

Expressionssysteme zur Gewinnung von rekombinantem *PfFNT* zur Reinigung, Funktionsuntersuchung & Kristallisation

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Julia Holm-Bertelsen

Kiel 2016

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Eric Beitz

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Axel Scheidig

Tag der mündlichen Prüfung:

20.07.2016

Zum Druck genehmigt:

20.07.2016

gez. Prof. Dr. Natascha Oppelt (Dekanin)

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Malaria­therapie	1
1.2 Die Formiat-Nitrit-Transporter-Familie.....	4
1.2.1 PfFNT- ein plasmodialer Laktat­transporter als valides Wirkstofftarget.....	7
1.3 Expression von Membranproteinen in <i>Escherichia coli</i>	9
1.4 Expression von Membranproteinen in <i>Pichia pastoris</i>	11
1.5 Zellfreie Proteinherstellung	12
1.6 Kristallisation von Membranproteinen	14
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	17
2 Material.....	18
2.1 Enzyme, Chemikalien, Kits, Material.....	18
2.2 Geräte.....	20
2.3 Plasmide.....	22
2.4 Codierende DNA Sequenzen	27
2.5 Primer/Oligonukleotide.....	27
2.6 <i>E. coli</i> -Stämme.....	29
2.7 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme.....	29
2.8 <i>P. pastoris</i> / <i>Komagataella phaffii</i> -Stämme.....	29
2.9 Antikörper	30
2.10 Puffer, Medien, Lösungen.....	31
3 Methoden	37
3.1 Molekularbiologische Methoden	37
3.1.1 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	37
3.1.2 DNA-Reinigung und Isolierung.....	37
3.1.3 Konzentrationsbestimmungen aus DNA.....	38
3.1.4 Restriktionsverdau	38
3.1.5 Dephosphorylierung.....	38
3.1.6 Ligation	39
3.1.7 Transformation von <i>E. coli</i>	39
3.1.8 Schnelltransformation von <i>E. coli</i>	39
3.1.9 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	39

3.1.10	Transformation von <i>P. pastoris</i>	40
3.1.11	Dauerkulturen von <i>E. coli</i>	40
3.1.12	Dauerkulturen von <i>S. cerevisiae</i>	40
3.1.13	Dauerkulturen von <i>P. pastoris</i>	41
3.1.14	Polymerasekettenreaktion	41
3.1.15	DNA-Sequenzierung	42
3.1.16	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen	43
3.1.17	Herstellung von Protoplasten aus <i>S. cerevisiae</i>	43
3.1.18	Isolierung der genomischen DNA aus <i>P. pastoris</i>	43
3.1.19	Generierung eines terminal verkürzten PfFNT DNA-Fragments	43
3.2	Proteinchemische Methoden	44
3.2.1	Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus <i>S. cerevisiae</i> und <i>P. pastoris</i>	44
3.2.2	Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus <i>E. coli</i>	45
3.2.3	Solubilisierung der Membranproteine aus <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i>	45
3.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	46
3.2.5	Western Blot	46
3.2.6	Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford	47
3.2.7	Proteinfällung mittels Trichloressigsäure	47
3.2.8	Bestimmung der Fluoreszenzintensität	47
3.2.9	Biotinylierung	47
3.2.10	Mikroskopische Untersuchung der Lokalisation mittels GFP-Fusionsproteinen	49
3.2.11	Faktor Xa Verdau	49
3.2.12	Proteinreinigung und Puffer-/Detergenzienaustausch	49
3.2.12.1	Nickel-Affinitätschromatographie	51
3.2.12.2	Größenausschlusschromatographie	51
3.2.13	Kristallisationsansätze	52
3.3	Proteinherstellung in <i>E. coli</i>	57
3.4	Proteingewinnung aus <i>P. pastoris</i>	57
3.4.1	Kultivierung und Proteininduktion	57
3.4.2	Fermentierung	58
3.5	Zellfreie Proteinsynthese	58
3.5.1	S30 Extrakt	58
3.5.2	T7 RNA Polymerase	59
3.5.3	Analytischer Ansatz	60
3.5.4	Präparativer Ansatz	62

3.5.5	Auswertung der analytischen Ansätze	63
3.6	Proteoliposomen	64
3.6.1	Präparation der Proteoliposomen	64
3.6.2	Saccharosegradient	64
3.7	Lichtstreuungsmessungen zur Funktionsuntersuchung	65
3.7.1	Funktionsmessung mittels <i>Stopped Flow</i>	65
3.7.2	Auswertung der Messkurven	65
4	Ergebnisse	67
4.1	Herstellung von <i>PfFNT</i> und putativen Monocarboxylattransportern in <i>S. cerevisiae</i>	67
4.1.1	Lokalisation des GFP-Fusionsproteins in der Zelle	68
4.1.2	Biotinylierung der membranständigen Proteine	69
4.2	Zellfreie Proteinherstellung	73
4.2.1	Herstellung und Qualität der S 30-Extrakte	73
4.2.2	Herstellung und Qualitätskontrolle der T7-RNA-Polymerase	74
4.2.3	Detergenzscreen für die zellfreie Proteinsynthese	76
4.2.4	Detergenzscreen für die Proteinreinigung	78
4.2.5	Vergleich der zellfreien Herstellung von <i>PfFNT</i> mit N- und C-terminalem His-tag	80
4.2.6	Faktor Xa-Verdau	80
4.3	Herstellung von <i>PfFNT</i> & <i>EcFocA</i> in BL21 Zellen	82
4.4	Herstellung von <i>PfFNT</i> in <i>P. pastoris</i>	84
4.4.1	Stabilitätsuntersuchung durch Denaturierung	85
4.4.2	Optimierung der Proteinausbeute	85
4.4.3	Einfluss zusätzlicher Stopp-codons	87
4.4.4	Detergenzscreen für die Solubilisierung	88
4.4.5	Fermentierung	90
4.5	Proteinreinigung für die Kristallisation	92
4.5.1	Nickel-Affinitätschromatographie	92
4.5.1.1	Vergleich der Elutionsprofile des zellfrei hergestellten <i>PfFNTs</i> mit unterschiedlich positionierten <i>tags</i> und in unterschiedlichen Detergenzien	92
4.5.1.2	Vergleich von automatisierter und manueller Affinitätschromatographie	94
4.5.2	Größenausschlusschromatographie	95
4.5.2.1	Untersuchung der Oligomerengrößen der Ni ²⁺ -Affinitätschromatographie Fraktionen	96
4.5.2.2	Elutionsprofile des zellfrei hergestellten <i>PfFNTs</i> in Brij78, Fos-Cholin 12 und Fos-Cholin 14	97
4.5.2.3	Einfluss des pH-Wertes und von Pufferzusätzen auf die Oligomerisierung	99
4.5.2.4	Verhalten von C-terminal <i>getaggetem PfFNT</i> und $\Delta N\Delta C$ <i>PfFNT</i>	100
4.5.2.5	Elutionsverhalten von <i>PfFNT</i> aus <i>P. pastoris</i>	101

4.5.2.6	Vergleich der Elutionsprofile von <i>in vivo</i> und zellfrei hergestelltem <i>EcFocA</i>	102
4.6	Funktionsuntersuchungen von <i>PfFNT</i>	103
4.6.1	Kontrolle der Rekonstitution.....	104
4.6.2	Bestimmung der Proteinorientierung.....	105
4.6.3	Messung der Transportraten und Substratspezifität.....	106
4.7	Kristallisationsansätze.....	108
5	Diskussion.....	111
5.1	Funktionsmessungen in Proteoliposomen.....	111
5.2	<i>PfFNT</i> - ein instabiles Pentamer?	114
5.3	Eignet sich die zellfreie Proteinsynthese für die Kristallisation von <i>PfFNT</i> ?	117
5.4	Rekombinante Herstellung in <i>E. coli</i> und <i>P. pastoris</i> als Alternative?	120
5.5	Ausblick	122
6	Zusammenfassung.....	125
7	Summary	127
8	Literaturverzeichnis	128
	Eidesstattliche Erklärung	147
	Danksagung.....	149
	Lebenslauf.....	151

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
<i>Aqua bidest.</i>	gereinigtes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BLU	Biolumineszenzeinheiten
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
C ₈ E ₅	Pentaethylglykolmonooktylether
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration
DDG	n-Dodecyl-β-D-Glucopyranosid
DDM	n-Dodecyl-β-D-Maltopyranosid
DG	n-Decyl-β-D-Glucopyranosid
DM	n-Decyl-β-D-Maltopyranosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCH	Fos-Cholin
FNT	Formiat-Nitrit-Transporter
Gal	Galactose
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Glc	Glucose
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
His	Histidin

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
KBE	kolonierbildende Einheit
LB	<i>Lysogenic Broth</i> , Medium für <i>E. coli</i>
LDAO	n-Dodecyl-N,N-Dimethylamin-N-oxid
MCT	Monocarboxylat-Transporter
NG	n-Nonyl- β -D-Glucopyranosid
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG MME	Polyethylenglykolmonomethylether
PEG	Polyethylenglykol
psi	<i>pound-force per square inch</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SD-Medium	<i>synthetic defined medium</i> , für die <i>S. cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U min ⁻¹	Umdrehungen pro Minute
U	<i>Unit</i>
Xyl	Xylose
β -OG	n-Octyl- β -D-Glucopyranosid

1 Einleitung

1.1 Malariatherapie

Mit 214 Millionen Neuinfektionen und 438.000 Toten im Jahr 2015 zählt Malaria auch heute noch zu den bedeutendsten Infektionskrankheiten weltweit. Betroffen sind vor allem tropische Länder in Afrika, Süd-Ost-Asien, Mittel- und Südamerika [1].

Die Protozoen der Gattung *Plasmodium*, die für die Infektion ursächlich sind, werden durch die weibliche Anopheles-Mücke übertragen. Dieses wurde bereits zum Ende des 19. Jahrhunderts von Giovanni Grassi und Ronald Ross entdeckt und beschrieben [2]. Neben *Plasmodium falciparum*, welches die häufigste und schwerste Form der Erkrankung, die Malaria tropica auslöst [3, 4], führen auch *P. vivax*, *ovale*, *malariae* und *knowlesi* zu Malariaerkrankungen im Menschen [5, 6]. Die Entwicklung im Menschen unterliegt einer ungeschlechtlichen Vermehrung (Abb. 1.1), bei der zunächst die Sporozoiten in den Körper gelangen und in die Leberzellen eindringen. Bis zu 30.000 dieser dort gebildeten Merozoiten werden anschließend freigesetzt und gelangen in der Blutbahn über einen komplexen Mechanismus in die Erythrozyten [7, 8]. In diesen wachsen sie ausgehend vom Ringstadium zu reifen Trophozoiten heran und können sich zu 32 Merozoiten entwickeln. Bei der Ruptur der Erythrozyten werden sie freigesetzt und können in frische Erythrozyten eindringen, um sich auch in diesen als reife Trophozoiten erneut zu teilen [9, 10, 5, 11–13]. Während dieser Zeit ist der Parasit im Erythrozyten durch eine Vakuole, die Parasitenvakuolenmembran und die Plasmodienmembran umgeben und bezieht die benötigten Nährstoffe und Energieresourcen aus dem Erythrozyten und dessen Umgebung über diese Membranen hinweg [14–16]. Nach einigen Vermehrungszyklen im erythrozytären Stadium entwickeln sich aus einem geringen Teil der Plasmodien auch Gametozyten, die nach erneuter Aufnahme durch eine weibliche Anopheles-Mücke in dieser zu einer sexuellen Vermehrung übergehen können [9].

Der Vorgang des Aufbrechens der Zellen geht mit dem typischen Symptom des Fieberschubs einher, der bei der Malaria tropica in unregelmäßigen Abständen wiederholt auftritt [8] und bereits durch C. Golgi 1889 beschrieben wurde. Auch alle weiteren Symptome wie Anämie, Übelkeit und Erbrechen, Kopfschmerzen, Diarrhoe, Azidose, Nierenschäden und Dehydrierung werden ausschließlich während des erythrozytären Stadiums beobachtet. Schwere Verläufe können auch mit einer zerebralen Malaria einhergehen, die komatöse Zustände oder den Tod zur Folge haben können [10].

Zur Behandlung der Malaria werden eine Reihe von Arzneistoffgruppen eingesetzt, die in Tab. 1.1 mit ihren Vertretern zusammengefasst sind [17, 18]. Abgesehen vom Primaquin zielen alle Stoffe hauptsächlich auf die Elimination des erythrozytären Stadiums ab. Primaquin hingegen zeigt eine erhöhte Wirksamkeit gegen das Leberstadium und Gametozyten [17].

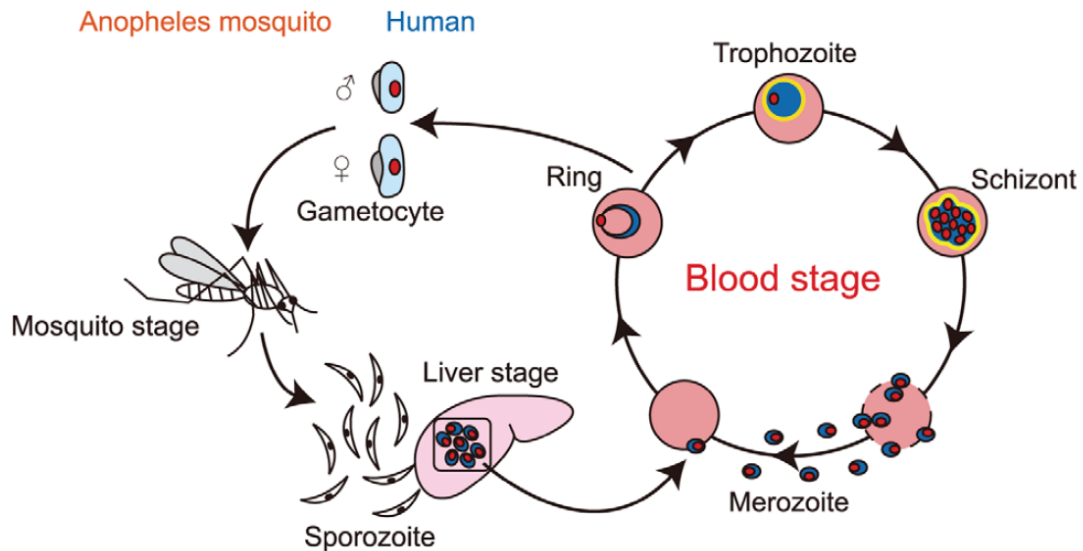


Abb. 1.1: Lebenszyklus von *P. falciparum* mit Schwerpunkt auf das erythrozytäre Stadium, entnommen aus [19]. Der Parasit befällt als Sporozoit zunächst die Leberzellen und dringt nach Freisetzung aus diesen in die Erythrozyten ein. Ein Teil entwickelt sich aus dem Ringstadium weiter zu Gametocyten, die von der Anopheles-Stechmücke erneut aufgenommen werden. Im Blutstadium kommt es über die Schritte des Trophozoiten und der Schizonten zur Entwicklung von bis zu 32 Merozoiten, die bei der Ruptur der Erythrozyten freigesetzt werden.

Chloroquin war über viele Jahrzehnte das Mittel der Wahl zur Therapie aller humanen Malaria-Arten [20]. Durch die Hemmung der Hämpolymerisation, des abgebauten Hämoglobins, kommt es zum Vorliegen von freiem Häm in der Zelle [21], was zu Schädigungen der Membranen [22] und verschiedener Enzyme im *Plasmodium* führt [23]. Die Resistenzentwicklung des *P. falciparum*s in fast allen Malariagebieten weltweit führte dazu, dass Chloroquin heute nur noch zur Therapie des *P. vivax* eingesetzt werden kann [24]. Ursächlich für diese Resistenz sind zwei verschiedene Transporter, das *Multidrug Resistance Protein 1* (*PfMRP1* [25]) und der Chloroquin-Resistenztransporter (*PfCRT* [26]), die durch Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in den Proteinen oder vermehrte Expression zu einem erhöhten Export des Chloroquins aus der Nahrungsvakuole führen [27, 28].

Dieser Mechanismus wurde auch für die synthetischen Chininderivate Amodiaquin, Mefloquin und Lumefantrin postuliert [29], aber auch für Chinin und Artemisinin, was die bereits aufgetretenen Resistenzen in Süd-Ost-Asien, Süd-Amerika und in Teilen von Afrika erklärt [24].

Tab. 1.1: Wirkstoffgruppen und Wirkstoffe zur Therapie der Malaria

Arzneistoffgruppe	Arzneistoff
4-Aminochinoline	Chloroquin
	Amodiaquin
8-Aminochinoline	Primaquin
Arylaminoalkohole	Chinin
	Mefloquin
	Lumefantrin
Antifolate	Sulfadoxin
	Pyrimethamin
Artemisinininderivate	Artemether
	Artesunat
	Arteether
Atovaquon/Proguanil	Atovaquon
	Proguanil
Antibiotika	Doxycyclin
	Clindamycin
	Tetracyclin

Die Antifolate verhindern durch die Hemmung der Dihydrofolatreduktase und der Dihydroopteroatsynthase die Bildung der Folsäure, welche für die Biosynthese der Nukleotide essentiell ist. Auch für diese beiden Enzyme konnten Mutationen als Ursache für die Resistenzen in *P. falciparum* und *P. vivax* ausgemacht werden [30], sodass sie, wenn überhaupt, nur noch als Kombinationstherapie eingesetzt werden können.

Die Artemisinininderivate hemmen eine sarkoendoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (*Pf*ATP6) [31] und setzen zusätzlich Sauerstoffradikale frei, die den mitochondrialen Elektronentransfer hemmen sollen [32]. Das schnelle Ansprechen auf die Therapie und die Wirkung gegen Gametozyten zeigen sich als Vorteile dieser Arzneistoffgruppe [18], allerdings müssen sie aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit in Kombination mit langwirksamen Therapeutika gegeben werden. Die ersten Veränderungen im Wirkprofil konnten auch für diese Klasse schon beobachtet werden [17]. Der genaue Resistenzmechanismus ist allerdings noch nicht abschließend geklärt und beruht möglicherweise auf einer Mutation im Kelchgen (K13) [33]. Aus diesem Grund werden die Artemisinininderivate in einer Artemisin basierten Kombinationstherapie (ACT) zusammen mit Amodiaquin, Lumefantrin, Mefloquin, Piperaquin, Sulfadoxin und Pyrimethamin eingesetzt [34], um die Resistenzentwicklung zu verhindern [35].

Atovaquon und Proguanil stehen als zusätzliche Arzneistoffe zur Verfügung, stören ebenfalls den mitochondrialen Elektronentransport [36] und können durch die schnelle Resistenzentwicklung gegen Atovaquon alleine nur in der Kombination verabreicht werden. Korsinczky *et al.* [37] konnten hier zeigen, dass die Resistenzen mit Mutationen des Cytochroms b einhergehen.

Die Antibiotika zielen auf den Apikoplasten im Parasiten und die dortige Proteintranslation [38], wirken aber nur langsam gegen den Parasiten und sind für Kinder unter 8 Jahren kontraindiziert [34]. Sie werden in der Regel als Kombinationspräparate eingesetzt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in fast jeder zur Therapie der Malaria eingesetzten Arzneistoffklassen Resistenzen aufgetreten sind und sich weiter ausbreiten [24]. Obwohl sich die Angriffspunkte in der Zelle zwischen den einzelnen Gruppen unterscheiden, gehen die Resistenzentwicklungen in allen Fällen mit Mutationen in den Ziel- oder Transportproteinen oder mit veränderten Expressionsleveln von Exporterproteinen einher. Die Entwicklung neuer antiplasmodialer Wirkstoffe ist durch die zunehmende Resistenzproblematik essentiell und muss auch unter Berücksichtigung neuer Angriffspunkte erfolgen [18].

1.2 Die Formiat-Nitrit-Transporter-Familie

Die Familie der Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) ist in Bakterien, Pilzen, Algen, Amöben und Apikomplexa weit verbreitet [39, 40]. Es handelt sich hierbei um Transmembranproteine, die den Transport von monovalenten Anionen, wie Chlorid, Nitrit und schwachen Säuren über die Zellmembran hinweg übernehmen [41, 40]. In höheren Organismen werden diese Aufgaben von Monocarboxylattransportern (MCTs) übernommen, die sich strukturell stark von den FNTs unterscheiden [42]. Während die MCTs in der Regel zwölf Transmembranspannen aufweisen [43], besitzen die FNTs nur sechs Transmembranspannen und erinnern von der Faltung, nicht jedoch von der Primärsequenz, eher an Aquaporine [44]. Die FNTs besitzen somit eine gänzlich andere Quartärstruktur und Gesamtgröße als die MCTs. Diese Tatsache ist für eine Nutzung der Formiat-Nitrit-Transporter als potenzielle neue Wirkstoffziele ideal, da mögliche Nebenwirkungen aufgrund einer unselektiven Hemmung unwahrscheinlicher sind. Zusätzlich sind die Aufgaben der einzelnen, bereits charakterisierten FNTs von zentraler Bedeutung für den Stoffwechsel und folglich auch für das Überleben der Zellen.

Verschiedene Vertreter aus drei Unterfamilien der FNTs, der Formiat-, Nitrit- und Hydrosulfidkanäle, sind bereits identifiziert und zum Teil näher charakterisiert. Hierzu zählen der Formiat-Kanal A (FocA) aus *E. coli* [45, 44], *Salmonella typhimurium* [46] und *Vibrio cholerae* [47] und die Formiat-Aufnahmepermease FdhC aus *Methanobacterium formicicum* [48], die Nitritkanäle NirC aus *E. coli* [49–52], *S. typhimurium* [53] und *Thermofilum pendens* [50], NitA aus *Aspergillus nidulans* [54] und NarI aus *Chalomydomonas reinhardtii* [55] und der Hydrosulfid-Kanal aus *Clostridium difficile* [56].

FocA und FdhC sind während der anaeroben Fermentierung für den Export von Formiat, Acetat und Laktat unerlässlich, da diese Abfallprodukte andernfalls aufgrund des periplasmatischen Metabolismus durch die Formiat-Dehydrogenase in der Zelle akkumulieren würden [45]. Neben der Funktion des Exports wird derzeit auch die Möglichkeit diskutiert, dass FocA durch N-terminales *Gating* unterhalb eines pH-Wertes von 5,7 auf einen aktiven Protonen-Anionen-Import umstellt [57, 58, 46, 41, 59]. *In vivo* soll allerdings nur der Export von Formiat von Relevanz sein [60].

Im Gegensatz dazu importieren die Nitritkanäle hauptsächlich Nitrit [50–52], um dieses unter bestimmten Bedingungen für biosynthetische Prozesse und den Stoffwechsel zu Ammonium reduzieren und verwenden zu können [61]. Der genaue Transportmechanismus und die Funktion sind noch nicht abschließend geklärt [41]. So gibt es sowohl Hinweise auf einen passiven Import und aktiven Export als Protonen-Symport [52], als auch auf einen Nitrit-Protonen-Antiport (gemessen an isolierten Proteinen in Proteoliposomen) [62]. Zudem wurde beschrieben, dass die Aufnahme von Nitrit und Peroxinitrit, beides Abwehrstoffe von Makrophagen, die Zellen durch eine anschließende Detoxifizierung im Zellinneren schützen kann [63]. In Mäusen, die mit einem *NirC-Knockout*-Stamm der *S. typhimurium* infiziert waren, konnte eine verminderte Zellproliferation festgestellt werden [64].

Der Hydrosulfidkanal ermöglicht den Export des anaeroben Metaboliten H_2S als HS^- , welches bei physiologischen pH vorwiegend vorliegt [56].

Alle Proteine dieser Familie weisen verschiedene Gemeinsamkeiten auf, die durch die Kristallstrukturen von *EcFocA*, *VcFocA*, *StFocA*, *CdHSC* und *StNirC* analysiert werden konnten [44, 46, 65, 56, 47]. Strukturell handelt es sich bei allen genannten Vertretern um Membranproteine, die sechs Transmembranspannen besitzen, deren zweite und fünfte Transmembranspanne jeweils aus zwei Halbhelices besteht, die in der Mitte über einen *Loop* verbunden sind. Die Termini ragen in den Intrazellulärraum. Fünf Monomere lagern sich zu einem Homopentamer zusammen, dessen mittlere Pore vermutlich durch Lipide blockiert ist (Abb. 1.2) [41].

Die Leitung der Substrate findet in den einzelnen Monomerenporen statt, die zwei Engstellen aufweisen und so die hydrophileren äußeren Bereiche von dem lipophileren Kernbereich trennen [44, 47, 46, 65, 59]. Die Konstriktionen werden durch die *Loops* der geteilten Helices gebildet und weisen hoch konservierte Aminosäuren auf. So wird die periplasmatische Konstriktion durch zwei Phenylalanine, ein Alanin und ein Histidin gebildet, die cytoplasmatische Verengung hingegen durch zwei Leucine, ein Valin und ein Threonin begrenzt (Abb. 1.3) [41, 59, 44].

Funktionell weisen alle FNTs eine geringe Selektivität für die einzelnen Substrate auf und leiten unspezifisch monovalente Anionen wie Laktat, Acetat, Formiat, Pyruvat, Nitrit und Hydrosulfid mit einer geringen Affinität [65, 41, 59].

Eine Wasserleitfähigkeit ist durch die hydrophobe Barriere in der Mitte der Pore ausgeschlossen [44]. Das zeigt, dass die Substratanionen für die Passage dieses Bereichs vorübergehend protoniert sein müssen, um diese zu überwinden. Der exakte Transportmechanismus ist noch nicht vollständig geklärt, wobei ein zentrales Histidin in der Pore und ein Lysin am Poreneingang als Protonendonoren im Gespräch sind [59, 58]. Die Transportrate ist konzentrationsabhängig, sättigbar und für einige Vertreter auch pH abhängig [59].

Die Eigenschaften der FNT-Familie führen dazu, dass sie nicht eindeutig den Transportern oder Kanälen zugeordnet werden können. So unterliegen sie weder größeren Konformationsänderungen [42], noch weisen sie einen einheitlichen *Gating*mechanismus oder eine hohe Substrataffinität auf, wie

es für Transporter üblich wäre [47]. Kanäle hingegen bilden in der Regel eine leitende Zentralpore [47, 66] und können nicht in einen aktiven Symport-/Antiportmechanismus übergehen [42, 62], wie es für einige Vertreter diskutiert wird.

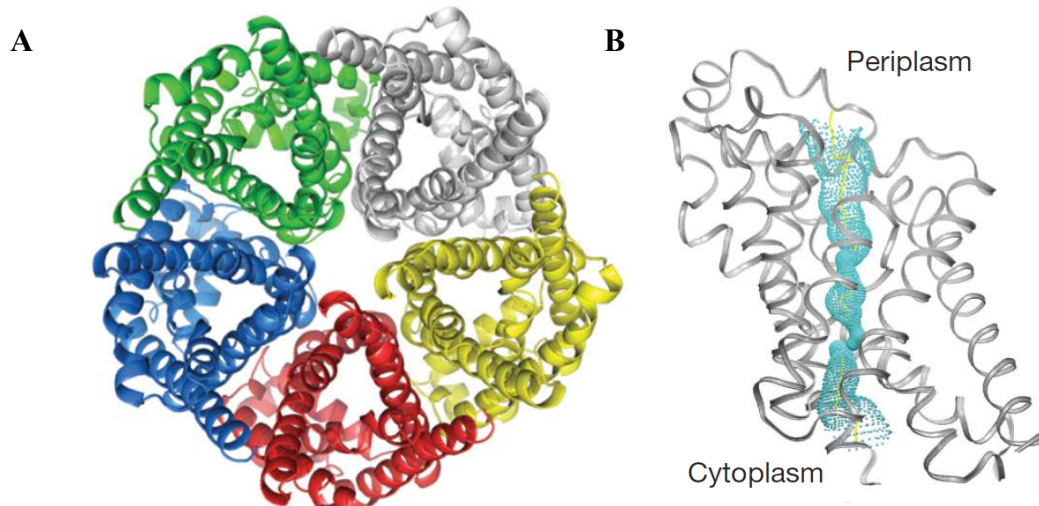


Abb. 1.2: Struktur des *EcFocA*-Pentamers, entnommen aus [44]. A: Aufsicht auf das Pentamer von der cytoplasmatischen Seite. B: seitliche Ansicht des Monomers mit Hervorhebung der Substratpore.

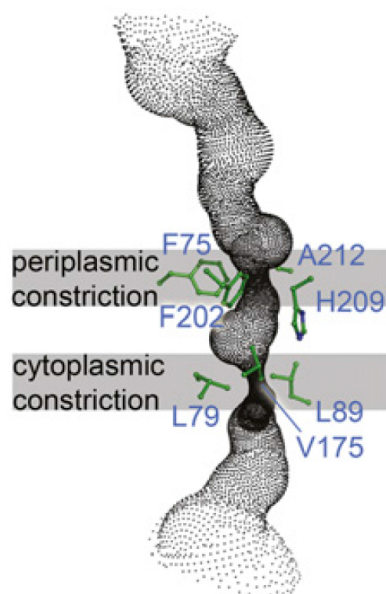


Abb. 1.3: Transportkanal des *StFocA*-Monomers mit den konservierten Aminosäurepositionen der Engstellen, entnommen aus [65].

1.2.1 PfFNT- ein plasmodialer Laktattransporter als valides Wirkstofftarget

Ein Vertreter der Formiat-Nitrit-Transporter ist auch im Stoffwechsel des Malaria tropica-Erregers *P. falciparum* von zentraler Bedeutung. Das PfFNT weist eine Sequenzähnlichkeit von 44 % und eine Identität von 25 % mit dem EcFocA auf [42] und konnte vor kurzem im Arbeitskreis als Laktattransporter identifiziert werden [39, 42]. Es ist für den Export des Stoffwechselproduktes Laktat verantwortlich und somit von wesentlicher Bedeutung für die Zelle.

Bei Erythrozyten, die mit Plasmodien infiziert sind, steigt der Bedarf der Zellen an Glucose bis auf das 75-fache an [67, 68]. Dieses ist durch den steigenden Energieumsatz des Parasiten, die Vermehrung während des Trophozoitenstadiums und den nicht funktionellen Zitratzyklus erklärbar [69]. Es findet demnach nur eine anaerobe Glykolyse bis zur Stufe des Laktats statt, bei der aus einem Mol Glucose zwei Mol Laktat, zwei Mol Protonen und zwei Mol ATP entstehen [15, 70]. Diese großen Mengen an Laktat müssen aus der Zelle entfernt werden, da es andernfalls zu einer Akkumulation der Stoffwechselprodukte führen würde, die einen Abfall des pH-Wertes und eine osmotische bedingte Instabilität der Zelle nach sich ziehen würden (Abb. 1.4) [71].

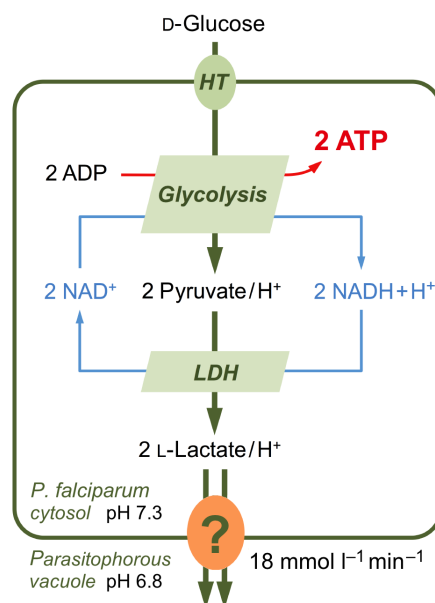


Abb. 1.4: Ablauf der Glucoseaufnahme, Energiegewinnung und des Laktatexports über das bis dato unbekannte Protein, entnommen aus [42]. Glucose wird über den Hexose-Transporter (HT) in den Parasiten aufgenommen und mittels Glykolyse zu zwei Mol Adenosintriphosphat (ATP), zwei Mol Laktat und Protonen verstoffwechselt und über PfFNT in die Parasitenvakuole ausgeschleust.

Wie die Glucose in den Parasiten gelangt ist bekannt und gut untersucht. Sie wird über den Glucose-Transporter in den Erythrozyten aufgenommen [72], gelangt über die *New Permeability Pathways* in die Parasitenvakuole [73, 74] und wird von dort über den Hexose-Transporter in den Parasiten importiert [75, 76].

Der Export des Laktats verläuft sehr wahrscheinlich über einen Laktat-Protonen-Sympport über das *PfFNT*, gefolgt von dem Übergang über die Parasitenvakuolenmembran durch die *New Permeability Pathways* und wird schließlich aus dem Erythrozyten über MCTs, Diffusion der Milchsäure oder über einen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher exportiert [77–79].

Der Laktat-Protonen-Sympport wurde bereits vor der Identifizierung des *PfFNTs* postuliert und an Parasiten gezeigt [80, 77, 71] und auch erste Untersuchungen des *PfFNTs* deuten auf diesen Transportmechanismus hin [39, 42].

Der Topologie-Plot des *PfFNTs* (Abb. 1.5) zeigt die charakteristischen Strukturen der FNT-Familie, wie die sechs Transmembranspannen, die beiden Halbhelices an Position 2 und 5, sowie die intrazellulär orientierten Termini (1.2). Mit Ausnahme des zweiten Leucins, welches durch ein Phenylalanin ausgetauscht ist, sind alle konservierten Aminosäuren der Konstriktionen identisch [42]. Ein Proteinmodell auf Grundlage der vorhandenen Kristallstrukturen ergab auch für *PfFNT* eine pentamere Struktur. Mit einer Größe von 309 Aminosäuren und 34,4 kDa ist es vergleichbar mit den bekannten FNTs [44, 47, 46, 65, 56].

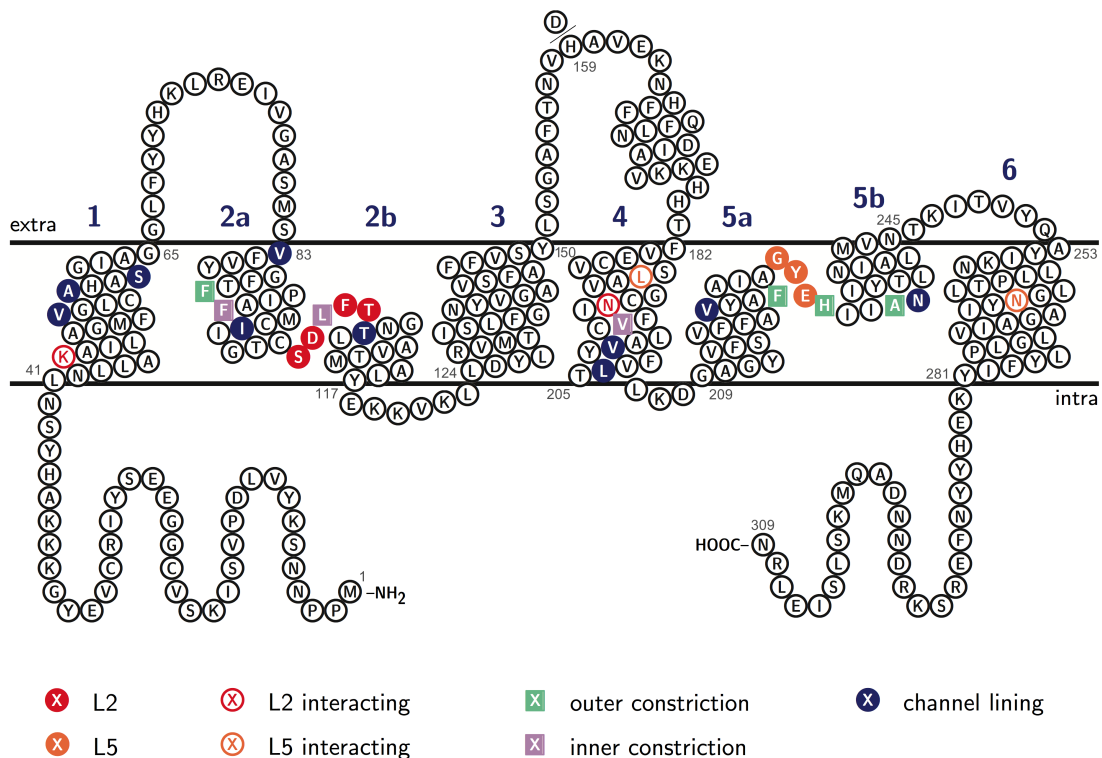


Abb. 1.5: Topologie-Plot des *PfFNTs*, entnommen aus [42]. *PfFNT* besitzt sechs Transmembranspannen und intrazellulär orientierte Termini. Die grün und violett markierten Aminosäuren zeigen die für die Konstriktionen verantwortlichen Positionen. In rot und orange sind die Verbindungen der Halbhelices gezeigt.

Die funktionelle Charakterisierung wurde in Oozyten und Hefezellen vorgenommen und konnte zeigen, dass *PfFNT*, wie andere Vertreter der Formiat-Nitrit-Transporter, eine geringere

Substratspezifität aufweist und neben L-Laktat auch Formiat, Acetat, Pyruvat und D-Laktat leitet. Des Weiteren ist die Transportrate sowohl von dem pH-Wert, als auch von der Konzentration des Substrats abhängig. So steigt diese bis zu L-Laktatkonzentration von 50 mM linear an. Das Erreichen der maximalen Transportrate läuft bei einem niedrigen pH schneller ab, da die Affinität zum Substrat zunimmt. Die maximale Transportgeschwindigkeit ist bei dem pH erreicht, der dem pKs des Substrats entspricht, da zu diesem Zeitpunkt die gleiche Menge an Anionen und Säure vorliegen. Dieses spricht für einen Laktat-Protonen-Symport, da die Korrektur mit der Henderson-Hasselbalch-Gleichung einen direkten Zusammenhang zwischen pH und Anionenkonzentration zeigt. Zusätzlich konnte durch die Zugabe von Protonenentkopplern der Transport nahezu vollständig unterbunden werden [42, 39].

Einige Verbindungen, wie Phloretin, Furosemid, α -Cyano-4-hydroxymethylsäure, α -Fluoromethylsäure, Nifluminsäure und 5-Nitro-2(3-Phenylpropylamino)benzoesäure konnten sowohl in Hefezellen und Oozyten für das PfFNT, aber auch in isolierten Parasiten eine Hemmung des Laktattransports zeigen. Ein Hemmstoff humaner MCTs, das p-Chloromercuribenzenesulfonat (pCMBS), ist jedoch nicht dazu in der Lage, den Laktattransport in einem der Systeme zu hemmen, was die Abgrenzung des PfFNTs zu den humanen MCTs wiederum verdeutlicht [39, 42, 80, 71].

Die zentrale Funktion im Energiestoffwechsel des *Plasmodium* Parasiten und die geringe Ähnlichkeit zu menschlichen MCTs stellen PfFNT als ein valides Wirkstofftarget heraus. Eine Hemmung des Laktattransporters würde einen neuen Therapieansatz der Malaria darstellen und weitere Möglichkeiten der Wirkstoffentwicklung eröffnen. Für ein rationales Inhibitor-Design ist jedoch die Aufklärung der exakten Struktur des Zielproteins unerlässlich.

1.3 Expression von Membranproteinen in *Escherichia coli*

Somatostatin war 1977 das erste humane Protein, welches erfolgreich in *Escherichia coli* exprimiert werden konnte [81]. Seitdem wurde die Technik kontinuierlich weiterentwickelt und zählt auch heute noch zu den am häufigsten genutzten Methoden der rekombinanten Proteinherstellung. Neben der industriellen Nutzung wird sie in der Forschung vorwiegend für die Proteingewinnung zur Strukturaufklärung und Funktionsuntersuchung eingesetzt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die kostengünstige Herstellung, die einfache Handhabung und dass das Verständnis über die Abläufe und möglichen Probleme bei der Überexpression in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen hat [82, 83]. Die meist genutzten Stämme sind BL21(DE3) und die potenziell robusteren C41(DE3) und C43(DE3) [84]. Über die Bakteriophage T7 wurde das Gen für die T7-RNA-Polymerase eingebracht, das als starker Promotor für die rekombinante Expression genutzt wird und in die genomische DNA integriert [85]. Die *E. coli* Zellen werden mit dem Plasmid transformiert, welches das Zielgen enthält. Dieses kann z.B. der pET-Vektor sein, der zwischen T7-Promotor und Zielgen zusätzlich das Lactose-Operon beinhaltet. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm BL21(DE3)pRep4 ist bereits das pREP4-Plasmid in den Zellen enthalten, welches für den Lac-Repressor kodiert. Dieser bindet im Bereich des *lac*-Operons an die DNA und verhindert so das Binden der Polymerase und infolgedessen

das Ablesen. Die Induktion erfolgt über die Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), welches den Lac-Repressor bindet, zu einer Konformationsänderung führt und so das Ablesen des *lac*-Operons und des Zielgens ermöglicht [86, 87].

Membranproteine und insbesondere eukaryotische Membranproteine stellen eine besondere Herausforderung für die Expression in *E. coli* dar. So können verschiedene Probleme auftreten, die dazu führen, dass wenig bis gar kein Protein gebildet wird oder dieses aggregiert, als sogenannte *inclusion bodies*, im Cytosol ausfällt. Ursächlich können hier unter anderem eine unterschiedliche *Codon Usage* zwischen dem exprimierenden und dem Wirts-Organismus sein [88], eine Überlastung der translokierenden Enzyme [82], toxische Effekte auf den Zellorganismus oder fehlende spezifische oder nicht ausreichende Chaperone [89–91]. Zudem können fehlende posttranslationale Modifikationen, wie Glykosylierungen [92, 93] eine funktionelle Faltung verhindern, ebenso wie veränderte Lipidzusammensetzungen der Membranen [94].

Um diese Probleme zu umgehen, wurden verschiedene Methoden entwickelt, die zu erfolgreichen Überexpressionen führten. Die Verwendung mutierter *E. coli* BL21-Stämme, die eine höhere Resistenz gegenüber den toxischen Effekten aufwiesen [84], die Koexpression von Chaperonen [95, 96], die Temperaturniedrigung zur Reduzierung der Translationsgeschwindigkeit [97] und die Herstellung von Fusionsproteinen haben die Raten der erfolgreich gewonnenen Membranproteine deutlich gesteigert. Die Bildung von Fusionsproteinen mit z.B. Grün fluoreszierendem Protein (GFP) ermöglicht heute nicht nur die direkte Lokalisation der rekombinanten Fusionsproteine in der Zelle, sondern auch die Überprüfung der Faltung *in vivo* [98, 99]. N- und C-terminale *tags* vermindern die unspezifische Degradierung durch Proteasen [100] und werden für die Detektion und Reinigung genutzt. Ebenso gibt es eine Reihe von Protokollen, die die erfolgreiche Rückfaltung aus *inclusion bodies* beschreiben und sich die großen Ausbeuten während der Herstellung zu Nutze machen [101, 102].

Nach der erfolgreichen Herstellung durch Optimierung verschiedener Parameter, wie der Induktionstemperatur und der Induktorkonzentration, folgt der Zellaufschluss mit der Isolierung der Membranfraktion und anschließender Solubilisierung mit geeigneten Detergenzien. Die Wahl des Detergenzes hat einen entscheidenden Einfluss auf die Stabilität und Faltung des Proteins. Es gilt für jedes Protein das Detergens zu finden, welches den größten Teil aus den Membranen solubilisiert und die Wechselwirkungen zwischen Lipiden und Protein am besten herabsetzt und dabei den geringsten denaturierenden Effekt auf das Protein ausübt [103].

Im Idealfall können so mehrere Milligramm solubilisiertes Membranprotein pro Liter Suspensionskultur erhalten werden, die für weitere Untersuchungen und die Kristallisation genutzt werden können. Mit 196 von derzeit 329 aufgeklärten Kristallstrukturen von integralen Membranproteinen (*Protein Data Bank*, Juni 2016), stellt die Herstellung in *E. coli* die erste Wahl für die Gewinnung rekombinanten Proteins für die Kristallisation dar.

1.4 Expression von Membranproteinen in *Pichia pastoris*

Die Nutzung von *E. coli* für die rekombinante Herstellung von Membranproteinen ist, wie in Kapitel 1.3 beschrieben, für eukaryotische Proteine stark limitiert. Insbesondere posttranslationale Modifikationen, die für die funktionelle Faltung einiger Proteine essentiell sind [93], können in *E. coli* nicht durchgeführt werden. Aus diesem Grund werden neben *E. coli* auch Hefezellen, humane Zelllinien und Insektenzellen für die rekombinante Expression eukaryotischer Proteine eingesetzt [104]. *Pichia pastoris* zählt zu der Familie der Saccharomycetaceae und wurde 1995 neu klassifiziert als *Komagataella phaffi* [105]. Die alte Bezeichnung wird aber auch heute noch größtenteils verwendet und deshalb auch in dieser Arbeit so bezeichnet. Sie gilt als die Hefe-Spezies, die die größten Mengen rekombinantes Protein pro Liter Zellsuspension herstellen kann, was durch ihre, im Vergleich zu *S. cerevisiae*, deutlich höhere Biomasse erklärt wird (Patent Wegner 1983 [106]). Sie wurde erst 1985 als neues Expressionssystem zugänglich [107]. Die ersten Proteine wie das Hepatitis B-Oberflächenantigen und der Tumornekrosefaktor konnten im Milligramm bis Gramm Maßstab pro Liter Kultur erhalten werden, was die Ausbeuten aus *S. cerevisiae* um das 10- bis 100fache übersteigt [108, 109].

Als methylotrophe Hefe besitzt *P. pastoris* die Fähigkeit Methanol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle zu verwerten [110], wobei die Methanolverstoffwechslung in den Peroxisomen stattfindet [111] und durch den ersten Schritt der Oxidation von Methanol zu Formaldehyd über die beiden Alkoholoxidasen (*AOX* 1 & 2) stark reguliert ist [112, 113, 110]. Diese starke Regulation, d.h. Repression durch Glucose und Induktion durch Methanol, ermöglicht es den *AOX1*-Promotor als induzierbaren Promotor für die rekombinante Proteinherstellung zu nutzen. Die Repression durch Glucose führt zu einer geringen Basalrate der Translation, so dass zunächst eine Zunahme der Biomasse durch Zufuhr von Glucose möglich ist und anschließend die Induktion durch die Methanolzufuhr durchgeführt werden kann [112]. Es existieren noch eine Reihe anderer induzierbarer Promotoren für *P. pastoris* [114], die allerdings für diese Arbeit keine Relevanz haben.

Es gibt weitere Stämme, die für die rekombinante Expression genutzt werden, hierzu zählen unter anderem der Wildtyp-Stamm X-33, der Histidin-auxotrophe Stamm GS115 [115], der *AOX1-Knockout* Stamm KM71 und der *Protease-Knockout* Stamm SMD1168 [114]. Die Firma Life Technologies™ hat zudem vor einigen Jahren einen auxotrophen Stamm auf den Markt gebracht: der *PichiaPink*™ besitzt eine *ADE2*-Deletion und weist die Besonderheit auf, dass die Selektion nicht mehr über die Zugabe von Antibiotika wie Zeocin oder Blasticidin und Resistenzkassetten auf den eingebrachten Plasmiden abläuft, sondern über eine Farbselektion, die es ermöglicht auf Selektionsplatten, die kein Adenin enthalten, Klone auszumachen, die das Plasmid und somit auch das *ADE2*-Gen aufgenommen haben. Die Klone, die nur eine geringe Anzahl an Kopien aufgenommen und in die genomische DNA integriert haben, weisen eine rosa Farbe auf, da die Vorstufen der Purine in ihren Vakuolen akkumulieren, während die Klone mit einer höheren Kopienzahl keine Störungen der *de novo*

Biosynthese von Purinen aufgrund der ursprünglichen *ADE2*-Deletion mehr aufweisen und weiß erscheinen [116]. Die Integration der linearisierten Plasmid-DNA in die genomische DNA durch die homologe Rekombination und nicht homologes *end-joining* [117] führt zur Bildung sehr stabiler Expressionsklone, die auch ohne Selektionsdruck stabil sind [118].

Nach der Selektion schließt sich eine Untersuchung der Proteinmengen an, die die einzelnen Klone herstellen, um größtmögliche Mengen aus den Zellen erhalten zu können. Damit kann indirekt der Klon ausgewählt werden, der die höchste Kopienanzahl in die DNA integriert hat, die noch nicht in einer Überlastung der Transkription und Translation resultiert [119]. Zudem folgen Untersuchungen zur idealen Zellzahl (OD_{600}) bei der Induktion und Analysen der Expressionslevel im zeitlichen Verlauf während der Induktion [120].

Die Steuerung der Wachstumsbedingungen während der Fermentierung führt durch eine bessere Sauerstoffversorgung zu höheren Zelldichten als in der Schüttelkultur und die limitierte Methanoldmenge sorgt zusätzlich für höhere Initiationsraten des AOX-Promotors [121]. Folglich können die größten Proteinausbeuten unter kontrollierten Bedingungen im Bioreaktor erhalten werden. Wie bereits für *E. coli* beschrieben schließen sich auch hier der Zellaufschluss und die Solubilisierung mit Detergenzien an.

Die Verwendung von *P. pastoris* zur Gewinnung großer Proteinmengen nimmt seit einigen Jahren kontinuierlich zu und gewinnt besonders für die Strukturaufklärung eukaryotischer Proteine an Bedeutung, da sie die Vorteile der einfachen und kostengünstigen Handhabung mit denen der eukaryotischen Translation vereint [122].

1.5 Zellfreie Proteinherstellung

Der Grundstein für die zellfreie Herstellung wurde bereits 1988 von Spirin *et al.* gelegt, als es ihnen gelang, ein Polypeptid mit bis zu 20 nmol ml^{-1} zu synthetisieren [123]. Diese Methode eröffnete insbesondere für toxische und Membranproteine neue Möglichkeiten, die bei der Expression in Zellsystemen auftretenden Probleme, wie der Bildung von *inclusion bodies*, geringe Proteinausbeuten, falsche Faltung oder toxische Effekte in der Zelle, zu umgehen. [82, 89, 124, 125] (1.3).

Die zellfreie Proteinherstellung hingegen ermöglicht durch ihr offenes System nicht nur hohe Proteinausbeuten in kurzer Zeit zu generieren, sondern auch das Hinzufügen von Proteaseinhibitoren, um Degradierungen zu minimieren, und Chaperonen, um die Faltung zu unterstützen [126, 127], und Detergenzien, Lipiden und Nanosidiscs [128–133], um Membranproteine „in Lösung“ herzustellen und in membranähnliche Verbände einzubauen. Zudem können zur weiteren Analyse einzelner Aminosäurepositionen im Protein auch unnatürliche [134] und radioaktiv markierte Aminosäuren eingesetzt werden [135].

In den letzten beiden Jahrzehnten hat sich das Verfahren der zellfreien Proteinsynthese kontinuierlich weiter entwickelt, sodass heute eine Vielzahl an Varianten verfügbar ist. Prinzipiell wird in der Art der

Herstellung zwischen einem geschlossenen System (dem *batch*-Verfahren) und einem kontinuierlich austauschenden System (*continuous exchange cell-free system* (CECF)) unterschieden [136, 137]. Letzteres ermöglicht durch das Entfernen toxischer Produkte und das Nachliefern von Ausgangsstoffen eine Syntheszeit von bis zu 24 h und deutlich größere Proteinausbeuten [123].

Neue Möglichkeiten haben sich auch für eukaryotische Proteine eröffnet. So ist es heute möglich, neben dem konventionellen *E. coli*-Extrakt basierten System auch Extrakte aus Weizenkeimen [138], Insektenzellen [139, 140], humanen Zellen [141], Kaninchenretikulozyten [142], Tabakpflanzenzellen [143] oder Protozoen zu verwenden [144, 145].

Das CECF-System, welches im Arbeitskreis durch Dr. Annika Müller-Lucks und Dr. Sinja Bock etabliert wurde, besteht aus zwei Komponenten, dem Reaktionsmix und dem *Feeding-Mix*, die über eine Dialysemembran miteinander verbunden sind (Abb. 1.6). Der Reaktionsmix setzt sich aus allen

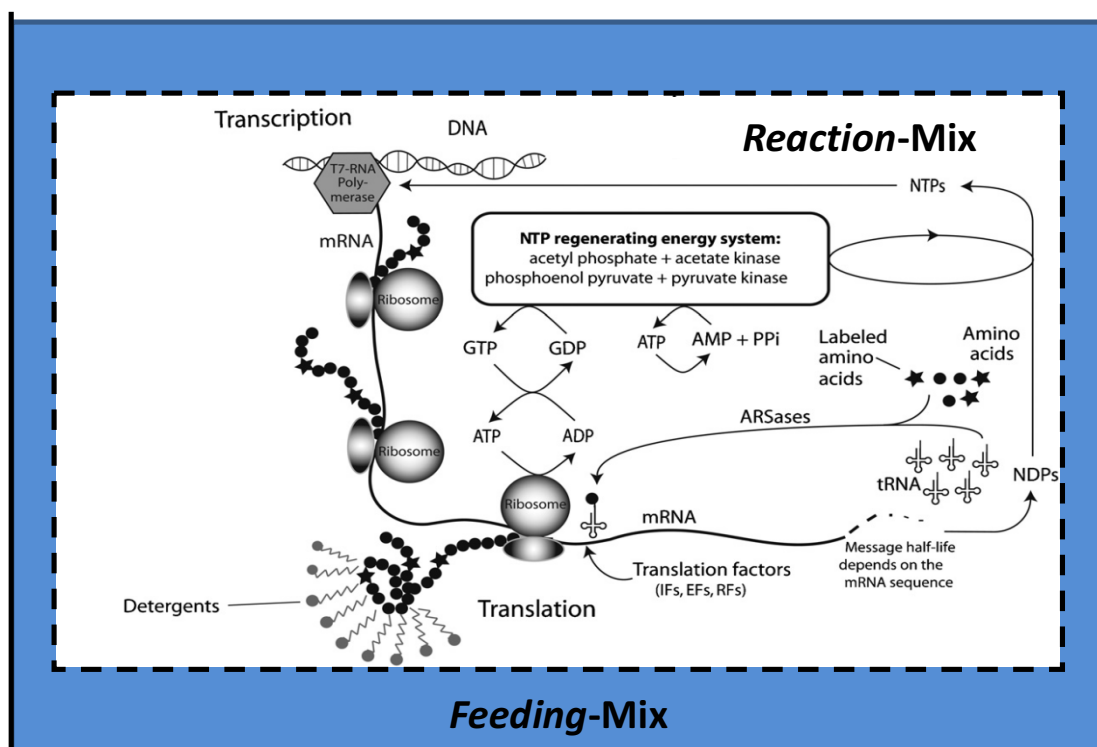


Abb. 1.6: Aufbau des CECF-Systems modifiziert nach [147]. Der Reaktionsmix beinhaltet alle Komponenten, die für die Proteinsynthese notwendig sind. In diesem läuft die Synthese ab. Über eine Dialysemembran können verbrauchte Stoffe aus dem *Feeding-Mix* nachgeliefert oder inhibierende Abfallprodukte verdünnt werden.

Komponenten zusammen, die für die Transkription und Translation benötigt werden. Hierzu zählt ein selbst-hergestellter S30-Extrakt, der unter anderem die Ribosomen, sowie die Translationsfaktoren und die Aminoacyl-tRNA-Synthetasen liefert [136]. Des Weiteren sind die zu transkribierende DNA, Aminosäuren, Nukleotide, *E. coli*-tRNA, Kalium- und Magnesiumacetat, Folsäure und eine rekombinant hergestellte T7-RNA-Polymerase enthalten. Zur Stabilisierung und Unterstützung des Systems sind zusätzlich noch Natriumazid, PEG, ein HEPES-EDTA-Puffer, ein Protease-Inhibitor, ein

RNAse-Inhibitor, sowie DTT vorhanden. Die Energie zur Regeneration von ATP und GTP wird durch die Acetatkinase, die bereits im S30-Extrakt enthalten ist, und durch die Pyruvatkinase durch Umsetzung von Acetylphosphat [126] und Phosphoenolpyruvat generiert [136, 146]. Der *Feeding-Mix* enthält zusätzlich noch einen Überschuss an Aminosäuren und dient zur Nachlieferung von Stoffen, die im Laufe der Reaktion bereits verbraucht wurden und zum Verdünnen inhibierender Abfallprodukte, wie z.B. Pyrophosphate.

Durch die Möglichkeit Lipide oder Detergenzien direkt in den Reaktionsansatz hinzufügen zu können, ist das System für die Herstellung von Membranproteinen einzigartig. Diese können im Anschluss an die Translation somit direkt in Detergenzien-Mizellen solubilisiert oder in Liposomen oder Nanodiscs rekonstituiert werden [128–130, 132, 131]. Alternativ kann das Membranprotein auch ohne diese Zusätze präzipitierend hergestellt und anschließend mit Detergenzien solubilisiert werden [130].

Eine Vielzahl von Detergenzien wird vom System toleriert. Zu diesen zählen insbesondere die Brij-Varianten Brij35, Brij58, Brij78 und Brij98, aber auch n-Dodecyl- β -D-Maltopyranosid (DDM), n-Decyl- β -D-Maltopyranosid (DM), Digitonin und Triton X 100. Für n-Octyl- β -D-Glucopyranosid (β -OG) konnte eine Hemmung der Synthese festgestellt werden [147, 130, 148].

Nicht jedes Protein lässt sich in allen Detergenzien korrekt gefaltet herstellen. Aus diesem Grund muss für jedes neue Protein vor der präparativen Herstellung zunächst eine Analyse der geeigneten Magnesiumkonzentration und Detergenzien durchgeführt werden, um diese durch die Verwendung eines GFP-Fusionsproteins direkt zum nativ gefalteten Protein zu optimieren. Das GFP-Fusionsprotein gilt hier als Faltungsindikator, dessen Fluoreszenz erst dann entsteht, wenn das restliche Protein ebenfalls korrekt gefaltet ist [149].

Insgesamt bietet die zellfreie Proteinherstellung insbesondere für Membranproteine eine effektive und schnelle Alternative zur Überexpression in Zellen und erleichtert zudem die Isolierung, da Zellaufschlüsse und Solubilisierungsschritte entfallen. Auch in der industriellen Großherstellung findet sie durch die gute Charakterisierbarkeit und Reproduzierbarkeit der Produkte [150] immer mehr Anwendung.

1.6 Kristallisation von Membranproteinen

Die Kristallisation von Membranproteinen ist essentiell zur Strukturaufklärung, um diese als Wirkstofftargets einem gezielten *drug design* zugänglich zu machen, stellt jedoch eine besondere Herausforderung dar. Dieses spiegelt sich auch in der Anzahl an aufgeklärten Strukturen von Membranproteinen wider, die mit zurzeit 620 (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>) deutlich unterhalb der ca. 119.000 Strukturen von löslichen Proteinen liegt (PDB, Stand Juni 2016).

Mögliche Ursachen sind in den einzelnen Schritten von der Gewinnung des Proteins, über die Reinigung, bis hin zur eigentlichen Kristallisation zu suchen [151–153]. Die Notwendigkeit des Zusatzes von Detergenzien, um die hydrophoben Proteine aus den Membranen herauszulösen und in

Lösung zu halten [154], stellt einen weiteren potenziell problematischen Faktor dar, der auch auf den Prozess der Kristallbildung einen entscheidenden Einfluss haben kann.

Für die Kristallisation von Membranproteinen stellt die Gewinnung des reinen, stabilen und homogenen Proteins immer noch ein Schlüsselproblem dar [155–157]. Wie bereits in den Kapiteln 1.3-1.5 erläutert, gibt es eine Reihe von Zellsystemen, die für die rekombinante Proteinherstellung genutzt werden. Die am häufigsten genutzten *E. coli* Zellen sind besonders für eukaryotische Membranproteine nicht ideal, da es oftmals zur Bildung von *inclusion bodies* kommt (Kapitel 1.3). Abhilfe schaffen hier gut charakterisierte, eukaryotische Systeme, wie *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, Insektenzelllinien oder humane Zelllinien [104, 153]. Die resultierenden Ausbeuten sind in der Regel allerdings nicht mit löslichen Proteinen vergleichbar. Dieser Umstand wird auch dadurch bedingt, dass die Proteine überwiegend in die Membranen integriert werden und mit geeigneten Detergenzien aus dem Membranverband solubilisiert werden müssen [154]. Die Auswahl des Detergenzes muss für jedes Protein wieder neu getroffen und experimentell ermittelt werden. Hierbei gilt es den Mittelweg zu finden zwischen ausreichender Solubilisierung und Herabsetzen der Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Lipiden und geringer Denaturierung des Zielproteins [154, 158, 103]. Als besonders erfolgreich haben sich in der Vergangenheit β -OG, DDM, DM und LDAO erwiesen [159].

Im Anschluss an die Extraktion aus den Membranen muss das Detergens zudem die Eigenschaft haben, das Protein stabil in Lösung zu halten und ein Präzipitieren zu verhindern [160]. Zudem darf es die native Faltung, die Oligomerisierung oder die Funktion nicht beeinflussen [158, 103]. Die Stabilität des Proteins in den gewählten Detergenzien ist somit essentiell für die Kristallbildung [161]. Ein Austausch des Detergenzes vor der Reinigung ermöglicht zudem die Verwendung eines harscheren Detergenzes für die Extraktion und eines mildereren für die Reinigung [162].

Die Reinigung durchläuft mehrere Phasen, beginnend mit einer Vorreinigung, die häufig mittels Affinitätschromatographie durchgeführt wird. Als zweiter Schritt folgt häufig eine Größenausschluss- oder Ionentauscherchromatographie, um unspezifische, ebenfalls eluierte Verunreinigungen abzutrennen. Final kann ein Dialyseschritt durchgeführt werden, der überschüssige Detergenzien entfernen soll [163, 164].

Während dieser Schritte ist der Einfluss des Detergenzes auf die Eigenschaften der Bindung und Elution des Proteins von zentraler Bedeutung und kann den Erfolg einer Reinigung stark beeinflussen. Die Homogenität kann ebenfalls durch veränderte Stabilitäten von Oligomeren modifiziert werden, was sich besonders während der Größenausschlusschromatographie zeigt [162, 161].

Die Homogenität und native Faltung muss vor der Kristallisation verifiziert werden. Funktionsuntersuchungen stellen für integrale Membranproteine jedoch ebenfalls eine besondere Herausforderung dar, weil diese häufig keine Substrate umsetzen, sondern ggf. über die Leitfähigkeit [165–168, 44] spezifischer Substrate charakterisiert werden oder noch keine Funktion bekannt ist

[153]. Die Leitfähigkeiten müssen nach der Reinigung in künstlichen Membranumgebungen bestimmt werden, die weitere nicht triviale Herstellprozesse erfordern [169].

Im Gegensatz zu Kristallisationsansätzen löslicher Proteine sind bei Membranproteinen auch die Detergenzien enthalten, die durch ihre Mizellgröße und Eigenschaften nicht nur Protein-Protein-Wechselwirkungen behindern und somit die Kristallisation hemmen können [151], sondern auch einen Einfluss auf die Auflösung der Kristallstruktur [160] und die Form der Kristalle haben können [170, 171].

Prinzipiell unterscheidet man zwischen verschiedenen Methoden der Kristallisation, wie der Dampfdiffusion der *Sitting-Drop* und der *Hanging-Drop*-Methode [172, 173], der *in meso*-Kristallisation in kubischen Lipidphasen [174, 175], dem *microbatch*-Verfahren [176] und der Dialyse [172]. Bei der Dampfdiffusion, wie sie auch in dieser Arbeit genutzt wurde, wird der Proteintropfen mit dem gleichen Volumen Puffer gemischt und in einem abgeschlossenen Gefäß durch Diffusion eine Übersättigung des Proteins im Tropfen herbeigeführt. Dieser instabile Zustand kann zur Bildung von Kristallisationskeimen führen und wird durch die Additive des Puffers forciert [172]. In dem Puffer sind verschiedene Komponenten enthalten, wie ein Präzipitant (entweder Salz, organisches Lösungsmittel oder langkettiges Polymer), ein Puffersalz für den definierten pH-Wert und ein Salz [172, 177, 178]. Nur bei einem idealen Zusammenspiel der Bestandteile und des Proteins kann die Bildung eines Kristallisationskeimes erfolgen. Weiterhin üben die initiale Proteinkonzentration, die Art [161] und Konzentration des Detergenzes und die Inkubationstemperatur entscheidende Einflüsse aus [177, 157]. Das übliche Vorgehen beinhaltet zunächst das Durchführen von *Initialscreens*, bei denen geeignete pH-Werte und Salzkombinationen ermittelt werden, sowie die Nutzung kommerzieller Kits (*Sparse Screens*), die bereits erfolgreich genutzte Bedingungen enthalten [172, 163, 179].

Durch die Vielzahl und kontinuierliche Verbesserung der Expressionsmethoden, das bessere Verständnis der Kristallisationsabläufe und Detergenzieneigenschaften und neue Kristallisationsmethoden, wie der *in meso* Kristallisation, hat die Zahl der Kristallstrukturen von Membranproteinen seit der ersten Struktur 1985 [180, 178] stetig zugenommen. So hat auch die zellfreie Proteinsynthese vier Kristallstrukturen von Membranproteinen hervorgebracht [171, 148, 181–183] und zu dem wachsenden Erfolg beigetragen. Nichtsdestotrotz bleibt die Kristallisation ein wenig vorhersehbarer Prozess, der nur über *trail and error* zum Erfolg führt.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es den Laktattransporter PfFNT, der als valides Wirkstofftarget zur Therapie der Malaria angesehen werden kann, in verschiedenen Systemen, wie dem zellfreien System, sowie in *E. coli* und *P. pastoris* zu exprimieren und, nach der Prüfung auf die native Faltung, große Mengen zu produzieren. Hierfür sollten auch die rekombinante Herstellung in *P. pastoris* und der Fermentierungsprozess etabliert werden.

Die Einflüsse der verschiedenen Detergenzien, sowie die Eignung der Systeme sollten geprüft werden, mit dem Ziel ein homogenes Protein zu erhalten, welches in einer reinen oligomeren Form, idealerweise als Pentamer, vorliegt. Zudem sollte eine Methode für die Prüfung der Funktionalität entwickelt und die Solubilisierung und Reinigung in verschiedenen Stufen etabliert werden. Die so gewonnenen homogenen Proteine sollten final für Kristallisationsversuche eingesetzt werden, um dem Schritt des rationalen Inhibitor designs auf Grundlage einer Kristallstruktur näher zu kommen.

2 Material

2.1 Enzyme, Chemikalien, Kits, Material

Anatrace, Maumee, USA

n-Octyl- β -D-Glucopyranoside, n-Decyl- β -D-Maltopyranoside, n-Dodecyl-n- β -D-Maltopyranoside, Dodecyl-N,N-Dimethylamine-N-Oxide, Popular Detergent Kit, Pentaethylene Glycol Monoethyl Ether (C₈E₅), Fos-Cholin 12

AppliChem, Darmstadt

Brij 35, Brij 58, Calciumacetat, Magnesiumchlorid, Zinkacetat, Tween 20, Natriumlaurylsulfat, Natriumlactat, Phosphoenolpyruvat

Avanti Polar lipids, Alabaster, USA

E. coli Polar Lipid Extract Powder

Becton, Dickinson and Company, Heidelberg

Difco™ Yeast Nitrogen Base w/o amino acids, Bacto™ Yeast Extract, Bacto™ Trypton, Bacto™ Pepto

Beckman Coulter, Krefeld

Genome™ LabDTCS Quick Start Kit, Microfuge Tube Polyallomer, Centrifuge Bottles Polycarbonate 26,3 ml

Bio-Rad, München

Bio-Rad Protein Assay, Poly-Prep Chromatography columns

GE Healthcare, Freiburg

PD-10 Desalting Columns, Q Sepharose Fast Flow, Amersham ECL Plus Western Blotting Detection System, PD MidiTrap G-25, HisTrap excel 1 ml, Blotting Membranes, Amersham™ Hybond™ 0.45 PVDF, Whatman Chromatography Paper 3MM

Genaxxon BioScience, Ulm

Ampicillin, Albumin Fraction V (pH 7,0), TEMED, Agarose LE

J.T. Baker, München

Ethanol, Methanol, Isopropanol, Essigsäure, Salzsäure, Schwefelsäure

Macherey-Nagel, Düren

NucleoBond PC 500

Merck Chemicals, Darmstadt

Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-30 membrane, Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-30 membrane

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromid, Zymolyase 20 T

New England BioLabs GmbH, Frankfurt

OneTaq[®] DNA Polymerase

Oxoid, Basingstoke, USA

Agar bacteriological

Peqlab, Erlangen

PeqGOLD Prestained Protein Marker III

PerkinElmer, Waltham, USA

OptiPlate-96

Promega, Mannheim

Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System

Qiagen, Hilden

Ni-NTA-Agarose, Factor Xa Protease 400 U

Roche Diagnostics, Mannheim

cOmplete EDTA-free Proteaseinhibitor, Pyruvatkinase, *E.coli*-tRNA

Roth, Karlsruhe

LB-Medium, Milchpulver blotting grade, Rotiphorese[®] Blau R, Rotiphorese[®] Gel 40, 2-Mercaptoethanol, Dialysierschlauch Visking, Natriumazid, alle weiteren nicht aufgeführten Chemikalien

Sartorius, Göttingen

Cellulose-Acetat Filter 0,2 µm

Sigma Aldrich, München

Biotin, Natriumformiat, Lithiumacetat, Eisensulfat Heptahydrat, Imidazol, 6-Aminocaprylsäure, Brij 78, CHAPS, Cobaltchlorid, Magnesiumacetat, Natriumiodid, Zinkchlorid, Polyoxyethylenglycol 8000, Polyoxyethylenglycol 2000, Harnstoff, L-Asparagin, L-Arginin, L-Cystein, L-Glutamin, L-Lysin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Aspartat, Adenin, Uracil, L-Thyrosin, L-Tryptophan, L-Threonin, L-Alanin, L-Glutamat, L-Prolin, L-Serin, Coomassie G250, IPTG, Antifoam Y30, Digitonin, *Glassbeads* (säuregewaschen)

Süd-Laborbedarf, Gauting

Hi Yield[®] Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit

Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Slide-A-Lyzer Dialysis Casette MWCO 10 kDa 3 ml, Pierce cell surface protein isolation Kit, Restriktionsendonukleasen, RiboLock RNase Inhibitor, dNTPs, T4-DNA-Ligase

2.2 Geräte

Beckman Coulter, Krefeld

Optima™ XL-80 K Ultrazentrifuge, Rotor 50.2 Ti, Rotor SW 60 T

DNA Sequencer CEQ™ 8000

Bio-Rad, München

Power Pac 200, Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell

BioSpec Products, Bartlesville, USA

Beadbeater

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

BioPhotometer, Innova U535

GE Healthcare, Freiburg

Äkta Purifier 10, Superdex 200 10/300 GL

Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Wasserbad

Heraeus Holding, Hanau

Multifuge 1S-R, Kelvitron T (Brutschrank)

Infors HT, Bottmingen

Brutschrank Minitron

Jasco, Gross-Umstadt

Stopped-Flow BioLogic: Software BioKine Ver 4.42, Küvette

FC-08, Lichtbox mit 150 W Xe(Hg)-Lampe, Mikroprozessor Unit MPS- 60,

Mischeinheit SFM-300, UV/Vis-und Fluoreszenzspektrometer MOS-200, Monochromator

BH-10-61UV, Photomultiplier PMS 250, Spannungsquelle ALX 250

Keison International, Essex, UK

Grant Bio PTR-30 360 Degree Vertical Multi-Function Rotator

Molecular Devices

ImageXpress® Micro XLS Hochdurchsatzmikroskop

PerkinElmer, Waltham, USA

Fluorimeter LS 55

Peqlab, Erlangen

Primus (HT) PCR-Blöcke, SDS-Gelgießstand und Laufkammer, Perfect Spin 24R, Perfect Spin 24Plus

Raytest, Straubenhardt

Gel-Dokumentations-System IDA

Roche Diagnostics, Mannheim

Bild-Dokumentationssystem Lumi Imager™ F1

Savant Instruments, Farmingdale, USA

Vakuumentrifuge DNA SpeedVac® DNA 110

Sartorius AG, Göttingen

BIOSTAT® APlus

Scientific Industries, Bohemia, USA

Vortex®-Genie 2

Schott Instruments, Mainz

Digital-Labor-pH-Meter Lab 850

Thermo Scientific, Schwerte

Hochdruck-Homogenisator French Press cell disrupter FA-078

2.3 Plasmide

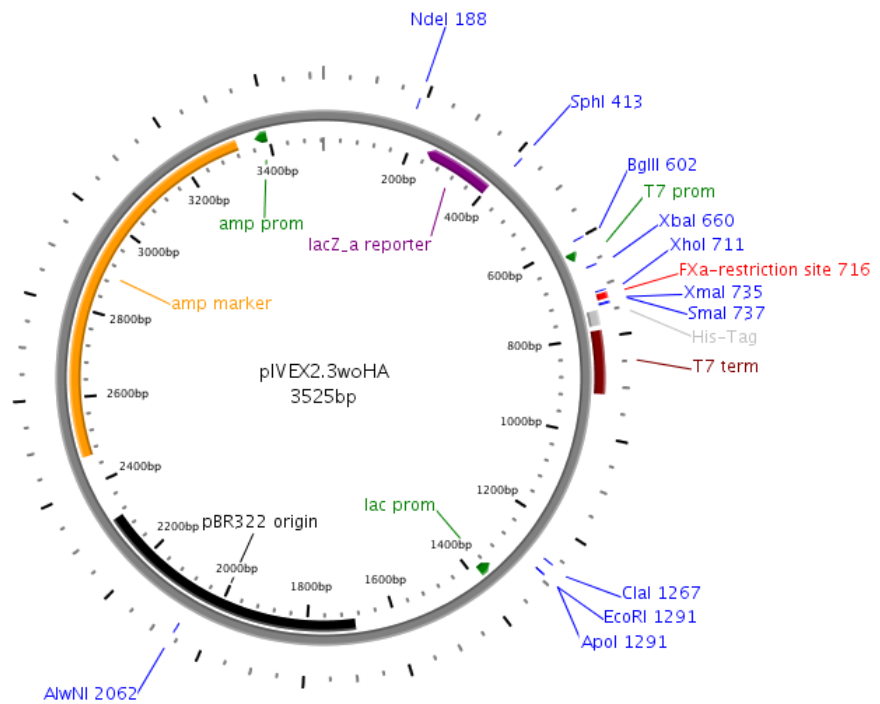


Abb. 2.1: pIVEX2.3woHA

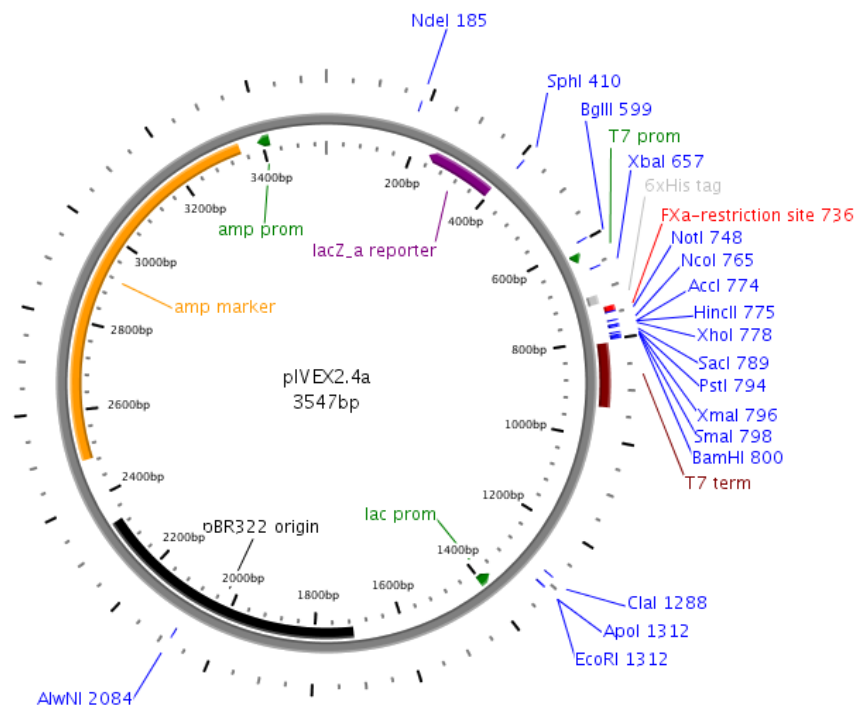


Abb. 2.2: pIVEX2.4a

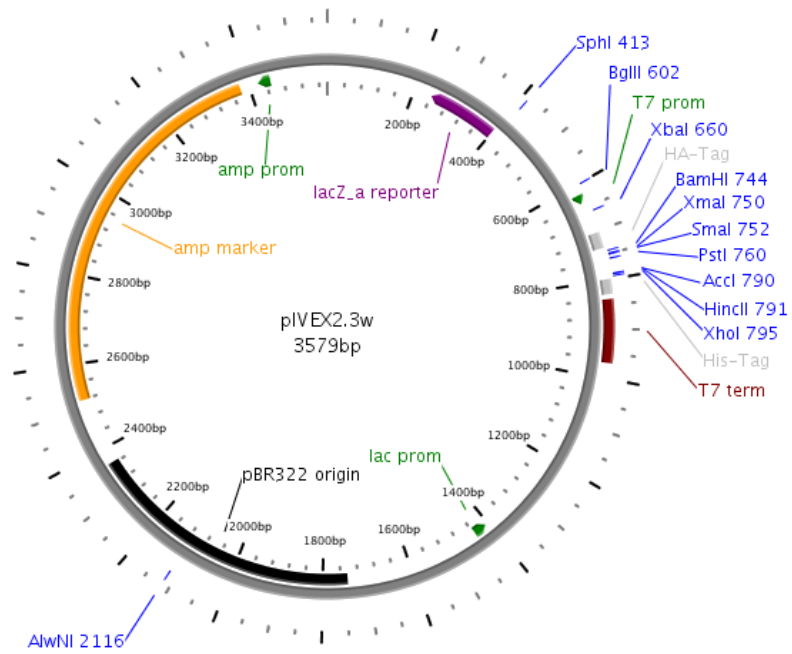


Abb. 2.3: pIVEX2.3w

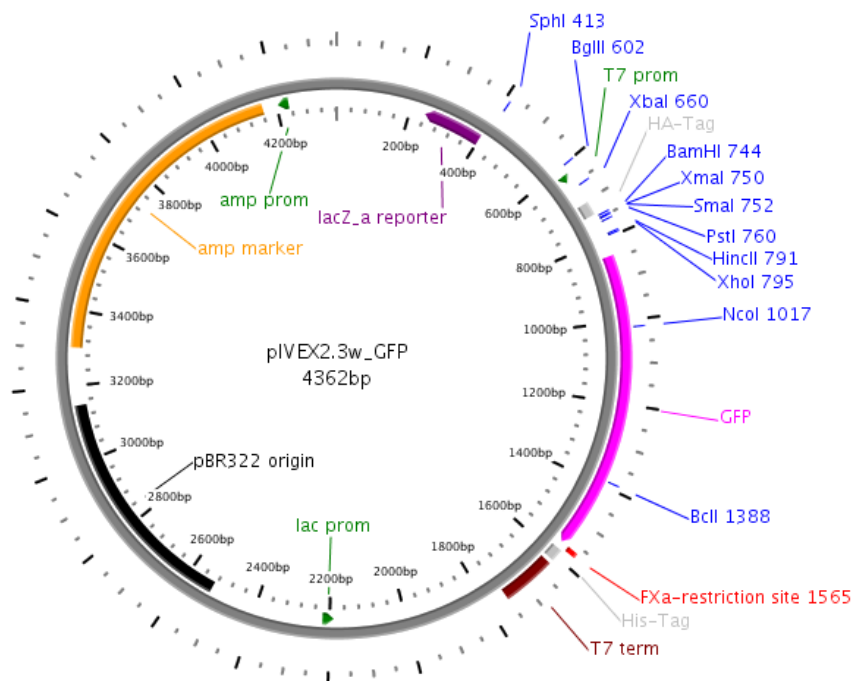


Abb. 2.4: pIVEX2.3w_GFP

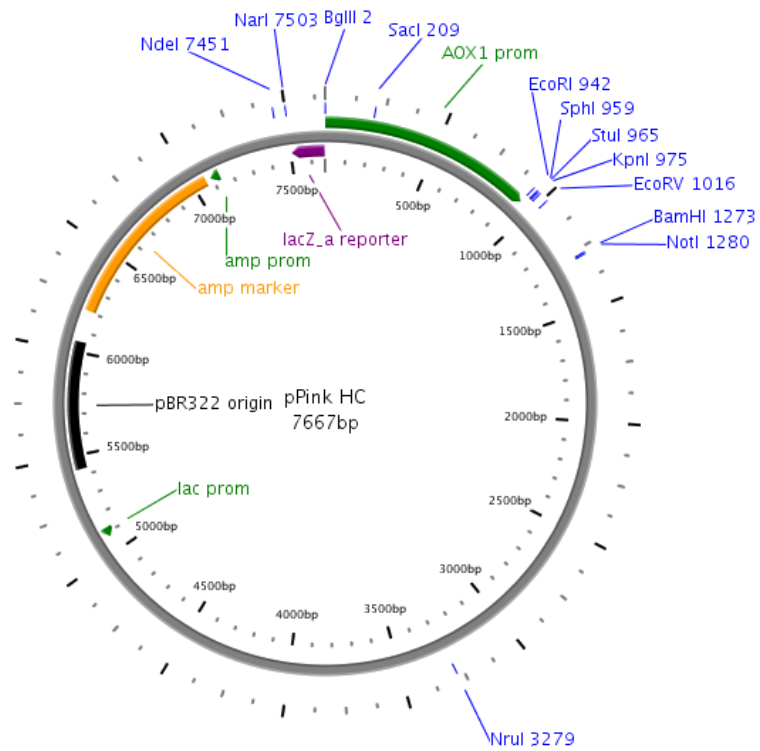


Abb. 2.5: pPink HC

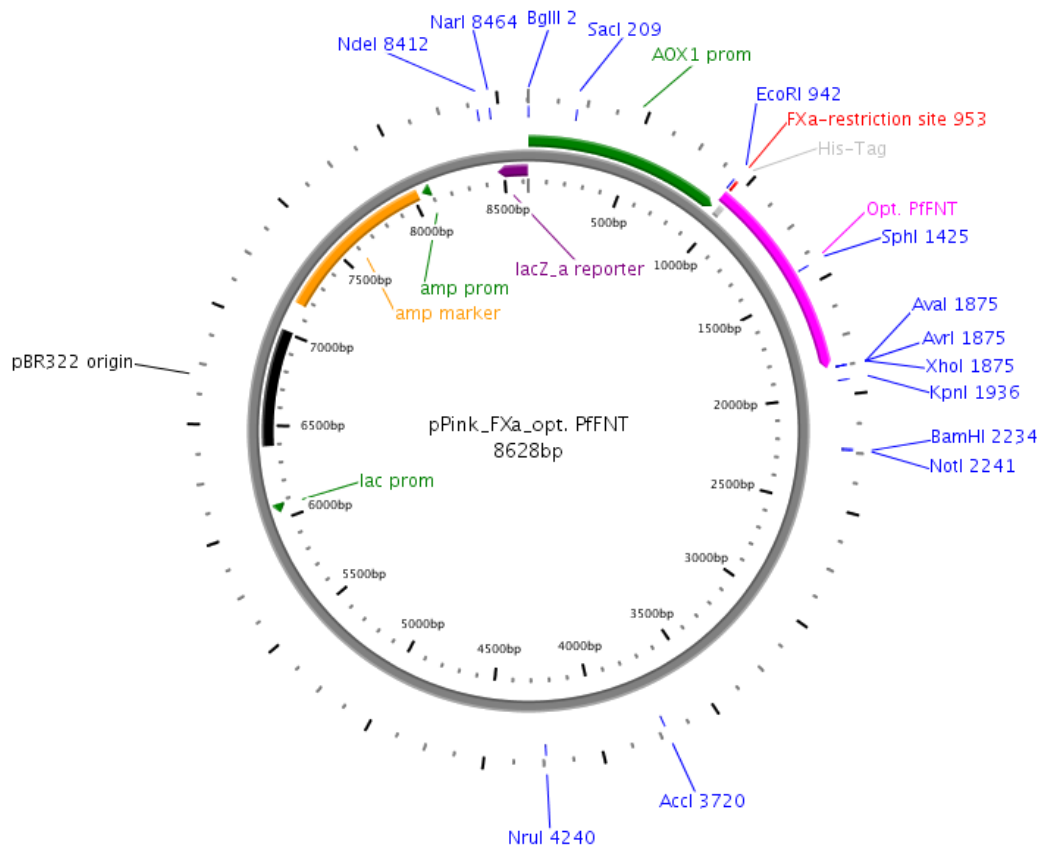


Abb. 2.6: pPink_FXa_opt. PffNT

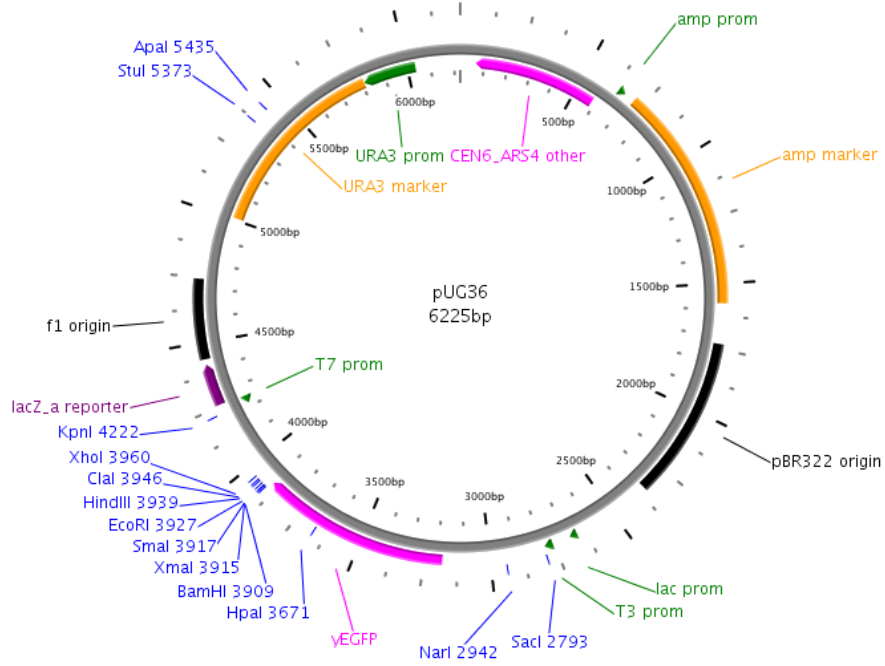


Abb. 2.7: pUG36

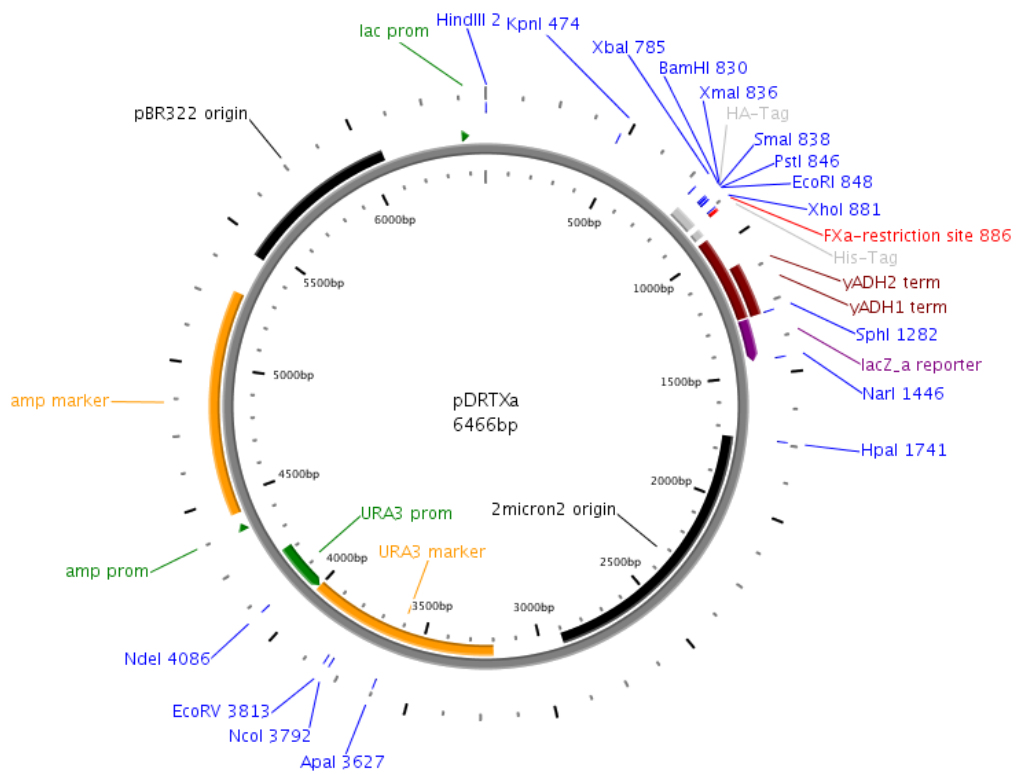


Abb. 2.8: pDRTXa

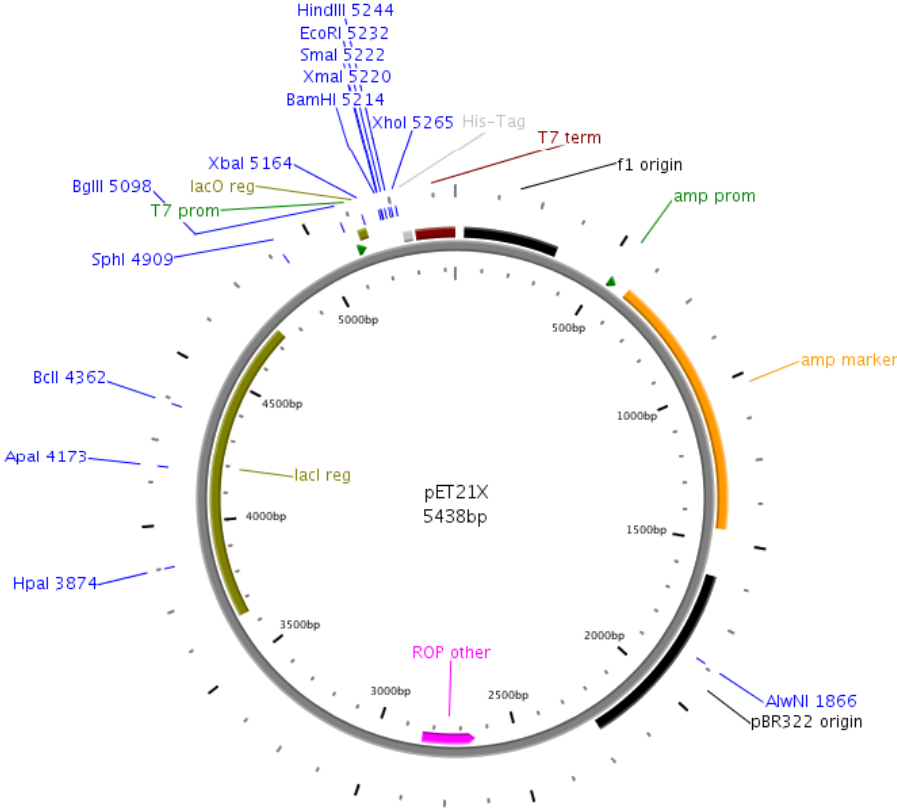


Abb. 2.9: pET21X

2.4 Codierende DNA Sequenzen

Name	Beschreibung	Gene ID
<i>PfFNT</i>	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>P. falciparum</i>	814480
<i>PfAQP</i>	Aquaglyceroporin aus <i>P. falciparum</i>	810885
<i>EcFocA</i>	Formiat-Kanal A aus <i>E. coli</i>	945513
<i>Pf70 (Pf11295c)</i>	putativer Monocarboxylattransporter aus <i>P. falciparum</i>	813539
<i>Pf75 (PfB0465c)</i>	putativer Monocarboxylattransporter aus <i>P. falciparum</i>	812693

2.5 Primer/Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
Opt. <i>PfFNT</i> _XhoI_s	GGC CTC GAG ATG CCT CCC AAC AAC TCG AAA TAT G
Opt. <i>PfFNT</i> _NotI_s	TTA GCG GCC GCA TGC CTC CCA ACA ACT CGA AAT
GFP_oM_XhoI_s	GGC CTC GAG AAC CAC ATG AGT AAA GGA GAA
GFP_oM_XmaI_as	GGC CCC GGG TTT GTA TAG TTC ATC CAT
pIVEX2.3_linker_s	CTA GAA ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA CGA CTA GTC TCG AGA TCG AAG GTC GTC GGC CGC CCG GGA
pIVEX2.3_linker_as	TCG ATC CCG GGC GGC CGA CGA CCT TCG ATC TCG AGA CTA GTC GTA TGT ATA TCT CCT TCT TAA AGT TAA ACA AAA TTA TTT
Opt. <i>PfFNT</i> _SpeI_ΔN_s	AAC ACT AGT ATG GGC AAG AAG AAA GCC CAT T
Opt. <i>PfFNT</i> _NotI_ΔN_s	ATA GCG GCC GCA TGG GCA AGA AGA AAG CCC ATT
pIVEX2.4_inker_as	GGC CGC GGC CTT CGA TGC CGC TCC CGG GCT CGA GGC TAT GAT GAT GAT GAT GAT GAG AAC CAG ACA TGG TAT ATC TCC TTC TTA AAG TTA AAC AAA ATT ATT T
pIVEX2.4_linker_s	CTA GAA ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC CAT GTC TGG TTC TCA TCA TCA TCA TCA TCA TAG CCT CGA GCC CGG GAG CGG CAT CGA AGG CCG C
Opt. <i>PfFNT</i> _XhoI_ΔC_as	CGG CTC GAG GTG TTC TTT GTA AAT GAA ATA
Opt. <i>PfFNT</i> _BamHI_ΔC_as	GCC GGA TCC TA GTG TTC TTT GTA AAT GAA ATA CAG
GFP_oM_XmaI_as	GGGCCCCGGGTTTGTATAGTTCATCCAT
Opt. <i>PfFNT</i> _BamHI_stp_as	TTT GGA TCC TAT TAC TAG TTG CGC AGT TCA ATG CTC
Opt. <i>PfFNT</i> _BamHI_ΔC_stp_as	GCC GGA TCC TAT TAC TA GTG TTC TTT GTA AAT GAA AT
<i>EcFocA</i> _BamHI_M_s	GCC GGA TCC ATG AAA GCT GAC AAC CCT TTT GAT
<i>EcFocA</i> _XhoI_as	GTT CTC GAG ATG GTG GTC GTT TTC ACG CAG

Opt. PffNT_BamHI_M_s	GAT GGA TCC ATG CCT CCC AAC AAC TCG AAA TAT G
pPink_linker_s	AAT TCC CCG GGA TCG ACT CGA GAT CGA AGG TCG TCA CCA CCA TCA TCA TCA CCA CCA TCA TCA TTA ATA GTG AGG TAC
pPink_linker_as	CTC ACT ATT AAT GAT GAT GGT GGT GAT GAT GAT GGT GGT GAC GAC CTT CGA TCT CGA GTC GAT CCC GGG G
Opt. PffNT_Xma_s	ATA CCC GGG ATG CCT CCC AAC AAC TCG A
Opt. PffNTHis_KpnI_as	ATA GGT ACC CTC AAT GAT GAT GAT GGT GGT G
Opt. PffNTHis_EcoRI_s	GCA GAA TTC ATG CCT CCC AAC AAC TCG
pPink-Fxa_his_s	TCG AGA TCG AAG GTC GTC ACC ACC ACC ACC ACC ACC ATC ATC ATC ATT GAT AAT AGG GTA C
pPink-Fxa_his_as	CCT ATT ATC AAT GAT GAT GAT GGT GGT GGT GGT GGT GGT GAC GAC CTT CGA TC

Sequenzierprimer

Bezeichnung	Sequenz	Sinn
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	s
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	as
T3 neu	GTG TAA GTT GGT ATT ATG TAG	as
AOX1	CGA CTG GTT CCA ATT GAC AAG C	s
CYC1	GGA GGG CGT GAA TGT AAG CG	as
pIVEX2.4a_Sequ_as	GCT AGT TAT TGC TCA GCG GTG	as
pIVEX2.3oHA_Sequ_as	CAG CCA ACT CAG CTT CCT TT	as
pIVEX2.4a_GFP_Sequ_as	CCG CAC ACG CTT TTG ATA GA	as
Sequ_PffNT_2.4a_GFP_s	AGC TGC TGG GAT TAC ACA TG	s
T7-Terminator_pET21X	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	as

2.6 *E. coli*-Stämme

Name	Genotyp
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)
BL21(DE3)pRep4	F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3) pRep4 (neo)
DH5α	F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>

2.7 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Name	Genotyp	Quelle
W303-1A Δ <i>jen1</i> Δ <i>ady2</i>	Δ <i>jen1</i> Δ <i>ady2</i> (MATa, <i>can1-100</i> , <i>ade2-1^{oc}</i> , <i>his3-11-15</i> , <i>leu2-3,-112</i> , <i>trp1-1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>jen1::kanMX4</i> , <i>ady2::hphMX4</i>)	M. Casal

2.8 *P. pastoris*/ *Komagataella phaffii*-Stämme

Name	Genotyp	Quelle
PichiaPink™ Strain 1	Δ <i>ade2</i>	Invitrogen

2.9 Antikörper

Primärantikörper	Beschreibung	Verdünnung
Penta His	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen 5 x Histidin gerichtet; Qiagen	1:5.000 in MTBST
HA 12CA5	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen YPYDVPDYA gerichtet; Roche	1:5.000 in MTBST
GFP (FL)	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen GFP gerichtet; Santa Cruz	1:10.000 in MTBST
PfFNT	polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen NDAQMKSLSIELRN gerichtet; Biogenes	1:1.000 in MTBST
T7-RNA-Polymerase	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen die T7-RNA-Polymerase gerichtet; Novagen	1:5.000 in MTBST
Sekundärantikörper	Beschreibung	Verdünnung
Anti-Maus	polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen die leicht Seitenkette des Maus IgG, Merrettich-Peroxidase konjugiert; Jackson ImmunoResearch, UK	1:5.000 in MTBST
Anti-Kaninchen	polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen das Kaninchen IgG, Merrettich-Peroxidase konjugiert; Jackson ImmunoResearch, UK	1:5.000 in MTBST

2.10 Puffer, Medien, Lösungen

Molekularbiologie:

Agarose-Gel-Elektrophorese:

TAE-Puffer:

40 mM Tris-Acetat, pH 8,0
1 mM EDTA

Ethidiumbromid (10 mg ml⁻¹):

1 Tablette Ethidiumbromid
10 ml *Aqua bidest.*

10 x Probenpuffer (Orange G):

0,4 % Orange G
30 % Glycerol
100 mM EDTA

***E. coli* Medien:**

LB-Medium:

20 g LB-Medium (Lennox)
1 l *Aqua bidest.*

LB-Agar:

35 g LB-Agar
1 l *Aqua bidest.*

ggf. Ampicillin 100 µg/ml

ggf. Kanamycin 40 µg/ml

***S. cerevisiae* Medien:**

YPD:

20 g Pepton
10 g Hefeextrakt
20 g Glucose
ad 1 l mit *Aqua bidest.*

SD-Medium:

1,7 g YNB
5 g Ammoniumsulfat
20 g Glucose
ad 1 l mit *Aqua bidest.* pH 5,6

YPD-Platten:

20 g Oxoid Agar
1 l YPD

SD-Platten:

20 g Oxoid Agar
1 l SD-Medium

Material

SD-AHLW:

nach dem Abkühlen wurden hinzugefügt:

Adenin 25 mg ml⁻¹

L-Histidin 20 mg ml⁻¹

L-Leucin 100 mg ml⁻¹

L-Tryptophan 10 mg ml⁻¹

***P. pastoris* Medien:**

BMGY:

1 % Hefeextrakt

2 % Pepton

1,34 % YNB

1 % Glycerol

100 mM K₂HPO₄ /KH₂PO₄, pH 6,0

Zellysepuffer (genomische DNA):

0,2 M Lithiumacetat

1 % SDS

PTM Trace Salts:

6,0 g Kupfersulfat Pentahydrat

0,08 g Natriumiodid

3,0 g Mangansulfat Dihydrat

0,2 g Natriummolybdat Dihydrat

0,02 g Borsäure

0,5 g Kobaltchlorid

20,0 g Zinkchlorid

65,0 g Eisen(II)sulfat Heptahydrat

0,2 g Biotin

5,0 ml Schwefelsäure

ad 1 l mit *Aqua bidest.*

SD-AHLW-Platten:

20 g Oxoid Agar

1l SD-Medium

nach Abkühlen auf ca. 50 °C:

Adenin 25 mg ml⁻¹

L-Histidin 20 mg ml⁻¹

L-Leucin 100 mg ml⁻¹

L-Tryptophan 10 mg ml⁻¹

BMMY:

1 % Hefeextrakt

2 % Pepton

1,34 % YNB

0,5 % Methanol

100 mM K₂HPO₄ /KH₂PO₄, pH 6,0

YPDS:

20 g Pepton
 10 g Hefeextrakt
 20 g Glucose
 182 g Sorbitol
 ad 1 l mit *Aqua bidest.*

Proteinchemie:**SDS-PAGE:**Kathodenpuffer:

25 mM Tris-HCl, pH 8,2-8,6
 192 mM Glycin
 0,1 % SDS

Trenngelbuffer 4 x:

1,5 M Tris, pH 8,8
 0,4 % SDS

Entfärbelösung:

10 % Eisessig
 30 % Ethanol

Western Blot:TBS 10 x:

0,2 M Tris-HCl, pH 7,6
 1,35 M NaCl

TBST:

100 ml TBS 10 x
 1 ml Tween 20
 ad 1 l mit *Aqua bidest.*

Basal Salt Medium:

40,05 ml Phosphorsäure 85 %
 1,395 g Calciumsulfat
 27,3 g Kaliumsulfat
 22,35 g Magnesiumsulfat Heptahydrat
 6,195 g Kaliumhydroxid
 60,3 ml Glycerol 99,5 %
 ad 1,5 l mit *Aqua bidest.*

SDS-Ladepuffer 4 x:

250 mM Tris-HCl, pH 6,8
 40 % Glycerol
 0,02 % Bromphenolblau
 8 % SDS
 400 mM DTT

Sammelgelbuffer 4 x:

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
 0,4 % SDS

M-TBST:

3 % Milchpulver in TBST

Transferpuffer 5 x:

5 mM Tris, pH 8,3 (nicht eingestellt)
 38,4 mM Glycin
 0,0075 % SDS
 20 % Methanol

Zellfreie Proteinsynthese:

S30-Puffer:

10 mM Tris-Acetat, pH 8,2
14 mM Magnesiumacetat
0,6 mM Kaliumacetat

Aminosäuremix:

4 mM jeder Aminosäure

HEPES-EDTA-Puffer:

2,5 M HEPES, pH 8,0
0,5 M EDTA

S30 Extrakt:

S30 Puffer A:

10 mM Tris-Acetat, pH 8,2
14 mM Magnesiumacetat
0,6 mM Kaliumchlorid
6 mM β -Mercaptoethanol

S30 Puffer C:

10 mM Tris-Acetat, pH 8,2
14 mM Magnesiumacetat
0,6 mM Kaliumacetat
0,5 mM DTT

Reinigungspuffer:

20 mM Tris-HCl, pH 8,0 (4 °C)
150 mM NaCl
Detergens je nach Methode

RCWMDE:

16,7 mM jeweils von RCWMDE

NTP-Mix:

360 mM ATP
je 240 mM CTP, GTP und UTP

S30 Puffer B:

10 mM Tris-Acetat, pH 8,2
14 mM Magnesiumacetat
0,6 mM Kaliumchlorid
1 mM DTT

2 x YTPG-Medium:

14,95 g KH_2PO_4
45,65 g K_2HPO_4
50 g Hefeextrakt
80 g Bactotrypton
25 g NaCl
99 g Glucose
500 μl Antifoam Y-30
ad 5 l mit *Aqua bidest.*
pH 7,0 (nicht eingestellt)

T7-RNA-Polymerase:

T7 Puffer:

30 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
50 mM NaCl
5% Glycerol
10 mM β -Mercaptoethanol

T7 Puffer II:

30 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
20 mM NaCl
5% Glycerol
10 mM β -Mercaptoethanol

T7-Dialysepuffer:

10 mM Tris-HCl, pH 8,0
1 mM EDTA
10 mM NaCl
1 mM DTT

Proteoliposomen

Präparationspuffer:

20 mM HEPES, pH 6,8

Substratpuffer:

20 mM HEPES, pH 6,8
40 mM Acetat, Formiat oder L-Laktat,
als Natriumsalze

Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *S. cerevisiae* und *P. pastoris*

Puffer B:

25 mM Tris-HCl, pH 7,5
5 mM EDTA

Puffer M:

100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0
50 mM NaCl

Solubilisierungspuffer *P. pastoris* und *E. coli*:

20 mM Tris-HCl, pH 8,0 (4 °C)
150 mM NaCl
10 % Glycerol
Detergens, siehe 3.2.3

Material

Faktor Xa-Reaktions-Puffer:

20 mM Tris-HCl, pH 6,5

50 mM NaCl

1 mM CaCl₂

0,05 % DDM

PBS:

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

auf pH 7,4 eingestellt

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde zur Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten sowie zur Abschätzung der Konzentration verwendet.

Das Agarosegel wurde aus 50 ml TAE-Puffer und 1 % Agarose hergestellt und zum Lösen der Agarose kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Zur späteren DNA-Interkalation wurde 1 μ l Ethidiumbromid (10 mg ml⁻¹) zugegeben. Nach der Aushärtung des Gels in der Gelkammer wurde dieses in die Laufkammer mit TAE-Puffer überführt. Die DNA-Proben wurden anschließend mit dem Ladepuffer vereinigt und bis zu 20 μ l der DNA in die Probenaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte entsprechend ihrer Größe bei 120 V für 20 bis 30 Minuten.

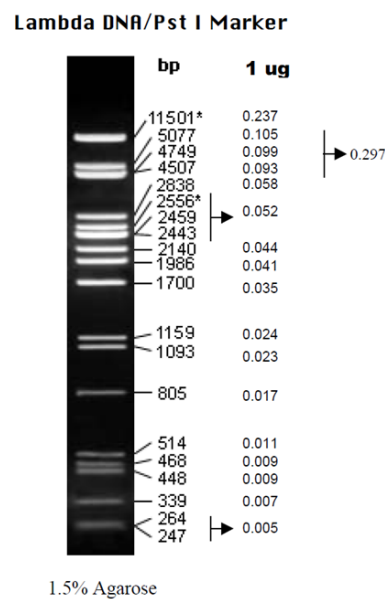


Abb. 3.1: λ -DNA für die Agarose-Gel-Elektrophorese, verdaut mit *Pst* I.

Der Abgleich der Größen des DNA-Fragments erfolgte über den λ -DNA-Pst I Marker (Abb. 3.1). Die DNA-Banden konnten durch die Interkalation des Ethidiumbromids in die DNA bei 366 nm zur Fluoreszenz angeregt werden. Einzelne Fragmente wurden mit einem Skalpell ausgeschnitten und für die weitere Verwendung mit dem Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit gereinigt.

3.1.2 DNA-Reinigung und Isolierung

Die Isolierung der DNA aus *E. coli* zur Gewinnung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System in Form einer Minipräparation. Hierfür wurde ein Klon in 5 ml frisches LB-Medium mit Selektionsantibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde für die Durchführung nach Herstellerangaben eingesetzt. Abweichend

vom Protokoll wurden folgende Schritte verändert: Die Zugabe der alkalischen Protease wurde hierbei nicht durchgeführt und die Elution erfolgte in 50 µl statt 100 µl *Aqua bidest.*

Für die Gewinnung größerer DNA-Mengen wurde eine Maxipräparation mit dem NucleoBond PC 500-Kit durchgeführt. Anstelle einer 5 ml Übernachtkultur, wurde zunächst eine 5 ml Vorkultur für ca. 8 Stunden bei 37 °C inkubiert und diese dann in 250 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum überführt. Diese Inkubation wurde ebenfalls bei 37 °C über Nacht durchgeführt. Die 250 ml wurden für die Maxipräparation nach Herstellerangaben eingesetzt und die gewonnene DNA nach dem Trocknen in 50 bis 200 µl *Aqua bidest.* gelöst.

Die Reinigung der DNA war nach der Auftrennung in einem Agarose-Gel sowie dem Verdau in einem Puffer notwendig. Die Abtrennung der Salze, der Agarose und des Ethidiumbromids erfolgte mit dem Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit entsprechend des Herstellerprotokolls. Für die Elution wurden 15-25 µl *Aqua bidest.* eingesetzt.

3.1.3 Konzentrationsbestimmungen aus DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration war notwendig, um die gewünschten DNA-Mengen für die Restriktionsverdau und Schnelltransformationen einsetzen zu können. Die Konzentrationen wurden mit dem BioPhotometer (Innova U535) über die Absorption bei 260 nm gemessen. Die Berechnung aus der Absorption erfolgte dabei über folgende Formel:

$$c (\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}) = A_{260 \text{ nm}} \cdot f \cdot \text{Verdünnung}$$

$f = 0,04$ für Doppelstrang-DNA, Plasmide

$f = 0,02$ für Einzelstrang-DNA, RNA und Oligonukleotide

Die Reinheit wurde über das Verhältnis von A_{260} zu A_{280} quantifiziert, da bei 280 nm verunreinigende Proteine erfasst werden. Ein Verhältnis über 1,8 wurde als ausreichend und für die weitere Verwendung geeignet angesehen.

3.1.4 Restriktionsverdau

Restriktionsverdau wurden in einem möglichst kleinen Volumen von 10-20 µl durchgeführt. Pro Verdau wurde 1 µg DNA, sowie 5-8 U des Enzyms eingesetzt und für 2-3 h bei 37 °C in dem vorgegebenen Restriktionspuffer inkubiert. Doppelverdau mit zwei Enzymen zur selben Zeit wurden in kompatiblen Puffern vorgenommen. Der Verdau mit *Sma* I erfolgte bei 30°C.

3.1.5 Dephosphorylierung

Das Dephosphorylieren war bei einigen Klonierungen notwendig, um eine Religation des geschnittenen Plasmids zu verhindern. Für die Dephosphorylierung wurde die *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) verwendet, später auch die Fast Alkaline Phosphatase (FastAP). Das verdaute

Plasmid wurde mit 1 U CIAP versetzt und 60 min bei 37 °C inkubiert. Bei Verwendung der FastAP wurde die Inkubation für 10 min bei 37 °C durchgeführt.

3.1.6 Ligation

Die Ligationen wurden mit der T4-DNA-Ligase im empfohlenen Puffer bei Raumtemperatur für 25 min durchgeführt. Das Verhältnis zwischen *insert* und Vektor betrug in der Regel 3:1, für *blunt*-Klonierungen wurde der Anteil des *inserts* auf 5:1 erhöht.

3.1.7 Transformation von *E. coli*

Für die Transformation der chemisch kompetenten *E. coli* Zellen (3.1.16) wurden die ligierten Plasmide zu 100 µl auf Eis aufgetauten Zellen pipettiert und für 30 min auf Eis, 1 min bei 42 °C und erneut 2 min auf Eis inkubiert. Zu den 100 µl Zellen wurden 900 µl LB-Medium hinzugefügt und eine rotierende Inkubation bei 37 °C für 45 min angeschlossen. Nach einer 30 sekündigen Zentrifugation bei 13.000 g wurden 900 µl des Überstands verworfen und die übrigen 100 µl nach dem Resuspendieren des Zellpellets auf einer LB Platte mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

3.1.8 Schnelltransformation von *E. coli*

Bei der Schnelltransformation wurden 0,2 µl der gewählten Minipräparationen auf angetaute chemisch kompetente *E. coli* Zellen gegeben und diese für 15 min auf Eis inkubiert. 40 µl dieser Zellen wurden anschließend auf Selektionsplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.9 Transformation von *S. cerevisiae*

Für die Transformation wurden zunächst 10 ml YPD-Medium mit einer einzelnen Kolonie des Stammes inokuliert und über Nacht bei 30 °C und 200 U min⁻¹ inkubiert. Diese Vorkultur wurde am nächsten Tag zum Animpfen der 50 ml YPD-Medium verwendet und diese bis zu einer OD 600 nm von 0,6 bei 30 °C für ca. 4 h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 2.500 g für 5 min gesammelt, mit 25 ml sterilem *Aqua bidest.* gewaschen und in 1 ml *Aqua bidest.* resuspendiert. 100 µl dieser gewaschenen Zellen wurden pro Transformation eingesetzt, in ein Eppendorfgefäß überführt und für 30 sec bei 13.000 g zentrifugiert. Die *single-stranded-carrier* DNA (Lachssperma) wurde vor der Verwendung für 5 min auf 95 °C erhitzt.

Das Zellpellet wurde mit 0,5 µl der Plasmid-DNA und dem Reaktionsmix (Tab. 3.1) versetzt und bei 42 °C für 50 min inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 13.000 g für 30 sec wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml sterilem *Aqua bidest.* resuspendiert. 70 µl dieser Zellsuspension wurden auf SD-AHLW-Platten ausgestrichen und für 4-5 Tage bei 30 °C inkubiert.

Tab. 3.1: Reaktionsmix für die Transformation

PEG 3500 50 % (m/V)	240 µl
<i>single-stranded-carrier-DNA</i>	50 µl
Lithiumacetat 1M	36 µl
<i>Aqua bidest.</i>	33,5 µl

3.1.10 Transformation von *P. pastoris*

Die Plasmid-DNA musste vor der Transformation zuerst mit *Spe I* linearisiert werden. Es wurden 10 µg DNA eingesetzt und wie in 3.1.4 beschrieben über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 12 µl 100 mM EDTA pH 8,0 und 3 µl *Aqua bidest.* gestoppt und mit 6,5 µl 3 M Natriumacetat und 180 µl eiskaltem Ethanol 100 % bei 13.000 g bei 4 °C für 15 min präzipitiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70 %igem Ethanol wurde die DNA final in 10 µl sterilem *Aqua bidest.* resuspendiert.

Wie bereits für *S. cerevisiae* beschrieben, wurde auch für den PichiaPink™ Stamm 1 zunächst eine Vorkultur in YPD-Medium mit frischen Kolonien inokuliert und diese nach der Inkubation für 8-24 h bei 30 °C für das Animpfen der 100 ml Hauptkultur verwendet. Die Hauptkultur wurde über Nacht bis zu einer Ziel-OD₆₀₀ von 1,3-1,5 inkubiert. Die Zellen wurden bei 1.500 g für 5 min geerntet, zunächst in 250 ml und anschließend in 50 ml sterilem kaltem *Aqua bidest.* gewaschen. Es folgte das Resuspendieren in 10 ml 1 M Sorbitol, erneutes Ernten der Zellen und schließlich resuspendieren in 300 µl 1 M Sorbitol. 80 µl dieser elektrokompenten Zellen wurden mit den 10 µl linearisierter und gereinigter DNA vereinigt, 5 min in einer eiskalten Küvette inkubiert und elektroporiert. Hierfür wurden 200 Ω, 2 kV und 25 µF eingestellt und 1 ml eiskaltes YPDS hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 2-4 Stunden wurden zwischen 100 und 300 µl dieser Zellsuspension auf SD-Platten ausgestrichen und erneut für 4-6 Tage bei 30 °C inkubiert. Die weißen Klone wurden auf eine erfolgreiche Transformation und Integration in die genomische DNA geprüft und diese mittels PCR mit den *primern* AOX1 und CYC1 verifiziert.

3.1.11 Dauerkulturen von *E. coli*

Dauerkulturen wurden aus 1 ml frischer Übernachtskultur angelegt und zur Kryoprotektion mit 500 µl 80 % Glycerol versetzt, gevortext und bei -80 °C gelagert.

3.1.12 Dauerkulturen von *S. cerevisiae*

Dauerkulturen von *S. cerevisiae* wurden aus 500 µl frischer Übernachtskultur und 500 µl 80 % Glycerol angelegt, gevortext und bei -80 °C eingefroren.

3.1.13 Dauerkulturen von *P. pastoris*

Aus einer Vorkultur wurden 200 ml BMGY-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 2-3 bei 30 °C und 220 U min⁻¹ inkubiert. Die Zellen wurden bei 1.500 g für 5 min geerntet und in YPD 25 % Glycerol resuspendiert und dabei auf eine OD₆₀₀ von 50-100 konzentriert. Die Aliquots wurden bei -80 °C sofort eingefroren und gelagert.

3.1.14 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde für die Amplifizierung von DNA-Sequenzen, den Nachweis der Integration von Genen in die genomische DNA und das Anfügen von Restriktionsschnittstellen an kodierende Gene/*inserts* genutzt.

Jeder PCR lag ein DNA-*template* zugrunde, bei welchem es sich entweder um ein Plasmid oder genomische DNA handelte. Zudem wurden zwei *primer* eingesetzt, die in dem gewünschten Abschnitt in der *sense* oder *antisense*-Richtung an den DNA-Strang banden. Das Pipettierschema ist in Tab. 3.2 zusammengefasst.

Tab. 3.2: Pipettierschema für die Polymerasekettenreaktion

Plasmid-DNA (Minipräparation)	0,2 µl
Primer sense (25 µM)	0,8 µl
Primer antisense (25 µM)	0,8 µl
OneTaq-Polymerase	0,4 µl
dNTP's (2,5 mM)	4 µl
Polymerasepuffer	10 µl
<i>Aqua bidest.</i>	33,8 µl

Die eingesetzten *primer* wurden jeweils so gewählt, dass sie eine Anlagerungstemperatur von 50-60 °C aufwiesen. Diese wurde mit folgender Formel errechnet:

$$T_m = 60 + 0,41 \text{ GC (\%)} - \left(\frac{600}{N}\right)$$

GC (%): GC-Gehalt in %

N: Anzahl der Basen des *primers*

Alle verwendeten *primer* sind in Abschnitt 2.5 zusammengefasst.

Die Reaktion wurde mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

Tab. 3.3: Temperaturverlauf der Polymerasekettenreaktion

Denaturierung	94 °C	1 min
Zyklen 28-30 x		
Denaturierung	94 °C	15 s
Primeranlagerung	T _m	20 s
Extension	68 °C	70 s
Haltephase (weitere Extension)	68 °C	5 min
Abkühlen & Lagerung	4 °C	

3.1.15 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungs-PCR wurde mit dem GenomeTM Lab DTCS Quick Start Kit durchgeführt. Die Sequenzierung läuft nach der Sanger-Methode mit fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotiden ab, die zu Kettenabbrüchen führen und anschließend entsprechend ihrer Länge mittels Kapillarelektrophorese aufgetrennt werden.

Hierfür wurden 50-150 fmol DNA-*template* (in 9,5 µl) eingesetzt und mit 2 µl DTCS Quick Start Mix und 3 µl *primern* gemischt. Das Verhältnis zwischen *primern* und *template* sollte ≥ 40 sein. Der PCR-Ansatz wurde folgendem Temperaturprotokoll unterworfen:

Tab. 3.4: Temperaturprogramm der Sequenzierungs-PCR

Initiale Denaturierung	86 °C	5 min
Zyklen 30 x		
Denaturierung	96 °C	20 s
Primeranlagerung	50 °	20 s
Extension	60 °C	4 min
Abkühlen & Lagerung	8 °C	

Die PCR-Reaktion wurde anschließend mit einer Stopplösung aus 2 µl 3 M Natriumacetat, 100 mM Na₂-EDTA (2 µl) und 1 µl Glycogen (20 mg ml⁻¹) beendet und mit 100 % Ethanol gefällt, 70 % Ethanol gewaschen und schließlich in 20-30 µl *sample loading solution* resuspendiert.

Die kapillarelektrophoretische Auftrennung erfolgte mit dem Beckman DNA Sequencer CEQTM 8000 und den GenomeLab Separationskapillaren von Beckman Coulter.

3.1.16 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen wurde nach der Calciumchlorid-Methode durchgeführt. Ein DH5 α -Klon wurde von einer frischen LB-Platte gepickt und zum Inokulieren von 5 ml LB-Medium verwendet. Diese Vorkultur wurde für 8-10 h bei 37 °C bei 200 U min⁻¹ inkubiert und anschließend in 100 ml LB-Medium überführt. Die Hauptkultur wurde bei 20 °C und 200 U min⁻¹ über Nacht bis zu einer Ziel-OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Die Zellen wurden zunächst 10 min auf Eis gekühlt, bei 2.000 g 10 min 4°C geerntet, in 30 ml 0,1 M CaCl₂ hinzugefügt, 10 min auf Eis gelagert und resuspendiert. Nach der erneuten Inkubation auf Eis für 10 min wurde der gesamte Prozess mit 20 ml 0,1 M CaCl₂ wiederholt. Einer 20 minütigen Inkubation auf Eis folgte eine Resuspendierung in 10 ml 0,1 M CaCl₂ mit 20 % Glycerol und eine mindestens 4-stündige Lagerung auf Eis. Die kompetenten Zellen wurden schließlich in 100 μ l Aliquots bei -80 °C gelagert. Die Effizienz wurde mittels einer Transformation mit 1 ng Plasmid-DNA ermittelt und ab einer Transformationseffizienz von 10⁶ KBE μ g⁻¹ als geeignet angesehen.

3.1.17 Herstellung von Protoplasten aus *S. cerevisiae*

Eine Kolonie von einer frischen SD-AHLW-Platte wurde zum Inokulieren von 200 ml Selektionsmedium verwendet und die Kultur bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7-1,0 bei 30 °C und 220 U min⁻¹ geschüttelt. Das Ernten der Zellen erfolgte bei 4.000 g für 5 min. Das Zellpellet wurde zunächst mit 25 ml *Aqua bidest.* und anschließend mit 10 ml Puffer I gewaschen und nach einer wiederholten Zentrifugation in 2 ml Puffer I resuspendiert. In diesem Puffer wurden die Zellen für 15 min bei 30 °C und 90 U min⁻¹ inkubiert, 1 mg Zymolyase 20T, 100 mg BSA und 4 ml Puffer II zugefügt und weitere 60 min bei 30 °C geschüttelt. Bei 900 g wurden die Protoplasten für 5 min zentrifugiert, in 10 ml Puffer III gewaschen und schließlich in 2 ml Puffer III resuspendiert und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert.

3.1.18 Isolierung der genomischen DNA aus *P. pastoris*

Die Isolierung der genomischen DNA wurde nach dem Protokoll von Lööcke *et al.* [184] durchgeführt. 1-3 Klone wurden in 100 μ l 0,2 M Lithiumacetat mit 1 % SDS resuspendiert und 5 min auf 70 °C erhitzt. Es folgte die Zugabe von 300 μ l eiskaltem 100 % Ethanol zur DNA-Fällung und zweimaliges Waschen mit 70 % Ethanol. Nach dem Trocknen in der Vakuumzentrifuge wurde die DNA in 50 μ l *Aqua bidest.* resuspendiert und Zelltrümmer bei 13.000 g für 15 s entfernt. 2 μ l der genomischen DNA wurden für die PCR eingesetzt.

3.1.19 Generierung eines terminal verkürzten *Pf*FNT DNA-Fragments

Für die verkürzte Version wurde mittels PCR zunächst die codierende DNA-Sequenz auf Grundlage des opt. *Pf*FNTs so verkürzt, dass N-terminal 90 Basen und C-terminal 72 Basen nicht amplifiziert wurden. Diese verkürzte DNA-Sequenz wurde über die Schnittstellen Not I und BamH I in den Vektor pIVEX2.4a ligiert. Folglich konnte aus dieser DNA das Δ N Δ C*Pf*FNT hergestellt werden, welches um

54 Aminosäuren verkürzt war. Der Topologie Plot des *Pf*FNTs und die Positionen der Verkürzung in der Proteinsequenz sind in Abb. 3.2 dargestellt.

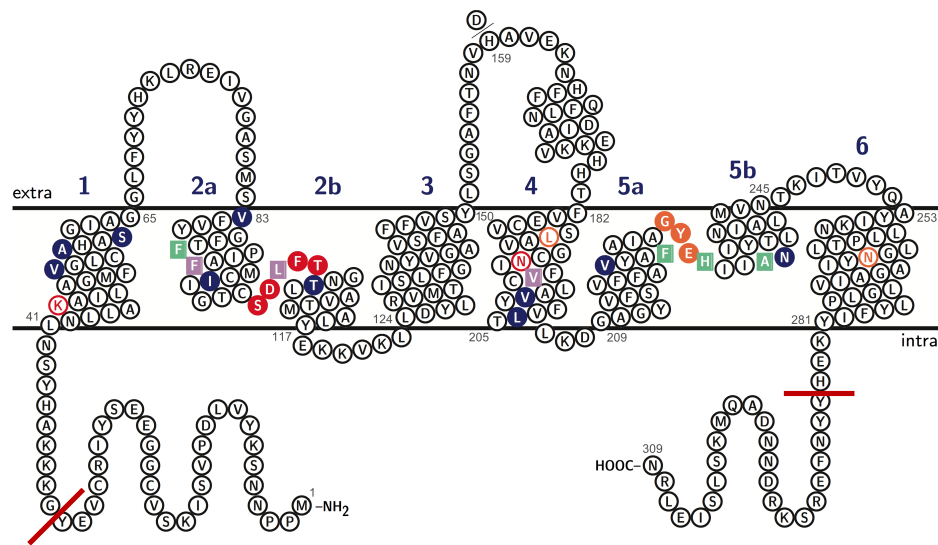


Abb. 3.2: Topologie Plot des *Pf*FNTs [42]. Die Verkürzung des Δ N Δ C*Pf*FNTs ist an dem neuen N- und C-Terminus gekennzeichnet.

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *S. cerevisiae* und *P. pastoris*

Für die Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *S. cerevisiae* wurden 100 ml SD-AHLW-Medium mit einer Kolonie angeimpft und bei 30 °C und 220 U min⁻¹ bis zu einer OD₆₀₀ von 1 inkubiert und bei 4000 g für 5 min geerntet. Das Zellpellet wurde in 50 ml *Aqua bidest.* und 1 ml Puffer B gewaschen.

Bei *P. pastoris* wurden 200 ml BMGY inokuliert und bei einer OD₆₀₀ von 2 bei 1.500 g für 5 min geerntet, in 40 ml BMMY resuspendiert und für weitere 32-38 h inkubiert. Diese 40 ml wurden für die Isolierung eingesetzt.

Die Zellpellets wurden mit 1 ml (*S. cerevisiae*) oder 2 ml (*P. pastoris*) Puffer B resuspendiert und die gleiche Menge säuregewaschene Glaskügelchen hinzugefügt. Die Zellruptur wurde durch 10 x 30 s vortexten mit 30-60 s Pausen auf Eis durchgeführt.

Größere Mengen der *P. pastoris* Zellen wurden mit dem Beadbeater aufgeschlossen. Hierfür wurden 80 g Zellen mit 50 ml Puffer B resuspendiert, 200 ml gewaschene eiskalte Glaskügelchen zugefügt und mit eiskaltem Puffer B aufgefüllt, sodass ein möglichst geringes Luftvolumen in dem Becher verblieb. Das Vortexten wurde in diesem Fall durch das automatisierte Rühren unter Eiskühlung für 12 x 30 s ersetzt.

Die Zelltrümmer wurden bei 1.000-5.000 g für 5 min bei 4 °C entfernt, mit 0,5 bis 1 ml Puffer B gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und bei 100.000 g für 40 min

4 °C zentrifugiert, die mikrosomale Fraktion wurde final, falls nicht für die Solubilisierung vorgesehen, in 100 μ l (*S. cerevisiae*) oder 200 μ l (*P. pastoris*) resuspendiert.

3.2.2 Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *E. coli*

Pro Gramm Zellmasse wurden 5 ml Reinigungspuffer zum Resuspendieren verwendet und in drei Durchgängen mit der *French Press* bei 20.000 psi aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 15.000 g 10 min 4 °C abgetrennt und der Überstand bei 150.000 g für 1 h bei 4 °C zentrifugiert. Das Resuspendieren der mikrosomalen Fraktion erfolgte, wenn nicht anders angegeben, mit 1 ml Reinigungspuffer pro Gramm.

3.2.3 Solubilisierung der Membranproteine aus *E. coli* und *P. pastoris*

Das Solubilisieren der Membranproteine erfolgte mit Detergenzien deren Konzentration, wenn nicht anders angegeben, der 10 bis 15-fachen CMC entsprachen.

Für *EcFocA* aus *E. coli* wurden β -OG (7,9 %) und DM (1 %) im Reinigungspuffer verwendet, wobei 1 g Pellet in 1,5 ml Puffer über Nacht rotierend bei 4 °C solubilisiert wurde. Für *P. pastoris* wurden Brij35 (2 %), β -OG (7,9 %), DDM (1 %), DM (1 %), Triton X 100 (2 %), Fos-Cholin 12 (0,7 %) und LDAO (0,5 %) untersucht (Abb. 3.3). Die Pellets der mikrosomalen Fraktion wurden in einem

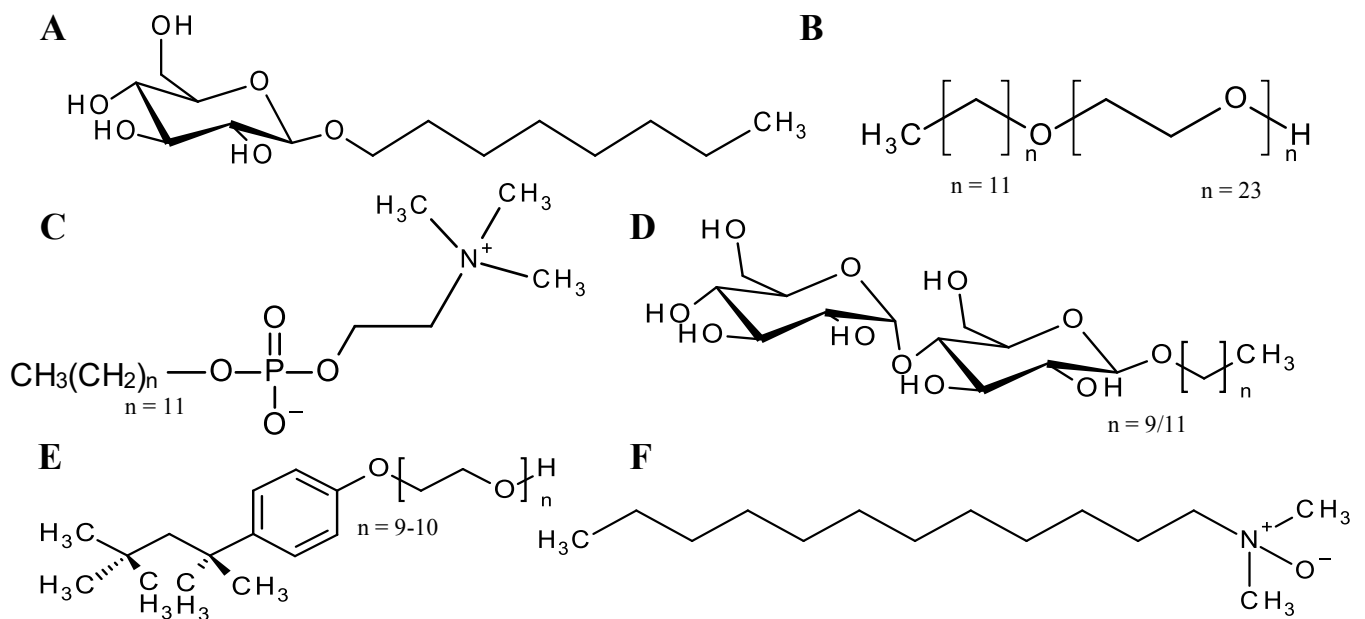


Abb. 3.3: Strukturformeln der verwendeten Detergenzien: β -OG (A), Brij35(B), Fos-Cholin 12 (C), DM/DDM (D), Triton X 100 (E) und LDAO (F)

entsprechendem Volumen Solubilisierungspuffer resuspendiert, dass die Gesamtproteinkonzentration während der Solubilisierung 5-6 mg ml⁻¹ betrug. Diese wurde ebenfalls bei 4 °C über Nacht durchgeführt, allerdings wurde anstelle des Rotators ein Magnetrührer verwendet.

In beiden Fällen wurden die nicht solubilisierten Membranproteine und Membranen in der Ultrazentrifuge abgetrennt (150.000 g, 30 min, 4 °C für *E. coli* und 100.000 g, 40 min für *P. pastoris*).

3.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von Proteinproben entsprechend ihrer Größe. Zur Auftrennung wurden, wenn nicht anders angegeben, 12,5 %ige Polyacrylamidgele gegossen und verwendet. Die Zusammensetzung ist in Tab. 3.5 angegeben.

Tab. 3.5: Zusammensetzung der SDS-Gele (12,5 % im Trenngel):

Trenngel:		Sammelgel:	
Trenngelpuffer	3,00 ml	Sammelgelpuffer	1,00 ml
<i>Aqua bidest.</i>	5,25 ml	<i>Aqua bidest.</i>	2,40 ml
Acrylamid	3,75 ml	Acrylamid	0,60 ml
TEMED	10 µl	TEMED	6 µl
APS (10 %)	80 µl	APS (10 %)	25 µl

Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf die SDS-Gele 30 min bei 37 °C mit dem 4 x SDS-Ladepuffer inkubiert, *P. pastoris*-Proben 20 min bei 60 °C. Dieses führte zu einer Denaturierung und Anlagerung des negativ geladenen SDS an die Proteine und ermöglichte somit im Gel eine Wanderung dieser Richtung Anode. Als Marker wurde der PeqGOLD Prestained Protein Marker III genutzt, um die Proteingrößen abzuschätzen. Pro Spur wurde bei den Gelen der *S. cerevisiae*-Proben die gleiche Menge Gesamtprotein, bezogen auf die Zellzahl aufgetragen. Wenn nicht anders angegeben, wurden bei allen anderen Gelen 30 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen.

Im Sammelgel wurden die Proben zunächst bei 160 V konzentriert und anschließend bei 200 V im Trenngel aufgetrennt. Die Gele konnten anschließend für einen Western Blot (3.2.5) genutzt oder mit Coomassie (Rotiphorese[®] Blau R) gefärbt werden. Für die Färbung wurde das Gel mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur mit der Färbelösung geschüttelt und bis zur Entfärbung des Hintergrunds mit der Entfärbelösung inkubiert.

3.2.5 Western Blot

Die Proteine, die per SDS-PAGE getrennt worden waren, wurden mittels der *semi-dry*-Methode bei 17 V für 60 min auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Whatman Chromatography Paper und die PVDF-Membran wurden zuvor in Transferpuffer inkubiert und die Membran in Methanol aktiviert. Für die Übertragung wurden drei Whatman Paper, die Membran, das Gel und drei weitere Whatman Paper auf der Anode übereinandergelegt.

Freie Bindestellen auf der PVDF-Membran wurden mit 3 % M-TBST für 1 h bei Raumtemperatur geblockt, über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper in M-TBST inkubiert und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper geschüttelt. Nach jeder Antikörperinkubation wurden jeweils drei 15-minütige Waschschrte mit TBST durchgeführt.

Die Detektion der Signale erfolgte über die Chemilumineszenzreaktion des Amersham ECL Plus-Reagenzes mit dem Sekundärantikörper und konnte über den Lumi ImagersTM betrachtet und ausgewertet werden.

3.2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford

Es wurde der Bio-Rad Protein Assay durchgeführt. 792 µl *Aqua bidest.* wurden mit 8 µl der Proteinlösung und 200 µl Bradford-Reagenz gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Absorption bei 595 nm gegen eine Negativkontrolle vermessen wurde. Lag die Absorption oberhalb des Lambert-Beerschen-Bereichs, wurde die Probe entsprechend verdünnt oder nur 0,8 µl in den Assay eingesetzt. Die Kalibrierung wurde mit BSA durchgeführt.

3.2.7 Proteinfällung mittels Trichloressigsäure

Die Proteinfällung mit Trichloressigsäure wurde verwendet um Proteine zu konzentrieren. Es wurden 4 Teile Proteinlösung mit 1 Teil 100 % Trichloressigsäure versetzt, 30 min bei 4 °C inkubiert und bei 13.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet dreimal mit 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Anschließend wurde das Pellet bei 95 °C für 5 min getrocknet und final im gewünschten Volumen PBS-Puffer resuspendiert.

Zu Beginn der Promotion wurde für die Proteinfällung mit 5 % Trichloressigsäure vorgenommen, nur für 15 min inkubiert und ohne waschen und trocknen resuspendiert. Dieses Protokoll wurde aber aufgrund von unzuverlässigen Ergebnissen geändert.

3.2.8 Bestimmung der Fluoreszenzintensität

Die Fluoreszenzintensität wurde entweder direkt im Gel oder als Proteinlösung mit dem Fluorimeter quantifiziert.

Im Gel erfolgte die Detektion und Messung nach Auftrennung der Proteine mit der SDS-PAGE am Lumi Imager F1TM bei einer Belichtung mit 520 nm und wurde mit der LumiAnalyst Software ausgewertet. Die Signalintensitäten wurden über Biolumineszenzeinheiten (BLU) quantifiziert.

Für die Messungen am Fluorimeter wurden 200 µl der verdünnten Probe (1:100 – 1:5.000) in 96-Well OptiPlatesTM pipettiert, bei 475 nm angeregt und die Emission bei 509 nm gemessen.

3.2.9 Biotinylierung

Die Biotinylierung wurde in Anlehnung an das Protokoll des *Pierce cell surface protein isolation Kits* angelehnt jedoch für die *S. cerevisiae* Zellen abgewandelt.

Aus 200 ml Übernachtskultur wurden 4 ml Protoplasten hergestellt (3.1.17). 6 mg des Biotinylierungsreagenzes (*O*-(3-Sulfosuccinimid-1-yl)-*S*-(ethyl-2-biotinamidyl)dithiopropionat) wurden in 8 ml PBS gelöst und mit 3 ml Protolpasten für 1 h auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Zugabe von 300 µl Quenching-Lösung gestoppt und die Zellen bei 900 g für 10 min abgetrennt. Nach dem Waschen mit 3 x 10 ml TBS-Puffer, wurden diese in 1 ml TBS resuspendiert und mit Glaskügelchen und Proteaseinhibitor versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte für 1 min auf dem Vortexer und wurde nach der Abnahme des Überstands und erneuter Zugabe von 0,5 ml TBS wiederholt. Die Zelltrümmer und Glaskügelchen wurden jeweils für 5 min 4 °C bei 1.000 g abgetrennt. Das biotinylierte Zelllysate wurde an gewaschene NeutrAvidin Agarose (Volumenverhältnis Zelllysate Agarose 1:1) für 1 h bei Raumtemperatur rotierend gebunden. Verunreinigungen wurden insgesamt vier Mal mit einem Äquivalent Waschpuffer mit Protease-Inhibitor entfernt. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit insgesamt 200 µl PBS mit 50 mM Dithiothreitol (DTT), nach einer einstündigen rotierenden Inkubation bei Raumtemperatur, bei 1.000 g für 2 min.

Bei der Inkubation des *O*-(3-Sulfosuccinimid-1-yl)-*S*-(ethyl-2-biotinamidyl)dithiopropionat mit den Protoplasten konnten primären Amine, z. B. von Lysinen, die aus den Protoplasten heraus in den Extrazellulärraum ragten mit dem Reagenz eine kovalente Bindung eingehen (Abb. 3.4). Durch die kovalente Bindung blieben die biotinylierten Proteine während der Affinitätschromatographie durch das Biotin fest an das NeutrAvidinTM (eine deglykosylierte Form des Avidins) gebunden, während unspezifisch gebundene Proteine durch die Waschschriffe entfernt werden konnten. Die Elution erfolgte durch die Spaltung der Disulfidbindung mit DTT, sodass das Biotin an dem NeutrAvidin und der Linker an dem Protein verblieb.

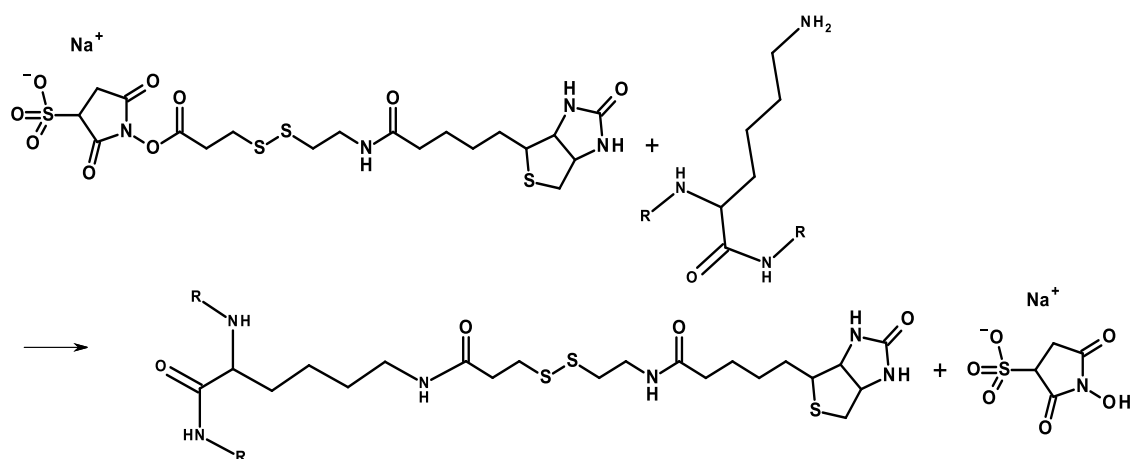


Abb. 3.4: Reaktionsgleichung der initialen Reaktion bei der Biotinylierung. Oberflächlich zugängliche Lysine reagieren mit dem Biotinylierungsreagenz und werden kovalent an den Disulfid-Biotinrest gebunden.

3.2.10 Mikroskopische Untersuchung der Lokalisation mittels GFP-Fusionsproteinen

Die mikroskopische Betrachtung der mit pUG36 transformierten Hefezellen wurde in 96-Well Zellkultur Mikroplatten (Greiner Bio-one) mit dem ImageXpress® Micro XLS Hochdurchsatzmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 472 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm durchgeführt. Die Vergrößerung betrug 100fach, es wurde bei Raumtemperatur mikroskopiert.

0,5 ml einer frischen 5 ml Übernachtskultur mit einer OD_{600} von 5 wurden bei 5.000 g geerntet, das Zellpellet in 2 ml *Aqua bidest.* gewaschen und final in 2 ml *Aqua bidest.* resuspendiert. 20 µl dieser Zellsuspension wurde in jedes Well pipettiert (ca. 20.000 Zellen) und mit je 150 µl Wasser verdünnt. Vor der Betrachtung unter dem Mikroskop wurden die Zellen 30 min zum Absetzen stehen gelassen. Trotz dieser Maßnahme, bewegten sich die Zellen zu schnell um von den gleichen Zellen eine Fluoreszenzaufnahme und ein Durchlichtbild machen zu können.

3.2.11 Faktor Xa Verdau

Für den Faktor Xa Verdau wurden pro 25 µg Protein 1-2,5 U Faktor Xa eingesetzt. Der Verdau wurde sowohl in Faktor Xa-Reaktions-Puffer als auch in Reinigungspuffer mit Zusatz von 1 mM $CaCl_2$ bei 4 °C für 3 h durchgeführt, um optimale Ergebnisse zu erzielen.

Für den Verdau von *PfFNT* in Proteoliposomen wurden *Glasvials* verwendet und aufgrund der geringen Proteinkonzentration wurde eine Proteinfällung mit Trichloressigsäure angeschlossen (3.2.5).

3.2.12 Proteinreinigung und Puffer-/Detergenzienaustausch

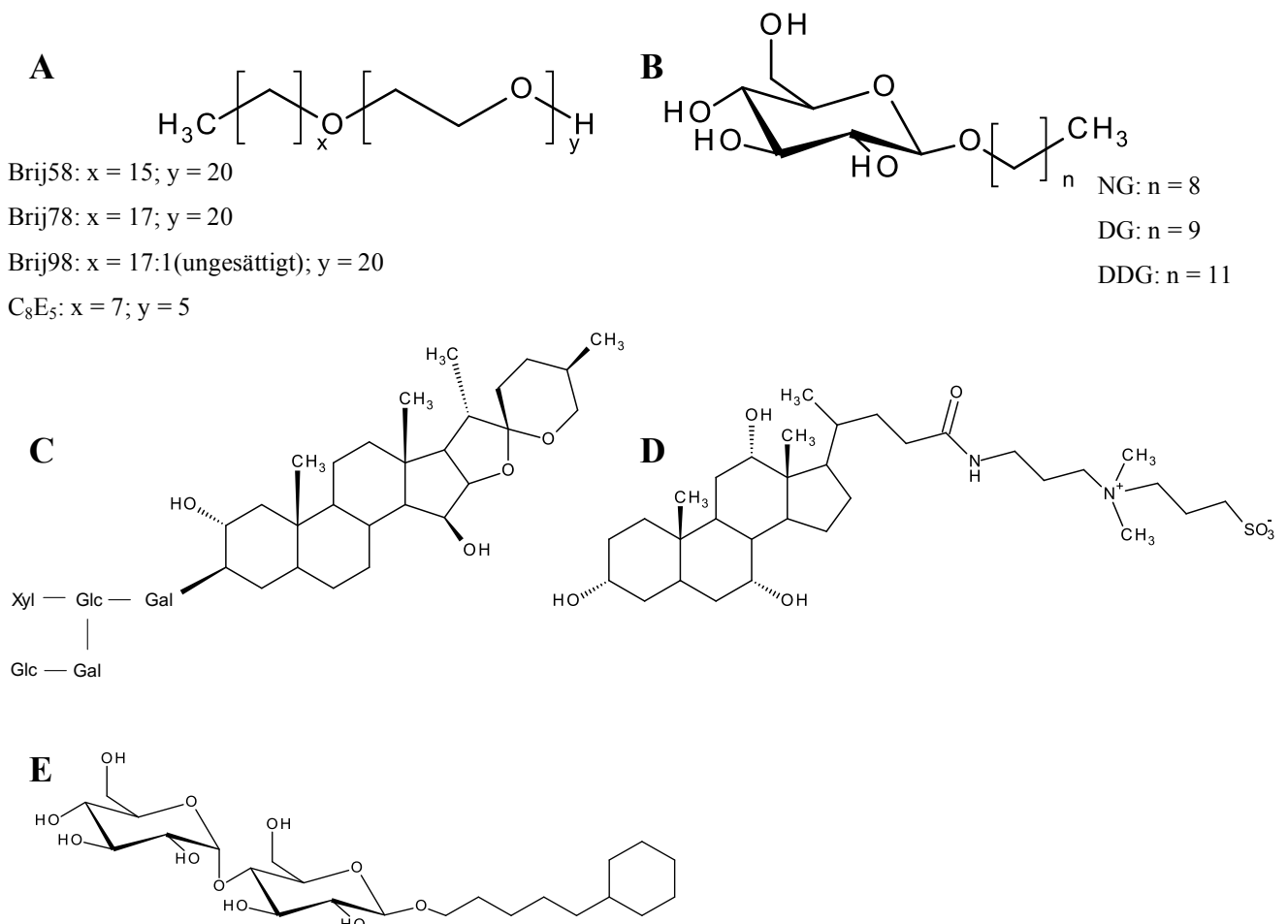
Die Proteine wurden im ersten Schritt immer über eine Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt, an die sich, wenn die Proteine für Kristallisationsansätze vorgesehen waren, eine Größenausschlusschromatographie anschloss.

Die Ni^{2+} -Chromatographie wurde auch zum Detergenzienaustausch genutzt, der Pufferaustausch fand mit *PD Desalting Columns* nach den Herstellerangaben statt.

Für die Reinigung wurden im Vergleich zur Synthese oder Solubilisierung geringere Detergenzienkonzentrationen von der doppelten bis zehnfachen kritischen Mizellkonzentration (CMC) in Anlehnung an das Nature Protocol von Newby *et al.* [163] eingesetzt. Die Strukturformeln der Detergenzien sind in den Abbildung Abb. 3.3 und Abb. 3.5 gezeigt.

Tab. 3.6: Kritische Mizellkonzentrationen und eingesetzte Konzentrationen der Detergenzien

Detergens	CMC (%)	eingesetzte Konzentration in %
DDM	0,0087	0,1
DM	0,087	0,2
CHAPS	0,49	1,0
FCH 12	0,047	0,1-0,2
β -OG	0,53	1,2
C ₈ E ₅	0,25	1,0
LDAO	0,023	0,25
Cymal-5	0,12	0,4
Brij78	0,005	0,05
NG	0,2	0,4
DG	0,07	0,14
DG	0,0066	0,014

**Abb. 3.5:** Strukturformeln der im zellfreien System verwendeten Detergenzien: Brij-Derivate (A), Glucosidderivate (B), Digitonin (C), CHAPS (D) und Cymal-5 (E).

3.2.12.1 Nickel-Affinitätschromatographie

Für die zellfreie Proteinsynthese wurden pro Milliliter Proteinansatz 150 μl Ni^{2+} -Nitrilotriessigsäure (NTA)-*beads* (300 μl *bead-slurry* 50 %) eingesetzt. Bei analytischen *Screens* wurden pro 55 μl Probe 15 μl Ni^{2+} -NTA-*bead-slurry* genutzt. Solubilisierte Proteine aus Zellaufschlüssen von *P. pastoris* wurden mit 1 ml gewaschenen Ni^{2+} -*beads* pro 240 mg Gesamtprotein mit einem Magnetrührer inkubiert.

Die Ni^{2+} -*beads* wurden vorher mit dem Reinigungspuffer und dem gewünschten Detergens gewaschen und zu der Proteinlösung pipettiert. Die Inkubation erfolgte rotierend bei 4 °C über Nacht. Das Waschen und Eluieren wurde im kleinen Maßstab manuell in gewaschenen Minipräparationssäulen mit einer 1 ml-Spritze, im größeren Maßstab per Schwerkraft in *Poly-Prep Chromatography columns* oder automatisiert mit der Äkta Purifier 10 (HisTrap excel 1 ml) durchgeführt.

In allen Fällen wurden die Ni^{2+} -*beads* zunächst vom Puffer/Zellysate abgetrennt, mit 20 Säulenvolumina 20 mM Imidazol im Reinigungspuffer mit Detergens gewaschen und, wenn nichts anderes angegeben ist, stufenweise mit je 5 Säulenvolumina 80 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM und 500 mM Imidazol im Reinigungspuffer nach einer 10 minütigen Inkubation pro Schritt eluiert. Für wiederholte Ansätze von Proteinen, deren Elutionsverhalten in den verwendeten Detergenzien bereits bekannt war, wurden vereinzelt Stufen übersprungen. Bei den Vorversuchen wurden die benötigten Konzentrationen des Imidazols durch Hinzufügen entsprechender Volumina eines 1 M Imidazol *Stocks* zum Reinigungspuffer erzeugt.

Das Imidazol wurde vor der Größenausschlusschromatographie, vor dem Konzentrieren des Proteins oder vor der Herstellung von Proteoliposomen mit den *PD Desalting Columns* entfernt (3.2.12). Im Anschluss an die Reinigung wurden die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt.

Bei der automatisierten Nickelreinigung wurde das Probenvolumen von 1 ml mit 0,1 ml min^{-1} aufgetragen und ebenfalls mit 20 Säulenvolumina 20 mM Imidazol gewaschen und in drei Stufen à 5 Säulenvolumina von 100 mM, 250 mM und 500 mM Imidazol eluiert. Anschließend folgte die Regenerierung der Säulen mit 10 Säulenvolumina Reinigungspuffer ohne Imidazol.

3.2.12.2 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde mit der Äkta Purifier 10 und einer Superdex 200 10/300 GL bei 4-8 °C durchgeführt. Sofern nicht anders angegeben wurde der Laufpuffer mit 20 mM Tris (HCl) pH 8,0 (4 °C) und 150 mM NaCl und einer Detergenzienkonzentration wie in 3.2.12 angegeben verwendet. Die Superdex-Säule wurde auf 20 % Ethanol gelagert und vor der Verwendung mit jeweils zwei Säulenvolumina Wasser und dem Laufpuffer gespült und äquilibriert. Das Protein wurde bei 10.000 g 4 °C für 10 min von Partikeln abgetrennt. Bei einer Flussrate von 0,5 ml min^{-1} wurden bis zu 10 mg Gesamtprotein in einem Volumen von maximal 500 μl über eine Auftragschleife

aufgetragen. Die Elution erfolgte ebenfalls bei einer Flussrate von $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ im unveränderten Laufpuffer über ein Säulenvolumen. Es wurden $500 \mu\text{l}$ Fraktionen gesammelt.

Das Totvolumen der Säule wurde mit Dextranblau (2 mg ml^{-1} , $500 \mu\text{l}$ Auftrag) bestimmt und lag, wie vom Hersteller angegeben bei $8,0 \text{ ml}$. Einen Anhaltspunkt für die Proteingrößen der retenierten Proteine gab die kleine Kalibrierung mit BSA (10 mg ml^{-1}) (Abb. 3.6). Das Monomer von 67 kDa konnte bei $14,53 \text{ ml}$ erfasst werden, während das Dimer bei $12,61 \text{ ml}$ (134 kDa) und das Trimer bei $11,4 \text{ ml}$ (201 kDa) detektiert wurde. So ergab sich zur Näherung eine Gerade von $y = -2,84 \ln(x) + 26,84$.

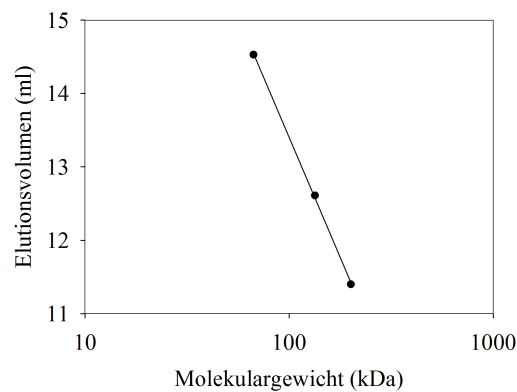


Abb. 3.6: Kalibrierung der Superdex 200 10/300 GL mit BSA.

Die Aussagen über die Proteingrößen stellen nur eine Näherung dar und sind nicht als absolut anzusehen. Sicherere Aussagen sind nur im Bereich zwischen 67 kDa und 201 kDa zu treffen, darüber hinaus werden die Größen nur über die Extrapolierung der Dreipunktkalibrierung berechnet.

3.2.13 Kristallisationsansätze

Für die Kristallisationsansätze wurden die gewünschten Fraktionen der Gelfiltration vereinigt und mit Amicon Filter Units nach Herstellerangaben auf $8\text{-}13 \text{ mg ml}^{-1}$ aufkonzentriert. Die Proben wurden in Hamburg am EMBL oder in Freiburg im Arbeitskreis von Prof. Dr. Einsle mit einem Pipettierroboter (Mosquito oder OryxNano) angesetzt. Hierfür wurden 96-Well-Platten der Firma Swissci und kommerzielle Kits von Molecular Dimensions, Jena Bioscience, Hamilton Research, sowie selbst hergestellte *Screens* eingesetzt (Tab. 3.7). Die Platten wurden in Freiburg bei 4 °C und 20 °C und in Hamburg bei 19 °C inkubiert.

Tab. 3.7: kommerzielle und hausgemachte Screens, die für *Pf*FNT und $\Delta N\Delta C$ *Pf*FNT verwendet wurden

Molecular Dimensions	MemGold
	MemGold2
	Morpheus
	Stura Footprint I + II
Jena Bioscience	Screen Membrane
Hamilton Research	Index Screen
selbst hergestellt (Uni Freiburg)	PEG Screen
	zusätzliche Kristallisationsbedingungen

buffers	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5	pH 8,5	pH 9,5
	0,1M sodium acetat/ acetic acid	0,1M tri-sodium citrate/ citric acid	0,1M MES/NaOH	0,1M HEPES/NaOH	0,1M Tris/HCl	0,1M CHES/NaOH

PEG Grid I

	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5	pH 8,5	pH 9,5	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5	pH 8,5	pH 9,5
PEG 400	20 % v/v	20 % v/v	20 % v/v	20 % v/v	20 % v/v	20 % v/v	25 % v/v	25 % v/v	25 % v/v	25 % v/v	25 % v/v	25 % v/v
	30 % v/v	30 % v/v	30 % v/v	30 % v/v	30 % v/v	30 % v/v	35 % v/v	35 % v/v	35 % v/v	35 % v/v	35 % v/v	35 % v/v
PEG 1000	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v
	30 % w/v	30 % w/v	30 % w/v	30 % w/v	30 % w/v	30 % w/v	35 % w/v	35 % w/v	35 % w/v	35 % w/v	35 % w/v	35 % w/v
PEG 3350	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v
	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	30 % w/v	30 % w/v	30 % w/v	30 % w/v	30 % w/v	30 % w/v
PEG 5000 MMME	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v
	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	30 % w/v	30 % w/v	30 % w/v	30 % w/v	30 % w/v	30 % w/v

PEG Grid II (PEG/ Ammoniumsulfate):

PEG 8000	10 % w/v	10 % w/v	10 % w/v	10 % w/v	10 % w/v	10 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v
	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v
PEG 10.000	10 % w/v	10 % w/v	10 % w/v	10 % w/v	10 % w/v	10 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v	15 % w/v
	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	20 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v	25 % w/v
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,3 M	0,3 M	0,3 M	0,3 M	0,3 M	0,3 M	0,6 M	0,6 M	0,6 M	0,6 M	0,6 M	0,6 M
	0,9 M	0,9 M	0,9 M	0,9 M	0,9 M	0,9 M	1,2 M	1,2 M	1,2 M	1,2 M	1,2 M	1,2 M
	1,5 M	1,5 M	1,5 M	1,5 M	1,5 M	1,5 M	1,8 M	1,8 M	1,8 M	1,8 M	1,8 M	1,8 M
	2,1 M	2,1 M	2,1 M	2,1 M	2,1 M	2,1 M	2,4 M	2,4 M	2,4 M	2,4 M	2,4 M	2,4 M

Abb. 3.7: selbst hergestellter PEG-Screen des Ak Einsle Uni Freiburg

Well	Item	Conc	Units	pH	Chemical
		6	v/v		ethanol
49	E1	0.1	M	5.5	ammonium acetate
		1.5	M	7	NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄
		15	v/v		ethanol
50	E2	0.1	M	5.5	ammonium acetate
		0.02	M		magnesium chloride
		25	v/v		ethanol
51	E3	0.1	M	5.5	ammonium acetate
		6	v/v		2-methyl-2,4-pentanediol
		35	v/v		ethanol
52	E4	0.1	M	5.5	ammonium acetate
		0.15	M		sodium chloride
		0.05	M	6.5	sodium cacodylate
53	E5	30	v/v		polyethylene glycol 200
		0.5	v/v		spermidine
		0.05	M	6.5	sodium cacodylate
54	E6	30	v/v		polyethylene glycol 200
		0.5	mM		zinc sulfate
		0.05	M	6.5	sodium cacodylate
55	E7	30	v/v		polyethylene glycol 200
		0.02	v/v		ethanol
		0.05	M	6.5	sodium cacodylate
56	E8	30	v/v		polyethylene glycol 200
		0.12	M		sodium benzoate
		0.05	M	7.5	HEPES
57	E9	10	v/v		2-methyl-2,4-pentanediol
		18	w/v		polyethylene glycol 4000
		0.05	M	7.5	HEPES
58	E10	10	v/v		2-methyl-2,4-pentanediol
		5	v/v		2-propanol
		0.05	M	7.5	HEPES
59	E11	10	v/v		2-methyl-2,4-pentanediol
		0.25	M		sodium chloride
		0.05	M	7.5	HEPES
60	E12	10	v/v		2-methyl-2,4-pentanediol
		0.01	M		calcium chloride
61	F1	0.8	M	5.5	FP sodium citrate - citric acid
		6	v/v		2-methyl-2,4-pentanediol
62	F2	1	M	5.5	FP sodium citrate - citric acid
		2	w/v		polyethylene glycol 2000
63	F3	1.2	M	5.5	FP sodium citrate - citric acid
		5	v/v		2-propanol
64	F4	1.4	M	5.5	FP sodium citrate - citric acid
		3.5	v/v		glycerol
65	F5	0.9	M		ammonium sulfate
		0.05	mM		zinc sulfate
66	F6	1.2	M		ammonium sulfate
		5	v/v		2-methyl-2,4-pentanediol
67	F7	1.8	M		ammonium sulfate
		5	v/v		glycerol
68	F8	2.4	M		ammonium sulfate
		10	v/v		ethanol
69	F9	0.8	M	8.5	NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄
		10	v/v		glycerol
70	F10	1.2	M	8.5	NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄
		5	v/v		2-propanol
71	F11	1.8	M	8.5	NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄
		2	w/v		polyethylene glycol 2000
72	F12	2.4	M	8.5	NaH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄
		2	v/v		2-methyl-2,4-pentanediol
		0.2	M		tri-sodium citrate
73	G1	0.1	M	6.5	sodium cacodylate
		30	v/v		2-propanol
		0.2	M		magnesium chloride
74	G2	0.1	M	7.5	HEPES
		30	v/v		2-propanol
		0.2	M		ammonium acetate
75	G3	0.1	M	8.5	Tris
		30	v/v		2-propanol
		0.2	M		calcium chloride
76	G4	0.1	M	4.6	sodium acetate
		20	v/v		2-propanol
		0.2	M		tri-sodium citrate
77	G5	0.1	M	7.5	HEPES
		20	v/v		2-propanol
		20	v/v		2-propanol
78	G6	20	w/v		polyethylene glycol 4000
		0.1	M	5.5	FP sodium citrate - citric acid
		0.1	M	7.5	HEPES
79	G7	20	w/v		polyethylene glycol 4000
		10	v/v		2-propanol
		0.5	M		sodium chloride
80	G8	8.9	mM		CTAB
		0.01	M		magnesium chloride
81	G9	35	v/v		dioxane
82	G10	2	M		ammonium sulfate
		5	v/v		2-propanol
		0.01	M		cobalt chloride
83	G11	0.1	M	4.6	sodium acetate
		1	M		1,6-hexanediol
		0.1	M		cadmium chloride
84	G12	30	v/v		polyethylene glycol 400
		0.1	M	4.6	sodium acetate
		0.5	M		sodium chloride
85	H1	2	w/v		ethylene imine polymer
		0.1	M	5.5	FP sodium citrate - citric acid
86	H2	35	v/v		tert-butanol
		0.1	M	5.5	FP sodium citrate - citric acid
		0.01	M		ferric chloride
87	H3	10	v/v		jeffamine M-600
		0.1	M	5.5	FP sodium citrate - citric acid
88	H4	2.5	M		1,6-hexanediol
		0.1	M	5.5	FP sodium citrate - citric acid
89	H5	0.1	M	6.5	MES
		12	w/v		polyethylene glycol 20000
		1.6	M		ammonium sulfate
90	H6	0.1	M	6.5	MES
		10	v/v		dioxane
		0.05	M		cesium chloride
91	H7	30	v/v		jeffamine M-600
		0.1	M	6.5	MES
92	H8	0.1	M	7.5	HEPES
		2	M		ammonium formate
		0.05	M		cadmium sulfate
93	H9	0.1	M	7.5	HEPES
		1	M		sodium acetate
		0.2	M		magnesium chloride
94	H10	3.4	M		1,6-hexanediol
		0.1	M	8.5	Tris
95	H11	0.1	M	8.5	Tris
		25	v/v		tert-butanol
		0.1	M	9	bicine
96	H12	10	w/v		polyethylene glycol 20000
		2	v/v		dioxane

Abb. 3.8: zusätzliche, selbst hergestellte Kristallisationsbedingungen

Tab. 3.8: Für die Kristallisationsscreens eingesetzte Proteinfractionen und die verwendeten Bedingungen

Protein	Oligomer	Kristallisationsscreen	Konzentration in mg ml ⁻¹	Detergens	Additiv
<i>Pf</i> FNT	Pentamer	MD_MemGold_HT96 JB_Membrane_HTS	8,8	Brij78	
<i>Pf</i> FNT	Pentamer	MD-MemGold_HT96 JB_Membrane_HTS	11	Fos-Cholin 12	
<i>Pf</i> FNT	Dimer	MD_MemGold_HT96 JB_Membrane_HTS MD_MemGold2_HT	13	Fos-Cholin 12	MMV007839 1,9 mM
<i>Pf</i> FNT	Trimer	MD_MemGold_HT96 JB_Membrane_HTS MD_MemGold2_HT	12,5	Fos-Cholin 12	MMV007839 1,9 mM
$\Delta N\Delta C$ <i>Pf</i> FNT	Trimer	MD_MemGold_HT96 JB_Membrane_HTS MD_MemGold2_HT	10	Fos-Cholin 12	
$\Delta N\Delta C$ <i>Pf</i> FNT	Monomer	MD_MemGold_HT96 JB_Membrane_HTS MD_MemGold2_HT	11,5	Fos-Cholin 12	
$\Delta N\Delta C$ <i>Pf</i> FNT	Monomer	MD_Morpheus HR_Index-Screen MD_Footprint selbstgemachte Screens	12	Fos-Cholin 12	

3.3 Proteinherstellung in *E. coli*

Die Proteinherstellung in *E. coli* erfolgte prinzipiell nach dem Nature Protocol von Newby *et al.* [163]. Die zu exprimierenden Zielgene wurden hierfür in den pET21X-Vektor kloniert (3.1.4) und BL21(DE3)pRep4 Zellen mit den Plasmiden transformiert. Nach der Selektion auf LB-Platten mit Ampicillin und Kanamycin wurde jeweils ein Klon gepickt und eine 5 ml Übernachtskultur in dem Selektionsmedium angesetzt. Die Inkubation wurde bei 37 °C und 200 U min⁻¹ vorgenommen. Die frische Übernachtskultur wurde zum Animpfen von 250 ml LB-Ampicillin-Kanamycin in einem 1-Liter Erlenmeyerkolben am nächsten Morgen verwendet und für 2-3 h unter gleichen Bedingungen inkubiert, bis eine Ziel-OD₆₀₀ von 0,5-0,6 erreicht war. Die Zellen wurden im Kühlschrank heruntergekühlt und mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) 1 M versetzt, dass eine finale Konzentration von 500 μ M–1 mM in dem Medium entstand. Die Zugabe führte zu einer Induktion der Proteinsynthese, da es durch Bindung des Lac-Repressors eine Konformationsänderung herbeiführte und zusätzlich das *lac*-Operon induzierte.

Es folgte eine weitere Inkubation bei 37 °C für 4 h 200 U min⁻¹ für die Expression von *EcFocA* und bei 17 °C für 20 h 200 U min⁻¹ für *PfFNT*. Anschließend wurden die Zellen bei 4.500 g für 15 min bei 4 °C geerntet und in 50 ml Reinigungspuffer pro Liter Kultur gewaschen. Für den Zellaufschluss wurde jedes Gramm Zellpellet in 5 ml Reinigungspuffer (4 °C) resuspendiert und in 3 Durchgängen mit der French Press bei 20.000 psi aufgeschlossen. Die Zelltrümmer wurden bei 4 °C und 15.000 g für 10 min abgetrennt und der Überstand für 1 h bei 150.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Die so erhaltenen mikrosomalen Fraktionen wurden entweder nach dem Resuspendieren in Reinigungspuffer direkt für eine SDS-PAGE und einen Western Blot verwendet oder mit 1 ml Solubilisierungspuffer pro Gramm Pellet über Nacht rotierend bei 4 °C inkubiert. Für *EcFocA* wurden dem Solubilisierungspuffer β -OG (7,9 %) und DM (1 %) und für *PfFNT* Fos-Cholin 12 (0,7 %) zugesetzt.

3.4 Proteingewinnung aus *P. pastoris*

Alle mit *P. pastoris* durchgeführten Arbeiten erfolgten nach dem Herstellerprotokoll von Thermo Fisher Scientific für den PichiaPink™ Stamm. Es wurde der Stamm 1 mit *ADE2-Knockout* ohne zusätzlichen Protease *Knockout* verwendet.

3.4.1 Kultivierung und Proteininduktion

Zu Beginn der Arbeit mit PichiaPink™ wurde zunächst über die Messung der OD₆₀₀ über mehrere Stunden die Generationszeit in der exponentiellen Phase abgeschätzt bei 30 °C und 220 U min⁻¹ in YPD-Medium. Nach der erfolgreichen Transformation der Zellen (3.1.10) wurde dieses ebenfalls für die transformierten Zellen in BMGY-Medium mit den gleichen Parametern durchgeführt.

Die Vermehrung der Zellen fand nach der Transformation in BMGY mit Glycerol als Kohlenstoffquelle unter den angegebenen Bedingungen bis zu der gewünschten Induktions-OD₆₀₀ statt. Anschließend wurden die Zellen bei 1.500 g für 5-10 min geerntet und in BMMY resuspendiert. Dieses führte durch das Vorhandensein von Methanol als einzige Kohlenstoffquelle zur Aktivierung des AOX1-Promotors und somit zum Ablesen des Zielgens. Es folgte eine weitere Inkubation für ca. 32-48 h bei der nach jeweils 24 h eine weitere Methanolzugabe folgte, die zu einer Konzentration von 0,5 % im Medium führte. Final wurde bei 1.500 g für 10 min geerntet und die Zellen bei -80 °C eingefroren.

3.4.2 Fermentierung

Die Fermentierung wurde nach einem Protokoll des Arbeitskreises Prof. Dr. Johanson der Universität Lund (Schweden) durchgeführt.

1,5 l *Basal Salt* Medium wurden hergestellt und im Fermenter autoklaviert. 2 x 50 ml BMGY wurden mit je einem Loop von Klonen einer frischen Platte angeimpft und über Nacht bei 30 °C geschüttelt. Nach dem Vorbereiten des Fermenters, sowie dem Anschließen von 1 M HCl und konzentrierter Ammoniumhydroxidlösung wurde das Medium mit den 100 ml der Vorkultur und einer OD₆₀₀ von ca. 18-25 angeimpft und ein pH von 5,0 eingestellt. Zusätzlich wurden 6,5 ml PTM *Trace Salts* und *Antifoam* hinzugefügt. Das Wachstum der Zellen fand während des Prozesses bei 30 °C und mindestens 20 % Sauerstoffsättigung statt. Nach dem Verbrauch des initial im Medium vorhandenen Glycerols wurde unter limitierenden Bedingungen 200 ml Glycerol (mit 12 ml PTM *Trace Salts* pro Liter) mit einer Rate von 30 ml h⁻¹ zugeführt und über Sauerstoffspikes der Verbrauch der Kohlenstoffquelle überprüft. Die Induktion wurde mit 100 % Methanol (mit 12 ml *Trace Salts* pro Liter) mit 3 ml h⁻¹ begonnen und bei schnellem Ansprechen der Kultur bis zum Ende langsam auf 6 ml h⁻¹ gesteigert. Die Induktionsphase dauerte 46 h an und wurde mit dem Ernten der Zellen bei 1.500 g für 10 min beendet. Die Zellpellets wurden bis zum Aufschluss bei -80 °C gelagert.

Antifoam, Säure und Base wurden während des ganzen Prozesses bei Bedarf hinzugefügt. Zudem erfolgte in regelmäßigen Abständen ein Probenzug zu Messung der OD₆₀₀, des Pelletgewichts und für die Expressionskontrolle.

3.5 Zellfreie Proteinsynthese

Alle Schritte der zellfreien Proteinsynthese und der Herstellung der Bestandteile wurde nach dem Protokoll von Schwarz *et al.* [136] durchgeführt und durch Dr. Annika Müller-Lucks und Dr. Sinja Bock im Arbeitskreis etabliert.

3.5.1 S30 Extrakt

Der S30 Extrakt als essentieller Bestandteil der zellfreien Proteinherstellung wurde benötigt, um unter anderem die Ribosomen und Translationsfaktoren bereitzustellen [136].

Für den S30 Extrakt wurden BL21(DE3) Zellen auf LB-Platten ausgestrichen und ein Klon verwendet, um 50 ml LB-Medium anzuimpfen und diese Vorkultur wurde über Nacht bei 37 °C und 220 U min⁻¹ geschüttelt. 5 Liter zweifachkonzentriertes YTPG-Medium wurden im Fermenter ohne die Glucose und den Phosphatpuffer autoklaviert. Der Phosphatpuffer wurde separat autoklaviert und die Glucose sterilfiltriert. Nach dem Vorbereiten des Fermenters wurden 500 µl Antifoam Y-30 sowie die Vorkultur zum Inokulieren hinzugefügt. Die Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 2,5-3 bei 37 °C und einem Sauerstoffgehalt von mind. 80 % kultiviert. Während dieses Prozesses wurden zur Kontrolle alle 20 min Proben gezogen um die OD₆₀₀ zu bestimmen.

Das Wachstum der Zellen wurde in der exponentiellen Phase durch das schnelle Abkühlen auf unter 14 °C in einem Eis-Wasser-Bad innerhalb von 45 min gestoppt, hierbei durfte eine OD₆₀₀ von 4 nicht überschritten werden. Es wurde bei 4.500 g für 15 min bei 4 °C geerntet, die Zellen in insgesamt 450 ml kaltem S30 A Puffer dreimal gewaschen und schließlich bei -80 °C eingefroren. Das Pellet wurde in 110 % (V/m) S30 B Puffer resuspendiert und die Zellen mit der French Press bei 20.000 psi aufgeschlossen. Im Anschluss an eine Zentrifugation bei 30.000 g für 30 min bei 4 °C wurden die oberen 2/3 des Überstandes vorsichtig abpipettiert und erneut zentrifugiert. Die oberen 2/3 des zweiten Zentrifugationsüberstandes wurden mit 4 M NaCl versetzt, dass sich eine finale Konzentration von 400 mM NaCl ergab und für 45 min bei 42 °C im Wasserbad geschüttelt. Über Nacht wurde der Extrakt zweimal gegen je 2,5 l S30 C Puffer bei 4 °C dialysiert. Der dialysierte Extrakt wurde erneut für 30 min bei 30.000 g zentrifugiert, die oberen, nicht getrüben 2/3 des Überstandes abpipettiert, aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Die geeignete Konzentration an Magnesium für zellfreie Ansätze und die Qualitätskontrolle wurden nach dem Protokoll des analytischen Ansatzes mit GFP geprüft. Im analytischen Screen wurden die entstandenen Proteinmengen GFP über die Fluoreszenzintensität bestimmt. Es wurden Magnesiumkonzentrationen von 8 mM bis 16 mM getestet und das Ergebnis der besten Bedingung mit dem eines früheren Extrakts im gleichen Ansatz verglichen.

3.5.2 T7 RNA Polymerase

Die T7 RNA Polymerase wurde, wie auch der S30 Extrakt, für das zellfreie System benötigt. Zwei Liter LB-Medium mit Selektionsantibiotikum wurden mit 20 ml frischer Übernachtskultur von BL21(DE3)pAR1219 Klonen angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6–0,8 bei 37 °C inkubiert. Die Expression der T7 RNA Polymerase wurde mit einer Konzentration von 1 mM IPTG induziert und die Zellsuspension für weitere 5 h kultiviert. Bei 4.500 g 4 °C wurden die Zellen für 15 min geerntet, mit 60 ml T7-Puffer gewaschen und bei -80 °C eingefroren. Die Pellets wurden nach dem Auftauen auf Eis mit 30 ml T7-Puffer II resuspendiert und bei 20.000 psi dreimal mit der French Press aufgeschlossen. Nach einer Zentrifugation bei 20.000 g für 30 min bei 4 °C wurde der Überstand tropfenweise mit 10 % iger Streptomycinsulfatlösung versetzt, bis sich eine Konzentration von 2 % einstellte. Die präzipitierte DNA wurde bei 30.000 g für 30 min abgetrennt. Die Reinigung der T7

RNA Polymerase wurde mittels Anionenaustauscherchromatographie auf einer Sepharose Q-Säule durchgeführt. Die Probe wurde mit 1 ml min^{-1} auf die zuvor mit T7-Puffer II aequilibrierte Säule aufgetragen, mit zwei Säulenvolumina T7-Puffer II gewaschen und mit linear steigender Salzkonzentration im T7-Puffer von 20-500 mM NaCl eluiert. Für die Elution wurde ein Puffervolumen von 1.500 ml (21 Säulenvolumen) genutzt und die Säule mit 2 Säulenvolumina T7-Puffer 1 M NaCl nachgespült. Während der Elution wurden Fraktionen von 12 ml gesammelt und bei 280 nm in einer 96-Well-Platte auf ihre Proteinkonzentrationen untersucht. Bei der Messung wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt und die Mittelwerte bestimmt. Fraktionen zwischen 100 mM und 300 mM, sowie einzelne Fraktionen des Beginns und des Endes des Gradienten, wurden auf einem Western Blot untersucht. Die Fraktionen für die auf dem Western Blot ein Signal für die T7 RNA Polymerase detektiert werden konnte wurden vereinigt, mit Amicon Filter Units auf 8 mg ml^{-1} aufkonzentriert und gegen den T7-Dialysepuffer über Nacht bei $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ dialysiert. Die dialysierte Polymerase wurde anschließend mit Glycerol auf 4 mg ml^{-1} verdünnt und enthielt final 50 % Glycerol. Die Aliquots wurden ebenfalls bei $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert und die Aktivität bei der Herstellung des GFPs im analytischen Ansatz mit einer früheren Charge verglichen.

3.5.3 Analytischer Ansatz

Sowohl die analytischen als auch die präparativen Ansätze der zellfreien Proteinsynthese wurden mit der *Continuous-Exchange*-Methode hergestellt, die eine Proteinsynthese von bis zu 24 h mit stetig steigender Proteinmenge ermöglicht. Für den analytischen Ansatz wurde eine selbstgebaute Dialysekammer nach dem Vorbild von Schneider *et al.* [142] genutzt. In diesen war eine simultane Doppelbestimmung für die Detergenzienscreens und Bestimmung der idealen Magnesiumkonzentration einer Charge des S30 Extrakts (3.5.1) möglich.

Der Reaktionsmix von $55 \text{ } \mu\text{l}$ Volumen wurde hierbei vom *Feeding-Mix* mit $850 \text{ } \mu\text{l}$ durch eine Dialysemembran mit 14 kDa MWCO getrennt. Es ergab sich somit ein Verhältnis von 1:15 zwischen dem Reaktionsmix und dem *Feeding-Mix*. Der *Feeding-Mix* wurde in einer 24-Well-Platte vorgelegt, in die die Dialysekammern luftblasenfrei platziert wurden. Die Inkubation erfolgte bei $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ bewegt im Wasserbad für bis zu 24 h. Die Reaktionsansätze wurden im Anschluss entnommen, eine Stunde auf Eis gelagert, pro Ansatz mit $15 \text{ } \mu\text{l}$ Ni^{2+} -NTA-bead-Slurry versetzt, mit 20 mM Imidazol im Reinigungspuffer gewaschen und mit dem zehnfachen Säulenvolumen 300 mM Imidazol nach 15 min Inkubation eluiert (3.2.12.1).

Die Komponenten und deren Konzentrationen sind in Tab. 3.9 gezeigt. Bei dem Ansetzen wurde zunächst der Mastermix pipettiert, $290 \text{ } \mu\text{l}$ für den Reaktionsmix abgenommen, und der S30-Puffer und weitere Aminosäuren zum *Feeding-Mix* hinzugefügt. Zu den $290 \text{ } \mu\text{l}$ des Mastermixes wurden die übrigen Komponenten addiert. Je nach Art des Screens wurde anschließend der Reaktionsmix und der *Feeding-Mix* aliquotiert und mit z.B. den Detergenzien versetzt, die untersucht werden sollten. Die Konzentrationen, der für die Analyse und präparativen Synthese eingesetzten Detergenzien sind in Tab. 3.10. zusammengefasst.

Tab. 3.9: Komponenten, Stockkonzentrationen und eingesetzte Volumina des analytischen Ansatz

Komponente	Konzentration des Stocks	Zugabe Mastermix (μl)	Zugabe zum <i>Feeding-Mix</i> (μl)
S30-Puffer	1 x		3308
RCWMDE	16,67 mM	609,9	
Aminosäure-Mix	4 mM	1270,6	1299
Acetylphosphat	1.000 mM	203,3	
Phosphoenolpyruvat	1.000 mM	203,3	
NTP-Mix	75 x	135,5	
DTT	500 mM	40,7	
Folsäure	10 mg ml ⁻¹	101,7	
cOmplete Protease Inhibitor	50 x	203,3	
Puffer (HEPES-EDTA)	24 x	372,7	
Magnesiumacetat	1.000 mM	92,5	
Kaliumacetat	4000 mM	330,4	
PEG 8000	40 %	508,3	
NaN ₃	10 %	50,8	
	gesamt:	4123	8440

Komponente	Konzentration des Stocks	Zugabe zum Reaktionsmix (μl)
S30 Extrakt	1 x	250
Plasmid-DNA	0,3 mg ml ⁻¹	53,6
RNAse Inhibitor (RiboLock)	40 U μl^{-1}	5,36
T7 RNA Polymerase	4 mg ml ⁻¹	30,64
<i>E. coli</i> tRNA	40 mg ml ⁻¹	12,51
Pyruvatkinase	10 mg ml ⁻¹	5,72
Mastermix		290
	gesamt:	647,83

Tab. 3.10: Detergenzienkonzentrationen im zellfreien System

Detergens	CMC (%)	eingesetzte Konzentration (%)
Brij35	0,011	0,2
Brij58	0,0086	1,5
Brij78	0,005	1,0
Brij98	0,0029	0,2
CHAPS	0,49	0,75
DDM	0,0087	0,1
Digitonin	0,089	0,4
Triton X 100	0,015	0,1
Tween 20	0,0072	0,075

3.5.4 Präparativer Ansatz

Die Bedingungen, die sich im analytischen Ansatz als optimal herausgestellt hatten, wurden im präparativen Ansatz in einem Maßstab von 1-3 ml in Slide-A-Lyzer Dialysekassetten angesetzt und in ebenfalls selbst hergestellten Kammern nach dem Vorbild von Schneider *et al.* [142] inkubiert. Die Zusammensetzung unterschied sich nur in dem Verhältnis zwischen Reaktionsmix und *Feeding-Mix*, dieser betrug präparativ 1:17. Bei den Ansetzen wurde zunächst der Mastermix pipettiert, 472,3 µl für den Reaktionsmix abgenommen, und der S30-Puffer, sowie Wasser und weitere Aminosäuren hinzugefügt. Die übrigen Bestandteile des Reaktionsmixes wurden zum Mastermix gegeben und diese Mischung in die Dialysekammer eingefüllt (Tab. 3.11).

Nach der Inkubation im Wasserbad wurden die Proben mittels Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt (3.2.12.1).

Tab. 3.11: Komponenten, Stockkonzentrationen und eingesetzte Volumina des präparativen Ansatzes

Komponente	Konzentration des Stocks	Zugabe Mastermix (μl)	Zugabe zum <i>Feeding</i> -Mix (μl)
S30-Puffer	1 x		5950
RCWMDE	16,67 mM	1080	
Aminosäure-Mix	4 mM	2250	2338
Acetylphosphat	1.000 mM	360	
Phosphoenolpyruvat	1.000 mM	360	
NTP-Mix	75 x	240	
DTT	500 mM	72	
Folsäure	10 mg ml ⁻¹	180	
cOmplete Protease Inhibitor	50 x	360	
Puffer (HEPES-EDTA)	24 x	660	
Magnesiumacetat	1.000 mM	163,8	
Kaliumacetat	4000 mM	585	
PEG 8000	40 %	900	
NaN ₃	10 %	90	
ddH ₂ O			684
	gesamt:	8500,8	17000

Komponente	Konzentration des Stocks	Zugabe zum Reaktionsmix (μl)
S30 Extrakt	1 x	350
Plasmid-DNA	0,3 mg ml ⁻¹	75
RNAse Inhibitor (RiboLock)	40 U μl^{-1}	7,5
T7 RNA Polymerase	4 mg ml ⁻¹	42,86
<i>E. coli</i> tRNA	40 mg ml ⁻¹	17,5
Pyruvatkinase	10 mg ml ⁻¹	8
Mastermix		472,3
ddH ₂ O		26,9
	gesamt:	1.000

3.5.5 Auswertung der analytischen Ansätze

Die analytischen Ansätze wurden über die Fluoreszenzintensität der GFP-Fusionsproteine oder des GFPs im Gel oder in Lösung quantifiziert (3.2.8). Bei den Detergenzienscreens wurden auf dem Western Blot auch die Signale quantifiziert, die keine Fluoreszenz in der In-Gel-Fluoreszenz gezeigt hatten und diese jeweils mit den fluoreszierenden Signalen ins Verhältnis gesetzt. Das Detergens mit dem größten Anteil richtig zu falsch gefaltetem Protein wurde für die präparativen Ansätze verwendet.

3.6 Proteoliposomen

Proteoliposomen wurden hergestellt, um die Funktion und korrekte Faltung des zellfrei hergestellten PfFNTs zu verifizieren. Als Negativkontrolle wurden zu Beginn leere Liposomen ohne Protein genutzt. Aufgrund der schwankenden und schlecht reproduzierbaren Durchlässigkeit wurden diese in späteren Versuchen durch PfAQP-Proteoliposomen ausgetauscht. Diese zeigten keinerlei Leitfähigkeit für die gemessenen Monocarboxylat-Substrate und verhielten sich gegenüber dem Gradienten wie leere Liposomen.

3.6.1 Präparation der Proteoliposomen

Die Herstellung der Proteoliposomen erfolgte nach den Angaben von Borgnia *et al.* [166] und Wang *et al.* [44]. 25 mg polare *E. coli* Lipide wurden in 1 ml Chloroform gelöst, mit Stickstoff evaporiert und in 500 µl 2 mM β-Mercaptoethanol für 1-2 h bei Raumtemperatur hydratisiert. Diese wurden in Aliquots von 100 µl bei -80 °C gelagert.

Für die Bildung unilamellarer Vesikel wurden 100 µl auf Eis aufgetaut, mit 10 µl 20 mM HEPES pH 6,8 versetzt und unter Stickstoff für 60-90 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Zu den 110 µl Lipiden wurden 100 µg Protein, ebenso wie Brij78 oder Fos-Cholin 12 (finale Konzentration von 0,05 % oder 0,1 %) und 20 mM HEPES-Puffer gegeben, sodass final 1 ml entstand. Dieser wurde gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Zum Entfernen des Detergenzes wurde der Ansatz schnell in ein 25-faches Volumen über eine 23G-Kanüle injiziert und anschließend für weitere 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteoliposomen wurden bei 140.000 g für 45 min bei 4 °C gesammelt und vor dem Vermessen in 4 ml HEPES-Puffer resuspendiert.

Alle Schritte mit Ausnahme der Zentrifugation wurden in Glasgefäßen durchgeführt, um eine Adsorption der Lipide an die Gefäßwände zu vermeiden.

3.6.2 Saccharosegradient

Die Rekonstitution in die Liposomen wurde mit einer Dichtegradientenzentrifugation nach Yakata *et al.* [185] untersucht. Es wurden jeweils 700 µl des Gradientenpuffers mit 0 %, 5 %, 15 %, 20 % und 25 % Saccharose übereinandergelegt, wobei die Saccharosekonzentration von unten nach oben abnahm. Die unterste Schicht bestand aus 350 µl Gradientenpuffer mit 30 % Saccharose und 350 µl Proteoliposomen. Die Zentrifugation wurde bei 164.000 g für 6 h bei 4 °C in einem SW60 Ti-Rotor durchgeführt. Im Anschluss an die Zentrifugation wurden die einzelnen Schichten wieder vorsichtig abgetrennt und separat mit Trichloressigsäure gefällt. Es wurden eine SDS-PAGE und ein Western Blot angeschlossen.

3.7 Lichtstreuungsmessungen zur Funktionsuntersuchung

3.7.1 Funktionsmessung mittels *Stopped Flow*

Die *PfFNT*-Proteoliposomen wurden immer im direkten Vergleich gegen leere Liposomen oder *PfAQP*-Proteoliposomen vermessen. Durch die Herstellung beider Liposomen in einem Prozess und aus der gleichen Lipidcharge konnten Schwankungen der Leitfähigkeiten und der Durchlässigkeit der Membranen minimiert werden und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erhöht werden. Die Messung selbst wurden angelehnt an die Messungen von Wang *et al.* [44] für *EcFocA*.

Die (Proteo)liposomen wurden schnell in der *Stopped-Flow*-Apparatur mit einem gleichen Volumen Substratpuffer gemischt, sodass ein nach innen gerichteter Gradient von 20 mM Acetat, Formiat oder L-Laktat entstand. Über einen Zeitraum von 80 s wurde nun die Veränderung der Lichtstreuung in Bezug auf die Änderung der Liposomengröße bei 546 nm gemessen. Pro Injektion wurden 75 µl Probe mit 75 µl Substratpuffer gemischt, so dass in jeder Messung ca. 95 µg Lipide mit ca. 2 µg *PfFNT* vermessen wurden.

Der osmotische Effekt führte initial zu einem schnellen Schrumpfen der Liposomen und somit Anstieg der Lichtstreuung, gefolgt von einem langsamen Substrateinstrom in die Proteoliposomen, der osmotisch bedingt Wasser nachzog. Dieses führte in den Proteoliposomen, nicht jedoch in den Liposomen/*PfAQP*-Proteoliposomen, zu einem langsameren Schwellen und folglich Sinken der Lichtstreuung.

Tab. 3.12: Einstellungen und Eigenschaften für die *Stopped-Flow*-Messungen

Xe/Hg-Lampe	100 W
Totzeit	2,6 ms
Flussrate	14 ml/s
Photomultiplier	400 x
Output Filter	300 µs
Temperatur	20 °C

3.7.2 Auswertung der Messkurven

Für die Auswertung wurden pro Messung 5-9 Kurven gemittelt, normalisiert und doppelt exponentiell mit der Biokine Software gefittet. Die in 4.6.3 gezeigten Transportraten für die einzelnen Substrate wurden aus 3-5 Versuchen gemittelt und die S.E.M.s bestimmt. Das Kurvenfitting hat Folkand Helmstetter durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Herstellung von *PfFNT* und putativen Monocarboxylattransportern in *S. cerevisiae*

Zur Untersuchung potenzieller Laktat-Transporter aus *P. falciparum* war es zunächst nötig die zu untersuchenden Proteine in *S. cerevisiae* herzustellen und zu zeigen, dass sie in ausreichender Menge in der Zelle gebildet und in die Membran eingebaut werden. Die Herstellung in diesem System war hierbei die Voraussetzung für die Messung des Substrattransports mit der von Dr. Janis Rambow etablierten Methode der radioaktiven Substrataufnahme in die *S. cerevisiae*-Zellen [42].

Die DNA-Konstrukte für die Transformation der Hefezellen wurden durch Dr. Binghua Wu kloniert und zur Verfügung gestellt. Es handelte sich hierbei um *PfFNT*, *PfB0465c* und *PfI1295c* und um die für *E. coli* codon-optimierten Varianten dieser Gene, die über die Schnittstellen *Spe* I und *Xho* I in den Vektor pDR196 (Addgene) mit zusätzlichem N-terminalem HA-tag sowie einem C-terminalen 10fach His-tag eingebracht wurden.

Um die Herstellung der Proteine *PfFNT*, *PfB0465c* und *PfI1295c* zu zeigen, wurde, wie in Kapitel 3.2.1 näher beschrieben, die mikrosomale Fraktion der Zellen gewonnen, diese mittels SDS-PAGE (3.2.3) aufgetrennt und anschließend ein Western Blot (3.2.5) durchgeführt. (Abb. 4.1) Die jeweiligen Proteine wurden über den N-terminalen HA-tag mit dem α -HA-Antikörper in einer Verdünnung von 1:5.000 detektiert. Für die Proteine konnten Signale von 31 kDa und 160 kDa für *PfFNT*, von 43 kDa für *PfB0465c* und von 52 kDa für *PfI1295c* identifiziert werden. Diese ermittelten Größen für *PfFNT* entsprechen dem monomeren und pentameren *PfFNT*.

Diese Proteingrößen auf dem Western Blot erscheinen durchweg etwas kleiner als theoretisch berechnet. Die rechnerischen Größen inklusive tags liegen für *PfFNT* bei 37 kDa, für *PfI1295c* bei 64 kDa und für *PfB0465c* bei 55 kDa. Dieses Phänomen des Größenshifts ist für Membranproteine bereits mehrfach beschrieben und resultiert aus der unvollständigen Denaturierung mit SDS in den hydrophoben Bereichen, insbesondere in den Transmembranspannen [186]. Aus vorherigen Western Blots war bekannt, dass *PfFNT* deutlich stärker exprimiert wird als die beiden putativen MCTs. Das Auftragen gleicher Gesamtproteinmengen würde die weniger intensiven Banden überstrahlen und ihre Detektion verhindern. Aus diesem Grund wurden bei diesem Western Blot unterschiedliche Mengen aufgetragen, um eine Detektion aller Signale zu ermöglichen. Eine quantitative Auswertung war bei diesem Western Blot somit nicht möglich. Alle drei Proteine wurden in den Zellen rekombinant hergestellt und waren somit einer Funktionsmessung zugänglich. Hefen, die mit dem Leerplasmid transformiert wurden, zeigten kein Signal im Western Blot.

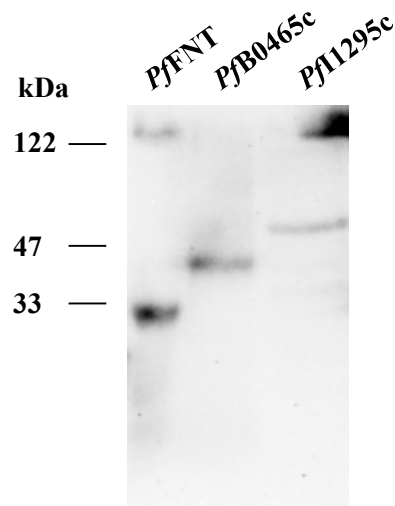


Abb. 4.1: Western Blot der mikrosomalen Fraktionen der transformierten Zellen von *PfFNT* und den putativen Monocarboxylattransportern jeweils mit HA- und His-tag. Verwendet wurde ein monoklonaler α -HA-Antikörper 1:5.000 in MTBST.

4.1.1 Lokalisation des GFP-Fusionsproteins in der Zelle

Zur Lokalisation der rekombinant hergestellten Proteine *PfFNT*, *PfB0465c* und *Pf11295c* wurden weitere Konstrukte zur Transformation hergestellt. Hierfür wurden die optimierten Varianten über die Schnittstellen *Spe I* und *Xho I* in das Plasmid pUG36 kloniert, welches ein N-terminales GFP aufweist. Nach der Transformation der *Saccharomyces*-Zellen mit diesen Plasmiden konnten die GFP-Fusionsproteine mikroskopisch betrachtet werden, um über die grüne Fluoreszenz in der Zelle einen Rückschluss auf die Lokalisation zu ermöglichen. Um die Lokalisation des löslichen GFPs im Zytosol zu zeigen, wurden zusätzlich Zellen mit dem Leerplasmid pUG36 transformiert. Die Aufnahmen wurden am ImageXpress[®] Micro XLS Hochdurchsatzmikroskop freundlicherweise von Dr. Julia von Bülow bei einer Anregungswellenlänge von 472 nm und einer Vergrößerung von 100fach durchgeführt (3.2.10). Aufgrund der hohen Beweglichkeit der Zellen im Wasser war es leider nicht möglich Durchlichtbilder aufzunehmen, um so eine tendenzielle Aussage über die Lokalisation treffen zu können. Die Abb. 4.2 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Bilder der Zellen mit löslichen GFP (links) und dem GFP-*PfFNT*-Fusionsprotein (rechts). Das lösliche GFP ist diffus in der Zelle, also dem Zytosol, verteilt, sodass mit Ausnahme der Vakuole die gesamte Zelle fluoresziert. Die Zellen mit GFP-*PfFNT*-Fusionsprotein zeigen eine hohe Fluoreszenz in der vermutlichen Zellmembran sowie einen inneren Ring der wahrscheinlich das endoplasmatische Retikulum zeigt. Die Fusionsproteine der putativen MCTs waren so gering exprimiert, dass die Fluoreszenz wegen der Eigenfluoreszenz der Zellen nicht detektiert wurde. Die Lokalisation war mit dieser Methode nicht möglich, da keine konfokalen mikroskopischen Aufnahmen gemacht und keine Cofärbung vorgenommen wurde. Es lässt sich nur die Tendenz erkennen, dass das *PfFNT* membranständig ist.

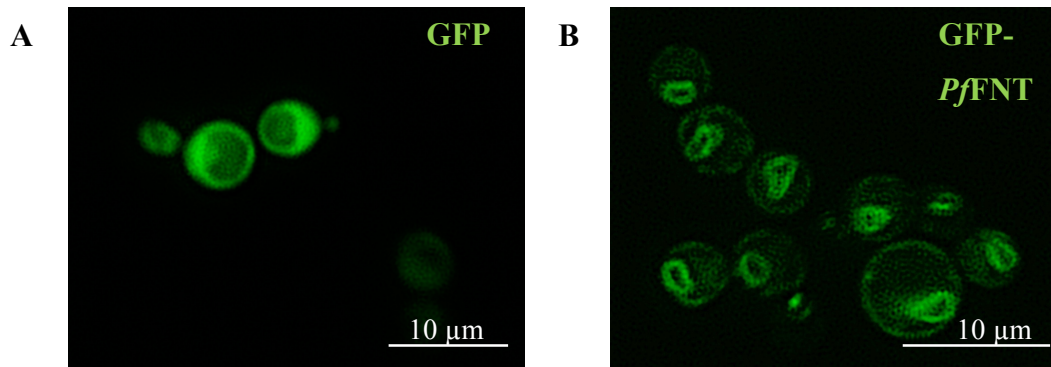


Abb. 4.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *S. cerevisiae* bei einer Anregungswellenlänge von 472 nm. A: *S. cerevisiae* mit löslichem GFP. B: *S. cerevisiae* mit GFP-PfFNT Fusionsprotein. Aufgenommen von Dr. Julia von Bülow.

4.1.2 Biotinylierung der membranständigen Proteine

Zur Bestätigung der Membranständigkeit von PfFNT, PfB0465c und PfI1295c in den Hefezellen (4.1) wurde eine Biotinylierung mit dem *Pierce cell surface protein isolation Kit* angewendet. Bei der Biotinylierung mit dieser Methode werden primäre Amine erfasst, in der Regel Seitenketten von Lysinen, die auf der Oberfläche von Zellen in den Extrazellulärraum ragen. Um bei *S. cerevisiae* diese Aminosäuren zugänglich zu machen wurden zellwandlysierte Protoplasten hergestellt, die dann für die eigentliche Reaktion verwendet wurden (3.1.17). Die Reaktion, Bindung und Elution der membranständigen Proteine ist in Kapitel 3.2.9 beschrieben.

Um sicherzustellen, dass bei der Biotinylierung nur plasmamembranständige Proteine erfasst werden, wurden zunächst sowohl eine Positivkontrolle mit PfAQP als auch eine Negativkontrolle mit GFP durchgeführt.

In der Abb. 4.3 sind die beiden Western Blots der Kontrollen gezeigt, bei der in der linken Spur jeweils das Gesamtprotein, der Überstand der Protoplasten nach Behandlung mit Glaskügelchen (3.2.1), und auf der rechten Spur das biotinylierte Protein aufgetragen ist. Für die Negativkontrolle ist ein starkes Signal bei 31 kDa zu sehen, welches der rechnerischen Größe des GFPs mit *tags* entspricht. In der Fraktion des biotinylierten Proteins ist ebenfalls ein schwaches Signal detektiert worden. Da es sich bei GFP um ein lösliches Protein handelt, sollte in dieser Spur theoretisch kein Protein zu finden sein, weil es bei der Reaktion von außen nicht erfasst werden kann. Während der Zellwandlyse mit der Zymolyase 20T und den nachfolgenden Zentrifugationsschritten kann es jedoch bei einem geringen Anteil der Protoplasten zur Beschädigungen der Zellmembran oder zur Zerstörung kommen, in dessen Folge auch intrazelluläres Protein erfasst wird. Die rechnerische Auswertung ergab, dass ca. 1 % des intrazellulären Proteins fälschlicherweise detektiert wurde.

Der Western Blot des PfAQPs auf der rechten Seite zeigt in beiden Fraktionen ein Signal für die dimere Form bei ca. 54 kDa und nur ein schwaches Signal für die monomere Form bei ca. 31 kDa. Die

Probe des Gesamtproteins wurde wie bei der Negativkontrolle nach Aufschluss der Protoplasten erhalten. Zusätzlich wurde noch eine Proteinfällung mittels Trichloressigsäure durchgeführt (3.2.7). In beiden Fraktionen ist das Protein detektierbar, was zeigt, dass diese Methode für die Erfassung der membranständigen Proteine geeignet ist.

Abbildung 4.4 zeigt den Western Blot der biotinylierten putativen MCTs und des *PfFNTs*. Für *PfI1295c* und *PfB0465c* konnte je ein Signal bei 52 kDa detektiert werden, für *PfFNT* konnten Signale bei 31 kDa für das Monomer aber auch die höheren Oligomere bei entsprechender Größe erfasst werden. Wie schon zuvor beobachtet, deutet dieses auf eine hohe Stabilität der Oligomere hin, da diese auch nach der Behandlung mit SDS bei 37 °C noch im Western Blot detektiert werden konnten. Die drei untersuchten Proteine werden somit alle in die Zellmembranen integriert.

Erstaunlich ist jedoch die gefundene Größe für das *PfB0465c* von 52 kDa, da dieses zuvor bei 43 kDa detektiert wurde (Abb. 4.1). Um zu prüfen, ob der Größenunterschied durch einen verstärkten Denaturierungseffekt hervorgerufen wurde, wurde eine weitere Biotinylierung der *PfB0465c* exprimierenden Zellen durchgeführt. Ein Teil des Eluats wurde direkt mit SDS-Ladepuffer inkubiert, der zweite Teil vor der Inkubation mit Trichloressigsäure vollständig denaturiert und anschließend wieder resuspendiert. Der Vergleich beider Proben auf dem SDS-Gel zeigt, dass das direkt inkubierte *PfB0465c* bei einer Größe von 43 kDa detektiert wird, während das denaturierte Protein bei 52 kDa erfasst wird. Diese Verschiebung des Signals war ebenfalls festzustellen, wenn das direkt inkubierte Protein nachträglich bei -20°C eingefroren wurde. Die Abb. 4.5 zeigt die Verschiebung des Signals mit und ohne zusätzlichen Denaturierungsschritt und wurde ebenfalls mit dem α -HA-Antikörper 1:5.000 entwickelt. Die weiterführende Untersuchung bestätigt, dass die Bande des *PfB0465c* auf dem Übersichtsblot das stärker denaturierte Protein zeigt. Da diese Eigenschaft der stärkeren Denaturierung nur bei dem zuvor biotinylierten Protein auftritt, kann dieses nur durch das kovalent gebundene Molekül (den Mercaptobutanon-Linker), welches nach der Disulfidspaltung an den Lysinen verbleibt, erklärt werden. Möglicherweise übt es einen sterischen Einfluss auf die Proteinfaltung aus, die dazu führt, dass es weniger kompakt ist und leichter denaturiert werden kann.

Die Messungen von Dr. Janis Rambow konnten in einem radioaktiven Aufnahmeassay in Hefezellen zeigen, dass keines der beiden putativen MCTs Laktat oder ein alternatives Monocarboxylat leitet. Nur *PfFNT* wird *in vivo* während des Trophozitenstadiums in vergleichbaren Mengen zum Hexosetransporter hergestellt und konnte die Funktionalität in den Messungen zeigen und somit als Laktattransporter in *P. falciparum* identifiziert werden [42].

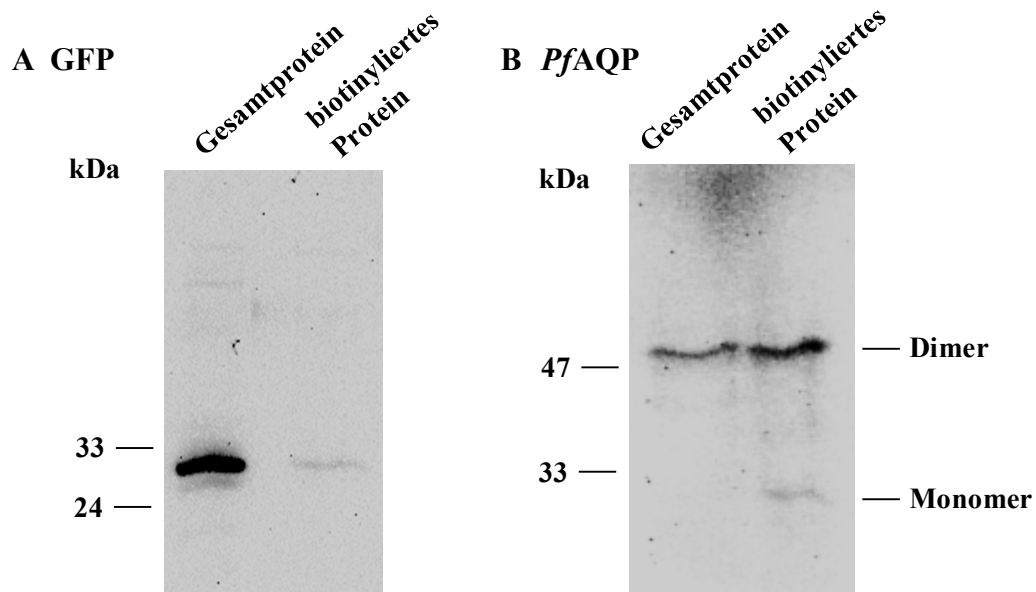


Abb. 4.3: Western Blots der Biotinylierungskontrollen von GFP (A) und *PfAQP* (B) aus *S. cerevisiae*. Es wurde jeweils das Gesamtprotein und das biotinylierte Protein aufgetragen. Für den Nachweis des GFPs wurde der α -GFP(FL)-Antikörper 1:10.000 und für den Nachweis des *PfAQP*s der α -HA-Antikörper 1:5.000 eingesetzt.

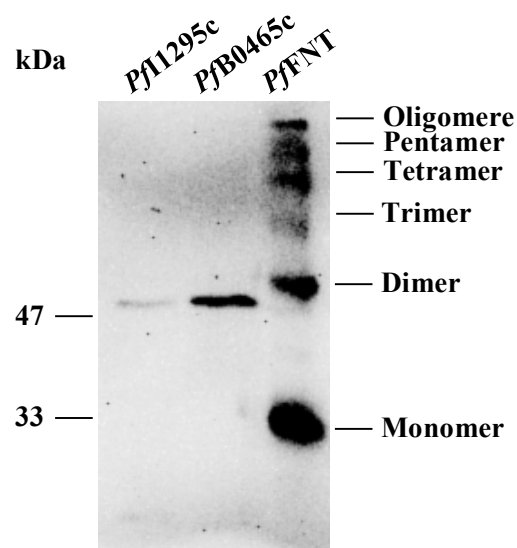


Abb. 4.4: Western Blot der biotinylierten Proteine *PfFNT*, *Pf11295c* und *PfB0465c* mit HA- und His-Tag. Verwendet wurde α -HA-Antikörper 1:5.000.

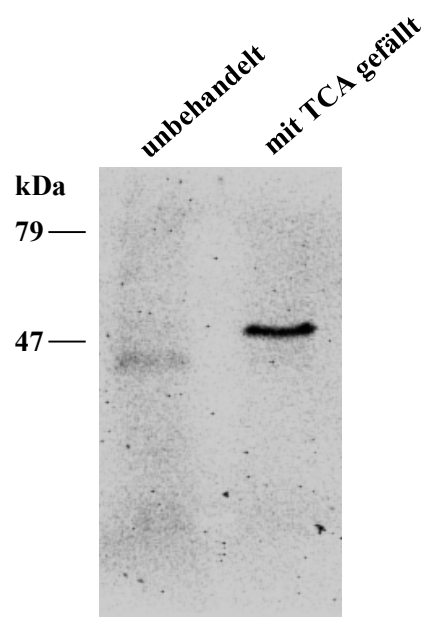


Abb. 4.5: Western Blot von biotinyliertem PfB0465c mit und ohne TCA-Fällung. Verwendet wurde der α -HA-Antikörper 1:5.000. Die Signale bei 43 kDa und 52 kDa zeigen das gleiche Protein mit unterschiedlicher Vorbehandlung und den Einfluss auf das Laufverhalten.

4.2 Zellfreie Proteinherstellung

Zur Herstellung von Proteinen im zellfreien System mussten zunächst zwei essentielle Bestandteile der Synthese gewonnen werden. Der S30-Extrakt, der unter anderem die Ribosomen und Translationsfaktoren enthält [136], und die T7-RNA-Polymerase, die die Transkription im System kontrolliert. Die Herstellung beider Komponenten erfolgte nach dem Protokoll von Schwarz *et al.* 2007 [136] aus *E. coli* Zellen, welche von Dr. Annika Müller-Lucks und Dr. Sinja Bock im Arbeitskreis etabliert wurden.

Die Qualität hat in beiden Fällen einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbeuten richtig gefalteter Proteine bei der zellfreien Herstellung und muss für jede neue Charge geprüft werden. Die Prüfung erfolgte über die Herstellung von GFP und die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität. Dieses konnte auch zur Bestimmung der optimalen Magnesiumkonzentration im System genutzt werden, da die Aktivitäten aller Enzyme im Reaktionsmix von der Magnesiumkonzentration abhängen und nur im Idealfall eine maximale Proteinausbeute erhalten werden kann [136].

4.2.1 Herstellung und Qualität der S 30-Extrakte

Der S30 Extrakt wurde wie unter 3.5.1 beschrieben hergestellt. Insgesamt wurden fünf Chargen aus lysierten BL21(DE3)-Zellen gewonnen und auf die optimale Magnesiumkonzentration für künftige Proteinsynthesen untersucht. Die Quantifizierung erfolgte fluorimetrisch als Doppelbestimmung in 96-Well Fluoreszenzplatten (3.2.8).

Die Ausbeuten lagen bei 13 bis 20 ml pro 5 Liter Fermenterkultur und waren qualitativ stabil, sodass die erhaltenen GFP-Proteinmengen im Mittel bei $106 \% \pm 20 \%$ einer früheren Charge, der SJ 9, lagen. Zudem konnte festgestellt werden, dass ältere Chargen, insbesondere nach einer Lagerung von über sechs Monaten, in der Aktivität abnahmen. Ein Vergleich der BLUs zur Qualitätskontrolle stellte sich als nicht praktikabel heraus, da die so erhaltenen Werte nicht vergleichbar waren. Dieses lag an verschiedenen Faktoren, die die Synthesebedingungen beeinflussen, wie der Variabilität der Puffer und *stocks*, der verwendeten T7-RNA-Polymerasen-Charge und der Inkubationsbedingungen. Vergleichbare Werte konnten erst im direkten Vergleich unter gleichen Bedingungen erzielt werden.

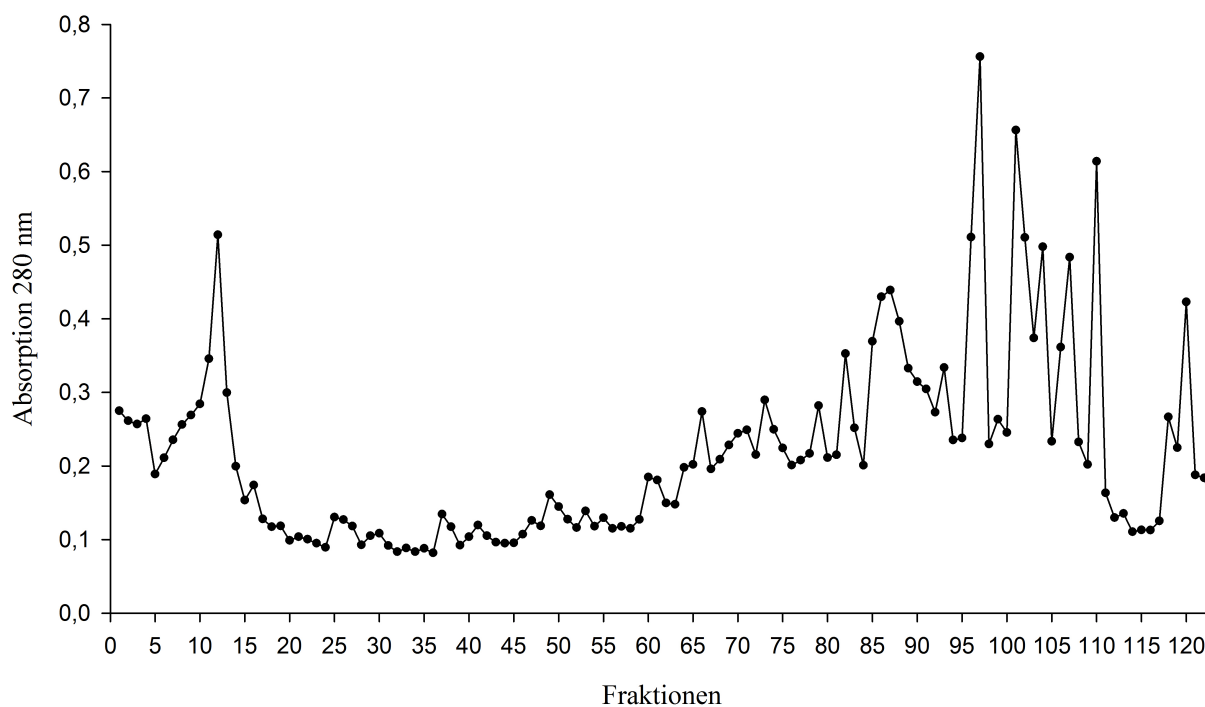
40 % der neu hergestellten Chargen wies ein Optimum der Magnesiumkonzentration von 12 mM auf, 60 % bei 14 mM. Insgesamt war auch dieser Wert trotz Verwendung einer neuen T7-RNA-Polymerase-Charge stabil.

Tab. 4.1: Vergleich der optimalen Magnesiumkonzentrationen und Aktivitäten der S30-Extrakt Chargen

Charge	Interne Bezeichnung	Optimum der Magnesiumkonzentration (mM)	Aktivität in Bezug auf die Charge SJ 9 (%)
9	SJ 9	12 mM	100
10	MJ 10	14 mM	90
11	AJ 11	12 mM	110
12	KJ 12	14 mM	125
13	FJ 13	14 mM	123

4.2.2 Herstellung und Qualitätskontrolle der T7-RNA-Polymerase

Die Herstellung T7-RNA-Polymerase erfolgte wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben. Die aus dem Zellaufschluss erhaltenen Lysate wurden über eine Anionenaustausch-chromatographie gereinigt. Die eluierten Fraktionen wurden in 96-Well UV-Greiner Platten bei 280 nm auf ihren Proteingehalt untersucht. Die Absorptionen der einzelnen Fraktionen sind in Abb. 4.6 dargestellt.

**Abb. 4.6:** Absorptionen der eluierten Fraktionen bei 280 nm der Anionenaustausch-chromatographie der Reinigung der rekombinanten T7-RNA-Polymerase.

Die Elution der T7-RNA-Polymerase wurde im Konzentrationsbereich von 150 mM bis 250 mM erwartet [136], dieses entsprach den Fraktionen 58 bis 79. Um festzustellen ab welcher Salzkonzentration und somit in welchen Fraktionen das Protein eluiert wurde, wurden über den gesamten Elutionsprozess Fraktionen ausgewählt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt. Der Großteil der Proben wurde ab der Fraktion 57 ausgewählt, da dieses der erwarteten Elution entsprach. Der Western Blot ist in Abb. 4.7 gezeigt. Signale konnten in den Fraktionen 57 bis 85 mit dem α -T7-RNA-Polymerase-Antikörper auf einer Höhe von 90 kDa und 110 kDa detektiert werden. Diese entsprachen den erwarteten Elutionsbedingungen. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurden die Fraktionen 60 bis 78 vereinigt und auf 8 mg ml^{-1} konzentriert. Die so erhaltenen 12 ml (96 mg Protein) wurden mit Glycerol so verdünnt, dass sie final in 50 % Glycerol bei einer Konzentration von 4 mg ml^{-1} bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden konnten. Die Aktivität wurde, wie bei dem S30-Extrakt auch, über die Menge GFP quantifiziert, die bei Verwendung im zellfreien System hergestellt werden konnte (4.2.1). Zum Vergleich der Qualität wurde auch hier eine frühere Charge der Polymerase verwendet. Hierbei handelte es sich um Charge I von Dr. Sinja Bock. Es erfolgte eine Doppelbestimmung.

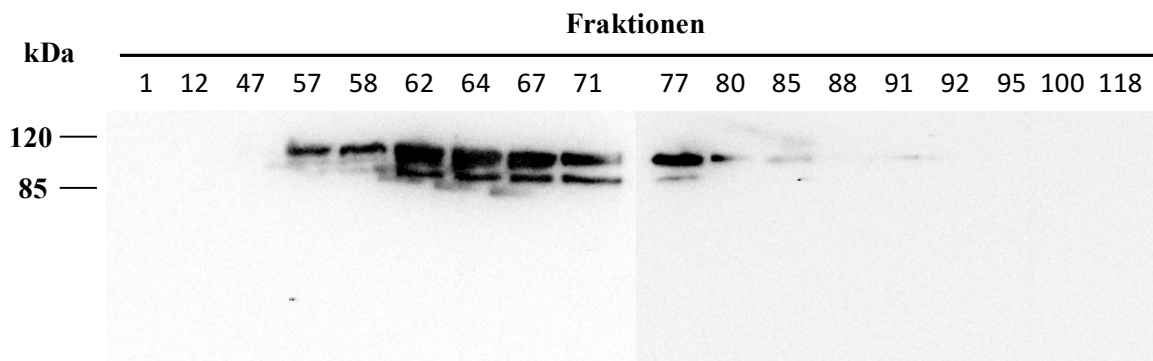


Abb. 4.7: Western Blot ausgewählter Fraktionen der Anionenaustauscherchromatographie zur Reinigung der T7-RNA-Polymerase. Die Signale zeigen die T7-RNA-Polymerase in den Fraktion 57 bis 85 mit dem α -T7-RNA-Polymerase-Antikörper bei einer Verdünnung von 1:5.000.

In Abb. 4.8 ist die gemessene Fluoreszenzintensität der neu hergestellten Charge im Vergleich zur vorherigen Charge dargestellt. Das Ergebnis zeigt, dass die Qualitäten sich nicht signifikant unterscheiden trotz der mehrjährigen Lagerung der älteren Charge.

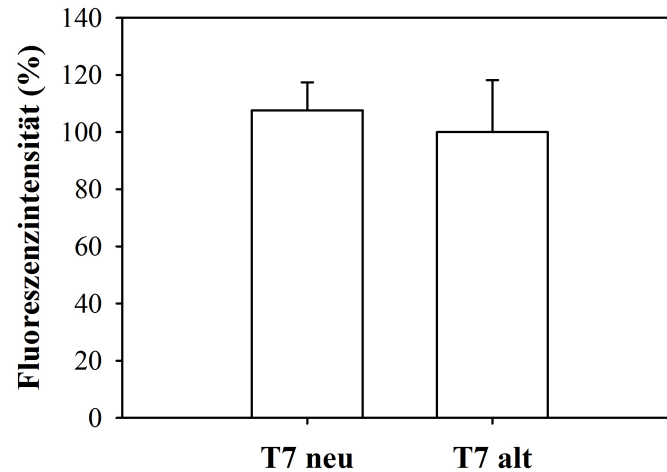


Abb. 4.8: Vergleich der T7-RNA-Polymerase Chargen über die Fluoreszenzintensität.

4.2.3 Detergenzienscreen für die zellfreie Proteinsynthese

Die zellfreie Proteinsynthese von Membranproteinen erfolgt im Arbeitskreis mit dem Ziel der direkten Solubilisierung. Das heißt, dass die herzustellenden Proteine im Prozess der Herstellung direkt mit Detergenzien solubilisiert werden und nicht präzipitieren. Ein geeignetes Detergens für die Herstellung muss jedoch für jedes Membranprotein individuell über einen Detergenzienscreen identifiziert werden. Durch die Verwendung von 24-Well-Platten und Dialysekammern mit 55 µl Fassungsvermögen, ist es möglich bis zu sechs Detergenzien parallel in einer Doppelbestimmung zu prüfen. Hierzu wurde die kodierende DNA, die C-terminal für GFP kodiert, mit den für die Reaktion benötigten Komponenten vereinigt, aliquotiert, mit den gewählten Detergenzien gemischt und bei 30 °C inkubiert (3.5.3). Der Reaktionsmix der verschiedenen Ansätze wurde anschließend per SDS-PAGE mittels In-Gel Fluoreszenz und Western Blot untersucht. Die Herstellung der GFP-Fusionsproteine ermöglichte die Optimierung der Synthese zu einer maximalen Ausbeute korrekt gefalteten Proteins, da das C-terminale GFP nur bei einer korrekten Faltung die Möglichkeit besitzt ein Fluorophor aus Serin, Thyrosin und Glycin zu bilden [187]. Dieses wurde für zellfrei hergestellte Membranproteine über Schmelzpunktbestimmungen und Zirkulardichroismusmessungen gezeigt [149].

Für *PfFNT* wurde ein Detergenzienscreen mit den Detergenzien Triton X 100 (0,1 %), Brij78 (1 %), DDM (0,1 %), Tween 20 (0,075 %) und CHAPS (0,75 %) durchgeführt. Einen zweiten Screen hat Dr. Sinja Bock mit Digitonin, Brij35, Brij58 und Brij98 durchgeführt (vgl. Dissertation Sinja Bock, 2014). In Abb. 4.9 ist die In-Gel-Fluoreszenz und der Western Blot der hergestellten Fusionsproteine gezeigt. Der Western Blot zeigt nur in der Spur des Brij78 Signale, welche dem richtig gefalteten Fusionsprotein bei 55 kDa und einer falsch gefalteten Variante bei 67 kDa entsprechen [149, 98]. In der In-Gel Fluoreszenz ist nur ein Fluoreszenzsignal bei 55 kDa sichtbar, welches dem GFP-Fusionsprotein entspricht. Der Screen zeigt, dass nur in Brij78 *PfFNT*-GFP hergestellt werden kann,

da die übrigen Spuren keine Signale zeigen.

Zur weiteren Optimierung der Herstellung wurde ein weiterer Detergenzienscreen durchgeführt, bei dem der Einfluss der Konzentration von Brij78 untersucht werden sollte. Konzentrationen von 0,4 bis 1,2 % Brij78 wurden für die Synthese eingesetzt und die hergestellten GFP-Fusionsproteine sowohl per SDS-PAGE aufgetrennt und die In-Gel-Fluoreszenz betrachtet, als auch die Fluoreszenzintensitäten mittels Fluorimeter vermessen (Abb. 4.10). Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung in der Herstellung und Auswertung. Hierbei zeigte sich ein Maximum an fluoreszierendem *PfFNT*-GFP bei 1 % Brij78.

Alle zellfrei hergestellten *PfFNT* und $\Delta N\Delta C$ *PfFNT*-Proteine wurden unter diesen Detergenzienbedingungen synthetisiert.

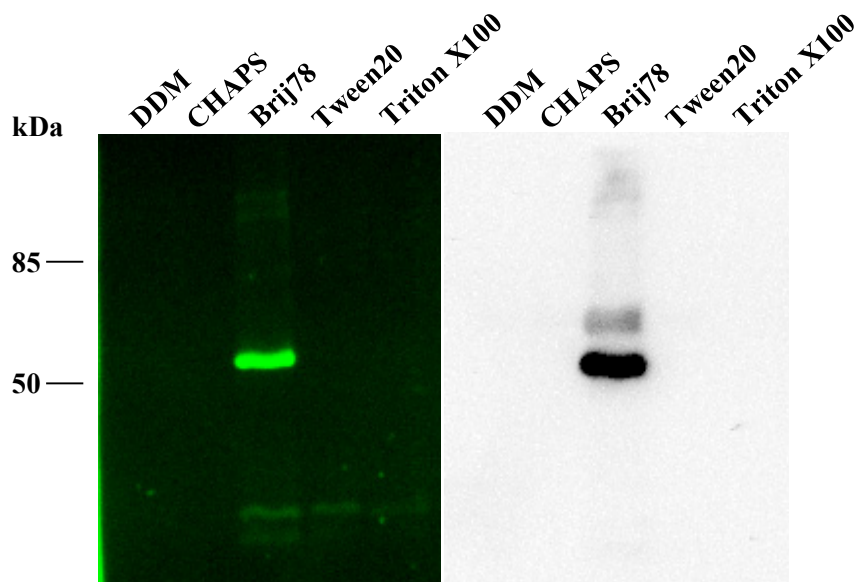


Abb. 4.9: In-Gel Fluoreszenz und Western Blot des *PfFNT* Detergenzienscreen Links: In-Gel Fluoreszenz des richtig gefalteten GFPs. Rechts: Western Blot der Fusionsproteine mit α -GFP(FL)-Antikörper 1:10.000 detektiert (2.9).

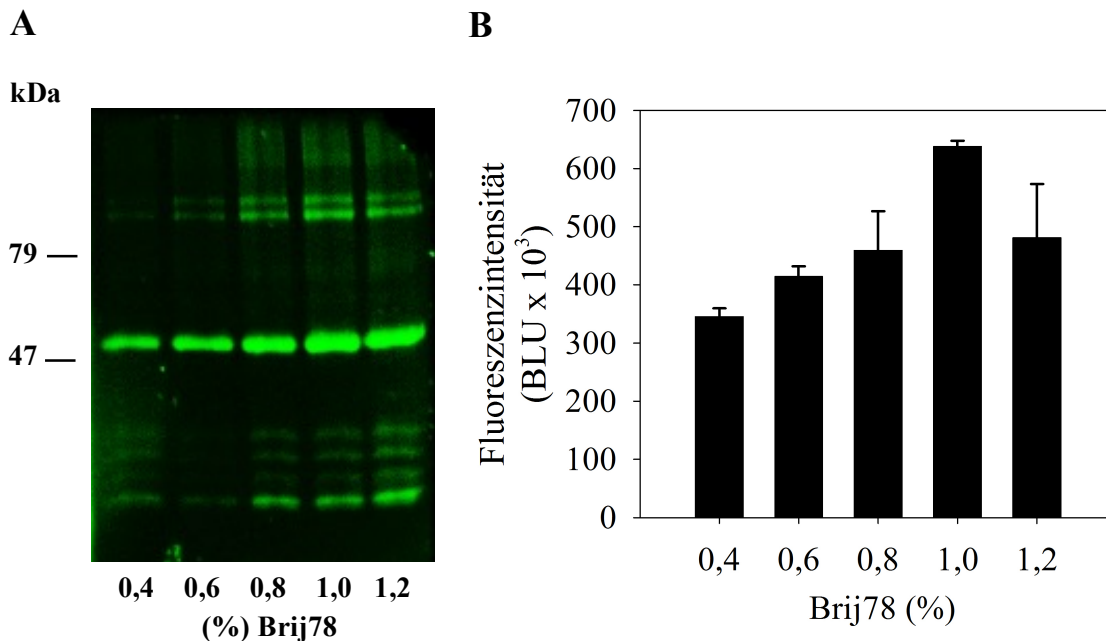


Abb. 4.10: In-Gel-Fluoreszenz der Konzentrationsuntersuchung von Brij78. A: In-Gel Fluoreszenz des Fusionsproteins bei steigenden Brij78-Konzentrationen. B: graphische Darstellung der gemessenen Fluoreszenz des Fusionsproteins bei Brij78-Konzentrationen von 0,4-1,2 %.

4.2.4 Detergenzscreen für die Proteinreinigung

Neben der Auswahl des Detergenzes für die Proteinsynthese mussten auch für die Proteinreinigung verschiedene Detergenzien auf ihre Eignung geprüft werden, da ein größeres Spektrum die Chancen für eine Kristallisation erhöhen würde. Aus diesem Grund wurden die Proteine während der Nickelreinigung (3.2.12.1) mit Puffern, die steigende Konzentrationen Imidazol und die zu prüfenden Detergenzien enthielten eluiert. Mit Hilfe der SDS-PAGE wurde anschließend überprüft, ob diese in der Lage waren *PfFNT* so zu solubilisieren und stabilisieren, dass es von den Nickel-*beads* abgelöst werden konnte.

In Abb. 4.11 sind die entsprechenden Gele nach einer Coomassiefärbung gezeigt. Getestet wurden DDM (0,1 %), DM (0,2 %), CHAPS (1 %), Fos-Cholin 12 (FCH 12) (0,2 %), β -OG (1,2 %), C₈E₅ (1 %), Cymal-5 (0,4 %), Brij78 (0,05 %), n-Nonyl- β -D-Glucopyranosid (NG) (0,4 %), n-Decyl- β -D-Glucopyranosid (DG) (0,14%) und n-Dodecyl- β -D-Glucopyranosid (DDG) (0,014 %) (Abb. 3.5). Eine Elution des gebundenen *PfFNTs* war lediglich bei den Detergenzien Brij78, DDM, Fos-Cholin 12 und DDG zu beobachten, diese erfolgte bei diesen in der Regel bis 400 mM Imidazol. Nur bei DDM konnte festgestellt werden, dass Protein nach der Elution mit 400 mM Imidazol an den Nickel-NTA-*beads* verblieb. Es war somit auch bei DDM keine vollständige Solubilisierung und Stabilisierung möglich, was sich ebenfalls in der Instabilität während der Lagerung zeigte. Das Protein präzipitierte

bereits innerhalb weniger Stunden bei 4 °C. Alle weiteren Detergenzien konnten das PfFNT nicht ausreichend solubilisieren, um eine Elution von den *beads* zu ermöglichen. Diese waren folglich nicht für die weitere Reinigung geeignet.

Die folgenden Gelfiltrationen (4.5.2) wurden mit Brij78 und Fos-Cholin durchgeführt. DDG konnte nicht verwendet werden, da die zweifache CMC bereits oberhalb der Löslichkeit in Wasser lag.

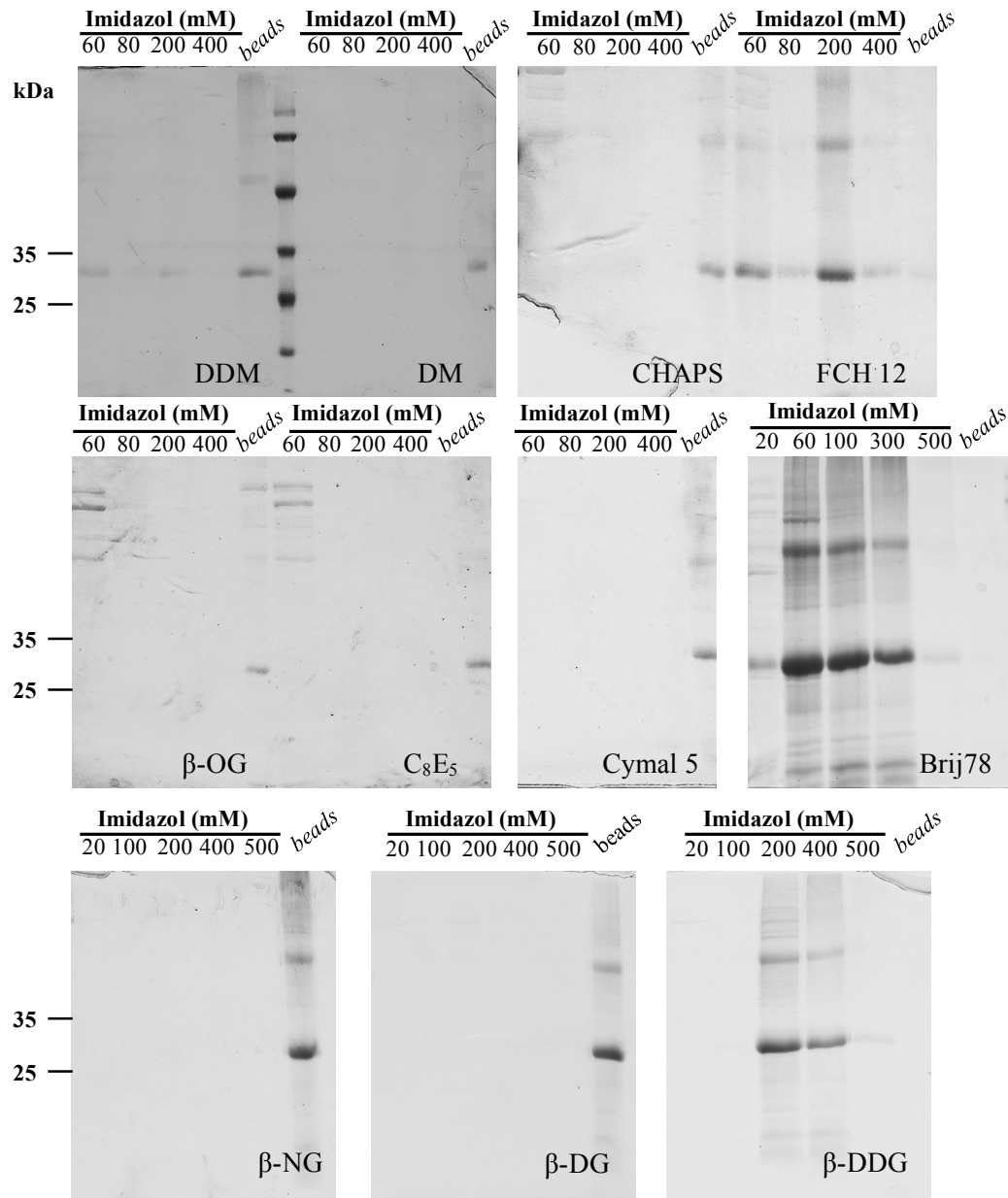


Abb. 4.11: Coomassie gefärbte SDS-Gele der Elutionsfraktionen der Ni^{2+} -NTA-Reinigungen des Detergenzienscreens.

4.2.5 Vergleich der zellfreien Herstellung von *PfFNT* mit N- und C-terminalem His-tag

Zusätzlich zu den eingesetzten Detergenzien in der Herstellung und Reinigung wurde auch der Einfluss der Position des His-tags auf die Expression und die Nickel-Affinitätschromatographie geprüft (4.5.1.1). Es ist bekannt, dass diese einen enormen Einfluss auf die Expressionslevel und die Eigenschaften des Proteins haben kann [188–190]. Neben dem pIVEX2.4a, der für einen N-terminalen His-tag und eine Faktor Xa-Proteaseschnittstelle zwischen dem tag und dem Zielgen kodiert, wurde auch der pIVEX2.3w durch das Entfernen des N-terminalen HA-tags und das Einfügen einer Linker-Sequenz so verändert, dass er als pIVEX2.3woHA eine Faktor Xa-Proteaseschnittstelle zwischen dem C-terminalen His-tag und dem Zielgen beinhaltet. So konnte *PfFNT* sowohl mit einem N-terminalen 6 x His-tag und einem C-terminalen 10 x His-tag hergestellt werden.

Bei der Synthese im *E. coli* basierten zellfreien System zeigten sich keine Unterschiede in Bezug auf das Verhalten in den verschiedenen Detergenzien, es konnte jedoch festgestellt werden, dass die Proteinmengen stark variierten. So war es möglich aus einem 1 ml-Ansatz bis zu 4 mg His-*PfFNT* herzustellen. Unter gleichen Bedingungen konnten allerdings nur 2,5 mg *PfFNT*-His nach der Ni²⁺-Chromatographie gewonnen werden.

4.2.6 Faktor Xa-Verdau

Der Faktor Xa-Verdau wurde eingesetzt, um den His-tag, der nur für die Affinitätschromatographie notwendig war, die Kristallisation aber stören könnte, zu entfernen. Dieser erfolgte wie in Kapitel 3.2.11 beschrieben. Betrachtet wurden hierfür die Unterschiede im Verdau des *PfFNTs* mit N- und mit C-terminalen His-tag. Beide Proteine wurden zellfrei synthetisiert. Die Proteolyse wurde bei 4 °C, 16 °C und 37 °C jeweils für 3, 6 und 24 Stunden durchgeführt, um die optimalen Bedingungen zu ermitteln und einen unspezifischen Verdau auszuschließen. Pro Bedingung wurden 10 µg Protein eingesetzt und mit einer U Faktor Xa verdaut.

In der Abb. 4.12 sind die Western Blots der Verdaue dargestellt. Für das N-terminal *getaggte PfFNT* ist für das unverdaute Protein eine Größe von 30 kDa mit dem α -*PfFNT*-Antikörper detektiert worden. Für das verdaute Protein wurde eine Verschiebung des Signals um 2 kDa erwartet, was der Größe des His-tags und der Faktor Xa Schnittstelle entspricht. Dieser Größenunterschied konnte auch in dem Western Blot detektiert werden. In allen Fraktionen, die für den Verdau eingesetzt wurden, ließ sich nur die kleinere Proteingröße nachweisen, was zeigt, dass das Protein unter allen Bedingungen vollständig umgesetzt wurde. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass die detektierbare Proteinmenge insgesamt mit zunehmender Zeit und Temperatur abnahm, welches aus einem unspezifischen Verdau und thermisch bedingter Zersetzung resultiert. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass das C-terminal *getaggte PfFNT* sich nicht vollständig verdauen ließ. In allen Fraktionen waren beide Proteingrößen vorhanden, die sich in ihrem Verhältnis zueinander nicht unterschieden.

Ein Optimum, bei dem das gesamte Protein verdaut wurde, konnte nicht ermittelt werden. Dieses ist sehr wahrscheinlich durch die benachbarten Aminosäuren der Faktor Xa-Sequenz verursacht, da diese einen großen Einfluss auf die Aktivität der Protease haben [191].

Es konnte somit festgestellt werden, dass nur das *PfFNT* mit dem N-terminalen His-tag vollständig verdaut wurde und die besten Bedingungen bei 4 °C und 3 Stunden lagen.

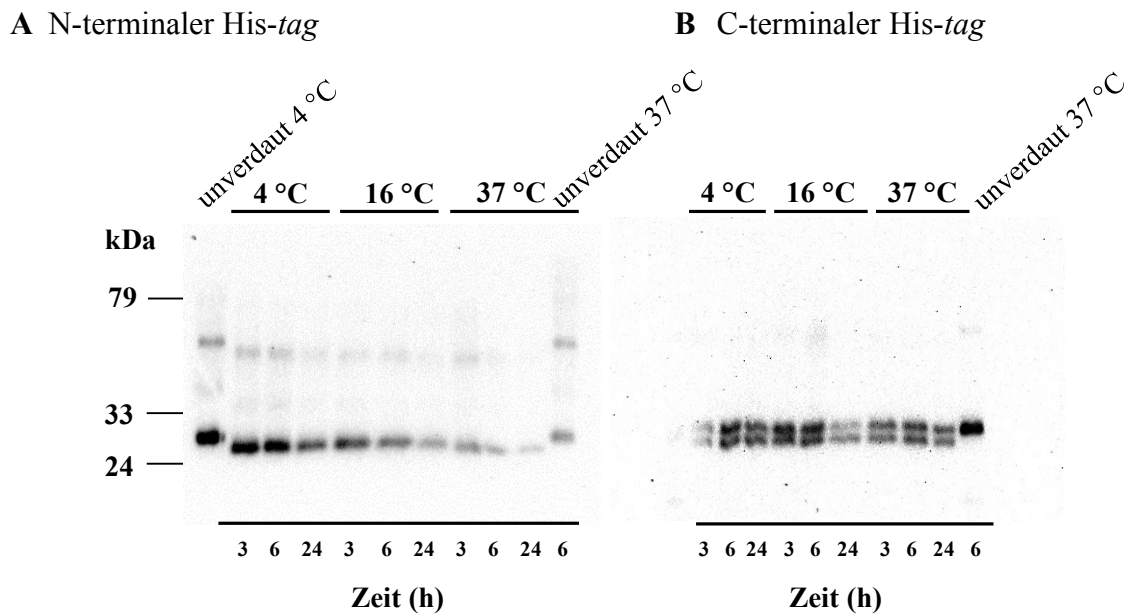


Abb. 4.12: Western Blot des Faktor Xa Verdaus von *PfFNT* mit N- oder C-terminalem His-tag. A: verdautes und unverdautes *PfFNT* mit N-terminalem His-tag inkubiert bei drei verschiedenen Temperaturen und für drei verschiedene Zeiträume. B: verdautes und unverdautes *PfFNT* mit C-terminalem His-tag. Beide Western Blots wurden mit dem α -*PfFNT*-Antikörper 1:10.000 entwickelt.

4.3 Herstellung von *PfFNT* & *EcFocA* in BL21 Zellen

PfFNT sollte zum Vergleich mit dem zellfrei synthetisiertem Protein ebenfalls *in vivo* in *E. coli*-Zellen hergestellt werden. Als Positivkontrolle wurde *EcFocA* als endogenes Protein ebenfalls unter den gleichen Bedingungen überexprimiert. Für die Transformation der Zellen wurden die offenen Leserahmen des *opt. PfFNT* und des *EcFocA* in den pET21X-Vektor über die Schnittstellen *Xho* I und *Bam*H I kloniert. Diese wurden zuvor über eine PCR an die jeweiligen *inserts* angefügt (3.1.14). Die Sequenz wurde vor der Verwendung über die Sequenzierung verifiziert.

Die Expression erfolgte in BL21(DE3) pRep4-Zellen und wurde mit 0,5 bis 1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) induziert. Die Herstellung von *EcFocA* erfolgte bei 37 °C für 4 h. Für *PfFNT* wurden verschiedenen Bedingungen bei 37 °C und 17 °C getestet. Die größte Menge Protein wurde für 500 μ M IPTG und eine Induktion bei 17 °C für 18 h erhalten. Nach der Ernte fand ein Zellaufschluss mit der *French Press* statt, die Zelltrümmer wurden bei 15.000 g abgetrennt und die mikrosomale Fraktion bei 150.000 g gesammelt. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 3.2.2 beschrieben. Die Abb. 4.13 zeigt einen Western Blot der Zelltrümmer und der mikrosomalen Fraktion. Die Detektion erfolgte mit dem α -Penta-His-Antikörper 1:5.000. In beiden Spuren ist eine Bande für das *PfFNT* bei einer Größe von 30 kDa erkennbar, allerdings konnte das stärkere Signal in der Zelltrümmerfraktion detektiert werden. Das lässt darauf schließen, dass der größere Anteil des rekombinanten *PfFNTs* als *inclusion body*, d.h. aggregiertes Protein, vorliegt und in der Zelle präzipitiert ist. Es handelt sich dabei um ein häufiges Phänomen bei der rekombinanten Proteinherstellung in *E. coli* [102]. Ohne weitere Rückfaltungsschritte war somit nur das Protein der Membranfraktion verwendbar. Die Ausbeuten waren jedoch so gering, dass eine Quantifizierung nach der Solubilisierung und Ni^{2+} -Reinigung nicht möglich war.

EcFocA wurde ebenfalls rekombinant hergestellt und konnte nach der Solubilisierung mit 7,9 % β -OG über die Affinitätschromatographie mit Ni^{2+} -NTA-Agarose gereinigt werden. Das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel ist in Abb. 4.14 gezeigt. Die Elution erfolgte wie in Kapitel 3.2.12.1 mit steigenden Konzentrationen Imidazol in Reinigungspuffer, der 1,5 % β -OG enthielt. *EcFocA* eluierte zwischen 200 und 500 mM Imidazol, in den entsprechenden Fraktionen ist das Protein bei 27 kDa in der monomeren Form sichtbar. Wie bei *PfFNT* sind auch bei *EcFocA* die Oligomere sehr SDS-stabil und im SDS-Gel sichtbar. Die Fraktionen mit 200, 300 und 500 mM Imidazol wurden anschließend vereinigt, das Imidazol entfernt und für die Gelfiltration verwendet. Insgesamt konnten aus 750 ml Zellsuspension 2,2 mg gereinigtes *EcFocA* erhalten werden.

Eine Solubilisierung des *EcFocAs* wurde ebenfalls mit 1 % DM durchgeführt, *EcFocA* konnte in DM allerdings nicht an die Ni^{2+} -NTA-Agarose binden und war somit einer weiteren Untersuchung nicht zugänglich.

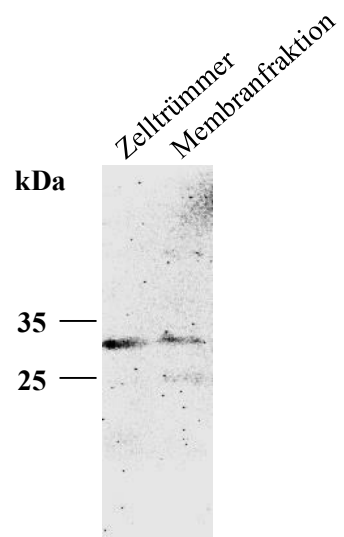


Abb. 4.13: Western Blot der rekombinanten Herstellung von *PfFNT* in *E. coli*. Die Detektion erfolgte mit dem α -Penta-His-Antikörper 1:5.000. Es wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

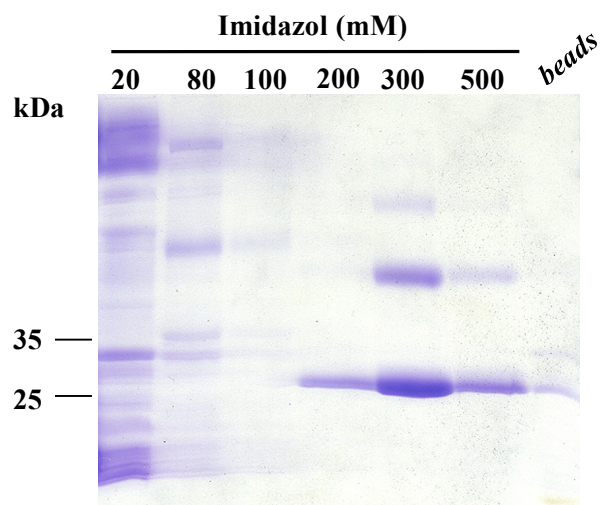


Abb. 4.14: Coomassie gefärbtes SDS-Gel der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie von *EcFocA* aus *E. coli*.

4.4 Herstellung von *PfFNT* in *P. pastoris*

Die Herstellung in *P. pastoris* wurde mit dem PichiaPink™ Expressionssystem durchgeführt. Verwendet wurde der pPink HC-Vektor, in den mit Hilfe eines Linkers (2.5) ein 10-fach His-tag und eine Faktor Xa-Protease-Schnittstelle zwischen die Schnittstellen *Xho* I und *Kpn* I eingebracht wurde. Die Schnittstellen *EcoR* I und *Kpn* I wurden zuvor mittels PCR an die kodierende DNA für *PfFNT* angefügt. Die DNA wurde anschließend sequenziert.

Der Stamm 1 des PichiaPink-Systems wurde mit der so erhaltenen DNA nach der Linearisierung mit *Spe* I transformiert (3.1.10). Nach der Transformation waren auf den Selektionsplatten (SD-Medium) zunächst nur weiße Klone nach einer Inkubationszeit von fünf Tagen entstanden. Diese wurden auf frischem Selektionsmedium erneut ausgestrichen und inkubiert. Rosa Klone erschienen erst nach einer mehrtägigen Lagerung bei 4 °C.

Die genomische DNA der frisch ausgestrichenen weißen Klone wurde isoliert (3.1.18) und mittels PCR geprüft, ob die kodierende DNA für das *PfFNT*-Protein erfolgreich integriert wurde. Hierfür wurden die *primer* AOX I und CYC I verwendet, die in den benachbarten Regionen des Zielgens binden. In Abb. 4.15 sind die so amplifizierte DNA-Sequenzen nach der Auftrennung auf einem 1 %-igen Agarosegel gezeigt.

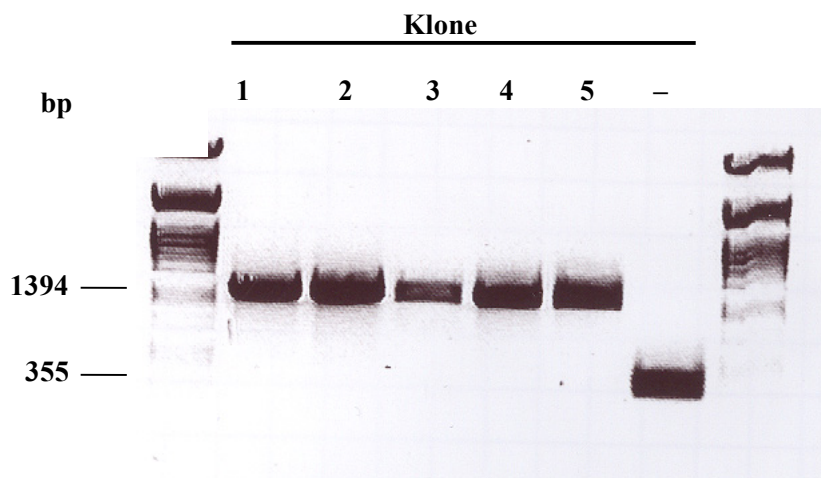


Abb. 4.15: Agarosegel der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente aus der genomischen DNA von fünf *P. pastoris* -Klonen, sowie einer Probe mit Leerplasmid (-).

Aus allen getesteten *PfFNT*-Klone konnte ein DNA-Fragment von ca. 1394 bp amplifiziert werden. Da dieses der berechneten Größe entspricht, konnte gezeigt werden, dass bei allen das *PfFNT* erfolgreich in die genomische DNA integriert wurde. Bei der Negativkontrolle handelt es sich um Zellen, die mit dem linearisierten Leerplasmid transformiert wurden. Für diese wurde auf dem Agarosegel eine Bande bei ca. 355 bp detektiert, welches ebenfalls der berechneten Größe entspricht. Die so verifizierten *PfFNT*-Klone wurden weiter untersucht, um den mit der größten Proteinausbeute zu identifizieren.

4.4.1 Stabilitätsuntersuchung durch Denaturierung

Zunächst wurden die Proben nach der Zellernte aufgeschlossen (3.2.1) und die mikrosomale Fraktion bei 37 °C im SDS-Ladepuffer inkubiert. Das Signal für *PfFNT* konnte auf einer Höhe von ca. 150 kDa mit dem α -Penta-His-Antikörper 1:5.000 detektiert werden. Dieses entspricht der Größe des Pentamers. Zur Verifizierung dieser Annahme wurde dieselbe Probe auch bei 50 °C und 60 °C vor dem Auftragen auf das SDS-Gel behandelt. Hierbei zeigte sich ein zunehmendes Signal bei ca. 30 kDa, welches dem Monomer entspricht und eine Abnahme der pentameren Form. Es handelt sich bei dem in *P. pastoris* hergestellten *PfFNT* somit um das Pentamer, welches gegenüber der Hitzedenaturierung im Ladepuffer sehr stabil ist. Die zunehmende Denaturierung ist in Abb. 4.16 dargestellt. Alle künftigen Proteinproben aus *P. pastoris* wurden bei 60 °C behandelt, bevor sie mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden.

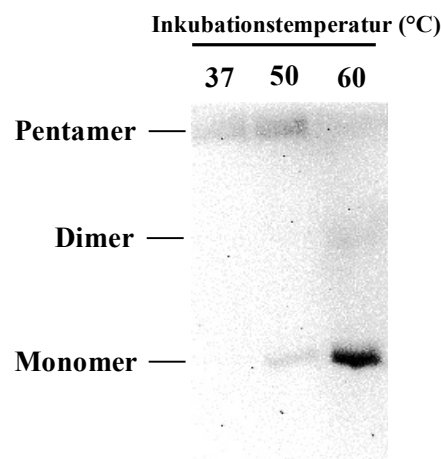


Abb. 4.16: Western Blot des in *P. pastoris* hergestellten *PfFNTs*, welches vor der SDS-PAGE bei unterschiedlichen Temperaturen denaturiert wurde. Die Detektion erfolgte mit dem α -Penta-His-Antikörper 1:5.000. Pro Spur wurden 30 μ g Gesamtprotein aufgetragen.

4.4.2 Optimierung der Proteinausbeute

Um möglichst hohe Expressionslevel zu erhalten, wurden verschiedene Parameter wie die optische Dichte bei 600 nm (Start-OD) bei der Induktion, die Inkubationszeit nach der Induktion und die einzelnen Klone untersucht. Die Analyse der optimalen OD_{600} zur Induktion wurde mit OD 2, 4 und 6 durchgeführt und einer Inkubationszeit nach der Induktion von 46 Stunden bei 30 °C. Hierbei zeigte sich, wie in Abb. 4.17 dargestellt, für OD 2 das Signal mit der höchsten Intensität und eine stetige Abnahme der Intensität mit höheren Zellzahlen.

Die Veränderung über die Zeit ist in Abb. 4.18 gezeigt. Eine Probennahme zu verschiedenen Zeitpunkten (nach 15,5, 24, 39 und 47 Stunden) während der Inkubation mit Methanol zeigte eine maximale Signalstärke bei 39 h. Die Abnahme der Proteinmenge bei 24 h und 47 h lässt sich durch einen proteolytischen Abbau in der Zelle erklären.

Die Auswahl eines Klones erfolgte nach den ermittelten Bedingungen. Es wurden hierfür drei Klone ausgewählt und die Signalintensitäten des detektierten *PfFNTs* auf dem Western Blot verglichen (Abb. 4.19). Die Quantifizierung der Signalintensitäten erfolgte mit Hilfe des Lumi Imagers. Klon 3 zeigte im Vergleich die höchste Intensität der Bande, allerdings sind in allen Spuren Doppelbanden auf Höhe des Monomers erkennbar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Überlesen des Stopp-codons durch die Polymerase, sodass das *PfFNT* hergestellt wird, aber auch ein 1 kDa größeres *PfFNT*, welches durch zusätzliche Aminosäuren bis zum nächsten Stopp-codon verlängert ist.

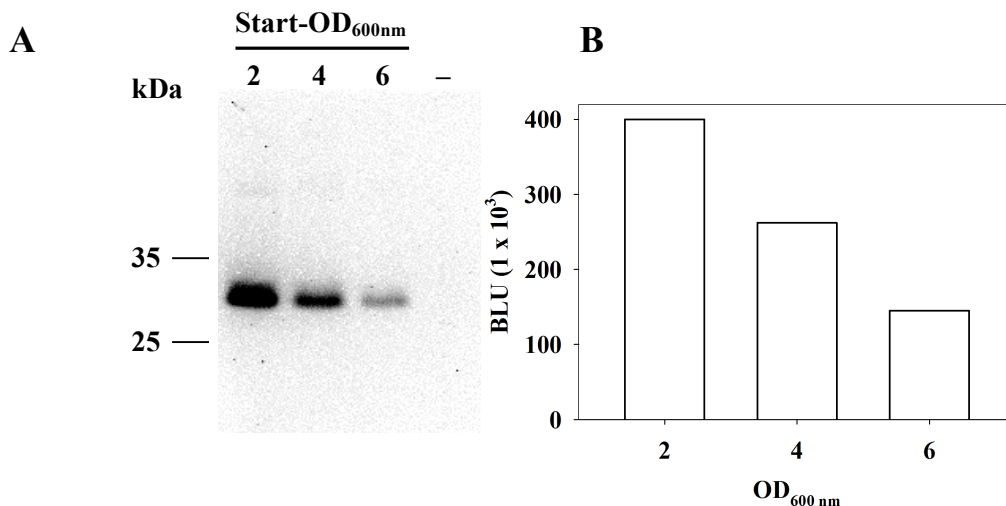


Abb. 4.17: A: Western Blot der mikrosomalen Fraktionen aus *P. pastoris* nach der Induktion bei der Start-OD 2, 4 und 6. Die Detektion erfolgte mit dem α -Penta-His-Antikörper 1: 5.000. Pro Spur wurden 30 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Spur 4 zeigt die Negativkontrolle (-), Zellen mit Leerplasmid, ohne *PfFNT*. B: Quantifizierung der Signalintensitäten am Lumi Imager.

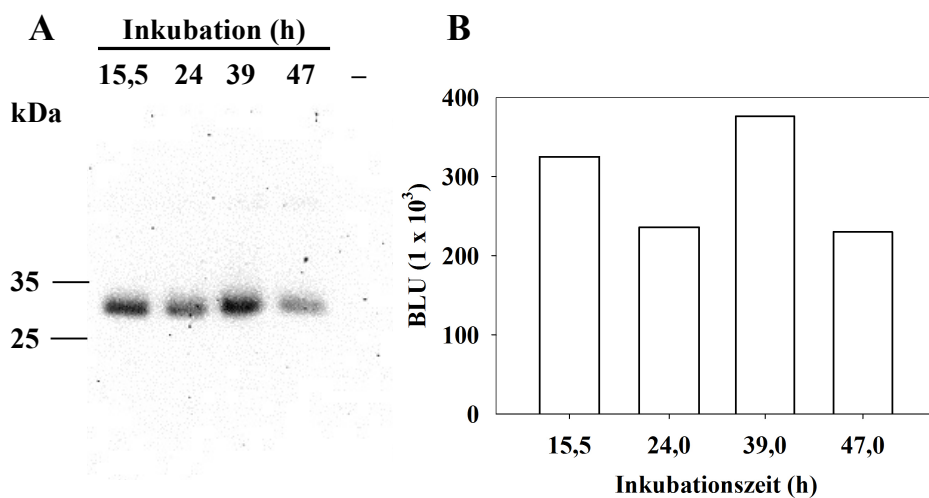


Abb. 4.18: A: Western Blot der mikrosomalen Fraktionen aus *P. pastoris* nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die Detektion erfolgte mit dem α -Penta-His-Antikörper 1:5.000. Pro Spur wurden 30 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Spur 5 zeigt die Negativkontrolle (-) der Zellen mit Leerplasmid. B: Quantifizierung der Signalintensitäten am Lumi Imager.

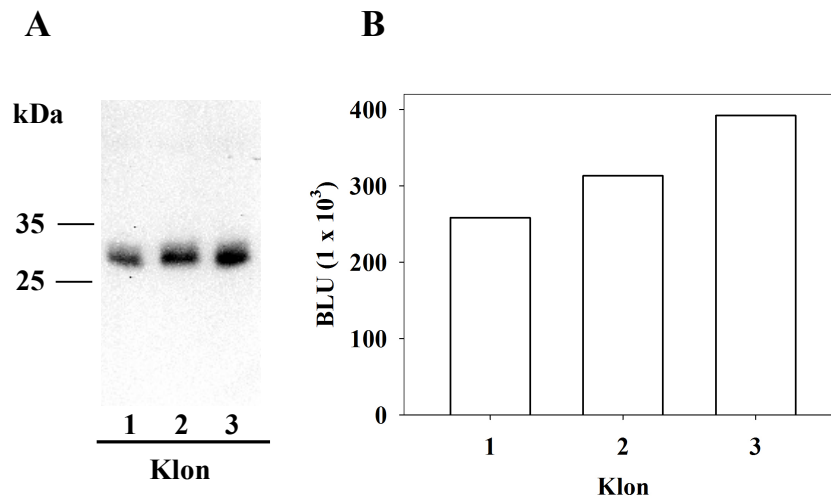


Abb. 4.19: A: Western Blot der mikrosomalen Fraktion dreier *PfFNT* exprimierender Klone, sowie die Quantifizierung der Signalintensitäten am Lumi Imager (B). Für die Detektion des Western Blots wurde der α -Penta-His-Antikörper 1:5.000 verwendet. 30 μ g Gesamtprotein pro Spur.

4.4.3 Einfluss zusätzlicher Stopp-codons

Das mögliche Überlesen des Stopp-codons sollte durch die Integration zwei weiterer Stopp-codons (TAA, TAG) verhindert werden, sodass nur noch das *PfFNT* mit *His-tag* ohne zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus hergestellt würde. Aus diesem Grund wurde das Plasmid *pPink_HC_opt. PfFNT* mit *Xho* I und *Kpn* I verdaut und ein Linker (2.5) zwischen diese Schnittstellen ligiert, der nach dem *His-tag* alle drei Stopp-codons enthielt. Das so erhaltene Plasmid *pPink_FXa_opt. PfFNT* wurde anschließend über den Verdau mit *Spe* I linearisiert und für die Transformation von elektrokompenten *P. pastoris* verwendet.

Die genomische Integration wurde über eine PCR verifiziert und die transformierten Klone auf ihre Expressionslevel überprüft. Die Herstellung erfolgte wie bereits ermittelt, d.h. es wurde zur Induktion eine OD₆₀₀ von 2 verwendet, sowie eine Inkubationszeit von 32 h. (Eine Inkubationsdauer von 39 h ließ sich aus praktischen Gründen nicht umsetzen.) Im Western Blot der Abb. 4.20 sind die Signale gezeigt, die durch den α -Penta-His-Antikörper in der mikrosomalen Fraktion detektiert wurden. Auf dem Western Blot ist pro Spur nur noch ein einfaches Signal für das Monomer vorhanden. Das Einführen zusätzlicher Stopp-codons hat demnach dazu geführt, dass nur noch das *PfFNT* in der gewünschten Größe hergestellt wird. Es lässt sich daraus schließen, dass zuvor das Stopp-codon überlesen wurde. Dieses kann dadurch bedingt sein, dass es sich bei dem zuvor verwendeten Stopp-codon TGA um das am wenigsten in *P. pastoris* verwendete Triplet der drei möglichen Stoppcodons handelt [115]. Die Signalintensitäten wurden wie zuvor ebenfalls mit dem Lumi Imager quantifiziert. Der Vergleich ergab das höchste Expressionslevel für Klon 5. Dieser wurde für die weiteren Arbeiten der Herstellung in *P. pastoris* verwendet.

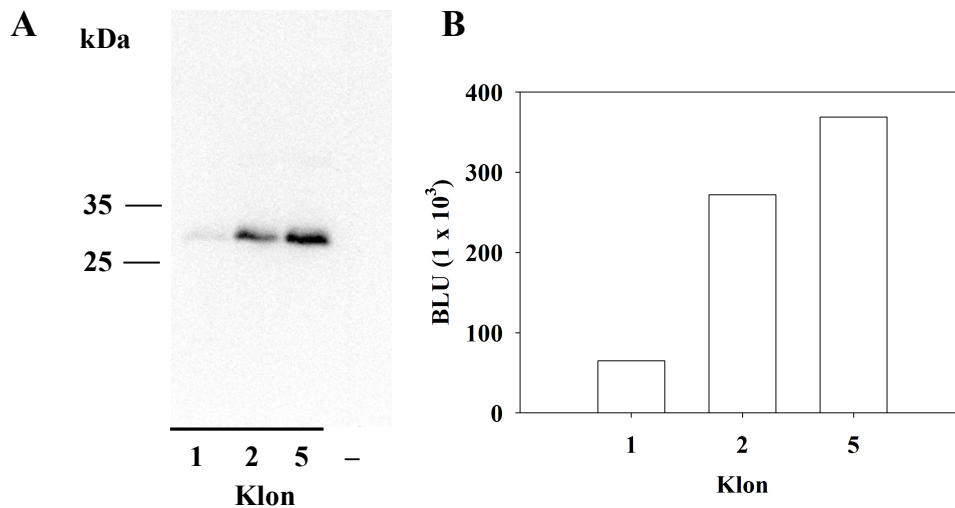


Abb. 4.20: Western Blot der mikrosomalen Fraktion dreier *PfFNT* exprimierender Klone (A), sowie die Quantifizierung der Signalintensitäten am Lumi Imager (B). Für die Detektion des Western Blots wurde der α -Penta-His-Antikörper 1:5.000 verwendet. Pro Spur wurden 30 μ g Gesamtprotein aufgetragen, die letzte Spur zeigt die Negativkontrolle (-).

4.4.4 Detergenzscreen für die Solubilisierung

Für die Solubilisierung des *PfFNTs* wurden die Zellpellets der mikrosomalen Fraktionen in dem Solubilisierungspuffer (2.10) mit den entsprechenden Detergenzien bei einer Proteinkonzentration von 5 mg ml⁻¹ über Nacht bei 4 °C resuspendiert. Das aus den Membranen solubilierte Protein wurde bei einer weiteren Zentrifugation von 100.000 g von den nicht solubilierten Bestandteilen abgetrennt, per SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend ein Western Blot durchgeführt (3.2.2). Als Detergenzien wurden Brij35 (2 %), β -OG (7,9 %), DDM (1 %), DM (1 %), Triton X 100 (2 %), Fos-Cholin 12 (0,7 %) und LDAO (0,5 %) verwendet, da diese in der Literatur für Membranproteine als erfolgreich beschrieben wurden [192]. SDS wurde als Positivkontrolle genutzt, da es durch seine Eigenschaft als ionisches Detergens besonders gut die Wechselwirkungen zwischen dem Membranprotein und der Zellmembran herabsetzen kann. Der Western Blot in Abbildung 4.21 zeigt die solubilierten Proteine. Das SDS konnte als Positivkontrolle die größte Menge *PfFNT*, LDAO und DDM nur ungefähr ein Zehntel bzw. ein Zwanzigstel dessen aus der Membran solubilisieren. Ein noch geringerer Anteil ließ sich durch DM und Fos-Cholin 12 solubilisieren. Brij35, β -OG und Triton X 100 waren hierfür nicht geeignet und zeigten kein Signal für *PfFNT*.

Die Solubilisierung im großen Maßstab für die Gelfiltration wurde dementsprechend mit LDAO und DDM durchgeführt.

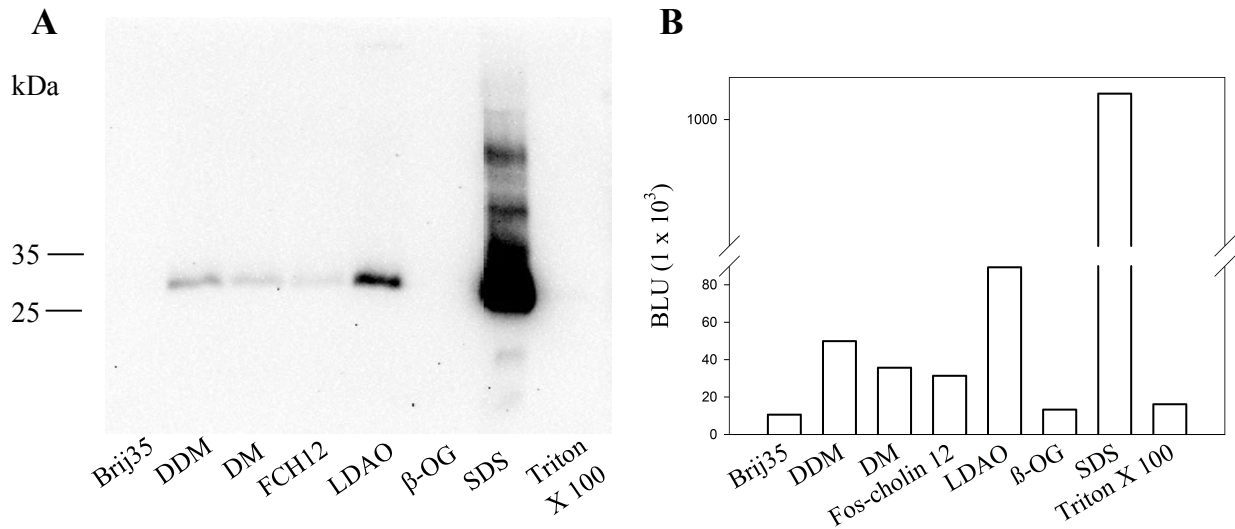


Abb. 4.21: A: Western Blot der solubilisierten Proteine in den untersuchten Solubilisierungspuffern. Die Detektion erfolgte mit dem α -Penta-His-Antikörper 1:5.000. Es wurden jeweils 30 μ g Gesamtprotein aufgetragen. B: Quantitative Auswertung der Signalintensitäten mit dem Lumi Imager.

4.4.5 Fermentierung

Zur Gewinnung großer Zellmassen und Proteinmengen wurde ein Fermentierprozess genutzt. Die Fermentierung wurde mit dem Klon 5 der mit dem *PfFNT* transformierten *P. pastoris*-Zellen nach einem Protokoll des Arbeitskreises von Prof. Urban Johanson der Universität Lund durchgeführt (3.4.3). Bei der Durchführung der Fermentierung wurde ein Sauerstoffgehalt von mindestens 20 % eingestellt und nach dem Verbrauch des initial enthaltenen Glycerols die Zufuhr der Kohlenstoffquellen (Glycerol und Methanol) mit einer sehr geringen Rate von 6 ml h^{-1} durchgeführt. Das Stoppen der Zufuhr ermöglichte die Kontrolle der Limitierung der Kohlenstoffquellen und der Vitalität der Zellen. Ein exponentieller Sauerstoffanstieg innerhalb von 30 Sekunden nach Beenden der Zufuhr erwies sich hierbei als ideal. Ein langsamerer oder zu einem späteren Zeitpunkt auftretender Sauerstoffanstieg deuteten darauf hin, dass zu viel des Glycerols oder Methanols im Fermenter akkumuliert war, d.h. die Rate zu hoch eingestellt oder die Zellen nicht vital waren. Insbesondere die Methanolinduktion musste sehr langsam durchgeführt werden, da es andernfalls zu einer toxischen Akkumulation im Fermenter führte. Der Sauerstoffgehalt war während der gesamten Zeit starken, schnellen Schwankungen unterworfen. Der gesamte Wachstums- und Induktionsprozess wurde über die OD_{600} der Kultur und das Pelletgewicht kontrolliert. Proben zur Untersuchung der Expressionlevel wurden nach 0 h, 3 h, 19 h, 24 h, 42 h und 46 h gezogen. Die Werte der gemessenen In-Prozess-Kontrollen sind in Abb. 4.22 dargestellt. Die OD_{600} und das Pelletgewicht erreichten nach ca. 25 h ihr Plateau mit einem Pelletgewicht von 280 g l^{-1} und einer OD von 250. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde die Biozellmasse unter limitierenden Bedingungen mit der Zufuhr von Glycerol erhöht. Anschließend erfolgte die Zufuhr von Methanol und somit die Induktion. Der Western Blot in Abb. 4.22 zeigt die mikrosomalen Fraktionen der während der Induktion gezogenen Proben. Zur Vergleichbarkeit wurden jeweils $30 \mu\text{g}$ Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Der α -Penta-His-Antikörper detektiert ein Signal bei 30 kDa für die monomere Form und einen Anstieg der Signalintensitäten bis 46 h. Die Proteinmenge in der Zelle stieg somit bis zum Fermentierungsende 46 h nach Beginn der Induktion kontinuierlich an. Insgesamt konnten 505 g Zellmasse aus einem Startvolumen von 1,5 l gewonnen werden. Bei der Reproduktion im Arbeitskreis ergab sich nach einer Induktionszeit von 24 h eine Zellmasse von 340 g bei 2 l Startvolumen.

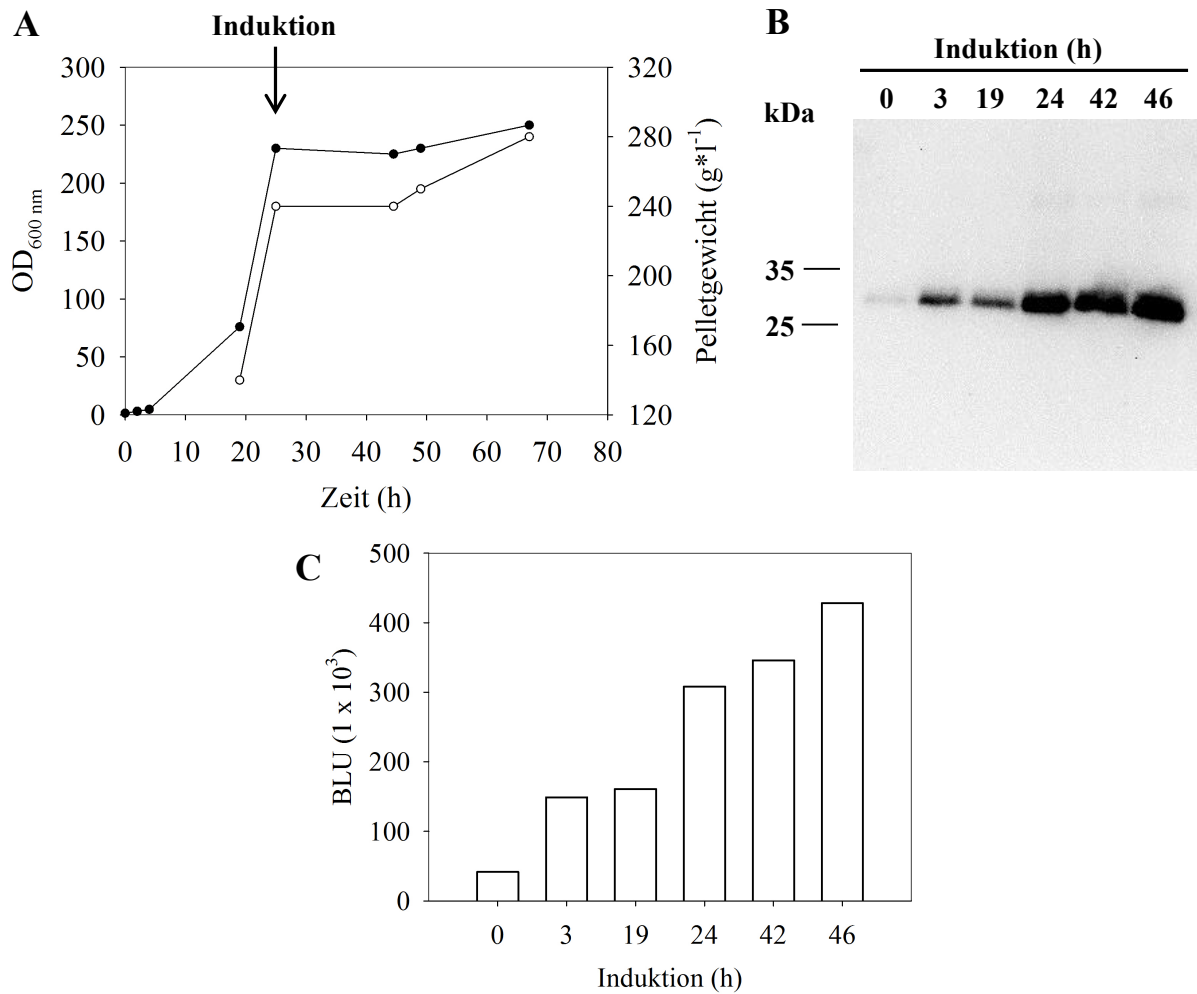


Abb. 4.22: A: In-Prozess-Kontrollen der Fermentierung. OD₆₀₀ und Pelletgewicht sind gegen die Zeit aufgetragen. Der Pfeil kennzeichnet den Induktionsbeginn. B: Western Blot der Proben während der Induktion. 30 µg Gesamtprotein pro Spur. Verwendet wurde der α-Penta-His-Antikörper 1:5.000. C: Quantitative Auswertung der Signalintensitäten des Western Blots mit dem Lumi Imager.

4.5 Proteinreinigung für die Kristallisation

Sowohl die zellfrei als auch die in *P. pastoris* hergestellten Proteine wurden für Kristallisationsansätze gereinigt. Hierfür wurde im ersten Schritt eine Ni²⁺-Affinitätschromatographie, ggf. mit Detergenzienaustausch, und im Anschluss eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Die Reinigungen sollten störende Fremdproteine entfernen, mit dem Ziel, nach der Gelfiltration ein homogenes, monodisperses *PfFNT* oder $\Delta N\Delta C$ *PfFNT* für die Kristallisation zu erhalten.

4.5.1 Nickel-Affinitätschromatographie

Wie bereits in Kapitel 4.2.4 beschrieben, wurde die Ni²⁺-Affinitätschromatographie nicht nur zur Proteinreinigung durchgeführt sondern diente auch zur Prüfung, ob die gewählten Detergenzien das Protein ausreichend solubilisieren und stabilisieren konnten. Im Anschluss an die Detergenzienscreens wurde diese Chromatographie nur noch für den Zweck der Reinigung verwendet.

4.5.1.1 Vergleich der Elutionsprofile des zellfrei hergestellten *PfFNTs* mit unterschiedlich positionierten *tags* und in unterschiedlichen Detergenzien

Die Durchführung der Affinitätschromatographie und die Konzentrationen der eingesetzten Detergenzien sind in Kapitel 3.2.12.1 beschrieben. Im Detergenzienscreen konnte festgestellt werden, dass lediglich Brij78, Fos-Cholin und bei niedrigeren Proteinkonzentrationen auch DDM, *PfFNT* ausreichend solubilisieren konnten (4.2.4). Betrachtet wurde in diesem Schritt allerdings nicht die Effektivität der Reinigung. In Abb. 4.23 sind die Coomassie-gefärbten SDS-Gele der Ni²⁺-NTA-Reinigungen gezeigt. Das N-terminal *getaggte PfFNT* wurde in Brij78, Fos-Cholin 12 und DDM gereinigt (Teil A, B und D der Abb. 4.23). Bei allen Detergenzien war bereits im Waschschriff mit 20 mM Imidazol eine schwache Elution des *PfFNTs* sichtbar sowie starke Verunreinigungen in den 60/80 mM-Fractionen. Zudem war bei allen die späteste Elutionsfraktion (300 mM Imidazol) die reinste, bei der neben dem *PfFNT* Monomer auch die Oligomere bis zum Pentamer detektiert wurden. Ein großer Unterschied zeigte sich jedoch in der Imidazolkonzentration, bei der das *PfFNT* größtenteils eluiert wurde. Dieses lag für Brij78 und DDM im niedrigeren Bereich um die 80 mM Imidazol, während in Fos-Cholin eine Verschiebung zu 200 mM Imidazol stattfand.

Die größte Affinität zum Nickelkomplex konnte somit in Fos-Cholin beobachtet werden. Daraus resultierte, dass die größte und „sauberste“ Menge *PfFNT* in Fos-Cholin gereinigt werden konnte. Hierbei war kein Unterschied zwischen Fos-Cholin 12 und Fos-Cholin 14 zu beobachten, die sich lediglich in der Länge der Alkylketten unterscheiden.

C-terminal getaggtes *PfFNT* wurde ebenfalls in vergleichbarer Weise eluiert, wie am Beispiel der Abb. 4.23 C gezeigt. Auch hier erfolgte die Elution in DDM bereits zum größten Teil bei 80 mM Imidazol, welches die schwache Affinität zum Nickelkomplex bestätigte.

Es konnte festgestellt werden, dass im Falle des zellfrei hergestellten *PfFNTs* die Position des *tags* im Protein im Vergleich zum Detergens eine untergeordnete Rolle für die Affinität spielte.

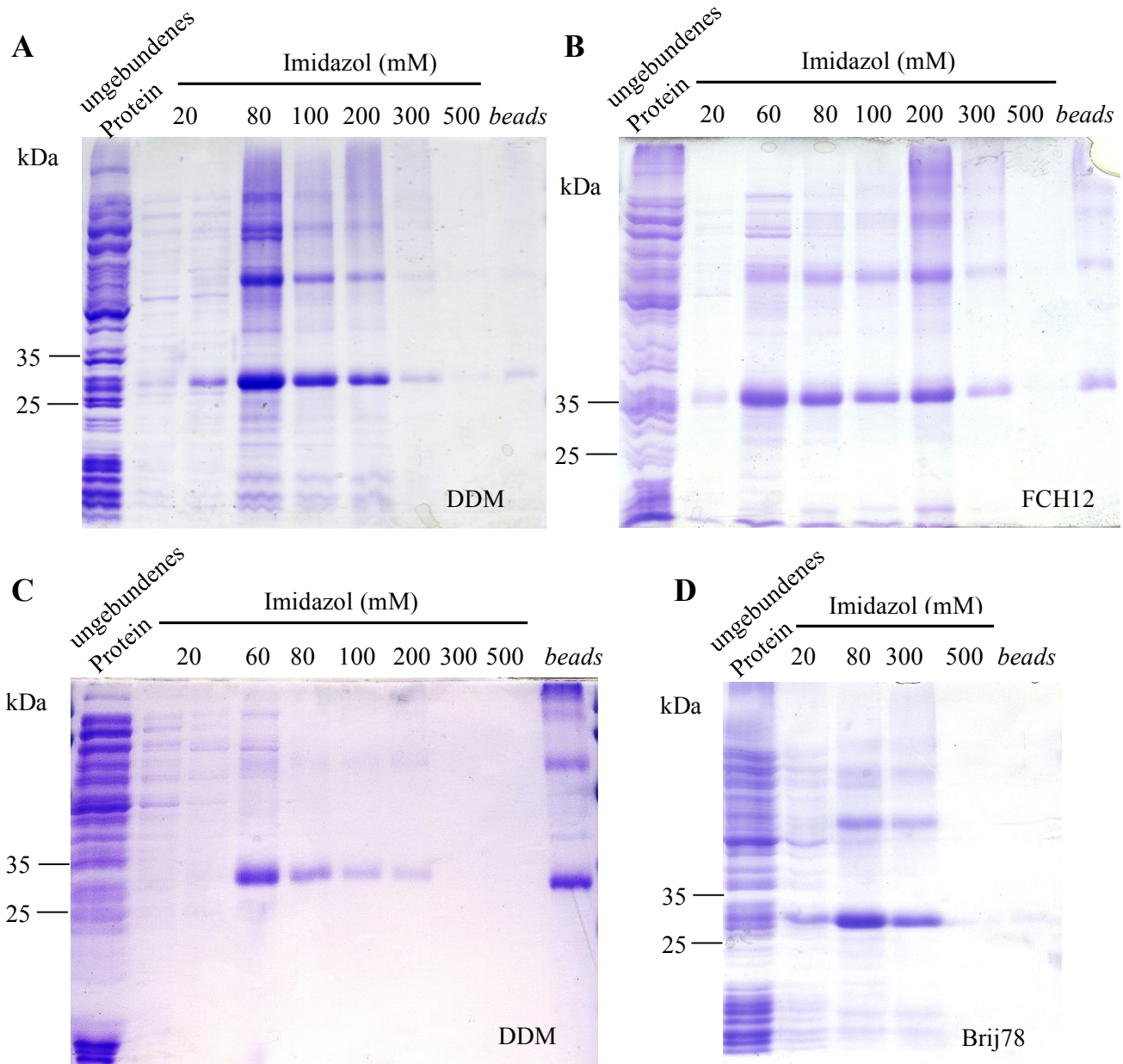


Abb. 4.23: Coomassie gefärbte SDS-Gele der Elutionsfraktionen der Ni^{2+} -NTA-Reinigungen von zellfrei hergestelltem *PfFNT* mit N-terminalem His-*tag* (A, B, D) und C-terminalem His-*tag* (C). Die Reinigung erfolgte in DDM (A, C), Fos-Cholin 12 (B) und Brij 78 (D).

4.5.1.2 Vergleich von automatisierter und manueller Affinitätschromatographie

Die Nickel-Affinitätschromatographie wurde in dieser Arbeit überwiegend manuell durchgeführt. Zum Vergleich der Ergebnisse wurde jedoch auch die automatisierte Reinigung mit Hilfe einer HisTrap[®]-Säule am Äkta Purifier durchgeführt.

Die Reinigung folgte dem Ablaufschema der manuellen Reinigung (3.2.12.1). Nach dem Binden des Proteins an die Säule wurden Verunreinigungen zunächst mit 20 Säulenvolumina 20 mM Imidazol im Reinigungspuffer (mit 0,05 % Brij78) entfernt und die stufenweise Elution mit je fünf Säulenvolumina à 100 mM und 250 mM durchgeführt.

In Abb. 4.24 ist der Verlauf der Absorption der Elutionsfraktionen bei 280 nm während der Reinigung gezeigt. Die hohe Absorption zu Beginn zeigt die Elution der ungebundenen Proteine. Während des Waschschritts mit 20 mM Imidazol ist eine geringe Absorption zu beobachten, die bei 27 ml mit dem Anstieg auf die 100 mM Imidazol-Stufe endet. Es folgen die Anstiege auf die 250 mM und 500 mM Imidazol-Stufen bei 32 und 37 ml. Die starke Absorption des Imidazols maskierte die schwache Absorption des PfFNTs, da dieses kein Tryptophan aufweist und somit eine schwache Absorption bei 280 nm besitzt. Ein kleiner Peak ließ sich dennoch zu Beginn der zweiten Stufe identifizieren. Eine Auftrennung der verschiedenen Fraktionen auf dem SDS-Gel konnte zeigen, dass ein geringer Anteil des PfFNTs bereits während der ersten Stufe, der größere Teil jedoch zu Beginn der zweiten Stufe eluiert wurde.

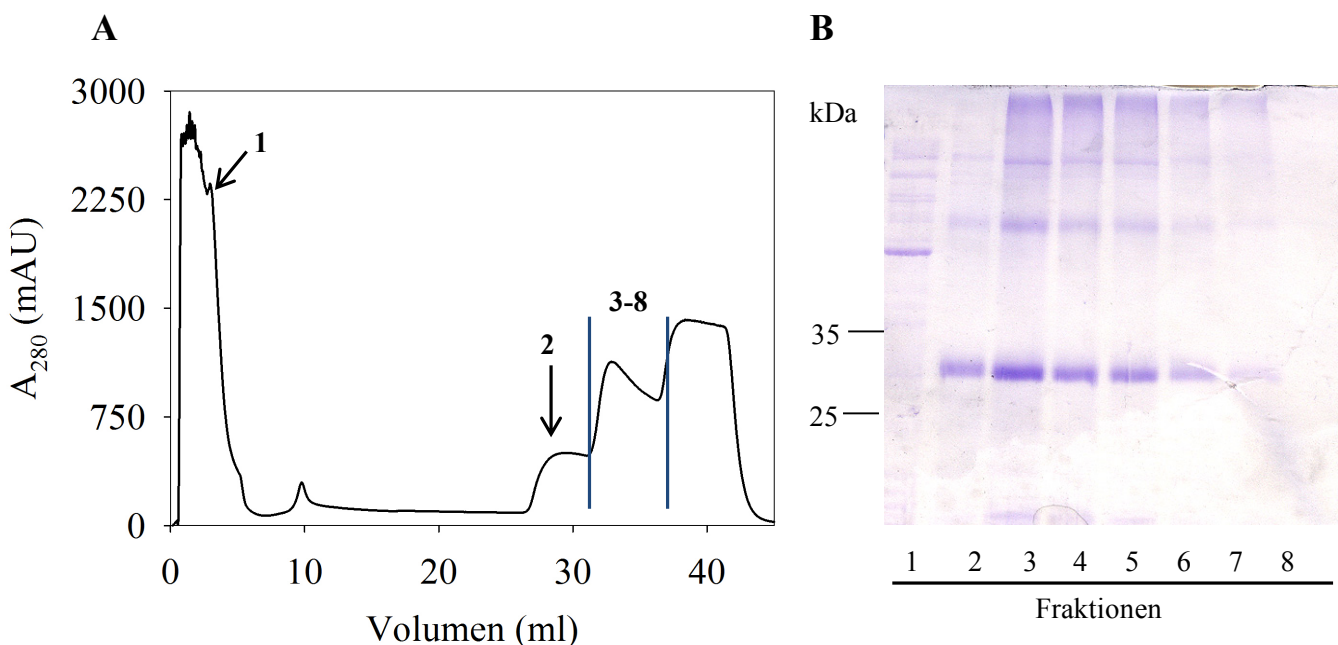


Abb. 4.24: Ni²⁺-Reinigung mit dem Äkta Purifier. A: Absorptionen der Elutionsfraktionen bei 280 nm. B: Coomassie-gefärbte SDS-Gele ausgewählter Fraktionen.

Der Vergleich der beiden Methoden zeigte, dass bei Beiden bereits eine Elution bis 100 mM Imidazol erfolgte, die reineren Proteine jedoch bei 250 mM bzw. 300 mM Imidazol erhalten wurden. Die entsprechenden Fraktionen zeigten auf dem SDS-Gel jeweils sauberes monomeres PfFNT und dessen Oligomere. Optisch konnten hierbei nur geringe Unterschiede in der Verteilung der Intensitäten der Oligomere untereinander festgestellt werden. Eine anschließende Größenausschlusschromatographie ergab keine Unterschiede in der Proteingröße, der Reinheit oder der oligomeren Form (Abb. 4.25).

Aus Gründen der schnelleren Durchführbarkeit und des geringeren Puffereinsatzes wurden alle weiteren Reinigungen manuell durchgeführt.

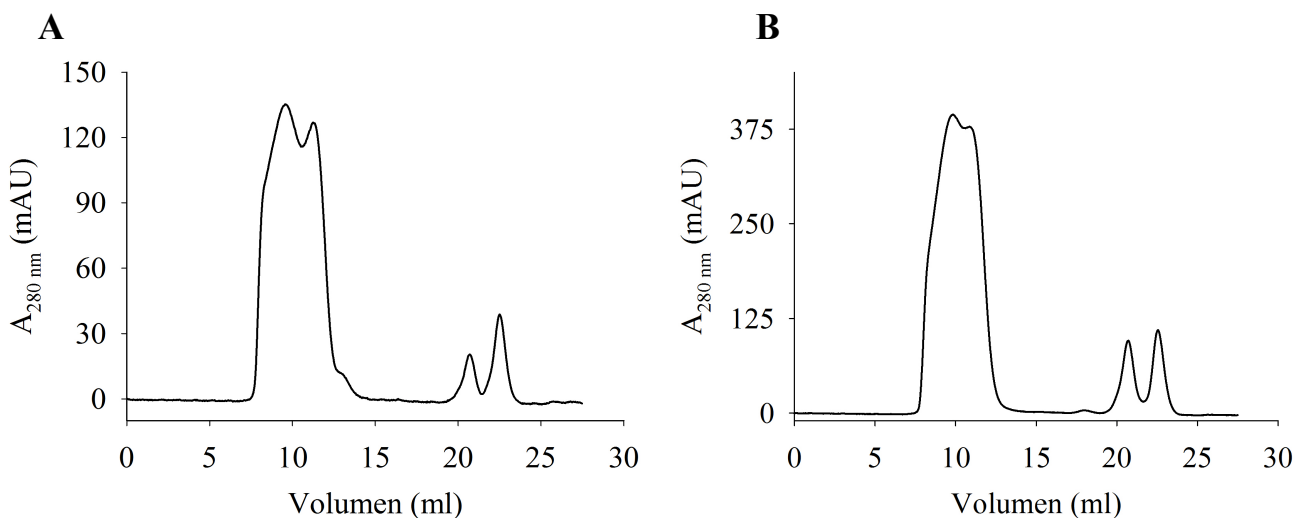


Abb. 4.25: Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie der 250/300 mM Imidazol Fraktionen. Gezeigt sind die Absorptionen bei 280 nm. A: automatisiert mit der Äkta gereinigtes PfFNT. B: manuell gereinigtes PfFNT.

4.5.2 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie folgte als zweiter Reinigungsschritt im Anschluss an die Nickel-Affinitätschromatographie. Verwendet wurde eine Superdex 200 10/300 GL Säule mit dem Äkta Purifier. Die Durchführung ist unter 3.2.12.2 beschrieben.

Die Gelfiltrationen wurden in unterschiedlichen Puffern und Detergenzien durchgeführt, die in den jeweiligen Abschnitten beschrieben sind. Diese dienten der Analyse des Proteinverhaltens unter den verschiedenen Bedingungen und hatten das Ziel, eine homogene, monodisperse Proteinfraction für die Kristallisationsansätze zu erhalten.

4.5.2.1 Untersuchung der Oligomeregrößen der Ni²⁺-Affinitätschromatographie Fraktionen

Bei der Durchführung der Ni²⁺-Affinitätschromatographie konnte festgestellt werden, dass die bei höheren Imidazolkonzentrationen eluierten Proteine stärkere Signale für die Oligomere auf dem SDS-Gel aufwiesen, als die 80 mM Fraktionen. Es wurde vermutet, dass bei den niedrigeren Konzentrationen zunächst die schwächer gebundenen Monomere eluiert würden, während die höheren Oligomere entsprechend ihrer höheren Anzahl an Histidin-*tags* erst später von den Ni²⁺-NTA-*beads* verdrängt würden. Eine mögliche Missfaltung dieser Monomere könnte hier für die Verhinderung der Oligomerisierung verantwortlich sein.

Zur Verifizierung dieser Annahme wurden sowohl die 80 mM als auch die 200 mM Imidazol Fraktionen separat mittels Größenausschlusschromatographie aufgetrennt. Am Beispiel des in Brij78 oder Fos-Cholin 12 solubilisierten *Pf*FNTs sind in Abb. 4.26 die gemessenen Elutionsprofile gezeigt. Es konnte sowohl in Brij78 als auch in Fos-Cholin 12 eine Verschiebung zu höheren Oligomeren/Proteingrößen mit steigender Imidazolkonzentration festgestellt werden. Während für Brij78 bei der 200 mM Fraktion zwei Signale bei 9,5 ml und 11,5 ml (ca. 395 kDa und 195 kDa) und eine Schulter im Ausschlussvolumen detektiert wurden, ist in der 80 mM Fraktion lediglich eine Schulter bei 395 kDa sowie eine Verschiebung des höchsten Signals zu dem späteren Peak zu beobachten. Bei den Peaks könnte es sich um das Pentamer bei 395 kDa sowie um das Trimer bei 195 kDa handeln. Die Schulter zeigt aggregiertes Protein, welches durch seinen großen hydrodynamischen Radius im Ausschlussvolumen erwartet wird.

Ein ähnliches Phänomen wurde für das *Pf*FNT in Fos-Cholin beobachtet. In der 80 mM Fraktion wurden Peakmaxima bei 12,5 ml und 13,9 ml (ca. 137 kDa und 84 kDa) und für die 300 mM Fraktion zusätzlich bei 10,6 ml (ca. 267 kDa) festgestellt. Bei einer Mizellgröße von 25 kDa für das Fos-Cholin 12 ergeben sich somit in der 80 mM Fraktion Proteingrößen, die dem Trimer und Dimer entsprechen, während in der 300 mM Fraktion auch das vermutete Pentamer vorhanden ist.

Dieses bestätigt die These, dass durch den zunehmenden Oligomerisierungsgrad eine verstärkte Affinität an den Ni²⁺-NTA-Komplex der Agarose vorliegt und somit höhere Imidazolkonzentrationen zur Verdrängung notwendig sind.

Das Auftragen der vereinigten Fraktionen führte zu einem Elutionsverhalten, das alle Peaks der gezeigten Elutionen in unterschiedlichem Verhältnis zueinander aufwies.

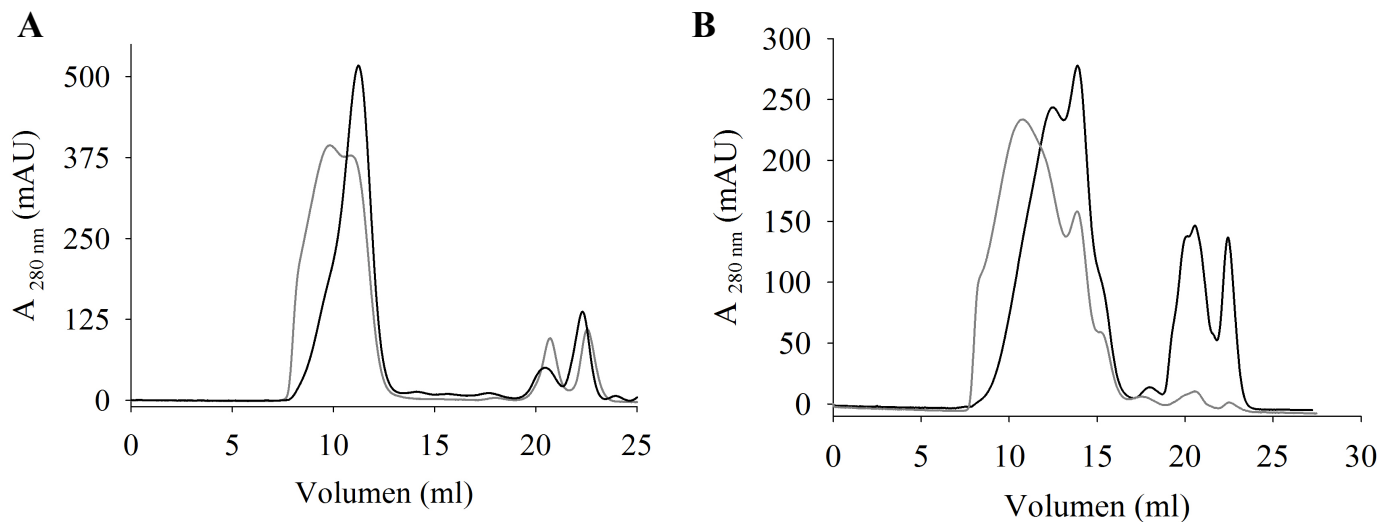


Abb. 4.26: Elutionsprofile der 80 mM (schwarz) und 200 mM (grau) Imidazol Fraktionen von *PfFNT* in 0,05 % Brij78 (A) und 0,1 % Fos-Cholin 12 (B).

4.5.2.2 Elutionsprofile des zellfrei hergestellten *PfFNTs* in Brij78, Fos-Cholin 12 und Fos-Cholin 14

Das zellfrei hergestellte *PfFNT* wurde in Fos-Cholin 12, Fos-Cholin 14 und Brij78 solubilisiert und mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt. Wie in Abb. 4.27 gezeigt, konnte in keiner der getesteten Bedingungen ein monodisperser Peak mit einer homogenen Proteingröße erhalten werden. In allen Fällen wurde ein Gemisch der verschiedenen Oligomere identifiziert. Der Einfluss auf die Oligomerenbildung und -stabilisierung durch die genannten Detergenzien wurde im Folgenden untersucht.

Für Fos-Cholin 12 und 14 wurde aufgrund der ähnlichen Struktur und Eigenschaften ein geringer Unterschied in der Stabilisierung des *PfFNTs* erwartet. Die höhere Hydrophobizität durch die verlängerte Alkylkette des Fos-Cholin 14 ließ jedoch vermuten, dass die Oligomerisierung zur pentameren Form verschoben würde. Wie in Abb. 4.27 (A und B) zu sehen ist, wurde diese These allerdings nicht bestätigt.

Für Fos-Cholin 12 konnten sowohl das vermutete Pentamer bei 10,6 ml (267 kDa), das Trimer bei 12,5 ml (137 kDa) und das Dimer bei 13,9 ml (84 kDa) im Elutionsprofil identifiziert werden. Für Fos-Cholin 14 war allerdings nur ein marginaler Unterschied auszumachen, der vornehmlich in einem schmalen Peak bestand. Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass Fos-Cholin 14 mit 47 kDa eine größere Mizellgröße besitzt als das Fos-Cholin 12 mit 25 kDa (Anatrace). Der Größenunterschied der Mizelle führte zu einer scheinbaren Verschmelzung der Peaks, da die Auflösung der geringen Größenunterschiede hierdurch überdeckt wurde. Auch bei dieser Elution waren noch das vermutete Pentamer bei 10,6 ml und das Dimer bei 13,2 ml detektierbar.

Für Brij78 (Abb. 4.27 (C)) konnte ein Signal mit einer linksseitigen Schulter beobachtet werden, welcher bei einer Größe von ca. 195 kDa wahrscheinlich der trimeren Form entspricht. Die Schulter

bei einem Elutionsvolumen von 9,5 ml könnte einen geringen Anteil Pentamer repräsentieren.

Eine Basislinientrennung der Oligomerenpeaks war in keinem der Fälle festzustellen, so dass eine Isolierung der einzelnen Oligomere nur schwer durchführbar war.

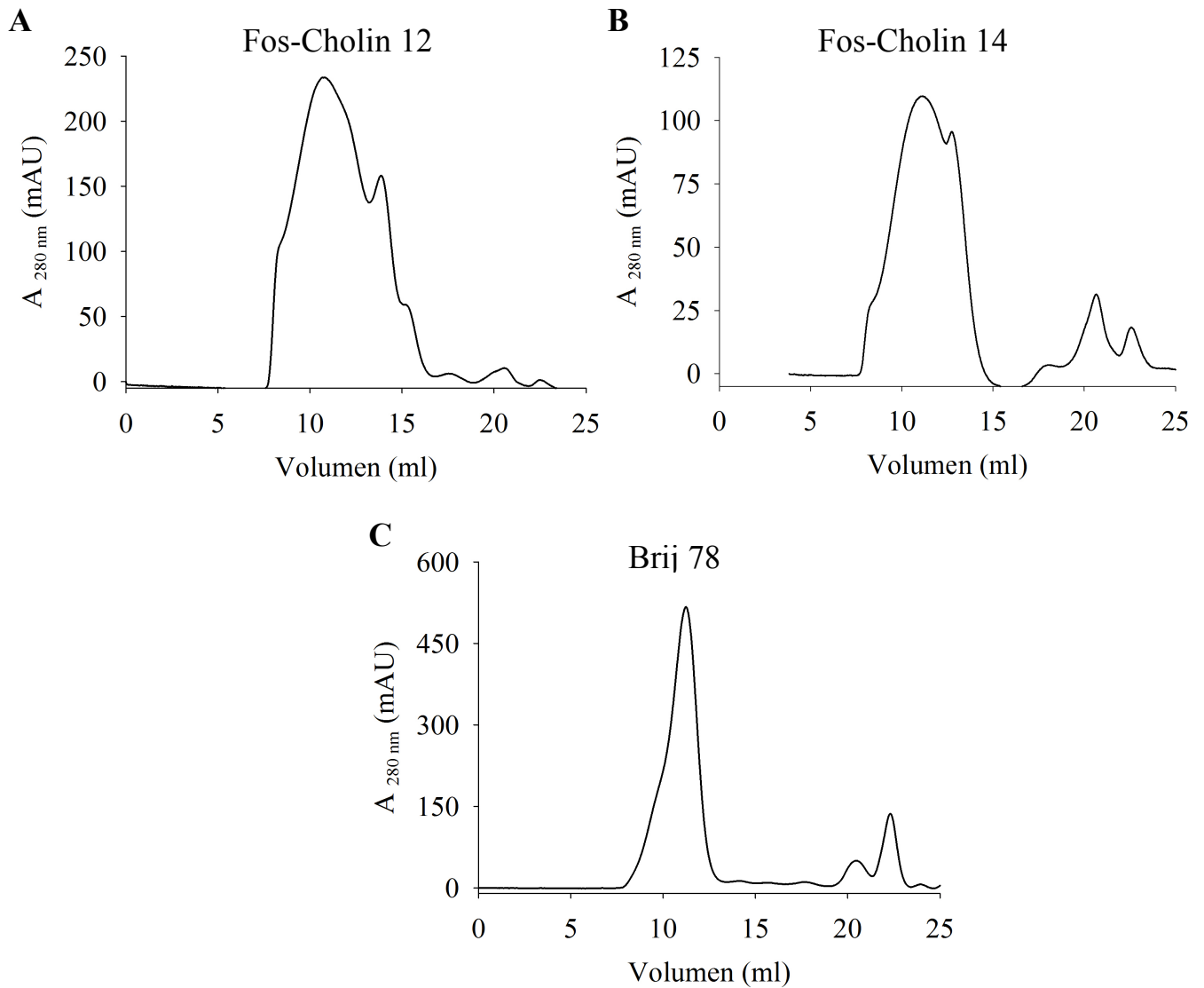


Abb. 4.27: Elutionsprofile des zellfrei hergestellten *Pf*fNTs in Fos-Cholin 12 (A), Fos-Cholin 14 (B) und Brij78 (C) der Größenausschlusschromatographie.

4.5.2.3 Einfluss des pH-Wertes und von Pufferzusätzen auf die Oligomerisierung

Mit dem Ziel, einen monodispersen Peak des Pentamers isolieren zu können, wurden neben der Auswahl der Detergenzien auch der Einfluss des pH-Werts, der Salzkonzentration im Puffer und der Zusatz von Glycerol auf die Oligomerisierung untersucht.

Der Zusatz von Glycerol soll durch die zunehmende Hydrophobizität des Puffers Oligomere stabilisieren [163]. Aus diesem Grund wurden dem Reinigungspuffer 10 % Glycerol zugesetzt. Es konnte hierbei kein Einfluss auf das Elutionsprofil des *PfFNTs* festgestellt werden (Abb. 4.28).

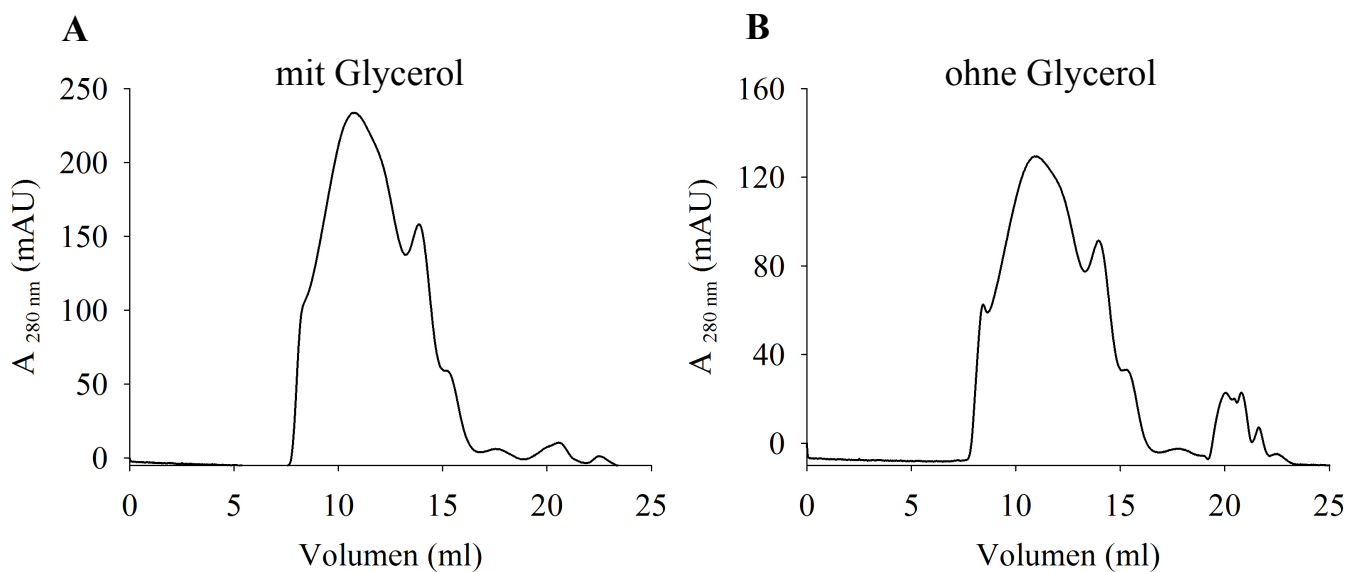


Abb. 4.28: Elutionsprofil *PfFNT* in 0,1 % Fos-Cholin 12. A: ohne Zusatz von Glycerol. B: mit Zusatz von 10 % Glycerol im Reinigungspuffer.

Die Erhöhung der Salzkonzentration im Reinigungspuffer von 150 mM auf 300 mM NaCl sowie die Senkung des pH-Wertes wurden in einem 0,02 % Fos-Cholin 14 haltigem Puffer durchgeführt. Für die Untersuchung bei pH 5 wurde ein Puffer aus 50 mM Citrat und 150 mM NaCl verwendet.

In Abb. 4.29 sind die Elutionsprofile des *PfFNTs* in den beiden variierten Puffern als auch im Reinigungspuffer mit 0,02 % Fos-Cholin 14 gezeigt. Es konnten keine Unterschiede im Oligomerisierungsverhalten des Proteins auf der Gelfiltrationssäule festgestellt werden. Weder die Erhöhung der Salzkonzentration auf 300 mM, noch die Senkung des pH-Wertes zeigte einen Effekt auf das *PfFNT*.

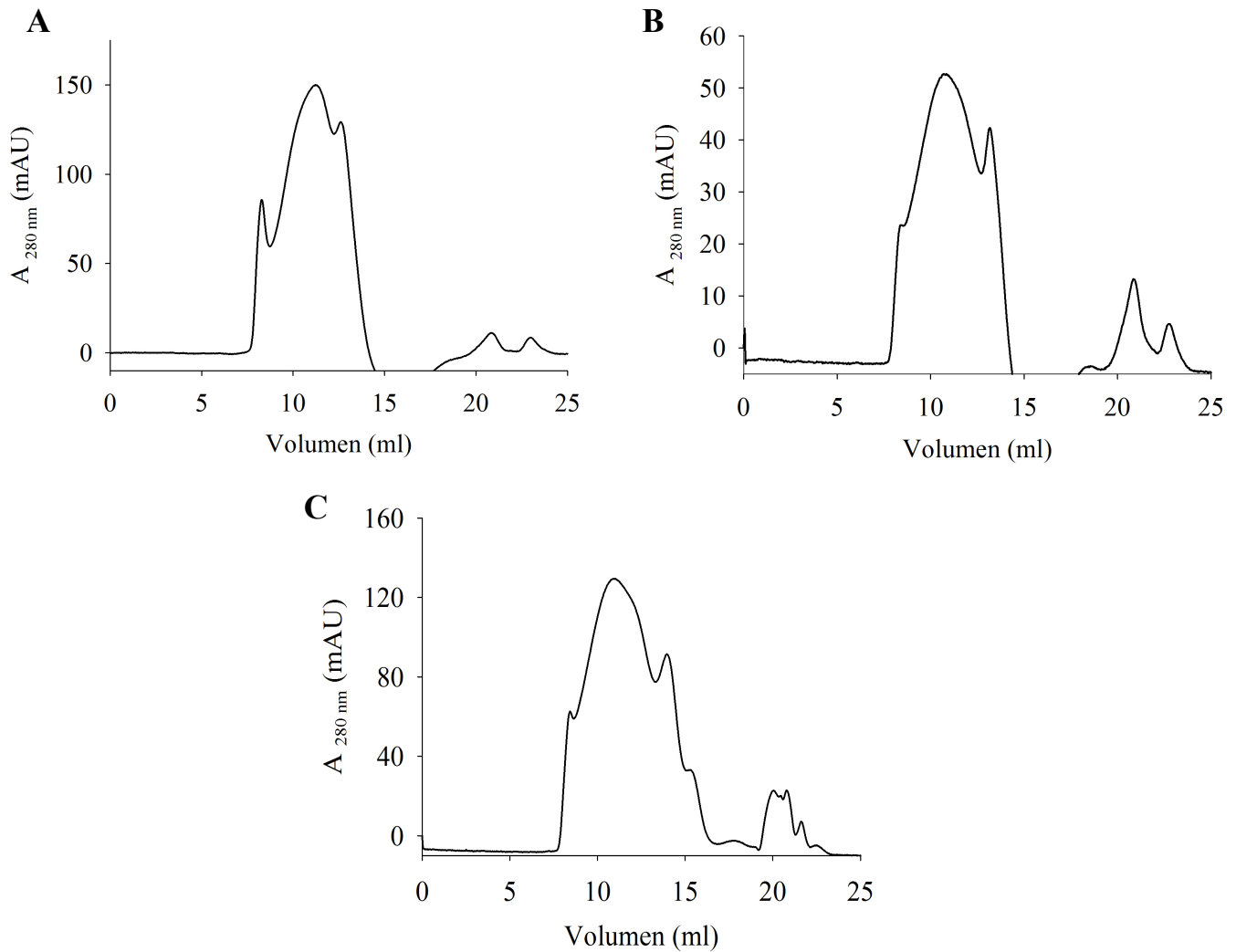


Abb. 4.29: Elutionsprofile von *PfFNT* in 0,02 % Fos-Cholin 12. A: Gelfiltration in Citratpuffer bei pH 5. B: Gelfiltration in Reinigungspuffer mit 300 mM NaCl. C: Gelfiltration in Reinigungspuffer.

4.5.2.4 Verhalten von C-terminal getaggetem *PfFNT* und $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ *PfFNT*

Wie bereits beschrieben, wurde neben dem N-terminal His-getaggeten *PfFNT* auch eine Variante mit C-terminalem His-tag, sowie eine mit verkürztem N- und C-Terminus ($\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ *PfFNT*) hergestellt (3.1.19). Für das C-terminal getaggte *PfFNT* wurde das pIVEX2.3woHA für die zellfreie Synthese eingesetzt.

Das Verkürzen der Termini sollte für die Kristallisation die Flexibilität des Proteins herabsetzen und somit die Chancen einer Kristallbildung durch eine gesteigerte Konformität der Struktur erhöhen.

Diese *PfFNT*-Varianten wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Oligomerisierung mit der Größenausschlusschromatographie analysiert. Während für das $\Delta\text{N}\Delta\text{C}$ *PfFNT* wieder ein Gemisch verschiedener oligomerer Zustände, wie auch bei dem *PfFNT* beobachtet wurde (Abb. 4.27 A), konnte

zusätzlich eine Verschiebung zu kleineren Oligomeren, bzw. dem Monomer festgestellt werden (Abb. 4.30). Die Peakmaxima bei 13 ml (ca. 115 kDa) und 14,8 ml (ca. 61 kDa) könnten das Trimer und Monomer repräsentieren. Das Pentamer hingegen war nur als schwach ausgeprägte Schulter zu erahnen.

Das C-terminal *getaggte* PfFNT zeigte hingegen einen großen Teil aggregiertes PfFNT sowie einen Peak bei 13,9 ml (ca. 84 kDa), welches dem Dimer entsprechen könnte (Abb. 4.30). Der *tag* verminderte die Penta- und Trimerbildung, die zuvor bei dem Histidin-PfFNT beobachtet wurde. Die Isolierung des Pentamers war folglich bei diesen PfFNT-Varianten nicht möglich.

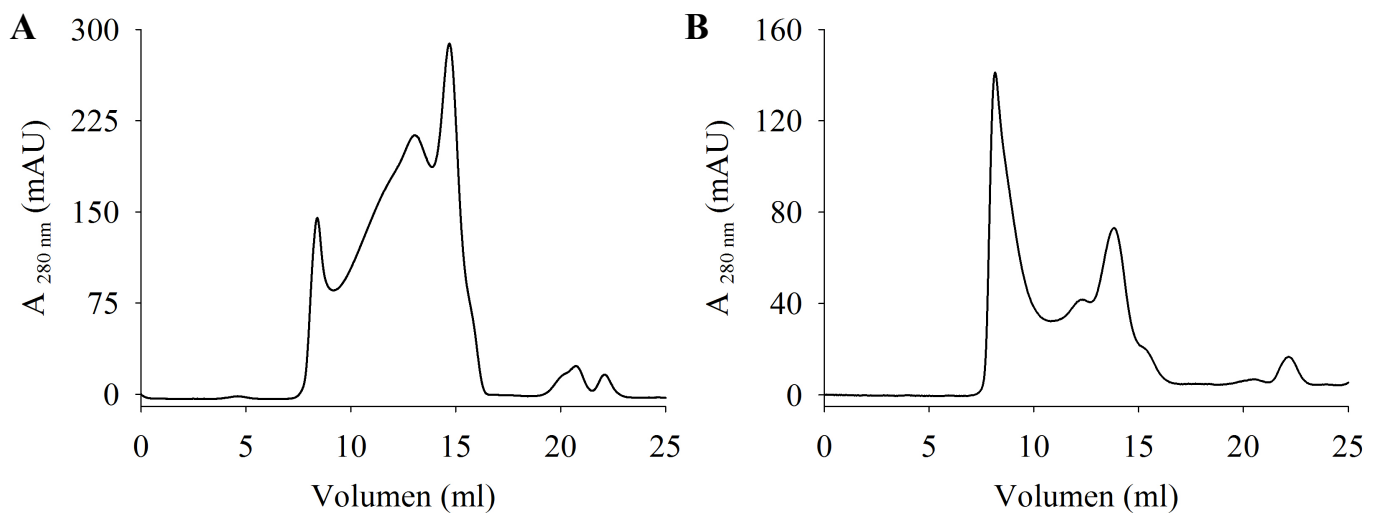


Abb. 4.30: Elutionsprofile des $\Delta N\Delta C$ PfFNTs (A) und des C-terminal *getaggten* PfFNTs (B) in Reinigungspuffer mit 0,1 % Fos-Cholin 12.

4.5.2.5 Elutionsverhalten von PfFNT aus *P. pastoris*

Das in *P. pastoris* exprimierte PfFNT wurde, wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben mit 1 % DDM und 0,5 % LDAO solubilisiert und mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie gereinigt. Die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie sind in Abb. 4.31 dargestellt.

Aufgrund des PfFNTs, welches sich auf dem Western Blot der Zellaufschlüsse als sehr stabil zeigte (Abb. 4.16), wurde ein monodisperser Peak für das Pentamer erwartet. Die Betrachtung der Chromatogramme zeigte jedoch, dass dieses für keines der verwendeten Detergenzien der Fall war.

Für DDM konnte neben aggregiertem Protein im Ausschlussvolumen ein Peak bei 12,1 ml (ca. 158 kDa) und 14,8 ml (ca. 61 kDa) identifiziert werden. Die Interpretation der Größen ist aufgrund der Mizellgröße von 60 kDa schwierig, würden aber ein Dimer und Verunreinigungen durch Fremdprotein vermuten lassen.

Die Elution in LDAO ergab ebenfalls aggregiertes Protein, eine Schulter bei ca. 10 ml (ca. 330 kDa) und Peaks bei 12,2 ml und 15,6 ml (ca. 150 kDa und 46 kDa). Bei einer erwarteten Mizellgröße von ca. 20 kDa entsprechen diese dem Pentamer, Tetra- oder Trimer und Monomer. Zudem werden bei

Elutionsvolumina über 15,6 ml noch weitere kleinere Signale detektiert, die ebenfalls degradiertes PfFNT oder Fremdproteine repräsentieren könnten. Das Verschmelzen des vermuteten Pentamers mit dem aggregierten Protein verhinderte auch in diesem Fall die Isolierung des Pentamers.

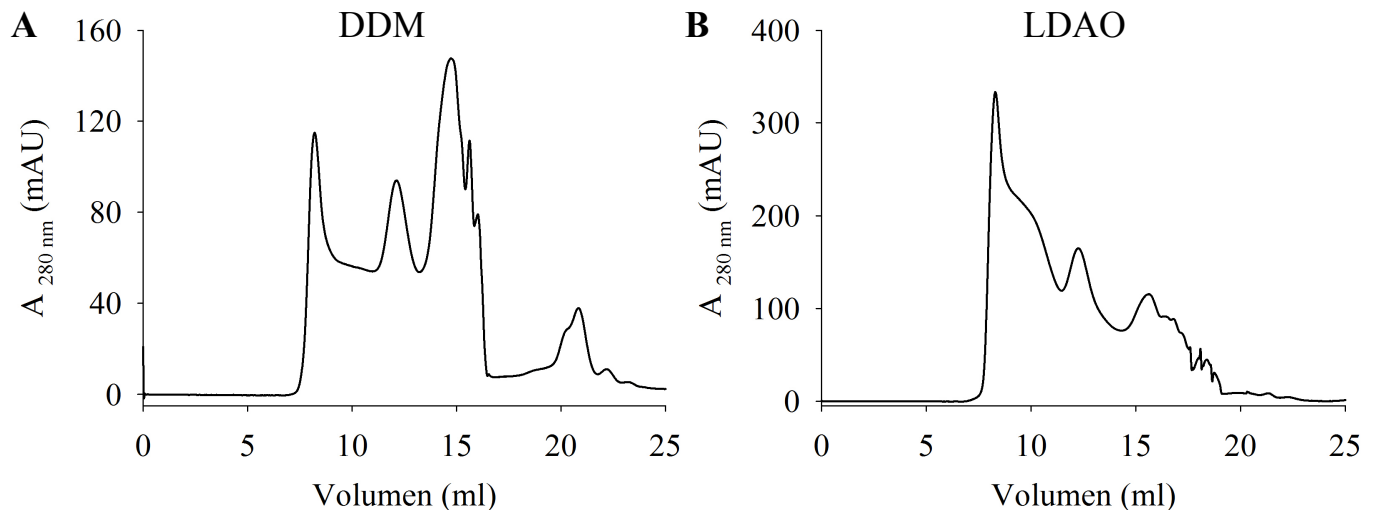


Abb. 4.31: Elutionsprofile des PfFNTs exprimiert in *P. pastoris* solubilisiert mit DDM (A) und LDAO (B).

4.5.2.6 Vergleich der Elutionsprofile von *in vivo* und zellfrei hergestelltem EcFocA

In Kapitel 1.3 und 1.5 wurde bereits auf die Herstellung von EcFocA in *E. coli* und zellfrei eingegangen. EcFocA diente bei der Expression in *E. coli* als Kontrolle für den Überexpressionsprozess, den Zellaufschluss und die Solubilisierung. Um die Proteineigenschaften und insbesondere die Oligomerisierung des zellfrei synthetisierten Proteins mit dem *in vivo* exprimierten vergleichen zu können, wurden die Proteine mittels Größenausschlusschromatographie untersucht und die Ergebnisse verglichen. Das *in vivo* exprimierte EcFocA konnte nur in β -OG (3.3), das *in vitro* hergestellte Protein nur in Fos-Cholin 12, nicht aber in β -OG solubilisiert und gereinigt werden. Aus diesem Grund mussten für die Gelfiltration unterschiedliche Detergenzien dem Reinigungspuffer zugesetzt werden.

Der Vergleich der Elutionsprofile zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen den Proteinen. Das *in vivo* hergestellte EcFocA eluierte bereits sehr früh, was sowohl aggregiertes Protein im Ausschlussvolumen und vermutlich auch höhere Oligomere wie das Pentamer zeigt. Eine exakte Auswertung war aufgrund des überlagerten Doppelpeaks nicht möglich.

Im Gegensatz dazu war die Elution des zellfrei hergestellten *EcFocAs* zu höheren Volumina und somit zu kleineren Proteingrößen verschoben, die in Bezug auf die Größen hauptsächlich dem Trimer (12,6 ml) und Dimer (14 ml) entsprechen (Abb. 4.32).

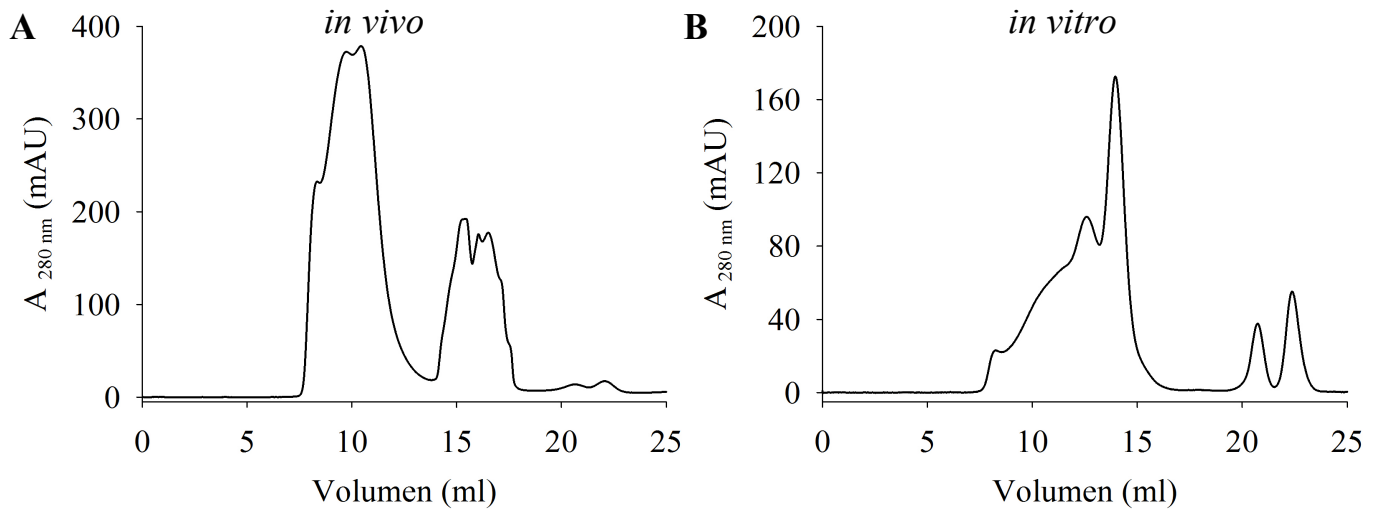


Abb. 4.32: Elutionsprofile von *EcFocA* solubilisiert aus *E. coli* in 1,5 % β -OG (A) und zellfrei hergestellt in 0,1 % Fos-Cholin 12 gereinigt. (B)

Unter Berücksichtigung der Einflüsse der unterschiedlichen Detergenzien konnte dennoch festgestellt werden, dass die Proteine sich in Bezug auf die Oligomerisierung stark unterschieden und auch im Hinblick auf die Solubilisierung nicht vergleichbar waren. So war das *in vivo* hergestellte Protein scheinbar stabiler als Pentamer, was vermutlich durch die umgebenden Lipide in der Membran bedingt war und durch die Detergenzien im zellfreien System nicht imitiert werden konnte. Es muss jedoch bedacht werden, dass es sich bei Fos-Cholin um ein zwitterionisches Detergens handelt, welches einen stärkeren denaturierenden Effekt auf das Protein ausübt als das Zuckerderivat. Dieser Effekt kann auch bei der Oligomerisierung eine entscheidende Rolle spielen.

4.6 Funktionsuntersuchungen von *PfFNT*

Zur Verifizierung der korrekten Proteinfaltung sollte die Funktion des *PfFNTs* gezeigt werden. Dieses erfolgte über die Rekonstitution in Liposomen und die Vermessung in einem Lichtstreuungsassay mit den Substraten Laktat, Acetat und Formiat gegen leere Liposomen oder *PfAQP*-Proteoliposomen. *PfAQP*-Proteoliposomen wurden genutzt, um die Zusammensetzung der Membranen zwischen der Kontrolle und den *PfFNT*-Proteoliposomen möglichst anzupassen und die Vergleichbarkeit durch eine verringerte Durchlässigkeit zu erhöhen.

4.6.1 Kontrolle der Rekonstitution

Die Herstellung der Proteoliposomen und das Entfernen des Detergenzes erfolgte wie in Kapitel 3.6.1 beschrieben. Um sicherzustellen, dass das *PfFNT* vollständig in die *E. coli* Lipide rekonstituiert wurde, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (3.6.2), in dessen Folge die Liposomen und nicht rekonstituierten Proteine entsprechend ihrer Dichte aufgetrennt wurden.

Die Fraktionen des Saccharosegradienten wurden nach der Zentrifugation mittels SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western Blot durchgeführt. Auf dem Western Blot in Abb. 4.33 konnten mit dem α -Penta-His-Antikörper 1:5.000 in der 15 % und 20 % Fraktion, in denen sich die Proteoliposomen anreichern, Signale für das *PfFNT* detektiert werden. Es konnte kein Protein in der 30 % Fraktion erfasst werden, was zeigt, dass das *PfFNT* vollständig rekonstituiert wurde [193].

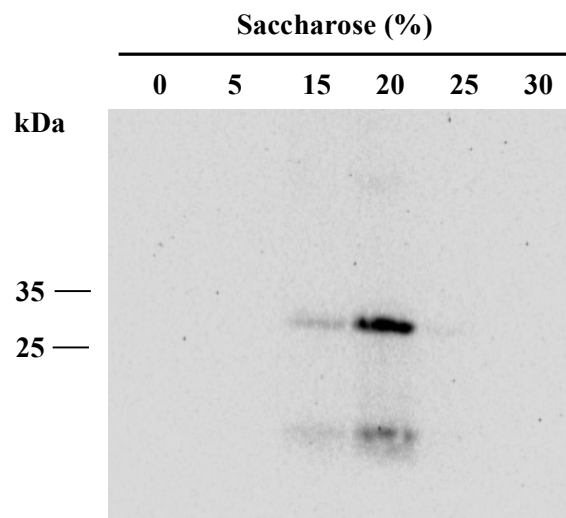


Abb. 4.33: Western Blot der Saccharosegradientenfraktionen. Die Detektion erfolgte mit dem α -Penta-His-Antikörper 1:5.000. Für *PfFNT* konnten Signale in der 15 und 20 % Fraktion identifiziert werden.

4.6.2 Bestimmung der Proteinorientierung

Die Orientierung der rekonstituierten Proteine wurde über den Verdau mit der Faktor Xa Protease ermittelt. Hierfür wurde der N-terminale His-tag durch die Protease vom C-terminalen PfFNT abgetrennt. Dieser Verdau war nur für die Proteine möglich, deren Termini zur Außenseite der Liposomen ragten und somit für die Protease von außen zugänglich waren. Die genaue Durchführung ist in Kapitel 3.2.11 beschrieben.

Die Signale der Proben, mit und ohne Faktor Xa-Behandlung, wurden anschließend auf einem Western Blot entsprechend ihrer Größe und Intensität verglichen (Abb. 4.34).

Der Verdau des solubilisierten His-PfFNTs hatte gezeigt, dass dieser vollständig stattfand (4.2.6). Die Zugabe der Protease zu den Proteoliposomen zeigte bei der Detektion mit dem α -PfFNT-Antikörper ebenfalls den Größenunterschied von ca. 2 kDa, der bereits bei dem Verdau des solubilisierten PfFNTs zu beobachten war. Die Abnahme der Proteingröße entsprach der erwarteten Größe des His-tags. Die Detektion der gleichen Proben mit dem α -Penta-His-Antikörper konnte in der Spur der mit Faktor Xa inkubierten Proteoliposomen kein Signal mehr zeigen.

Beide Western Blots zeigten, dass eine scheinbar vollständige Umsetzung des rekonstituierten His-PfFNTs stattgefunden hat. Folglich sind alle Termini der PfFNTs nach außen in die Pufferlösung um die Liposomen orientiert.

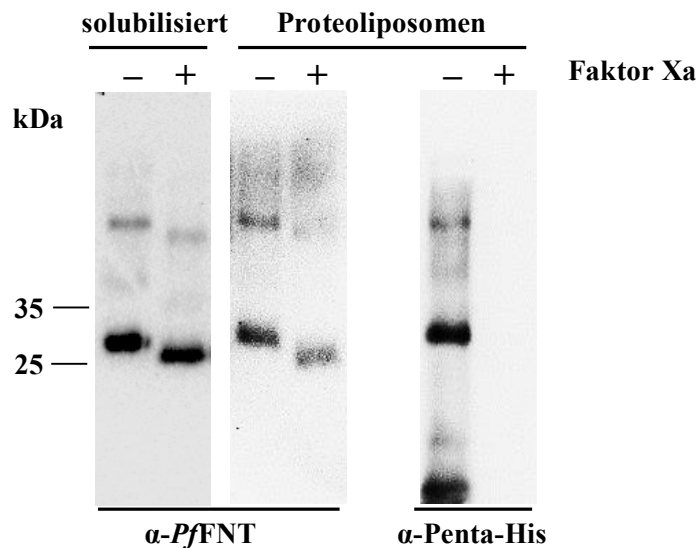


Abb. 4.34: Western Blots des PfFNTs (solubilisiert und rekonstituiert in Proteoliposomen) mit (+) und ohne (-) Faktor Xa Behandlung. Die Detektion erfolgte mit dem α -PfFNT (1:1.000) oder α -Penta-His-Antikörper (1:5.000).

4.6.3 Messung der Transportraten und Substratspezifität

Die Funktionsmessungen erfolgten mit einem Lichtstreuungs-*Assay* in einer *Stopped-Flow*-Apparatur. In dem Versuch wurde die Veränderung der Lichtstreuung in Abhängigkeit der Liposomengröße gemessen. Durch Mischung der Liposomensuspension mit dem Messpuffer entstand ein 20 mM Gradient des jeweiligen Substrats. Dieses führte zunächst zu einem osmotisch bedingten Ausstrom von Wasser aus den Liposomen und folglich einem Schrumpfen der Vesikel. Es folgte ein langsamerer Einstrom des Substrats in die Proteoliposomen durch das *PfFNT* und infolgedessen ebenfalls ein Wassernachstrom. Der Prozess wurde mittels Lichtstreuung beobachtet und mit Hilfe des exponentiellen Kurvenfittings ausgewertet.

Die gemessenen Lichtstreuungskurven sind beispielhaft für die drei Substrate Laktat, Acetat und Formiat in Abb. 4.35 gezeigt. Für jedes Substrat wurden drei bis fünf Messungen durchgeführt, die Mittelwerte errechnet und die S.E.M. bestimmt (Abb. 4.36). Jeweils ein Messwert wurde durch Folkhard Helmstetter gemessen.

Für Formiat und Acetat konnten vergleichbare Raten von $0,006 \text{ s}^{-1}$ ermittelt werden, während für Laktat nur ca. ein Drittel der Rate mit $0,0017 \text{ s}^{-1}$ bestimmt wurde. Das Verhältnis dieser Raten zueinander entspricht den bereits in *S. cerevisiae*-Zellen gemessenen Substratspezifitäten. Sowohl in die *S. cerevisiae*-Zellen als auch in die Proteoliposomen wurde jeweils der Import in die jeweiligen Vesikel gemessen, allerdings ist die Orientierung der Proteine in den Proteoliposomen umgekehrt (4.2.6) und die Transportrichtung durch die Pore des *PfFNTs* entspricht nur in den Proteoliposomen der physiologischen. Die Ergebnisse zeigten somit nicht nur die Funktion und native Faltung des *PfFNTs*, sondern auch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der verschiedenen Systeme.

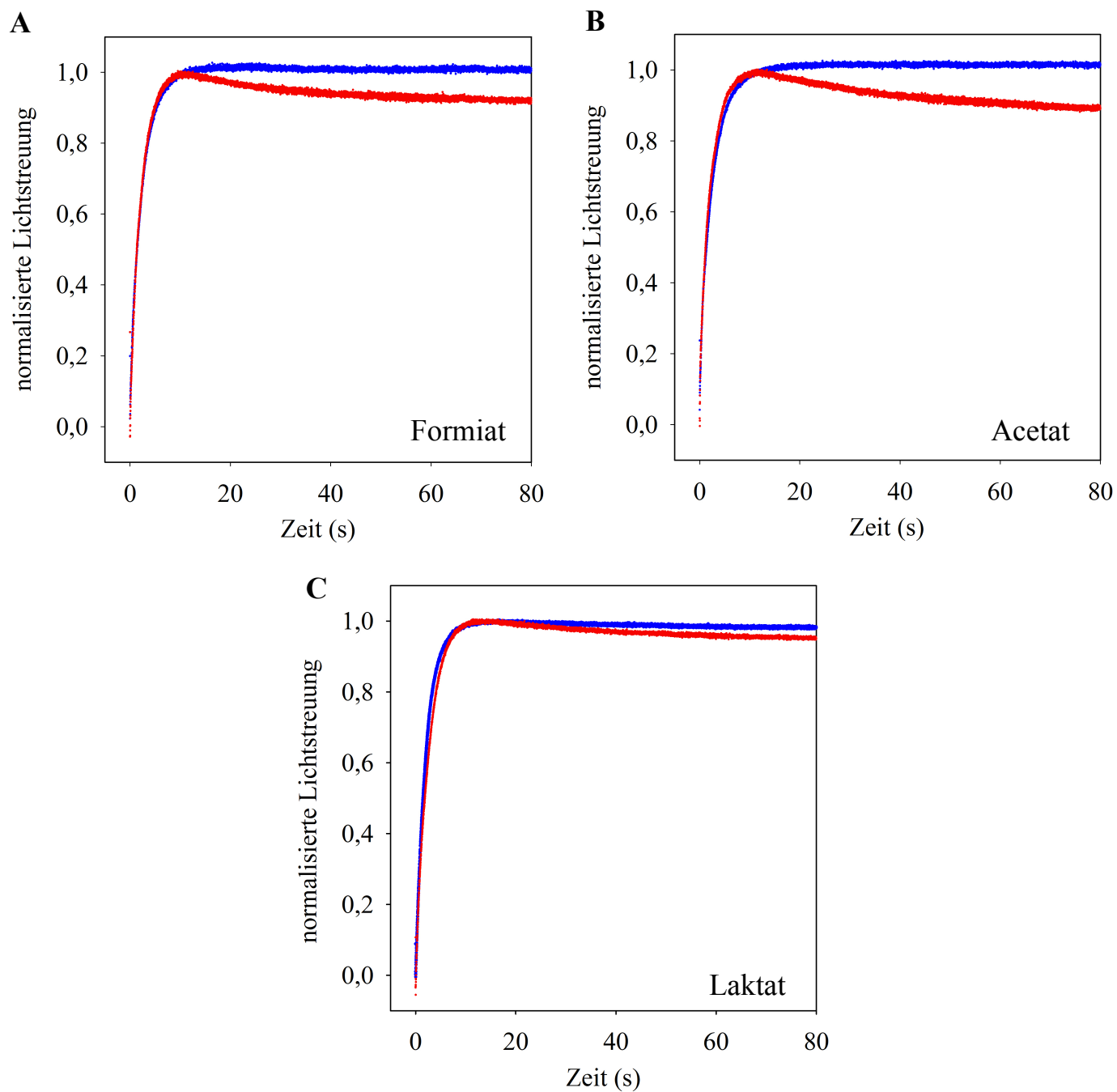


Abb. 4.35: Lichtstreuungskurven der *Pf*FNT-Proteoliposomen (rot) und leeren Liposomen (blau) gegen einen Gradienten von 20 mM Formiat (A), Acetat (B) und Laktat (C).

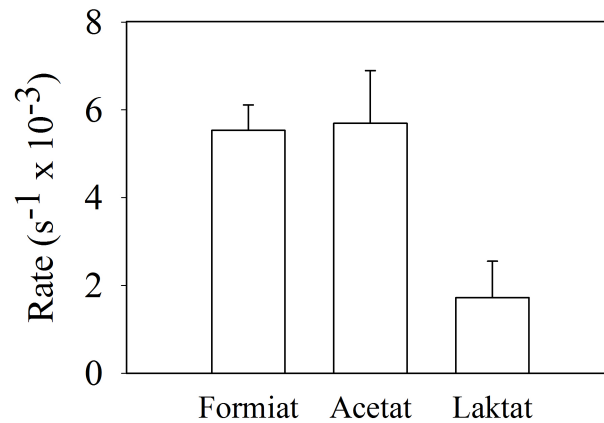


Abb. 4.36: Vergleich der Transportraten von *PfFNT*-Proteoliposomen von Formiat, Acetat und Laktat. Die Raten wurden aus drei bis fünf unabhängigen Messungen ermittelt, die Abweichungen sind als S.E.M. angegeben.

4.7 Kristallisationsansätze

Die Kristallisationsscreens sollten mit möglichst homogenem, sauberem *PfFNT* angesetzt werden. Wie bereits in Kapitel 4.5.2 beschrieben, war die Isolierung der reinen pentameren oder monomeren Form aus dem Gemisch der Oligomere nur eingeschränkt möglich. Aus diesem Grund wurden alle oligomeren Formen, die aus der Größenausschlusschromatographie möglichst rein erhalten werden konnten, für die Screens eingesetzt. Das Pipettieren der Ansätze wurde am EMBL in Hamburg mit einem Mosquito-Pipettierroboter durchgeführt. Verwendet wurden Swissci-96-Well-Platten, die die *Sitting Drop*-Methode ermöglichten und drei Fächer besaßen, sodass der Pufferdurchlauf vom Konzentrieren direkt mit aufgetragen werden konnte. Der Puffer diente als Negativkontrolle, falls in dem Proben tropfen Salzkristalle entstehen sollten, müssten diese theoretisch auch im Puffer entstehen. Die Tropfen wurden aus 100 nl Protein à 8-13 mg ml⁻¹ und 100 nl Puffer aus dem Reservoir angesetzt und das Pufferreservoir fasste ein Volumen von 30 µl. Es wurden kommerziell erhältliche Kits von Jena Bioscience, Molecular Dimensions und Hamilton Research sowie selbst hergestellte Screens verwendet (3.2.13). Ein Teil der Screens des $\Delta N\Delta C P f F N T s$ wurde zusätzlich in dem Arbeitskreis um Prof. Einsle von Florian Kemper an der Universität Freiburg angesetzt.

Die eingesetzten Proteine, die Eigenschaften und die verwendeten kommerziellen Screens sind in Tab. 3.8. zusammengefasst. Die Form der verwendeten Peaks in Fos-Cholin12 ist in Abb. 4.37 gezeigt.

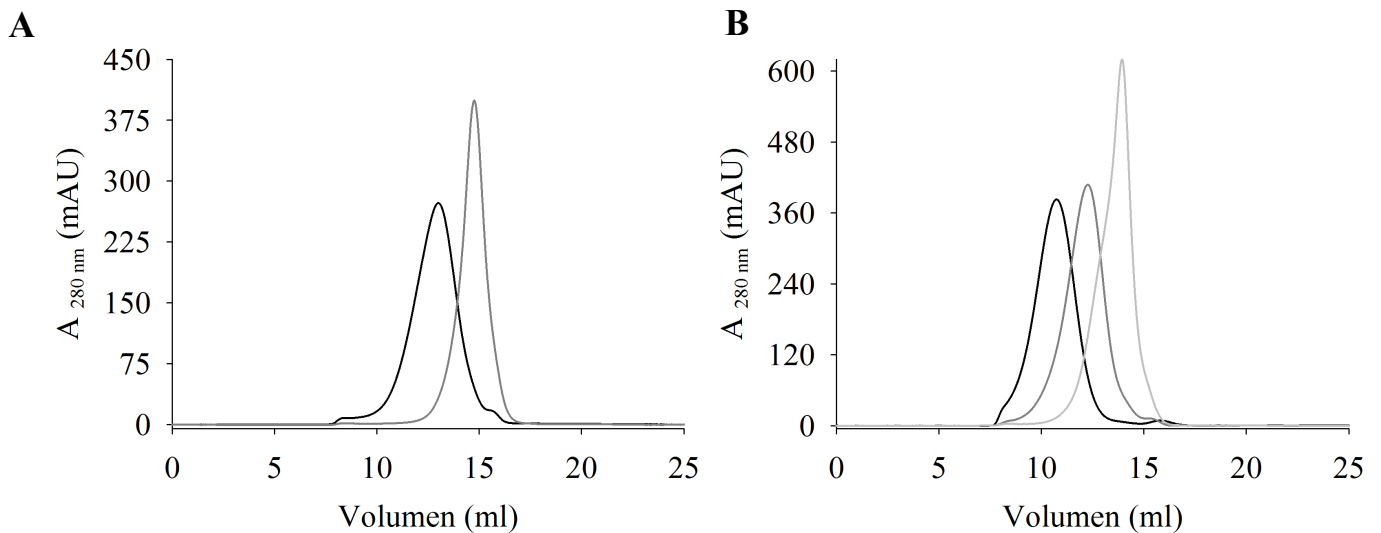


Abb. 4.37: Elutionsprofile des Trimers (schwarz) und Monomers (grau) des $\Delta N\Delta C P f F N T s$ (A) und des Pentamers (schwarz), Trimers (dunkel grau) und Dimers (grau) des $P f F N T s$ (B).

In keinem der Fälle konnte ein Proteinkristall erzielt werden. Neben Salzkristallen wurden vor allem Präzipitat und Phasenseparationen erhalten. Während der Anteil an Präzipitat für $P f F N T$ in Brij78 mit 8 % und 19 %, vermutlich auch aufgrund der niedrigen Konzentration noch gering war, stieg er für die einzelnen Oligomere auf bis zu 58 % an. Einige exemplarische Tropfen und Salzkristalle sind in Abb. 4.38 und Abb. 4.39 gezeigt.

Der Zusatz von MMV007839, einem Inhibitor von $P f F N T$, der im Arbeitskreis von André Golldack aus der Malariabox identifiziert wurde, sollte zur Verringerung der Flexibilität des Proteins eingesetzt werden und wurde in der fünffachen Molarität zum $P f F N T$ gegeben. Auch dieser Zusatz zeigte keinen Effekt auf die Kristallbildung.

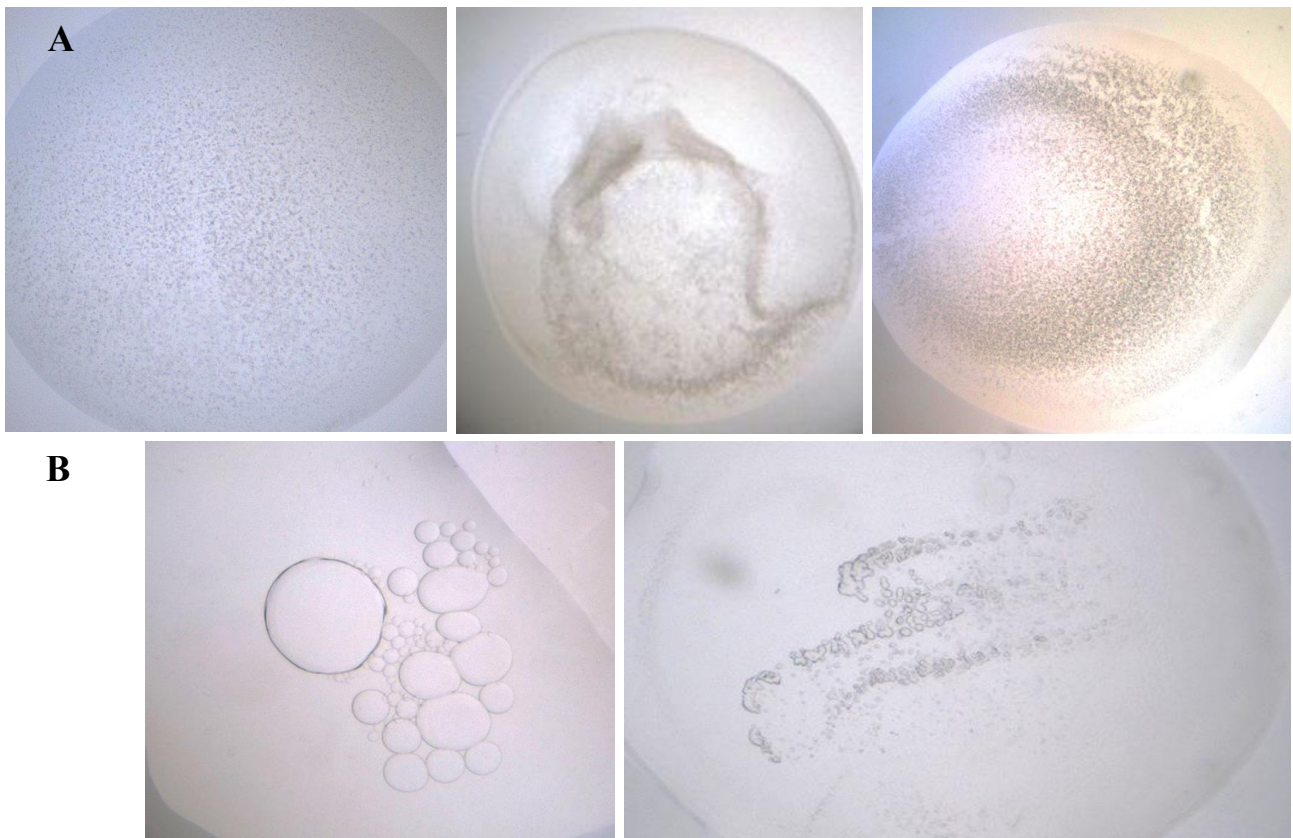


Abb. 4.38: mikroskopische Aufnahmen der Tropfen der Kristallisationsansätze mit Präzipitat (A) und Phasenseparationen (B).

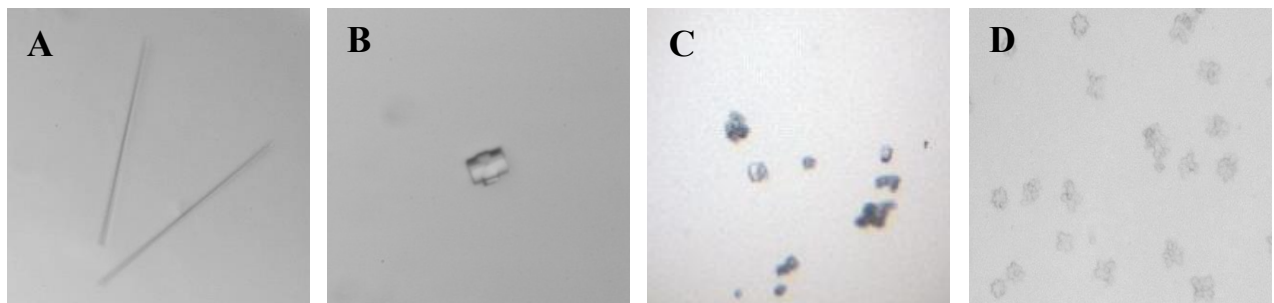


Abb. 4.39: Salzkristalle der Kristallisationsscreens. Sie wurden unter folgenden Bedingungen erhalten:

A: M $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ pH 7,5; 0,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$;

B: 0,05 M BaSO_4 ; 0,1 M Tris pH 8,2; 32 % PEG 400; 0,05 M CaCl_2 ;

C: 0,2 M CaCl_2 ; 0,1 M Tris pH 8,0; 44 % PEG 400;

D: 100 mM MOPS/HEPES pH 7,5; 30 mM NaF; 30 mM NaBr; 30 mM NaI;

10 % PEG 20000; 20 % PEG MME

5 Diskussion

5.1 Funktionsmessungen in Proteoliposomen

Die Überprüfung der korrekten Faltung der zellfrei hergestellten und aus *P. pastoris* solubilisierten PfFNTs kann am besten über den Nachweis der Funktion in Proteoliposomen erfolgen. Der Saccharosegradient hat gezeigt, dass das PfFNT solubilisiert in Brij78 vollständig in die Liposomen rekonstituiert wird. Die Rekonstitution aus den Detergenzienmizellen erfolgte durch ein schnelles Verdünnen der Detergenzienkonzentration unter die CMC. Diese Methode wurde gewählt, da die alternative Möglichkeit über die Zugabe von *biobeads* [194] im Arbeitskreis keine zufriedenstellenden Resultate erbracht hatte. Mit zunehmender Ni^{2+} -bead-Menge hatte auch die Durchlässigkeit der Membranen zugenommen und keine verlässlichen Messungen ermöglicht (Dissertation Annika Müller-Lucks, 2012).

Die Methode über die Detergenzienverdünnung konnte hier eine scheinbar verlässlichere Möglichkeit bieten. Es konnte jedoch auch bei der Herstellung mit der in dieser Arbeit verwendeten Detergenzienverdünnung eine Problematik in der Reproduzierbarkeit in Bezug auf die Durchlässigkeit der Liposomen festgestellt werden. Ursächlich sind hier eine Reihe von Schritten während der Präparation. Bereits die Hydratisierung der *E. coli* Lipide stellt den ersten kritischen Punkt dar. Die Evaporierung der Lipide aus der Chloroformlösung führt zu einer ungleichmäßigen Schichtdicke der getrockneten Lipide und somit zu veränderten Effektivitäten der Hydratisierung. Eine größere Oberfläche durch eine breitere Aufspaltung während der Evaporierung wirkt sich somit in einer größeren Menge Liposomen aus, die aus der gleichen Menge Lipiden hydratisiert werden konnten.

Die zweite Schwankung besteht in der Bildung der unilammelaren Vesikel im Ultraschallbad. Hier spielen verschiedene Faktoren eine Rolle: die verwendete Glasdicke, die Temperatur des Wasserbads und die Dauer der Inkubation. Hierbei konnte festgestellt werden, dass eine dickere Glasschicht in durchlässigeren Liposomen resultiert. Ein ähnlicher Effekt konnte für die Inkubationsdauer beobachtet werden. Je länger die Liposomen im Ultraschallbad verblieben, desto dichter waren die Membranen gepackt (Abb. 5.1). Hierbei muss aber berücksichtigt werden, dass eine längere Inkubation auch mit einer zunehmenden Erwärmung des Wasserbads einhergeht, was wiederum einen negativen Einfluss auf die Durchlässigkeit ausübt.

Der letzte kritische Punkt besteht in der Rekonstitution der Proteine. Es konnte im Saccharosegradienten zwar mehrfach bestätigt werden, dass das PfFNT vollständig rekonstituiert wird, aufgrund des langwierigen Prozesses und der geringen Proteoliposomenmengen, die in einem Prozess gewonnen werden können, ist eine Verifizierung für jede Messung allerdings praktisch nicht umsetzbar.

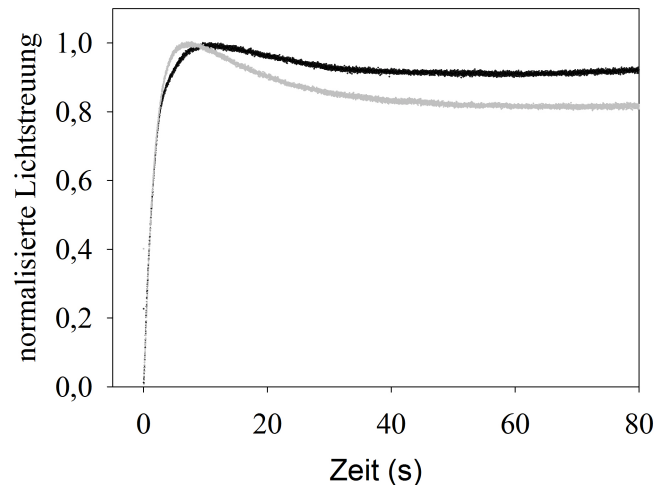


Abb. 5.1: Laktateinstrom in Leerliposomen nach 45 min (grau) Inkubation im Wasserbad und 2 h (Schwarz), gemessen als Änderung der Lichtstreuung.

Um die Auswirkungen dieser Schritte auf die Messungen möglichst gering zu halten, wurde bei jeder Messung immer eine Negativkontrolle mit vermessen und unter den gleichen Bedingungen hergestellt wie die Probe. Variierende Durchlässigkeiten der Leerliposomen waren dennoch zu beobachten. Zur Reduzierung dieser Problematik wurden zum Ende der Arbeit die leeren Liposomen der Negativkontrolle durch *PfAQP*-Proteoliposomen ausgetauscht, um so eine vergleichbarere Zusammensetzung der Membranen der Liposomen untereinander zu ermöglichen. Da *PfAQP* keine Anionen leitet [195], war es gut als Negativkontrolle geeignet. Kontrollen nach den einzelnen Schritten könnten dieses Problem reduzieren, sind allerdings durch die geringen Mengen, die während der Herstellung entstehen, nur bedingt möglich.

Die größte Problematik besteht jedoch in der Messung selbst. Die Lichtstreuungsmessungen stellen ein indirektes Messsystem dar, welches die Veränderungen der Vesikelgröße in Abhängigkeit des Wasserein- und -ausstroms misst. Die Anionenleitfähigkeit, die für die Funktionsmessung des *PfFNTs* bestimmt werden muss, kann somit nur über den Wassernachstrom in die Liposomen gemessen werden. Hohe Durchlässigkeiten der Liposomen für Wasser und Anionen stellen hier ein besonderes Problem dar, da diese die Ergebnisse verfälschen können. Die Komposition des Mischpuffers bedingt ein starkes, schnelles Schrumpfen der Liposomen zu Beginn, während die Messung des osmotisch bedingten Wassereinstroms, als Konsequenz des Substratimports in die Vesikel, in der zweiten Hälfte deutlich geringer ausfällt. Eine bessere Alternative würde hier ein osmotisch ausgeglichener Puffer bieten, bei dem alleine der Substrattransport gemessen werden könnte und nicht durch die initiale Volumenabnahme der Liposomen zu Beginn der Messung beeinflusst wäre.

Der Effekt, der durch den Anionentransport beobachtet werden kann, ist klein und kann deshalb auch durch durchlässigere Liposomen maskiert werden. Die Messung der Negativkontrolle im Vergleich ist daher essentiell. Auffällig war hier vor allem der hohe Laktateinstrom in die Liposomen, der deutlich oberhalb der von Acetat und Formiat lag und bei jeder neuen Präparation beobachtet werden konnte.

Die Diffusion geladener Teilchen über Membranen ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da diese geladen nicht den hydrophoben Bereich der Fettsäurereste durchdringen können und auch die zunehmende Größe von Formiat über Acetat zu Laktat, spricht gegen die Theorie der Diffusion.

Eine Argumentation über die Zunahme des Anteils an Milchsäure lässt sich mit Blick auf die pKs-Werte auch nicht bestätigen, da der pKs von Milchsäure mit 3,86 deutlich unter dem von Essigsäure mit 4,75 liegt und für Acetat dieser Effekt nicht festgestellt wurde. Die Messung findet außerdem bei einem pH von 6,8 statt, so dass der Teil protonierter Milchsäure ohnehin nur 1:1.000 beträgt. Eine Erklärung für dieses Phänomen steht somit noch aus.

Ein weiterer Punkt ist die Orientierung der Proteine in den Proteoliposomen. Erwartet wurde eine statistische Verteilung der Orientierung. Der Faktor Xa Verdau der Proteoliposomen konnte allerdings eine uniforme Integration feststellen. Dieses Phänomen wurde schon häufig beschrieben [196–199]. Rigaud *et al.* [193] konnten zeigen, dass die Orientierung unter anderem durch die Herstellung beeinflusst wird und eine uniforme Integration bei dem Zusatz des Proteins nach der Bildung der Proteoliposomen erzielen.

Der gerichtete Einbau lässt sich möglicherweise durch die Eigenschaften des hydrophoben Transmembranspannungsbereichs und die daraus resultierende Form des Proteins erklären. Die Krümmung der Membran kann hier ein entscheidender Faktor sein, die nur eine Orientierung in der Membran zulässt. Diese Orientierung würde dem physiologischen Einbau in die intrazellulären Transportvesikel im Parasiten entsprechen, in die die Proteine ebenfalls gerichtet, mit den Termini nach außen eingebaut werden, und die in ihrer Größe und Membrankrümmung mit den Liposomen gut vergleichbar sind.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit bieten die Termini. Der polare Charakter sowie mögliche Ladungen der Lysine am N-Terminus bei dem gegebenen pH-Wert können einen Übergang über die Lipidbarriere verhindern.

Die Möglichkeiten, die sich durch diese Feststellung ergeben, sind vielfältig. So konnte zum ersten Mal direkt der Transport über das PfFNT in der physiologischen Transportrichtung gemessen werden. Die bisherigen Messungen der Aktivität für PfFNT wurden in Hefezellen [42] und Oozyten [39] gemessen und konnten systembedingt nur die Gegenrichtung untersuchen. Die gezielte Messung einer Transportrichtung ermöglicht so zum ersten Mal die Bestimmung der Direktionalität und eine Untersuchung der Varianz beider Transportrichtungen. Die Raten, die für Acetat, Laktat und Formiat in Liposomen ermittelt werden konnten, sind zwar nicht als absolute Zahlenwerte mit den Ergebnissen der Zellsysteme vergleichbar, geben aber im Vergleich zueinander eine Aussage über die Substratselektivität für die physiologische Transportrichtung. Erstaunlich ist die Vergleichbarkeit der Selektivitäten für beide Transportrichtungen in den unterschiedlichen Systemen. Die Funktionalität konnte gezeigt und gleichzeitig die Substratselektivität für den physiologischen Transportweg bestätigt werden, bei der Laktat nur ca. ein Drittel der Transportrate von Acetat und Formiat aufweist.

Die Hemmung des *PfFNTs* in Proteoliposomen, die die Funktionalität noch einmal zusätzlich bestätigen würde, konnte bisher allerdings noch nicht erfolgreich durchgeführt werden. Die Messungen der Proteoliposomen, die mit Nifluminsäure und MMV007839 inkubiert wurden, waren nicht auswertbar oder ergaben eine zusätzliche Aktivierung der Substrataufnahme. Diese Ergebnisse gehen vermutlich auf die verwendeten Lösungsmittel DMSO und Ethanol zurück, die eine erhöhte Durchlässigkeit der Lipiddoppelschichten verursachten [200]. Eine Reduzierung dieser Konzentrationen auf ein Minimum zeigte keinen Effekt.

Die Vermessung der *PfFNT*-Aktivität in Proteoliposomen ist durch eine schlecht reproduzierbare Herstellung gekennzeichnet, die durch die gewonnen Erkenntnisse zur Beeinflussung der Durchlässigkeit an Transparenz zugenommen hat. Die gleichzeitige Produktion von Kontrollliposomen steigerte die Verlässlichkeit des Systems enorm und ermöglichte so die erstmalige Messung von Anionentransportraten in Proteoliposomen im Arbeitskreis. Funktionsmessungen des aus *P. pastoris* solubilisierten *PfFNTs* in Proteoliposomen schaffen zudem eine neue Kontrollmöglichkeit der Faltung im Anschluss an die einzelnen Reinigungsschritte und so eine direkte Abschätzung des denaturierenden Effekts der verwendeten Detergenzien auf das Protein. Der gerichtete Einbau bietet für die Messungen der Direktionalität und die weitere Untersuchung des Protonensymports einen guten Ausgangspunkt und geht somit weit über den Punkt der Funktionalitätsprüfung des zellfrei hergestellten Proteins hinaus. Die Möglichkeit die Liposomen mit Molekülen, wie z.B. einem Fluoreszenzfarbstoff oder Substrat zu beladen oder nur an der Innenseite des Proteins im Rahmen einer chemischen Reaktion zu modifizieren, sind vielfältig und einzigartig für dieses System.

Die Übertragbarkeit auf andere Proteine ist jedoch begrenzt und bedarf vor Beginn der Messungen einer Prüfung der Rekonstitution in die Liposomen, da die Art des Detergenzes einen starken Einfluss auf die Effektivität hat [193], und auf die Orientierung, die in den Proteoliposomen vorliegt. Um dieses sicher zu prüfen, muss bereits im solubilisierten Protein die vollständige Umsetzung des *getaggt*en Proteins mit dem Faktor Xa getestet werden und bei einem negativen Ergebnis eine alternative Protease oder eine Veränderung der Position oder Länge des *tags* gewählt werden.

5.2 *PfFNT*- ein instabiles Pentamer?

Die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie des rekombinanten *PfFNTs* haben in keinem der Fälle initial eine homogene Proteinfraction ergeben sondern fast ausschließlich eine Mischung verschiedener oligomerer Größen gezeigt. Es drängt sich daher die Frage auf, ob *PfFNT* überhaupt ein stabiles Pentamer bildet, welches für die Kristallisation eingesetzt werden kann oder ob die verschiedenen oligomeren Größen im Gleichgewicht vorliegen.

Es ist denkbar, dass die Bildung des Pentamers zellfrei durch den Zusatz von Detergenzien und den Mangel an Lipiden gestört ist (5.3). Dagegen spricht jedoch die Detektion des Pentamers in verschiedenen Detergenzien während der Gelfiltration. Sollte die Bildung wirklich nachhaltig beeinflusst sein, so würden keine höheren Oligomere als Monomere detektiert werden [201]. Es ist

allerdings möglich, dass nicht alle Monomere eine native Faltung aufweisen und aus diesem Grund keine vollständige Bildung der Pentamere stattfindet. Hier reichen schon minimale Konformationsänderungen aus, um die Wechselwirkungen zwischen den Monomeren herabzusetzen, wie es für *EcGlpF* und *hAQP4* beschrieben wurde [202, 203]. Diese These wird ebenfalls durch die Beobachtungen während der Nickelreinigung unterstützt, bei der mit zunehmenden Imidazolkonzentrationen auch eine Verschiebung zu größeren Oligomeren stattfindet. Bereits vor der Reinigung lagen nicht vollständig oligomerisierte Proteine vor, die auch früher eluiert wurden. Die Ergebnisse des Detergenzienscreens geben einen weiteren Anhaltspunkt für diese Theorie, da bereits auf dem SDS-Gel, welche die Fusionsproteine zeigt, zwei Faltungsformen [149] detektiert werden konnten.

Andererseits zeigt die SDS-Resistenz des Pentamers und der weiteren Oligomere eine hohe Stabilität der Wechselwirkungen der Untereinheiten, wie es auch für Aquaporine beschrieben wurde (z.B. bei *EcAQPZ* [166]). Ein weiteres Argument für die Pentamerstabilität scheint die Funktionsmessung in Proteoliposomen zu liefern, da diese vermuten lässt, dass die Membranintegration und Funktion nur als Pentamer stattfinden kann. Für *EcGlpF* und *hAQP3* konnte jedoch gezeigt werden, dass diese Proteine, die üblicherweise als Tetramere angesehen werden [202, 204], auch als Monomere und Dimere in Membranen eingebaut werden und als Monomere ebenfalls funktionell sind [202, 205, 206]. Die Quartärstruktur stellt demnach für diese Aquaporine keine Voraussetzung für die Leitfähigkeit dar [202], da genau wie bei den FNTs die Monomere die Substrate leiten [44]. Aufschluss über den vorliegenden Oligomerisierungsgrad könnte unter anderem eine *Blue-Native-PAGE* geben, die den nativen Zustand in den Liposomen erfasst [207].

Der Einfluss der Termini auf die Oligomerisierung war nur von untergeordneter Bedeutung, da auch bei der trunkierten *PfFNT*-Variante alle bisher beobachteten Formen nebeneinander vorlagen, wenn auch in veränderten Verhältnissen zueinander. Eine Rolle in der Pentamerbildung und Stabilisierung der Quartärstruktur ist daher unwahrscheinlich. *PfFNT* mit C-terminalem *His-tag* fiel im Gegensatz dazu vornehmlich in einer Form an, die vermutlich dem Dimer entspricht. Der unnatürliche, basische Rest scheint die Pentamerbildung im Vergleich zum N-terminalen *tag* nachteilig zu beeinflussen und sollte für weitere Arbeiten nicht gewählt werden.

Die Resultate des *in vivo* exprimierten *EcFocAs* im Vergleich zu dem zellfrei synthetisierten lassen auch hier einen geringeren Anteil höherer Oligomere des zellfreien Proteins vermuten. Die erfolgreiche Kristallisation des *FocAs* zeigt [44], dass diese Problematik nicht durch eine Pentamerinstabilität zustande kommt, sondern durch die Synthese und Reinigung bedingt ist. Die Oligomerisierung stellt für die zellfreie Proteinsynthese möglicherweise ein Hindernis dar, welches auf den Eigenschaften der verwendeten Detergenzien beruht und der Einschränkungen in der Auswahl (5.3). Es kann mit der Identifizierung eines geeigneten Detergenzes jedoch überwunden werden, wie die Strukturen zweier zellfrei hergestellter oligomerisierender Membranproteine zeigt [181, 182].

Hierbei muss aber auch der Einfluss der Kristallisationsmethode bedacht werden, da beide Kristalle in kubischen Lipidphasen erzeugt wurden, die eine Oligomerisierung beeinflussen können [208].

Die Untersuchungen der Größenausschlusschromatographie haben nicht nur eine Mischung der Oligomere gezeigt sondern auch, dass nach der Isolierung einer Proteingröße und einer zweiten Reinigung nur noch diese eine Form vorlag. Dieses legt die Vermutung nahe, dass kein Gleichgewicht zwischen den Oligomeren vorliegt, zur Verifizierung müsste diese Untersuchung nach einigen Tagen mit der gleichen Fraktion allerdings wiederholt werden, da dieses sich unter Umständen erst nach einiger Zeit wieder einstellt [163]. Das Vorliegen eines Gleichgewichts der Oligomere würde aber eine plausible Erklärung für die erfolglosen Kristallisationsansätze bieten, da das eingesetzte, scheinbar homogene Protein doch wieder heterogen im Tropfen vorliegen würde. Ein ähnlicher Effekt könnte auch durch nur scheinbar homogenes Protein nach der zweiten Reinigung entstehen, da der Detergenzien-Protein-Komplex den hydrodynamischen Radius im Vergleich zur Proteingröße ohne Detergens stark beeinflusst und eine eindeutige Beurteilung der Proteingröße und des Oligomerisierungsgrads erschwert.

Eine weitere theoretische Erklärung ist, dass das *Pf*FNT die gesamte Zeit als Pentamer solubilisiert vorliegt und lediglich durch die Scherkräfte während der Gelfiltration „zerstört“ wird. Gegen diese Theorie sprechen die Ergebnisse der Ni^{2+} -Affinitätschromatographie, deren unterschiedliche Fraktionen auch ein unterschiedliches Verhalten auf der Gelfiltrationssäule zeigten.

Die Temperaturresistenz des Pentamers in *P. pastoris* Zellmembranen, die SDS-Resistenz der zellfrei hergestellten Proteine und auch die pentamere Form aller kristallisierten FNTs deuten darauf hin, dass das *Pf*FNT Pentamer nicht so labil ist, dass es eine oligomerenreine Isolierung verhindert. Die großen Interaktionsflächen der einzelnen Monomere, wie sie im FocA vorliegen [47], finden sich in allen kristallisierten Vertretern der FNTs [56, 65, 46, 47, 44] und legen auch für *Pf*FNT eine stabile Pentamerbildung nahe. Durch die große hydrophobe Fläche, die ohne Kontakte zwischen den Monomeren frei wird, stellt die Oligomerisierung zudem den energetisch günstigsten Zustand dar [209, 210]. Der Einfluss durch die Temperatur, den pH, die Konzentration und das Detergens spielen eine wichtige Rolle im Prozess der Oligomerisierung und für die Stabilisierung [211–213]. Wie die Ergebnisse zeigen, ist in den beiden Systemen die Bildung des Pentamers möglich, es ist bisher nur fraglich, welche Eigenschaften die Umgebung aufweisen muss, um diese Form auch stabilisieren zu können. Eine Antwort auf diese Frage kann nur die systematische Variation der beeinflussenden Parameter und die daraus resultierende Analyse des Proteinverhaltens geben.

Die Reinigung des in *P. pastoris* exprimierten *Pf*AQPs zeigte bei der Gelfiltration ebenfalls das Tetramer und Monomer und konnte dennoch kristallisiert werden [214], das zeigt, dass das Vorliegen verschiedener oligomerer Zustände nebeneinander keine Ausnahme ist und bei einer guten Trennung der Signale eine Isolierung kein Problem darstellt.

Es bleibt allerdings die Frage, ob zwingend pentameres *PfFNT* für die Kristallisation eingesetzt werden muss oder ob eine Zusammenlagerung der Untereinheiten zu den Pentameren ohnehin stattfindet. Die *in meso*-Kristallisation könnte hier durch die Lipide Abhilfe schaffen und genau dieses fördern.

5.3 Eignet sich die zellfreie Proteinsynthese für die Kristallisation von *PfFNT*?

PfFNT konnte erfolgreich zellfrei hergestellt und durch die Evaluierung des Detergenzes für die Synthese und dessen Konzentration die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein optimiert werden. Ausbeuten von bis zu 4 mg ml⁻¹ konnten über Nacht gewonnen werden. Die Vorteile des zellfreien Systems liegen daher auf der Hand: gute Reproduzierbarkeit, schnelle Proteingewinnung durch einen kurzen Syntheseprozess und das Entfallen der Schritte für Zellaufschlüsse oder Solubilisierung, hohe Proteinausbeuten [123], keine toxischen Effekte auf das System [215] und ein einfacher Prozessablauf ohne kontinuierliche Überwachung und variierende Parameter. Es bleibt jedoch fraglich, ob das synthetisierte Protein auch für die Kristallisation eingesetzt werden kann.

Voraussetzung für die Kristallisation sind große Mengen nativ gefaltetes, homogenes Protein. Große Ausbeuten konnten problemlos erhalten werden, aber ist das *PfFNT* auch nativ gefaltet?

Bereits während der Optimierung der Herstellung und Reinigung gab es verschiedene Indizien, die auf eine korrekte Faltung hindeuteten. Erstes Indiz war die Fluoreszenz des GFP-Fusionsproteins. Es konnte sowohl in *E. coli* [99], als auch im zellfreien System [149] gezeigt werden, dass die Fluoreszenz nur dann entstehen kann, wenn das N-terminale Protein eine native Faltung einnimmt. Eine Missfaltung führt auch zu einer falschen Faltung des GFPs, was den Ringschluss des Fluorophors [187] verhindert [99].

Das zweite Indiz zeigte sich auf dem SDS-Gel der Affinitätschromatographie. Hier waren mit zunehmender Reinheit in den Fraktionen nicht nur die monomere Form, sondern auch die Oligomere bis zum Pentamer, trotz der Denaturierung im SDS-Ladepuffer bei 37 °C, zu identifizieren. Das Bilden von Oligomeren ist nur im Falle einer korrekten Faltung möglich [201].

Um diese beiden Hinweise zu verifizieren, wurde zudem die Funktion in Proteoliposomen geprüft. Diese konnte mit verschiedenen Substraten bestätigt werden. Die Voraussetzung der nativen Faltung scheint somit erfüllt zu sein.

Die zweite Voraussetzung der Monodispersität stellte jedoch eine größere Herausforderung dar. Neben der Verwendung unterschiedlicher Detergenzien und Variationen der Pufferbedingungen während der Reinigung, wurden auch verschiedene Proteinkonstrukte mit veränderten *tag*-Positionen oder verkürzten Termini geprüft. In keinem der Fälle konnte initial ein monodisperser Peak erreicht werden, der basisliniengetreunt von den übrigen Signalen vorlag. Jedes der Elutionsprofile zeigte eine Mischung aus verschiedenen Oligomeren, bei denen das Pentamer, welches für die Kristallisation

bevorzugt war, teilweise nicht identifizierbar oder nicht eindeutig von den übrigen Proteingrößen trennbar war. Das Vereinigen einzelner Elutionsfraktionen führte zwar in der Regel zu homogenen Proteinen nach der zweiten Größenausschlusschromatographie, dennoch konnte aus keiner der gereinigten Proteinlösungen ein Kristall erhalten werden. Die Frage ist demnach, wieso zeigt das PfFNT, welches funktionell gefaltet ist, so ein heterogenes Bild bei der Gelfiltration?

Dieser Frage muss konsequent von Prozessbeginn an nachgegangen werden. Eine erste Ursache kann bereits bei der Synthese vermutet werden. Bei der zellfreien Proteinsynthese handelt es sich um ein künstliches System, welches sich die einzelnen Bestandteile des natürlichen Prozesses in der Zelle zu nutzen macht. Der größte Unterschied besteht in dem Schritt nach der Translation. Zellfrei werden die Proteine in Detergenzienmizellen integriert, die sich in ihren Eigenschaften von den natürlichen Lipidmembranen unterscheiden. Die Phospholipide der Membranen bestehen, wie die Detergenzien auch, aus einem hydrophilen Bereich, dem Phosphatrest, und einem hydrophoben Bereich aus Fettsäureestern. Die Art dieser Reste in Detergenzien unterscheidet sich jedoch stark von denen der Phospholipide. Wie in Kapitel 3.2.3 gezeigt, sind die Detergenzien sehr verschieden, was wiederum die unterschiedlichen Eigenschaften erklärt. Ionische Detergenzien besitzen einen großen denaturierenden Effekt, während dieser über die zwitterionischen hin zu nicht-ionischen Detergenzien immer weiter abnimmt [216–218]. Variationen der Alkylkettenlängen beeinflussen diesen Effekt zusätzlich (Abb. 5.2) [217].

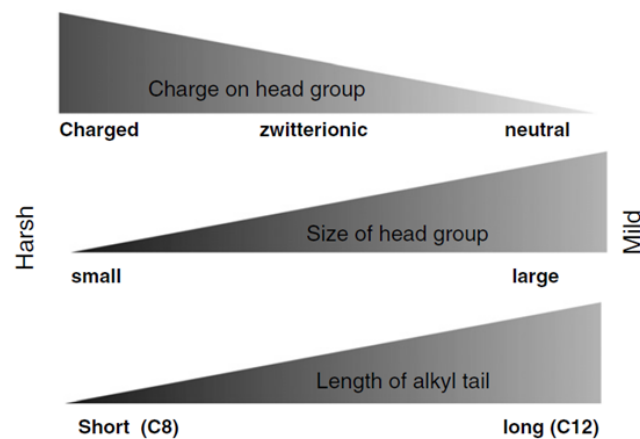


Abb. 5.2: Übersicht der Detergenzeigenschaften basierend auf ihrer chemischen Struktur, entnommen aus [192].

Des Weiteren ist die räumliche Anordnung verändert. In Biomembranen liegen die Phospholipide als Doppelschicht vor, deren lipophile Fettsäurerester zueinander zeigen und deren polare Köpfe nach außen ragen und so eine Schicht bilden. Bei Detergenzien hingegen kommt es in wässriger Lösung zur Bildung von Mizellen, die eine eher kugelartige Form einnehmen und sich als *monolayer* um die hydrophoben Bereiche der Membranproteine lagern [219]. Diese unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften führen dazu, dass Detergenzien nicht dazu in der Lage sind Membranen vollständig zu imitieren. Die Bildung von Membranproteinen in Detergenzienumgebung kann dementsprechend dazu

führen, dass die Faltung gegenüber der nativen verändert ist [201]. Abhilfe könnte die Synthese in Liposomen [220] oder Nanodiscs [131–133] schaffen, die durch einen anderen Aufbau und ihre Eigenschaften als Lipide die Biomembranen besser imitieren können. So wurde bereits für verschiedene Membranproteine beschrieben, dass diese erst eine volle Aktivität, native Faltung oder Oligomerisierung aufwiesen, sobald der Zusatz von Lipiden erfolgte (Bsp.: [221–223]).

Zudem konnte festgestellt werden, dass nicht jedes Detergens zum Syntheseansatz hinzugefügt werden kann. So zeigen z.B. β -OG und Fos-Cholin einen inhibierenden Effekt auf das Expressionssystem [128, 130]. Als geeignet haben sich in mehreren Fällen insbesondere Digitonin und verschiedene Brij-Derivate gezeigt [128, 130], deren Erfolg sich möglicherweise durch die unpolaren Eigenschaften und die langen Alkylketten erklären lässt. Die Einschränkungen bereits während der Synthese führen allerdings auch dazu, dass die Auswahlmöglichkeiten und somit die Möglichkeiten der Veränderungen der Detergenzeigenschaften gering sind. Die Nutzung von Bizellen [224] und Mischmizellen bietet hier einen größeren Spielraum, ist jedoch für die systematische Testung sehr aufwändig.

Die Einschränkungen der Detergenzienwahl haben auch einen Einfluss auf die Reinigung und den Detergenzienaustausch. Brij78, das erfolgreichste Detergens für die zellfreie Synthese im Arbeitskreis, besitzt eine geringe CMC [130] und ist durch die lange PEG-Kette (20 Einheiten) und den Stearyl-Alkylrest sehr groß. Resultierend aus diesen Eigenschaften lässt sich Brij78 nur schwer gegen andere Detergenzien austauschen. Dieses schränkt die Auswahl der Detergenzien für die Reinigung sehr ein. Wie an *Pf*FNT gezeigt, war nur das zwitterionische Fos-Cholin in der Lage *Pf*FNT zu solubilisieren und stabilisieren. Fos-Cholin stellt durch seinen zwitterionischen Charakter jedoch ein potenziell denaturierendes Detergens dar, was möglicherweise dazu führt, dass außerhalb einer membranähnlicheren Umgebung, wie Liposomen, nicht mehr die Pentamere, sondern auch kleinere Oligomere, wie Dimere und Trimere stabilisiert werden. In Liposomen kann es dann, durch den anderen Aufbau und die veränderten physikalischen Eigenschaften, wieder zum Zusammenlagern der pentameren Form kommen (5. 2), sodass die Funktionalität gezeigt werden konnte. Das weitere Reinigen und Kristallisieren in Brij78 ohne zusätzlichen Detergenzienaustausch ist allerdings ebenso wenig erfolgversprechend, weil die Mizellgröße die notwendigen Protein-Protein-Wechselwirkungen verhindern kann [151, 192].

Zur Frage, ob zellfrei hergestellte Membranproteine für die Kristallisation geeignet sind, lässt sich sagen, dass die künstliche Detergenzienumgebung zwar einen Effekt auf die Faltung des Proteins ausübt, aber nicht zwingend zu einer falschen Faltung und einer Hemmung der Kristallisation führt. Die Kristallisation von vier zellfrei hergestellten Membranproteinen [181, 148, 182, 183, 171] zeigt, dass das System prinzipiell als Ausgangspunkt für die Kristallisation genutzt werden kann. Allerdings stellen oligomere Membranproteine eine zusätzliche Herausforderung dar, die insbesondere im zellfreien System schwer zu überwinden ist, da das Protein zu keinem Zeitpunkt vor der Reinigung als Pentamer in eine native Membran eingebaut wurde. Das Bilden der Oligomere ist eine zusätzliche Hürde, die überwunden werden muss und stark von den Umgebungseinflüssen abhängt. Die direkte

Synthese in Liposomen oder Nanodiscs oder die Verwendung einer lipophileren Umgebung für die Kristallisation, wie bei der *in meso* Kristallisation [175], können dieses Problem möglicherweise reduzieren und so zum Erfolg führen.

5.4 Rekombinante Herstellung in *E. coli* und *P. pastoris* als Alternative?

Die Versuche haben gezeigt, dass die zellfreie Synthese von PfFNT in Detergenzienumgebung nicht die erwünschten Erfolge erbracht hat. Aus diesem Grund stellte sich die Frage, ob die *in vivo* Expression in *E. coli* oder *P. pastoris* möglicherweise eine Alternative darstellen.

Die Expression in BL21-Zellen hat gezeigt, dass PfFNT hergestellt wird, dieses allerdings in geringen Proteinausbeuten und einem großen Anteil *inclusion bodies* resultiert. Optimierungsversuche mit dem Ziel einer verringerten Translationsrate, durch Senken der Temperatur oder Verringern der Induktorkonzentration, und daraus resultierend höherem Anteil korrekt gefalteten Proteins [97], blieben ohne Erfolg. Die Ergebnisse für diesen Expressionsversuch spiegeln die in der Literatur beschriebenen Problematiken der eukaryotischen Proteine in prokaryotischen Zellsystemen wider (zusammengefasst in [89]). Die Nutzung dieses Expressionssystems für die Gewinnung der großen Mengen benötigten Proteins ist somit nicht ohne weitere Veränderungen möglich. Die Koexpression von Chaperonen [96, 95] oder die Aufarbeitung der *inclusion bodies* bieten jedoch potenzielle Angriffspunkte [101, 102], um dieses Zellsystem dennoch für die Gewinnung des PfFNTs in Betracht zu ziehen. Bei der Rückfaltung der *inclusion bodies* kann allerdings keine Voraussage getroffen werden, ob diese in die native Faltung überführt werden können und auch die Koexpression von Chaperonen stellt lediglich einen Versuch dar, die Faltung zu unterstützen. Es stellt sich daher die Frage, warum die zellfreie Synthese in einem *E. coli* basierten System solch hohe Ausbeuten erzielen kann, während in den Zellen das Protein aggregiert. Die Antworten darauf lassen sich in den Schritten nach der Translation des Proteins finden, da diese den größten Unterschied der beiden Expressionssysteme ausmachen. Wie bereits beschrieben, muss das Protein in der Bakterienzelle zur Membran transportiert werden. Dieser Prozess ist möglicherweise durch Inkompatibilitäten der Translokationsfaktoren (wie in [225] gezeigt) oder durch eine Überlastung, resultierend aus den hohen Translationsraten [226] gestört und führt so zu einem Anfall der aggregierten Proteine im Cytosol. Auf gleiche Weise kann die Integration in die Membran verhindert werden [89]. Diese Probleme treten im zellfreien durch die direkte Solubilisierung nicht auf.

Die heterologe Expression in *P. pastoris* zeigte im Gegensatz dazu vielversprechendere Ergebnisse. Die Untersuchung verschiedener Klone und Induktionsbedingungen führte bereits in Schüttelkulturen zu ausreichenden Expressionsleveln. Die Detektion auf dem Western Blot bestätigte zudem nicht nur die Expression, sondern konnte auch zeigen, dass das PfFNT in den Zellmembranen als Pentamer vorliegt und für die Zersetzung zum Monomer einer höheren Temperatureinwirkung bedarf. Diese Pentamerstabilität scheint der Schlüssel für die Erzielung homogenen PfFNTs zu sein. Ein weiterer Vorteil der *P. pastoris* Zellen ist die hohe Biomasse, die im Fermenter erreicht werden kann und die

bei gleichem Volumen deutlich über der von *S. cerevisiae* liegt [107]. Es konnten so bei einem initialen Fermentervolumen von 1,5 l über 500 g Zellmasse erhalten werden, die für den Zellaufschluss und die Solubilisierung des PfFNTs aus den Membranen genutzt werden konnten.

Die Untersuchung der geeigneten Detergenzien für die Solubilisierung offenbarte mit DDM, DM, Fos-Cholin 12 und LDAO vier verschiedene Möglichkeiten der Extraktion. LDAO und DDM besaßen zwar die größte Effektivität und konnten die größten Mengen PfFNT solubilisieren, die Verwendung der alternativen Detergenzien eröffnet allerdings die Möglichkeit die unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften für die Solubilisierung zu nutzen und den Effekt auf das PfFNT zu untersuchen. Dieses kann unter Umständen dazu führen, dass ein weniger effektives Detergens für die Solubilisierung gewählt wird, welches die native Faltung dafür aber am geringsten beeinflusst. Mit DDM konnten aus 80 g Zellmasse 8,4 mg PfFNT solubilisiert werden, mit LDAO sogar 15 mg. Diese Ergebnisse zeigen, dass auch eine geringere Solubilisierungsrate ausreichend Material für die nachfolgende Gelfiltration und Kristallisationsansätze liefern kann.

Die Größenausschlusschromatographie konnte die Stabilität des Pentamers mit einem monodispersen Peak in DDM und LDAO nicht bestätigen und scheint somit auf den ersten Blick keinen Vorteil für die heterologe Expression in *P. pastoris* zu zeigen. Hierbei muss jedoch wiederum die Bedeutung der Detergenzien bedacht werden. Die Einflüsse auf das PfFNT waren durch den zwitterionischen Charakter des LDAOs eventuell zu stark denaturierend [192], was in dem großen Peak des Ausschlussvolumens, welcher aggregiertes Protein repräsentiert, resultiert. Die Beobachtungen der Zersetzung des Pentamers in Trimer und Monomer können ebenfalls durch diesen Einfluss bedingt sein oder durch eine Teildenaturierung durch den langwierigen Reinigungsprozess und die mehrtägige Lagerung auf Eis außerhalb der schützenden Membran entstanden sein. Das DDM kann einen ähnlichen Einfluss auf die Stabilität besitzen, dieser Effekt wird durch seine chemische Struktur allerdings eine untergeordnete Rolle spielen. Es wird als mildes Detergens beschrieben, da es durch die relativ lange Alkylkette, den großen hydrophilen Part des Maltosidrests und seinen neutralen Charakter gering denaturierend wirkt [192]. Eine größere Rolle könnte hier die Entfernung der angelagerten Lipide aus der Membran spielen. Die Stabilisierung durch den lateralen Druck und den Wasserausschluss durch die angelagerten Lipide [227] kann DDM möglicherweise nicht imitieren und führt somit zu einem auseinanderbrechen der Oligomere.

DDM und LDAO sind die einzigen Detergenzien, die in dieser Arbeit bisher für die Solubilisierung und Reinigung aus *P. pastoris* getestet wurden, dementsprechend ist noch ein großer Spielraum für weitere Versuche vorhanden. Die Prüfung verschiedener Detergenzien, die bereits erfolgreich in der Kristallisation eingesetzt wurden [228, 163], wie das β -OG, β -NG, DM, Fos-Cholin 12, C₁₂E₈ und C₈E₄, im Anschluss an die Solubilisierung ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zum nativ gefalteten, homogenen PfFNT. Jedes dieser Detergenzien besitzt leicht veränderte chemische und physikalische Eigenschaften und kann daher den entscheidenden Vorteil während der Stabilisierung besitzen [161]. Es gilt zwei Detergenzien zu finden, eines welches möglichst viel PfFNT aus den Membranverbänden

herauslösen kann und dabei den geringsten denaturierenden Einfluss auf das PfFNT besitzt und ein zweites für die Reinigung, welches das Pentamer bestmöglich stabilisiert und dabei durch die Mizellgröße die Kristallisation nicht inhibiert [192].

Die hohe Varianz an Detergenzien, die für die Solubilisierung und die Reinigung in diesem System genutzt werden können, bietet viele Chancen das Ziel des stabilen homogenen PfFNTs zu erreichen. Die ersten Ergebnisse in DDM und LDAO zeigen lediglich, dass diese nicht für beide Schritte, die Extraktion und die Reinigung, geeignet sind, für den alleinigen Einsatz in der Solubilisierung können sie aber dennoch das Mittel der Wahl sein. Das lässt sich dadurch erklären, dass die beiden Schritte unterschiedliche Anforderungen an die Eigenschaften des Detergenzes stellen.

Die Pentamerstabilität, die auf dem Western Blot festgestellt werden konnte, gibt Hoffnung dass dieses auch in Detergenzienmizellen stabilisiert werden kann. Zudem besteht die Möglichkeit, dass verbleibende Lipide, die nach der Solubilisierung mit einigen Detergenzien weiter am Protein anhaften, den entscheidenden Faktor für die Stabilität des Oligomeres liefern, wie es auch für andere Membranproteine schon beschrieben wurde [223, 222].

Der Nachweis der Funktionalität und der korrekten Faltung steht noch aus. Die vorhandene Oligomerisierung legt allerdings die Vermutung nahe, dass diese im Membranverband vorliegt [201]. Der Einfluss der Detergenzien während des gesamten Prozesses ist allerdings nicht zu unterschätzen und sollte zwingend nach einer erfolgreichen Isolierung in Proteoliposomen überprüft werden.

Die Vorteile der größeren Detergenzienauswahl und des Einbaus in natürliche Phospholipiddoppelschichten gegenüber der zellfreien Expression, und die guten Ausbeuten im Fermentierprozess, sowie die hohe Pentamerstabilität bieten einen idealen Ausgangspunkt für die weitere Optimierung und anschließende Kristallisation. Die zeitintensivere Fermentierung und der zusätzliche Detergenzienverbrauch für die Solubilisierung stellen jedoch kritische Punkte dar, die bei einer rationalen Abwägung der Eignung des Zellsystems mit einbezogen werden müssen.

5.5 Ausblick

Die Gewinnung des rekombinanten PfFNTs aus verschiedenen Systemen konnte in dieser Arbeit erfolgen und ebenso die Herstellung im Großmaßstab für das zellfreie System und in *P. pastoris*. Die Nutzung von *E. coli* Zellen für die heterologe Expression stellte sich als eher ungeeignet heraus, ließe sich durch den Zusatz von Chaperonen oder die Rückfaltung von *inclusion bodies* aber möglicherweise noch optimieren.

Die großen Mengen Protein die in *P. pastoris* gewonnen werden konnten, sind ein vielversprechender Ausgangspunkt für das Vorhaben der Kristallisation. Insbesondere das Wachstum im Bioreaktor stellte sich als sehr effizient heraus. Zur Nutzung für die Kristallisation sollte im Folgenden eine Analyse der geeigneten Bedingungen erfolgen, die das pentamere Oligomer stabilisieren. Hierzu zählen unter

anderem die Auswahl eines Detergenzes für die Solubilisierung, eines Detergenzes für die Reinigung, sowie des pH-Wertes, der Salzkonzentration und des Glycerolanteils im Puffer.

Das zellfreie System hat nicht nur funktionelles *Pf*FNT hervorgebracht, sondern auch zur Entwicklung einer Methode für die Messung der Direktionalität beigetragen. Die Zugabe von Bizellen, Liposomen oder Nanodiscs könnten die aufgetrennen Probleme reduzieren, auch wenn diese möglicherweise zu geringeren Proteinausbeuten führen würden. Der Vorteil der großen Proteinausbeuten wäre zwar nicht mehr gegeben, die positiven Effekte durch die Zeitersparnis und den nicht notwendigen Zellaufschluss und die Solubilisierung wären dennoch enorm. Die weitere Nutzung dieses Systems ist daher auf jeden Fall sinnvoll.

Für die Kristallisation wären alternative Methoden zur Dampfdiffusion nutzbar. Hier hat vor allem die *in meso* Kristallisation gute Erfolge für Membranproteine und oligomere, „zellfreie“ Membranproteine gezeigt [175]. Die kubischen Lipidphasen stellen eine veränderte Umgebungssituation dar, die sich positiv auf die Bildung des Pentamers auswirken könnte.

Die *Pf*FNT-Proteoliposomen können weiterhin für die Messungen der Direktionalität fungieren, den Nachweis der Funktionalität des aus *P. pastoris* solubilisierten *Pf*FNTs und auch zur Untersuchung des postulierten Protonensymports durch Beladen mit Fluoreszenzfarbstoffen dienen. Erste Versuche hierzu wurden bereits mit Pyranin durchgeführt, führten aber zu keinen auswertbaren Ergebnissen, sodass eine weitere Etablierung sinnvoll ist. Die Analyse der oligomeren Form in den Proteoliposomen wäre ebenfalls erstrebenswert, um abzuschätzen, ob eine Synthese in Liposomen, Bizellen oder Nanodiscs Sinn macht. Des Weiteren ist die Funktionsprüfung aller zellfrei hergestellten FNTs in Liposomen denkbar, muss jedoch in der Abhängigkeit des Detergenzes geprüft werden.

6 Zusammenfassung

PfFNT, ein Laktat-Transporter aus dem Malaria-Erreger *P. falciparum*, ist aufgrund seiner Rolle im Energiestoffwechsel des Parasiten ein valides Target für die Therapie der Malaria. Ziel dieser Arbeit war es, große Mengen gereinigtes, homogenes und korrekt gefaltetes Protein zu gewinnen, um Kristallisationscreens anzusetzen, um die daraus resultierende Kristallstruktur später für ein rationales Inhibitor-design nutzen zu können. Die Eignung verschiedener Expressionssysteme sollte für diesen Zweck geprüft werden. Es konnte gezeigt werden, dass *PfFNT* sowohl in *E. coli*, *P. pastoris* und im zellfreien System hergestellt wurde.

Mit einer Ausbeute von mehreren Milligramm Protein pro Milliliter über Nacht, schien die zellfreie Proteinherstellung ein idealer Ausgangspunkt für weitere Reinigungen zu sein. Transportassays nach Rekonstitution in Liposomen verstärkten diesen Eindruck, da diese in Lichtstreuungsmessungen die Funktionalität und somit korrekte Faltung des *PfFNTs* zeigen konnten. Die beobachtete Substratspezifität für Formiat, Acetat und Laktat bestätigte die Ergebnisse aus Messungen in Hefezellen und Oozyten. Des Weiteren konnte ein Faktor Xa Verdau zeigen, dass ein gerichteter Einbau in die liposomale Lipiddoppelschicht erfolgte und alle Termini nach außen orientiert waren. Diese Entdeckung ermöglichte erstmalig die Messung der physiologischen Transportrichtung und eröffnete die Möglichkeit die Direktionalität des Transports zu untersuchen.

Trotz dieser Ergebnisse konnten die Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie nur eine Mischung verschiedener oligomerer Formen zeigen, deren einzelne Oligomere schwer zu isolieren waren. Eine Optimierung durch die Verwendung verschiedener Pufferbedingungen und Fos-Cholin anstelle von Brij78 waren nicht erfolgreich. Es konnten allerdings verschiedene oligomere Formen, wie das Pentamer, Monomer, Dimer und Trimer in einer zweiten Reinigung isoliert und für Kristallisationsversuche eingesetzt werden. Zusätzlich wurden auch die monomere und trimere Form einer N- und C-terminal verkürzten *PfFNT*-Variante verwendet. Ein Proteinkristall konnte in keinem der Versuche gewonnen werden.

In *E. coli* Zellen konnte ebenfalls *PfFNT* exprimiert werden, die Ausbeuten waren allerdings gering und fielen vornehmlich als *inclusion bodies* an. Die Nutzung für die Kristallisation wurde daher nicht weiter in Erwägung gezogen.

Aus *P. pastoris* Zellen konnten nach der erfolgreichen Fermentierung mehrere Milligramm *PfFNT* mit DDM, LDAO, DM und Fos-Cholin 12 aus den Membranen solubilisiert werden und DDM und LDAO für weitere Untersuchungen der Oligomerisierung genutzt werden. Obwohl das Pentamer sich als sehr stabil erwiesen hatte, was aus einem SDS-resistenten und temperaturunempfindlichen Signal auf dem Western Blot hervorging, wurde auch bei dieser Reinigung wieder eine Mischung verschiedener Oligomere gefunden.

Nichtsdestotrotz scheint die Gewinnung aus *P. pastoris* Zellen aufgrund der hohen Pentamerstabilität vielversprechend und bietet eine wichtige Grundlage für weitere Studien, um herauszufinden, welche Bedingungen und Detergenzien diese Form stabilisieren können.

7 Summary

PfFNT, a lactate transporter of *P. falciparum*, is due to its role in the energy metabolism a valid drug target for the therapy of malaria. The aim of this work was to receive large amounts of pure, homogenous and correctly folded protein to start crystallization trials, to use this structure in the future for a rational drug design. The suitability of different expression systems should be evaluated for this purpose. It could be shown, that *PfFNT* was expressed in *E. coli*, *P. pastoris* and an *E. coli* based cell-free system.

With milligram yields of protein per milliliter overnight, the cell-free expression appeared to be an ideal starting point for further purification steps. Transport assays after reconstitution in liposomes strengthened this result, as they revealed functionality in light scattering measurements and therefore native folding of the *PfFNT*. The observed substrate selectivity for formate, acetate and lactate confirmed the results measured before in yeast cells and oocytes. Furthermore, a factor Xa digest indicated an even orientation in the liposome bilayer, with the termini facing the outside. This discovery led, for the first time, to measurements of the physiological transport direction and opened up the possibility to analyze the directionality of the transport.

However, the elution profiles of size exclusion chromatography revealed a mixture of oligomeric forms, with oligomers hard to isolate, and could not be optimized using several buffer conditions and Fos-Choline instead of Brij78. For this reason crystallization trials were set up not only with the pentamer, but also with the monomer, dimer and trimer, which could be extracted in a second run. Additionally, the monomeric and trimeric forms of a N- and C-terminal truncated *PfFNT* were used. Crystallization has not yet been successful in this trials.

In *E. coli*, *PfFNT* could be expressed in very small amounts and mainly as inclusion bodies. It was therefore not taken into consideration for crystallization.

After a successful growth in a bioreactor several milligrams *PfFNT* could be solubilized with DDM, DM, LDAO and Fos-Cholin 12 of *P. pastoris* cells and DDM and LDAO were used for further purification and analyzing the oligomeric state on a gelfiltration column. Although the pentamer seemed to be very stable, which was indicated by a SDS-resistant and temperature insensitive signal on the Western blot, a mixture of different oligomeric states was found again in this step.

Nevertheless, expression in *P. pastoris* appears promising, because of the high stability of the pentamer, and therefore is an important basis for further studies, to identify conditions and detergents that maintain the pentameric form.

8 Literaturverzeichnis

1. *World malaria report 2015*, World Health Organization, Genf, 2016
2. F. E. G. Cox. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasites Vectors*, 3:5, 2010
3. R. W. Snow, E. L. Korenromp and E. Gouws. Pediatric mortality in africa: *Plasmodium falciparum* malaria as a cause or risk? *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71:16–24, 2004
4. J. A. Rowe, A. Claessens, R. A. Corrigan and M. Arman. Adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to human cells: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11:e16, 2009
5. R. Tuteja. Malaria – an overview. *The FEBS Journal*, 274:4670–4679, 2007
6. B. Singh, L. K. Sung, A. Matusop, A. Radhakrishnan, S. S. Shamsul, J. Cox-Singh, A. Thomas and D. J. Conway. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. *The Lancet*, 363:1017–1024, 2004
7. H. E. Shortt, N. H. Fairley, G. Covell, P. G. Shute and P. C. C. Garnham. Pre-erythrocytic stage of *Plasmodium falciparum*. *British Medical Bulletin*, 2:1006–1008, 1949
8. A. F. Cowman and B. S. Crabb. Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell*, 124:755–766, 2006
9. R. S. Bray and P. C. Garnham. The life-cycle of primate malaria parasites. *British Medical Bulletin*, 38:117–122, 1982
10. L. H. Miller, D. I. Baruch, K. Marsh and O. K. Doumbo. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415:673–679, 2002
11. L. Bannister, J. Hopkins, R. Fowler, S. Krishna and G. Mitchell. A brief illustrated guide to the ultrastructure of *Plasmodium falciparum* asexual blood stages. *Parasitology Today*, 16:427–433, 2000
12. S. G. Langreth, J. B. Jensen, R. T. Reese and W. Trager. Fine structure of human malaria *in vitro*. *The Journal of Protozoology*, 25:443–452, 1978
13. L. Tilley, M. W. Dixon and K. Kirk. The *Plasmodium falciparum*-infected red blood cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 43:839–842, 2011
14. M. Aikawa, L. H. Miller, J. Johnson and J. Rabbege. Erythrocyte entry by malarial parasites. A moving junction between erythrocyte and parasite. *The Journal of Cell Biology*, 77:72–82, 1978
15. I. W. Sherman. Biochemistry of *Plasmodium* (malarial parasites). *Microbiological Reviews*, 43:453–495, 1979
16. S. Baumeister, M. Winterberg, J. M. Przyborski and K. Lingelbach. The malaria parasite *Plasmodium falciparum*: cell biological peculiarities and nutritional consequences. *Protoplasma*, 240:3–12, 2010

17. L. Cui, S. Mharakurwa, D. Ndiaye, P. K. Rathod and P. J. Rosenthal. Antimalarial drug resistance: literature review and activities and findings of the ICEMR network. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 93:57–68, 2015
18. R. G. Ridley. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature*, 415:686–693, 2002
19. M. Enomoto, S. Kawazu, S. Kawai, W. Furuyama, T. Ikegami, J. Watanabe and K. Mikoshiba. Blockage of spontaneous Ca^{2+} oscillation causes cell death in intraerythrocytic *Plasmodium falciparum*. *PloS one*, 7:e39499, 2012
20. D. J. Krogstad. Malaria as a reemerging disease. *Epidemiologic Reviews*, 18:77–89, 1996
21. A. F. Slater and A. Cerami. Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature*, 355:167–169, 1992
22. A. Yayon, R. Timberg, S. Friedman and H. Ginsburg. Effects of chloroquine on the feeding mechanism of the intraerythrocytic human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *The Journal of Protozoology*, 31:367–372, 1984
23. D. E. Goldberg, A. F. Slater, A. Cerami and G. B. Henderson. Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*: an ordered process in a unique organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87:2931–2935, 1990
24. *Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance: 2000-2010*, World Health Organization, Genf, 2010
25. S. J. Foote, D. E. Kyle, R. K. Martin, A. Oduola, K. Forsyth, D. J. Kemp and A. F. Cowman. Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 345:255–258, 1990
26. X. Su, L. A. Kirkman, H. Fujioka and T. E. Wellems. Complex polymorphisms in an approximately 330 kDa protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in Southeast Asia and Africa. *Cell*, 91:593–603, 1997
27. A. Ecker, A. M. Lehane, J. Clain and D. A. Fidock. PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. *Trends in Parasitology*, 28:504–514, 2012
28. J. B. Koenderink, R. A. Kavishe, S. R. Rijpma and F. G. Russel. The ABCs of multidrug resistance in malaria. *Trends in Parasitology*, 26:440–446, 2010
29. A. B. Sidhu, A. C. Uhlemann, S. G. Valderramos, J. C. Valderramos, S. Krishna and D. A. Fidock. Decreasing pfmdr1 copy number in *Plasmodium falciparum* malaria heightens susceptibility to mefloquine, lumefantrine, halofantrine, quinine, and artemisinin. *The Journal of Infectious Diseases*, 194:528–535, 2006
30. D. S. Peterson, W. K. Milhous and T. E. Wellems. Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87:3018–3022, 1990

31. U. Eckstein-Ludwig, R. J. Webb, I. D. van Goethem, J. M. East, A. G. Lee, M. Kimura, P. M. O'Neill, P. G. Bray, S. A. Ward and S. Krishna. Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 424:957–961, 2003
32. W. Li, W. Mo, D. Shen, L. Sun, J. Wang, S. Lu, J. M. Gitschier and B. Zhou. Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in action of artemisinin. *PLoS Genetics*, 1:e36, 2005
33. F. Ariey, B. Witkowski, C. Amaratunga, J. Beghain, A. C. Langlois, N. Khim, S. Kim, V. Duru, C. Bouchier, L. Ma, P. Lim, R. Leang, S. Duong, S. Sreng, S. Suon, C. M. Chuor, D. M. Bout, S. Menard, W. O. Rogers, B. Genton, T. Fandeur, O. Miotto, P. Ringwald, J. Le Bras, A. Berry, J. C. Barale, R. M. Fairhurst, F. Benoit-Vical, O. Mercereau-Puijalon and D. Menard. A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature*, 505:50–55, 2014
34. *Guidelines for the treatment of malaria*, 2nd Ed., World Health Organization, Genf, 2010
35. F. Nosten and N. J. White. Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77:181–192, 2007
36. I. K. Srivastava and A. B. Vaidya. A mechanism for the synergistic antimalarial action of atovaquone and proguanil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43:1334–1339, 1999
37. M. Korsinczky, N. Chen, B. Kotecka, A. Saul, K. Rieckmann and Q. Cheng. Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44:2100–2108, 2000
38. M. E. Fichera and D. S. Roos. A plastid organelle as a drug target in apicomplexan parasites. *Nature*, 390:407–409, 1997
39. R. V. Marchetti, A. M. Lehane, S. H. Shafik, M. Winterberg, R. E. Martin and K. Kirk. A lactate and formate transporter in the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Nature Communications*, 6:6721, 2015
40. M. H. Saier, B. H. Eng, S. Fard, J. Garg, D. A. Haggerty, W. J. Hutchinson, D. L. Jack, E. C. Lai, H. J. Liu, D. P. Nusinew, A. Omar, S. S. Pao, I. T. Paulsen, J. A. Quan, M. Sliwinski, T. T. Tseng, S. Wachi and G. B. Young. Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1422:1–56, 1999
41. W. Lü, J. Du, N. J. Schwarzer, T. Wacker, S. L. Andrade and O. Einsle. The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biological Chemistry*, 394:715–727, 2013
42. B. Wu, J. Rambow, S. Bock, J. Holm-Bertelsen, M. Wiechert, A. B. Soares, T. Spielmann and E. Beitz. Identity of a *Plasmodium* lactate/H⁽⁺⁾ symporter structurally unrelated to human transporters. *Nature Communications*, 6:6284, 2015
43. A. P. Halestrap. The monocarboxylate transporter family-Structure and functional characterization. *IUBMB Life*, 64:1–9, 2012

44. Y. Wang, Y. Huang, J. Wang, C. Cheng, W. Huang, P. Lu, Y.-N. Xu, P. Wang, N. Yan and Y. Shi. Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature*, 462:467–472, 2009
45. B. Suppmann and G. Sawers. Isolation and characterization of hypophosphite-resistant mutants of *Escherichia coli*: Identification of the FocA protein, encoded by the pfl operon, as a putative formate transporter. *Molecular Microbiology*, 11:965–982, 1994
46. W. Lü, J. Du, T. Wacker, E. Gerbig-Smentek, S. L. A. Andrade and O. Einsle. pH-dependent gating in a FocA formate channel. *Science*, 332:352–354, 2011
47. A. B. Waight, J. Love and D.-N. Wang. Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17:31–37, 2010
48. W. B. White and J. G. Ferry. Identification of formate dehydrogenase-specific mRNA species and nucleotide sequence of the fdhC gene of *Methanobacterium formicicum*. *Journal of Bacteriology*, 174:4997–5004, 1992
49. T. Peakman, J. Crouzet, J. F. Mayaux, S. Busby, S. Mohan, N. Harbone, J. Wootton, R. Nicolson and J. Cole. Nucleotide sequence, organisation and structural analysis of the products of genes in the nirB-cysG region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *European Journal of Biochemistry*, 191:315–323, 1990
50. S. Clegg, F. Yu, L. Griffiths and J. A. Cole. The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC in *Escherichia coli* K-12: two nitrate and three nitrite transporters. *Molecular Microbiology*, 44:143–155, 2002
51. W. Jia and J. A. Cole. Nitrate and nitrite transport in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions*, 33:159–161, 2005
52. W. Jia, N. Tovell, S. Clegg, M. Trimmer and J. Cole. A single channel for nitrate uptake, nitrite export and nitrite uptake by *Escherichia coli* NarU and a role for NirC in nitrite export and uptake. *Biochemical Journal*, 417:297–307, 2009
53. W. Lü, N. J. Schwarzer, J. Du, E. Gerbig-Smentek, S. Andrade and O. Einsle. Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella typhimurium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:18395–18400, 2012
54. S. E. Unkles, V. F. Symington, Z. Kotur, Y. Wang, M. Y. Siddiqi, J. R. Kinghorn and A. D. M. Glass. Physiological and biochemical characterization of AnNitA, the *Aspergillus nidulans* high-affinity nitrite transporter. *Eukaryotic Cell*, 10:1724–1732, 2011
55. J. Rexach, E. Fernandez and A. Galvan. The *Chlamydomonas reinhardtii* Nar1 gene encodes a chloroplast membrane protein involved in nitrite transport. *The Plant Cell*, 12:1441–1453, 2000
56. B. K. Czyzewski and D.-N. Wang. Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature*, 483:494–497, 2012
57. R. G. Sawers. Formate and its role in hydrogen production in *Escherichia coli*. *Biochemical Society Transactions*, 33:42–46, 2005

58. X. Lv, H. Liu, M. Ke and H. Gong. Exploring the pH-dependent substrate transport mechanism of FocA using molecular dynamics simulation. *Biophysical Journal*, 105:2714–2723, 2013
59. A. B. Waight, B. K. Czyzewski and D.-N. Wang. Ion selectivity and gating mechanisms of FNT channels. *Current Opinion in Structural Biology*, 23:499–506, 2013
60. L. Beyer, C. Doberenz, D. Falke, D. Hunger, B. Suppmann and R. G. Sawers. Coordination of FocA and pyruvate formate-lyase synthesis in *Escherichia coli* demonstrates preferential translocation of formate over other mixed-acid fermentation products. *Journal of Bacteriology*, 195:1428–1435, 2013
61. O. Einsle and P. M. Kroneck. Structural basis of denitrification. *Biological Chemistry*, 385:875–883, 2004
62. A. Rycovska, L. Hatahet, K. Fendler and H. Michel. The nitrite transport protein NirC from *Salmonella typhimurium* is a nitrite/proton antiporter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818:1342–1350, 2012
63. D. Chakravorty and M. Hensel. Inducible nitric oxide synthase and control of intracellular bacterial pathogens. *Microbes and Infection*, 5:621–627, 2003
64. P. Das, A. Lahiri and D. Chakravorty. Novel role of the nitrite transporter NirC in *Salmonella* pathogenesis: SPI2-dependent suppression of inducible nitric oxide synthase in activated macrophages. *Microbiology*, 155:2476–2489, 2009
65. W. Lü, J. Du, N. J. Schwarzer, E. Gerbig-Smentek, O. Einsle and S. Andrade. The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109:13254–13259, 2012
66. N. Unwin. The structure of ion channels in membrane excitable cells. *Neuron*, 3:665–676, 1989
67. R. W. McKee, R. A. Ormsbee, C. B. Anfinsen, Q. M. Geiman and E. G. Ball. Studies on malarial parasites: VI. The chemistry and metabolism of normal and parasitized (*P. knowlesi*) monkey blood. *The Journal of Experimental Medicine*, 84:569–582, 1946
68. E. F. Roth, C. Raventos-Suarez, M. Perkins and R. L. Nagel. Glutathione stability and oxidative stress in *P. falciparum* infection *in vitro*: Responses of normal and G6PD deficient cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 109:355–362, 1982
69. I. W. Sherman *Malaria: Parasite biology, pathogenesis, and protection*, ASM Press, Washington, DC, 1998
70. M. A. Pfaller, D. J. Krogstad, A. R. Parquette and P. Nguyen-Dinh. *Plasmodium falciparum*: stage-specific lactate production in synchronized cultures. *Experimental Parasitology*, 54:391–396, 1982
71. J. L. Elliott, K. J. Saliba and K. Kirk. Transport of lactate and pyruvate in the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *The Biochemical Journal*, 355:733–739, 2001

72. M. Mueckler, C. Caruso, S. Baldwin, M. Panico, I. Blench, H. Morris, W. Allard, G. Lienhard and H. Lodish. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*, 229:941–945, 1985
73. S. A. Desai and R. L. Rosenberg. Pore size of the malaria parasite's nutrient channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94:2045–2049, 1997
74. S. A. Desai, D. J. Krogstad and E. W. McCleskey. A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Nature*, 362:643–646, 1993
75. S. Krishna, C. J. Woodrow, R. Burchmore, K. J. Saliba and K. Kirk. Hexose transport in asexual stages of *Plasmodium falciparum* and *Kinetoplastidae*. *Parasitology Today*, 16:516–521, 2000
76. C. J. Woodrow, J. I. Penny and S. Krishna. Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* expresses a high affinity facilitative hexose transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 274:7272–7277, 1999
77. G. Kanaani. Transport of lactate in *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes. *Journal of Cellular Physiology*, 149:469–476, 1991
78. A. P. Halestrap. Transport of pyruvate and lactate into human erythrocytes. *Biochemical Journal*, 156:193–207, 1976
79. B. Deuticke. Monocarboxylate transport in erythrocytes. *The Journal of Membrane Biology*, 70:89–103, 1982
80. S. L. Cranmer, A. R. Conant, W. E. Gutteridge and A. P. Halestrap. Characterization of the enhanced transport of L- and D-lactate into human red blood cells infected with *Plasmodium falciparum* suggests the presence of a novel saturable lactate proton cotransporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 270:15045–15052, 1995
81. K. Itakura, T. Hirose, R. Crea, A. Riggs, H. Heyneker, F. Bolivar and H. Boyer. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*, 198:1056–1063, 1977
82. D. Drew, L. Fröderberg, L. Baars and J.-W. L. de Gier. Assembly and overexpression of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Overexpression of Integral Membrane Proteins*, 1610:3–10, 2003
83. F. Baneyx. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Current Opinion in Biotechnology*, 10:411–421, 1999
84. B. Miroux and J. E. Walker. Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 260:289–298, 1996
85. F. W. Studier, A. H. Rosenberg, J. J. Dunn and J. W. Dubendorff. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods in Enzymology*, 185:60–89, 1990
86. F. Jacob and J. Monod. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology*, 3:318–356, 1961

87. M. Lewis. Allostery and the lac operon. *Journal of Molecular Biology*, 425:2309–2316, 2013
88. K. Zahn. Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. *Journal of Bacteriology*, 178:2926–2933, 1996
89. S. Wagner, M. L. Bader, D. Drew and J.-W. de Gier. Rationalizing membrane protein overexpression. *Trends in Biotechnology*, 24:364–371, 2006
90. S. Nagamori, I. N. Smirnova and H. R. Kaback. Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *The Journal of Cell Biology*, 165:53–62, 2004
91. J. G. Thomas, A. Ayling and F. Baneyx. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. To fold or to refold. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 66:197–238, 1997
92. A. Helenius and M. Aebi. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annual Review of Biochemistry*, 73:1019–1049, 2004
93. K. Olden, R. M. Pratt and K. M. Yamada. Role of carbohydrates in protein secretion and turnover: effects of tunicamycin on the major cell surface glycoprotein of chick embryo fibroblasts. *Cell*, 13:461–473, 1978
94. A. G. Lee. How lipids affect the activities of integral membrane proteins. *Lipid-Protein Interactions*, 1666:62–87, 2004
95. K. Nishihara, M. Kanemori, M. Kitagawa, H. Yanagi and T. Yura. Chaperone coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:1694–1699, 1998
96. T. K. van Dyk, A. A. Gatenby and R. A. LaRossa. Demonstration by genetic suppression of interaction of GroE products with many proteins. *Nature*, 342:451–453, 1989
97. N. Bonander, K. Hedfalk, C. Larsson, P. Mostad, C. Chang, L. Gustafsson and R. M. Bill. Design of improved membrane protein production experiments: quantitation of the host response. *Protein Science*, 14:1729–1740, 2005
98. E. R. Geertsma, M. Groeneveld, D. J. Slotboom and B. Poolman. Quality control of overexpressed membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105:5722–5727, 2008
99. D. E. Drew, G. von Heijne, P. Nordlund and J.-W. L. de Gier. Green fluorescent protein as an indicator to monitor membrane protein overexpression in *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 507:220–224, 2001
100. K. Ito and Y. Akiyama. Cellular functions, mechanism of action, and regulation of FTSH protease. *Annual Review of Microbiology*, 59:211–231, 2005
101. H. Kiefer. In vitro folding of alpha-helical membrane proteins. *Overexpression of Integral Membrane Proteins*, 1610:57–62, 2003

102. I. Palmer and P. T. Wingfield. Preparation and extraction of insoluble (inclusion-body) proteins from *Escherichia coli*. *Current Protocols in Protein Science*, Chapter 6:6.3.1, 2004
103. M. Le Maire, P. Champeil and J. V. Møller. Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Detergents in Biomembrane Studies*, 1508:86–111, 2000
104. R. M. Bill. Playing catch-up with *Escherichia coli*: using yeast to increase success rates in recombinant protein production experiments. *Frontiers in Microbiology*, 5:85, 2014
105. Y. Yamada, M. Matsuda, K. Maeda and K. Mikata. The phylogenetic relationships of methanol-assimilating yeasts based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs: the proposal of *Komagataella* gen. nov. (*Saccharomycetaceae*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 59:439–444, 2014
106. H. C. Wegner. Biochemical conversions by yeast fermentation at high cell densities. US 4414329 A. *Patent*, 1983
107. J. M. Cregg, K. J. Barringer, A. Y. Hessler and K. R. Madden. *Pichia pastoris* as a host system for transformations. *Molecular and Cellular Biology*, 5:3376–3385, 1985
108. K. Sreerikshna, R. H. Potenz, J. A. Cruze, W. R. McCombie, K. A. Parker, L. Nelles, P. K. Mazzaferro, K. A. Holden, R. G. Harrison, P. J. Wood, D. A. Phelps, C. E. Hubbard and F. Motohiro. High level expression of heterologous proteins in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of Basic Microbiology*, 28:265–278, 1988
109. J. M. Cregg, J. F. Tschopp, C. Stillman, R. Siegel, M. Akong, W. S. Craig, R. G. Buckholz, K. R. Madden, P. A. Kellaris, G. R. Davis, B. L. Smiley, J. Cruze, R. Torregrossa, G. Velicelebi and G. P. Thill. High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia Pastoris*. *Nature Biotechnology*, 5:479–485, 1987
110. S. B. Ellis, P. F. Brust, P. J. Koutz, A. F. Waters, M. M. Harpold and T. R. Gingeras. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, 5:1111–1121, 1985
111. M. Roa and G. Blobel. Biosynthesis of peroxisomal enzymes in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 80:6872–6876, 1983
112. J. F. Tschopp, P. F. Brust, J. M. Cregg, C. A. Stillman and T. R. Gingeras. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Research*, 15:3859–3876, 1987
113. J. M. Cregg, K. R. Madden, K. J. Barringer, G. P. Thill and C. A. Stillman. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Molecular and Cellular Biology*, 9:1316–1323, 1989
114. M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler and H. Schwab. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98:5301–5317, 2014

115. K. de Schutter, Y.-C. Lin, P. Tiels, A. van Hecke, S. Glinka, J. Weber-Lehmann, P. Rouzé, Y. van de Peer and N. Callewaert. Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, 27:561–566, 2009
116. B. J. Zonneveld and A. L. van der Zanden. The red ade mutants of *Kluyveromyces lactis* and their classification by complementation with cloned ADE1 or ADE2 genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 11:823–827, 1995
117. L. Näätsaari, B. Mistlberger, C. Ruth, T. Hajek, F. S. Hartner and A. Glieder. Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology. *PloS one*, 7:e39720, 2012
118. J. L. Cereghino and J. M. Cregg. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24:45–66, 2000
119. J. J. Clare, F. B. Rayment, S. P. Ballantine, K. Sreekrishna and M. A. Romanos. High-level expression of tetanus toxin fragment C in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene. *Biotechnology*, 9:455–460, 1991
120. K. Hedfalk. Further advances in the production of membrane proteins in *Pichia pastoris*. *Bioengineered*, 4:363–367, 2013
121. J. M. Cregg, J. L. Cereghino, J. Shi and D. R. Higgins. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Molecular Biotechnology*, 16:23–52, 2000
122. S. J. Routledge, L. Mikaliunaite, A. Patel, M. Clare, S. P. Cartwright, Z. Bawa, M. D. Wilks, F. Low, D. Hardy, A. J. Rothnie and R. M. Bill. The synthesis of recombinant membrane proteins in yeast for structural studies. *Integrated Structural Biology*, 95:26–37, 2016
123. A. S. Spirin, V. I. Baranov, L. A. Ryabova, S. Y. Ovodov and Y. B. Alakhov. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science*, 242:1162–1164, 1988
124. P. Renesto and D. Raoult. From genes to proteins: *in vitro* expression of rickettsial proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990:642–652, 2003
125. M. Bannwarth and G. E. Schulz. The expression of outer membrane proteins for crystallization. *Overexpression of Integral Membrane Proteins*, 1610:37–45, 2003
126. L. A. Ryabova, D. Desplancq, A. S. Spirin and A. Pluckthun. Functional antibody production using cell-free translation: effects of protein disulfide isomerase and chaperones. *Nature Biotechnology*, 15:79–84, 1997
127. G. Yin and J. R. Swartz. Enhancing multiple disulfide bonded protein folding in a cell-free system. *Biotechnology and Bioengineering*, 86:188–195, 2004
128. G. Ishihara, M. Goto, M. Saeki, K. Ito, T. Hori, T. Kigawa, M. Shirouzu and S. Yokoyama. Expression of G protein coupled receptors in a cell-free translational system using detergents and thioredoxin-fusion vectors. *Protein Expression and Purification*, 41:27–37, 2005

129. C. Klammt, F. Lohr, B. Schafer, W. Haase, V. Dotsch, H. Ruterjans, C. Glaubitz and F. Bernhard. High level cell-free expression and specific labeling of integral membrane proteins. *The FEBS Journal*, 271:568–580, 2004
130. C. Klammt, D. Schwarz, K. Fendler, W. Haase, V. Dötsch and F. Bernhard. Evaluation of detergents for the soluble expression of alpha-helical and beta-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *The FEBS Journal*, 272:6024–6038, 2005
131. J. A. Cappuccio, C. D. Blanchette, T. A. Sulchek, E. S. Arroyo, J. M. Kralj, A. K. Hinz, E. A. Kuhn, B. A. Chromy, B. W. Segelke, K. J. Rothschild, J. E. Fletcher, F. Katzen, T. C. Peterson, W. A. Kudlicki, G. Bench, P. D. Hoepflich and M. A. Coleman. Cell-free co-expression of functional membrane proteins and apolipoprotein, forming soluble nanolipoprotein particles. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7:2246–2253, 2008
132. F. Katzen, J. E. Fletcher, J.-P. Yang, D. Kang, T. C. Peterson, J. A. Cappuccio, C. D. Blanchette, T. Sulchek, B. A. Chromy, P. D. Hoepflich, M. A. Coleman and W. Kudlicki. Insertion of membrane proteins into discoidal membranes using a cell-free protein expression approach. *Journal of Proteome Research*, 7:3535–3542, 2008
133. E. N. Lyukmanova, Z. O. Shenkarev, N. F. Khabibullina, G. S. Kopeina, M. A. Shulepko, A. S. Paramonov, K. S. Mineev, R. V. Tikhonov, L. N. Shingarova, L. E. Petrovskaya, D. A. Dolgikh, A. S. Arseniev and M. P. Kirpichnikov. Lipid–protein nanodiscs for cell-free production of integral membrane proteins in a soluble and folded state: Comparison with detergent micelles, bicelles and liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818:349–358, 2012
134. C. J. Noren, S. J. Anthony-Cahill, M. C. Griffith and P. G. Schultz. A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science*, 244:182–188, 1989
135. T. Kigawa, T. Yabuki, Y. Yoshida, M. Tsutsui, Y. Ito, T. Shibata and S. Yokoyama. Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins. *FEBS Letters*, 442:15–19, 1999
136. D. Schwarz, F. Junge, F. Durst, N. Frölich, B. Schneider, S. Reckel, S. Sobhanifar, V. Dötsch and F. Bernhard. Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nature Protocols*, 2:2945–2957, 2007
137. D. M. Kim, T. Kigawa, C. Y. Choi and S. Yokoyama. A highly efficient cell-free protein synthesis system from *Escherichia coli*. *The FEBS Journal*, 239:881–886, 1996
138. B. E. Roberts and B. M. Paterson. Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70:2330–2334, 1973
139. Y. Sato, K. Aizawa, T. Ezure, E. Ando and N. Uozumi. A simple fed-batch method for transcription and insect cell-free translation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114:677–679, 2012

140. M. Wakiyama, Y. Kaitsu, T. Matsumoto and S. Yokoyama. Coupled transcription and translation from polymerase chain reaction-amplified DNA in *Drosophila Schneider 2* cell-free system. *Analytical Biochemistry*, 400:142–144, 2010
141. S. Mikami, T. Kobayashi, M. Masutani, S. Yokoyama and H. Imataka. A human cell-derived *in vitro* coupled transcription/translation system optimized for production of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 62:190–198, 2008
142. B. Schneider, F. Junge, V. A. Shirokov, F. Durst, D. Schwarz, V. Dötsch and F. Bernhard. Membrane protein expression in cell-free systems. *Methods in Molecular Biology*, 601:165–186, 2010
143. M. Buntru, S. Vogel, H. Spiegel and S. Schillberg. Tobacco BY-2 cell-free lysate: an alternative and highly-productive plant-based *in vitro* translation system. *BMC Biotechnology*, 14:1–11, 2014
144. O. Kovtun, S. Mureev, W. Jung, M. H. Kubala, W. Johnston and K. Alexandrov. *Leishmania* cell-free protein expression system. *Methods*, 55:58–64, 2011
145. Y. Zhou, H. Asahara, E. A. Gaucher and S. Chong. Reconstitution of translation from *Thermus thermophilus* reveals a minimal set of components sufficient for protein synthesis at high temperatures and functional conservation of modern and ancient translation components. *Nucleic Acids Research*, 40:7932–7945, 2012
146. G. Zubay. *In vitro* synthesis of protein in microbial systems. *Annual Review of Genetics*, 7:267–287, 1973
147. D. Schwarz, C. Klammt, A. Koglin, F. Löhr, B. Schneider, V. Dötsch and F. Bernhard. Preparative scale cell-free expression systems: new tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods*, 41:355–369, 2007
148. T. A. Nguyen, S. S. Lieu and G. Chang. An *Escherichia coli*-based cell-free system for large-scale production of functional mammalian membrane proteins suitable for X-ray crystallography. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 18:85–91, 2010
149. A. Müller-Lucks, S. Bock, B. Wu and E. Beitz. Fluorescent *in situ* folding control for rapid optimization of cell-free membrane protein synthesis. *PloS one*, 7:e42186, 2012
150. J. F. Zawada, G. Yin, A. R. Steiner, J. Yang, A. Naresh, S. M. Roy, D. S. Gold, H. G. Heinsohn and C. J. Murray. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production—a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnology and Bioengineering*, 108:1570–1578, 2011
151. R. M. Bill, P. J. Henderson, S. Iwata, E. R. Kunji, H. Michel, R. Neutze, S. Newstead, B. Poolman, C. G. Tate and H. Vogel. Overcoming barriers to membrane protein structure determination. *Nature Biotechnology*, 29:335–340, 2011
152. C. Ostermeier and H. Michel. Crystallization of membrane proteins. *Current Opinion in Structural Biology*, 7:697–701, 1997

153. F. Bernaudat, A. Frelet-Barrand, N. Pochon, S. Dementin, P. Hivin, S. Boutigny, J.-B. Rioux, D. Salvi, D. Seigneurin-Berny, P. Richaud, J. Joyard, D. Pignol, M. Sabaty, T. Desnos, E. Pebay-Peyroula, E. Darrouzet, T. Vernet and N. Rolland. Heterologous expression of membrane proteins: choosing the appropriate host. *PLoS one*, 6:e29191, 2011
154. A. Helenius and K. Simons. Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 415:29–79, 1975
155. C. G. Tate. Overexpression of mammalian integral membrane proteins for structural studies. *FEBS Letters*, 504:94–98, 2001
156. K. Lundstrom, R. Wagner, C. Reinhart, A. Desmyter, N. Cherouati, T. Magnin, G. Zeder-Lutz, M. Courtot, C. Prual, N. Andre, G. Hassaine, H. Michel, C. Cambillau and F. Pattus. Structural genomics on membrane proteins: comparison of more than 100 GPCRs in 3 expression systems. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 7:77–91, 2006
157. R. M. Garavito and D. Picot. The art of crystallizing membrane proteins. *Methods*, 1:57–69, 1990
158. C. Tanford and J. A. Reynolds. Characterization of membrane proteins in detergent solutions. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, 457:133–170, 1976
159. J. L. Parker and S. Newstead. Current trends in α -helical membrane protein crystallization: An update. *Protein Science*, 21:1358–1365, 2012
160. H. J. Kang, C. Lee and D. Drew. Breaking the barriers in membrane protein crystallography. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 45:636–644, 2013
161. Y. Sonoda, S. Newstead, N. J. Hu, Y. Alguet, E. Nji, K. Beis, S. Yashiro, C. Lee, J. Leung, A. D. Cameron, B. Byrne, S. Iwata and D. Drew. Benchmarking membrane protein detergent stability for improving throughput of high-resolution X-ray structures. *Structure*, 19:17–25, 2011
162. J. R. Casey and R. A. Reithmeier. Detergent interaction with band 3, a model polytopic membrane protein. *Biochemistry*, 32:1172–1179, 1993
163. Z. E. R. Newby, J. D. O'Connell, F. Gruswitz, F. A. Hays, W. E. C. Harries, I. M. Harwood, J. D. Ho, J. K. Lee, D. F. Savage, L. J. W. Miercke and R. M. Stroud. A general protocol for the crystallization of membrane proteins for X-ray structural investigation. *Nature protocols*, 4:619–637, 2009
164. M. C. Wiener. A pedestrian guide to membrane protein crystallization. *Methods*, 34:364–372, 2004
165. D. Levy, M. Seigneuret, A. Bluzat and J. L. Rigaud. Evidence for proton countertransport by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase during calcium transport in reconstituted proteoliposomes with low ionic permeability. *The Journal of Biological Chemistry*, 265:19524–19534, 1990

166. M. J. Borgnia, D. Kozono, G. Calamita, P. C. Maloney and P. Agre. Functional reconstitution and characterization of AqpZ, the *E. coli* water channel protein. *Journal of Molecular Biology*, 291:1169–1179, 1999
167. D. Levy, A. Gulik, A. Bluzat and J. L. Rigaud. Reconstitution of the sarcoplasmic reticulum Ca⁽²⁺⁾-ATPase: mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1107:283–298, 1992
168. K. Venema, F. J. Quintero, J. M. Pardo and J. P. Donaire. The arabidopsis Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:2413–2418, 2002
169. G. D. Eytan. Use of liposomes for reconstitution of biological functions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 694:185–202, 1982
170. M. J. Lemieux, J. Song, M. J. Kim, Y. Huang, A. Villa, M. Auer, X. D. Li and D. N. Wang. Three-dimensional crystallization of the *Escherichia coli* glycerol-3-phosphate transporter: A member of the major facilitator superfamily. *Protein Science*, 12:2748–2756, 2003
171. A. Deniaud, L. Liguori, I. Blesneac, J. L. Lenormand and E. Pebay-Peyroula. Crystallization of the membrane protein hVDAC1 produced in cell-free system. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1798:1540–1546, 2010
172. J. A. Delmar, J. R. Bolla, C.-C. Su and E. W. Yu. Crystallization of membrane proteins by vapor diffusion. *Membrane Proteins*, Waltham, MA, Academic Press, 2015
173. H. A. Kelders, K. H. Kalk, P. Gros and W. G. Hol. Automated protein crystallization and a new crystal form of a subtilisin:eglin complex. *Protein Engineering*, 1:301–303, 1987
174. M. Caffrey and V. Cherezov. Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. *Nature Protocols*, 4:706–731, 2009
175. E. M. Landau and J. P. Rosenbusch. Lipidic cubic phases: a novel concept for the crystallization of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93:14532–14535, 1996
176. N. E. Chayen, P. D. Shaw Stewart, D. L. Maeder and D. M. Blow. An automated system for micro-batch protein crystallization and screening. *Journal of Applied Crystallography*, 23:297–302, 1990
177. K. Weckstrom. Aqueous micellar systems in membrane protein crystallization. Partial miscibility of a nonionic surfactant in the presence of salt or polyethylene glycol. *FEBS Letters*, 192:220–224, 1985
178. H. Michel and D. Oesterhelt. Three-dimensional crystals of membrane proteins: bacteriorhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77:1283–1285, 1980
179. J. Jancarik and S. H. Kim. Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins. *Journal of Applied Crystallography*, 24:409–411, 1991

180. J. Deisenhofer, O. Epp, K. Miki, R. Huber and H. Michel. Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3Å resolution. *Nature*, 318:618–624, 1985
181. T. Wada, K. Shimono, T. Kikukawa, M. Hato, N. Shinya, S. Y. Kim, T. Kimura-Someya, M. Shirouzu, J. Tamogami, S. Miyauchi, K.-H. Jung, N. Kamo and S. Yokoyama. Crystal structure of the eukaryotic light-driven proton-pumping rhodopsin, *Acetabularia* rhodopsin II, from marine alga. *Journal of Molecular Biology*, 411:986–998, 2011
182. C. Boland, D. Li, S. T. A. Shah, S. Haberstock, V. Dötsch, F. Bernhard and M. Caffrey. Cell-free expression and in meso crystallisation of an integral membrane kinase for structure determination. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71:4895–4910, 2014
183. Y.-J. Chen, O. Pornillos, S. Lieu, C. Ma, A. P. Chen and G. Chang. X-ray structure of EmrE supports dual topology model. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:18999–19004, 2007
184. M. Looke, K. Kristjuhan and A. Kristjuhan. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques*, 50:325–328, 2011
185. K. Yakata, Y. Hiroaki, K. Ishibashi, E. Sohara, S. Sasaki, K. Mitsuoka and Y. Fujiyoshi. Aquaporin-11 containing a divergent NPA motif has normal water channel activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1768:688–693, 2007
186. A. Rath, M. Glibowicka, V. G. Nadeau, G. Chen and C. M. Deber. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106:1760–1765, 2009
187. C. W. Cody, D. C. Prasher, W. M. Westler, F. G. Prendergast and W. W. Ward. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry*, 32:1212–1218, 1993
188. C. M. Halliwell, G. Morgan, C.-P. Ou and A. E. Cass. Introduction of a (poly)histidine tag in lactate dehydrogenase produces a mixture of active and inactive molecules. *Analytical Biochemistry*, 295:257–261, 2001
189. A. K. Mohanty and M. C. Wiener. Membrane protein expression and production: Effects of polyhistidine tag length and position. *Protein Expression and Purification*, 33:311–325, 2004
190. K. Terpe. Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60:523–533, 2003
191. M. He, L. Jin and B. Austen. Specificity of factor Xa in the cleavage of fusion proteins. *Journal of Protein Chemistry*, 12:1–5, 1993
192. G. G. Privé. Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods*, 41:388–397, 2007

193. J. L. Rigaud, M. T. Paternostre and A. Bluzat. Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 2. Incorporation of the light-driven proton pump bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 27:2677–2688, 1988
194. D. Levy, A. Bluzat, M. Seigneuret and J. L. Rigaud. A systematic study of liposome and proteoliposome reconstitution involving Bio-Bead-mediated Triton X-100 removal. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1025:179–190, 1990
195. M. Hansen, J. F. J. Kun, J. E. Schultz and E. Beitz. A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *Journal of Biological Chemistry*, 277:4874–4882, 2002
196. S. Ishijima, Z. Shigemi, H. Adachi, N. Makinouchi and I. Sagami. Functional reconstitution and characterization of the *Arabidopsis* Mg⁽²⁺⁾ transporter AtMRS2-10 in proteoliposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818:2202–2208, 2012
197. L. Xiao, W. S. Xie and F. Y. Yang. A method for uni-directional reconstitution of human erythrocyte glucose transporter. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 44:1217–1223, 1998
198. Y. Moritani, S. M. Nomura, I. Morita and K. Akiyoshi. Direct integration of cell-free-synthesized connexin-43 into liposomes and hemichannel formation. *The FEBS Journal*, 277:3343–3352, 2010
199. C. Pernstich, L. Senior, K. A. MacInnes, M. Forsaith and P. Curnow. Expression, purification and reconstitution of the 4-hydroxybenzoate transporter PcaK from *Acinetobacter* sp. ADP1. *Protein Expression and Purification*, 101:68–75, 2014
200. Z. W. Yu and P. J. Quinn. The modulation of membrane structure and stability by dimethyl sulphoxide (review). *Molecular Membrane Biology*, 15:59–68, 1998
201. M. Jaehme and H. Michel. Evaluation of cell-free protein synthesis for the crystallization of membrane proteins—a case study on a member of the glutamate transporter family from *Staphylothermus marinus*. *The FEBS Journal*, 280:1112–1125, 2013
202. F. Cymer and D. Schneider. A single glutamate residue controls the oligomerization, function, and stability of the aquaglyceroporin GlpF. *Biochemistry*, 49:279–286, 2010
203. P. Kitchen, M. T. Conner, R. M. Bill and A. C. Conner. Structural determinants of oligomerization of the aquaporin-4 channel. *The Journal of Biological Chemistry*, 291:6858–6871, 2016
204. B. L. Smith and P. Agre. Erythrocyte Mr 28,000 transmembrane protein exists as a multisubunit oligomer similar to channel proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 266:6407–6415, 1991
205. N. Roudier, P. Bailly, P. Gane, N. Lucien, R. Gobin, J.-P. Cartron and P. Ripoché. Erythroid expression and oligomeric state of the AQP3 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 277:7664–7669, 2002

206. P. Bron, V. Lagree, A. Froger, J. P. Rolland, J. F. Hubert, C. Delamarche, S. Deschamps, I. Pellerin, D. Thomas and W. Haase. Oligomerization state of MIP proteins expressed in *Xenopus* oocytes as revealed by freeze-fracture electron-microscopy analysis. *Journal of Structural Biology*, 128:287–296, 1999
207. H. Schägger and G. von Jagow. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry*, 199:223–231, 1991
208. G. Khelashvili, P. B. C. Albornoz, N. Johner, S. Mondal, M. Caffrey and H. Weinstein. Why GPCRs behave differently in cubic and lamellar lipidic mesophases. *Journal of the American Chemical Society*, 134:15858–15868, 2012
209. S. Miller, A. M. Lesk, J. Janin and C. Chothia. The accessible surface area and stability of oligomeric proteins. *Nature*, 328:834–836, 1987
210. J. Janin, S. Miller and C. Chothia. Surface, subunit interfaces and interior of oligomeric proteins. *Journal of Molecular Biology*, 204:155–164, 1988
211. L. Politi, E. Chiancone, L. Giangiacomo, L. Cervoni, d. A. Scotto, S. Scorsino and R. Scandurra. pH-, temperature- and ion-dependent oligomerization of *Sulfolobus solfataricus* recombinant amidase: a study with site-specific mutants. *Archaea*, 2:221–231, 2009
212. S. Yoeun, J.-I. Kim and O. Han. Cellular localization and detergent dependent oligomerization of rice allene oxide synthase-1. *Journal of Plant Research*, 128:201–209, 2015
213. V. Lagree, A. Froger, S. Deschamps, I. Pellerin, C. Delamarche, G. Bonnac, J. Gouranton, D. Thomas and J. F. Hubert. Oligomerization state of water channels and glycerol facilitators. Involvement of loop E. *The Journal of Biological Chemistry*, 273:33949–33953, 1998
214. K. Hedfalk, N. Pettersson, F. Öberg, S. Hohmann and E. Gordon. Production, characterization and crystallization of the *Plasmodium falciparum* aquaporin. *Protein Expression and Purification*, 59:69–78, 2008
215. Y. Xun, P. Tremouilhac, C. Carraher, C. Gelhaus, K. Ozawa, G. Otting, N. E. Dixon, M. Leippe, J. Grotzinger, A. J. Dingley and A. V. Kralicek. Cell-free synthesis and combinatorial selective ¹⁵N-labeling of the cytotoxic protein amoebapore A from *Entamoeba histolytica*. *Protein Expression and Purification*, 68:22–27, 2009
216. P. Banerjee, J. B. Joo, J. T. Buse and G. Dawson. Differential solubilization of lipids along with membrane proteins by different classes of detergents. *Chemistry and Physics of Lipids*, 77:65–78, 1995
217. S. Lund, S. Orłowski, B. de Foresta, P. Champeil, M. Le Maire and J. V. Moller. Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry*, 264:4907–4915, 1989
218. A. M. Seddon, P. Curnow and P. J. Booth. Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Lipid-Protein Interactions*, 1666:105–117, 2004

219. J. V. Moller and M. Le Maire. Detergent binding as a measure of hydrophobic surface area of integral membrane proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 268:18659–18672, 1993
220. R. Kalmbach, I. Chizhov, M. C. Schumacher, T. Friedrich, E. Bamberg and M. Engelhard. Functional cell-free synthesis of a seven helix membrane protein: *in situ* insertion of bacteriorhodopsin into liposomes. *Journal of Molecular Biology*, 371:639–648, 2007
221. C. Roos, M. Zocher, D. Muller, D. Munch, T. Schneider, H. G. Sahl, F. Scholz, J. Wachtveitl, Y. Ma, D. Proverbio, E. Henrich, V. Dotsch and F. Bernhard. Characterization of co-translationally formed nanodisc complexes with small multidrug transporters, proteorhodopsin and with the *E. coli* MraY translocase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1818:3098–3106, 2012
222. H. de Cock, M. Pasveer, J. Tommassen and E. Bouveret. Identification of phospholipids as new components that assist in the *in vitro* trimerization of a bacterial pore protein. *European Journal of Biochemistry*, 268:865–875, 2001
223. F. J. Sharom. The P-glycoprotein multidrug transporter: interactions with membrane lipids, and their modulation of activity. *Biochemical Society Transactions*, 25:1088–1096, 1997
224. K. Shimono, M. Goto, T. Kikukawa, S. Miyauchi, M. Shirouzu, N. Kamo and S. Yokoyama. Production of functional bacteriorhodopsin by an *Escherichia coli* cell-free protein synthesis system supplemented with steroid detergent and lipid. *Protein Science*, 18:2160–2171, 2009
225. V. Goder, T. Junne and M. Spiess. Sec61p contributes to signal sequence orientation according to the positive-inside rule. *Molecular Biology of the Cell*, 15:1470–1478, 2004
226. Y. Chen, J. Song, S. F. Sui and D. N. Wang. DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorA overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 32:221–231, 2003
227. S. J. Allen, A. R. Curran, R. H. Templer, W. Meijberg and P. J. Booth. Controlling the folding efficiency of an integral membrane protein. *Journal of Molecular Biology*, 342:1293–1304, 2004
228. S. Newstead, S. Ferrandon and S. Iwata. Rationalizing α -helical membrane protein crystallization. *Protein Science*, 17:466–472, 2008

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die Abhandlung, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, nach Inhalt und Form die eigene Arbeit ist. Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ein Teil dieser Arbeit wurde unter dem folgenden Titel publiziert:

- B. Wu, J. Rambow, S. Bock, J. Holm-Bertelsen, M. Wiechert, A. Blancke Soares, T. Spielmann and E. Beitz. Identity of a Plasmodium lactate/H⁽⁺⁾ symporter structurally unrelated to human transporters. *Nature Communications*, 6:6284, 2015

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden.

Julia Holm-Bertelsen

Kiel, Juni 2016

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Eric Beitz. Ihm möchte ich für das Überlassen dieses interessanten und vielfältigen Themas danken, sowie für die Anregungen, Ideen, Diskussionen und die gemeinsame Projektentwicklung.

Dem Arbeitskreis um Urban Johanson danke ich für die hilfsbereite Einarbeitung in die Fermentierung von *Pichia pastoris*, Florian Kemper für das Ansetzen weiterer Kristallisationsscreens und die gemeinsame Proteinreinigung und Sebastian Krossa für die Hilfe bei sämtlichen Problemen mit der Äkta. Björn danke ich unter anderem für die tatkräftige Unterstützung mit der French Press.

Bei Felix, Tine, Holger, Chris und Danilo möchte ich mich für die unterhaltsame Praktikumsbetreuung und die gemeinsamen Stunden vor den HPLCs bedanken.

Allen meinen Kollegen möchte ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit, den offenen Blick auf Ergebnisse und die konstruktiven Vorschläge für weitere Versuche danken. Sinja Bock danke ich besonders für die sorgfältige Einarbeitung in die zellfreie Proteinherstellung und Julia von Bülow für interessante Diskussionen und die Beantwortung jeglicher Fragen zur praktischen Labortätigkeit.

Monja, Julia, Marie und Tineke danke ich für die gemeinsame Zeit im Gruppenbüro, die stets unterhaltsam, aber dennoch inspirierend und effektiv war. Mit ihrer aufbauenden und fröhlichen Art konnten sie auch nach kleinen Rückschlägen im Labor stets neu motivieren. Diese Vier sowie André, Lukas, Philipp, Holger, Folknand, Sinja, Ellen, Karin, Heyka, Tamara, Franzi und Malte werde ich noch lange mit amüsanten und abwechslungsreichen Gesprächen während der Mittagspausen in Erinnerung behalten.

Allen Korrekturlesern möchte ich herzlich für die kritische Betrachtung dieser Seiten danken.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Ehemann Stephan für jegliche Unterstützung während der gesamten Promotion bedanken. Ihr habt mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Danke, dass Ihr immer für mich da seid.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Julia Holm-Bertelsen
Geburtsdatum 03.02.1989
Geburtsort Itzehoe
Nationalität Deutsch

Schule und Studium

06/2007 Abitur am Gymnasium Bad Nenndorf
10/2007–11/2011 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
12/2011–05/2012 Pharmazeut im Praktikum bei der Chiesi GmbH in Hamburg
06/2012–11/2012 Pharmazeut im Praktikum bei der Hirsch-Apotheke in Kiel-Friedrichsort
01/2013 Approbation als Apothekerin

Promotion

seit 03/2013 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der CAU Kiel und Promotion zum Thema:
„Expressionssysteme zur Gewinnung von rekombinantem PfFNT zur Reinigung, Funktionsuntersuchung und Kristallisation“ unter der Leitung von Prof. Dr. Eric Beitz; Betreuung des 5. Fachsemesters Pharmazie (Arzneibuchanalytik)

Vorträge

Vortrag „High-level cell-free expression of functional PfFNT as a basis for crystallization trials and physiological transport direction measurements“ auf der DPhG Doktorandentagung in Aachen, 2016

Publikationen

B. Wu, J. Rambow, S. Bock, J. Holm-Bertelsen, M. Wiechert, A. B. Soares, T. Spielmann and E. Beitz. Identity of a *Plasmodium* lactate/H⁽⁺⁾ symporter structurally unrelated to human transporters. *Nature Communications*, 6:6284, 2015