

**Identifizierung chemischer und pharmakologischer Chaperone zur
Korrektur *trafficking*-defizienter Zapfen CNG-Kanäle**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
und
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

Joachim Träger
aus St. Georgen

August 2015

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2016

Dekan der Math.-Nat. Fakultät: Prof. Dr. W. Rosenstiel
Dekan der Medizinischen Fakultät: Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Bernd Wissinger
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Ruth

Prüfungskommission:
Prof. Dr. Bernd Wissinger
Prof. Dr. Bernd Antkowiak
Prof. Dr. Thomas Euler
PD Dr. Andrea Wizenmann

Ich erkläre, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: „Identifizierung chemischer und pharmakologischer Chaperone zur Korrektur *trafficking*-defizienter Zapfen CNG-Kanäle“ selbstständig verfasst, nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich versichere an Eides statt, dass diese Angaben wahr sind und dass ich nichts verschwiegen habe. Mir ist bekannt, dass die falsche Abgabe einer Versicherung an Eides statt mit Freiheitsstrafe bis zu drei Jahren oder mit Geldstrafe bestraft wird.

Tübingen, den _____

Datum

Unterschrift

I. Inhaltsverzeichnis

I. Inhaltsverzeichnis	I
II. Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Der Aufbau der Retina	1
1.2 Die Photorezeptoren	2
1.3 Die Phototransduktionskaskade	3
1.4 Die Familie der zyklisch Nukleotid-gesteuerten (CNG-) Kanäle	6
1.5 Der Zapfen CNG-Kanal	6
1.6 Modifikation und Modulation des Zapfen CNG-Kanals	9
1.7 Die Achromatopsie	10
1.8 Funktionelle Untersuchungen mutanter CNG-Kanäle	12
1.9 Das Proteinqualitäts-Kontrollsystem	14
1.10 Ansätze zur Reduzierung des <i>trafficking</i> -Defekts	14
2. Wissenschaftliche Zielsetzung	20
3. Material	21
3.1 Geräte	21
3.2 Chemikalien	22
3.3 Lösungen und Puffer	25
3.4 Enzyme	29
3.5 Antikörper	29
3.6 Primer	30
3.7 Bakterienstämme	30
3.8 Plasmide	30
3.9 Zelllinien	31
3.10 Längenstandards	31
3.11 Kits	31
3.12 Verbrauchsmaterialien	31
3.13 Software	32
3.14 Testsubstanzen	32
4. Methoden	36
4.1 Mikrobiologische Techniken	36
4.1.1 Transformation von <i>E.coli DH5α</i> und <i>E.coli JM109</i>	36
4.1.2 Aufreinigen von Plasmiden aus Bakterienkulturen	36

INHALTSVERZEICHNIS

4.1.3 Anlegen von Glycerolstocks.....	37
4.2 Aufreinigen und Aufkonzentrieren von Nukleinsäureproben.....	37
4.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion	37
4.2.2 Ethanol-Präzipitation	37
4.2.3 Gelextraktion von Nukleinsäureproben.....	38
4.2.4 Aufkonzentrierung von Nukleinsäureproben über Vakuumzentrifugation.....	38
4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäureproben	38
4.4 Molekularbiologische Techniken.....	38
4.4.1 Generierung eines Expressionsvektors für zytosolisch lokalisiertes Apoaequorin	38
4.4.2 Restriktionsverdau	39
4.4.3 Herstellung von blunt-end DNA-Fragmenten.....	40
4.4.4 Gelelektrophorese	41
4.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten.....	42
4.4.6 Kolonie-PCR	42
4.4.7 Sequenzieren von DNA-Proben	43
4.5 Zellbiologische Techniken	44
4.5.1 Auftauen von HEK293-Zellen.....	44
4.5.2 Kultivieren und Splitten von HEK293-Zellen	44
4.5.3 Einfrieren von HEK293-Zellen	45
4.5.4 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer	45
4.5.5 Transfektion von HEK293-Zellen	46
4.6 Immunzytochemische Färbung	48
4.7 Aequorin-basierter Bioassay	50
4.7.1 Rekonstitution des Aequorins.....	51
4.7.2 Lumineszenzmessung	51
4.7.3 Substanzscreening.....	51
4.7.4 Auswertung der Lumineszenzsignale	52
4.7.5 Identifizierung aktiver Substanzen	52
4.7.6 Einstufung Korrektoren versus Potentiatoren.....	54
4.8 Zellviabilitätsassay.....	55
4.9 SDS-PAGE und Western Blot	55
4.9.1 Proteinisolierung und Anreicherung von Membranfraktionen	56
4.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	56
4.9.3 Durchführung des SDS-Page und des Western Blots.....	57
4.9.4 Strippen der Nitrozellulosemembran	58

4.9.5 Oberflächenbiotinylierung.....	59
5. Ergebnisse	61
5.1 Entwicklung eines Aequorin-basierten Bioassay.....	61
5.1.1 Die Generierung des zyt-pCAeq Expressionskonstruktes	61
5.1.2 Verifizierung der Funktion des zyt-pCAeq als zytosolischer Calciumsensor	62
5.2 Die Etablierung des Bioassays	64
5.2.1 Die Optimierung der Parameter	64
5.2.2 Evaluation verschiedener trafficking-defizienter CNGA3-Kanalmutanten.....	67
5.2.3 Positivkontrolle für das Substanzscreening.....	68
5.2.4 Einfluss der Lösemittel auf die Oberflächenexpression des CNG-Kanals	69
5.2.5 Die Charakterisierung des Bioassays.....	70
5.3 Der Substanzscreen.....	72
5.3.1 Chemische Chaperone	72
5.3.2 Pharmakologische Chaperone.....	75
5.4 Weiterführende Untersuchungen mit ausgewählten pharm. Chaperonen.....	107
5.4.1 Untersuchung der Zellviabilität	107
5.4.2 Untersuchung weiterer mutanter, trafficking-defizienter CNG-Kanäle	108
5.4.3 Untersuchung der Potentiator-Wirkung von Nisoldipin.....	111
5.4.4 Einfluss der Substanzen auf die Apoequorin und CNGA3 _{E228K} -Expression	113
5.4.5 Einfluss der pharm. Chaperone auf die Oberflächenexpression von CNGA3 _{WT} -Kanälen..	117
5.4.6 Oberflächenbiotinylierung zum Nachweis der Wiederherstellung des traffickings	119
6. Diskussion	122
6.1 Design des Aequorin-basierten Bioassay	122
6.2 Ergebnisse des Substanzscreens	130
6.2.1 Chemische Chaperone	131
6.2.2 Pharmakologische Chaperone.....	133
6.2.3 Pharmakophormodell.....	145
6.2.4 Funktionelle Kategorien der untersuchten Substanzen.....	146
6.3 Weiterführende Experimente mit ausgewählten pharm. Chaperonen.....	149
6.4 Abschließende Beurteilung	159
6.5 Weitere Nutzungsmöglichkeiten des Aequorin-basierten Bioassays	161
6.6 Ausblick	162
7. Zusammenfassung	165
8. Summary	167
9. Anhang	167

INHALTSVERZEICHNIS

9.1 Sequenz von pCAeq.....	169
9.2 Molekülstrukturen der untersuchten Substanzen.....	172
10. Literaturverzeichnis	187
Danksagung.....	207

II. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
6-AHA	6-Aminohexansäure
AIF	<i>Apoptosis-inducing factor</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
AT II	AmpliTaQ II
AUC	<i>Area under the curve</i>
AUC _{beh}	AUC der behandelten Wells
AUC _{unbeh}	AUC der unbehandelten Kontrolle
BGB	<i>Blocking-grade blocker</i> (Magermilchpulver)
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C-terminal	Carboxyterminales Ende des Proteins
ca.	Circa
Ca ²⁺	Calciumionen
CaM	Calmodulin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
CI Lösung	<i>Calcium-Imaging</i> Lösung
CLZ	<i>Carboxy-terminal Leucine Zipper</i>
cm	Zentimeter
CNBD	<i>Cyclic nucleotide binding domain</i>
CNG-Kanal	Zyklische Nukleotid-gesteuerter Kanal
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cs ⁺	Caesiumionen
d.h.	Das heißt
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DHP	Dihydropyridin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline
DTT	1,4-Dithiothreit
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECB	Extrazellulärpuffer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENaC	Epithelialer Natriumkanal
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
FC	<i>fold change</i>
FC _{max}	maximaler FC
Fs	<i>Frameshift</i>
g	Erdbeschleunigung

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

GCAP	Guanylatzyklase-aktivierende Proteine
GCL	Ganglienzellschicht
GDP	Guanosindiphosphat
GECI	<i>Genetically encoded calcium indicators</i>
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Chlorwasserstoff
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HEK	<i>Human embryonic kidney</i>
hERG	<i>Human Ether-a-go-go related gene</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
Hsp70	<i>Heat-shock 70 kDa protein</i>
INL	Innere Körnerschicht
IPL	Innere plexiforme Schicht
IS	Innensegment (der Photorezeptoren)
K ⁺	Kaliumionen
KcsA	<i>Potassium crystallographically-sited activation channel</i>
kDa	Kilodalton
KM	Kulturmedium
KRP	Modifizierte Krebs-Ringer Puffer
K _v	Spannungsgesteuerter Kaliumkanal
Li ⁺	Lithiumionen
μ	Mittelwert
μF	Microfarad
μl	Microliter
μM	Micromolar
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumionen
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mio.	Million
mito	Mitochondrial
MTS	mitochondriale <i>targeting</i> -Sequenz
mV	Millivolt
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl der Versuchswiederholungen; Anzahl der Tage
n.d.	nicht detektierbar
N-terminal	Aminotermiales Ende des Proteins
Na ⁺	Natriumionen
Na _v	Spannungsgesteuerter Natriumkanal
NCKX	Na ⁺ /Ca ²⁺ -K ⁺ -Austauscher
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet® P40
OCT	Optischen Kohärenztomographie
Ω	Ohm
ONL	Äußere Körnerschicht
OPL	Äußere plexiforme Schicht

OS	Außensegment (der Photorezeptoren)
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
pharm.	pharmakologisch
PI	Phosphoinositide
PLL	Poly-L-Lysin
pmol	Picomol
PQK	Protein-Qualitätskontrollsystem
PXR	<i>Pregnane X receptor</i>
Rb ⁺	Rubidiumionen
RLU	<i>Relative light units</i>
RPE	Retinales Pigmentepithelium
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SD; σ	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
sek	Sekunden
SOB	<i>Super Optimal Broth</i> (Medium zur Bakterienaufzucht)
SOC	<i>Super Optimal broth with Catabolite Repression</i> (Medium zur Bakterienaufzucht)
T	Anzahl unabhängiger Transfektionen
Td	Transducin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembrandomäne
TMAO	Trimethylaminoxid
TRP	<i>Transient receptor potential</i>
TUDCA	Tauroursodeoxycholsäure
U	Units
u.a.	Unter anderem
V	Volt
z.B.	Zum Beispiel
zyt	Zytosolisch

1. Einleitung

1.1 Der Aufbau der Retina

Die Retina liegt im hinteren Teil des Säugetierauges und stellt die Licht-sensitive Schicht des Auges dar. Die Lichtstrahlen dringen durch die Pupille in den Augapfel (Bulbus) ein und wandern durch den Glaskörper (Vitreus), bevor sie von den Photorezeptoren der Retina detektiert und in einen elektrischen Impuls umgewandelt werden. Neben der Detektion der Lichtphotonen findet in der Retina auch eine erste Verarbeitung der visuellen Informationen statt. Dazu wird das Signal, welches von den Photorezeptoren über die Bipolarzellen zu den Ganglienzellen weitergeleitet wird, durch positiven *Feedback* und negativer Rückkopplung wie der lateralen Hemmung über die Horizontalzellen und Amakrinzellen moduliert (Masland, 2001; Joselevitch, 2008; Jackman et al., 2011). Um diese Signalprozessierung zu erleichtern, ist die Retina aus mehreren Zellschichten aufgebaut (Siehe Abb. 1).

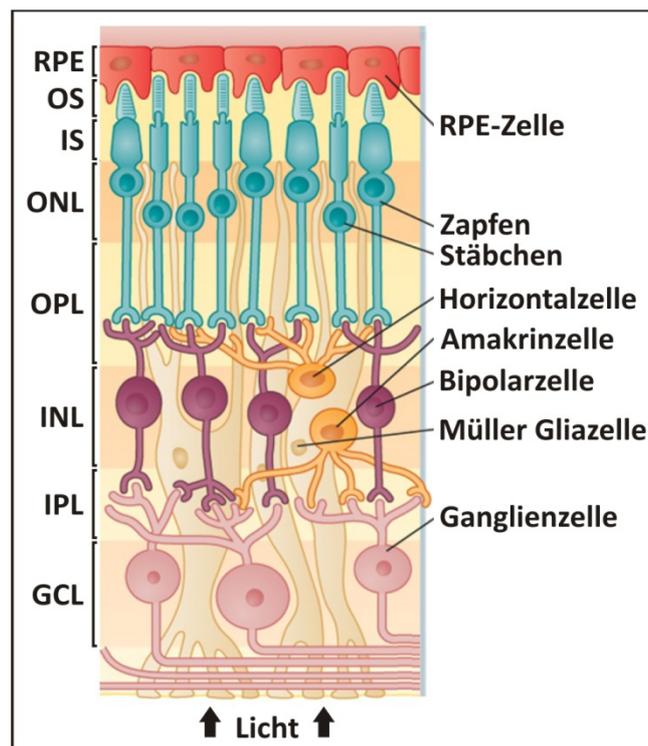


Abb. 1: Aufbau der Netzhaut (verändert nach Koeppen und Stanton, 2009). Die äußere Körnerschicht (ONL) wird durch die Nuklei der Stäbchen- und Zapfenphotorezeptoren gebildet, deren Innensegmente (IS) und Außensegmente (OS) in Richtung des retinalen Pigmentepithels (RPE) orientiert sind. In der äußeren plexiformen Schicht (OPL) liegen die Zell-Zell-Kontakte der Photorezeptoren mit Bipolarzellen und Horizontalzellen, deren Zellkörper mit denen der Amakrinzellen und Müller Gliazellen die innere Körnerschicht (INL) bilden. Die Ganglienzellschicht (GCL) ist durch die innere plexiforme Schicht (IPL), in der die Ausläufer der Bipolarzellen und Amakrinzellen die Ganglienzellen kontaktieren, von der INL abgegrenzt. Die Müller Gliazellen durchziehen nahezu die gesamte Retina, von der GCL bis zu der ONL.

EINLEITUNG

Photorezeptoren bilden mit ihren Zellkernen die äußere Körnerschicht und formen Zell-Zell-Kontakte mit den Bipolarzellen und Horizontalzellen in der äußeren plexiformen Schicht. Die Nuklei der Bipolarzellen, Horizontalzellen, Amakrinzellen und Müller Gliazellen befinden sich in der inneren Körnerschicht. In der nachfolgenden inneren plexiformen Schicht kontaktieren die Bipolarzellen und Amakrinzellen die Ganglienzellen, welche die Ganglienzellschicht ausbilden. Angrenzend an die Photorezeptorschicht befindet sich das retinale Pigmentepithel (RPE) welches nicht-neuronalen Ursprungs ist. Das RPE ist an der Erneuerung der Außensegmente beteiligt, absorbiert überschüssige Photonen, wodurch es zur Abbildungsschärfe beiträgt, und transportiert Nährstoffe aus der Blutbahn zu der äußeren Retina (Sung und Chuang, 2010; Palczewski, 2012). Eine weitere wichtige Funktion des RPE ist die Regeneration des Chromophors 11-*cis*-Retinal (Hildebrand und Fielder, 2011; Parker et al., 2011). Wie das RPE sind auch die Müller Gliazellen nicht-neuronalen Ursprungs. Die Müller Gliazellen durchziehen mit ihren Ausläufern die gesamte Retina und erfüllen wichtige physiologische Aufgaben wie die Regulation des pH-Wertes, Versorgung mit trophischen und antioxidativen Faktoren, Kontrolle der synaptischen Aktivität, dem Recycling von 11-*cis*-Retinal und Detektion von mechanischen Schädigungen der Retina (Dyer und Cepko, 2000; Reichenbach und Bringmann, 2013). Daneben fungieren sie als Lichtleiter, um Lichtphotonen an der lichtstreuenden inneren Retina vorbei zu den Photorezeptoren zu führen (Franze et al., 2007).

1.2 Die Photorezeptoren

Zwei Arten von Photorezeptoren liegen in der humanen Retina vor, die Zapfen und die Stäbchen. Beide Photorezeptortypen weisen einen ähnlichen Aufbau auf: Sie verfügen über ein Außensegment, dem Kompartiment, in dem die Photonen absorbiert werden und welches ursprünglich aus einem Zilium hervorging, dem Innensegment, in welchem die Mitochondrien, große Teile des Endoplasmatischen Retikulum (ER) und der Golgi-Apparat liegen, dem Nukleus und der Synapse. Strukturell kann man Zapfen und Stäbchen anhand der Größe und des Aufbaus ihrer Außensegmente unterscheiden. Stäbchen besitzen längere Außensegmente, in welchen mehrere Hundert scheibenförmige Disks eingelagert vorliegen, die Zapfenphotorezeptoren haben kürzere Außensegmente, die konisch zulaufen und zahlreiche Membraneinstülpungen aufweisen.

Stäbchenphotorezeptoren ermöglichen das Dämmerungssehen, während das Farbsehen und das Sehen unter Tageslichtbedingungen durch die Zapfenphotorezeptoren vermittelt werden. Um das Farbsehen zu ermöglichen, liegen drei verschiedene Zapfentypen vor, die sich in dem Opsin, das sie exprimieren, unterscheiden. Die drei Opsine in der menschlichen Retina besitzen verschiedene Absorptionsmaxima für das Licht. Die Absorptionsmaxima liegen für das S-Opsin bei ca. 420 nm (kurzwelliges, blaues Licht), für das M-Opsin bei ca. 530 nm (grünes Licht, mittlerer Wellenlänge) und für das L-Opsin bei ca. 560 nm (langwelliges, rotes Licht). Das Photopigment der Stäbchen ist das Rhodopsin, welches ein Absorptionsmaximum bei ca. 496 nm besitzt (Hildebrand und Fielder, 2011).

In der humanen Retina befinden sich etwa 92 Mio. Stäbchen und 4,6 Mio. Zapfen (Curcio et al., 1990). Die Verteilung der Photorezeptoren in der Retina ist nicht gleichmässig: In der *Fovea centralis* befinden sich vorwiegend Rot- und Grün-Zapfen – Blauzapfen finden sich vor allem in der Peripherie. Die Zapfenphotorezeptoren sind in der *Fovea centralis* so dicht wie physikalisch möglich gepackt und 1:1 mit Ganglienzellen verschaltet, wodurch die höchste Sehschärfe an diesem Ort vorliegt (Hildebrand und Fielder, 2011). In der Peripherie dominieren die Stäbchenphotorezeptoren, die Zapfendichte nimmt fortschreitend ab. Im nasalen Teil der Retina befindet sich außerdem die Papille (*Papilla nervi optici*), wo der Sehnerv austritt und Blutgefäße zur Versorgung der inneren Retina ins Auge gelangen. Da an diesem Ort keine Photorezeptoren lokalisiert sind und somit keine Lichtdetektion stattfinden kann, bezeichnet man diese Region als blinden Fleck.

1.3 Die Phototransduktionskaskade

Die Phototransduktionskaskade beschreibt die molekularen Mechanismen, die an der Umwandlung eines Lichtsignals in einen elektrischen Impuls beteiligt sind und im Außensegment der Photorezeptoren auftreten. Die meisten Untersuchungen bezüglich des Ablaufs der Phototransduktionskaskade wurden an Stäbchenphotorezeptoren durchgeführt. Untersuchungen an isolierten Zapfenphotorezeptoren aus dem Karpfen zeigen aber, dass die Vorgänge bei der Phototransduktion in den Zapfen prinzipiell ähnlich sind (Kawamura und Tachibanaki, 2008), aber von homologen Enzymkomponenten durchgeführt werden (Burns und Pugh, 2009).

EINLEITUNG

Im Dunkeln liegt eine hohe Konzentration des intrazellulären Botenstoffs zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) in den Außensegmenten der Photorezeptoren vor, welches von der Guanylatzyklase gebildet wird. Das cGMP fungiert als Ligand des zyklisch Nukleotid-gesteuerten Ionenkanals (CNG-Kanal) und hält diesen geöffnet, wodurch ein permanenter Einstrom von Natrium- und Calciumionen in das Außensegment ermöglicht wird. Die Calciumionen werden durch den im Außensegment lokalisierten $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ -Austauscher und die Natriumionen im Innensegment über Na^+/K^+ -ATPasen aus der Zelle transportiert (Fu und Yau, 2007; Vedovato und Rispoli, 2007). Der ausgleichende Strom an Kaliumionen aus der Zelle heraus erfolgt über verschiedene spannungsabhängige Kaliumkanäle im Innensegment des Photorezeptors (Pelucchi et al., 2008). Dieser im Dunkeln dauerhaft bestehende Ionenstrom wird als Dunkelstrom bezeichnet und hält das Membranpotential der Photorezeptoren bei etwa -35 mV , wodurch eine konstante Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat an der Synapse bewirkt wird (Siehe Abb. 2).

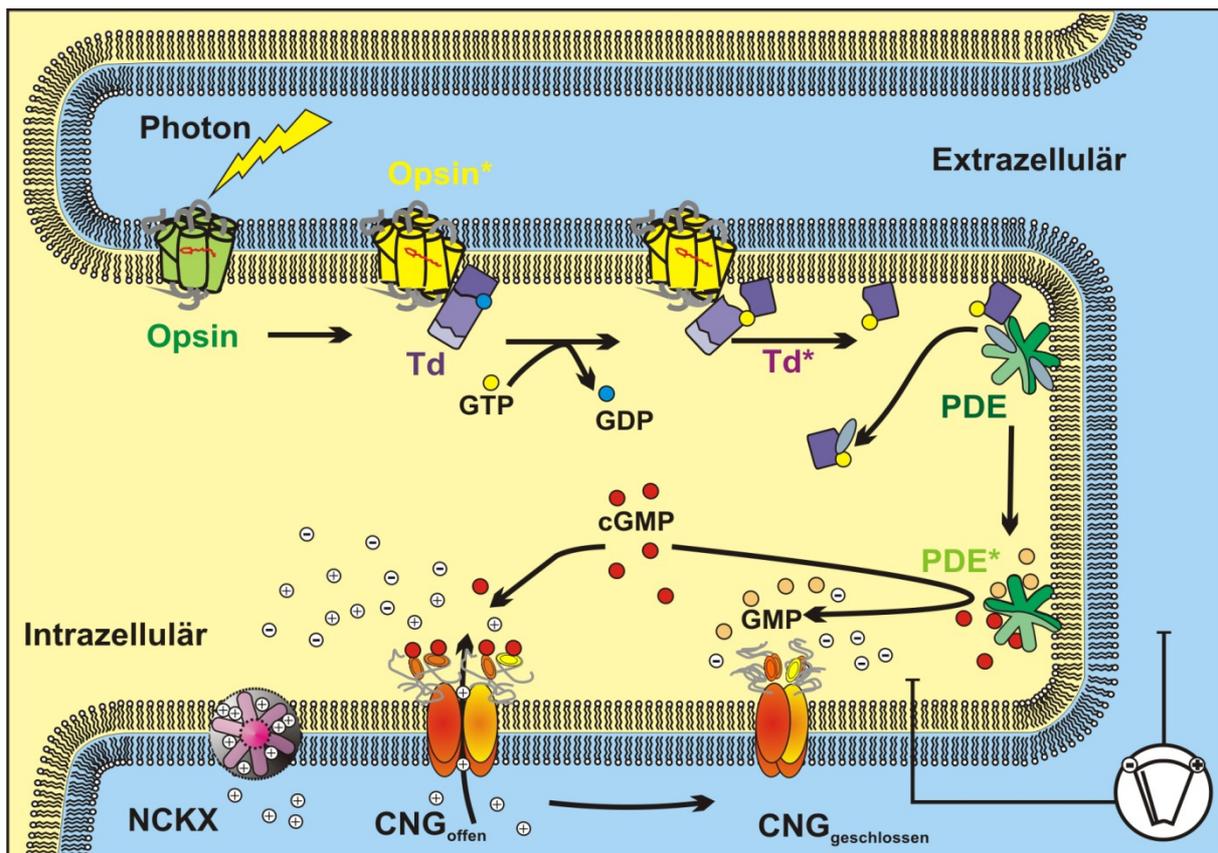


Abb. 2: Schematische Darstellung der Phototransduktionskaskade im Zapfenphotorezeptor (verändert nach Wissinger und Kohl, 2005). Im Dunkeln liegt eine hohe Konzentration des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) vor, wodurch der zyklisch Nukleotid-gesteuerte Ionenkanal (CNG) offen gehalten wird und der Dunkelstrom generiert wird. Durch Absorption eines Photons wird das Opsin angeregt und aktiviert das G-Protein Transducin (Td). Dieses aktiviert die Phosphodiesterase (PDE), wodurch cGMP abgebaut wird. Dadurch schließt der CNG-Kanal und die Zelle hyperpolarisiert.

Licht wird über das zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehörende Photopigment (Rhodopsin bzw. Zapfenopsin) und dem gebundenen, Licht-sensitiven Chromophor 11-*cis*-Retinal detektiert. Die Absorption eines Photons führt zur Photoisomerisierung des Chromophors und zur Anregung des Photopigments, welches das G-Protein Transducin aktiviert (Kawamura und Tachibanaki, 2008). Die Aktivierung des Transducins führt zu einem Austausch des an der α -Untereinheit gebundenen GDP durch ein GTP, wodurch die α -Untereinheit von der $\beta\gamma$ -Untereinheit des Komplexes freigesetzt wird und ihrerseits die Phosphodiesterase (PDE) durch Binden der inhibitorischen γ -Untereinheiten aktiviert (Joselevitch, 2008). Die PDE katalysiert den enzymatischen Abbau von cGMP zu GMP. Durch das Absinken des zytosolischen cGMP-Levels schließen CNG-Kanäle und der Dunkelstrom wird reduziert. Dadurch hyperpolarisiert die Zelle auf ein Membranpotential von etwa -70 mV wodurch die synaptische Aktivität, d.h. die Freisetzung von Glutamat, an der Synapse sinkt (Calvert und Makino, 2002).

Photorezeptoren besitzen mehrere Mechanismen zur Inaktivierung der Enzymkaskade, um bereit für die erneute Lichtdetektion zu sein. Das Photopigment kann durch Arrestin inaktiviert werden, dessen Bindung nach Phosphorylierung des Photopigments durch die Rhodopsinkinase in Stäbchen bzw. der Opsinkinase in Zapfen ermöglicht wird (Invergo et al., 2013). Daneben hydrolisiert die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit des Transducins das gebundene GTP, wodurch das Transducin inaktiviert wird. Über Calcium-abhängige Rückkopplungsmechanismen kann zudem die Lichtantwort moduliert werden: (I) die Guanylatzyklase kann durch Guanylatzyklase-aktivierende Proteine (GCAP) stimuliert werden, welche bei niedrigen intrazellulären Calciumkonzentrationen aktiviert vorliegen. (II) Bei hohen Calciumkonzentrationen kann Recoverin in Stäbchen nach Bindung von Calciumionen die Rhodopsinkinase binden und inaktivieren, wodurch die Hemmung des Rhodopsins durch Arrestin verzögert wird (Makino et al., 2004). Bei dem entsprechenden Homolog des Recoverins in Zapfenphotorezeptoren konnte die Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt werden (Kawamura et al., 1996). (III) Die Calcium-abhängige Calmodulin-Modulierung führt zu einer Reduktion der cGMP-Sensitivität in heteromeren Stäbchen CNG-Kanälen. In humanen Zapfenphotorezeptoren ist die Identität des korrespondierenden Proteins in der humanen Retina noch ungeklärt, im Felsenbarsch (*Morone saxatilis*) wurde es als CNG-Modulin beschrieben (Haynes und Stotz, 1997; Rebrik et al., 2012).

1.4 Die Familie der zyklisch Nukleotid-gesteuerten (CNG-) Kanäle

Der CNG-Kanal gehört zu der Superfamilie der spannungsgesteuerten Ionenkanäle, obwohl nur eine sehr geringe Spannungsabhängigkeit beobachtet wurde (Tang und Papazian, 1997). Der CNG-Kanal stellt einen nicht-selektiven Kationenkanal dar, welcher unter physiologischen Bedingungen als Heterotetramer – bestehend aus CNGA- und CNGB-Untereinheiten – vorliegt und unter physiologischen Bedingungen vor allem Natrium- und Calciumionen leitet. Bislang wurden sechs humane CNG-Untereinheiten identifiziert, vier CNGA-Untereinheiten und zwei modulatorische CNGB-Untereinheiten (Gerstner et al., 2000; Kaupp und Seifert, 2002). Der CNG-Kanal des Stäbchenphotorezeptors wird von der CNGA1- und der CNGB1-Untereinheit mit einer 3:1-Stöchiometrie gebildet (Zhong et al., 2002; Weitz et al., 2002; Zheng et al., 2002). Für diesen CNG-Kanal konnte gezeigt werden, dass dessen Assemblierung durch eine Leuzin-Zipper-ähnliche Struktur am C-Terminus (*Carboxy-terminal Leucine Zipper*, CLZ) vermittelt wird (Shuart et al., 2011). Diese Domäne, welche eine Trimerisierung initiiert, ist lediglich in den CNGA-Untereinheiten – jedoch nicht in den CNGB-Untereinheiten – konserviert. Aufgrund der Trimerisierung der CLZ-Domäne wird auch für den Zapfen CNG-Kanal, der aus CNGA3- und CNGB3-Untereinheiten besteht, eine 3:1-Stöchiometrie favorisiert (Shuart et al., 2011). Der olfaktorische CNG-Kanal besteht aus zwei CNGA2-, einer CNGA4 und einer CNGB1b-Untereinheit (kürzere Spleißisoform von CNGB1; Zheng und Zagotta, 2004). Dieser CNG-Kanal wird im gleichen Maße von den Liganden cAMP und cGMP aktiviert (Frings et al., 1992; Reisert und Bradley, 2005). Die retinalen CNG-Kanäle favorisieren im Gegensatz dazu cGMP – cAMP stellt einen partiellen Agonisten dar.

1.5 Der Zapfen CNG-Kanal

Die CNGA3- und die CNGB3-Untereinheit des Zapfen CNG-Kanals besitzen eine homologe Struktur mit sechs Transmembrandomänen (TM), einer Porenregion zwischen TM5 und TM6, einer intrazellulären Bindestelle für zyklische Nukleotide, welche über einen C-Linker mit TM6 verbunden ist, sowie intrazellulär lokalisierte aminoterminalen (N-terminalen) und carboxyterminalen (C-terminalen) Enden (Siehe Abb. 3).

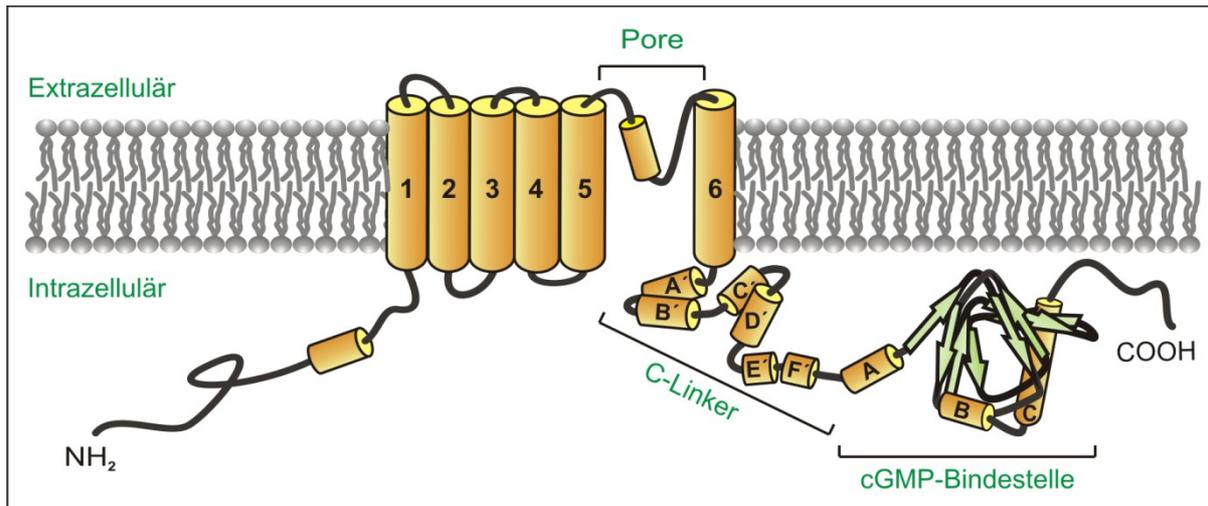


Abb. 3: Topologische Darstellung einer CNG-Kanal-Untereinheit (verändert nach Koeppen et al., 2008). Sowohl CNGA3 als auch CNGB3 bestehen aus sechs Transmembrandomänen (TM), einer Porenregion zwischen TM5 und TM6, einem C-Linker und der Bindestelle für zyklische Nukleotide (CNBD) am intrazellulären carboxyterminalen Ende.

Die Porenregion des CNG-Kanals ist der des bakteriellen Kaliumkanal *KcsA* (*Potassium crystallographically-sited activation channel*) ähnlich (Kaupp und Seifert, 2002). Beide Ionenkanäle besitzen einen Selektivitätsfilter an der auswärts gelegenen Öffnung des Kanals, einen darunterliegenden Wasser-gefüllten Hohlraum sowie ein an der zytoplasmatischen Seite gelegenes *gate*. Diese drei Elemente bilden eine trichterartige Öffnung, welche auch als invertiertes Tipi (*inverted teepee*) bezeichnet wird (Doyle et al., 1998). Unterschiede zwischen beiden Kanälen sind aber insbesondere in dem Selektivitätsfilter vorhanden. Beim CNG-Kanal ist lediglich das erste Glycin des unter den Kaliumkanälen konservierten Motivs G-Y-G vorhanden (Bernèche und Roux, 2005). Diese und weitere Unterschiede im Selektivitätsfilter erklären den nicht-selektiven Charakter des CNG-Kanals gegenüber dem *KcsA*-Kanal. Der Zapfen CNG-Kanal des Felsenbarsch leitet einwertige Alkalimetall-Ionen mit folgender Präferenz: $K^+ > Na^+ \sim Li^+ \sim Rb^+ > Cs^+$ = 1,11:1,0:0,99:0,96:0,82 (Picones und Korenbrot, 1992). Daneben können auch zweiwertige Kationen wie das Calcium die Pore des CNG-Kanals passieren, wenngleich die Leitfähigkeit für Calcium schlechter ist als für einwertige Kationen. Zweiseitige Kationen besitzen eine längere Verweildauer an der Porenöffnung und blockieren dadurch den Ionenstrom der einwertigen Kationen kurzzeitig.

Über den C-Linker – bestehend aus sechs α -Helices – ist die Bindedomäne für zyklische Nukleotide (*cyclic nucleotide binding domain*, CNBD) mit der TM6 verbunden. Die CNBD besteht aus drei α -Helices ($\alpha A'$, $\alpha B'$ und $\alpha C'$) und acht β -Strängen ($\beta 1 - \beta 8$), welche eine

EINLEITUNG

Fass-Struktur zwischen $\alpha B'$ und $\alpha C'$ ausbilden (Kaupp und Seifert, 2002). Die Bindung von zyklischen Nukleotiden wird hauptsächlich über Interaktion mit acht Aminosäureresten in $\beta 5 - \beta 7$ und $\alpha C'$ vermittelt, von denen sechs zwischen CNGA3 und CNGB3 konserviert sind. Die Identität einer Aminosäure (D609 in CNGA3) in $\alpha C'$ ist entscheidend für die Selektivität der CNGA3-Untereinheit für cGMP über cAMP (Varnum et al., 1995). Wird diese Asparaginsäure durch eine neutrale Aminosäure ersetzt, so steigt die Affinität des Kanals für cAMP (Varnum et al., 1995). In CNGB3 befindet sich an der homologen Aminosäureposition ein basisches Lysin, welches mit höherer Affinität das cAMP bindet und somit die höhere Sensitivität der heteromeren Kanäle gegenüber cAMP erklärt. Durch Bindung des Liganden orientiert sich die $\alpha C'$ -Helix zu der β -Fass-Struktur (Johnson und Zagotta, 2001). Diese Konformationsänderung wird über den C-Linker weitergegeben und bewirkt eine Rotation der TM6 und somit das Öffnen der Ionenkanal-Pore (Giogetti et al., 2005). Der tetramere Ionenkanal besitzt vier Bindestellen für zyklische Nukleotide, jedoch reicht bereits die Bindung von zwei Liganden aus, um die Pore über einen kooperativen Mechanismus zu öffnen. Die Bindung weiterer Liganden führt zu einer Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit (Ruiz und Karpen, 1997; Biskup et al., 2007).

Obwohl beide Untereinheiten einen ähnlichen Aufbau besitzen, kann lediglich das CNGA3 funktionelle homomere Kanäle in heterologen Expressionssystemen bilden und wird daher als Hauptuntereinheit betrachtet (Bright et al., 2005). Das CNGB3 ist dazu nicht in der Lage, kann aber die Funktion des heteromeren CNG-Kanals modulieren. Heteromere Zapfen CNG-Kanäle besitzen eine geringere apparente cGMP-Sensitivität, eine höhere apparente cAMP-Sensitivität und eine reduzierte Offenwahrscheinlichkeit (Gerstner et al., 2000), der Calciumblock ist verringert und die Sensitivität gegenüber dem Kanalantagonisten *L-cis*-Diltiazem erhöht (Liu et al., 2013). Zudem ist die CNGB3-Untereinheit möglicherweise für den Transport heteromere Kanäle in das Zapfenaußensegment notwendig. Für den Stäbchen CNG-Kanal konnte gezeigt werden, dass die CNGB1-Untereinheit über einen Ankyrin-vermittelten Mechanismus den Transport heteromerer Kanäle in das Außensegment der Stäbchenphotorezeptoren ermöglicht (Kizhatil et al., 2009). Dabei wird die Bildung heteromerer Kanäle durch ein N-terminales ER-Retentionssignal in der CNGB1-Untereinheit reguliert, das nur durch Interaktion mit der CNGA1-Untereinheit verdeckt wird (Trudeau und Zagotta, 2002).

Obwohl der Zapfen CNG-Kanal in erster Linie mit der Retina assoziiert wird, besitzen *CNGA3* und *CNGB3* ein breites Expressionsspektrum. *CNGA3* wurde unter anderem in dem Gehirn, der Lunge, dem Herz, der Leber, dem Hodengewebe und in Spermatozyten, dem olfaktorischen Epithel, dem Skelettmuskel, der Cochlea und mehreren Sekretionsdrüsen nachgewiesen (Biel et al., 1993; Biel et al., 1994; Distler et al., 1994; Timpe et al., 1999; Cassar et al., 2004; Leinders-Zufall et al., 2007; Wu et al., 2009; Wilkinson et al., 2011; Selvakumar et al., 2012). *CNGB3* besitzt ein ähnliches Expressionsspektrum (Wiesner et al., 1998, Wu et al., 2009).

1.6 Modifikation und Modulation des Zapfen CNG-Kanals

Eine proteolytische Abspaltung der ersten 92 Aminosäuren der CNGA1-Untereinheit wurde in angereicherten Außensegmenten von bovinen Stäbchenphotorezeptoren nachgewiesen. Das resultierende Protein mit einem Molekulargewicht von 63 kDa konnte auch in weiteren Spezies, u.a. auch dem Menschen, identifiziert werden, allerdings ist dessen Funktion bislang ungeklärt (Molday et al., 1991). Für CNGA3 wurde lediglich im Huhn eine N-terminale Prozessierung beschrieben, welche zu einer Verringerung des Molekulargewichts um 9 kDa führt (Bönigk et al., 1993).

Die CNGA3-Untereinheit verschiedener Spezies besitzen das Glykosylierungsmotif N-X-S/T nach der TM5 (Faillace et al., 2004). Untersuchungen an heterolog exprimiertem CNGA3 zeigten, dass unglykosylierte Kanaluntereinheiten eine Matrix-Metalloproteasen-vermittelte Erhöhung der apparenten cGMP-Sensitivität und der Effizienz des partiellen Agonisten cAMP erfahren (Meighan et al., 2012). Sind unglykosylierte CNG-Kanäle längere Zeit den Matrix-Metalloproteasen ausgesetzt, so erfolgt eine proteolytische Spaltung des Kanalproteins (Meighan et al., 2013). Glykosylierte CNGA3-Untereinheiten sind vor Matrix-Metalloproteasen-vermittelten Modulationen und der proteolytischen Spaltung geschützt (Meighan et al., 2013).

Eine Modulation des CNG-Kanals kann ebenfalls durch Phosphorylierungen der Proteinkinase C oder der Interaktion mit Phosphoinositiden (PI) erfolgen. In *patch-clamp* Untersuchungen an bovinen, homomeren Zapfen CNG-Kanälen führte die Behandlung mit einem Aktivator der Proteinkinase C zu einer 10-fach geringeren cGMP-Sensitivität. Dieser

EINLEITUNG

Effekt wurde durch Mutagenese der Serinreste an Position 577 und 579 (homolog zu p.S558 und p.S560 im humanen CNGA3) unterbunden (Müller et al., 2001). Außerdem konnte nach heterologer Expression des humanen, homomeren CNGA3 durch Interaktion mit PI die Effizienz des cAMP für das Öffnen des CNG-Kanals erhöht werden (Dai et al., 2013). Mutagenesestudien belegten, dass sowohl p.R643 als auch p.R646 in CNGA3 wichtig für die Interaktion mit PI sind. Bei dem humanen, heteromeren Zapfen CNG-Kanal führte die Interaktion mit PI zu einer Verringerung der apparenten cGMP-Sensitivität (Dai et al., 2013).

Der Stäbchen und der olfaktorische CNG-Kanal können durch das Calcium-abhängige Calmodulin (CaM) moduliert werden (Trudeau und Zagotta, 2003). In den Stäbchenphotorezeptoren bindet CaM in Anwesenheit von Calcium am N-Terminus des CNGB1 und führt zu einer Senkung der apparente cGMP-Sensitivität (Trudeau und Zagotta, 2004). Der Zapfen CNG-Kanal wird ebenfalls durch ein Calcium-abhängiges Protein moduliert, dessen Identität im Mensch bislang jedoch noch nicht geklärt ist.

1.7 Die Achromatopsie

Bei der totalen Farbenblindheit (Achromatopsie, ACHM) sind die Zapfenphotorezeptoren durch den vollständigen Funktionsverlust (komplette Form) oder eine stark reduzierte Funktion (inkomplette Form) betroffen. Die Achromatopsie ist eine seltene, retinale Erkrankung mit einer Prävalenz von etwa 1:50 000 (Sharpe et al., 2001) und einem autosomal-rezessiven Erbgang. Im Falle der kompletten Form der Achromatopsie geht die Erkrankung mit einem fehlenden Farbunterscheidungsvermögen, einer Reduktion der Sehschärfe, einer erhöhten Blendempfindlichkeit und typischerweise einem Nystagmus einher (Kohl et al., 2000). Die Symptome sind kongenital und stationär. Untersuchungen mittels der optischen Kohärenztomographie (OCT), einer nicht-invasiven, bildgebenden Methode, belegen aber einen progressiven Verlust an Zapfenphotorezeptoren (Thiadens et al., 2010b; Thomas et al., 2011; Fahim et al., 2013; Aboshiha et al., 2014). Das Elektroretinogramm (ERG) zeigt in kompletten Achromaten keine Zapfenfunktion unter photopischen Bedingungen, bei inkompletten Achromaten kann eine Restfunktion gemessen werden. Dagegen ist die skotopische Lichtantwort der Stäbchen nicht bzw. nur minimal beeinträchtigt (Wang et al., 2012).

Bislang wurden sechs Gene mit der Achromatopsie assoziiert, welche etwa 75 % der Krankheitsfälle erklären. Die Mehrheit der Patienten weist Mutationen in *CNGA3* (OMIM 216900) und *CNGB3* (OMIM 262300) auf. Etwa 40 – 50 % der Betroffenen tragen Mutationen in *CNGB3* und bei 20 – 30 % der Patienten liegen Mutationen in *CNGA3* vor. In < 2 % der Fälle wurden Mutationen in *GNAT2* (OMIM 613856; Kohl et al., 2002; Aligianis et al., 2002), dem Gen für die α -Untereinheit des Zapfen Transducins, und *PDE6C* (OMIM 613093; Chang et al., 2009; Grau et al., 2011), welches für die α -Untereinheiten der Zapfen Phosphodiesterase kodiert, identifiziert. Bei weniger als 1 % der betroffenen Patienten liegen Mutationen im *PDE6H* Gen (OMIM 610024; Kohl et al., 2012), das für die inhibitorische γ -Untereinheit der Zapfen Phosphodiesterase kodiert, und im *ATF6* Gen (OMIM 605537; Kohl et al., 2015) kodierend für das *Activating transcription factor 6*, welches an dem zellulären ER-Stress Signalweg beteiligt ist, vor. Bislang wurden über 80 Mutationen in *CNGA3* identifiziert (Kohl et al., 1998; Wissinger et al., 2001; Tränkner et al., 2004; Johnson et al., 2004; Nishiguchi et al., 2005; Goto-Omoto et al., 2006; Wiszniewski et al., 2007; Koeppen et al., 2008; Reuter et al., 2008; Ahuja et al., 2008; Thiadens et al., 2010a; Azam et al., 2010; Koeppen et al., 2010; Vincent et al., 2011; Genead et al., 2011; Saqib et al., 2011; Wang et al., 2011; Fahim et al., 2013; Sundaram et al., 2014; Li et al., 2014; Shaikh et al., 2014). Am häufigsten treten *missense*-Mutationen auf, daneben sind einige wenige *nonsense*-Mutationen, sowie Insertionen und Deletionen vertreten. In *CNGB3* wurden über 50 Mutationen erfasst (Sundin et al., 2000; Kohl et al., 2000; Eksandh et al., 2002; Rojas et al., 2002; Peng et al., 2003; Johnson et al., 2004; Michaelides et al., 2004; Okada et al., 2004; Kellner et al., 2004; Nishiguchi et al., 2005; Kohl et al., 2005; Versányi et al., 2005; Wiszniewski et al., 2007; Thiadens et al., 2009; Azam et al., 2010; Thiadens et al., 2012; Huang et al., 2013; Corton et al., 2013; Sundaram et al., 2014; Greenberg et al., 2014), bei welchen es sich hauptsächlich um *nonsense*- und *frameshift*-Mutationen sowie Spleißdefekte handelt – nur wenige *missense*-Mutationen sind bekannt.

Analog zu der Situation bei Achromatopsie-Patienten konnten bisher verschiedene Tiermodelle mit Mutationen in den orthologen Genen für *CNGA3* und *CNGB3* generiert bzw. identifiziert werden – verschiedene Mausmodelle für *CNGA3* und *CNGB3* sowie ein Schafmodell für *CNGA3* und zwei Hundemodelle für *CNGB3* (Biel et al., 1999; Sidjanin et al., 2002; Michalakis et al., 2005; Ding et al., 2009; Pang et al., 2010; Reicher et al., 2010; Shamir et al., 2010; Pang et al., 2012;). Die *Cnga3-knockout* Maus und das natürlich entstandene

EINLEITUNG

Mausmodell *cpfl5* (*cone photoreceptor function loss 5*), welches eine *missense* Mutation in Exon 5 von *Cnga3* trägt, zeigen bereits im frühen Alter stark reduzierte ERG-Signale, welche mit einer Degeneration der Zapfenphotorezeptoren einhergehen (Michalakis et al., 2005; Pang et al., 2010). Dagegen weist das natürlich entstandene Schafmodell mit homozygoter Stopppmutation in *Cnga3* einen milderen Phänotyp mit einer mäßigen Reduktion der Zapfenfunktion im ERG und Tagblindheit (Hemeralopie) auf – eine Zapfendegeneration wurde im Alter von fünf Monaten nicht beobachtet (Reicher et al., 2010; Shamir et al., 2010). In der *Cngb3-knockout* Maus und den beiden natürlichen kaninen Modellen wurde eine reduzierte Zapfenfunktion erfasst – die Zapfenrestfunktion ist vermutlich auf die Bildung homomerer CNG-Kanäle zurückzuführen – und geht ebenfalls mit einer Degeneration der Zapfen einher (Sidjanin et al., 2002; Ding et al., 2009).

1.8 Funktionelle Untersuchungen mutanter CNG-Kanäle

Um zu klären, wie die bei Achromatopsie-Patienten identifizierten Mutationen in CNGA3 die CNG-Kanalfunktion beeinträchtigen, wurden zahlreiche Kanalmutanten funktionell untersucht (Tränkner et al., 2004; Faillace et al., 2004; Liu und Varnum et al., 2005; Patel et al., 2005; Nishiguchi et al., 2005; Muraki-Oda et al., 2007; Reuter et al., 2008; Koeppen et al., 2008; Matveev et al., 2010; Koeppen et al., 2010; Ding et al., 2010; Shaik et al., 2014). Die Analysen erfolgten an homo- und heteromeren CNG-Kanälen, welche heterolog in Zellkultur-systemen oder in *Xenopus Oozyten* exprimiert wurden. Dabei konnten verschiedenen Veränderungen beobachtet werden: (I) Änderungen in der apparenten Ligandensensitivität, (II) Änderungen in der Oberflächenexpression und (III) Änderungen in der Ionenselektivität oder Ionenleitfähigkeit. In vielen Fällen führte eine Mutation sogar zu einem vollständigen Funktionsverlust des Proteins. So wurde z.B. bei den Mutationen p.R377W und p.F488L des murinen *Cnga3* (entsprechen den Mutationen p.R436W und p.F547L des humanen CNGA3), welche im kodierten Protein im C-Linker und der cGMP-Bindestelle liegen, ein Fehlen der Konformationsänderung nach Binden des Liganden nachgewiesen, die ein Öffnen des Kanals nach Ligandenbindung verhindert (Matveev et al., 2010). Bei manchen Kanalmutanten konnte durch Ko-Expression der CNGB3-Untereinheit oder durch Herabsetzen der Kultivierungstemperatur bei heterologer Expression die Kanalfunktion teilweise wiederhergestellt werden (Liu und Varnum et al., 2005; Reuter et al., 2008; Koeppen et al., 2010).

Eine veränderte Ionenselektivität wurde bislang nur bei CNGA3_{G367V} gefunden, bei welcher ein Austausch des polaren Glycins gegen ein unpolares Valin im Selektivitätsfilter vorliegt (Koeppen et al., 2010). Häufiger wurde bei Kanalmutanten eine Reduktion oder Erhöhung der apparenten cGMP-Sensitivität beobachtet. Die ausgeprägtesten Veränderungen der cGMP-Sensitivität wurden bei den homomeren Kanälen CNGA3_{R427C}, CNGA3_{A469T} und CNGA3_{E590K} identifiziert, welche allesamt zu einer deutlichen Erhöhung der apparenten cGMP-Sensitivität führten (Koeppen et al., 2008; Reuter et al., 2008). Eine reduzierte Oberflächenexpression ist in der Regel mit einem *trafficking*-Defekt verbunden und kann durch Ko-Lokalisation des Kanalproteins mit einem Plasmamembranmarker in immunzytochemischen Färbungen erfasst werden.

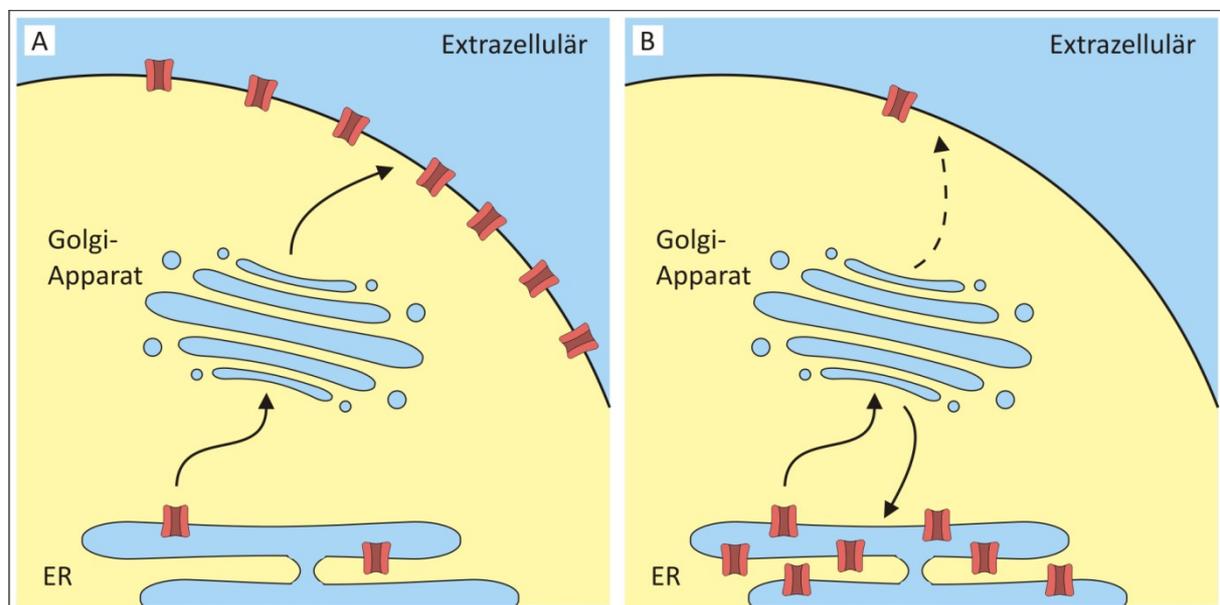


Abb. 4: Die Retention *trafficking*-defizienter CNG-Kanäle führt zu einer reduzierten Oberflächenexpression. (A) Die Expression des Wildtyp CNGA3-Kanals führt zu einer hohen Kanaldichte in der Plasmamembran. (B) Einige Mutationen in CNGA3 induzieren eine Fehlfaltung, welche von den Komponenten des Proteinqualitäts-Kontrollsystem erkannt wird, zur Retention des Kanals in intrazellulären Kompartimenten wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und somit zu einer reduzierten Oberflächenexpression führt.

Bei einem *trafficking*-Defekt wird das Protein im Zellinneren zurückgehalten, wodurch die Menge des Proteins, welches zur Plasmamembran transportiert wird, deutlich reduziert ist (Siehe Abb. 4). Bei manchen *trafficking*-defizienten Kanalmutanten wie beispielsweise der CNGA3_{T291R} und der CNGA3_{E590K} konnte durch Absenken der Kultivierungstemperatur in heterolog exprimierenden HEK293-Zellen eine Verbesserung der Oberflächenexpression erreicht werden (Reuter et al., 2008), allerdings trat dieser Temperatureffekt nicht bei jeder

EINLEITUNG

Kanalmutante auf, wie für CNGA3_{S341P} gezeigt wurde (Koeppen et al, 2010). Die Anzahl membranständiger CNGA3-Kanäle konnte bei CNGA3_{R427C} und CNGA3_{R563C} auch durch Behandlung mit 10 % Glycerol erhöht werden (Koeppen et al., 2008). Bisherige Untersuchungen an *trafficking*-defizienten Zapfen CNG-Kanälen weisen darauf hin, dass das ER eine entscheidende Rolle bei der Retention der mutanten Kanäle spielt (Faillace et al., 2004).

1.9 Das Proteinqualitäts-Kontrollsystem

Fehlgefaltete Proteine sind durch den Verlust der Proteinfunktion (*loss-of-function*), einem möglichen Funktionszugewinn (*gain-of-function*) und der Bildung von Proteinaggregaten problematisch für die Zelle. Deswegen wird während der Reifung eines jeden Proteins dessen Faltung über ein zelleigenes Protein-Qualitätskontrollsystem (PQK), welches aus den molekularen Chaperonen und dem Ubiquitin-Proteasom-System besteht, überwacht. Insbesondere die Hitzeschockproteine spielen eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase, indem sie aktiv an dem Faltungsprozess beteiligt sind, Proteinaggregate auflösen und unwiderruflich fehlgefaltene Proteine der ER-assoziierten Degradation zuführen (Schirmer et al., 1996; Fink, 1999; Lee und Tsai, 2005; Saibil, 2008; Nakatsukasa und Brodsky, 2008). Kommt es zur Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER, wird durch das Hsp70 Protein Bip ER-Stress ausgelöst – ein Signalweg, der der Zelle das Beseitigen der Proteinaggregate ermöglichen soll. Dass dieser Signalweg auch bei mutanten CNG-Kanälen angeschaltet wird, wurde für die CNGA3_{R563H} und CNGA3_{Q655X} in gezeigt (Duricka et al., 2012). Lang anhaltender ER-Stress kann über denselben Signalweg die Expression des Transkriptionsfaktors CHOP auslösen und das Eintreten apoptotischer Prozesse begünstigen (Sano und Reed, 2013).

1.10 Ansätze zur Reduzierung des *trafficking*-Defekts

Die Identifizierung von Faltungs- und/oder Transport-Defekten mutanter Proteine sowie deren Behandlung rückt mehr und mehr in den Fokus der Forschung (Naik et al., 2012; Aymami et al., 2013; Leidenheimer und Ryder, 2014; Wang et al., 2014). Mittlerweile wurde für einige Erkrankungen ein Mutations-induzierter *trafficking*-Defekt als Pathomechanismus

Tab. 1: Übersicht über ausgewählte Proteine bei denen Mutations-bedingte Faltungs- und/oder Transportdefekte nachgewiesen wurden sowie deren assoziierte Erkrankungen.

trafficking-defiziente Proteine	Erkrankungen (#OMIM)	Referenzen
Ionenkanäle		
Alpha-Untereinheit des Zapfen CNG-Kanals (CNGA3)	Achromatopsie (OMIM 216900)	Reuter et al., 2008; Koeppen et al., 2010; Duricka et al., 2012
<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i> (CFTR)	Zystische Fibrose (OMIM 219700)	Denning et al., 1992; Sato et al., 1996; Skach, 2000
<i>Human Ether-a-go-go-Related Gene</i> -(hERG)-Kanal	Long-QT-Syndrom (OMIM 613688)	Zhou et al., 1998; Furutani et al., 1999; Ficker et al., 2000
G-Protein gekoppelte Rezeptoren		
Rhodopsin	Retinitis Pigmentosa (OMIM 613731)	Saliba et al., 2002; Illing et al., 2002; Noorwez et al., 2003
Frizzled-4	Exsudative Vitreoretinopathie (OMIM 133780)	Robitaille et al., 2002; Milhem et al., 2014
Melanocortin-4-Rezeptor	Adipositas (OMIM 155541)	Yeo et al., 2003; Tan et al., 2009; Wang et al., 2014
Enzyme		
Glucoocerebrosidase	Gaucher-Syndrom (OMIM 606463)	Sawkar et al., 2002; Schmitz et al., 2005; Sawkar et al., 2005
Alpha-Galactosidase A	Fabry-Syndrom (OMIM 300644)	Yam et al., 2005; Yam et al., 2006; Lieberman et al., 2009
Intrazelluläre Rezeptoren		
Peroxisomaler Biogenesefaktor 1 (PEX1)	Zellweger-Syndrom (OMIM 602136)	Berendse et al., 2013
Transportproteine		
Niemann-Pick C1 Protein	Niemann-Pick-Syndrom (OMIM 257220)	Gelsthorpe et al., 2008; Yu et al., 2012
<i>ATP-binding cassette sub-family C member 6</i> (ABCC6)- Transporter	Grönblad-Strandberg-Syndrom (OMIM 264800)	Le Saux et al., 2011; Pomozi et al., 2014
Extrazelluläre Matrixproteine		
Laminin β 2	Pierson-Syndrom (OMIM 150325)	Chen et al., 2013
Amelogenin	Amelogenesis Imperfecta (OMIM 300391)	Brookes et al., 2013
Zellwand-stabilisierende Proteine		
Alpha-Sarkoglykan	Gliedergürteldystrophie (OMIM600119)	Bartoli et al., 2008; Soheili et al., 2012

EINLEITUNG

identifiziert (Tab. 1; Sato et al., 1996; Tamarappoo und Verkman, 1998; Burrows et al., 2000; Ficker et al., 2000; Sawkar et al., 2002; Noorweez et al., 2003; Ueda et al., 2004; Gelsthorpe et al., 2008; Lee et al., 2010; Majtan et al., 2010; Valenzano et al., 2011; Thompson et al., 2012; Siekierska et al., 2012; Porto et al., 2012; Mesa-Torres et al., 2013; Chen et al., 2013; Orhan et al., 2013; LaConte et al., 2014; Murray et al., 2014; Milhem et al., 2014; Chen et al., 2014; Pomozi et al., 2014; Brookes et al., 2014; Wang et al., 2014; Pey et al., 2014). Ein Beispiel für eine weitere retinale Erkrankung mit *trafficking*-Defekt ist die Retinitis Pigmentosa, welche unter anderem durch mutantes Rhodopsin mit der Mutation p.P23H verursacht wird. Die Expression des mutanten Rhodopsins führte zur Retention im ER, wodurch das mutante Rhodopsin nur noch eingeschränkt an seinen Bestimmungsort – dem Stäbchenaußensegment – gelangte (Krebs et al., 2010).

Erste Ansätze zur Erhöhung der Oberflächenexpression *trafficking*-defizienter Proteine in heterologen Expressionssystemen lieferten Untersuchungen an CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) und dem hERG-Kanal (*human Ether-a-go-go related gene*). Durch Absenken der Kultivierungstemperatur konnte sowohl bei CFTR_{F508del}-Kanälen als auch bei hERG_{N470D}-Kanälen eine höhere Oberflächenexpression erzielt werden (Denning et al., 1992; Fleischhauer et al., 1998; Zhou et al., 1999). Der zu Grunde liegende Mechanismus ist unklar: durch die niedrigere Temperatur wird entweder die Proteinfaltung effizienter oder mehr fehlgefaltetes Protein entkommt aus dem ER und/oder dem Golgi-Apparat. Dieser Temperatureffekt führte auch bei mutanten homomeren und heteromeren CNG-Kanälen zu einer Verbesserung der Proteinfaltung und/oder des Transports (Siehe Kapitel 1.8). Für therapeutische Zwecke – z.B. als Therapie für Achromatopsie – lässt sich diese Strategie allerdings nicht einsetzen.

Eine weitere Strategie ist die Interaktion des mutanten Proteins mit molekularen Chaperonen zu reduzieren. Die Interaktion des molekularen Chaperons Hsp70 mit dem mutanten CFTR_{F508del} wird beispielsweise durch Deoxyspergulin vermindert und resultiert in einer verbesserten Oberflächenexpression (Jiang et al., 1998). Analog dazu kann durch Inhibieren der Mannosidase I mit Kifunensin eine höhere Oberflächenexpression von mutantern α -Sarkoglykan erzielt werden (Soheili et al., 2012). Da aber molekulare Chaperone eine wichtige Funktion in der Proteinhomöostase der Zelle einnehmen, ist es fraglich, ob Substanzen, welche die molekularen Chaperone inhibieren oder um deren Bindestellen

konkurrieren, therapeutisch genutzt werden können. Ebenso sind Substanzen, die den proteasomalen Abbau inhibieren, nur bedingt therapeutisch einsetzbar.

Die Proteinfaltung kann auch durch chemische Chaperone – niedermolekulare Substanzen, welche meist osmolytisch aktiv sind – unterstützt werden. Viele der chemischen Chaperone gehören zu den Aminosäuren, Kohlenhydraten oder Methylaminen. In ihrer Eigenschaft als Osmolyte sind sie in der Lage, die Eigenschaften des umgebenen Lösungsmittels so zu verändern, dass der fehlgefaltete Zustand des Proteins energetisch ungünstiger ist (Yancey, 2001; Leandro und Gomes, 2008). Chemische Chaperone können allerdings auch über andere Mechanismen die Oberflächenexpression *trafficking*-defizienter Proteine erhöhen: (I) sie können die Expression von Hitzeschockproteinen fördern. Dadurch läuft der Faltungsprozess mit höherer Effizienz ab und mehr mutantes Protein wird zum Zielort transportiert (Diamant et al., 2001); (II) chemische Chaperone können generell die Genexpression erhöhen, wodurch proportional auch die Menge an korrekt gefaltetem Protein steigt (Arakawa et al., 2006). Die Wirkung chemischer Chaperone bei retinalen Erkrankungen wurde bereits erfolgreich in zwei Tiermodellen gezeigt. In einem Rattenmodell für Retinitis Pigmentosa, bei dem Rh_{OP23H} die Fehlfaltung und Retention des Rhodopsins verursacht, führte eine intraperitoneale Injektion von TUDCA (Tauroursodeoxycholsäure) zu einer Reduktion apoptotischer Zellen und zur Erhaltung der synaptischen Kontakte in der Retina (Fernández-Sánchez et al., 2011). Eine Reduzierung des ER-Stress und einen neuroprotektiven Effekt von TUDCA konnte in einem Mausmodell für Lebersche kongenitale Amaurose gezeigt werden (Zhang et al., 2012; Fu und Zhang, 2014). Da chemische Chaperone unspezifisch sind und häufig in hohen Konzentrationen eingesetzt werden müssen, ist ihr therapeutischer Nutzen allerdings limitiert.

Eine höhere Spezifität lässt sich mit pharmakologischen Chaperonen erreichen, bei denen es sich um Agonisten oder Antagonisten des Zielproteins handelt. Pharmakologische Chaperone entfalten ihren Effekt durch direkte Interaktion mit dem mutanten Protein, so dass durch sterischen Kräfte oder polare bzw. unpolare Interaktionen die Fehlfaltung zumindest partiell korrigiert und das *trafficking* verbessert werden kann. Pharmakologische Chaperone sollen nur eine schwache Bindung mit dem fehlgefalteten Protein eingehen, da sich so die Faltung und der Transport des Proteins wiederherstellen lassen ohne wesentlich die Funktion des Proteins zu beeinflussen. Bei pharmakologischen Chaperonen unterscheidet man zwischen

EINLEITUNG

Korrektoren, welche den Transport des mutanten Proteins wiederherstellen können, und den Potentioren, welche die Aktivität des mutanten Proteins verstärken (Carlile et al., 2007). Damit letztere wirken können, müssen sich jedoch bereits einige Proteine an dem Zielort befinden.

In verschiedenen Studien wurde bereits die Effektivität pharmakologischer Chaperone unter Beweis gestellt. Allerdings ist der Weg bis zur Identifizierung eines für therapeutische Zwecke geeigneten pharmakologischen Chaperons langwierig. Bei mutantern Rhodopsin wurden hierzu diverse Derivate des Chromophors 11-*cis*-Retinal getestet (Noorwez et al., 2003; Noorwez et al., 2004; Krebs et al., 2010). Mithilfe eines *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)-Assay, der die Quantifizierung von heterolog exprimiertem, membranständigem Rhodopsin ermöglichte, konnten Retinobenzaldehyde als wirksam identifiziert werden, welche chemisch stabiler als die bislang getesteten Retinale sind (Ohgane et al., 2010). Besonders weit fortgeschritten sind die Untersuchungen an dem mutanten CFTR. Mehrere hunderttausend Substanzen wurden mittels Iodid-Flux-Assays, einer immunzytochemischen oder auf Halid-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffen basierende Nachweismethode von Kanalproteinen mit extrazellulärem Tag untersucht (Loo et al., 2008; Yang et al., 2003; Carlile et al., 2007; Robert et al., 2008; Van Goor et al., 2008). Dabei wurden Korrektoren und Potentioren identifiziert, die nanomolaren Affinitäten aufweisen und zum Teil bereits auf dem Markt als Medikament erhältlich sind (Van Goor et al., 2011; Ramsey et al., 2011; Ren et al., 2013). In klinischen Studienphasen befinden sich ebenfalls Wirkstoffe für Diabetes (Bernier et al., 2006; Narayen und Mandal, 2012), lysosomale Speichererkrankungen (Parenti, 2009; Valenzano et al., 2011) und ein bislang als Mukolytikum eingesetztes Präparat für die Behandlung des Gaucher-Syndroms (Zimran et al., 2013)

Auch für Zapfen CNG-Kanäle, die, bedingt durch Mutationen in CNGA3, einen *trafficking*-Defekt aufweisen, gibt es eine erste Studie, die der Identifikation chemischer und pharmakologischer Chaperone dient. Hierzu wurden die *trafficking*-defiziente Kanäle CNGA3_{R563H}, welche einen Aminosäureaustausch in der CNBD besitzt, oder CNGA3_{Q655X}, welche in der CLZ Struktur liegt, heterolog exprimiert und die Effektivität verschiedener Testsubstanzen in Western Blot-Experimenten und immunzytochemischen Untersuchungen analysiert (Duricka et al., 2012). Für 8-(4-chlorophenylthio)-cGMP – einem Analog des

Liganden cGMP – konnte eine Erhöhung der Oberflächenexpression für CNGA3_{R563H}- aber nicht für CNGA3_{Q655X}-Kanäle gezeigt werden. Das chemische Chaperon TUDCA konnte die Oberflächenexpression beider Kanalmutanten verbessern (Duricka et al., 2012).

Neben den klassischen niedermolekularen Wirkstoffen könnte auch eine Gensatztherapie zur Behandlung von Patienten, welche *trafficking*-defiziente Proteine exprimieren, zum Zuge kommen. Die Gensatztherapie weist ein großes Potential auf, in erster Linie seltene, monogenetische Erkrankungen zu therapieren, allerdings sind die Langzeitfolgen einer Gensatztherapie noch immer nicht abschätzbar. Insbesondere ist nicht klar, welchen Einfluss die viralen Bestandteile der für den Gentransfer benötigten Vektoren bergen. Daneben kann bei Komplikation die Expression des Transgens nicht ohne weiteres abgeschaltet werden. Außerdem wird bei der Gensatztherapie das defekte Gen nicht ersetzt, sondern eine zusätzliche Wildtyp-Kopie des Gens exprimiert, sodass das mutante Protein weiter exprimiert und zellulären Stress verursachen kann. Da man bislang aber nur mit niedermolekularen Wirkstoffen die Wiederherstellung der Funktion eines mutanten Proteins erreichen kann, werden diese auch in der nahen Zukunft eine bedeutende Rolle einnehmen.

2. Wissenschaftliche Zielsetzung

Ziel der hier durchgeführten Untersuchung war die Identifikation von Substanzen (chemische und pharmakologische Chaperone), welche die Oberflächenexpression *trafficking*-defizienter CNGA3-Kanäle verbessern können. Hierzu wurde im ersten Schritt ein Bioassay entwickelt, das im zweiten Schritt durchgeführte Substanzscreening in einem mittleren Durchsatz ermöglichen sollte.

1. Etablierung eines Bioassays zur Detektion der Oberflächenexpression von CNGA3-Kanälen.

Es sollte ein Bioassay etabliert werden, mit welchem die Oberflächenexpression von homomeren Zapfen CNG-Kanälen im heterologen Expressionssystem evaluiert werden kann. Die Kanaldichte in der Plasmamembran sollte in einem Lumineszenz-basierten Assay indirekt über den Einstrom von Calciumionen in die Zelle detektiert werden. Dazu sollte der genetisch kodierte Calciumsensor Aequorin genutzt werden.

2. Identifikation von chemischen und pharmakologischen Chaperonen zur Behandlung *trafficking*-defizienter CNGA3-Kanäle.

Mutationen in CNGA3 führen häufig zu einem Faltungs- und/oder Transportdefekt, welcher zu einer reduzierten Oberflächenexpression führt. Unter Verwendung des in dem ersten Projektabschnitt etablierten Bioassays sollten chemische und pharmakologische Chaperone identifiziert werden, welche die Oberflächenexpression *trafficking*-defizienter CNGA3_{E228K}-Kanäle erhöhen. Im Rahmen dieses Screenings sollten 50 – 100 Testsubstanzen in mehreren Konzentrationen getestet werden. Die Effektivität der hierbei identifizierten aktivsten Substanzen sollte an weiteren mutanten *trafficking*-defizienten CNGA3-Kanälen evaluiert werden. Zudem wurde die Oberflächenexpression-verbessernde Wirkung der aktivsten Substanzen durch Western Blot-Experimente an biotinylierten plasmamembranständigen CNG-Kanälen verifiziert. Durch Anwendung eines Zellviabilitätsassays sollte die Toxizität der aktivsten Testsubstanzen und mittels eines modifizierten Bioassayprotokolls und Western Blot-Untersuchungen unerwünschte Nebeneffekte auf die Kanalfunktion und die Expression des Reporters bzw. des mutanten Kanalproteins analysiert werden.

3. Material

3.1 Geräte

3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
CO ₂ -Inkubator CB210	Binder GmbH, Tuttlingen
CPA Analysewaage CPA225D	Sartorius, Göttingen
Dunkelkammerleuchte Dukalux x-tronik	Kindermann, Eibelstadt
Feinwaage PJ400	Mettler Toledo, Gießen
Filmentwicklungsmaschine Curix 60	AGFA Health Care GmbH, Rottenburg
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager Z1 mit Apotome-Einschub	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Gene Pulser mit Pulse Controller	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heraeus Biofuge 13	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Heraeus Multifuge 1 L-R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Imaging-Kamera AxioCam MRm	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Inkubationsschüttler Minitron	Infors HAT, Bottmingen, CH
Labornetzgerät EV202	Consort, Turnhout, B
Labornetzgerät EV231	Consort, Turnhout, B
Magnetrührer mit Heizung RCT basic	IKA-Werke GmbH, Staufen
Membranpumpe LVS 300	ILMVAC GmbH, Ilmenau
Metallblockthermostat	Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG, Bielefeld
Mikroskop Wilovert A	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
Mini-PROTEAN® 3 Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Mini-Zentrifuge C-1202	Labnet International Inc., Woodbridge, NJ, USA
Nalgene™ Dewargefäß 1 L	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Nalgene™ Cryo 1°C Freezing-Container	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Orion Mikroplatten Luminometer mit Injektoreinheit	Berthold Detection Systems, Pforzheim
pH-Meter Seven Multi™ Ion S80-KS	Mettler Toledo, Gießen
Pipettierhelfer	VWR, Wien, A

MATERIAL

Rotator R052, 4 rpm	TAAB Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston, UK
Schüttelwasserbad 1086	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Scotsman MF36 Ice Flaker und SB393 Storage Bin	Hubbard Systems, Ipswich, UK
Sicherheitsbrenner GASI	Schütt-Biotec GmbH, Göttingen
SpeedVac Kältefalle KF-2-60	Bachofer GmbH, Reutlingen
Sterilwerkbank BDK-S 1500	Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen
Sterilwerkbank Jouan MSC 12 Class II A2	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Stuart Roller Mixer SRT9	Bibby Scientific, Staffordshire, UK
Ultraspec 2000 Spectrophotometer	Pharmacia Biosystems, Freiburg
Ultrazentrifuge Optima™ TLX	Beckman Coulter, Krefeld
Umwälzthermostat F30	Julabo GmbH, Seelbach
UV-Transilluminator	Bachofer GmbH, Reutlingen
Vaccum Concentrator	Bachofer GmbH, Reutlingen
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, CH
Wasseraufbereitungssystem Biocel A10	Merck Millipore, Darmstadt
Wide Mini Sub Cell für Gelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Wipptisch Rocky-1000	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau

3.2 Chemikalien

1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (DABCO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
1,4-Dithiothreit (DTT)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
8-Bromo-cGMP	BIOLOG Life Science Institute, Bremen
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt
Agar <i>bacteriological grade</i>	MP Biomedicals Inc, Illkirch, F
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aphotericin B (100 x)	Biochrom GmbH, Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

<i>Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i> (Bradford Messlösung)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
<i>Blocking-grade Blocker</i> (BGB)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Borsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck KGaA, Darmstadt
dNTP-Mix (je 5 mM dATP, dTTP, dGTP und dCTP in 5 mM Tris, pH 7,0)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM) mit Natriumpyruvat, L-Glutamin und 4,5 g/l Glukose	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
<i>Dulbecco's Phosphat-gepufferte Saline</i> (DPBS)	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol (100 %)	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Glucose Monohydrat, D (+)	Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropanol	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Seelze
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
LB-Agar (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
LB-Medium (Luria/Miller)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Lipofectamine 2000	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
<i>Low Electroendosmosis-Agarose</i>	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf

MATERIAL

Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Merck KGaA, Darmstadt
Methanol	VWR, Wien, A
Mitotracker Orange CMTMRos	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Mowiol®	Clariant GmbH, Frankfurt
Natrium-Butyrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Nonidet® P40 (NP-40)	Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
OPTIMEM	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Penicillin/Streptomycin (100 x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Phenolrot	AppliChem GmbH, Darmstadt
Phenol/Chlorophorm (70 %), Wassergesättigt	Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Pierce® ECL Western Blotting Substrat	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Pluronic® F-127 (20% in DMSO)	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Protease Inhibitor Cocktail Set III	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ponceau-S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure (32 %)	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Super Optimal Broth (SOB)</i> -Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris Base	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trizma® Hydrochloride	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Triton X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trypsin-EDTA (1x)	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
Trypton	AppliChem GmbH, Darmstadt

Tween® 20

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

Xylencyanol FF

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

3.3 Lösungen und Puffer

Für den Bioassay

Calcium-Imaging (CI) Lösung

2 mM Calciumchlorid Dihydrat
2 mM Magnesiumchlorid Hexahydrat
5 mM Kaliumchlorid
150 mM Natriumchlorid
10 mM HEPES
30 mM Glucose
pH 7,4

Extrazellulärpuffer (ECB)

1 mM Magnesiumchlorid Hexahydrat
1 mM Calciumchlorid Dihydrat
20 mM Kaliumchlorid
140 mM Natriumchlorid
20 mM HEPES
5 mM Glucose
0,1 mg/ml bovines Serumalbumin
pH 7,4

Modifizierte Krebs-Ringer Puffer (KRP)

1 mM Calciumchlorid Dihydrat
1,2 mM Kaliumdihydrogenphosphat
1,2 mM Magnesiumsulfat Heptahydrat
5 mM Kaliumchlorid
125 mM Natriumchlorid
25 mM HEPES
6 mM Glucose
pH 7,4

Badlösung

2 mM Magnesiumchlorid Hexahydrat
5 mM Kaliumchlorid
10 mM Calciumchlorid Dihydrat
150 mM Natriumchlorid
10 mM HEPES
30 mM Glucose
pH 7,4

Waschlösung

0,02 mM Phenolrot in CI Lösung

8-Br-cGMP Stocklösung

100 mM in CI Lösung

Coelenterazin Stocklösung

0,8 mM Coelenterazin in Ethanol (100 %)

Coelenterazin Lösung

1 % (v/v) Coelenterazin Stocklösung in CI Lösung

MATERIAL

Für die Immunzytochemie

Phosphat-gepufferte Saline (1 x PBS)	3 mM Natriumdihydrogenphosphat 7 mM Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat 130 mM Natriumchlorid
4 % Paraformaldehydlösung (PFA)	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS 10 mM Natriumhydroxyd pH 7,4
Lösung C	10 % (v/v) Fötale Kälberserum in 1 x PBS
Lösung CT	0,1 % (v/v) Triton X-100 in Lösung C
Mitotracker Stocklösung	1 mM Mitotracker Orange CMTMRos in DMSO
Mitotracker Färbelösung	0,025 % (v/v) Mitotracker Stocklösung in Kulturmedium 0,02 % (v/v) Pluronic® F-127

Für die Mikrobiologie

LB-Medium	2,5 % (w/v) LB-Medium (Luria/Miller)
LB-Agar	4 % (w/v) LB-Agar (Luria/Miller)
<i>Low-salt</i> LB-Medium	1 % (w/v) Trypton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 85 mM NaCl
<i>Low-salt</i> LB-Agar	1,5 % (w/v) Agar in <i>low-salt</i> LB-Medium
<i>Super Optimal broth with Catabolite Repression</i> (SOC)-Medium	2,664 % (w/v) SOB-Medium 20 mM Glucose pH 7,0
Ampicilin Stocklösung	100 mg/ml in H ₂ O, steril filtriert

Für die Molekularbiologie

Tris-EDTA Puffer (TE)	10 mM Trizma® Hydrochloride 1 mM EDTA pH 7,5
¼ TE	2,5 mM Trizma® Hydrochloride 0,25 mM EDTA pH 8,0
AmpliTaQ II (AT II) Puffer	100 mM Trizma® Hydrochloride 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 0,01 % (w/v) Gelatine

Ethidiumbromid Stocklösung	100 µg/ml in TE
Ladepuffer (10 x)	20 % (w/v) Ficoll 400 100 mM EDTA 0,2 % (w/v) Bromphenolblau 0,2 % (w/v) Xylencyanol FF
Ladepuffer (1x)	3 ml Ladepuffer (10 x) 29 ml 50 % Glycerol
DNA-Marker	20 µg DNA-Konzentrat 120 µl Ladepuffer (10 x) 860 µl TE
Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer	40 mM Tris Base 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,0
Tris-Borat-EDTA (TBE) Puffer	89 mM Tris Base 89 mM Borsäure 2,5 mM EDTA pH 8,0

Für die Zellbiologie

Natrium-Butyrat Stocklösung	0,5 M Natrium-Butyrat in H ₂ O
Transfektionsmedium	10 % (v/v) Fötale Kälberserum in DMEM
Kulturmedium	10 % (v/v) Fötale Kälberserum in DMEM 1 % (v/v) Penicillin/Streptomycin (100 x) 1 % (v/v) Amphotericin B (100 x)
Einfriermedium 1	30 % (v/v) Fötale Kälberserum in Kulturmedium
Einfriermedium 2	20 % (v/v) DMSO in DMEM (mit Natriumpyruvat, L-Glutamin und 4,5 g/l Glukose)

Für die SDS-PAGE und den Western Blot

Laemmli Puffer (5 x)	300 mM Trizma [®] Hydrochloride 50 % (v/v) Glycerol 25 % (v/v) 2-Mercaptoethanol 10 % (w/v) SDS 0,05 % (w/v) Bromphenolblau
Lysepuffer	10 mM HEPES 1 mM EDTA 1 mM DTT pH 7,4

MATERIAL

Resuspensionspuffer	1 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail Set III in Lysepuffer
Trenngelpuffer	1,5 M Tris Base pH 8,8
Sammelgelpuffer	1,5 M Tris Base pH 6,8
Ammoniumperoxodisulfat (10 %)	10 % (w/v) APS in H ₂ O
SDS-Laufpuffer (10 x)	2 M Glycin 250 mM Tris Base 1 % (w/v) SDS
SDS-Laufpuffer (1 x)	10 % (v/v) SDS-Laufpuffer (10 x) in H ₂ O
Towbin-Puffer	25 mM Tris Base 192 mM Glycin 0,05 % (w/v) SDS 20 % (v/v) Methanol
TBS (1 x)	7,7 mM Trizma [®] Hydrochloride 150 mM Natriumchlorid
TBST (1 x)	0,1 % (v/v) Tween [®] 20 in 1 x TBS
5 % BGB Lösung	5 % (w/v) BGB in 1 x TBST
1 % BGB Lösung	1 % (w/v) BGB in 1 x TBST
Modifizierter Lysepuffer	100 mM NaCl 10 mM HEPES 1 mM EDTA 1 % (v/v) NP-40 1 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail Set III pH 7,4
Biotinylierungsreagenz	0,1 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin in eiskaltem DPBS
<i>Quenching</i> Lösung	1 M Tris Base in DPBS pH 8,0
Waschpuffer 1	25 mM Tris Base 1 % (v/v) NP-40 0,1 % (w/v) SDS 1 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail Set III pH 7,4
Waschpuffer 2	25 mM Tris Base 0,5 M NaCl 1 % (v/v) NP-40 1 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail Set III pH 7,4

Elutionspuffer 20 % (v/v) Laemmli Puffer (5 x) ohne Bromphenolblau
5 mM DTT
1 % (v/v) Protease Inhibitor Cocktail Set III

Stripping-Puffer 62,5 mM Trizma® Hydrochloride
100 mM 2-Mercaptoethanol
2 % (w/v) SDS
pH 6,7

3.4 Enzyme

ExoSAP-IT Affymetrix, High Wycombe, UK
HindIII Restriktionsenzym (20 U/μl) New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
NsiI Restriktionsenzym (10 U/μl) New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Taq-DNA Polymerase (5 U/μl) ATG Biosynthetics, Merzhausen
T4-DNA Polymerase I (5 U/μl) Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
T4-DNA Ligase (400 U/μl) New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Mai

3.5 Antikörper

Tab. 2: Verwendete Antikörper

Antikörper	Herkunft	Antigen
Primärantikörper		
Maus anti-beta-Aktin	Millipore, Merck KGaA, Darmstadt	beta-Aktin
Kaninchen anti-AIF	Epitomics, Abcam PLC, Cambridge, UK	<i>Apoptosis-inducing factor</i> (AIF), polyklonal
Maus anti-c-Myc	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach	c-Myc-Tag, monoklonal
Kaninchen anti-CNGA3 SA3899	Eigenbau, Prof. Wissinger	CNGA3-Untereinheit des Zapfen CNG-Kanals
Sekundärantikörper		
Ziege anti-Kaninchen Alexa 660-gekoppelt	Molecular Probes, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA	IgG-Antikörper aus Kaninchen
Ziege anti-Maus Alexa488-gekoppelt	Molecular Probes, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA	IgG ₁ -Antikörper aus Maus
Ziege anti-Maus <i>horseradish peroxidase</i> (HRP)-gekoppelt	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt	IgG-Antikörper aus Maus
Esel anti-Kaninchen HRP-gekoppelt	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg	IgG-Antikörper aus Kaninchen

MATERIAL

3.6 Primer

Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics bezogen und in ¼ TE gelöst.

Tab. 3: Verwendete Primer

Primerbezeichnung	Sequenz
Aeq-GenREV01	5`-CACCAAAATCAACGGGACTT-3`
CMV-PromFOR01	5`-GCGTACTTTTCCAGCTCGT-3`

3.7 Bakterienstämme

E.coli DH5 α (Genotyp: *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)*U169 phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)*M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*), New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main

E.coli JM109 (Genotyp: *endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1, supE44, \Delta*(*lac-proAB*), [*F'* *traD36, proAB, laqI*^q Δ M15]), Herkunft: Dr. Joachim Messing (Yanisch-Perron et al., 1985), Präparation: Prof. Bernd Wissinger

3.8 Plasmide

Tab. 4: Verwendete Plasmide

Plasmid	Kodierend für	Resistenzgen	Herkunft
pCAEQ	mitochondriales Apoaequorin	Zeocin	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA
K1-Vektor	humanes Wildtyp CNGA3	Ampicilin/Zeocin	Dr. Susanne Kohl
CNGB3 _{WT} -Vektor	humanes Wildtyp CNGB3	Ampicilin/Zeocin	Prof. Bernd Wissinger
CNGA3 _{E228K} -Vektor	humanes CNGA3 mit der Mutation p.E228K	Ampicilin/Zeocin	Dr. Peggy Reuter
Ma1-Vektor	humanes CNGA3 mit der Mutation p.R283Q	Ampicilin/Zeocin	Dr. Susanne Kohl
CNGA3 _{T291R} -Vektor	humanes CNGA3 mit der Mutation p.T291R	Ampicilin/Zeocin	Dr. Peggy Reuter
CNGA3 _{S341P} -Vektor	humanes CNGA3 mit der Mutation p.S341P	Ampicilin/Zeocin	Dr. Katja Köppen
CNGA3 _{E376K} -Vektor	humanes CNGA3 mit der Mutation p.E376K	Ampicilin/Zeocin	Dr. Katja Köppen
CNGA3 _{R427C} -Vektor	humanes CNGA3 mit der Mutation p.R427C	Ampicilin/Zeocin	Dr. Katja Köppen
CNGA3 _{R563C} -Vektor	humanes CNGA3 mit der Mutation p.R563C	Ampicilin/Zeocin	Dr. Katja Köppen

3.9 Zelllinien

HEK293-Zellen (*human embryonic kidney cells*), erhalten von Ingo Weyand am Institut für Biologische Informationsverarbeitung, Jülich

3.10 Längenstandards

DNA-Marker:

Lambda DNA/ <i>HindIII</i> Marker	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main
Lambda DNA/ <i>EcoRI</i> + <i>HindIII</i> Marker	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
pcDNA3.1 Zeo/ <i>TaqI</i> (=KEB-Marker)	Eigenherstellung, etabliert von Dr. Katja Köppen, Molekulargenetisches Labor, Tübingen

Protein-Größenstandard:

<i>Novex Sharp Pre-stained Protein-standard</i>	Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
---	--

3.11 Kits

<i>BigDye[®] Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
<i>CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay</i>	PROMEGA GmbH, Mannheim
<i>GenElute[™] HP Plasmid Midiprep Kit</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>peqGOLD Plasmid Miniprep Kit</i>	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Qiagen GmbH, Hilden

3.12 Verbrauchsmaterialien

Plastikmaterialien wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Gefäße zur Kultivierung von eukaryotischen Zelllinien wurden von wechselnden Anbietern bezogen.

MATERIAL

3.13 Software

E.A.S.Y Win32 A+B N5	Herolab GmbH, Wiesloch
Sequencing Analysis 5.2	Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA
DNASTAR® Lasergene Package (<i>EditSeq</i> und <i>SeqMan</i>)	DNASTAR Inc, Madison, WI, USA
Axiovision 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
GraphPad Prism 4.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
MYSTAT 12	Systat Software Inc., London, UK
ImageJ 1.48	Entwickler: Wayne Rasband, National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA
Simplicity 2	Berthold Detection Systems, Pforzheim
ChemSketch 12.01	Advanced Chemistry Development (ACD/Labs), Frankfurt
CorelDRAW Graphics Suite X3	Corel GmbH, München
Endnote X7	Thomson Reuters, Philadelphia, PA, USA
Office 2007 (Word, Powerpoint, Excel)	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

3.14 Testsubstanzen

Tab. 5: Eingesetzte chemische Chaperone

Produktname	Hersteller	Verwendetes Lösemittel	Konzentration der Stocklösung
6-Aminohexansäure (6-AHA)	Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	H ₂ Odd/ Kulturmedium	2,5 M
Betain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	H ₂ Odd	1 M
Glutamin, L (-)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Kulturmedium	100 mM
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Kulturmedium	2,5 M
Mannitol, D (-)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Kulturmedium	0,67 M
Myo-Inositol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	Kulturmedium	0,5 M
Sorbitol, D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	H ₂ Odd/ Kulturmedium	2,5 M
Trehalose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	H ₂ Odd/ Kulturmedium	1,33 M
Trimethylaminoxid (TMAO)	Fluka, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim	H ₂ Odd/ Kulturmedium	2,5 M
TUDCA	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt	H ₂ Odd/ Kulturmedium	100 mM

Tab. 6: Eingesetzte Ionenkanalantagonisten

Produktname	Hersteller	Verwendetes Lösemittel	Konzentration der Stocklösung
22184	Molmall Sarl, Lonay, CH	DMSO	50 mM
2',4'-Dichlorbenzamil • HCl	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach	DMSO	100 mM
4-Aminopyridin	Ascent Scientific Ltd, Bristol, UK	DMSO	100 mM
Amilorid • HCl	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	100 mM
Amiodaron • HCl	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	Methanol	100 mM
Amlodipin	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	100 mM
Astemizol	Tocris Bioscience, Bristol, UK	DMSO	100 mM
Azelnidipin	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	100 mM
Benidipin • HCl	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	100 mM
Bepidil • HCl	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	100 mM
Benzamil Hydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	DMSO	100 mM
Bupivacain • HCl	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	100 mM
BTB14326	Maybridge, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	DMSO	100 mM
Caroverin • HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	DMSO	100 mM
Cilnidipin	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	100 mM
Cinnarizin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	DMSO	10 mM
Cisaprid	Ascent Scientific Ltd, Bristol, UK	DMSO	100 mM
Clonidin • HCl	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	100 mM
Dandrolen	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	10 mM
Dequaliniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	DMSO	5 mM
Dofetilid	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	100 mM
E-4031 • 2HCl	Ascent Scientific Ltd, Bristol, UK	H ₂ O	100 mM
Efonidipin • HCl Monoethanolat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	DMSO	50 mM
Felodpin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	DMSO	50 mM
Flunarizin • 2HCl	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	100 mM
FPL64176	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach	DMSO	100 mM
Fluspirilen	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	100 mM
Glibenclamid	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	100 mM
Glipizid	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	100 mM
Ibutilid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	H ₂ O	100 mM
Isradipin	Ascent Scientific Ltd, Bristol, UK	DMSO	100 mM
Ivabradin	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	100 mM
JFD03311	Maybridge, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	DMSO	100 mM
L-cis-Diltiazem	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach	H ₂ O	10 mM
LOE 908 • HCl	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	100 mM
Loperamid • HCl	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach	DMSO	100 mM

MATERIAL

Fortsetzung Tab. 5

Produktname	Hersteller	Verwendetes Lösemittel	Konzentration der Stocklösung
LT00054255	Prof. Dr. J. Beger und Dipl.-Ing. U. Beger Labotest OHG, Niederschöna	DMSO	50 mM
L-Typ Calciumkanal-blocker	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	100 mM
Metoclopramide	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	100 mM
Methoxyverapamil	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach	H ₂ Odd	10 mM
Mibefradil • 2HCl	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	H ₂ Odd	100 mM
Midodrin • HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	DMSO	100 mM
Mirtazapin	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	Ethanol	50 mM
Nicardipin • HCl	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	100 mM
Nifedipin (meta)	ChemDiv Inc., San Diego, CA, USA	DMSO	100 mM
Nifedipin (ortho)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	DMSO	100 mM
Nifedipin (para)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	DMSO	100 mM
Niguldipin	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach	DMSO	100 mM
Nilvadipin	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	50 mM
Nimodipin	Ascent Scientific Ltd, Bristol, UK	DMSO	100 mM
Nisoldipin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	DMSO	100 mM
Nisoldipin (+)	Zur Verfügung gestellt von Bayer HealthCare AG	DMSO	100 mM
Nisoldipin (-)	Zur Verfügung gestellt von Bayer HealthCare AG	DMSO	100 mM
Nitrendipin	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	100 mM
OSSK_000971	Princeton BioMolecular Research, Monmouth Jct., NJ, USA	DMSO	100 mM
OSSK_014625	Princeton BioMolecular Research, Monmouth Jct., NJ, USA	DMSO	100 mM
OSSK_364814	Princeton BioMolecular Research, Monmouth Jct., NJ, USA	DMSO	50 mM
OSSK_390157	Princeton BioMolecular Research, Monmouth Jct., NJ, USA	DMSO	50 mM
OSSL_119859	Princeton BioMolecular Research, Monmouth Jct., NJ, USA	DMSO	50 mM
OSSL_126729	Princeton BioMolecular Research, Monmouth Jct., NJ, USA	DMSO	5 mM
OSSL_127229	Princeton BioMolecular Research, Monmouth Jct., NJ, USA	DMSO	10 mM
OSSL_590453	Princeton BioMolecular Research, Monmouth Jct., NJ, USA	DMSO	50 mM
Paxilin	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	100 mM
Penfluridol	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	100 mM
Phentolamin • HCl	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	Ethanol	10 mM
Pimozid	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	25 mM

Fortsetzung Tab. 5

Produktname	Hersteller	Verwendetes Lösemittel	Konzentration der Stocklösung
Quinidin	Tocris Bioscience, Bristol, UK	DMSO	100 mM
R420530	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	DMSO	50 mM
RJC03435	Maybridge, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA	DMSO	100 mM
SKF96365	Ascent Scientific Ltd, Bristol, UK	H ₂ O _{dd}	100 mM
Sotalol • HCl	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	H ₂ O _{dd}	100 mM
SR33805	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	100 mM
Stock1S-56409	InterBioScreen Ltd., Moskau, RU	DMSO	50 mM
Terfenadin	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	100 mM
Tetracain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	DMSO	100 mM
Tetraethylammonium Chlorid	Ascent Scientific Ltd, Bristol, UK	H ₂ O _{dd}	100 mM
Tetrandrin	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg	DMSO	5 mM
Tolbutamid	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	100 mM
U-50488	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach	DMSO	100 mM
Verapamil • HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	H ₂ O _{dd}	50 mM
YS-035 HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München	H ₂ O _{dd}	100 mM
Zatebradin • HCl	Biotrend Chemikalien GmbH, Köln	DMSO	100 mM
ZD7288	Ascent Scientific Ltd, Bristol, UK	DMSO	100 mM
Zonisamid	Ascent Scientific Ltd, Bristol, UK	DMSO	100 mM

4. Methoden

4.1 Mikrobiologische Techniken

4.1.1 Transformation von *E.coli* DH5 α und *E.coli* JM109

Transformationen wurden durchgeführt, um Plasmide in Bakterienstämme einzubringen. Dabei wurden der chemisch-kompetente Bakterienstamm *E.coli* DH5 α und die elektrokompetenten *E.coli* JM109 eingesetzt. Die *E.coli* JM109 wurden auf Eis aufgetaut und 1:1 mit H₂O verdünnt. 5 ng des aufgereinigten Plasmids wurden mit den *E.coli* JM109 vermischt, in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Gene Pulser® Cuvette, 0,1 cm Elektrodenabstand, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) überführt und der Elektroschock ausgelöst (1,8 V, 25 μ F und 200 Ω). Bei den chemisch kompetenten DH5 α erfolgte die Transformation nach Angaben des Herstellers, wobei 1/10 des Ligationsansatzes eingesetzt wurde. Im Anschluss an den Hitzeschock bzw. der Elektroporation wurden 400 μ l bis 1 ml vorgewärmtes SOC-Medium zu den transformierten Bakterien gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurden 300 μ l sowie 100 μ l mit dem Drigalski-Spatel auf zwei Antibiotika-haltige Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

4.1.2 Aufreinigen von Plasmiden aus Bakterienkulturen

Plasmide können in Bakterienstämme eingebracht werden, in denen sie autonom vom bakteriellen Chromosom unter Selektionsdruck eines Antibiotikums repliziert werden. Somit lassen sich durch Bakterienpräparationen große Mengen des eingebrachten Plasmids gewinnen. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in Antibiotika-haltigem LB-Medium (0,15 mg/ml Ampicillin oder 0,05 mg/ml Zeocin). Für Plasmid-Minipreps wurden 5 ml und für Plasmid-Midipreps 80 ml Bakterienkultur angesetzt. Zur Anzucht von Bakterien transformiert mit dem Apoaequorin-Plasmid wurde ein *low-salt* LB-Agar und ein *low-salt* LB-Medium verwendet.

Die Bakterien wurden bei 37 °C und 180 – 200 rpm für 18 – 20 h im Schüttelinkubator angezogen. Für die Anfertigung von Plasmid-Midipreps wurde – nach Empfehlung des Herstellers – das einzusetzende Volumen an Bakterienkultur durch Messung der optischen Dichte der Kultur bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Für die Isolierung der

Plasmid-DNA wurde das *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit* bzw. das *GeneElute™ HP Plasmid Midiprep Kit* verwendet. Beide Protokolle basieren auf einer alkalischen Lyse der Bakterien gefolgt von einer Silicagel-Säulenaufreinigung der Plasmid-DNA. Bei der Plasmid-Miniprep wurde die Plasmid-DNA mit sterilem H₂O eluiert.

4.1.3 Anlegen von Glycerolstocks

Für die Langzeitlagerung von Bakterienkulturen wurden Glycerolstocks hergestellt. Dazu wurden 500 µl einer Bakteriensuspension mit 500 µl 50 % Glycerol gemischt und anschließend zügig bei -80 °C eingefroren.

4.2 Aufreinigen und Aufkonzentrieren von Nukleinsäureproben

4.2.1 Phenol/Chloroform-Extraktion

Die Phenol/Chloroform-Extraktion ist eine Methode zur Abtrennung von Proteinen von DNA-Proben. Dabei wurde zunächst die DNA-Probe mit demselben Volumen an wassergesättigtem 70 % Phenol/Chloroform versetzt und gemischt. Durch Zentrifugation der Probe bei 13 000 rpm für 5 min, RT in einer handelsüblichen Tischzentrifuge wurden die Phasen separiert. Die wässrige, obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltende DNA mittels einer Ethanol-Fällung (Siehe 4.2.2) aufkonzentriert.

4.2.2 Ethanol-Präzipitation

Die Ethanol-Fällung dient der Aufkonzentrierung von DNA-Proben. Das 0,1-fache Volumen an 3 M Natriumacetat (pH 5,5) und das 2-fache Volumen an eiskaltem 100 % Ethanol wurden zu der Probe gegeben, die Flüssigkeit gut durchmischt und für 30 min bei -80 °C gekühlt. Dabei wird der DNA die Hydrathülle entzogen und die negative Ladung der Phosphatgruppen maskiert, wodurch bei niedriger Temperatur die DNA effizient ausgesalzen werden kann. Durch Zentrifugieren bei 13 000 rpm für 5 min bei RT in einer handelsüblichen Tischzentrifuge wurde die DNA präzipitiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei 20 – 37 °C getrocknet. Phenol-Chloroform-aufgereinigte DNA wurden in 7 – 10 µl H₂O und isolierte Plasmid-DNA in einem Volumen von 50 – 150 µl ¼ TE aufgenommen.

4.2.3 Gelextraktion von Nukleinsäureproben

Die Gelextraktion wird zur Isolierung von DNA-Molekülen aus einem Agarosegel durchgeführt. Dabei wurde das Protokoll des *QIAquick Gel Extraction Kits* verwendet. Die DNA wurde mit 60 µl H₂O eluiert und mittels Vakuumzentrifugation (Siehe 4.2.4) aufkonzentriert.

4.2.4 Aufkonzentrierung von Nukleinsäureproben über Vakuumzentrifugation

Die Konzentration von Nukleinsäuren, welche in Wasser gelöst vorliegen, kann durch Vakuumzentrifugation erhöht werden. Das Lösemittelvolumen wird hierbei durch Zentrifugation der Probe im Vakuum reduziert.

4.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäureproben

Die Konzentration gelöster Nukleinsäureproben wurde spektrophotometrisch mittels des NanoDrop ND-1000 nach Angaben des Herstellers bestimmt. Dabei wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt.

4.4 Molekularbiologische Techniken

4.4.1 Generierung eines Expressionsvektors für zytosolisch lokalisiertes Apoaequorin

Das Plasmid pCAEQ kodiert für ein mitochondrial lokalisiertes Apoaequorin und wurde freundlicherweise von der Firma Perkin Elmer zur Verfügung gestellt. Für das hier bearbeitete Projekt wurde ein zytosolisch lokalisiertes Apoaequorin benötigt, weshalb die mitochondriale *targeting*-Sequenz (MTS) entfernt werden musste. Abb. 5 zeigt die entwickelte Klonierungsstrategie, welche angewandt wurde. Die MTS wurde durch sequenziellen Verdau mit den Restriktionsenzymen *HindIII* und *NsiI* herausgeschnitten, das Plasmid nach dem Glätten der Überhänge re-ligiert und so der Vektor pCAEQ-Cy generiert, welcher für das zytosolisch lokalisierte Apoaequorin kodiert.

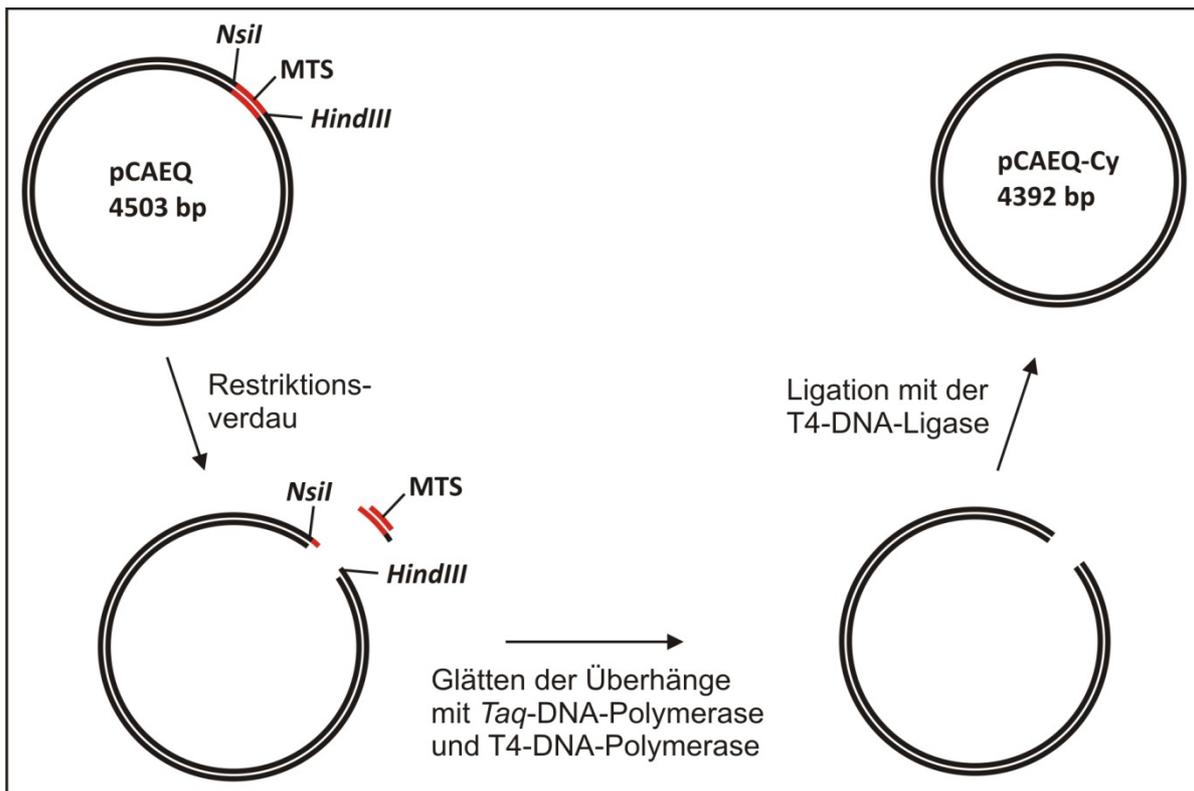


Abb. 5: Klonierungsschema zur Generierung von pCAEQ-Cy. Um die mitochondriale *targeting*-Sequenz (MTS) zu entfernen, wurde das Plasmid pCAEQ kodierend für das mitochondriale Apoaequorin mit den Restriktionsenzymen *NsiI* und *HindIII* geschnitten und anschließend die überhängenden DNA-Enden mit der *Taq*- und T4-DNA-Polymerase geglättet. Mittels der T4-DNA-Ligase wurde das Plasmid re-ligiert.

4.4.2 Restriktionsverdau

Mithilfe eines Restriktionsverdaus sollte die MTS aus dem Vektor pCAEQ ausgeschnitten werden. Hierbei wurde die Eigenschaft von Restriktionsendonukleasen genutzt, dass diese bestimmte – meist palindromische – Sequenzmotive erkennen, binden und DNA-Doppelstrangbrüche erzeugen. Für den hier durchgeführten Restriktionsverdau wurden die Enzyme *HindIII* und *NsiI* verwendet. Zunächst wurde der Verdau mit *HindIII* über Nacht bei 37 °C und nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion (Siehe 4.2.1) und Ethanol-Präzipitation (Siehe 4.2.2) der Verdau mit *NsiI* für 5 h bei 37 °C durchgeführt.

Der Ansatz für den Verdau mit *HindIII* setzte sich wie folgt zusammen:

2 µg Plasmid pCAEQ
 2,5 µl NEBuffer 2 (10x)
 10 U *HindIII*

 Ad 25 µl mit H₂O

METHODEN

Nach der Ethanol-Präzipitation lag die DNA in einem Volumen von 10 µl vor. Der Ansatz für den nachfolgenden Verdau mit *NsiI* setzte sich wie folgt zusammen:

10 µl *HindIII*-verdautes Plasmid pCAEQ
1,5 µl NEBuffer 3 (10x)
10 U *NsiI*

Ad 15 µl mit H₂O

Im Anschluss an den Verdau mit *NsiI* wurde das Enzym durch eine erneute Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation entfernt. Die präzipitierte DNA wurde in 7 µl H₂O aufgenommen.

4.4.3 Herstellung von *blunt-end* DNA-Fragmenten

Die hier verwendeten Restriktionsenzyme *HindIII* und *NsiI* erzeugen nach dem Schneiden von DNA-Fragmenten 5'- und 3'-Überhänge die nicht kompatibel sind. Daher mussten die Enden der Plasmid-DNA geglättet werden, bevor sie ligiert werden konnten. Dazu wurde zunächst mit der *Taq*-DNA-Polymerase der 5'-Überhang der *HindIII*-Schnittstelle aufgefüllt. Anhand der T4-DNA-Polymerase konnte der zusätzlich von der *Taq*-DNA-Polymerase gebildete 3'-Adenosin-Überhang und der 3'-Überhang der *NsiI*-Schnittstelle abgebaut werden. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

7 µl geschnittener und aufgereinigter Vektor pCAEQ
1 µl dNTP-Mix (je 5 mM/Nukleotid)
1 µl AT II Puffer (10 x)
1 U *Taq*-DNA-Polymerase

Ad 10 µl mit H₂O

Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 72 °C inkubiert, anschließend auf Eis gekühlt und durch Zugabe der folgenden Komponenten komplementiert:

4 µl Puffer (5 x) für T4-DNA-Polymerase
1 µl dNTP-Mix (je 5 mM/Nukleotid)
5 µl geschnittener und aufgereinigter Vektor pCAEQ
1 U T4-DNA-Polymerase

Ad 20 µl H₂O

Der Ansatz wurde für 20 min bei 11 °C inkubiert und die DNA anschließend über eine Phenol-Chlorophorm-Extraktion (Siehe 4.2.1) gefolgt von einer Ethanol-Präzipitation (Siehe 4.2.2) isoliert. Mittels einer elektrophoretischen Auftrennung (Siehe 4.4.4) des geschnittenen Plasmids pCAEQ wurde der Erfolg des Restriktionsverdau verifiziert und gleichzeitig wurde durch eine nachfolgende Gelextraktion (Siehe 4.2.3) eine Aufreinigung des DNA-Konstrukts durchgeführt.

4.4.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient der Auftrennung und anschließender Visualisierung von Nukleinsäureproben und kann dazu eingesetzt werden, DNA-Moleküle mittels Gelextraktion aufzureinigen. Je nach Größe der DNA-Moleküle können unterschiedlich konzentrierte Agarosegele (in der Regel zwischen 0,8 – 4 %) hergestellt werden, wobei höhere Agarose-Konzentrationen für die Auftrennung kleinerer DNA-Moleküle verwendet werden. Für Gelextraktionen wurde zur Herstellung des Agarosegels und als Laufpuffer der TAE-Puffer verwendet, für sonstige Anwendungen wurde der TBE-Puffer genommen. Nach PCR-Amplifikation wurden 5 µl Probenlösung versetzt mit 4 µl Ladepuffer (Verhältnis 1,25:1) und bei Plasmidlösungen 50 – 100 ng in einem Volumen von 10 µl versetzt mit 4 µl Ladepuffer (Verhältnis 2,5:1) eingesetzt. Bei der Gelextraktion wurde der gesamte Ansatz bestehend aus 20 µl versetzt mit 5 µl Ladepuffer (Verhältnis 4:1) aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 5 – 8 V/cm. Anhand der im Ladepuffer enthaltenen Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol konnte die zurückgelegte Laufstrecke der DNA-Moleküle im Gel abgeschätzt werden. Mittels des in die DNA interkalierten Farbstoffes Ethidiumbromid, welches in einer Konzentration von 125 µg/µl eingesetzt wurde, wurden die DNA-Moleküle durch Bestrahlung mit UV-Licht am UV-Transilluminator sichtbar und durch das Kamerasystem (E.A.S.Y 429K, Herolab GmbH, Wiesloch) und der Software E.A.S.Y Win32 A+B N5 dokumentiert. Eine Größenabschätzung der aufgetrennten DNA-Moleküle ist anhand der aufgetragenen Marker KEB (100 ng/Spur), Lambda DNA/*HindIII* (200 ng/Spur) oder Lambda DNA/*EcoRI* + *HindIII* (200 ng/Spur) möglich. Bei Gelextraktionen wurden die Banden aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltenen DNA-Moleküle mittels einer Gelextraktion isoliert (Siehe 4.2.3).

METHODEN

4.4.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Um die geschnittene Plasmid-DNA zu ligieren, wurde die T4-DNA-Ligase eingesetzt, welche unter Verbrauch von ATP, die Verknüpfung des 5'- und 3'-Endes katalysiert. Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet:

10 – 30 ng DNA
1 µl Puffer (10 x) für T4-DNA-Ligase
400 U T4-DNA-Ligase

Ad 10 µl mit H₂Odd

Der Reaktionsansatz wurde über Nacht bei 16 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend in *E.coli* DH5α transformiert (Siehe 4.1.1)

4.4.6 Kolonie-PCR

Im Anschluss an die Transformation sollten die erhaltenen Bakterienklone auf die Abwesenheit der mitochondrialen *targeting*-Sequenz (MTS) in dem neu generierten Plasmid pCAEQ-Cy mittels einer Kolonie-Polymerasekettenreaktion (Kolonie-PCR) untersucht werden. Dabei wurde nach der Lyse der Bakterien eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Anhand der Größe der auf einem Agarose-Gel aufgetrennten PCR-Produkte konnte anschließend zwischen positiven (ohne MTS) und negativen (mit MTS) Klonen unterschieden werden – negative Klone fielen durch ein größeres PCR-Produkt bedingt durch das Vorhandensein der MTS auf.

Für jeden Ansatz wurden zunächst 40 µl H₂Odd in ein PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt. Mit einer Pipettenspitze wurde eine Bakterienkolonie von einer Agarplatte gepickt und damit das vorgelegte Wasser angeimpft. Zudem wurde die Kolonie auf eine Antibiotika-haltigen *Backup*-Agarplatte übertragen, welche über Nacht bei 37 °C inkubiert wurde. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

40 µl angeimpftes H₂Odd
5 µl AT-II Puffer (10 x)
2 µl dNTP-Mix (je 5 mM/Nukleotid)
0,2 pmol/µl Forward-Primer CMV-PromFOR01
0,2 pmol/µl Reverse-Primer Aeq-GenREV01
1 U *Taq*-DNA-Polymerase

Ad 50 µl mit H₂Odd

Die PCR erfolgte in einem Thermocycler unter Verwendung des nachfolgenden PCR-Programmes. Dem PCR-Programm war eine 20-minütige Inkubation bei 60 °C vorgeschaltet, welche der Lyse der Bakterienzellen diente.

60 °C	20 min	
94 °C	4 min	
94 °C	30 sek	} 25 Zyklen
58 °C	30 sek	
72 °C	3 min	
72 °C	5 min	

Die PCR-Amplifikate wurden anschließend auf einem 2 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Siehe 4.4.4).

4.4.7 Sequenzieren von DNA-Proben

Bei der Sequenzierung wurde die Kettenabbruchsynthese mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden angewandt (Sanger et al., 1977). Sequenzierungen dienten der Überprüfung, ob die mitochondriale *targeting*-Sequenz entfernt wurde sowie der Verifizierung der Sequenzübergänge. Bei PCR-Produkten mussten vor der Sequenzierung überschüssige Primer und dNTPs entfernt werden, da diese bei der Sequenzier-PCR stören würden. Dies erfolgte mittels ExoSAP-IT, welche sich aus der Exonuklease I und der Shrimp Alkaline Phosphatase zusammensetzte und die Oligonukleotide sowie dNTPS degradierten. Dabei wurden 0,8 µl des Kolonie-PCR Ansatzes mit 5 µl ExoSAP-IT (1:20 verdünnt in H₂O) versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Enzyme wurden durch Inkubation bei 80 °C für 15 min inaktiviert. Anschließend wurde der Sequenzieransatz hergestellt, welcher sich wie folgt zusammensetzt:

5,8 µl ExoSAP-IT aufgereinigtes PCR-Produkt
2 µl BigDye-Puffer (5 x)
1 µl Primer Aeq-GenREV01
1 µl BigDye Sequencing Mix v1.1
<hr style="width: 10%; margin-left: 0;"/> Ad 10 µl mit H ₂ O

Das *BigDye Sequencing Mix v1.1* enthält die für die Sequenzierung benötigten unmarkierten dNTPs, die fluoreszenzmarkierten ddNTPs sowie die Polymerase.

METHODEN

Folgendes PCR-Programm wurde für die Sequenzierung eingesetzt:

96 °C	2 min	} 25 Zyklen
96 °C	15 sek	
53 °C	15 sek	
60 °C	4 min	

Im Anschluss an die PCR-Reaktion wurden die Proben durch Zugabe des 4-fachen Volumens an 75 % Isopropanol gefällt. Durch Zentrifugieren bei 13 000 rpm für 30 min bei RT in einer handelsüblichen Tischzentrifuge wurde die DNA pelletiert und der Überstand anschließend verworfen. Die DNA wurde in 50 µl Hi-Di Formamid aufgenommen und auf der Matrix des 3130xl Genetic Analyzer Kapillarsequenziergeräts aufgetrennt und detektiert. Die Sequenzen wurden mit den Programmen Sequencing Analysis 5.2 und dem DNASTAR® Lasergene Package (*EditSeq* und *SeqMan*) ausgewertet.

4.5 Zellbiologische Techniken

Die Kultivierung der HEK293-Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte. Als Qualitätskontrolle der genutzten HEK293-Zelllinie wurde einmalig ein PCR-basierter Mycoplasmentest (MycoTrace, PAA, Pasching, AUT) durchgeführt, welcher negativ ausfiel.

4.5.1 Auftauen von HEK293-Zellen

Für die Langzeitlagerung wurde die HEK293-Zelllinie in der Gasphase über flüssigem Stickstoff gelagert. Nach der Entnahme eines Kryoröhrchens aus dem Stickstoffbehälter wurde dieses im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut. Die aufgetaute Zellsuspension wurde zügig in 10 ml Kulturmedium verdünnt, um die Konzentration der im Einfriermedium enthaltenen toxischen Bestandteile herabzusetzen. Die Zellen wurden bei 215 x g für 5 min, RT abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 2 ml Kulturmedium resuspendiert und in eine T75-Zellkulturflasche zu 25 ml Kulturmedium gegeben.

4.5.2 Kultivieren und Splitten von HEK293-Zellen

Die HEK293-Zellen wurden im Brutschrank mit Kulturmedium kultiviert und gesplittet, wenn sie eine Dichte von ca. 80 – 90 % erreicht hatten. Um die Zellen zu splitten, wurde zunächst

der Überstand der Zellkultur abgesaugt und die Zellen mit 10 ml Calcium- und Magnesium-freiem DPBS gespült. Nach dem Absaugen des DPBS wurde das Ablösen der Zellen durch Verdau mit 2 ml EDTA-haltigem Trypsin und Inkubation für 2 – 3 min bei 37°C durchgeführt. Die Zellen wurden durch leichtes Klopfen gegen die Zellkulturflasche abgelöst. Zum Abstoppen der Trypsin-Reaktion wurden 13 ml Kulturmedium zugegeben, anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15-ml-Falcon überführt. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 215 x g, RT zentrifugiert und danach der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 4 ml Kulturmedium resuspendiert. Zum Anlegen der Erhaltungskultur wurde in eine T75-Flasche 25 ml Kulturmedium vorgelegt. Da die HEK293-Zellen eine Verdopplungszeit von ca. 24 h besitzen, ließ sich das Volumen der auszusäenden Zellsuspension mit Formel (1) berechnet, wobei n die Anzahl der Tage bis zu dem nächsten Splitten darstellt. Die HEK293-Erhaltungskultur wurde zwei Mal in der Woche gesplittet.

$$V = \frac{4 \text{ ml (Resuspensionsvolumen)}}{2^n} \quad (1)$$

4.5.3 Einfrieren von HEK293-Zellen

Für die Langzeitaufbewahrung wurden HEK293-Zellen in frühen Passagen in T75-Kulturflaschen angezogen bis sie ca. 80 % konfluent waren. Die HEK293-Zellen wurden wie beim Splitten (Siehe 4.5.2) zunächst mit DPBS gewaschen und mit EDTA-haltigem Trypsin abgelöst. Nach dem Zentrifugieren und dem Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 4,5 ml Einfriermedium 1 resuspendiert. Je 750 µl wurden auf Kryoröhrchen verteilt und mit 750 µl Einfriermedium 2 versetzt. Anschließend wurden die Kryoröhrchen zügig verschlossen und in einem *Freezing*-Container bei -80 °C eingefroren. Der mit Isopropanol gefüllte Gefriercontainer stellt ein langsames Einfrieren sicher, wodurch die Gefahr der Bildung von kristallinem Eis und somit ein Platzen der Zellen reduziert wird. Zwei Tage später wurden die Kryoröhrchen in den Stickstoffbehälter überführt. In einem Aliquot lagen ca. $3,75 \times 10^6$ Zellen in 1,5 ml Einfriermedium vor.

4.5.4 Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer

Die Zellzählung wurde durchgeführt, um eine konstante Anzahl an Zellen aussäen, transfizieren und analysieren zu können und so in nachfolgenden Untersuchungen

METHODEN

reproduzierbarere Ergebnisse zu erhalten. Die Neubauer-Zählkammer (*Neubauer Improved, bright line*, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH, Sondheim v. d. Rhön) besitzt ein eingezühtes Gitter, welches die Zählung von eukaryotischen Zellen in einem konstanten Volumen erlaubt. Dazu wurde nach dem Zentrifugieren der Zellen der Überstand abgenommen und das Pellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und mit 90 µl Kulturmedium verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 10 µl auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Für die Zählung wurde die Zellzahl in den vier äußeren Großquadranten bestimmt, der Mittelwert gebildet, mit dem Kammerfaktor (10 000) und dem Verdünnungsfaktor (1:10) multipliziert und so die Anzahl an Zellen pro ml Medium berechnet.

4.5.5 Transfektion von HEK293-Zellen

Transfektionen wurden durchgeführt, um gentechnisch erzeugte Plasmide in eukaryotische Zellen transient zu exprimieren. Das exprimierte Protein kann anschließend funktionell untersucht werden, dessen Expressionslevel mittels Western Blot oder die Lokalisation mittels immunzytochemischen Färbungen ermittelt werden. Für die Transfektion wurde Lipofectamine 2000 bestehend aus kationischen Lipiden genutzt (Lipofektion). Transfektionen wurden entweder in einer 6-cm-Schale, einer 6-Well-Platte oder für immunzytochemische Färbungen in einer 24-Well-Platte durchgeführt. Die HEK293-Zellen wurden nach dem Protokoll von Life Technologies transfiziert, in Tab. 7 sind die Parameter für die Transfektionen zusammengefasst. Für die Bioassay-Untersuchungen und für den Zellviabilitätsassay wurden Ko-Transfektionen von pCAEQ-Cy und dem CNGA3-Expressionsvektor im Verhältnis 2,08:1 durchgeführt, bei einigen Versuchsansätzen wurde zusätzlich das CNGB3-Plasmid ko-transfiziert. Für die Untersuchung des Proteinexpressionslevels mittels Western Blot wurden HEK293-Zellen in 6-Well-Platten mit 7,5 µg Plasmid transfiziert, für die Oberflächenbiotinylierungsexperimente wurden 20 µg Plasmid in 6-cm-Schalen transfiziert. Für immunzytochemische Färbungen wurden 1,5 µg Plasmid eingesetzt.

Tab. 7: Zellzahl, Plasmidmenge und die Menge des Lipofectamine 2000 für die Transfektion von HEK293-Zellen

	Ansatz in 6-cm-Schale	6-Well-Ansatz	24-Well-Ansatz
Zellzahl	ca. 5×10^6	ca. $2,5 \times 10^6$	ca. 5×10^5
Plasmidansatz	Einzeltransfektion: 20 µg Plasmid ad 500 µl OPTIMEM	Einzeltransfektion: 7,5 µg Plasmid ad 250 µl OPTIMEM	Einzeltransfektion: 1,5 µg Plasmid ad 50 µl OPTIMEM
		Ko-Transfektion: (I) 6,25 µg pCAEQ-Plamid + 3 µg CNGA3-Plamid ad 250 µl OPTIMEM (II) 6,25 µg pCAEQ-Plamid + 3 µg CNGA3-Plamid + 1 µg CNGB3-Vektor ad 250 µl OPTIMEM	
Volumen Lipofectamine 2000	40 µl ad 500 µl OPTIMEM	20 µl ad 250 µl OPTIMEM	4 µl ad 50 µl OPTIMEM

Tab. 8: Volumina der Reagenzien für das Umsetzen der Zellen nach der Transfektion und Zellzahl für die Aussaat bei den entsprechenden Plattenformaten.

	Ansatz in 6-cm-Schale	6-Well-Ansatz	24-Well-Ansatz
Waschen (1x)	4 ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freies PBS	2 ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freies PBS	0,5 ml $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freies PBS
Abtrypsinisieren (2-3 min)	1 ml Trypsin-EDTA	0,5 ml Trypsin-EDTA	0,1 ml Trypsin-EDTA
Stoppen der Trypsin-Reaktion	8 ml Kulturmedium	4 ml Kulturmedium	0,9 ml Kulturmedium
Zentrifugieren	215 x g für 5 min, RT	215 x g für 5 min, RT	215 x g für 5 min, RT
Resuspendieren und Aussaat	4 ml Kulturmedium, Aussaat von ca. $2,5 \times 10^6$ Zellen pro 6-cm-Schale in 5 ml Kulturmedium	2 ml Kulturmedium, Aussaat von ca. $1,25 \times 10^6$ Zellen pro 6-Well in 2 ml Kulturmedium (Western Blot) oder $7,5 \times 10^4$ Zellen pro 96-Well (Bioassay) in 100 µl Kulturmedium	1 ml Kulturmedium, Aussaat von ca. 8×10^4 Zellen pro 24-Well in 665 µl Zellkulturmedium

METHODEN

Der Lipofectamine 2000-OPTIMEM-Mix wurde nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT zu der Plasmidlösung gegeben und gemischt. Es folgte eine Inkubation für 20 min bei RT, bei der sich die Liposomen mit eingeschlossener Plasmid-DNA bildeten. Danach wurde die Lösung auf die Zellen gegeben und für 6 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Transfektion wurden die Zellen abtrypsinisiert und umgesetzt. Die hierfür verwendeten Reagenzien und Volumina sind in Tab. 8 **Error! Reference source not found.** zusammengefasst. Um vor den Substanzbehandlungen Schwankungen in der Transfektionseffizienz auszugleichen, wurden mehrere Wells unter identischen Bedingungen transfiziert und anschließend gepoolt.

Für immunzytochemische Färbungen wurden die Zellen auf Poly-L-Lysin (PLL) beschichteten Glasplättchen ausgesät. Dazu wurden die Glasplättchen zunächst durch Abflammen sterilisiert, in ein 24-Well gelegt, für 30 – 60 min mit 400 – 500 µl PLL bei RT beschichtet und anschließend zwei Mal mit 500 µl DPBS gewaschen. Die immunzytochemische Färbung der transfizierten Zellen erfolgte 48 h nach Transfektionsbeginn.

Für Bioassay-Experimente wurden HEK293-Zellen in opaque 96-Well-Platten (Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA) ausgesät.

Um das Expressionslevel der eingebrachten Plasmide zu erhöhen, wurden vor den Bioassay- und Western Blot-Untersuchungen eine Behandlung mit 3 mM Natrium-Butyrat durchgeführt. Natrium-Butyrat kann über einen bislang nicht vollständig aufgeklärten Mechanismus die Expression transfizierter Plasmide erhöhen, dabei ist der CMV-Promoter involviert (Dion et al., 1997; Choi et al., 2005; de Poorter et al., 2007). Die Butyrat-Behandlung erfolgte etwa 24 nach Transfektionsstart für einen Zeitraum von 24 h für Bioassay-Untersuchungen und Oberflächenbiotinylierungsexperimente aber für 30 h für die Untersuchung der Proteinexpressionslevel.

4.6 Immunzytochemische Färbung

Immunzytochemische Färbungen wurden durchgeführt, um die Lokalisation des mitochondrial bzw. zytosolisch vorliegenden Apoaequorins zu untersuchen. Mitochondrien wurden über den Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker Orange CMTMRos oder durch

Immunmarkierung des *Apoptosis-inducing factor* (AIF) angefärbt. Das Apoaequorin wurde mithilfe des N-terminalen c-Myc-Tags markiert.

Sämtliche Wasch- und Markierungsschritte wurden mit Ausnahme der Mitotracker-Färbung bei RT auf einem Wipptisch durchgeführt. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf ein 24-Well. Alle Waschschrte erfolgten mit 500 µl 1 x PBS.

Die Markierung der Mitochondrien durch den Fluoreszenzfarbstoff Mitotracker wurde vor der Fixierung der transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt. Hierzu wurde eine Färbelösung bestehend aus 250 nM Mitotracker Orange CMTMRos und 0,02 % Pluronic® F-127 in Kulturmedium angesetzt – Pluronic® F-127 verbessert die Aufnahme des Mitotracker in die Zelle. Zu den transfizierten HEK293-Zellen wurden 500 µl der Mitotracker-Färbelösung gegeben und diese 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen zwei Mal für 5 min mit DPBS gewaschen, für 5 min mit 500 µl eiskaltem 100 % Aceton fixiert und erneut zwei Mal für je 10 min mit 1 x PBS gewaschen.

Transfizierte HEK293-Zellen, in denen die Mitochondrien durch Markierung von AIF erfasst werden sollten, wurden für 15 min mit 500 µl 4 % PFA bei RT fixiert. Das PFA wurde abgenommen und die Wells zwei Mal für je 10 min mit 1 x PBS gewaschen.

Die Blockierung unspezifischer Bindestellen und die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lösung CT und Inkubation für 30 min. Die Lösung wurde abgesaugt und durch 200 µl der in Lösung CT verdünnten Primärantikörper ersetzt (Siehe Tab. 9) und für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Wells ein Mal kurz und zwei Mal für 10 min mit 1 x PBS gewaschen. Der Sekundärantikörper wurde in 200 µl Lösung C angesetzt und die Wells damit für 50 min inkubiert (Siehe Tab. 9). Im Anschluss wurden die Wells zwei Mal für je 5 min mit 1 x PBS gewaschen und danach mit Mowiol und 2,5 % DAPCO eingedeckt. Das Färbeergebnis wurde mikroskopisch durch das Axio Imager Z1 mit der Zusatzkomponente ApoTome, der Kamera AxioCam MRm und der Software Axiovision 4.8 dokumentiert.

Tab. 9: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für immunzytochemische Färbungen.

Antigen	Antikörper
<i>Apoptosis-inducing factor</i> (AIF)	Primär: Kaninchen anti-AIF (1:500)
	Sekundär: Ziege anti-Kaninchen-Alexa 660 (1:250)
Apoaequorin mit c-Myc-Tag	Primär: Maus anti-c-Myc (1:350)
	Sekundär: Esel anti-Maus-Alexa 488 (1:250)

4.7 Aequorin-basierter Bioassay

Das erste Ziel der Doktorarbeit war die Entwicklung und Etablierung eines Bioassays, welcher sich zur Quantifizierung der Oberflächenexpression *trafficking*-defizienter, homomerer CNGA3-Kanäle eignete. Da unter gesättigten Ligandenkonzentrationen eine konstante Menge an Calcium die geöffneten Kanäle passiert, reflektierte die Stärke des Calciumeinstroms die Anzahl membranständiger CNGA3-Kanäle. Für die Bestimmung des Calciumeinstroms während der Messung wurde das zytosolisch vorliegende Calcium-sensitive Photoprotein Aequorin genutzt. Der Ablauf des Bioassays ist in Abb. 6 dargestellt. Apoaequorin wurde zusammen mit dem Wildtyp oder mutanten CNGA3-Kanal transient in HEK293-Zellen exprimiert. Im inaktiven Zustand lag Apoaequorin mit seiner gebundenen prosthetischen Gruppe Coelenterazin vor. Durch Zugabe des membranpermeablen Liganden 8-Br-cGMP wurde der CNG-Kanal geöffnet und Calcium-Ionen gelangten in die Zelle, wo diese vom Aequorin gebunden wurden. Wurden alle drei Calcium-Bindestellen des Aequorins besetzt, löste dies eine Konformationsänderung aus, welche zur Oxidation des Coelenterazins zu Coelenteramid führte (Kendall und Badminton, 1998). Das aus der Bindetasche freigesetzte Coelenteramid befand sich im angeregten Zustand und emittierte ein einzelnes Photon mit der Wellenlänge von ca. 470 nm. Dieses Lumineszenzsignal kann mit einem herkömmlichen Plattenlesegerät erfasst werden.

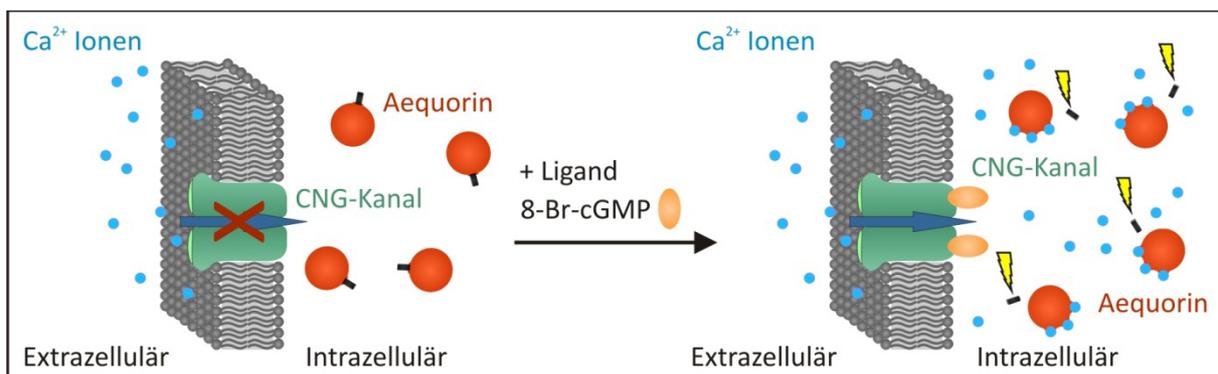


Abb. 6: Prinzip des Aequorin-basierten Bioassays. Der CNG-Kanal und Apoaequorin wurden in HEK293-Zellen exprimiert und das Aequorin mit Coelenterazin rekonstituiert. Erst nach Zugabe des Liganden 8-Br-cGMP konnten die extrazellulär vorliegenden Calciumionen durch den CNG-Kanal in die Zelle einströmen und an Aequorin binden. Wenn alle drei Calcium-Bindestellen des Aequorins belegt, so fand eine Konformationsänderung statt, in deren Zuge das Coelenterazin oxidiert und in einen angeregten Zustand versetzt wurde. Das Coelenteramid wurde freigesetzt und emittierte ein Photon mit einer Wellenlänge von 470 nm.

4.7.1 Rekonstitution des Aequorins

Bevor das Lumineszenzsignal gemessen werden konnte, musste das Aequorin rekonstituiert werden. Die hier angegebenen Volumina beziehen sich auf ein 96-Well. Es wurde zunächst von den transfizierten und Substanz-behandelten Zellen der Überstand abgesaugt und diese mit 75 µl Waschlösung gewaschen. In der Waschlösung war Phenolrot enthalten, was die visuelle Kontrolle beim Arbeiten mit Flüssigkeit in der weißen Wellplatte vereinfachte. Nach Abnehmen der Waschlösung wurde das Aequorin durch Zugabe von 75 µl Coelenterazin-Lösung und Inkubation für 4 h im Brutschrank rekonstituiert. Anschließend wurden die Wells nochmals mit 75 µl Waschlösung gewaschen. Für die Messung wurden 90 µL Badlösung zu den Zellen gegeben und diese im Dunkeln für 30 min bei RT inkubiert.

4.7.2 Lumineszenzmessung

Die Messungen der Lumineszenz erfolgten bei Raumtemperatur in dem Orion Mikroplatten Luminometer mit Injektoreinheit unter Verwendung der Software Simplicity 2. Wenn nicht anders angegeben, wurde die Lumineszenz für einen Zeitraum von 50 sek aufgezeichnet und dabei 50 Messpunkte generiert. Somit stellte jeder Messpunkt die Gesamtzahl gemessener Photonen für ein Zeitintervall von einer Sekunde dar. Die Lumineszenzsignale wurden vor (Hintergrundrauschen) und nach Ligandenzugabe gemessen. Die Ligandenzugabe erfolgte 3 Sekunden nach Start der Messung durch automatische Applikation von 10 µl einer 100 mM 8-Br-cGMP-Lösung in das Messwell, über welchem sich der Detektor befand – die finale Konzentration des Liganden betrug somit 10 mM. Die Messwerte wurden als Excel-Datei gespeichert und anschließend ausgewertet.

4.7.3 Substanzscreening

Das Screening erfolgte mit der CNGA3-Mutante p.E228K an homomeren Kanälen. Die Behandlung der transfizierten Zellen mit Testsubstanzen erfolgte zusammen mit der Natrium-Butyrat-Applikation. Chemische Chaperone wurden in einem Konzentrationsbereich von 10 µM bis 2,5 M und Ionenkanalantagonisten in Konzentrationen von 100 nM bis 400 µM eingesetzt. Es wurde das Lumineszenzsignal, d.h. der CNG-Kanal vermittelte Calciumeinstrom, in unbehandelten (Negativkontrolle; nur Butyratbehandlung) und behandelten (Butyratbehandlung und Substanzbehandlung) Zellen korreliert. Sämtliche

METHODEN

Messungen erfolgten in Quadruplikaten und wurden an mindestens zwei unabhängig transfizierten HEK293-Zellpopulationen durchgeführt. Zusätzlich wurde das Glycerol mit einer Endkonzentration von 2,5 % als Positivkontrolle verwendet, welches bereits in früheren Untersuchungen an *trafficking*-defizienten CNGA3-Kanälen eine Erhöhung der Oberflächenexpression zeigte (Koeppen et al., 2008).

4.7.4 Auswertung der Lumineszenzsignale

Für die Auswertung wurden lediglich die Messungen herangezogen, welche bei der unbehandelten Kontrolle Lumineszenzsignale von mindestens 80 000 RLU oder höher erreichten. Daneben musste das Verhältnis von Positivkontrolle zur unbehandelten Kontrolle einen FC von $\geq 1,5$ betragen. Dadurch wurde sicher gestellt, dass eine ausreichend hohe Transfektionseffizienz vorhanden war. Bei der Datenauswertung wurde zunächst das Hintergrundsignal von den Messwerten abgezogen, die Lumineszenzsignale gegen die Zeit geplottet und dann die Kurvenfläche (*area under the curve*, AUC) für den Zeitraum von 11 – 37 Sekunden nach Beginn der Messung bestimmt. Die AUC-Werte der Quadruplikate wurden gemittelt und der *fold-change* (FC) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt. Zur Bestimmung des FC wurden die Einzelwerte auf den gemittelten Wert der unbehandelten Kontrolle bezogen. Anschließend wurde für alle Gruppen die Standardabweichung bestimmt. Für die graphische Darstellung der Daten wurde GraphPad Prism 4.0 genutzt. Bei der statistischen Auswertung wurde unter Verwendung der Software MYSTAT 12 der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test durchgeführt, wobei die Messwerte von einer Substanz bei einer bestimmten Konzentration mit denen der unbehandelten Kontrolle verglichen wurden.

4.7.5 Identifizierung aktiv Substanzen

Eine Substanz wurde als aktiv, d.h. die Oberflächenexpression der Kanalmutante CNGA3_{E228K} verbessernd, eingestuft, wenn ein FC von 1,5 oder höher erreicht wurde. Dadurch wurde gewährleistet, dass nur Substanzen mit einer bedeutsamen Lumineszenzerhöhung als aktiv bezeichnet wurden.

Chemischen Chaperone wurden in Konzentrationen getestet, welche in der Literatur als effektiv beschrieben wurden. Bei den höchsten untersuchten Konzentrationen trat bereits

Toxizität auf, weshalb höhere Konzentrationen nicht untersucht wurden. Das Substanzscreening der pharmakologischen Chaperone dagegen umfasste ein mehrstufiges Protokoll (Siehe Abb. 7). Im ersten Screening-Schritt erfolgte die Behandlung transfizierter HEK293-Zellen mit den Testsubstanzen in den Konzentrationen 100 μ M, 33 μ M, 10 μ M und 3,3 μ M. In Abhängigkeit der daraus resultierenden Ergebnisse wurde anhand eines Entscheidungsbaumes die weitere Vorgehensweise gewählt:

A) Lag der FC bei den vier getesteten Konzentrationen bei $1,0 \pm 0,1$, so war die Konzentration möglicherweise zu niedrig um Aktivität zu messen und es wurden Messungen mit höheren Konzentrationen (maximal 400 μ M) durchgeführt, bei deren Auswertung nochmals der Entscheidungsbaum durchlaufen wurde.

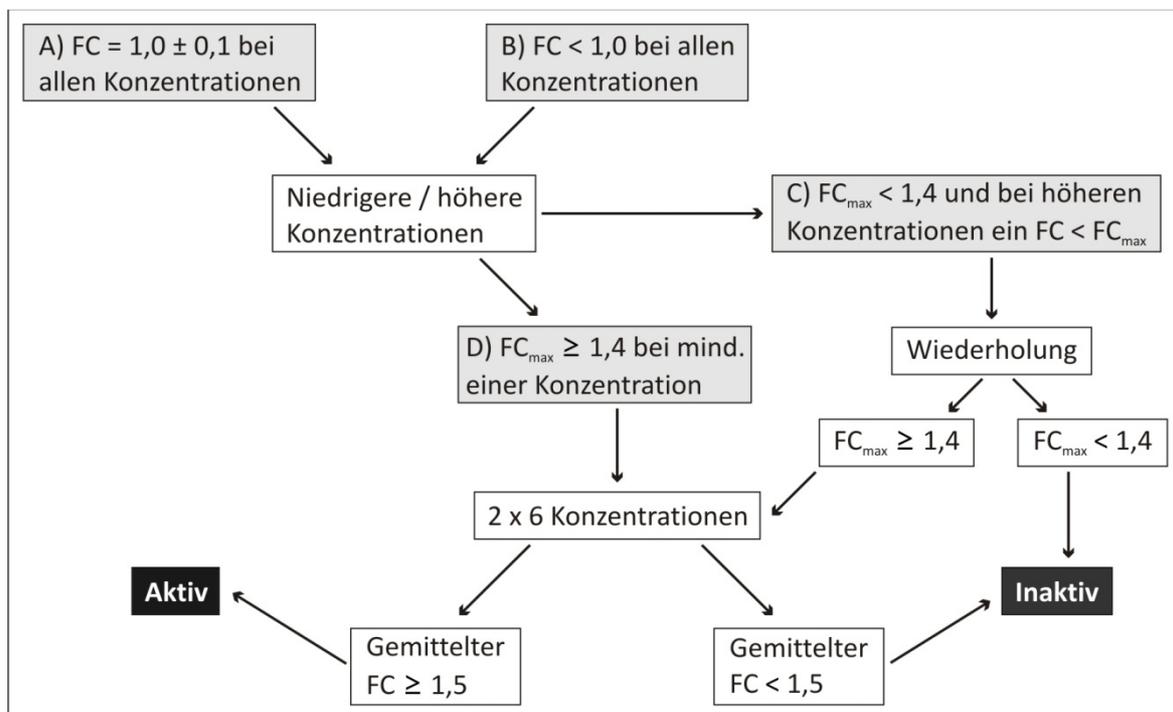


Abb. 7: Entscheidungsbaum für die Auswertung. Zunächst wurden vier Konzentrationen der Substanzen jeweils in Quadruplikaten gemessen (100 μ M, 33 μ M, 10 μ M und 3,3 μ M der Testsubstanzen). Je nach Ergebnis des ersten Screens wurde einer von vier möglichen Wegen beschrieben, welcher schlussendlich eine Beurteilung der Aktivität der Testsubstanzen erlaubte. (A) Bei einem $FC = 1,0 \pm 0,1$ war die Konzentration der Testsubstanzen zu niedrig, um Aktivität nachzuweisen. Höhere Konzentrationen (max. 400 μ M) der Substanz wurden getestet, anschließend nochmals der Entscheidungsbaum durchlaufen. (B) Ein $FC < 1,0$ bei allen Konzentrationen wurde durch Toxizität verursacht, niedrigere Konzentrationen wurden getestet. Bei der Auswertung wurde der Entscheidungsbaum nochmals durchlaufen. (C) Trat ein $FC_{max} < 1,4$ und bei höheren Konzentrationen ein $FC < FC_{max}$ auf, so wurde die Messung nochmals wiederholt. War das Ergebnis der Wiederholung identisch, war die Substanz inaktiv. Wurde ein $FC_{max} \geq 1,4$ bei mindestens einer Konzentration gemessen, wurde wie bei D verfahren. (D) Wurde ein $FC_{max} \geq 1,4$ bei mindestens einer Konzentration gemessen, wurden an zwei unabhängig transfizierten HEK293-Zellpopulationen sechs Konzentrationen der Substanz untersucht. Lag der gemittelte $FC \geq 1,5$, so war die Substanz aktiv. War der $FC < 1,5$, wurde die Substanz als inaktiv eingestuft.

METHODEN

B) War der FC aller getesteten Konzentrationen kleiner als eins, so waren die untersuchten Konzentrationen bereits toxisch und es wurden weitere Messungen mit niedrigeren Substanzkonzentrationen durchgeführt. Die dabei generierten Daten gingen erneut in den Entscheidungsbaum ein, um über die Aktivität der Substanz zu entscheiden.

C) Wurde ein $FC_{\max} < 1,4$ bei einer bestimmten Konzentration gemessen und bei höheren Substanzkonzentration ein $FC < FC_{\max}$, so wurde die Messung mit einer unabhängig transfizierten HEK293-Zellpopulation wiederholt. Wurden die Ergebnisse reproduziert, so wurde die Substanz als inaktiv eingestuft. Wies die Wiederholung einen $FC_{\max} \geq 1,4$ auf, wurden Messungen an zwei unabhängigen Transfektionsansätzen mit jeweils sechs Konzentrationen durchgeführt.

D) War der $FC_{\max} \geq 1,4$, so wurde die Messung an zwei unabhängigen Transfektionsansätzen mit jeweils sechs Konzentrationen der Substanz wiederholt. Die Substanz besaß Aktivität, wenn der gemittelte $FC \geq 1,5$ war und keine Aktivität, wenn der $FC < 1,5$ war.

keine Aktivität, wenn der $FC < 1,5$ war.

4.7.6 Einstufung Korrektoren versus Potentiatoren

Es sollte der bestehende Bioassay modifiziert werden, um direkte Effekte von Substanzen auf die Kanalfunktion (Potentiator-Wirkung) zu erfassen. Im Gegensatz zu der Korrektur der Proteinfehlfaltung und der Erhöhung der Oberflächenexpression (Korrektor-Wirkung), erfolgt die Potentiator-Wirkung unverzüglich. Korrektoren hingegen müssen erst in ausreichender Konzentration die Plasmamembran durchqueren, an dem Kanalprotein binden und die dadurch die Transportprozesse zur Plasmamembran auslösen und benötigen somit etwas mehr Zeit. Um zwischen Potentiatoren und Korrektoren unterscheiden zu können, wurde im Potentiator-Modus die Substanzen erst mit der Badlösung zu den transfizierten Zellen gegeben und ohne weiteren Inkubationsschritt direkt im Luminometer die Messung durchgeführt. Die Substanzen lagen somit während der Messung vor. Parallel dazu wurden die Substanzen nach dem ursprünglich etablierten Bioassay-Protokoll für die Standard-Messungen (Siehe **Error! Reference source not found.**) auf ihre Korrektor-Wirkung untersucht. Dort wurden nach der Substanzbehandlung mehrere Waschschrte und die Rekonstitution des Aequorins durchgeführt, so dass während der Messung die Testsubstanzen nicht mehr in den Messwells vorlagen. Für die Messung wurde das etablierte

Messprotokoll angewandt (Siehe 4.7.2) und die Auswertung wie bereits beschrieben (Siehe 4.7.4) durchgeführt.

4.8 Zellviabilitätsassay

Die Messung der Zellviabilität wurde mit dem CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Nach Ko-Transfektion von 6,25 µg pCAEQ-Cy und 3 µg CNGA3 (Siehe 4.5.5) wurden die Zellen mit Natrium-Butyrat mit oder bei der unbehandelten Kontrolle ohne den Testsubstanzen für 24 h behandelt. Im Anschluss wurden die HEK293-Zellen mit 75 µl Waschlösung gewaschen und in 50 µl *Calcium-Imaging*-Lösung aufgenommen. Der anschließende Lumineszenzassay wurde nach Angaben des Herstellers in dem Luminometer durchgeführt. Jede Substanz wurde an zwei unabhängig transfizierten Zellpopulationen jeweils in Quadruplikaten gemessen. Für die Auswertung wurden die Messwerte auf die unbehandelte Kontrolle (nur Butyratbehandlung) korreliert. Die Daten mit Standardabweichung wurden mit Graphpad Prism 4.0 graphisch dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests durchgeführt und die Software MYSTAT 12 genutzt, wobei die Messwerte von einer Substanz mit denen der unbehandelten Kontrolle verglichen wurden.

4.9 SDS-PAGE und Western Blot

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung denaturierter Proteine nach ihrem Molekulargewicht, welche bei dem anschließenden Western Blot nachgewiesen werden. Western Blot Analysen wurden genutzt, um in transfizierten HEK293-Zellen das Expressionslevel des Apoaequorins und der Kanalmutante mit der Mutation p.E228K nach Substanzbehandlung zu ermitteln sowie die Gesamtmenge und die Fraktion der membranständigen CNGA3-Kanäle nach der Oberflächenbiotinylierung zu bestimmen. Dabei wurden die untersuchten pharmakologischen Chaperone in den Konzentrationen eingesetzt, welche im Aequorin-basierten Bioassay (Siehe 4.7) den höchsten FC erbrachten. Als Negativkontrolle wurden nur mit Natrium-Butyrat behandelte Zellen eingesetzt. Bei der Untersuchung des Expressionslevels fungierten HEK293-Zellen behandelt mit Natrium-Butyrat und 2,5 % Glycerol als Positivkontrolle, bei den Oberflächenbiotinylierungsexperimenten wurden HEK293-Zellen

METHODEN

transfiziert mit dem Wildtyp CNGA3 als Positivkontrolle mitgeführt. Die Konzentration an DMSO war in allen Ansätzen gleich. Im nachfolgenden wird zunächst das Protokoll für die Untersuchung des Expressionslevels beschrieben, in Abschnitt 4.9.5 **Error! Reference source not found.** werden die Oberflächenbiotinylierungsexperimente dargestellt.

4.9.1 Proteinisolierung und Anreicherung von Membranfraktionen

Die Zellen wurden wie unter Abschnitt 4.5.5 beschrieben abgeerntet. Das gewonnene Zellpellet wurde mit 5 ml Calcium- und Magnesium-freiem DPBS gewaschen, nach Zentrifugation (215 x g, 5 min, RT) in 80 µl Lysepuffer pro 6-Well-Ansatz aufgenommen und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Durch 4-maliges vollständiges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen für ca. 1 min im Heizblock bei 37°C wurden die Zellen aufgeschlossen. Größere Zelltrümmer und die Zellnuklei wurden durch eine anschließende Zentrifugation (470 x g, 20 min, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues 1,5-ml Reaktionsgefäß transferiert und zur Anreicherung der Membranfraktion bei 29 000 x g für 45 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 25 µl Membranpuffer aufgenommen. Die Proben wurden anschließend bei -80 °C gelagert.

4.9.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinproben wurde mittels eines Bradford-Tests bestimmt. Für die Standardkurve wurden Proteinkonzentrationen von 10 µg/ml bis 1 mg/ml mit einer bovinen Serumalbumin (BSA)-Lösung (Ausgangskonzentration: 10 mg/ml) hergestellt (Siehe Tab. 10).

Tab. 10: Pipettierschema zur Erstellung der Proteinstandardkurve für den Bradford-Test.

Sollkonzentration	BSA-Volumen	H₂Odd-Volumen
1000 µg/ml	10 µl der 10 mg/ml Lösung	90 µl
500 µg/ml	50 µl der 1000 µg/ml Lösung	50 µl
250 µg/ml	50 µl der 500 µg/ml Lösung	50 µl
100 µg/ml	10 µl der 1000 µg/ml Lösung	90 µl
50 µg/ml	10 µl der 500 µg/ml Lösung	90 µl
20 µg/ml	20 µl der 100 µg/ml Lösung	80 µl
10 µg/ml	10 µl der 100 µg/ml Lösung	90 µl

Die Proteinproben wurden 1:10 in H₂Odd verdünnt. Die Bradford-Messlösung wurde 1:5 in H₂Odd verdünnt und je 1 ml in Küvetten vorgelegt. Anschließend wurden 10 µl H₂Odd als

Referenzprobe, 10 µl der BSA-Verdünnungen für die Erstellung der Standardkurve oder 10 µl der verdünnten Proteinprobe zugegeben. Die Ansätze wurden gemischt, 5 min im Dunkeln inkubiert und bei einer Wellenlänge von 595 nm im Photometer vermessen. Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen. Anhand der gemessenen optischen Dichte der Standardproteinproben konnte die Konzentration der Proteinproben abgeleitet werden.

4.9.3 Durchführung des SDS-Page und des Western Blots

Für die elektrophoretische Proteinauftrennung wurden denaturierende SDS-Gele verwendet. Die Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele ist in Tab. 11 dargestellt. Für die Gelelektrophorese wurde das Mini-PROTEAN® 3-System von Bio-Rad Laboratories genutzt.

Tab. 11: Die Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele für die SDS-PAGE. Die Volumina sind für die Herstellung von 2 Gelen angegeben.

Komponente	Trenngel			Sammelgel
	7 %	10 %	12 %	
H ₂ O	5 ml	4 ml	3,3 ml	4,1 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	2,3 ml	3,3 ml	4 ml	1 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
1,5 M Tris, pH 6,8	-	-	-	750 µl
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	60 µl
10 % APS	50 µl	50 µl	50 µl	60 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	6 µl

Die Proteinlysate wurden mit Laemmli-Puffer für eine Stunde auf Eis denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker wurde der *Novex Sharp Pre-stained* Proteinstandard (10 µl/Spur) verwendet. Der Gellauf wurde mit einem Tris-Glycin-haltigen SDS-Laufpuffer bei 20 mA pro Gel, RT durchgeführt. Proteinlysate von Apoaequorin-exprimierenden HEK293-Zellen wurden auf einem 12 % Trenngel aufgetrennt, Lysate von CNGA3_{E228K}-exprimierenden HEK293-Zellen auf 10 % Trenngelen. Das 7 % Trenngel wurde zur Auftrennung der Proteinlysate nach der Oberflächenbiotinylierung verwendet (Siehe 4.9.5). Die gelelektrophoretische Auftrennung der Banden dauerte ca. 1 - 1½ h und wurde anhand der Lauffront des im Ladepuffer enthaltenen Bromphenolblaus und der sichtbaren Markerbanden verfolgt. Der Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran erfolgte mittels des Tank-Blot-Systems von Bio-Rad Laboratories für 1 h bei 200 mA und 4 °C mit Towbin-Puffer. Die Qualität der Auftrennung und der Erfolg des Transfers wurden mittels einer

METHODEN

Ponceau S-Färbung überprüft. Durch mehrere Waschschritte mit vollentsalztem Wasser wurde der Farbstoff von der Membran entfernt.

Die anschließenden Wasch- und Inkubationsschritte wurden auf einem Wipptisch durchgeführt. Die Membran wurde zwei Mal mit 1 x TBS gewaschen und in 5 % BGB Lösung über Nacht bei 4 °C inkubiert, um unspezifische Bindestellen zu blockieren. Danach wurde die Membran 3 Mal für je 10 min mit 1 x TBS gewaschen. Die Primärantikörper wurden in 1 % BGB Lösung verdünnt und die Membran in der Antikörperlösung für 1 h bei RT inkubiert (Siehe Tab. 12). Die Membran wurde nochmals mit 1 x TBS gewaschen (3 x für 10 min) und für 1 h mit dem HRP-gekoppelten Sekundärantikörper (Siehe Tab. 12) verdünnt in 1 % BGB Lösung bei RT inkubiert. Es folgten weitere Waschschritte mit 1 x TBS (3 x für 10 min). Für die Detektion wurde die Membran für 2 min mit dem Pierce® ECL Western Blotting Substrat behandelt und die Banden mittels licht-sensitiver Filme detektiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte automatisch mittels der Filmentwicklungsmaschine AGFA Curix 60. Die Auswertung der Bandenintensitäten wurde mit ImageJ durchgeführt.

Tab. 12: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot.

Antigen	Antikörper
CNGA3-Untereinheit	Primär: Kaninchen anti-CNGA3 SA3899 (1:1 000)
	Sekundär: Esel anti-Kaninchen-HRP (1:4 000)
Apoaequorin mit c-Myc-Tag	Primär: Maus anti-c-Myc (1:700)
	Sekundär: Ziege anti-Maus-HRP (1:10 000)
Beta-Aktin	Primär: Maus anti- β -Aktin (1:4 000)
	Sekundär: Ziege anti-Maus-HRP (1:10 000)

4.9.4 Strippen der Nitrozellulosemembran

Um eine Nitrozellulosemembran für die Detektion eines weiteren Antigens heranzuziehen, kann durch *Strippen* der davor gebundene Antikörper abgelöst werden. Dazu wird die Nitrozellulosemembran mit *Stripping*-Puffer überschichtet und 10 min bei 50 °C inkubiert. Der Inkubationsschritt wird zwei Mal mit frischem *Stripping*-Puffer wiederholt. Die Membran wird 3 x für 10 min mit 1 x TBS gewaschen und anschließend ist sie für die erneute Blockierung und Proteinnachweis bereit (Siehe 4.9.3).

4.9.5 Oberflächenbiotinylierung

Bei der Oberflächenbiotinylierung werden extrazellulär frei zugängliche Lysinreste durch Anfügen eines Biotinrestes modifiziert, welcher eine Aufreinigung membranständiger Proteine über eine Avidinsäule ermöglicht.

Die Oberflächenbiotinylierung wurde nach dem Protokoll des *Cell Surface Protein Isolation Kit* von Pierce durchgeführt, um in einem kleineren Maßstab arbeiten zu können, wurden jedoch die Einzelkomponenten bestellt. Nach der Behandlung mit den Testsubstanzen wurden die HEK293-Zellen in den 6-cm-Schalen zwei Mal zügig mit eiskaltem DPBS gespült und mit 1 ml Biotinylierungsreagenz (EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-Biotin, Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) für 15 min auf Eis auf dem Wipptisch inkubiert. Anschließend wurden 400 µl *Quenching* Lösung zugegeben, um das überschüssige Biotinylierungsreagenz abzufangen. Die Zellen wurden durch Abkratzen mit einem Zellschaber (Corning GmbH, Kaiserslautern) geerntet und die Zellkulturschalen mit eiskaltem 1 x TBS nachgespült. Die HEK293-Zellen wurden durch Zentrifugation (500 x g, 3 min, RT) pelletiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 5 ml 1 x TBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (500 x g, 3 min, RT) wurde das Pellet in 125 µl modifiziertem Lysepuffer aufgenommen. Durch viermaliges Einfrieren im flüssigen Stickstoff und Auftauen im Heizblock bei 37 °C wurden die Zellen aufgeschlossen, durch Zentrifugation (3200 rpm, 20 min, 4 °C) wurden die Zelltrümmer entfernt. Der Überstand wurde in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und homogenisiert. Parallel dazu wurden Trennsäulen (Pierce® Micro-Spin Columns, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) mit 100 µl NeutrAvidin-Suspension (NeutrAvidin® Agarose Resin, Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) befüllt und – wie bei den nachfolgenden Zentrifugationsschritten – bei 3200 rpm in einer handelsüblichen Tischzentrifuge für 1 min, RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Säulenmaterial durch 3 x Waschen mit je 100 µl Waschlösung 2 ohne Protease-Inhibitor Cocktail Set III und nachfolgenden Zentrifugationsschritten konditioniert. Auf die konditionierten Trennsäulen wurden 100 µl Überstand der Proteinlysate aufgetragen und für 1 h bei RT auf einem Rotator inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde die Trennsäule 1 x mit 100 µl Waschpuffer 1 und 3 x mit je 100 µl Waschpuffer 2 gewaschen. Anschließend wurden 40 µl Elutionspuffer aufgetragen und die Säulchen für 1 h bei RT auf

METHODEN

dem Rotator inkubiert. Durch Zentrifugation für 2 min bei 3200 rpm, RT wurde das aufgereinigte Protein eluiert.

Von dem restlichen, unaufgereinigten Gesamtproteinlysate wurde mittels Bradford die Proteinkonzentration bestimmt (Siehe 4.9.2). 30 µg des Gesamtlysates wurden mit Laemmli-Puffer und die biotinylierte Fraktion mit 2-4 µl Bromphenolblau versetzt und 1 h auf Eis denaturiert. Die Proteinproben wurden zusammen mit dem Größenmarker *Novex Sharp Pre-stained* Proteinstandard (10 µl/Spur) auf einem 7 % Polyacrylamid-Trenngel (Siehe 4.9.3) in Tris-Glycin-haltigen SDS-Laufpuffer für 80 – 90 min bei 20 mA pro Gel, RT aufgetrennt. Der Transfer auf Nitrozellulosemembranen wurde für 1½ h bei 200 mA bei 4 °C mit Towbin-Puffer durchgeführt. Die nachfolgenden Schritte bis zur Detektion der Proteinbanden wurden wie unter 4.9.3 beschrieben durchgeführt.

Die Bandenintensitäten wurden mit der Software ImageJ durch Ermitteln der AUC des Signals bestimmt. Bei der Auswertung wurde der Anteil an biotinyliertem Protein bezogen auf das Gesamtprotein im Lysat bestimmt. Dazu wurden zunächst die Proteinmengen bestimmt, welche von dem Proteinlysate und der biotinylierten Fraktion auf das Gel aufgetragen wurden. Dadurch konnte die AUC/µg Protein bestimmt werden. Im Anschluss wurde das Verhältnis zwischen den Werten für die biotinylierte Fraktion und dem Gesamtprotein gebildet und dieses auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

5. Ergebnisse

5.1 Entwicklung eines Aequorin-basierten Bioassay

5.1.1 Die Generierung des zyt-pCAeq Expressionskonstruktes

Für den im Rahmen dieses Projektes zu entwickelnden Bioassay sollte das Calcium-sensitive Photoprotein Aequorin genutzt werden. Apoequorin wird durch das Plasmid pCAeq kodiert, welches freundlicherweise von der Firma Perkin Elmer zur Verfügung gestellt wurde.

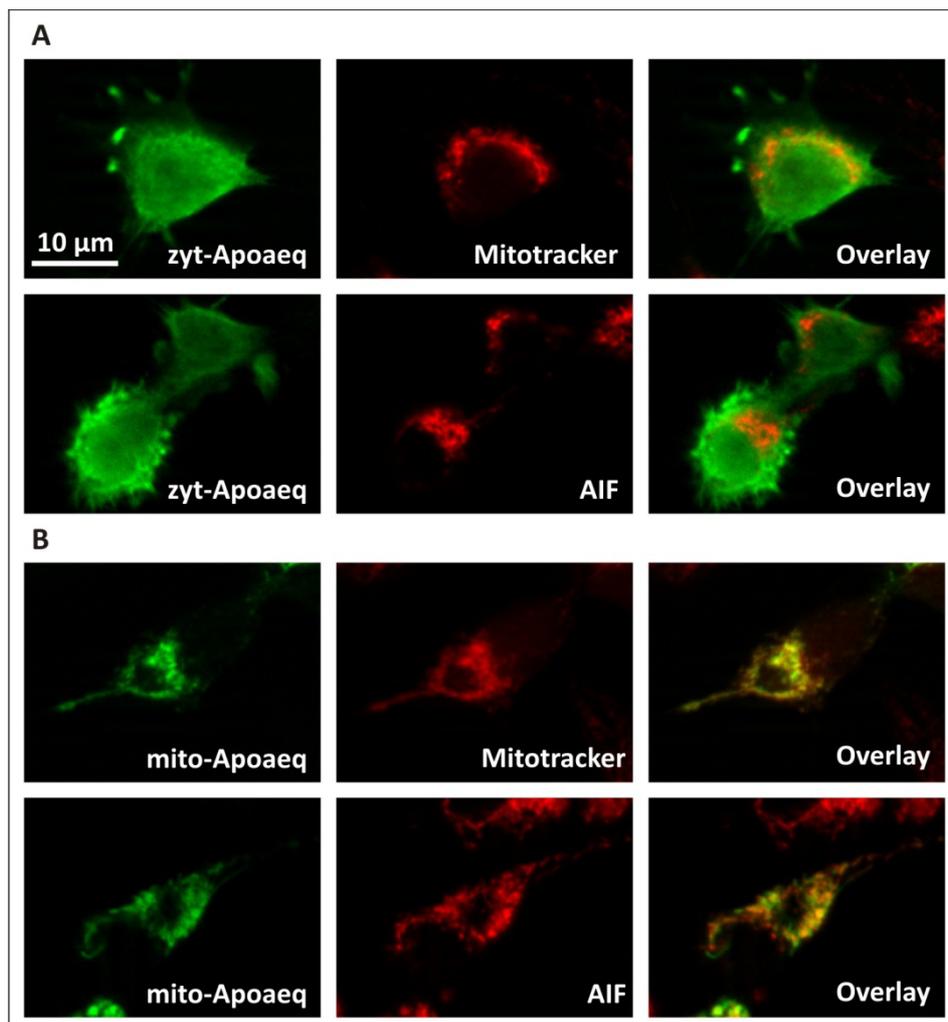


Abb. 8: Immunzytochemischer Nachweis der Lokalisation des zytosolischen und mitochondrialen Apoequorins. In HEK293-Zellen wurden das zytosolische Apoequorin (zyt-Apoeq) (A) oder das mitochondriale Apoequorin (mito-Apoeq) (B) heterolog exprimiert. Das Apoequorin wurde anhand des N-terminalen c-Myc-Tags immunzytochemisch markiert (grün dargestellt). Die Mitochondrien wurden durch immunzytochemische Färbung des *Apoptosis-inducing factor* (AIF) oder anhand eines Mitotrackers lokalisiert (rot dargestellt). Die dritte Spalte enthält *overlay*-Bilder beider Markierungen. Zyt-Apoeq zeigte eine homogene Verteilung und keine Ko-Lokalisation mit den Mitochondrien. Im Gegensatz dazu lag für mito-Apoeq eine lokal begrenzte Färbung vor, die mit der Markierung der Mitochondrien überlappt.

ERGEBNISSE

Das pCAeq enthielt eine mitochondriale *targeting*-Sequenz (MTS), welches für ein mitochondrial lokalisiertes Apoaequorin (mito-Apoaeq) kodierte. Für die hier geplanten Untersuchungen wurde ein zytosolisch lokalisierter Calciumsensor benötigt, weshalb die MTS durch Umklonieren entfernt wurde. Hierbei konnte der Klon 7 von zyt-pCAeq mit der gewünschten gentechnischen Veränderung identifiziert werden (Siehe 9.1). Die zytosolische Lokalisation des neu generierten Apoaequorins wurde über eine immunzytochemische Ko-Lokalisationsanalyse in transfizierten HEK293-Zellen untersucht, als Vergleich diente die Lokalisierung des mito-Apoaeq (Siehe Abb. 8). Die Kontrollfärbung des mito-Apoaeq zeigte eine lokal begrenzte Färbung mit Clustern, die mit den mitochondrialen Markern AIF und Mitotracker ko-lokalisierte. Die immunzytochemische Färbung des zytosolischen Apoaequorin (zyt-Apoaeq) bestätigte eine homogene Verteilung im Zytosol und eine fehlende Assoziation mit den mitochondrialen Markern.

5.1.2 Verifizierung der Funktion des zyt-pCAeq als zytosolischer Calciumsensor

Um zu untersuchen, ob mittels des zytosolisch vorliegenden Apoaequorin ein Calciumeinstrom detektiert werden konnte, wurde das zyt-Apoaeq mit CNGA3_{WT}-Kanälen heterolog in HEK293-Zellen ko-exprimiert. Für diese erste funktionelle Untersuchung wurden 40 000 transfizierte HEK293-Zellen pro 96-Well ausgesät und die Rekonstitution erfolgte durch eine vierstündige Behandlung mit 10 µM Coelenterazin in *Calcium-Imaging* (CI) Lösung. Die Lumineszenz wurde für 90 sek aufgenommen und 6 sek nach Start der Messung wurde der Ligand 8-Br-cGMP appliziert.

Nach Zugabe des Liganden konnte ein deutlicher Anstieg des Lumineszenzsignals bei den zyt-Apoaeq- und CNGA3_{WT}-exprimierenden Zellen beobachtet werden (Siehe Abb. 9). Das Signal zeigte einen transienten Verlauf mit einem Maximum von $6,39 \times 10^5 \pm 0,11 \times 10^5$ *relative light units* (RLU), welches 10 sek nach Applikation des Liganden auftrat. Die ermittelte Kurvenfläche (*area under the curve*, AUC) betrug $4,71 \times 10^6 \pm 0,17 \times 10^6$ RLU x sek (n=6).

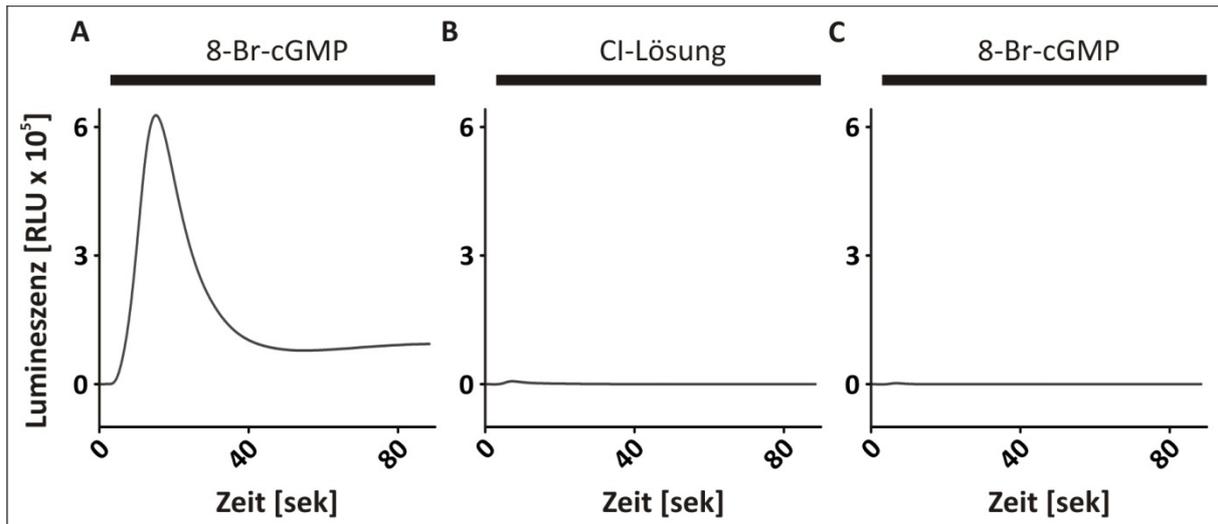


Abb. 9: Aequorin-basierte Lumineszenzmessung von CNG-Kanal vermittelten Calcium-Strömen. (A) Die Applikation von 8-Br-cGMP resultierte in einem transienten Anstieg des Lumineszenzsignals in HEK293-Zellen, welche CNGA3_{WT} und Apoaequorin ko-exprimierten (n=6). (B) Wurde bei diesen Zellen Cl Lösung ohne Ligand appliziert, so konnte nur ein minimaler Anstieg der Lumineszenz beobachtet werden, welcher mit dem Zeitpunkt der Flüssigkeitszugabe (6 sek nach Start der Messung) korrelierte und als Artefakt angesehen werden kann (n=2). (C) In HEK293-Zellen, welche nur Apoaequorin exprimierten, führte die Applikation von 8-Br-cGMP zu keinem messbaren Calcium-Einstrom – es wurde lediglich das Applikationsartefakt nach Flüssigkeitszugabe detektiert (n=6).

Kontrollen mit HEK293-Zellen, welche (I) das zyt-Apoaeq und CNGA3_{WT} exprimierten aber bei denen während der Messung anstelle des Liganden die Cl Lösung appliziert wurde oder (II) das zyt-Apoaeq und keinen CNG-Kanal exprimierten und bei denen während der Messung der Ligand appliziert wurde, wiesen nur einen minimalen Anstieg des Lumineszenzsignals (Applikationsartefakt) bei der Applikation der Cl Lösung bzw. des Liganden auf. Das Maximum des Applikationsartefakts wurde nach 2 sek gemessen und betrug bei den Kontrollen nach Applikation der Cl Lösung einen Wert von $0,08 \times 10^5 \pm 0,02 \times 10^5$ RLU (n=2). Bei den Kontrollen, die keinen CNG-Kanal exprimierten war das Applikationsartefakt im Vergleich dazu etwa halb so hoch ($0,04 \times 10^5 \pm 0,04 \times 10^5$ RLU; n=6). Die AUC war in beiden Kontrollexperimenten um einen Faktor von über 100 niedriger als in dem Experiment mit zyt-Apoaeq- und CNGA3_{WT}-exprimierenden HEK293-Zellen und Applikation von 8-Br-cGMP während der Messung (ohne Ligand: $0,03 \times 10^5 \pm 0,02 \times 10^5$ RLU x sek; ohne CNG-Kanal: $0,16 \times 10^5 \pm 0,04 \times 10^5$ RLU x sek).

5.2 Die Etablierung des Bioassays

5.2.1 Die Optimierung der Parameter

Um einen möglichst robusten und reproduzierbaren Bioassay zu erhalten, fand vor der Durchführung des Screens eine Optimierung hinsichtlich der Zellzahl pro Well, der Coelenterazinbehandlung und der Calciumkonzentration in der Badlösung während der Messung statt. Für die Optimierung wurden HEK293-Zellen genutzt, welche Wildtyp CNGA3-Kanäle exprimierten.

Optimierung der Zellzahl

Es sollte die Zellzahl ermittelt werden, welche zu dem Zeitpunkt der Messung eine Konfluenz von annähernd 100 % lieferte. Es wurden $2,5 \times 10^4$ bis $1,5 \times 10^5$ HEK293-Zellen pro 96-Well in einem Volumen von 100 μ l ausgesät, mit Natrium-Butyrat behandelt (siehe 4.5.5) und die Konfluenz lichtmikroskopisch begutachtet. Optimale Resultate wurden bei $7,5 \times 10^4$ HEK293-Zellen pro 96-Well erzielt.

Optimierung der Coelenterazinbehandlung

Bislang wurde zur Rekonstitution des Aequorins eine vierstündige Inkubation mit 10 μ M Coelenterazin in CI Lösung verwendet. Um die besten Bedingungen für die Rekonstitution des Aequorins zu finden, wurden weitere Konzentrationen des Coelenterazins, unterschiedliche Coelenterazinbehandlungszeiten und Puffer getestet. Die bei den Auswertungen erhaltenen AUC wurden auf die bisher verwendeten Bedingungen (4 h, 10 μ M, CI Lösung) normiert.

Es wurden Konzentrationen von 2,5 – 40 μ M Coelenterazin getestet. Die Behandlung mit Coelenterazin wurde für 4 Stunden in CI Lösung durchgeführt und die Lumineszenzsignale für 90 sek aufgenommen. Die höchsten Signale wurden bei 10 μ M Coelenterazin gemessen (Siehe Abb. 10 (A)). 5 μ M Coelenterazin lieferte leicht geringere Signale, die sich nicht signifikant von den Signalen bei 10 μ M unterschieden. Die getesteten niedrigeren und höheren Coelenterazinkonzentrationen lieferten signifikant kleinere Messwerte ($p < 0,001$) als die Behandlung mit 10 μ M – bei 20 μ M und 40 μ M treten wahrscheinlich bereits zytotoxische Effekte auf. Obwohl somit eine Coelenterazinkonzentration von 10 μ M die höchsten Signale lieferte, wurden für die nachfolgenden Experimente 8 μ M Coelenterazin

eingesetzt, um das Auftreten von zytotoxischen Effekten, bedingt durch Konzentrationsunterschiede bei der Herstellung der Coelenterazinlösung, zu verhindern.

In der Literatur wurden Behandlungsdauern von 1 – 4 h für die Rekonstitution des Aequorins bei HEK293-Zellen beschrieben (Feighner et al., 1999; Ungrin et al., 1999; George et al., 2000). Eine Behandlungsdauer von maximal 4 h ermöglichte zudem die Durchführung mehrerer Assays pro Tag. Somit wurden transfizierte Zellen für 1 h, 2 h und 4 h mit 10 μ M Coelenterazin inkubiert. Nach einer Rekonstitution über eine Dauer von 4 h wurden die maximalsten Signale detektiert – 1 h und 2 h Coelenterazinbehandlung lieferten 5-fach geringere Signale (Siehe Abb. 10 (B)).

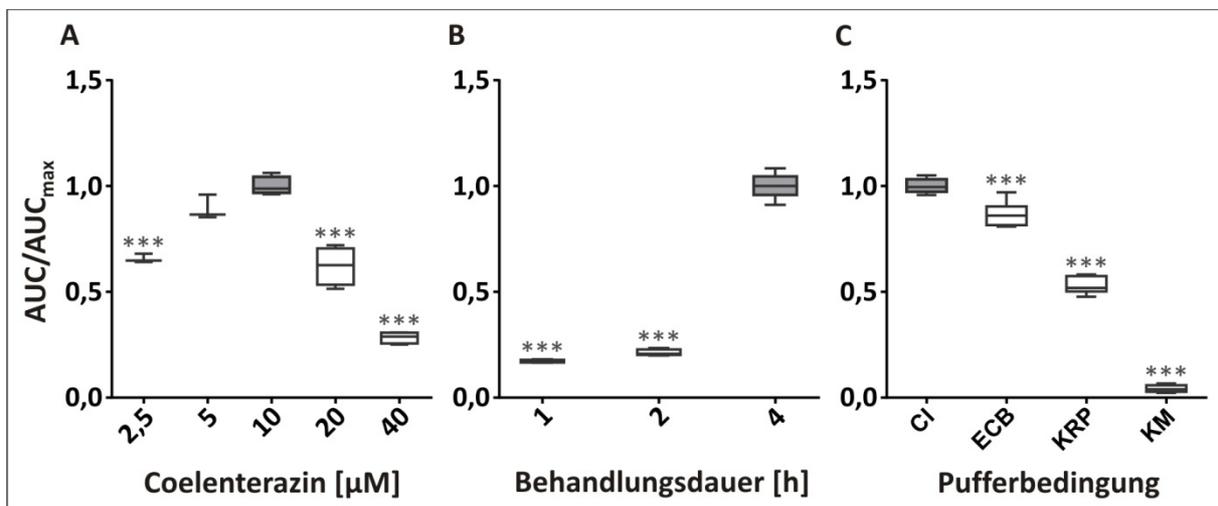


Abb. 10: Optimierung der Coelenterazinbehandlung. Coelenterazin wird zur Rekonstitution des Aequorins benötigt. Als Ausgangsbedingung diente eine vierstündige Inkubation mit 10 μ M Coelenterazin in CI Lösung. Um die Rekonstitution mit Coelenterazin zu optimieren, wurden weitere Konzentrationen (A), Behandlungszeiten (B) und verschiedene Puffer (C) getestet. Für die Auswertung wurden die AUC auf die Werte für die bislang verwendeten Bedingungen normiert (graue Boxen). (A) Bei der Coelenterazinkonzentration wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten für 5 μ M und 10 μ M Coelenterazin ermittelt (5 μ M: $0,89 \pm 0,06$, $n=3$; 10 μ M: $1,00 \pm 0,07$, $n=8$), niedrigere und höhere Coelenterazinkonzentrationen führten zu einer signifikanten Reduktion des Signals gegenüber den 10 μ M Coelenterazin ($0,66 \pm 0,02$ für 2,5 μ M; $0,62 \pm 0,09$ für 20 μ M; $0,28 \pm 0,03$ für 40 μ M; $n \geq 3$). (B) Kürzere Inkubationszeiten führten zu einer deutlichen Reduktion des Signals verglichen mit der vierstündigen Behandlungsdauer (1 h: $0,17 \pm 0,01$; 2 h: $0,21 \pm 0,01$; 4 h: $1,00 \pm 0,05$, $n \geq 5$). (C) Die Rekonstitution in der *Calcium-Imaging* (CI) Lösung lieferte signifikant höhere Signale verglichen mit den anderen Puffern (CI: $1,00 \pm 0,03$, $n=8$; ECB (Extrazellulärpuffer): $0,87 \pm 0,06$, $n=8$; KRP (modifizierter Krebs-Ringer Puffer): $0,53 \pm 0,04$, $n=8$ KM (Kulturmedium): $0,04 \pm 0,01$, $n=5$). ***: $p < 0,001$

Des Weiteren wurden neben der CI Lösung andere Puffer für die Rekonstitution mit Coelenterazin getestet. Eine vierstündige Behandlung transfizierter HEK293-Zellen mit

ERGEBNISSE

10 μM Coelenterazin in der CI Lösung lieferte höhere Signale als der Extrazellulärpuffer (ECB), der modifizierte Krebs-Ringer Puffer oder Kulturmedium ($p < 0,001$; Siehe Abb. 10 (C)).

Zusammenfassend kann die Rekonstitution von Aequorin mit 8 μM Coelenterazin in CI-Puffer mit einer Behandlungsdauer von 4 h als optimal angesehen werden.

Optimierung der Calciumbedingungen

Mit dem Aequorin-basierten Bioassay wird der Einstrom von Calciumionen in die Zelle detektiert. Daher sollte die extrazelluläre Calciumkonzentration, welche während der Messung in der Badlösung vorliegt, optimiert werden. Bei der Auswertung wurden alle AUC auf den gemittelten Wert für 10 mM Ca^{2+} normiert.

Wurde die extrazelluläre Calciumkonzentration von 2 mM auf 5 mM oder 10 mM erhöht, so führte dies zu Lumineszenzkurven mit schmalere Peak (Siehe Abb. 11 (A)) und früher auftretenden und höheren Maxima. Die AUC bei 2 mM und 5 mM unterschieden sich nicht signifikant von 10 mM Ca^{2+} ($p > 0,05$, Siehe Abb. 11 (B)). Bei 15 mM Calciumionen trat eine signifikante Reduktion der AUC im Vergleich zu 10 mM auf ($p < 0,05$).

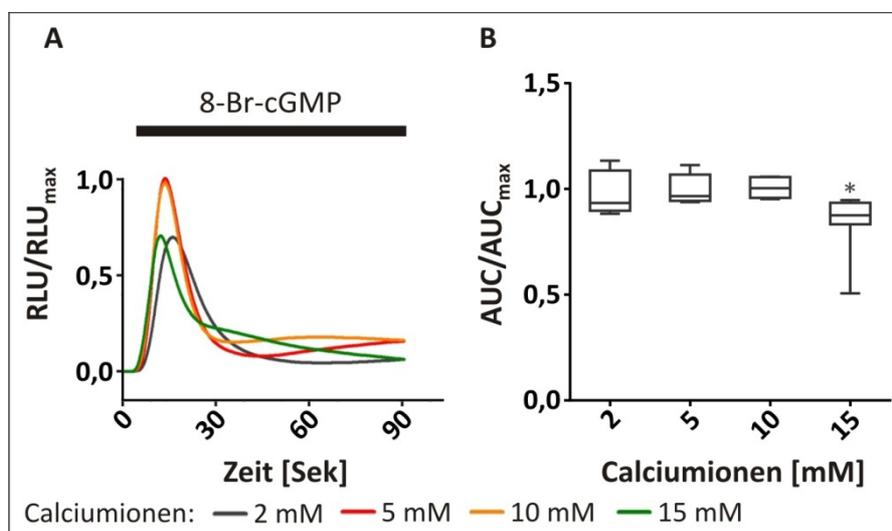


Abb. 11: Optimierung der extrazellulären Calciumkonzentration. (A) Durch Ändern der extrazellulären Calciumkonzentration in der Badlösung während der Messung konnte der zeitliche Verlauf des Lumineszenzsignals moduliert werden. Die gemittelten Lumineszenzkurven für 5 mM (rot) und 10 mM Ca^{2+} (orange) zeigten einen schmalere Peak und ein früher auftretendes und höheres Maximum im Vergleich zu 2 mM Ca^{2+} (schwarz). Mit 15 mM Ca^{2+} (grün) ist das Peakmaximum früher erreicht als bei 5 oder 10 mM, dennoch ist die Peakhöhe vergleichbar mit 2 mM Ca^{2+} . (B) Nach Ermittlung der AUC der Kurven aus (A) wurden diese auf den gemittelten Wert von 10 mM Ca^{2+} normiert. Die AUC für 2 und 5 mM Ca^{2+} zeigten keinen signifikanten Unterschied zu dem Wert für 10 mM Ca^{2+} (2 mM: $0,97 \pm 0,10$; 5 mM: $0,99 \pm 0,07$; 10 mM: $1,00 \pm 0,05$; $n \geq 5$). Im Vergleich dazu führten 15 mM Ca^{2+} zu einer statistisch signifikanten Reduktion der AUC (15 mM: $0,83 \pm 0,15$; $n=7$). *: $p < 0,05$.

Der Ablauf des optimierten Bioassays ist in Abb. 12 zusammengefasst.

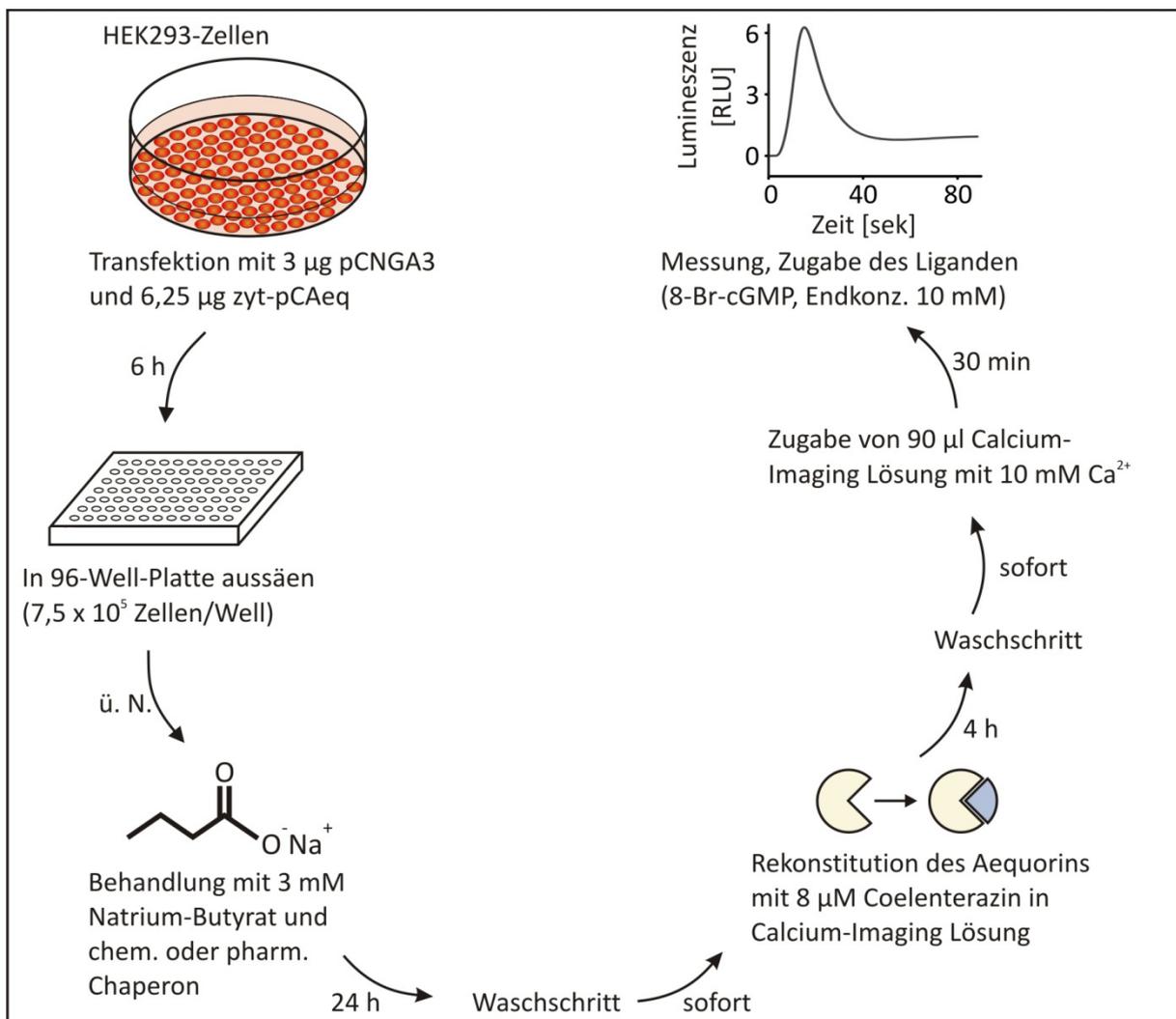


Abb. 12: Ablauf des optimierten Aequorin-basierten Bioassays zum Screening chemischer oder pharmakologischer Chaperone. HEK293-Zellen wurden im 6-Well-Format transfiziert, anschließend in 96-Well-Platte umgesetzt und über Nacht im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Die transfizierten Zellen wurden mit Natrium-Butyrat und den Testsubstanzen für 24 h behandelt. Im Anschluss fand die Rekonstitution des Aequorins mit Coelenterazin statt, davor und danach werden die Zellen gewaschen. Zum Schluss wurde die Badlösung zugegeben und die Lumineszenz im Luminometer bestimmt.

5.2.2 Evaluation verschiedener *trafficking*-defizienter CNGA3-Kanalmutanten

Um eine geeignete CNGA3-Kanalmutante für das Substanzscreening zu identifizieren, wurden drei verschiedene mutante CNGA3-Kanäle (CNGA3_{E228K}, CNGA3_{R427C} und CNGA3_{R563C}), welche eine reduzierte Oberflächenexpression zeigen (Koeppen et al., 2008; Reuter et al., 2008), untersucht. Für die Auswertung wurden die AUC der Kanalmutanten auf die Werte des Wildtyp Kanals normiert, wobei sich zeigte, dass die AUC der mutanten CNGA3-Kanäle statistisch signifikant kleiner waren als bei CNGA3_{WT} (Siehe Abb. 13). Im

ERGEBNISSE

Gegensatz zu den Kanalproteinen mit den Mutationen p.R427C und p.R563C konnte bei CNGA3_{E228K}-Kanälen eine Restfunktion detektiert werden.

Für das Substanzscreening wurde CNGA3_{E228K} ausgewählt, da anhand der verbliebenen Funktion toxische Nebeneffekte der zu untersuchenden Substanzen erfasst werden können.

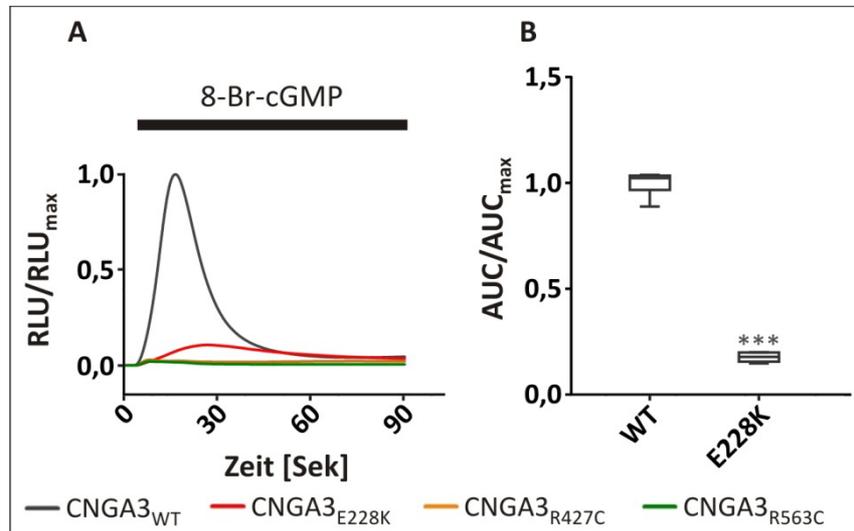


Abb. 13: Aequorin-basierte Lumineszenzmessung von Wildtyp und mutanten CNGA3-Kanälen. (A) Die gemittelten Lumineszenzsignale der CNGA3-Kanäle mit den Mutationen p.E228K (rot), p.R427C (orange) und p.R563C (grün) wurden vergleichend zum Wildtyp (schwarz) gemessen. Bei den CNGA3_{R427C}- und CNGA3_{R563C}-Kanälen konnte kein Calciumeinstrom erfasst werden, wohingegen CNGA3_{E228K}-Kanäle noch eine Restaktivität zeigten. (B) CNGA3_{E228K}-Kanäle wiesen einen 5,5-fach geringeren Calcium-Einstrom im Vergleich zum Wildtyp Kanal auf (Wildtyp: $1,00 \pm 0,06$; CNGA3_{E228K}: $0,18 \pm 0,02$; $n=6$). ***: $p<0,001$.

5.2.3 Positivkontrolle für das Substanzscreening

Es wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass Glycerol die Oberflächenexpression *trafficking*-defizienter CNGA3-Kanäle verbessert (Koeppen et al., 2008). Daher sollte geprüft werden, ob Glycerol als Positivkontrolle für das hier durchgeführte Screening genutzt werden konnte.

Es wurden vier Glycerolkonzentrationen zwischen 2,5 % und 10 % an CNGA3_{E228K}-exprimierenden HEK293-Zellen im Aequorin-basierten Bioassay getestet. Die AUC aller Messungen wurden auf die Werte der unbehandelten Kontrolle normiert. 2,5 % Glycerol resultierte in einer 1,7-fachen, statistisch signifikanten Erhöhung der AUC im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ($p<0,05$; Siehe Abb. 14). 5 % Glycerol führte ebenfalls zu einer Erhöhung der AUC, die aber nicht statistisch signifikant war. Höhere Glycerolkonzentrationen führten aufgrund toxischer Nebeneffekte zu geringeren Signalen im

Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Somit wurde die Behandlung mit 2,5 % Glycerol als Positivkontrolle für das Substanzscreening genutzt.

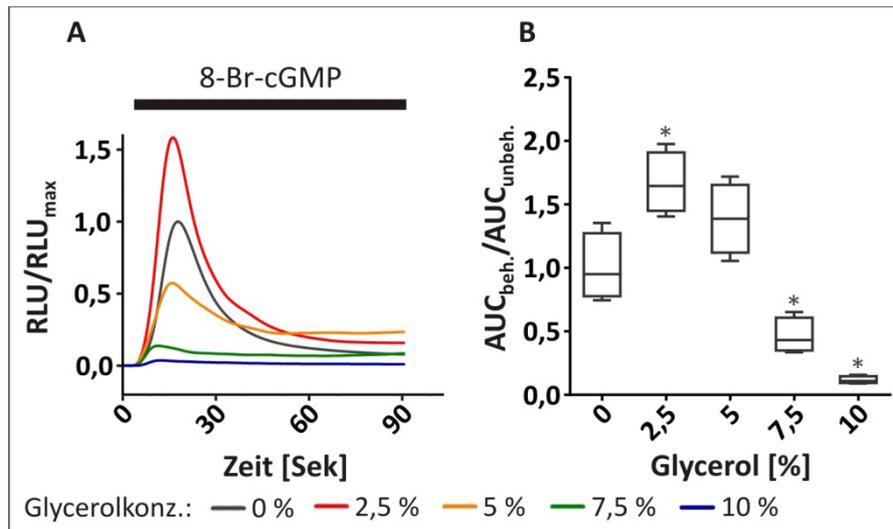


Abb. 14: Lumineszenzmessung nach Behandlung mit Glycerol. (A) Die gemittelten Lumineszenzsignale wurden auf die unbehandelte Kontrolle (schwarz) normiert. Die Behandlung von CNGA3_{E228K}-exprimierenden HEK293-Zellen mit 2,5 % Glycerol (rot) führt zu einer Erhöhung der Lumineszenz, während 5 % (orange), 7,5 % (grün) und 10 % Glycerol (blau) niedrigere Lumineszenzsignale lieferten. (B) Die konzentrationsabhängigen Effekte wurden auch bei den auf die unbehandelte Kontrolle normierten AUC beobachtet. 2,5 % Glycerol führte zu einer signifikanten Erhöhung der AUC. Höhere Glycerolkonzentrationen zeigten nur einen geringen oder keinen Effekt (0 % Glycerol: $1,00 \pm 0,26$; 2,5 % Glycerol: $1,67 \pm 0,24$; 5 % Glycerol: $1,39 \pm 0,28$; 7,5 % Glycerol: $0,46 \pm 0,14$; 10 % Glycerol: $0,12 \pm 0,03$; n=4). *:p<0,05.

5.2.4 Einfluss der Lösemittel auf die Oberflächenexpression des CNG-Kanals

Viele der chemischen und pharmakologischen Chaperone, welche später mit dem Bioassay untersucht werden sollten, wurden in dem Lösemittel DMSO gelöst, einzelne auch in Ethanol oder Methanol. Es sollte überprüft werden, ob die Lösemittel *per se* die CNG-Kanalexpression bzw. Lumineszenzmessung beeinflussen.

HEK293-Zellen, welche CNGA3_{E228K}-Kanäle exprimierten, wurden – zusätzlich zur Behandlung mit Natrium-Butyrat – mit 112, 224 und 336 mM DMSO, 50 und 150 mM Methanol oder 33, 100 und 400 mM Ethanol für 24 h behandelt (Siehe Abb. 15). Die getesteten Konzentrationen entsprachen dabei den später im Assay während der Substanzbehandlung vorliegenden Lösemittelkonzentrationen. Bei der Auswertung wurden die AUC der behandelten Proben auf die unbehandelte Kontrolle (nur Butyrat) normiert. Die ermittelten AUC wiesen keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf.

ERGEBNISSE

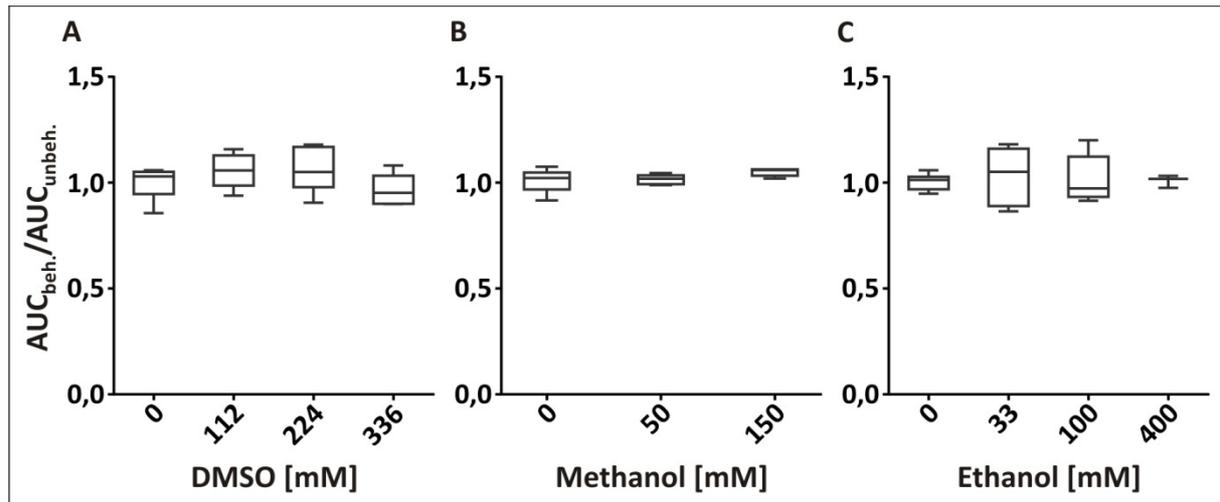


Abb. 15: Effekt der Lösemittel auf die Oberflächenexpression von CNG-Kanälen. DMSO (A), Methanol (B) und Ethanol (C), welche als Lösemittel der zu analysierenden Pharmaka dienen, wurden hinsichtlich unspezifischer Nebeneffekte im Aequorin-basierten Bioassay an $CNGA3_{E228K^-}$ exprimierenden HEK293-Zellen getestet. Es wurden die AUC bestimmt und auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede beobachtet werden (0 mM DMSO: $1,00 \pm 0,08$; 112 mM DMSO: $1,06 \pm 0,08$; 224 mM DMSO: $1,06 \pm 0,1$; 336 mM DMSO: $0,97 \pm 0,08$; 0 mM Methanol: $1,00 \pm 0,05$; 50 mM Methanol: $1,01 \pm 0,02$; 150 mM Methanol: $1,05 \pm 0,02$; 0 mM Ethanol: $1,00 \pm 0,04$; 33 mM Ethanol: $1,02 \pm 0,12$; 100 mM Ethanol: $1,00 \pm 0,11$; 400 mM Ethanol: $1,01 \pm 0,03$; $n \geq 3$).

5.2.5 Die Charakterisierung des Bioassays

Der Bioassay sollte hinsichtlich seiner Tauglichkeit für eine Substanzscreening evaluiert werden. Es sollte geprüft werden, ob mit dem Bioassay Änderungen in der CNG-Kanaldichte in der Plasmamembran transfizierter HEK293-Zellen detektiert werden können: (I) Durch unterschiedliche Mischverhältnisse von transfizierten und untransfizierten HEK293-Zellen wurde die Anzahl transfizierter Zellen im Well variiert. (II) Die Plasmidmenge bei der Transfektion wurde reduziert, um das Expressionslevel der CNG-Kanäle in den Zellen zu modulieren (Siehe Abb. 16 **Error! Reference source not found.**).

Die unter beiden Bedingungen erhaltenen Lumineszenzsignale korrelieren mit dem Mischverhältnis bzw. dem Verhältnis der transfizierten Plasmidmenge. So ist die AUC bei der Zellpopulation, welche 25 % transfizierte Zellen enthält, etwa um den Faktor 4 geringer als bei der Population, welche zu 100 % aus den transfizierten Zellen besteht (Siehe Abb. 16).

Die AUC nach Transfektion mit 8,3 % der Standard-Plasmidmenge ist etwa halb so groß wie nach Transfektion mit 16,6 % der Wildtyp CNGA3-Plasmidmenge und etwa 1/12 von der Standard-Plasmidmenge (3 μ g pCNGA3_{WT}). Nur nach Transfektion von 50 % des CNGA3-

Plasmids ist die ermittelte AUC mit $0,62 \pm 0,02$, $n=6$ deutlich höher als erwartet verglichen mit der Standard-Plasmidmenge. Dieser Wert lag außerhalb des bestimmten 95 % Konfidenzintervalls.

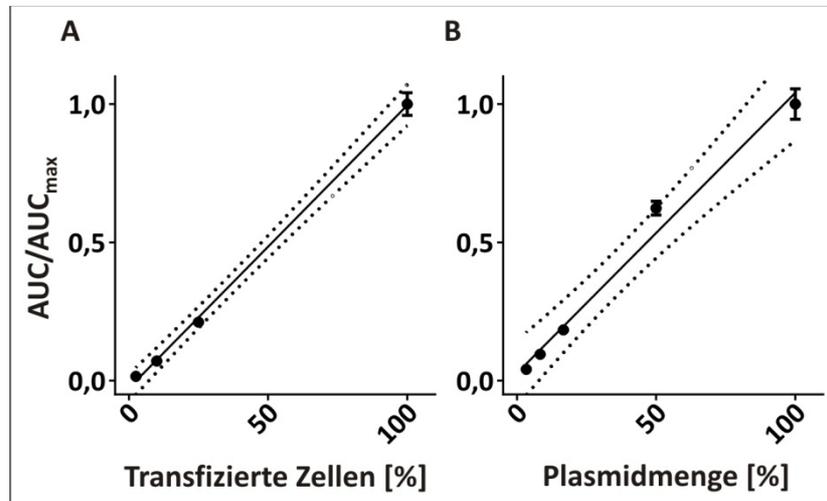


Abb. 16: Korrelation der CNG-Kanalmenge und dem Aequorin-vermittelten Lumineszenzsignal. Unterschiedliche Mengen an CNG-Kanälen im HEK293-Expressionssystem wurden durch (A) Mischen von transfizierten Zellen mit untransfizierten Zellen und (B) durch Transfektion von geringeren Mengen an CNGA3_{WT}-Plasmid simuliert. Die Aequorin-vermittelten Lumineszenzsignal wurde gemessen und die berechneten AUC auf die Daten der Standardbedingungen (100% der transfizierten Zellen und 3 μg pCNGA3_{WT}) normiert und das 95%-Konfidenzintervall berechnet ($n \geq 6$). Unter beiden Versuchsbedingungen ist eine Korrelation zwischen der CNG-Kanalmenge und den gemessenen Lumineszenzsignalen zu beobachten.

Ein Maß für die Fähigkeit, aktive Substanzen in dem Bioassay als solche zu erkennen, stellt der z-Faktor dar, welcher somit einen Qualitätsmerkmal für den Bioassay ist. Für die Berechnung des z-Faktor werden die Mittelwerte (μ) und die Standardabweichungen (σ) einer Negativkontrolle (n) und einer Positivkontrolle (p) benötigt:

$$z - \text{Faktor} = 1 - \frac{3(\sigma_p + \sigma_n)}{|\mu_p - \mu_n|} \quad (2)$$

Die Negativkontrolle stellt die unbehandelten Wells dar und die mit 2,5 % Glycerol behandelten Wells, welche als Positivkontrolle dienten. Für 20 aufeinanderfolgende Messungen innerhalb von einem Zeitraum von ca. zwei Monaten, wurden je vier Messwerte von der Negativkontrolle und der Positivkontrolle für die Berechnung des z-Faktors herangezogen. Es wurde ein gemittelter z-Faktor von 0,4 erhalten (Siehe Abb. 17).

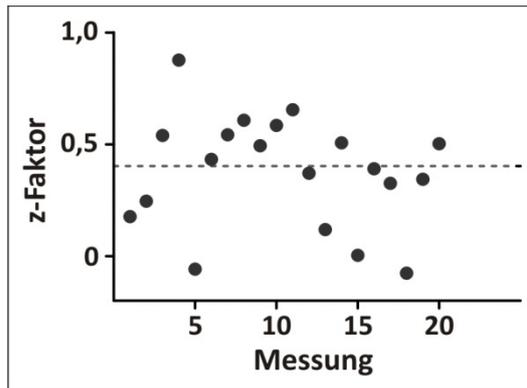


Abb. 17: Bestimmung des z-Faktors für den etablierten Aequorin-basierten Bioassay. Der z-Faktor wird anhand der Mittelwerte und Standardabweichungen einer Negativkontrolle (unbehandelte Wells) und einer Positivkontrolle (Behandlung mit 2,5 % Glycerol) bestimmt. Messwerte von 20 aufeinanderfolgenden Messungen innerhalb eines Zeitraums von ca. zwei Monaten wurden für die Berechnung des z-Wertes herangezogen. Es wurde ein gemittelter z-Faktor von 0,4 berechnet (gestrichelte Linie).

5.3 Der Substanzscreen

Es sollten chemische und pharmakologische Chaperone auf ihre Fähigkeit hin getestet werden, den Membraneinbau von *trafficking*-defizienten CNGA3-Kanälen mit der Mutation p.E228K zu verbessern. HEK293-Zellen, welche CNGA3_{E228K}-Kanäle heterolog exprimierten, wurden für 24 h mit den zu testenden chemischen und pharmakologischen Chaperonen behandelt. Für die Auswertung wurden die AUC der Lumineszenzsignale ermittelt und auf die unbehandelte Kontrolle normiert ($AUC_{\text{beh.}}/AUC_{\text{unbeh.}}$). Diese Werte entsprachen somit dem *fold change* (FC), welche die Behandlung einer Testsubstanz bezogen auf die unbehandelte Kontrolle hervorrief.

In Abhängigkeit des hervorgerufenen *fold changes*, konnten die Substanzen anschließend in inaktiv bzw. Substanzen mit geringer, mittlerer oder hoher Aktivität eingestuft werden. Im Rahmen der Auswertung wurden die Signifikanzlevel nur für Testsubstanzen berechnet, welche normierte AUC bzw. FC Werte von 1,0 oder höher aufwiesen.

5.3.1 Chemische Chaperone

Chemische Chaperone stellen eine bekannte Gruppe von Verbindungen dar, welche meistens osmotische Aktivität besitzen. Es wurden neun aus der Literatur bekannte chemische Chaperone mit dem Bioassay untersucht, wobei sich auch die im Bioassay verwendeten Konzentration nach den in der Literatur beschriebenen effektiven Konzentrationen – häufig im millimolaren Bereich – richteten (Howard et al., 2003; Mulhern et al., 2007; Roth et al., 2012; Cao et al., 2013).

Unter den getesteten chemischen Chaperonen waren unter anderem Methylamine, Kohlenhydrate und eine Aminosäure. Einige der getesteten Substanzen erzielten eine kleine Erhöhung der AUC, wie z.B. die Tauroursodeoxycholsäure (TUDCA). Eine $\geq 1,5$ -fache Erhöhung der AUC konnte bei der Aminosäure L-Glutamin bei einer Konzentration von 100 mM beobachtet werden, welche daher als „aktiv“ eingestuft wurde (Siehe Tab. 13, Abb. 18). Bei den kleineren Konzentrationen des L-Glutamins konnte keine statistisch signifikanten Verbesserungen der Lumineszenzsignale beobachtet werden. Konzentrationen über 100 mM L-Glutamin konnten aufgrund der erreichten Löslichkeitsgrenze nicht analysiert werden.

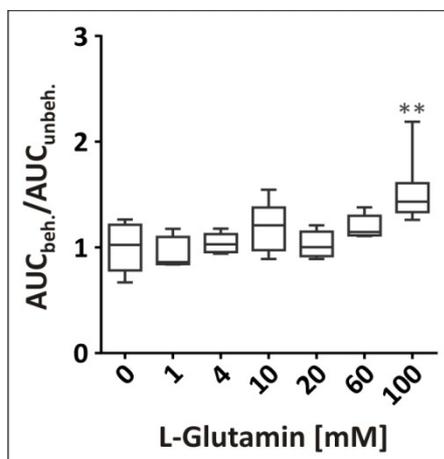


Abb. 18: Lumineszenzmessung von CNGA3_{E228K}-Kanälen nach Behandlung mit dem chemischen Chaperon L-Glutamin. Die Effektivität von L-Glutamin in Konzentrationen von 1 bis 100 mM wurde mit dem Bioassay untersucht. Die ermittelten AUC wurden auf die unbehandelte Kontrolle normiert. Konzentrationen von 1 bis 60 mM zeigten keinen Unterschied gegenüber der unbehandelten Kontrolle jedoch konnte für 100 mM L-Glutamin eine signifikante Erhöhung des Signals um einen Faktor von 1,5 beobachtet werden. $n \geq 4$; **: $p < 0,01$.

Tab. 13: Zusammenfassung der normierten AUC der im Bioassay untersuchten chemischen Chaperone. Diese wurden in mindestens vier verschiedenen Konzentrationen getestet, und bei Erreichen eines $FC \geq 1,5$ als aktiv eingestuft.

Substanz		Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4	Konzentration 5	Konzentration 6
Aktiv							
L-Glutamin (Aminosäure)	FC \pm SD Konz. T / n	0,9 \pm 0,2 1 mM 1 / 4	1,0 \pm 0,1 4 mM 1 / 5	1,2 \pm 0,2 10 mM 2 / 8	1,0 \pm 0,1 20 mM 1 / 6	1,2 \pm 0,1 60 mM 1 / 5	1,5 \pm 0,3 100 mM 2 / 11
Inaktiv							
6-AHA (Sonstige)	FC \pm SD Konz. T / n	0,9 \pm 0,2 1 mM 2 / 10	1,1 \pm 0,1 4 mM 1 / 4	1,1 \pm 0,1 10 mM 3 / 15	0,8 \pm 0,2 100 mM 3 / 15	n. d. 200 mM 1 / 5	-
Betain (Methylamin)	FC \pm SD Konz. T / n	0,9 \pm 0,2 1 mM 1 / 5	1,0 \pm 0,1 4 mM 1 / 5	1,2 \pm 0,2 10 mM 1 / 5	0,9 \pm 0,1 50 mM 1 / 5	0,6 \pm 0,1 100 mM 1 / 5	n. d. 200 mM 1 / 5
Mannitol (Kohlenhydrat)	FC \pm SD Konz. T / n	1,1 \pm 0,1 10 mM 1 / 6	1,2 \pm 0,2 30 mM 1 / 6	0,7 \pm 0,0 70 mM 1 / 6	0,6 \pm 0,1 140 mM 1 / 6	n. d. 280 mM 1 / 6	n. d. 850 mM 1 / 5
Myo-Inositol (Kohlenhydrat)	FC \pm SD Konz. T / n	1,0 \pm 0,1 12,5 mM 1 / 4	0,9 \pm 0,1 25 mM 1 / 4	0,9 \pm 0,0 50 mM 1 / 5	0,8 \pm 0,1 100 mM 1 / 5	n. d. 200 mM 1 / 5	n. d. 400 mM 1 / 6
Sorbitol (Kohlenhydrat)	FC \pm SD Konz. T / n	1,1 \pm 0,0 0,66 mM 1 / 4	1,0 \pm 0,1 2 mM 1 / 4	1,1 \pm 0,1 4 mM 1 / 4	0,9 \pm 0,1 8 mM 1 / 4	0,7 \pm 0,0 100 mM 1 / 4	0,2 \pm 0,1 200 mM 1 / 7
TMAO (Methylamin)	FC \pm SD Konz. T / n	1,0 \pm 0,13 2 mM 1 / 4	1,0 \pm 0,2 4 mM 1 / 4	1,0 \pm 0,2 8 mM 1 / 4	0,9 \pm 0,0 10 mM 1 / 4	0,5 \pm 0,1 100 mM 1 / 4	0,1 \pm 0,0 200 mM 1 / 7
Trehalose (Kohlenhydrat)	FC \pm SD Konz. T / n	0,9 \pm 0,2 0,5 mM 2 / 10	1,2 \pm 0,3 5 mM 2 / 8	0,9 \pm 0,5 50 mM 2 / 10	0,6 \pm 0,3 100 mM 1 / 5	n. d. 200 mM 1 / 5	-
TUDCA (Sonstige)	FC \pm SD Konz. T / n	1,1 \pm 0,2 0,64 mM 1 / 6	1,2 \pm 0,1 1,6 mM 1 / 4	1,3 \pm 0,1 3,3 mM 1 / 8	0,2 \pm 0,0 10 mM 2 / 13	n. d. 33 mM 1 / 7	n. d. 100 mM 1 / 7

FC \pm SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; Konz.: Konzentration; T: Anzahl unabhängiger Transfektionen; n: Anzahl Messungen; n.d.: nicht detektierbar

5.3.2 Pharmakologische Chaperone

Insgesamt wurden 83 pharmakologische Chaperone untersucht (Siehe Abb. 19). Von diesen Substanzen zeigten 33 Substanzen (40 %) in dem Bioassay eine Aktivität ($FC \geq 1,5$), bei 50 (60 %) wurde keine Aktivität gemessen. Ein Großteil der untersuchten Substanzen stellten aus der Literatur bekannte Antagonisten von spannungsgesteuerten Calciumkanälen, den Dihydropyridinen (DHP) sowie deren Derivate, dar. Der Effekt von 32 DHP und 51 Nicht-DHP auf die Oberflächenexpression des mutanten $CNGA3_{E228K}$ -Kanals wurde bestimmt, dabei wurde bei 17 DHP (20 %) und 16 Nicht-DHP (19 %) eine Aktivität nachgewiesen.

Die 33 aktiven Substanzen wurden entsprechend der Höhe des erbrachten Wirkeffekts in verschiedene Klassen eingeteilt. Bei 13 DHP (41 % der DHP) und 12 Nicht-DHP (24 % der Nicht-DHP) wurden geringe Signalerhöhungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle gemessen ($1,5 \leq FC < 2$), bei je drei Substanzen der DHP (9 %) und Nicht-DHP (6 %) eine mittlere Aktivität ($2 \leq FC < 3$) und je eine Substanz aus der Gruppe der DHP (3 %) und Nicht-DHP (2 %) wiesen eine hohe Aktivität auf ($FC \geq 3$). 13 Substanzen mit geringer, drei Substanzen mit mittlerer und eine Substanz mit hoher Aktivität waren DHP.

75

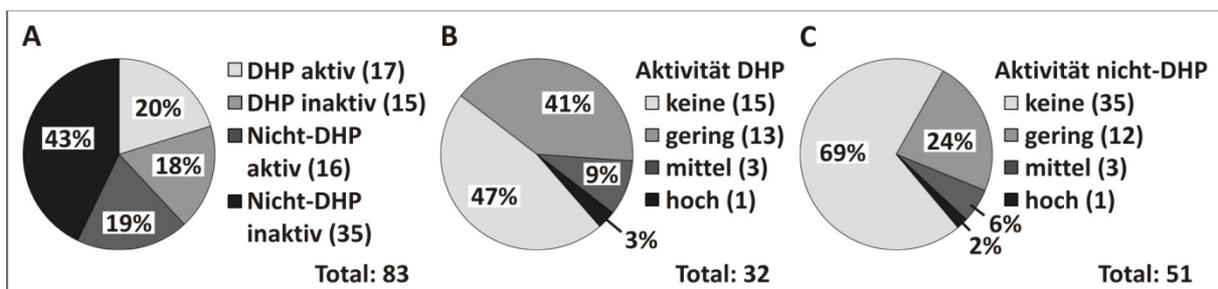


Abb. 19: Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem Screening pharmakologischer Chaperone. (A) Insgesamt wurden 83 Substanzen auf ihre Fähigkeit, den Membraneinbau der $CNGA3_{E228K}$ -Kanalmutante zu verbessern, untersucht. Die Behandlung mit 17 Dihydropyridinen (DHP) und 16 Nicht-DHP führte in dem hier durchgeführten Bioassay zu einer Steigerung des gemessenen Calciumeinstroms. Bei 15 DHP und 35 Nicht-DHP konnte keine Aktivität beobachtet werden. (B) Die aktiven Substanzen wurden nach ihrer Effekthöhe in verschiedene Gruppen eingeteilt. Von 32 DHP wiesen 13 DHP einen *fold change* (FC) von 1,5 bis 2 auf, drei DHP besaßen einen FC zwischen 2 und 3 und ein DHP einen FC von über 3. (C) Von 51 Nicht-DHP wurde bei 12 Substanzen ein FC von 1,5 bis 2, bei drei ein FC zwischen 2 und 3 und bei einer Substanz ein FC von über 3 nachgewiesen. Da beide Enantiomere des Nisoldipins mit dem Bioassay untersucht wurden, wurde das Racemat hier nicht berücksichtigt.

1.3.2.1 Das Screening von Nicht-Dihydropyridinen

Es wurden 51 Nicht-DHP mit dem Bioassay untersucht (Siehe Tab. 14).

Tab. 14: Zusammenfassung der normierten AUC der im Bioassay untersuchten Nicht-DHP. Diese wurden in mindestens vier verschiedenen Konzentrationen getestet, und bei Erreichen eines $FC \geq 1,5$ als aktiv eingestuft. Bei den aktiven Substanzen wird zwischen hoher ($FC \geq 3$), mittlerer ($2 \leq FC < 3$) und geringer Aktivität ($1,5 \leq FC < 2$) unterschieden.

Substanz		Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4	Konzentration 5	Konzentration 6
Hohe Aktivität ($FC \geq 3$)							
Amilorid	FC \pm SD Konz. T / n	1,3 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 8	1,2 \pm 0,1 10 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,2 33 μ M 2 / 8	2,0 \pm 0,4 100 μ M 2 / 8	2,5 \pm 0,4 200 μ M 2 / 8	3,8 \pm 0,9 400 μ M 2 / 8
Mittlere Aktivität ($2 \leq FC < 3$)							
Bupivacain	FC \pm SD Konz. T / n	1,2 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 14	1,2 \pm 0,2 10 μ M 2 / 15	1,2 \pm 0,2 33 μ M 2 / 15	1,5 \pm 0,3 100 μ M 2 / 15	1,8 \pm 0,4 200 μ M 2 / 15	2,0 \pm 0,3 400 μ M 2 / 15
Zatebradin	FC \pm SD Konz. T / n	1,2 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 8	1,3 \pm 0,2 10 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,2 33 μ M 2 / 8	1,8 \pm 0,3 100 μ M 2 / 8	1,9 \pm 0,4 200 μ M 2 / 8	2,5 \pm 0,3 400 μ M 2 / 8
ZD7288	FC \pm SD Konz. T / n	1,1 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 9	1,2 \pm 0,2 10 μ M 2 / 9	1,6 \pm 0,5 33 μ M 2 / 10	2,1 \pm 0,3 100 μ M 2 / 10	2,2 \pm 0,2 200 μ M 2 / 10	1,06 \pm 0,11 400 μ M 2 / 10
Geringe Aktivität ($1,5 \leq FC < 2$)							
Benzamil	FC \pm SD Konz. T / n	1,1 \pm 0,1 0,33 μ M 2 / 8	1,2 \pm 0,1 1 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 8	1,6 \pm 0,1 10 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,2 33 μ M 2 / 8	0,3 \pm 0,1 100 μ M 2 / 8
Caroverin	FC \pm SD Konz. T / n	1,3 \pm 0,1 3,3 μ M 2 / 8	1,3 \pm 0,1 10 μ M 2 / 8	1,6 \pm 0,2 20 μ M 2 / 8	1,6 \pm 0,2 33 μ M 2 / 8	1,7 \pm 0,1 50 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,1 100 μ M 2 / 8
Cisaprid	FC \pm SD Konz. T / n	1,2 \pm 0,1 0,33 μ M 2 / 8	1,2 \pm 0,1 1 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,1 3,3 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,0 10 μ M 2 / 8	1,3 \pm 0,1 33 μ M 2 / 8	1,2 \pm 0,2 100 μ M 2 / 8
2,4-Dichlorbenzamil	FC \pm SD Konz. T / n	1,5 \pm 0,2 0,33 μ M 2 / 8	1,8 \pm 0,3 1 μ M 2 / 8	1,7 \pm 0,3 3,3 μ M 2 / 8	1,1 \pm 0,2 10 μ M 2 / 8	0,3 \pm 0,1 20 μ M 2 / 8	n. d. 33 μ M 2 / 8

FC \pm SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; Konz.: Konzentration; T: Anzahl unabhängiger Transfektionen; n: Anzahl Messungen; n.d.: nicht detektierbar.

Fortsetzung Tab. 14:

Substanz		Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4	Konzentration 5	Konzentration 6
Geringe Aktivität ($1,5 \leq FC < 2$)							
Dofetilid	FC \pm SD Konz. T / n	1,1 \pm 0,1 3,3 μ M 2 / 8	1,0 \pm 0,1 10 μ M 2 / 8	1,1 \pm 0,1 33 μ M 2 / 8	1,2 \pm 0,1 100 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,2 200 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,3 400 μ M 2 / 7
E-4031	FC \pm SD Konz. T / n	1,1 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 7	1,1 \pm 0,1 10 μ M 2 / 9	1,2 \pm 0,2 33 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,2 100 μ M 2 / 9	1,4 \pm 0,1 200 μ M 2 / 8	1,7 \pm 0,2 400 μ M 2 / 9
FPL-64176	FC \pm SD Konz. T / n	1,1 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 8	1,1 \pm 0,1 10 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,2 20 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,2 33 μ M 2 / 8	1,0 \pm 0,1 50 μ M 2 / 8	0,1 \pm 0,1 100 μ M 2 / 8
Glibenclamid	FC \pm SD Konz. T / n	1,2 \pm 0,1 3,3 μ M 2 / 8	1,2 \pm 0,1 10 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,1 20 μ M 2 / 8	1,7 \pm 0,2 33 μ M 2 / 8	1,6 \pm 0,1 100 μ M 2 / 8	0,9 \pm 0,1 200 μ M 2 / 8
LOE 908	FC \pm SD Konz. T / n	1,2 \pm 0,1 0,33 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,1 1 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,1 3,3 μ M 2 / 8	1,0 \pm 0,2 10 μ M 2 / 8	0,4 \pm 0,1 20 μ M 2 / 8	0,1 \pm 0,0 33 μ M 2 / 8
Metoclopramid	FC \pm SD Konz. T / n	1,3 \pm 0,3 3,3 μ M 2 / 8	1,2 \pm 0,2 10 μ M 2 / 8	1,3 \pm 0,2 33 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,2 100 μ M 2 / 8	1,7 \pm 0,2 200 μ M 2 / 8	1,8 \pm 0,2 400 μ M 2 / 8
Midodrin	FC \pm SD Konz. T / n	1,1 \pm 0,1 3,3 μ M 2 / 8	1,1 \pm 0,1 10 μ M 2 / 8	1,2 \pm 0,2 33 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,1 100 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,2 200 μ M 2 / 8	1,7 \pm 0,2 400 μ M 2 / 8
SKF96365	FC \pm SD Konz. T / n	1,2 \pm 0,1 1 μ M 2 / 8	1,0 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,3 10 μ M 2 / 8	1,6 \pm 0,3 20 μ M 2 / 8	0,9 \pm 0,2 33 μ M 2 / 8	0,4 \pm 0,2 50 μ M 2 / 8
Inaktiv ($FC < 1,5$)							
4-Aminopyridin	FC \pm SD Konz. T / n	1,1 \pm 0,1 0,1 μ M 1 / 4	1,1 \pm 0,1 0,66 μ M 1 / 4	1,3 \pm 0,1 3,3 μ M 2 / 8	1,3 \pm 0,3 10 μ M 2 / 8	1,3 \pm 0,1 33 μ M 2 / 11	1,2 \pm 0,2 100 μ M 2 / 8

FC \pm SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; Konz.: Konzentration; T: Anzahl unabhängiger Transfektionen; n: Anzahl Messungen; n.d.: nicht detektierbar.

Fortsetzung Tab. 14:

Substanz		Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4	Konzentration 5	Konzentration 6
Inaktiv (FC < 1,5)							
Amiodaron HCl	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,1 0,33 µM 2 / 6	1,0 ± 0,1 1 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 10 µM 2 / 8	0,1 ± 0,1 33 µM 2 / 8	n. d. 100 µM 2 / 8
Astemizol	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,1 0,1 µM 2 / 8	1,1 ± 0,0 0,33 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 0,66 µM 2 / 8	1,2 ± 0,0 1 µM 2 / 8	1,2 ± 0,0 2 µM 2 / 8	0,8 ± 0,0 3,3 µM 2 / 8
Bepridil	FC ± SD Konz. T / n	1,0 ± 0,1 0,33 µM 2 / 8	1,2 ± 0,2 1 µM 2 / 8	1,3 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,2 ± 0,2 10 µM 2 / 8	0,7 ± 0,4 20 µM 2 / 8	n. d. 33 µM 2 / 8
Cinnarizin	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,1 0,33 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 1 µM 2 / 8	1,2 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,2 ± 0,2 10 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 20 µM 2 / 8	0,8 ± 0,1 40 µM 2 / 8
Clonidin HCl	FC ± SD Konz. T / n	1,0 ± 0,1 3,3 µM 2 / 7	1,0 ± 0,1 10 µM 2 / 8	1,0 ± 0,2 33 µM 2 / 8	0,9 ± 0,1 100 µM 2 / 7	-	-
Dandrolen	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,1 0,1 µM 1 / 4	1,1 ± 0,2 0,33 µM 2 / 7	1,0 ± 0,1 1 µM 2 / 7	1,04 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,00 ± 0,1 10 µM 2 / 8	0,8 ± 0,0 33 µM 1 / 4
Dequaliniumchlorid	FC ± SD Konz. T / n	0,9 ± 0,3 0,03 µM 2 / 10	1,0 ± 0,2 0,1 µM 2 / 10	1,2 ± 0,2 0,33 µM 2 / 10	1,2 ± 0,2 1 µM 2 / 10	1,0 ± 0,2 3,3 µM 2 / 11	0,1 ± 0,0 10 µM 1 / 6
Flunarizin 2HCl	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,1 0,33 µM 2 / 8	1,2 ± 0,1 1 µM 2 / 8	1,1 ± 0,3 3,3 µM 3 / 12	0,8 ± 0,3 10 µM 2 / 8	n. d. 33 µM 2 / 8	n. d. 100 µM 2 / 8
Fluspirilen	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,1 0,03 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 0,1 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 0,33 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 1 µM 2 / 8	0,6 ± 0,3 3,3 µM 2 / 8	0,3 ± 0,2 10 µM 2 / 8

FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; Konz.: Konzentration; T: Anzahl unabhängiger Transfektionen; n: Anzahl Messungen; n.d.: nicht detektierbar.

Fortsetzung Tab. 14:

Substanz		Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4	Konzentration 5	Konzentration 6
Inaktiv (FC < 1,5)							
Glipizid	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,2 ± 0,1 10 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 33 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 100 µM 2 / 8	-	-
Ibutilid	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,2 3,3 µM 2 / 8	1,1 ± 0,2 10 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 20 µM 2 / 8	0,9 ± 0,1 33 µM 2 / 8	0,9 ± 0,1 50 µM 2 / 8	0,5 ± 0,1 100 µM 2 / 8
Ivabradin	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 10 µM 2 / 8	1,2 ± 0,1 33 µM 2 / 8	1,2 ± 0,1 100 µM 2 / 8	1,3 ± 0,1 200 µM 2 / 8	1,2 ± 0,1 400 µM 2 / 8
L- <i>cis</i> -Diltiazem	FC ± SD Konz. T / n	1,0 ± 0,1 1 µM 2 / 8	0,9 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	0,8 ± 0,3 10 µM 2 / 8	0,9 ± 0,2 50 µM 2 / 8	0,8 ± 0,2 100 µM 2 / 8	0,5 ± 0,2 300 µM 2 / 8
Loperamid	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,2 0,33 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 0,66 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 1 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 2 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	0,9 ± 0,1 10 µM 2 / 8
L-type Calcium Channel Blocker	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,1 0,1 µM 2 / 8	1,0 ± 0,0 0,33 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 1 µM 2 / 8	1,1 ± 0,2 3,3 µM 3 / 12	0,9 ± 0,0 10 µM 1 / 4	0,7 ± 0,1 33 µM 1 / 4
Methoxyverapamil	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,1 0,33 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 1 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,0 ± 0,0 10 µM 2 / 8	1,0 ± 0,0 33 µM 2 / 8	0,6 ± 0,1 100 µM 2 / 8
Mibefradil	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,1 0,33 µM 2 / 8	1,2 ± 0,1 1 µM 2 / 8	1,3 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	0,8 ± 0,1 10 µM 2 / 8	0,4 ± 0,1 20 µM 2 / 8	0,1 ± 0,0 33 µM 2 / 8
Mirtazapin	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 10 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 20 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 33 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 50 µM 2 / 8	1,0 ± 0,2 100 µM 2 / 8

FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; Konz.: Konzentration; T: Anzahl unabhängiger Transfektionen; n: Anzahl Messungen; n.d.: nicht detektierbar.

Fortsetzung Tab. 14:

Substanz		Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4	Konzentration 5	Konzentration 6
Inaktiv (FC < 1,5)							
Paxilin	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,2 1 µM 1 / 4	1,1 ± 0,2 3,3 µM 2 / 8	0,9 ± 0,1 10 µM 2 / 8	0,2 ± 0,0 20 µM 1 / 4	n. d. 33 µM 2 / 8	n. d. 100 µM 2 / 8
Penfluridol	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,1 0,1 µM 2 / 8	1,1 ± 0,2 0,33 µM 2 / 8	0,9 ± 0,2 1 µM 2 / 8	0,9 ± 0,1 2 µM 2 / 8	0,8 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	n. d. 10 µM 2 / 8
Phentolamin	FC ± SD Konz. T / n	1,0 ± 0,1 0,33 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 1 µM 2 / 8	0,8 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	0,6 ± 0,1 10 µM 2 / 8	-	-
Pimozid	FC ± SD Konz. T / n	1,3 ± 0,1 0,33 µM 2 / 8	1,4 ± 0,1 1 µM 2 / 8	1,3 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	0,6 ± 0,2 10 µM 2 / 8	n. d. 20 µM 2 / 8	n. d. 33 µM 2 / 8
Quinidin	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,2 0,33 µM 2 / 8	1,1 ± 0,2 1 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,1 ± 0,3 10 µM 2 / 8	1,0 ± 0,2 33 µM 2 / 8	0,6 ± 0,1 100 µM 2 / 8
Sotalol	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,0 3,3 µM 2 / 8	1,0 ± 0,0 10 µM 2 / 8	1,0 ± 0,0 33 µM 2 / 8	0,9 ± 0,1 100 µM 2 / 8	-	-
SR33805	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,1 0,1 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 0,33 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 1 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 2 µM 2 / 8	0,8 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	0,5 ± 0,2 10 µM 2 / 8
Terfenadin	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,1 0,1 µM 1 / 4	1,3 ± 0,1 0,66 µM 1 / 4	0,8 ± 0,1 3,3 µM 3 / 13	0,2 ± 0,0 10 µM 2 / 9	n. d. 33 µM 2 / 9	n. d. 100 µM 2 / 8
Tetracain	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 10 µM 2 / 7	1,1 ± 0,2 33 µM 2 / 8	0,9 ± 0,1 100 µM 2 / 8	-	-

FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; Konz.: Konzentration; T: Anzahl unabhängiger Transfektionen; n: Anzahl Messungen; n.d.: nicht detektierbar.

Fortsetzung Tab. 14:

Substanz		Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4	Konzentration 5	Konzentration 6
Inaktiv (FC < 1,5)							
Tetraethylammoniumchlorid	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,3 3,3 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 10 µM 2 / 8	1,2 ± 0,3 33 µM 2 / 7	1,0 ± 0,2 100 µM 2 / 7	--	--
Tetrandrin	FC ± SD Konz. T / n	1,0 ± 0,0 0,33 µM 2 / 8	0,9 ± 0,0 1 µM 2 / 8	0,9 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	0,4 ± 0,0 10 µM 2 / 8	-	-
Tolbutamid	FC ± SD Konz. T / n	1,0 ± 0,1 3,3 µM 2 / 7	1,0 ± 0,1 10 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 33 µM 2 / 8	0,8 ± 0,1 100 µM 2 / 8	-	-
U-50488	FC ± SD Konz. T / n	1,0 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 10 µM 2 / 8	0,8 ± 0,1 33 µM 2 / 8	0,4 ± 0,1 100 µM 2 / 8	-	-
Verapamil HCl	FC ± SD Konz. T / n	1,0 ± 0,1 1 µM 2 / 11	1,1 ± 0,1 5 µM 2 / 11	1,0 ± 0,1 10 µM 2 / 11	1,0 ± 0,1 15 µM 2 / 11	0,8 ± 0,1 30 µM 2 / 11	0,3 ± 0,1 200 µM 2 / 11
YS-035 HCl	FC ± SD Konz. T / n	1,3 ± 0,2 3,3 µM 2 / 8	1,2 ± 0,1 10 µM 2 / 8	1,2 ± 0,2 33 µM 2 / 8	1,3 ± 0,2 100 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 200 µM 2 / 8	0,9 ± 0,1 400 µM 2 / 8
Zonisamid	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,1 3,3 µM 2 / 7	1,0 ± 0,1 10 µM 2 / 7	1,0 ± 0,1 33 µM 2 / 7	0,8 ± 0,2 100 µM 2 / 7	-	-

FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; Konz.: Konzentration; T: Anzahl unabhängiger Transfektionen; n: Anzahl Messungen; n.d.: nicht detektierbar.

ERGEBNISSE

Die Nicht-DHP können in verschiedene Substanzklassen eingeteilt werden. Diese sind die Sulfonylharnstoffe (3 Substanzen), N-Phenylsulfonamide (4 Substanzen), Substanzen mit Dimethoxybenzolgruppen (5 Substanzen), oder Fluorophenylgruppen (6 Substanzen) sowie die Pyrazin- und Benzamide (5 Substanzen). Die übrigen 28 Substanzen lassen sich nicht ohne weiteres in gemeinsame Substanzklassen einordnen.

Pyrazinamide und Benzamide

Die untersuchten Substanzen Amilorid, Benzamil und 2,4-Dichlorbenzamil stellen Pyrazinamide dar und das Metoclopramid sowie das Cisaprid sind Benzamide. Der höchste FC aller Nicht-DHP wurde bei dem Amilorid gemessen. 400 μ M des Amilorid führten zu einer 3,8-fachen Erhöhung des Lumineszenzsignals gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Siehe Abb. 20 (A)). Das Amilorid besteht aus einem Pyrazinring mit zwei Aminogruppen an C3 und C5, einem Chlorid an C6 und einem längeren Rest an C2 (Siehe Abb. 20 (D)). Daneben wurde auch bei den weiteren Pyrazinamiden Aktivität beobachtet (Siehe Abb. 20 (B) und Abb. 20 (C)). Die FC_{max} von Benzamil und 2,4-Dichlorbenzamil lagen bei Werten von 1,6 und 1,8, verglichen mit dem Amilorid wurden dafür aber deutlich geringere Konzentrationen benötigt. Bei Benzamil wurden 10 μ M der Substanz eingesetzt, um das FC_{max} zu erreichen, bei 2,4-Dichlorbenzamil reichten 1 μ M aus. Sowohl das Benzamil als auch das 2,4-Dichlorbenzamil besitzen verglichen mit dem Amilorid einen längeren Rest an C2 mit einer zusätzlichen Benzylgruppe, bei letzterem sind am dem Phenylring zwei Chloratome gebunden.

Die Benzamide Metoclopramid und Cisaprid besitzen anstelle des Pyrazinringes einen Benzolring sowie eine Methoxygruppe anstelle einer Aminogruppe (Siehe 9.2). Nach Behandlung mit dem Cisaprid, welches gegenüber dem Metoclopramid über einen deutlich längeren Rest verfügt, wurde ein FC von 1,5 bei einer Konzentration von 10 μ M erhalten, bei einer Konzentration von 400 μ M wurde das höchste Signal bei Metoclopramid mit einem FC von 1,8 gemessen – dieselbe Konzentration, die auch bei dem Amilorid für das Erreichen des höchsten Signals eingesetzt werden musste.

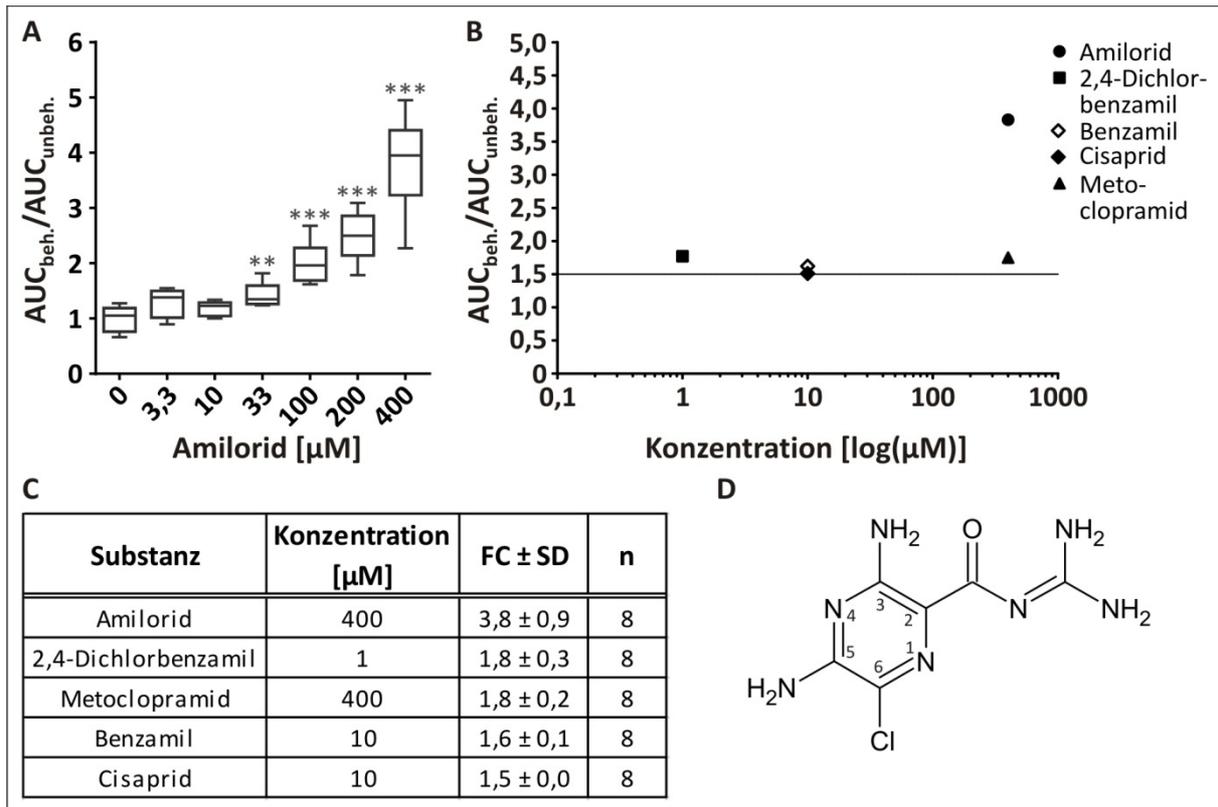


Abb. 20: Untersuchung der Pyrazinamide und Benzamide. (A) Ab einer Konzentration von 33 μM Amilorid wurde ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Lumineszenzsignals gemessen, das höchste Signal wurde bei 400 μM Amilorid mit einem FC von 3,8 erfasst. (B) Die maximal gemessenen Lumineszenzerhöhungen nach Behandlung mit den Pyrazinamiden Amilorid (Kreis), Benzamil (offene Raute), 2,4-Dichlorbenzamil (Quadrat) sowie den Benzamiden Cisaprid (Raute) und Metoclopramid (Dreieck) gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Alle Substanzen wiesen Aktivität auf, da deren maximale FC einen FC von $\geq 1,5$ (schwarze Trennlinie) besaßen. (C) Zusammenfassung der maximal gemessenen Lumineszenzsignale, der dafür benötigten Substanzkonzentrationen und die Anzahl der durchgeführten Messungen für die Pyrazinamide und Benzamide. (D) Strukturformel des Amilorids. An dem Pyrazinring sind zwei Aminogruppen (C3 und C5), ein Chloridatom (C6) und eine Carbonsäureamidgruppe am C2 gebunden. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

Substanzen mit Fluorophenylgruppen

Das Flunarizin, Penfluridol, Pimozid und Fluspirilen stellten die Substanzen mit Fluorophenylgruppe dar. Aufgrund ihrer ähnlichen Struktur wurden ebenfalls das Cinnarizin und das Terfenadin in diese Gruppe eingeteilt, obwohl beiden Substanzen die Fluoratome an den Phenylgruppen fehlen. Bei Fluspirilen wurde bis zu einer Konzentration von 1 μM kein Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle detektiert, bei höheren Konzentrationen wurde eine Reduktion des Lumineszenzsignals durch zytotoxische Effekte festgestellt (Siehe Abb. 21 (A)), und das Fluspirilen war somit inaktiv. Auch die anderen Substanzen dieser Gruppe wiesen einen FC kleiner als 1,5 auf (Siehe Abb. 21 (B) und Abb. 21 (C)).

ERGEBNISSE

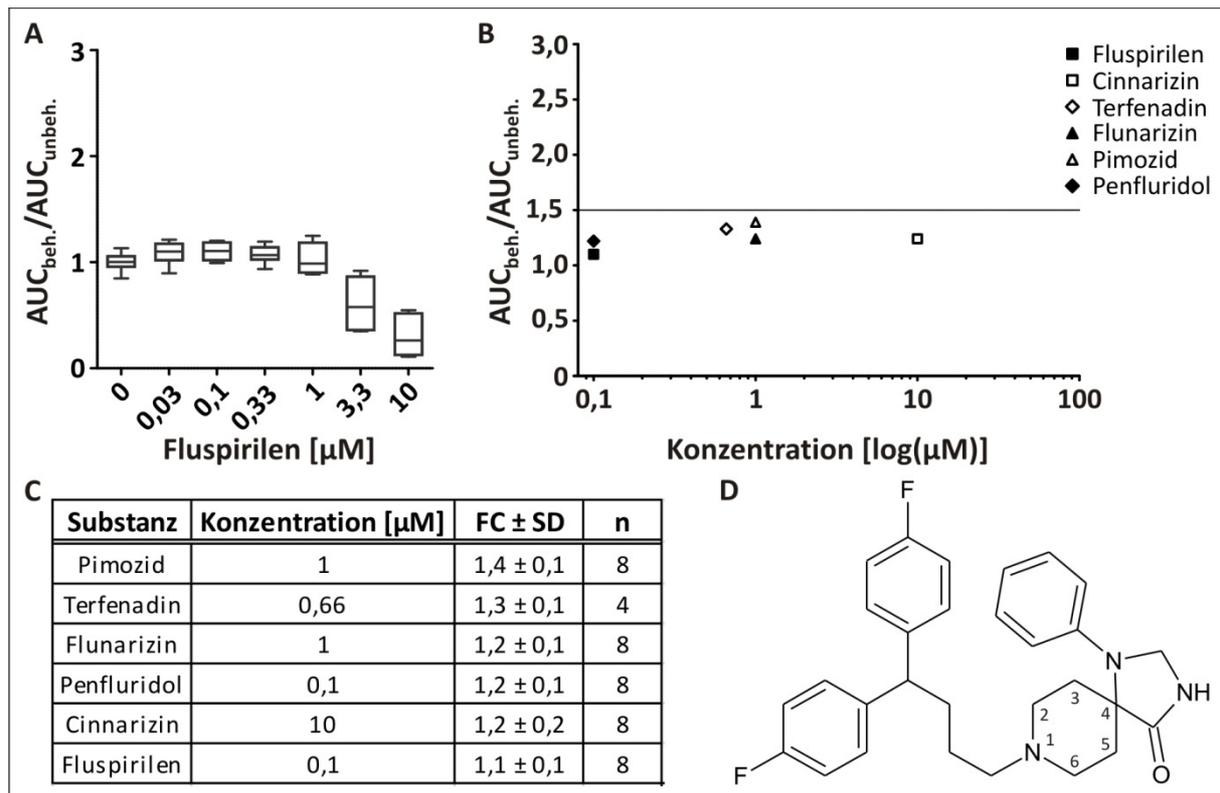


Abb. 21: Ergebnisse des Substanzscreenings von Substanzen, welche Fluorphenylgruppen tragen. Aufgrund der Ähnlichkeit der Strukturformeln wurden zusätzlich das Cinnarizin und Fluspirilen in diese Substanzgruppe aufgenommen. (A) Ergebnis der Untersuchung verschiedener Fluspirilen-Konzentrationen. Niedrige Konzentrationen bis zu 1 μM wiesen keinen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle auf. Bei höheren Konzentrationen wurde das Auftreten toxischer Effekte bemerkt. Somit zeigte das Fluspirilen keine Aktivität. (B) Die maximal gemessenen Lumineszenzerhöhungen nach Behandlung mit Fluspirilen (Quadrat), Cinnarizin (offenes Quadrat), Terfenadin (offene Raute), Flunarizin (Dreieck), Pimozid (offenes Dreieck) und Penfluridol (Raute) gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Alle Substanzen besaßen einen FC kleiner als 1,5 (schwarze Trennlinie) und waren somit inaktiv. (C) Zusammenfassung der maximalsten FC Werte, der dazu benötigten Konzentration der Substanz und der Anzahl an Messwerten für die Substanzen mit Fluorphenylgruppe. (D) Struktur des Fluspirilens. Das zentrale Piperidin besitzt an dem N1 eine 4,4-Bis(4-fluorphenyl)butylgruppe. Die über den Alkylrest gebundenen Phenylgruppen sind charakteristisch für diese Substanzgruppe. FC \pm SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

Die Gemeinsamkeiten in der Struktur dieser Substanzen wird anhand des Fluspirilens verdeutlicht (Siehe Abb. 21 (D)). Das Fluspirilen besteht aus einem Piperidin, dessen Stickstoffatom eine 4,4-Bis(4-fluorphenyl)butylgruppe bindet. Andere Substanzen dieser Gruppe besitzen anstelle des Piperidins ein Piperazin, welches über eine Kohlenwasserstoffkette unterschiedlicher Länge mit den zwei Phenylresten verbunden ist. An dem C4 der Piperidine bzw. dem N4 der Piperazine sind unterschiedliche Reste gebunden.

Substanzen mit Dimethoxybenzolgruppen

Zu den Substanzen mit endständigen Dimethoxybenzolgruppen gehören das Zatebradin, Verapamil, Methoxyverapamil, Ivabradin und YS-035. Bei Zatebradin wurde ab einer Konzentration von 10 μM ein signifikanter Anstieg des Lumineszenzsignals detektiert, das höchste Signal mit einem FC von 2,5 wurde bei einer Konzentration von 400 μM gemessen (Siehe Abb. 22 (A)). Das Zatebradin stellt die einzige aktive Substanz dieser Gruppe dar, da die anderen Substanzen nicht einen FC_{max} von 1,5 erreichen (Siehe Abb. 22 (B) und Abb. 22 (C)). Wie die meisten Substanzen dieser Gruppe besitzt das Zatebradin zwei Dimethoxybenzolgruppen, welche über eine hydrophobe Kette bestehend aus 5 bis 7

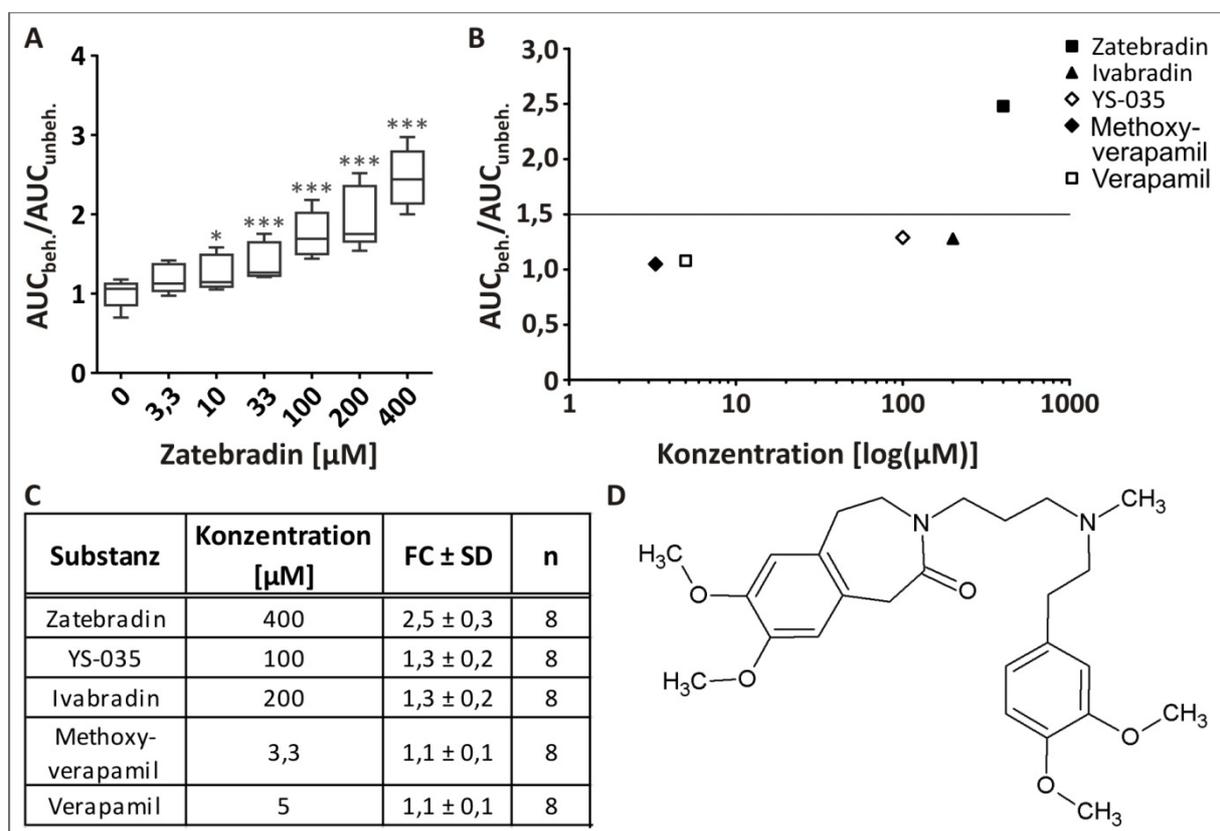


Abb. 22: Ergebnis des Substanzscreenings von Substanzen mit Dimethoxybenzolgruppe. (A) Ergebnis nach Behandlung mit mehreren Konzentrationen des Zatebradins. Ab einer Konzentration von 10 μM wurde eine statistisch signifikante Erhöhung des Lumineszenzsignals gemessen. (B) Die maximal gemessenen Lumineszenzerhöhungen nach Behandlung mit Zatebradin (Quadrat), Ivabradin (Dreieck), YS-035 (offene Raute), Methoxyverapamil (Quadrat) und Verapamil (offenes Quadrat) gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Außer bei Zatebradin wurde bei den anderen Substanzen keine Aktivität gemessen, da der FC niedriger als 1,5 (schwarze Trennlinie) war. (C) Zusammenfassung der maximal gemessenen Lumineszenzsignale für die Substanzen mit Dimethoxybenzolgruppe sowie der dafür benötigten Konzentrationen und die Anzahl an Messwerten. (D) Die Struktur des Zatebradins besteht aus zwei Dimethoxybenzolgruppen, welche über einen Azepanring und einer Kette von 6 Kettengliedern miteinander verbunden sind. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$. FC \pm SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

ERGEBNISSE

Kettengliedern miteinander verbunden sind und weitere zyklische Reste enthalten können (Siehe Abb. 22 (D)). Nur das Methoxyverapamil besitzt neben einer Dimethoxybenzol- eine Trimethoxybenzolgruppe.

Die N-Phenylsulfonamide

Das E-4031 gehört zu der Gruppe der N-Phenylsulfonamide. Nach Behandlung mit 33 μM oder höheren Konzentrationen wurden signifikante Erhöhungen der Lumineszenzsignale gemessen (Siehe Abb. 23 (A)). Das höchste Signal wurde bei einer Konzentration von 400 μM mit einem FC von 1,7 erhalten. Zu den N-Phenylsulfonamiden zählen auch das Ibutilid, das Sotalol und das Dofetilid. Von diesen drei Substanzen wurde bei dem Dofetilid Aktivität in dem Bioassay gemessen, das Ibutilid und das Sotalol wiesen FC Werte unter 1,5 auf. Die

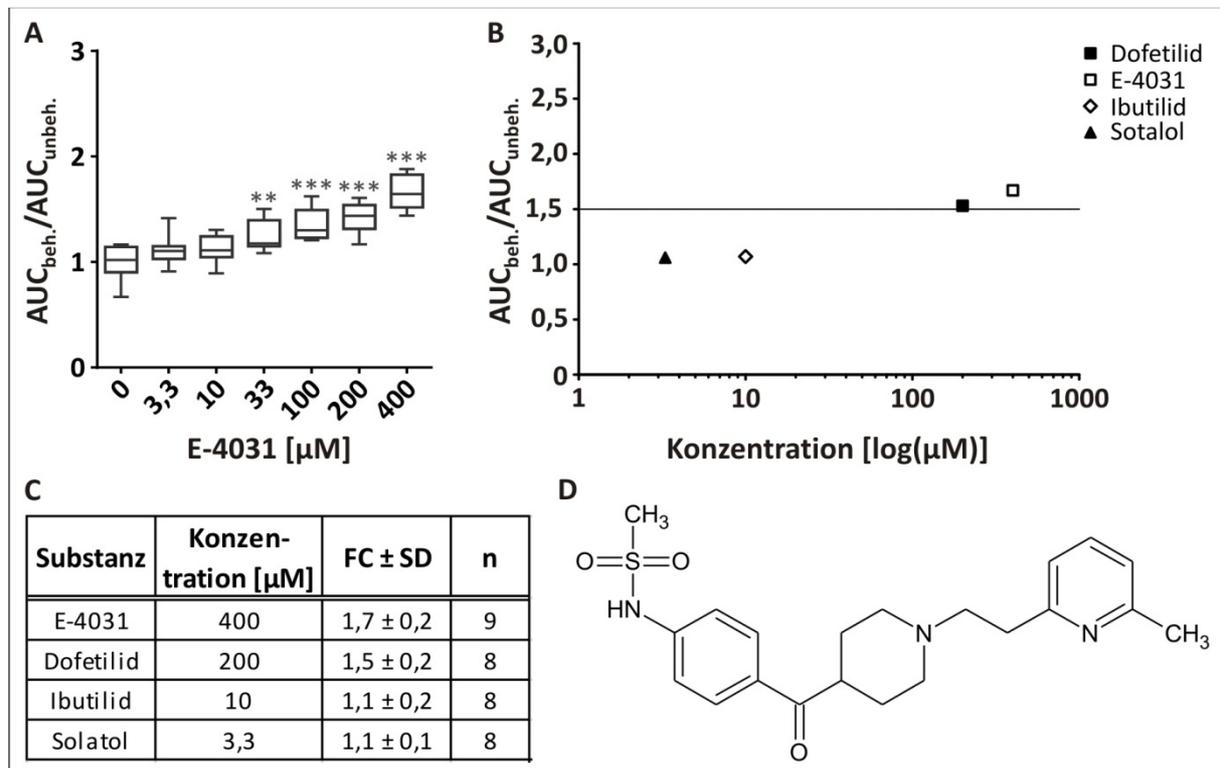


Abb. 23: Screeningergebnisse der N-Phenylsulfonamide. (A) Das E-4031 wies das höchste Lumineszenzsignal bei einer Konzentration von 400 μM auf. Ab einer Konzentration von 33 μM wurde eine statistisch signifikante Erhöhung des Lumineszenzsignals gegenüber der unbehandelte Kontrolle gemessen. (B) Die maximal gemessenen Lumineszenzerhöhungen nach Behandlung mit Dofetilid (Quadrat), E-4031 (offenes Quadrat), Ibutilid (offene Raute) und Sotalol (Dreieck) gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Bei den Substanzen E-4031 und Dofetilid wurde Aktivität nachgewiesen, Sotalol und Ibutilid waren mit einem FC kleiner als 1,5 (schwarze Trennlinie) inaktiv. (C) Zusammenfassung der Ergebnisse aus der Untersuchung der N-Phenylsulfonamide. Dargestellt sind die FC_{max} , die dafür benötigten Konzentrationen und die Anzahl der Messungen. (D) Strukturformel des Dofetilids, welches zwei N-Phenylsulfonamidgruppen, welche über eine Kette bestehend aus sechs Kettengliedern miteinander verbunden sind. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. FC \pm SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

Behandlung mit Dofetilid führte zu einem FC_{max} von 1,5 bei einer Konzentration von 200 μM , das Lumineszenzsignal war somit geringfügig kleiner als bei E-4031, wobei die benötigte Konzentration halb so hoch war (Siehe Abb. 23 (B) und Abb. 23 (C)).

Alle Substanzen besitzen eine endständige N-Phenylsulfonamidgruppe, die daran gebundenen Reste sind aber sowohl in ihrer Länge als auch in ihren chemischen Eigenschaften unterschiedlich. Das in Abb. 23 (D) dargestellte E-4031 besitzt einen längeren Rest mit einem Pyridin- und einem Piperidinring. Nur das Dofetilid hat zwei N-Phenylsulfonamidgruppen, welche mit einer Kette bestehend aus 6 Kettengliedern miteinander verbunden sind. Die beiden inaktiven Substanzen Sotalol und Ibutilid besitzen einen längeren nicht-aromatischen Rest bestehend aus 5 bzw. 12 Kettengliedern. (Siehe 9.2).

Die Sulfonylharnstoffe

Die Gruppe der Sulfonylharnstoffe besteht aus dem Glibenclamid, dem Glipizid sowie dem Tolbutamid. Aus dieser Gruppe wies nur das Glibenclamid Aktivität auf (Siehe Abb. 24 (A)). Bereits bei 3,3 μM Glibenclamid, der niedrigsten Konzentration, die mit dem Bioassay untersucht wurde, wurde bereits eine signifikante Erhöhung des Lumineszenzsignals gegenüber der unbehandelten Kontrolle gemessen. Das Signalmaximum lag bei einer Konzentration von 33 μM und einem FC von 1,7. Bei Glipizid und Tolbutamid lag der maximale FC bei einem Wert von 1,2 und 1,0, somit besaßen beide Substanzen keine Aktivität (Siehe Abb. 24 (B) und Abb. 24 (C)).

In Abb. 24 (D) ist die Strukturformel des Glibenclamids dargestellt. Das Stickstoffatom des Sulfonylharnstoffs bindet einen Cyclohexanring, die Sulfonylgruppe bindet einen längeren, aromatischen Rest mit einer Chlormethoxybenzoylgruppe am Ende. Glipizid besitzt eine ähnliche Struktur wie das Glibenclamid, weist allerdings ein endständiges Methylpyrazin auf. Das Tolbutamid besitzt ein wesentlich kleineres Molekülgerüst mit kurzen Alkylgruppen an beiden Enden des Sulfonylharnstoffes (Siehe 9.2).

ERGEBNISSE

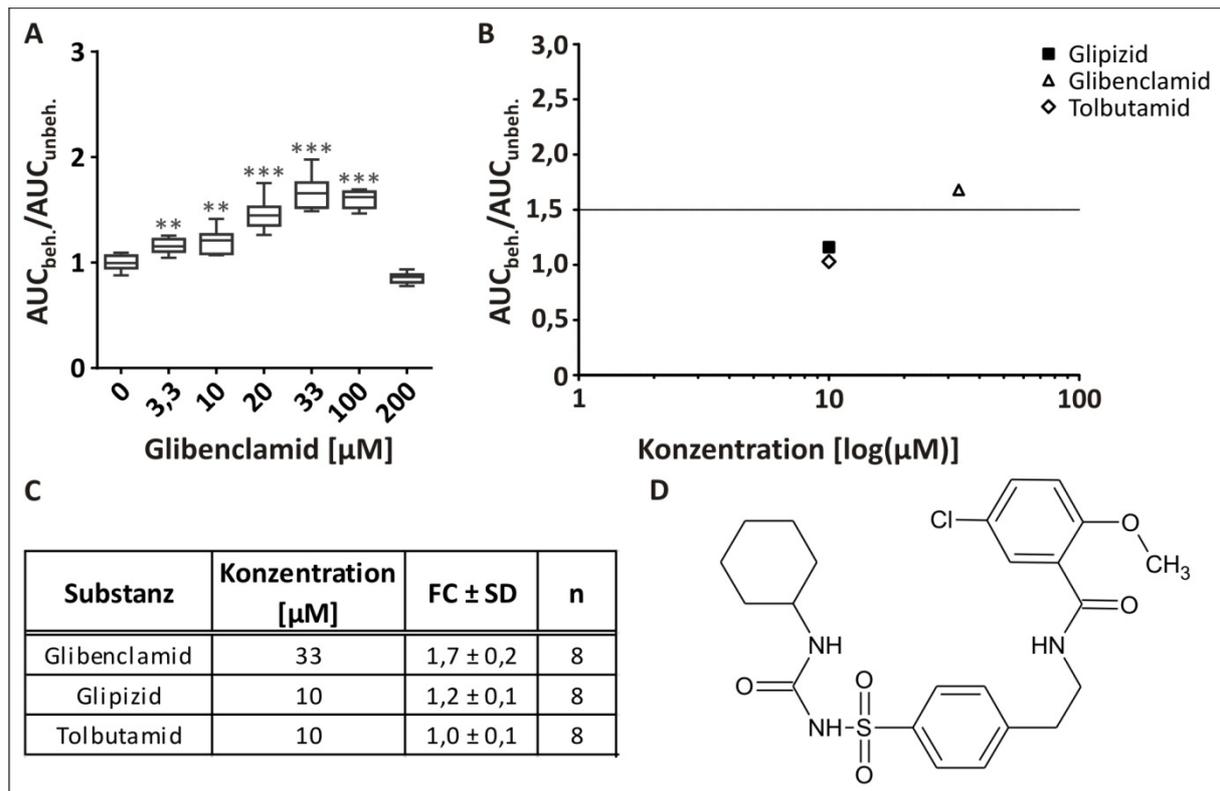


Abb. 24: Ergebnis des Substanzscreenings der Substanzen mit Sulfonylharnstoffgruppen. (A) Lumineszenzsignale nach Behandlung mit mehreren Konzentrationen des Glibenclamids. Ab 3,3 μM wurde eine signifikante Erhöhung des Lumineszenzsignals gegenüber der unbehandelten Kontrolle gemessen, das maximale Signal wurde bei einer Konzentration von 33 μM Glibenclamid erzielt. Höhere Konzentrationen führen zu einer Reduktion des Signals. (B) Die maximal gemessenen Lumineszenzerhöhungen nach Behandlung mit Glipizid (Quadrat), Glibenclamid (offenes Dreieck) und Tolbutamid (offene Raute) gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Aktivität wurde nur bei dem Glibenclamid gefunden, Glipizid und Tolbutamid besaßen eine FC kleiner als 1,5 (schwarze Trennlinie). (C) Zusammenfassung der detektierten Signalmaxima unter Angabe der eingesetzten Konzentration und der Anzahl an Messungen für die Sulfonylharnstoffe. (D) Strukturformel des Glibenclamids. Das Stickstoffatom der Sulfonylharnstoffgruppe bindet einen Cyclohexanring, die Sulfonylgruppe einen längeren Rest mit zwei aromatischen Kohlenwasserstoffen. **: p<0,01; ***: p<0,001. FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

Weitere Substanzen mit Aktivität

Unter den restlichen Nicht-DHP waren 21 inaktive Substanzen und sieben Substanzen, darunter das Bupivacain, Caroverin, FPL64176, LOE 908, Midodrin, SKF96365 und das ZD7288, welche Aktivität aufwiesen. Von diesen sieben Substanzen wurden die höchsten FC bei ZD7288 gemessen (Siehe Abb. 25 (A)). Ab einer Konzentration von 10 μM wurde eine signifikante Erhöhung des Lumineszenzsignals gegenüber der unbehandelten Kontrolle erfasst. Das Signalmaximum mit einem FC von 2,2 wurde bei einer Konzentration von 200 μM erreicht. Bei 400 μM ZD7288 wurde kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle festgestellt.

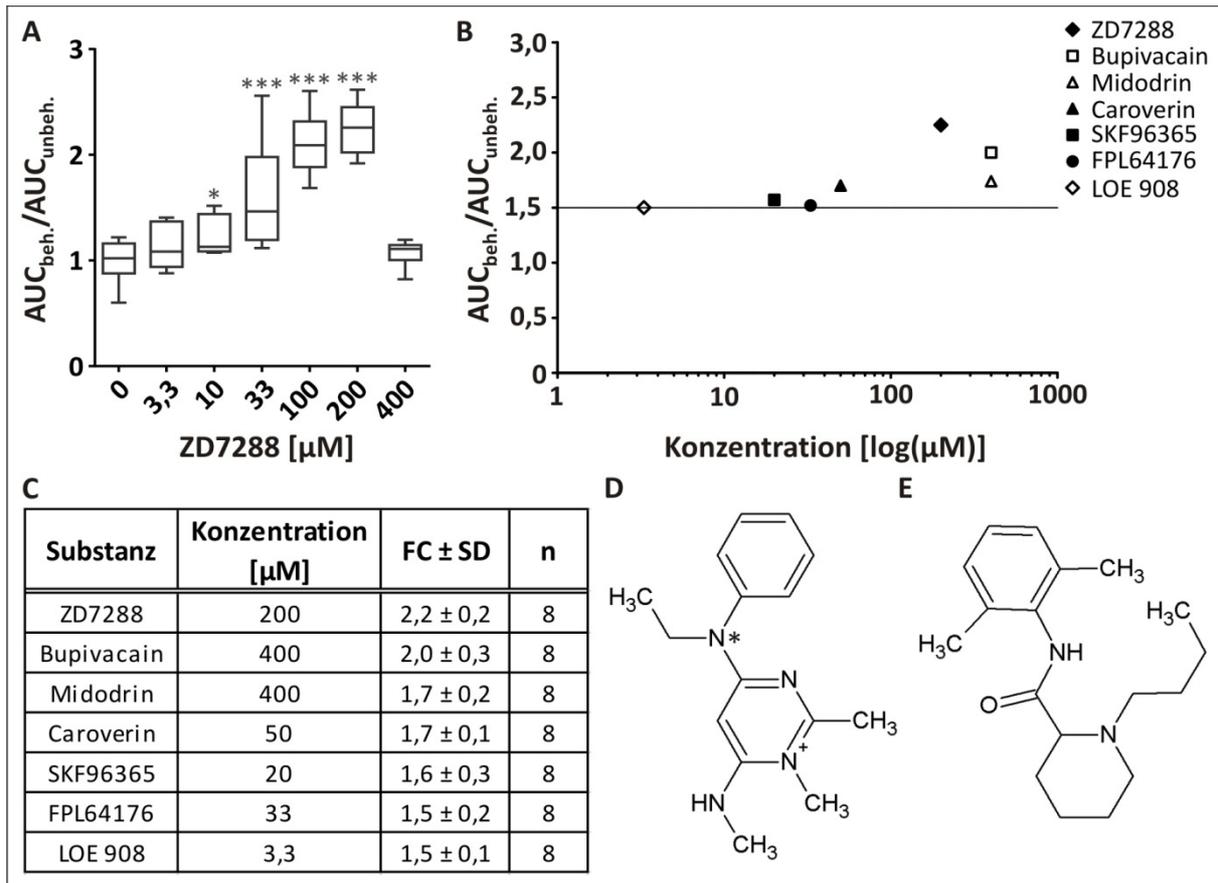


Abb. 25: Screeningergebnisse aktiver Substanzen mit heterogener Molekülstruktur. (A) Die Behandlung mit ZD7288 führte ab Konzentrationen von 10 μM zu einer signifikanten Erhöhung des Lumineszenzsignals, bis das Signalmaximum bei einer Konzentration von 200 μM erreicht wurde. Bei 400 μM wies das Lumineszenzsignal keinen Unterschied gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf. (B) Die maximal gemessenen Lumineszenzerhöhungen nach Behandlung mit ZD7288 (Raute), Bupivacain (offenes Quadrat), Midodrin (offenes Dreieck), Caroverin (Dreieck), SKF96365 (Quadrat), FPL64176 (Kreis) und LOE 908 (offene Raute) gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Da der FC dieser Substanzen einen Wert von 1,5 (schwarze Trennlinie) oder höher betrug, wurden diese Substanzen als aktiv klassifiziert. (C) Zusammenfassung der FC_{max} , der dabei verwendeten Konzentration der Substanzen und der Anzahl an Messungen für die sieben aktiven Substanzen mit heterogener Molekülstruktur. (D) Strukturformel des ZD7288, welches aus einem Pyrimidinring, zwei Aminogruppen und eine N-Phenylgruppe besteht. Das chirale Zentrum ist mit einem (*) markiert. (E) Strukturformel des Bupivacains bestehend aus einem Piperidinring mit Butylrest an dem Stickstoffatom sowie einer Amidgruppe, welche eine 2,6-Dimethylphenylgruppe bindet. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$. FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

Die Signalmaxima der anderen aktiven Substanzen sind in Abb. 25 (B) und Abb. 25 (C) dargestellt. Bupivacain und Midodrin wiesen bei Konzentrationen von 400 μM das Signalmaximum mit FC von 2,0 bzw. 1,7 auf. Bei der doppelten Konzentration lagen somit die FC_{max} niedriger als bei ZD7288. Konzentrationen im Bereich von 3,3 μM bis 50 μM wurden für die Substanzen LOE 908, FPL64176, SKF96365 und Caroverin benötigt, die Signalmaxima lagen bei diesen Substanzen mit FC Werten von 1,5 bis 1,7 niedriger als bei ZD7288. Das

ERGEBNISSE

ZD7288 und das Bupivacain lieferten somit in dieser Gruppe die höchsten FC_{max} . Das ZD7288 besteht aus einem Pyrimidinring mit zwei gebundenen Aminogruppen und einem N-Phenylrest (Siehe Abb. 25 (D)). Das Bupivacain setzt sich aus einem N-Butylpiperidin mit einer Amidgruppe sowie einer 2,6-Dimethylphenylgruppe zusammen (Siehe Abb. 25 (E)). Die Strukturformeln der anderen Substanzen sind im Anhang abgebildet (Siehe 9.2).

1.3.2.2 Untersuchung von Dihydropyridinen

Die Dihydropyridine bestehen aus einem heterozyklischen, aromatischen Ring, an welchem zwei Wasserstoffatome in para-Stellung gebunden sind. Verschiedene Substituenten sind an dem Ring gebunden, typisch für die meisten Antagonisten von spannungsgesteuerten Calciumkanälen sind die zwei Estergruppen an Position 3 und 5 des Dihydropyridinringes, zwei Methylgruppen an Position 2 und 6 und eine kopfständige Nitrobenzolgruppe (Siehe Abb. 26). Viele Dihydropyridine besitzen chirale Zentren, welche auftreten, wenn die Reste beider Estergruppen unterschiedlich sind.

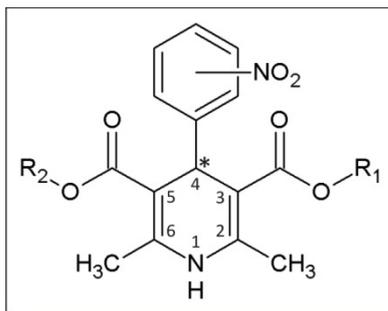


Abb. 26: Aufbau der meisten Dihydropyridinantagonisten von spannungsgesteuerten Calciumkanälen. Der heterozyklische Dihydropyridinring ist häufig mit zwei Methylgruppen, zwei Estergruppen, zwei Wasserstoffatomen in para-Stellung sowie einer kopfständigen Nitrobenzolgruppe substituiert. Der Stern (*) markiert das Kohlenstoffatom, welches bei Vorhandensein zweier unterschiedlicher Reste R1 und R2 an den Estergruppen ein chirales Zentrum darstellt.

Es wurden zunächst 17 DHP untersucht, darunter 14 bekannte Antagonisten von spannungsgesteuerten Calciumkanälen, welche durch eine Literaturrecherche ausgewählt wurden, und drei Derivate des Nifedipins (JFD03311, BTB14326, RJC03435). Bei der Untersuchung dieser 17 DHP wurde eine Substanz mit hoher, eine Substanz mit mittlerer und 6 Substanzen mit geringer Aktivität identifiziert (Siehe Tab. 15).

In einem zweiten Versuchsansatz wurden unter Rücksprache mit Charlotta Schärfe und Dr. Jens Krüger von der Arbeitsgruppe *Applied Bioinformatics* in Tübingen 16 weitere DHP ausgewählt und getestet, um Informationen über Strukturmerkmale zu erhalten, die für die Korrektur von mutanten CNGA3-Kanälen wichtig sind. Es wurden ein DHP mit hoher, 2 DHP mit mittlerer und 7 DHP mit geringer Aktivität mit dem Bioassay gefunden (Siehe Tab. 16).

Tab. 15: Zusammenfassung der normierten AUC der im Bioassay untersuchten Dihydropyridine, welche im initialen Substanzscreening untersucht wurden. Diese wurden in mindestens vier verschiedenen Konzentrationen getestet, und bei Erreichen eines $FC \geq 1,5$ als aktiv eingestuft. Bei den aktiven Substanzen wird zwischen hoher ($FC \geq 3$), mittlerer ($2 \leq FC < 3$) und geringer Aktivität ($1,5 \leq FC < 2$) unterschieden.

Substanz		Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4	Konzentration 5	Konzentration 6
Hohe Aktivität ($FC \geq 3$)							
Nisoldipin	FC \pm SD Konz. T / n	1,8 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 8	3,1 \pm 0,7 10 μ M 2 / 8	4,8 \pm 1,0 20 μ M 2 / 8	2,4 \pm 0,7 33 μ M 2 / 8	0,4 \pm 0,2 50 μ M 2 / 8	n. d. 100 μ M 2 / 8
Mittlere Aktivität ($2 \leq FC < 3$)							
JFD03311	FC \pm SD Konz. T / n	1,5 \pm 0,3 1 μ M 2 / 14	1,7 \pm 0,4 5 μ M 2 / 15	2,1 \pm 0,3 10 μ M 2 / 15	2,4 \pm 0,2 15 μ M 2 / 15	1,5 \pm 0,4 30 μ M 2 / 15	0,4 \pm 0,1 50 μ M 2 / 15
Geringe Aktivität ($1,5 \leq FC < 2$)							
Benidipin	FC \pm SD Konz. T / n	1,2 \pm 0,1 0,1 μ M 2 / 8	1,3 \pm 0,2 0,33 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,2 1 μ M 2 / 8	1,8 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,4 10 μ M 2 / 8	0,3 \pm 0,2 33 μ M 2 / 8
Cilnidipin	FC \pm SD Konz. T / n	1,2 \pm 0,2 0,1 μ M 2 / 8	1,1 \pm 0,1 0,33 μ M 2 / 8	1,3 \pm 0,2 1 μ M 2 / 8	1,7 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,3 10 μ M 2 / 8	0,2 \pm 0,0 20 μ M 2 / 8
Isradipin	FC \pm SD Konz. T / n	1,2 \pm 0,1 3,3 μ M 2 / 12	1,3 \pm 0,3 10 μ M 2 / 12	1,3 \pm 0,3 20 μ M 2 / 12	1,5 \pm 0,2 33 μ M 2 / 12	1,3 \pm 0,1 50 μ M 2 / 11	n. d. 100 μ M 2 / 12
Nicardipin	FC \pm SD Konz. T / n	1,2 \pm 0,1 0,33 μ M 2 / 8	1,2 \pm 0,1 1 μ M 2 / 8	1,6 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 8	1,8 \pm 0,2 10 μ M 2 / 8	1,6 \pm 0,1 20 μ M 2 / 8	0,7 \pm 0,1 33 μ M 2 / 8
Nifedipin	FC \pm SD Konz. T / n	1,4 \pm 0,1 12,5 μ M 2 / 7	1,3 \pm 0,1 25 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,2 50 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,2 75 μ M 2 / 8	1,6 \pm 0,1 100 μ M 2 / 8	0,9 \pm 0,2 200 μ M 2 / 8
Niguldipin	FC \pm SD Konz. T / n	1,5 \pm 0,2 0,33 μ M 2 / 8	1,6 \pm 0,1 0,66 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,2 1 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,1 2 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 8	0,3 \pm 0,1 10 μ M 2 / 8

FC \pm SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; Konz.: Konzentration; T: Anzahl unabhängiger Transfektionen; n: Anzahl Messungen; n.d.: nicht detektierbar.

Fortsetzung Tab. 15:

Substanz		Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4	Konzentration 5	Konzentration 6
Inaktiv (FC < 1,5)							
Amlodipin	FC ± SD Konz. T / n	1,0 ± 0,1 0,1 µM 1 / 4	0,9 ± 0,1 0,67 µM 1 / 4	0,9 ± 0,0 1 µM 2 / 8	0,7 ± 0,1 3,3 µM 2 / 9	0,5 ± 0,1 10 µM 2 / 8	n. d. 33 µM 2 / 8
Azelnidipin	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,0 0,1 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 0,33 µM 2 / 8	1,2 ± 0,2 1 µM 2 / 8	0,9 ± 0,0 3,3 µM 2 / 8	n. d. 10 µM 2 / 8	n. d. 33 µM 2 / 8
BTB14326	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,1 3,3 µM 1 / 4	1,1 ± 0,1 10 µM 2 / 10	1,2 ± 0,3 33 µM 2 / 10	0,9 ± 0,1 100 µM 2 / 10	-	-
Efonidipin HCl Monoethanolat	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,2 0,33 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 1 µM 2 / 8	1,2 ± 0,2 3,3 µM 2 / 8	1,1 ± 0,2 10 µM 2 / 8	0,1 ± 0,0 33 µM 2 / 8	0,1 ± 0,0 100 µM 2 / 8
Felodipin	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,0 1 µM 2 / 7	1,1 ± 0,1 3,3 µM 2 / 7	0,9 ± 0,2 10 µM 2 / 7	0,2 ± 0,1 20 µM 2 / 7	-	-
Nilvadipin	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,3 0,33 µM 2 / 8	1,1 ± 0,2 1 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,2 ± 0,2 7,5 µM 2 / 9	1,2 ± 0,2 15 µM 2 / 9	0,8 ± 0,2 33 µM 2 / 8
Nimodipin	FC ± SD Konz. T / n	1,1 ± 0,1 1 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 3,3 µM 2 / 9	1,1 ± 0,1 10 µM 2 / 9	1,4 ± 0,1 20 µM 2 / 9	1,2 ± 0,1 33 µM 2 / 9	0,5 ± 0,1 50 µM 2 / 9
Nitrendipin	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,0 3,3 µM 2 / 8	1,2 ± 0,1 10 µM 2 / 8	1,4 ± 0,1 20 µM 2 / 8	1,4 ± 0,3 33 µM 2 / 8	1,2 ± 0,3 50 µM 2 / 8	n. d. 100 µM 2 / 8
RJC03435	FC ± SD Konz. T / n	1,3 ± 0,1 3,3 µM 1 / 4	1,1 ± 0,2 10 µM 2 / 9	1,0 ± 0,2 33 µM 2 / 9	0,8 ± 0,2 100 µM 2 / 9	-	-

FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; Konz.: Konzentration; T: Anzahl unabhängiger Transfektionen; n: Anzahl Messungen; n.d.: nicht detektierbar.

Tab. 16: Zusammenfassung der normierten AUC der im Bioassay untersuchten Dihydropyridine. Diese wurden in mindestens vier verschiedenen Konzentrationen getestet, und bei Erreichen eines $FC \geq 1,5$ als aktiv eingestuft. Bei den aktiven Substanzen wird zwischen hoher ($FC \geq 3$), mittlerer ($2 \leq FC < 3$) und geringer Aktivität ($1,5 \leq FC < 2$) unterschieden.

Substanz		Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4	Konzentration 5	Konzentration 6
Hohe Aktivität ($FC \geq 3$)							
Nisoldipin (-)	FC \pm SD Konz. T / n	2,0 \pm 0,2 3,3 μ M 2 / 8	3,2 \pm 0,3 10 μ M 2 / 8	2,9 \pm 0,5 20 μ M 2 / 8	0,8 \pm 0,1 33 μ M 2 / 8	0,1 \pm 0,0 50 μ M 2 / 8	n. d. 100 μ M 2 / 8
Mittlere Aktivität ($2 \leq FC < 3$)							
OSSK_390157	FC \pm SD Konz. T / n	1,7 \pm 0,1 0,5 μ M 1 / 4	1,6 \pm 0,1 1,5 μ M 2 / 8	1,8 \pm 0,4 5 μ M 2 / 8	2,2 \pm 0,3 15 μ M 2 / 8	2,2 \pm 0,6 33 μ M 2 / 8	1,9 \pm 0,4 100 μ M 2 / 8
OSSL_127229	FC \pm SD Konz. T / n	1,6 \pm 0,2 0,15 μ M 2 / 8	1,7 \pm 0,2 0,5 μ M 1 / 6	2,2 \pm 0,4 1,5 μ M 2 / 8	2,4 \pm 0,3 5 μ M 2 / 8	1,7 \pm 0,2 15 μ M 2 / 7	1,7 \pm 0,4 33 μ M 2 / 8
Geringe Aktivität ($1,5 \leq FC < 2$)							
22184	FC \pm SD Konz. T / n	1,1 \pm 0,2 0,5 μ M 2 / 6	1,2 \pm 0,1 1,5 μ M 1 / 4	1,2 \pm 0,2 5 μ M 2 / 8	1,2 \pm 0,1 15 μ M 2 / 8	1,9 \pm 0,3 33 μ M 2 / 8	0,8 \pm 0,4 100 μ M 2 / 8
LT00054255	FC \pm SD Konz. T / n	1,4 \pm 0,1 0,5 μ M 2 / 6	1,4 \pm 0,2 1,5 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,1 5 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,2 15 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,1 33 μ M 2 / 8	0,9 \pm 0,2 100 μ M 2 / 8
OSSK_000971	FC \pm SD Konz. T / n	1,4 \pm 0,2 0,5 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,2 1,5 μ M 2 / 8	1,7 \pm 0,1 5 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,2 15 μ M 2 / 8	1,3 \pm 0,1 33 μ M 2 / 8	1,1 \pm 0,2 100 μ M 2 / 8
OSSK_014625	FC \pm SD Konz. T / n	1,2 \pm 0,2 0,5 μ M 2 / 8	1,4 \pm 0,3 1,5 μ M 2 / 8	1,5 \pm 0,2 5 μ M 2 / 8	1,0 \pm 0,7 15 μ M 2 / 8	n. d. 33 μ M 2 / 8	-
OSSK_364814	FC \pm SD Konz. T / n	1,6 \pm 0,2 1,5 μ M 2 / 8	1,9 \pm 0,2 5 μ M 2 / 8	1,9 \pm 0,2 20 μ M 2 / 8	1,2 \pm 0,2 33 μ M 2 / 8	n. d. 100 μ M 2 / 8	-

FC \pm SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; Konz.: Konzentration; T: Anzahl unabhängiger Transfektionen; n: Anzahl Messungen; n.d.: nicht detektierbar.

Fortsetzung Tab. 16:

Substanz		Konzentration 1	Konzentration 2	Konzentration 3	Konzentration 4	Konzentration 5	Konzentration 6
Geringe Aktivität (1,5 ≤ FC < 2)							
OSSL_119859	FC ± SD Konz. T / n	1,3 ± 0,0 0,5 µM 1 / 4	1,4 ± 0,1 1,5 µM 1 / 4	1,3 ± 0,2 5 µM 1 / 4	1,5 ± 0,2 20 µM 2 / 8	1,7 ± 0,2 33 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 100 µM 1 / 4
OSSL_126729	FC ± SD Konz. T / n	1,5 ± 0,2 0,15 µM 2 / 6	1,5 ± 0,2 0,5 µM 2 / 8	1,5 ± 0,1 1,5 µM 2 / 8	1,8 ± 0,1 5 µM 2 / 8	0,8 ± 0,2 15 µM 2 / 8	0,3 ± 0,0 33 µM 1 / 4
Inaktiv (FC < 1,5)							
Nifedipin (para)	FC ± SD Konz. T / n	1,3 ± 0,3 12,5 µM 2 / 8	1,3 ± 0,3 25 µM 2 / 8	0,9 ± 0,2 50 µM 2 / 8	0,6 ± 0,3 75 µM 2 / 8	0,7 ± 0,2 100 µM 2 / 8	0,7 ± 0,1 200 µM 2 / 8
Nifedipin (meta)	FC ± SD Konz. T / n	1,2 ± 0,1 12,5 µM 2 / 8	1,4 ± 0,1 25 µM 2 / 8	1,3 ± 0,1 50 µM 2 / 8	1,2 ± 0,1 75 µM 2 / 8	1,3 ± 0,2 100 µM 2 / 8	1,1 ± 0,2 200 µM 2 / 8
Nisoldipin (+)	FC ± SD Konz. T / n	1,4 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,4 ± 0,1 10 µM 2 / 8	1,3 ± 0,2 20 µM 2 / 8	1,2 ± 0,1 33 µM 2 / 8	1,3 ± 0,2 50 µM 2 / 8	n. d. 100 µM 2 / 8
OSSL_590453	FC ± SD Konz. T / n	1,3 ± 0,2 0,5 µM 2 / 8	1,3 ± 0,1 1,5 µM 2 / 8	1,3 ± 0,1 5 µM 2 / 8	1,3 ± 0,2 15 µM 2 / 8	1,1 ± 0,1 33 µM 2 / 8	0,7 ± 0,2 100 µM 2 / 8
R420530	FC ± SD Konz. T / n	1,3 ± 0,2 0,5 µM 2 / 8	1,3 ± 0,2 1,5 µM 2 / 8	1,1 ± 0,2 5 µM 2 / 8	1,2 ± 0,2 15 µM 2 / 8	1,1 ± 0,2 33 µM 2 / 8	1,0 ± 0,1 100 µM 1 / 4
Stock1S-56409	FC ± SD Konz. T / n	1,4 ± 0,2 0,5 µM 2 / 8	1,4 ± 0,3 1,5 µM 2 / 8	1,4 ± 0,2 5 µM 2 / 8	1,1 ± 0,3 15 µM 2 / 8	1,1 ± 0,3 33 µM 2 / 8	-

FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; Konz.: Konzentration; T: Anzahl unabhängiger Transfektionen; n: Anzahl Messungen; n.d.: nicht detektierbar

A) Korrektur des *trafficking*-Defekts von CNGA3_{E228K} durch Behandlung mit DHP

Die 17 untersuchten DHP wurden für eine weitere Beschreibung anhand struktureller Gemeinsamkeiten gruppiert.

Dihydropyridine mit kurzen Estergruppen

Den höchsten im Substanzscreening gemessenen Effekt — eine 4,8-fache Erhöhung der AUC — lieferte das Dihydropyridin Nisoldipin bei einer Konzentration von 20 μM (Siehe Abb. 27 (A)). Nach Behandlung mit 3,3 μM , 10 μM und 33 μM Nisoldipin wurde ebenfalls Aktivität nachgewiesen, der FC war jedoch kleiner als bei 20 μM Nisoldipin. Höhere Nisoldipinkonzentrationen führten auf Grund toxischer Effekte zu einer Reduktion des Lumineszenzsignals gegenüber der unbehandelten Kontrolle.

Es wurden weitere, dem Nisoldipin strukturell ähnliche DHP untersucht, die kurze Seitengruppen tragen. Diese waren die DHP JFD03311, Nifedipin, Isradipin, Nimodipin, Nitrendipin und Nilvadipin, deren maximale FC-Werte gegen die dafür benötigte Konzentration in Abb. 27 (B) dargestellt sind. Das JFD03311, welches gegenüber dem Nisoldipin an beiden Estergruppen Ethylreste hat, wies einen FC von 2,4 bei einer Konzentration von 15 μM auf. Bei Nifedipin, welches an beiden Estergruppen Methylreste besitzt, wurde ein FC von 1,6 bei einer Konzentration von 100 μM nachgewiesen. Nitrendipin mit einem Ethyl- und einem Methylrest an den Estergruppen und der Nitrogruppe in meta-Position an dem Benzolring war nicht aktiv, da der $\text{FC} < 1,5$ war. Ebenfalls keine Aktivität wurde bei Nimodipin und Nilvadipin gemessen, welche die Nitrogruppe in meta-Position tragen. Daneben liegt bei beiden Substanzen eine Isopropylgruppe an einer Estergruppe vor, bei Nilvadipin ist zusätzlich eine Methylgruppe an dem Dihydropyridinring durch eine Nitrilgruppe ersetzt (Siehe 9.2). Das Isradipin besitzt wie das Nilvadipin und Nimodipin eine Isopropylgruppe und anstelle der Nitrogruppe am Benzolring ein Oxadiazol. Mit dem Bioassay wurde ein FC von 1,5 nach Behandlung mit 33 μM Isradipin erhalten.

ERGEBNISSE

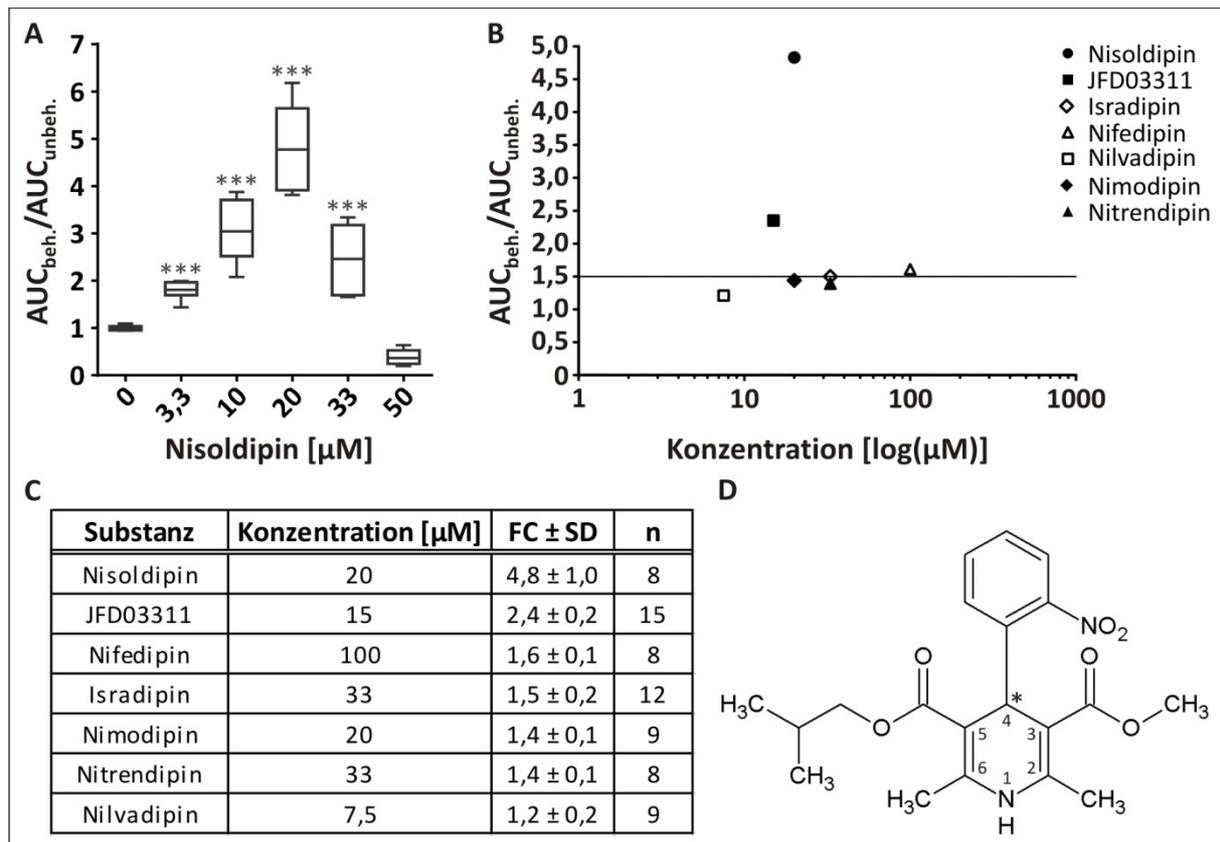


Abb. 27: Darstellung der Ergebnisse von Nisoldipin und strukturell ähnlichen Dihydropyridinen mit kurzen Estergruppen. (A) Nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Nisoldipin trat ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Lumineszenzsignals bis zum Erreichen des Signalmaximums bei 20 μM auf. Bei höheren Konzentrationen traten zunehmend toxische Effekte auf. (B) Die maximal gemessenen relativen Lumineszenzerhöhungen nach Behandlung mit Nisoldipin (Kreis), JFD03311 (Quadrat), Isradipin (offene Raute), Nifedipin (offenes Dreieck), Nilvadipin (offenes Quadrat), Nimodipin (Raute) und Nitrendipin (Dreieck) gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Das Nisoldipin besitzt den höchsten FC, gefolgt von JFD03311, Nifedipin und Isradipin. Die Substanzen Nimodipin, Nitrendipin und Nilvadipin wiesen keine Aktivität auf, da ihr FC unter dem Wert von 1,5 (schwarze Trennlinie) liegt. (C) Zusammenfassung der detektierten Signalmaxima unter Angabe der eingesetzten Konzentration und der Anzahl an Messungen für Nisoldipin und dessen strukturverwandte Derivaten. (D) Strukturformel des Nisoldipin, welches sich durch eine Isobutyl- und eine Methylgruppe an den Estergruppen auszeichnet. Die Nitrogruppe an dem Benzolring besitzt eine ortho-Orientierung. Da das Nisoldipin über zwei verschiedene Estergruppen verfügt, besitzt es ein chirales Zentrum (*). ***: $p < 0,001$. FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

Dihydropyridine mit langen Estergruppen

Daneben wurden Dihydropyridine mit langen Resten an den Estergruppen mit dem Bioassay untersucht. Abb. 28 (A) zeigt die Lumineszenzsignale von Niguldipin über mehrere Konzentrationen. Der maximale FC von 1,6 nach Behandlung mit Niguldipin war um das 3-fache niedriger als bei Nisoldipin (Siehe Abb. 28 (B)), wurde jedoch bei einer etwa 30-fach geringeren Konzentration erreicht. Zudem zeigte Niguldipin, dessen Strukturformel in Abb. 96

28 (D) dargestellt ist, über einen großen Konzentrationsbereich (0,3 μM bis 3,3 μM) vergleichbare Signale. Weitere untersuchte DHP mit langen Estergruppen waren das Azelnidipin, Cilnidipin, Benidipin, Efonidipin und das Nicardipin (Siehe Abb. 28 (C)).

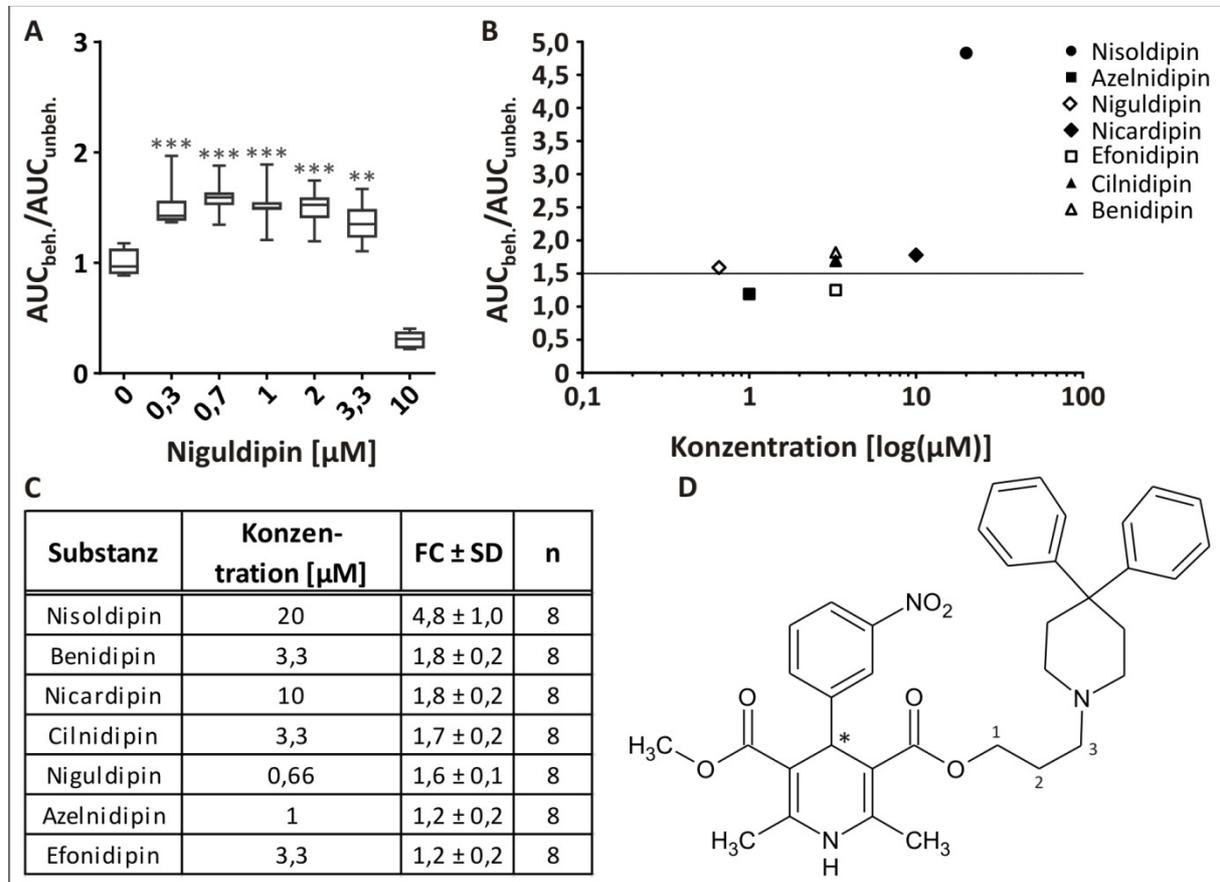


Abb. 28: Darstellung der Ergebnisse von Dihydropyridinen mit langen Estergruppen. (A) Konzentrationen von 0,3 μM bis 3,3 μM Niguldipin führten zu einem erhöhten Einbau mutanter CNGA3_{E228K}-Kanäle in die Plasmamembran. Das Signalmaximum wurde bei einer Konzentration von 0,7 μM mit einem FC von 1,6 detektiert. (B) Die maximal gemessenen relativen Lumineszenzerhöhungen nach Behandlung mit Azelnidipin (Quadrat), Niguldipin (offene Raute), Nicardipin (offenes Dreieck), Efonidipin (offenes Quadrat), Cilnidipin (Dreieck) und Benidipin (Stern) gegenüber der unbehandelten Kontrolle und im Vergleich zu Nisoldipin (Kreis). Neben Nisoldipin wiesen Benidipin, Nicardipin, Cilnidipin und Niguldipin Aktivität auf, bei Azelnidipin und Efonidipin lag der FC unterhalb von 1,5 (schwarze Trennlinie). (C) Zusammenfassung der erfassten Signalmaxima und Angabe der eingesetzten Konzentration sowie der Anzahl an Messungen für Nisoldipin und dessen Derivate mit langer Estergruppe. (D) Strukturformel des Niguldipins. Das Niguldipin besitzt die Nitrogruppe in meta-Position, eine kurze und eine lange Estergruppe mit einer endständigen 4,4-Diphenylpiperidingruppe sowie zwei Methylreste an dem Dihydropyridinring. Das chirale Zentrum ist mit einem (*) markiert. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. FC \pm SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

Dihydropyridine wie das Niguldipin besitzen jeweils nur eine lange Estergruppe, die andere Estergruppe ist klein, wie z.B. der Methylrest von Niguldipin. Die lange Estergruppe des Niguldipins besteht aus drei Kohlenwasserstoffen und einer endständigen trizyklischen

ERGEBNISSE

Gruppe, der 4,4-Diphenylpiperidingruppe. Die lange Estergruppe bei Nicardipin besteht aus vier Kettengliedern, drei Kohlenwasserstoffen und einem Stickstoff an N3, welches eine zusätzliche Methylgruppe bindet. Das terminale Kohlenstoffatom bindet zudem eine Phenylgruppe. Bei Benidipin liegt zusätzlich ein Piperidinring vor, in welchen der Stickstoff N3 sowie die Kohlenstoffe C1 und C2 miteinbezogen sind (Siehe 9.2). Die Estergruppe des Cilnidipins besteht lediglich aus drei Kettengliedern, ohne dem Stickstoff, dafür aber mit einer Doppelbindung zwischen C2 und C3. Die drei Substanzen Nicardipin, Benidipin und Cilnidipin weisen etwas höhere FC_{max} auf als das Niguldipin und 2,7- bis 3-fach geringere FC_{max} im Vergleich zu Nisoldipin. Dazu mussten bei diesen drei Substanzen Konzentrationen eingesetzt werden, welche 2- bis 6-fach geringer waren im Vergleich zu Nisoldipin, aber immer noch 4,7-fach höher waren als bei Niguldipin.

Das Efonidipin besitzt anstelle der Methylgruppe an dem N3 einen weiteren Phenylrest, die andere Estergruppe ist durch einen Phosphorsäuretriester ersetzt. Azelnidipin trägt wie das Niguldipin eine terminale trizyklische Gruppe, welche bei Azelnidipin direkt an den Ester gebunden ist, während bei Niguldipin diese Gruppe über drei Kettenglieder bestehend aus Kohlenwasserstoffen mit der Estergruppe verbunden vorliegt. Das Azelnidipin verfügt zudem über eine primäre Aminogruppe anstelle eines der Methylreste an dem Dihydropyridinring. In dem Bioassay zeigten das Efonidipin sowie das Azelnidipin keine Aktivität.

Dihydropyridine mit lipophilen Substituenten am Benzolring

Es wurde eine weitere Gruppe von Dihydropyridinen untersucht, welche einen unsubstituierten oder einen mit lipophilen Chloratomen substituierten Benzolring besaßen. In Abb. 29 (A) sind die FC Werte nach Behandlung mit verschiedenen Amlodipinkonzentrationen dargestellt. Bei den niedrigen Konzentrationen wurde kein Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle festgestellt, bei höheren Konzentrationen traten toxische Effekte auf. Auch bei RJC03435, Felodipin und BTB14326 lagen die maximalen FC unter 1,5 (Siehe Abb. 29 (B) und Abb. 29 (C)). Alle Substanzen dieser Gruppe wurden somit als inaktiv eingestuft. Die Strukturformel des Amlodipins ist in Abb. 29 (D) gezeigt. Verglichen mit dem Nisoldipin besitzt das Amlodipin anstelle der Nitrogruppe ein Chloratom in ortho-Position an dem Benzolring, charakteristisch für diese Substanz ist außerdem die Aminoethoxygruppe am C6 des Pyridinringes. Das strukturell sehr ähnliche

Felodipin besitzt dieses Charakteristikum nicht, trägt jedoch zwei Chloratome am Benzolring in ortho- und meta-Position. RJC03435 und BTB14326 unterscheiden sich von den beiden anderen Substanzen dieser Gruppe bzw. auch von Nisoldipin durch einen unsubstituierten Benzolring. Alle vier hier beschriebenen Substanzen besitzen kurze Seitengruppen an den Esterresten und mit Ausnahme des Amlodipins zwei Methylgruppen am Dihydropyridinring.

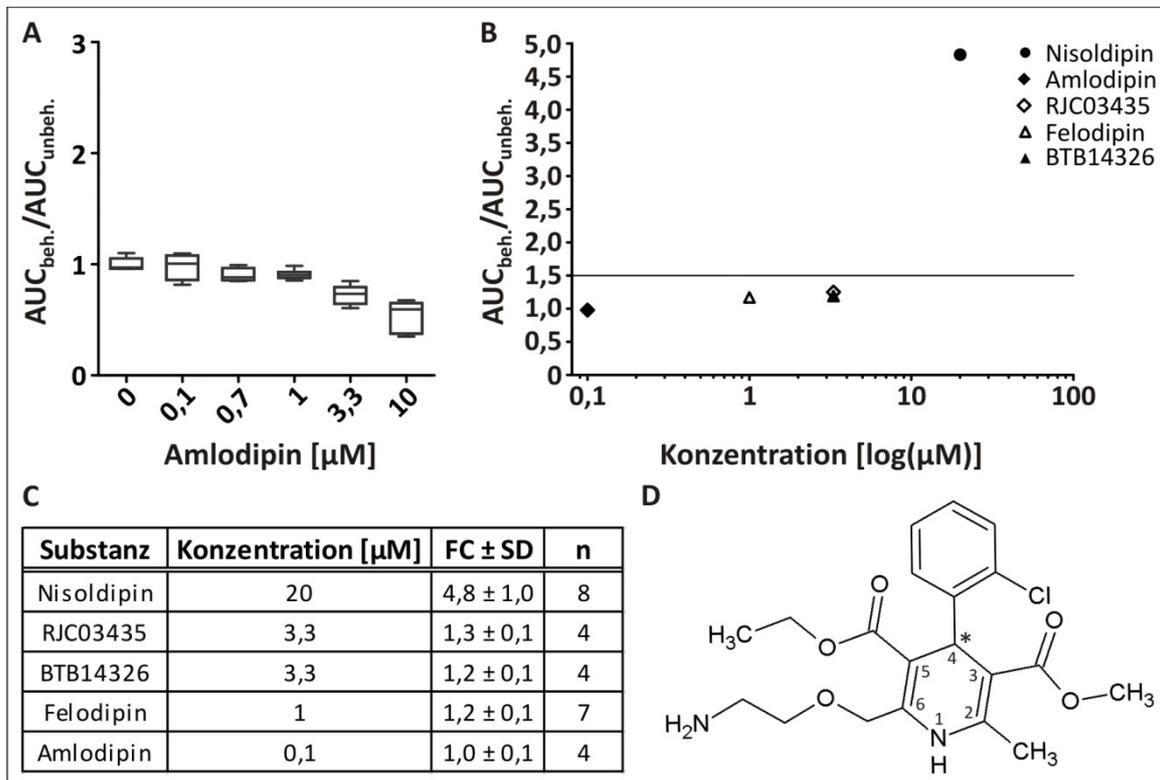


Abb. 29: Darstellung der Ergebnisse von Dihydropyridinen mit lipophiler Kopfgruppe am C4 des Pyridinringes. (A) Das Amlodipin zeigte in dem Bioassay keine Aktivität. Bei niedrigen Konzentrationen wurde kein Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle gefunden, bei den beiden höchsten Konzentrationen (3,3 μM und 10 μM) wurden toxische Effekte beobachtet, wodurch das Signal gegenüber der unbehandelten Kontrolle reduziert war. (B) Die maximal gemessenen Lumineszenzerhöhungen nach Behandlung mit Amlodipin (Raute), RJC03435 (offene Raute), Felodipin (offenes Dreieck) und BTB14326 (Dreieck) gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Das Nisoldipin (Kreis) dient als Vergleich. Bei keiner Substanz mit lipophilen Substituenten am Benzolring wurde eine Aktivität gemessen, der FC lag unterhalb von 1,5 (schwarze Trennlinie). (C) Zusammenfassung der detektierten Signalmaxima unter Angabe der eingesetzten Konzentration und der Anzahl an Messungen für die Dihydropyridine mit lipophiler Kopfgruppe und dem Nisoldipin. (D) Strukturformel des Amlodipins, welches anstelle der Nitrogruppe ein Chloratom in ortho-Position am Benzolring besitzt, kurze Estergruppen hat und an einer Methylgruppe ein Aminoethoxygruppe trägt. Das chirale Zentrum ist mit einem (*) markiert. FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

B) Untersuchung von DHP zur Identifizierung wichtiger struktureller Merkmale

Für diese Versuche wurden DHP anhand der Ergebnisse aus Abschnitt 5.3.2.2 A) spezifisch ausgewählt, um strukturelle Eigenschaften der DHP aufzuklären, die für die Interaktion und Korrektur von *trafficking*-defizienten mutanten Zapfen CNG-Kanälen wichtig sind.

Untersuchung welches Enantiomer des Nisoldipins die Aktivität vermittelt

Die Dihydropyridine besitzen, insofern sie unterschiedliche Reste an den Estergruppen tragen, ein chirales Kohlenstoffatom an Position C4 des Dihydropyridinringes. Bei den hier untersuchten chiralen Substanzen handelte es sich jeweils um Racemate. Um zu untersuchen, welches der beiden Enantiomere die Aktivität vermittelt, wurden das S (+) Nisoldipin und das R (-) Nisoldipin, welche freundlicherweise von Bayer HealthCare AG zur Verfügung gestellt wurden, analysiert. Die transfizierte HEK293-Zellen wurden entweder mit einem der beiden Enantiomere oder mit der 1:1 Mischung der Enantiomere behandelt, welches das Racemat darstellt. Die Ergebnisse der Messung sind in Abb. 30 dargestellt.

Bei dem Nisoldipin Racemat lag das maximale Signal mit einem FC von 2,8 bei einer Konzentration von 20 μM . Höhere Konzentration der Mischung beider Enantiomere führten aufgrund zytotoxischer Effekte zu einer Reduktion des Signals gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung mit dem S (-) Enantiomer führte zu einem Signalmaximum bei 3,3 μM mit einem FC von 1,4. Bei einer Konzentration von 20 μM S (-) Nisoldipin wurde ebenfalls eine statistisch signifikante Erhöhung des Lumineszenzsignals gegenüber der unbehandelten Kontrolle gemessen. Das R (-) Nisoldipin lieferte eine FC_{max} von 3,2 bei einer Konzentration von 10 μM der Substanz, also bei der Hälfte der für das Racemat benötigten Konzentration. Bei 3,3 μM und 20 μM R (-) Nisoldipin war das Signal ebenfalls signifikant höher als bei der unbehandelten Kontrolle (Siehe Abb. 30 (A)). Während somit das maximale Signal nach Behandlung mit R (-) Nisoldipin nahezu identisch mit dem maximalen Signal des Racemats war, wies das S (-) Nisoldipin einen halb so hohen FC_{max} verglichen mit dem Racemat auf.

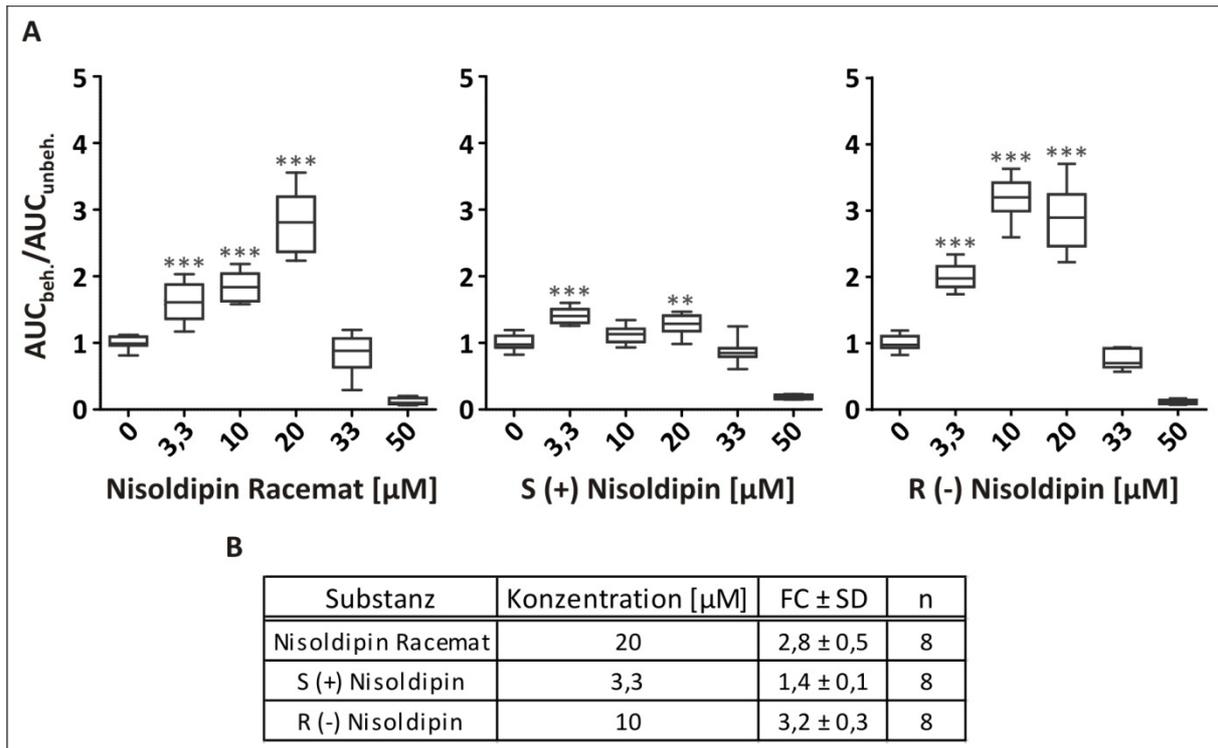


Abb. 30: Untersuchung beider Nisoldipin Enantiomere und des Racemats. (A) Das Nisoldipin Racemat, welches durch Mischen beider Enantiomere hergestellt wurde, führte zu maximalen Lumineszenzsignal nach Behandlung mit 20 µM, bei höheren Konzentrationen trat bedingt durch toxische Effekte eine Reduktion der Lumineszenzsignals gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf. Das S (+) Nisoldipin wies nur geringe Signalerhöhungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle auf mit einem FC_{max} von 1,4 bei einer Konzentration von 3,3 µM. Im Gegensatz dazu wurde mit dem R (-) Nisoldipin ein FC_{max} von 3,2 bei einer Konzentration von 10 µM nachgewiesen. (B) Zusammenfassung der maximalen Lumineszenzsignale, der dafür benötigten Konzentration und der Anzahl an Messungen für die untersuchten Nisoldipin Enantiomere und das durch Mischen hergestellte Racemat. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

Untersuchungen zur Position der Nitrogruppe am Benzolring

Bei den bislang untersuchten Dihydropyridinen lag mit Ausnahme des Isradipins immer eine Nitrogruppe an dem Benzolring entweder in ortho- oder in meta-Position vor. Um die Orientierung der Nitrogruppe zu identifizieren, welche den höchsten FC generiert, wurden die Lumineszenzsignale des Nifedipins und deren Derivate mit Position der Nitrogruppe in meta- und para-Position verglichen. Bei dem ortho-Nifedipin ist die Nitrogruppe an dem C2

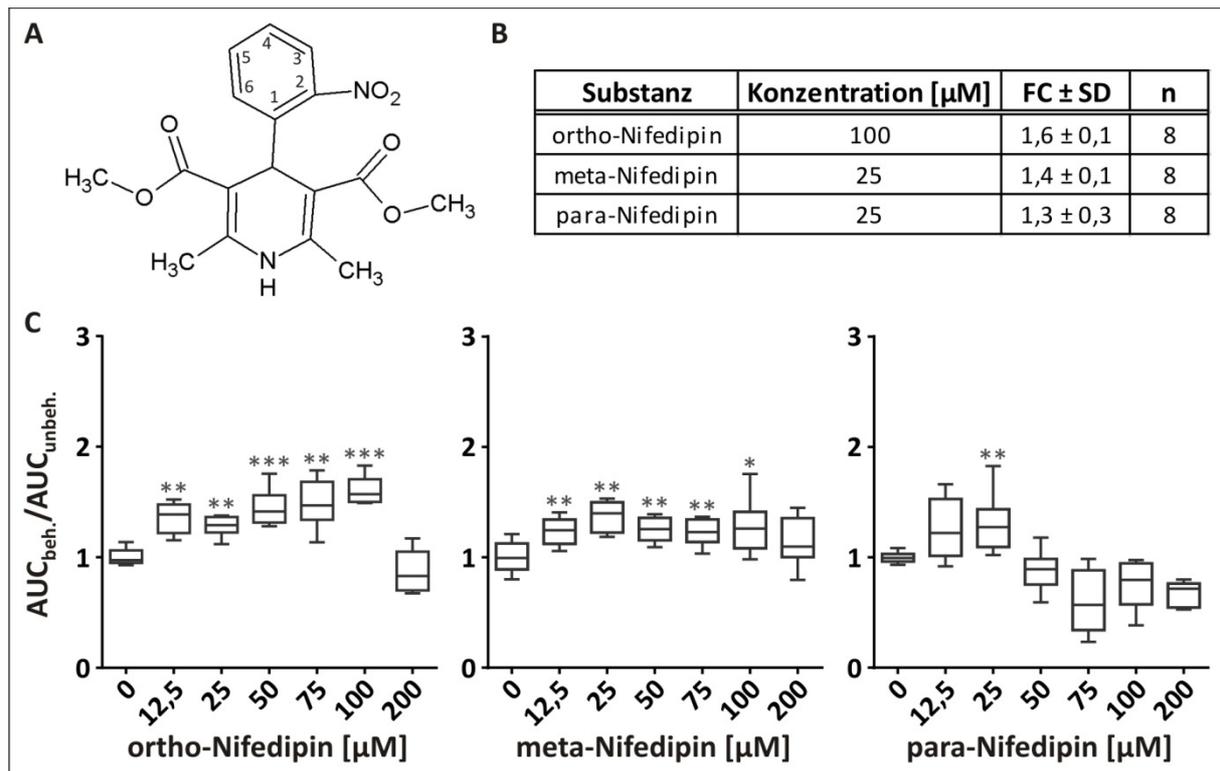


Abb. 31: Ergebnisse der Nifedipin-Derivate mit unterschiedlicher Position der Nitrogruppe. (A) Strukturformel des ortho-Nifedipins. Die Nitrogruppe ist an dem C2-Kohlenstoff des Benzolringes gebunden. (B) Zusammenfassung der FC_{max} sowie der eingesetzten Konzentration und die Anzahl an Messungen für ortho-, meta- und para-Nifedipin. Ein FC von 1,6 bei einer Konzentration von 100 µM wurde für das ortho-Nifedipin gemessen. Bei dem meta- und para-Nifedipin betragen die maximalen FC-Werte von unter 1,5. (C) Graphische Darstellung der Messergebnisse von ortho-, meta- und para-Nifedipin. Bei ortho-Nifedipin und meta-Nifedipin wurden über einen großen Konzentrationsbereich signifikant höhere Lumineszenzsignale gegenüber der unbehandelten Kontrolle erhalten. Das para-Nifedipin wies nur bei 25 µM ein signifikant höheres Lumineszenzsignal verglichen mit der unbehandelten Kontrolle auf. Der höchste FC wurde bei ortho-Nifedipin mit einem Wert von 1,6 bei einer Konzentration von 100 µM gemessen. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

des Benzolringes gebunden (Siehe Abb. 31 (A)), bei meta-Nifedipin ist die Nitrogruppe an C3 und bei dem para-Nifedipin an C4 des Benzolringes gebunden. Nach Behandlung mit ortho- und meta-Nifedipin wurde in dem Konzentrationsbereich von 12,5 µM bis 100 µM eine Erhöhung des Lumineszenzsignals gegenüber der unbehandelten Kontrolle gemessen – für höhere Konzentrationen wurde eine leichte Reduktion des Signals gegenüber der unbehandelten Kontrolle detektiert. Para-Nifedipin zeigte nur im Bereich von 12,5 bis 50 µM Aktivität. Der maximalste FC dieser drei Substanzen wurde von ortho-Nifedipin bei einer Konzentration von 100 µM erreicht und betrug 1,6. Die Signalmaxima von meta- und para- waren mit FC von 1,4 bzw. 1,3 nur etwas geringer im Vergleich zu ortho-Nifedipin, jedoch

war bei diesen beiden Substanzen eine 4-fach geringere Konzentration für das Erreichen von FC_{max} notwendig im Vergleich zu dem ortho-Derivat.

Dihydropyridine mit hydrophilen Substituenten anstelle der Nitrogruppe

Im nachfolgenden wurden Substanzen untersucht, bei welchen die Nitrogruppe durch einen polaren Substituenten ausgetauscht vorlag. Bei niedrigen Konzentrationen des OSSK_000971 wurde zunächst ein moderater Anstieg des FC bis zu dem Signalmaximum von 1,7 bei 5 mM

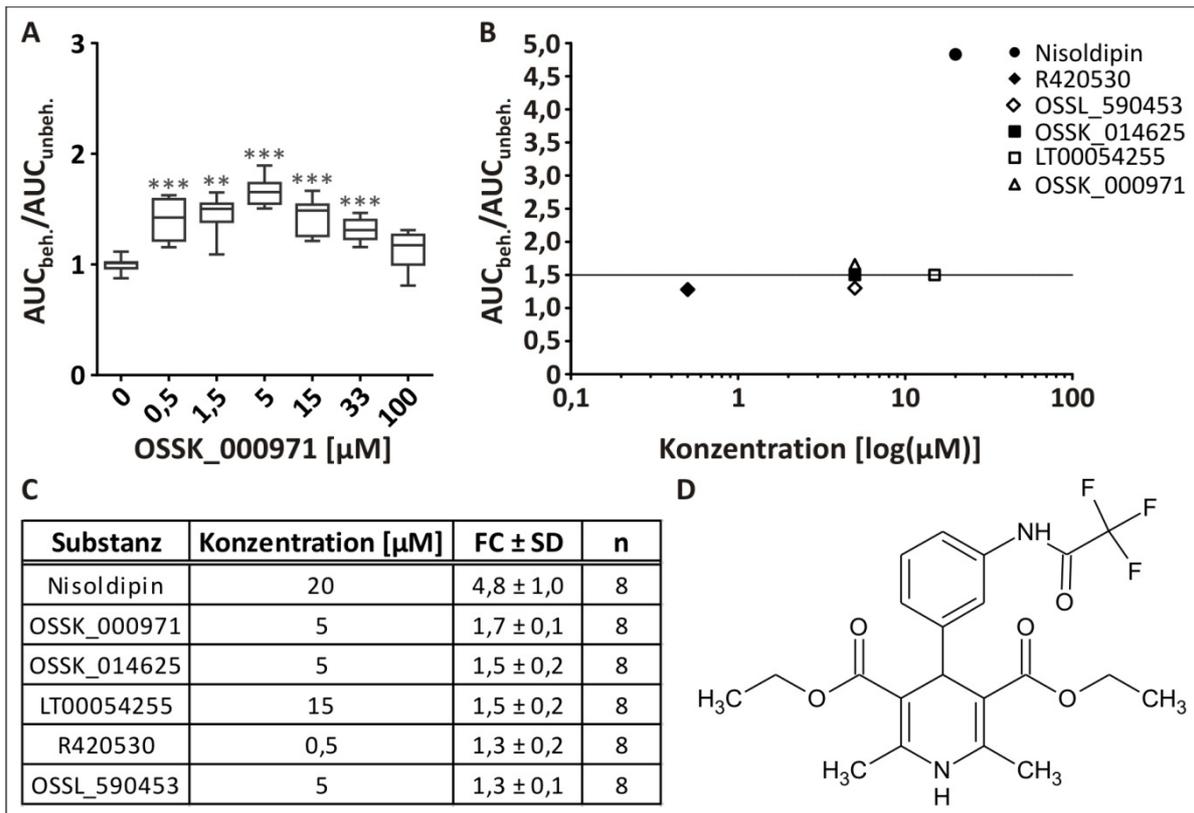


Abb. 32: Darstellung der Ergebnisse von Dihydropyridinen mit hydrophilen Substituenten anstelle der Nitrogruppe am Benzolring. (A) Das OSSK_000971 wies bei geringen Konzentrationen einen konzentrationsabhängigen Anstieg des FC auf, bis das Signalmaximum bei 5 μM mit einem FC von 1,7 erreicht wurde. Bei höheren Konzentrationen führten toxische Effekte zu einer moderaten Reduktion des FC, welcher erst ab einer Konzentration von 100 μM nicht mehr signifikant höher als die unbehandelte Kontrolle war. (B) Die maximal gemessenen Lumineszenzerhöhungen nach Behandlung mit R420530 (Raute), OSSL_590453 (offene Raute), OSSK_014625 (Stern), LT00054255 (offenes Quadrat) und OSSK_000971 (Dreieck) gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Das Nisoldipin (Kreis) dient als Vergleich. Bei den Substanzen OSSK_000971, LT00054255 und OSSK_014625 wurde eine Aktivität mit dem Bioassay nachgewiesen, bei R420530 und OSSL_590453 lag der FC unter 1,5 (schwarze Trennlinie). (C) Zusammenfassung der maximalsten FC Werte, der dazu benötigten Konzentration der Substanz und der Anzahl an Messwerten für Nisoldipin und dessen Derivate mit ersetzter Nitrogruppe am Benzolring. (D) Strukturformel des OSSL_590453, welches anstelle der Nitrogruppe eine 2-Amino-2-Oxoethoxygruppe in ortho-Position am Benzolring besitzt, kurze Estergruppen hat und zwei Methylgruppen an dem Dihydropyridinring besitzt. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$. FC ± SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

ERGEBNISSE

erfasst. Höhere Konzentrationen der Substanz führten zu einer moderaten Reduktion des Lumineszenzsignals gegenüber dem Signal bei 5 μM OSSK_000971, der FC war jedoch bis zu einer Konzentration von 33 μM signifikant größer als bei der unbehandelten Kontrolle. Bei einer Konzentration von 100 μM OSSK_000971 wurde kein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle detektiert (Siehe Abb. 32 (A)). Der FC des OSSK_000971 war im Vergleich zu Nisoldipin 2,8-fach niedriger, die für das Signalmaximum benötigte Konzentration war um ein Viertel niedriger als bei Nisoldipin (Siehe Abb. 27).

Die Substanzen R420530, OSSL_590453 und LT00054255 unterscheiden sich gegenüber dem OSSK_000971 in dem Rest, der an dem C3 bzw. bei dem OSSL_590453 an dem C2 des Benzolringes vorliegt (Siehe 9.2). Die Struktur des OSSK_000971 ist in Abb. 32 (D) dargestellt, das neben dem OSSK_000971 ebenfalls aktive LT00054255 besitzt eine Hydroxygruppe an dem C3 des Benzolringes. Die Aktivität dieser Substanzen geht von inaktiv über einen FC_{max} von 1,5 für das LT00054255 bis zu einem FC_{max} von 1,7 für das OSSK_000971. Die Konzentrationen, bei welchen der FC_{max} gemessen wurde, unterscheiden sich deutlich. Für das inaktive R420530 wurde das maximale Signal bei einer Konzentration von 0,5 μM gemessen, während bei LT00054255 das Signalmaximum bei 15 μM lag.

Das OSSK_014625 unterscheidet sich von den anderen Substanzen dieser Gruppe durch die Dioxylgruppe. Dieser heterozyklische Fünfring ist an C3 und C4 des Benzolringes gebunden (Siehe 9.2). Bei OSSK_014625 wurde ein FC_{max} von 1,5 bei einer Konzentration von 5 μM gemessen – vergleichbar mit den anderen aktiven Substanzen dieser Gruppe.

Substitution einer Methylgruppe am Dihydropyridinring

Die Substanzen 22184 und Stock1S-56409 besitzen eine modifizierte Methylgruppe am C6 des Dihydropyridinring. Das 22184 wies in dem Bioassay bei Konzentrationen zwischen 0,5 und 15 μM keinen signifikanten Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle auf. Bei 33 μM wurde das Signalmaximum mit einem FC von 1,9 erfasst (Siehe Abb. 33 (A)). Der erreichte FC_{max} war um das 2,5-fach geringer im Vergleich zu Nisoldipin, zudem wurde dieses erst bei einer 1,7-fach höheren Konzentration erzielt. Im Gegensatz dazu besaß das Stock1S-56409 in dem Bioassay bei allen getesteten Konzentrationen einen FC kleiner 1,5 und war somit inaktiv (Siehe Abb. 33 (B) und Abb. 33 (C)). Beide Substanzen tragen eine Nitrogruppe in meta-Position am Benzolring, kurze Reste an den Estergruppen und das 22184 trägt eine

Chlormethylgruppe am C6 des Pyridinringes (Siehe Abb. 33 (D)), während das Stock1S-56409 eine primäre Aminogruppe am C6 besitzt.

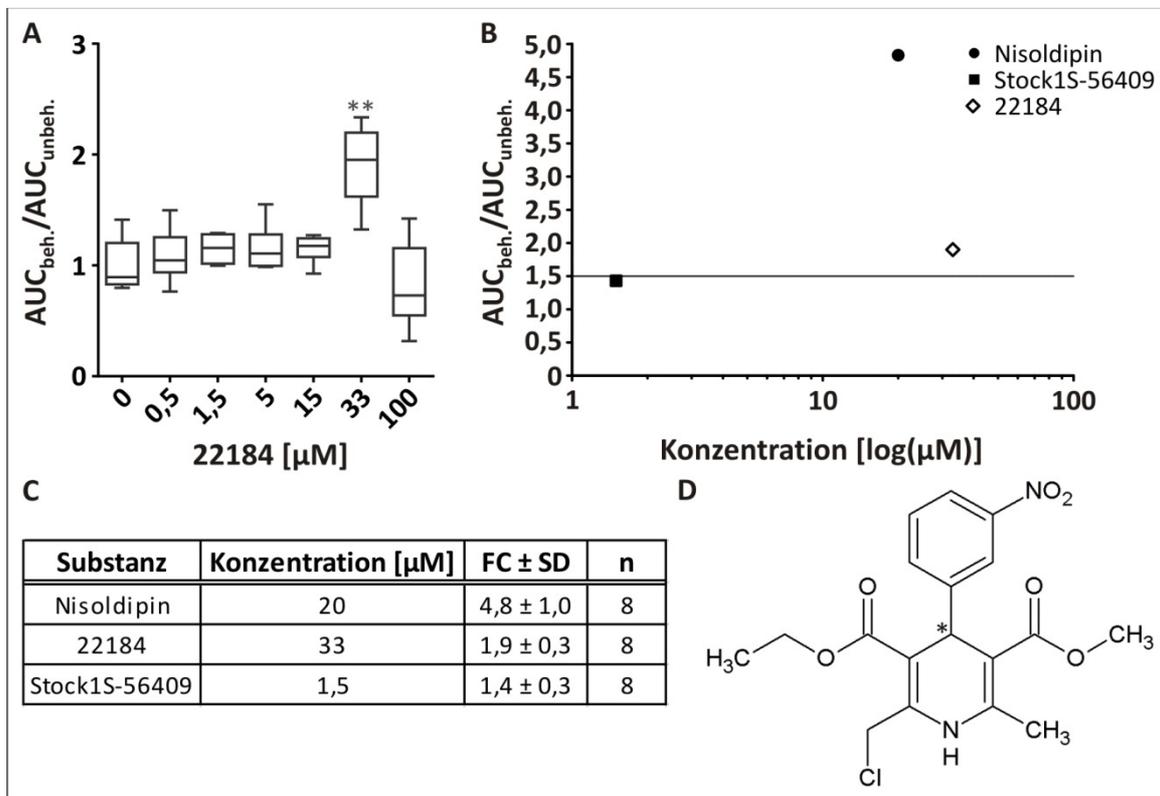


Abb. 33: Darstellung der Ergebnisse von Dihydropyridinen mit substituierter Methylgruppe am Dihydropyridinring. (A) Das 22184 wies nur bei 33 μM ein signifikant höheres Signal als die unbehandelte Kontrolle, bei höheren Konzentrationen war das Signal auf Grund toxischer Effekte kleiner als bei der unbehandelten Kontrolle. (B) Die maximal gemessenen Lumineszenzerhöhungen nach Behandlung mit Stock1S-56409 (Quadrat) und 22184 (offene Raute) gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Das Nisoldipin (Kreis) dient als Vergleich. Während bei 22184 Aktivität gemessen wurde, wies die Substanz Stock1S-56409 einen FC kleiner als 1,5 auf (schwarze Trennlinie) und war somit nicht aktiv. (C) Zusammenfassung der detektierten Signalmaxima unter Angabe der eingesetzten Konzentration und der Anzahl an Messungen für Nisoldipin und dessen Derivate mit substituierter Methylgruppe am Benzolring. (D) Strukturformel des 22184, welches eine Chlormethylgruppe am C6 des Pyridinringes besitzt. Die Nitrogruppe liegt in meta-Position vor und die Estergruppen besitzen einen Methyl- und einen Ethylrest. Das chirale Zentrum ist mit einem (*) markiert. **: $p < 0,01$. FC \pm SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

Substanzen mit starrem Ringsystem oder Substitution eines Wasserstoffs am Dihydropyridinring

Unter den Dihydropyridin-Derivate, welche mit dem Bioassay untersucht wurden, um die strukturellen Merkmalen zu identifizieren, welche bei der Korrektur der Fehlfaltung von mutanten $\text{CNGA3}_{\text{E228K}}$ -Kanälen von Bedeutung sind, befanden sich Moleküle bei denen das Wasserstoffatom am Stickstoffatom (N1) des Dihydropyridinringes ersetzt wurde.

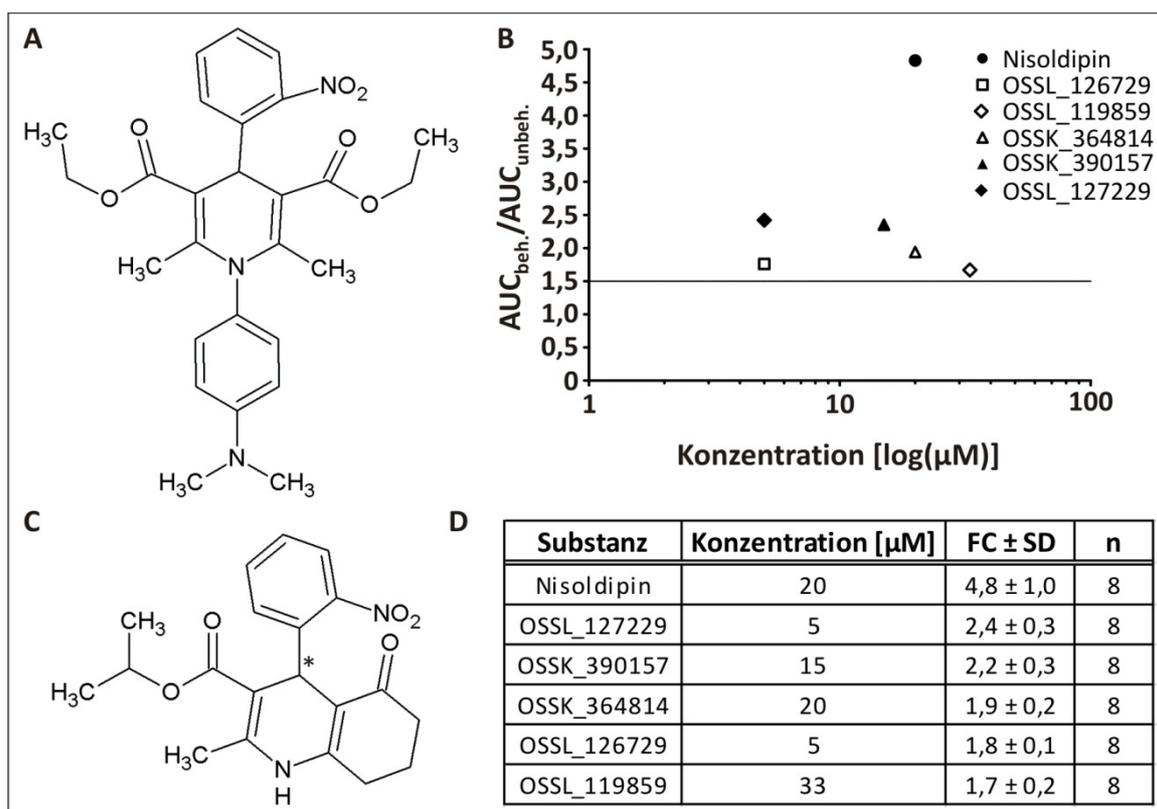


Abb. 34: Darstellung der Ergebnisse des Substanzscreenings von Dihydropyridin-Derivaten mit substituiertem Wasserstoff an dem Dihydropyridinring oder von DHP mit starrem Ringsystem. (A) Strukturformel des OSSL_127229, welches neben zwei Methylgruppen an dem Dihydropyridinring, zwei Ethylreste an den Estergruppen und der Nitrogruppe in ortho-Position, die charakteristische 4-(Dimethylamino)-phenylgruppe an dem N1 des Pyridinringes besitzt. (B) Die maximal gemessenen Lumineszenzerhöhungen nach Behandlung mit OSSL_126729 (offenes Quadrat), OSSL_127229 (offene Raute), OSSK_364814 (offenes Dreieck), OSSK_390157 (Dreieck) und OSSL_127229 (Raute) gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Das Nisoldipin (Kreis) dient als Vergleich. Alle untersuchten Substanzen wiesen Aktivität auf, da deren FC_{\max} über einem Wert von 1,5 (schwarze Trennlinie) lagen. (C) Strukturformel des OSSL_119859, bei welchem nach einem Ringschluss eine Estergruppe mit dem C2 des Dihydropyridinringes verbunden vorliegt und ein zyklisches Keton bildet. Ein Isopropylrest ist an der einzig verbliebenen Estergruppe gebunden. Die Nitrogruppe befindet sich in ortho-Position an dem Benzolring. Das chirale Zentrum ist mit einem (*) markiert. (D) Zusammenfassung über die maximal erzielten FC und den Konzentrationen, welche dafür benötigt wurden sowie die Anzahl der Messungen. FC \pm SD: gemittelte normierte AUC mit Standardabweichung; n: Anzahl Messungen.

Das in Abb. 34 (A) dargestellte OSSL_127229 ist ein Derivat mit gebundener 4-(Dimethylamino)phenylgruppe an dem N1 des Pyridinringes. Das OSSL_126729 ist nahezu identisch mit dem OSSL_127229, es unterscheidet sich nur durch ein Bromatom, welches die Nitrogruppe am Benzolring ersetzt. Das OSSK_390157 besitzt mit einer Methylgruppe nur einen kleinen Substituenten an N1 des Pyridinringes und unterscheidet sich in der Größe der Estergruppen und der Position der Nitrogruppe an dem Benzolring von den beiden anderen Derivaten (Siehe 9.2). Alle drei Substanzen besitzen einen FC_{\max} zwischen 1,8 und 2,4, wobei

das OSSL_127229 den höchsten Effekt erzielte, damit war der maximale FC dieser Gruppe halb so hoch wie der FC_{max} von Nisoldipin. Die Konzentrationen von OSSL_127229 und OSSL_126729, welche zu dem Erreichen des FC_{max} benötigt wurden, lagen 4-fach niedriger als bei Nisoldipin. Von dem OSSK_390157 wurde eine 1,3-fach niedrigere Konzentration verglichen mit dem Nisoldipin benötigt.

Daneben wurden die beiden Derivate OSSL_119859 und OSSK_364814 untersucht, bei welchen nach intramolekularem Ringschluss ein zyklisches Keton vorliegt. Das somit resultierende Molekülgerüst ist im Vergleich zu Nisoldipin relativ starr (Abb. 34 (C)) Die beiden Substanzen unterscheiden sich in dem Rest an der verbliebenen Estergruppe (Siehe 9.2). Das OSSL_119859 mit einer Isopropylgruppe an dem Ester lieferte einen FC von 1,7 bei einer Konzentration von 33 μ M, bei OSSK_364814, welches eine Butylgruppe an dem Ester besitzt, wurde ein FC von 1,9 bei 20 μ M detektiert (Siehe Abb. 34 (D)). Verglichen mit dem Nisoldipin wurde als ein 2,8- bzw. 2,5-fach kleiner FC_{max} bei ähnlichen Konzentrationen erhalten.

Trotz der zum Teil sehr deutlichen Erhöhungen in den Lumineszenzsignalen konnte somit bei keinem weiteren Dihydropyridin-Derivat der FC des Nisoldipins erreicht werden (Siehe Abb. 34 (B)).

5.4 Weiterführende Untersuchungen mit ausgewählten pharm. Chaperonen

Die höchsten Effekte im Bioassay wurden mit den Substanzen Amilorid, Bupivacain, Zatebradin, ZD7288 und einigen Dihydropyridinen erhalten. Für weiterführende Experimente wurden diese vier Substanzen und aus der Gruppe der Dihydropyridine das JFD03311 und das Nisoldipin ausgewählt. Dabei wurden jeweils die Konzentrationen der Substanzen eingesetzt, welche in dem Bioassay die höchsten FC ergeben hatten.

5.4.1 Untersuchung der Zellviabilität

Mit den ausgewählten sechs Substanzen wurde ein Zellviabilitätsassay durchgeführt, um zu bestimmen, ob während der Behandlung der HEK293-Zellen zytotoxische Nebeneffekte hervorgerufen werden. Der Zellviabilitätsassay basierte auf der Lumineszenz-basierten

ERGEBNISSE

Messung des ATP-Gehalts in den Wells. Bei der Auswertung wurden die Lumineszenzsignale der behandelten Wells auf die Lumineszenzsignale der unbehandelten Kontrolle normiert.

Keine signifikante Reduktion der Lumineszenzsignale wurde bei Behandlung mit 400 μM Amilorid und 15 μM JFD03311 gemessen – es wurden Lumineszenzsignale detektiert, die eine Signalhöhe von 99 % bzw. 96 % der unbehandelten Kontrolle erreichten (Siehe Abb. 35).

Die Lumineszenzsignale nach Behandlung mit den vier weiteren getesteten Substanzen war signifikant niedriger gegenüber der unbehandelten Kontrolle: Bei Zatebradin und Bupivacain entsprachen die gemittelten Lumineszenzwerte nach Behandlung mit Konzentrationen von jeweils 400 μM 89 % bzw. 84 % der unbehandelten Kontrolle und nach Behandlung mit 20 μM Nisoldipin wurde eine Reduktion des Lumineszenzsignals um 20 % gemessen. Der ausgeprägteste Effekt wurde bei der Behandlung mit ZD7288 nachgewiesen, bei dem die Signalintensität bei 64 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle lag.

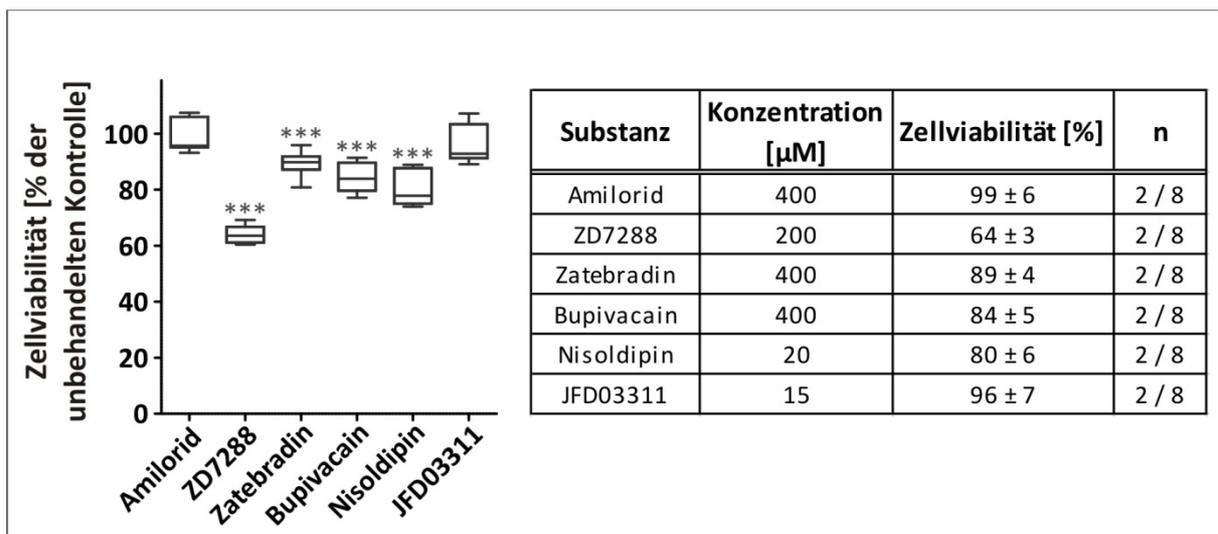


Abb. 35: Untersuchung der Zellviabilität nach Behandlung CNGA3_{E228K}-exprimierender HEK293-Zellen mit pharmakologischen Chaperonen. Für die Substanzbehandlung wurden die Konzentrationen genutzt, welche die höchsten *fold changes* (FC) im Bioassay erbrachten. Die Behandlung mit Amilorid und JFD03311 hatte keinen Effekt auf die Zellviabilität. Dagegen führten die Behandlung mit Zatebradin, Bupivacain und Nisoldipin zu einer geringen und die Behandlung mit ZD7288 zu einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität. ***: $p < 0,001$. n: Anzahl der Transfektionsansätze / Anzahl der Messwerte.

5.4.2 Untersuchung weiterer mutanter, *trafficking*-defizienter CNG-Kanäle

Es wurden pharmakologische Chaperone identifiziert, welche das *trafficking* von CNGA3-Kanälen mit der Mutation p.E228K verbessern können. Anhand der hier durchgeführten

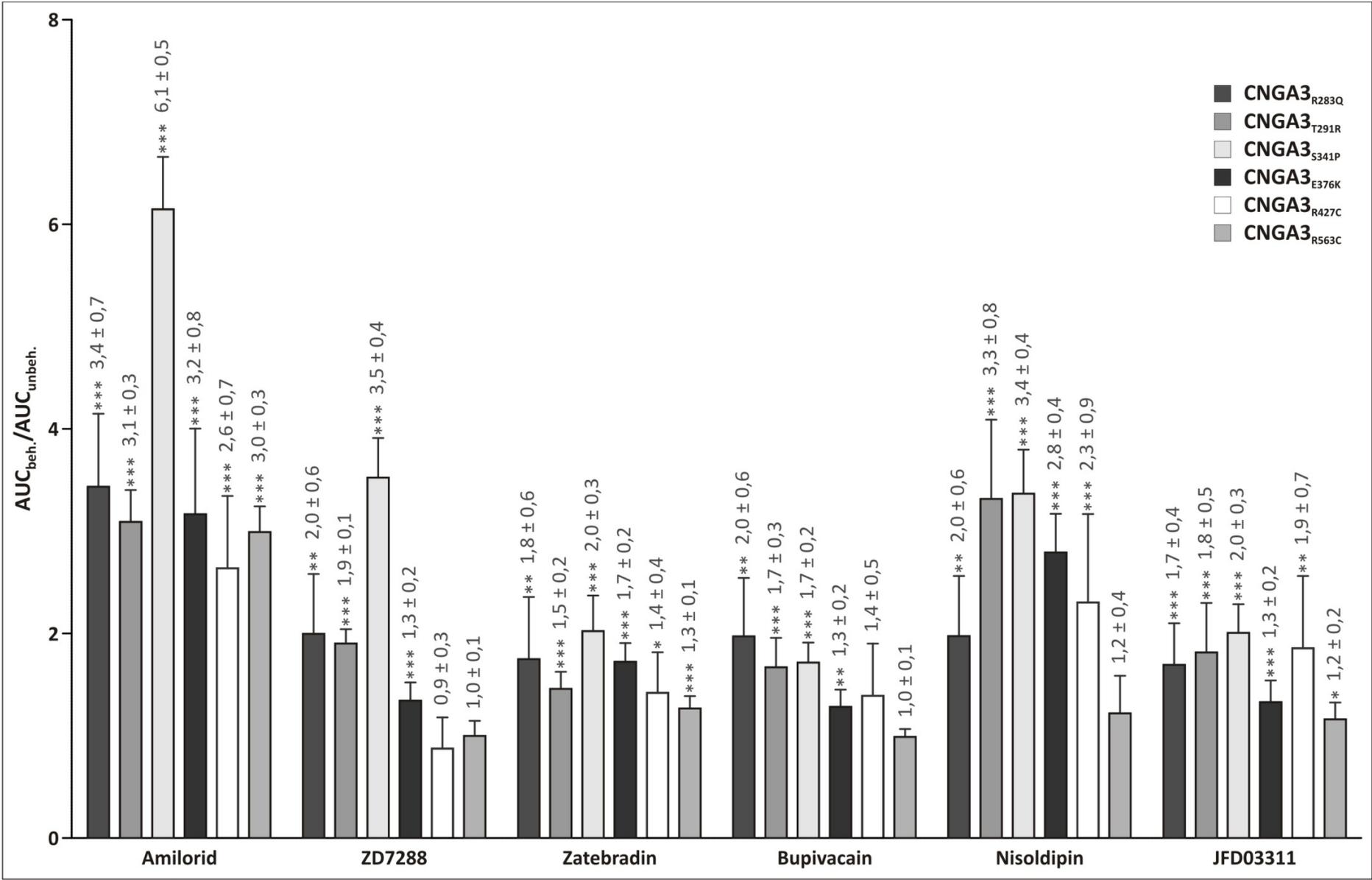
Untersuchungen sollte geprüft werden, ob dieser Effekt auch bei anderen *trafficking*-defizienten Kanälen mit den Mutationen p.R283Q, p.T291R, p.S341P, p.E376K, p.R427C und p.R563C mit den ausgewählten Substanzen erzielt werden kann. Um die Lumineszenzsignale zu erhöhen, wurden in diesem Versuchsabschnitt heteromere Kanäle (CNGA3 und CNGB3) analysiert. In diesem Versuchsabschnitt wurde eine Substanzbehandlung als erfolgreich angesehen, wenn ein FC von mindestens 1,5 erreicht wurde.

Der höchste FC aller untersuchten Kanalmutanten wurde nach Behandlung mit 400 μ M Amilorid bei CNGA3_{S341P} erhalten. Amilorid führte bei dieser Kanalmutante zu einer 6,1-fachen Erhöhung des Lumineszenzsignals gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die Behandlung mit Amilorid war auch bei den anderen fünf Kanalmutanten erfolgreich, jedoch war der Effekt deutlich niedriger ausgeprägt, da hier FC Werte zwischen 2,6 und 3,4 erzielt werden konnten (Siehe Abb. 36).

Nach Behandlung mit ZD7288 wurde der höchste FC mit einem Wert von 3,5 ebenfalls bei CNGA3_{S341P} erfasst. Bei CNGA3_{R283Q} und CNGA3_{T291R} führte die ZD7288-Behandlung zu einem FC von 2,0 bzw. 1,9, also ebenfalls zu einer Verbesserung des Lumineszenzsignals. Für die Kanäle mit den Mutationen p.E376K, p.R563C und p.R427C wurde kein Effekt beobachtet.

Die Zatebradin-Behandlung führte bei vier Kanalmutanten zu einer Erhöhung des Signals mit FC zwischen 1,5 und 2,0, wobei der höchste FC erneut bei CNGA3_{S341P} gemessen wurde. Bei den Kanalmutanten CNGA3_{R427C} und CNGA3_{R563C} wurde nach Zatebradin-Behandlung nur ein geringer Effekt beobachtet – der FC lag in beiden Fällen unter 1,5.

Abb. 36: Wiederherstellung der Oberflächenexpression mutanter, *trafficking*-defizienter CNG-Kanäle durch Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen. CNG-Kanäle mit den Mutationen p.R283Q, p.T291R, p.S341P, p.E376K, p.R427C und p.R563C in der CNGA3-Untereinheit verursachen einen *trafficking*-Defekt. Die Kanalproteine wurden als Heteromere (CNGA3 und CNGB3) in HEK293-Zellen heterolog exprimiert, mit sechs pharmakologischen Chaperonen behandelt und mit dem Bioassay untersucht. Nach der Lumineszenzmessung wurden die AUC der behandelten Wells auf die AUC der unbehandelten Kontrolle normiert, ab einem $FC \geq 1,5$ wurden die Substanzen als aktiv eingestuft. Amilorid zeigte bei allen sechs getesteten Kanalmutanten einen Effekt und lieferte in diesem Versuchsansatz den höchsten ermittelten FC mit 6,1 bei Behandlung von CNG-Kanälen mit der Mutation CNGA3_{S341P}. Bei dieser Kanalmutante zeigte auch ZD7288 Aktivität mit einem FC von 3,5. Die Behandlung mit Nisoldipin resultierte bei fünf Kanalmutanten in einen FC von 2,0-3,5 – kein Effekt zeigte sich bei CNGA3_{R563C}. Nach Behandlung mit Zatebradin und JFD03311 wurde ebenfalls bei CNGA3_{S341P} der höchste FC ermittelt, jeweils mit einem FC von 2,0. Nur bei Bupivacain wurde der höchste Effekt mit einem FC von 2,0 bei CNGA3_{R283Q} gemessen. Die Kanalmutante CNGA3_{R563C} wies nur nach Behandlung mit Amilorid ein $FC \geq 1,5$ auf. n=8; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.



Der höchste FC nach Behandlung mit Bupivacain wurde bei CNGA3_{R283Q} erhalten und führte zu einer 2-fachen Erhöhung des Lumineszenzsignals gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Bei CNGA3_{T291R} und CNGA3_{S341P} lag der FC bei 1,7. Bei CNGA3_{E376K}, CNGA3_{R427C} und CNGA3_{R563C} wurde ein FC kleiner als 1,5 detektiert.

20 µM Nisoldipin führte bei CNGA3_{S341P} und CNGA3_{T291R} zu einem FC von 3,4 bzw. 3,3. Somit war der FC nach Behandlung mit Nisoldipin und ZD7288 bei CNGA3_{S341P} ähnlich hoch. Bei CNGA3_{R283Q}, CNGA3_{E376K} und CNGA3_{R427C} wurden FC zwischen 2,0 und 2,8 erhalten, keine signifikante Erhöhung des Lumineszenzsignals wurde bei CNGA3_{R563C} gemessen.

Nach Behandlung mit JFD03311 wurde der höchste FC bei CNGA3_{S341P} bestimmt, die Behandlung mit JFD03311 war auch bei CNGA3_{R283Q}, CNGA3_{T291R} und CNGA3_{R427C} erfolgreich und führte zu FC Werte zwischen 1,7 und 1,9. Keine Aktivität wurde bei CNGA3_{E376K} und CNGA3_{R563C} nachgewiesen

5.4.3 Untersuchung der Potentiator-Wirkung von Nisoldipin

Bei mutanten CFTR Kanälen wurde ermittelt, dass deren Offenwahrscheinlichkeit durch einige Dihydropyridine, welche hier als pharmakologische Chaperone identifiziert wurden, erhöht werden kann (Pedemonte et al., 2005, Pedemonte et al., 2007; Caputo et al., 2009). Es sollte geprüft werden, ob die im Substanzscreening beobachtete Lumineszenzerhöhungen durch eine verbesserte Oberflächenexpression der CNG-Kanalmutanten hervorgerufen wurde oder auf unspezifische Mechanismen wie der Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit beruhte. Um eine Wirkung als Potentiator zu erfassen, wurde das Assay-Protokoll dahingehend modifiziert, dass die CNGA3_{E228K}-exprimierenden HEK293-Zellen nicht 24 h mit den Substanzen behandelt wurden, sondern die Substanzen erst mit der Cl-Badlösung zugegeben wurden und so während der Messung vorlagen. Parallel zu diesem Versuchsansatz wurden Messungen nach dem ursprünglichen Bioassay-Protokoll durchgeführt. Exemplarisch wurde Nisoldipin, das DHP mit dem ausgeprägtesten Effekt im Substanzscreening, und als Kontrolle für den Versuchsaufbau der CNG-Kanal Antagonist Tetracain getestet.

Wird die Behandlung mit Nisoldipin nach dem ursprünglichen Bioassay-Protokoll durchgeführt, so wird zunächst ein konzentrationsabhängiger Anstieg und bei höheren

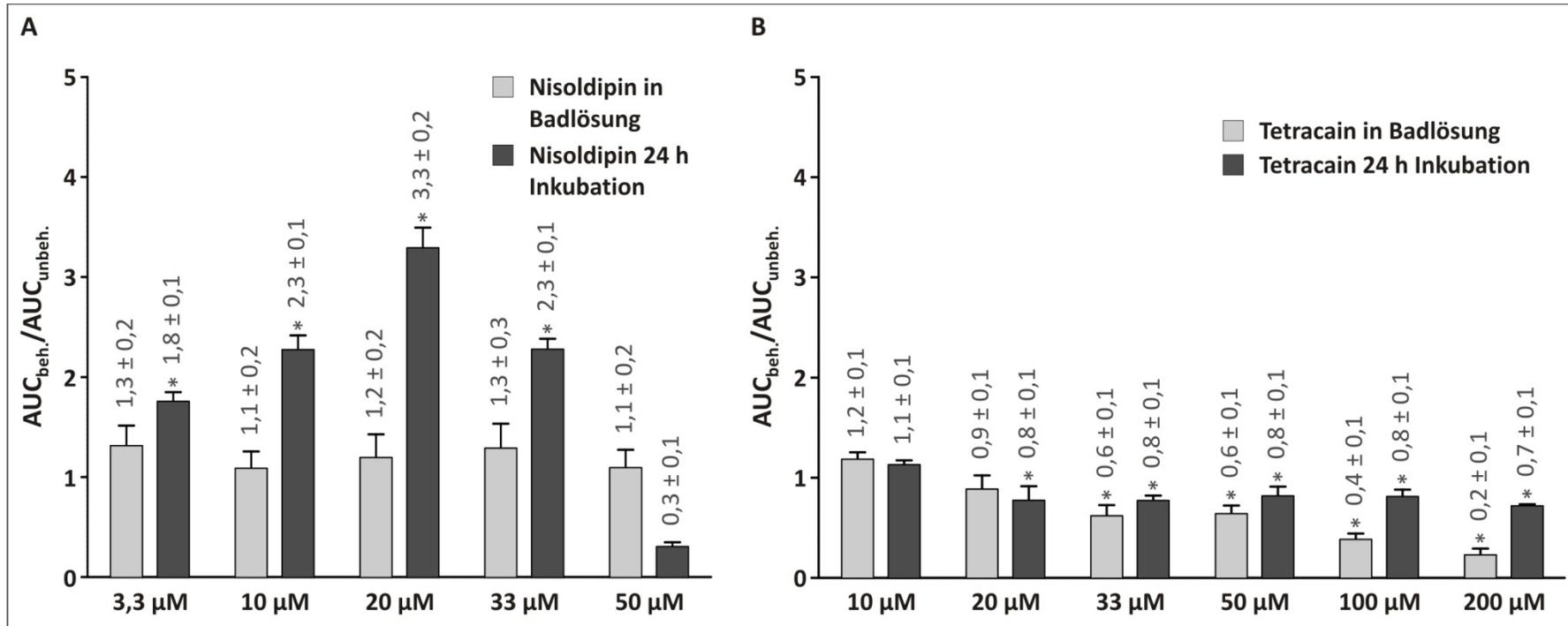


Abb. 37: Untersuchung der Potentiator- und Korrektor-Wirkung von Nisoldipin und Tetracain. Beide Substanzen wurden in verschiedenen Konzentrationen mit zwei Protokollen getestet. Anhand des ursprünglichen Protokolls für den Bioassay mit der 24-stündigen Inkubation der Testsubstanzen konnte die Korrektor-Wirkung untersucht werden (dunkelgrau). Da in nachfolgenden Waschschritten die Testsubstanzen weggewaschen wurden, lag die Testsubstanzen während der Messung nicht vor. Bei dem modifizierten Messprotokoll wurden die Testsubstanzen mit der Badlösung zugegeben (hellgrau), wodurch die Substanzen während der Messung vorlagen und substanzspezifische Veränderungen der Kanalfunktion ermittelt werden konnten (Potentiator/Kanalblock). Bei der Auswertung wurden die AUC der behandelten Wells auf die AUC der unbehandelten Kontrolle normiert. (A) Nach Zugabe verschiedener Nisoldipin-Konzentrationen in die Badlösung und der Lumineszenzmessung wurden nur geringe, nicht-signifikante Unterschiede gegenüber der unbehandelten Kontrolle erfasst. Entsprechend den Ergebnissen aus dem Substanzscreening wurde nach 24-stündiger Inkubation mit Nisoldipin ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Lumineszenzsignals erhalten. Bei 20 µM Nisoldipin wurde das Signalmaximum mit einem FC von 3,3 gemessen. (B) Die Zugabe von Tetracain in die Badlösung führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des Lumineszenzsignals. Nach Applikation von 20 µM Tetracain wurde kein signifikanter Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen, aber nach Applikation von 200 µM betrug der gemittelte FC nur noch einen Wert von 0,2. Nach 24-stündiger Inkubation von 20 – 200 µM Tetracain wurde gegenüber der unbehandelten Kontrolle eine signifikante Reduktion des Lumineszenzsignals gemessen, über die gemessenen Konzentrationen veränderte sich aber das Lumineszenzsignal kaum. n=4; *: p<0,05.

Konzentrationen ein Abfall der Lumineszenz gegenüber der unbehandelten Kontrolle gemessen. Das Maximum lag, vergleichbar zu dem Ergebnis aus dem Substanzscreening, bei 20 μM Nisoldipin. Wurden die CNGA3_{E228K}-exprimierenden HEK293-Zellen nicht mit Nisoldipin behandelt, sondern lag dieses während der Messung vor, so wurden auch bei variierenden Konzentrationen keine Veränderungen in dem Lumineszenzsignal erfasst (Siehe Abb. 37). Tetracain dagegen führte nach dem ursprünglichen Bioassay-Protokoll bei einer Konzentration von 10 μM zu einer leichten Erhöhung des Signals gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Bei höheren Tetracainkonzentrationen war das Signal signifikant kleiner als bei der unbehandelten Kontrolle, blieb aber bei ansteigenden Konzentrationen weitestgehend konstant. Wurde das Tetracain in verschiedenen Konzentrationen in die Badlösung gegeben, so trat eine konzentrationsabhängige Reduktion des Lumineszenzsignals auf. Bei 200 μM Tetracain wurde entsprach das erfasste Lumineszenzsignal nur einem Fünftel verglichen mit dem Signal der unbehandelten Kontrolle.

5.4.4 Einfluss der Substanzen auf die Apoaequorin und CNGA3_{E228K}-Expression

Der in dem Screening beobachtete Anstieg des Lumineszenzsignal nach Substanzbehandlung konnte nicht nur durch eine verbesserte Oberflächenexpression der CNG-Kanalmutante hervorgerufen worden sein, sondern auch durch einer Erhöhung der Expression des Reporters Apoaequorin oder des CNGA3-Proteins bedingt sein. Um dies zu klären, wurden Western Blot-Untersuchungen durchgeführt. Es wurden HEK293-Zellen, welche CNGA3_{E228K} oder Apoaequorin exprimierten mit den sechs ausgewählten Substanzen behandelt und analysiert, als Kontrolle wurde die Behandlung mit Glycerol durchgeführt. Bei der Auswertung wurden die Bandenintensitäten der CNGA3- und Apoaequorinbanden auf die Ladekontrolle β -Aktin bezogen und die Werte der behandelten Proben auf die unbehandelte Kontrolle normiert.

Nach Transfektion des Apoaequorin wurde nach Behandlung mit Amilorid, Bupivacain und Nisoldipin eine starke Erhöhung des Expressionslevel des Apoaequorins ermittelt (Siehe Abb. 38).

ERGEBNISSE

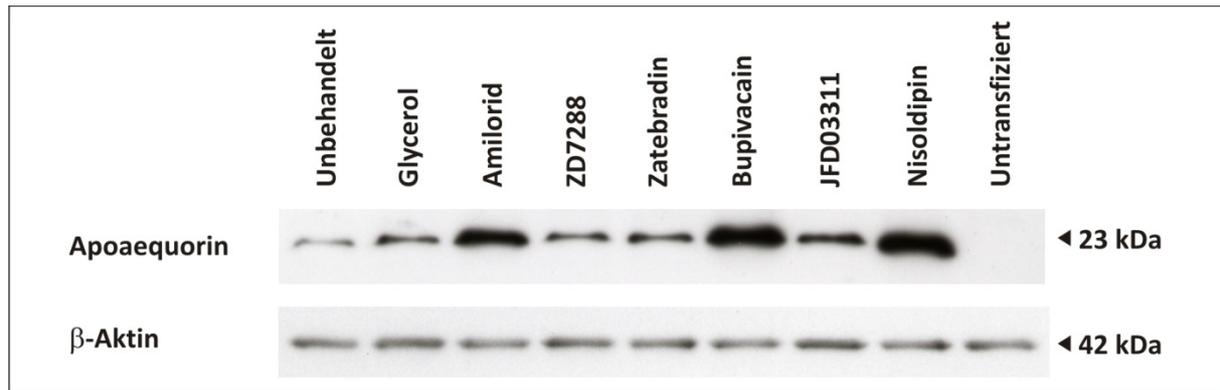


Abb. 38: Western Blot Ergebnisse zur Bestimmung der Expressionslevel von Apoaequorin nach Behandlung mit sechs pharmakologischen Chaperonen. HEK293-Zellen, welche Apoaequorin transient exprimierten wurden mit sechs Substanzen behandelt und das Expressionslevel des Apoaequorins untersucht. Nach Behandlung mit Amilorid, Bupivacain und Nisoldipin wurde eine deutliche Erhöhung des Expressionslevels im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachgewiesen, die Behandlung mit den anderen pharmakologischen Chaperonen oder der Kontrolle Glycerol führte ebenfalls zu einem Anstieg in dem Expression des Apoaequorins, welcher aber deutlich geringer als bei den Amilorid, Bupivacain und Nisoldipin war. Das β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Das Expressionslevel des Apoaequorins wies eine 10,7-fache Erhöhung nach Behandlung mit Amilorid, eine 18,1-fache mit Bupivacain und eine 25,4-fache Erhöhung des Expressionslevels nach Behandlung mit Nisoldipin auf. Nach Behandlung mit Zatebradin, ZD7288 und JFD03311 und der Kontrollbehandlung mit 2,5 % Glycerol wurde ebenfalls eine Erhöhung des Expressionslevels des Apoaequorins erfasst, welche aber nur bei JFD03311 statistisch signifikant höher verglichen mit der unbehandelten Kontrolle lag (Siehe Tab. 17).

Tab. 17: Expressionslevel des Reporters Apoaequorin ohne Behandlung, nach Behandlung mit sechs ausgewählten pharmakologischen Chaperonen und nach Behandlung mit Glycerol als Kontrolle.

Behandlung	Konzentration	FC ± SD	n	Statistik
Unbehandelt	-	1,0 ± 0,4	3	-
Glycerol	2,5 %	1,8 ± 0,6	3	n.s.
Amilorid	400 µM	10,7 ± 7,0	3	p<0,05
ZD7288	200 µM	2,4 ± 1,6	3	n.s.
Zatebradin	400 µM	3,7 ± 3,2	3	n.s.
Bupvacain	400 µM	18,1 ± 5,8	3	p<0,05
Nisoldipin	20 µM	25,4 ± 9,7	3	p<0,05
JFD03311	15 µM	5,3 ± 2,7	3	p<0,05

FC: Bandenintensität der behandelten Probe normiert auf die unbehandelte Kontrolle; SD: Standardabweichung; n: Anzahl unabhängiger Experimente; n.s.: nicht signifikant

Da bei den DHP Nisoldipin und JFD03311 eine deutliche Überexpression des Apoaequorins gemessen wurde, stellte sich die Frage, ob I) auch andere DHP zu einer Überexpression des Reporters führen und II) die Überexpression des Reporters Enantiomer-spezifisch ist. Somit wurden in einem weiteren Versuchsansatz der Effekt von Benidipin, Niguldipin und den beiden Nisoldipin-Enantiomeren getestet. Das Benidipin und Niguldipin wurden ausgewählt, da sie I) Aktivität in dem Bioassay aufwiesen und II) eine größere Moleküloberfläche als das Nisoldipin und das JFD03311 besitzen und somit mehr und vermutlich auch spezifischere Interaktionen mit dem CNG-Kanal eingehen konnten. Als Kontrolle wurde das Nisoldipin-Racemat genutzt.

Für das Nisoldipin-Racemat wurde erneut eine starke Überexpression von Apoaequorin nachgewiesen, welche ebenfalls nach Behandlung mit dem in dem Bioassay aktiven Enantiomer des Nisoldipins – dem R (-) Nisoldipin – erhalten wurde (Siehe Abb. 39).

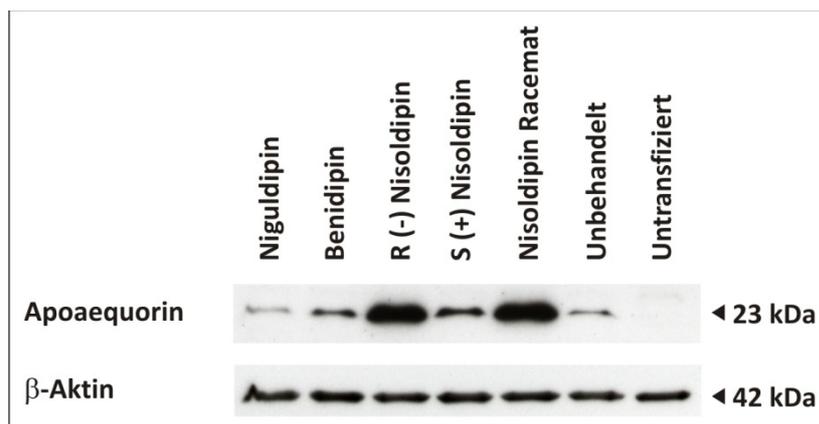


Abb. 39: Expressionslevel von Apoaequorin nach Behandlung transfizierter HEK293-Zellen mit den zwei Nisoldipin-Enantiomeren, dem Nisoldipin Racemat, Niguldipin und Benidipin. Nisoldipin und das R (-) Enantiomer führten zu einer deutlichen Erhöhung des Apoaequorinlevels und das Benidipin sowie das S (+) Nisoldipin zu einer leichten Erhöhung der Apoaequorinexpression gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Im Gegensatz dazu wurde mit Niguldipin eine geringe Reduktion des Expressionslevels gegenüber der unbehandelten Kontrolle beobachtet. Das β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Nach Behandlung mit S (+) Nisoldipin wurde eine Erhöhung des Expressionslevels des Apoaequorin um den Faktor 2,7 gemessen, welche somit deutlich geringer als bei dem R (-) Nisoldipin war. Nach Behandlung mit Benidipin wurde eine 1,5-fache Überexpression des Reporterproteins und nach Behandlung mit Niguldipin eine Halbierung der Apoaequorin-Expression beobachtet (Siehe Tab. 18).

ERGEBNISSE

Tab. 18: Expressionslevel des Apoaequorins nach Behandlung transfizierter HEK293-Zellen mit den beiden Nisoldipin-Enantiomeren, dem Nisoldipin Racemat, Benidipin und Niguldipin.

Behandlung	Konzentration [μM]	FC	n
Unbehandelt	-	1,0	1
Niguldipin	0,66	0,5	1
Benidipin	3,3	1,6	1
R (-) Nisoldipin	10	23,2	1
S (+) Nisoldipin	10	2,7	1
Nisoldipin Racemat	20	24,0	1

FC: Bandenintensität der behandelten Probe normiert auf die unbehandelte Kontrolle; n: Anzahl unabhängiger Experimente.

Die Behandlung von $\text{CNGA3}_{\text{E228K}}$ -exprimierenden HEK293-Zellen mit den sechs pharmakologischen Chaperonen und 2,5 % Glycerol führte ebenfalls zu einem erhöhten Expressionslevel (Siehe Abb. 40), wobei der höchste Effekt nach Glycerol-Behandlung auftrat.

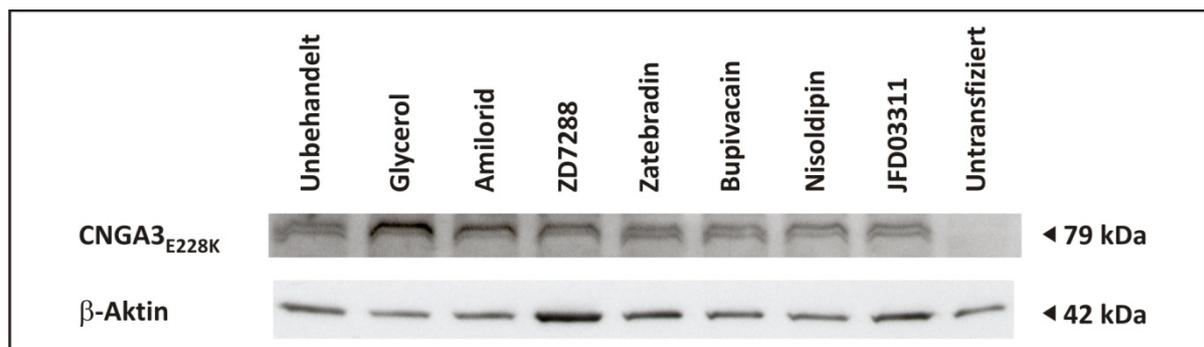


Abb. 40: Western Blot Ergebnisse zur Bestimmung der Expressionslevel von $\text{CNGA3}_{\text{E228K}}$ nach Behandlung mit sechs pharmakologischen Chaperonen. In HEK293-Zellen, welche $\text{CNGA3}_{\text{E228K}}$ transient exprimieren, wurde die Expression des mutanten Kanals durch Behandlung mit Glycerol deutlich erhöht. Bei den pharmakologischen Chaperonen trug die Behandlung mit Amilorid zu einer leichten Erhöhung des Expressionslevels bei, bei den anderen Substanzen wurde kein deutlicher Einfluss auf das Expressionslevel festgestellt. Das β -Aktin wurde als Ladekontrolle für die anschließende Quantifizierung verwendet.

Die Quantifizierung des Expressionslevels von $\text{CNGA3}_{\text{E228K}}$ war bei ZD7288 und Bupivacain aufgrund von inkonsistenten Daten keine Quantifizierung möglich. Eine Verdopplung des Expressionslevel von $\text{CNGA3}_{\text{E228K}}$ wurde nach Behandlung mit 2,5 % Glycerol erhalten, Amilorid und das Nisoldipin führten zu einer 1,9-fachen bzw. 1,7-fachen Erhöhung des Expressionslevels, das JFD03311 um den Faktor 1,6 und das Zatebradin um den Faktor 1,5 (Siehe Tab. 19).

Tab. 19: Expressionslevel des CNG-Kanals mit der Mutation p.E228K nach Behandlung mit sechs ausgewählten pharmakologischen Chaperonen.

Behandlung	Konzentration	FC ± SD	n	Statistik
Unbehandelt	-	1,0 ± 0,3	3	-
Glycerol	2,5 %	2,0 ± 0,7	3	p<0,05
Amilorid	400 µM	1,9 ± 0,3	3	p<0,05
Zatebradin	400 µM	1,5 ± 0,3	3	n.s.
Nisoldipin	20 µM	1,7 ± 0,5	3	n.s.
JFD03311	15 µM	1,6 ± 0,0	3	p<0,05

FC: Bandenintensität der behandelten Probe normiert auf die unbehandelte Kontrolle; SD: Standardabweichung; n: Anzahl unabhängiger Experimente; n.s.: nicht signifikant.

5.4.5 Einfluss der pharm. Chaperone auf die Oberflächenexpression von CNGA3_{WT}-Kanälen

Die meisten der im Western Blot untersuchten DHP führten zu einer Erhöhung der Apoaequorinexpression. Erhöhte Mengen des Reporters im Bioassay könnten wiederum zu einer Erhöhung des Lumineszenzsignals führen. Es sollte untersucht werden, ob die Aktivität der Testsubstanzen im Bioassays nur auf die Überexpression des Reporters zurückzuführen ist, oder ob und zu welchem Teil eine Wiederherstellung der Oberflächenexpression des mutanten Kanals erfolgt. Für diese Untersuchung wurden Apoaequorin- und CNGA3_{WT}-exprimierende HEK293-Zellen verwendet. Das Wildtyp Protein weist keinen *trafficking*-Defekt auf, somit wäre eine Erhöhung der Lumineszenz ausschließlich auf das höhere Expressionslevel des Reporters zurückzuführen. Durch Vergleich der Messwerte, die für die *trafficking*-defiziente Kanäle mit der Mutation p.E228K und dem Wildtyp Kanal erzielt wurden, kann anschließend der Effekt bestimmt werden, welcher auf die Wiederherstellung der Faltung und/oder des Transport des mutanten Kanals zur Plasmamembran zurückzuführen ist. Als Testsubstanzen wurden alle Dihydropyridine eingesetzt, welche in dem Bioassay Aktivität aufwiesen, sowie das Amilorid, das Bupivacain und das ZD7288.

Insgesamt wurden mit diesem Versuchsansatz 19 pharmakologische Chaperone getestet. Eine Lumineszenzerhöhung um den Faktor 2 oder höher gegenüber der unbehandelten Kontrolle wurde bei den Substanzen Nisoldipin und Amilorid erhalten. Deutliche Erhöhungen der Lumineszenzwerte um einen Faktor von etwa 1,5 bis 1,9 wurden außerdem für die Substanzen OSSK_390157 und Bupivacain erfasst. Geringe Effekte mit signifikantem

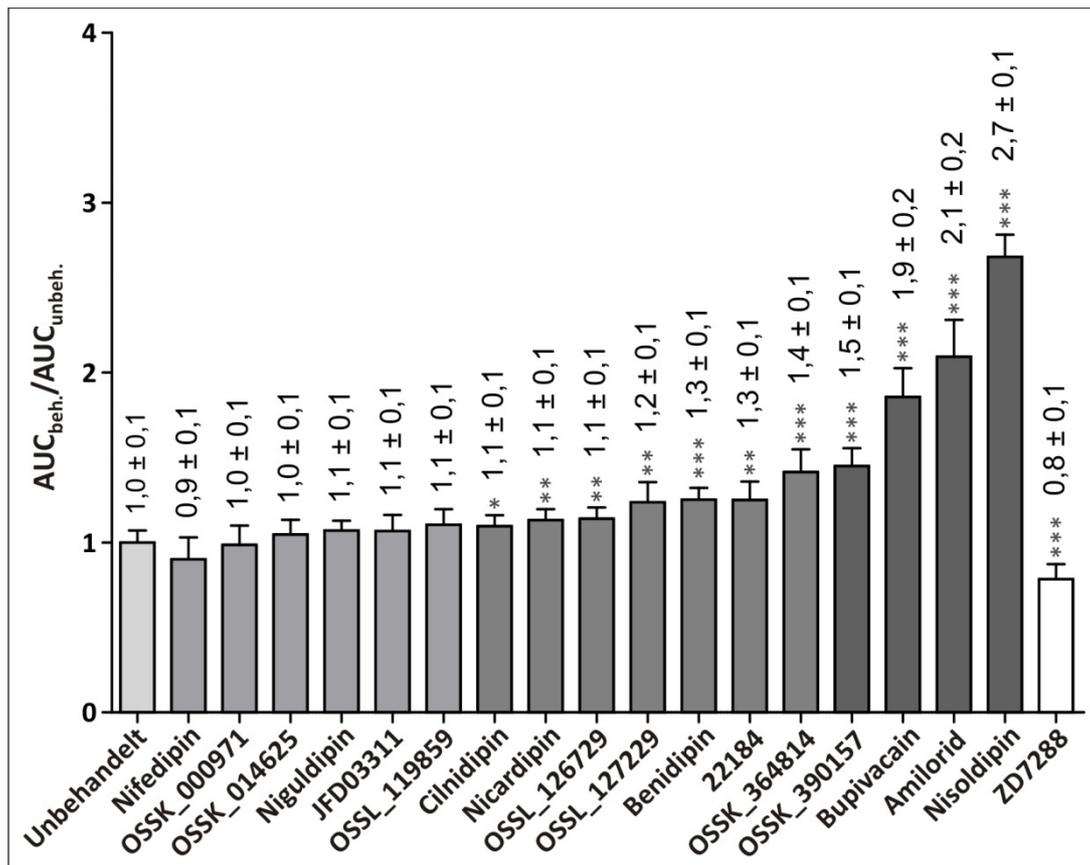


Abb. 41: Effekt pharmakologischer Chaperone auf die Oberflächenexpression von CNGA3_{WT} Kanälen Der Wildtyp CNGA3-Kanal besitzt keinen *trafficking*-Defekt, Erhöhungen in dem Lumineszenzsignal nach Behandlung mit den pharmakologischen Chaperonen wären somit durch das erhöhte Expressionslevel des Reporters zu erklären. OSSK_390157, Bupivacain, Amilorid und Nisoldipin wiesen einen deutlich erhöhten FC zwischen 1,5 und 2,7 in dem Assay auf. Die Substanzen Cilnidipin, Nicardipin, OSSL_126729, OSSL_127229, Benidipin, 22184 und OSSK_364814 zeigten eine signifikante Erhöhung gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit einem FC zwischen 1,1 und 1,4. Keinen statistisch signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle wiesen die Substanzen Nifedipin, OSSK_000971, OSSK_014625, Niguldipin, JFD03311 und OSSL_119859 auf. Bei ZD7288 wurde ein FC von 0,8 gemessen. n=8; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001.

Nicardipin, OSSL_126729, OSSL_127229, Benidipin, 22184 und OSSK_364814 mit einem FC von 1,1 bis 1,4 erhalten. Keinen statistisch signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle wiesen die Substanzen Nifedipin, OSSK_000971, OSSK_014625, Niguldipin, JFD03311 und OSSL_119859 auf. Nach Behandlung mit ZD7288 war die normierte AUC mit einem FC von 0,8 sogar niedriger als bei der unbehandelten Kontrolle (Siehe Abb. 41).

5.4.6 Oberflächenbiotinylierung zum Nachweis der Wiederherstellung des *traffickings*

Eine erhöhte Oberflächenexpression des *trafficking*-defizienten CNGA3_{E228K}-Kanals durch die Substanzen Amilorid, Bupivacain, JFD03311, Nisoldipin, ZD7288 und Zatebradin sollte mit einer zweiten, unabhängigen Methode bestätigt werden. Dazu wurde an CNGA3_{E228K}-exprimierenden HEK293-Zellen im Anschluss an die Substanzbehandlung eine Oberflächenbiotinylierung durchgeführt. Diese Methode erlaubt die Detektion und Quantifizierung der in der Plasmamembran vorhandenen CNG-Kanäle. Die biotinylierten Proteine wurden über eine Säule aufgereinigt und vergleichend zu Gesamtlysatproben anhand von Western Blot Untersuchungen analysiert und so die Menge des mutanten CNGA3 in beiden Fraktion bestimmt. Durch Vergleich der CNGA3_{E228K}-Menge im Gesamtlysat konnten toxische Effekte bedingt durch die Substanzbehandlung kompensiert werden. Die ermittelten Werte wurden auf die unbehandelte CNGA3_{E228K}-Probe normiert. Als Kontrolle wurde das Wildtyp Protein ohne Substanzbehandlung mitgeführt.

Abb. 42 zeigt ein repräsentatives Ergebnis des Western Blots. In dem Gesamtlysat ist nach Expression des CNGA3_{WT} bereits deutlich mehr Kanalprotein vorhanden als nach Expression des CNGA3_{E228K}. Auch in der biotinylierten Fraktion ist die Bande nach Expression des Wildtyp-Proteins deutlich stärker verglichen mit der Bande nach Expression des CNGA3_{E228K} und ohne Substanzbehandlung. Nach der Durchführung einer Substanzbehandlung bei Zellen, welche das mutante Kanalprotein exprimierten, wurde nach Behandlung mit Amilorid eine Erhöhung membranständiger CNG-Kanäle nachgewiesen, nach Behandlung mit den anderen Substanzen traten keine offensichtlichen Veränderungen in der Oberflächenexpression des mutanten CNG-Kanals auf (Siehe Abb. 42).

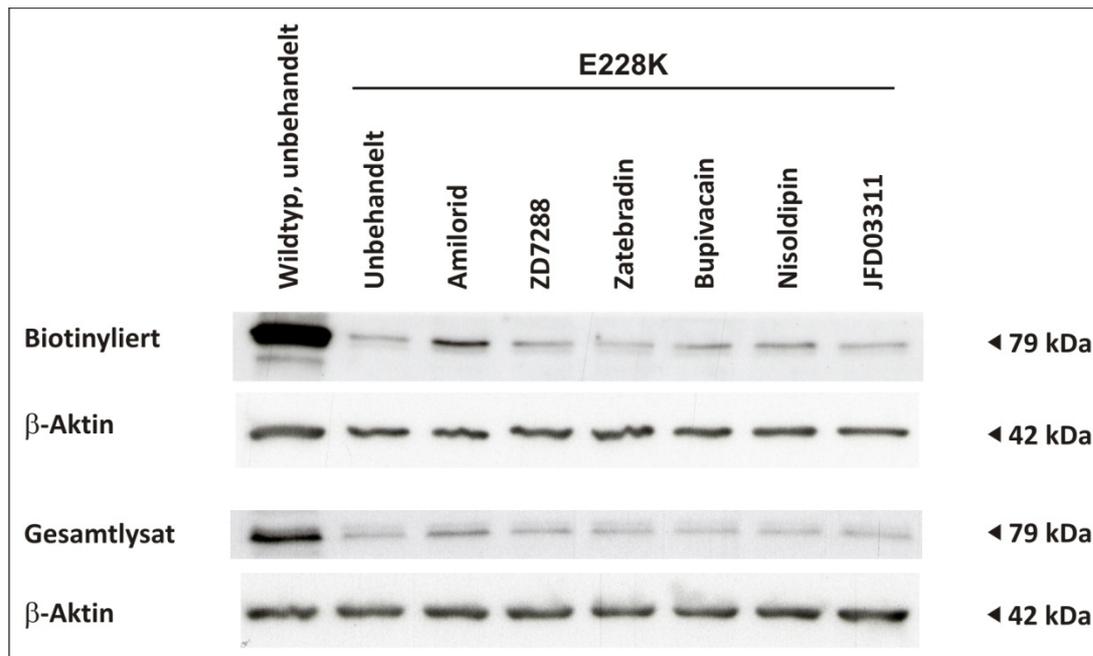


Abb. 42: Bestimmung der Oberflächenexpression von CNGA3_{E228K} nach Substanzbehandlung anhand von Oberflächenbiotinylierung und Western Blot Experimenten. HEK293-Zellen, welche CNGA3_{E228K}-Kanäle exprimierten, wurden mit verschiedenen pharmakologischen Chaperonen behandelt: Amilorid, ZD7288, Zatebradin, Bupivacain, Nisoldipin oder JFD03311. Nach der Oberflächenbiotinylierung wurde das biotinylierte Protein aufgereinigt und anschließend CNGA3 mittels Western Blot im Gesamtlysat und der biotinylierten Fraktion detektiert. Als Kontrolle wurde der unbehandelte Wildtyp Kanal mitgeführt und die Markierung des β -Aktin diene als Ladekontrolle. Nach Expression des Wildtyp-Proteins wurde im Gesamtlysat eine deutlich höhere Menge an CNG-Kanälen nachgewiesen als nach Expression des CNGA3_{E228K}. In der biotinylierten Fraktion wurde ebenfalls eine deutlich stärkere Bande nach Expression des Wildtyp Proteins verglichen mit dem unbehandelten mutanten Protein erfasst. Nach der Behandlung mit dem Amilorid wurde eine stärkere CNGA3_{E228K}-Bande verglichen mit der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen, die anderen pharmakologischen Chaperone führten zu keinen offensichtlichen Veränderungen der Oberflächenexpression.

Für eine exakte Auswertung der Western Blot Ergebnisse wurden die Bandenintensitäten der Proben (biotinylierte Fraktion) bestimmt, auf die Ladekontrolle β -Aktin normiert und verglichen. Die Daten stammen von zwei unabhängigen Experimenten – ein dritter Ansatz wurde aufgrund inkonsistenter Ergebnisse für die CNGA3_{WT}-Kontrollprobe nicht berücksichtigt. Der unbehandelte Wildtyp-Kanal wies eine um den Faktor 3,0 höhere Oberflächenexpression als CNGA3_{E228K} auf (Siehe Tab. 20). Wurde die *trafficking*-defiziente Kanalmutante mit den Substanzen Amilorid, ZD7288 und JFD03311 behandelt, so erhöhte sich der Anteil membranständiger CNG-Kanäle um den Faktor 1,4, 1,6 bzw. 1,3. Nach Behandlung mit Nisoldipin und Bupivacain war nahezu kein Unterschied in der Oberflächenexpression verglichen mit der unbehandelten Kontrolle bemerkbar, die Behandlung mit Zatebradin führte zu einer geringfügig reduzierten Oberflächenexpression.

Tab. 20: Auswertung der Western Blot Ergebnisse zur Bestimmung der Oberflächenexpression von homomeren CNG-Kanälen mit der Mutation p.E228K nach Behandlung mit sechs verschiedenen pharmakologischen Chaperonen. Als Kontrolle dienten Wildtyp CNGA3-Kanäle. Die Daten wurden auf die unbehandelte CNGA3_{E228K}-Probe normiert. Die Daten stammen von zwei unabhängigen Experimenten.

	Substanzbehandlung		FC ± SD	n
	Substanz	Konzentration [µM]		
CNGA3 _{WT}	-	-	3,0 ± 0,9	2
CNGA3 _{E228K}	-	-	1,0 ± 0,1	2
	Amilorid	400	1,4 ± 0,1	2
	ZD7288	200	1,6 ± 0,6	2
	Zatebradin	400	0,9 ± 0,4	2
	Bupivacain	400	1,1 ± 0,1	2
	Nisoldipin	20	1,1 ± 0,1	2
	JFD03311	15	1,3 ± 0,1	2

FC: *fold change*, repräsentiert das gemittelte Verhältnis der Bandenintensität von Gesamtlysat zu der biotinylierten Fraktion normiert auf die unbehandelte CNGA3_{E228K}-Probe; SD: Standardabweichung; n: Anzahl unabhängiger Experimente.

6. Diskussion

Das Vorhandensein von Mutationen wie der p.F508del in CFTR führt zu Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur des Proteins gegenüber dem Wildtyp Protein (Serohijos et al., 2008; Protasevich et al., 2010). Die fehlerhafte Faltung wird durch das Proteinqualitätskontrollsystem erkannt und führt zu einer Retention des fehlgefalteten Proteins im Zellinneren und zum proteasomalen Abbau (Younger et al., 2006) bzw. Autophagievermittelten Abbau (Fu und Sztul; 2009). Durch den Einsatz pharmakologischer Chaperone wie dem VX-809 kann die Oberflächenexpression des mutanten CFTR erhöht werden (Farinha et al., 2013). Bislang wurden *trafficking*-Defekte für eine Vielzahl weiterer Proteine beschrieben, wie z.B. dem mutanten hERG-Kanal und dem mutanten Rhodopsin (Sato et al., 1996; Tamarappoo und Verkman, 1998; Burrows et al., 2000; Ficker et al., 2000; Sawkar et al., 2002; Noorweez et al., 2003; Ueda et al., 2004; Gelsthorpe et al., 2008; Lee et al., 2010; Majtan et al., 2010; Valenzano et al., 2011; Thompson et al., 2012; Siekierka et al., 2012; Porto et al., 2012; Mesa-Torres et al., 2013; Orhan et al., 2013; LaConte et al., 2014; Murray et al., 2014; Milhem et al., 2014; Chen et al., 2014; Pomozi et al., 2014; Brookes et al., 2014; Wang et al., 2014b; Pey et al., 2014). Verschiedene Mutationen in dem mit der Achromatopsie assoziiertem *CNGA3*-Gen führen ebenfalls zu einem *trafficking*-Defekt in dem kodierten Protein (Koeppen et al., 2008; Reuter et al., 2008; Ding et al., 2010; Duricka et al., 2012). Anhand der Kanalmutante *CNGA3*_{E228K} sollten in diesem Projekt chemische und pharmakologische Chaperone identifiziert werden, welche die Oberflächenexpression von mutanten CNG-Kanälen erhöhen. Dazu wurde zunächst ein geeigneter Bioassay entwickelt und etabliert, mit welchem die Oberflächenexpression des CNG-Kanals erfasst und quantifiziert werden konnte.

6.1 Design des Aequorin-basierten Bioassay

Um die Durchführung eines Screenings zur Identifizierung von Substanzen, welche die Oberflächenexpression mutanter, *trafficking*-defizienter *CNGA3*-Kanäle erhöhen, zu ermöglichen, wurde im ersten Schritt ein Bioassay entwickelt. Der dafür benötigte Assay sollte (I) eine relative Quantifizierung der CNG-Kanäle in der Plasmamembran ermöglichen und (II) ein Substanzscreening mit mittlerem Durchsatz erlauben.

Für Substanzscreenings an Ionenkanälen können verschiedene Prinzipien, wie z.B. immunzytochemischen Färbungen (Carlile et al., 2007), *patch-clamp* Messungen (Moran und Zegarra-Moran; 2008) oder der Einsatz von Fluoreszenz- oder Lumineszenzindikatoren (Song et al., 2008; Vasilyev et al., 2009; Castillo et al., 2010) genutzt werden. Anhand von immunzytochemischen Färbungen, mittels eines Antikörpers der ein extrazelluläres Epitop erkennt bzw. durch Detektion anhand eines extrazellulären Tags, können spezifisch die Kanäle markiert und quantifiziert werden, welche in der Zellmembran lokalisiert sind. Ein derartiges Vorgehen war für die hier untersuchten CNG-Kanäle nicht möglich, da Antikörper, die ein extrazelluläres Epitop in CNGA3 detektieren, nicht zur Verfügung standen und der Einbau von (extrazellulären) Tags in CNGA3 *per se* zu einer Beeinträchtigung der Oberflächenexpression führt. *Patch-clamp* Messungen wurden wegen des hohen technischen Aufwand und dem geringen Durchsatz bislang nur für einzelne Substanzen durchgeführt, wie für den mutanten hERG-Kanal gezeigt (Zhou et al., 1999; Sampson et al., 2013; Mao et al., 2013). Eine Untersuchung von 50 – 100 Substanzen ist für CNG-Kanäle schwer zu realisieren. Die Oberflächenexpression von Ionenkanälen sollte in der *whole-cell*-Konfiguration untersucht werden. Homomere CNGA3-Kanäle sind jedoch Liganden-gesteuerte Ionenkanäle mit einer intrazellulär lokalisierten Ligandenbindungsdomäne, was eine gezielte Aktivierung und Inaktivierung der Kanäle im *whole-cell* Modus unmöglich macht. CNG-Kanäle können sehr gut in *inside-out patches* untersucht werden, hierbei hat man jedoch das Problem, dass man die Kanäle in isolierten Membranstücken untersucht und die Kanaldicht in diesem *patch* nicht unbedingt repräsentativ für die Kanaldichte der gesamten Zelle ist. Zudem sind immunzytochemischen Färbungen und *patch-clamp* Messungen nur unter hohen technischen Aufwand im mittleren bis hohen Durchsatz durchführbar.

Daher war die Grundidee für den hier entwickelten Assay, die Oberflächenexpression der CNG-Kanäle indirekt durch den vermittelten Calciumeinstrom und damit der Menge an intrazellulär freien Calciumionen zu bestimmen. Die Messung des Calciumeinstroms kann grundsätzlich mit verschiedenen Calciumsensoren durchgeführt werden: calciumabhängige Fluoreszenzfarbstoffe und genetisch kodierte Calciumsensoren (*genetically encoded calcium indicators*, GEI). Membranpermeable Fluoreszenzfarbstoffe besitzen den Nachteil, dass sie trotz Estermodifizierung aus der Zelle entweichen oder in andere subzelluläre Kompartimente diffundieren können. Außerdem können membranpermeable

DISKUSSION

Fluoreszenzfarbstoffe bei längeren Messungen ausbleichen. Genetisch kodierte Calciumsensoren lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen: (I) nicht-ratiometrische GECl, (II) ratiometrische GECl und (III) Biolumineszenz-basierte Calciumsensoren. Mitglieder der Gruppen I und II zählen zu der Familie der Fluoreszenz-basierten Calciumsensoren und benötigen somit eine Anregung, um die Fluoreszenzsignale messen zu können. Genetisch kodierte Biolumineszenz-basierte Calciumsensoren wie das Aequorin benötigen keine Anregung, dadurch tritt kein Ausbleichen auf, die Anzahl falsch-positiver Treffer durch autofluoreszente Substanzen ist niedriger (Menon et al., 2008) und es reicht ein einfacher Lumineszenz-Mikroplattenreader mit Einzelphoton-Detektion für die Messung aus. Daneben ist das Aequorin nicht zytotoxisch, bindet nur in geringem Maße andere zweiwertigen Ionen (Le Poul et al., 2002) und das Aequorin verfügt über einen großen dynamischen Bereich wodurch Calciumkonzentrationen in biologisch relevanten Konzentrationen gemessen werden können (Brini et al., 1995; Dupriez et al., 2002). Somit fiel die Wahl auf das Aequorin.

Als heterologes Expressionssystem für den Aequorin-basierten Bioassay wurden HEK293-Zellen verwendet, da diese Zelllinie keine intrinsische Expression von CNGA3 oder CNGB3 zeigt (Koeppen et al., 2008) und einfach sowie mit hoher Effizienz zu transfizieren ist.

Der so entwickelte Assay ermöglichte die Messung des Calciumeinstroms in einem 96-Well-Platten Format im mittleren Durchsatz, so dass die Untersuchung von knapp 100 Substanzen in verschiedenen Konzentrationen und mehreren Replikaten möglich war.

Optimierung der Versuchsbedingungen des Bioassay

Für die Entwicklung des Aequorin-basierten Bioassays wurde zunächst die Lokalisation des Reporterproteins optimiert, da zu Beginn ein Expressionskonstrukt zur Verfügung stand, das die Lokalisation von Aequorin in Mitochondrien vermittelte. Es sollte jedoch die Menge an freiem Calcium im Zytoplasma detektiert werden. Somit wurde die mitochondriale *Targeting*-Sequenz am Apoaequorin entfernt und dessen korrekte Lokalisation im Zytoplasma durch immunzytochemische Färbungen verifiziert (Siehe Abb. 8). Im nächsten Schritt wurde getestet, ob mit dem zytoplasmatischen Apoaequorin der CNG-Kanal vermittelte Calciumeinstrom im heterologen Expressionssystem erfasst werden kann. Bei Ko-Expression von Aequorin und homomeren Wildtyp CNG-Kanälen konnten nach Applikation des Liganden 8-Br-cGMP ein transientes Lumineszenzsignal mit hohem

Signal/Rausch-Verhältnis detektiert werden – das Lumineszenzmaximum lag bei $6,39 \times 10^5$ RLU und wurde nach 10 Sek nach Applikation des Liganden erreicht (Siehe Abb. 9). Das dieses Signal durch einen CNG-Kanal-vermittelten Calciumeinstrom ausgelöst wird, konnte durch Kontrollexperimente, bei denen (I) Cl Lösung ohne den Liganden appliziert wurde und (II) die Applikation von 8-Br-cGMP zu HEK293-Zellen, die nur Aequorin und keine CNG-Kanäle exprimierten, bestätigt werden. In beiden Kontrollen wurden kleinere Lumineszenzsignale ($0,08 \times 10^5$ und $0,04 \times 10^5$ RLU) gemessen (Siehe Abb. 9), welche mit dem Zeitpunkt der Ligandenapplikation korrelierten und daher als „Applikationsartefakt“ angesehen wurde. Dieses wurde möglicherweise durch endogene, zugaktivierte Calcium-leitende Ionenkanäle hervorgerufen wie die *transient receptor potential channel* (TRP-) Kanaluntereinheit TRPC1 (Maroto et al., 2005) welche endogen in HEK293-Zellen exprimiert wird (Skopin et al., 2013) und vermutlich bei der Flüssigkeitszugabe durch den Injektor aktiviert wurde.

Der transiente Verlauf des spezifischen Lumineszenzsignals wurde nicht durch den Zapfen CNG-Kanal verursacht, da dieser nicht desensitisiert, wie z.B. in *Calcium-Imaging* Messungen mit einem calciumabhängigen Fluoreszenzfarbstoff oder in elektrophysiologischen Ableitungen beobachtet wurde (Matveev et al., 2010; Ding et al., 2010). Für die Entstehung des transienten Lumineszenzsignals kann somit nur das Aequorin verantwortlich sein.

Etwa 40 Sekunden nach Zugabe des Liganden erreichte das Signal ein Plateau, welches ebenfalls bei einem Aequorin-basiertem zellulären Assay nach Aktivierung eines konstitutiv geöffneten Calcium-leitenden Kanals auftrat (Wunder et al., 2005a) und somit charakteristisch für die Messung von in die Zelle einströmendes Calcium mittels Aequorin zu sein scheint.

Für die Aequorin-basierten Lumineszenzmessungen wurden die Versuchsbedingungen hinsichtlich Zellzahl, Coelenterazinbehandlung und extrazelluläre Calciumkonzentration optimiert. Die zu untersuchenden Zellen sollten zum Zeitpunkt der Messung im Well möglichst konfluent sein und als Monolayer vorliegen. Die besten Ergebnisse wurden nach Aussaat von $7,5 \times 10^5$ HEK293-Zellen pro Well erhalten.

Zur Optimierung der Aequorin-Rekonstitution wurden verschiedene Konzentrationen des Coelenterazins, Inkubationszeiten und verschiedene Puffer getestet (Siehe Abb. 10). Mit

DISKUSSION

ansteigender Coelenterazinkonzentration konnte eine Dosis-abhängige Erhöhung des Signals bis zu einer Konzentration von 10 μM detektiert werden. Höhere Konzentrationen führten zu kleiner werdenden Signalen, vermutlich verursacht durch Toxizität. Um bei der Coelenterazinbehandlung nicht in den toxischen Bereich zu kommen, wurden für die Versuche 8 μM Coelenterazin genutzt. Daneben wurden für die Rekonstitution unterschiedliche Behandlungszeiten getestet, wobei sich eine vierstündige Behandlung positiv auf die Höhe der Lumineszenzsignale auswirkte. Des Weiteren wurde der Puffer für die Rekonstitution optimiert. Die höchsten Signale wurden mit der CI Lösung erhalten, gefolgt von dem Extrazellulärpuffer und dem modifizierten Krebs-Ringer Puffer. Das Kulturmedium lieferte die geringsten Signale. Möglicherweise durchläuft das Coelenterazin in diesem Medium eine chemische Reaktion oder es wird an Mediumbestandteile gebunden und konnte dadurch das Apoaequorin nicht effizient rekonstituieren.

Die extrazelluläre Calciumkonzentration während der Messung wurde ebenfalls optimiert und es zeigte sich, dass bei Verwendung von 10 mM Ca^{2+} das Lumineszenzsignal einen kürzeren zeitlichen Verlauf bei gleich bleibender AUC aufwies (Siehe Abb. 11). Dadurch konnte die Messdauer pro Well reduziert werden.

Identifizierung einer geeigneten CNG-Kanalmutante für den Bioassay

Für das Substanzscreening sollte eine geeignete CNG-Kanalmutante identifiziert werden. Daher wurden die drei *trafficking*-defizienten Kanalmutanten $\text{CNGA3}_{\text{E228K}}$, $\text{CNGA3}_{\text{R427C}}$ und $\text{CNGA3}_{\text{R563C}}$ untersucht, welche in *Calcium-Imaging* Versuchen bei 37°C und als homomere Kanal exprimiert eine Restfunktion aufwiesen (Reuter et al., 2008; Koeppen et al., 2008). Daneben besaßen die homomeren Kanalmutanten $\text{CNGA3}_{\text{E228K}}$ und $\text{CNGA3}_{\text{R563C}}$ ähnliche Dosis-Wirkungskurven für den Liganden cGMP wie das Wildtyp Protein, nur das homomere $\text{CNGA3}_{\text{R427C}}$ zeigte eine deutlich erhöhte apparente cGMP-Sensitivität (Reuter et al., 2008; Koeppen et al., 2008). Mit dem hier genutzten Bioassay konnten allerdings nur bei homomeren CNGA3-Kanälen mit der Mutation p.E228K ein 8-Br-cGMP-induziertes Lumineszenzsignal detektiert werden (Siehe Abb. 13). Das $\text{CNGA3}_{\text{E228K}}$ wies dabei verglichen mit dem Wildtyp CNG-Kanal ein deutlich niedrigeres Signal auf, welches nach Berechnung der AUC etwa ein Sechstel des Wildtyp Signals entsprach. In den *Calcium-Imaging* Messungen von $\text{CNGA3}_{\text{E228K}}$ -exprimierenden HEK293-Zellen wurde mittels Fura-2 ein

Calciumstrom bei etwa 39 % der transfizierten Zellen detektiert, etwa die Hälfte im Vergleich zu CNGA3_{WT}-exprimierenden Zellen (Reuter et al., 2008). Mit dieser Untersuchungsmethode wurde auch bei CNGA3_{R427C} und CNGA3_{R563C} bei 34 % bzw. bei 43 % der Zellen ein Calciumstrom ermittelt (Koeppen et al., 2008). Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse waren die unterschiedlichen Zellpopulationen, welche für die Auswertung herangezogen wurden. Bei *Calcium-Imaging* Experimenten wurden nur transfizierte Zellen ausgewertet, welche anhand des ko-exprimierten *green fluorescent protein* (GFP) identifiziert wurden. Bei dem Bioassay dagegen wurde das Lumineszenzsignal der im Well vorhandenen Gesamtpopulation untersucht und enthielt somit auch die untransfizierten Zellen.

Für das geplante Substanzscreening wurde CNGA3_{E228K} ausgewählt, da anhand der Restfunktion des mutanten Kanalproteins toxische Effekte der zu testenden Substanzen detektiert werden konnten.

Prüfung der Assay-Sensitivität und Qualität

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass Glycerol die Oberflächenexpression mutanter *trafficking*-defizienter CNG-Kanäle erhöhen kann (Koeppen et al., 2008). Bei diesen Untersuchungen wurde eine Behandlung der CNG-Kanalmutanten mit 10 % Glycerol für 24-30 h durchgeführt. Um zu prüfen, ob diese Beobachtung mit dem hier etablierten Bioassay reproduziert werden kann, wurden HEK293-Zellen, welche neben dem Apoaequorin CNGA3_{E228K}-Kanäle exprimierten, mit verschiedenen Glycerolkonzentrationen behandelt. Mit dem Bioassay konnte die Effektivität von Glycerol bestätigt werden, wobei die maximalsten Lumineszenzsignale nach Behandlung mit 2,5 % Glycerol detektiert wurden – eine 1,7-fache Erhöhung der AUC im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Siehe Abb. 14). Bei 5 % Glycerol führten toxische Effekte zu einer Reduktion des Lumineszenzsignals, wodurch die Effekte, welche zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression führten, überlagert wurden. Nach Behandlung mit 10 % Glycerol wurde nur noch ein geringes Lumineszenzsignal detektiert, welches etwa 15% des Signals von unbehandelten Zellen betrug, und auf eine hohe Toxizität des Glycerol hindeutete. Dass mit dem Bioassay kein positiver Effekt bei 10% Glycerol beobachtet werden konnte, kann dadurch erklärt werden, dass in der Publikation jeweils nur einzelne Zellen elektrophysiologisch und immunzytochemisch untersucht wurden und toxische Effekte auf die gesamte Zellpopulation nicht berücksichtigt wurden.

DISKUSSION

Während des Substanzscreenings wurden 2,5 % Glycerol als „Qualitäts“-Kontrolle eingesetzt. Messungen, bei welchen ein FC kleiner als 1,5 für das Glycerol erhalten wurden, wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

Die meisten der im Substanzscreening getesteten Substanzen konnten nicht in Wasser gelöst werden, bei diesen Substanzen wurden DMSO, Methanol und Ethanol als Lösemittel genutzt. Zur Qualitätssicherung des Bioassay wurde daher untersucht, ob durch Behandlung CNGA3_{E228K}-exprimierender HEK293-Zellen mit den Lösemitteln unspezifische Effekte im Bioassay generiert werden (Siehe Abb. 15). Die getesteten Lösemittelkonzentrationen entsprachen hierbei den Mengen, die während der Substanzbehandlung eingesetzt wurden. Bei keinem der drei untersuchten Lösemitteln wurden signifikante Unterschiede in der AUC im Vergleich zu unbehandelten Zellen detektiert, so dass alle während des Substanzscreenings mit dem Bioassay detektierten Effekte auf die jeweilige getestete Substanz zurückgeführt werden konnten.

Es wurde untersucht, ob der Assay eine ausreichend hohe Sensitivität besitzt, um eine relative Quantifizierung von membranständigen CNG-Kanälen zu ermöglichen. Dazu wurden die Lumineszenzsignale von Wells mit unterschiedlichen Mengen an exprimierten Wildtyp CNG-Kanälen, zum Einen durch Transfektion unterschiedlicher Mengen des CNGA3-kodierenden Plasmids, zum Anderen durch verschiedene Mischverhältnisse von transfizierten und untransfizierten Zellen, untersucht (Siehe Abb. 16). Bis auf den Messwert nach Transfektion von 1,5 µg des K1-Vektors kodierend für CNGA3_{WT} wurden nur geringfügige Abweichungen zu den erwarteten Messwerten ermittelt, wobei bis auf diesen Transfektionsansatz alle Werte in dem 95 % Konfidenzintervall lagen. Die Messsignale wiesen somit eine gute Korrelation mit der Menge membranständiger CNG-Kanäle auf und zeigten, dass der Bioassay geeignet für das in diesem Projekt durchzuführende Substanzscreening war.

Um mit einem Bioassay aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, muss der Bioassay ermöglichen, einen Treffer als solchen zu identifizieren. Dies wird anhand der Signalerhöhung einer Positivkontrolle gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit oder ohne Einbezug der Standardabweichung beurteilt (Fallarero et al., 2014). Dabei gilt es als unwahrscheinlicher, die Aktivität einer Testsubstanz zu übersehen, je mehr Replikate

gemessen werden, da durch eine höhere Anzahl an Replikaten die Variabilität eines Assay besser kontrolliert werden kann (Iversen et al., 2012). In der Industrie werden in der Regel Hunderttausende Substanzen bei einer gegebenen Fragestellung untersucht, um dabei die Kosten und den Zeitaufwand in Grenzen zu halten, wird pro Substanz nur eine Messung bei einer Konzentration durchgeführt. Deswegen werden bei der Etablierung strenge Kriterien an einen Assay gestellt. Um die Qualität eines Assays zu bestimmen, wird der so genannte z-Faktor bestimmt, für dessen Berechnung neben der Signalhöhe der unbehandelten Kontrolle und der Positivkontrolle auch die Standardabweichungen beider Gruppen berücksichtigt wird. Ein guter Assay weist einen z-Faktor zwischen 0,5 und 1,0 auf (Zhang et al., 1999). In diesem Projekt wurde anhand von Stichproben der unbehandelten Kontrollen und Glycerol-behandelten Wells von 20 Wellplatten ein durchschnittlicher z-Faktor von 0,4 ermittelt (Siehe Abb. 17), weshalb sich dieser Assay nicht für das Testen von Substanzen in Einzelmessungen eignete. Durch Erhöhen der Anzahl an Messungen – bei diesem Screening wurden Quadruplikaten an je zwei unabhängig transfizierten HEK293-Zellpopulationen durchgeführt – lassen sich aber verlässliche Aussagen über die Aktivität der Testsubstanzen treffen.

Um Substanzen als aktiv zu klassifizieren, mussten sie einen FC von 1,5 oder höher aufweisen. Dieser *cutoff* wurde gesetzt, um nur Substanzen mit bedeutendem Einfluss auf das *trafficking* des mutanten CNG-Kanals zu identifizieren und ermöglichte somit die Elimination von falsch-positiven Treffern, deren FC-Erhöhung auf einem Messfehler beruhte. Bei einem *cutoff* von 1,5 werden somit weniger Treffer erhalten als durch Bestimmen des Signifikanzniveaus (Dalman et al., 2012). Der *cutoff* wurde auf 1,5 gesetzt, da bei einem höheren *cutoff* die Zahl falsch-negativer Ergebnisse steigen würde.

Die Etablierung des Assays wurde durchgeführt, um für alle zu untersuchenden Substanzen gleiche Bedingungen zu schaffen, und somit auch die Wirkung vergleichen zu können und so Aussagen über die Eigenschaften der Substanzen treffen zu können. Durch die unterschiedlichen chemischen und pharmakologischen Eigenschaften der Substanzen, wie z.B. die Reinheit, Stabilität bei der Lagerung oder in Lösung bzw. die Bindung an Mediumbestandteilen oder die Membranpermeabilität, ist jedoch ein Vergleich verschiedener Substanzen nur bedingt möglich. Die Substanzbehandlung wurde für 24

DISKUSSION

Stunden durchgeführt, die effektive Wirkstoffbehandlung kann aber, je nach Eigenschaft der untersuchten Substanz, kürzer sein.

6.2 Ergebnisse des Substanzscreens

Von allen aktiven Substanzen wurden mindestens fünf, in den meisten Fällen sogar sechs Konzentrationen untersucht. Bei vielen aktiven Substanzen fiel folgender konzentrationsabhängige Verlauf auf, wenn ein ausreichend großes Konzentrationspektrum getestet wurde: (I) Bereich, bei dem die getesteten Konzentrationen zu niedrig waren, um einen Effekt zu erzeugen ($FC \sim 1,0$), (II) Bereich, in welchem der FC ansteigt ($FC > 1,0$) und schließlich einen FC von $\geq 1,5$ erreichte, und (III) einem Bereich, bei dem auf Grund von zytotoxischer Effekte eine Abnahme der Signale erfolgte ($FC < FC_{max}$). Bei einigen aktiven Substanzen wurde der Bereich (I) oder der Bereich (III) nicht erfasst. Diese Bereiche müssen aber nicht zwangsweise detektiert werden, um eine Aussage über die Aktivität der Substanzen zu treffen. Beispielsweise wurde bei Amilorid nur die Bereiche (I) und (II) erfasst, eine Reduktion des Signals wegen Zytotoxizität wurde jedoch nicht beobachtet, da die Konzentrationen, bei denen diese Effekte auftreten, nicht erreicht bzw. untersucht wurden (Siehe Abb. 43). Bei Amilorid und anderen Substanzen, bei denen der Bereich (III) nicht erfasst wurde, muss daher berücksichtigt werden, dass das hier gemessene Signalmaximum nicht unbedingt dem maximalsten Effekt, der mit diesen Substanzen erzielt werden kann, repräsentiert.

Inaktive Substanzen wiesen zwei konzentrationsabhängige Bereiche auf: (I) einem Bereich, bei welchem die Signale etwa so hoch waren wie bei der unbehandelten Kontrolle ($FC \sim 1,0$) und einen FC von 1,5 nicht erreichten, sowie (II) einem Bereich, bei welchem wegen des Auftretens zytotoxischer Effekte eine Abnahme der Signale im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auftrat ($FC < FC_{max}$) bzw. das detektierte Signal unter die Basisantwort fiel ($FC < 1,0$).

In Abb. 43 sind die Lumineszenzsignale in Abhängigkeit der Substanzkonzentrationen (Dosis-Wirkungskurven) der inaktiven Substanz Fluspirilen und der beiden aktiven Substanzen ZD7288 und SKF96365 dargestellt.

Betrachtet man für verschiedene Substanzen den Konzentrationsbereich, in dem Aktivität gemessen wurde, so kann dieser breit oder relativ eng sein. Die Dihydropyridine Isradipin, Niguldipin und OSSK_000971 zeigten im Vergleich zu anderen Substanzen eine größere Konzentrationsspanne mit Aktivität. Bei Niguldipin bleibt der FC über eine Konzentration von 0,3 bis 2 μM bei Werten zwischen 1,5 und 1,6 (Siehe Abb. 28). Ein Beispiel für einen engen Konzentrationsbereich zwischen Aktivität und Toxizität war das Dihydropyridin 22184 (Siehe Abb. 33). Eine Verdreifachung der Konzentration von 33 μM mit einem FC von 1,9 auf 100 μM führte zu durch zytotoxische Effekte zu einem FC auf 0,8. Bei 15 μM 22184 wurde ein FC von kleiner als 1,5 und somit keine Aktivität gemessen. Somit wurde nur nach Behandlung mit 33 μM Aktivität gemessen.

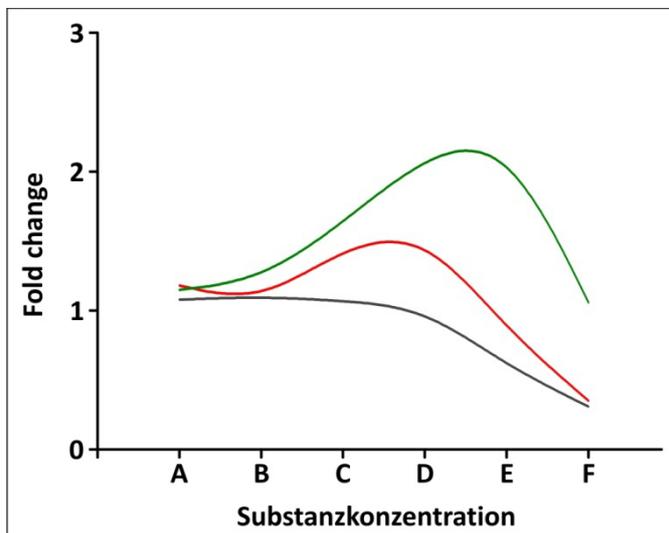


Abb. 43: Charakteristischer Kurvenverlauf inaktiver und aktiver Substanzen in dem hier durchgeführten Aequorin-basierten zellulären Assay. Repräsentativ wurden die gemittelten *fold changes* (FC) bei sechs verschiedenen Konzentrationen (A-F) der inaktiven Substanz Fluspirilen (dunkelgrau) und der beiden aktiven Substanzen SKF96365 (rot) und ZD7288 (grün) aufgetragen. Wurde ein entsprechend großer Konzentrationsbereich gemessen, so lässt sich der Kurvenverlauf in zwei (bei inaktiven Substanzen) bzw. drei (bei aktiven Substanzen) Abschnitte unterteilen: (I) Bereich, in welchem der FC bei etwa 1,0 liegt, die Substanzkonzentration ist zu gering, um Effekte zu bewirken; (II) aktive Substanzen zeigen im mittleren Bereich eine Signalerhöhung ($\text{FC} \geq 1,5$); (III) durch auftretende toxische Effekte kommt es zu einer Reduktion des Signals ($\text{FC} > \text{FC}_{\text{max}}$).

6.2.1 Chemische Chaperone

Chemische Chaperone sind niedermolekulare, organische Verbindungen, welche die Fehllokalisierung und/oder Aggregation von krankheitsverursachenden, mutanten Proteinen beheben können (Perlmutter et al., 2002). Der Mechanismus, über den chemische Chaperone das *trafficking* mutanter Proteine verbessern können, ist unklar. Es wird

DISKUSSION

vermutet, dass sie fehlerhaft gefaltete Proteine stabilisieren können, die Aggregatbildung reduzieren, unproduktive Interaktionen mit anderen Proteinen verhindern können und die Aktivität von molekularen Chaperonen verändern können, wodurch die mutanten Proteine effizienter zu ihrem Zielort transportiert werden können (Perlmutter, 2002). Zu den chemischen Chaperonen zählt auch das als Positivkontrolle im Assay verwendete Glycerol.

Zunächst wurden neun chemische Chaperone aus verschiedenen Substanzklassen (Aminosäuren, Kohlenhydraten, Methylamine und andere) untersucht, welche eine hohe Diversität in ihrer Molekülstruktur und damit vermutlich auch Unterschiede in ihrem Wirkprinzip aufwiesen. Das L-Glutamin war die einzige aktive Substanz aus dieser Gruppe mit einem maximalen FC von 1,5 bei einer Konzentration von 100 mM. Aus der Literatur ist bekannt, dass das L-Glutamin die Expression der Hitzeschockproteine Hsp25 (Maus) bzw. Hsp27 (Mensch) und Hsp70 induzieren kann (Swiecki et al., 2003; Chamney et al., 2013; Kim et al., 2013) und so Schutz vor extremer Hitze oder Oxidantien und den daraus resultierenden apoptotischen Prozessen bietet (Sanders und Kon, 1991; Wischmeyer et al., 1998; Mates et al., 2002). Im heterologen Expressionssystem konnte dabei gezeigt werden, dass durch die L-Glutamin-induzierte Aktivierung des Hsp70 die Reifung und das *trafficking* des mutanten CFTR_{F508del} verbessert werden kann. In dem dabei durchgeführten Versuch führte die Behandlung mit 50 mM L-Glutamin für 48 - 72 Stunden zu einer 2,5-fachen Erhöhung der Menge an vollständig glykosyliertem CFTR_{F508del} (Choo-Kang und Zeitlin, 2001). Die Konzentration des L-Glutamins, welche für die Korrektur des CNGA3_{E228K} eingesetzt werden mussten, war somit vergleichbar, das mutante CFTR wurde jedoch mit höherer Effizienz korrigiert.

Basierend auf der Beobachtung von Choo-Kang und Zeitlin kann die Aktivität des L-Glutamins bei dem mutanten CNG-Kanal auf eine Beteiligung des Hsp70 während des Reifeprozesses des CNG-Kanals hindeuten. Kleinere Hitzeschockproteine wie das Hsp27 sind häufig nicht aktiv im Faltungsprozess involviert sondern halten denaturierte Proteine nach Möglichkeit in Lösung. Das L-Glutamin wirkt somit — im Gegensatz zu Glycerol — vermutlich über einen eher indirekten Mechanismus, durch welchen z.B. im Falle des mutanten CFTR eine Stabilisierung des Proteinkomplexes erzielt werden kann (Sato et al., 1996).

Bei TUDCA konnte in dem Bioassay eine leichte Erhöhung des Lumineszenzsignals gegenüber der unbehandelten Kontrolle mit einem FC von 1,3 bei einer Konzentration von 3,3 mM detektiert werden. Dabei wurde ein signifikanter Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle nachgewiesen, da der FC aber unter 1,5 blieb, wurde die Substanz als nicht aktiv klassifiziert. In der Studie von Duricka und Kollegen wurde 1 mM TUDCA für die Behandlung des heteromeren Zapfen CNG-Kanals mit der Mutationen p.R563H und p.R655X im heterologen Expressionssystem eingesetzt (Duricka et al., 2012). Dabei wurde durch Oberflächenbiotinylierung sowie durch immunzytochemische Färbungen ein verbesserter Membraneinbau beider mutanter CNG-Kanäle nach Behandlung mit TUDCA nachgewiesen (Duricka et al., 2012).

Die Trefferquote beim Screening der chemischen Chaperone war mit 11 % gering. Ein Grund hierfür kann die geringe Anzahl an untersuchten Substanzen in dieser Gruppe sein. Eine weitere Ursache kann die Verwendung von Natrium-Butyrat zur Stimulation der Aequorin- und CNGA3_{E228K}-Expression in transfizierten HEK293-Zellen sein, die parallel zur Behandlung mit den chemischen Chaperonen durchgeführt wurde. Natrium-Butyrat kann selbst als chemisches Chaperone wirken, wie z.B. für den mutanten CFTR gezeigt wurde (Moyer et al., 1999). Geringe Effekte der untersuchten chemischen Chaperone könnten somit durch die Effekte des Butyrats überdeckt worden sein. Die Behandlung mit Natrium-Butyrat war jedoch essentiell für den Assay, um eine ausreichend hohe CNGA3_{E228K}-Expression für das Screening zu erhalten.

Natrium-Phenylbutyrat (4-PBA) ist als sehr effizientes chemisches Chaperon für beispielsweise CFTR, das hereditäre-Hämochromatose-Protein, dem Serotonintransporter oder Myocilin in der Literatur beschrieben (Rubenstein und Zeitlin, 2000; de Almeida et al., 2007; Zode et al., 2011; Fujiwara et al., 2013), wurde aber aufgrund seiner chemischen Ähnlichkeit mit dem Natrium-Butyrat nicht für das Screening berücksichtigt.

6.2.2 Pharmakologische Chaperone

Für das nachfolgende Substanzscreening zur Identifizierung pharmakologischer Chaperone sollten 50 bis 100 Substanzen untersucht werden. Es bestand dabei die Möglichkeit, die Substanzen über eine Substanzbibliothek oder einzeln zu beziehen. Substanzbibliotheken werden von vielen Unternehmen vertrieben und setzen sich teilweise aus Hunderttausenden

DISKUSSION

Substanzen zusammen. Die zu Beginn dieses Projektes erhältlichen Substanzbibliotheken waren aber entweder viel zu groß und zu divers oder nicht auf die Untersuchung von Ionenkanälen zugeschnitten – inzwischen werden Substanzbibliotheken speziell für Substanzscreens an Ionenkanälen angeboten (www.chembridge.com oder www.otavachemicals.com). Für das hier durchgeführte Projekt wurden zunächst 68 Substanzen – 51 Nicht-DHP und 17 DHP – getestet. Diese wurden zum Einen durch eine Literaturrecherche ausgewählt und beinhalteten zum Zweiten drei Derivate des Nifedipin (JFD03311, BTB14326, RJC03435).

Weil die DHP viel versprechende Ergebnisse lieferten, wurde nach Rücksprache mit Charlotta Schärfe und Jens Krüger (*Applied Bioinformatics Group*, Universität Tübingen) 16 weitere DHP für ein Screening ausgewählt, um eine erste Aufklärung strukturell wichtiger Moleküleigenschaften vorzunehmen.

Insgesamt wurden 83 Substanzen untersucht von denen 33 Substanzen (39 %) aktiv in dem Bioassay waren. Bei den Nicht-DHP lag die Trefferquote bei 31 % (16 aktive aus 51 Substanzen). Die DHP, welche anhand der Literaturrecherche ausgewählt wurden sowie die drei Derivate des Nifedipins (JFD03311, RJC03436 und BTB14326), wiesen eine Trefferquote von 44 % auf. Dabei wurde das Nisoldipin Racemat nicht miteinbezogen. Die DHP, welche anschließend für die Strukturoptimierung ausgewählt wurden, waren sogar zu 63 % aktiv.

Die Anzahl an Treffern mit hoher, mittlerer und geringer Aktivität war unter den DHP und Nicht-DHP fast identisch. In beiden Gruppen wurden eine Substanz mit hoher Aktivität und drei Substanzen mit mittlerer Aktivität identifiziert. Da aber fast doppelt so viele Nicht-DHP wie DHP in dem Screening untersucht wurden, wurden bei den DHP vergleichsweise mehr und potentere Treffer gefunden (Siehe Abb. 19).

In dem hier durchgeführten Screening wurden zahlreiche aktive Substanzen mit einer insgesamt relativ hohen Trefferquote identifiziert. Hierfür gibt es verschiedene Gründe: (I) Einen großen Anteil der getesteten Substanzen bildeten die DHP (39 % der untersuchten Substanzen), von denen etwa die Hälfte (53 %) aktiv waren. (II) Viele Substanzen wurden über eine Literaturrecherche ausgewählt, wodurch die Wahrscheinlichkeit höher war, dass diese mit dem CNG-Kanal interagieren. (III) Wie sich später herausstellen sollte, führte die Behandlung von Apoaequorin- und CNGA3_{E228K}-exprimierender HEK293-Zellen mit einigen

Substanzen zu einer deutlichen Erhöhung des Expressionslevels des Apoaequorins, wodurch unter den identifizierten Substanzen möglicherweise falsch-positive Treffer enthalten sind.

Effekt der Nicht-DHP auf das *trafficking* der CNGA3_{E228K}-Kanäle

Es wurden 51 Nicht-DHP getestet, von denen sich 23 Substanzen anhand struktureller Merkmale in Substanzklassen einteilen ließen: Diese waren die Pyrazinamide und Benzamide (5 Substanzen, 100 % aktiv), die Substanzen mit Fluorophenylgruppen (6 Substanzen, 0 % aktiv), Substanzen mit Dimethoxybenzolgruppen (5 Substanzen, 20 % aktiv), die N-Phenylsulfonamide (4 Substanzen, 50 % aktiv) und die Sulfonylharnstoffe (3 Substanzen, 33 % aktiv). Von den 28 Nicht-DHP, die keine strukturelle Klassifikation erlaubten, waren sieben (25 %) aktiv.

Zu den Pyrazinamiden gehören das Amilorid, das Benzamil sowie das 2,4-Dichlorbenzamil. Das Amilorid ist eine schwache Base, welche in seiner kationischen Form ein Antagonist des epithelialen Natriumkanals (ENaC) darstellt (Turnheim, 2013). Im Gegensatz zu den meisten anderen Ionenkanälen besitzt der ENaC-Kanal eine große extrazelluläre Schleife zwischen TM1 und TM2 und ermöglicht dadurch die extrazelluläre Bindung des Amilorids (Kelly et al., 2003). Amilorid bindet den ENaC im „offen“-Zustand und besitzt einen IC₅₀ von 100 nM (Lu et al., 2008). In höheren Konzentrationen kann Amilorid auch als Antagonist des olfaktorischen und des Stäbchen CNG-Kanals wirken (McLatchie und Matthews, 1994; Kleene, 2000). Die Behandlung mit Amilorid führte zu dem zweithöchsten FC, welcher bei der Kanalmutante CNGA3_{E228K} im gesamten Screening gemessen wurde (Siehe Abb. 20).

Auch für die beiden Amilorid-Derivate 2,4-Dichlorbenzamil und Benzamil wurde im Bioassay Aktivität beobachtet. Dem Benzamil fehlen, verglichen mit 2,4-Dichlorbenzamil, die Chloratome an dem Benzolring. Bei Benzamil war das Signalmaximum fast 2,4-fach geringer im Vergleich zu Amilorid, jedoch wurde dieses bei einer 40-fach geringeren Konzentration erreicht. Die höhere Potenz des Benzamils im Vergleich zu Amilorid wurde auch in Studien am ENaC-Kanal festgestellt (Hirsh et al., 2004). Das Signalmaximum, welches nach Behandlung mit 2,4-Dichlorbenzamil erreichte wurde, war ähnlich dem von Benzamil, die Konzentration, welche hierbei eingesetzt wurde, lag bei 1 µM und war 10-fach geringer als bei Benzamil und sogar 400-fach geringer als bei Amilorid.

DISKUSSION

Die Ergebnisse zeigten, dass bereits durch das Vorhandensein einer zusätzlichen Benzylgruppe am Amilorid (Benzamil) die Spezifität der Interaktion mit dem mutanten CNG-Kanal drastisch erhöht wurde und durch das Vorhandensein zweier Chloratome am Benzolring (2,4-Dichlorbenzamil) noch weiter verstärkt werden konnte. Die Effektstärke wurde trotz dieser Modifizierungen nur mäßig beeinflusst.

Metoclopramid sowie das Cisaprid stellen Benzamide dar, welche ähnlich wie das Amilorid und dessen Derivate über einen längeren Rest gebunden an einem aromatischen Ring verfügen. Metoclopramid und Cisaprid besitzen unter anderem eine antagonistische Wirkung gegenüber dem hERG-Kanal, welcher eine entfernte Verwandtschaft mit dem CNG-Kanal aufweist (Kaupp und Seiffert, 2002). Ursprünglich wurden Cisaprid und Metoclopramid aufgrund ihrer antagonistischen Interaktion mit Serotoninrezeptoren als Prokinetikum bzw. Antiemetikum eingesetzt. Für Cisaprid und den beiden strukturell nicht verwandten hERG-Kanal Antagonisten E-4031 und dem in dieser Studie inaktiven Astemizol wurde gezeigt, dass sie bei Konzentrationen von 5 μM die Oberflächenexpression von *trafficking*-defizienten hERG-Kanälen mit der Mutation p.N470D in einem heterologen Expressionssystem verbessern können (Zhou et al., 1999). Wie bisherige Studien zeigten interagiert das Cisaprid auf mittlerer Höhe bzw. etwas in Richtung der cytoplasmatischen Seite der TM6 mit dem hERG-Kanal (Mitcheson et al., 2000; Fernandez et al., 2004), für Metoclopramid liegen keine Informationen vor. Beide Substanzen zeigten im Bioassay eine ähnliche Aktivität, unterschieden sich jedoch deutlich in der für das Erreichen von FC_{max} notwendigen Substanzkonzentration – für Cisaprid war eine 40-fach geringere Konzentration notwendig im Vergleich zu Metoclopramid (Siehe Abb. 20). Möglicherweise werden durch die größere Molekülstruktur des Cisaprids spezifischere Interaktionen mit dem mutanten $\text{CNGA3}_{\text{E228K}}$ -Kanal ausgebildet, wodurch die Konzentration für das Erreichen des Signalmaximums niedriger lag.

Für keine der getesteten Substanzen mit Fluorophenylgruppen wurde nach Behandlung von $\text{CNGA3}_{\text{E228K}}$ -Kanälen eine Verbesserung der Oberflächenexpression detektiert. Dabei stellt das lipophile Pimozid einen bekannter Antagonisten des heteromeren Stäbchen CNG-Kanals dar (Nicol, 1993). Nach Behandlung mit 1 μM Pimozid wurde der höchste FC mit einem Wert von 1,4 gemessen (Siehe Abb. 21). Terfenadin ist ein Antagonist des hERG-Kanals und Flunarizin, Fluspirilen, Penfluridol und Cinnarizin stellen Calciumkanalantagonisten dar. Die

Struktur des Terfenadins besitzt Ähnlichkeit mit dem Cisaprid, weicht aber insbesondere in der für diese Substanzgruppe charakteristischen Hydroxy-Diphenyl-Methylgruppe von dem Cisaprid ab. Somit könnte dieser Rest – entweder dadurch, dass er die Bindetasche nicht gut besetzen kann oder wegen mangelnder Spezifität – für das Fehlen von Aktivität in dieser Substanzgruppe verantwortlich sein.

Fünf Substanzen mit Dimethoxybenzolgruppen wurden mit dem Bioassay untersucht, das, Verapamil, Methoxyverapamil, YS-035, Zatebradin und das Ivabradin – Aktivität wurde nur bei Zatebradin detektiert. Das Zatebradin ist ein Antagonisten des eng mit dem CNG-Kanal verwandten HCN-Kanal (Biel, 2008). Es kann alle vier Untereinheiten des HCN-Kanals mit ähnlichen IC_{50} inhibieren (Stieber et al., 2006). Zatebradin kann zudem den spannungsgesteuerten Kaliumkanal $K_v1.5$ blocken (Valenzuela et al., 1996). Die Struktur des Zatebradins und Ivabradins unterscheiden sich nur durch das Vorhandensein eines Cyclobutans in Ivabradin, welches auf Grund des zusätzlichen Ringes eingeschränkte Bewegungsfreiheitsgrade besitzt und vermutlich deswegen keine Aktivität in dem Bioassay aufwies.

Die untersuchten N-Phenylsulfonamide E-4031, Dofetilid, Ibutilid und Sotalol sind hERG-Kanalantagonisten, allerdings wurde Sotalol zunächst als Antagonist von Kaliumkanälen und β -Adrenorezeptoren beschrieben (Jin et al., 2008; Liu et al., 2012). In dem Assay zeigten das E-4031 mit einem FC_{max} von 1,7 bei 400 μ M und das Dofetilid mit einem FC_{max} von 1,5 bei 200 μ M Aktivität (Siehe Abb. 23). Im Gegensatz dazu wurde bei Sotalol und Ibutilid, welche sich durch einen aliphatischen Rest von E-4031 und Dofetilid (beide mit aromatischen Resten) unterscheiden, keine Aktivität gemessen. Anhand eines Mutagenesescreeenings wurde die Bindestelle für E-4031 und Dofetilid im hERG-Kanal identifiziert. Hierbei zeigte sich, dass Aminosäurereste in TM6 und der Porenhelix die Bindestelle ausbilden und für die Interaktion mit den Substanzen wichtig sind, wobei die Kombination der interagierenden Aminosäurereste für verschiedenen Substanzen variiert (Kamiya et al., 2006). Dies könnte erklären, warum nur das E-4031 und das Dofetilid Aktivität aufwiesen, da vermutlich nur diese Substanzen mit Aminosäuren interagierten, welche die Fehlfaltung zumindest teilweise korrigieren konnten.

Zu den Sulfonylharnstoffen zählen das Tolbutamid, Glipizid und Glibenclamid. Alle drei Substanzen sind Antagonisten von Kaliumkanälen. In dem Screening war aber nur das

DISKUSSION

Glibenclamid mit einem FC_{max} von 1,7 bei einer Konzentration von 33 μ M aktiv (Siehe Abb. 24). Da das Glibenclamid einen Rest mit Ähnlichkeit zu den Benzamiden besitzt, könnte die Aktivität größtenteils über diesen Rest vermittelt worden sein.

Sieben aktive und 21 inaktive Substanzen konnten anhand ihrer strukturellen Merkmale nicht einer bestimmten Substanzklasse zugeordnet werden. Keine Aktivität wurde unter anderem auch bei einigen Substanzen erfasst, welche bereits als Antagonisten von CNG-Kanälen beschrieben wurden. Das L-*cis*-Diltiazem ist ein Antagonist des heteromeren Zapfen CNG-Kanals (Stern et al., 1986; Schnetkamp, 1990; Gerstner et al., 2000), dessen antagonistische Wirkung durch Interaktion mit der CNGB3-Untereinheit vermittelt wird – der homomere Zapfen CNG-Kanal wird kaum blockiert (Peng et al., 2003; Tränkner et al., 2004). Diese Spezifität für die B3-Untereinheit würde auch die Unfähigkeit von L-*cis*-Diltiazem bei der Korrektur von CNGA3_{E228K}-Kanälen erklären. Das Tetracain interagiert mit homomeren CNGA3-Kanälen (Liu und Varnum, 2005), wie auch die Ergebnisse des modifizierten Potentiator- bzw. Kanalblock-Assays zeigten, führte jedoch während des Substanzscreenings nicht zu einer erhöhten Oberflächenexpression des mutanten CNG-Kanals. Ursache dafür könnte sein, dass eine Interaktion mit einem Antagonisten nicht zwangsweise zu einer Korrektur der Fehlfaltung und somit des *trafficking* führen muss. Ebenfalls im Bioassay inaktiv war das Dequaliniumchlorid, welcher als Antagonist des homomeren CNGA1- und CNGA2-Kanals beschrieben wurde (Rosenbaum et al., 2004). Entweder interagierte das Dequaliniumchlorid nicht mit dem mutanten CNGA3 oder es konnte durch dessen Interaktion die Fehlfaltung des mutanten Kanalproteins nicht korrigiert werden.

Aktiv waren das ZD7288, welches ähnlich wie das Zatebradin mit der TM6 des HCN-Kanals interagiert (Bois et al., 2011) aber auch den spannungsgesteuerten Natriumkanal Na_v1.4 inhibiert (Wu et al., 2012), das Lokalanästhetikum Bupivacain, welches an Aminosäuren unterhalb des Selektivitätsfilters in TM6 von Na_v1.4 und von dem spannungsgesteuerten Kaliumkanals K_v1.5 bindet (Franqueza et al., 1997; Nau et al., 2003; Andér et al., 2008), die Calciumkanalantagonisten SKF96365, FPL64176 und Caroverin sowie der unspezifische Kationenkanalantagonisten LOE 908 und der hERG-Kanalantagonisten Midodrin. Für SKF96365 wurde bislang nur die Bindestelle an der TRP-Untereinheit M8 identifiziert, wo es mit Aminosäuren in der Mitte bzw. der cytoplasmatischen Seite von TM2 und TM4 dieses nicht-selektiven Kationenkanals interagiert (Malkia et al., 2009). FPL64176 interagiert mit

Aminosäuren in der Porenhelix von L-Typ Calciumkanälen (Yamaguchi et al., 2000). Bei Caroverin, LOE 908 und Midodrin liegen keine Informationen über die Bindestellen vor. Von diesen sieben Substanzen wurden die höchsten FC nach Behandlung mit 200 μ M ZD7288 ($FC_{\max} = 2,2$) und 400 μ M Zatebradin ($FC_{\max} = 2,0$) erhalten (Siehe Abb. 25).

Effekt der DHP auf den Membraneinbau von CNGA3_{E228K}-Kanälen

Dihydropyridine stellen eine große Gruppe an Antagonisten spannungsgesteuerter Calciumkanäle dar, sie interagieren aber auch mit anderen Ionenkanälen z.B. den alpha-Adrenorezeptoren (Bronzetti et al., 1994) oder auch den spannungsgesteuerten Kaliumkanaluntereinheiten $K_v3.4$ und $K_v1.5$ (Lin et al., 2001; Bett et al., 2006). Zudem fungieren die DHP als Potentioren des CFTR_{F508del} (Pedemonte et al., 2005). Um die Bindestelle der Dihydropyridine an spannungsgesteuerten Calciumkanälen zu identifizieren, wurden unter anderem Mutagenesestudien durchgeführt. Bei spannungsgesteuerten Calciumkanälen binden die DHP Aminosäuren auf mittlerer Höhe der TM 5 und TM 6 der Domänen I, III und IV (Lacinová, 2005; Tikhonov und Zhorov, 2009), wobei auch eine Interaktion mit dem am Selektivitätsfilter gebundenen Calciumion auftritt.

Nach Behandlung mit 20 μ M Nisoldipin wurde bei CNGA3_{E228K}-exprimierenden HEK293-Zellen das höchste Signal ($FC_{\max} = 4,8$) aller getesteten DHP gemessen (Siehe Abb. 27). Das JFD03311 war das DHP mit der zweithöchsten Aktivität in dem hier durchgeführten Screening. Das JFD03311 ist ein Derivat des Nifedipins, welches wie das Nisoldipin die Nitrogruppe in ortho-Position am Benzolring besitzt, aber anstelle der Isobutyl- und Methylreste an den Estergruppen über zwei Ethylreste verfügt und somit kein chirales Zentrum aufweist.

Nifedipin wird als spezifischer L-Typ Calciumkanalantagonist eingesetzt, inhibiert aber daneben auch die TRP-Untereinheit M3 (Drews et al., 2014) und den olfaktorischen CNG-Kanal (Zufall und Firestein, 1993; Hofmann et al., 2003). Nifedipin ist dem Nisoldipin strukturell sehr ähnlich und unterscheidet sich von diesem nur in der Länge der Seitenkette einer Estergruppe des Dihydropyridinringes. Diese strukturell „kleine“ Änderung führt dazu, dass sich der FC_{\max} um zwei Drittel reduziert und sich die notwendige Substanzkonzentration

DISKUSSION

um das 5-fache erhöht. Offensichtlich schien eine längere Seitenkette, wie sie bei Nisoldipin vorliegt, für eine effiziente Korrektur des mutanten CNGA3_{E228K}-Kanals von Vorteil zu sein.

Keine Aktivität wurde für Nimodipin, Nitrendipin und Nilvadipin nachgewiesen, deren FC-Werte unter 1,5 lagen und als Antagonisten von L-Typ Calciumkanälen beschrieben wurden (McCarthy und Fry, 1988; Rosenthal, 1994; Fanelli et al., 1994). Das Nitrendipin, welches außerdem BK (*big potassium*) Kanäle inhibiert (Ellory et al., 1994), besitzt kleine Reste an den Estergruppen, die Nitrogruppe in meta-Position und ansonsten keine Unterschiede in der Struktur gegenüber dem JFD03311 oder Nisoldipin, trotzdem war dessen Aktivität reduziert (FC <1,5). Der Substituent einer der beiden Estergruppen von Nitrendipin ist um ein Kohlenwasserstoffkettenglied länger verglichen mit dem Nifedipin, die andere Estergruppe ist identisch. Im Gegensatz zu dem Nisoldipin führte aber bei Nitrendipin eine längere Estergruppe nicht zu einer höheren Aktivität. Folglich scheint die meta-Position der Nitrogruppe bei dem Nitrendipin einen wesentlichen Einfluss auf die Effektivität der Substanz zu haben. Bei Nimodipin liegt die Nitrogruppe in meta-Position vor und die Estergruppen binden einen Isopropylrest und einem 2-Methoxyethylrest. Geht man davon aus, dass die verschiedenen DHP eine gemeinsame Bindestelle am Zapfen CNG-Kanal besitzen, so kann man vermuten, dass diese Reste nicht optimal in die Bindetasche passen, was sich in einem FC von maximal 1,4 widerspiegelt und somit die geringere Aktivität im Vergleich zu Nisoldipin erklärt. Das Nilvadipin besitzt an einer der Methylgruppen einen Nitrilrest, wodurch die Polarität dieser Gruppe erhöht wird, was sich möglicherweise ebenfalls störend auf die Interaktion mit dem mutanten CNGA3_{E228K} auswirkte und so die Inaktivität erklärt.

Eine weitere strukturelle Gruppe an DHP bilden Benidipin, Nicardipin, Cilnidipin, Niguldipin, Azelnidipin und Efonidipin, die sich durch einen längeren, aromatischen Rest an einer der Estergruppen im Vergleich zu Nisoldipin auszeichnen. Das Azelnidipin und das Efonidipin wiesen keine Aktivität in dem Bioassay auf. Das Efonidipin blockt L- und T-Typ Calciumkanäle und besitzt als auffälliges strukturelles Merkmal einen Phosphorsäuretriester anstelle einer Estergruppe. Der daran gebundene aliphatische Rest verleiht dieser Seitengruppe eine Starrheit ähnlich wie sie durch die Azetidinygruppe bei dem Azelnidipin vorliegt. Dies deutet darauf hin, dass die Flexibilität dieser Seitengruppe eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit CNGA3 spielt.

Als „aktive Substanzen“ dieser Gruppe wurden Niguldipin, Cilnidipin, Nicardipin und Benidipin mit den Bioassay identifiziert. Das Niguldipin ist als Inhibitor von L- und T-Typ Calciumkanälen sowie alpha-Adrenorezeptoren bekannt und besitzt bei T-Typ Calciumkanälen einen IC_{50} von etwa $0,3 \mu\text{M}$ (Stengel et al., 1998). Nicardipin, Cilnidipin und Benidipin sind L-Typ Calciumkanalantagonist, blocken aber auch N- und/oder T-Typ Calciumkanäle (Kuga et al., 1990). Eine genauere Betrachtung dieser 4 DHP zeigt, dass sie längere Estermodifizierungen mit höherer Flexibilität am Dihydropyridinring tragen. Durch diese höhere Flexibilität sind diese Moleküle vermutlich besser in der Lage, sich optimal in der Bindetasche an CNGA3 zu orientieren und so die Faltung des mutanten CNGA3_{E228K} zu korrigieren. Dies spiegelt sich auch in den deutlich geringeren Konzentrationen wieder, die für das Erreichen des FC_{max} im Vergleich zu Nisoldipin oder anderen DHP mit kurzen Estergruppen nötig waren – die FC lagen zwischen 1,6 und 1,8 bei Konzentrationen von $0,7$ bis $10 \mu\text{M}$. (Siehe Abb. 28). Die für das Erreichen des Signalmaximums benötigten Konzentrationen korrelieren mit dem Molekulargewicht der einzelnen Substanzen: je höher das Molekulargewicht, umso niedriger die Konzentration, die für das Erreichen des Signalmaximum benötigt wurde (Niguldipin: Signalmaximum bei $0,7 \mu\text{M}$, MW = 610 g/mol ; Benidipin: Signalmaximum bei $3,3 \mu\text{M}$, MW = 506 g/mol ; Cilnidipin: Signalmaximum bei $3,3 \mu\text{M}$, MW = 493 g/mol ; Nicardipin: Signalmaximum bei $10 \mu\text{M}$, MW = 480 g/mol). Eine ähnliche Korrelation von Molekulargewicht und Effektstärke (pharmakologische Potenz) wurde für Niguldipin, Nicardipin, Nimodipin und Nifedipin beim Block von T-Typ Ca^{2+} -Kanälen in Neuroblastom-Gliom-Hybridzellen beobachtet (Stengel et al., 1998). Interessanterweise scheinen derartige Effekte spezifisch für die Kanaltypen zu sein, da die Potenz dieser vier Substanzen beim Block von T-Typ Ca^{2+} -Kanälen in neuronalen Zellen und Zellen der vaskulären glatten Muskulatur vergleichbar ist.

Zusammenfassend scheint bei Azelnidipin und Efonidipin die Flexibilität der Seitenkette nicht auszureichen, um die Bindetasche am CNGA3_{E228K} optimal auszufüllen bzw. die Faltung des mutanten Kanals nach deren Binden zu verbessern, während Niguldipin, Benidipin, Cilnidipin und Nicardipin abhängig von der Größe ihrer Kontaktfläche bessere pharmakologische Eigenschaften besitzen und so die Faltung der hier untersuchten Kanalmutante effizient korrigieren können.

DISKUSSION

Bei den über Literaturrecherche ausgewählten DHP, fanden sich vier Substanzen, die am Phenylring keine Nitrogruppe tragen – Amlodipin, Felodipin, RJC03435 und BTB14326. Das Felodipin und das Amlodipin sind L-Typ Calciumkanalantagonisten, zudem stellt das Felodipin einen potenten Potentiator für das mutante *trafficking*-defiziente CFTR dar (Pedemonte et al., 2005). RJC03435 und BTB14326 sind Derivate des Nifedipins die bislang noch nicht als Kanalantagonisten beschrieben wurden. Bei keiner der vier Substanzen in dieser Gruppe wurde Aktivität im Bioassay gemessen.

Mit Ausnahme der fehlenden Nitrogruppe besitzt das BTB14326 denselben molekularen Aufbau wie das aktive JFD03311 und das RJC03435 eine analoge Struktur zu Nifedipin. Für Nifedipin und JFD03311 wurde im Bioassay maximale FC von 1,6 bzw. 2,4 gemessen. Im Gegensatz dazu wurden bei den strukturell homologen Substanzen BTB14326 und RJC03435 deutlich geringere FC_{max} von 1,2 bzw. 1,3 detektiert. Dieser Effekt ist möglicherweise durch das Fehlen der Nitrogruppe bedingt und kann somit als Indiz für die Wichtigkeit der Nitrogruppe bei der Korrektur von *trafficking*-defizienten Kanälen mit der Mutation p.E228K angesehen werden.

Das Felodipin und das Amlodipin besitzen ebenfalls keine Nitrogruppe an dem Benzolring, stattdessen trägt das Felodipin zwei und das Amlodipin ein Chloratom am Phenylring, wodurch der Benzolring an Lipophilie gewinnt. Das Amlodipin hat außerdem eine Aminoethoxymethylgruppe anstelle einer Methylgruppe am C6 des Dihydropyridinring. Diese basische Seitenkette liegt bei neutralem pH geladen vor und führt somit zu einer Verschlechterung der Membrangängigkeit des Moleküls (Mason et al., 1989).

Untersuchung spezieller DHP zur Aufklärung struktureller Merkmale

Bei der Untersuchung von DHP, welche mittels Literaturrecherche ausgewählt wurden, zeigte sich bereits, dass es strukturelle Merkmale gibt, die die Aktivität und Effektivität einer Substanz bei der Korrektur von $CNGA3_{E228K}$ beeinflussen. Um diese Merkmale zu identifizieren und näher zu charakterisieren, wurden 16 DHP ausgewählt und mit dem Bioassay untersucht. Über die in diesem Abschnitt untersuchten DHP liegen keine Daten über die pharmakologischen Eigenschaften der Substanzen vor.

Im ersten Schritt sollte geklärt werden, ob bei chiralen DHP eine Präferenz für eines der beiden Enantiomere vorliegt. Diese Untersuchung wurde mit den Nisoldipin-Enantiomeren durchgeführt, welche freundlicherweise von Bayer HealthCare AG zu Verfügung gestellt wurden. Die Ergebnisse belegten, dass das R (-) Nisoldipin mit einem FC_{max} von 3,2 eine deutlich höhere Aktivität besitzt als das S (+) Nisoldipin mit einem FC_{max} von 1,4 (Siehe Abb. 30). Somit wird die Aktivität des Racemats hauptsächlich durch das R (-) Nisoldipin vermittelt. Das aus beiden Enantiomeren hergestellte Racemat besaß im Vergleich zu dem R (-) Enantiomer ein niedrigeres Signalmaximum, da vermutlich das S (+) Nisoldipin die Bindestelle des mutanten CNG-Kanals besetzen und somit für das effizientere Enantiomer blockieren könnte. Zudem lag das Signalmaximum bei dem Racemat bei 20 μ M, das Signalmaximum des R (-) Nisoldipins wurde bei einer Konzentration von 10 μ M erreicht. Berücksichtigt man, dass in dem Racemat nur die Hälfte der Moleküle aus einem der beiden Enantiomere bestehen, so zeigte dies ebenfalls auf, dass die Aktivität des Racemats hauptsächlich durch das R (-) Nisoldipin getragen wurde. Zudem fiel auf, dass der FC_{max} des Racemats, welcher aus der 1:1 Mischung beider Enantiomere hergestellt wurde, deutlich kleiner war als bei der Messung des von Sigma Aldrich bezogenen Racemats. Dies ist möglicherweise auf Unterschiede in der Reinheit oder Konzentrationsunterschiede bei der Substanzbehandlung zurückzuführen.

Daneben wurde untersucht, welchen Effekt die Position der Nitrogruppe auf die Korrektur der Fehlfaltung des mutanten CNGA3_{E228K} besitzt. Dazu wurden zwei Derivate des Nifedipins mit der Nitrogruppe in meta- und para-Position untersucht. Da sich diese Substanzen durch das Fehlen eines chiralen Zentrums auszeichnen, konnten keine Enantiomer-spezifischen Effekte auftreten. Das meta-Nifedipin und para-Nifedipin lieferten geringere FC_{max} mit Werten von 1,4 und 1,3 im Vergleich zu dem ortho-Nifedipin (FC_{max} von 1,6) auf (Siehe Abb. 31). Somit kann die Fehlfaltung des mutanten CNGA3 effizienter korrigiert werden, wenn die Nitrogruppe des DHP in ortho-Position vorliegt.

Anhand von fünf Substanzen wurde angestrebt, die Nitrogruppe am Benzolring gleichwertig zu ersetzen. Dabei wurden verschiedene Reste mit polaren Eigenschaften untersucht, wobei das Molekülgerüst der DHP auf dem JFD03311 basierte. Da jedoch vier von fünf Substanzen eine Substitution in meta-Position am Benzolring aufwiesen, können sie nicht direkt mit dem JFD03311 korreliert werden. Das R420530 besitzt ein primäres Amin in meta-Position und

DISKUSSION

zeigte keine Aktivität bei der Messung. Der Ersatz der Nitrogruppe durch eine Hydroxygruppe (LT00054255, $FC_{\max} = 1,5$), eine Dioxolgruppe (OSSK_014625, $FC_{\max} = 1,5$) oder eine Trifluoracetyl-Aminogruppe (OSSK_000971, $FC_{\max} = 1,7$) führte zu FC -Werten $\geq 1,5$ und waren somit erfolgreich (Siehe Abb. 32). Die Substanz OSSL_590453 weist eine 2-Amino-2-Oxoethoxygruppe in ortho-Position auf und kann somit mit JFD03311 verglichen werden. Es wurde ein FC_{\max} von 1,3 und somit keine Aktivität nachgewiesen. Möglich ist, dass OSSL_590453 wegen der Größe der 2-Amino-2-Oxoethoxygruppe die Bindetasche des mutanten CNGA3 nicht mehr optimal ausfüllen kann und durch sterischen Effekte eine für die Korrektur notwendige Interaktion mit dem mutanten Ionenkanal beeinträchtigt ist.

Zwei weitere untersuchte Substanzen besaßen Modifikationen am C6 des Dihydropyridinringes. Bei Stock1S-56409 wurde die Methylgruppe durch ein primäres Amin ausgetauscht, zudem liegen zwei an den Estergruppen gebundene Ethylreste und die Nitrogruppe in meta-Position vor. Im Bioassay wies diese Substanz mit einem FC_{\max} von 1,4 keine Aktivität auf. Das 22184 ist strukturell fast identisch mit dem als „inaktiv“ eingestuften Nitrendipin und unterscheidet sich von diesem durch eine Chlormethylgruppe am C6 des Dihydropyridinringes. Bei der Untersuchung des 22184 wurde ein FC_{\max} von 1,9 bei einer Konzentration von 33 μM gemessen und war somit höher als bei Nitrendipin. Dies belegte, dass an dem C6 des Dihydropyridinringes lipophile Interaktionen mit dem *trafficking*-defizienten CNGA3 ausgebildet wurden, welche einen wesentlichen Einfluss auf die Korrektur der Fehlfaltung ausübten.

Bei den zwei Dihydropyridinen OSSL_119859 und OSSK_364814 wurde die Beweglichkeit einer der beiden Estergruppen durch Ringschluss und somit Bildung eines zyklischen Ketons eingeschränkt. Unterschiedlich zwischen beiden Substanzen war lediglich die Identität des an der zweiten Estergruppe gebundenen Restes, welcher entweder aus einer Isopropylgruppe oder einer Butylgruppe bestand. In dem Bioassay wurde bei 20 μM OSSK_364814 — dem Derivat mit der Butylgruppe — ein FC_{\max} von 1,9 und bei 33 μM OSSL_119859 ein FC_{\max} von 1,7 nachgewiesen (Siehe Abb. 34). Obwohl somit die Molekülbewegung eingeschränkt war, konnten beide Substanzen die Faltung und das *trafficking* von CNGA3_{E228K} verbessern, was darauf hindeutet, dass die Beweglichkeit der Estergruppen bei der Interaktion mit CNGA3 keine bzw. nur eine minimale Rolle spielte.

Bei drei Substanzen wurde das Wasserstoff des Dihydropyridins durch eine Methylgruppe oder die deutlich größere 4-(Dimethylamino)-phenylgruppe ersetzt. Das OSSK_390157 stellt ein Derivat des meta-Nifedipins mit der Methylgruppe als Substituenten dar, bei welchem ein deutlich höherer FC_{max} gemessen wurde (Siehe Abb. 34). Durch Austausch des Substituenten an dem Dihydropyridin-Stickstoff ließ sich also die Effizienz verbessern, mit welcher die Fehlfaltung des mutanten CNGA3 korrigiert wurde. Das OSSL_127229 ist ein Derivat des JFD03311, welches an dem Stickstoffatom eine 4-(Dimethylamino)-Phenylgruppe besitzt. In dem Bioassay wurde nach Behandlung mit 5 μ M OSSL_127229 derselbe FC_{max} wie bei JFD03311 gemessen, allerdings mit einer 3-fach höheren JFD03311 Konzentration. Somit konnte durch den großen Substituenten die Spezifität der Substanz erhöht werden, zu einer Erhöhung der Faltungseffizienz konnte der Substituent nicht beitragen. Das OSSL_126729 besitzt denselben Substituenten an dem Dihydropyridin-Stickstoff wie das OSSL_127229, jedoch liegt anstelle der Nitrogruppe des kopfständigen Benzolringes ein lipophiles Bromatom vor, wodurch ein Verlust in der Effizienz, mit welcher die Fehlfaltung in dem mutanten CNGA3 korrigiert wird, erwartet wurde. Der gemessene maximale FC-Wert betrug 1,8 und war somit deutlich kleiner als bei OSSL_127229. Offensichtlich trug die 4-(Dimethylamino)-Phenylgruppe dazu bei, den Verlust in der Faltungseffizienz, resultierend aus dem Fehlen der Nitrogruppe, etwas auszugleichen und somit ein $FC \geq 1,5$ zu erreichen.

6.2.3 Pharmakophormodell

Anhand des Substanzscreenings konnten einige strukturell wichtige Merkmale der DHP identifiziert werden, die bei der Interaktion und Korrektur des *trafficking*-defizienten CNGA3-Kanals mit der Mutation p.E228K vorteilhaft sind (Siehe Abb. 44): (I) Am kopfständigen Benzolring sollte eine Nitrogruppe oder ein ähnlicher Elektronenakzeptor in ortho-Position vorhanden sein (II) Die höheren Messsignale für das R (-) Enantiomer des Nisoldipins im Vergleich zu dem S (+) Nisoldipin bei Kanälen mit der Mutation p.E228K zeigten, dass bei chiralen Substanzen die Konfiguration der Substituenten beachtet werden muss. (III) Eine Chlormethylgruppe anstelle einer Methylgruppe am C6 des Dihydropyridinringes erwies sich als aktivitätsfördernd. (IV) Eine der Estergruppen kann wie in Abb. 44 dargestellt einen flexiblen, aromatischen Rest besitzen – hier ist der Rest des Nicardipins dargestellt – während an der zweiten Estergruppe eine kurze Ethylgruppe

DISKUSSION

vorliegt, welche bei dem JFD03311 gute Ergebnisse lieferte. (V) An dem Dihydropyridin-Stickstoff ist das Vorhandensein eines Substituenten möglich.

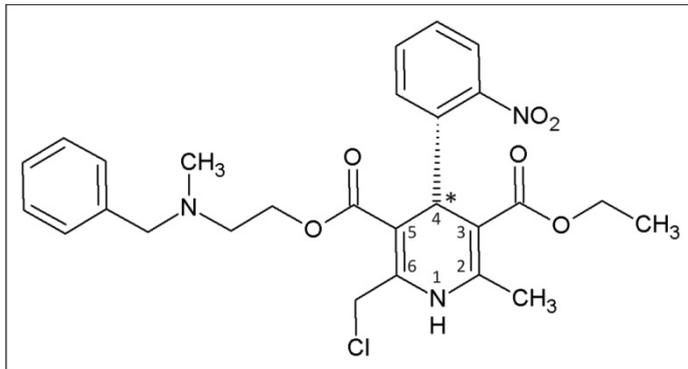


Abb. 44: Darstellung eines Pharmakophormodells basierend auf den DHP, wie es für ein *in silico* Screening eingesetzt werden könnte. Das Molekül besitzt eine Nitrogruppe in ortho-Position und ist in der R-Konformation dargestellt. Die Estergruppen binden die Seitengruppe des Nicardipins und eine Ethylgruppe. Am C6 des Dihydropyridinringes liegt eine Chlormethylgruppe gebunden vor.

Anhand dieser Kriterien kann ein Pharmakophormodell erstellt werden, welches anschließend genutzt werden könnte, um *in silico* in Substanzdatenbanken spezifischere Substanzgruppen zu identifizieren, welche als pharmakologische Chaperone für *trafficking*-defiziente CNGA3-Kanalmutanten eingesetzt werden können. Die Aktivität der identifizierten Substanzgruppen könnte anschließend mit dem Bioassay nachgewiesen werden.

6.2.4 Funktionelle Kategorien der untersuchten Substanzen

Um zu untersuchen, ob Antagonisten eines bestimmten Kanaltyps besser geeignet für die Erhöhung der Oberflächenexpression mutanter CNGA3_{E228K}-Kanäle sind, wurden die Substanzen in funktionelle Kategorien eingeteilt. Folgende Kategorien wurden definiert: Antagonisten des CNG-Kanals, Antagonisten des phylogenetisch eng mit dem CNG-Kanal verwandten HCN-Kanals, Antagonisten des entfernt mit dem CNG-Kanal verwandten hERG-Kanals (Craven und Zagotta; 2006) und Antagonisten weiterer Kationenkanäle. Substanzen, welche in zwei Kategorien fielen, wurden der Kategorie mit höherem Verwandtschaftsgrad zu dem zu CNG-Kanal zugeordnet. Die Einteilung der Substanzen sowie die Trefferquoten der Kategorien sind in Tab. 21 zusammengefasst.

Die Antagonisten der CNG-Kanäle, der HCN-Kanäle und des hERG-Kanals wiesen eine Trefferquote von 43 bis 56 %, d.h. etwa jede zweite Substanz zeigte Aktivität. Bei den insgesamt 20 Substanzen stellte dies eine hohe Trefferquote dar. Eine vergleichbar hohe Trefferquote wurde für die Dihydropyridin-Derivate erhalten. Die Trefferquote von 58 % ist aber nicht überraschend, da sich bereits die davor untersuchten DHP-

Calciumkanalantagonisten als potente Substanzgruppe erwiesen hatten. Somit wurden bei den Dihydropyridin-Derivaten und den hERG-Kanalantagonisten eine ähnliche Trefferquote erhalten. Die Natriumkanalantagonisten und der einzige nicht-selektive Kationenkanalantagonist lieferten ebenfalls hohe Trefferquoten, wobei berücksichtigt werden muss, dass die Anzahl der untersuchten Substanzen pro Gruppe relativ gering war. Interessant ist dennoch, dass hier 3 aktive Substanzen identifiziert wurden, die untereinander keine gemeinsamen Strukturmerkmale aufweisen. Dies belegt, dass es sich lohnen kann, Substanzen aus verschiedenen Kategorien für das Screening einzubeziehen. Die 40 Antagonisten von Calcium- und Kaliumkanälen lieferten die niedrigsten Trefferquoten zwischen 13 und 28 %.

Tab. 21: Einteilung der untersuchten Ionenkanalantagonisten in Kategorien und deren Trefferquoten. Die Einteilung in die Kategorien erfolgte in Abhängigkeit der Art des Kanals, der durch die Substanzen inhibiert werden. Substanzen, welche gleichzeitig in mehrere Kategorien eingeteilt werden konnten, wurden als Kanalantagonisten in der Reihenfolge CNG>HCN>hERG>Rest eingeteilt.

Kategorie	Trefferquote	Substanzen
CNG-Kanalantagonisten	43 % (3 von 7)	2,4-Dichlorbenzamil, Amilorid, Dequaliniumchlorid, L-cis Diltiazem, Nifedipin, Pimozid, Tetracain
HCN-Kanalantagonisten	50 % (2 von 4)	Clonidin, Ivabradin, Zatebradin, ZD7288
hERG-Kanalantagonisten	56 % (5 von 9)	Astemizol, Cisaprid, Dofetilid, E-4031, Ibutilid, Metoclopramid, Midodrin, Quinidin, Terfenadin
Calciumkanalantagonisten	28 % (9 von 32)	Amiodaron, Amlodipin, Azelnidipin, Benidipin, Bepidil, Caroverin, Cilnidipin, Cinnarizin, Dandrolen, Efonidipin, Felodipin, Flunarizin, FPL64176, Fluspirilen, Isradipin, Loperamid, L-type Calcium Channel Blocker, Methoxyverapamil, Mibefradil, Nicardipin, Nifedipin, Niguldipin, Nilvadipin, Nimodipin, Nitrendipin, Paxilin, Penfluridol, SKF96365, SR33805, Tetrandrin, U-50488, Verapamil, Zonisamid
Kaliumkanalantagonisten	13 % (1 von 8)	4-Aminopyridin, Glibenclamid, Glipizid, Phentolamin, Sotalol, Tetraethylammoniumchlorid, Tolbutamid, YS-035
Natriumkanalantagonisten	67% (2 von 3)	Benzamil, Bupivacain, Mirtezapin
Nicht-selektiver Kationenkanalantagonist	100 % (1 von 1)	LOE 908
Dihydropyridin-Derivate	58 % (11 von 19)	22184, BTB14326, JFD03311, LT00054255, ortho-Nifedipin, para-Nifedipin, R (-) Nisoldipin, S (+) Nisoldipin, OSSK_000971, OSSK_014625, OSSK_364814, OSSK_390157, OSSL_119859, OSSL_126729, OSSL_127229, OSSL_590453, R420530, RJC03435, Stock1S-56409

Einfluss chemischer Eigenschaften der Substanzen auf die Funktionalität im Bioassay

Die Signalmaxima der 33 identifizierten aktiven pharmakologischen Chaperonen wurden bei sehr unterschiedlichen Konzentrationen erreicht. Bei zwölf Substanzen lag das Signalmaximum bei einer Konzentration kleiner als 10 μM , bei 13 Substanzen bei einer Konzentration in dem Bereich zwischen 10 und 100 μM und bei acht Substanzen bei über 100 μM . Die niedrigste Konzentration zum Erreichen des Signalmaximums wurde bei Niguldipin mit 0,7 μM benötigt, die Effizienz mit einem $\text{FC}_{\text{max}} = 1,5$ war aber verglichen mit anderen Substanzen moderat. Tendenziell mussten von den DHP im Durchschnitt niedrigere Konzentrationen zum Erreichen des jeweiligen Signalmaximums eingesetzt werden als bei den Nicht-DHP, insbesondere bei Substanzen mit mittlerer bis hoher Aktivität (Siehe Abb. 45 A und Abb. 45 B). Somit schienen die DHP entweder eine höhere Membranpermeabilität oder eine höhere Spezifität zu besitzen, wodurch bereits bei niedrigeren Konzentrationen die Oberflächenexpression des mutanten CNG-Kanals erhöht wurde.

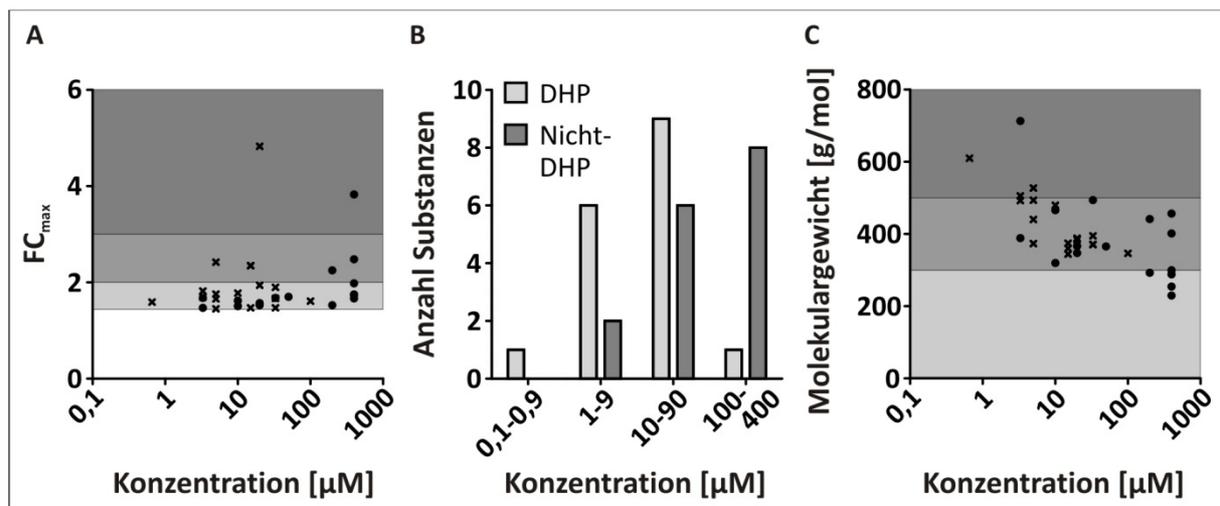


Abb. 45: Korrelation der FC_{max} aktiver Substanzen mit der benötigten Konzentration und dem Molekulargewicht. A: Die jeweiligen im Bioassay detektierten maximalen FC und die dafür benötigten Konzentrationen sind gezeigt. Die Ergebnisse der Dihydropyridine sind mit einem Kreuz dargestellt, die der Nicht-Dihydropyridine mit einem Punkt. Es fällt auf, dass in der Substanzgruppe mit mittlerer ($3,0 > \text{FC}_{\text{max}} \geq 2,0$) und hoher Aktivität ($\text{FC}_{\text{max}} \geq 3,0$) bei den Dihydropyridinen etwas niedrigere Substanzkonzentrationen für das Erreichen der Signalmaxima benötigt wurden. B: Die Häufigkeitsverteilung bestätigt, dass die Konzentrationen, welche für das Erreichen der FC_{max} benötigt werden, bei den DHP (hellgrau) niedriger sind als bei den Nicht-DHP (dunkelgrau). C: Der Vergleich der für das Erreichen von FC_{max} erforderlichen Substanzkonzentration mit dem Molekulargewicht zeigt, dass von Substanzen mit niedrigerem Molekulargewicht höhere Konzentrationen eingesetzt werden mussten. Die Ergebnisse der Dihydropyridine sind mit einem Kreuz dargestellt, die der Nicht-Dihydropyridine mit einem Punkt.

Der Vergleich des Molekulargewichts aktiver Substanzen mit der für das Erreichen des Signalmaximums benötigten Konzentrationen verdeutlicht, dass von kleineren Molekülen höhere Konzentrationen eingesetzt werden mussten (Siehe Abb. 45 C). Substanzen mit einem Molekulargewicht von unter 300 g/mol wiesen ein Signalmaximum bei Konzentrationen von 200 μ M oder höher auf. Bei Substanzen mit höherem Molekulargewicht wurde tendenziell eine niedrigere Konzentration benötigt, um das Signalmaximum zu erreichen. Eine Korrelation zwischen dem Signalmaxima und dem Molekulargewicht konnte nicht beobachtet werden.

6.3 Weiterführende Experimente mit ausgewählten pharm. Chaperonen

Effekt der Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen auf die Zellviabilität

Die weiteren Untersuchungen wurden mit sechs Substanzen durchgeführt, welche die höchste Wirkstärke in dem Bioassay aufwiesen: den Nicht-DHP Amilorid, Bupivacain, Zatebradin und ZD7288 sowie den DHP Nisoldipin und JFD03311. Zunächst wurde untersucht, ob nach Behandlung von HEK293-Zellen mit diesen Substanzen zytotoxische Effekte auftraten. Trat eine Zytotoxizität auf, so war die Zellzahl in den Wells reduziert, was aber umgekehrt auch bedeutet, dass der FC_{max} , welcher während des Substanzscreenings gemessen wurde, auf ein Lumineszenzsignal zurückzuführen ist, welches von weniger Zellen generiert wurde.

Amilorid und JFD03311 induzierten in dem Vitalitätstest keine zytotoxischen Effekte, bei Zatebradin, Bupivacain und Nisoldipin wurde eine geringe Toxizität erfasst. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit 200 μ M ZD7288 zu einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität um 36%. Somit wurde der gemessene FC_{max} von 2,3 im Substanzscreening von den im Well verbliebenen 64 % der Zellen erbracht. Der FC unterrepräsentiert somit den eigentlichen *trafficking*-verbessernden Effekt dieser Substanz. Wodurch die Toxizität verursacht wurde, ist unklar. Da ZD7288 wie viele der anderen untersuchten Substanzen eine gute Membranpermeabilität besitzt und bei dem schlechter membranpermeablen Amilorid keine Toxizität erfasst wurde, können osmotische Effekte ausgeschlossen werden.

Korrektur verschiedener *trafficking*-defizienter CNGA3-Kanalmutanten

Der Einsatz von pharmakologischen Chaperonen zur Wiederherstellung des *traffickings* ist in der Regel nicht auf eine einzige Mutation des kodierten Proteins beschränkt (Tropak et al., 2008; Krebs et al., 2010; Dawson et al., 2010; Soheili et al., 2012). Im Falle des mutanten CNG-Kanals sollte es somit möglich sein, die Fehlfaltung weiterer Kanalmutanten zu stabilisieren. Mutante CNGA3-Kanaluntereinheiten mit einem eindeutig nachgewiesenen *trafficking*-Defekt (Reuter et al., 2008; Koeppen et al., 2008; Koeppen et al., 2010) und mit Mutationen in unterschiedlichen Proteindomänen wurden für diese Untersuchung herangezogen. Die Mutationen p.R283Q und p.T291R liegen in der TM4, p.S341P und p.E376K liegen in der Porendomäne zwischen TM5 und TM6, die Mutation p.R427C liegt zwischen der ersten und zweiten Helix des C-Linkers und die Mutation p.R563C liegt zwischen der sechsten und siebten β -Faltblattstruktur der Ligandenbindedomäne des kodierten Proteins. Um die Lumineszenzsignale zu erhöhen, wurden für diese Versuche die CNGB3-Untereinheit ko-exprimiert, d.h. heteromere Kanäle analysiert.

Die Untersuchung zeigte, dass die sechs ausgewählten pharmakologischen Chaperone in der Lage waren, den *trafficking*-Defekt anderer CNGA3 Kanalmutanten zu beheben. Der höchste FC aller untersuchten Kanalmutanten mit einem Wert von 6,1 wurde nach Behandlung von CNGA3_{S341P} mit Amilorid detektiert. Auch bei den anderen fünf Kanalmutanten wurde mindestens eine 2,6-fache Erhöhung der Lumineszenzsignale erfasst, sogar bei CNGA3_{R563C}, welche einen Aminosäureaustausch in der Ligandenbindestelle besitzt. Basierend auf Untersuchungen an HCN-, Natrium-, Kalium- und Calciumkanälen kann man vermuten, dass sich die Bindestellen von Kanalantagonisten in der Porenregion oder Poren-nahen Strukturen befinden (Franqueza et al., 1997; Nau et al., 2003; Lacinová, 2005; Andér et al., 2008; Tikhonov und Zhorov, 2009; Bois et al., 2011). Eine Fehlfaltung in der cGMP-Bindestelle zu korrigieren ist bei diesen Substanzen also eher unwahrscheinlich. Die Erhöhung des Lumineszenzsignals nach Behandlung mit Amilorid bei CNGA3_{R563C}-Kanälen kann entweder durch unspezifische Effekte oder durch eine zweite Bindestelle in der cGMP-Bindestelle bzw. CNBD-nahen Strukturen erfolgen. Dabei wurde aber auch nach Behandlung mit Nisoldipin und JFD03311 bei CNGA3_{R427C} Aktivität gemessen. Die Behandlung mit Bupivacain, Zatebradin und ZD7288 führte dagegen nur bei den Kanalmutanten, deren Aminosäureaustausch in der TM4 oder der Porenregion liegen, zu Verbesserungen der

150

Oberflächenexpression, wobei aber nur Zatebradin bei CNGA3_{E376K} erfolgreich war. Diese Kanalmutante besitzt einen Aminosäureaustausch kurz vor dem N-terminalen Ende von TM6 und somit nah an der extrazellulär zugewandten Seite. Scheinbar kann eine Fehlfaltung in dieser Proteinregion besser durch das lang gestreckte Zatebradin korrigiert werden im Vergleich zu den kleineren Bupivacain und ZD7288

Mit Ausnahme der Behandlung mit Bupivacain wurden die höchsten FC nach Substanzbehandlung jeweils bei CNG-Kanälen mit der Mutation p.S341P erhalten. Diese Aminosäureaustausch liegt etwa 15 Aminosäuren nach dem C-terminalen Ende der TM5 in der Porenschleife, welche in die Plasmamembran hereinragt. Entweder liegt diese Aminosäureaustausch an einer für alle Substanzen gut zugänglichen Stelle, oder es reicht bereits eine mäßige Interaktion mit dem mutanten Kanal aus, um die Fehlfaltung ausgelöst durch die Mutation p.S341P effizient zu korrigieren.

Nachweis der Spezifität der gemessenen Lumineszenzerhöhungen nach Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen

Nachfolgend wurde untersucht, ob die durch das Substanzscreening gewonnenen Ergebnisse einzig auf eine Erhöhung der Oberflächenexpression zurückzuführen waren, oder ob unspezifische Effekte zu den Erhöhungen der Lumineszenzsignale aktiver Substanzen beitragen. Das Auftreten unspezifischer Effekte wie die Absorption oder Emission von Photonen oder die Beeinflussung der Aktivität des Reportersystems, wurden bei Substanzscreens bereits beschrieben (Thorne et al., 2010). Es gibt Bestrebungen, Substanzen, welche diese Effekte zeigen, wie z.B. das Curcumin oder Isothiazolinone, Quinone sowie Hydroxyphenyl-Hydrazone, zu identifizieren und aus Substanzscreenings auszuschließen (Crisman et al., 2007; Baell und Holloway, 2010; Schorpp et al., 2013), trotzdem tauchen sie nach wie vor in Publikationen auf, wo sie als vermeintlich aktiv beschrieben werden (Baell und Walters, 2014). Da die meisten in diesem Projekt untersuchten Substanzen therapeutisch eingesetzt werden und somit bereits diversen Überprüfung unterzogen wurden, ist es sehr unwahrscheinlich, dass sie zu den *frequent hitters* zählen. Allerdings konnte nicht ausgeschlossen werden, dass Substanzen in dem Assay das Expressionslevel der transfizierten Plasmide erhöhen oder die Funktion des CNG-Kanals beeinflussen bzw. steigern, d. h. nicht als Korrektoren sondern als Potentiatoren wirken.

Wirkungsweise der DHP – Potentiator oder Korrektor

Für einige DHP wurde gezeigt, dass sie als Potentioren des mutanten CFTR eingesetzt werden können (Pedemonte et al., 2005, Pedemonte et al., 2007; Caputo et al., 2009), wie beispielsweise das Nicardipin, Felodipin, Nifedipin und Isradipin und das Nitrendipin, wobei das Felodipin der potenteste Potentiator war. Aber gerade das Felodipin besaß bei dem Screening mit CNGA3_{E228K}-exprimierenden HEK293-Zellen keine Aktivität. Außerdem ist für eine Beeinflussung der CNG-Kanalfunktion notwendig, dass die Testsubstanz während der Messung im Messwell vorliegt. Da jedoch nach der Substanzbehandlung das Medium/die Badlösung mehrmals gewechselt wurde, kann man davon ausgehen, dass während der Messung vermutlich keine/wenige Wirkstoffmoleküle in dem Messwell vorlagen. Um die DHP dennoch auf eine mögliche Potentiator-Wirkung zu testen, wurde der Bioassay modifiziert, so dass die zu testende Substanz während der Messung vorlag. Diese Versuche wurden mit Nisoldipin – wegen dem höchsten Effekt aller Dihydropyridine im Bioassay – durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass Nisoldipin die Kanalfunktion des mutanten CNG-Kanals nicht beeinflusst und somit als Korrektor wirkt. Der CNG-Kanalantagonist Tetracain wurde als Kontrolle mitgeführt und bestätigte, dass anhand des modifizierten Assays Effekte auf die Kanalfunktion detektiert werden konnten.

Untersuchung der Expression des Reporters Aequorin und der CNGA3_{E228K}-Kanalmutante nach Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen

Die mit dem Bioassay beobachtete Erhöhung der Lumineszenzsignale nach Substanzbehandlung könnten auch durch eine Erhöhung der Expression des Reporterproteins Apoaequorin oder der CNGA3_{E228K}-Kanäle hervorgerufen wurden sein. Anhand von Western Blot-Untersuchungen wurde das Expressionslevel des Apoaequorin und CNGA3_{E228K} nach Behandlung mit den vier Nicht-DHP Amilorid, Bupivacain, Zatebradin und ZD7288 sowie den beiden DHP Nisoldipin und JFD03311 bestimmt.

Das Amilorid, Bupivacain und Nisoldipin führten zu einer starken Erhöhung des Apoaequorinlevels um das 10,7- bis 25,4-fache gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Niedrigere Effekte mit einer Erhöhung der Apoaequorinexpression um das 2,4- bis 5,3-fache wurden für die Substanzen ZD7288, Zatebradin und JFD03311 erhalten. Das Glycerol, für welches bereits Effekte auf die Genexpression beschrieben wurden (Leandro et al., 2001; Du

et al., 2007; Deocaris et al., 2008), führte zu einer 1,8-fachen Steigerung des Apoaquorinlevels.

Bei der Expression von CNGA3_{E228K} führte Amilorid zu dem höchsten Effekt mit einer 1,9-fachen Erhöhung der Expression des mutanten Kanals – ähnlich der Positivkontrolle Glycerol mit einem FC von 2,0. Bei Nisoldipin, JFD03311 und Zatebradin wurde eine 1,5-fache bis 1,7-fache Erhöhung der CNGA3_{E228K}-Expression nachgewiesen. ZD7288 und Bupivacain lieferten in drei Replikaten inkonsistente Resultate, so dass für diese beiden Substanzen keine zuverlässige Aussage bezüglich der CNGA3_{E228K}-Expression getroffen werden konnte.

Um zu testen, ob die Erhöhung des Apoaquorinlevels nach Behandlung mit dem Nisoldipin Enantiomer-spezifisch ist, wurden in diesem Versuchsansatz beide Enantiomere getestet. Dabei wurde festgestellt, dass die Überexpression des Apoaquorins größtenteils durch das R (-) Nisoldipin vermittelt wurde, dem Enantiomer welches auch in dem Bioassay die Aktivität besaß. Des Weiteren wurden die beiden Dihydropyridine Niguldipin und Benidipin untersucht, welche (I) in dem Substanzscreening aktiv waren und (II) über eine spezifischere Interaktion – basierend auf den geringen Substanzkonzentrationen, die eingesetzt wurden – mit CNGA3_{E228K} im Vergleich zu Nisoldipin und JFD03311 verfügen. Daher sollte die Wahrscheinlichkeit, dass diese Substanzen das Expressionslevel des Apoaquorins beeinflussen, geringer sein. Die Behandlung von Apoaquorin-exprimierenden HEK293-Zellen mit Benidipin führte zu einer 1,6-fachen Erhöhung des Expressionslevels während nach Behandlung mit Niguldipin eine Reduktion des Apoaquorinlevels um die Hälfte nachgewiesen wurde.

Die Ursache für die Erhöhung der Apoaquorin- oder CNGA3_{E228K}-Expression ist unklar, sie könnte aus einer erhöhten Proteinexpression oder einer Erhöhung der Proteinstabilität und somit einem reduzierten Abbau resultieren. Im Falle des CNGA3_{E228K} könnte auch die Korrektur der Fehlfaltung – wodurch das Protein in die Plasmamembran eingebaut wird – und somit durch einen verminderten Proteinabbau zu einer relativen Erhöhung des Expressionslevels gegenüber der unbehandelten Kontrolle geführt haben. Um dies zu klären müssten weitere Versuche durchgeführt werden und z.B. durch pharmakologische Blockierung der an der Proteindegradation beteiligten Komponenten. Bei einigen Dihydropyridinen konnte bereits eine Beeinflussung des Expressionslevels bestimmter Genen auf mRNA-Ebene oder auf Ebene des Proteins gezeigt werden. So wurde nach Gabe

DISKUSSION

von Nifedipin, Nisoldipin, Nitrendipin, Nimodipin und Nicardipin in das Futter von Ratten eine bis zu 10-fache Erhöhung der Gesamt-RNA der Cytochrom P450-kodierenden Gene *CYP2B1* und *CYP3A1* in der Leber beobachtet (Konno und Degawa, 2004). Als Mechanismus wurde die Aktivierung des *pregnane X receptor* (PXR)-vermittelten Signalweges zu Grunde gelegt, wobei darauf hingewiesen wurde, dass vermutlich auch PXR-unabhängige Signalwege existieren.

Das Benidipin führte dagegen nach Behandlung von Aortenendothelzellen zu einer Herunterregulierung des mRNA- und Proteinlevels von Genen, die für Proteine involviert in der Zelladhäsion, Chemokine und intrazelluläre Signalwege kodieren (Matsubara und Hasegawa, 2004). Dagegen wurde durch Benidipin-Behandlung einer murinen Proteoblasten-Zelllinie die Expression von Genen relevant für die Differenzierung in Osteoblasten hochreguliert (Wang et al., 2014). Dies belegt, dass eine Behandlung mit Substanzen, welche zu Veränderungen in der Genexpression führen, nicht unbedingt das Expressionslevel nur in eine Richtung – also z.B. nur zu einer Erhöhung der Genexpression aller betroffenen Gene – verändern können.

Auch für das Nicht-DHP Bupivacain wurde bereits in verschiedenen Studien eine Beeinflussung der Expression verschiedener Gene wie z.B. dem *WD repeat-containing protein 35* in einer murinen Neuroblastom-Zelllinie (Huang et al., 2014) oder dem *Human Leukocyte Antigen* in Monozyten (Kawasaki et al., 2004) nachgewiesen. Als Mechanismus konnten Huang und Kollegen eine Bupivacain-induzierte Aktivierung der *AMP-activated protein kinase* und der *p38 mitogen-activated protein kinase* feststellen.

Ein höheres Expressionslevel des Reporters führte zu einer höheren Menge an Apoaequorin in den Zellen. Ähnlich dazu, kann man annehmen, dass eine Erhöhung der CNGA3_{E228K}-Proteinmenge auch eine Erhöhung der Kanaldichte in der Plasmamembran verursachen würde. In beiden Fällen würde nach Auslösen des Calciumeinstroms ein höheres Lumineszenzsignal gemessen werden, so dass der Anstieg des Lumineszenzsignals nach Substanzbehandlung unspezifisch wäre und nicht durch eine Korrektur der Fehlfaltung von CNGA3_{E228K} bedingt wäre.

Korreliert man die Ergebnisse der Western Blot-Experimente mit den gemessenen FC_{max} im Bioassays, so fällt auf, dass in dem Western Blot nach Behandlung mit Bupivacain und

Nisoldipin die Aequorinexpression um den Faktor 18,1 bzw. 25,4 erhöht war, in dem Bioassay wies das Bupivacain jedoch einen FC von 2,0 auf im Vergleich zu Nisoldipin mit einem FC von 4,8. Dies deutet darauf hin, dass der unspezifische Effekt durch Erhöhung des Apoaequorinlevels nur zu einem Teil zu der Erhöhung des Lumineszenzsignals in dem Bioassay beiträgt.

Behandlung von CNGA3_{WT}-Kanälen mit pharmakologischen Chaperonen

Die Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen kann die Apoaequorinexpression und die Expression des CNGA3 in transfizierten HEK293-Zellen erhöhen. Es sollte nachfolgend geklärt werden, ob und wie stark dadurch das Lumineszenzsignal im Bioassay beeinflusst wurde. Für die im Screening mit CNGA3_{E228K}-Kanälen gemessenen FC_{max} nach Substanzbehandlung, kann dann der Effekt abgeleitet werden, welcher tatsächlich durch eine verbesserte Oberflächenexpression erzielt wurde. Durch Einbezug des mit dem Wildtyp CNG-Kanal bestimmten, unspezifischen Wirkeffekts von den mit dem mutanten CNGA3_{E228K}-Kanal ermittelten Werten, lassen sich die korrigierten FC bestimmen, welche der reinen Erhöhung der Oberflächenexpression entsprechen. Die korrigierten FC-Werte sind in Tab. 22 zusammengefasst.

Mit dem Bioassay wurden Untersuchungen an HEK293-Zellen durchgeführt, die Wildtyp CNG-Kanäle exprimierten. Der Wildtyp CNG-Kanal besitzt keinen *trafficking*-Defekt, sodass eine durch Behandlung mit pharmakologischen Chaperonen hervorgerufene Erhöhung der Lumineszenzsignale unter diesen Bedingungen auf eine gesteigerte Apoaequorinexpression zurückgeführt werden kann. In diesem Versuchsansatz wurden sieben der Substanzen mit einem FC_{max} ≥ 2,0 aus dem Substanzscreening sowie 12 weitere aktive DHPs getestet. Nach Behandlung von Apoaequorin-exprimierenden HEK293-Zellen mit Zatebradin wurde in den Western Blot—Experimenten eine ähnliche Erhöhung des Expressionslevels wie für ZD7288 und JFD03311 erhalten, weshalb auf die Zatebradin-Behandlung verzichtet wurde.

Keine signifikanten Veränderungen gegenüber der unbehandelten Kontrolle wurde für die Substanzen Nifedipin, LT00054255, OSSK_000971, OSSK_014625, Niguldipin, JFD03311 und OSSL_119859 erhalten. In dem Western Blot zeigte die Behandlung von Apoaequorin-exprimierenden HEK293-Zellen mit Niguldipin ebenfalls keine Erhöhung des

DISKUSSION

Apoaequorinlevels, folglich ist der Effekt von Niguldipin auf die Korrektur des mutanten CNGA3_{E228K} spezifisch. JFD03311 wies in dem Western Blot eine 5,3-fache Erhöhung des Apoaequorinlevels auf, dies hatte allerdings keinen Einfluss auf den Assay, da nach Behandlung von CNGA3_{WT}-exprimierenden Zellen mit JFD03311 kein signifikanter Unterschied zu der unbehandelten Kontrolle gefunden wurde. Geringe aber statistisch signifikante 1,1- bis 1,4-fache Erhöhungen des FC wurden für die Substanzen Cilnidipin, Nicardipin, OSSL_126729, OSSL_127229, Benidipin, 22184 und OSSK_364814 erhalten.

Bei den Substanzen, die eine >10-fache Erhöhung der Apoaequorinexpression verursachten, wurden auch Effekte im Bioassay mit CNGA3_{WT} detektiert. Hierbei fällt vor allem Bupivacain auf, bei dem die gemessenen FC von 2,0 für CNGA3_{E228K} im Screening ausschließlich auf der gesteigerten Aequorinexpression zu beruhen scheinen, da ein ähnlich hoher FC auch nach Behandlung von CNGA3_{WT} gemessen wurde. Bupivacain kann somit als inaktiv eingestuft werden, da es die Oberflächenexpression der CNGA3-Kanalmutante nicht erhöhen kann. Im Falle von Amilorid und Nisoldipin führen die unspezifischen Effekte durch Erhöhung der Expressionslevel von Apoaequorin und dem mutanten CNGA3 nur einen Teil zu der Erhöhung des Lumineszenzsignals während des Screenings bei. Durch die Korrektur der FC-Werte bleibt das Nisoldipin die Substanz, welche bei CNGA3_{E228K} zu dem höchsten Signal im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle führte.

Alle untersuchten DHP sowie das ZD7288 und das Amilorid hatten korrigierte FC_{max}-Werte von $\geq 1,5$. Die höchsten unspezifischen Effekte der DHP wiesen das OSSK_364814, OSSK_390157 und das Nisoldipin auf. Alle drei DHP haben verglichen mit den anderen aktiven DHP ein verhältnismäßig niedriges Molekulargewicht. Gemeinsame Strukturmerkmale, welche charakteristisch für den unspezifischen Charakter von OSSK_364814, OSSK_390157 und Nisoldipin sind, lassen sich aber nicht bestimmen, insbesondere da das Nifedipin trotz ähnlicher Molekülstruktur keinen unspezifischen Effekt auf das Expressionslevel des Apoaequorins bzw. CNGA3_{E228K} ausübte.

Tab. 22: Zusammenfassung der korrigierten *fold changes* (FC) für die aktiven Dihydropyridine sowie für Amilorid, ZD7288 und Bupivacain. Die korrigierten FC wurden aus den FC der Bioassaymessungen mit dem mutanten CNG-Kanal und dem Wildtyp Kanal berechnet. Vergleichend wurden auch die mittels Western Blot gemessenen FC für die untersuchten Substanzen dargestellt.

Substanz	Bioassay mit CNGA3 _{WT}	Bioassay mit CNGA3 _{E228K}	Korrigierter FC-Wert	Western Blot Apoaequorin
ZD7288	0,8 ± 0,1 200 µM 2 / 8	2,2 ± 0,2 200 µM 2 / 10	2,4	2,4
Nifedipin	0,9 ± 0,1 100 µM 2 / 8	1,6 ± 0,1 100 µM 2 / 8	1,7	-
LT00054255	1,0 ± 0,1 15 µM 2 / 8	1,5 ± 0,2 15 µM 2 / 8	1,5	-
OSSK_000971	1,0 ± 0,1 5 µM 2 / 8	1,7 ± 0,1 5 µM 2 / 8	1,7	-
OSSK_014625	1,0 ± 0,1 5 µM 2 / 8	1,5 ± 0,2 5 µM 2 / 8	1,5	-
Niguldipin	1,1 ± 0,1 0,66 µM 2 / 8	1,6 ± 0,1 0,66 µM 2 / 8	1,5	0,5
JFD03311	1,1 ± 0,1 15 µM 2 / 8	2,4 ± 0,2 15 µM 2 / 15	2,3	5,3
OSSL_119859	1,1 ± 0,1 33 µM 2 / 8	1,7 ± 0,2 33 µM 2 / 8	1,6	-
Cilnidipin	1,1 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,7 ± 0,2 3,3 µM 2 / 8	1,6	-
Nicardipin	1,1 ± 0,1 10 µM 2 / 8	1,8 ± 0,2 10 µM 2 / 8	1,7	-
OSSL_126729	1,1 ± 0,1 5 µM 2 / 8	1,8 ± 0,1 5 µM 2 / 8	1,7	-
OSSL_127229	1,2 ± 0,1 5 µM 2 / 8	2,4 ± 0,3 5 µM 2 / 8	2,2	-
Benidipin	1,3 ± 0,1 3,3 µM 2 / 8	1,8 ± 0,2 3,3 µM 2 / 8	1,5	1,6
22184	1,3 ± 0,1 33 µM 2 / 8	1,9 ± 0,3 33 µM 2 / 8	1,6	-
OSSK_364814	1,4 ± 0,1 20 µM 2 / 8	1,9 ± 0,2 20 µM 2 / 8	1,5	-

DISKUSSION

Fortsetzung Tab. 22

Substanz	Bioassay mit CNGA3 _{WT}	Bioassay mit CNGA3 _{E228K}	Korrigierter FC _{max} -Wert	Western Blot Apoaequorin
OSSK_390157	1,5 ± 0,1 15 µM 2 / 8	2,2 ± 0,3 15 µM 2 / 8	1,7	-
Bupivacain	1,9 ± 0,2 400 µM 2 / 8	2,0 ± 0,3 400 µM 2 / 15	1,1	18,1
Amilorid	2,1 ± 0,2 400 µM 2 / 8	3,8 ± 0,9 400 µM 2 / 8	2,7	10,7
Nisoldipin	2,7 ± 0,1 20 µM 2 / 8	4,8 ± 1,0 20 µM 2 / 8	3,1	25,4

Nachweis der verbesserten Oberflächenexpression nach Substanzbehandlung mittels Oberflächenbiotinylierung

Mittels der Oberflächenbiotinylierung sollte mit einer unabhängigen Methode nachgewiesen werden, dass die identifizierten pharmakologischen Chaperone die Oberflächenexpression des mutanten CNG-Kanals erhöhen. Vergleicht man die Menge an Wildtyp und mutantern CNG-Kanal in der biotinylierten Fraktion, so wurde bei dem Wildtyp Kanal deutlich mehr Protein biotinyliert. Die Quantifizierung ergab, dass etwa 3-fach mehr Wildtyp Kanal in die Plasmamembran gelangte verglichen mit dem mutanten CNGA3_{E228K}-Kanal. Es ist aber nicht nur der prozentuale Anteil der CNG-Kanäle in der Plasmamembran bei dem Wildtyp Protein höher, sondern auch die Gesamtmenge membranständiger Kanäle deutlich höher.

Nach Substanzbehandlung von CNGA3_{E228K}-exprimierenden HEK293-Zellen wurde bei Amilorid, ZD7288 und JFD03311 eine 1,3-bis 1,6-fache Erhöhung in der Oberflächenexpression gemessen. Dies belegte, dass eine Behandlung mit Amilorid, ZD7288 oder JFD03311 die Oberflächenexpression des mutanten CNG-Kanals erhöhen konnten.

Bupivacain führte zu keiner Verbesserung der Oberflächenexpression. Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen aus dem Bioassays mit Wildtyp-Kanälen, anhand derer Bupivacain als inaktiv eingestuft wurde. Bei Zatebradin wurde im Substanzscreening ein FC_{max} von 2,5 gemessen und sollte – beruhend auf den Ergebnissen des Bioassays mit CNGA3_{WT}-exprimierenden Zellen und nach Behandlung mit ZD7288 oder JFD03311 – nur einen geringen unspezifischen Effekt besitzen. Daher ist unklar warum nach der

Oberflächenbiotinylierung eine Reduktion der Oberflächenexpression detektiert wurde. Auch überraschend sind die Ergebnisse für das Dihydropyridin Nisoldipin, welche keine Verbesserung in der Oberflächenexpression verglichen mit der unbehandelten Kontrolle aufwies. Legt man das korrigierte Signal aus dem Bioassay zugrunde, müsste die Behandlung mit Nisoldipin eine ähnliche Erhöhung der Oberflächenexpression wie Amilorid erzielen. Weitere Experimente müssen durchgeführt werden, um über eine Verbesserung des Membraneinbaus von CNGA3_{E228K} zu entscheiden. Vermutlich kann nur anhand direkter Nachweismethoden wie dem Einbringen eines Tags an einem mutanten *trafficking*-defizienten CNG-Kanal und anschließender immunzytochemischer Färbung oder anhand elektrophysiologischer Messungen eine Aussage über eine Verbesserung der Oberflächenexpression nach Substanzbehandlung getroffen werden, auch wenn bei beiden Methoden Nachteile in Kauf genommen werden müssen.

Anhand der Untersuchungen mittels Oberflächenbiotinylierung konnte somit für Amilorid, ZD7288 und JFD03311 eine Verbesserung der Oberflächenexpression des mutanten CNGA3_{E228K} bestätigt werden.

6.4 Abschließende Beurteilung

Durch das Substanzscreening mittels des Aequorin-basierten Bioassays konnten zahlreiche Substanzen identifiziert werden, die viel versprechende Kandidaten als Korrektoren für Zapfen CNG-Kanäle darstellen: verschiedene Dihydropyridine, darunter das Nisoldipin und das JFD03311, sowie das Pyrazinamid Amilorid, der HCN-Kanalantagonist Zatebradin und das ZD7288. Mit einigen der identifizierten Substanzen wurden Validierungsexperimente durchgeführt. Ein Vorgehen, welches sich z.B. im Falle von Bupivacain, das im Bioassay eine gute, aber ausschließlich auf unspezifischen Effekten beruhende Aktivität zeigte, als essentiell erwies.

Das ZD7288 konnte in diesem Projekt erfolgreich als Korrektor für mutante *trafficking*-defiziente Zapfen CNG-Kanäle identifiziert werden. Im Bioassay und nach der Oberflächenbiotinylierung konnte eine Verbesserung der Oberflächenexpression der *trafficking*-defizienten CNGA3_{E228K}-Kanäle bestätigt werden, zudem zeigte ZD7288 Effektivität bei verschiedenen Kanalmutanten. Das ZD7288 besitzt keine gemeinsamen

DISKUSSION

charakteristischen Strukturmerkmale mit anderen untersuchten Substanzen, welche eine Einteilung in eine Substanzgruppe erlauben. Es wären weitere Untersuchungen notwendig, um z. B. durch Testen von Derivaten wichtige Strukturelemente zu identifizieren, welche relevant für die Interaktion mit dem mutanten *trafficking*-defizienten Zapfen CNG-Kanal sind. Dies gilt auch für die Substanzen Caroverin, FPL64176, LOE 908, Midodrin und SKF96365, bei denen außerdem die unspezifischen Effekte durch Beeinflussung des Expressionslevels von Apoaequorin oder dem mutanten CNGA3_{E228K} bestimmt werden sollten.

Das Amilorid konnte die Oberflächenexpression aller untersuchten *trafficking*-defizienten CNGA3-Kanäle verbessern, obwohl auch unspezifische Effekte beobachtet wurden. Die Gruppe der Pyrazinamide und Benzamide, zu denen das Amilorid gehört, stellen viel versprechende Kandidaten dar, wobei auch hier eine Optimierung der Molekülstruktur notwendig wäre. In nachfolgenden Experimenten könnte *in vivo* die Wirkung in Zapfenphotorezeptoren, welche einen mutanten *trafficking*-defizienten CNG-Kanal exprimieren, verifiziert werden. Für eine Strukturoptimierung kann ebenfalls das Metoclopramid berücksichtigt werden, welches wegen seinem 5-Chlor-2-Methoxybenzamid Ähnlichkeiten mit dem Cisaprid und Metoclopramid aufweist. Es könnte zudem untersucht werden, ob neben Amilorid auch die weiteren Substanzen dieser Gruppe die Oberflächenexpression aller hier untersuchten *trafficking*-defizienten Kanalmutanten verbessern.

Das Substanzscreening wies mittlere bzw. hohe Effekte für das JFD03311 und Nisoldipin nach, aber nur für das JFD03311 konnte mittels Oberflächenbiotinylierung eine erhöhte Oberflächenexpression bestätigt werden. Beide Substanzen konnten die Oberflächenexpression weiterer *trafficking*-defizienter CNGA3-Kanäle verbessern. Somit stellen auch die Dihydropyridine interessante Kandidaten für weiterführende Untersuchungen dar, wobei zunächst der Schwerpunkt auf die Identifizierung einer Leitstruktur gelegt werden sollte.

Die N-Phenylsulfonamide wären auch als Ausgangsstruktur für eine weitere Optimierung geeignet, man müsste aber zunächst die Spezifität der Substanzen nachweisen. Dafür könnte man – wie in diesem Projekt durchgeführt – CNGA3_{WT}-exprimierende HEK293-Zellen mit diesen Substanzen behandeln. Wird bestätigt, dass diese Substanzgruppe die

Oberflächenexpression *trafficking*-defizienter CNG-Kanäle verbessern kann, wäre diese Substanzgruppe ebenfalls als Ausgangsstruktur für eine weitere Optimierung geeignet.

Die Sulfonylharnstoffe (Kaliumkanalantagonisten) sowie die Substanzen mit Fluorophenylgruppe (Calciumkanalantagonisten) stellen keine interessanten Molekülstrukturen dar, da bei den Sulfonylharnstoffen nur das Glibenclamid Aktivität besaß, welche vermutlich auf einen dem Benzamid-ähnlichen Rest zurückzuführen ist. Keines der Substanzen mit Fluorophenylgruppe zeigte Aktivität in dem Bioassay.

Der Effekt von Zatebradin scheint spezifisch zu sein, auch wenn für diese Substanz die Validierung mittels der Oberflächenbiotinylierung nicht erfolgreich war. Unter den Substanzen mit Dimethoxybenzolgruppen war das Zatebradin aber das einzige Molekül mit Aktivität – besonders die Inaktivität des chemisch sehr ähnlichen Ivabradin fiel auf. Eine weitere Optimierung der Molekülstruktur könnte sich als schwierig erweisen, weshalb vor der Durchführung weiterführender Experimente der Aufwand und der Nutzen genau abgewägt werden sollte.

6.5 Weitere Nutzungsmöglichkeiten des Aequorin-basierten Bioassays

Prinzipiell können mit dem entwickelten Bioassay Korrektoren *trafficking*-defizienter CNGA3-Kanäle identifiziert werden, wobei es keine Einschränkungen gibt hinsichtlich der Lokalisation der Mutation in den Proteindomänen (Transmembrandomäne, Pore, C-Linker, Ligandenbindestelle). Zudem ist der Assay natürlich für alle Mitglieder der CNG-Kanalfamilie anwendbar. Der Bioassay kann auch genutzt werden, um neue Antagonisten oder Agonisten homomerer oder heteromerer CNG-Kanäle zu identifizieren.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit bietet sich bei der Analyse von CNG-Kanälen mit *nonsense*-Mutation beim Screening nach Substanzen, welche einen translationalen *readthrough* erlauben, wie das Ataluren (Aurino und Nigro, 2006; Welch et al., 2007; Sermet-Gaudelus et al., 2010) oder Aminoglykoside (Manuvakhova et al., 2000; Howard et al., 2004; Pinotti et al., 2006). Bei diesem Ansatz kann die Behandlung mit den Pharmaka ein „Überlesen“ des vorzeitigen Stopcodons z.B. in CNGA3 vermitteln, und so zu einer vollständigen Synthese des Proteins führen. Mittels des Bioassays könnte anschließend die Bildung funktioneller Kanäle nachgewiesen und quantifiziert werden.

DISKUSSION

Anhand des hier etablierten Bioassays könnten auch neue oder bisher nicht untersuchte Mutationen in *CNGA3*- oder auch *CNGA1*-Gen nach Expression im heterologen Expressionssystem funktionell analysiert werden, um zu prüfen, ob die Kanalmutanten noch einen Einstrom von Calciumionen ermöglichen. Außerdem ist es möglich mit einem leicht modifizierten Assay auch anderen Calcium-leitenden Kanälen zu untersuchen.

Daneben können durch Ko-Expression der Guanylatzyklase Antagonisten oder Agonisten des cGMP-produzierenden Enzyms indirekt anhand des CNG-Kanal-vermittelten Calciumeinstroms untersucht werden (Wunder et al., 2005a; Wunder et al., 2007). Durch Ko-Expression einer cGMP-abbauenden Phosphodiesterase (PDE) können Agonisten oder Antagonisten der PDE identifiziert werden (Wunder et al., 2005b). Dieser Assay kann auch durch Expression des olfaktorischen CNG-Kanals auf die Untersuchung von Enzyme übertragen werden, welche an der Synthese oder Degradation von cAMP beteiligt sind (Rich und Karpen, 2005). Außerdem kann durch Ko-Expression eines G-Protein gekoppelten Rezeptors (GPCR) mit Apoaequorin und einem cAMP-sensitiven CNG-Kanals ebenfalls Agonisten und Antagonisten von GPCR identifiziert werden (Corazza, 2009).

6.6 Ausblick

Zwei Strategien bieten sich für das weitere Vorgehen an. Zum Einen könnte man das anhand der DHP generierte Pharmakophormodell für ein *in silico* Screening einsetzen, um neue Molekülgerüste und Substanzen zu identifizieren, welche die Oberflächenexpression des *trafficking*-defizienten *CNGA3* verbessern könnten (mündliche Kommunikation mit Charlotta Schärfe, *Applied Bioinformatics Group*). Ziel muss es sein, Substanzen zu finden, welche nicht mit anderen, in der Retina exprimierten Kanäle interagieren, da z.B. mit 500 μ M Amilorid oder 10 μ M Benzamil Kanäle bestehend aus der P3-Untereinheit des TRP in Ganglienzellen inhibiert werden können (Dai et al., 2007). Die Aktivität dieser Substanzen könnte anschließend in dem Bioassay überprüft werden.

Zum Anderen könnten durch chemische Modifikation der bereits identifizierten Substanzen Leitstrukturen mit verbesserter Spezifität und Wirksamkeit identifiziert werden. Für die aktiven Substanzen interessanter Gruppen sollte zunächst der reine Korrektoreffekt ermittelt werden. Hilfreich bei der Strukturoptimierung aber technisch sehr aufwendig wäre

die Ermittlung der Kristallstruktur des mutanten Zapfen CNG-Kanals mit und ohne gebundenen Korrektor. Dadurch könnten Informationen gewonnen werden, wo und wie der Korrektor mit dem CNG-Kanal interagiert und welche strukturellen Modifikationen durchgeführt werden sollten, um die verfügbaren Bindetaschen des Kanalproteins besser auszufüllen.

Um geeignete Substanzen als mögliche Therapeutika für Achromatopsie etablieren zu können, sollten diese bezüglich ihrer Wirkung als Korrektoren im Tiermodell getestet werden. Bislang existiert jedoch kein geeignetes Tiermodell, da bei den bisher beschriebenen Modellen mit Mutation in *Cnga3* ein kompletter Funktionsverlust (*knockout*) vorliegt bzw. unklar ist, ob die in der *cpfl5* Maus vorliegende *missense*-Mutation, einen *trafficking*-Defekt induziert (Biel et al., 1999; Pang et al., 2012). Daher müsste zunächst ein Tiermodell generiert werden, in welchem ein mutanter *trafficking*-defizienter CNG-Kanal in den Zapfenphotorezeptoren exprimiert wird. Die Applikation der zu testenden Substanz kann im Anschluss systematisch oder lokal erfolgen. Denkbar wäre auch, die Substanzbehandlung an retinalen Explantatkulturen durchzuführen, da hier die Konzentration der Substanzen viel exakter und homogen über die gesamte Retina eingestellt werden kann. Über eine immunhistologische Markierung der CNG-Kanäle kann anschließend durch eine Ko-Färbung mit dem Außensegment der Zapfenphotorezeptoren bestimmt werden, ob und wie viel der mutanten Kanäle nach Substanzbehandlung im Außensegment lokalisiert sind. Funktionell ließe sich eine Wiederherstellung der Zapfenfunktion mittels ERG-Messungen überprüfen.

Eine weitere Herausforderung für die Entwicklung pharmakologische Chaperone als Therapie für Achromatopsie ist die Identifizierung einer geeigneten Darreichungsform. Eine systematische Darreichungsform scheint wegen der Überquerung der Blut-Retina-Schranke, einer möglicherweise geringen Bioverfügbarkeit und/oder schweren Nebenwirkungen unvorteilhaft. Eine topische Anwendungsform, bei der der Patient die Medikation selbst durchführen kann, wäre denkbar (Sigurdsson et al., 2007; Furrer et al., 2009) dabei müssten jedoch die Substanzen zunächst die Cornea überqueren, wobei eine optimierte Formulierungen als Gel oder dem Verpacken des Wirkstoffs in z.B. Nanomizellen die Wirkstoffaufnahme verbessern kann (Cholkar et al., 2012). Okulare Injektionen, z.B. in den Vitreus, der periokularen Region, der Tenonschen Kapsel oder dem Augenmuskel (Janoria et al., 2007) sind zwar sehr unangenehm für die Patienten, können aber auf einfachen Weg

DISKUSSION

höhermolekulare Wirkstoffe in die Nähe des Wirkorts bringen. Retinale Implantate können dagegen den Wirkstoffspiegel über längere Zeit konstant halten, erfordern aber einen operativen Eingriff.

Vorraussetzung für eine Behandlung von Achromatopsie Patienten ist zudem, dass man die vorliegenden Mutationen in dem *CNGA3*-Gen bereits kennt und experimentell nachgewiesen hat, dass die vorliegenden Mutationen einen *trafficking*-Defekt in dem Kanalprotein verursachen.

Obwohl bei diesem Projekt erste chemische und pharmakologische Chaperone identifiziert wurden, welche die Oberflächenexpression des mutanten CNGA3 erhöhen, ist es noch ein weiter Weg bis eine therapeutische Anwendung und somit eine Milderung der Krankheitssymptome bei Achromatopsie-Patienten möglich ist.

7. Zusammenfassung

Die autosomal rezessiv vererbte Achromatopsie ist eine seltene, retinale Erkrankung, welche sich durch eine Beeinträchtigung der Zapfenphotorezeptorfunktion auszeichnet. Bei der Mehrheit der Patienten liegen Mutationen in *CNGA3* und *CNGB3* vor, welche für die Untereinheiten des zyklisch Nukleotid-gesteuerten (CNG) Ionenkanals im Zapfenaußensegment kodieren. Die CNG-Kanäle nehmen eine essentielle Rolle bei der Phototransduktion der Zapfenphotorezeptoren ein.

Für zahlreiche Mutationen in der *CNGA3*-Untereinheit wurde in heterologen Expressionssystemen eine Beeinträchtigung des *traffickings* der CNG-Kanäle nachgewiesen. Diese führt zu einer Retention des häufig noch funktionalen Kanalproteins im Zellinneren und zu einer reduzierten Oberflächenexpression. Ziel dieses Projektes war daher die Identifizierung von chemischen und pharmakologischen Chaperonen, welche den *trafficking*-Defekt von *CNGA3*-Kanalmutanten korrigieren. Dazu wurde ein Aequorin-basierter Bioassay entwickelt, mit welchem im Zellkultursystem die Oberflächenexpression von CNG-Kanälen anhand des Liganden-vermittelten Calciumeinstroms quantifiziert werden kann. Für eines der neun getesteten chemischen Chaperone (dem L-Glutamin) sowie 33 der untersuchten 83 pharmakologischen Chaperone konnte nach Behandlung von CNG-Kanälen mit der Mutation p.E228K eine Erhöhung des Calciumeinstroms mit dem Bioassay detektiert werden. Das höchste Signal wurde nach Behandlung mit Nisoldipin erhalten, weitere besonders effektive pharmakologische Chaperone waren verschiedene Dihydropyridine, der epitheliale Natriumkanalantagonist Amilorid, der Natriumkanalantagonist Bupivacain sowie die Antagonisten des *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated* (HCN) Ionenkanals ZD7288 und Zatebradin. Anhand der Messergebnisse der Dihydropyridine konnten auch einige Aussagen über strukturelle Merkmale, welche für die Korrektur der *CNGA3*_{E228K}-Kanäle relevant sind, getroffen werden, wie z.B. eine Präferenz der Nitrogruppe am Benzolring in ortho-Position.

Für die Substanzen Amilorid, Bupivacain, ZD7288, Zatebradin, Nisoldipin und JFD03311 konnte demonstriert werden, dass sie auch den *trafficking*-Defekt anderer CNG-Kanalmutanten (p.R283Q, p.T291R, p.S3419, p.E376K, p.R427C und p.R563C in *CNGA3*) verbessern können und dass, mit Ausnahme von ZD7288, die Substanzbehandlung *per se* die Zellviabilität nicht bzw. nur gering beeinträchtigt wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden Kontrollexperimente durchgeführt, die Aufschluss darüber geben sollten, ob die im Bioassay detektierten Effekte spezifisch waren. Hierbei zeigte sich, dass einige Substanzen unspezifische Wirkungen hatten und die Proteinexpression des Reporters Aequorin und des CNGA3_{E228K} erhöhten. Diese Expressionsunterschiede trugen – außer im Fall von Bupivacain – jedoch nur zum Teil zur gemessenen Signalerhöhung in dem Substanzscreening bei, wie durch Behandlung von Wildtyp CNG-Kanälen belegt werden konnte. Die Effektivität der im Bioassay als aktiv identifizierten Substanzen konnte somit bestätigt werden.

Durch Oberflächenbiotinylierungsexperimente wurde nachgewiesen, dass Amilorid, ZD7288 und JFD03311 das *trafficking* und somit den Membraneinbau von CNGA3_{E228K}-Kanälen verbessern können.

Somit konnten mit dem Aequorin-basierten Bioassay erfolgreich chemische und pharmakologische Chaperone identifiziert werden, die das *trafficking* von mutanten Zapfen CNG-Kanälen verbessern und möglicherweise einen ersten Ansatzpunkt für die Entwicklung einer pharmakologischen Therapie der Achromatopsie bieten.

8. Summary

Achromatopsia is a rare, autosomal recessive retinal disorder. Two forms of achromatopsia can be distinguished, depending on the severity of the symptoms. Complete achromatopsia is characterized by a loss of cone photoreceptor function, whereas incomplete achromatopsia results in a residual but disturbed cone function. The majority of achromatopsia patients carry mutations in *CNGA3* and *CNGB3* encoding the two subunits of the cyclic nucleotide-gated (CNG) ion channel expressed in cone photoreceptor outer segments. The CNG-channel plays an essential role in the cone photoreceptor phototransduction cascade.

A large number of mutations in *CNGA3* cause an impaired CNG-channel trafficking in heterologous expression systems. This trafficking defect causes a retention of functional channels inside the cell and a reduced surface expression. The objective of this study was the correction of the trafficking defect of mutant CNG-channels by identifying chemical and pharmacological chaperones. Therefore, an aequorin-based bioassay was established using HEK293-cells allowing the quantification of CNG-channels in the plasma membrane by measuring the ligand-mediated calcium influx. Using this bioassay, one out of nine chemical chaperones and 33 out of 83 pharmacological chaperones were found to increase the signal of CNG-channels carrying the mutation p.E228K. The highest effect was obtained after treatment with nisoldipine, other effective substances were additional dihydropyridines, the epithelial sodium channel antagonist amiloride, the sodium channel antagonist bupivacaine as well as the *hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated* (HCN) ion channel antagonists ZD7288 and zatebradine. The results of the analyzed dihydropyridines allowed to draw conclusions regarding structural features important for the correction of *CNGA3*_{E228K}-channels including the preference of a nitro group positioned in ortho direction at the benzene ring.

For the pharmacological chaperones amiloride, bupivacaine, ZD7288, zatebradine, nisoldipine and JFD03311, a rescue of other trafficking-deficient CNG-channels (p.R283Q, p.T291R, p.S3419, p.E376K, p.R427C und p.R563C in *CNGA3*) was demonstrated. Additionally, with the exception of ZD7288, the viability of HEK293-cells expressing mutant CNG-channels was not or only mildly affected.

SUMMARY

Control experiments were performed in order to verify the specificity of the detected signals using the bioassay. For some substances, unspecific effects causing an increase of the expression level of the aequorin reporter system and the mutant CNG-channel were identified. Experiments using the wild type CNGA3-channel showed that, with the exception of bupivacaine, these unspecific effects only partially explained the increase in the signal detected with the bioassay. Thus, the activity of several substances identified using the bioassay was verified.

Surface biotinylation experiments confirmed the rescue of the trafficking defect for CNG-channels with the mutation p.E228K after treatment with amiloride, ZD7288 and JFD03311. Thus, using the aequorin-based bioassay, chemical and pharmacological chaperones correcting the trafficking of mutant cone CNG-channels were successfully identified and provide a first step towards a pharmacological treatment of achromatopsia.

9. Anhang

9.1 Sequenz von pCAeq

655 bp – 660 bp: Schnittstelle des Restriktionsenzym *NsiI* (grau markiert)

766 bp – 771 bp: Schnittstelle des Restriktionsenzym *HindIII* (grau markiert)

656 bp – 766 bp: Herausgeschnittenes Fragment kodierend für die mitochondriale targeting Sequenz (unterstrichen)

778 bp – 1395 bp: Nukleotidsequenz kodierend für das c-Myc-getaggte Apoaequorin (kursiv)

AS 1 – AS 35: Proteinsequenz der mitochondrialen *targeting*-Sequenz (fett)

AS 37 – AS 242: Proteinsequenz des c-Myc-getaggten Apoaequorins (kursiv)

		10	20	30	40	50	60
1	ATCCAAGCTCAGATCCAAGCTACCGGTTTAAACCCAGATATACGCGTTGACATTGATTAT						
61	TGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGT						
121	TCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCC						
181	CATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGAC						
241	GTCAATGGGTGGACTATTTACGGTAAACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATCATA						
301	TGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCC						
361	AGTACATGACCTTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA						
421	TTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAC						
481	GGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACCAAAATC						
541	AACGGGACTTTCCAATAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGC						
601	GTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGATCACTCC ATGCAT						
661	ACCACCATGTCCGTCCTGACACCACTGCTGCTGCGGGGCTTGACAGGCTCGGCCCGGGCGG						
-2	 M S V L T P L L L R G L T G S A R R						
721	CTCCAGTGCCGCGCGCCAAGATCCATTTCCTTGCCACCTGAGGGGAAGCTTTCCGGAATG						
19	L P V P R A K I H S L P P E G K L S G M						
781	<i>GAGCAGAAGCTCATCTCCGAGGAGGATCTGAACTCGAGCGGCCGCGTGAAGCTGACCAGC</i>						
39	<i>E Q K L I S E E D L N S S G R V K L T S</i>						
841	<i>GACTTCGACAACCCCGGTGGATCGGCCGGCACAAGCACATGTTCAACTTTCTGGACGTG</i>						
59	<i>D F D N P R W I G R H K H M F N F L D V</i>						
901	<i>AACCACAACGGCAAGATCAGCCTGGACGAGATGGTGTACAAGGCCAGCGACATCGTGATC</i>						
79	<i>N H N G K I S L D E M V Y K A S D I V I</i>						
961	<i>AACAACCTGGGCGCCACACCCGAGCAGGCCAAGCGGCACAAGGACGCCGTGGAGGCCTTC</i>						
99	<i>N N L G A T P E Q A K R H K D A V E A F</i>						
1021	<i>TTCGGCGGAGCCGGCATGAAGTACGGCGTGGAGACCGACTGGCCCGCCTACATCGAGGGC</i>						
119	<i>F G G A G M K Y G V E T D W P A Y I E G</i>						
1081	<i>TGGAAGAAGCTGGCCACCGACGAGCTGGAAAAGTACGCCAAGAACGAGCCCACCCTGATC</i>						
139	<i>W K K L A T D E L E K Y A K N E P T L I</i>						
1141	<i>CGGATCTGGGGCGACGCCCTGTTTCGACATCGTGGACAAGGACCAGAACGGCGCCATCACC</i>						
159	<i>R I W G D A L F D I V D K D Q N G A I T</i>						
1201	<i>CTGGATGAGTGGAAGGCCTACACCAAAGCCGCGGAATCATCCAGAGCAGCGAGGACTGC</i>						
179	<i>L D E W K A Y T K A A G I I Q S S E D C</i>						

ANHANG

10 20 30 40 50 60
1261 GAGGAAACCTTCAGAGTGTGCGACATCGACGAGAGCGGCCAGCTGGACGTGGATGAGATG
199 E E T F R V C D I D E S G Q L D V D E M
1321 ACCCGGCAGCACCTGGGCTTTTGGTACACCATGGACCCCGCCTGCGAGAAGCTGTATGGC
219 T R Q H L G F W Y T M D P A C E K L Y G
1381 GGAGCCGTGCCCTGATGAGCGGCCGCTTCCCTTTAGTGAGGGTTAATGCTTCGAGCAGAC
239 G A V P * *
1441 ATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGTGAAAAAATGC
1501 TTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAA
1561 CAAGTTAAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGATGTGGGAG
1621 GTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAAATCCGATAAGGATCGATGCTC
1681 ACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGT
1741 GAGCAAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCC
1801 ATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA
1861 ACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTC
1921 CTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGG
1981 CGTTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGC
2041 TGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATC
2101 GTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACA
2161 GGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACT
2221 ACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCG
2281 GAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTT
2341 TTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCT
2401 TTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCACGTAAAGGGATTTTGGTCAATGA
2461 CATTAACTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTTCGGTGATG
2521 ACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGG
2581 ATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGCGGGGTGTCGGGGCT
2641 GGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAA
2701 TACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATT
2761 AAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC
2821 GCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCA
2881 AGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC
2941 CAAAAAATTGATTAGGGTGTGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTT
3001 TCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAACTGGAAC
3061 AACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTTCGGC
3121 CTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTTAACAAAATATT
3181 AACGTTACAATTTCCATTTCGCATTCAGGCTGAACTAGATCGATCTAGAGTCCGTTACA
3221 TAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGACGTCA
3301 ATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTG
3361 GAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACG
3421 CCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACC
3481 TTATGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTG
3541 ATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTTGACTCACGGGGATTTCCA
3601 AGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAATCAACGGGACTTT
3661 CCAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG
3721 GAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCA
3781 CGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGCGGCCGGGAACGG
3841 TGCATTGGAACGGACCTGCAGCACGTGTTGACAATTAATCATCGGCATAGTATATCGGCA
3901 TAGTATAATACGACTCACTATAGGAGGGCCACCATGGCCAAGTTGACCAGTGCCGTTCCG
3961 GTGCTCACCGCGCGCGACGTCGCCGAGCGGTGCGAGTTCTGGACCGACCGGCTCGGGTTC
4021 TCCCGGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGACGTGACCTGTTC
4081 ATCAGCGCGGTCCAGGACCAGGTGGTGCCGACAACACCCTGGCCTGGGTGTGGGTGCGC
4141 GGCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGTGGTCCGAGGTCGTGTCCACGAACCTCCGGGACGCC
4201 TCCGGGCCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCCGTGGGGGCGGGAGTTCCGCCCTGCGC

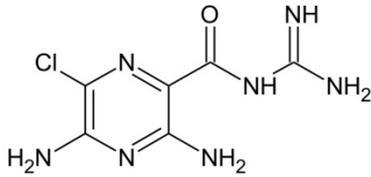
4261 10 20 30 40 50 60
GACCCGGCCGGCAA | | | | | |
CTGCGTGCACTTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGACCGACGCCGACC

4321 AACACCGCCGGTCCGACGCGGCCCGACGGGTCCGAGGGGGGTGACCTCGAAACTTGTTT
4381 ATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAATAAAGCA
4441 TTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTC
4501 TGG

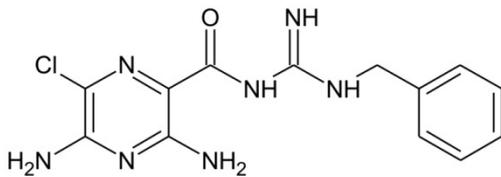
9.2 Molekülstrukturen der untersuchten Substanzen

Chirale Zentren sind durch einen (*) markiert.

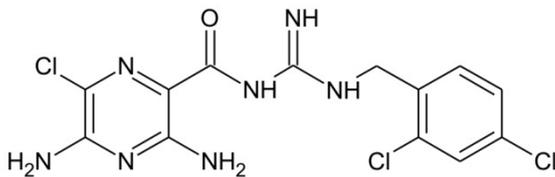
Pyrazinamide und Benzamide



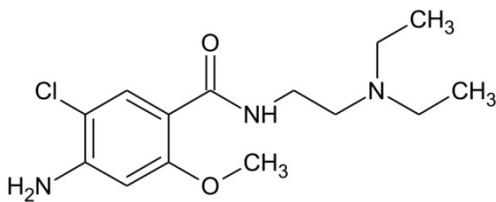
Amilorid



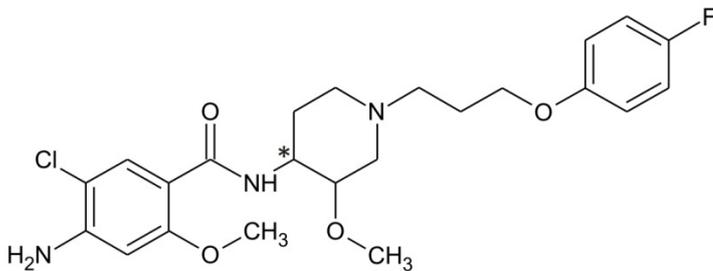
Benzamil



2,4-Dichlorbenzamil

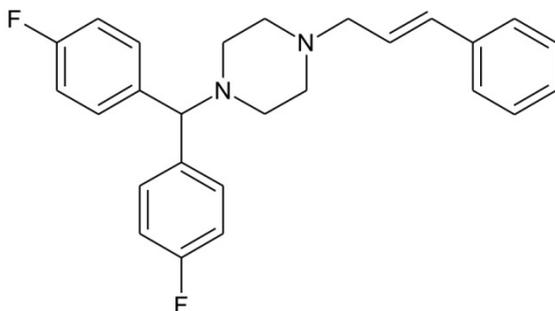


Metoclopramid

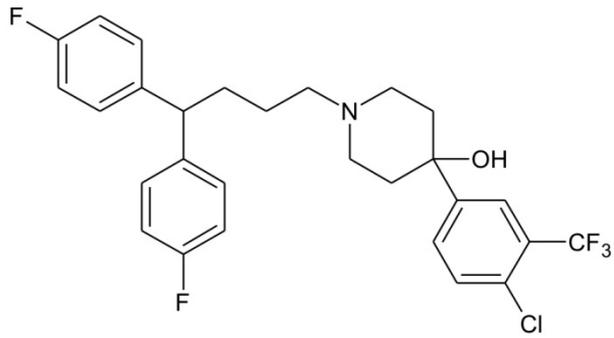


Cisaprid

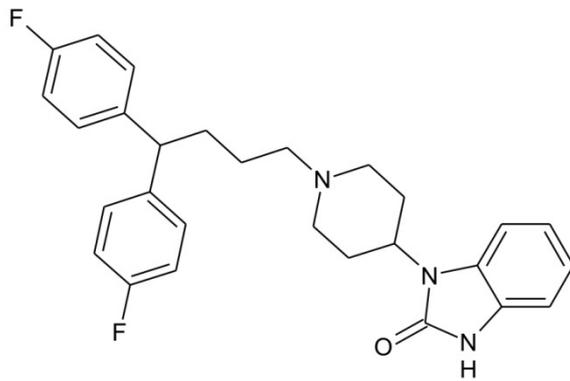
Substanzen mit Fluorphenylgruppe



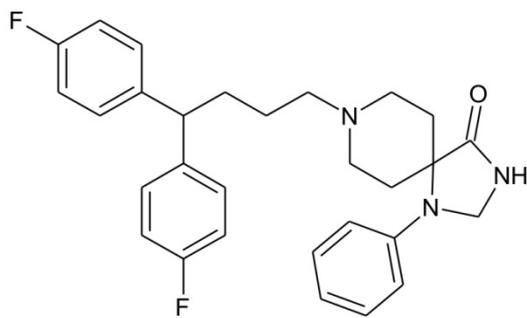
Flunarizin



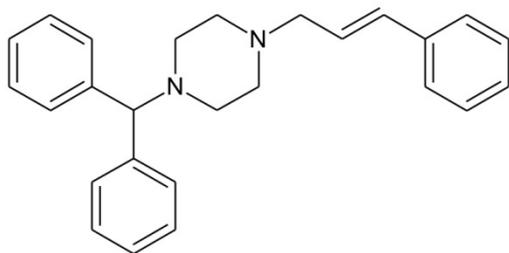
Penfluridol



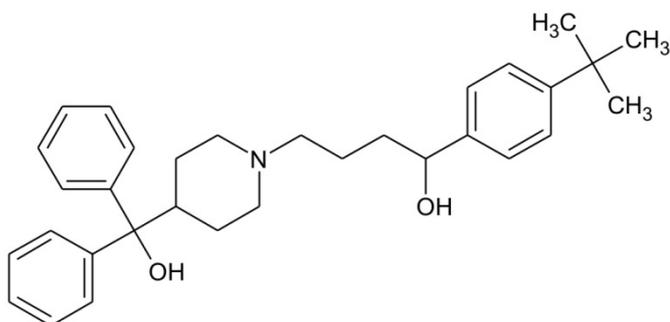
Pimozid



Fluspirilen

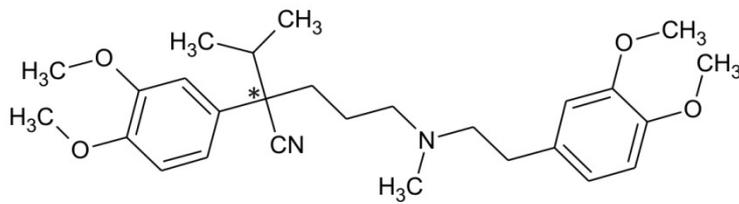


Cinnarizin

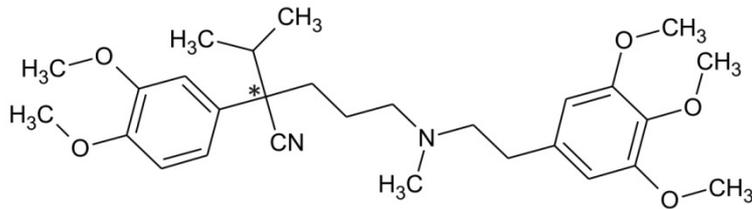


Terfenadin

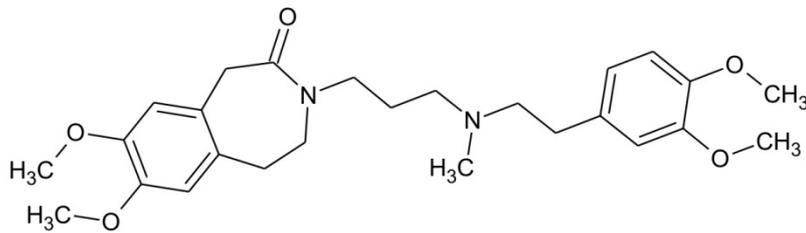
Substanzen mit Dimethoxybenzolgruppe



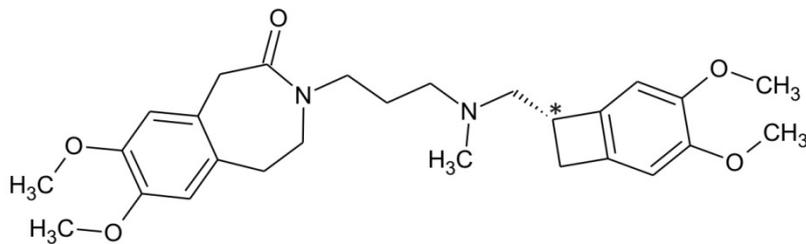
Verapamil



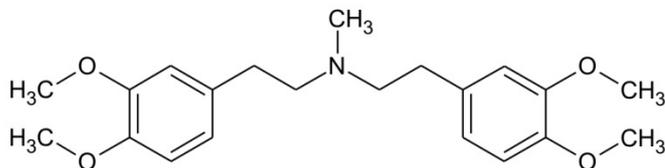
Methoxyverapamil



Zatebradin

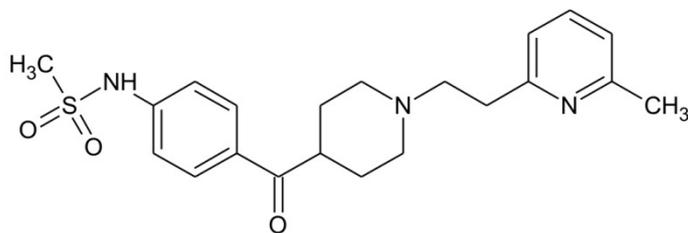


Ivabradin

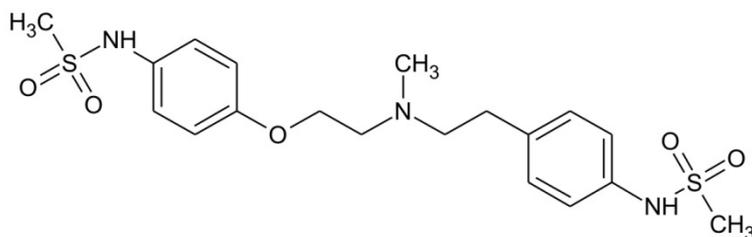


YS-035

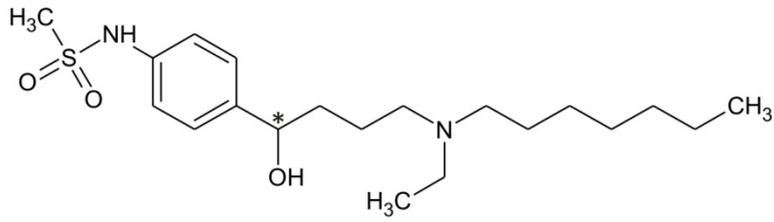
N-Phenylsulfonamide



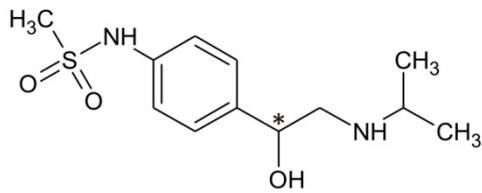
E-4031



Dofetilid

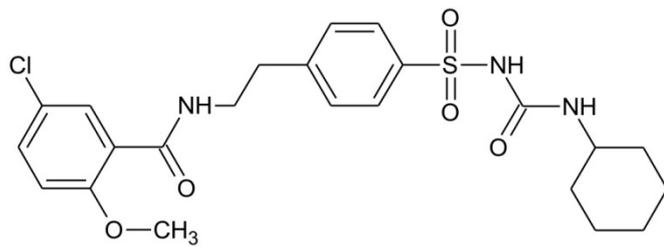


Ibutilid

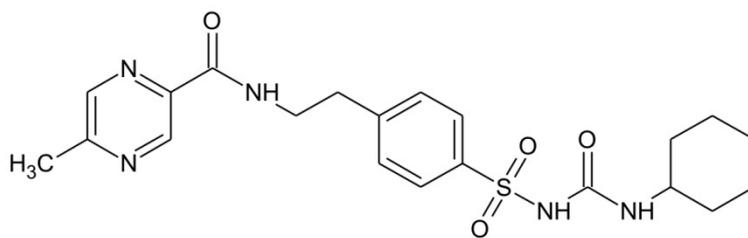


Sotalol

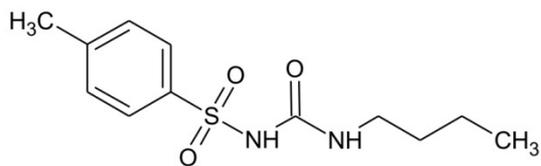
Sulfonylharnstoffe



Glibenclamid

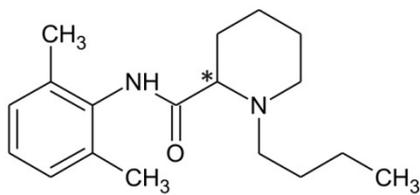


Glipizid

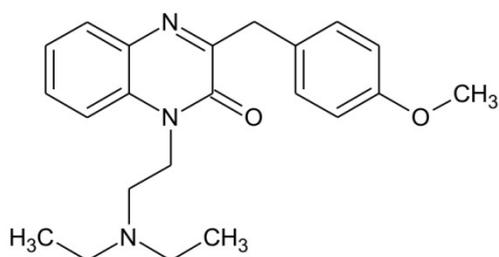


Tolbutamid

Weitere Nicht-DHP

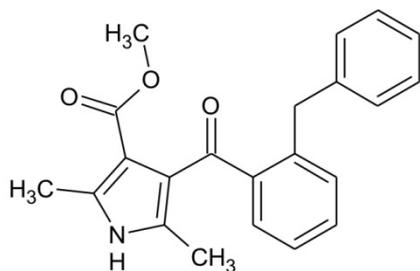


Bupivacain

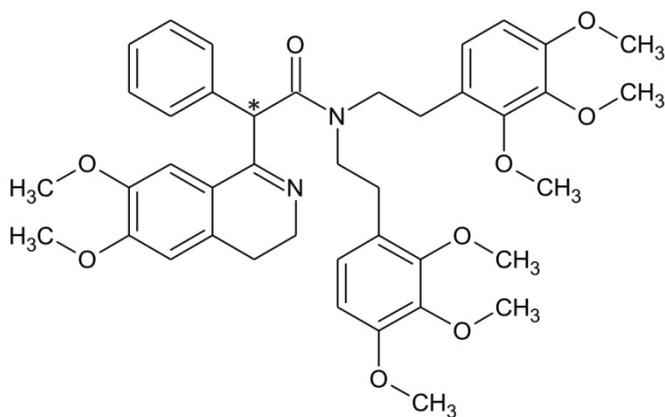


Caroverin

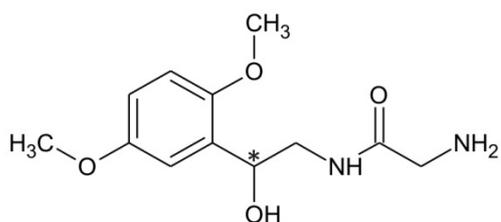
ANHANG



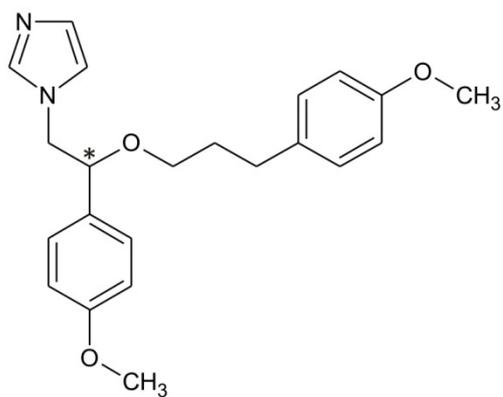
FPL64176



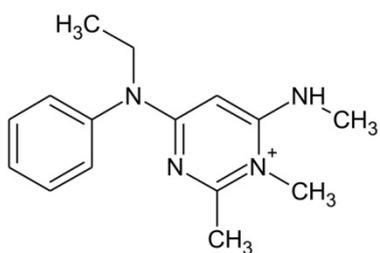
LOE 908



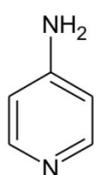
Midodrin



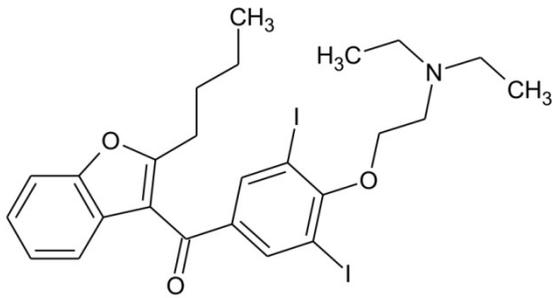
SKF96365



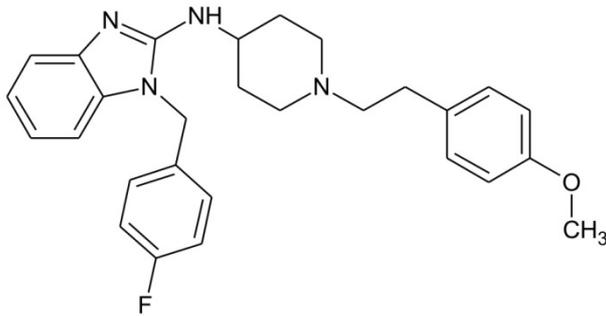
ZD7288



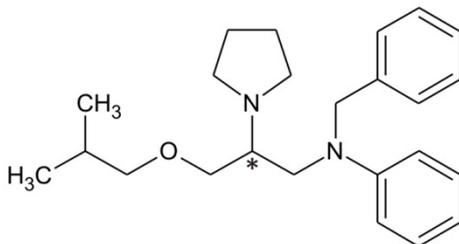
4-Aminopyridin



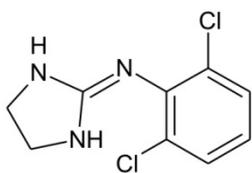
Amiodaron



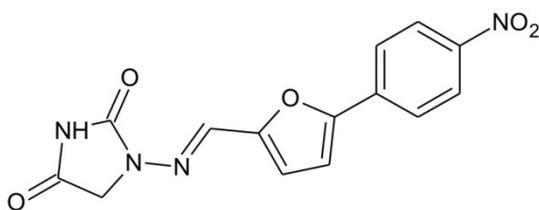
Astemizol



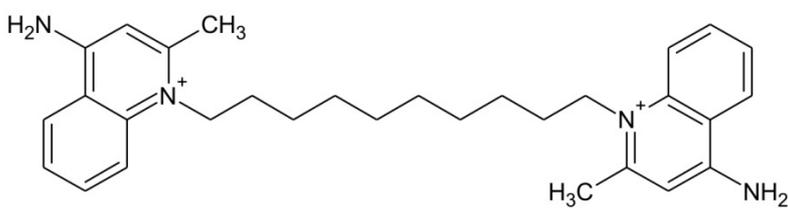
Bepridil



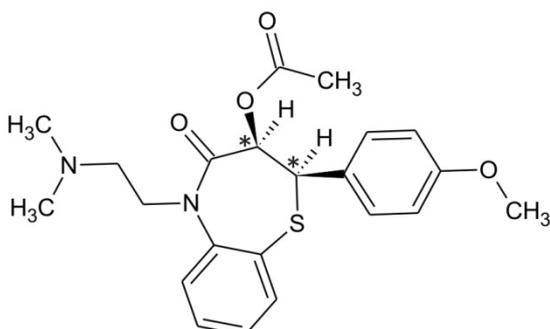
Clonidin



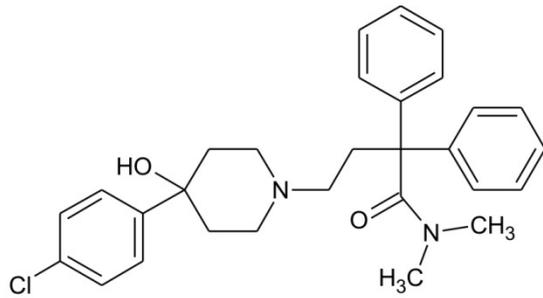
Dandrolen



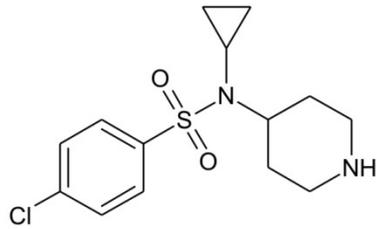
Dequaliniumchlorid



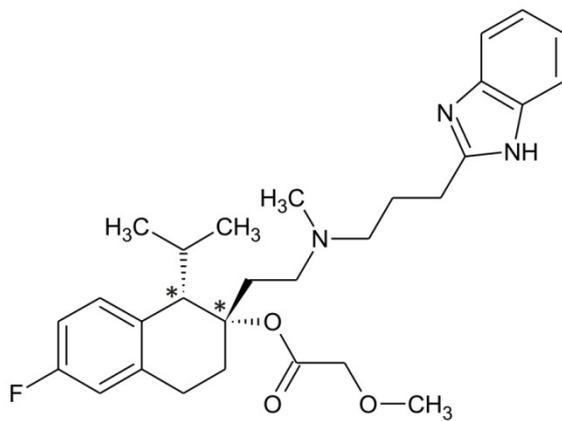
L-cis-Diltiazem



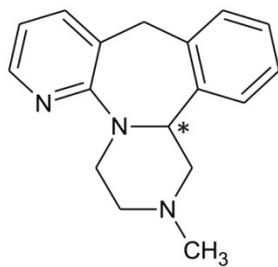
Loperamid



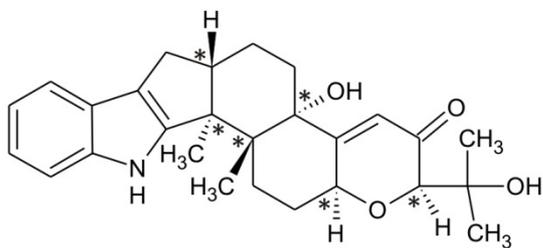
L-type Calcium
Channel Blocker



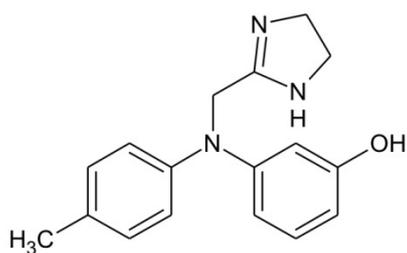
Mibefradil



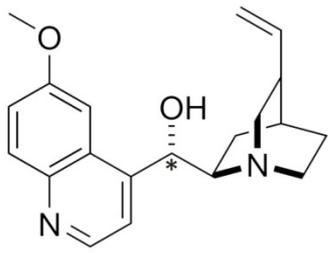
Mirtazapin



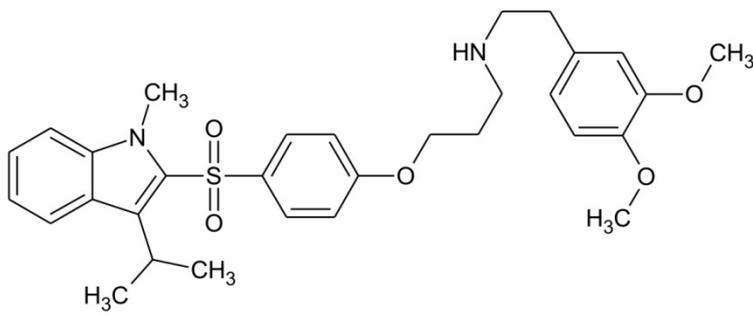
Paxilin



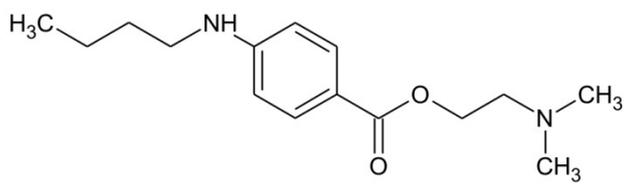
Phentolamin



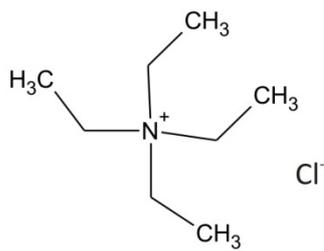
Quinidin



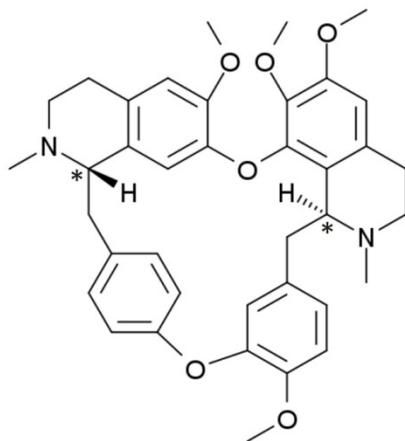
SR33805



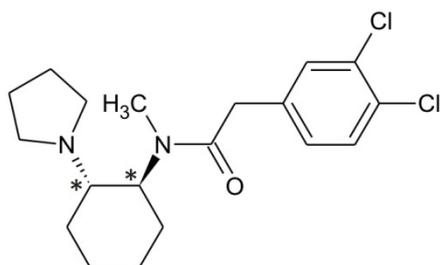
Tetracain



Tetraethylammonium
chlorid

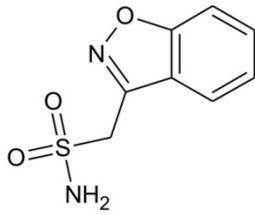


Tetrandrin



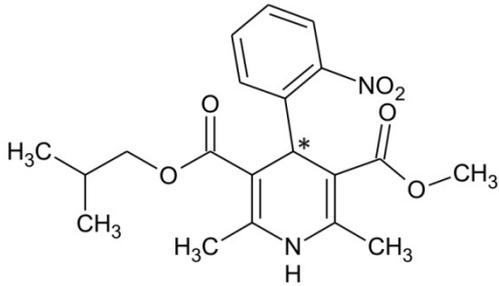
U-50488

ANHANG

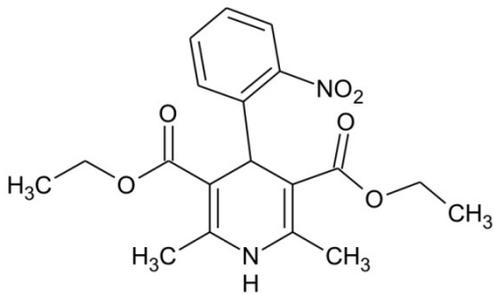


Zonisamid

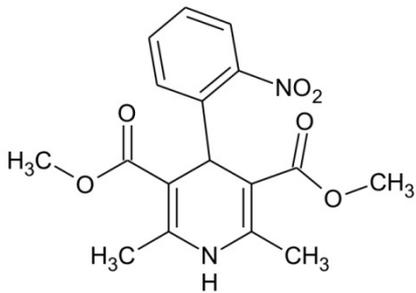
Dihydropyridine mit kurzer Seitenkette



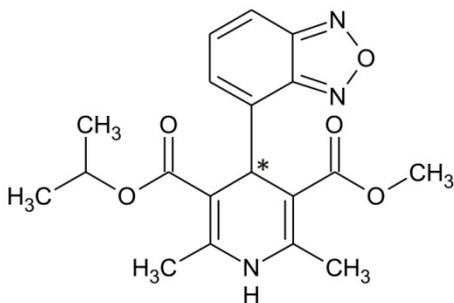
Nisoldipin



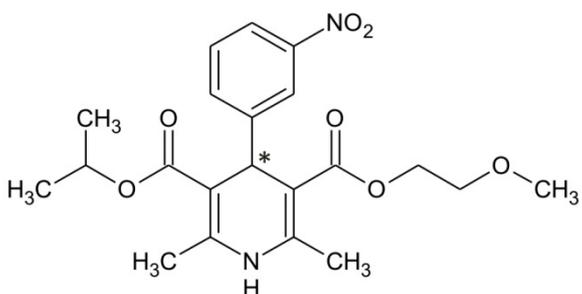
JFD03311



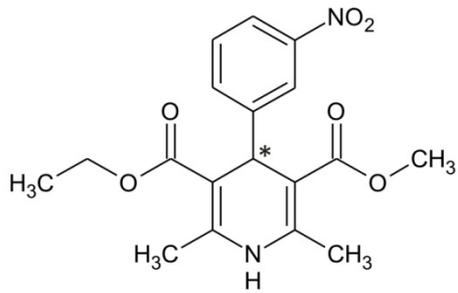
Nifedipin,
ortho-Nifedipin



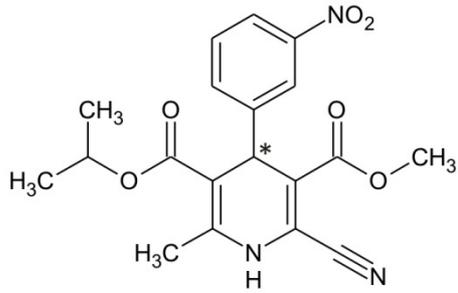
Isradipin



Nimodipin

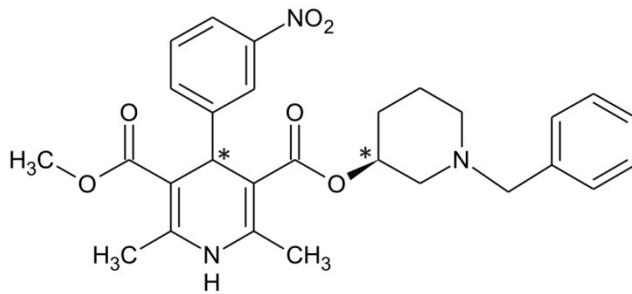


Nitrendipin

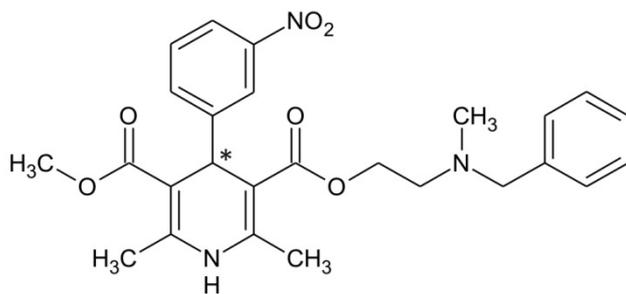


Nilvadipin

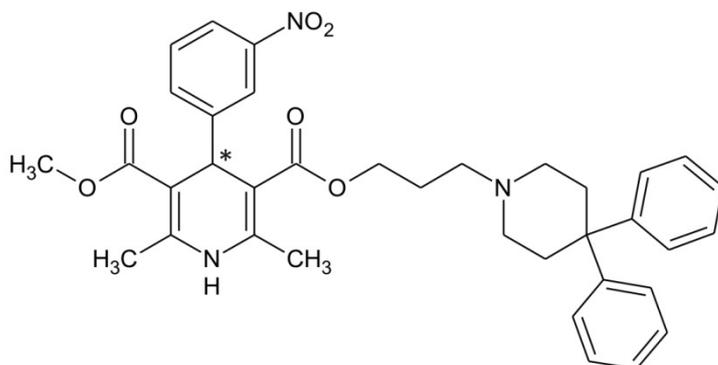
Dihydropyridine mit langer Seitenkette



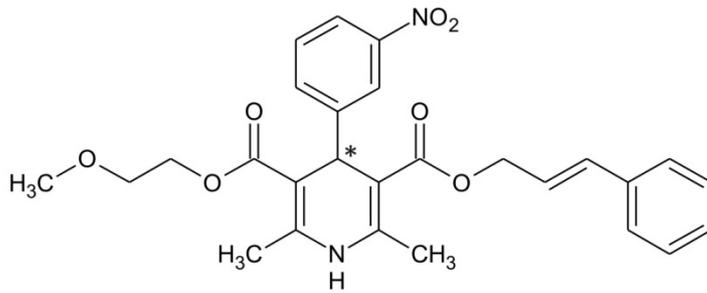
Benidipin



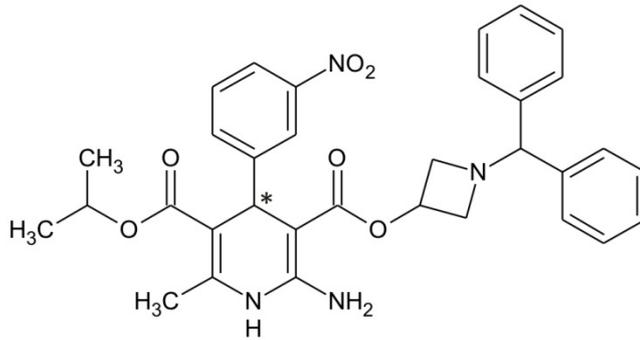
Nicardipin



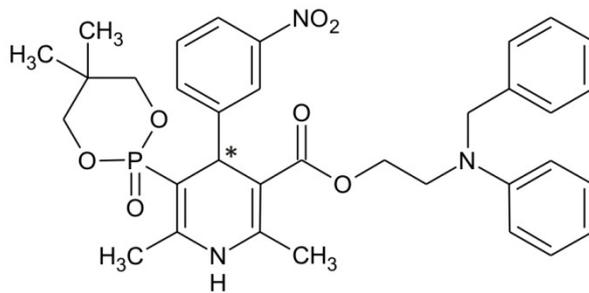
Niguldipin



Cilnidipin

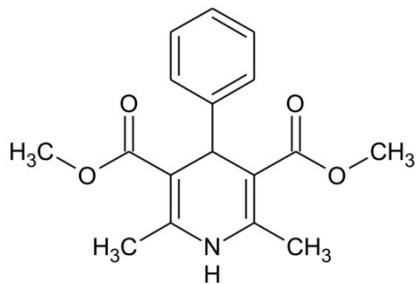


Azelnidipin

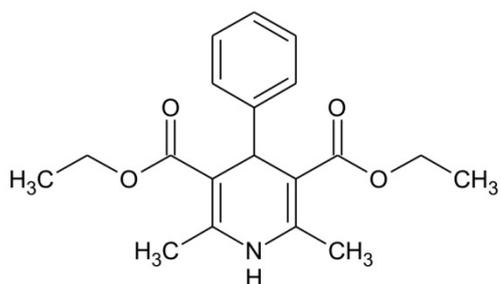


Efonidipin

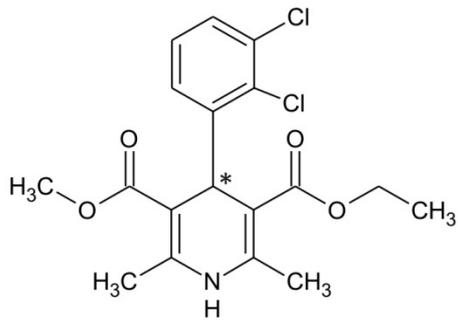
Dihydropyridine mit lipophilen Substituenten am Benzolring



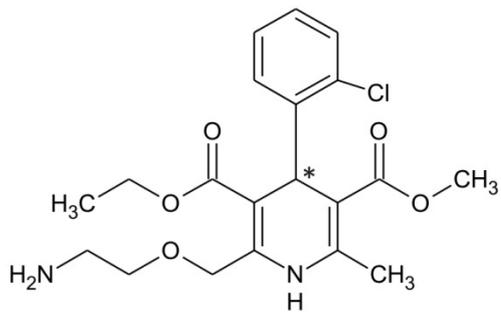
RJC03435



BTB14326

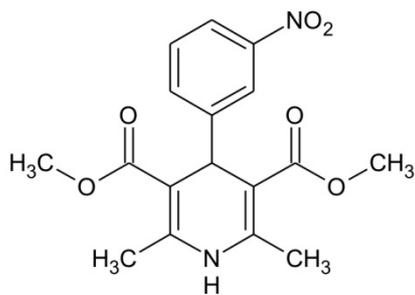


Felodipin

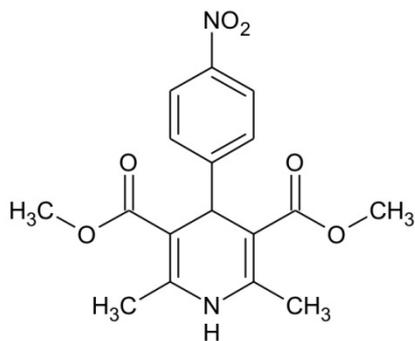


Amlodipin

Derivate des Nifedipins

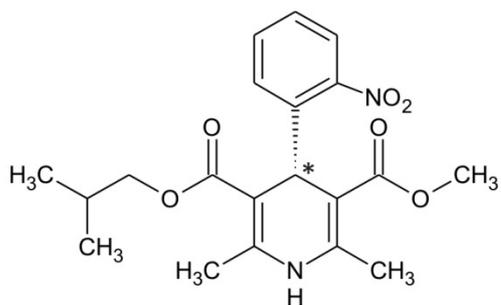


meta-Nifedipin

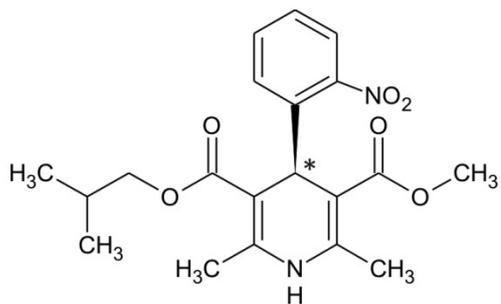


para-Nifedipin

Enantiomere des Nisoldipins

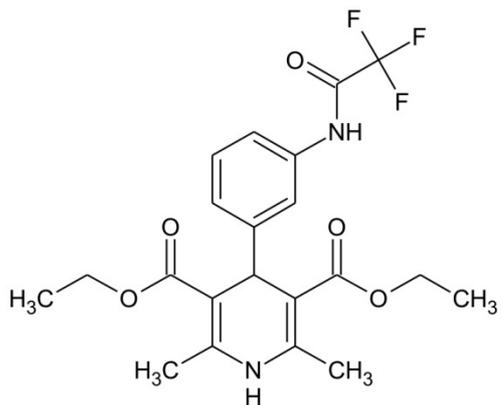


R (-) Nisoldipin

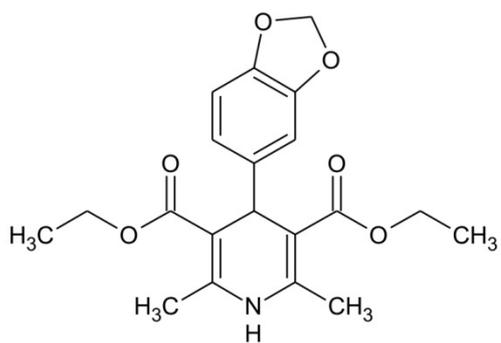


S (+) Nisoldipin

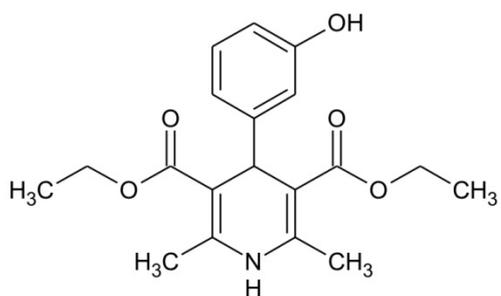
Dihydropyridine mit hydrophilen Substituenten am Benzolring



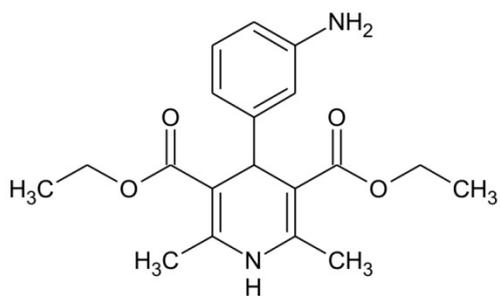
OSSK_000971



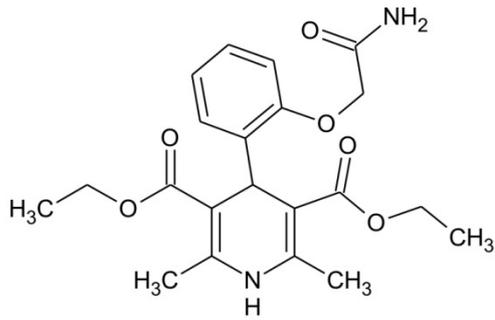
OSSK_014625



LT00054255

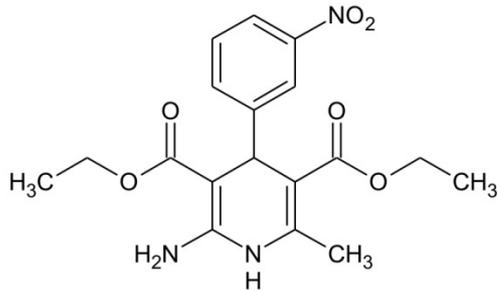


R420530

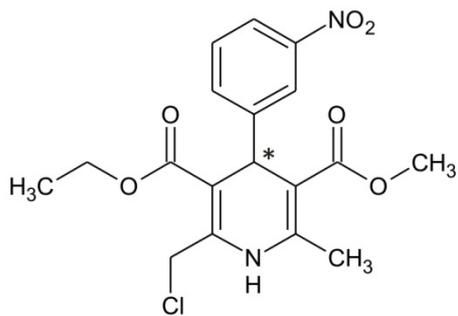


OSSL_590453

Dihydropyridine mit substituierter Methylgruppe am Pyridinring

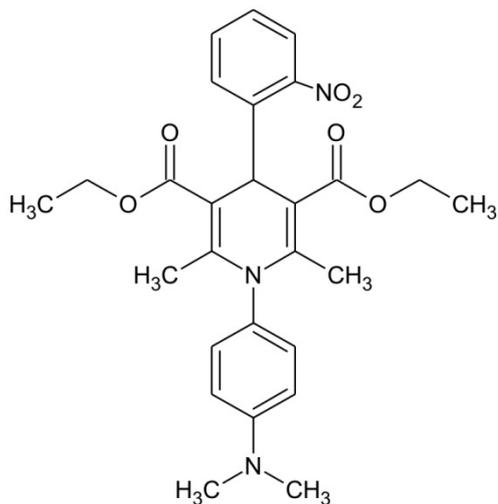


STOCK1S-56409



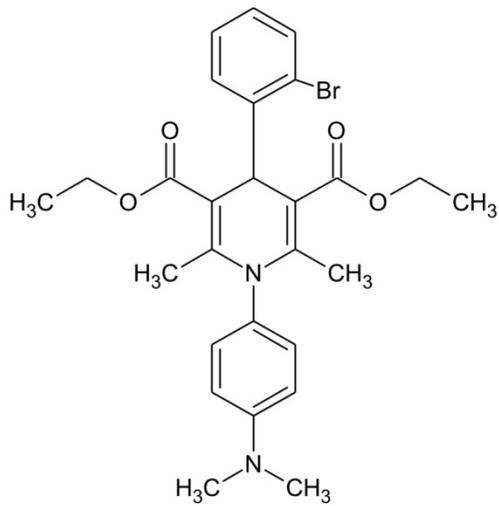
22184

Dihydropyridine mit substituiertem Dihydropyridin-Stickstoff

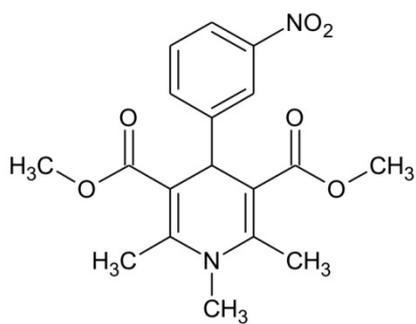


OSSL_127229

ANHANG

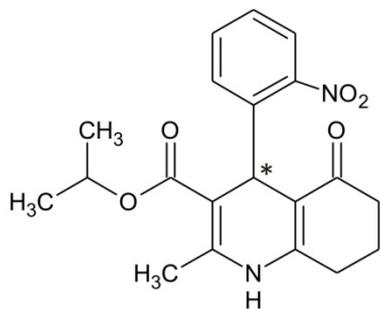


OSSL_126729

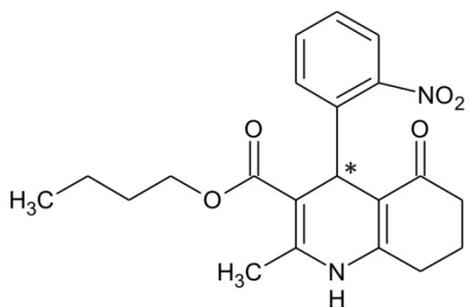


OSSK_390157

Dihydropyridine mit starrem Ringsystem



OSSL_119859



OSSK_364814

10. Literaturverzeichnis

- Aboshiha J**, Dubis AM, Cowing J, Fahy RT, Sundaram V, Bainbridge JW, Ali RR, Dubra A, Nardini M, Webster AR, Moore AT, Rubin G, Carroll J, Michaelides M (2014). A prospective longitudinal study of retinal structure and function in achromatopsia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **55**(9):5733-43.
- Ahuja Y**, Kohl S, Traboulsi EI (2008). CNGA3 mutations in two United Arab Emirates families with achromatopsia. *Mol Vis.* **14**:1293-7.
- Aligianis IA**, Forshew T, Johnson S, Michaelides M, Johnson CA, Trembath RC, Hunt DM, Moore AT, Maher ER (2002). Mapping of a novel locus for achromatopsia (ACHM4) to 1q and identification of a germline mutation in the alpha subunit of cone transducin (GNAT2). *J Med Genet.* **39**(9):656-60.
- Andér M**, Luzhkov VB, Aqvist J (2008). Ligand binding to the voltage-gated Kv1.5 potassium channel in the open state--docking and computer simulations of a homology model. *Biophys J.* **94**(3):820-31.
- Arakawa T**, Ejima D, Kita Y, Tsumoto K (2006). Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. *Biochim Biophys Acta.* **1764**(11):1677-87.
- Aurino S und Nigro V** (2006). Readthrough strategies for stop codons in Duchenne Muscular dystrophy. *Acta Myol.* **25**(1):5-12.
- Aymami J**, Barril X, Rodríguez-Pascau L, Marinell M (2013). Pharmacological chaperones for enzyme enhancement therapy in genetic diseases. *Pharm Pat Anal.* **2**(1):109-24.
- Azam M**, Collin RW, Shah ST, Shah AA, Khan MI Hussain A, Sadeque A, Strom TM, Thiadens AA, Roosing S, den Hollander AI, Cremers FP, Qamar R (2010). Novel CNGA3 and CNGB3 mutations in two Pakistani families with achromatopsia. *Mol Vis.* **16**:774-81.
- Baell JB und Holloway GA** (2010). New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J Med Chem.* **53**(7):2719-40.
- Baell J und Walters MA** (2014). Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature* . **513**(7519):481-3.
- Bartoli M**, Gicquel E, Barrault L, Soheili T, Malissen M, Malissen B, Vincent-Lacaze N, Perez N, Udd B, Danos O, Richard I (2008). Mannosidase I inhibition rescues the human alpha-sarcoglycan R77C recurrent mutation. *Hum Mol Genet.* **17**(9):1214-21.
- Berendse K**, Ebberink MS, Ijlst L, Poll-The BT, Wanders RJ, Waterham HR (2013). Arginine improves peroxisome functioning in cells from patients with a mild peroxisome biogenesis disorder. *Orphanet J Rare Dis.* **8**:138.
- Bernèche S und Roux B** (2005). A gate in the selectivity filter of potassium channels. *Structure.* **13**(4):591-600.
- Bernier V**, Morello JP, Zarruk A, Debrand N, Salahpour A, Lonergan M, Arthus MF, Laperrière A, Brouard R, Bouvier M, Bichet DG (2006). Pharmacologic chaperones as a potential treatment for X-linked nephrogenic diabetes insipidus. *J Am Soc Nephrol.* **17**(1):232-43.
- Bett GC**, Morales MJ, Strauss HC, Rasmusson RL (2006). KchIP2b modulates the affinity and use-dependent block of Kv4.3 by nifedipine. *Biochem Biophys Res Commun.* **340**(4):1167-77.
- Biel M**, Altenhofen W, Hullin R, Ludwig J, Freichel M, Flockerzi V, Dascal N, Kaupp UB, Hofmann F (1993). Primary structure and functional expression of a cyclic nucleotide-gated channel from rabbit aorta. *FEBS Lett.* **329**(1-2):134-8.

LITERATURVERZEICHNIS

- Biel M**, Zong, X, Distler M, Bosse E, Klugbauer N, Murakami M, Flockerzi V, Hofmann F (1994). Another member of the cyclic nucleotide-gated channel family, expressed in testis, kidney, and heart. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**(9):3505-9.
- Biel M**, Seeliger M, Pfeifer A, Kohler K, Gerstner A, Ludwig A, Jaissle G, Fauser S, Zrenner E, Hofmann F (1999). Selective loss of cone function in mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNG3. *Proc Natl Acad Sci USA*. **96**(13):7553-7.
- Biel M** (2008). Cyclic nucleotide-regulated cation channels. *J Biol Chem*. **284**(14):9017-21.
- Biskup C**, Kusch J, Schulz E, Nache V, Schwede F, Lehmann F, Hagen V, Benndorf K (2007). Relating ligand binding to activation gating in CNGA2 channels. *Nature*. **446**(7134):440-3.
- Bois P**, Chatelier A, Bescond J, Faivre JF (2011). Pharmacology of Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated (HCN) Channels. In: Gupta SP (Hrsg.) Ion Channels and their Inhibitors. Erste Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg, 33-51.
- Bönigk W**, Altenhofen W, Müller F, Dose A, Illing M, Molday RS, Kaupp UB (1993). Rod and cone photoreceptor cells express distinct genes for cGMP-gated channels. *Neuron*. **10**(5):865-77.
- Bright SR**, Brown TE, Varnum MD (2005). Disease-associated mutations in CNGB3 produce gain of function alterations in cone cyclic nucleotide-gated channels. *Mol Vis*. **11**:1141-50.
- Brini M**, Marsault R, Bastianutto C, Alvarez J, Pozzan T, Rizzuto R (1995). Transfected aequorin in the measurement of cytosolic Ca²⁺ concentration ([Ca²⁺]_i). A critical evaluation. *J Biol Chem*. **270**(17):9896-903.
- Bronzetti E**, Felici L, Polidori C, Amenta F (1994). Interactions between calcium channel blockers and alpha-adrenoceptors in the human coronary and mammary arteries: a radioligand binding study. *J Auton Pharmacol*. **14**(2):79-85.
- Brookes SJ**, Barron MJ, Boot-Handford R, Kirkham J, Dixon MJ (2014). Endoplasmic reticulum stress in *amelogenesis imperfecta* and phenotypic rescue using 4-phenylbutyrate. *Hum Mol Genet*. **23**(9):2468-80.
- Burns ME und Pugh EN Jr.** (2009). RGS9 concentration matters in rod phototransduction. *Biophys J*. **97**(6):1538-47.
- Burrows JA**, Willis LK, Perlmutter DH (2000). Chemical chaperones mediate increased secretion of mutant alpha 1-antitrypsin (alpha 1-AT) Z: A potential pharmacological strategy for prevention of liver injury and emphysema in alpha 1-AT deficiency. *Proc Natl Acad Sci USA*. **97**(4):1796-801.
- Calvert PD und Makino CL** (2002). The time course of light adaptation in vertebrate retinal rods. *Adv Exp Med Biol*. **514**:37-60.
- Cao SS**, Zimmermann EM, Chuang BM, Song B, Nwokoye A, Wilkinson JE, Eaton KA, Kaufman RJ (2013). The unfolded protein response and chemical chaperones reduce protein misfolding and colitis in mice. *Gastroenterology*. **144**(5):989-1000.
- Caputo A**, Hinzpeter A, Caci E, Pedemonte N, Arous N, Di Duca M, Zegarra-Moran O, Fanen P, Galiotta LJ (2009). Mutation-specific potency and efficacy of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel potentiators. *J Pharmacol Exp Ther*. **330**(3):783-91.
- Carlile GW**, Robert R, Zhang D, Teske KA, Luo Y, Hanrahan JW, Thomas DY (2007). Correctors of protein trafficking defects identified by a novel high-throughput screening assay. *Chembiochem*. **8**(9):1012-20.
- Cassar SC**, Chen J, Zhang D, Gopalakrishnan M (2004). Tissue specific expression of alternative splice forms of human cyclic nucleotide-gated channel subunit CNGA3. *Mol Vis*. **10**:808-13.

- Castillo B**, Pörzgen P, Penner R, Horgen FD, Fleig A (2010). Development and optimization of a high-throughput bioassay for TRPM7 ion channel inhibitors. *J Biomol Screen*. **15**(5):498-507.
- Chamney C**, Godar M, Garrigan E, Huey KA (2013). Effects of glutamine supplementation on muscle function and stress responses in a mouse model of spinal cord injury. *Exp Physiol*. **98**(3):796-806.
- Chang B**, Grau T, Dangel S, Hurd R, Jurklies B, Sener EC, Andreasson S, Dollfus H, Baumann B, Bolz S, Artemyev N, Kohl S, Heckenlively J, Wissinger B (2009). A homologous genetic basis of the murine cpfl1 mutant and human achromatopsia linked to mutations in the PDE6C gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. **106**(46):19581-6.
- Chen DN**, Ma YT, Liu H, Zhou QY, Li JD (2014). Functional rescue of Kallmann syndrome-associated prokineticin receptor 2 (PKR2) mutants deficient in trafficking. *J Biol Chem*. **289**(22):15518-26.
- Chen YM**, Zhou Y, Go G, Marmorstein JT, Kikkawa Y, Miner JH (2013). Laminin β 2 gene missense mutation produces endoplasmic reticulum stress in podocytes. *J Am Soc Nephrol*. **24**(8):1223-33.
- Choi KH**, Basma H, Singh J, Cheng PW (2005). Activation of CMV promoter-controlled glycosyltransferase and beta-galactosidase glycoconjugates by butyrate, trichostatin A, and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Glycoconj J*. **22**(1-2):63-9.
- Cholkar K**, Patel A, Vadlapudi AD, Mitra (2012). Novel Nanomicellar Formulation Approaches for Anterior and Posterior Segment Ocular Drug Delivery. *Recent Pat Nanomed*. **2**(2):82-95.
- Choo-Kang LR und Zeitlin PL** (2001). Induction of HSP70 promotes DeltaF508 CFTR trafficking. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **281**(1):L58-68.
- Corton M**, Nishiguchi KM, Avila-Fernández A, Nikopoulos K, Riveiro-Alvarez R, Tatu SD, Ayuso C, Rivolta C (2013). Exome sequencing of index patients with retinal dystrophies as a tool for molecular diagnosis. *PLoS One*. **8**(6):e65574.
- Craven KB und Zagotta WN** (2006). CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu Rev Physiol*. **68**:375-401.
- Crisman TJ**, Parker CN, Jenkins JL, Scheiber J, Thoma M, Kang ZB, Kim R, Bender A, Nettles JH, Davies JW, Glick M (2007). Understanding false positives in reporter gene assays: in silico chemogenomics approaches to prioritize cell-based HTS data. *J Chem Inf Model*. **47**(4):1319-27.
- Curcio CA**, Sloan KR, Kalina RE, Hendrickson AE (1990). Human photoreceptor topography. *J Comp Neurol*. **292**(4):497-523.
- Dai G**, Peng C, Liu C, Varnum MD (2013). Two structural components in CNGA3 support regulation of cone CNG channels by phosphoinositides. *J Gen Physiol*. **141**(4):413-30.
- Dai XQ**, Ramji A, Liu Y, Li Q, Karpinski E, Chen XZ (2007). Inhibition of TRPP3 channel by amiloride and analogs. *Mol Pharmacol*. **72**(6):1576-85.
- Dalman MR**, Deeter A, Nimishakavi G, Duan ZH (2012). Fold change and p-value cutoffs significantly alter microarray interpretations. *BMC Bioinformatics*. **13** Suppl 2:S11.
- Dawson G**, Schroeder C, Dawson PE (2010). Palmitoyl:protein thioesterase (PPT1) inhibitors can act as pharmacological chaperones in infantile Batten disease. *Biochem Biophys Res Commun*. **95**(1):66-9.
- de Almeida SF**, Picarote G, Fleming JV, Carmo-Fonseca M, Azevedo JE, de Sousa M (2007). Chemical chaperones reduce endoplasmic reticulum stress and prevent mutant HFE aggregate formation. *J Biol Chem*. **282**(38):27905-12.
- de Poorter JJ**, Lipinski KS, Nelissen RG, Huizinga TW, Hoeben RC (2007). Optimization of short-term transgene expression by sodium butyrate and ubiquitous chromatin opening elements (UCOEs). *J Gene Med*. **9**(8):639-48.

LITERATURVERZEICHNIS

- Denning GM**, Anderson MP, Amara JF, Marshall J, Smith AE, Welsh MJ (1992). Processing of mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is temperature-sensitive. *Nature*. **358**(6389):761-4.
- Deocaris CC**, Takano S, Priyandoko D, Kaul Z, Yaguchi T, Kraft DC, Yamasaki K, Kaul SC, Wadhwa R (2008). Glycerol stimulates innate chaperoning, proteasomal and stress-resistance functions: implications for geronto-manipulation. *Biogerontology*. **9**(4):269-82.
- Diamant S**, Eliahu N, Rosenthal D, Golouobinoff P (2001). Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stress. *J Biol Chem*. **276**(43):39586-91.
- Ding XQ**, Harry CS, Umino Y, Matveev AV, Fliesler SJ, Barlow RB (2009). Impaired cone function and cone degeneration resulting from CNGB3 deficiency: down-regulation of CNGA3 biosynthesis as a potential mechanism. *Hum Mol Genet*. **18**(24):4770-80.
- Ding XQ**, Fitzgerald JB, Quiambao AB, Harry CS, Malykhina AP (2010). Molecular pathogenesis of achromatopsia associated with mutations in the cone cyclic nucleotide-gated channel CNGA3 subunit. *Adv Exp Med Biol*. **664**:245-53.
- Dion LD**, Goldsmith KT, Tang DC, Engler JA, Yoshida M, Garver RI Jr. (1997). Amplification of recombinant adenoviral transgene products occurs by inhibition of histone deacetylase. *Virology*. **231**(2):201-9.
- Distler M**, Biel M, Flockerzi V, Hofmann F (1994). Expression of cyclic nucleotide-gated cation channels in non-sensory tissues and cells. *Neuropharmacology*. **33**(11):1275-82.
- Doyle DA**, Morais Cabral J, Pfuetzner RA, Kuo A, Gulbis JM, Cohen SL, Chait BT, MacKinnon R (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*. **280**(5360):69-77.
- Drews A**, Mohr F, Rizun O, Wagner TF, Dembla S, Rudolph S, Lambert S, Konrad M, Philipp SE, Behrendt M, Marchais-Oberwinkler S, Covey DF, Oberwinkler J (2014). Structural requirements of steroidal agonists of transient receptor potential melastatin 3 (TRPM3) cation channels. *Br J Pharmacol*. **171**(4):1019-32.
- Du XB**, Sun Y, Lin F, Zheng KY, Wang KW, Lin TT, Liu JQ, Shen JC, Luo GM (2007). Chemical chaperones increasing expression level of soluble single-chain Fv antibody (scFv2F3). *Chemical Research in Chinese Universities*. **23**(1):69-75.
- Dupriez VJ**, Maes K, Le Poul E, Burgeon E, Dethoux M (2002). Aequorin-based functional assays for G-protein-coupled receptors, ion channels, and tyrosine kinase receptors. *Receptors Channels*. **8**(5-6):319-30.
- Duricka DL**, Brown RL, Varnum MD (2012). Defective trafficking of cone photoreceptor CNG channels induces the unfolded protein response and ER-stress-associated cell death. *Biochem J*. **441**(2):685-96.
- Dyer MA und Cepko CL** (2000). Control of Müller glia cell proliferation and activation following retinal injury. *Nat. Neurosci*. **3**(9):873-80.
- Eksandh L**, Kohl S, Wissinger B (2002). Clinical features of achromatopsia in Swedish patients with defined genotypes. *Ophthalmic Genet*. **23**(2):109-20.
- Ellory JC**, Culliford SJ, Smith PA, Wolowyk MW, Knaus EE (1994). Specific inhibition of Ca-activated K channels in red cells by selected dihydropyridine derivatives. *Br J Pharmacol*. **111**(3):903-5.
- Fahim AT**, Khan NW, Zahid S, Schacher IH, Branham K, Kohl S, Wissinger B, Elner VM, Heckenlively JR, Javasundera T (2013). Diagnostic fundus autofluorescence patterns in achromatopsia. *Am J Ophthalmol*. **156**(6):1211-9.

- Faillace MP**, Berabeu RO, Korenbrot JI (2004). Cellular processing of cone photoreceptor cyclic GMP-gated ion channels: a role for the S4 structural motif. *J Biol Chem.* **279**(21):22643-53.
- Fallarero A**, Hanski L, Vuorela P (2014). How to translate a bioassay into a screening assay for natural products: general considerations and implementation of antimicrobial screens. *Planta Med.* **80**(14):1182-99.
- Fanelli RJ**, McCarthy RT, Chisholm J (1994). Neuropharmacology of nimodipine: from single channels to behavior. *Ann N Y Acad Sci.* **747**:336-50.
- Farinha CM**, King-Underwood J, Sousa M, Correia AR, Henriques BJ, Roxo-Rosa M, Da Paula AC, Williams J, Hirst S, Gomes CM, Amaral MD (2013). Revertants, low temperature, and correctors reveal the mechanism of F508del-CFTR rescue by VX-809 and suggest multiple agents for full correction. *Chem Biol.* **20**(7):943-55.
- Feighner SD**, Tan CP, McKee KK, Palyha OC, Hreniuk DL, Pong SS, Austin CP, Figueroa D, MacNeil D, Cascieri MA, Nargund R, Bakshi R, Abramovitz M, Stocco R, Kargman S, O'Neill G, Van Der Ploeg LH, Evans J, Patchett AA, Smith RG, Howard AD (1999). Receptor for motilin identified in the human gastrointestinal system. *Science.* **284**(5423):2184-8.
- Fernandez D**, Ghanta A, Kauffman GW, Sanguinetti MC (2004). Physicochemical features of the HERG channel drug binding site. *J Biol Chem.* **279**(11):10120-7.
- Fernández-Sánchez L**, Lax P, Pinilla I, Martin-Nieto J, Cuenca N (2011). Tauroursodeoxycholic acid prevents retinal degeneration in transgenic P23H rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **52**(8):4998-5008.
- Ficker E**, Thomas D, Viswanathan PC, Dennis AT, Priori SG, Napolitano C, Memmi M, Wible BA, Kaufman ES, Iyengar S, Schwartz PJ, Rudy Y, Brown AM (2000). Novel characteristics of a misprocessed mutant HERG channel linked to hereditary long QT syndrome. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **279**(4):H1748-56.
- Fink AL** (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev.* **79**(2):425-49.
- Fleischhauer R**, Mitrovic N, Deymeer F, Lehmann-Horn F, Lerche H (1998). Effects of temperature and mexiletine on the F1473S Na⁺ channel mutation causing paramyotonia congenita. *Pflugers Arch.* **436**(5):757-65.
- Franqueza L**, Longobardo M, Vicente J, Delpón E, Tamkun MM, Tamargo J, Snyders DJ, Valenzuela C (1997). Molecular determinants of stereoselective bupivacaine block of hKv1.5 channels. *Circ Res.* **81**(6):1053-64.
- Franze K**, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, Schild D, Uckermann O, Travis K, Reichenbach A, Guck J (2007). Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104**(20):8287-92.
- Frings S**, Lynch JW, Lindemann B (1992). Properties of cyclic nucleotide-gated channels mediating olfactory transduction. Activation, selectivity, and blockage. *J Gen Physiol.* **100**(1):45-67.
- Fu L und Sztul E** (2009). ER-associated complexes (ERACs) containing aggregated cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) are degraded by autophagy. *Eur J Cell Biol.* **88**(4):215-26.
- Fu Y und Yau KW** (2007). Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Arch.* **454**(5):805-19.
- Fu Y und Zhang T** (2014). Pathophysiological mechanism and treatment strategies for Leber congenital amaurosis. *Adv Exp Med Biol.* **801**:791-6.
- Fujiwara M**, Yamamoto H, Miyagi T, Seki T, Tanaka S, Hide I, Sakai N (2013). Effects of the chemical chaperone 4-phenylbutylate on the function of the serotonin transporter (SERT) expressed in COS-7 cells. *J Pharmacol Sci.* **122**(2):71-83.

LITERATURVERZEICHNIS

- Furrer E**, Berdugo M, Stella C, Behar-Cohen F, Gurny R, Feige U, Lichtlen P, Urech DM (2009). Pharmacokinetics and posterior segment biodistribution of ESBA105, an anti-TNF-alpha single-chain antibody, upon topical administration to the rabbit eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **50**(2):771-8.
- Furutani M**, Trudeau MC, Hagiwara N, Seki A, Gong Q, Zhou Z, Imamura S, Nagashima H, Kasanuki H, Takao A, Momma K, January CT, Robertson GA, Matsuoka R (1999). Novel mechanism associated with an inherited cardiac arrhythmia: defective protein trafficking by the mutant HERG (G601S) potassium channel. *Circulation.* **99**(17):2290-4.
- Gelsthorpe ME**, Baumann N, Millard E, Gale SE, Langmade SJ, Schaffer JE, Ory DS (2008). Niemann-Pick type C1 I1061T mutant encodes a functional protein that is selected for endoplasmic reticulum-associated degradation due to protein misfolding. *J Biol Chem.* **283**(13):8229-36.
- Genead MA**, Fishman GA, Rha J, Dubis AM, Bonci DM, Dubra A, Stone EM, Neitz M, Carroll J (2011). Photoreceptor structure and function in patients with congenital achromatopsia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **52**(10):7298-308.
- George SE**, Schaeffer MT, Cully D, Beer MS, McAllister G (2000). A high-throughput glow-type aequorin assay for measuring receptor-mediated changes in intracellular calcium levels. *Anal Biochem.* **286**(2):231-7.
- Gerstner A**, Zong X, Hofmann F, Biel M (2000). Molecular cloning and functional characterization of a new modulatory cyclic nucleotide-gated channel subunit from mouse retina. *J Neurosci.* **20**(4):1324-32.
- Goto-Omoto S**, Havashi T, Gekka T, Kubo A, Takeuchi T, Kitahara K (2006). Compound heterozygous CNGA3 mutations (R436W, L633P) in a Japanese patient with congenital achromatopsia. *Vis Neurosci.* **23**(3-4)395-402.
- Grau T**, Artemyev NO, Rosenberg T, Dollfus H, Haugen OH, Cumhuri Sener E, Jurklics B, Andreasson S, Kernstock C, Larsen M, Zrenner E, Wissinger B, Kohl S (2011). Decreased catalytic activity and altered activation properties of PDE6C mutants associated with autosomal recessive achromatopsia. *Hum Mol Genet.* **20**(4):719-30.
- Greenberg JP**, Sherman J, Zweifel SA, Chen RW, Duncker T, Kohl S, Baumann B, Wissinger B, Yannuzzi LA, Tsang SH (2014). Spectral-domain optical coherence tomography staging and autofluorescence imaging in achromatopsia. *JAMA Ophthalmol.* **132**(4):437-45.
- Haynes LW und Stotz SC** (1997). Modulation of rod, but not cone, cGMP-gated photoreceptor channels by calcium-calmodulin. *Vis Neurosci.* **14**(2):233-9.
- Hildebrand GD und Fielder AR** (2011). Anatomy and physiology of the retina. In: Reynolds JD und Olitsky SE (Hrsg.) *Pediatric Retina*. Erste Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg, 39-65.
- Hirsh AJ**, Sabater JR, Zamurs A, Smith RT, Paradiso AM, Hopkins S, Abraham WM, Boucher RC (2004). Evaluation of second generation amiloride analogs as therapy for cystic fibrosis lung disease. *J Pharmacol Exp Ther.* **311**(3):929-38.
- Hofmann F**, Biel M, Kaupp UB, International Union of Pharmacology (2003). International Union of Pharmacology. XLII. Compendium of voltage-gated ion channels: cyclic nucleotide-modulated channels. *Pharmacol Rev.* **55**(4):587-9.
- Howard M**, Fischer H, Roux J, Santos BC, Gullans SR, Yancey PH, Welch WJ (2003). Mammalian osmolytes and S-nitrosoglutathione promote Delta F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) protein maturation and function. *J Biol Chem.* **278**(37):35159-67.
- Howard MT**, Anderson CB, Fass U, Khatri S, Gesteland RF, Atkins JF, Flanigan KM (2004). Readthrough of dystrophin stop codon mutations induced by aminoglycosides. *Ann Neurol.* **55**(3):422-6.

- Huang L**, Zhang Q, Li S, Guan L, Xiao X, Zhang J, Jia X, Sun W, Zhu Z, Gao Y, Yin Y, Wang P, Guo X, Wang J, Zhang Q (2013). Exome sequencing of 47 Chinese families with cone-rod dystrophy: mutations in 25 known causative genes. *PLoS One*. **8**(6):e65546.
- Huang L**, Kondo F, Gosho M, Feng GG, Harato M, Xia ZY, Ishikawa N, Fujiwara Y, Okada S (2014). Enhanced expression of WD repeat-containing protein 35 via CaMKK/AMPK activation in bupivacaine-treated Neuro2a cells. *PLoS One*. **9**(5):e98185.
- Illing ME**, Rajan RS, Bence NF, Kopito RR (2002). A rhodopsin mutant linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa is prone to aggregate and interacts with the ubiquitin proteasome system. *J Biol Chem*. **277**(37):34150-60.
- Invergo BM**, Montanucci L, Koch KW, Bertranpetit J, Dell'orco D (2013). Exploring the rate-limiting steps in visual phototransduction recovery by bottom-up kinetic modeling. *Cell Commun Signal*. **11**(1):36.
- Iversen PW**, Beck B, Chen YF, Dere W, Devanarayan V, Eastwood BJ, Farmen MW, Iturria SJ, Montrose C, Moore RA, Weidner JR, Sittampalam GS. HTS Assay Validation. 2012 May 1 [Updated 2012 Oct 1]. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, et al., (Hrsg.). Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004-.
- Jackman SL**, Babai N, Chambers JJ, Thoreson WB, Kramer RH (2011). A positive feedback synapse from retinal horizontal cells to cone photoreceptors. *PLoS Biol*. **9**(5):e1001057.
- Janoria KG**, Gunda S, Boddu SH, Mitra AK (2007). Novel approaches to retinal drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. **4**(4):371-88.
- Jiang C**, Fang SL, Xiao YF, O'Connor SP, Nadler SG, Lee DW, Jefferson DM, Kaplan JM, Smith AE, Cheng SH (1998). Partial restoration of cAMP-stimulated CFTR chloride channel activity in DeltaF508 cells by deoxyspergualin. *Am J Physiol*. **275**(1 Pt 1):C171-8.
- Jin Q**, Chen X, Smith WM, Ideker RE, Huang J (2008). Effects of procainamide and sotalol on restitution properties, dispersion of refractoriness, and ventricular fibrillation activation patterns in pigs. *J Cardiovasc Electrophysiol*. **19**(10):1090-7.
- Johnson JP Jr und Zagotta WN** (2001). Rotational movement during cyclic nucleotide-gated channel opening. *Nature*. **412**(6850):917-21.
- Johnson S**, Michaelides M, Aligianis IA, Ainsworth JR, Mollon JD, Maher ER, Moore AT, Hunt DM (2004). Achromatopsia caused by novel mutations in both CNGA3 and CNGB3. *J Med Genet*. **41**(2):e20.
- Joselevitch C** (2008). Human retinal circuitry and physiology. *Psy. & Neurosci*. **1**(2):141-65.
- Kamiya K**, Niwa R, Mitcheson JS, Sanguinetti MC (2006). Molecular determinants of HERG channel block. *Mol Pharmacol*. **69**(5):1709-16.
- Kaupp UB und Seifert R** (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev*. **82**(3):769-824.
- Kawamura S**, Kuwata O, Yamada M, Matsuda S, Hisatomi O, Tokunaga F (1996). Photoreceptor protein s26, a cone homologue of S-modulin in frog retina. *J Biol Chem*. **271**(35):21359-64.
- Kawamura S und Tachibanaki S** (2008). Rod and cone photoreceptors: molecular basis of the difference in their physiology. *Comp. Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. **150**(4):369-77.
- Kawasaki T**, Kawasaki C, Ogata M, Shigematsu A (2004). The effect of local anesthetics on monocyte mCD14 and human leukocyte antigen-DR expression. *Anesth Analg*. **98**(4):1024-9.
- Kellner U**, Wissinger B, Kohl S, Kraus H, Foerster MH (2004). Molecular genetic findings in patients with congenital cone dysfunction. Mutations in the CNGA3, CNGB3, or GNAT2 genes. *Ophthalmologie*. **101**(8):830-5.

LITERATURVERZEICHNIS

- Kelly O**, Lin C, Ramkumar M, Saxena NC, Kleyman TR, Eaton DC (2003). Characterization of an amiloride binding region in the alpha-subunit of ENaC. *Am J Physiol Renal Physiol.* **285**(6):F1279-90.
- Kendall JM und Badminton MN** (1998). Aequorin Victoria bioluminescence moves into an exciting new era. *Trends Biotechnol.* **16**(5):216-24.
- Kim KS**, Suh GJ, Kwon YQ, Lee HJ, Jeong KY, Jung SK, Kwak YH (2013). The effect of glutamine on cerebral ischaemic injury after cardiac arrest. *Resuscitation* **84**(9):1285-90.
- Kleene SJ** (2000). Spontaneous gating of olfactory cyclic-nucleotide-gated channels. *J Membr Biol.* **178**(1):49-54.
- Koeppen BM und Stanton BA** (2009). *Berne & Levy Physiology, Updated Edition, 6th edition.* Philadelphia: Mosby Elsevier.
- Koeppen K**, Reuter P, Kohl S, Baumann B, Ladewig T, Wissinger B (2008). Functional analysis of human CNGA3 mutations associated with colour blindness suggests impaired surface expression of channel mutants A3(R427C) and A3(R563C). *Eur J Neurosci.* **27**(9):2391-401.
- Koeppen K**, Reuter P, Ladewig T, Kohl S, Baumann B, Jacobson SG, Plomp AS, Hamel CP, Janecke AR, Wissinger B (2010). Dissecting the pathogenic mechanism of mutations in the pore region of the human cone photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel. *Hum Mutat.* **31**(7):830-9.
- Kohl S**, Marx T, Giddings I, Jägle H, Jacobson SG, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Sharpe LT, Wissinger B (1998). Total colour blindness is caused by mutations in the gene encoding the alpha-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated cation channel. *Nat Genet.* **19**(3):257-9.
- Kohl S**, Baumann B, Broghammer M, Jägle H, Sieving P, Kellner U, Spegal R, Anastasi M, Zrenner E, Sharpe LT, Wissinger B (2000). Mutations in the CNGB3 gene encoding the beta-subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated channel are responsible for achromatopsia (ACHM3) linked to chromosome 8q21. *Hum Mol Genet.* **9**(14):2107-16.
- Kohl S**, Baumann B, Rosenberg T, Kellner U, Lorenz B, Vadalà M, Jacobson SG, Wissinger B (2002). Mutations in the cone photoreceptor G-protein alpha-subunit gene GNAT2 in patients with achromatopsia. *Am J Hum Genet.* **71**(2):422-5.
- Kohl S**, Varsanyi B, Antunes GA, Baumann B, Hoyng CB, Jägle H, Rosenberg T, Kellner U, Lorenz B, Salati R, Jurklics B, Farkas A, Andreasson S, Weleber RG, Jacobson SG, Rudolph G, Castellan C, Dollfus H, Legius E, Anastasi M, Bitoun P, Lev D, Sieving PA, Munier FL, Zrenner E, Sharpe LT, Cremers FP, Wissinger B (2005). CNGB3 mutations account for 50% of all cases with autosomal recessive achromatopsia. *Eur J Hum Genet.* **13**(3):302-8.
- Kohl S**, Coppieters F, Meire F, Schaich S, Roosing S, Brennenstuhl C, Bolz S, van Genderen MM, Riemslag FC, European Retinal Disease Consortium, Lukowski R, den Hollander AI, Cremers FP, De Baere E, Hoyng CB, Wissinger B (2012). A nonsense mutation in PDE6H causes autosomal-recessive incomplete achromatopsia. *Am J Hum Genet.* **91**(3):527-32.
- Kohl S**, Zobor D, Chiang WC, Weisschuh N, Staller J, Menendez IG, Chang S, Beck SC, Garcia Garrido M, Sothilingam V, Seeliger MW, Stanzial F, Benedicenti F, Inzana F, Héon E, Vincent A, Beis J, Strom TM, Rudolph G, Roosing S, Hollander AI, Cremers FP, Lopez I, Ren H, Moore AT, Webster AR, Michaelides M, Koenekoop RK, Zrenner E, Kaufman RJ, Tsang SH, Wissinger B, Lin JH (2015). Mutations in the unfolded protein response regulator ATF6 cause the cone dysfunction disorder achromatopsia. *Nat Genet.* **47**(7):757-65.
- Konno Y und Degawa M** (2004). Gene activations of CYP2B1 and CYP3A1 by dihydropyridine calcium channel antagonists in the rat liver: the structure-activity relationship. *Biol Pharm Bull.* **27**(6):903-5.
- Krebs MP**, Holden DC, Joshi P, Clark CL 3rd, Lee AH, Kaushal S (2010). Molecular mechanisms of rhodopsin retinitis pigmentosa and the efficacy of pharmacological rescue. *J Mol Biol.* **395**(5):1063-78.

- Kuga T**, Sadoshima J, Tomoike H, Kanaide H, Akaike N, Nakamura M (1990). Actions of Ca²⁺ antagonists on two types of Ca²⁺ channels in rat aorta smooth muscle cells in primary culture. *Circ Res.* **67**(2):469-80.
- Lacinová L** (2005). Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys.* **24** Suppl 1:1-78.
- LaConte LE**, Chavan V, Mukherjee K (2014). Identification and glycerol-induced correction of misfolding mutations in the X-linked mental retardation gene CASK. *PLoS One.* **9**(2):e88276.
- Le Poul E**, Hisada S, Mizuguchi Y, Dupriez VJ, Burgeon E, Detheux M (2002). Adaptation of aequorin functional assay to high throughput screening. *J Biomol Screen.* **7**(1):57-65.
- Le Saux O**, Fülöp K, Yamaguchi Y, Iliás A, Szabó Z, Brampton CN, Pomozi V, Huszár K, Arányi T, Váradi A (2011). Expression and in vivo rescue of human ABCC6 disease-causing mutants in mouse liver. *PLoS One.* **6**(9):e24738.
- Leandro P**, Lechner MC, Tavares de Almeida I, Konecki D (2001). Glycerol increases the yield and activity of human phenylalanine hydroxylase mutant enzymes produced in a prokaryotic expression system. *Mol Genet Metab.* **73**(2):173-8.
- Leandro P und Gomes CM** (2008). Protein misfolding in conformational disorders: rescue of folding defects and chemical chaperoning. *Mini Rev Med Chem.* **8**(9):901-11.
- Lee S und Tsai FT** (2005). Molecular chaperones in protein quality control. *J Biochem Mol Biol.* **38**(3):259-65.
- Lee WC**, Kang D, Causevic E, Herdt AR, Eckman EA, Eckman CB (2010). Molecular characterization of mutations that cause globoid cell leukodystrophy and pharmacological rescue using small molecule chemical chaperones. *J Neurosci.* **30**(16):5489-97.
- Leidenheimer NJ und Ryder KG** (2014). Pharmacological chaperoning: a primer on mechanism and pharmacology. *Pharmacol Res.* **83**:10-9.
- Leinders-Zufall T**, Cockerham RE, Michalakis S, Biel M, Garbers DL, Reed RR, Zufall F, Munger SD (2007). Contribution of the receptor guanylyl cyclase GC-D to chemosensory function in the olfactory epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA.* **104**(36):14507-12.
- Li S**, Huang L, Xiao X, Jia X, Guo X, Zhang Q (2014). Identification of CNGA3 mutations in 46 families: common cause of achromatopsia and cone-rod dystrophies in Chinese patients. *JAMA Ophthalmol.* **132**(9):1076-83.
- Lieberman RL**, D'aquino JA, Ringe D, Petsko GA (2009). Effects of pH and iminosugar pharmacological chaperones on lysosomal glycosidase structure and stability. *Biochemistry.* **48**(22):4816-27.
- Lin S**, Wang Z, Fedida D (2001). Influence of permeating ions on Kv1.5 channel block by nifedipine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **280**(3):H1160-72.
- Liu C und Varnum MD** (2005). Functional consequences of progressive cone dystrophy-associated mutations in the human cone photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel CNGA3 subunit. *Am J Physiol Cell Physiol.* **289**(1):C187-98.
- Liu C**, Sherpa T, Varnum MD (2013). Disease-associated mutations in CNGB3 promote cytotoxicity in photoreceptor-derived cells. *Mol Vis.* **19**:1268-81.
- Liu W**, Okochi H, Benet LZ, Zhai SD (2012). Sotalol permeability in cultured-cell, rat intestine, and PAMPA system. *Pharm Res.* **29**(7):1768-74.
- Loo TW**, Bartlett MC, Clarke DM (2008). Correctors promote folding of the CFTR in the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* **413**(1):29-36.

LITERATURVERZEICHNIS

- Lu M**, Echeverri F, Kalabat D, Laita B, Dahan DS, Smith RD, Xu H, Staszewski L, Yamamoto J, Ling J, Hwang N, Kimmich R, Li P, Patron E, Keung W, Patron A, Moyer BD (2008). Small molecule activator of the human epithelial sodium channel. *J Biol Chem.* **283**(18):11981-94.
- Majtan T**, Lui L, Carpenter JF, Kraus JP (2010). Rescue of cystathionine beta-synthase (CBS) mutants with chemical chaperones: purification and characterization of eight CBS mutant enzymes. *J Biol Chem.* **285**(21):15866-73.
- Makino CL**, Dodd RL, Chen J, Burns ME, Roca A, Simon MI, Baylor DA (2004). Recoverin regulates light-dependent phosphodiesterase activity in retinal rods. *J Gen Physiol.* **123**(6):729-41.
- Malkia A**, Pertusa M, Fernández-Ballester G, Ferrer-Montiel A, Viana F (2009). Differential role of the menthol-binding residue Y745 in the antagonism of thermally gated TRPM8 channels. *Mol Pain.* **5**:62.
- Manuvakhova M**, Keeling K, Bedwell DM (2000). Aminoglycoside antibiotics mediate context-dependent suppression of termination codons in a mammalian translation system. *RNA* **6**(7):1044-55.
- Mao H**, Lu X, Karush JM, Huang X, Yang X, Ba Y, Wang Y, Liu N, Zhou J, Lian J (2013). Pharmacologic approach to defective protein trafficking in the E637K-hERG mutant with PD-118057 and Thapsigargin. *PLoS One.* **8**(6):e65481.
- Maroto R**, Raso A, Wood TG, Kurosky A, Martinac B, Hamill OP (2005). TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells. *Nat Cell Biol.* **7**(2):179-85.
- Masland RH (2001)**. The fundamental plan of the retina. *Nat. Neurosci.* **4**(9):877-86.
- Mason RP**, Campbell SF, Wang SD, Herbette LG (1989). Comparison of location and binding for the positively charged 1,4-dihydropyridine calcium channel antagonist amlodipine with uncharged drugs of this class in cardiac membranes. *Mol Pharmacol.* **36**(4):634-40.
- Mates JM**, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I, Asenjo M, Marquez J (2002). Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *Int J Biochem Cell Biol.* **34**(5):439-58.
- Matsubara M und Hasegawa K** (2004). Effects of benidipine, a dihydropyridine-Ca²⁺ channel blocker, on expression of cytokine-induced adhesion molecules and chemoattractants in human aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* **498**(1-3):303-14.
- Matveev AV**, Fitzgerald JB, Xu J, Malykhina AP, Rodgers KK, Ding XQ (2010). The disease-causing mutations in the carboxyl terminus of the cone cyclic nucleotide-gated channel CNGA3 subunit alter the local secondary structure and interfere with the channel active conformational change. *Biochemistry.* **49**(8):1628-39.
- McCarthy RT und Fry HK** (1988). Nitrendipine block of calcium channel currents in vascular smooth muscle and adrenal glomerulosa cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* **12** Suppl 4:S98-101.
- McLatchie LM und Matthews HR** (1994). The effect of pH on the block by L-cis-diltiazem and amiloride of the cyclic GMP-activated conductance of salamander rods. *Proc Biol Sci.* **255**(1344):231-6.
- Meighan PC**, Meighan SE, Rich ED, Brown RL, Varnum MD (2012). Matrix metalloproteinase-9 and -2 enhance the ligand sensitivity of photoreceptor cyclic nucleotide-gated channels. *Channels (Austin).* **6**(3):181-96.
- Meighan SE**, Meighan PC, Rich ED, Brown RL, Varnum MD (2013). Cyclic nucleotide-gated channel subunit glycosylation regulates matrix metalloproteinase-dependent changes in channel gating. *Biochemistry.* **52**(46):8352-62.

- Menon V**, Ranganathn A, Jorgensen VH, Sabio M, Christoffersen CT, Uberti MA, Jones KA, Babu PS (2008). Development of an aequorin luminescence calcium assay for high-throughput screening using a plate reader, the LumiLux. *Assay Drug Dev Technol.* **6**(6):787-93.
- Mesa-Torres N**, Fabelo-Rosa I, Riverol D, Yunta C, Albert A, Salido E, Pey AL (2013). The role of protein denaturation energetics and molecular chaperones in the aggregation and mistargeting of mutants causing primary hyperoxaluria type I. *PLoS One.* **8**(8):e71963.
- Michaelides M**, Aligianis IA, Ainswoth JR, Good P, Mollon JD, Maher ER, Moore AT, Hunt DM (2004). Progressive cone dystrophy associated with mutation in CNGB3. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **45**(6):1975-82.
- Michalakakis S**, Geiger H, Haverkamp S, Hofmann F, Gerstner A, Biel M (2005). Impaired opsin targeting and cone photoreceptor migration in the retina of mice lacking the cyclic nucleotide-gated channel CNGA3. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **46**(4):1516-24.
- Milhem RM**, Ben-Salem S, Al-Gazali L, Ali BR (2014). Identification of the cellular mechanisms that modulate trafficking of frizzled family receptor 4 (FZD4) missense mutants associated with familial exudative vitreoretinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **55**(6):3423-31.
- Mitcheson JS**, Chen J, Lin M, Culberson C, Sanguinetti MC (2000). A structural basis for drug-induced long QT syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**(22):12329-33.
- Molday RS**, Molday LL, Dosé A, Clark-Lewis I, Illing M, Cook NJ, Eismann E, Kaupp UB (1991). The cGMP-gated channel of the rod photoreceptor cell characterization and orientation of the amino terminus. *J Biol Chem.* **266**(32):21917-22.
- Moran O und Zegarra-Moran O** (2008). On the measurement of the functional properties of the CFTR. *J Cyst Fibros.* **7**(6):483-94.
- Moyer BD**, Loffing-Cueni D, Loffing J, Reynolds D, Stanton BA (1999). Butyrate increases apical membrane CFTR but reduces chloride secretion in MDCK cells. *Am J Physiol.* **277**(2 Pt 2):F271-6.
- Mulhern ML**, Madson CJ, Kador PF, Randazzo, J, Shinohara T (2007). Cellular osmolytes reduce lens epithelial cell death and alleviate cataract formation in galactosemic rats. *Mol Vis.* **13**:1397-405.
- Müller F**, Vantler M, Weitz D, Eismann E, Zoche M, Koch KW, Kaupp UB (2001). Ligand sensitivity of the 2 subunit from the bovine cone cGMP-gated channel is modulated by protein kinase C but not by calmodulin. *J Physiol.* **532**(Pt 2):399-409.
- Muraki-Oda S**, Toyoda F, Okada A, Tanabe S, Yamada S, Ueyama H, Matsuura H, Ohji M (2007). Functional analysis of rod monochromacy-associated missense mutations in the CNGA3 subunit of the cone photoreceptor cGMP-gated channel. *Biochem Biophys Res Commun.* **362**(1):88-93.
- Murray LS**, Lu Y, Taggart A, Van Regemorter N, Vilain C, Abramowicz M, Kadler KE, Wan Agtmael T (2014). Chemical chaperone treatment reduces intracellular accumulation of mutant collagen IV and ameliorates the cellular phenotype of a COL4A2 mutation that causes haemorrhagic stroke. *Hum Mol Genet.* **23**(2):283-92.
- Naik S**, Zhang N, Gao P, Fisher MT (2012). On the design of broad based screening assays to identify potential pharmacological chaperones of protein misfolding diseases. *Curr Top Med Chem.* **12**(22):2504-22.
- Nakatsukasa K und Brodsky JL (2008)**. The recognition and retrotranslocation of misfolded proteins from the endoplasmic reticulum. *Traffic.* **9**(6):861-70.
- Narayan G und Mandal SN** (2012). Vasopressin receptor antagonists and their role in clinical medicine. *Indian J Endocrinol Metab.* **15**(2):183-91.
- Nau C**, Wang SY, Wang GK (2003). Point mutations at L1280 in Nav1.4 channel D3-S6 modulate binding affinity and stereoselectivity of bupivacaine enantiomers. *Mol Pharmacol.* **63**(6):1398-406.

LITERATURVERZEICHNIS

- Nicol GD** (1993). The calcium channel antagonist, pimozide, blocks the cyclic GMP-activated current in rod photoreceptors. *J Pharmacol Exp Ther.* **265**(2):626-32.
- Nishiguchi KM**, Sandberg MA, Gorji N, Berson EL, Dryja TP (2005). Cone cGMP-gated channel mutations and clinical findings in patients with achromatopsia, macular degeneration, and other hereditary cone diseases. *Hum Mutat.* **25**(3):248-58.
- Noorwez SM**, Kuksa V, Imanishi Y, Zhu L, Filipek S, Palczewski K, Kaushal S (2003). Pharmacological chaperone-mediated in vivo folding and stabilization of the P23H-opsin mutant associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *J Biol Chem.* **278**(16):14442-50.
- Noorwez SM**, Malhotra R, McDowell JH, Smith KA, Krebs MP, Kaushal S (2004). Retinoids assist the cellular folding of the autosomal dominant retinitis pigmentosa opsin mutant P23H. *J Biol Chem.* **279**(16):16278-84.
- Ohgane K**, Dodo K, Hashimoto Y (2010). Retinobenzaldehydes as proper-trafficking inducers of folding-defective P23H rhodopsin mutant responsible for retinitis pigmentosa. *Bioorg Med Chem.* **18**(19):7022-8.
- Okada A**, Ueyama H, Toyoda F, Oda S, Ding WG, Tanabe S, Yamade S, Matsuura H, Ohkubo I, Kani K (2004). Functional role of hCngb3 in regulation of human cone cng channel: effect of rod monochromacy-associated mutations in hCNGB3 on channel function. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **45**(7):2324-32.
- Orhan E**, Prézéau L, El Shamieh S, Bujakowska KM, Michiels C, Zagar Y, Vol C, Bhattacharya SS, Sahel JA, Sennlaub F, Audo I, Zeitz C (2013). Further insights into GPR179: expression, localization, and associated pathogenic mechanisms leading to complete congenital stationary night blindness. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **54**(13):8041-50.
- Palczewski K** (2012). Chemistry and biology of vision. *J. Biol. Chem.* **187**(3):1612-9.
- Pang JJ**, Alexander J, Lei B, Deng W, Zhang K, Li Q, Chang B, Hauswirth WW (2010). Achromatopsia as a potential candidate for gene therapy. *Adv Exp Med Biol.* **664**:639-46.
- Pang JJ**, Deng WT, Dai X, Lei B, Everhart D, Umino Y, Li J, Zhang K, Mao S, Boye SL, Liu L, Chiodo VA, Liu X, Shi W, Tao Y, Chang B, Hauswirth WW (2012). AAV-mediated cone rescue in a naturally occurring mouse model of CNGA3-achromatopsia. *PLoS One.* **7**(4):e35250.
- Parenti G** (2009). Treating lysosomal storage diseases with pharmacological chaperones: from concepts to clinics. *EMBO Mol Med.* **1**(5):268-79.
- Parker R**, Wang JS, Kefalov VJ, Crouch RK (2011). Interphotoreceptor retinoid-binding protein as the physiologically relevant carrier of 11-cis-retinol in the cone visual cycle. *J Neurosci.* **31**(12):4714-9.
- Patel KA**, Bartoli KM, Fandino RA, Ngatchou AN, Woch G, Carey J, Tanaka JC (2005). Transmembrane S1 mutations in CNGA3 from achromatopsia 2 patients cause loss of function and impaired cellular trafficking of the cone CNG channel. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **46**(7):2282-90.
- Pedemonte N**, Diena T, Caci E, Nieddu E, Mazzei M, Ravazzolo R, Zegarra-Moran O, Galiotta LJ (2005). Antihypertensive 1,4-dihydropyridines as correctors of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel gating defect caused by cystic fibrosis mutations. *Mol Pharmacol.* **68**(8):1736-46.
- Pedemonte N**, Boido D, Moran O, Giampieri M, Mazzei M, Ravazzolo R, Galiotta LJ (2007). Structure-activity relationship of 1,4-dihydropyridines as potentiators of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channel. *Mol Pharmacol.* **72**(1):197-207.
- Pelucchi B**, Grimaldi A, Moriondo A (2008). Vertebrate rod photoreceptors express both BK and IK calcium-activated potassium channels, but only BK channels are involved in receptor potential regulation. *J Neurosci Res.* **86**(1):194-201.

- Peng C**, Rich ED, Varnum MD (2003). Achromatopsia-associated mutation in the human cone photoreceptor cyclic nucleotide-gated channel CNGB3 subunit alters the ligand sensitivity and pore properties of heteromeric channels. *J Biol Chem.* **278**(36):34533-40.
- Perlmutter DH** (2002). Chemical chaperones: a pharmacological strategy for disorders of protein folding and trafficking. *Pediatr Res.* **52**(6):832-6.
- Pey AL**, Maggi M, Valentini G (2014). Insights into human phosphoglycerate kinase 1 deficiency as a conformational disease from biochemical, biophysical, and in vitro expression analyses. *J Inherit Metab Dis.* **37**(6):909-16.
- Picones A und Korenbrot JI** (1992). Permeation and interaction of monovalent cations with the cGMP-gated channel of cone photoreceptors. *J Gen Physiol.* **100**(4):647-73.
- Pinotti M**, Rizzotto L, Pinton P, Ferraresi P, Chuansumrit A, Charoenkwan P, Marchetti G, Rizzuto R, Mariani G, Bernardi F; International Factor VII Deficiency Study Group (2006). Intracellular readthrough of nonsense mutations by aminoglycosides in coagulation factor VII. *J Thromb Haemost.* **4**(6):1308-14.
- Pomozi V**, Brampton C, Fülöp K, Chen LH, Apana A, Li Q, Uitto J, Le Saux O, Váradi A (2014). Analysis of pseudoxanthoma elasticum-causing missense mutants of ABCC6 in vivo; pharmacological correction of the mislocalized proteins. *J Invest Dermatol.* **134**(4):946-53.
- Porto C**, Ferrara MC, Meli M, Acampora E, Avolio V, Rosa M, Cobucci-Ponzano B, Colombo G, Moracci M, Andria G, Parenti G (2012). Pharmacological enhancement of α -glucosidase by the allosteric chaperone N-acetylcysteine. *Mol Ther.* **20**(12):2201-11.
- Protasevich I**, Yang Z, Wang C, Atwell S, Zhao X, Emtage S, Wetmore D, Hunt JF, Brouillette CG (2010). Thermal unfolding studies show the disease causing F508del mutation in CFTR thermodynamically destabilizes nucleotide-binding domain 1. *Protein Sci.* **19**(10):1917-31.
- Ramsey BW**, Davies J, McElvaney NG, Tullis E, Bell SC, Dřevínek P, Griese M, McKone EF, Wainwright CE, Konstan MW, Moss R, Ratjen F, Sermet-Gaudelus I, Rowe SM, Dong Q, Rodriguez S, Yen K, Ordoñez C, Elborn JS; VX08-770-102 Study Group (2011). A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med.* **365**(18):1663-72.
- Rebrik TI**, Botchkina I, Arshavsky VY, Craft CM, Korenbrot JI (2012). CNG-modulin: a novel Ca-dependent modulator of ligand sensitivity in cone photoreceptor cGMP-gated ion channels. *J Neurosci.* **32**(9):3142-53.
- Reichenbach A und Bringmann A** (2013). New functions of Müller cells. *Glia.* **61**(5):651-78.
- Reicher S**, Seroussi E, Gootwine E (2010). A mutation in gene CNGA3 is associated with day blindness in sheep. *Genomics.* **95**(2):101-4.
- Reisert J und Bradley J** (2005). Activation of olfactory cyclic nucleotide-gated channels revisited. *J Physiol.* **569**(Pt 1):4-5.
- Ren HY**, Grove DE, De La Rosa O, Houck SA, Sopha P, Van Goor F, Hoffman BJ, Cyr DM (2013). VX-809 corrects folding defects in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein through action on membrane-spanning domain 1. *Mol Biol Cell.* **24**(19):3016-24.
- Reuter P**, Koeppen K, Ladewig T, Kohl S, Baumann B, Wissinger B, Achromatopsia Clinical Study Group (2008). Mutations in CNGA3 impair trafficking or function of cone cyclic nucleotide-gated channels, resulting in achromatopsia. *Hum Mutat.* **29**(10):1228-36.
- Rich TC und Karpen JW** (2005). High-throughput screening of phosphodiesterase activity in living cells. *Methods Mol Biol.* **307**:45-61.

LITERATURVERZEICHNIS

- Robert R**, Carlile GW, Pavel C, Liu N, Anjos SM, Liao J, Luo Y, Zhang D, Thomas DY, Hanrahan JW (2008). Structural analog of sildenafil identified as a novel corrector of the F508del-CFTR trafficking defect. *Mol Pharmacol.* **73**(2):478-89.
- Robitaille J**, MacDonald ML, Kaykas A, Sheldahl LC, Zeisler J, Dubé MP, Zhang LH, Singaraja RR, Guernsey DL, Zheng B, Siebert LF, Hoskin-Mott A, Trese MT, Pimstone SN, Shastry BS, Moon RT, Hayden MR, Goldberg YP, Samuels ME (2002). Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy. *Nat Genet.* **32**(2):326-30.
- Rojas CV**, Maria LS, Santos JL, Cortés F, Alliende MA (2002). A frameshift insertion in the cone cyclic nucleotide-gated cation channel causes complete achromatopsia in a consanguineous family from a rural isolate. *Eur J Hum Genet.* **10**(10):638-42.
- Rosenbaum T**, Gordon-Shaaq A, Islas LD, Cooper J, Munari M, Gordon SE (2004). State-dependent block of CNG-channels by dequalinium. *J Gen Physiol.* **123**(3):295-304.
- Rosenthal J** (1994). Nilvadipine: profile of a new calcium antagonist. An overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* **24** Suppl 2:S92-107.
- Roth SD**, Scchüttrumpf J, Milanov P, Abriss D, Ungerer C, Quade-Lyssa P, Simpson JC, Pepperkok R, Seifried E, Tonn T (2012). Chemical chaperones improve protein secretion and rescue mutant factor VIII in mice with hemophilia A. *PLoS One.* **7**(9):e445005.
- Rubenstein RC und Zeitlin PL** (2000). Sodium 4-phenylbutyrate downregulates Hsc70: implications for intracellular trafficking of DeltaF508-CFTR. *Am J Physiol Cell Physiol.* **278**(2):C259-67.
- Ruiz ML und Karpen JW** (1997). Single cyclic nucleotide-gated channels locked in different ligand-bound states. *Nature.* **389**(6649):389-92.
- Saibil HR** (2008). Chaperone machines in action. *Curr Opin Struct Biol.* **18**(1):35-42.
- Saliba RS**, Munro PM, Luthert PJ, Cheetham ME (2002). The cellular fate of mutant rhodopsin: quality control, degradation and aggresome formation. *J Cell Sci.* **115**(Pt 14):2907-18.
- Sampson HM**, Lam H, Chen PC, Zhang D, Mottillo C, Mirza M, Qasim K, Shrier A, Shyng SL, Hanrahan JW, Thomas DY (2013). Compounds that correct F508del-CFTR trafficking can also correct other protein trafficking diseases: an in vitro study using cell lines. *Orphanet J Rare Dis.* **8**:11. doi: 10.1186/1750-1172-8-11.
- Sanders MM und Kon C** (1991). Glutamine is a powerful effector of heat shock protein expression in *Drosophila* Kc cells. *J Cell Physiol.* **146**(1): 180–190.
- Sanger F**, Nicklen S, Coulson AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **74**(12):5463-7.
- Sano R und Reed JC** (2013). ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* **1833**(12):3460-70.
- Saqib MA**, Awan BM, Sarfraz M, Khan MN, Rashid S, Ansar M (2011). Genetic analysis of four Pakistani families with achromatopsia and a novel S4 motif mutation of CNGA3. *Jpn J Ophthalmol.* **55**(6):676-80.
- Sato S**, Ward CL, Krouse ME; Wine JJ, Kopito RR (1996). Glycerol reverses the misfolding phenotype of the most common cystic fibrosis mutation. *J Biol Chem.* **271**(2):635-8.
- Sawkar AR**, Cheng WC, Beutler E, Wong CH, Balch WE, Kelly JW (2002). Chemical chaperones increase the cellular activity of N370S beta-glucosidase: a therapeutic strategy for Gaucher disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* **99**(24):15428-33.

- Sawkar AR**, Adamski-Werner SL, Cheng WC, Wong CH, Beutler E, Zimmer KP, Kelly JW (2005). Gaucher disease-associated glucocerebrosidases show mutation-dependent chemical chaperoning profiles. *Chem Biol.* **12**(11):1235-44.
- Schirmer EC**, Glover JR, Singer MA, Lundquist S (1996). HSP100/Clp proteins: a common mechanisms explains diverse functions. *Trends Biochem Sci.* **21**(8):289-96.
- Schmitz M**, Alfalah M, Aerts JM, Naim HY, Zimmer KP (2005). Impaired trafficking of mutants of lysosomal glucocerebrosidase in Gaucher's disease. *Int J Biochem Cell Biol.* **37**(11):2310-20.
- Schnetkamp PP** (1990). Cation selectivity of and cation binding to the cGMP-dependent channel in bovine rod outer segment membranes. *J Gen Physiol.* **96**(3):517-34.
- Schorpp K**, Rothenaigner I, Salmina E, Reinshagen J, Low T, Brenke JK, Gopalakrishnan J, Tetko IV, Gul S, Hadian K (2013). Identification of Small-Molecule Frequent Hitters from AlphaScreen High-Throughput Screens. *J Biomol Screen.* **19**(5):715-26.
- Selvakumar D**, Drescher MJ, Dowdall JR, Khan KM, Hatfield JS, Ramakrishnan NA, Drescher DG (2012). CNGA3 is expressed in inner ear hair cells and binds to an intracellular C-terminus domain of EMILIN1. *Biochem J.* **443**(2):463-76.
- Sermet-Gaudelus I**, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, Roussel D, Fritsch J, Hanssens L, Hirawat S, Miller NL, Constantine S, Reha A, Ajayi T, Elfring GL, Miller LL (2010). Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* **182**(10):1262-72.
- Serohijos AW**, Hegedus T, Aleksandrov AA, He L, Cui L, Dokholyan NV, Riordan JR (2008). Phenylalanine-508 mediates a cytoplasmic-membrane domain contact in the CFTR 3D structure crucial to assembly and channel function. *Proc Natl Acad Sci USA.* **105**(9):3256-61.
- Shamir MH**, Ofri R, Bor A, Brenner O, Reicher S, Obolensky A, Averbukh E, Banin E, Gootwine E (2010). A novel day blindness in sheep: epidemiological, behavioural, electrophysiological and histopathological studies. *Vet J.* **185**(2):130-7.
- Sharpe LT**, Stockman A, Jägle H, Nathans J (2001). Opsin genes, cone photopigments, color vision, and color blindness. In: Gegenfurtner KR und Sharpe LT (Hrsg.) *Color Vision: From Genes to Perception*. Erste Auflage Cambridge University Press, 3-52.
- Shuart NG**, Haitin Y, Camp SS, Black KD, Zagotta WN (2011). Molecular mechanism for 3:1 subunit stoichiometry of rod cyclic nucleotide-gated ion channels. *Nat Commun.* **2**:457.
- Sidjanin DJ**, Lowe JK, McElwee JL, Milne BS, Phippen TM, Sargan DR, Aguirre GD, Acland GM, Ostrander EA (2002). Canine CNGB3 mutations establish cone degeneration as orthologous to the human achromatopsia locus ACHM3. *Hum Mol Genet.* **11**(16):1823-33.
- Siekierska A**, De Baets G, Reumers J, Gallardo R, Rudyak S, Broersen K, Couceiro J, Van Durme J, Schymkowitz J, Rousseau F (2012). α -Galactosidase aggregation is a determinant of pharmacological chaperone efficacy on Fabry disease mutants. *J Biol Chem.* **287**(34):28386-97.
- Sigurdsson HH**, Konráethsdóttir F, Loftsson T, Stefánsson E (2007). Topical and systemic absorption in delivery of dexamethasone to the anterior and posterior segments of the eye. *Acta Ophthalmol Scand.* **85**(6):598-602.
- Skach WR** (2000). Defects in processing and trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Kidney Int.* **57**(3):825-31.
- Skopin A**, Shalygin A, Vigont V, Zimina O, Glushankova L, Mozhayeva GN, Kaznacheeva E (2013). TRPC1 protein forms only one type of native store-operated channels in HEK293 cells. *Biochimie.* **95**(2):347-53.

LITERATURVERZEICHNIS

Soheili T, Gicquel E, Poupiot J, N'Guyen L, Le Roy F, Bartoli M, Richard I (2012). Rescue of sarcoglycan mutations by inhibition of endoplasmic reticulum quality control is associated with minimal structural modifications. *Hum Mutat.* **33**(2):429-39.

Song Y, Buelow B, Perraud AL, Scharenberg AM (2008). Development and validation of a cell-based high-throughput screening assay for TRPM2 channel modulators. *J Biomol Screen.* **13**(1):54-61.

Stengel W, Jainz M, Andreas K (1998). Different potencies of dihydropyridine derivatives in blocking T-type but not L-type Ca²⁺ channels in neuroblastoma-glioma hybrid cells. *Eur J Pharmacol.* **342**(2-3):339-45.

Stern JH, Kaupp UB, MacLeish PR (1986). Control of the light-regulated current in rod photoreceptors by cyclic GMP, calcium, and l-cis-diltiazem. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **83**(4):1163-7.

Stieber J, Wieland K, Stöckl G, Ludwig A, Hofmann F (2006). Bradycardic and proarrhythmic properties of sinus node inhibitors. *Mol Pharmacol.* **69**(4):1328-37.

Sundaram V, Wilde C, Aboshiha J, Cowing J, Han C, Langlo CS, Chana R, Davidson AE, Sergouniotis PI, Bainbridge JW, Ali RR, Dubra A, Rubin G, Webster AR, Moore AT, Nardini M, Carroll J, Michaelides M (2014). Retinal structure and function in achromatopsia: implications for gene therapy. *Ophthalmology.* **121**(1):234-45.

Sundin OH, Yang JM, Li Y, Zhu D, Hurd JN, Mitchell TN, Silva ED, Maumenee IH (2000). Genetic basis of total colour blindness among the Pingelapese islanders. *Nat Genet.* **25**(3):289-93.

Sung CH und Chunag JZ (2010). The cell biology of vision. *J. Cell. Biol.* **190**(6):953-63.

Swiecki C, Whiteman SK, Dawson H, Zhao A, Shea-Donohue TS (2003). Enteral L-glutamine induced heat shock protein 72kDa (HSP-72) in diabetic rats in vivo. *Gastroenterology.* **124**(4):A815.

Tamarappoo BK und Verkman AS (1998). Defective aquaporin-2 trafficking in nephrogenic diabetes insipidus and correction by chemical chaperones. *J Clin Invest.* **101**(10):2257-67.

Tan K, Pogozeva ID, Yeo GS, Hadaschik D, Keogh JM, Haskell-Leuvano C, O'Rahilly S, Mosberg HI, Farooqi IS (2009). Functional characterization and structural modeling of obesity associated mutations in the melanocortin 4 receptor. *Endocrinology.* **150**(1):114-25.

Tang CY und Papazian DM (1997). Transfer of voltage independence from a rat olfactory channel to the *Drosophila* ether-à-go-go K⁺ channel. *J Gen Physiol.* **109**(3):301-11.

Thiadens AA, Slingerland NW, Roosing S, van Schooneveld MJ, van Lith-Verhoeven JJ, van Moll-Ramirez N, van den Born LI, Hoyng CB, Cremers FP, Klaver CC (2009). Genetic etiology and clinical consequence of complete and incomplete achromatopsia. *Ophthalmology.* **116**(10):1984-9.

Thiadens AA, Roosing S, Collin RW, van Moll-Ramirez N, van Lith-Verhoeven JJ, van Schooneveld MJ, den Hollander AI, van den Born LI, Hoyng CB, Cremers FP, Klaver CC (2010a). Comprehensive analysis of the achromatopsia genes CNGA3 and CNGB3 in progressive cone dystrophy. *Ophthalmology.* **117**(4):825-30.

Thiadens AA, Somervou V, van den Born LI, Roosing S, van Schooneveld MJ, Kuijpers RW, van Moll-Ramirez N, Cremers FP, Hoyng CB, Klaver CC (2010b). Progressive loss of cones in achromatopsia: an imaging study using spectral-domain optical coherence tomography. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **51**(11):5952-7.

Thiadens AA, Phan TM, Zekveld-Vroon RC, Leroy BP, van den Born LI, Hoyng CB, Klaver CC; Writing Committee for the Cone Disorders Study Group Consortium, Roosing S, Pott JW, van Schooneveld MJ, van Moll-Ramirez N, van Genderen MM, Boon CJ, den Hollander AI, Bergen AA, De Baere E, Cremers FP, Lotery AJ (2012). Clinical course, genetic etiology, and visual outcome in cone and cone-rod dystrophy. *Ophthalmology.* **119**(4):819-26.

- Thomas MG**, Kumar A, Kohl S, Proudlock FA, Gottlob I (2011). High-resolution in vivo imaging in achromatopsia. *Ophthalmology*. **118**(5):882-7.
- Thompson CH**, Porter JC, Kahlig KM, Daniels MA, George AL Jr. (2012). Nontruncating SCN1A mutations associated with severe myoclonic epilepsy of infancy impair cell surface expression. *J Biol Chem*. **287**(50):42001-8.
- Thorne N**, Auld DS, Inglese J (2010). Apparent activity in high-throughput screening: origins of compound-dependent assay interference. *Curr Opin Chem Biol*. **14**(3):315-24.
- Tikhonov DB und Zhorov BS** (2009). Structural model for dihydropyridine binding to L-type calcium channels. *J Biol Chem*. **284**(28):19006-17.
- Timpe LC**, Jin KL, Puelles L, Rubenstein JL (1999). Cyclic nucleotide-gated cation channel expression in embryonic chick brain. *Brain Res Mol Brain Res*. **66**(1-2):175-8.
- Tränkner D**, Jäggle H, Kohl S, Apfelstedt-Sylla E, Sharpe LT, Kaupp UB, Zrenner E, Seifert R, Wissinger B (2004). Molecular basis of an inherited form of incomplete achromatopsia. *J Neurosci*. **24**(1):138-47.
- Tropak MB**, Kornhaber GJ, Rigat BA, Maegawa GH, Buttner JD, Blanchard JE, Murphy C, Tuske SJ, Coales SJ, Hamuro Y, Brown ED, Mahuran DJ (2008). Identification of pharmacological chaperones for Gaucher disease and characterization of their effects on beta-glucocerebrosidase by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *Chembiochem*. **9**(16):2650-62.
- Trudeau MC und Zagotta WN** (2002). An intersubunit interaction regulates trafficking of rod cyclic nucleotide-gated channels and is disrupted in an inherited form of blindness. *Neuron*. **23**(2):197-207.
- Trudeau MC und Zagotta WN** (2003). Calcium/calmodulin modulation of olfactory and rod cyclic nucleotide-gated ion channels. *J Biol Chem*. **278**(21):18705-8.
- Trudeau MC und Zagotta WN** (2004). Dynamics of Ca²⁺-calmodulin-dependent inhibition of rod cyclic nucleotide-gated channels measured by patch-clamp fluorometry. *J Gen Physiol*. **124**(3):211-23.
- Ueda K**, Nakamura K, Hayashi T, Inagaki N, Takahashi M, Arimura T, Morita H, Higashiuesato Y, Hirano Y, Yasunami M, Takishita S, Yamashina A, Ohe T, Sunamori M, Hiraoka M, Kimura A (2004). Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J Biol Chem*. **279**(26):27194-8.
- Ungrin MD**, Singh LM, Stocco R, Sas DE, Abramovitz M (1999). An automated aequorin luminescence-based functional calcium assay for G-protein-coupled receptors. *Anal Biochem*. **272**(1):34-42.
- Valenzano KJ**, Khanna R, Powe AC, Boyd R, Lee G, Flanagan JJ, Benjamin ER (2011). Identification and characterization of pharmacological chaperones to correct enzyme deficiencies in lysosomal storage disorders. *Assay Drug Dev Technol*. **9**(3):213-35.
- Valenzuela C**, Delpón E, Franqueza L, Gay P, Pérez O, Tamargo J, Snyders DJ (1996). Class III antiarrhythmic effects of zatebradine. Time-, state-, use-, and voltage-dependent block of hKv1.5 channels. *Circulation*. **94**(3):562-70.
- Van Goor F**, Hadida S, Grootenhuis P (2008). Pharmacological rescue of mutant CFTR function for the treatment of cystic fibrosis. In: Fermini B und Priest BT (Hrsg.) Ion Channels. Erste Auflage Springer Verlag Berlin Heidelberg, 91-120.
- Van Goor F**, Hadida S, Grootenhuis PD, Burton B, Stack JH, Straley KS, Decker CJ, Miller M, McCartney J, Olson ER, Wine JJ, Frizzell RA, Ashlock M, Negulescu PA (2011). Correction of the F508del-CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Acad Sci USA*. **108**(46):18843-8.
- Varnum MD**, Black KD, Zagotta WN (1995). Molecular mechanism for ligand discrimination of cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron*. **15**(3):619-25.

LITERATURVERZEICHNIS

- Vasilyev DV**, Shan QJ, Lee YT, Soloveva V, Nawoschik SP, Kaftan EJ, Dunlop J, Mayer SC, Bowlby MR (2009). A novel high-throughput screening assay for HCN channel blocker using membrane potential-sensitive dye and FLIPR. *J Biomol Screen*. **14**(9):1119-28.
- Vedovato N und Rispoli G** (2007). Modulation of the reaction cycle of the Na⁺:Ca²⁺, K⁺ exchanger. *Eur Biophys J*. **36**(7):787-93.
- Versányi B**, Wissinger B, Kohl S, Koeppen K, Farkas A (2005). Clinical and genetic features of Hungarian achromatopsia patients. *Mol Vis*. **11**:996-1001.
- Vincent A**, Wright T, Billingsley G, Westall C, Héon E (2011). Oligocone trichromacy is part of the spectrum of CNGA3-related cone system disorders. *Ophthalmic Genet*. **32**(2):107-13.
- Wang B**, Bi M, Zhu Z, Wu L, Wang J (2014a). Effects of the antihypertensive drug benidipine on osteoblast function in vitro. *Exp Ther Med*. **7**(3):649-653.
- Wang I**, Khan NW, Branham K, Wissinger B, Kohl S, Heckenlively JR (2012). Establishing baseline rod electroretinogram values in achromatopsia and cone dystrophy. *Doc Ophthalmol*. **125**(3):229-33.
- Wang X**, Wang H, Cao M, Li Z, Chen X, Patenia C, Gore A, Abboud EB, Al-Rajhi AA, Lewis RA, Lupski JR, Mardon G, Zhang K, Muzny D, Gibbs RA, Chen R (2011). Whole-exome sequencing identifies ALMS1, IQCB1, CNGA3, and MYO7A mutations in patients with Leber congenital amaurosis. *Hum Mutat*. **32**(12):1450-9.
- Wang XH**, Wang HM, Zhao BL, Yu P, Fan ZC (2014b) Rescue of defective MC4R cell-surface expression and signaling by a novel pharmacoperone Ipsen 17. *J Mol Endocrinol*. **53**(1):17-29.
- Weitz D**, Ficek N, Kremmer E, Bauer PJ, Kaupp UB (2002). Subunit stoichiometry of the CNG channel of rod photoreceptors. *Neuron*. **36**(5):881-9.
- Welch EM**, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, Paushkin S, Patel M, Trotta CR, Hwang S, Wilde RG, Karp G, Takasugi J, Chen G, Jones S, Ren H, Moon YC, Corson D, Turpoff AA, Campbell JA, Conn MM, Khan A, Almstead NG, Hedrick J, Mollin A, Risher N, Weetall M, Yeh S, Branstrom AA, Colacino JM, Babiak J, Ju WD, Hirawat S, Northcutt VJ, Miller LL, Spatrick P, He F, Kawana M, Feng H, Jacobson A, Peltz SW, Sweeney HL (2007). PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. *Nature*. **447**(7140):87-91.
- Wiesner B**, Weiner J, Middendorff R, Hagen V, Kaupp UB, Weyand I (1998). Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm. *J Cell Biol*. **142**(2):473-84.
- Wilkinson WJ**, Benjamin AR, De Probst I, Orogo-Wenn MC, Yamazaki Y, Staub O, Morita T, Adriaensen D, Riccardi D, Walters DV, Kemp PJ (2011). Alveolar epithelial CNGA1 channels mediate cGMP-stimulated, amiloride-insensitive, lung liquid absorption. *Pflugers Arch*. **462**(2):267-79.
- Wischmeyer PE**, Musch MW, Madonna MB, Thisted R, Chang EB (1998). Glutamine protects intestinal epithelial cells: role of inducible HSP70. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. **272**(4 Pt 1):G879-G884.
- Wissinger B**, Gamer D, Jäggle H, Giorda R, Marx T, Mayer S, Tippmann S, Broghammer M, Jurklies B, Rosenberg T, Jacobson SG, Sener EC, Tatlipinar S, Hoyng CB, Castellan C, Bitoun P, Andreasson S, Rudolph G, Kellner U, Lorenz B, Wolff G, Verellen-Dumoulin C, Schwartz M, Cremers FP, Apfelstedt-Sylla E, Zrenner E, Salati R, Sharpe LT, Kohl S (2001). CNGA3 mutations in hereditary cone photoreceptor disorders. *Am J Hum Genet*. **69**(4):722-37.
- Wissinger B**, Kohl S (2005). Genetische Ursachen des Farbensehens. *BIOspektrum*. Elsevier. 11. Jahrgang Nr.1. pp 29-33.
- Wiszniewski W**, Lewis RA, Lupski JR (2007). Achromatopsia: the CNGB3 p.T383fsX mutation results from a founder effect and is responsible for the visual phenotype in the original report of uniparental disomy 14. *Hum Genet*. **121**(3-4):433-9.

- Wu C**, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, Hodge CL, Haase J, Janes J, Huss JW 3rd, Su AI (2009). BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol.* **10**(11):R130.
- Wu X**, Liao L, Liu X, Luo F, Yang T, Li C (2012). Is ZD7288 a selective blocker of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel currents? *Channels (Austin)*. **6**(6):438-42.
- Wunder F**, Stasch JP, Hütter J, Alonso-Alija C, Hüser J, Lohrmann E (2005a). A cell-based cGMP assay useful for ultra-high-throughput screening and identification of modulators of the nitric oxide/cGMP pathway. *Anal Biochem.* **339**(1):104-12.
- Wunder F**, Tersteegen A, Rebmann A, Erb C, Fahrig T, Hendrix M (2005b). Characterization of the first potent and selective PDE9 inhibitor using a cGMP reporter cell line. *Mol Pharmacol.* **68**(6):1775-81.
- Wunder F**, Buehler G, Hüser J, Mundt S, Bechem M, Kalthof B (2007). A cell-based nitric oxide reporter assay useful for the identification and characterization of modulators of the nitric oxide/guanosine 3',5'-cyclic monophosphate pathway. *Anal Biochem.* **363**(2):219-27.
- Yam GH**, Zuber C, Roth J (2005). A synthetic chaperone corrects the trafficking defect and disease phenotype in a protein misfolding disorder. *FASEB J.* **19**(1):12-8.
- Yam GH**, Bosshard N, Zuber C, Steinmann B, Roth J (2006). Pharmacological chaperone corrects lysosomal storage in Fabry disease caused by trafficking-incompetent variants. *Am J Physiol Cell Physiol.* **290**(4):C1076-82.
- Yamaguchi S**, Okamura Y, Nagao T, Adachi-Akahane S (2000). Serine residue in the IIS5-S6 linker of the L-type Ca²⁺ channel alpha 1C subunit is the critical determinant of the action of dihydropyridine Ca²⁺ channel agonists. *J Biol Chem.* **275**(52):41504-11.
- Yancey PH** (2001). Water stress, osmolytes and proteins. *Amer Zool.* **41**:699-709.
- Yang H**, Shelat AA, Guy RK, Gopinath VS, Ma T, Du K, Lukacs GL, Taddei A, Folli C, Pedemonte N, Galiotta LJ, Verkman AS (2003). Nanomolar affinity small molecule correctors of defective Delta F508-CFTR chloride channel gating. *J Biol Chem.* **278**(37):35079-85.
- Yanisch-Perron C**, Vieira J, Messing J (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.* **33**(1):103-19.
- Yeo GS**, Lank EJ, Farooqi IS, Keogh J, Challis BG, O'Rahilly S (2003). Mutations in the human melanocortin-4 receptor gene associated with severe familial obesity disrupts receptor function through multiple molecular mechanisms. *Hum Mol Genet.* **12**(5):561-74.
- Yu T**, Chung C, Shen D, Xu H, Lieberman AP (2012). Ryanodine receptor antagonists adapt NPC1 proteostasis to ameliorate lipid storage in Niemann-Pick type C disease fibroblasts. *Hum Mol Genet.* **21**(14):3205-14.
- Zhang JH**, Chung TD, Oldenburg KR (1999). A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J Biomol Screen.* **4**(2):67-73.
- Zhang T**, Baehr W, Fu Y (2012). Chemical chaperone TUDCA preserves cone photoreceptors in a mouse model of Leber congenital amaurosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **53**(7):3349-56.
- Zheng J**, Trudeau MC, Zagotta WN (2002). Rod cyclic nucleotide-gated channels have a stoichiometry of three CNGA1 subunits and one CNGB1 subunit. *Neuron.* **36**(5):891-6.
- Zheng J und Zagotta WN** (2004). Stoichiometry and assembly of olfactory cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron.* **42**(3):411-21.
- Zhong H**, Molday LL, Molday RS, Yau KW (2002). The heteromeric cyclic nucleotide-gated channel adopts a 3A:1B stoichiometry. *Nature.* **420**(6912):193-8.

LITERATURVERZEICHNIS

Zhou Z, Gong Q, Epstein ML, January CT (1998). HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. *J Biol Chem.* **273**(33):21061-6.

Zhou Z, Gong Q, January CT (1999). Correction of defective protein trafficking of a mutant HERG potassium channel in human long QT syndrome. Pharmacological and temperature effects. *J Biol Chem.* **274**(44):31123-6.

Zimran A, Altarescu G, Elstein D (2013). Pilot study using ambroxol as a pharmacological chaperone in type 1 Gaucher disease. *Blood Cells Mol Dis.* **50**(2):134-7.

Zode GS, Kuehn MH, Nishimura DY, Searby CC, Mohan K, Grozdanic SD, Bugge K, Anderson MG, Clark AF, Stone EM, Sheffield VC (2011). Reduction of ER stress via a chemical chaperone prevents disease phenotypes in a mouse model of primary open angle glaucoma. *J Clin Invest.* **121**(9):3542-53.

Zufall F und Firestein S (1993). Divalent cations block the cyclic nucleotide-gated channel of olfactory receptor neurons. *J Neurophysiol.* **69**(5):1758-68.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich vor allem bei Herrn Prof. Bernd Wissinger, der mir die Durchführung meiner Promotion ermöglicht hat. Ich danke ihm für zahlreiche konstruktive Gespräche und anregende Diskussionen, eine intensive, professionelle Begleitung meiner Arbeit und für die Begutachtung meiner Dissertationsschrift.

Herrn Prof. Peter Ruth danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens. Er und Herr Prof. Bernd Antkowiak erklärten sich zudem bereit, meine Arbeit im Zuge eines wissenschaftlichen Advisory Boards zu begleiten und haben mich durch hilfreiche Ratschläge unterstützt. Als zusätzlicher Prüfer hat sich zudem Herr Prof. Thomas Euler bereit erklärt, dem ich hiermit auch danken möchte.

Besonders möchte ich Frau Dr. Peggy Reuter danken, die meine Arbeit betreut und in vielerlei Hinsicht unterstützt hat. Durch ihre konstruktiven Ratschläge, ihre technische Unterstützung und nicht zuletzt der Durchsicht der Dissertation trug sie zum Erfolg meiner Arbeit bei. Sie und Frau Dr. Katja Köppen leisteten einen großen Beitrag bei der funktionellen Charakterisierung mutanter CNG-Kanäle und konnten mir durch ihr Wissen viele hilfreiche Ratschläge geben. Zudem möchte ich Frau Britta Baumann für die schnelle und zuverlässige Durchführung der Sequenzierarbeiten danken. Allen meinen ehemaligen Kollegen danke ich für das hervorragende Arbeitsklima und der guten Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Herrn Dr. Norbert Kinkl und Herrn Dr. Andreas Vogt für die technische Unterstützung bei den Western Blot-Experimenten sowie Frau Sylvia Bolz und Herrn Dr. Andreas Mack für die Unterstützung bei der Mikroskopie.

Eine große Hilfe bei der Auswahl weiterer Testsubstanzen war die Arbeitsgruppe *Applied Bioinformatics* in Tübingen unter der Leitung von Herrn Prof. Oliver Kohlbacher. Einen großen Anteil dabei hatten Frau Charlotta Schärfe und Herr Dr. Jens Krüger, zustande gekommen war die Kooperation durch Herrn Dr. Andreas Kämper.

Mein Dank gilt auch Frau Heidrun Lange von Perkin Elmer, unter deren Vermittlung uns freundlicherweise das Plasmid kodierend für das Apoaequorin zur Verfügung gestellt wurde. Daneben möchte ich mich bei Herrn Matthias Schneider und Herrn Adam Nitsche von Bayer HealthCare AG bedanken, welche uns freundlicherweise die Nisoldipin-Enantiomere zur

DANKSAGUNG

Verfügung gestellt haben. Des Weiteren danke ich Herrn Horst Rothfuss von Berthold Detection Systems GmbH für seine Hilfe bei technischen Problemen mit der Injektoreinheit des Lumineszenzgerätes. Außerdem danke ich der Jürgen Manchot-Stiftung und der Neuro-Ophthalmologischen Gesellschaft für die freundliche Unterstützung und das entgegengebrachte Vertrauen.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Familie und Freunde für ihr Verständnis und für die zahlreichen unterstützenden Worte. Vielen Dank auch an meine Frau Libo, die mich jederzeit unterstützt hat und mir bei dem ständigen Auf und Ab des Forscherlebens Kraft gegeben hat.