87-89-8 |
| FH025 | Nicotinamide | 98-92-0 |
| FH026 | 2-Methyl-L-cysteine | 1187-84-4 |
| FH031 | trans-4-Hydroxy-L-proline | 51-35-4 |
| FH034 | L-Pyroglutamic acid | 98-79-3 |
| FH035 | D-Arginine | 74-79-3 |
| FH036 | L-Citrulline | 372-75-8 |
| FH037 | 1-Aminocyclopropane-carboxylic acid | 22059-21-8 |
| FH040 | Glycyl glycyl glycine | 556-33-2 |
| FH041 | N-acetyl-L-cysteine | 616-91-1 |
| FH047 | Azaserine | 115-02-6 |
| FH048 | Hexylene glycol | 107-41-5 |
| FH049 | Betaine | 107-43-7 |
| FH050 | Gly-Pro | 704-15-4 |
| FH052 | N,N-Dimethylglycine | 1118-68-9 |
| FH053 | L-Canavanine | 543-38-4 |
| FH058 | L-Carnitine | 541-15-1 |
| FH065 | 6-Aminocaproic acid | 60-32-2 |
| FH069 | trans-4-(Aminomethyl) cyclohexane carboxylic acid | 1197-18-8 |
| FH078 | Daminozide | 1596-84-5 |
| FH096 | D-Penicillamine | 52-67-5 |
| FH097 | (-)-Norepinephrine | 51-41-2 |
| FH100 | Barbituric acid | 67-52-7 |
| JS003 | p-Hydroxybenzalacetone | 3160-35-8 |
| JS007 | 1-(3-Chlorophenyl)-3-isopropylurea | *CC(C)NC(=O)Nc1cccc(c1)Cl |
| JS025 | 5-(4-Ethoxyphenyl)-1,2-oxazol-3-amine | *CCOC1CCC(CC1)C2CC(N)O2 |
| JS031 | Ethyl-3-amino-4-methylbenzoate | *CCOC(=O)C1CC(C)N)C |
| JS056 | 3-Chloromandelic acid | 61008-98-8 |
| JS069 | 1,2,3,4,6,10B-Hexahydropyrimido [2,1-A] isoindol-6-one | 22641-00-5 |
| JS073 | Salicylic acid | 69-72-7 |
| JS198 | 6-Methyl-5-(methylsulfanyl)-1,2,4-triazin-3 (2H)-one | 98213-64-0 |
| JS266 | 6-(Dimethylamino)nicotinic acid | *CN(C)C1CCC(CN1)C(=O)O |
| JS288 | 4-Bromobenzenesulfonic acid | 79326-93-5 |
| JS339 | 5-(1H-Pyrrol-1-yl)nicotinic acid | *c1ccn(c1)c2cc(cnc2)C(=O)O |
| JS354 | 4-Hydroxy-6-methyl-1-benzofuran-3(2H)-one | *Cc1cc(c2c(c1)OCC2=O)O |
| SD001 | Potassium benzoic acid | 582-25-2 |
| SD002 | Benzamide | 55-21-0 |

| Kürzel | Verbindung | CAS-Nummer (* = SMILES) |
|--------|--------------------------|-------------------------|
| SD003 | Benzamidine | 618-39-3 |
| SD004 | Nicotinamide | 98-92-0 |
| SD005 | 2-Hydroxypyridine | 142-08-5 |
| SD006 | 2-Piperidone | 675-20-7 |
| SD007 | Guanidine hydrochloride | 50-01-1 |
| SD008 | Methylsulfonamide | 3144-09-0 |
| SD009 | Imidazole | 288-32-4 |
| SD010 | 4-Methylimidazole | 822-36-6 |
| SD011 | Benzimidazole | 51-17-2 |
| SD012 | Indazole | 271-44-3 |
| SD013 | Benzonitrile | 100-47-0 |
| SD014 | 4-Chlorobenzotrifluoride | 98-56-6 |

Tabelle 11: Übersicht der am BESSY verwendeten Fragmente für das *Soaking* zur Testung der Methode des Fragment-basierten *Screenings*. Die Verbindungen stammten aus einer bereits publizierten Bibliothek [161]. * = ausgewertete Datensätze.

| Kürzel | Verbindung | CAS-Nummer (* = SMILES) |
|--------|---|-------------------------|
| FH001 | PIPES* | 5625-37-6 |
| FH013 | N-Acetyl-D-glucosamine* | 7512-17-6 |
| FH026 | 2-Methyl-L-cysteine | 1187-84-4 |
| FH032 | 1-Methyl-D-tryptophane | 110117-83-4 |
| FH037 | 1-Aminocyclopropane carboxylic acid | 22059-21-8 |
| FH046 | 8-Azaxanthine | 1468-26-4 |
| FH047 | Azaserine* | 115-02-6 |
| FH053 | L-Canavanine* | 543-38-4 |
| FH061 | 4-Nitrocatechol* | 3316-09-4 |
| FH062 | 3-(1,3-oxazol-5-yl)aniline* | 157837-31-5 |
| FH063 | 5-Hydroxyindole | 1953-54-4 |
| FH066 | L-Epinephrine | 51-43-4 |
| FH076 | 3,5-Dinitrocatechol | 7659-29-2 |
| FH077 | 6,7-Dinitroquinoxaline-2,3-dione (DNQX) | 2379-57-9 |
| FH079 | 3-(Acetylamino)thiophene-2-carboxylic acid | 50901-18-3 |
| FH086 | Nitroxoline* | 4008-48-4 |
| FH089 | 5-Aminocrotic acid | 7164-43-4 |
| FH093 | Isatin | 91-56-5 |
| FH097 | (-)-Norepinephrine | 51-41-2 |
| FH101 | Riboflavine | 83-88-5 |
| FH102 | Feutamide | 13311-84-7 |
| FH114 | 4-(Bromomethyl)pyridine-hydrobromide | 73870-24-3 |
| FH120 | (S)-3-Amino-2,4-dimethyl-2-pentanol hydrochloride | *CC(C)C(C(C)(C)O)N.Cl |

8. Literaturnachweis

1. Kyle, RA, *et al.*, *Multiple Myeloma*. New England Journal of Medicine, 2004. **351**(18): p. 1860-1873.
2. Palumbo, A, *et al.*, *Multiple myeloma*. New England Journal of Medicine, 2011. **364**(11): p. 1046-1060.
3. Kristinsson, SY, *et al.*, *Patterns of Survival in Multiple Myeloma: A Population-Based Study of Patients Diagnosed in Sweden From 1973 to 2003*. Journal of Clinical Oncology, 2007. **25**(15): p. 1993-1999.
4. Radons, J, *The human HSP70 family of chaperones: where do we stand?* Cell Stress and Chaperones, 2016. **21**(3): p. 379-404.
5. Davenport, EL, *et al.*, *Heat shock protein inhibition is associated with activation of the unfolded protein response pathway in myeloma plasma cells*. Blood, 2007. **110**(7): p. 2641-2649.
6. Chatterjee, M, *et al.*, *The PI3K/Akt signaling pathway regulates the expression of Hsp70, which critically contributes to Hsp90-chaperone function and tumor cell survival in multiple myeloma*. Haematologica, 2013. **98**(7): p. 1132-1141.
7. Powers, MV, *et al.*, *Dual targeting of HSC70 and HSP72 inhibits HSP90 function and induces tumor-specific apoptosis*. Cancer Cell, 2008. **14**(3): p. 250-262.
8. Sakkiah, S, *et al.*, *Pharmacophore based virtual screening, molecular docking studies to design potent heat shock protein 90 inhibitors*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2011. **46**(7): p. 2937-2947.
9. Kim, YS, *et al.*, *Update on Hsp90 Inhibitors in Clinical Trial*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2009. **9**(15): p. 1479-1492.
10. Gupta, RS, *et al.*, *Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus*. Current Biology, 1994. **4**(12): p. 1104-1114.
11. Hunt, C, *et al.*, *Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1985. **82**(19): p. 6455-6459.
12. Lindquist, S, *et al.*, *The heat-shock proteins*. Annual Review of Genetics, 1988. **22**: p. 631-677.
13. Tissieres, A, *et al.*, *Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: relation to chromosome puffs*. Journal of Molecular Biology, 1974. **84**(3): p. 389-398.
14. Finka, A, *et al.*, *Quantitative proteomics of heat-treated human cells show an across-the-board mild depletion of housekeeping proteins to massively accumulate few HSPs*. Cell Stress & Chaperones, 2015. **20**(4): p. 605-620.
15. Ciocca, DR, *et al.*, *Heat shock proteins and heat shock factor 1 in carcinogenesis and tumor development: an update*. Archives of Toxicology, 2013. **87**(1): p. 19-48.
16. Gunther, S, *et al.*, *Correlation of Hsp70 serum levels with gross tumor volume and composition of lymphocyte subpopulations in patients with squamous cell and adeno non-small cell lung cancer*. Frontiers in Immunology, 2015. **6**.
17. Hom, LL, *et al.*, *Eleven days of moderate exercise and heat exposure induces acclimation without significant HSP70 and apoptosis responses of lymphocytes in college-aged males*. Cell Stress & Chaperones, 2012. **17**(1): p. 29-39.
18. Molvarec, A, *et al.*, *Circulating heat shock protein 70 (HSPA1A) in normal and pathological pregnancies*. Cell Stress & Chaperones, 2010. **15**(3): p. 237-247.
19. Pockley, AG, *et al.*, *Extracellular cell stress proteins as biomarkers of human disease*. Biochemical Society Transactions, 2014. **42**(6): p. 1744-1751.
20. Qu, B, *et al.*, *The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review*. Cell Stress & Chaperones, 2015. **20**(6): p. 885-892.

21. Gehrman, MK, *et al.*, *Imaging of Hsp70-positive tumors with cmHsp70.1 antibody-conjugated gold nanoparticles*. International Journal of Nanomedicine, 2015. **10**: p. 5687-5700.
22. Hantschel, M, *et al.*, *Hsp70 plasma membrane expression on primary tumor biopsy material and bone marrow of leukemic patients*. Cell Stress & Chaperones, 2000. **5**(5): p. 438-442.
23. Multhoff, G, *et al.*, *A stress-inducible 72-kDa heat-shock protein (HSP72) is expressed on the surface of human tumor cells, but not on normal cells*. International Journal of Cancer, 1995. **61**(2): p. 272-279.
24. Multhoff, G, *et al.*, *Cell surface expression of heat shock proteins and the immune response*. Cell Stress Chaperones, 1996. **1**(3): p. 167-176.
25. Pelham, HRB, *Hsp70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock*. Embo Journal, 1984. **3**(13): p. 3095-3100.
26. Li, GC, *et al.*, *Thermal response of rat fibroblasts stably transfected with the human 70-kDa heat shock protein-encoding gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991. **88**(5): p. 1681-1685.
27. Jaattela, M, *et al.*, *Major heat shock protein hsp70 protects tumor cells from tumor necrosis factor cytotoxicity*. Embo Journal, 1992. **11**(10): p. 3507-3512.
28. Itoh, T, *et al.*, *Phylogenetic analysis of the third hsp70 homolog in Escherichia coli; a novel member of the Hsc66 subfamily and its possible co-chaperone*. DNA research, 1999. **6**(5): p. 299-305.
29. Bertelsen, EB, *et al.*, *Topology and dynamics of the 10 kDa C-terminal domain of DnaK in solution*. Protein Science, 1999. **8**(2): p. 343-354.
30. Qian, XG, *et al.*, *Direct interactions between molecular chaperones heat-shock protein (Hsp) 70 and Hsp40: yeast Hsp70 Ssa1 binds the extreme C-terminal region of yeast Hsp40 Sis1*. Biochemical Journal, 2002. **361**(Pt 1): p. 27-34.
31. Li, J, *et al.*, *Crystal structure of yeast Sis1 peptide-binding fragment and Hsp70 Ssa1 C-terminal complex*. Biochemical Journal, 2006. **398**(3): p. 353-360.
32. Stricher, F, *et al.*, *HSPA8/HSC70 chaperone protein: structure, function, and chemical targeting*. Autophagy, 2013. **9**(12): p. 1937-1954.
33. Fourie, AM, *et al.*, *Characterization and regulation of the major histocompatibility complex-encoded proteins Hsp70-Hom and Hsp70-1/2*. Cell Stress & Chaperones, 2001. **6**(3): p. 282-295.
34. Huszar, G, *et al.*, *Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2*. Biology of Reproduction, 2000. **63**(3): p. 925-932.
35. Scieglinska, D, *et al.*, *Differential expression of HSPA1 and HSPA2 proteins in human tissues; tissue microarray-based immunohistochemical study*. Histochemistry and Cell Biology, 2011. **135**(4): p. 337-350.
36. Rohde, M, *et al.*, *Members of the heat-shock protein 70 family promote cancer cell growth by distinct mechanisms*. Genes & Development, 2005. **19**(5): p. 570-582.
37. Gething, MJ, *Role and regulation of the ER chaperone BiP*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 1999. **10**(5): p. 465-472.
38. Noonan, EJ, *et al.*, *Hsp70B' regulation and function*. Cell Stress & Chaperones, 2007. **12**(4): p. 393-402.
39. Parsian, AJ, *et al.*, *The human Hsp70B gene at the HSPA7 locus of chromosome 1 is transcribed but non-functional*. Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression, 2000. **1494**(1-2): p. 201-205.
40. Bukau, B, *et al.*, *Molecular chaperones and protein quality control*. Cell, 2006. **125**(3): p. 443-451.
41. Florin, L, *et al.*, *Nuclear translocation of papillomavirus minor capsid protein L2 requires Hsc70*. Journal of Virology, 2004. **78**(11): p. 5546-5553.
42. Mizzen, LA, *et al.*, *Identification, characterization, and purification of two mammalian stress proteins present in mitochondria, grp 75, a member of the hsp 70 family and hsp 58, a*

- homolog of the bacterial groEL protein*. Journal of Biological Chemistry, 1989. **264**(34): p. 20664-20675.
43. Wadhwa, R, et al., *An Hsp70 family chaperone, mortalin/mthsp70/PBP74/Grp75: what, when, and where?* Cell Stress & Chaperones, 2002. **7**(3): p. 309-316.
 44. Hartl, FU, *Molecular chaperones in cellular protein folding*. Nature, 1996. **381**(6583): p. 571-580.
 45. Mattoo, RUH, et al., *Molecular chaperones are nanomachines that catalytically unfold misfolded and alternatively folded proteins*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2014. **71**(17): p. 3311-3325.
 46. Thulasiraman, V, et al., *In vivo newly translated polypeptides are sequestered in a protected folding environment*. Embo Journal, 1999. **18**(1): p. 85-95.
 47. Strickland, E, et al., *The molecular chaperone Hsc70 assists the in vitro folding of the N-terminal nucleotide-binding domain of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*. Journal of Biological Chemistry, 1997. **272**(41): p. 25421-25424.
 48. Meacham, GC, et al., *The Hdj-2/Hsc70 chaperone pair facilitates early steps in CFTR biogenesis*. Embo Journal, 1999. **18**(6): p. 1492-1505.
 49. Jana, NR, et al., *Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity*. Human Molecular Genetics, 2000. **9**(13): p. 2009-2018.
 50. Watanabe, M, et al., *Histological evidence of protein aggregation in mutant SOD1 transgenic mice and in amyotrophic lateral sclerosis neural tissues*. Neurobiology of Disease, 2001. **8**(6): p. 933-941.
 51. Wang, J, et al., *Progressive aggregation despite chaperone associations of a mutant SOD1-YFP in transgenic mice that develop ALS*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(5): p. 1392-1397.
 52. Stankiewicz, AR, et al., *Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation*. Journal of Biological Chemistry, 2005. **280**(46): p. 38729-38739.
 53. Yang, X, et al., *Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells*. Cancer Letters, 2012. **321**(2): p. 137-143.
 54. Guo, F, et al., *Mechanistic role of heat shock protein 70 in Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis in human acute leukemia cells*. Blood, 2005. **105**(3): p. 1246-1255.
 55. Gehrmann, M, et al., *The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (Hsp70) expression by tumor cells*. Cell Stress & Chaperones, 2008. **13**(1): p. 1-10.
 56. Flaherty, KM, et al., *Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein*. Nature, 1990. **346**(6285): p. 623-628.
 57. Zhu, XT, et al., *Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK*. Science, 1996. **272**(5268): p. 1606-1614.
 58. Arakawa, A, et al., *Biochemical and structural studies on the high affinity of Hsp70 for ADP*. Protein Science, 2011. **20**(8): p. 1367-1379.
 59. Wisniewska, M, et al., *Crystal Structures of the ATPase Domains of Four Human Hsp70 Isoforms: HSPA1L/Hsp70-hom, HSPA2/Hsp70-2, HSPA6/Hsp70B', and HSPA5/BiP/GRP78*. Plos One, 2010. **5**(1).
 60. Moro, F, et al., *The lid subdomain of DnaK is required for the stabilization of the substrate-binding site*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(19): p. 19600-19606.
 61. Scheufler, C, et al., *Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine*. Cell, 2000. **101**(2): p. 199-210.
 62. Kajander, T, et al., *Electrostatic Interactions of Hsp-organizing Protein Tetratricopeptide Domains with Hsp70 and Hsp90: computational analysis and protein engineering*. Journal of Biological Chemistry, 2009. **284**(37): p. 25364-25374.
 63. Brinker, A, et al., *Ligand discrimination by TPR domains - Relevance and selectivity of EEVD-recognition in Hsp70 x Hop x Hsp90 complexes*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(22): p. 19265-19275.

64. Jiang, JW, *et al.*, *Structural basis of interdomain communication in the Hsc70 chaperone*. *Molecular Cell*, 2005. **20**(4): p. 513-524.
65. Swain, JF, *et al.*, *Hsp70 chaperone ligands control domain association via an allosteric mechanism mediated by the interdomain linker*. *Molecular Cell*, 2007. **26**(1): p. 27-39.
66. Rist, W, *et al.*, *Amide hydrogen exchange reveals conformational changes in Hsp70 chaperones important for allosteric regulation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(24): p. 16493-16501.
67. Vogel, M, *et al.*, *Allosteric regulation of Hsp70 chaperones involves a conserved interdomain linker*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006. **281**(50): p. 38705-38711.
68. Zhuravleva, A, *et al.*, *Allosteric signal transmission in the nucleotide-binding domain of 70-kDa heat shock protein (Hsp70) molecular chaperones*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011. **108**(17): p. 6987-6992.
69. Chang, Y-W, *et al.*, *Crystal structures of the 70-kDa heat shock proteins in domain disjoining conformation*. *Journal of Biological Chemistry*, 2008. **283**(22): p. 15502-15511.
70. Bertelsen, EB, *et al.*, *Solution conformation of wild-type E. coli Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009. **106**(21): p. 8471-8476.
71. Zhuravleva, A, *et al.*, *An Interdomain Energetic Tug-of-War Creates the Allosterically Active State in Hsp70 Molecular Chaperones*. *Cell*, 2012. **151**(6): p. 1296-1307.
72. Gillies, AT, *et al.*, *Synthetic lethal interactions in yeast reveal functional roles of J protein co-chaperones*. *Molecular Biosystems*, 2012. **8**(11): p. 2901-2908.
73. Bukau, B, *et al.*, *The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines*. *Cell*, 1998. **92**(3): p. 351-366.
74. Pellicchia, M, *et al.*, *Structural insights into substrate binding by the molecular chaperone DnaK*. *Nature Structural Biology*, 2000. **7**(4): p. 298-303.
75. Pirkkala, L, *et al.*, *Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond*. *Faseb Journal*, 2001. **15**(7): p. 1118-1131.
76. Akerfelt, M, *et al.*, *Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2010. **11**(8): p. 545-555.
77. Mason, PB, *et al.*, *Cooperative and competitive protein interactions at the Hsp70 promoter*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(52): p. 33227-33233.
78. Brehme, M, *et al.*, *Model systems of protein-misfolding diseases reveal chaperone modifiers of proteotoxicity*. *Disease Models & Mechanisms*, 2016. **9**(8): p. 823-838.
79. Ciocca, DR, *et al.*, *Heat shock proteins in cancer: diagnostic, prognostic, predictive, and treatment implications*. *Cell Stress & Chaperones*, 2005. **10**(2): p. 86-103.
80. Seo, JS, *et al.*, *T cell lymphoma in transgenic mice expressing the human Hsp70 gene*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1996. **218**(2): p. 582-587.
81. Mosser, DD, *et al.*, *Molecular chaperones and the stress of oncogenesis*. *Oncogene*, 2004. **23**(16): p. 2907-2918.
82. Garrido, C, *et al.*, *Heat shock proteins: endogenous modulators of apoptotic cell death*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001. **286**(3): p. 433-442.
83. Buzzard, KA, *et al.*, *Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 1998. **273**(27): p. 17147-17153.
84. Pocaly, M, *et al.*, *Overexpression of the heat-shock protein 70 is associated to imatinib resistance in chronic myeloid leukemia*. *Leukemia*, 2007. **21**(1): p. 93-101.
85. Gabai, VL, *et al.*, *Increased expression of the major heat shock protein Hsp72 in human prostate carcinoma cells is dispensable for their viability but confers resistance to a variety of anticancer agents*. *Oncogene*, 2005. **24**(20): p. 3328-3338.
86. Wegele, H, *et al.*, *Hsp70 and Hsp90--a relay team for protein folding*. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 2004. **151**: p. 1-44.
87. Richter, K, *et al.*, *Hsp90: chaperoning signal transduction*. *Journal of Cellular Physiology*, 2001. **188**(3): p. 281-290.

88. Powers, MV, *et al.*, *Inhibitors of the heat shock response: biology and pharmacology*. FEBS Letters, 2007. **581**(19): p. 3758-3769.
89. Taldone, T, *et al.*, *Purine-scaffold Hsp90 inhibitors*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2009. **9**(15): p. 1436-1446.
90. Chaudhury, S, *et al.*, *Hsp90 as a target for drug development*. ChemMedChem, 2006. **1**(12): p. 1331-1340.
91. Bagatell, R, *et al.*, *Induction of a heat shock factor 1-dependent stress response alters the cytotoxic activity of hsp90-binding agents*. Clinical Cancer Research, 2000. **6**(8): p. 3312-3318.
92. Powers, MV, *et al.*, *Death by chaperone: HSP90, HSP70 or both?* Cell Cycle, 2009. **8**(4): p. 518-526.
93. Zaarur, N, *et al.*, *Targeting heat shock response to sensitize cancer cells to proteasome and Hsp90 inhibitors*. Cancer Research, 2006. **66**(3): p. 1783-1791.
94. Evans, CG, *et al.*, *Heat Shock Protein 70 (Hsp70) as an Emerging Drug Target*. Journal of Medicinal Chemistry, 2010. **53**(12): p. 4585-4602.
95. Goloudina, AR, *et al.*, *Inhibition of HSP70: A challenging anti-cancer strategy*. Cancer Letters, 2012. **325**(2): p. 117-124.
96. Nadler, SG, *et al.*, *Interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin with a member of the Hsp70 family of heat shock proteins*. Science, 1992. **258**(5081): p. 484-486.
97. Umeda, Y, *et al.*, *Synthesis and antitumor activity of spergualin analogs. I. Chemical modification of 7-guanidino-3-hydroxyacyl moiety*. Journal of Antibiotics, 1985. **38**(7): p. 886-898.
98. Brodsky, JL, *Selectivity of the molecular chaperone-specific immunosuppressive agent 15-deoxyspergualin - Modulation of HSC70 ATPase activity without compromising DnaJ chaperone interactions*. Biochemical Pharmacology, 1999. **57**(8): p. 877-880.
99. Nadeau, K, *et al.*, *Quantitation of the interaction of the immunosuppressant deoxyspergualin and analogs with Hsc70 and Hsp90*. Biochemistry, 1994. **33**(9): p. 2561-2567.
100. Nadler, SG, *et al.*, *Identification of a binding site on Hsc70 for the immunosuppressant 15-deoxyspergualin*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1998. **253**(1): p. 176-180.
101. Dhingra, K, *et al.*, *Phase-II study of deoxyspergualin in metastatic breast cancer*. Investigational New Drugs, 1994. **12**(3): p. 235-241.
102. Plowman, J, *et al.*, *Preclinical antitumor activity and pharmacological properties of deoxyspergualin*. Cancer Research, 1987. **47**(3): p. 685-689.
103. Williamson, DS, *et al.*, *Novel Adenosine-Derived Inhibitors of 70 kDa Heat Shock Protein, Discovered Through Structure-Based Design*. Journal of Medicinal Chemistry, 2009. **52**(6): p. 1510-1513.
104. Schlecht, R, *et al.*, *Functional Analysis of Hsp70 Inhibitors*. Plos One, 2013. **8**(11): p. e78443.
105. Rousaki, A, *et al.*, *Allosteric Drugs: The Interaction of Antitumor Compound MKT-077 with Human Hsp70 Chaperones*. Journal of Molecular Biology, 2011. **411**(3): p. 614-632.
106. Wadhwa, R, *et al.*, *Selective toxicity of MKT-077 to cancer cells is mediated by its binding to the hsp70 family protein mot-2 and reactivation of p53 function*. Cancer Research, 2000. **60**(24): p. 6818-6821.
107. Chiba, Y, *et al.*, *MKT-077, localized lipophilic cation: Antitumor activity against human tumor xenografts serially transplanted into nude mice*. Anticancer Research, 1998. **18**(2A): p. 1047-1052.
108. Propper, DJ, *et al.*, *Phase I trial of the selective mitochondrial toxin MKT 077 in chemoresistant solid tumours*. Annals of Oncology, 1999. **10**(8): p. 923-927.
109. Tatsuta, N, *et al.*, *Pharmacokinetic analysis and antitumor efficacy of MKT-077, a novel antitumor agent*. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 1999. **43**(4): p. 295-301.
110. Leu, JIJ, *et al.*, *A Small Molecule Inhibitor of Inducible Heat Shock Protein 70*. Molecular Cell, 2009. **36**(1): p. 15-27.

111. Balaburski, GM, *et al.*, *A Modified HSP70 Inhibitor Shows Broad Activity as an Anticancer Agent*. *Molecular Cancer Research*, 2013. **11**(3): p. 219-229.
112. Kaiser, M, *et al.*, *Antileukemic activity of the HSP70 inhibitor pifithrin- μ in acute leukemia*. *Blood Cancer Journal*, 2011. **1**: p. e28.
113. Steele, AJ, *et al.*, *2-phenylacetylenesulfonamide (PAS) induces p53-independent apoptotic killing of B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells*. *Blood*, 2009. **114**(6): p. 1217-1225.
114. Williams, DR, *et al.*, *An apoptosis-inducing small molecule that binds to heat shock protein 70*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2008. **47**(39): p. 7466-7469.
115. Cho, HJ, *et al.*, *A Small Molecule That Binds to an ATPase Domain of Hsc70 Promotes Membrane Trafficking of Mutant Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*. *Journal of the American Chemical Society*, 2011. **133**(50): p. 20267-20276.
116. Evans, LE, *et al.*, *Investigating Apoptozole as a Chemical Probe for HSP70 Inhibition*. *Plos One*, 2015. **10**(10): p. e0140006.
117. Peinz, U, *Strukturbasiertes computergestütztes Wirkstoffdesign an flexiblen Proteintargets: Aldose Reduktase und Hsp70*. Dissertation, Universität Würzburg, 2017.
118. Jiang, J, *et al.*, *Crystallization of a functionally intact Hsc70 chaperone*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 2006. **62**(Pt 1): p. 39-43.
119. Zilian, D, *Neuartige, empirische Scoring-Modelle für Protein-Ligand-Komplexe und computergestützte Entwicklung von Hsp70-Inhibitoren*. Dissertation, Universität Würzburg, 2014.
120. Hartung, AW, *Entwicklung neuartiger pharmakologischer Wirkstoffe als Inhibitoren des HSF-1/HSP70-Systems zur Behandlung des Multiplen Myeloms*. Dissertation, Universität Würzburg, 2014.
121. Ungewickell, E, *et al.*, *Functional interaction of the auxilin J domain with the nucleotide- and substrate-binding modules of Hsc70*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(31): p. 19594-19600.
122. Wilbanks, SM, *et al.*, *Solution small-angle X-ray scattering study of the molecular chaperone Hsc70 and its subfragments*. *Biochemistry*, 1995. **34**(38): p. 12095-12106.
123. Dale, GE, *et al.*, *The protein as a variable in protein crystallization*. *Journal of Structural Biology*, 2003. **142**(1): p. 88-97.
124. Veessler, S, *et al.*, *Influence of polydispersity on protein crystallization: a quasi-elastic light-scattering study applied to alpha-amylase*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 1994. **50**(Pt 4): p. 355-360.
125. Derewenda, ZS, *Rational protein crystallization by mutational surface engineering*. *Structure*, 2004. **12**(4): p. 529-535.
126. Williams, A, *et al.*, *Ion-exchange chromatography*. *Current Protocols in Protein Science*, 2001. **Chapter 8**: p. Unit8.2.
127. Jennissen, HP, *et al.*, *General aspects of hydrophobic chromatography. Adsorption and elution characteristics of some skeletal muscle enzymes*. *Biochemistry*, 1975. **14**(4): p. 754-760.
128. Hofstee, BH, *et al.*, *Non-ionic adsorption chromatography of proteins*. *Journal of Chromatography*, 1978. **159**(1): p. 57-69.
129. Bornhorst, JA, *et al.*, *Purification of proteins using polyhistidine affinity tags*. *Methods in Enzymology*, 2000. **326**: p. 245-254.
130. Dümmler, A, *et al.*, *Simplified screening for the detection of soluble fusion constructs expressed in E. coli using a modular set of vectors*. *Microbial Cell Factories*, 2005. **4**: p. 34-34.
131. Hong, P, *et al.*, *Size-Exclusion Chromatography for the Analysis of Protein Biotherapeutics and their Aggregates*. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2012. **35**(20): p. 2923-2950.
132. Murata, S, *et al.*, *Purification and assay of the chaperone-dependent ubiquitin ligase of the carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein*. *Methods in Enzymology*, 2005. **398**: p. 271-279.

133. Patrick, MH, *Crystallography made crystal clear: A guide for users of macromolecular models (3rd Ed.)*. Biochemistry and Molecular Biology Education, 2007. **35**(5): p. 387-388.
134. Chayen, NE, Shaw Stewart, P. D., Maeder, D. L. & Blow, D. M., *An automated system for micro-batch protein crystallization and screening*. Journal of Applied Crystallography, 1990. **23**: p. 297-302.
135. Auton, M, *et al.*, *Predicting the energetics of osmolyte-induced protein folding/unfolding*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(42): p. 15065-15068.
136. Baskakov, IV, *et al.*, *Trimethylamine N-oxide-induced cooperative folding of an intrinsically unfolded transcription-activating fragment of human glucocorticoid receptor*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(16): p. 10693-10696.
137. Baskakov, I, *et al.*, *Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(9): p. 4831-4834.
138. Bolen, DW, *Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization*. Methods, 2004. **34**(3): p. 312-322.
139. Sousa, R, *Use of glycerol, polyols and other protein structure stabilizing agents in protein crystallization*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 1995. **51**(Pt 3): p. 271-277.
140. Grimm, C, *Crystal Structure of bovine hsc70(aa1-554)E213A/D214A at 1.9Å Resolution*. PDB Code 4FL9, 2012.
141. Muller, I, *Guidelines for the successful generation of protein-ligand complex crystals*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2017. **73**(2): p. 79-92.
142. Joyce, MG, *et al.*, *A rational approach to heavy-atom derivative screening*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2010. **66**(Pt 4): p. 358-365.
143. Pike, AC, *et al.*, *An overview of heavy-atom derivatization of protein crystals*. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2016. **72**(Pt 3): p. 303-318.
144. Xu, J, *et al.*, *How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5?* Bioinformatics, 2010. **26**(7): p. 889-895.
145. Maiorov, VN, *et al.*, *Significance of root-mean-square deviation in comparing three-dimensional structures of globular proteins*. Journal of Molecular Biology, 1994. **235**(2): p. 625-634.
146. Moro, F, *et al.*, *Interdomain interaction through helices A and B of DnaK peptide binding domain*. FEBS Letters, 2003. **533**(1-3): p. 119-123.
147. Jerabek-Willemsen, M, *et al.*, *MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond*. Journal of Molecular Structure, 2014. **1077**: p. 101-113.
148. Thulasiraman, V, *et al.*, *Luciferase Renaturation Assays of Chaperones and Chaperone Antagonists*, in *Bioluminescence Methods and Protocols*, LaRossa, RA, Editor. 1998, Humana Press: Totowa, NJ. p. 129-141.
149. Seidel, SAI, *et al.*, *Microscale Thermophoresis Quantifies Biomolecular Interactions under Previously Challenging Conditions*. Methods, 2013. **59**(3): p. 301-315.
150. Sadikot, T, *et al.*, *Development of a high-throughput screening cancer cell-based luciferase refolding assay for identifying Hsp90 inhibitors*. Assay and Drug Development Technologies, 2013. **11**(8): p. 478-488.
151. Cassel, JA, *et al.*, *Novel inhibitors of heat shock protein Hsp70-mediated luciferase refolding that bind to DnaJ*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2012. **20**(11): p. 3609-3614.
152. Galam, L, *et al.*, *High-throughput assay for the identification of Hsp90 inhibitors based on Hsp90-dependent refolding of firefly luciferase*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2007. **15**(5): p. 1939-1946.
153. Ernst, K, *et al.*, *A novel Hsp70 inhibitor prevents cell intoxication with the actin ADP-ribosylating Clostridium perfringens iota toxin*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 20301.
154. Mayer, MP, *et al.*, *Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2005. **62**(6): p. 670-684.

155. Szabo, A, *et al.*, *The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the Escherichia coli Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994. **91**(22): p. 10345-10349.
156. Lehmann, A, *Entwicklung potenzieller Inhibitoren der Hitzeschockkomponenten HSF1 und HSP70 am Modell des Multiplen Myeloms*. Dissertation, Universität Würzburg, 2017.
157. Lipinski, CA, *et al.*, *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2001. **46**(1): p. 3-26.
158. LaPlante, SR, *et al.*, *Compound aggregation in drug discovery: implementing a practical NMR assay for medicinal chemists*. Journal of Medicinal Chemistry, 2013. **56**(12): p. 5142-5150.
159. Ladbury, JE, *Calorimetry as a tool for understanding biomolecular interactions and an aid to drug design*. Biochemical Society Transactions, 2010. **38**(4): p. 888-893.
160. Schiebel, J, *et al.*, *One Question, Multiple Answers: Biochemical and Biophysical Screening Methods Retrieve Deviating Fragment Hit Lists*. ChemMedChem, 2015. **10**(9): p. 1511-1521.
161. Huschmann, FU, *et al.*, *Structures of endothiapepsin-fragment complexes from crystallographic fragment screening using a novel, diverse and affordable 96-compound fragment library*. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 2016. **72**(Pt 5): p. 346-355.
162. Draxler, S, *Fragment-based screening on a cochaperone target protein*. Master Thesis, Universität Würzburg, 2016.
163. Rees, DC, *et al.*, *Fragment-based lead discovery*. Nature Reviews Drug Discovery, 2004. **3**(8): p. 660-672.
164. Hajduk, PJ, *et al.*, *A decade of fragment-based drug design: strategic advances and lessons learned*. Nature Reviews Drug Discovery, 2007. **6**(3): p. 211-219.
165. Fink, T, *et al.*, *Virtual Exploration of the Chemical Universe up to 11 Atoms of C, N, O, F: Assembly of 26.4 Million Structures (110.9 Million Stereoisomers) and Analysis for New Ring Systems, Stereochemistry, Physicochemical Properties, Compound Classes, and Drug Discovery*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2007. **47**(2): p. 342-353.
166. Price, AJ, *et al.*, *Fragment-based drug discovery and its application to challenging drug targets*. Essays In Biochemistry, 2017. **61**(5): p. 475-484.
167. Reverter, D, *et al.*, *A Basis for SUMO Protease Specificity Provided by Analysis of Human Senp2 and a Senp2-SUMO Complex*. Structure, 2004. **12**(8): p. 1519-1531.