

**Biochemische Charakterisierung und Hemmung von  
drei Formiat-Nitrit-Transportern (FNT) aus  
*Toxoplasma gondii***

**Dissertation**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität  
zu Kiel

vorgelegt von  
**Holger Erler**  
Kiel 2018



Erster Gutachter:

Prof. Dr. Eric Beitz

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Axel Scheidig

Tag der mündlichen Prüfung:

01.11.2018



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<i>Toxoplasma gondii</i> .....	1
1.1.1	Entdeckung des Parasiten .....	1
1.1.2	Lebenszyklus von <i>Toxoplasma gondii</i> .....	2
1.1.3	Toxoplasmose – Epidemiologie und Pathogenese.....	5
1.1.4	Toxoplasmose – Diagnose und Therapie.....	7
1.1.5	Aktuelle Wirkstoffentwicklung.....	9
1.1.6	<i>Toxoplasma gondii</i> als Modell-Parasit.....	10
1.1.7	Energiestoffwechsel und Aufnahme von Nährstoffen .....	12
1.2	<b>Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) .....</b>	<b>14</b>
1.2.1	Struktureller Aufbau.....	17
1.2.2	Transportmechanismus.....	21
1.2.3	Selektivitätsfilter.....	25
1.3	<b>Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>28</b>
<b>2</b>	<b>Material und Geräte.....</b>	<b>29</b>
2.1	<b>Chemikalien, Enzyme, Material, Kits.....</b>	<b>29</b>
2.2	<b>Geräte.....</b>	<b>31</b>
2.3	<b>Kodierende DNA-Sequenzen .....</b>	<b>34</b>
2.4	<b>Plasmide .....</b>	<b>35</b>
2.5	<b>Primer (Oligonukleotide).....</b>	<b>37</b>
2.6	<b><i>E. coli</i>, <i>S. cerevisiae</i>, <i>T. gondii</i>-Stämme und humane Zellen .....</b>	<b>39</b>
2.7	<b>Antikörper .....</b>	<b>39</b>
2.8	<b>Puffer, Kulturmedien, Lösungen .....</b>	<b>40</b>

## Inhaltsverzeichnis

2.8.1	Molekularbiologie .....	40
2.8.2	Proteinbiochemie .....	42
2.8.3	Aufnahme von <sup>14</sup> C-markierten Substraten in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	43
2.8.4	Phänotypisches Screening.....	43
2.8.5	Parasitenkultur .....	44
<b>3</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>45</b>
3.1.1	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> .....	45
3.1.2	Transformation von <i>Escherichia coli</i> .....	46
3.1.3	Schnelltransformation von <i>Escherichia coli</i> .....	46
3.1.4	Dauerkulturen von <i>Escherichia coli</i> .....	46
3.1.5	Isolation von Plasmid-DNA .....	47
3.1.6	Konzentrationsbestimmung von DNA mittels Absorptionsspektroskopie.....	47
3.1.7	Konzentrationsbestimmung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese .....	48
3.1.8	Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	48
3.1.9	Restriktionsverdau .....	50
3.1.10	Dephosphorylierung.....	50
3.1.11	Glätten von überhängenden Basen.....	50
3.1.12	Phosphorylierung .....	50
3.1.13	Agarose-Gelelektrophorese .....	51
3.1.14	Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	52
3.1.15	Reinigung von DNA mittels chaotroper Salze.....	52
3.1.16	Ligation .....	53
3.1.17	Sequenzierung von DNA.....	54
3.1.18	<i>In-vitro</i> -Mutagenese.....	56
3.1.19	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	57
3.1.20	Dauerkulturen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	58

## Inhaltsverzeichnis

<b>3.2</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden</b> .....	<b>58</b>
3.2.1	Isolation der mikrosomalen Fraktion aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	58
3.2.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen .....	59
3.2.3	Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	60
3.2.4	Western-Blot .....	61
<b>3.3</b>	<b>Fluoreszenzmikroskopie von GFP-markierten Membranproteinen</b> .....	<b>62</b>
<b>3.4</b>	<b>Aufnahme von <sup>14</sup>C-markierten Substraten in <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b> .....	<b>63</b>
3.4.1	Prinzip der Messung .....	63
3.4.2	Zeitabhängige Substrataufnahme .....	64
3.4.3	pH-abhängige Substrataufnahme .....	65
3.4.4	Konzentrationsabhängige Inhibition und IC <sub>50</sub> -Bestimmung von Inhibitoren .....	65
3.4.5	Chemische Modifikation von Cysteinen im Protein .....	66
<b>3.5</b>	<b>Phänotypisches Screening</b> .....	<b>67</b>
3.5.1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Wachstumsassay in L-Laktat-Selektionsmedium .....	67
3.5.2	Screening von Inhibitoren .....	68
<b>3.6</b>	<b><i>Toxoplasma gondii</i>-Parasitenkultur</b> .....	<b>68</b>
3.6.1	Kulturbedingungen .....	68
3.6.2	Transformation von <i>Toxoplasma gondii</i> -Tachyzoiten .....	68
3.6.3	Lokalisation der TgFNTs in <i>T. gondii</i> Tachyzoiten über Immunofluoreszenz .....	69
3.6.4	<i>Toxoplasma gondii</i> -Plaque-Assay .....	69
3.6.5	Wachstumsassay mit YFP exprimierenden <i>Toxoplasma gondii</i> -Parasiten.....	69
<b>3.7</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>70</b>
<b>3.8</b>	<b>Bioinformatik</b> .....	<b>71</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>72</b>
<b>4.1</b>	<b>Expression und funktionelle Charakterisierung der Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Toxoplasma gondii</i> im Hefesystem</b> .....	<b>72</b>
4.1.1	Identifikation von drei Formiat-Nitrit Transportern im Genom von <i>T. gondii</i> .....	72

## Inhaltsverzeichnis

4.1.2	Expression und funktionelle Charakterisierung der Wildtypkonstrukte.....	74
4.1.3	Expression und funktionelle Charakterisierung kodon-optimierter Konstrukte.....	79
4.1.4	Einfluss der Termini auf Expression und Funktionalität von <i>TgFNT1</i> und <i>TgFNT2</i> .....	85
4.1.5	Einfluss des Substratgradienten auf die linearen Kurvenverläufe von <i>TgFNT1</i> und <i>TgFNT2</i> .....	91
4.1.6	Nachweis von Membranproteinen in der Hefemembran .....	96
4.1.7	Verkürzung der Termini auf die gleiche Länge führte zur gleichen Expression und Funktionalität von <i>TgFNT1-3</i> .....	98
<b>4.2</b>	<b>Evaluation des Transportmechanismus und Identifikation des Selektivitätsfilters ..</b> .....	<b>102</b>
4.2.1	Die Substrataufnahme der drei <i>TgFNTs</i> ist abhängig vom äußeren pH-Wert .....	102
4.2.2	Identifikation des <i>TgFNT</i> Selektivitätsfilters mittels chemischer Modifikation .....	102
<b>4.3</b>	<b>Hemmung der Substrat-Aufnahme von <i>TgFNT1-3</i> durch Inhibitoren .....</b>	<b>107</b>
4.3.1	Screening von <i>TgFNT</i> -Inhibitoren mittels phänotypischen Wachstumsassay .....	107
4.3.2	Hemmung der Substrataufnahme durch MMV007839 und ausgewählte Analoga im direkten <sup>14</sup> C-Aufnahmeassay .....	112
4.3.3	Bestätigung der intrazellulären Bindestelle der Inhibitoren .....	115
<b>4.4</b>	<b>Lokalisation und Hemmung der <i>TgFNTs</i> in <i>Toxoplasma gondii</i> Parasiten .....</b>	<b>119</b>
4.4.1	Lokalisation der <i>TgFNTs</i> in der Plasmamembran von <i>T. gondii</i> Parasiten .....	119
4.4.2	Hemmung von <i>Toxoplasma gondii</i> -Tachyzoiten mit <i>TgFNT</i> -Inhibitoren .....	119
<b>4.5</b>	<b>Biochemische Charakterisierung der Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Babesia bovis</i> und <i>Theileria equi</i> im Hefesystem.....</b>	<b>123</b>
4.5.1	Expression und funktionelle Charakterisierung von <i>BbFNT</i> und <i>TeFNT</i> .....	123
4.5.2	Einfluss der natürlichen Resistenz von <i>BbFNT</i> auf den Inhibitor MMV007839 .....	127
<b>5</b>	<b>Diskussion und Ausblick .....</b>	<b>131</b>
<b>5.1</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>131</b>
5.1.1	Expression von <i>TgFNT1-3</i> in <i>Toxoplasma gondii</i> -Parasiten.....	131
5.1.2	<i>FNTs</i> aus <i>Toxoplasma gondii</i> leiten im Energiestoffwechsel relevante Substrate.....	132



## Inhaltsverzeichnis

5.1.3	Ist der Transportmechanismus auf beide Transportrichtungen anwendbar? .....	134
5.1.4	Wird der <i>TgFNT</i> -Substrattransport über die langen Termini reguliert? .....	136
5.1.5	Identifikation der <i>TgFNT</i> -Selektivitätsfilter .....	141
5.1.6	Entwicklung und Optimierung von <i>TgFNT</i> -Hemmstoffen .....	142
5.1.7	Übertragung der Ergebnisse auf andere Vertreter der Familie Apicomplexa .....	145
<b>5.2</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>147</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>149</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>150</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>151</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

a.u.	<i>arbitrary unit</i>
AIDS	<i>acquired immune deficiency syndrome</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AQP	Aquaporin
BSA	Bovines Serumalbumin
Cas9	CRISPR-associated 9-Endonuklease
CIC	<i>chloride channel</i>
CoA	Koenzym A
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> zur Kultur von <i>T. gondii</i> -Parasiten
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FNT	Formiat-Nitrit-Transporter
FocA	<i>formate channel</i>
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GT	Glukose-Transporter
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HFF	<i>human foreskin fibroblasts</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HSC	<i>hydrosulfide channel</i>
HT	Hexose-Transporter
HXGPRT	Hypoxanthin-Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
IgG	Immunglobulin G
LB	<i>Luria broth (E. coli-Medium</i> nach Luria und Burrous)
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MIP	<i>major intrinsic proteins</i>
MMTS	Methyl-Methanthiosulfonat
MMV	<i>medicines for malaria venture</i>
MTSES	(2-Sulfonatoethyl)methanthiosulfonat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
pCMBS	4-Chloromercuribenzolsulfonsäure

## Abkürzungsverzeichnis

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SD-Medium	<i>synthetic defined</i> -Minimalmedium zur Kultur von <i>S. cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	TRIS- <i>buffered saline</i>
TBST	TBS-Puffer mit Tween 20 <sup>®</sup>
TE	TRIS-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembranspanne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i> – reichhaltiges Nährmedium zur Kultur von <i>S. cerevisiae</i>

# 1 Einleitung

Der weltweit vorkommende pathogene Parasit *Toxoplasma gondii* aus der Familie der Apicomplexa kann nahezu alle Wirbeltiere infizieren und ist Auslöser der Erkrankung Toxoplasmose, die ein Gesundheitsrisiko insbesondere für Schwangere und immunsupprimierte Patienten darstellt (1). Da die aktuelle Therapie mit vielen Nebenwirkungen behaftet ist, werden neue Wirkstoffe gegen diesen Erreger dringend benötigt (2). Membranproteine wie Kanäle und Transporter besitzen durch Import und Export von Nährstoffen und Metaboliten eine essentielle Bedeutung im Stoffwechsel von Zellen und sind deshalb attraktive Ziele zur Entwicklung von neuen Wirkstoffen gegen Parasiten.

## 1.1 *Toxoplasma gondii*

### 1.1.1 Entdeckung des Parasiten

Der Erreger *Toxoplasma gondii* wurde erstmals 1908 von den Forschern Charles Nicolle und Louis Manceaux beschrieben (3). Isoliert wurde der Parasit am Pasteur-Institut in Tunis aus dem Gewebe eines Gundis (*Ctenodactylus gundi*), die dort zu dieser Zeit zur Erforschung der Leishmaniose eingesetzt wurden. Im gleichen Jahr wurde der Parasit von Alfonso Splendore in São Paulo aus einem domestizierten Hasen (*Oryctolagus cuniculus*) isoliert (4). Beide Funde wurden zunächst irrtümlicherweise für einen *Leishmania*-Parasiten gehalten. Nicolle und Manceaux erkannten schließlich, dass es sich um einen neu entdeckten Organismus handelte und benannten ihn nach seiner sichelförmigen Morphologie *Toxoplasma* (altgriechisch: *toxos* = Bogen; *plasma* = Gebilde) (5). Der Name *gondii* geht auf das hamsterähnliche Nagetier *Ctenodactylus gundi* zurück, der Wirtsorganismus, aus dem der Parasit zuerst isoliert wurde. In den nächsten dreißig Jahren wurde *T. gondii* in vielen anderen Organismen gefunden und zunächst jeweils nach dem Wirt benannt, so auch der von Splendore isolierte Parasit, der *Toxoplasma cuniculus* genannt wurde (6). Sabin und Olitsky isolierten im Jahr 1937 erstmals einen lebenden Stamm aus einem Meerschweinchen in Nordamerika und konnten durch Versuche an Mäusen, Affen und Hühnern die Pathogenität und intrazellulären Parasitismus von *Toxoplasma* feststellen (7). Außerdem gelang es ihnen Antikörper zu isolieren, mit denen eine Infektion mit dem Parasiten in einigen Tieren

## Einleitung

nachzuweisen war (8). Nachdem es mehrere nicht gesicherte Hinweise auf eine mögliche *Toxoplasma*-Infektion im Menschen gab, die zum Teil auch anderen Parasiten zugeschrieben wurden (9-15), konnte 1937 erstmals durch Wolf und Cowen eine Enzephalomyelitis bei einem Kind mit einer *Toxoplasma*-Infektion in Verbindung gebracht werden (16). Anschließend wurden in den darauf folgenden Jahren die klassischen Symptome einer Toxoplasmose beim Menschen beschrieben und *Toxoplasma gondii* wurde von mehreren Arbeitsgruppen als Auslöser identifiziert (17-26). Die in Tieren nachgewiesenen *Toxoplasma*-Erreger stellten sich indes als identisch mit den in Menschen gefundenen Parasiten dar, sodass alle als *T. gondii* zusammengefasst werden konnten (27).

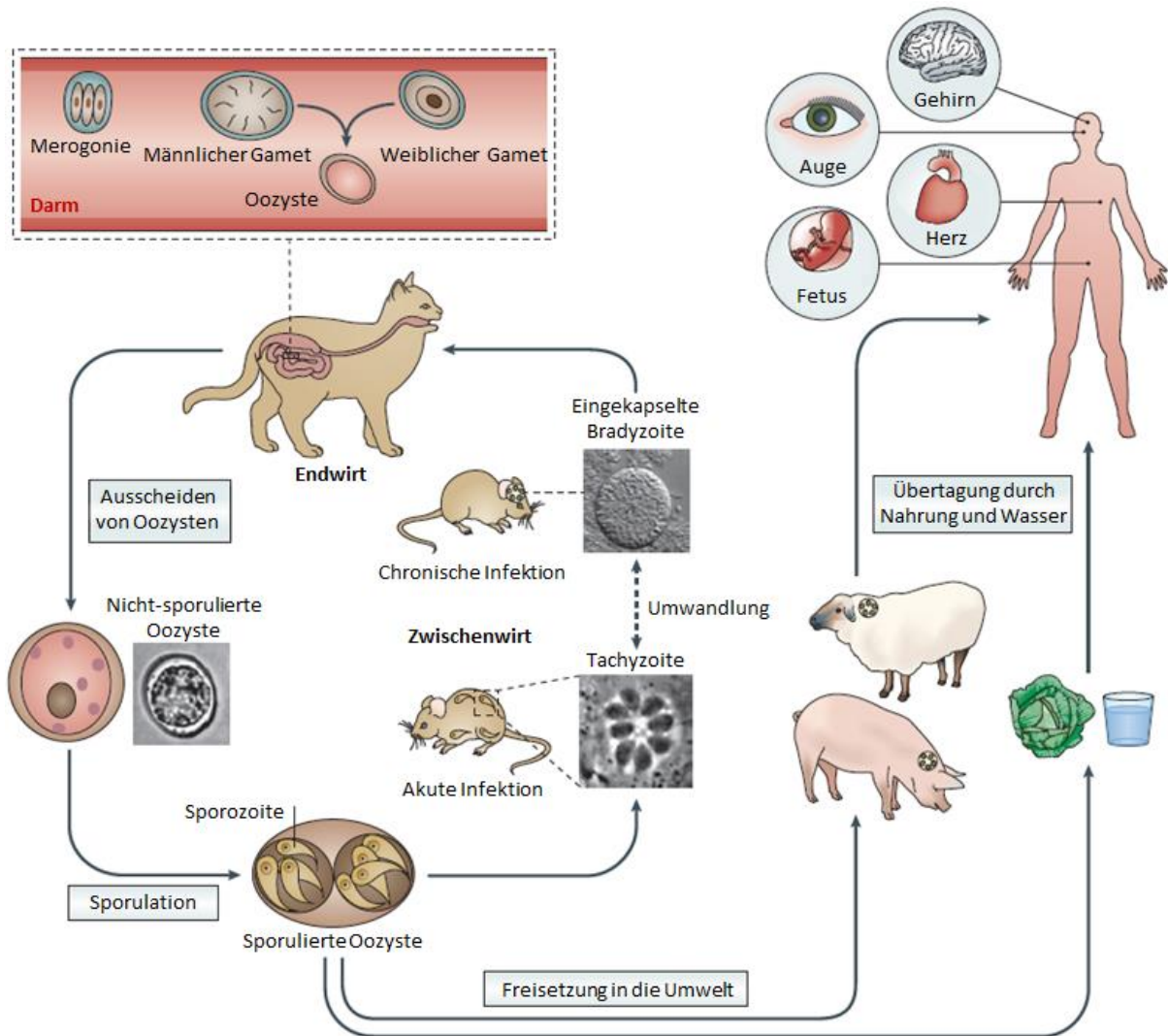
### **1.1.2 Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii***

Über den Lebenszyklus des Parasiten und, wie sich der Mensch genau infiziert, war zunächst allerdings nicht viel bekannt. Den Grundstein für weitere Untersuchungen legten Sabin und Feldman, die einen sensitiven serologischen Farbttest entwickelten, mit dem die Diagnose einer *T. gondii*-Infektion im Menschen möglich wurde (28). Dies führte zu ausgedehnten epidemiologischen Untersuchungen, die eine hohe Prävalenz des Erregers im Menschen in vielen verschiedenen Ländern ergab. Daraufhin kam es zur vermehrten Untersuchung des Übertragungsweges, der erst mit der Entdeckung des Lebenszyklus von *T. gondii* im Jahre 1970 vollständig geklärt werden konnte. Vermutet wurde zunächst ausschließlich eine kongenitale Infektion wie von Wolf und Cowen beschrieben (16). Diese kommt aber zu selten vor um alleine für eine solch weite Verbreitung des Parasiten verantwortlich sein zu können (29). Daraufhin kam 1954 die Vermutung auf, dass sich die Infektion auch durch den Verzehr von nicht vollständig durchgegartem Fleisch ausbreiten kann (30). Untersuchungen zur Morphologie des Parasiten brachten hierbei neue Hinweise und ergaben zunächst zwei verschiedene Stadien. Es wurde eine aktive, proliferierende Form des Parasiten beschrieben, die Tochterzellen bildet und mit einer akuten Infektion assoziiert wurde (31-33), sowie eine im Gewebe eingekapselte Form, die sich nur langsam teilt (14, 34-36). Jacobs *et al.* fanden heraus, dass die eingekapselte Form besser vor der Wirkung von proteolytischen Enzymen geschützt war als die proliferierende Form, sodass die aus der Kapsel freigesetzten Parasiten lange genug überlebten um eine Infektion auszulösen (37, 38). Dies war ein Hinweis zur Unterstützung der Theorie der Verbreitung durch nicht durchgegartes Fleisch, da die eingekapselten Parasiten in Geweben überdauern können. Experimentell belegt wurde die

## Einleitung

Theorie 1965 von Desmonts *et al.* durch Experimente mit nicht durchgegartem Rind-, Pferde- und Lammfleisch an Kindern, wobei die Prävalenz von *T. gondii* in Lammfleisch am höchsten war. Epidemiologisch gab es außerdem Hinweise auf eine größere Anzahl an *T. gondii*-Infektionen im Menschen in Regionen, in denen regelmäßig rohes Fleisch verzehrt wurde (39). Die Verbreitung über den Verzehr von Fleisch erklärte allerdings nicht die hohe Prävalenz von *T. gondii* im Gewebe von pflanzenfressenden Schafen. Hutchison verfolgte daher die Theorie der Übertragung durch Faeces und begann Untersuchungen an Katzen anzustellen (40). Hierbei fiel ihm eine neue, sehr stabile Form des Parasiten auf, die bis zu zwölf Monate in Wasser gelagert werden konnte und danach immer noch infektiös in Mäusen war. Diese Oozysten genannte Form wurde weiter untersucht, konnte regelmäßig in dem Faeces von Katzen nachgewiesen werden und führte nachweislich zur Infektion (41-44). Ein weiterer Übertragungsweg ist also eine Freisetzung der stabilen Oozysten in die Umwelt und beruht auf einer fäkal-oralen Schmierinfektion mit kontaminierten Pflanzen (Verzehr von nicht abgewaschenem Gemüse) oder kontaminiertem Erdreich. Basierend auf diesen Daten konnte 1970 der komplette Lebenszyklus aufgeklärt werden (45-49) (Abb. 1.1). *Toxoplasma gondii* wurde als Parasit der Untergruppe Kokzidien klassifiziert und besitzt eine langsam wachsende, im Gewebe eingekapselte Form, die Bradyzoiten (*bradys* = langsam), und eine schnell proliferierende, sich asexuell vermehrende Form, die Tachyzoiten (*tachy* = schnell). Als Zwischenwirte können eine große Vielzahl an verschiedenen warmblütigen Wirbeltieren dienen, wobei vor allem Nutztiere wie Schafe herauszustellen sind. Da die Toxoplasmose häufig Fehlgeburten bei Schafen verursacht, kam es durch den Erreger in der Vergangenheit zu großen ökonomischen Verlusten in der Landwirtschaft (50). Im Gewebe von Nutztieren vorhandene Bradyzoiten können außerdem auch zur Infektion des Menschen führen, wenn nicht vollständig durchgegartes Fleisch verzehrt wird. Die sexuelle Vermehrung des Parasiten findet ausschließlich im Dünndarm von Katzen und verwandten Arten statt. Diese sind somit Endwirte des Parasiten. Katzen können durch Aufnahme eines einzelnen Bradyzoiten Millionen von Oozysten in die Umwelt ausscheiden, die dort 12-18 Monate überleben und infektiöse Sporozoiten bilden. Somit sind Vertreter der Familie Felidae die Hauptursache von Infektionen mit *Toxoplasma* in Mensch und Tier (51, 52). Aufgrund seiner Fähigkeit, sich in einer Vielzahl von Zwischenwirten und in vielen Regionen zu vermehren, zählt *Toxoplasma gondii* zu den erfolgreichsten Parasiten auf der Welt. Dies wird nochmal verdeutlicht durch den kürzlichen Nachweis des Erregers in Eisbären und Polarfüchsen der

## Einleitung



**Abb. 1.1** Der Lebenszyklus von *Toxoplasma gondii*. Katzen sind der Endwirt des Parasiten, in deren Enterozyten die sexuelle Replikation stattfindet. Durch ungeschlechtliche Fortpflanzung (Merogonie) bilden sich zunächst Merozoiten. Danach werden männliche und weibliche Gameten gebildet, deren Fusion diploide Oozysten hervorbringt. Diese werden von der Katze ausgeschieden und bilden in der Umwelt jeweils durch Meiose acht haploide Sporozysten. Werden diese von einem Zwischenwirt aufgenommen bilden sich proliferierende Tachyzoiten und führen zur akuten Infektion. Umwandlung in langsam wachsende Bradyzoiten, die sich in Gewebe einkapseln, führt zur chronischen Infektion. Durch Wiederaufnahme von Parasiten über das Gewebe des Zwischenwirtes im Rahmen der Nahrungskette startet der Kreislauf wieder mit der sexuellen Replikation. Durch Freisetzung von Oozysten in die Umwelt kann der Mensch über kontaminiertes Wasser infiziert werden sowie durch Bradyzoiten in nicht durchgegartem Fleisch von Nutztieren. Die Infektion kann zu typischen Symptomen der Toxoplasmose führen. Entnommen aus (53).



Arktis ohne jegliches Vorkommen von Katzen (54) sowie in Meeressäugern wie dem Seeotter (55).

### 1.1.3 Toxoplasmose – Epidemiologie und Pathogenese

Die Toxoplasmose ist eine weltweit auftretende Erkrankung mit der schätzungsweise 30-50 % der Weltbevölkerung infiziert sind (1). Die akute Infektion verläuft im gesunden Menschen meist symptomlos oder mit milden Grippesymptomen und resultiert anschließend in einer chronischen Infektion durch Bradyzoiten im Gewebe (56). Damit ist die Toxoplasmose die Infektionskrankheit mit der häufigsten Prävalenz, noch vor der latenten Tuberkulose, von der ein Drittel der Weltbevölkerung betroffen ist (57). Es gibt bestimmte Risikogruppen wie Menschen mit geschwächtem oder noch nicht ausgebildetem Immunsystem, bei denen eine Infektion mit *T. gondii* einen gefährlichen bis tödlichen Verlauf nehmen kann. Unterschieden werden hierbei eine kongenitale Toxoplasmose (19) und eine erworbene beziehungsweise akute Toxoplasmose (20, 23).

Nur 10-20 % der gesunden, immunkompetenten Personen zeigen bei einer akuten Infektion mit *T. gondii* überhaupt klinische Anzeichen und dann in der Regel nur Schwellung der Lymphknoten oder grippeähnliche Symptome, die in wenigen Monaten verschwinden. In seltenen Fällen kann es aber auch in gesunden Personen zu schwerwiegenden Symptomen einer akuten Toxoplasmose wie Entzündungen des Herzmuskels, Lungenentzündung, Hepatitis, Myositis oder Enzephalitis kommen (58-61). Des Weiteren kann eine Infektion mit *T. gondii* im gesunden Menschen bei Erreichen des Auges zu einer Regenbogenhautentzündung (Uveitis) beziehungsweise einer akuten Aderhautentzündung (Chorioretinitis) führen und ist eine der Hauptursachen für diese Erkrankung (62). Die Entzündung beruht auf einer Einkapselung der Parasiten als Bradyzoiten in der Retina, wobei die genaue Pathogenese noch unklar ist (63). Früher wurde diese okuläre Erkrankung ausschließlich der kongenitalen Toxoplasmose zugeordnet. Es gibt aber immer mehr Fälle, die auf eine akute Infektion mit anschließender Bildung von latenten Bradyzoiten als weitere Ursache hinweisen (64, 65). Eine chronische Infektion mit Bildung von eingekapselten Parasiten im Hirngewebe wird außerdem als Risikofaktor für Schizophrenie und Verhaltensänderungen wie Angststörungen beim Menschen diskutiert (66-68). Im Gegensatz zu gesunden Personen geht die erworbene, akute Infektion mit *T. gondii* bei bestimmten Risikogruppen ohne therapeutische Intervention meist tödlich aus. Hier sind allgemein

## Einleitung

Personen mit einem geschwächten Immunsystem zu nennen, wie zum Beispiel Patienten mit Tumorerkrankungen (Hodgkin-Lymphom), AIDS-Patienten und Patienten, die Immunsuppressiva oder Zytostatika einnehmen. Hier äußert sich die Toxoplasmose mit den schwerwiegenden Symptomen Enzephalitis, Lungenentzündung oder Myokarditis (69). Insbesondere im Rahmen von HIV-Infektionen ist das Auftreten einer Enzephalitis sehr häufig (70), wobei aber auch viele andere Organe betroffen sein können. Dies kann bei AIDS-Patienten zu einer Reihe an anderen schweren Symptomen wie Ateminsuffizienz oder zerebrale Störungen führen (71-73). Bei den genannten Risikogruppen werden die Symptome vor allem durch Reaktivierung der eingekapselten Bradyzoiten hervorgerufen. Durch das geschwächte Immunsystem wird aus einer latenten Infektion eine akute Infektion, die nun vom Körper nicht mehr kontrolliert werden kann. Empfänger einer Organspende können so ebenfalls eine akute Infektion erwerben, indem im transplantierten Organ des Spenders latente Bradyzoiten enthalten sind, die sich bei supprimiertem Immunsystem in Tachyzoiten umwandeln (74).

Eine weitere Form der *T. gondii* Infektion ist die kongenitale Toxoplasmose. Die Ursache ist hier die Übertragung einer erworbenen akuten Infektion über die Plazenta auf den Fetus in der Schwangerschaft durch die Mutter (75). Da die Infektion bei schwangeren Frauen in den meisten Fällen symptomlos verläuft, wird empfohlen zum Schutz des Embryos eine serologische Untersuchung durchzuführen, um eine mögliche Infektion der Mutter mit *T. gondii* auszuschließen und durch entsprechende therapeutische Maßnahmen eine Übertragung auf das ungeborene Kind zu verhindern (76). Entscheidend ist hierbei meist nur die Erstinfektion der Mutter mit dem Parasiten, da bei einer zuvor schon mal vorhandenen Infektion Antikörper gebildet wurden und so eine schnelle Immunantwort erfolgt und eine Übertragung verhindert werden kann. Allerdings sind hier auch Ausnahmen beschrieben. Insbesondere bei Schwangeren mit zusätzlich geschwächtem Immunsystem oder einer AIDS-Erkrankung gibt es auch bei einer Zweitinfektion ein Risiko für das ungeborene Kind (77, 78). Wenn die akute Zweitinfektion kurz vor der Geburt auftritt, besteht ebenfalls ein erhöhtes Risiko (79). Je nachdem in welchem Trimester der Schwangerschaft eine Übertragung des Erregers auf das ungeborene Kind eintritt, unterscheiden sich die Folgen. Bei Übertragung im ersten und zweiten Trimester kommt es mit höherer Wahrscheinlichkeit zu einer schweren, klinischen Manifestation der Erkrankung bis hin zur Fehlgeburt (80). Im dritten Trimester

zeigen die Neugeborenen oft gar keine oder nur leichte klinische Anzeichen einer Infektion, von denen allerdings ohne therapeutische Maßnahmen 85 % später Symptome wie Chorioretinitis oder Entwicklungsstörungen entwickeln (81, 82). Die typischen Anzeichen einer klinisch manifestierten, kongenitalen Toxoplasmose umfassen die bereits 1942 von Sabin zusammengefassten Symptome (24) Hydrozephalus, Mikrozephalie, intrazerebrale Kalzifikation und die okuläre Erkrankung Chorioretinitis. Allerdings treten diese nicht immer gleichzeitig auf und es können eine Vielzahl anderer Symptome wie Strabismus, Epilepsie, psychomotorische Störungen, Entwicklungsstörungen, Anämie, Durchfall, Lungenentzündung, Hypothermie und weitere unspezifische Symptome vorkommen (69).

Zusammenfassend kann der Parasit *T. gondii* viele verschiedene Gewebe des Menschen, unter anderem Herz, Gehirn, Plazenta und sogar die Netzhaut im Auge, infizieren und so eine Vielzahl an schwerwiegenden Symptomen insbesondere in immungeschwächten Patienten auslösen. Dem Immunsystem weicht er als eingekapselte, latente bradyzoite Form aus und kann aus dieser bei Immunschwäche wieder reaktiviert werden (83). Dies unterstreicht die Anpassungsfähigkeit des Parasiten an verschiedene äußere Einflüsse und erklärt die hohe Prävalenz im Menschen und anderen Zwischenwirten.

### **1.1.4 Toxoplasmose – Diagnose und Therapie**

Als erster serologischer Test auf eine Infektion mit *T. gondii* ist der schon erwähnte Farbttest von Sabin und Feldman aus dem Jahre 1948 zu nennen (28). Dies ist ein einfacher und sicherer Test, der Anti-*Toxoplasma*-IgG-Antikörper über ihre Fähigkeit kultivierte *Toxoplasma*-Tachyzoiten zu lysieren nachweist. Hierbei werden die Parasiten mit dem Serum des Patienten inkubiert und mit Methylenblau versetzt. Kommt es durch die Antikörper zur Lyse der Parasiten, können diese den Farbstoff nicht aufnehmen und bleiben farblos. Sind hingegen keine Antikörper vorhanden, werden die Parasiten blau angefärbt. Auch heute noch gilt dieser Nachweis als wichtiger Referenztest mit hoher Sensitivität und Spezifität (84). Eine weitere Methode ist der Nachweis von IgM-Antikörpern und ist insbesondere zur Diagnose einer kongenitalen Toxoplasmose nach der Geburt geeignet, da IgM-Antikörper nicht über die Nabelschnur übertragen werden und so ausschließlich vom Kind stammen (85). Die Detektion der IgG- und IgM-Antikörper geschieht heute routinemäßig mittels ELISA (86). Als Alternative stehen PCR-Methoden zur Verfügung (87).

## Einleitung

Zur Therapie der Toxoplasmose wurde recht früh die Wirksamkeit von Sulfonamiden gegen *T. gondii* in Mäusen festgestellt (88). Weiterhin erwies sich eine Kombination mit Pyrimethamin als sehr effektiv (89). Die Kombination von Sulfadiazin und Pyrimethamin ist bis heute die Standardtherapie bei Toxoplasmose (2). Beide Stoffe greifen in die Folsäuresynthese ein und hemmen dort synergistisch die Dihydrofolatreduktase und die Dihydropteroatsynthese vergleichbar mit der antibiotischen Therapie-Kombination aus Sulfamethoxazol und Trimethoprim. Erweitert wurden die Therapieoptionen durch das Makrolidantibiotikum Spiramycin, welches über eine Bindung an der 50S-Untereinheit der Ribosomen wirkt (90). Auch bei Allergie gegen Sulfonamide können Makrolide wie Spiramycin, Clarithromycin oder Azithromycin zur Therapie eingesetzt werden (91, 92). Als weiterer Wirkstoff zweiter Wahl steht das Lincosamid-Antibiotikum Clindamycin mit gleichem Wirkmechanismus zur Verfügung (93, 94). Auch Tetrazykline wie Doxycyclin und Minocyclin zeigen Wirksamkeit gegen *T. gondii* über eine vermutete Wirkung am Apikoplast und können alternativ eingesetzt werden (95-97). Der neueste klinisch eingesetzte Wirkstoff gegen Toxoplasmose ist das als Malaria-Mittel etablierte Atovaquon, dessen Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist (98-100). Postuliert wird die Hemmung des Cytochrom-bc1-Komplexes und somit ein Eingreifen in den Elektronen-Transport der Atmungskette. Der Wirkstoff bekämpft in Mäusen auch die eingekapselte Bradyzoite-Form (100). Atovaquon wird vor allem bei okularer Toxoplasmose oder zerebraler Toxoplasmose von AIDS-Patienten eingesetzt und zeigt dort eine gute Wirkung (101-103). Der gesicherte Nachweis der Wirkung gegen die bradyzoite Form von *T. gondii* im Menschen muss allerdings noch erbracht werden. Eine Übersicht der aktuell verwendeten Arzneistoffe gegen Toxoplasmose ist in Tabelle 1.1 aufgeführt. Insgesamt gibt es bisher nicht viele Wirkstoffe zur Behandlung der Toxoplasmose. Die meisten Verbindungen werden seit über 50 Jahren verwendet und sind mit vielen Nebenwirkungen behaftet und nicht in der Schwangerschaft einsetzbar (2). Lediglich Spiramycin ist nicht fruchtschädigend und wird als Mittel der ersten Wahl im ersten Trimester der Schwangerschaft eingesetzt (80). Insbesondere die Standardtherapie ist aufgrund schwerwiegender Nebenwirkungen als ungenügend herauszustellen, da Pyrimethamin zur Knochenmarkschädigung führen kann und viele Patienten allergische Reaktionen gegen Sulfadiazin zeigen (104). Ein weiteres Problem ist, dass bisher keine Therapie nachweislich gegen die latente bradyzoite Form wirkt, die zur Reaktivierung einer akuten Infektion von immungeschwächten Patienten führen kann und

## Einleitung

vermehrt als Risikofaktor für Erkrankungen des ZNS diskutiert wird (66, 68). Deshalb werden neue Wirkstoffe gegen *T. gondii* mit weniger Nebenwirkungen und höherer Effektivität insbesondere gegen die bradyzoite Form dringend benötigt, um eine sichere Therapie gegen diesen weltweit vorkommenden Parasiten zu gewährleisten.

**Tab. 1.1** Wirkstoffe zur Behandlung der Toxoplasmose

Wirkstoff	Wirkstoffziel
Pyrimethamin	Dihydrofolatreduktase
Sulfonamide (Sulfadiazin, Sulfamethoxazol)	Dihydropteroatsynthase
Makrolide (Spiramycin, Clarithromycin)	Ribosomen (50S-Untereinheit)
Lincosamide (Clindamycin)	Ribosomen (50S-Untereinheit)
Tetrazykline (Doxycyclin, Minocyclin)	Teilung des Apikoplast
Atovaquon	Cytochrom-bc1-Komplex

### 1.1.5 Aktuelle Wirkstoffentwicklung

Die Suche nach neuen Arzneistoffen mit Aktivität gegen *T. gondii* Parasiten ist deshalb Gegenstand der aktuellen Forschung. Hierbei werden verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einem werden bereits klinisch etablierte Wirkstoffe mit eigentlich anderer Indikation auf ihre Anti-Toxoplasma-Aktivität getestet (105), zum anderen wird probiert neue Substanzen durch Screening von Substanzbibliotheken zu finden. Beim Auftreten von Treffern wird versucht das Wirkstoffziel herauszufinden und so eine Optimierung des Wirkstoffes möglich zu machen. Welche Substanzen in den Jahren 2006-2016 eine vielversprechende Aktivität gezeigt haben und welche möglichen Wirkmechanismen zugrunde liegen, ist von Montazeri *et al.* 2017 in einem *review*-Artikel zusammengefasst worden (106). Bisher ist davon allerdings noch keine der Substanzen erfolgreich in weiterführende klinische Studien oder in die Anwendung gelangt und deshalb stellen diese eher Startpunkte für die Suche nach neuen

Wirkstoffen dar. Interessant ist hierbei, dass die meisten Wirkstoffe innerhalb des Parasiten angreifen. Bisher sind noch keine Wirkstoffe bekannt die an Membranproteinen von *T. gondii* wirken. Ein Beispiel für eine wichtige Substanzbibliothek auf der Suche nach neuen Wirkstoffen ist die *Pathogen Box* (107). Diese wurde nach dem Vorbild der *Malaria Box* erstellt, die von *Medicines for Malaria Venture* (MMV) herausgegeben wurde und 400 Substanzen mit bestätigter Anti-Malaria-Aktivität enthält (108). Diese Substanzen wurden aufgrund ihres Potentials als Wirkstoff gezeigt durch Wirksamkeit, geringer Toxizität und guter Bioverfügbarkeit aus 20.000 ursprünglichen Treffern eines großen Screenings von 4 Millionen Substanzen ausgewählt. Die Substanzen des Screenings wurden aus Bibliotheken von *Novartis*, *GlaxoSmithKline* und des *St. Jude Children's Research Hospitals* bereitgestellt. Auf gleicher Grundlage wurden 400 Substanzen gegen verschiedene Pathogene der sogenannten *neglected diseases*, also vernachlässigten Krankheiten, ausgewählt und von MMV als *Pathogen Box* herausgegeben. Darunter fallen sowohl tropische Krankheiten wie Leishmaniose oder Schlafkrankheit als auch Krankheiten wie Tuberkulose oder Toxoplasmose. In der *Pathogen Box* sind 15 Substanzen mit bekannter Aktivität gegen *T. gondii*-Parasiten enthalten. Die Effektivität dieser Substanzen gegen Parasiten wurde auch schon von Spalenka *et al.* in Zellkultur-Versuchen mit Vero-Zellen durch Generierung von IC<sub>50</sub>-Werten weiter untersucht (109). Die genauen Mechanismen oder Wirkstoffziele bleiben jedoch weiterhin offen.

### **1.1.6 *Toxoplasma gondii* als Modell-Parasit**

Viele pathogene Parasiten sind der Familie Apicomplexa zuzuordnen. Hierzu gehören neben *T. gondii* der Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum*, die Erreger von Magen-Darm-Erkrankungen *Eimeria* und *Cryptosporidium* sowie die Veterinär-Pathogene *Babesia* und *Theileria*. *T. gondii* konnte als erster Vertreter der Familie Apicomplexa erfolgreich gentechnisch verändert werden. Die pathogenen Tachyzoiten können leicht kultiviert werden und benötigen im Gegensatz zum Malaria-Erreger nur ein Labor der biologischen Sicherheitsstufe 2. Aufgrund der ersten transienten Transfektion von *Toxoplasma*-Parasiten im Jahre 1993 durch Soldati und Boothroyd (110) haben sich viele Methoden zur genetischen Manipulation von *T. gondii* entwickelt. Kim *et al.* entwickelten eine stabile Transfektion, was den Grundstein für die Identifikation von regulatorischen Elementen zur Gen-Expression legte (111, 112). Daraus entwickelten sich viele Möglichkeiten zur Selektion

## Einleitung

über Selektionsmarker wie zum Beispiel über HXGPRT, der Hypoxanthin-Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase. Hierbei wurden HXGPRT-*knockout*-Mutanten generiert und der Marker konnte zusätzlich auch zur negativen Selektion eingesetzt werden (113). Auch wurde es möglich, Reporter-Gene wie das *yellow fluorescent protein* (YFP) in die Parasiten einzubringen, um die Replikation zu verfolgen und Substanz-Screenings für Wirkstoffe gegen *Toxoplasma* möglich zu machen (114). Die Transfektion von *T. gondii*-Parasiten wurde in den 90er Jahren zur Routine und konnte mit hoher Effizienz durchgeführt werden, wodurch der Parasit zum bevorzugten Modell zur Untersuchung von Zellbiologie und Validierung von *drug targets* der Familie Apicomplexa geworden ist (115). Die genetische Veränderung anderer Apicomplexa gestaltete sich zunächst schwieriger, weshalb *Toxoplasma* auch zur Expression von Genen anderer Parasiten als Expressionssystem genutzt wurde. Ende der 90er Jahre konnte schließlich auch der Malaria-Erreger *P. falciparum* erfolgreich gentechnisch verändert werden (116-118). Stabile Transfektionen brauchen allerdings länger und sind weniger effizient als bei *Toxoplasma*. Dadurch wurde *T. gondii* als Modellparasit zumindest für einige zellbiologische Fragestellungen noch nicht komplett abgelöst (115). Die Rolle als wichtiges Modell zur gentechnischen Veränderung von Parasiten der Familie Apicomplexa wurde allerdings 2014 noch einmal bestätigt, da hier zum ersten Mal eine CRISPR/Cas9-Methode erfolgreich an einem Vertreter dieser Familie von Shen *et al.* durchgeführt werden konnte (119).

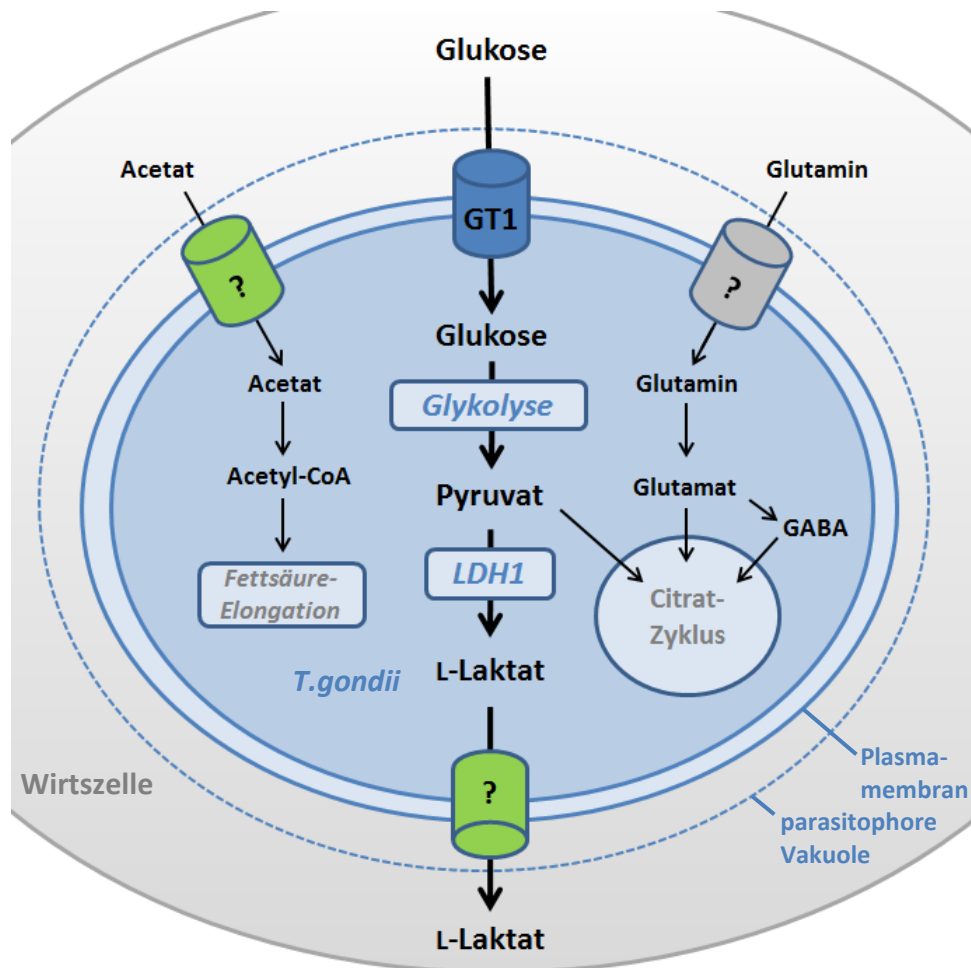
Im Zuge der vielen Experimente hat sich *T. gondii* aufgrund seiner Verwandtschaft zu anderen pathogenen Parasiten zwar gut zur Charakterisierung der Zellbiologie der Familie Apicomplexa erwiesen, jedoch konnten auch immer mehr Unterschiede zwischen den verschiedenen Parasiten herausgestellt werden. Dies betrifft insbesondere den Stoffwechsel, da *Toxoplasma* dort im Vergleich zu *P. falciparum* bei einigen Enzymen des Metabolismus Redundanz zeigt (115). Als Beispiel ist hier der *Purin-Salvage-Pathway* zu nennen. *Toxoplasma* kann sowohl Adenosin als auch Hypoxanthin verwerten und erst der gleichzeitige *knockout* von Adenosin-Kinase und HXGPRT führt zum Absterben der Parasiten (113, 120). In *Plasmodium* wird hingegen nur Hypoxanthin über die essentielle Purin-Nukleosid-Phosphorylase (PNP) verwertet (121, 122).

### 1.1.7 Energiestoffwechsel und Aufnahme von Nährstoffen

Der intrazelluläre Parasit *T. gondii* muss relevante Nährstoffe aktiv aus seiner Umgebung aufnehmen, um Energie zu generieren und sich zu teilen. Als Nährstoffe sind hier Kohlenstoffquellen, essentielle Aminosäuren und Lipide zu nennen. Während andere Parasiten der Familie Apicomplexa ihre asexuelle Teilung ausschließlich in bestimmten Kompartimenten vollziehen, scheint sich *T. gondii* in fast jeder zellkernhaltigen Zelle des Wirtsorganismus teilen zu können. Auch gibt es im Vergleich zu anderen Parasiten Unterschiede im Energiestoffwechsel. Der Malaria-Erreger *P. falciparum* nutzt im erythrozytären Stadium ausschließlich die Glykolyse, um Energie zu gewinnen (123). *T. gondii*-Tachyzoiten generieren zwar auch hauptsächlich Energie über die Glykolyse unter Bildung von L-Laktat als Stoffwechsel-Endprodukt aus Pyruvat über die Laktatdehydrogenase LDH1 (124, 125). Zusätzlich konnte in Tachyzoiten aber auch ein aktiver Citrat-Zyklus beobachtet werden (126, 127). Ob dieser essentiell für das Wachstum ist, konnte allerdings noch nicht vollständig geklärt werden. Schaut man sich den Energiestoffwechsel von *T. gondii* genauer an, scheint es, als hätte der Parasit viele Ausweichrouten und alternative Nährstoffe gefunden, um sich an viele verschiedene Umwelteinflüsse anzupassen. Unabhängig ob Energie in Organismen über den Citratzyklus oder die Glykolyse generiert wird, ist Glukose die primäre Kohlenstoffquelle in schnell teilenden Zellen. Die Aufnahme von Glukose ist zum Beispiel für *P. falciparum* essentiell und ein *knockout* des einzigen Glukose-Transporters PfHT führt zum Absterben der Parasiten (128, 129). Auch in anderen Parasiten und in Tumorzellen wird die Hemmung der Glukose-Aufnahme als vielversprechendes Ziel für Wirkstoffe diskutiert (130, 131). In *T. gondii* führte sowohl die Hemmung sowie der *knockout* des einzigen Glukose-Transporters TgGT1 zwar zur drastischen Verringerung der Glukose-Aufnahme jedoch nicht zum Absterben des Parasiten, sondern lediglich zu einer langsameren Wachstumsrate (132, 133). Die Virulenz des Parasiten konnte nicht gestoppt werden. Die Generierung von Energie über Glukose als Kohlenstoffquelle scheint also nicht essentiell zu sein, sodass von mindestens einer alternativen Kohlenstoffquelle auszugehen ist, um ATP zu generieren. Eine Alternative wurde identifiziert, als man Glutamin zum Kulturmedium gegeben hatte und so den Wachstumsdefekt des *TgGT1-knockouts* retten konnte (133). Die Einspeisung von Glutamin in den Citratzyklus über die Glutaminolyse zu Glutamat ist für *T. gondii* ein weiterer Weg der Energiegewinnung (135, 126). Auch die Aufnahme und Verwendung von Acetat als Kohlen-



## Einleitung



**Abb. 1.2** Energiestoffwechsel von *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten. Glukose wird über den Glukose-Transporter (GT1) aufgenommen und im Rahmen der Glykolyse zu L-Laktat umgewandelt, was exportiert werden muss. Acetat und Glutamin dienen als alternative Nährstoffquellen und werden aufgenommen. Die beteiligten Transporter sind jeweils unbekannt.

*Toxoplasma gondii* verfügt über einen aktiven Citrat-Zyklus. Modifiziert nach (134, 135).

stoffquelle wird diskutiert, da über die Acetyl-CoA-Synthase Acetyl-CoA generiert werden kann, das wiederum in den Citratzyklus eingespeist wird (135). Auch kann generiertes Acetyl-CoA zur Elongation von Fettsäuren während der Fettsäuresynthese genutzt werden (136). Der Transport dieser Stoffe aus der Wirtszelle über die Plasmamembran in den Parasiten ist essentiell zur Erhaltung des Stoffwechsels. Durch die Stoffwechselprozesse fallen wiederum Abfallprodukte an, die bei Akkumulation zum Ausbremsen des Stoffwechsels bis hin zur Toxizität führen können. Das Ausschleusen von Stoffwechselendprodukten ist daher als ebenso wichtig anzusehen wie die Aufnahme von Nährstoffen. Die im Energiestoffwechsel beteiligten Transporter in der Plasmamembran sind jedoch nicht vollständig untersucht. So

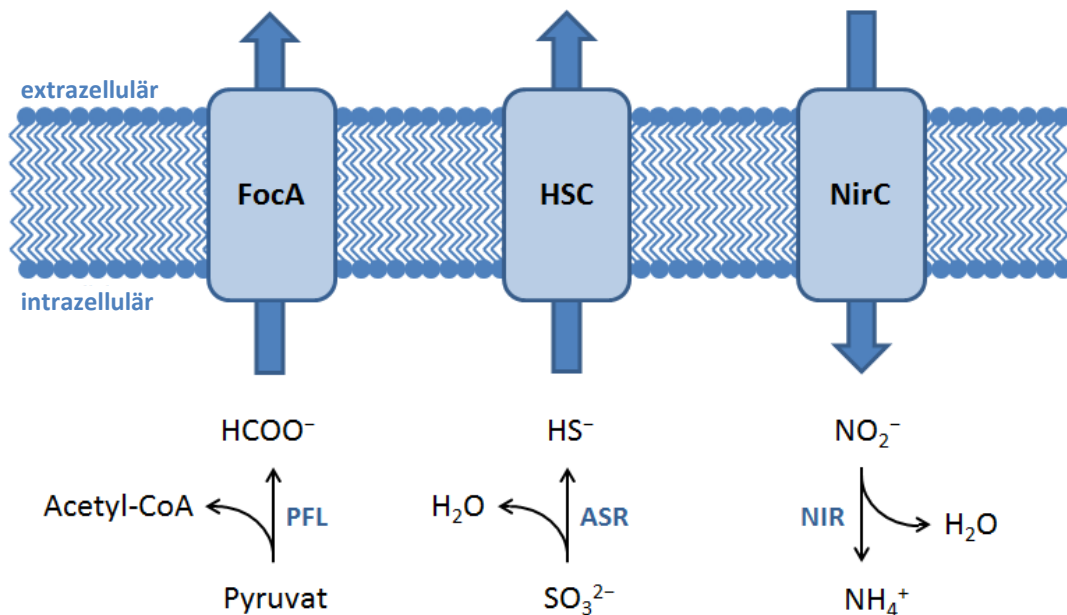
ist zwar der Glukose-Transporter *TgGT1* charakterisiert worden, über welchen Weg jedoch Monocarboxylat-Anionen wie Acetat und L-Laktat transportiert werden oder wie Glutamin in die Zelle aufgenommen wird, ist unbekannt. Membrantransporter, die diese Rolle im Stoffwechsel übernehmen können, sind in *T. gondii* noch nicht charakterisiert worden. Der postulierte Stoffwechsel von *T. gondii*-Tachyzoiten ist in Abbildung 1.2 zusammengefasst.

### 1.2 Formiat-Nitrit-Transporter (FNT)

Die Familie der Formiat-Nitrit-Transporter kommt ausschließlich in Mikroorganismen wie Archaeen, Bakterien, Algen oder einzelligen Parasiten vor (137) und ist verantwortlich für den Transport von monovalenten Anionen über die Plasmamembran (138). Die Arbeitsgruppe von Gary Sawers bewies als Erste das Ausschleusen des Formiat-Anions aus *Escherichia coli* über FocA („*formate channel*“) (139). Das Gen für dieses zunächst als Formiat-Kanal bezeichnete Protein liegt auf dem gleichen Operon, das auch für die Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) kodiert. Die PFL katalysiert die Reaktion von Pyruvat zu Acetyl-CoA und ist somit ein Schlüsselenzym bei der gemischten Säuregärung von Enterobakterien (140, 141). Bei der Reaktion fällt auch das Formiat-Anion als Nebenprodukt an, welches über FocA ausgeschleust werden muss, um eine Azidifizierung des Zytoplasmas und so eine Toxizität zu vermeiden (142). Die auf dem gleichen Operon kodierten Proteine FocA und PFL stehen also in direkter physiologischer Beziehung zueinander und haben eine wichtige Rolle im Stoffwechsel von *Escherichia coli*. Auch in anderen Enterobakterien wie *Vibrio cholerae* (143) und *Salmonella typhimurium* (144) konnten FocA-Orthologe mit der gleichen physiologischen Relevanz und verknüpft mit der PFL gefunden werden. Umgekehrt kann FocA auch dazu dienen, Formiat aufzunehmen, damit dieses über die Formiat-Wasserstoff-Lyase zu CO<sub>2</sub> und Wasserstoff umgewandelt wird (145, 146). Ein weiterer Formiat-Transporter ist das FocA-Ortholog *fdhC* aus dem Archaeobakterium *Methanobacterium formicum*. Die zweite Unterfamilie der FNTs sind die Nitrit-Transporter NirC zur aktiven Aufnahme von Nitrit in Bakterienzellen. Das toxische Nitrit wird katalysiert über die Nitrit-Reduktase (NIR) zu Ammonium reduziert und so unschädlich gemacht. Dieser Mechanismus schützt zum Beispiel *S. typhimurium* gegen Makrophagen, die Stickstoffmonoxid (NO) sezernieren, um das Bakterium abzutöten (147, 148). Das NO wird durch Autoxidation in Nitrit umgewandelt, welches durch den Transport über NirC in das Bakterium dem Gleichgewicht entzogen wird und so außen die NO-Konzentration verringert wird. NirC liegt

## Einleitung

wie FocA auf dem gleichen Operon seines korrespondierenden Enzyms, der Nitritreduktase (NIR). Neben StNirC sind weitere NirC-Orthologe aus *E. coli* (149), dem Archaeobakterium *Thermophilum pendens* (150) und dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatus* (151) charakterisiert worden. Der Schutzmechanismus der Nitrit-Aufnahme über *EcNirC* konnte auch bei für Vögel pathogenen *Escherichia coli*-Zellen beobachtet werden (152).



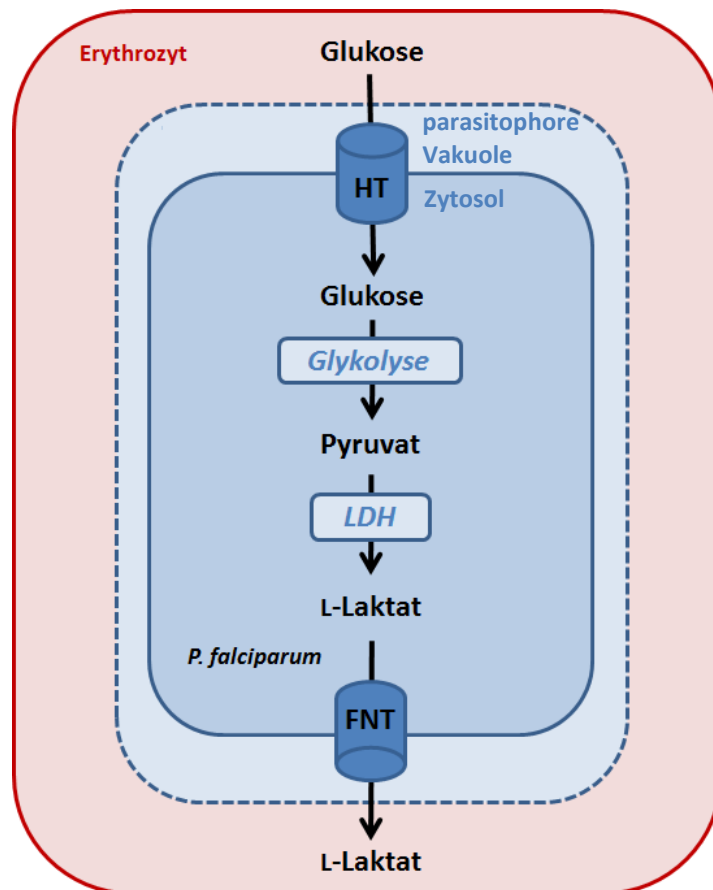
**Abb. 1.3** Die physiologische Funktion der Formiat-Nitrit-Transporter-Untergruppen FocA, HSC und NirC in Prokaryoten. Formiat entsteht aus Pyruvat über die Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) und wird über FocA ausgeschleust. Hydrogensulfid entsteht aus Sulfat über die assimilatorische Sulfid-Reduktase (ASR) und wird über HSC ausgeschleust. Nitrit wird über NirC aufgenommen und von der Nitritreduktase (NIR) zu Ammonium umgewandelt.

Modifiziert nach (138).

Die dritte Unterfamilie der FNTs sind die Hydrosulfid-Transporter HSC zum Ausschleusen von Hydrogensulfid, das bei der Reduktion von Sulfid über die assimilatorische Sulfid-Reduktase (ASR) entsteht (153). Auch hier wird ein toxischer Metabolit über einen Transporter der FNT-Familie ausgeschleust und entsprechend liegen HSC und ASR auf demselben Operon. Zusammenfassend erfüllen Formiat-Nitrit-Transporter eine wichtige Funktion im Stoffwechsel von pathogenen Prokaryoten wie *S. typhimurium* oder *V. cholerae* und stellen so ein Wirkstoffziel für die Entwicklung neuer Antibiotika dar (Abb. 1.3). In unserer Arbeitsgruppe konnte 2015 erstmals ein Formiat-Nitrit-Transporter aus einem

## Einleitung

eukaryotischen Parasiten charakterisiert werden (154). Im Energiestoffwechsel des humanen Malaria-Erregers *P. falciparum* fällt im erythrozytären Stadium das Monocarboxylat-Anion L-Laktat als hauptsächliches Endprodukt der Glykolyse an und muss ausgeschleust werden (123, 155).



**Abb. 1.4** Energiestoffwechsel des intraerythrozytären Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum*. Glukose wird über den plasmodialen Hexose-Transporter (HT) aufgenommen und im Rahmen der Glykolyse zu L-Laktat biotransformiert. Der Export von L-Laktat erfolgt über den plasmodialen Formiat-Nitrit-Transporter *Pf*FNT (FNT). LDH: Laktatdehydrogenase.

Modifiziert nach (154).

Ebenso wie Formiat in Bakterien führt auch eine Akkumulation von L-Laktat in diesem pathogenen Parasiten zur Azidifizierung des Zytosols und zur Toxizität. Der Export von L-Laktat über die Plasmamembran ist als essentiell für das Überleben des Parasiten anzunehmen. Unsere Arbeitsgruppe entdeckte, dass der Formiat-Nitrit-Transporter *Pf*FNT als einziger Monocarboxylat-Transporter in *P. falciparum* diese wichtige Funktion im

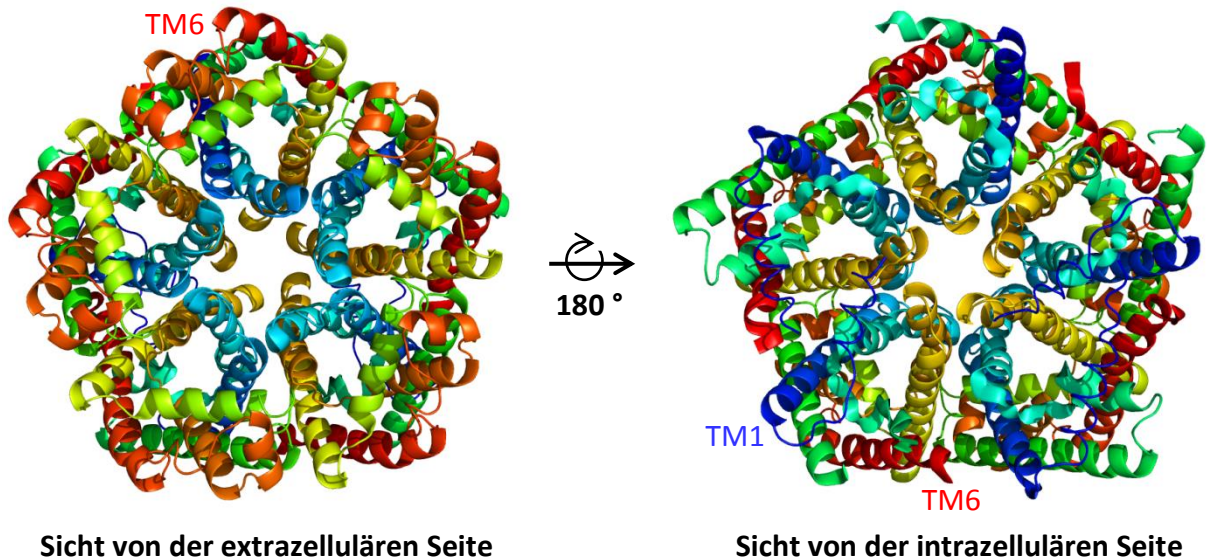
## Einleitung

Energiestoffwechsel übernimmt (Abb. 1.4) (154). Die Ergebnisse konnten von der Arbeitsgruppe um Kieran Kirk bestätigt werden (137). Diese Erkenntnisse machen *PfFNT* zu einem attraktiven Ziel zur Entwicklung neuer Wirkstoffe gegen Malaria. In unserer Arbeitsgruppe wurde von André Gollack durch ein Screening von 400 Substanzen aus der *Malaria Box* (108) der *PfFNT*-Inhibitor MMV007839 identifiziert und charakterisiert, der *P. falciparum*-Kulturen in nanomolarer Konzentration abtötet (156, 157). Dies bestätigte die essentielle Rolle von *PfFNT* im Energiestoffwechsel und für das Überleben dieses pathogenen Parasiten. Ein Vorteil der Inhibitoren ist hierbei auch, dass die Rolle des Monocarboxylat-Transportes in höheren Organismen nicht von FNTs übernommen wird. Für diese Funktion sind dort die Monocarboxylat-Transporter (MCT) verantwortlich, die sich strukturell und mechanistisch von der FNT-Familie unterscheiden (158, 159). Die Hemmung des L-Laktat-Transporters mit FNT-Inhibitoren betrifft damit spezifisch die parasitären FNT-Transporter (154) und stellt einen Ausgangspunkt für die Arzneistoff-Entwicklung dar.

Auch in weiteren eukaryotischen Einzellern konnten Formiat-Nitrit-Transporter charakterisiert werden wie die Nitrit-Transporter NitA aus dem Pilz *Aspergillus nidulans* (150, 160, 161) und Nar1 aus der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* (162). Nar1.2 leitet zusätzlich das Bicarbonat-Anion (163, 164). Ein eukaryotisches FocA-Homolog wurde in Augentierchen der Art *Euglenes gracilis* entdeckt (165). Bei chronischer Exposition mit Cadmium wurde der Transporter *EgFth* in cadmiumresistenten Zellen überexprimiert. Das Protein selbst wurde jedoch nicht weiter charakterisiert (165).

### 1.2.1 Struktureller Aufbau

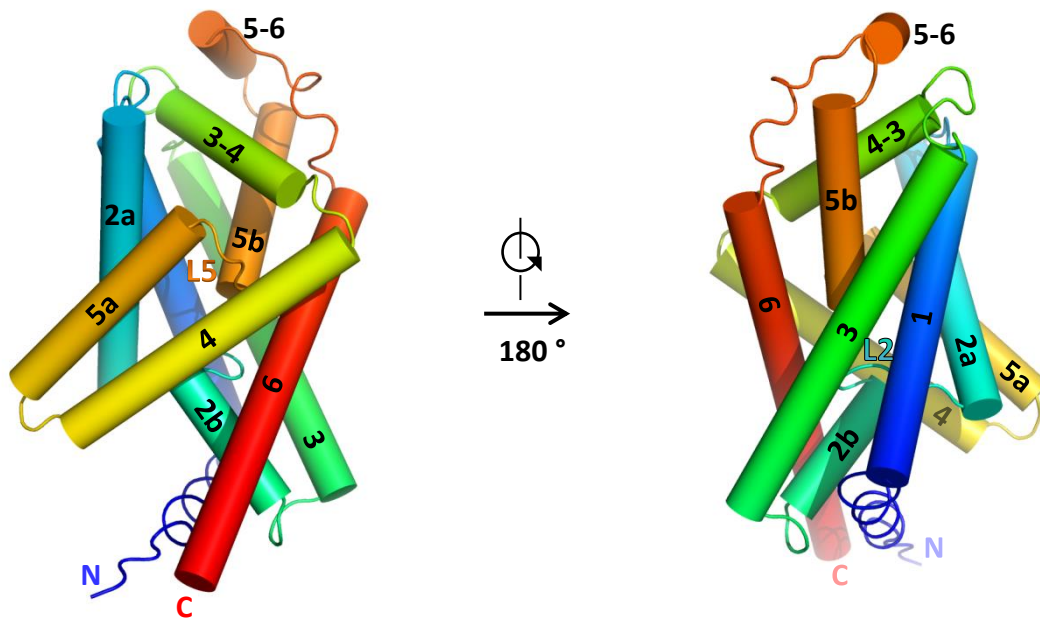
Im Jahre 2009 wurde die erste hoch aufgelöste Kristallstruktur von FocA aus *Escherichia coli* von Wang *et al.* publiziert (166). Weitere FNT Kristallstrukturen folgten mit FocA aus *V. cholerae* (143), HSC aus *C. difficile* (153) sowie NirC und FocA aus *S. typhimurium* (167, 144). Anhand der fünf bekannten Kristallstrukturen lassen sich folgende typische Merkmale der Formiat-Nitrit-Transporter-Familie ableiten. Die Quartärstruktur der FNTs zeigt fünf identische Protomere, die ein scheibenförmiges Homopentamer mit einer ungefähren Schichtdicke von 44 Å und einem Durchmesser von ungefähr 80 Å bilden (166, 168). Die einzelnen Protomere umschließen eine zentrale Pore, die allerdings nicht für den Transport von Substraten verantwortlich ist (Abb. 1.5). Die zentrale Pore ist mit Lipiden gefüllt, worauf Daten der Elektronendichte-Verteilung hindeuten, die der Elektronendichte von Lipiden oder



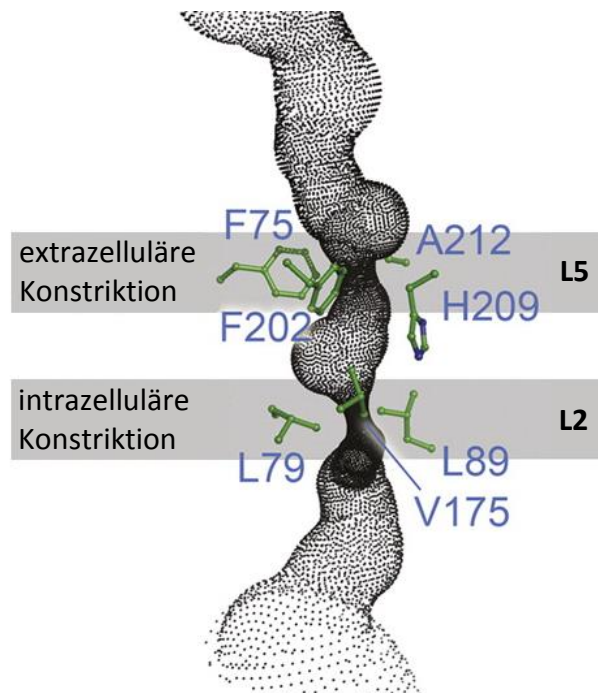
**Abb. 1.5** Struktur des FocA-Pentamers aus *Salmonella typhimurium* (PDB 3Q7K) von der extrazellulären Seite und der intrazellulären Seite aus. C- und N-Terminus zeigen zur intrazellulären Seite. Die erste (TM1) und die letzte (TM6) Transmembranspanne sind markiert. Erstellt mit PyMOL Molecular Graphics System.

Detergenz-Molekülen ähnelt (166). Die polaren Termini liegen nach der „positive-inside“-Regel des sekretorischen Proteineinbaus in Membranen intrazellulär vor (169, 170). Als Template für in dieser Arbeit verwendete Modelle wurde die Kristallstruktur von FocA aus *S. typhimurium* (PDB 3Q7K) genutzt. Deshalb wird im Folgenden die Struktur von *StFocA* zur Veranschaulichung des strukturellen Aufbaus der FNT-Familie in Abbildungen verwendet. Jedes der fünf Protomere besitzt einen eigenen Transportpfad, der durch sechs Transmembranspannen gebildet wird, welche eine enge Pore formen (Abb. 1.6). Der Transportpfad besitzt zwei lipophile Engstellen, die ein zentrales Vestibül jeweils von der intrazellulären und extrazellulären Seite abschirmen. Zwei der Transmembranspannen, TM2 und TM5, sind unterbrochen und werden aus jeweils zwei Halbhelices gebildet, die durch die *loop*-Regionen L2 und L5 miteinander verbunden sind. Diese *loop*-Regionen sind essentiell zur Bildung der Engstellen, wobei L2 die intrazelluläre und L5 die extrazelluläre Konstriktion bildet. Die verantwortlichen Aminosäuren der Konstriktionen sind in der Familie der FNTs konserviert und schirmen ein ebenfalls konserviertes zentrales Histidin von der extra- und intrazellulären Seite ab, in dem ein lipophiles Vestibül gebildet wird (Abb. 1.7).

## Einleitung



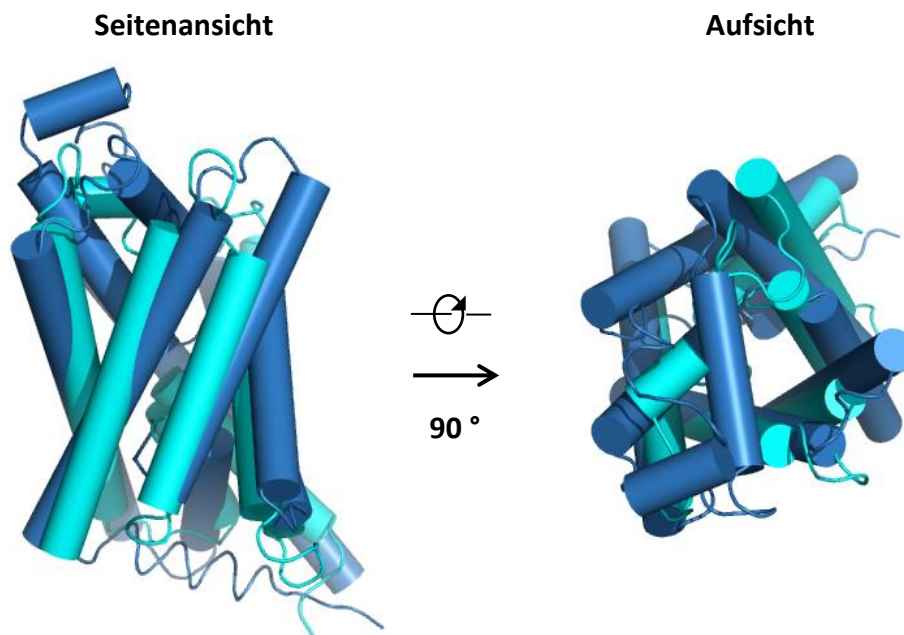
**Abb. 1.6** Seitenansicht auf das FocA Monomer aus *Salmonella typhimurium* (PDB 3Q7K). Die einzelnen Transmembranspannen (TM 1-6) sind zylindrisch dargestellt. TM 2 und 5 sind unterbrochen und jeweils durch die *loop*-Regionen L2 und L5 verbunden und bilden so die lipophilen Konstriktionen der Transportpore. Erstellt mit PyMOL Molecular Graphics System.



**Abb. 1.7** Seitenansicht auf die Transportpore von StFocA (PDB 3Q7K). Die beteiligten, konservierten Aminosäuren schirmen das Histidin (H209) unter Bildung eines zentralen Vestibüls durch die Konstriktionen L2 und L5 ab. Der Transportpfad ist gepunktet dargestellt und wurde mit HOLE berechnet (171, 172). Abbildung entnommen aus (172).

## Einleitung

Ausgehend von der Primärsequenz der Formiat-Nitrit-Transporter ist keine deutliche, evolutionäre Verwandtschaft zu einer anderen Membranproteinfamilie zu erkennen. Interessanterweise ist die Topologie und der Aufbau aus sechs Transmembranspannen strukturell ähnlich zu der Membranproteinklasse der Aquaporine (166). Die einzelnen Protomere lassen sich trotz nicht verwandter Primärsequenz mit nur geringer Abweichung übereinanderlegen (Abb. 1.8).



**Abb 1.8** FNTs und Aquaporine teilen die gleiche Topologie, obwohl die Primärsequenzen nicht verwandt sind. Das *StFocA*-Protomer (PDB 3Q7K) (blau) und das *EcAqpZ*-Protomer (PDB 1RC2) (hellblau) lassen sich mit geringer Abweichung übereinanderlegen. Erstellt mit PyMOL Molecular Graphics System.

Auch die Unterbrechungen in TM2 und TM5 sind in der Struktur der Aquaporine vorhanden und bilden dort eine zentrale Engstelle. Die Carbonylfunktionen der Aminosäuren zeigen hierbei in den Transportpfad und ermöglichen Wasserstoffbrückenbindungen zu polaren Substraten. In FNTs ragen die Seitenketten in den Transportpfad und bilden so eine lipophile Umgebung. Aquaporine leiten deshalb ungeladene, polare Teilchen wie Wasser oder Glycerol. Auch hier ist jedes einzelne Protomer zur Leitfähigkeit von Substraten befähigt (173). Die FNTs ahmen also trotz unterschiedlicher Primärsequenz und Funktionalität die Tertiärstruktur der Aquaporine nach (strukturelle „Mimikry“). Erst in der Quartärstruktur gibt es wieder Unterschiede, da FNTs Homopentamere bilden und Aquaporine Homotetramere.

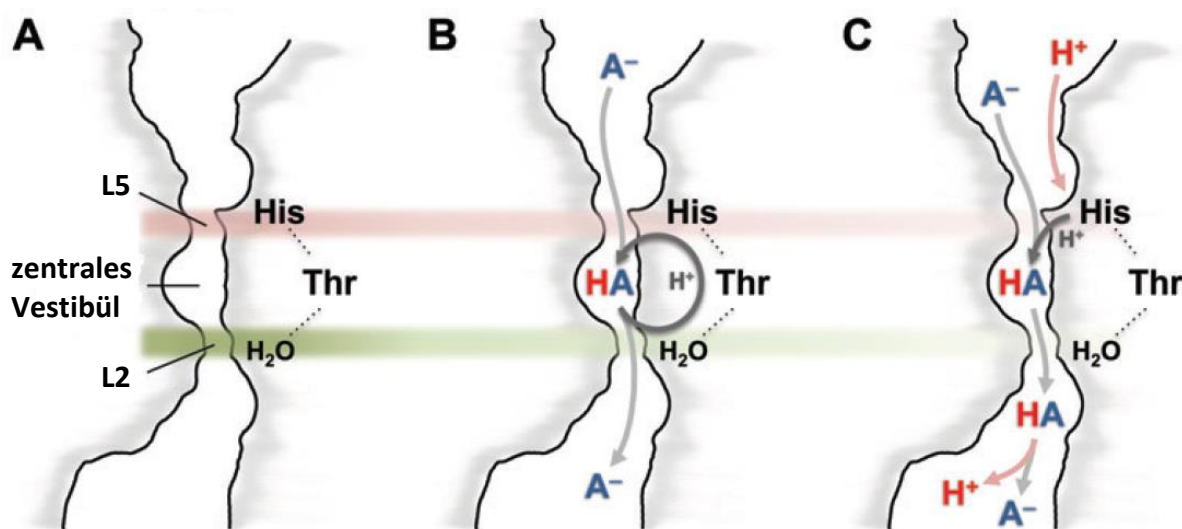


### 1.2.2 Transportmechanismus

Im „*Transporter Classification System*“ nach Saier war die Familie der Formiat-Nitrit-Transporter 1996 zunächst der *Major Intrinsic Protein* (MIP)-Superfamilie zugeordnet worden, in der auch die Kanalproteine der Aquaporine zu finden sind (174). Nach dieser Klassifikation wären FNTs Anionen-Kanäle. Im Jahr 2002 wurden sie aufgrund weiterer phylogenetischer Charakterisierung über Genom-Analyse (175) und experimenteller Daten eines putativen Acetat-Protonen-Transporters in *Saccharomyces cerevisiae* (176) als Transporter des Typs Symporter unter der Nummer 2.A.44 eingeordnet (177). Trotz dieser Einordnung war der Transportmechanismus zu dem Zeitpunkt noch nicht geklärt und die Frage, ob es sich tatsächlich um einen bidirektionalen Kanal oder einen sekundär-aktiven Transporter unter Einbindung eines Protonengradienten handelt, blieb zunächst offen. Wang *et al.* zeigten 2009 erstmals am isolierten Protein die Formiat-Aufnahme in Proteoliposomen über *EcFocA* und argumentierten aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Aquaporinen für einen Anionenkanal. Die ersten umfangreicheren, funktionellen Untersuchungen an FNTs wurden von der Arbeitsgruppe Einsle an *StFocA* und *StNirC* vorgenommen und basierten auf elektrophysiologischen Methoden, um das Substratspektrum und die pH-abhängige Aufnahme des Transporters abzubilden (144, 167). Die Messungen zeigten, dass die FNTs ein breites Spektrum an monovalenten Anionen wie Formiat, Acetat, Nitrit, Chlorid oder Hypophosphit durchlassen. Die Substrataffinität lag hierbei im hohen millimolaren Bereich und wies somit auf die passive Leitfähigkeit eines Anionenkanals hin. Eine weitere Beobachtung war das Stoppen der Substrat-Aufnahme unterhalb eines pH-Wertes von 5,1. Als Ursache wurde ein N-terminaler, pH-abhängiger *gating*-Mechanismus diskutiert und die Theorie stütze sich auf Kristallstruktur-Daten von *StFocA* bei einem saurem pH-Wert von 4,0. Dort ist der N-Terminus in einer Position zu sehen, der den Transportpfad verdeckt beziehungsweise verkleinert, sodass die Struktur als „geschlossene Form“ gedeutet wurde (144). Dem zentralen Histidin 209 wurde anhand von Molekulardynamik-Simulationen eine Rolle im N-terminalen-*gating* durch eine Interaktion mit Asparagin 262 zugesprochen (178). Anhand der Kristallstruktur von *V. cholerae* *FocA* wurde wiederum ein *gating*-Mechanismus über die Konformation und Flexibilität des L2-loops postuliert (166). Während diese Daten auf eine passive Anionen-Leitfähigkeit der FNTs, die über pH-abhängiges *gating* reguliert wird hindeuteten, wurde *StNirC* von Rycovska *et al.* als aktiver Proton-Nitrit-Antiporter beschrieben (179).

## Einleitung

Aufgrund der verschiedenen Untersuchungen und den bekannten Kristallstrukturen wurde dem zentralen Histidin eine essentielle Rolle im Transportmechanismus zugeschrieben. Eine Mutation zum Phenylalanin in *StFocA* führte zum Verlust der Leitfähigkeit (172). Da die Imidazol-Seitenkette des Histidins in das zentrale Vestibül hineinragt (166), wurde eine direkte Interaktion mit dem Substrat (143) oder eine Protonierung des Anions (167) diskutiert. Von der Arbeitsgruppe Einsle wurden daraufhin zwei verschiedene Transportmechanismen unter Einbeziehung des zentralen Histidins diskutiert (138). Die von Einsle postulierten Mechanismen sind in Abbildung 1.9 dargestellt.



**Abb. 1.9** Postulierte Transportmechanismen für die Formiat-Nitrit-Transporter-Familie der Arbeitsgruppe Einsle. **A:** Darstellung des Transportpfades mit den zwei lipophilen Engstellen und dem zentralen Vestibül. **B:** Bidirektionale passive Anionen-Leitfähigkeit über drei Protonierungsschritte (His-Thr-H<sub>2</sub>O) des monovalenten Anions. **C:** Sekundär-aktiver Transport bei niedrigem äußeren pH-Wert über die Protonierung des monovalenten Anions durch das Histidin. Nach erfolgtem Transport wird das Histidin wieder reprotoniert. Entnommen aus und modifiziert nach (138).

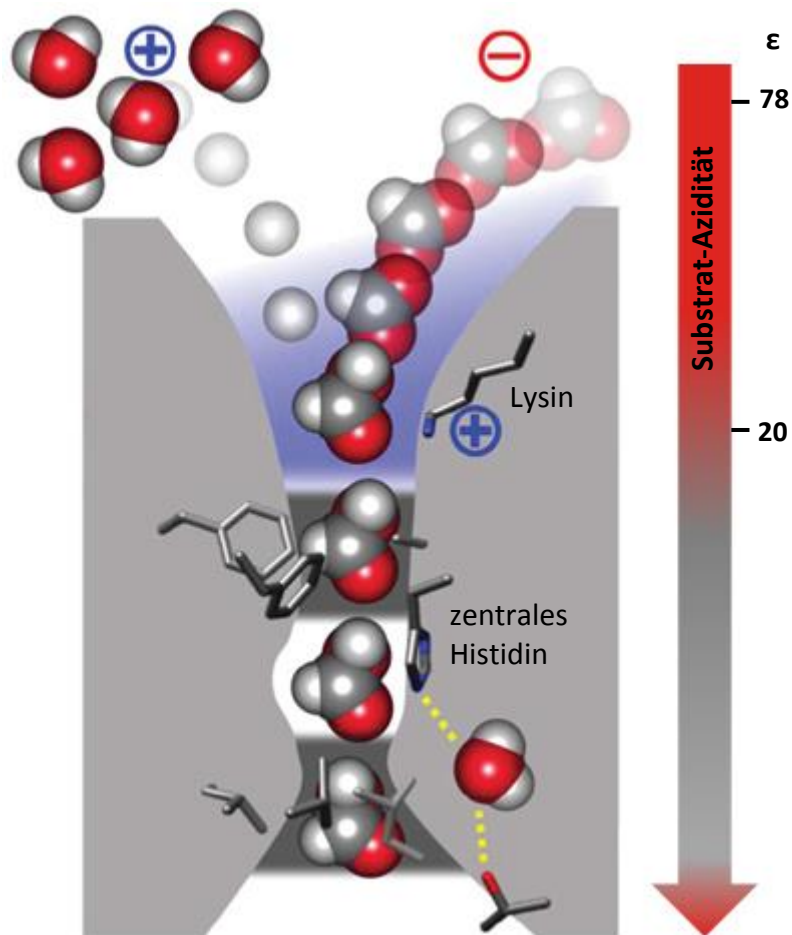
Postuliert wurde anhand der elektrophysiologischen Messungen ein bidirektionaler, elektrogener Anionen-Transport über eine Protonierung des Substrates durch das zentrale Histidin. Das Anion wird durch Aufnahme des Protons nach außen hin ungeladen und kann die Pore passieren. Danach wird das Proton wieder an das Protein abgegeben und kann über ein fixiertes Wassermolekül und ein Threonin zurück zum Histidin gebracht werden. Zur Reaktivierung des Histidins sind drei Protonierungsschritte notwendig. Als Alternative wurde

## Einleitung

bei saurem äußerem pH-Wert das Umschalten auf einen aktiven Protonen-Anionen-Symport postuliert. Hierbei wird das Histidin durch den sauren äußeren pH-Wert bevorzugt protoniert und gibt das Proton an das Substrat-Anion ab. Das nun ungeladene Substrat wird transportiert und das Proton nicht an das Protein zurückgegeben. Dieser Transport ist nicht mehr elektrogen und kann über elektrophysiologische Experimente nicht nachgewiesen werden. Beide Mechanismen haben gemeinsam, dass eine Protonierung des Substrates notwendig ist, da es wahrscheinlich nur ungeladen die lipophilen Konstriktionen passieren kann (138). Bei beiden Mechanismen stellt sich jedoch die Frage, wie das zentrale Histidin protoniert wird, da es zwischen den lipophilen Engstellen liegt und ein geladenes Proton das Histidin möglicherweise gar nicht erreichen kann (180). Weitere experimentelle Untersuchungen waren also notwendig, um den Transportmechanismus aufzuklären. In unserer Arbeitsgruppe wurde mit *PfFNT* ein weiterer Vertreter der FNT-Familie als pH-abhängiger, Proton-Anionen-Symporter charakterisiert. Daraufhin hatte sich Marie Wiechert aus unserer Arbeitsgruppe detailliert mit der Fragestellung des genauen Transportmechanismus von *EcFocA* und *PfFNT* auseinandergesetzt. Dabei nutzte sie direkte Aufnahmeassays mit radioaktiv markierten Substraten. Die Proteine wurden dabei von Hefezellen hergestellt und der Import der radioaktiv markierten Substrate in die Zelle gemessen. Dies ermöglichte die Messung des Transports der neutralen Form sowie des Substrat-Anions. Dabei wurde bewiesen, dass der in elektrophysiologischen Experimenten beobachtete Verlust der Funktionalität unter einem pH-Wert von 5,1 mit einem Transport der elektroneutralen Form des Formiats zu erklären ist (181). Der Transport der neutralen Form war im direkten Transportassay nachweisbar. Die Transportrate ist hierbei abhängig vom Protonengradienten und steigt bei saurem pH an. Auch der von Einsle postulierte Protonentransfer über drei Schritte konnte über Experimente mit Deuterium widerlegt werden. Daraufhin wurde folgender Transportmechanismus aufgrund der durchgeführten Experimente von Wiechert und Beitz postuliert (181). Das Substrat-Anion wird über ein konserviertes Lysin am Poreneingang elektrostatisch angezogen. Durch die lipophile Umgebung sinkt die Azidität über eine sinkende dielektrische Leitfähigkeit von 78 in Wasser auf 20-30 am Poreneingang und sorgt für eine erleichterte Protonierung des Anions durch das vorhandene Bulkwasser. Passiert das nun ungeladene Substrat die erste Engstelle, sinkt die dielektrische Leitfähigkeit weiter und das ungeladene Anion „rutscht“ zusammen mit

## Einleitung

dem Proton in die zentrale Vestibüle und passiert anschließend die zweite Engstelle (182) (Abb. 1.10).



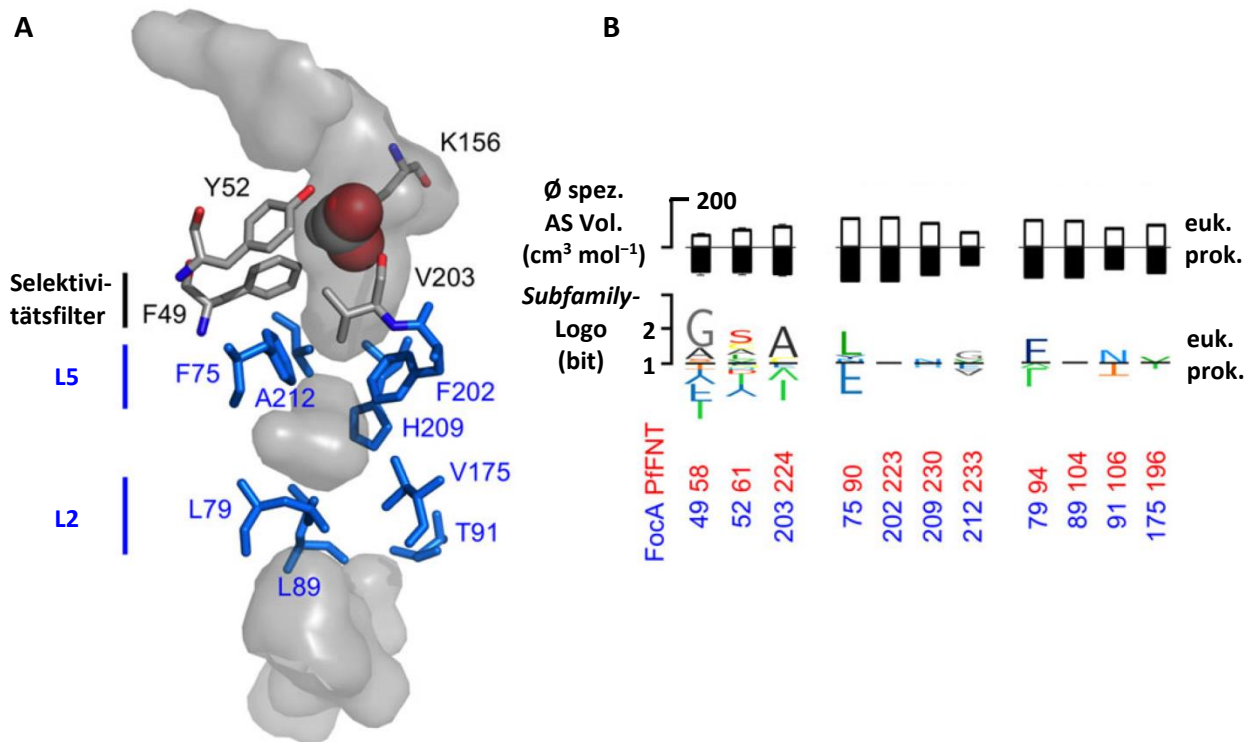
**Abb. 1.10** Transportmechanismus der Formiat-Nitrit-Transporter nach Wiechert und Beitz (182). Das Substrat-Anion wird von dem konservierten Lysin am Poreneingang elektrostatisch angezogen. Durch die lipophile Umgebung sinkt aufgrund der dielektrischen Leitfähigkeit die Azidität des Substrates. Dadurch wird die Protonierung durch das vorhandene Bulkwasser erleichtert und das Substrat passiert den Transportpfad inklusive der Engstellen in seiner neutralen, unpolaren Form. Modifiziert nach (182).

Dieser Mechanismus ist auch bei der Familie der Ammonium-Transporter wie AmtB aus *E. coli* zu beobachten. Auch hier wird das Ammonium-Kation vor der Passage durch zwei lipophile Engstellen zu Ammoniak neutralisiert (183). Deshalb wurde vorgeschlagen, die FNTs und die Ammonium-Transporter zu einer neuen Transporterklasse der *weak-acid and base neutralizing transporter* zusammenzufassen (181, 182). Diese neue Zuordnung wäre

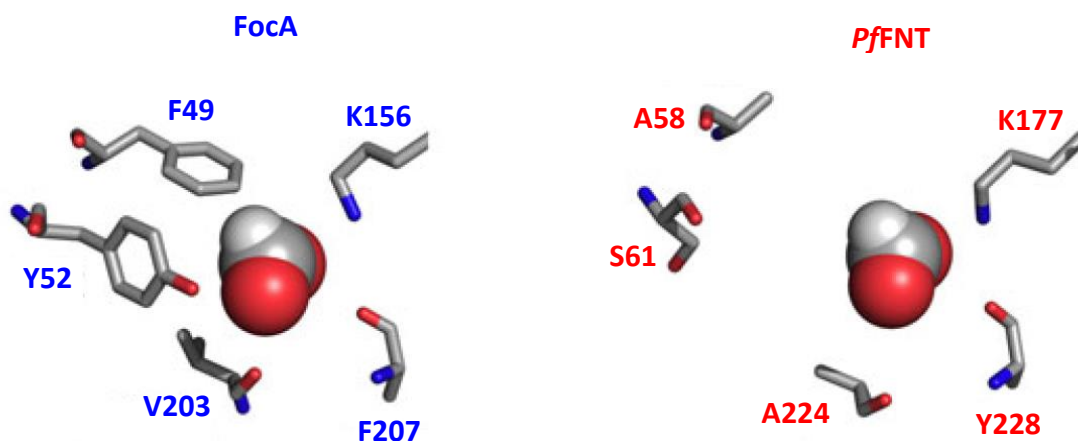
sinnvoll, da sich FNTs anhand der bisherigen Daten nicht eindeutig zur Klasse der Kanäle oder der Transporter zuordnen lassen. Zum einem ist die Affinität der Substrate im hohen millimolaren Bereich und auch strukturell ähneln die FNTs der Klasse der Aquaporin-Kanäle. Dies würde auf eine Klassifizierung als Kanal hinweisen. Zum anderen folgt der Transportmechanismus jedoch einem aktiven Proton-Anionen-Symport, der durch einen Protonengradienten getrieben wird. Die klassische Einteilung als Kanal oder Transporter lässt sich auf Formiat-Nitrit-Transporter also nicht anwenden. Auch gibt es weitere Beispiele, bei denen die klassische Einteilung nicht zutrifft wie der ClC-0-Anionenkanal, der bei jedem vollendeten Zyklus zwischen „offen“ und „geschlossen“ ein Proton über die Membran schleust (184). Ein weiteres Beispiel ist der Anthrax-Toxin-Kanal, der ein Protein durch eine gebildete Pore transportiert, indem sechs Säuregruppen des Proteins vorher protoniert werden. Dieser Kanal kann daher auch als Protein-Proton-Symporter klassifiziert werden (184, 185).

### 1.2.3 Selektivitätsfilter

Bei der Charakterisierung mittels direkten Aufnahmeassay von *EcFocA* und *PfFNT* wurde deutlich, dass das prokaryotische *FocA* die Substrate Formiat und Acetat leitet (154, 181). Das eukaryotische *PfFNT* leitete zusätzlich das größere Substrat L-Laktat. Dies steht im Einklang mit dem jeweiligen physiologischen Kontext, wirft aber die Frage auf, wie die Selektivität in Formiat-Nitrit-Transportern realisiert ist. Waight *et al.* vermuteten die lipophilen Konstriktionen als Grund für die Selektivität über ein Größenausschluss-Prinzip, da sie die engste Stelle im Transportpfad darstellen. Marie Wiechert aus unserer Arbeitsgruppe hat sich der Fragestellung angenommen und den Selektivitätsfilter in Formiat-Nitrit-Transportern identifiziert und charakterisiert (186). Dazu wurden 71 repräsentative FNT-Sequenzen aus 41 eukaryotischen und 30 prokaryotischen FNTs bioinformatisch verglichen und ein *Subfamily-Logo* erstellt. Das *Subfamily-Logo* stellte die relevanten Unterschiede in den Aminosäure-Sequenzen zwischen den beiden Gruppen unter Gewichtung der Aminosäure-Frequenz an der jeweiligen Alignment-Position dar. Daraus ergaben sich zwischen den beiden Untergruppen kaum Unterschiede in der Aminosäure-Zusammensetzung der Konstriktionsstellen (Abb. 1.11). Vergleich man *EcFocA* und *PfFNT* direkt miteinander, war sogar nur eine Aminosäure-Position (*EcFocA*: 79 *PfFNT*: 90) unterschiedlich. In *PfFNT* ist hier anstatt eines Leucins ein Phenylalanin vorhanden. Die Generierung einer *PfFNT*-F94L-Mutan-



**Abb. 1.11 A:** Seitenansicht auf den Transportpfad von *StFocA* (PDB 3Q7K) mit den Konstriktionen (blau) und dem Selektivitätsfilter (grau). Das konservierte Lysin fixiert ein Formiat-Molekül. Abbildung erstellt von Marie Wiechert mit PyMOL Molecular Graphics System. **B:** *Subfamily*-Logo und mittlere spezifische Aminosäure-Größe der Konstriktionen und des Selektivitätsfilters. Das Logo wurde aus 71 FNT-Sequenzen unter Gewichtung der Aminosäure-Frequenz von Prof. Dr. Eric Beitz erstellt (187). Entnommen aus (186).



**Abb. 1.12** Aufsicht auf die Transportpore von *StFocA* und *PifNT*. Die fünf gezeigten Aminosäuren bilden den Selektivitätsfilter und diskriminieren die Fläche der Transportpore. Erstellt von Marie Wiechert mit PyMOL Molecular Graphics System. Entnommen aus (186).

## Einleitung

te ergab keine Änderung in der L-Laktat-Leitfähigkeit. Die lipophilen Engstellen waren also nicht verantwortlich für die Selektivität und schienen flexibel genug zu sein um das L-Laktat durchzulassen. Direkt oberhalb der extrazellulären Konstriktion konnte schließlich ein Bereich identifiziert werden, der deutliche Unterschiede zwischen eukaryotischen und prokaryotischen FNTs in der Aminosäure-Zusammensetzung aufweist. Prokaryotische FNTs besitzen dort bevorzugt größere Aminosäuren wie Phenylalanin oder Tyrosin, wohingegen eukaryotische FNTs dort Aminosäuren wie Alanin oder Serin enthalten (Abb. 1.11, Abb. 1.12). Auch ein hoch konserviertes Lysin ist bei beiden Untergruppen in diesem Bereich anzutreffen und hatte sich zuvor als essentiell für den Transportmechanismus in FNTs erwiesen (181).

Anhand der bekannten Kristallstruktur-Daten wurden Modelle von *EcFocA* und *PfFNT* in diesem Bereich erstellt und es ergab sich ein putativer Selektivitätsfilter, der nach einem Größenausschluss-Prinzip funktioniert. In prokaryotischen FNTs schienen die größeren Aminosäuren den Poreneingang zu verengen, so dass nur kleinere Substrate wie Formiat oder Acetat durchpassten. In eukaryotischen FNTs war der Durchmesser durch die kleineren Aminosäuren jedoch doppelt so groß, wodurch eine L-Laktat-Leitfähigkeit prinzipiell möglich war. Durch viele verschiedene Mutationen in der putativen Filterregion von *PfFNT* und *EcFocA* konnte Marie Wiechert den Selektivitätsfilter experimentell nachweisen (186). Aufgrund des Filterlayouts lassen sich so auch Vorhersagen über die Substratselektivität von bisher noch nicht charakterisierten FNTs machen, wobei eukaryotische FNTs aufgrund ihrer physiologischen Funktion bevorzugt größere Substrate wie L-Laktat durchlassen. Um dieses Prinzip zu untermauern wurden zwei weitere FNTs charakterisiert, das prokaryotische *EcNirC* aus *Escherichia coli* mit einem engen Filterlayout und das eukaryotische *BbFNT* aus *Babesia bovis* mit einem weiten Filterlayout. Dabei konnte von André Golldack für *EcNirC* eine spezifische Formiat-Leitfähigkeit nachgewiesen werden, Acetat und L-Laktat wurden nicht transportiert. Für *BbFNT* wurde eine Leitfähigkeit für Formiat, Acetat und L-Laktat nachgewiesen (186) (181). Damit konnte das Prinzip des Selektivitätsfilters auf zwei weitere FNTs übertragen werden. FNTs scheinen sich in Eukaryoten den jeweiligen Stoffwechsel-Bedingungen in Hinblick auf den Transport von größeren Substraten evolutionär angepasst zu haben. Die Ergebnisse für *BbFNT* werden auch im Rahmen dieser Arbeit dargestellt. Der von unserer Arbeitsgruppe gefundene Selektivitätsfilter ist mit seinem Layout und seiner

Positionierung direkt über der lipophilen Konstriktion interessanterweise sehr ähnlich zum Selektivitätsfilter der Aquaporine. Dort ist oberhalb der zentralen lipophilen Konstriktion ein ar/R-Selektivitätsfilter, der auch nach dem Größenausschlussprinzip funktioniert (188). Dieser enthält lipophile, aromatische Aminosäuren und ein hoch konserviertes Arginin. In prokaryotischen FNTs werden größere Substrate auch über lipophile Aminosäuren zurückgehalten und es ist ein hoch konserviertes Lysin vorhanden. Deshalb wurde der Selektivitätsfilter als *hydrophobic/lysine constriction* ( $\Phi/K$ ) bezeichnet (186).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit ist die Identifikation und biochemische Charakterisierung von Formiat-Nitrit-Transportern aus dem weltweit vorkommenden, pathogenen Parasiten *T. gondii*. Damit ist es möglich aufzuklären, wie physiologisch relevante Monocarboxylate über die Plasmamembran des Parasiten transportiert werden und ihre Funktion im Stoffwechsel übernehmen können. Insbesondere Acetat und L-Laktat werden als physiologisch relevante Substrate diskutiert und im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Die essentielle Rolle von FNTs im Stoffwechsel von pathogenen Parasiten konnte bereits für den plasmodialen L-Laktat-Transporter aus *P. falciparum* gezeigt werden. Weitergehend soll über die Hemmung der Formiat-Nitrit-Transporter aus *T. gondii* mit dem PfFNT-Inhibitor MMV007839 untersucht werden, ob die FNTs dort ebenso essentiell für das Überleben des Parasiten sind. Dies könnte den Grundstein für die Entwicklung von dringend benötigten Wirkstoffen gegen *T. gondii* und zur Behandlung Toxoplasmose legen. Auch könnten weitere Erkenntnisse über den komplexen Metabolismus des an viele Umwelteinflüsse angepassten Parasiten *T. gondii* erlangt werden. Die Charakterisierung von FNTs weiterer wichtiger Vertreter der Familie Apicomplexa kann außerdem die Rolle dieser Transporter-Familie im Energiestoffwechsel verschiedener pathogener Parasiten weiter aufklären und dieses Wissen zur Entwicklung von neuen Wirkstoffen gegen weitere pathogene Apicomplexa eingesetzt werden.



## 2 Material und Geräte

### 2.1 Chemikalien, Enzyme, Material, Kits

#### **Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland**

Natrium-L-Laktat, Natriumlaurylsulfat, Tween<sup>®</sup> 20

#### **Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA**

PfuTurbo<sup>®</sup> DNA Polymerase AD

#### **Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland**

Genome Lab<sup>™</sup> DTCS-Quick Start Kit, Microfuge Tube Polypropylen

#### **Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland**

Bacto<sup>™</sup> Yeast Extract, Bacto<sup>™</sup> Pepton, Difco<sup>™</sup> Yeast Nitrogen Base (ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat)

#### **Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland**

Bio-Rad Protein-Assay, Clarity<sup>™</sup> Western ECL Substrate

#### **BIOTREND Chemikalien GmbH, Köln, Deutschland**

(2-Sulfonatoethyl)methanthiosulfonat Natriumsalz

#### **Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland**

Agar-Agar Kobe I, Albumin Fraktion V, Ammoniumsulfat, Bromphenolblau, Calciumchlorid, Citronensäure (wasserfrei), DMSO, DTT, EDTA, Eisessig, Ethanol, Glukose-Monohydrat, Glycerol (wasserfrei), Glycin, HCl, HEPES, Isopropanol, L-Leucin, LB-Agar (Lennox), LB-Medium (Lennox), MES, Methanol, Milchpulver (*blotting grade*), NaOH, Natriumacetat (wasserfrei), Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat, Natriumhydrogenphosphat, Orange G, Rotiphorese<sup>®</sup> Gel 40, TRIS

#### **GE Healthcare, Freiburg, Deutschland**

Amersham<sup>™</sup> ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, Amersham<sup>™</sup> Hybond<sup>™</sup> 0,45 PVDF Blotting Membran, Whatman<sup>®</sup> Glasfaserrundfilter GF/C 25 mm

**Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Deutschland**

Agarose LE, Ampicillin, TEMED

**Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich**

µClear® Zellkultur Polystyrol Mikroplatte 96 Well, schwarz, F-Boden

**Hartmann Analytics GmbH, Braunschweig, Deutschland**

[1-<sup>14</sup>C]-Natriumacetat, [<sup>14</sup>C]-Natriumformiat, [1-<sup>14</sup>C]-Natrium-L-Laktat

**ICN Biomedicals Inc., Aurora, USA**

Ethidiumbromid-Tabletten

**New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland**

OneTaq® DNA Polymerase, Restriktionsenzyme

**PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland**

PeqGold Prestained Protein Marker III

**Promega Corporation, Mannheim, Deutschland**

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

**Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland**

Ammoniumpersulfat, EDTA Lösung 100 mM pH 8.0, *Glass Beads (acid-washed)*, L-Alanin, L-Histidin, L-Tryptophan, Lithiumacetat, Methylmethanthiosulfonat, Natriumacetat, Pufferlösung pH 5.2, Natriumformiat, PEG 3015-3685, Whatman® Chromatography Paper Cellulose 3MM

**Simport Scientific, Beloeil, Kanada**

Szintillations-Fläschchen Snaptwist®

**Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland**

λ-DNA, ATP, CIAP, dNTPs, Fast AP Alkalische Phosphatase, Glycogen, PEG 6000, T<sub>4</sub> Polynukleotidkinase, Primer (Oligonukleotide), Restriktionsenzyme, T<sub>4</sub> DNA Ligase, T<sub>4</sub> DNA Polymerase

**Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting, Deutschland**

Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit

**Toronto Research Chemicals Inc., North York, Kanada**

4-Chloromercuribenzolsulfonat-Natriumsalz

**Zinsser Analytik GmbH, Frankfurt, Deutschland**

Quicksafe A Scintillationscocktail

## **2.2 Geräte**

**B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland**

Certomat® MO Laborschüttler

**Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland**

CEQ™ 8000 Genetic Analysis System DNA-Sequenziergerät, Optima™ XL-80K Ultrazentrifuge mit 50.2 Ti Rotor

**Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland**

Brutschrank, Wärmeschrank

**Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland**

PowerPac™ 200 SDS-PAGE Netzteil, Trans Blot SD® Semi-Dry Transfer Cell Western Blot Transfergerät

**Clemens GmbH, Waldbüttelbrunn, Deutschland**

Primus HT Thermocycler, Primus 25 Thermocycler

**Edmund Bühler GmbH, Bodelshausen, Deutschland**

WS-10 Wippschüttler, KL-2 Kombischüttler

**Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland**

Centrifuge 5424 R Kühlzentrifuge, BioPhotometer

**Elysia-Raytest GmbH, Straubenhardt, Deutschland**

Raytest IDA Gel-Dokumentationssystem

**Grant Instruments Ltd, Cambridge, UK**

Grant Bio PTR-30 Multifunktionsschüttler

**H + P Labortechnik, München, Deutschland**

Variomag Mono Magnetrührer

**Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland**

Kelvitron® T Brutschrank , Multifuge 1S-R Zentrifuge, Heraguard Reinluftwerkbank, Biofuge pico Zentrifuge, Function Line UT12 Trockenschrank

**Ilmvac GmbH, Ilmenau, Deutschland**

MPC 101 Z Membranpumpe Typ 400171 chemiefest

**Infors HT, Bottmingen, Schweiz**

Minitron Inkubationsschüttler

**Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland**

Kern ABS 120-4 Analysenwaage

**Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland**

Seven Compact™ pH/Ion-Messgerät, New Classic MS Semimikrowaage, PB 3002-S Delta Range® Präzisionswaage

**Mitsubishi Electric Corporation, Nagaokakyo-City, Japan**

P91E Videodrucker

**Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland**

Image Xpress Micro XLS Fluoreszenzmikroskop

**New Brunswick Scientific GmbH, Edison, USA**

TC-7 Schüttelrad, Innova U535 Ultratiefkühlschrank

**Oy Growth Curves Ab Ltd., Helsinki, Finnland**

Bioscreen C Automated Microbiology Growth Curve Analysis System

**Packard Instrument Company Inc., Downers Grove, USA**

Tri-Carb 2900TR Flüssigszintillationszähler

**Panasonic Deutschland, Hamburg, Deutschland**

NN-E245W Mikrowelle

**PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland**

Perfect Spin 24 Plus Mikrozentrifuge, Perfect Spin 24R Mikrokühlzentrifuge, S62C Heizblock, SDS-Gelgießstand und Laufkammer

**Pharmacia Biotech, Piscataway, USA**

EPS 300 Elektrophorese Netzteil

**Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland**

Lumi Imager F1TM

**Savant Instruments Inc., Farmingdale, USA**

SpeedVac™ DNA 110 Vakuumzentrifuge

**Scientific Industries, Bohemia, USA**

Vortex-Genie® 2 Vortexmischer

**SI Analytics GmbH, Mainz, Deutschland**

Lab 850 pH-Meter, Blue Line 12 pH-Elektrode

**Techne, Stone, UK**

Dri-Block® DB20 Heizblock

**Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland**

E1-ClipTip Mehrkanalpipette

**VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland**

Puranity TU 6 UV/UF Wasseraufbereitungssystem

**Zirbus Technology GmbH, Bad Grund, Deutschland**

Dampfsterilisator LTA 32/25

### 2.3 Kodierende DNA-Sequenzen

Die kodierenden Sequenzen für *PfFNT* und *EcFocA* lagen zu Beginn dieser Arbeit bereits in der Arbeitsgruppe vor und wurden freundlicherweise schon als Plasmid-DNA in den Vektoren pDRTxa und pUG35 von Marie Wiechert zur Verfügung gestellt.

Die kodierende Sequenz für *EcFocA* (Gen-ID: 945513) wurde in unserer Arbeitsgruppe aus genomischer *E. coli* DNA amplifiziert.

#### **Life Technologies, Carlsbad, USA**

Synthese der kodierenden Sequenz von *PfFNT* (PF3D7\_0316600) auf Grundlage von Daten aus der Datenbank PlasmoDB. Die *PfFNT* Sequenz wurden vor der Synthese für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* kodon-optimiert (Dissertation Dr. Sinja Bock, 2014).

#### **GenScript, Piscataway, USA**

Synthese der kodierenden Sequenzen auf Grundlage von Daten aus den Datenbanken PiroplasmaDB und ToxoDB: *TgFNT1* (TGGT1\_209800), *TgFNT2* (TGGT1\_292110), *TgFNT3* (TGGT1\_229170), *BbFNT* (BBOV\_I000410) und *TeFNT* (BEWA\_034910).

Die *TgFNT* Sequenzen wurden vor der Synthese für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae* mit *JCat* kodon-optimiert (189). Im Rahmen der Optimierung wurden folgende Schnittstellen für die Verkürzungen der Termini eingeführt:

*TgFNT1* $\Delta$ 294-ter über eine *Xho I*-Schnittstelle, *TgFNT2* $\Delta$ C350-ter über eine *SnaBI*-Schnittstelle, *TgFNT2* $\Delta$ 1-44 über eine *EcoRI*-Schnittstelle

#### **Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Göttingen, Deutschland**

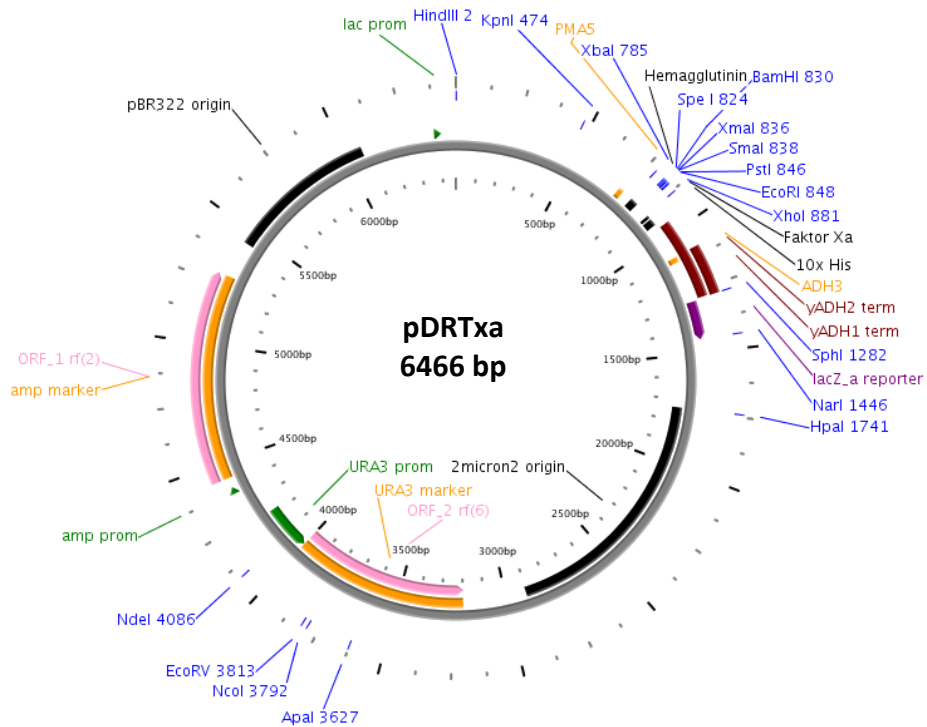
genomische DNA und cDNA aus *T. gondii*-Tachyzoiten (Stamm: NTE Typ II) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Carsten Lüder zur Verfügung gestellt.

#### **Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland**

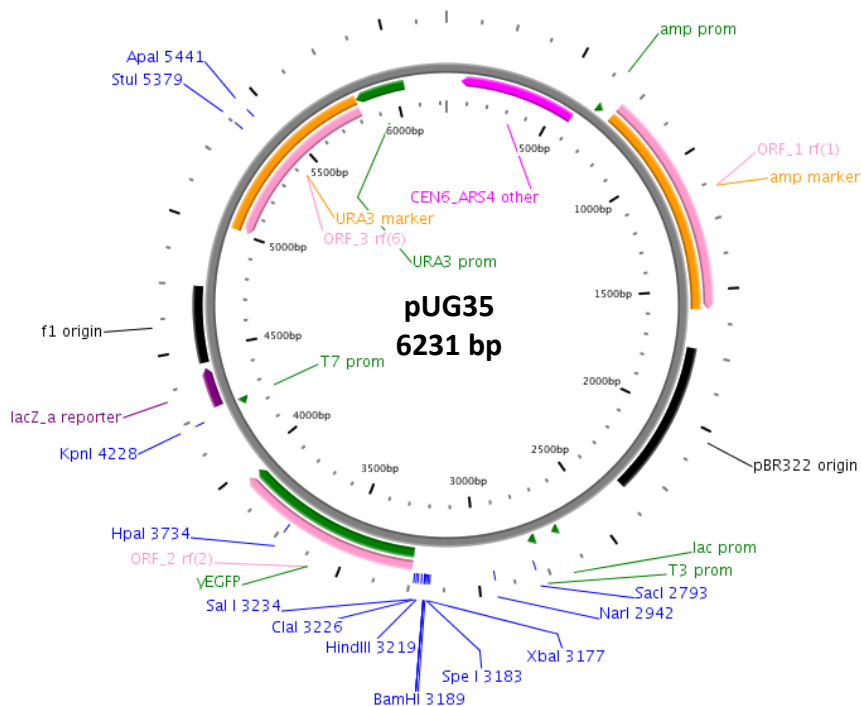
Synthese der kodierenden Sequenz für den *Snorkel-tag* nach Brown et al. (190).

## 2.4 Plasmide

Die Vektorkarten der verwendeten Plasmide wurden mittels Plasmapper erstellt (191).

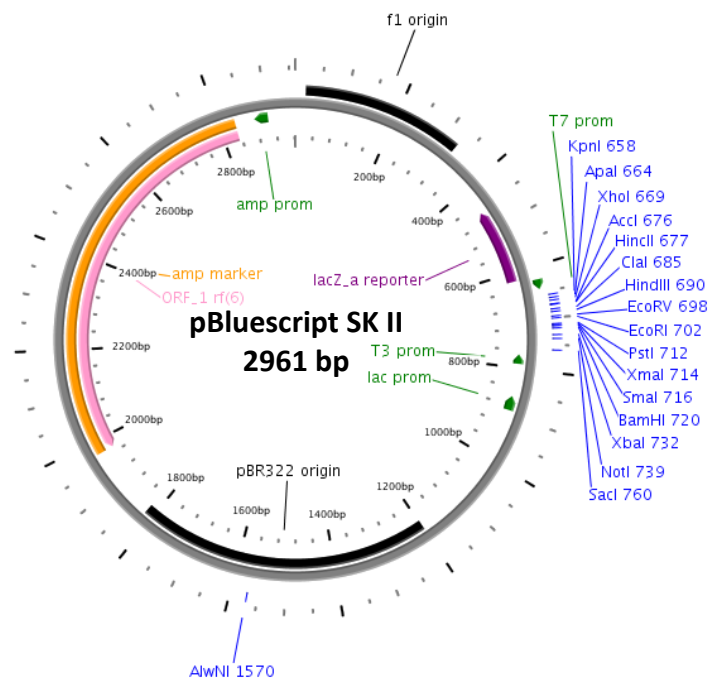


**Abb. 2.1** Modifizierter pDR196 Vektor zur Hefeexpression mit N-terminalem Hemagglutinin-tag, C-terminalem 10x Histidin-tag (His) und Faktor Xa-Schnittstelle.

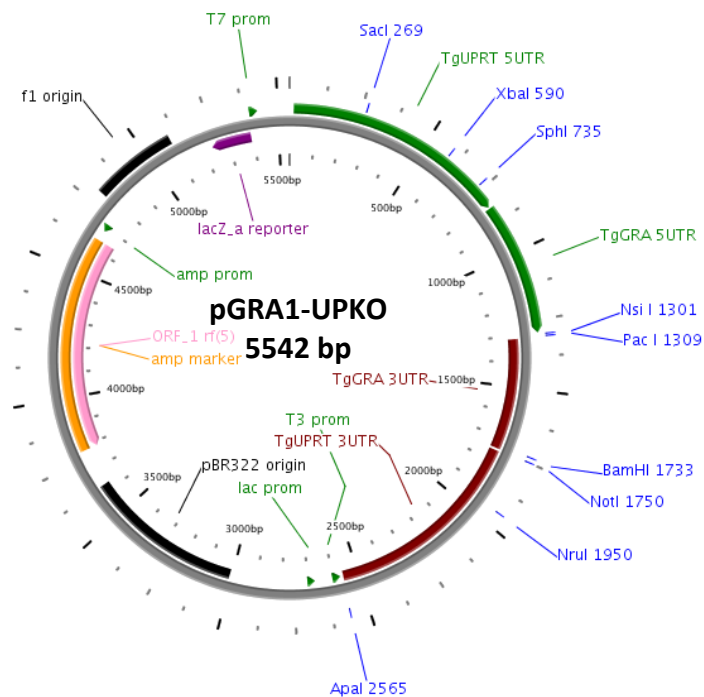


**Abb. 2.2** Vektor pUG35 zur Hefeexpression mit C-terminalem yEGFP-tag, einer für Hefen optimierten Variante des grünen fluoreszierenden Proteins (GFP) (192).

## Material und Geräte



**Abb. 2.3** Vektor pBluescript II SK (–) ist ein Standardvektor für Klonierungen und wurde im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich bei Sequenzierungen mit T7 und T3 Primern eingesetzt.



**Abb 2.4** Vektor pGRA1-UPKO für die *single-copy* Expression in *T. gondii* Parasiten über den UPRT-Lokus und Regulation von *TgGRA1*. Modifiziert aus dem Vektor pTKO-HXGPRT.



## 2.5 Primer (Oligonukleotide)

### Primersequenzen für Klonierungen:

**Tab. 2.1** Sequenzen der für die Klonierungen verwendeten Oligonukleotide, die verwendeten Schnittstellen sind unterstrichen. fw = *forward*, rv = *reverse*.

Primerbezeichnung	Primersequenz	Schnittstelle
wTgFNT1 fw	TTA <u>ACT AGT</u> ATG GTG GTG ACA GCG TCT CCG GAT AC	<i>Spe I</i>
wTgFNT1 rv	ATT <u>CTC GAG</u> GCT TGT CGC TGT GGG CGA G	<i>Xho I</i>
wTgFNT2 fw	ATA <u>ACT AGT</u> ATG TGC TCG ATA CCG CCA CTA CGG	<i>Spe I</i>
wTgFNT2 rv	ATA <u>CTC GAG</u> CAC TTG CTG GGC CAC CGA TTC	<i>Xho I</i>
wTgFNT3 fw	GAC <u>ACT AGT</u> ATG GTG CTT GCG GCC AGT C	<i>Spe I</i>
wTgFNT3 rv	TAT <u>GTC GAC</u> AAT GGT AGA CGC CGG GTG C	<i>Sal I</i>
optTgFNT1Δ277-ter fw	ATT <u>GCT AGC</u> AAA GTA TCG TAT GGC TGG GGC AGC TGC	<i>Nhe I</i>
optTgFNT1Δ277-ter rv	ATT <u>GTC GAC</u> AAT GCT GCC TTC CGC GGC GTC A	<i>Sal I</i>
optTgFNT2Δ1-73 fw	ATT <u>ACT AGT</u> ATG GTT GTT ACT GCT GGT GCT GAC GC	<i>Spe I</i>
optTgFNT2Δ1-73 rv	GTA <u>CTC GAG</u> AAC TTG TTG AGC AAC AGA TTC AGC AG	<i>Xho I</i>
optTgFNT3Δ277-ter fw	GCG <u>CTG CAG</u> TGT TTC TGT TTG GCT GTT GGT TGT AAC	<i>Pst I</i>
optTgFNT3Δ277-ter rv	GCA <u>CTC GAG</u> TGG CAA TGG TTG TCT AGC TTC TTG AAC	<i>Xho I</i>

### Gegenläufige Primersequenzen zur Kontrolle der wTgFNT3 Primer:

**Tab. 2.2** Gegenläufige Primersequenzen zur Kontrolle der wTgFNT3 Primer. fw = *forward*, rv = *reverse*

Primername	Primersequenz
TgFNT3_g_350 rv	TAG ACA GAC GAG CAA CAA GTC CAG TAT CGC
TgFNT3_g_4046 fw	AAA GCA TCG AAA GGT CTC TAC GTA GAG AGA

**Primersequenzen für die Sequenzierungen**

**Tab. 2.3** Primersequenzen die bei der Sequenzierung eingesetzt wurden. fw = *forward*, rv = *reverse*.

Primerbezeichnung	Primersequenz	Sinn
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	fw
T3	AAT TAA CCC TCA CTA AAG GG	rv
PMA5	CTC TCT TTT ATA CAC ACA TTC	fw
ADH3	GCG AAT TTC TTA TGA TTT ATG	rv
wTgFNT2_SeqPrim_350	ATA GAA GAG CGC CGG TCC AG	fw
wTgFNT2_SeqPrim_1050	CTC CTC CAG GCC TTT ATG GC	rv
optTgFNT2-Seq-476	CTG GTT CTT ACC CAA CTG AC	fw
optTgFNT2-Seq-952	GAA CAC ATC ATC GCT AAC AT	fw
optTgFNT1-Seq-Nhel	TTG GGT ACT ATG TTC TCT GC	fw
optTgFNT3_Seq	TGT TTT GCA AGA CCC AGA CC	fw

**Primersequenzen für die Mutagenese**

**Tab. 2.4** Primersequenzen, die bei der Mutagenese-PCR eingesetzt wurden. Das Kodon mit dem entsprechenden Basenaustausch ist unterstrichen. fw = *forward*, rv = *reverse*.

Primerbezeichnung	Primersequenz
BbFNT_S93G_fw	ACC GAC CTA GTC ACA GGC AAT TGT ATG AAC TTT
BbFNT_S93G_rv	TGT GAC TAG GTC GGT ACC AGT GAA TAC GAT
optTgFNT1_G93S_fw	GCA GAG CTG TTT ACA <u>AGT</u> AAT ACA ATG ACT
optTgFNT1_G93S_rv	TGT AAA CAG CTC TGC ACC GGT CAT GAT AAT
optTgFNT2_G166S_fw	GGT GCT GAA TTG TTC ACT <u>AGT</u> AAC ACT ATG AC
optTgFNT2_G166S_rv	AGT GAA CAA TTC AGC ACC AGT CAA GAT GAT
optTgFNT3_G93S_fw	GCT GAA TTG TTC ACT <u>TCT</u> AAC ACT ATG ACT
optTgFNT3_G93S_rv	AGT GAA CAA TTC AGC ACC AGT GAA GAT GAT

## 2.6 *E. coli*, *S. cerevisiae*, *T. gondii*-Stämme und humane Zellen

### ***Escherichia coli* Stamm:**

DH5 $\alpha$

Genotyp: F-  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 *recA1 endA1 hsdR17*( $r_{k-}$ ,  $m_{k+}$ ) *phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1*

### ***Saccharomyces cerevisiae* Stamm:**

W303-1A  $\Delta$ *jen1*  $\Delta$ *ady2*

Genotyp: MATa, *can1-100, ade2-1<sub>oc</sub>, his3-11-15, leu2-3,-112, trp1-1-1, ura3-1, jen1::kanMX4, ady2::hphMX4*

Der Hefestamm W303-1A  $\Delta$ *jen1*  $\Delta$ *ady2* wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Margarida Casal (University of Minho, Braga, Portugal) zur Verfügung gestellt.

### ***Toxoplasma gondii* Stamm:**

*Toxoplasma gondii* Typ I RH und *Toxoplasma gondii* Typ I RH-YFP

Genotyp: -*hxgprt*<sup>-</sup>

### **Humane Zelllinien:**

*Humane foreskin fibroblasts* (HFF) von CLS Cell Lines Service GmbH (Eppelheim, Deutschland)

## 2.7 Antikörper

### **Department of Microbiology and Molecular Medicine, Universität Genf, Schweiz**

Monoklonaler Hasen-Antikörper gerichtet gegen  $\alpha$ TgGAP45, wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Soldati-Favre zur Verfügung gestellt (193).

### **Jackson ImmunoResearch, Newmarket, UK**

Polyklonaler Ziegen-Antikörper gerichtet gegen die leichte Kette von Maus-IgG-Antikörpern, konjugiert mit Meerrettichperoxidase zur Detektion mit ECL Substrat.

### **Life Technologies, Waltham, USA**

Polyklonale Ziegen-Antikörper gerichtet gegen Maus oder Hasen-IgG-Antikörper konjugiert mit den Fluorophoren Alexa Fluor 488 oder Alexa Fluor 594 .

**Qiagen, Hilden, Deutschland**

Monoklonaler Maus-Antikörper gerichtet gegen die Penta-Histidin Peptidsequenz (HHHHH).

**Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland**

Monoklonaler Maus-Antikörper gerichtet gegen die Hemagglutinin Peptidsequenz (YPYDVPDYA).

## 2.8 Puffer, Kulturmedien, Lösungen

### 2.8.1 Molekularbiologie

#### Agarosegel-Elektrophorese

50x TAE-Puffer:	242 g TRIS, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 57,1 ml Eisessig, mit sterilem Wasser auf 1 l auffüllen, der pH sollte bei 8,5 liegen.
1x TAE-Puffer	40 ml 50x TAE Puffer, mit sterilem auf 2 l auffüllen.
Ethidiumbromid-Lösung	5 Ethidiumbromid-Tabletten (je 100 mg) in 50 ml sterilem Wasser lösen, lichtgeschützt bei 4 °C lagern.
0,5 M EDTA (pH 8,0)	46,5 g Na <sub>2</sub> EDTA, 250 ml steriles Wasser, dabei pH auf 8,0 einstellen, autoklavieren.
10x Orange G Ladepuffer	0,4 % Orange G, 30 % Glycerol, 100 mM EDTA in gewünschter Menge sterilem Wasser lösen. Aliquotieren und bei 4 °C lagern.
$\lambda$ -Pst I Größenmarker (0,05 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ )	100 $\mu\text{l } \lambda$ -DNA (30 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ ), 380 $\mu\text{l}$ steriles Wasser, 54 $\mu\text{l}$ 10x Pst I Puffer, 6 $\mu\text{l}$ Pst I (60 U), inkubieren bei 37 °C über Nacht, 60 $\mu\text{l}$ 10x Orange G Ladepuffer zugeben, aliquotieren, bei -20 °C lagern.

## Material und Geräte

### Nährmedien für *Escherichia coli*

LB-Flüssigmedium	20 g LB-Medium (Lennox), 1000 ml steriles Wasser, autoklavieren.
LB-Amp-Flüssigmedium	20 g LB-Medium (Lennox), 1000 ml steriles Wasser, autoklavieren. Zusatz von 0,01 % Ampicillin.
LB-Amp-Agarplatten	35 g LB-Agar (Lennox), 1000 ml gereinigtes Wasser, autoklavieren, Zusatz von 0,01 % Ampicillin.

### Nährmedien für *Saccharomyces cerevisiae*

YPD-Flüssigmedium	20 g Pepton, 10 g <i>Yeast Extract</i> , 20 g Glucose, 1000 ml steriles Wasser, autoklavieren.
YPD-Agarplatten	20 g Pepton, 10 g <i>Yeast Extract</i> , 20 g Glucose, 5 g Agar-Agar Kobe I, 1000 ml steriles Wasser, autoklavieren.
SD-AHLW-Medium	1,7 g <i>Yeast Nitrogen Base</i> , 5 g Ammoniumsulfat, 20 g Glukose, 1000 ml steriles Wasser, pH dabei auf 5,6 einstellen, autoklavieren, nach dem Abkühlen 5 ml Adenin (5 mg ml <sup>-1</sup> ), 1 ml L-Histidin (20 mg ml <sup>-1</sup> ), 5 ml L-Leucin (20 mg ml <sup>-1</sup> ) und 2 ml L-Tryptophan (5 mg ml <sup>-1</sup> ) zusetzen.
SD-AHLW-Agarplatten	1,7 g <i>Yeast Nitrogen Base</i> , 5 g Ammoniumsulfat, 20 g Glukose, 1000 ml steriles Wasser, pH dabei auf 5,6 einstellen, 20 g Agar zugeben, autoklavieren, nach dem Abkühlen 5 ml Adenin (5 mg ml <sup>-1</sup> ), 1 ml L-Histidin (20 mg ml <sup>-1</sup> ), 5 ml L-Leucin (20 mg ml <sup>-1</sup> ) und 2 ml L-Tryptophan (5 mg ml <sup>-1</sup> ) zusetzen.

### Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

TE-Puffer	158 mg TRIS-HCl, 29 mg EDTA mit sterilem Wasser auf 100 ml auffüllen, dabei pH auf 8,0 einstellen, autoklavieren
Lithiumacetat 1 M	16,5 mg Lithiumacetat, 250 steriles Wasser, autoklavieren
<i>single-stranded-carrier</i> -DNA (2 mg ml <sup>-1</sup> )	200 mg hochmolekulare DNA aus Lachssperma, 100 ml TE-Puffer, aliquotieren, bei -20 °C lagern, vor Gebrauch 5 min bei 100 °C erhitzen.

## Material und Geräte

Polyethylenglykol (50 %) 50 mg Polyethylenglykol 3015-3685, 35 ml steriles Wasser, lösen, auf 100 ml auffüllen, autoklavieren.

### 2.8.2 Proteinbiochemie

#### Isolation der mikrosomalen Fraktion aus *Saccharomyces cerevisiae*

Extraktionspuffer B 3 g TRIS, 10 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), 800 ml demineralisiertes Wasser, einstellen auf pH 7,5, auffüllen auf 1000 ml.

Puffer M 93,2 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 M), 6,8 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 M), 2,9 g NaCl, mit demineralisiertes auffüllen auf 1000 ml, dabei pH einstellen auf 8,0.

#### SDS-PAGE

4x Trenngelpuffer 36,4 g TRIS, 0,8 g SDS, mit demineralisiertem Wasser auf 200 ml auffüllen, dabei pH auf 8,8 einstellen.

4x Sammelgelpuffer 12,1 g TRIS, 0,8 g SDS, mit demineralisiertem Wasser auf 200 ml auffülle, dabei pH auf 6,8 einstellen.

10x Kathodenpuffer 144,1 g Glycin, 30,3 g TRIS, 10 g SDS, auffüllen auf 1000 ml mit demineralisiertem Wasser.

1x Kathodenpuffer 100 ml 10x Kathodenpuffer mit 900 ml demineralisiertem Wasser versetzen

4x SDS-Ladepuffer 3,5 ml demineralisiertes Wasser, 2,5 ml TRIS (1 M, pH 6,8), 2,5 ml Glycerol, 2 mg Bromphenolblau, 0,8 g SDS, 0,62 g Dithiothreitol, lagern bei -20 °C.

10 % APS 5 g Ammoniumpersulfat in 50 ml demineralisiertem Wasser lösen, lagern bei 4 °C.

#### Western Blot

5x Transferpuffer 7,6 g TRIS, 36,0 g Glycin, 0,9 g SDS, mit demineralisiertem Wasser auf 500 ml auffüllen.

1x Transferpuffer 10 ml 5x Transferpuffer, 10 ml Methanol, 30 ml demineralisiertes Wasser.

## Material und Geräte

10x TBS-Puffer	80 g NaCl, 24,3 g TRIS, mit demineralisiertem Wasser auf 1000 ml auffüllen, dabei pH auf 7,6 einstellen.
1x TBST-Puffer	100 ml 10x TBS-Puffer, 900 ml demineralisiertes Wasser, 1 ml Tween <sup>®</sup> 20.
M-TBST-Puffer	1,2 g Magermilchpulver, 40 ml 1x TBST-Puffer.

### 2.8.3 Aufnahme von <sup>14</sup>C-markierten Substraten in *Saccharomyces cerevisiae*

Assaypuffer pH 6,8	50 mM HEPES, 50 mM TRIS in sterilem Wasser im benötigten Volumen lösen, dabei pH auf 6,8 einstellen, sterilfiltrieren.
Assaypuffer pH 4,8	50 mM HEPES, 50 mM Citronensäure in sterilem Wasser im benötigten Volumen lösen, dabei pH auf 4,8 einstellen, sterilfiltrieren.
Substratlösung pH 6,8	5 mM Substrat (Acetat, Formiat oder L-Laktat) im Assaypuffer pH 6,8 im benötigten Volumen lösen, pH auf 6,8 einstellen, sterilfiltrieren.
Substratlösung pH 4,8	5 mM Substrat (Acetat, Formiat oder L-Laktat) im Assaypuffer pH 4,8 im benötigten Volumen lösen, pH auf 4,8 einstellen, sterilfiltrieren.

### 2.8.4 Phänotypisches Screening

L-Laktat-Selektionsmedium	1,7 g <i>Yeast Nitrogen Base</i> , 5 g Ammoniumsulfat, 2,5 g L-Laktat (= 0,25 %), 3,9 g MES, 1000 ml steriles Wasser, pH dabei auf 6,0 einstellen, autoklavieren, nach dem Abkühlen 5 ml Adenin (5 mg ml <sup>-1</sup> ), 1 ml L-Histidin (20 mg ml <sup>-1</sup> ), 5 ml L-Leucin (20 mg ml <sup>-1</sup> ) und 2 ml L-Tryptophan (5 mg ml <sup>-1</sup> ) zusetzen.
---------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## Material und Geräte

### 2.8.5 Parasitenkultur

PBS-Puffer	8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,42 g NaHPO <sub>4</sub> , 0,27 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , lösen in demineralisiertem Wasser, auf 1000 ml auffüllen
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Enthält Glukose (4500 mg l <sup>-1</sup> ), anorganische Salze (CaCl <sub>2</sub> , Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> , KCl, MgSO <sub>4</sub> , NaCl, NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , NHCO <sub>3</sub> ), Vitamine und Phenolrot
Cytomix Puffer	Enthält 120 mM KCl, 0,15 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 25 mM HEPES, 2 mM EGTA, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM Glutathion, 5 mM ATP



## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Herstellung kompetenter *Escherichia coli*

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte mit der Calciumchlorid-Methode (194). Aus einer Dauerkultur des *E. coli*-DH5 $\alpha$ -Stammes wurden Zellen auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 4 ml LB-Medium mit einer Kolonie von der Agarplatte in 4 ml LB-Medium inokuliert und bei 37 °C und 200 U min<sup>-1</sup> auf einem Laborschüttler inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde am Nachmittag eine Hauptkultur erstellt. Dafür wurden die 4 ml Vorkultur in einen 500 ml Erlenmeyerkolben überführt und 100 ml frisches LB-Medium zugegeben. Über Nacht wurde diese Hauptkultur bei 20 °C und 200 U min<sup>-1</sup> auf einem Laborschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde mit dem Photometer die optische Dichte bei  $\lambda = 600$  nm (OD<sub>600</sub>) bestimmt, die einen Rückschluss auf die Anzahl der gewachsenen Zellen zulässt. War eine OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 erreicht, wurde die Hauptkultur auf zwei 50 ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde bei 2.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Pellets mit 15 ml eiskalter 0,1 M Calciumchlorid-Lösung versetzt. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde die Pellets vorsichtig durch leichtes Schütteln resuspendiert und anschließend weitere 10 min auf Eis gekühlt. Die Zellsuspension wurde bei 2.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert, der Überstand verworfen, mit 10 ml eiskalter 0,1 M Calciumchlorid-Lösung versetzt und nach 20 min Kühlung auf Eis wieder vorsichtig resuspendiert. Die Zellsuspension wurde ein letztes Mal zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurden die Pellets mit 5 ml 0,1 M eiskalter Calciumchlorid-Lösung, die nun zusätzlich 20 % Glycerol enthielt, versetzt. Nach vorsichtigem Resuspendieren der Pellets wurden diese in einem Zentrifugenröhrchen vereinigt und für mindestens 4 h auf Eis inkubiert. Aus der Zellsuspension wurden nun 100  $\mu$ l-Aliquots hergestellt und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert. Zum Ermitteln der Kompetenz wurden die Zellen mit 1 ng Plasmid-DNA transformiert (3.1.2) und die gewachsenen Kolonien ausgezählt. Die Kompetenz der Zellen ergibt sich aus der Anzahl der koloniebildenden

Einheiten (KBE) pro  $\mu\text{g}$  Plasmid DNA und sollte mindestens  $10^6$  KBE  $\mu\text{g}^{-1}$  betragen um eine erfolgreiche Klonierung gewährleisten zu können.

### **3.1.2 Transformation von *Escherichia coli***

Ein Aliquot der wie unter 3.1.1 beschriebenen hergestellten kompetenten *E. coli*-Zellen wurde aus dem  $-80$  °C-Tiefkühlschrank entnommen und 3 min auf Eis gelagert, bis die Zellsuspension leicht anfangt aufzutauen. Nun wurden entweder  $0,2$   $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA oder der gesamte Ansatz einer Ligation (3.1.14) zugegeben und mit der Pipettenspitze sehr vorsichtig umgerührt. Da die Zellen in dieser Phase empfindlich sind, wurden sie nicht mit dem Vortexmischer oder durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei  $42$  °C für 1 min und eine anschließende Kühlung auf Eis für 2 min. Die Zellen wurden mit  $900$   $\mu\text{l}$  LB-Medium ohne Zugabe eines Selektions-Antibiotikums versetzt und 45 min in einem Schüttelrad bei  $37$  °C im Brutschrank inkubiert. Nun wurden die Zellen bei  $13.500$   $g$  für 30 s zentrifugiert,  $900$   $\mu\text{l}$  Überstand abgenommen und die restlichen  $100$   $\mu\text{l}$  nach Resuspendieren auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei  $37$  °C im Brutschrank inkubiert.

### **3.1.3 Schnelltransformation von *Escherichia coli***

Ein Aliquot der wie unter 3.1.1 beschrieben hergestellten kompetenten *E. coli*-Zellen wurde aus dem  $-80$  °C-Tiefkühlschrank entnommen und 3 min auf Eis gelagert, bis die Zellsuspension leicht anfangt aufzutauen. Nun wurden  $0,2$   $\mu\text{l}$  Plasmid-DNA zugegeben und es wurde mit der Pipettenspitze sehr vorsichtig umgerührt. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurde der gesamte  $100$   $\mu\text{l}$ -Ansatz auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei  $37$  °C im Brutschrank inkubiert.

### **3.1.4 Dauerkulturen von *Escherichia coli***

Um eine Kultur zur dauerhaften Lagerung von gentechnisch veränderten *E. coli*-Zellen anzulegen, wurde nach erfolgreicher Transformation eine einzelne Kolonie von der Agarplatte in  $5$  ml LB-Ampicillin-Medium überimpft. Nach Inkubation über Nacht bei  $37$  °C in einem Schüttelrad wurden dieser Flüssigkultur am nächsten Tag  $500$   $\mu\text{l}$  entnommen und mit  $500$   $\mu\text{l}$   $80$  % Glycerol versetzt. Nach sofortigem Mischen mit einem Vortexmischer wurden die Zellen bei  $-80$  °C zur Lagerung eingefroren. Zur Reaktivierung der Dauerkultur wurde diese wieder aus dem  $-80$  °C-Tiefkühlschrank entnommen und mit der Impföse etwas

Zellsuspension abgenommen. Diese wurde auf einer LB-Ampicillin-Agarplatte ausgestrichen und die Platte bei 37 °C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

### **3.1.5 Isolation von Plasmid-DNA**

Die Isolation der Plasmid-DNA beruht auf einer alkalischer Lyse der Zellen mit anschließender Bindung und Reinigung an Kieselgelsäulen. Dazu wurde das Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System benutzt. Zunächst wurde von einer LB-Amp-Agarplatte der gewünschten *E. coli* Kultur eine einzelne Kolonie in 5 ml LB-Amp-Medium überimpft und über Nacht auf einem Schüttelrad bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden von dieser Flüssigkultur 1,5 ml abgenommen und bei 13.500 *g* zentrifugiert und der Überstand abgenommen, um das Medium zu entfernen. Die Pellets wurden mit 200 µl Resuspensionspuffer versetzt und resuspendiert. Nun wurden 200 µl Lysepuffer zugegeben und durch Umschütteln gemischt. Nach 3 min wurde mit 300 µl Neutralisationspuffer neutralisiert. Nach einer Zentrifugation bei 13.500 *g* für 10 min wurde der Überstand auf Kieselgelsäulen gegeben. Die Säulen wurden 1 min bei 13.500 *g* zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Danach wurde mit 750 µl ethanolhaltigen Waschpuffer, anschließend mit 250 µl Waschpuffer gewaschen und die Säulen 3 min bei 13.500 *g* in der Zentrifuge getrocknet. Um die Plasmid-DNA zu eluieren wurden 30 µl steriles Wasser auf die Säule gegeben und es wurde für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und letztlich zur Elution bei 13.500 *g* für 2 min zentrifugiert.

### **3.1.6 Konzentrationsbestimmung von DNA mittels Absorptionsspektroskopie**

Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch Messung der Absorption von UV-Strahlung bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Biophotometer. In diesem Wellenlängenbereich besitzen Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum. Eine Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm erlaubt zusätzlich Aussagen über die Reinheit der Probe und eine mögliche Verunreinigung mit Proteinen, da diese durch die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan in diesem Bereich ihr Absorptionsmaximum besitzen. Die Reinheit wird über das Verhältnis von  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  ausgedrückt und liegt für eine proteinfreie Nukleinsäurelösung bei 1,8-2,0. Die Konzentrationsbestimmung wurde nach dem Gesetz von Lambert-Beer in einem linearen Absorptionsbereich von 0,2-0,8 durchgeführt und die zu bestimmende DNA-Probe dafür entsprechend verdünnt. Zur Bestimmung der Konzentration von Plasmid-DNA wurden 4 µl

DNA mit 96  $\mu\text{l}$  Wasser gemischt, in eine Quarzküvette gefüllt und vermessen. Die Konzentration ergibt sich durch Berechnung aus der Absorption bei 260 nm, der eingesetzten Verdünnung und einem für DNA spezifischen Multiplikationsfaktor, der im Falle von doppelsträngiger Plasmid-DNA bei  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  liegt.

### **3.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA mittels Agarose-Gelelektrophorese**

Da geringere Mengen von DNA nicht mehr zuverlässig mit dem Photometer vermessen werden können, wurde die Konzentration von Proben mit geringen DNA-Mengen mittels Agarose-Gelelektrophorese (3.1.12) bestimmt. Dies wurde insbesondere genutzt, um die benötigte DNA-Menge für Ligationsansätze zu berechnen. Um die Konzentration zu ermitteln, wurde 1  $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Probe mit etwas Ladepuffer versetzt und auf einem Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich wurden 5  $\mu\text{l}$   $\lambda$  / *Pst* I Größenmarker aufgetragen, der eine bekannte Konzentration von  $0,05 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$  besitzt. Durch Vergleich der Bandenintensitäten von Marker und Probe war es nun möglich die DNA-Konzentration der Probe abzuschätzen.

### **3.1.8 Amplifikation von DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Mit der PCR ist es möglich geringste Mengen an Template-DNA zu vervielfältigen. Diese Methode wurde unter anderem auch dazu genutzt, um neue Schnittstellen in ein bestehendes Konstrukt einzufügen oder Veränderungen daran vorzunehmen, wie zum Beispiel das Verkürzen eines Ausgangskonstruktes. Die Vervielfältigung von Template-DNA wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase und zwei passenden, gegenläufigen Oligonucleotid-Primern erreicht. Die Reaktion teilt sich in drei Schritte auf, der Denaturierung, der Anlagerung und der Elongation. Für jeden Schritt ist eine andere Temperatur notwendig, so dass ein Thermocycler verwendet wurde. Zur Durchführung der PCR wurden standardmäßig 0,5-1,0  $\mu\text{l}$  Template-DNA verwendet. Im Falle von Plasmid-DNA wurde diese vorher 1 : 100 verdünnt. Die eingesetzte Menge entsprach dann 25-50 pg. Dazu wurden weitere Komponenten nach Pipettierschema unter Kühlung auf Eis hinzugefügt (Tab. 3.1). Hierbei wurde beachtet, dass die DNA-Polymerase als Letztes pipettiert wurde, damit bei Zugabe die Konzentration des Puffers korrekt eingestellt war. Dies verhindert einen Aktivitätsverlust der Polymerase. Waren alle Komponenten durch Auf- und Abpipettieren gemischt, wurde die Probe in einen Thermocycler gestellt und die Reaktion mit einem entsprechenden Temperaturprogramm gestartet (Tab. 3.2).

## Methoden

**Tab. 3.1** Pipettierschema für die Polymerasekettenreaktion

0,5-1 µl	Template-DNA
10,0 µl	PCR-Reaktionspuffer 5x (9 mM MgCl <sub>2</sub> )
4,0 µl	dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)
1,5 µl	Primer <i>forward</i> (20 µM)
1,5 µl	Primer <i>reverse</i> (20 µM)
0,5 µl	DNA-Polymerase (1,25 U)
33,5-34,0 µl	steriles Wasser

**Tab. 3.2** Temperaturprogramm für die Polymerasekettenreaktion

95 °C	5 min	initiale Denaturierung	} 30 Zyklen
95 °C	30 s	Denaturierung	
T <sub>A</sub> °C	1 min	Anlagerung	
68 °C	1 min / kb	Elongation	
68 °C	5 min	finale Elongation	
8 °C	∞	Abkühlen und Lagerung	

Die Temperatur für die Anlagerung (T<sub>A</sub>) hing von den verwendeten Primern ab und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$T_A = 60 + 0,41 \times GC (\%) - 600 / N$$

GC (%) = Gehalt an Guanin und Cytosin in Prozent ; N = Anzahl der Basen des Primers

Die Primer wurden so gewählt dass sie einen GC-Gehalt von 40-60 % und eine T<sub>A</sub> zwischen 55 und 65 °C aufwiesen.

### 3.1.9 Restriktionsverdau

Für den Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen wurde 1 µg DNA mit 8 µl sterilem Wasser, dem zu verwendenden Restriktionsenzym und 1 µl des vom Hersteller vorgegebenen Reaktionspuffers in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 2-3 h bei 37 °C inkubiert. Für den Verdau mit zwei oder mehreren Restriktionsenzymen musste auf die Kompatibilität der Enzyme in den vorgegebenen Reaktionspuffern geachtet beziehungsweise ein geeigneter ausgewählt werden. Da nun mehr Enzym zugegeben vorhanden war, wurde das verwendete Volumen des sterilen Wassers entsprechend angepasst um wieder das Gesamtvolumen von 10 µl erreichen. Für einen Kontrollverdau von Plasmid-DNA wurden nur 250 ng DNA verdaut und nur 0,2 µl des zu verwendenden Enzyms eingesetzt.

### 3.1.10 Dephosphorylierung

Um die Effizienz einer Klonierung zu erhöhen, kann es hilfreich sein, das geschnittene Plasmid vor der Ligation zu dephosphorylieren, um eine Religation zu vermindern. Insbesondere bei Ligationen mit glatten Enden wurde deshalb eine Dephosphorylierung durchgeführt. Dafür wurde der Ansatz eines erfolgreichen Restriktionsverdaus ohne vorherige Reinigung mit 1 µl *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) versetzt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym durch Inkubation für 5 min bei 72 °C inaktiviert. Alternativ wurde 1 µl der schnelleren *Fast Alkaline Phosphatase* (FastAP) verwendet, mit der sich die Inkubationszeit von 60 min auf 10 min bei 37 °C verringert.

### 3.1.11 Glätten von überhängenden Basen

Die *Taq*-Polymerase erzeugt bei der PCR eine überhängende Base (meist ein Adenin), die im Falle einer direkten *blunt-end*-Klonierung des Produktes geglättet werden muss. Dies geschah mit gereinigtem PCR-Produkt unter Einsatz von 0,2 µl T<sub>4</sub>-Polymerase, 1 µl dNTPs (je 2,5 mM) und 2 µl entsprechend geeignetem Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl durch Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur und Inaktivierung des Enzyms bei 75 °C für 10 min. Daran schloss sich in der Regel eine Phosphorylierung an.

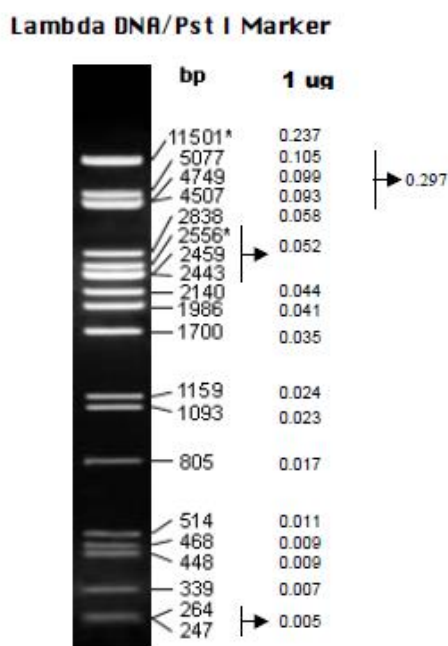
### 3.1.12 Phosphorylierung

Bei einer direkten *blunt-end*-Klonierung von PCR-Produkten konnte es notwendig sein, einen vorher mit T<sub>4</sub>-Polymerase geglätteten Überhang wieder zu phosphorylieren, insbesondere wenn das Konstrukt in ein dephosphoryliertes Plasmid eingebracht werden sollte. Dafür

wurden zum vorher inaktivierten T<sub>4</sub>-Polymerase-Ansatz direkt 2 µl ATP (10 mM) und 1 µl T<sub>4</sub>-Polynukleotid-Kinase zugegeben und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach Reinigung der DNA mittels chaotroper Salze konnte eine Ligation angeschlossen werden.

### **3.1.13 Agarose-Gelelektrophorese**

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Trennung kommt durch Anlegen von Spannung an ein Agarosegel in einer mit Puffer gefüllten Elektrophorese-Kammer zustande. Aufgrund der negativ geladenen Phosphatreste der DNA-Fragmente wandern diese zur Kathode. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt hierbei von der Größe des DNA-Fragments ab, wobei kleinere Fragmente schneller durch das Agarosegel wandern als größere Fragmente. Das Laufverhalten wird außerdem von der Porengröße des Agarosegels bestimmt, welche sich nach der verwendeten Konzentration an Agarose richtet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1 %ige Agarosegele verwendet, da die Größe der zu trennenden DNA-Fragmente bei 100-8.000 Basenpaaren lag. Dafür wurden 0,5 g Agarose mit 50 ml TAE-Puffer versetzt und in der Mikrowelle bis zum Lösen der Agarose erhitzt. Durch die Wärme verdampftes Wasser wurde ergänzt und 1 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg ml<sup>-1</sup>) zugegeben. Daraus wurde mit Hilfe eines Gelschlittens und eines Kammes ein Gel mit Taschen gegossen. Nach Aushärtung wurde dieses in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer überführt. Nachdem die DNA-Proben mit Ladepuffer versetzt wurden, konnte das Gel mit bis zu 20 µl pro Tasche beladen werden. Anschließend wurde eine Spannung von 120 V angelegt und die DNA-Fragmente für 20-30 min aufgetrennt. Die Detektion erfolgte bei UV-Licht. Das zugesetzte Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann bei einer Wellenlänge von 366 nm zur Fluoreszenz angeregt werden, wodurch eine Detektion der DNA-Fragmente möglich wird. Um die Größe der Banden anhand der Laufhöhe abzuschätzen, wurden zusätzlich zu den Proben 5 µl λ / Pst I Größenmarker aufgetragen (siehe Abb. 3.1). Um die Laufhöhe der detektierten Banden dauerhaft festzuhalten, wurde das Gel fotografiert und das entstandene Bild ausgedruckt. Zur weiteren Verwendung der DNA-Fragmente wurden diese mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend wurde eine Gelextraktion durchgeführt (3.1.14).



**Abb. 3.1** Größenmarker für die Agarose-Gelelektrophorese aus mit *Pst I* verdauter  $\lambda$ -DNA.

### 3.1.14 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um die DNA nach der Agarose-Gel-Elektrophorese weiter zu verwenden wurde diese mit dem HiYield<sup>®</sup> Gel DNA/PCR Extraction Kit extrahiert. Das Prinzip beruht auf Zusatz von chaotropen Salzen, die zum Auflösen der Agarose führen und zum Binden der DNA an eine Glasfasermatrix führen. Das ausgeschnittene Gelstück ( $\leq 300$  mg) wurde mit 500  $\mu$ l DF-Puffer versetzt und für 10-15 min bei 60 °C unter gelegentlichem Umschütteln inkubiert, bis das Gelstück vollständig gelöst war. Nach Abkühlen wurde die Probe in eine Glasfasersäule überführt, bei 15.000  $g$  für 30 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Daraufhin wurde zweimal mit 600  $\mu$ l Waschlösung gewaschen und nach Verwerfen des Durchflusses die Säule bei 15.000  $g$  für 3 min getrocknet. Zuletzt wurde die Säule mit 20  $\mu$ l sterilem Wasser versetzt, für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zentrifugation bei 15.000  $g$  für 2 min eluiert.

### 3.1.15 Reinigung von DNA mittels chaotroper Salze

Durch den Einsatz von chaotropen Salzen ist das HiYield<sup>®</sup> Gel DNA/PCR Extraction Kit auch für das Reinigen von PCR-Produkten oder mit Restriktionsenzymen verdauter DNA-Proben geeignet, da das Puffermilieu auch zum Denaturieren von Enzymen führt und beim Waschschriff der DNA an der Säule Puffersalze entfernt werden. Die DNA-Probe wurde mit der fünffachen Menge DF-Puffer gemischt, direkt auf die Glasfasersäule gegeben, bei 15.000  $g$



## Methoden

für 30 s zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Daraufhin wurde einmal mit 600 µl Waschpuffer gewaschen und nach Verwerfen des Durchflusses die Säule bei 15.000 g für 3 min getrocknet. Daraufhin wurde die Säule mit 20 µl sterilem Wasser versetzt, für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zentrifugation bei 15.000 g für 2 min eluiert.

### 3.1.16 Ligation

Um eine gewünschte DNA Sequenz in ein Plasmid einzubringen, müssen sowohl Sequenz als auch Vektor jeweils zur Generierung passender Enden über einen Restriktionsverdau (3.1.9) geschnitten werden. Um die Sequenz einzufügen und wieder ein komplettes Plasmid zu erhalten, wird eine Ligation durchgeführt. Die Vorgehensweise hängt hierbei von den verwendeten Restriktionsenzymen beziehungsweise den daraus resultierenden generierten Enden ab. Man unterscheidet zwischen Ligationen mit überstehenden Enden (*sticky ends*) und Ligationen mit glatten Enden (*blunt ends*). Die Ligation von überstehenden Enden ist in der Regel einfacher, da beide Enden komplementär zueinander sein müssen, um erfolgreich ligiert zu werden, und somit die Spezifität erhöht ist. Die Ligation der unspezifischeren glatten Enden ist schwieriger und wurde deshalb nur mit dephosphoryliertem Vektor (3.1.10) durchgeführt, um eine Religation zu minimieren. Zur Durchführung einer Ligation wurde zunächst die Konzentration der geschnittenen und gereinigten DNA mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (3.1.7) bestimmt. Für die Ligation wurden standardmäßig 25 ng des Vektors eingesetzt und, je nachdem welche Enden generiert wurden, die fünffache Stoffmenge bei einer Ligation mit überstehenden Enden oder die fünfzehnfache Stoffmenge bei einer Ligation mit glatten Enden verwendet. Zur Berechnung der erforderlichen Masse der DNA-Sequenz in ng wurde folgende vereinfachte Formel verwendet:

$$\text{Masse der Sequenz (ng)} = 125 \text{ ng} \times \frac{\text{Länge}_{\text{Sequenz}} \text{ (bp)}}{\text{Länge}_{\text{Vektor}} \text{ (bp)}}$$

Der Faktor von 125 ng am Anfang der Formel erhöht sich bei Ligationen mit glatten Enden entsprechend auf 375 ng. Mit den zuvor bestimmten Konzentrationen konnte nun das für

## Methoden

die Ligation benötigte Volumen an Sequenz und Vektor berechnet werden. Der Ligationsansatz wurde nach dem in Tabelle 3.3 aufgeführtem Pipettierschema durchgeführt.

**Tab. 3.3:** Pipettierschema für die Ligation

x $\mu$ l	DNA-Sequenz
x $\mu$ l	Plasmid-DNA
1 $\mu$ l	T <sub>4</sub> -DNA-Ligase-Puffer (10x)
1 $\mu$ l	T <sub>4</sub> -DNA-Ligase
1 $\mu$ l	PEG 4000 (nur bei glatten Enden)
ad 10 $\mu$ l	steriles Wasser

Es wurde darauf geachtet ein möglichst kleines Gesamtvolumen einzuhalten (< 20  $\mu$ l). Hat das errechnete Volumen für DNA-Sequenz und Vektor unter Einbeziehung der weiteren Komponenten zum Überschreiten des im Pipettierschema angegebenen Gesamtvolumens von 10  $\mu$ l geführt, wurde die Menge an Puffer und PEG 4000 entsprechend dem neuen Gesamtvolumen angepasst. Die Reaktion wurde für Ligationen mit überstehenden Enden 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und der gesamte Ansatz für die Transformation von kompetenten *E. coli*-Zellen verwendet (3.1.2). Bei Ligationen mit glatten Enden wurde die Inkubationszeit der Reaktion auf 60 min bei Raumtemperatur verlängert oder alternativ der Ansatz über Nacht bei 4 °C inkubiert.

### 3.1.17 Sequenzierung von DNA

Um die Richtigkeit einer DNA-Sequenz insbesondere nach Amplifikation eines Konstruktes durch PCR sicherzustellen, wurde diese sequenziert. Die Methode beruht auf einer Sanger-Sequenzierung (195) mit *Taq*-Polymerase. Diese ist eine spezielle Form der PCR, bei der zusätzlich zu normalen Desoxynukleotiden auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide eingesetzt werden. Wird von der Polymerase ein Didesoxynukleotid eingebaut, kommt es zum Stoppen der Reaktion und das gebildete Konstrukt wird nicht weiter verlängert. Daraus resultieren DNA-Fragmente verschiedener Länge, die eine Fluoreszenzmarkierung am Ende ihrer Sequenz besitzen. Trennt man diese mittels Kapillarelektrophorese der Größe nach auf, erhält man ein Elektropherogramm, das direkt die Sequenz des DNA-Templates wiedergibt. Die vier verschiedenen Basen werden durch vier verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe

## Methoden

abgebildet, die durch einen Laser angeregt werden. Die Durchführung der Sequenzierung erfolgte mit dem Genome™ Lab DTCS Quick Start Kit nach Pipettierschema in Tabelle 3.4. Danach wurde die Reaktion in einen Thermocycler gestellt und die PCR mit entsprechendem Temperaturprogramm gestartet (Tab 3.5).

**Tab. 3.4** Pipettierschema für die Sequenzier-Reaktion

x µl	DNA-Template (50-150 fmol)
ad 9,5 µl	steriles Wasser
<i>preheat</i> bei 86 °C zur Denaturierung	
1,5 µl	Sequenzierprimer (5 µM)
2,0 µl	DTSC-Mix

**Tab. 3.5** Temperaturprogramm für die Sequenzier-PCR

96 °C	20 s	Denaturierung	} 30 Zyklen
50 °C	20 s	Anlagerung	
60 °C	4 min	Elongation	
8 °C	∞	Abkühlen und Lagerung	

Anschließend wurden die Proben mittels Ethanolfällung aufgereinigt. Dazu wurden zur auf Eis befindlichen DNA 2 µl Natriumacetat Pufferlösung pH 5,2 (3 M), 2 µl Natrium-EDTA-Lösung pH 8,0 (100 mM) und 1 µl Glycogen (20 mg ml<sup>-1</sup>) dazugegeben, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und mit 60 µl eiskaltem 99 % Ethanol versetzt. Nach Zentrifugation bei 15.000 g für 15 min wurde der Überstand ohne das Pellet zu beschädigen entfernt. Das Pellet wurde nun zweimal mit 200 µl 70 % eiskaltem Ethanol gewaschen, wobei jeweils mit 15.000 g für 5 min zentrifugiert wurde. Um Rückstände des Ethanols zu entfernen, wurde das Pellet für 20 min in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und anschließend in 30 µl Sequenzier-Ladepuffer gelöst. Nun wurden die Proben in die Ladeplatte des Sequenzier-Gerätes aufgetragen, mit Öl überschichtet und eine Kapillarelektrophorese durchgeführt.

### 3.1.18 *In-vitro*-Mutagenese

Die Einführung von Punktmutationen in Proteine wurde durch eine *in-vitro*-Mutagenese der entsprechenden DNA nach dem Stratagene QuikChange-Protokoll durchgeführt. Der zur Mutation der Aminosäure führende Basenaustausch im entsprechenden Kodon wurde durch Primer eingeführt. Das gesamte Plasmid inklusive Mutationsstelle wurde mit dem in Tabelle 3.6 angegebenen Pipettierschema und dem in Tabelle 3.7 angegebenen Temperaturprogramm mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurde der Ansatz mit 1  $\mu\text{l}$  *Dpn I* versetzt und 2-3 h bei 37 °C inkubiert, um die Template-DNA zu verdauen. 10  $\mu\text{l}$  dieses Ansatzes wurden zur Transformation von *E. coli*-Zellen verwendet. Von der resultierenden LB-Ampicillin-Agarplatte wurden einzelne Klone gepickt und die Plasmid-DNA (3.1.5) isoliert. Die erfolgreiche Mutagenese der einzelnen Klone wurde daraufhin mittels Sequenzierung (3.1.17) verifiziert.

**Tab. 3.6** Pipettierschema für die *in-vitro*-Mutagenese

0,5 $\mu\text{l}$	Plasmid-DNA
5,0 $\mu\text{l}$	<i>Pfu I</i> Reaktions-Puffer (10x)
4,0 $\mu\text{l}$	dNTP-Mix (jeweils 2,5 mM)
1,5 $\mu\text{l}$	Primer <i>forward</i> (25 $\mu\text{M}$ )
1,5 $\mu\text{l}$	Primer <i>reverse</i> (25 $\mu\text{M}$ )
0,8 $\mu\text{l}$	<i>Pfu I</i> Turbo AD DNA-Polymerase (2 U)
36,7 $\mu\text{l}$	steriles Wasser

**Tab. 3.7** Temperaturprogramm für die *in-vitro*-Mutagenese

95 °C	30 sek	initiale Denaturierung	} 16 Zyklen
95 °C	30 sek	Denaturierung	
55 °C	1 min	Anlagerung	
68 °C	2 min / kb	Elongation	
68 °C	20 min	finale Elongation	
8 °C	$\infty$	Abkühlen und Lagerung	

### 3.1.19 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Transformation selbst beruht auf der Lithiumacetat/*single-stranded-carrier*-DNA/Polyethylenglykol-Methode (196). Um ein gewünschtes Protein in Hefen herzustellen, musste die entsprechende kodierende DNA-Sequenz jedoch zunächst in ein für Hefe geeignetes Plasmid kloniert werden. Hierzu wurde die entsprechende Sequenz über *Spe I* / *Xho I* oder *Spe I* / *Sal I* in den Expressionsvektor pDRTxa kloniert. Der Vektor enthält das URA3-Gen, das für das Enzym Orotidin-5-Phosphat-Decarboxylase kodiert und so eine Selektion der erfolgreich transformierten Hefen möglich macht. Die Selektion erfolgt über den Zusatz von bestimmten Aminosäuren zum Medium, die nur von erfolgreich transformierten Hefen verstoffwechselt werden können. Wächst die Hefe also auf dem Selektionsmedium, ist die entsprechende DNA-Sequenz mit Plasmid eingeführt worden und das Protein wird hergestellt. Für die Transformation wurde der Hefestamm W303-1A, der die endogenen Monocarboxylat-Transporter *jen1* und *ady2* nicht exprimiert (197), aus einer Dauerkultur auf einer YPD-Platte unter der Reinluftwerkbank ausgestrichen und für 3-5 Tage im Brutschrank bei 30 °C inkubiert. Von dieser Platte wurde nachmittags eine einzelne Kolonie mit der Impföse in 5 ml YPD-Flüssigmedium überimpft und diese Vorkultur über Nacht bei 30 °C im Brutschrank unter Schütteln (200 U min<sup>-1</sup>) inkubiert. Am nächsten Tag wurde für fünf Transformationen aus der Vorkultur eine 25 ml-Hauptkultur mit einer OD<sub>600</sub> von 0,2 in YPD-Flüssigmedium erstellt. Dazu wurde zunächst die OD<sub>600</sub> der Vorkultur bestimmt und daraus berechnet wie viel Volumen davon zur Herstellung der Hauptkultur benötigt wurde. Die Hauptkultur wurde für 3-5 h im Brutschrank bei 30 °C unter Schütteln inkubiert bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht war. Zum Ernten wurde die Kultur in ein 50 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und für 5 min bei 2.500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Hefepellet mit 20 ml sterilem Wasser gewaschen und es wurde nochmals zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet unter einer Reinluftwerkbank mit 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde mit 13.500 g für 30 s zentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit der Pipette abgenommen, das Pellet in 500 µl sterilem Wasser resuspendiert und mit jeweils 100 µl auf fünf Reaktionsgefäße aufgeteilt. Nach erneuter Zentrifugation bei 13.500 g für 30 s und Abnahme des Überstandes mit der Pipette wurden in jedes Reaktionsgefäß 360 µl Transformationsmix, bestehend aus den in Tabelle 3.8 aufgeführten Komponenten, zugegeben. Die *single-stranded-carrier*-DNA musste zuvor durch 5 minütiges Inkubieren bei

## Methoden

100 °C linearisiert werden. Sobald der Transformationsmix vorgelegt worden war, wurde in jedes Reaktionsgefäß 0,8 µl der gewünschten Plasmid-DNA pipettiert, die Proben resuspendiert und bei 42 °C für 45-60 min in einem Heizblock inkubiert. Danach wurden die Proben 30 s bei 13.500 g zentrifugiert, der Transformationsmix wurde abgenommen und das Zellpellet in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert. Davon wurden 100 µl abgenommen und durch Zugabe von 900 µl Wasser eine 1 : 10 Verdünnung erstellt. Von dieser Verdünnung wurden 100 µl auf einer Selektions-Agarplatte ausgestrichen und 3-5 Tage bei 30 °C im Brutschrank inkubiert.

**Tab. 3.8** Transformationsmix für die Hefe-Transformation

240 µl	Polyethylenglykol 3015-3685 (50 %)
50 µl	<i>single-stranded-carrier</i> DNA
36 µl	Lithiumacetat 1 M
34 µl	steriles Wasser

### 3.1.20 Dauerkulturen von *Saccharomyces cerevisiae*

Um Dauerkulturen der transformierten Hefen zu erstellen wurde eine einzelne Kolonie von der Selektions-Agarplatte mit der Impföse in 5 ml Flüssigmedium überimpft und 24 h bei 30 °C im Brutschrank unter Schütteln (200 U min<sup>-1</sup>) inkubiert. Davon wurden 500 µl Hefesuspension abgenommen, mit 500 µl 80 % Glycerol gemischt und bei -80 °C eingefroren. Zur Reaktivierung der Dauerkultur wurde diese aus dem -80 °C-Tiefkühlschrank entnommen, mit der Impföse etwas Zellsuspension abgenommen, auf einer Selektions-Agarplatte ausgestrichen und bei 30 °C für 3-5 Tage im Brutschrank inkubiert.

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 Isolation der mikrosomalen Fraktion aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zunächst wurde eine Hefevorkultur erstellt indem von einer Selektionsplatte eine einzelne Kolonie mit der Impföse in 5 ml SD-AHLW-Flüssigmedium überimpft wurde. Nach Inkubation im Brutschrank bei 30 °C über 24 h unter Schütteln bei 200 U min<sup>-1</sup> wurde von dieser Vorkultur eine 100 ml-Hauptkultur in SD-AHLW-Flüssigmedium erstellt. Dazu wurde die OD<sub>600</sub> der Vorkultur mit einem Photometer bestimmt. Das benötigte Volumen an Vorkultur

## Methoden

wurde anhand der Generationszeit, der Ziel OD<sub>600</sub> und der geplanten Wachstumszeit (z.B. über Nacht für 16 h) berechnet. Das ausgerechnete Volumen wurde pipettiert, 100 ml Medium zugegeben und die Kultur wurde über Nacht bei 30 °C im Brutschrank unter Schütteln bei 200 U min<sup>-1</sup> inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur bei einer OD<sub>600</sub> von 1,0 ± 0,1 durch Zentrifugation bei 3000 U min<sup>-1</sup> für 5 min bei 4 °C geerntet. Darauf folgten Waschschriffe mit 50 ml eiskaltem Wasser und 10 ml eiskaltem Extraktionspuffer B mit jeweiliger nachfolgender Zentrifugation unter denselben Bedingungen. Das Zellpellet wurde nun entweder 20 min bei -80 °C im Tiefkühlschrank eingefroren oder dort für eine spätere Weiterverarbeitung gelagert. Das gefrorene Zellpellet wurde auf Eis aufgetaut und mit 500 µl Extraktionspuffer B versetzt und es wurden 0,5 g säuregewaschenen *glass beads* hinzugefügt. Um die Zellen aufzuschließen, wurde nun zehnmal für 30 s auf dem Vortexmischer gemischt, wobei die Zellen zwischen den Intervallen jeweils 1 min auf Eis gekühlt wurden. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dem Pellet wurden nochmals 500 µl Extraktionspuffer B zugesetzt, es wurde mit dem Vortexmischer gemischt und 5 min bei 1.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit den vorherigen 500 µl vereinigt und 5 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert, um die restlichen Zelltrümmer zu entfernen. Um die mikrosomale Fraktion zu isolieren, wurde der Überstand mit der Ultrazentrifuge bei 100.000 g und 4 °C für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Pellet mit 100 µl Puffer M resuspendiert. Zur Vorbereitung für die Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) (3.2.3) wurde der Proteingehalt bestimmt (3.2.2) und anschließend 33,5 µl 4x SDS-Ladepuffer zugegeben sowie die Probe bei 37 °C für 30 min unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Nun wurde entweder direkt eine SDS-PAGE durchgeführt oder die Probe bei -20 °C zur späteren Verwendung gelagert.

### 3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung des Proteingehaltes eines Hefeaufschlusses wurde photometrisch nach dem Bradford-Test durchgeführt und beruht auf der Bindung von Coomassie-Brilliant-Blau G-250 an Proteine (198). Daraufhin verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Verbindung von 465 nm auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Es wurde eine Kalibrierung mit verschiedenen BSA

## Methoden

Konzentrationen im Lambert-Beer'schen-Bereich vorgenommen. Bei der Vermessung der Proben wurde darauf geachtet, diese so zu verdünnen, dass die Absorptionen im kalibrierten Bereich lagen. Dazu wurden 1-8  $\mu\text{l}$  Probe auf 800  $\mu\text{l}$  mit sterilem Wasser aufgefüllt und 200  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz zugegeben. Zusätzlich wurde eine Messung ohne Protein durchgeführt, um die Eigenabsorption des Bradford-Reagenzes zu berücksichtigen. Aus der BSA-Kalibriergerade, der Absorption und dem Verdünnungsfaktor wurde nun die Proteinkonzentration in  $\mu\text{g ml}^{-1}$  der Probe berechnet. Die Messung der Proteinkonzentration musste vor der Zugabe von Natriumlaurylsulfat zur Probe erfolgen, da dieses den Nachweis stören würde.

### 3.2.3 Natriumlaurylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei dieser Methode werden Proteine nach vorheriger Denaturierung mit Natriumlaurylsulfat (SDS) ihrem Molekulargewicht nach unter Verwendung von Polyacrylamid-Gelen elektrophoretisch (PAGE) aufgetrennt (199). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode zur Auftrennung der aus Hefen isolierten Proteine verwendet. Zunächst wurde das Polyacrylamid-Gel nach Pipettierschema in Tab 3.9 erstellt, das aus einem 12,5 %igen Trenngel und einem 6 %igen Sammelgel besteht.

**Tab. 3.9** Pipettierschema für die Herstellung von 12,5 %igen Polyacrylamid-Gelen

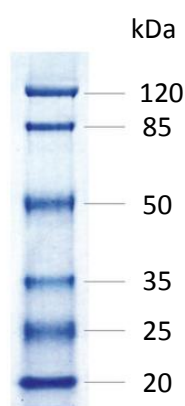
Trenngel	Sammelgel	
5,25 ml	2,4 ml	demineralisiertes Wasser
3,0 ml	--	4x Trenngelpuffer
--	1,0 ml	4x Sammelgelpuffer
3,75 ml	0,6 ml	Acrylamid-Lösung 40 %
10 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$	TEMED
80 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$	APS 10 %

Dazu wurden eine Glas- und eine Keramikplatte in eine Gelgießstation eingespannt und das Trenngel-Gemisch in einen durch zwei *Spacer* realisierten Zwischenraum pipettiert. Um eine gerade Kante zu erhalten, wurde das Gemisch mit Isopropanol überschichtet. Nach dem



## Methoden

Aushärten wurde dieses wieder entfernt und das Sammelgel-Gemisch pipettiert sowie ein Kamm hinzugefügt um Taschen für die Proben zu erhalten. Nach dem Aushärten wurde es in die Auftrennungsapparatur überführt, diese mit Kathodenpuffer befüllt und die zuvor mit SDS-Ladepuffer versetzten Proben in die Taschen pipettiert. Wenn nicht anders angegeben, wurden 25 µg Protein pro Tasche aufgetragen. Um das Molekulargewicht feststellen zu können, wurden 3 µl Proteingrößenmarker (Abb. 3.2) mit aufgetragen. Die initiale Konzentrierung der Proben im Sammelgel erfolgte bei 160 V für 10-15 min und die anschließende Auftrennung im Trenngel bei 200 V für 60 min. Zur Detektion der Proteine wurde anschließend ein Western-Blot durchgeführt.



**Abb 3.2** Proteingrößenmarker PeqGOLD Marker III (*prestained*) für die SDS-PAGE

### 3.2.4 Western-Blot

Zur spezifischen Detektion von Proteinen wurden diese mit dem Western-Blot-Verfahren auf eine PVDF-Membran übertragen und über Antikörper sichtbar gemacht (200). Dafür wurde die Membran 60 s in Methanol aktiviert und zusammen mit sechs Whatman®-Papieren 5 min lang in Transferpuffer inkubiert. Auf der Blotapparatur wurde entsprechend dem *semi-dry electro blot*-Verfahren ein sogenanntes „Western-Blot-Sandwich“ erstellt. Dafür wurden zunächst drei Whatman®-Papiere auf die Blotapparatur gelegt. Darauf folgte die PVDF-Membran, auf die wiederum das Polyacrylamid-Gel aus der SDS-PAGE gelegt wurde. Nach Bedecken mit drei weiteren Whatman®-Papieren wurde die Blotapparatur geschlossen und durch Anlegen einer Spannung von 17 V für 1 h wurden die Proteine auf die Membran übertragen. Um die Proteine mit Antikörpern sichtbar zu machen, wurde die Membran durch Inkubation mit 20 ml M-TBST-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler geblockt. Dies verringerte unspezifische Bindungen der Antikörper.

## Methoden

Anschließend wurde der primäre, spezifische Antikörper, der gegen eine entsprechende Aminosäuresequenz im Protein gerichtet war, dazugegeben. Dazu wurde dieser 1 : 5000 mit M-TBST-Puffer verdünnt, auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal mit 15 ml TBST-Puffer jeweils 15 min gewaschen und danach mit dem sekundären Antikörper versetzt, der gegen den ersten Antikörper gerichtet war und zusätzlich eine Konjugation mit Meerrettichperoxidase aufwies. Der Antikörper wurde 1 : 5000 mit M-TBST-Puffer verdünnt und die Membran nach Zugabe 1 h bei Raumtemperatur auf einem Wippschüttler inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal mit 15 ml TBST-Puffer für jeweils 15 min gewaschen und die Membran mit ECL entwickelt. Die Detektion der so entstandenen Chemilumineszenz wurde der Lumi Imager F1TM verwendet.

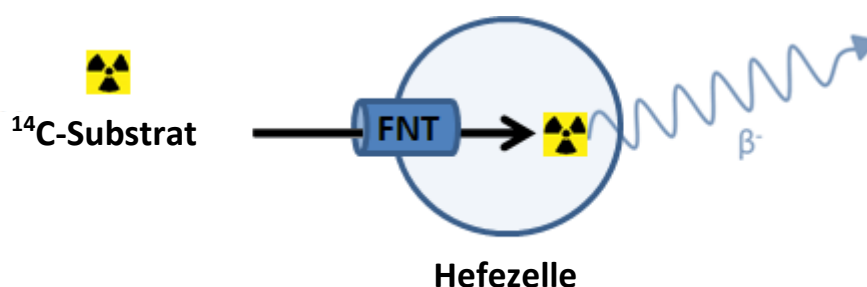
### **3.3 Fluoreszenzmikroskopie von GFP-markierten Membranproteinen**

Um einen Hinweis auf die Lokalisation der in Hefen exprimierten Membranproteine zu bekommen, wurden diese mit dem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) C-terminal fusioniert. Dafür wurden die Konstrukte zunächst in den Hefe-Expressionsvektor pUG35 über *Spe I / Sal I* umklontiert, der die kodierende Sequenz des GFPs enthält. Mit diesen Konstrukten wurden Hefen transformiert (3.1.19) und davon eine einzelne Kolonie in 5 ml SD-AHLW-Selektionsmedium überimpft und diese über Nacht bei 30 °C unter Schütteln bei 220 U / min<sup>-1</sup> inkubiert. Am nächsten Tag wurde die OD<sub>600</sub> der Kulturen gemessen und so viel von der Kultur abgenommen, dass die OD<sub>600</sub> in 1 ml 1,34 betrug. Die Hefensuspension wurde 3 min bei 4.000 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen, um das Medium zu entfernen, und einmal mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Das durch erneute Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und mit dem Vortexmischer gemischt. Nun wurden 20 µl Hefensuspension mit 130 µl sterilem Wasser verdünnt und die gesamten 150 µl in ein Well einer 96 Well Mikrotiterplatte pipettiert. Diese Platte war speziell für die Fluoreszenzmikroskopie geeignet, da der Boden eine hohe Transparenz besaß. Während die Platte 30 min lang stehen gelassen wurde, damit die Hefen absinken, wurde das Fluoreszenzmikroskop angeschaltet und die Temperierung auf 25 °C eingestellt. Zum Mikroskopieren wurde das Objektiv mit 100facher Vergrößerung ausgewählt. Die Aufnahme der Bilder erfolgte zuerst unter Durchlicht und anschließend mit einem Filter für die Wellenlänge von GFP (Anregung 472 nm, Emission 520 nm).

### 3.4 Aufnahme von $^{14}\text{C}$ -markierten Substraten in *Saccharomyces cerevisiae*

#### 3.4.1 Prinzip der Messung

Für die direkte Messung der Funktion von Formiat-Nitrit-Transportern (FNT) wurde die Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -markierten Substraten wie Acetat, Formiat und L-Laktat in eine definierte Menge FNT produzierender Hefezellen gemessen (Abb 3.3).



**Abb. 3.3** Aufnahme von radioaktiv-markierten Substrat in Hefezellen über einen exprimierten Formiat-Nitrit-Transporter (FNT).

Die verwendete Hefe W303-1A ist ein *knockout*-Stamm, bei dem die endogenen Monocarboxylat-Transporter *jen1* und *ady2* ausgeschaltet sind. Eine Aufnahme der Substrate über die Hefe-Plasmamembran ist so nur noch durch den exprimierten Formiat-Nitrit-Transporter oder durch passive Diffusion über die Membran möglich.  $^{14}\text{C}$  ist ein instabiles Isotop des Kohlenstoffes, das unter Freisetzung von  $\beta^-$ -Strahlung mit einer Halbwertszeit von 5730 Jahren zerfällt. Um den für die Messung verwendeten Konzentrationsgradienten zu erreichen, wurde eine kleinere Menge radioaktiv-markiertes („heißes“) Substrat zu einer größeren Menge nicht radioaktiv-markiertem („kaltem“) Substrat zugemischt. Dies entspricht §6 der Strahlenschutzverordnung zur Dosisreduzierung und spart gleichzeitig Kosten. Da sich das  $^{14}\text{C}$ -Isotop im chemischen Verhalten nicht vom kalten Substrat unterscheidet, werden sie in gleicher Weise vom Transporter aufgenommen. Mit einem bekannten Verhältnis von heißem zu kaltem Substrat erlauben die erhaltenen Werte also einen Rückschluss auf die aufgenommene Gesamtmenge an Substrat in die Hefe. Um die Menge an aufgenommenen  $^{14}\text{C}$  zu bestimmen, wurden die Proben in mit Szintillationsflüssigkeit gefüllte Vials überführt und mit einem Szintillationscounter ausgewertet. In der Szintillationsflüssigkeit sind die lipophilen, aromatischen Verbindungen

## Methoden

p-Ethoxynonylphenol und Diisopropyl-naphthalin enthalten. Diese können durch  $\beta^-$ -Strahlung angeregt werden und emittieren Lichtsignale, die über zwei Photomultiplier verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt werden. Man erhält die Anzahl an Signalen pro Minute (*cpm = counts per minute*) die mit der aufgenommenen Menge an  $^{14}\text{C}$ -markiertem Substrat korreliert. Rechnet man nun die Molarität und das Verhältnis von heißem zu kaltem Substrat mit ein und bezieht dies auf die Hefe-Trockenmasse bei einer bestimmten Zellzahl, erhält man die aufgenommene Stoffmenge Substrat pro mg Hefe für die gemessene Probe.

### 3.4.2 Zeitabhängige Substrataufnahme

Für die Messung wurde von einer SD-AHLW-Selektionsplatte eine einzelne Hefekolonie in 5 ml SD-AHLW-Flüssigmedium überführt und 24 h bei 30 °C unter Schütteln im Brutschrank inkubiert ( $200 \text{ U min}^{-1}$ ). Am nächsten Tag wurde von dieser Vorkultur eine 100-200 ml Hauptkultur in SD-AHLW-Flüssigmedium erstellt. Dazu wurde die  $\text{OD}_{600}$  der Vorkultur photometrisch bestimmt und das benötigte Volumen anhand der Generationszeit, der Ziel- $\text{OD}_{600}$  und der geplanten Wachstumszeit berechnet. Nach Pipettieren des entsprechenden Volumens an Vorkultur und Zugabe von 100-200 ml SD-AHLW-Flüssigmedium wurde die Hauptkultur über Nacht bei 30 °C im Brutschrank unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde bei einer  $\text{OD}_{600}$  von  $1,0 \pm 0,1$  durch Zentrifugation bei  $4.000 \text{ U min}^{-1}$  für 5 min bei 4 °C geerntet. Nach Waschen mit 25 ml sterilem Wasser wurde die Hefekultur mit Messpuffer auf eine  $\text{OD}_{600}$  von  $50,0 \pm 5,0$  eingestellt und auf Eis bis zur Messung gelagert. Im Isotopenlabor wurde eine für die Messung benötigte Menge 5 mM Substratlösung mit einer vorher berechneten Menge an  $^{14}\text{C}$ -markiertem Substrat versetzt. Das molare Verhältnis von kaltem zu heißem Substrat war 1 : 136 und pro Messpunkt wurde eine Aktivität von 0,04  $\mu\text{Ci}$  verwendet. Zu 80  $\mu\text{l}$  eingestellter Hefekultur wurden nun 20  $\mu\text{l}$  radioaktiver Substratlösung zugegeben und die Substrataufnahme zu einem vorher definierten Zeitpunkt durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Wasser gestoppt. Der entstandene Konzentrationsgradient betrug 1 mM Substrat. Die Hefesuspension wurde nun auf eine GF/C-Filtermembran gegeben und über eine Membranpumpe abgesaugt. Die Hefezellen verblieben auf dem Filter und wurden mit 7 ml eiskaltem Wasser gewaschen, um noch oberflächlich vorhandene Aktivität von den Hefen zu entfernen. Die Filtermembran wurde in ein mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit gefülltes Vial überführt, mit dem Vortexmischer gemischt und 24 h stehen gelassen, bis der Filter sich aufgelöst hatte. Um die maximale Aktivität, die in 20  $\mu\text{l}$  radioaktiver

Substratlösung enthalten ist, zu bestimmen, wurde die entsprechende Menge direkt in ein mit Szintillationsflüssigkeit gefülltes Vial pipettiert. Die Proben wurden nochmal gemischt und mit einem Szintillationscounter ausgewertet. Für jeden Zeitpunkt wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Aus den erhaltenen Aufnahmekurven konnte durch exponentielles oder lineares *fitting* die Transportrate bestimmt werden.

### **3.4.3 pH-abhängige Substrataufnahme**

Die Messung der pH-abhängigen Aufnahme entsprach der Durchführung für eine zeitabhängige Aufnahme. Die Hauptkultur wurde hier jedoch nach dem Ernten und Waschen auf zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und jeweils mit Messpuffer pH 6,8 oder Messpuffer pH 4,8 auf eine OD<sub>600</sub> 50,0 ± 5,0 eingestellt. Auch die Substratlösungen wurden jeweils mit dem entsprechenden Messpuffer hergestellt. Die Messung resultierte in zwei verschiedenen Aufnahmekurven, die aus der gleichen Hauptkultur generiert wurde.

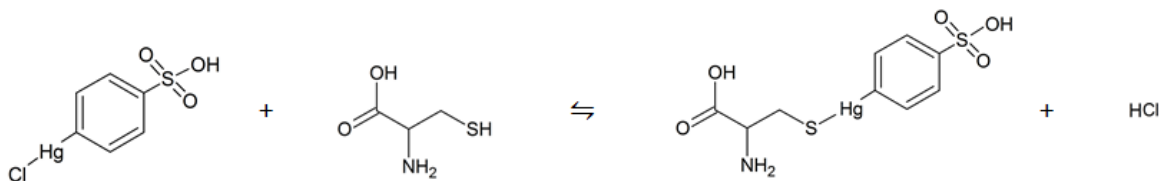
### **3.4.4 Konzentrationsabhängige Inhibition und IC<sub>50</sub>-Bestimmung von Inhibitoren**

Um Inhibitoren von Formiat-Nitrit-Transportern zu finden und deren Effizienz darzustellen, wurde auch der direkte <sup>14</sup>C-Aufnahmeassay verwendet. Hierbei wurde die Aufnahme von Substrat durch einen geeigneten Inhibitor verhindert beziehungsweise verringert. 80 µl der vorher mit Messpuffer auf OD<sub>600</sub> 50,0 ± 5,0 eingestellten Hefesuspension wurde mit 1 µl des in DMSO gelösten Inhibitors versetzt und für 15-20 min vorinkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 20 µl radioaktiver Substratlösung versetzt und für eine feste Zeitspanne lang inkubiert. Diese Zeit wurde anhand der vorher gemessenen Aufnahmekurven bestimmt und so gewählt, dass sich die Aufnahme in der initialen Phase befand. Die Zeitspanne betrug je nach FNT 20 s (*BbFNT*), 1 min (*BbFNTS93G*) 2 min (*TgFNT1-3*) oder 4 min (*TgFNT1G93S*, *TgFNT2G166S*, *TgFNT3G93S*). Danach wurde die Aufnahme gestoppt und, wie in 3.4.2 beschrieben, weiterverfahren. Um eine Hemmkurve zu generieren, wurde die Messung bei verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen durchgeführt und die Hemmung gegen die Konzentration aufgetragen. Als Referenz (100 % Kontrolle) dienten ungehemmte FNT exprimierende Hefen, um die Aufnahmemenge an Substrat für die Zeitspanne festzustellen. Abgezogen von allen Proben wurden außerdem Werte von ungehemmten, nicht exprimierenden Kontroll-Hefen. Um eine Wirkung des DMSO auszuschließen, wurden ungehemmte Hefen mit 1 µl DMSO anstatt Inhibitor versetzt. Die Gesamtkonzentration an DMSO in allen Proben betrug 1,25 %. Aus der konzentrationsabhängigen Hemmkurve ergab

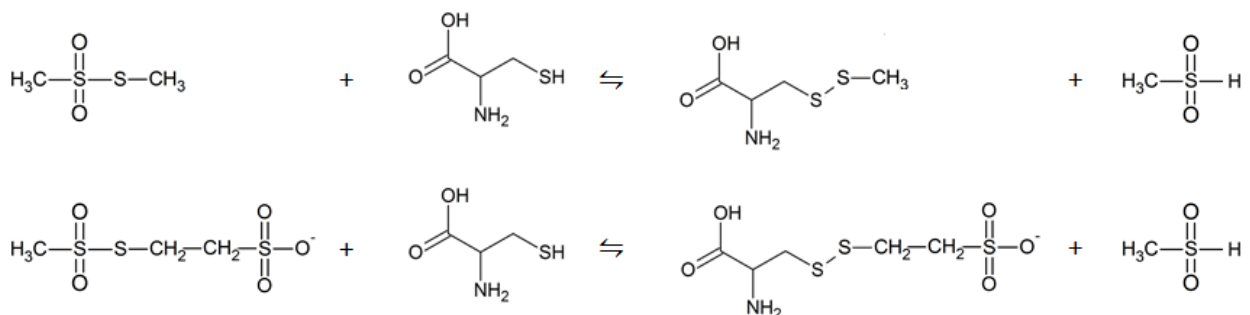
sich durch sigmoidales *fitting* der  $IC_{50}$ -Wert, der bei 50 % Hemmung aus dem Kurvenverlauf abgelesen wurde. Der  $IC_{50}$ -Wert gibt also die Konzentration an, bei der die halbmaximale Hemmung erreicht ist. Dieser Wert erlaubt Aussagen über die Wirkstärke eines Inhibitors und kann zum Vergleich von verschiedenen Inhibitoren herangezogen werden. Hierbei ist zu beachten, dass sich nur  $IC_{50}$ -Werte direkt vergleichen lassen, die sich auf das gleiche Messsystem beziehen. So können aus einem Hefesystem generierte Werte nicht zwingend direkt auf zum Beispiel an Parasiten generierte Werte bezogen werden.

### 3.4.5 Chemische Modifikation von Cysteinen im Protein

Für die Modifikation wurden verschiedene chemische Verbindungen verwendet, die mit Cysteinen über Bildung einer kovalenten Bindung oder Disulfidbrücke reagieren (Abb. 3.4, Abb. 3.5).



**Abb. 3.4** Reaktion der Verbindungen 4-Chloromercuribenzolsulfonsäure (pCMBS) mit Cysteinen durch kovalente Bindung des Quecksilberatoms an die Thiolgruppe des Cysteins.



**Abb. 3.5** Reaktion der sulfhydryl-aktiven Verbindungen Methyl-Methanthiosulfonat (MMTS) und (2-Sulfonatoethyl)methanthiosulfonat (MTSES) mit Cysteinen durch Bildung einer Disulfidbrücke.

## Methoden

In dieser Arbeit wurden als Modifikatoren die Verbindungen 4-Chloromercuri-benzolsulfonsäure (pCMBS), Methyl-Methanthiosulfonat (MMTS) und (2-Sulfonatoethyl)-methanthiosulfonat (MTSES) verwendet. Um den Einfluss dieser Modifikationen auf das Protein zu untersuchen, wurde der  $^{14}\text{C}$ -Aufnahmeassay verwendet. Hierfür wurden ähnlich wie unter 3.4.4 die Substanzen in einer bestimmten Konzentration in Wasser gelöst, 1  $\mu\text{l}$  zu 80  $\mu\text{l}$  eingestellter Hefesuspension pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei Kontrollhefen wurde 1  $\mu\text{l}$  steriles Wasser verwendet. Die Messung wurde hierbei wieder in der initialen Phase der Substrataufnahme durchgeführt. Die Auswertung erfolgte als Inhibition in Bezug auf nicht modifizierte Kontrollhefen.

### 3.5 Phänotypisches Screening

#### 3.5.1 *Saccharomyces cerevisiae* Wachstumsassay in L-Laktat-Selektionsmedium

Die erfolgreiche Expression von Formiat-Nitrit-Transportern wurde auch phänotypisch über einen Wachstumsassay nachgewiesen. Hierfür wurden die transformierten W303-1A-Hefen in einem Medium kultiviert, das L-Laktat als einzige Kohlenstoffquelle aufweist. Die typischerweise in Nährmedien genutzte Glukose wird hier weggelassen, was zwar zu langsameren Wachstumsraten führt, aber dafür Rückschluss auf einen L-Laktat-Transport in die Hefezelle zulässt. Die Aufnahme von L-Laktat ist in Abwesenheit von Glukose essentiell für das Wachstum der Hefen. Für den Assay wurde zunächst eine einzelne Hefekolonie von einer Selektionsplatte in 5 ml SD-AHLW-Flüssigmedium überführt. Diese Vorkultur enthält zunächst noch Glukose als Nährstoffquelle. Nach Inkubation über Nacht bei 30 °C im Brutschrank unter Schütteln ( $200 \text{ U min}^{-1}$ ) wurde die  $\text{OD}_{600}$  gemessen. Nun wurde die Menge Kultur abgenommen, um nach Auffüllen auf 1 ml eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 zu erreichen. Die Zellen wurden bei 2.500 g für 30 s zentrifugiert und dreimal mit 1 ml Wasser gewaschen. Danach wurde auf das Zielvolumen von 1 ml mit Wasser aufgefüllt. Unter der Reinluftwerkbank wurden von dieser eingestellten Kultur 10  $\mu\text{l}$  pro Well in eine Bioscreen-Honeycomb-Platte pipettiert und jeweils 90  $\mu\text{l}$  L-Laktat-Selektionsmedium hinzugefügt. Die Platte wurde nun in das Bioscreen-Gerät überführt, welches in 30-minütigen Intervallen über 3 Tage die  $\text{OD}_{420-580}$  der Proben misst. Die Proben wurden 10 Sekunden vor jedem Messvorgang gemischt, indem das Gerät die gesamte Platte schüttelte. Als Kontrolle wurde nur Medium in die Wells pipettiert, um eine Kontamination auszuschließen. Diese Werte wurden als Rauschen von allen erhaltenen Messwerten abgezogen. Zum Nachweis der

erfolgreichen Selektion wurden gleichzeitig Hefen vermessen, die keinen L-Laktat-Transporter exprimieren. Diese Werte wurden von den erhaltenen Werten der FNT exprimierenden Hefen abgezogen.

### 3.5.2 Screening von Inhibitoren

Der phänotypische Assay eignete sich außerdem auch zum einfachen Screening von Inhibitoren, da eine Hemmung der L-Laktat Aufnahme direkt mit der Hemmung des Hefewachstums im Assay korreliert. Die Durchführung entsprach dem vorher beschriebenen Wachstumsassay (3.5.1). Die einzige Änderung war hierbei, dass in die Wells der Honeycomb-Platten 1 µl des in DMSO gelösten Inhibitors mit bestimmter Konzentration vorgelegt wurde. Um das Wachstum vergleichen zu können, wurden gleichzeitig noch FNT exprimierende Hefen mit Zugabe von 1 µl DMSO ohne Inhibitor vermessen. Über die erhaltenen Wachstumskurven konnte durch Vergleich der AUC von gehemmt und ungehemmt Hefen die Inhibition in Prozent ermittelt werden.

## 3.6 *Toxoplasma gondii*-Parasitenkultur

Alle Experimente mit *T. gondii*-Parasiten wurden am Institut für Molekulare Parasitologie der Humboldt-Universität in Berlin von Bingjian Ren unter Betreuung von Dr. Nishith Gupta durchgeführt.

### 3.6.1 Kulturbedingungen

*T. gondii*-Tachyzoiten des Stammes RH oder RH-YFP wurden in Monolayern von *human foreskin fibroblasts* (HFF) in Anlehnung an Gubbels *et al.* und Gupta *et al.* (201, 114) kultiviert. Die Wirtszellen wurden in *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) unter Zusatz von 10 % *fetal bovine serum* (FBS), 2 mM Glutamin, 1mM Natrium-Pyruvat, Penicillin (100 U ml<sup>-1</sup>), Streptomycin (100 µg ml<sup>-1</sup>) und nicht-essentiellen Aminosäuren bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die Infizierung der Zellen durch *T. gondii*-Tachyzoiten erfolgte mit einer Multiplizität der Infektion von 3. Für eine kontinuierliche Kultur wurden die Tachyzoiten jeden zweiten Tag in frische Wirtszellen passagiert.

### 3.6.2 Transformation von *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten

Die kodierenden Sequenzen der TgFNTs wurden inklusive N-terminalem Hemagglutinin-tag über *Nsi I / Pac I* in den für *T. gondii*-Parasiten geeigneten Expressionsvektor pGRA1-UPKO umkloniert. Dieser enthält einen Uracil-Phosphoribosyltransferase-Lokus an dem die *single-*



*copy* Expression der *TgFNTs* über negative Selektion mit 5-Fluorodeoxyuridin erfolgte. Die zu transformierenden extrazellulären Tachyzoiten wurden mit einer Zellzahl von etwa  $10^7$  geerntet, in Cytomix-Puffer resuspendiert und mit 10 µg der entsprechenden Plasmid-DNA elektroporiert. Die transformierten Parasiten wurden genutzt um kultivierte HFF-Zellen zu infizieren. Unter Zugabe von 5-Fluorodeoxyuridin erfolgte die Selektion. Nach genügend Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wurden die Tachyzoiten geerntet.

### **3.6.3 Lokalisation der *TgFNTs* in *T. gondii* Tachyzoiten über Immunofluoreszenz**

Frische HFF-Zellen wurden auf Deckgläsern ausgesät, mit frisch isolierten *T. gondii*-Tachyzoiten infiziert und 24 h inkubiert. Die Zellen wurden durch Inkubation mit 4 % Paraformaldehyd für 10 min fixiert und anschließend wurde mit 0,1 M Glycin in PBS-Puffer für 5 min neutralisiert. Darauf folgte eine Behandlung mit 0,1 % Triton X-100 in PBS-Puffer um die Zellen durchlässig zu machen. Nach Blocken mit 2 % BSA in PBS und 0,1 % Triton X-100 für 20 min wurden die Proben mit den zwei primären Antikörpern Anti-HA und Anti-*TgGap45* versetzt und 1 h im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde für 45 min im Dunkeln mit den entsprechenden sekundären Antikörpern Alexa 488 und Alexa 594 inkubiert. Die Proben wurden nun in eine Mischung aus Fluoromount G und DAPI überführt, getrocknet und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben über Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

### **3.6.4 *Toxoplasma gondii*-Plaque-Assay**

Frische HFF-Zellen wurden in 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und es wurden Plaque-Assays, wie von Hartmann et al. (202) beschrieben, durchgeführt. Die in DMSO gelösten Inhibitoren wurden mit 2 ml Kulturmedium gemischt, auf die entsprechende Konzentration verdünnt und in die Wells pipettiert. Als Kontrolle wurde DMSO ohne Inhibitor verwendet. Die entstandenen HFF-Monolayer wurden nun mit 150 *T. gondii* Tachyzoiten infiziert und für 7 Tage ungestört bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurden die entstandenen Plaques mit eiskaltem Methanol für 10 min fixiert und anschließend 15 min lang mit Kristallviolett gefärbt. Die Größe der Plaques wurde mit dem Bildanalyse-Programm *ImageJ* ausgewertet.

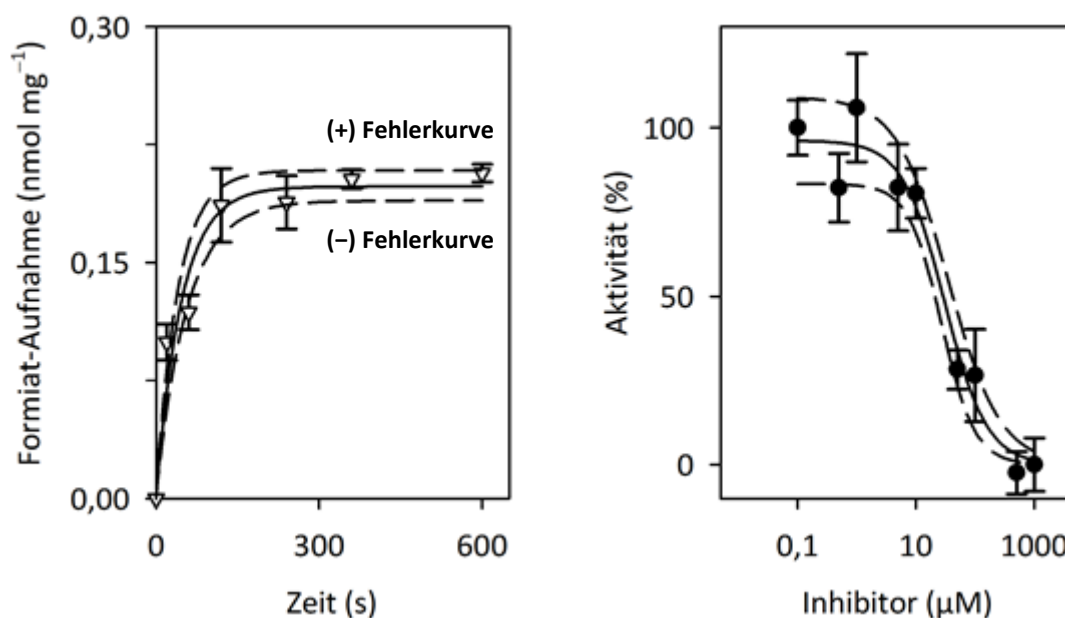
### **3.6.5 Wachstumsassay mit YFP exprimierenden *Toxoplasma gondii*-Parasiten**

In 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesäte HFF-Zellen wurden mit  $7 \times 10^3$  *T. gondii*-Tachyzoiten infiziert. Es wurde hierfür ein *T. gondii*-Stamm verwendet, der das gelb-fluoreszierende

Protein (YFP) exprimiert. Nach Inkubation von 4 Stunden wurde das Kulturmedium durch ein farbloses Medium, das kein Phenolrot mehr enthielt, ersetzt. Die entsprechende Konzentration an Inhibitor wurde zugesetzt und die Fluoreszenzintensität des YFP alle 24 Stunden gemessen (Anregung 485 nm, Emission 528 nm). Als Negativkontrolle diente DMSO ohne Inhibitor und als Positivkontrolle der bekannte *T. gondii* Hemmstoff Pyrimethamin in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$ .

### 3.7 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden aus mindestens drei unabhängigen biologischen Experimenten erhoben. Wurden weniger Experimente durchgeführt, ist dies explizit am Graphen kenntlich gemacht worden. Der Fehler ist angegeben als Standardfehler des Mittelwertes unter Berücksichtigung der Anzahl an biologischen Experimenten und technischen Replikaten. Ist bei einem Graphen  $n = 1$  als Anzahl der biologischen Experimente angegeben und es sind trotzdem Fehlerbalken vorhanden, so handelt es sich hierbei um die Standardabweichung der technischen Replikate. Die Bestimmung der Fehler der angegebenen Raten und  $\text{IC}_{50}$ -Werte erfolgte jeweils aus den Fehlerkurven, die mittels Addition und Subtraktion der Standardfehler des Mittelwertes von den Messwerten bestimmt wurden (Abb. 3.6).



**Abb. 3.6** Der Fehler der Aufnahmeraten und der  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurde über die jeweiligen Fehlerkurven (gestrichelte Linien) bestimmt. Aus diesen Fehlerkurven wurden wiederum die Transportraten und  $\text{IC}_{50}$ -Werte bestimmt, deren Differenz zum Mittelwert den Fehler des Wertes darstellen.

### 3.8 Bioinformatik

Die DNA und Protein-Sequenzen stammen von den Datenbanken ToxoDB, PlasmoDB und PiropasmaDB sowie der NCBI-Datenbank. Die Proteinstrukturen stammen von der RCSB-Datenbank. Strukturmodelle der FNTs wurden mit SwissModel (203) auf Basis der Kristallstruktur von *S. typhimurium* FocA (PDB 3Q7K) (144) erstellt und mit der Software PyMOL Molecular Graphics System (Schrödinger, LCC) visualisiert. Alignments von Sequenzen, *Subfamily*-Logos und Topologie-Plots wurden mit TeXshade und TeXtopo von Prof. Dr. Eric Beitz generiert (204, 187, 205).

## 4 Ergebnisse

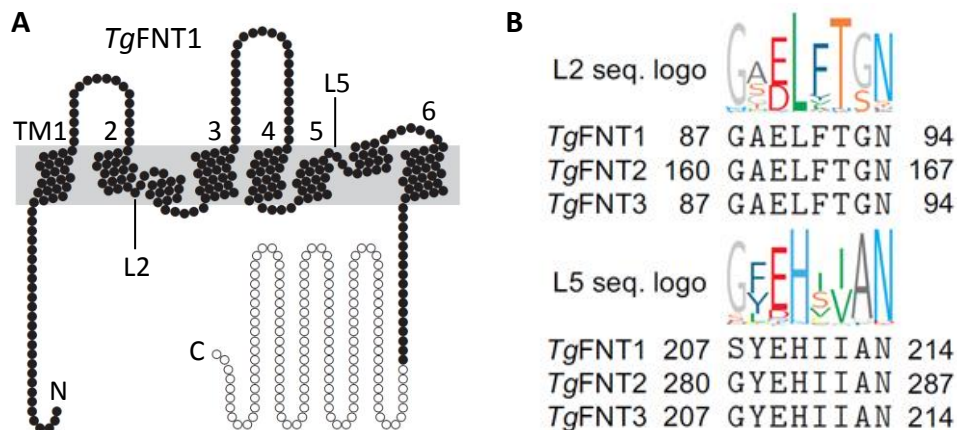
### 4.1 Expression und funktionelle Charakterisierung der Formiat-Nitrit-Transporter aus *Toxoplasma gondii* im Hefesystem

#### 4.1.1 Identifikation von drei Formiat-Nitrit Transportern im Genom von *T. gondii*

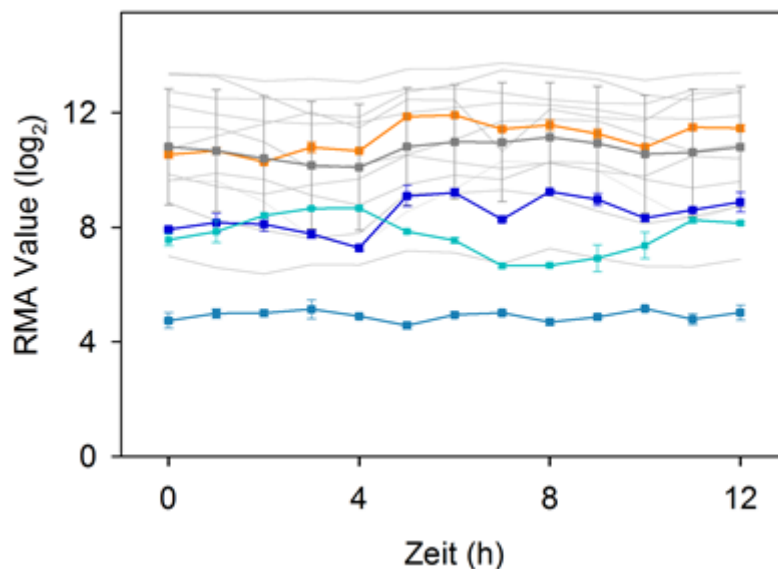
Die Suche im annotierten Genom von *T. gondii* nach Genen, die für Formiat-Nitrit-Transporter kodieren könnten, ergab drei Genloki mit dem entsprechenden Leserahmen. Das Gen für *TgFNT1* (TGGT1\_209800) liegt auf dem Chromosom Ib und besitzt keine Introns. Die kodierende Sequenz ist 1239 Basenpaare lang und das Genprodukt umfasst entsprechend 412 Aminosäuren (44,3 kDa). Auf dem Chromosom IX liegt das Gen für *TgFNT2* (TGGT1\_292110). Die Sequenz besitzt sechs Exons und ist nach Transkription 1392 Basenpaare lang und liefert ein Protein mit 463 Aminosäuren (50,8 kDa). Das Gen für *TgFNT3* (TGGT1\_229170) translatiert ein Genprodukt mit 501 Aminosäuren (53,3 kDa). Die genomische Sequenz liegt auf Chromosom VIII und enthält fünf Exons. Nach Transkription ist die kodierende Sequenz 1503 Basenpaare lang. Alle drei *TgFNTs* zeigen typische Strukturmerkmale, die einem Protein aus der Formiat-Nitrit-Transporter Familie entsprechen (Abb. 4.1). Dazu gehören die durch jeweils zwei Halbhelices gebildeten *loop*-Regionen L2 und L5 sowie der Aufbau aus sechs Transmembranspannen (166). Auffällig ist, dass alle *TgFNTs* einen für FNTs sehr langen C-Terminus besitzen, der um 115-225 Aminosäuren länger ist als der von bereits charakterisierten FNTs. *TgFNT2* besitzt zusätzlich auch einen um 70 Aminosäuren längeren N-Terminus. Während die Termini der drei *TgFNTs* untereinander sehr heterogen zusammengesetzt sind, ist die für FNTs typische Kernregion der Proteine sehr ähnlich mit 61-66 % Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz und 75-78 % Sequenzähnlichkeit. Um mehr über die Expression der drei putativen Transporter zu erfahren, wurden basierend auf Daten der Datenbank ToxoDB die Expressionslevel der Transkripte der drei *TgFNTs* in *T. gondii* Tachyzoiten bioinformatisch analysiert und mit der Expression von Enzymen der Glykolyse und des Glukose-Transporters *TgGT1* (TGGT1\_214320) verglichen. Es waren nur Daten des *T. gondii* Stammes-RH Typ I verfügbar. In diesem Stamm werden alle genannten Transkripte mit vergleichbaren Leveln exprimiert. Dabei ist die Expression von *TgFNT3* allerdings etwas niedriger als die der anderen beiden

## Ergebnisse

*TgFNTs* (Abb. 4.2). Eine Rolle der FNTs im Export des Stoffwechselendproduktes L-Laktat aus der Glykolyse in *T. gondii* schien anhand der Daten also realistisch, weshalb die *TgFNTs* im Laufe dieser Arbeit auf ihre Funktion hin charakterisiert wurden.



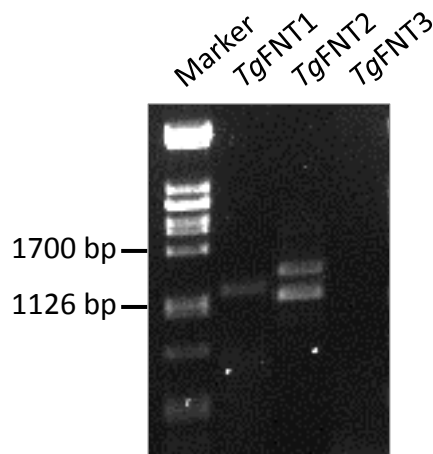
**Abb. 4.1 A:** Topologie-Plot von *TgFNT1* mit den sechs Transmembran-Spannen (TM1-6) und typischen FNT Signaturen (L2, L5) und langem C-Terminus (weiß). **B:** Alignment der Signaturen L2 und L5 von *TgFNT1-3* mit Sequenz-Logos erstellt von Prof. Dr. Eric Beitz (187).



**Abb. 4.2** Expressionsprofil von *TgFNT1* (blau), *TgFNT2* (cyan) und *TgFNT3* (hellblau) verglichen mit dem des Glukosetransporters *TgGT1* (orange) und der Glykolyse-Enzyme (grau) sowie der Mittelwert der Enzyme (■). Transkript-Level sind angegeben als normalisierte *Robust Multi-array Average* (RMA)-Werte ( $\log_2$ ) (206).

#### 4.1.2 Expression und funktionelle Charakterisierung der Wildtypkonstrukte

Die drei für Formiat-Nitrit-Transporter aus *Toxoplasma gondii* kodierenden DNA-Sequenzen wurden mittels PCR aus isolierter DNA des NTE Typ II Stammes amplifiziert. Da die genomische Sequenz für *TgFNT1* keine Introns enthält, konnte diese direkt aus genomischer *T. gondii* DNA amplifiziert werden. Dies wurde im Rahmen der Masterarbeit von Jana Grolig durchgeführt und das Konstrukt für weiterführende Experimente im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Um die kodierenden Sequenzen für *TgFNT2* und *TgFNT3* zu bekommen, wurde eine PCR mit *T. gondii* cDNA durchgeführt. cDNA ist mittels Reverser Transkriptase aus Gesamt-mRNA umgeschriebene komplementäre DNA. Diese enthält deshalb die kodierenden Sequenzen, da die Introns vorher im Rahmen der Transkription zur Herstellung der mRNA entfernt wurden. Bei der PCR wurde auch die kodierende Sequenz von *TgFNT1* als Kontrolle nochmal mitamplifiziert. Das Ergebnis der PCR zeigt, dass es möglich war, *TgFNT1* und *TgFNT2* aus cDNA erfolgreich zu amplifizieren, die Amplifikation von *TgFNT3* war hingegen nicht möglich (Abb. 4.3).

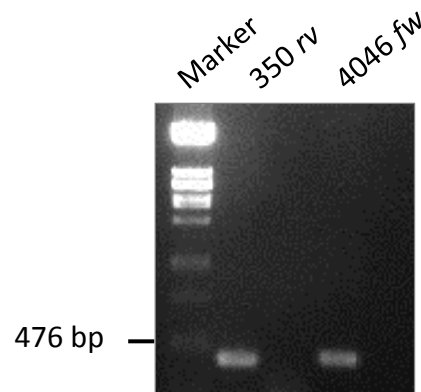


**Abb. 4.3** Amplifikation der kodierenden Sequenz von *TgFNT1* (1239 bp), *TgFNT2* (1392 bp) und *TgFNT3* (1503 bp) aus *Toxoplasma gondii* cDNA.

Auffällig ist hierbei, dass sich bei *TgFNT2* zwei verschiedene PCR-Produkte gebildet haben. Dies hätte ein Hinweis auf verschiedene *splice*-Varianten der mRNA sein können. Eine Sequenzierung des kürzeren Konstruktes nach *blunt-end*-Ligation in den Vektor pBluescript II SK (-) ergab jedoch, dass sich nach der Translation kein sinnvolles Protein ergeben hätte, da es mitten in einer Transmembranspanne unterbrochen gewesen wäre. Eine Transportfunktion wurde daher ausgeschlossen und das PCR-Produkt auf Proteinebene nicht weiter charakterisiert. Das längere PCR-Produkt stimmte hingegen mit der Datenbank-DNA-

## Ergebnisse

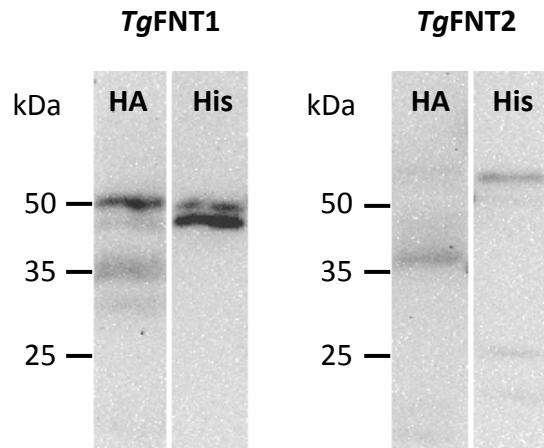
Sequenz von *TgFNT2* überein und wurde weiterverwendet. Da für *TgFNT3* keine Amplifikation möglich war, wurde die Funktionalität der verwendeten Primer kontrolliert, indem eine weitere PCR mit genomischer DNA (gDNA) durchgeführt wurde. Da die Gesamtlänge des Konstrukts inklusive Introns bei 4396 Basenpaaren liegt, wurden nur die ersten und die letzten 350 bp der Sequenz amplifiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass Exon- und Intronsequenzen gleichermaßen miteinbezogen wurden. Die PCR wurde mit Hilfe der zuvor verwendeten Primer und jeweils neuen, entsprechend gegenläufigen Primern durchgeführt (Abb. 4.4).



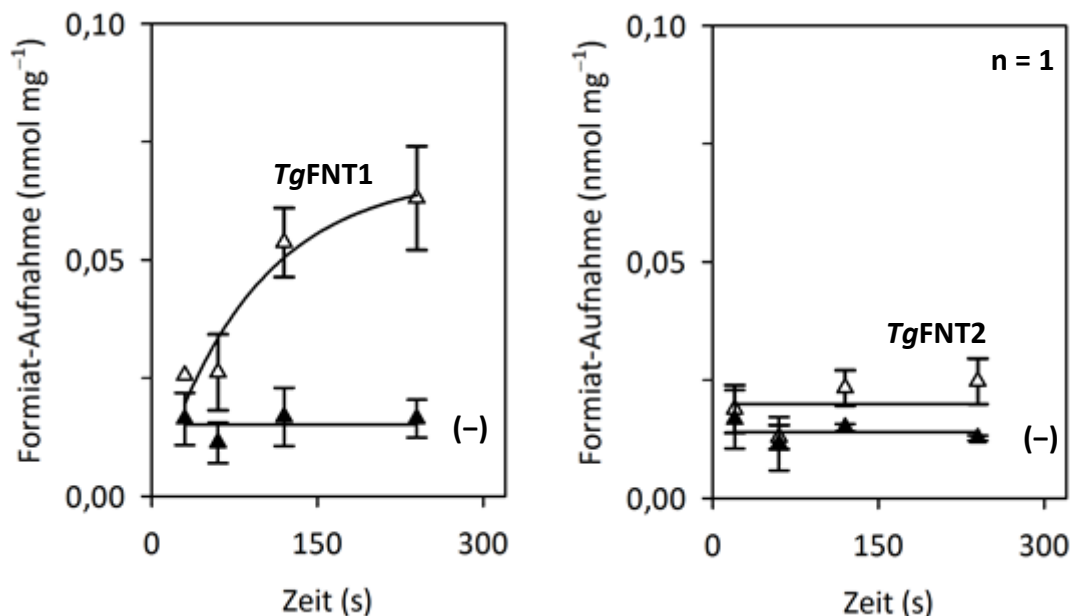
**Abb. 4.4** Amplifikation von Teilen der genomischen *TgFNT3* Sequenz aus *T. gondii* gDNA zur Überprüfung der Primer *TgFNT3* fw und *TgFNT3* rv mittels jeweils gegenläufiger Primer (*TgFNT3* 350 rv, *TgFNT3* 4046 fw). Die Produktlänge beträgt jeweils 350 bp.

Das Ergebnis zeigt, dass die Primer dazu in der Lage waren, die Sequenz von *TgFNT3* zu amplifizieren. Daraus lässt sich schließen, dass Tachyzoiten des *T. gondii*-Stammes NTE Typ II zu wenig *TgFNT3* mRNA bilden, da die Amplifikation zuvor aus der extrahierten cDNA nicht möglich war. *TgFNT3* konnte deshalb zunächst nicht untersucht werden. Nach Klonierung der kodierenden Sequenzen von *TgFNT1* und *TgFNT2* in den Hefevektor pDRTxa über *Spe* I / *Sal* I und *Spe* I / *Xho* I, wurde eine Hefetransformation (3.1.19) durchgeführt, um die Proteine herzustellen. Mittels Hefeaufschluss, SDS-PAGE (3.2.3) und Western-Blot (3.2.4) wurde zunächst die Expression in der Hefe überprüft (Abb. 4.5). Die Konstrukte wurden zwar in Hefe hergestellt, jedoch waren Abbruchfragmente zu erkennen. Die Bande von *TgFNT2* war bei einer Auftragsmenge von 25 µg Protein zudem als relativ schwach zu betrachten. Da beide Konstrukte Banden mit der richtigen Größe zeigten, wurde dennoch eine funktionelle Überprüfung durchgeführt. Die gemessene Aufnahme von Formiat über ein <sup>14</sup>C-Aufnahmeassay im Hefesystem ist in Abbildung 4.6 gezeigt.

## Ergebnisse



**Abb. 4.5** Western Blot von in Hefe hergestelltem *TgFNT1* (44,3 kDa) und *TgFNT2* (50,8 kDa) detektiert mit Antikörpern gegen den N-terminalem Hemagglutinin-tag (HA) und C-terminalem 10x-Histidin-tag (His). Auftragsmenge: 25  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein



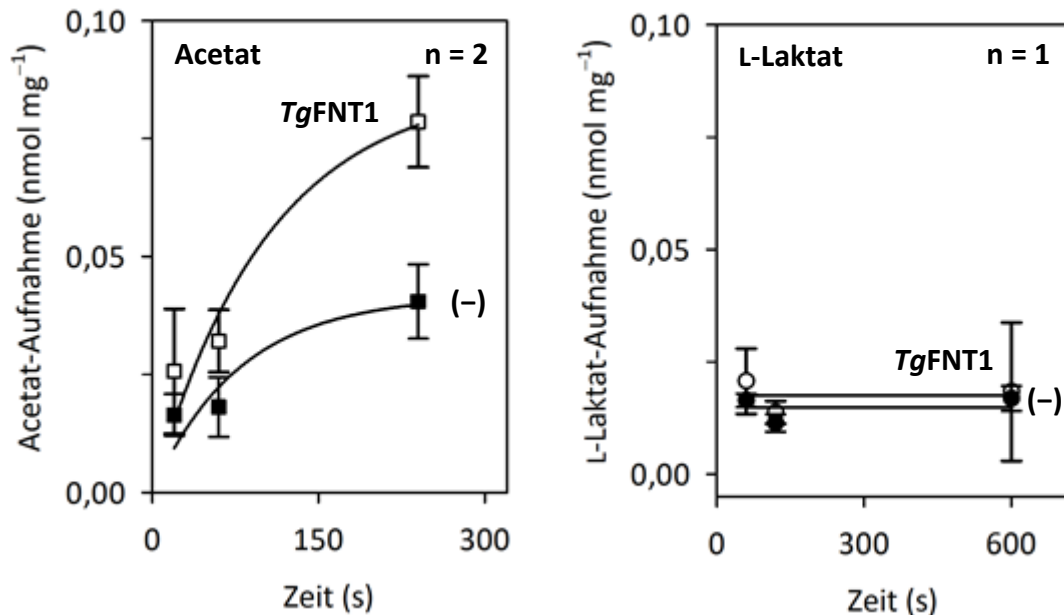
**Abb. 4.6** Aufnahme von Formiat ( $\Delta$ ) über 4 min in Hefezellen, die *TgFNT1* oder *TgFNT2* exprimierten. Als Kontrolle diente die Aufnahme in Hefezellen, die kein Transportprotein exprimierten ( $\blacktriangle$ ). Gradient: 1 mM Formiat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Formiat; pH: 6,8.

*TgFNT1* zeigte hierbei eine Aufnahme von Formiat, so dass eine Funktion dieses Transporters nachgewiesen werden konnte. Für *TgFNT2* konnte hingegen nach 4 min keine Leitfähigkeit für Formiat festgestellt werden und zeigte somit keine Funktionalität. Um *TgFNT1* weiter zu



## Ergebnisse

charakterisieren, wurde die Leitfähigkeit der physiologisch relevanteren und größeren Monocarboxylate Acetat und L-Laktat bestimmt (Abb. 4.7).



**Abb. 4.7** Aufnahme der Substrate Acetat (□) und L-Laktat (○) in Hefezellen, die *TgFNT1* exprimierten. Als Kontrolle dienten Hefen, die kein Transportprotein exprimierten (■/●).

Gradient: 1 mM Substrat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$  <sup>14</sup>C-Substrat; pH: 6,8.

Dies ergab eine schwache Leitfähigkeit für Acetat nach 4 min, allerdings keine Leitfähigkeit für L-Laktat nach 10 min. Auffällig ist hierbei noch die im Vergleich zu Formiat und L-Laktat höhere Membrandiffusion von Acetat. Dies hängt mit dem höheren pKs-Wert der Essigsäure zusammen, da bei einem pH-Wert von 6,8 auch undissoziierte Säure vorliegt. Diese kann passiv durch die Membran diffundieren. Aus den Kurven wurde nach Abzug der Werte für die nicht exprimierenden Hefen mittels exponentiellen *fittings* die Aufnahmerate bestimmt. Vergleicht man die Raten der Substrate Formiat und Acetat mit anderen im Arbeitskreis charakterisierten Formiat-Nitrit-Transportern fällt auf, dass *TgFNT1* eine relativ langsame Aufnahmerate besitzt (Tab. 4.1). Insbesondere *PfFNT*, das als eukaryotisches FNT von der physiologischen Funktion her *TgFNT* näherkommt, besitzt um ein Vielfaches höhere Aufnahmeraten und leitet das relevante Stoffwechsel Endprodukt L-Laktat. Allerdings hängt die Aufnahme von Substraten durch die Hefemembran unter anderem auch von der Anzahl

## Ergebnisse

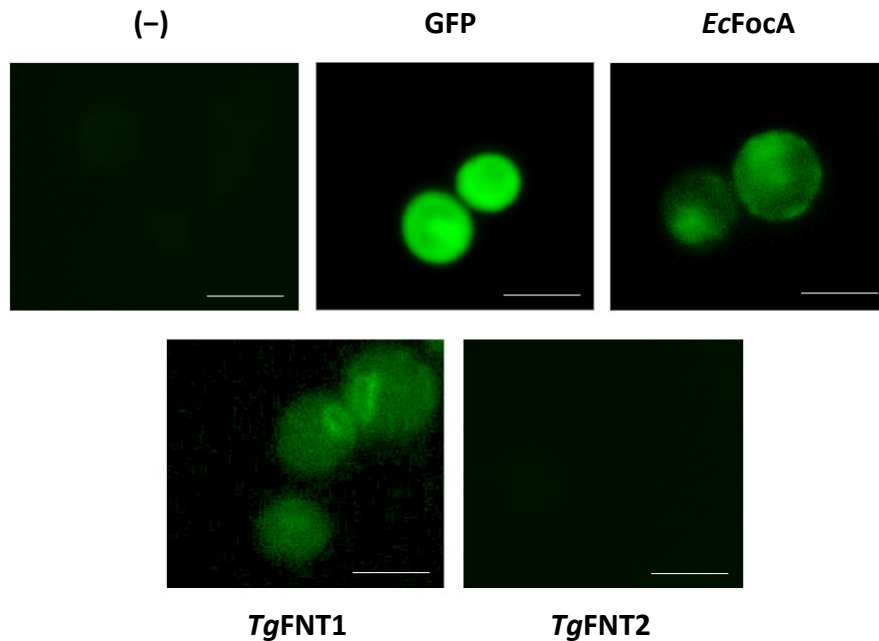
**Tab. 4.1:** Aufnahmearten von *TgFNT1* im Vergleich zu anderen Formiat-Nitrit-Transportern.

Aufnahmerate (nmol mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )			
	<i>TgFNT1</i>	<i>EcFocA</i> *	<i>PfFNT</i> *
Formiat	0,016 ± 0,009	0,060 ± 0,004	0,192 ± 0,017
Acetat	0,014 ± 0,015	0,069 ± 0,005	0,198 ± 0,006
L-Laktat	0	0	0,086 ± 0,005

\*Die Messung der Aufnahmearten von *EcFocA* und *PfFNT* wurde von Marie Wiechert durchgeführt (186).

der in die Membran eingebauten Transporter ab. Daher sind die absoluten Werte der in Hefen bestimmten Aufnahmearten verschiedener FNTs nicht direkt vergleichbar, da verschiedene Expressionslevel der Proteine in der Membran möglich sind. Ein Grund für die schlechte beziehungsweise komplett fehlende Leitfähigkeit von *TgFNT1* und *TgFNT2* kann deshalb zum einen die allgemein ungenügende Expression des Proteins in der Hefe oder fehlerhaftes *trafficking* in die Hefemembran sein. Auf dem Western Blot (Abb. 4.5) waren bei *TgFNT1* außerdem Fragment-Banden zu sehen, die auf eine Instabilität des Proteins hinweisen. Die Herstellung von *TgFNT2* in Hefe war im Allgemeinen schwach. Um den Grund dafür näher zu beleuchten, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt. Durch Fusionieren der Transporter mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) wurde über Fluoreszenzmikroskopie der Hefezellen die Lokalisation der Membranproteine bestimmt (Abb. 4.8). Zu beachten ist, dass diese Methode lediglich einen Hinweis zur Lokalisation gibt. Zur genaueren und zweifelsfreien Bestimmung wäre eine Aufnahme mit dem Elektronenmikroskop notwendig gewesen. Als Kontrollen wurden Hefen vermessen, die unfusioniertes, lösliches GFP herstellten, sowie Hefen, die das bereits charakterisierte FNT *EcFocA* als GFP-Fusionsprotein herstellten. Ein in der Membran lokalisiertes GFP-Fusionsprotein, zeigt eine die Hefezelle scharf umrandende Fluoreszenz, wird hingegen lösliches Protein hergestellt, ist die Fluoreszenz diffus und es ist keine klare Umrandung sichtbar. Die aufgenommenen Bilder zeigen, dass *TgFNT1*-GFP von den Hefen hergestellt wurde und auch in der Membran vorliegt. Der Rand wirkt jedoch diffuser als bei *EcFocA*. Außerdem ist hier die Golgimembran am Zellkern stärker umrandet, was ein Hinweis auf schlechtes *trafficking* des Proteins zur Membran sein könnte. Das *TgFNT2*-GFP Fusions-

## Ergebnisse



**Abb. 4.8** Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von *TgFNT*-GFP-Fusionsproteinen in Hefezellen bestimmt mit einer Anregungswellenlänge von 472 nm. Kontrollen (oben): Hefen die kein GFP herstellten (-), Hefen die lösliches GFP herstellten (GFP), Hefen die ein bereits charakterisiertes FNT herstellten (*EcFocA*). Der weiße Balken entspricht 5 µm.

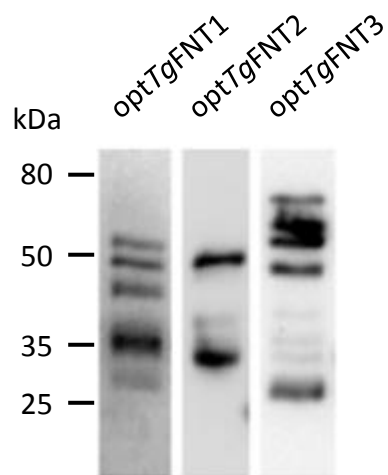
protein wurde hingegen gar nicht hergestellt, was sich auch mit den schwachen Banden auf dem zuvor gezeigten Western Blot deckt. Das nächste Ziel war also die Herstellung der beiden Proteine in Hefe zu verbessern.

### 4.1.3 Expression und funktionelle Charakterisierung kodon-optimierter Konstrukte

Um im Rahmen der Translation Proteine herzustellen, gibt es auf DNA-Ebene mehrere Möglichkeiten um die gleiche Aminosäure zu generieren. Für Alanin sind zum Beispiel vier Kombinationen möglich (GCG, GCA, GCC, GCT). Welche Kodons bevorzugt benutzt werden, unterscheidet sich zwischen verschiedenen Organismen (207). Die Hefe *S.cerevisiae* verwendet bei der Translation daher bevorzugt andere Kodons als der Parasit *T. gondii*. Parasiten der Familie Apicomplexa haben im Vergleich zur Hefe außerdem ein generell Adenin- und Thymin-reiches Genom, weshalb es zu Problemen bei der Translation von Proteinen aus Parasiten in Hefe kommen kann. Für die Optimierung der Konstrukte wurden von der Hefe selten verwendete Kodons mit Hilfe des Programms *JCat* (189) analysiert. Die nun optimierten kodierenden DNA-Sequenzen von *TgFNT1-3* wurden anschließend von der Firma GenScript synthetisiert. Da man hier nicht mehr auf Amplifikation aus cDNA

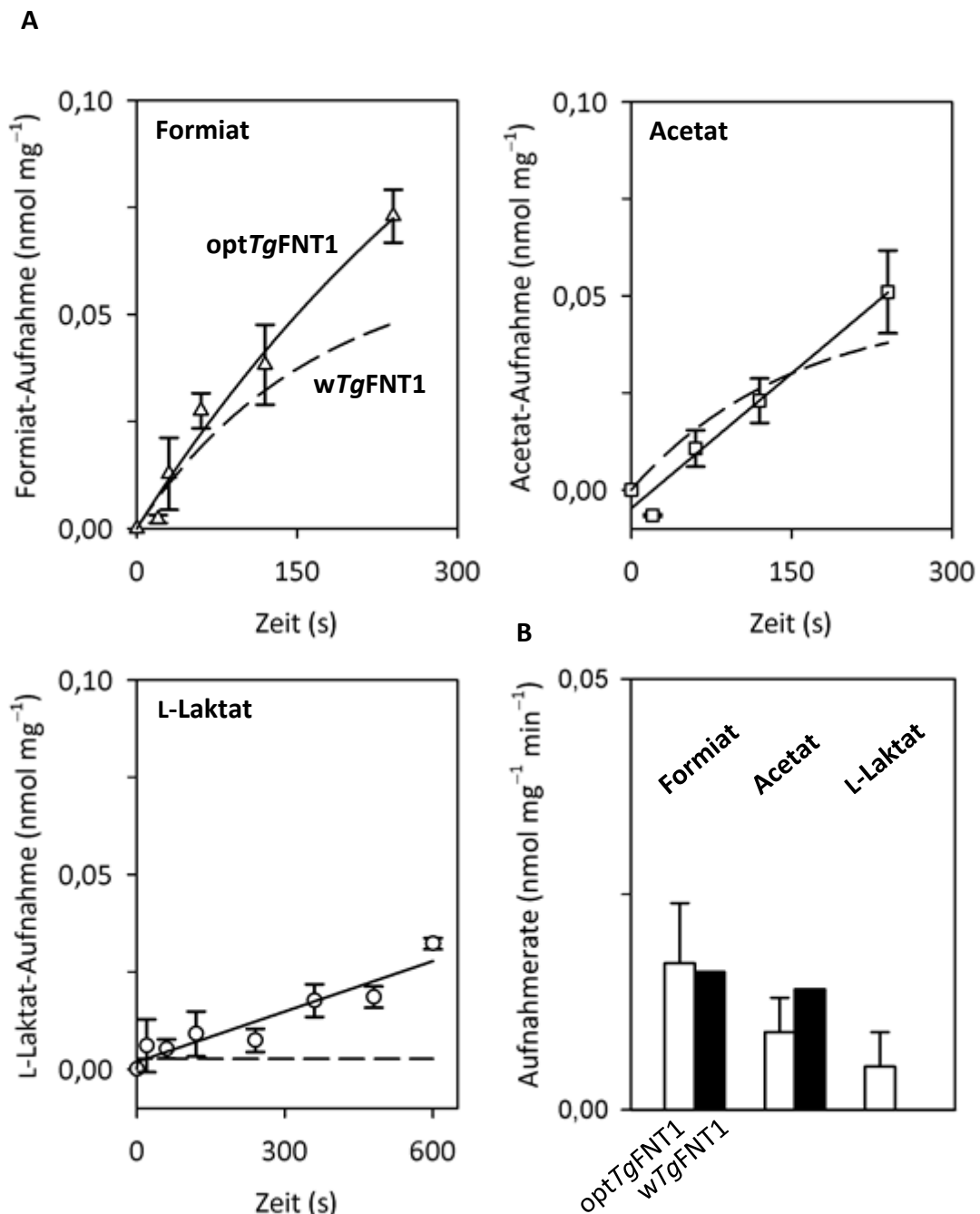
## Ergebnisse

angewiesen ist, war es nun möglich auch *TgFNT3* zu untersuchen. Nach Klonierung der Sequenzen in den Hefevektor pDRTxa über *Spe I / Sal I* oder *Spe I / Xho I* wurden Hefen transformiert und die Expression mittels Western-Blot überprüft (Abb. 4.9).



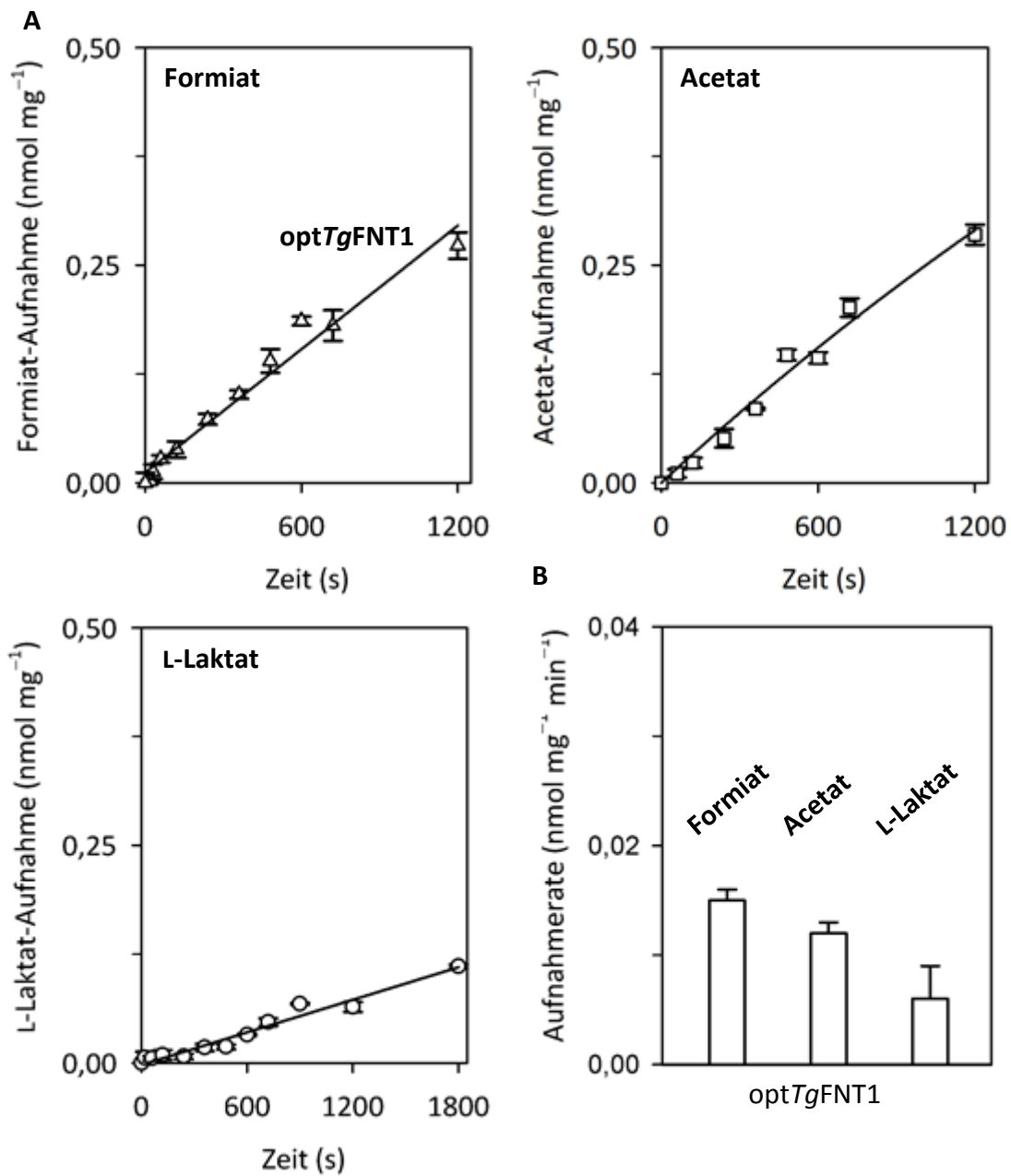
**Abb. 4.9** Western Blot der kodon-optimierten Konstrukte *TgFNT1* (44,3 kDa), *TgFNT2* (50,8 kDa) und *TgFNT3* (53,3 kDa) detektiert mit Antikörpern gerichtet gegen den N-terminalen Hemagglutinin-tag (HA). Auftragsmenge: 25 µg Gesamtprotein.

Bei den optimierten Konstrukten kam es wieder zu Abbruchfragmenten, allerdings konnte die Expression von *TgFNT2* verbessert werden. Auch die Herstellung von *TgFNT3* in Hefen konnte erstmals gezeigt werden, wobei auch hier Abbruchfragmente aufgetreten sind. Ein anschließendes <sup>14</sup>C-Substrataufnahmesassay ergab für das optimierte *TgFNT1* eine ähnliche Substrataufnahme von Formiat und Acetat wie für das Wildtypkonstrukt. Das optimierte Konstrukt war allerdings zusätzlich schwach leitfähig für L-Laktat. Auffallend war außerdem der für FNTs untypische lineare Kurvenverlauf der Kurven für Acetat und L-Laktat (Abb. 4.10). Die Ermittlung der Raten aus den Kurven mittels exponentiellen und linearen *fittings* ergab keine großen Unterschiede in den zuvor bestimmten Aufnahmeraten des Wildtypkonstrukts (Tab 4.2). Um abzuschätzen, ob nach längerer Zeit eine Sättigung der Aufnahme erreicht wird und so doch ein exponentieller Kurvenverlauf vorliegt, wurden die Kurven mit weiteren Zeitpunkten ergänzt (Abb. 4.11). Die Aufnahme wurde über 20-30 min gemessen wobei für diese Kurven die bereits gemessenen Werte aus Abbildung 4.10 mit einbezogen wurden.



**Abb. 4.10 A:** Aufnahmekurven für Formiat ( $\Delta$ ), Acetat ( $\square$ ) und L-Laktat ( $\circ$ ) von in Hefe hergestelltem *optTgFNT1* (schwarze Linie) im Vergleich zu *wTgFNT1* (gestrichelte Linie). Die Werte der nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. **B:** Aufnahmeraten für verschiedene Substrate von *optTgFNT1* (weiße Balken) berechnet aus den Aufnahmekurven im Vergleich zu *wTgFNT1* (schwarze Balken). Gradient: 1 mM Substrat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$

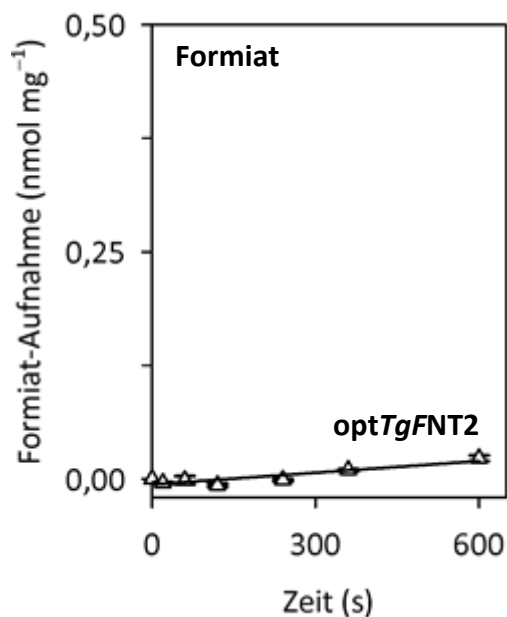
<sup>14</sup>C-Substrat; pH: 6,8.



**Abb. 4.11 A:** Aufnahmekurven für Formiat ( $\Delta$ ), Acetat ( $\square$ ) und L-Laktat ( $\circ$ ) von in Hefe hergestelltem optTgFNT1 (schwarze Linie) nach 20-30 min. Die Werte der nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. **B:** Aufnahmeraten von optTgFNT1 (weiße Balken) für verschiedene Substrate berechnet aus den Aufnahmekurven. Gradient: 1 mM Substrat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Substrat; pH: 6,8.

## Ergebnisse

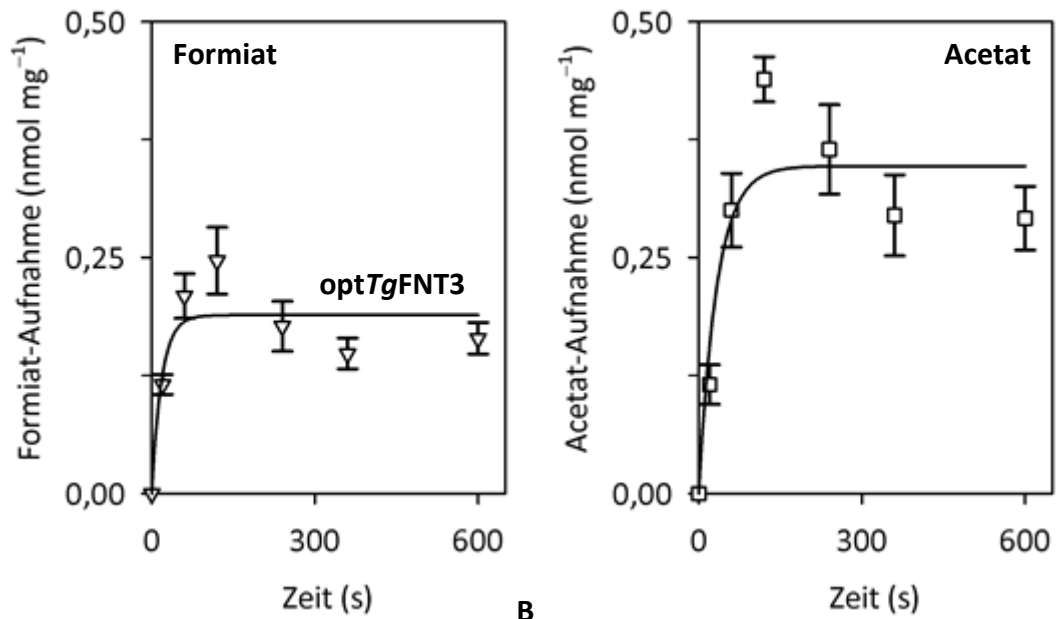
Nach einer Messung von 20-30 min war immer noch keine Sättigung der Aufnahme der Substrate in die Hefezellen, die *optTgFNT1* exprimierten, erreicht. Die Kurve verlief nicht wie für Formiat-Nitrit-Transporter typisch exponentiell, sondern hatte einen linearen Kurvenverlauf. Bei *TgFNT2* blieb die Optimierung ohne Einfluss auf die Funktionalität des Transporters, auch wenn nach einer Erhöhung der Messzeit auf 10 min ein kleiner Einstrom von Formiat messbar war (Abb. 4.12).



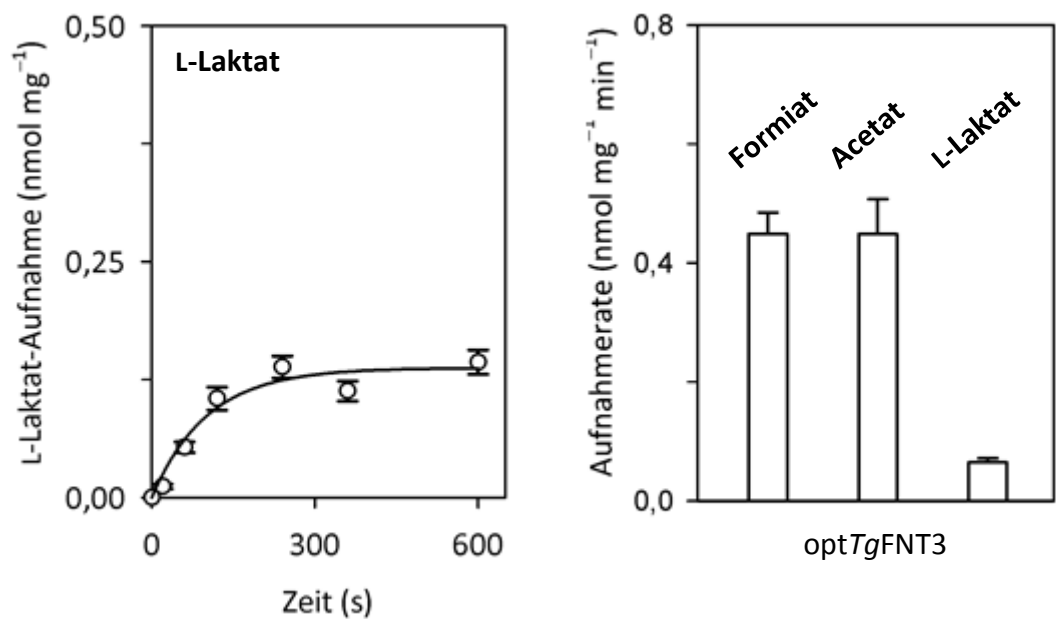
**Abb. 4.12:** Aufnahmekurve für Formiat ( $\Delta$ ) von *optTgFNT2* exprimierenden Hefen. Die Werte der nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. Gradient: 1 mM Substrat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Substrat; pH: 6,8.

Für das vorher nicht charakterisierte *TgFNT3* konnte trotz der Abbruchfragmente auf dem Western Blot eine gute Leitfähigkeit für alle drei Substrate für das kodon-optimierte *optTgFNT3* festgestellt werden (Abb. 4.13). Im Vergleich zu anderen charakterisierten FNTs wies *optTgFNT3* eine hohe Aufnahmerate von Formiat und Acetat auf. Die Aufnahmerate von L-Laktat war zwar etwas geringer als bei *PfFNT*, war aber in derselben Größenordnung. Die Aufnahmekurven sind im Gegensatz zu *optTgFNT1* exponentiell und entsprechen anderen Formiat-Nitrit-Transportern. Zusammenfassend sind die Aufnahmeraten der drei optimierten Konstrukte tabellarisch in Tabelle 4.2 aufgeführt. Die Berechnung erfolgte aus den Aufnahmekurven und je nach Verlauf mittels exponentiellen oder linearen *fitting*.

A



B



**Abb. 4.13 A:** Aufnahmekurven für die Substrate Formiat ( $\Delta$ ), Acetat ( $\square$ ) und L-Laktat ( $\circ$ ) von in Hefe hergestellten *optTgFNT3* nach 10 min. Die Werte der nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. **B:** Aufnahmeraten von *optTgFNT3* (weiße Balken) für verschiedene Substrate berechnet aus den Aufnahmekurven. Gradient: 1 mM Substrat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Substrat; pH: 6,8.



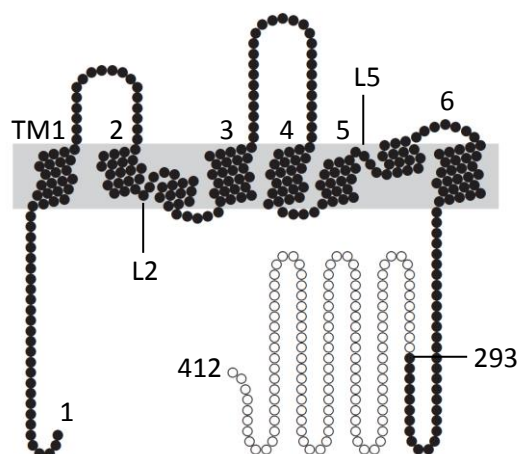
**Tab. 4.2:** Aufnahmeraten der kodon-optimierten Konstrukte *optTgFNT1-3*

Aufnahmerate (nmol mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )			
	<i>optTgFNT1</i>	<i>optTgFNT2</i>	<i>optTgFNT3</i>
Formiat	0,015 ± 0,001	0,001 ± 0,000	0,499 ± 0,036
Acetat	0,012 ± 0,001	--*	0,499 ± 0,059
L-Laktat	0,004 ± 0,003	--*	0,058 ± 0,007

\*Messung nicht durchgeführt

#### 4.1.4 Einfluss der Termini auf Expression und Funktionalität von *TgFNT1* und *TgFNT2*

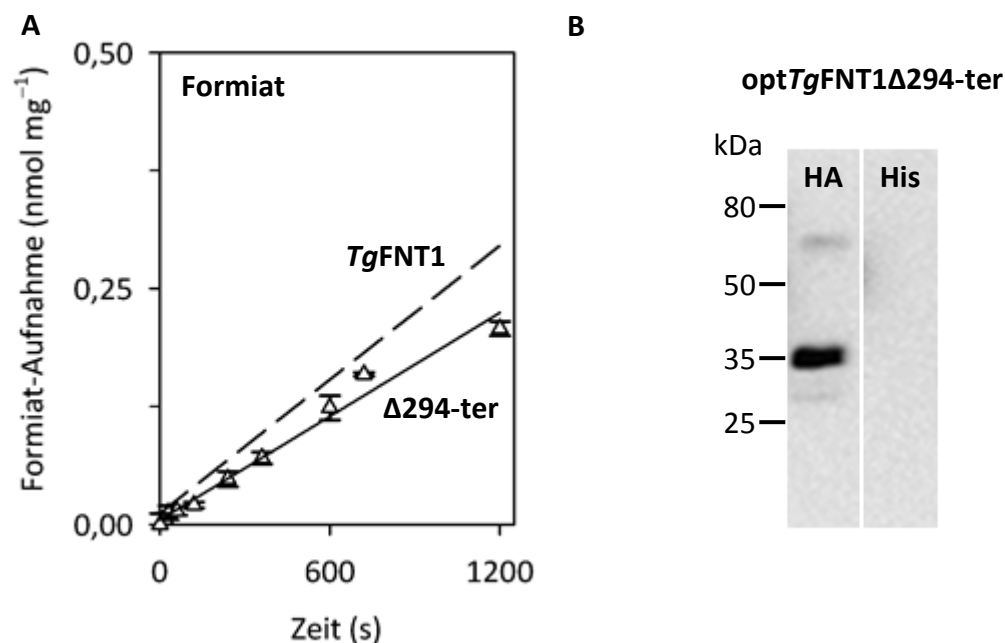
Die Formiat-Nitrit-Transporter aus Kokzidien wie *T. gondii* besitzen im Gegensatz zu FNTs anderer Parasiten des Stammes Apicomplexa sehr lange C-Termini. *TgFNT2* besitzt zusätzlich einen langen N-Terminus. Da nur für *TgFNT3* ein FNT-typischer exponentieller Kurvenverlauf gezeigt werden konnten, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der Termini auf die Herstellung und Funktionalität der Transporter *optTgFNT1* und *optTgFNT2* in der Hefe untersucht. Die Termini wurden dafür in ihrer Länge variiert und der Effekt mittels Western Blot und direkter Aufnahme von <sup>14</sup>C-Substraten untersucht. Als Erstes wurde der C-Terminus von *TgFNT1* um 119 Aminosäuren verkürzt, sodass nur noch 32 Aminosäuren übrig blieben. Der Großteil des Terminus war also nicht mehr vorhanden. Diese Verkürzung wird im Folgenden *optTgFNT1Δ294-ter* genannt und ist in Abbildung 4.14 graphisch dargestellt.



**Abb. 4.14** Topologie-Plot von *optTgFNT1Δ294-ter* und Markierung der entsprechenden Verkürzung (weiße Punkte). Erstellt mit TeXtopo von Prof. Dr. Eric Beitz (205).

## Ergebnisse

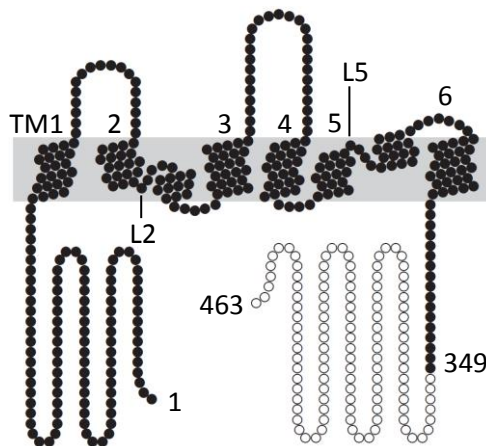
Dieses Konstrukt zeigte im  $^{14}\text{C}$ -Aufnahmesassay eine vergleichbare, lineare Aufnahmekurve und mit  $0,012 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  eine vergleichbare Aufnahme­rate für Formiat wie *TgFNT1* ohne Verkürzung (Abb. 4.15 A, Tab. 4.3). Auffällig bei dieser Variante war die stabile Expression in der Hefe, da trotz unveränderter Funktionalität keine Abbruchfragmente im Western Blot auftraten. Interessant war auch, dass sich dieses Konstrukt nicht mit dem C-terminalem Anti-His-Antikörper nachweisen ließ (Abb. 4.15 B). Die Verkürzung führte zwar zu einer stabilen Expression des Konstruktes, eine Änderung der Aufnahmekurve war jedoch nicht zu beobachten.



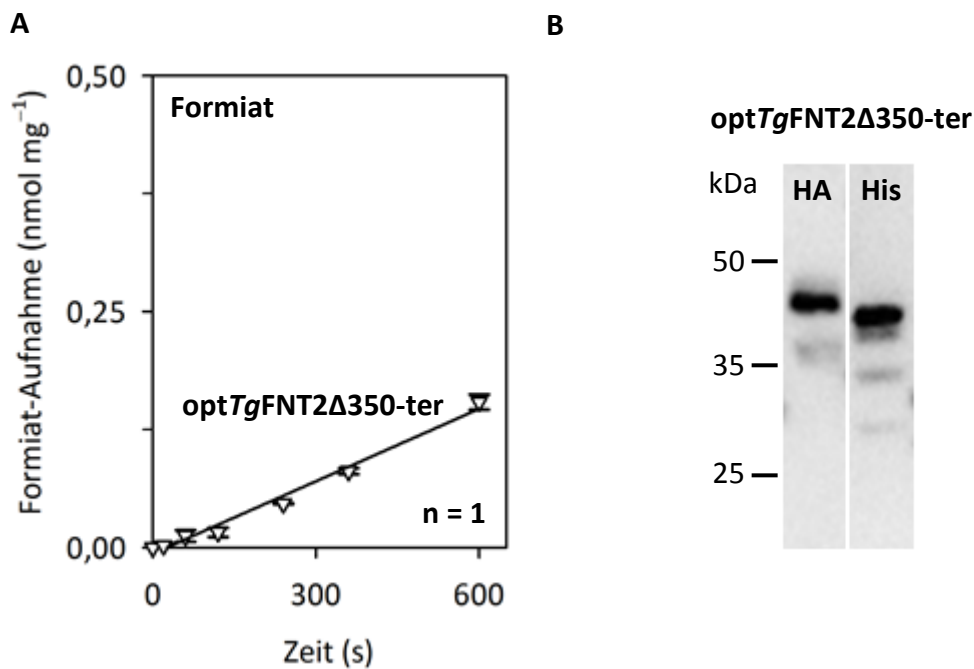
**Abb. 4.15 A:** Aufnahmekurve für das Substrat Formiat ( $\Delta$ ) von in Hefe hergestellten *optTgFNT1* $\Delta 294\text{-ter}$  (schwarze Linie) über 20 min verglichen mit dem unverkürzten Konstrukt (gestrichelte Linie). Die Werte nicht exprimierender Kontrollhefen wurden abgezogen. Gradient: 1 mM Substrat mit  $0,04 \mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ -Substrat; pH: 6,8. **B:** Western Blot von *optTgFNT1* $\Delta 294\text{-ter}$  (32,1 kDa) detektiert mit N-terminalem Hemagglutinin-*tag* (HA) und 10x-Histidin-*tag* (His). Auftragsmenge: 25  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein

Als nächstes wurde der C-Terminus von *TgFNT2* verkürzt. Aufgrund unterschiedlicher vorhandener Schnittstellen in den kodierenden DNA-Sequenzen wurde der C-Terminus von *TgFNT2* nur um 114 Aminosäuren verkürzt, was in einem Terminus mit einer Länge von 14 Aminosäuren resultierte. Der entstandene C-Terminus war also noch kürzer als der von *optTgFNT1* $\Delta 294\text{-ter}$ . Die Verkürzung *optTgFNT2* $\Delta 350\text{-ter}$  ist in Abbildung 4.16 graphisch dargestellt.

## Ergebnisse



**Abb. 4.16** Topologie-Plot von *optTgFNT2Δ350-ter* und Markierung der entsprechenden Verkürzung (weiße Punkte). Erstellt mit TeXtopo von Prof. Dr. Eric Beitz (205).

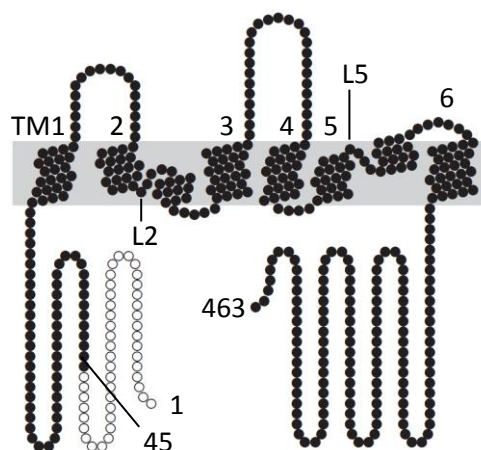


**Abb. 4.17 A:** Aufnahmekurve für das Substrat Formiat ( $\Delta$ ) von in Hefe hergestellten *optTgFNT2Δ350-ter* über 10 min. Die Werte nicht exprimierender Kontrollhefen wurden abgezogen. Gradient: 1 mM Substrat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$  <sup>14</sup>C-Substrat; pH: 6,8. **B:** Western Blot von *optTgFNT2Δ350-ter* (38,3 kDa) detektiert mit N-terminalem Hemagglutinin-*tag* (HA) und 10x-Histidin-*tag* (His). Auftragsmenge: 25  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein

## Ergebnisse

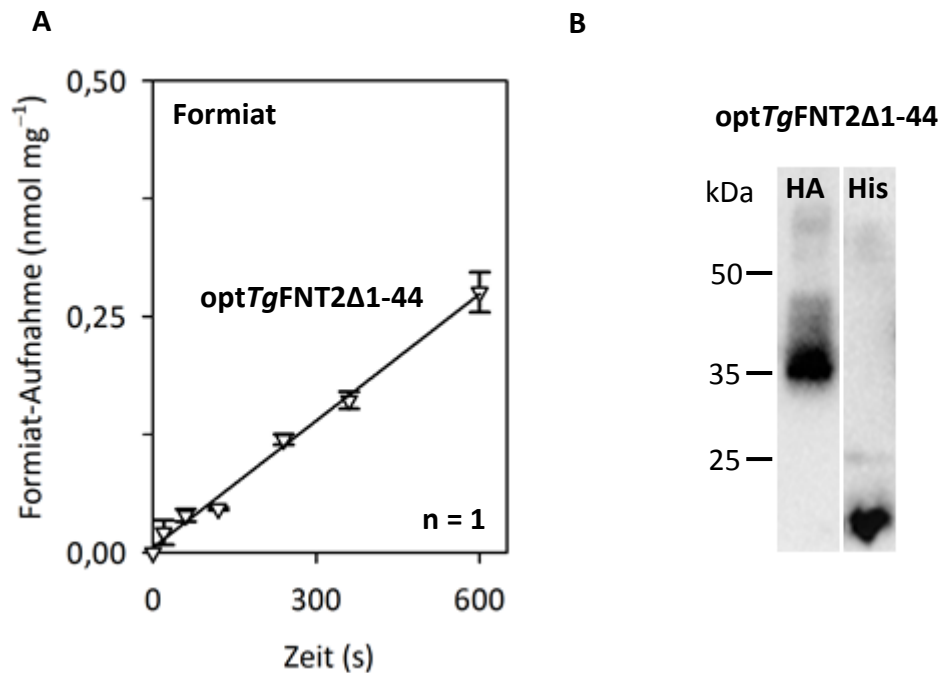
Im Gegensatz zum unverkürzten *TgFNT2* ist das C-terminal verkürzte Konstrukt funktionell und zeigte eine Leitfähigkeit für Formiat. Der lineare Kurvenverlauf und die Aufnahme­rate von  $0,014 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  für Formiat entsprach hierbei dem unverkürzten *TgFNT1* (Abb. 4.17 A, Tab. 4.3). Auf dem Western Blot zeigten sich mit N- und C-terminalen Antikörpern zwar schwache Abbruchfragmente, jedoch war auch eine starke Bande auf der Gesamtgröße des Proteins zu detektieren. Bei der unverkürzten Variante war hingegen zuvor die stärkste Bande nicht auf der richtigen Laufhöhe (Abb. 4.9). Durch die C-terminale Verkürzung kam es bei *TgFNT2* also ebenfalls zu einer stabileren Expression des Konstruktes und im Gegensatz zum unverkürzten Konstrukt zu einer Formiat-Leitfähigkeit.

Um zu untersuchen, ob auch der N-Terminus einen Einfluss auf die Funktion hat, wurde eine Verkürzung des Terminus um 44 Aminosäuren vorgenommen. Diese Variante von *TgFNT2* ist in Abbildung 4.18 dargestellt.



**Abb. 4.18** Topologie-Plot von opt*TgFNT2*Δ1-44 und Markierung der entsprechenden Verkürzung (weiße Punkte). Erstellt mit TeXtopo von Prof. Dr. Eric Beitz (205).

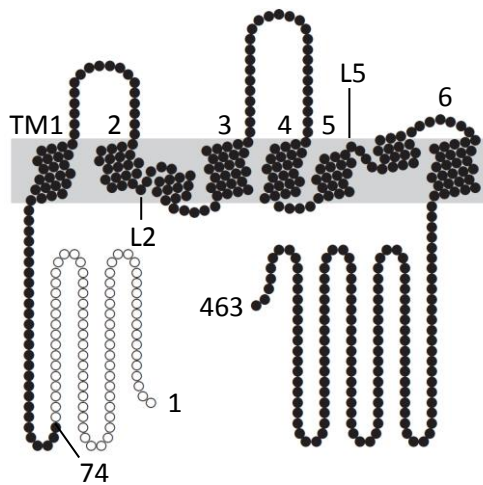
Bei diesem Konstrukt ergab sich wie bei der C-terminalen Verkürzung auch ein linearer Kurvenverlauf (Abb. 4.19 A), allerdings mit einer um Faktor 2 erhöhten Aufnahme­rate von  $0,028 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (Tab. 4.3). Bei der Kontrolle der Expression mittels Western Blot wurde deutlich, dass dieses N-terminal verkürzte Konstrukt instabil war und sich Teile des C-Terminus lösten (Abb. 4.19 B). Es war mittels Antikörpern gerichtet gegen den N-terminalen Hemagglutinin-tag keine Bande zu erkennen, die der Gesamtgröße des Proteins entsprach. Hier war nur eine Bande zu beobachten, die einer kleineren Proteingröße entsprach. Mittels C-terminalen Histidin-tag konnte außerdem eine starke Bande unterhalb von 25 kDa detek-



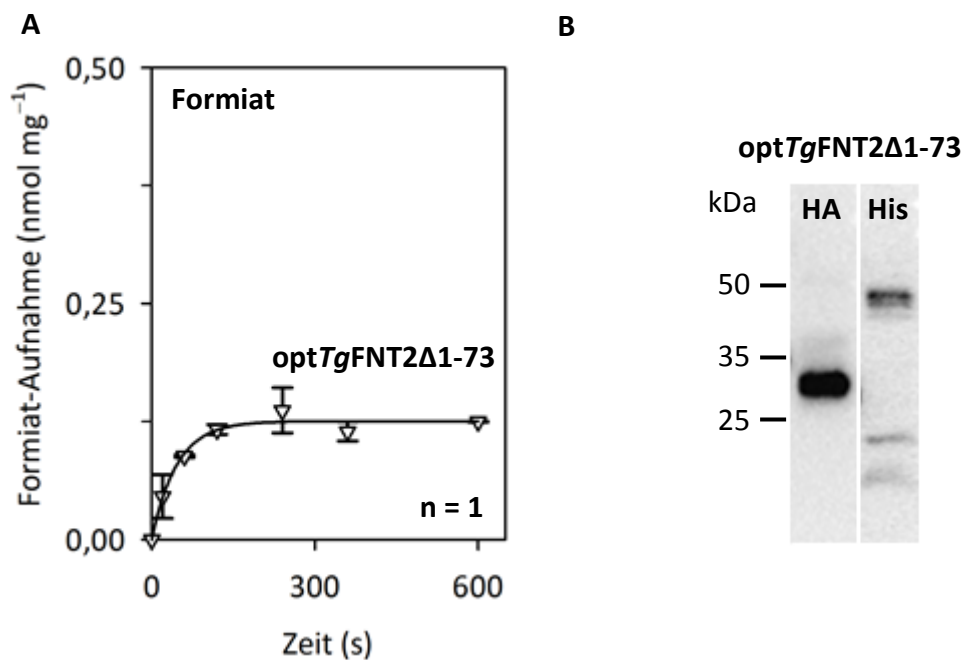
**Abb. 4.19 A:** Aufnahmekurve für das Substrat Formiat ( $\Delta$ ) von in Hefe hergestellten *optTgFNT2Δ1-44* über 10 min. Die Werte nicht exprimierender Kontroll-hefen wurden abgezogen. Gradient: 1 mM Substrat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Substrat; pH: 6,8. **B:** Western Blot von *optTgFNT2Δ1-44* (45,8 kDa) detektiert mit N-terminalem Hemagglutinin-*tag* (HA) und 10x-Histidin-*tag* (His). Auftragsmenge: 25  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein

tiert werden. Dies spricht für ein kleines Abbruchfragment des C-Terminus. Trotz instabiler Expression in der Hefe konnte auch hier durch die Verkürzung eines Terminus eine Formiat-Leitfähigkeit erreicht werden. Da bei diesem Konstrukt im Gegensatz zur C-terminalen Verkürzung auf dem Western Blot noch keine Proteinbande auf der richtigen Höhe nachgewiesen werden konnte, wurde der N-Terminus noch weiter verkürzt. Dies resultierte im Konstrukt *optTgFNT2Δ1-73* mit einer Verkürzung des N-Terminus um 73 Aminosäuren. Das entstandene Konstrukt ist in Abbildung 4.20 dargestellt. Interessanterweise zeigte diese Verkürzung eine Änderung im Transportverhalten. Während *optTgFNT2Δ1-44* einen linearen Kurvenverlauf gezeigt hatte, konnte bei *optTgFNT2Δ1-73* ein exponentieller Kurvenverlauf beobachtet werden (Abb. 4.21 A). Die Transportrate lag mit 0,140 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> dadurch fünfmal höher als bei *optTgFNT2Δ1-44* (Tab 4.3). Trotz der beobachteten Transportänderung war auf dem Western Blot nur mit dem Antikörper gerichtet gegen den Histidin-*tag* eine Proteinbande auf der richtigen Höhe detektierbar und auch hier waren C-terminale Abbruchfragmente zu erkennen (Abb. 4.21 B).

## Ergebnisse



**Abb. 4.20** Topologie-Plot von *optTgFNT2Δ1-73* und Markierung der entsprechenden Verkürzung (weiße Punkte). Erstellt mit TeXtopo von Prof. Dr. Eric Beitz (205).



**Abb. 4.21 A:** Aufnahmekurve für das Substrat Formiat ( $\Delta$ ) von in Hefe hergestellten *optTgFNT2Δ1-73* über 10 min. Die Werte nicht exprimierender Kontrollhefen wurden abgezogen. Gradient: 1 mM Substrat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Substrat; pH: 6,8. **B:** Western Blot von *optTgFNT2Δ1-73* (42,5 kDa) detektiert mit N-terminalem Hemagglutinin-*tag* (HA) und 10x-Histidin-*tag* (His). Auftragsmenge: 25  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein

## Ergebnisse

Zusammengefasst konnten also folgende Beobachtungen gemacht werden. Die Verkürzung des C-Terminus von *TgFNT1* hatte einen Effekt auf die stabile Expression des Konstruktes, jedoch nicht auf die Funktionalität (Abb. 4.15). Wurde der C-Terminus von *TgFNT2* verkürzt, ergab sich eine stabile Expression und im  $^{14}\text{C}$ -Aufnahmeassay eine lineare Aufnahmekurve (Abb. 4.17). Bei Verkürzung des N-Terminus um 44 Aminosäuren ergab sich trotz instabiler Expression ebenfalls eine lineare Aufnahmekurve mit doppelt so hoher Rate wie beim C-terminal verkürzten Konstrukt (Abb. 4.19). Verkürzte man den N-Terminus weiter bis Position 73 ergab sich wiederum ein exponentieller Kurvenverlauf, obwohl die Expression auch hier weiterhin instabil war (Abb. 4.21). Für *TgFNT2* konnte also mittels dieser Experimente die für eine Funktionsänderung entscheidende Region zwischen Aminosäureposition 43 und 73 am N-Terminus eingekreist werden. Zusätzlich lassen die Ergebnisse der Western Blots auf eine Interaktion mit dem C-Terminus schließen, da bei Verkürzung des N-Terminus Teile vom C-Terminus fragmentiert sind. Dies weist auf eine Rolle des N-Terminus zur Stabilisierung des C-Terminus hin. Die Aufnahmezeiten für die Formiat-Leitfähigkeit der verschiedenen Verkürzungen sind in Tabelle 4.3 zusammenfassend aufgeführt.

**Tab. 4.3:** Aufnahmezeiten der verschiedenen verkürzten Konstrukte von *optTgFNT1* und *optTgFNT2* berechnet aus den Aufnahmekurven über lineares oder exponentielles *fitting*.

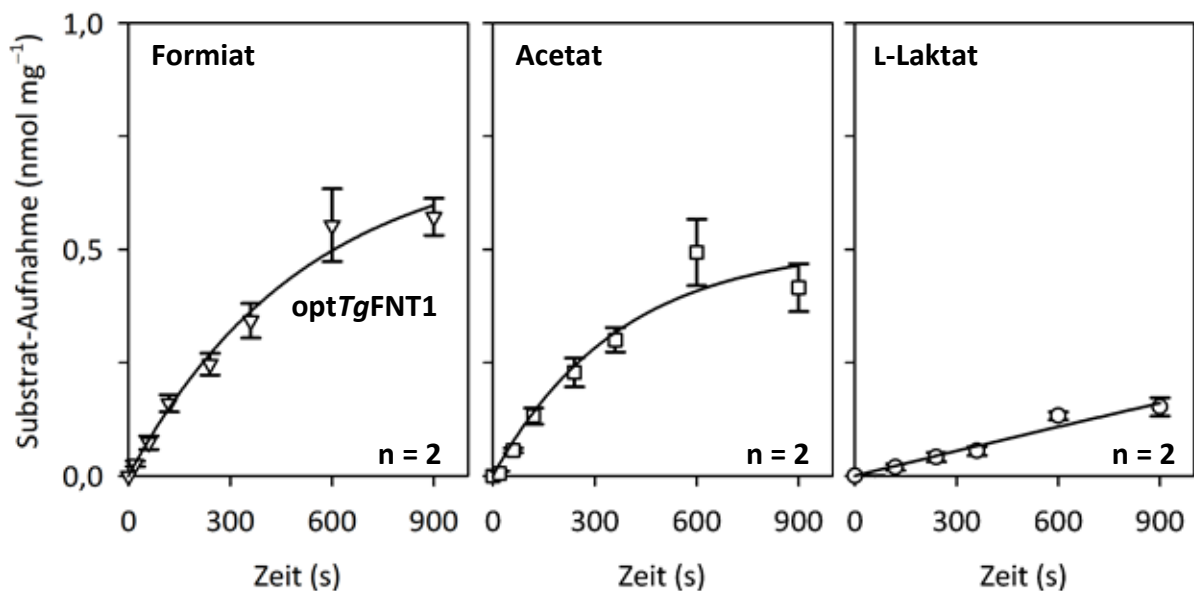
Aufnahmerate ( $\text{nmol mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )				
	<i>optTgFNT1</i>	<i>optTgFNT2</i>	<i>optTgFNT2</i>	<i>optTgFNT2</i>
	$\Delta 294\text{-ter}$	$\Delta 350\text{-ter}$	$\Delta 1\text{-}44$	$\Delta 1\text{-}73$
Formiat	$0,012 \pm 0,001$	$0,014 \pm 0,001$	$0,028 \pm 0,002$	$0,145 \pm 0,030$

### 4.1.5 Einfluss des Substratgradienten auf die linearen Kurvenverläufe von *TgFNT1* und *TgFNT2*

Die Konstrukte *optTgFNT1*, *optTgFNT2* $\Delta 350\text{-ter}$  und *optTgFNT2* $\Delta 1\text{-}44$  zeigten einen für FNTs untypischen linearen Kurvenverlauf. Deshalb stellte sich die Frage, ob diese nur aufgrund der langsamen Aufnahmezeit linear erschienen oder es sich tatsächlich um einen linearen Kurvenverlauf handelte. Da man in die initiale Phase einer Exponentialfunktion eine Gerade

## Ergebnisse

legen kann, wäre es möglich, dass die beobachteten linearen Kurvenverläufe nach genügend Zeit doch noch in einen exponentiellen Kurvenverlauf übergehen. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels  $^{14}\text{C}$ -Substrataufnahmeassays im Hefesystem untersucht. Zunächst war angedacht, die Zeit der Aufnahme zu erhöhen. Der Assay sollte allerdings nicht über zu lange Zeiträume durchgeführt werden, da die Stabilität der Hefe nicht mehr ausreicht, um noch zuverlässige Ergebnisse zu erhalten. Deshalb wurde der Substratgradient um das Fünffache von 1 mM auf 5 mM erhöht, um die Geschwindigkeit der Aufnahme des Substrates in die Hefe zu beschleunigen. Dies ermöglicht eine größere Gesamtaufnahme in die Hefezellen, sodass eine eventuelle Sättigung der Aufnahme schneller eintreten konnte. Für das unverkürzte *optTgFNT1* ergaben sich im  $^{14}\text{C}$ -Aufnahmeassay bei einer Messzeit von 15 min für Acetat und Formiat nun Kurven, die mehr mit einem exponentiellen Kurvenverlauf korrelierten als mit einem linearen Verlauf. Es wurde allerdings keine vollständige Sättigung der Aufnahme erreicht, da noch kein ausgeprägtes Plateau zu sehen war. Dafür hätte die Messzeit oder der Gradient noch weiter erhöht werden müssen. Bedingt durch die langsame Aufnahmerate für L-Laktat war hier trotz Gradientenerhöhung ein linearer Kurvenverlauf zu sehen. Die Aufnahmekurven sind in Abbildung 4.22 aufgetragen.

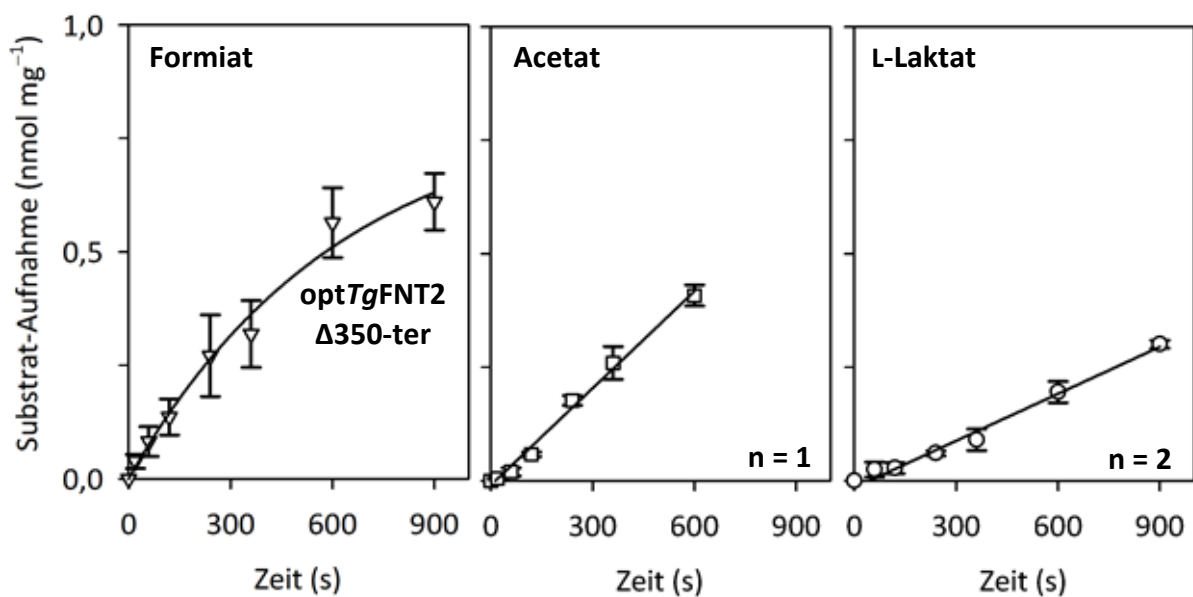


**Abb. 4.22** Aufnahmekurven für die Substrate Formiat ( $\Delta$ ), Acetat ( $\square$ ) und L-Laktat ( $\circ$ ) von in Hefe hergestellten *optTgFNT1* über 15 min. Die Werte der nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. Gradient: 5mM Substrat mit  $0,04 \mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Substrat; pH: 6,8.



## Ergebnisse

Anschließend wurde der Einfluss des 5 mM Substratgradienten auf das *optTgFNT2Δ350*-ter-Konstrukt untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.23 aufgetragen. Für Formiat war nach 15-minütiger Aufnahme ebenfalls ein exponentieller Kurvenverlauf zu erkennen. Die Aufnahme von Acetat zeigte nach 10 min einen Kurvenverlauf, der besser mit einem linearen Verlauf korrelierte. Wie bei *optTgFNT1* wäre hier auch ein exponentieller Verlauf zu erwarten gewesen. Dieser Verlauf wurde bei der Acetat-Aufnahmekurve von *optTgFNT1* allerdings erst nach 15 Minuten deutlich (Abb. 4.22). Anhand der beiden Acetat-Kurven kann man also gut erkennen, dass die eigentlich exponentiellen Kurven in den ersten 10 min linear verlaufen. Dies lässt sich auch auf die gezeigten Formiat-Kurven übertragen. Würde man den 15 min-Wert der Kurven nicht mit einbeziehen, würde auch hier eine lineare Korrelation funktionieren. Für L-Laktat konnte bei *optTgFNT2Δ350*-ter ebenfalls aufgrund der langsamen Aufnahmezeit eine lineare Aufnahme über 15 min gezeigt werden.

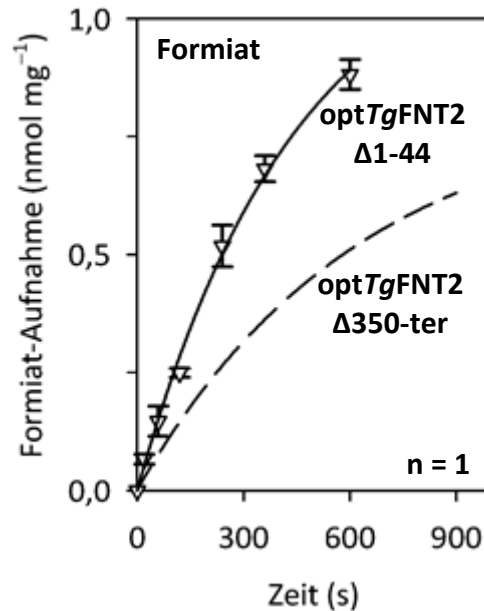


**Abb. 4.23** Aufnahmekurven für die Substrate Formiat ( $\Delta$ ) und Acetat ( $\square$ ) von in Hefe hergestellten *optTgFNT2Δ350*-ter über 10-15 min. Die Werte nicht exprimierender Kontrollhefen wurden abgezogen. Gradient: 5mM Substrat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$  <sup>14</sup>C-Substrat; pH: 6,8.

Als weitere Variante, die bei den 1 mM-Experimenten einen linearen Kurvenverlauf zeigte, wurde die N-terminale Verkürzung *optTgFNT2Δ1-44* mit erhöhtem Gradienten untersucht. Die Aufnahmekurve für Formiat zeigte wie zuvor eine höhere Aufnahmezeit als

## Ergebnisse

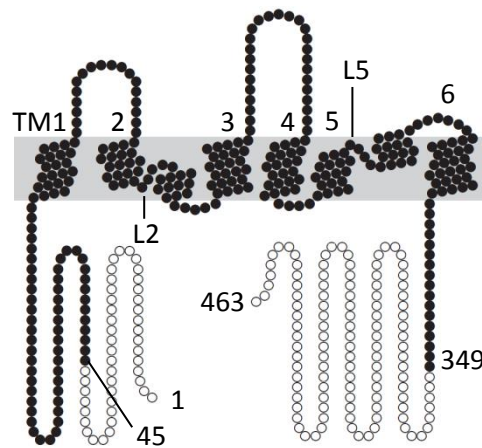
*optTgFNT2* $\Delta$ 350-ter und tendierte bereits nach 10 min zu einem Verlauf, der besser mit einer Exponentialfunktion korrelierte als mit einem linearen Zusammenhang (Abb. 4.24).



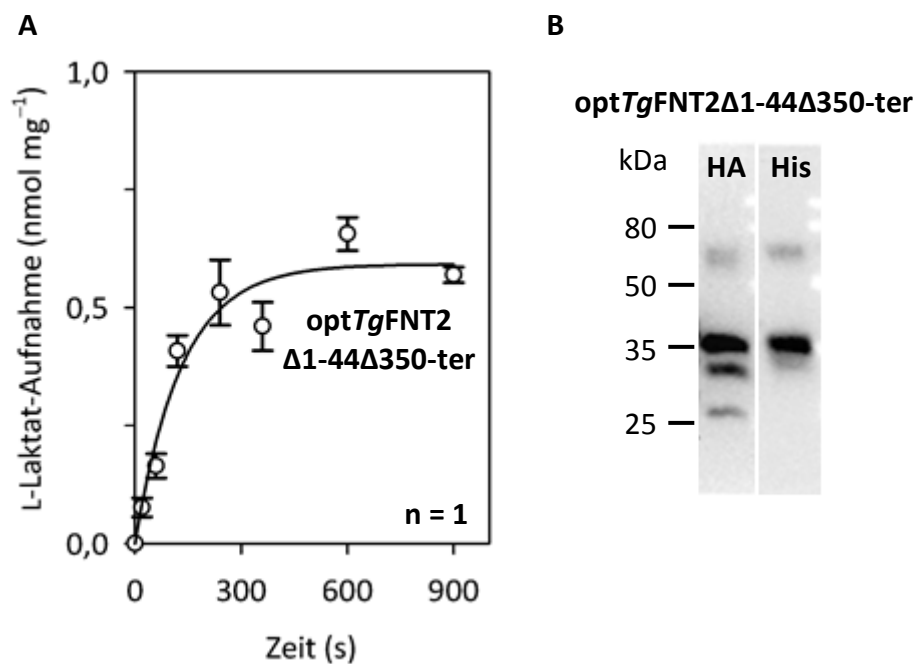
**Abb. 4.24:** Aufnahmekurve für das Substrat Formiat ( $\Delta$ ) von in Hefe hergestellten *optTgFNT2* $\Delta$ 1-44 über 10 min (schwarze Linie) im Vergleich zu *optTgFNT2* $\Delta$ 350-ter. Die Werte der nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. Gradient: 5mM Substrat mit 0,04  $\mu$ Ci <sup>14</sup>C-Substrat; pH: 6,8.

Im Rahmen der Experimente mit erhöhtem Substratgradienten wurde noch eine neue Verkürzung von *optTgFNT2* getestet. Die C-terminalen Verkürzungen *optTgFNT2* $\Delta$ 350-ter und die N-terminale *optTgFNT2* $\Delta$ 1-44 hatten in den 1 mM-Experimenten jeweils eine langsamere Aufnahmezeit gezeigt als die N-terminale Verkürzung *optTgFNT2* $\Delta$ 1-73. Deshalb wurde nun eine doppelt verkürzte Variante generiert. Daraus resultierte das Konstrukt *optTgFNT2* $\Delta$ 1-44 $\Delta$ 350-ter. Die Verkürzungen sind in Abbildung 4.25 graphisch dargestellt. Die Untersuchung der Leitfähigkeit geschah direkt mit dem physiologisch relevanten L-Laktat. Die neue Variante zeigte für L-Laktat einen exponentiellen Kurvenverlauf mit Erreichen eines Plateaus innerhalb von 10 min (Abb. 4.26 A). Auch die Expression des Proteins in der Hefe zeigte sich im Western Blot stabil mit der stärksten Bande bei der richtigen Laufhöhe (Abb. 4.26 B).

## Ergebnisse



**Abb. 4.25** Topologie-Plot von *optTgFNT2Δ1-44Δ350-ter* und Markierung der entsprechenden Verkürzungen (weiße Punkte). Erstellt mit TeXtopo von Prof. Dr. Eric Beitz (205).



**Abb. 4.26 A:** Aufnahmekurve des Substrats L-Laktat (o) von in Hefe hergestellten *optTgFNT2Δ1-44Δ350-ter* (schwarze Linie) über 15 min. Die Werte der nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. Gradient: 5mM L-Laktat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$  <sup>14</sup>C- L-Laktat; pH: 6,8.

**B:** Western Blot des verkürzten Konstrukts *optTgFNT2Δ1-44Δ350-ter* (33,1 kDa) detektiert mit Antikörpern gerichtet gegen den N-terminalen Hemagglutinin-*tag* (HA) und 10x-Histidin-*tag* (His). Auftragsmenge: 25  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein.

## Ergebnisse

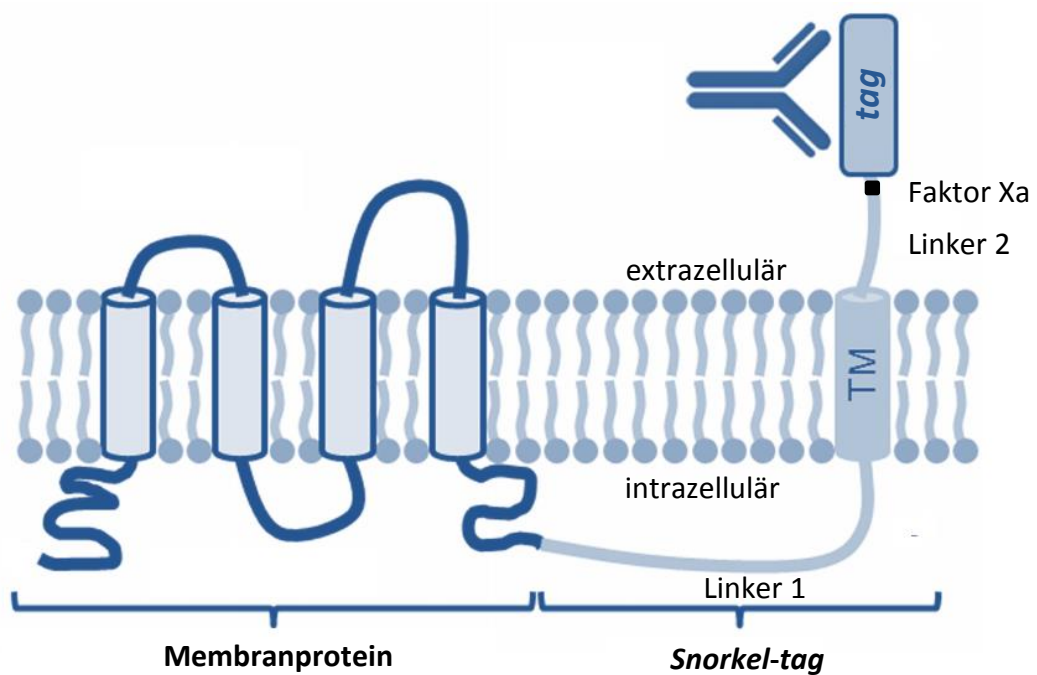
Die Verkürzung beider Termini führte also zu einer exponentiellen Aufnahmekurve mit einer schnellen Aufnahmerate und Erreichen des Plateaus innerhalb von 10 Minuten. Gleichzeitig ist auf dem Blot eine stabile Expression des Konstruktes zu erkennen ohne C-terminale Abbruchfragmente. Dies bestätigt erneut eine mögliche Interaktion von N- und C-Terminus, die durch doppelte Verkürzung nicht mehr stattzufinden scheint und zu einer stabilen Expression führt.

Zusammenfassend konnte durch die 5 mM-Experimente gezeigt werden, dass auch die Konstrukte mit langsamer Aufnahmerate nach Erhöhung des Gradienten annähernd einen FNT-typischen exponentiellen Kurvenverlauf aufwiesen. Außerdem konnten die Experimente die vorher aufgezeigten Unterschiede zwischen den verschiedenen Verkürzungen und deren Rolle zur Änderung von langsamer zu schneller Aufnahmerate noch einmal bestätigen. Nun blieb jedoch weiterhin die Frage offen, wie die Unterschiede in den Aufnahmeraten zustande kamen. Hierbei galt herauszufinden, ob die geringere Aufnahmerate durch weniger in die Membran eingebautes Protein beziehungsweise instabiles Protein begründet ist oder ob eine eventuelle Regulation durch die langen Termini eine Rolle spielt.

### **4.1.6 Nachweis von Membranproteinen in der Hefemembran**

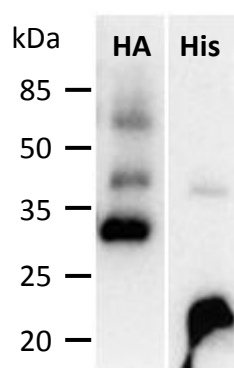
Um diese Fragestellung zu klären, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Methode zur Quantifizierung der Transporter in der Hefe-Plasmamembran getestet. Dies sollte durch die Expression eines sogenannten *Snorkel-tags* nach Brown *et al.* (190) realisiert werden. Bei dieser Methode wird das Membranprotein durch Klonierung C-terminal mit einem „Schnorchel“-Protein fusioniert. Dieses besteht aus einem Linker, einer einzelnen Transmembranspanne und einem 10x-Histidin-*tag* mit Faktor Xa-Schnittstelle, der extrazellulär herausragt (Abb. 4.27). Gleichzeitig ist N-terminal weiterhin ein Hemagglutinin-*tag* vorhanden. Durch einen Faktor Xa-Verdau von Protoplasten könnten hiermit die membranständigen Proteine verkürzt werden, was nach anschließendem Western Blot durch Detektion mit einem Anti-Hemagglutinin-Antikörper sichtbar gemacht werden könnte. Außerdem wären diese nicht mehr mit dem Anti-Histidin-Antikörper detektierbar. Der Anteil an membranständigen und gelösten Protein könnte also mit dieser Methode festgestellt werden. Um die Methode durchzuführen, wurde die Sequenz des *Snorkel-tags* synthetisiert (Thermo Fisher) und über *Sal I / Xho I* in den Vektor pDRTxa C-terminal zwischen die kodierende Sequenz des FNTs und die Faktor Xa Schnittstelle kloniert. Für den ersten Test

wurde mit dem in Hefe stabil exprimierbaren Formiat-Nitrit-Transporter *BbFNT*, der in Kapitel 4.3 näher beschrieben wird, gearbeitet.



**Abb. 4.27** Membranprotein mit C-terminal fusioniertem *Snorkel-tag*. Dieser weist eine einzelne Transmembranspanne (TM), zwei Linker, eine Faktor Xa-Schnittstelle und einen 10x-Histidin-*tag* auf (*tag*), der extrazellulär hinausragt. Modifiziert nach (190).

#### ***BbFNT* mit C-terminalem *Snorkel-tag***

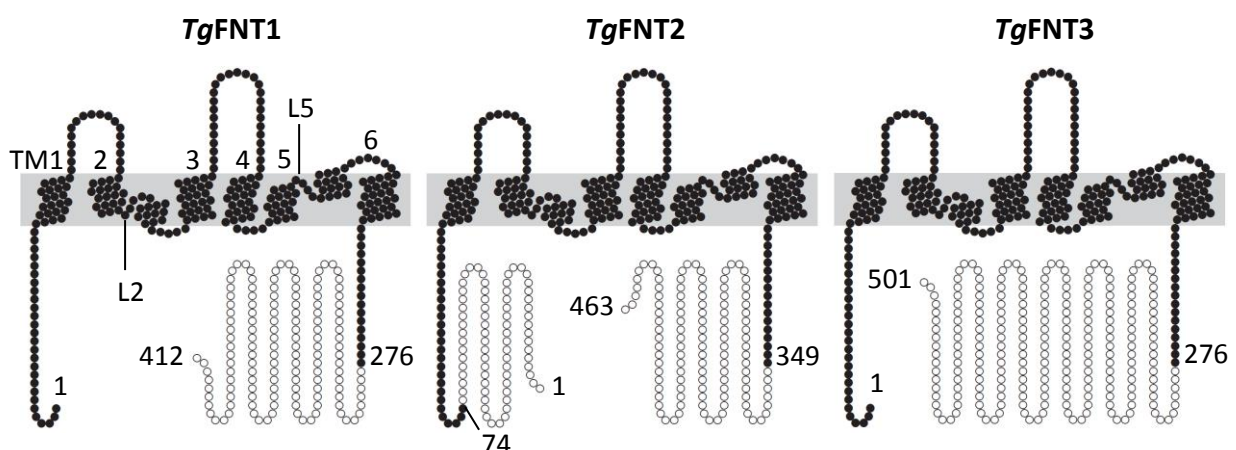


**Abb. 4.28** Western Blot des Formiat-Nitrit Transporters *BbFNT* mit C-terminal fusioniertem *Snorkel-tag* (39,0 kDa) detektiert mit Antikörpern gerichtet gegen den N-terminalen Hemagglutinin-*tag* (HA) und 10x-Histidin-*tag* (His). Es waren auch Banden von nicht fusioniertem *BbFNT* (30,0 kDa) zu erkennen. Auftragsmenge: 25 µg Gesamtprotein.

Der Western Blot ergab eine Bande auf der richtigen Größe, jedoch waren auch starke Banden des nicht fusionierten Proteins zu sehen. Die Detektion mit Anti-Histidin-Antikörpern offenbarte eine starke Bande im unteren kDa Bereich, was für eine starke Instabilität des Fusionsproteins spricht. Aus diesem Grund wurde diese Methode verworfen, sodass im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden konnte, ob oder mit welcher Menge die Konstrukte von *optTgFNT1* und *optTgFNT2* ohne Funktionalität oder mit langsamer Aufnahme rate überhaupt in der Plasmamembran der Hefezellen integriert wurden.

#### 4.1.7 Verkürzung der Termini auf die gleiche Länge führte zur gleichen Expression und Funktionalität von *TgFNT1-3*

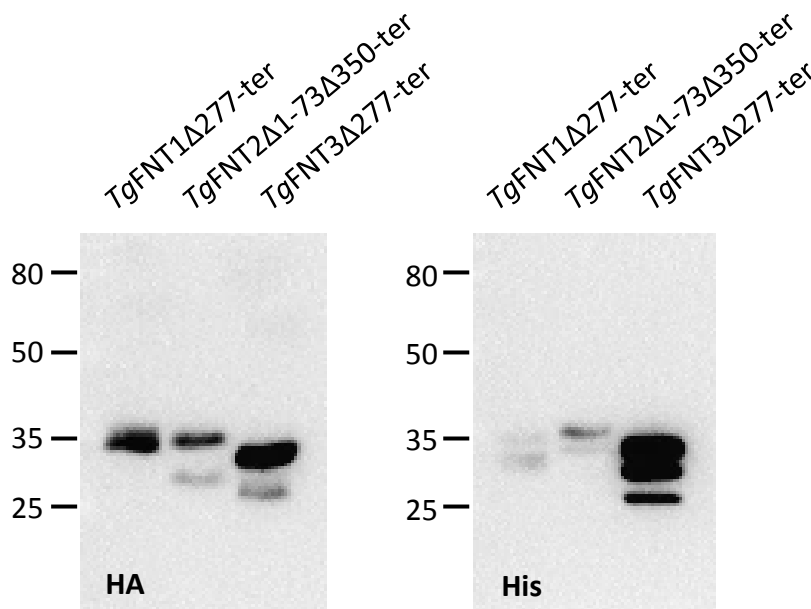
Auch wenn die genaue Ursache nicht geklärt werden konnte, wurde anhand der vorher genannten Ergebnisse gezeigt, dass die Verkürzung der Termini einen Einfluss auf die Aufnahme rate der *TgFNTs* besitzt. Unterschiedliche Verkürzungen zeigten außerdem unterschiedliche Änderungen in der Aufnahme rate und der Expression der Konstrukte. Diese Tatsache erschwerte eine Charakterisierung und den Vergleich der drei *TgFNTs* untereinander. Deshalb lag der Gedanke nahe, die Termini aller drei *TgFNTs* auf die gleiche Länge zu kürzen, um zu untersuchen, ob dies zu einer gleichen Expression und zu einer gleichen Aufnahme rate führt. Dafür wurde der C-Terminus aller drei *TgFNTs* auf eine Länge von 14 Aminosäuren gekürzt. Der N-Terminus von *TgFNT2* wurde zusätzlich auf die gleiche Länge des N-Terminus von *TgFNT1* und *TgFNT3* gekürzt. Die vorgenommenen Verkürzungen sind in Abbildung 4.29 dargestellt.



**Abb. 4.29:** Topologie-Plots von *TgFNT1-3* mit Markierung der entsprechenden Verkürzungen (weiße Punkte) auf gleiche Länge, um nur die Kernregion darzustellen und zu charakterisieren. Erstellt mit TeXtopo von Prof. Dr. Eric Beitz (205).

## Ergebnisse

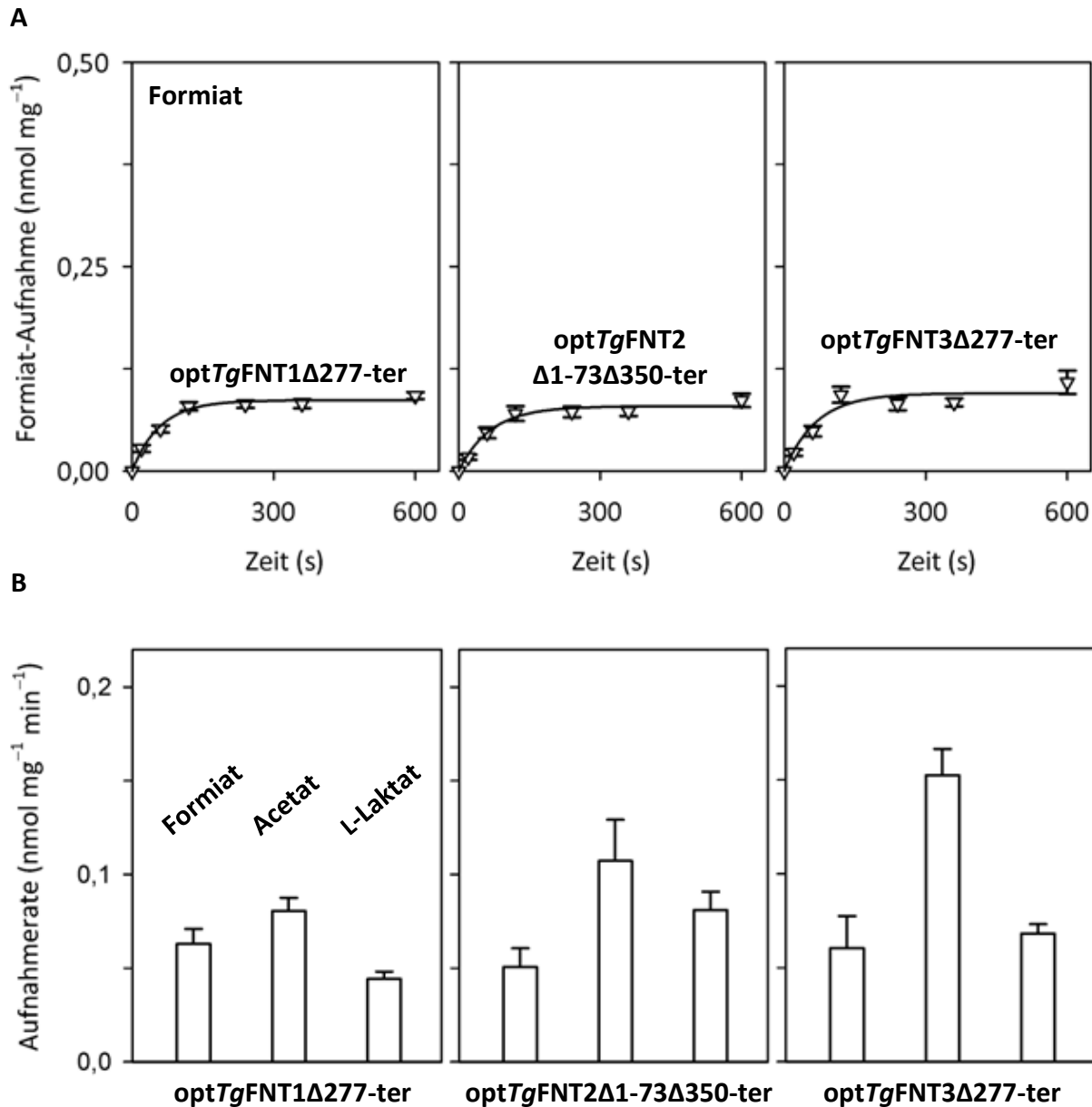
Anschließend wurde die Expression der generierten Konstrukte in Hefe mittels Western Blot überprüft. Alle drei *TgFNTs* zeigten nach Verkürzung auf die gleiche Länge eine stabile Expression ohne die Vielzahl an Abbruchfragmenten, die bei den vorherigen Varianten zu beobachten waren (Abb. 4.30).



**Abb. 4.30:** Western Blot der kodon-optimierten und terminal verkürzten Konstrukte *TgFNT1Δ277-ter* (30,3 kDa), *TgFNT2Δ1-73Δ350-ter* (29,9 kDa) und *TgFNT3Δ277-ter* (30,0 kDa) detektiert mit Antikörpern gerichtet gegen den N-terminalen Hemagglutinin-*tag* (HA) und C-terminalen 10x-Histidin-*tag* (His). Auftragsmenge: 25 µg Gesamtprotein.

Die verkürzten Konstrukte wurden anschließend mittels  $^{14}\text{C}$ -Aufnahemessung mit einem 1 mM Substratgradienten auf ihre Funktion hin untersucht. Die Verkürzung des C-Terminus auf die gleiche Länge führte letztlich bei allen drei *TgFNTs* zur Änderung der Aufnahmekurve (Abb. 4.31). Bei *TgFNT1* änderte sich der Kurvenverlauf von einem linearen zu einem exponentiellen Kurvenverlauf, der nach 10 min eine Sättigung erreichte und eine schnellere Aufnahmerate aufwies als das unverkürzte Konstrukt (Tab. 4.4). *TgFNT3* zeigte durch die Verkürzung weiterhin exponentielle Kurvenverläufe, die aber eine geringere Gesamtaufnahme aufwiesen als die Kurven des unverkürzten Konstrukts. Außerdem verringerte sich die Aufnahmerate von Formiat und Acetat (Tab 4.4). Für L-Laktat konnte jedoch im Vergleich zur unverkürzten Variante eine schnellere Aufnahmerate festgestellt werden (Tab. 4.4). *TgFNT2* wurde im Vergleich zur unverkürzten Variante funktionell und wies ebenfalls einen exponentiellen Kurvenverlauf auf (Abb. 4.31). Die Rate für Formiat war hierbei allerdings

## Ergebnisse



**Abb. 4.31 A:** Aufnahmekurven für Formiat ( $\Delta$ ) von in Hefe hergestellten *optTgFNT1Δ277-ter*, *optTgFNT2Δ1-73Δ350-ter*, *optTgFNT3Δ277-ter* über 10 min. Die Werte der nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. **B:** Aufnahmeraten von *optTgFNT1Δ277-ter*, *optTgFNT2Δ1-73Δ350-ter*, *optTgFNT3Δ277-ter* (weiße Balken) für die verschiedenen Substrate berechnet aus den Aufnahmekurven. Gradient: 1 mM Substrat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Substrat; pH: 6,8. Die exponentiellen Aufnahmekurven für Acetat und L-Laktat sind im Anhang in Abbildung A1 dargestellt.



## Ergebnisse

langsamer als die Rate der einfach N-terminal verkürzten Variante  $\Delta 1-73$  (Tab 4.4). Die Aufnahmezeiten aller drei Konstrukte für die Substrate Formiat, Acetat und L-Laktat sind in Tabelle 4.4 aufgeführt.

**Tab. 4.4:** Aufnahmezeiten der auf die gleiche Länge verkürzten Konstrukte von *TgFNT1*, *TgFNT2* und *TgFNT3* berechnet aus den Aufnahmezeiten über exponentielles *fitting*.

	Aufnahmerate (nmol mg <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )		
	opt <i>TgFNT1</i> $\Delta 277$ -ter	opt <i>TgFNT2</i> $\Delta 1-73\Delta 350$ -ter	opt <i>TgFNT3</i> $\Delta 277$ -ter
Formiat	0,063 ± 0,008	0,051 ± 0,010	0,060 ± 0,017
Acetat	0,081 ± 0,008	0,107 ± 0,022	0,153 ± 0,014
L-Laktat	0,044 ± 0,004	0,081 ± 0,010	0,068 ± 0,005

Im Vergleich zu den Termini besitzt die Kernregion der drei FNTs aus *T. gondii* sehr geringe Variabilität. Dies wird durch die Ergebnisse der Verkürzungen untermauert. Das Verkürzen der Termini auf dieselbe Länge, so dass nur die Kernregion der Proteine zur Funktion beiträgt, führte zu einer stabilen Expression und Funktionalität der drei *TgFNTs*. Alle drei leiteten die Substrate Formiat, Acetat und L-Laktat mit vergleichbaren, exponentiellen Kurvenverläufen und vergleichbaren Aufnahmezeiten. Die Ergebnisse decken sich außerdem auch mit der postulierten physiologischen Rolle der FNTs als Monocarboxylat-Transporter in *T. gondii*.

## 4.2 Evaluation des Transportmechanismus und Identifikation des Selektivitätsfilters

Um die Formiat-Nitrit-Transporter aus *T. gondii* weiter biochemisch zu charakterisieren, wurden für alle weiteren Experimente aufgrund der vorherigen Ergebnisse die verkürzten Konstrukte *optTgFNT1Δ277-ter*, *optTgFNT2Δ1-73Δ350-ter* und *optTgFNT3Δ277-ter* verwendet. Diese waren auf die gleiche Länge gekürzt, zeigten stabile Expression in der Hefe und eine vergleichbare Funktionalität. Zusätzlich konnten Unsicherheiten wie Instabilität des Proteins, fehlerhafter Einbau in die Plasmamembran oder mögliche Einflüsse der Termini ausgeschlossen werden. Zur Vereinfachung wird im Folgenden die Benennung auf *TgFNT1*, *TgFNT2* und *TgFNT3* reduziert. Die folgenden Experimente wurden aber immer mit den oben genannten kodon-optimierten, verkürzten Konstrukten durchgeführt.

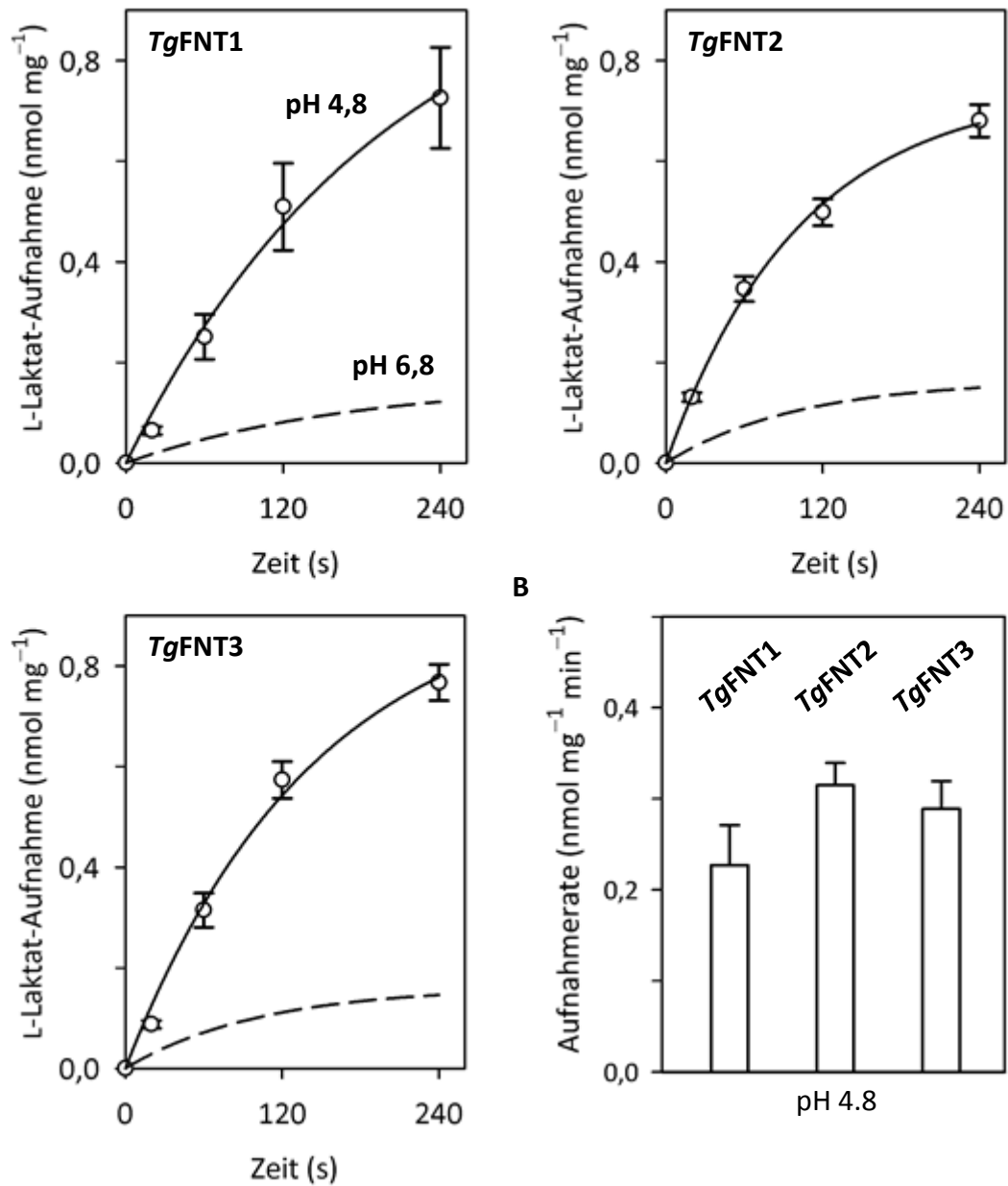
### 4.2.1 Die Substrataufnahme der drei *TgFNTs* ist abhängig vom äußeren pH-Wert

Die bei uns im Arbeitskreis bereits charakterisierten Formiat-Nitrit-Transporter *EcFocA* und *PfFNT* zeigten beide den Transportmechanismus eines Anionen-Protonen-Symporters und somit eine pH-abhängige Substrataufnahme (181). Um zu prüfen, ob die FNTs aus *T. gondii* den gleichen Transportmechanismus besitzen, wurde eine Messung der pH-Abhängigkeit der Substrataufnahme durchgeführt. Der äußere pH wurde hierbei bei der Messung um zwei logarithmische Einheiten von pH 6,8 auf pH 4,8 gesenkt und die Aufnahme über den Einstrom von <sup>14</sup>C-L-Lakat gemessen. Daraus ergab sich eine Erhöhung der Transportrate um den Faktor 4 bei allen drei Transportern (Abb. 4.32). Dies deckt sich mit der zuvor im Arbeitskreis gemessenen pH-abhängigen Erhöhung der Transportrate bei *PfFNT* (154) und ist ein Hinweis darauf, dass die FNTs aus *T. gondii* demselben Transportmechanismus folgen.

### 4.2.2 Identifikation des *TgFNT* Selektivitätsfilters mittels chemischer Modifikation

Die drei verkürzten *TgFNTs* haben im Rahmen der Experimente alle Leitfähigkeit für die Substrate Formiat, Acetat und L-Laktat gezeigt. Auch die Aufnahmeraten unterschieden sich nicht viel voneinander. Die Tatsache, dass alle drei *TgFNTs* keine großen Unterschiede in ihrer Funktion aufwiesen, könnte durch Betrachtung des Selektivitätsfilters dieser Proteine erklärt werden. Die Identifikation und der Einfluss des Selektivitätsfilters von Formiat-Nitrit-Transportern auf die Leitfähigkeit von Substraten wurden von Marie Wiechert aus unserer Arbeitsgruppe anhand von *PfFNT* und *EcFocA* detailliert untersucht. Der eukaryotische plas-

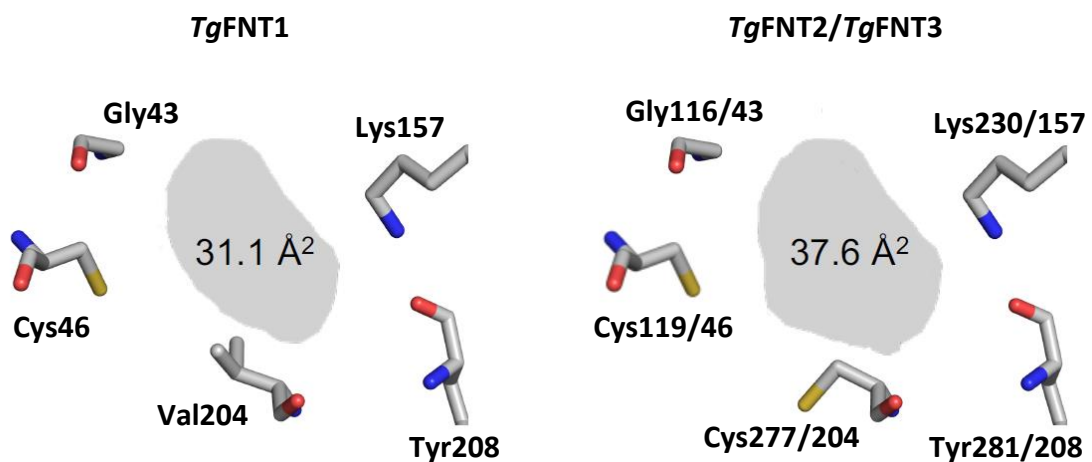
A



**Abb. 4.32 A:** Aufnahmekurven für das Substrat L-Laktat (o) von in Hefe hergestellten TgFNT1-3 über 4 min bei pH 4,8 (schwarze Linie) im Vergleich mit pH 6,8 (gestrichelte Linie). Die Werte der nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. **B:** Aufnahmeraten von TgFNT1-3 (weiße Balken) für das Substrat L-Laktat bei pH 4,8 berechnet aus den Aufnahmekurven. Gradient: 1mM L-Laktat mit 0,04  $\mu\text{Ci } ^{14}\text{C}$ - L-Laktat; **pH: 4,8**.

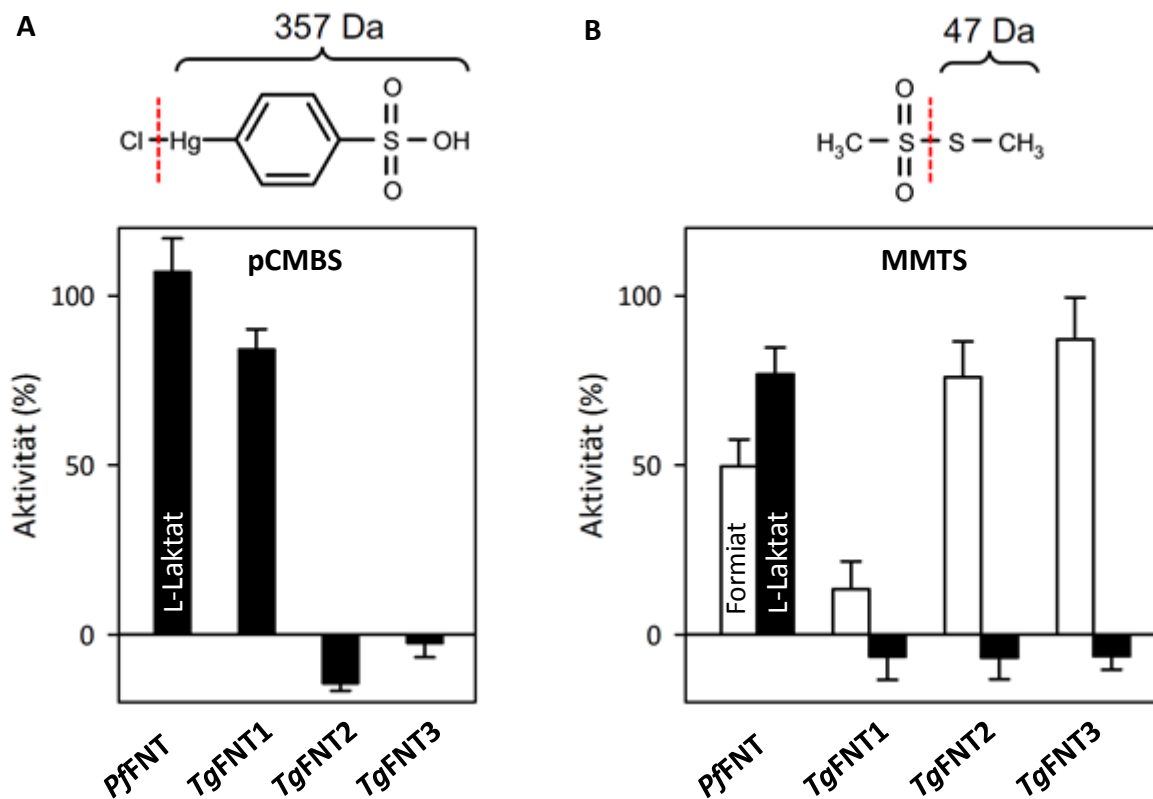
## Ergebnisse

modiale Formiat-Nitrit-Transporter *PfFNT* leitet mit einer Filterfläche von  $41,2 \text{ \AA}^2$  das räumlich größere Substrat L-Laktat. Der prokaryotische Formiat-Nitrit-Transporter *EcFocA* besitzt eine kleinere Filterfläche von  $18,9 \text{ \AA}^2$  und leitet deshalb kein L-Laktat, lediglich die räumlich kleineren Substrate Formiat und Acetat (186). Betrachtet man die Selektivitätsfilter der *TgFNTs* sind diese untereinander auf den ersten Blick fast identisch und entsprechen mit einer Filterfläche von  $31,1 \text{ \AA}^2$  (*TgFNT1*) und  $37,6 \text{ \AA}^2$  (*TgFNT2*, *TgFNT3*) der Größenordnung des Filters von *PfFNT*, woraus sich die Leitfähigkeit für L-Laktat erklären lässt (Abb 4.33).



**Abb. 4.33** Aufsicht auf die Transportpore von *TgFNT1-3* von der extrazellulären Seite aus. Die jeweils fünf gezeigten Aminosäuren bilden den Selektivitätsfilter, wodurch die van-der-Waals Fläche der Pore (grau) auf eine bestimmte Größe diskriminiert wird.

Der einzige Unterschied zwischen den *TgFNTs* untereinander ergibt sich aus der Aminosäure-Position 204 (*TgFNT2*: 277). An dieser Stelle besitzt *TgFNT1* ein Valin, *TgFNT2* und *TgFNT3* besitzen dort jedoch ein Cystein, was in einem kleineren Filterdurchmesser für *TgFNT1* resultiert. An Position 46 (*TgFNT2*:119) besitzen alle drei *TgFNTs* ein weiteres Cystein im Filter. Um die Modelle der Selektivitätsfilter experimentell nachzuweisen, wurden die vorhandenen Cysteine im Filter chemisch modifiziert, um eine Hemmung der Substrataufnahme zu erreichen. Die chemische Reaktion beruht jeweils auf einer kovalenten Bindung eines Molekülteils an die Thiolgruppe des Cysteins. Zunächst wurde die recht große Organoquecksilber-Verbindung pCMBS eingesetzt und die Funktion der FNTs über einen  $^{14}\text{C}$ -L-Laktat-Aufnahmeassay überprüft (Abb. 4.34 A). Die Reaktion mit pCMBS führte zur Hemmung von *TgFNT2* und *TgFNT3* jedoch nicht zur Hemmung von *TgFNT1*. Als Kontrolle



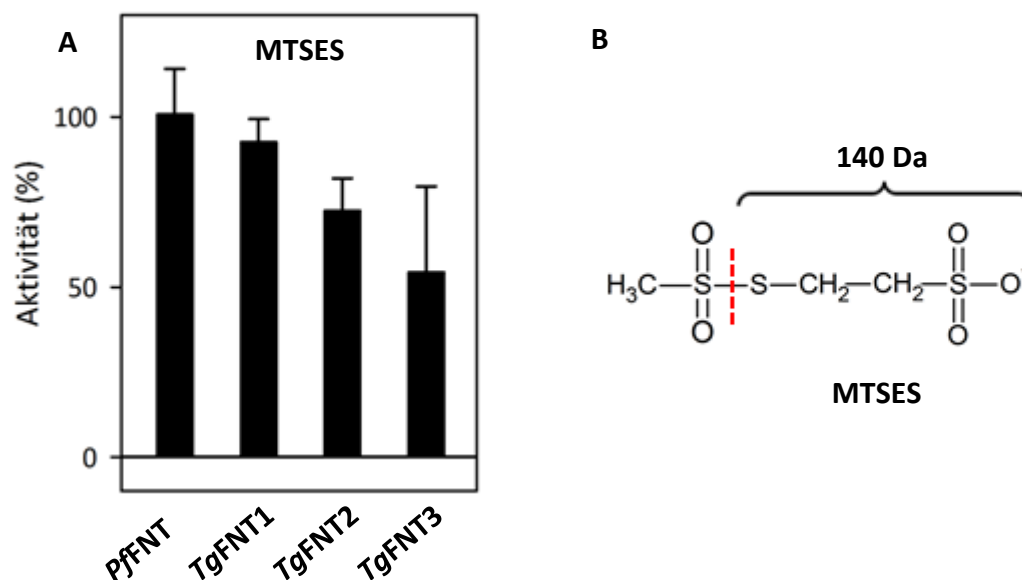
**Abb. 4.34 A:** Hemmung der L-Laktat-Aufnahme (schwarze Balken) von *TgFNT1-3* mit 100  $\mu$ M pCMBS. Die Strukturformel von pCMBS und Gewicht des modifizierenden Molekülteils ist oben gezeigt. **B:** Hemmung der Formiat-(weiße Balken) und L-Laktat-Aufnahme (schwarze Balken) von *TgFNT1-3* mit 1000  $\mu$ M MMTS. Die Strukturformel von MMTS und Gewicht des modifizierenden Molekülteils (rote Linie) ist oben gezeigt. Gradient: 1 mM Substrat mit 0,04  $\mu$ Ci  $^{14}$ C-Substrat; pH: 6,8. *PfFNT* diente jeweils als Kontrolle.

diente *PfFNT*, welches keine Cysteine in der Filterregion aufweist. *PfFNT* wurde wie erwartet nicht durch pCMBS gehemmt. Nun stellte sich die Frage, ob das Cystein in *TgFNT2/3* an Position 46/119 prinzipiell nicht auf diese Reaktion anspricht und nur das Cystein an Position 204/277 reagiert, da dieses bei *TgFNT1* nicht vorhanden ist. Eine andere Möglichkeit wäre, dass pCMBS das Cystein an Position 46 bei *TgFNT1* aufgrund des geringeren Filterdurchmessers räumlich nicht erreichen kann. Deshalb wurde die kleinere Verbindung MMTS eingesetzt und abermals die  $^{14}$ C-L-Laktat-Aufnahme der Transporter überprüft (Abb. 4.34 B). Bei allen drei *TgFNTs* konnte nun eine Hemmung durch die Bindung von MMTS an Cysteine im Selektivitätsfilter festgestellt werden. Der leicht hemmende Effekt auf die Kontrolle *PfFNT* könnte durch eine kompetitive Hemmung erklärt werden, da MMTS und L-Laktat eine ähnliche Größe besitzen und in der gleichen Konzentration von 1 mM

## Ergebnisse

eingesetzt wurden. Wurde der Versuch nun mit einem  $^{14}\text{C}$ -Formiat-Aufnahmeassay durchgeführt, kam es interessanterweise nur zur Hemmung von *TgFNT1*, während *TgFNT2* und *TgFNT3* das kleinere Substrat Formiat durchließen. Die Bindung von MMTS schien also insgesamt den Filterdurchmesser zu verkleinern, jedoch nicht vollkommen zu blockieren. Dass *TgFNT1* bei einer Bindung von MMTS kein Formiat mehr durchlässt, weist auf einen kleineren Filterdurchmesser hin und bestätigt so das vorher postulierte Modell der Filterregion. Die Experimente mit pCMBS und MMTS weisen damit also insgesamt die Selektivitätsfiltermodelle der drei *TgFNTs*, die vorhandenen und chemisch modifizierbaren Cysteine und das Prinzip des Größenausschlusses nach, da eine künstliche Verkleinerung der Filterregion mit MMTS zu einem Selektivitätsprofil führte, dass dem eines prokaryotischen Formiat-Nitrit-Transporters entspricht.

Im Rahmen dieser Experimente wurde noch eine weitere modifizierende Verbindung ausprobiert. Die Verbindung MTSES führte ähnlich wie pCMBS nur zur Hemmung von *TgFNT2* (28 %  $\pm$  10 %) und *TgFNT3* (46 %  $\pm$  25 %), jedoch mit viel geringerer Wirkung. MTSES ist sogar etwas kleiner als pCMBS und sollte daher in die Filterregion von *TgFNT2* und *TgFNT3* passen (Abb 4.35).



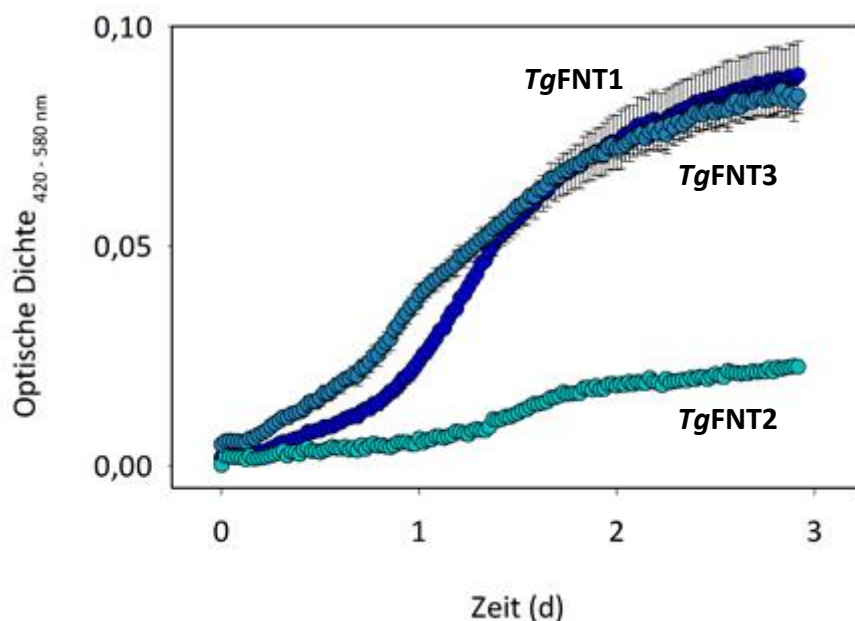
**Abb. 4.35 A:** Hemmung der L-Laktat-Aufnahme (schwarze Balken) von *TgFNT1-3* mit 1000  $\mu\text{M}$  MTSES. **B:** Strukturformel der Verbindung MTSES mit Anzeige des Gewichts des modifizierenden Molekülteils (rote Linie). Gradient: 1mM L-Laktat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ - L-Laktat; pH: 6,8. *PfFNT* diente jeweils als Kontrolle. Die Messwerte von *TgFNT2* und *TgFNT3* stammen jeweils aus nur einem biologischen Experiment ( $n=1$ ).

Eine mögliche Ursache der schlechten Hemmwirkung des MTSES könnte die Ladung der Verbindung sein. Zwar könnte die Substanz aufgrund der negativen Ladung vom Lysin angezogen werden, jedoch könnte die Verbindung falschherum orientiert sein. Eine Reaktion mit Cysteinen wäre nicht mehr möglich, wenn die Disulfidbrücke aus der Pore „herausragt“ und nicht an die Thiolgruppe herankommt.

### 4.3 Hemmung der Substrat-Aufnahme von *TgFNT1-3* durch Inhibitoren

#### 4.3.1 Screening von *TgFNT*-Inhibitoren mittels phänotypischen Wachstumsassay

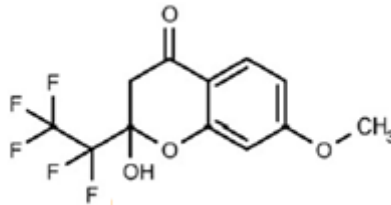
Um ein erfolgreiches phänotypisches Screening durchführen zu können, wurde zunächst das Wachstum der transformierten Hefen im L-Laktat-Selektionsmedium überprüft (Abb. 4.36). Das L-Laktat ist die einzige Kohlenstoffquelle im Medium, sodass nur die Hefen überleben, die ein FNT exprimieren. Die *TgFNT1* und *TgFNT3* exprimierenden Hefen zeigten eine Wachstumskurve, deren Plateau nach 3 Tagen etwa um das 8fache über dem eingestellten Startwert von  $OD_{600} = 0,01$  lag. Bei *TgFNT2* war dieser Unterschied nur um das zweifache höher als der Startwert.



**Abb. 4.36** Wachstumskurven von *TgFNT1* (blau), *TgFNT2* (cyan) und *TgFNT3* (hellblau) exprimierenden Hefen in L-Laktat-Selektionsmedium. Werte von nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. 0,25 % L-Laktat, pH: 6,0.

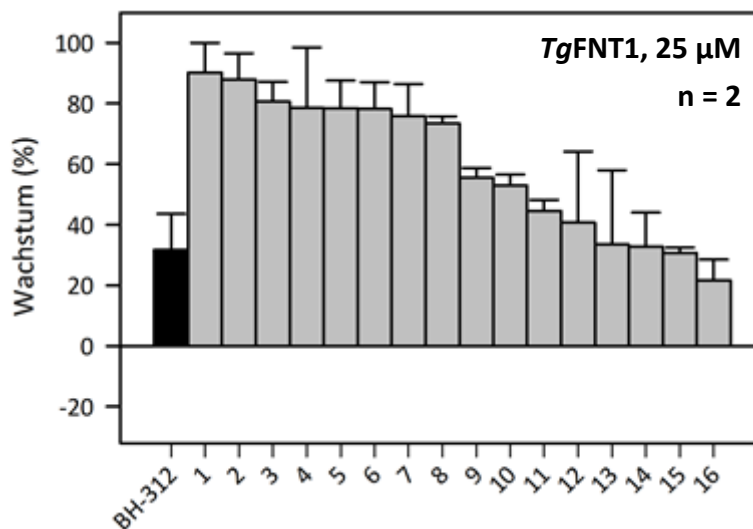
## Ergebnisse

Da die *TgFNT1* exprimierenden Hefen das beste Wachstum gezeigt haben, wurden diese Hefen für die folgenden Screenings verwendet. Beim Screening wurde die Hemmwirkung von Substanzen aus zwei verschiedenen Substanzbibliotheken auf das Wachstum von Hefen überprüft. Als Erstes wurde die von André Gollmack als *PfFNT*-Inhibitor entdeckte *Malaria Box* Verbindung MMV007839 verwendet (156) (Abb. 4.37).



**Abb. 4.37** Die Strukturformel des *PfFNT*-Inhibitors MMV007839.

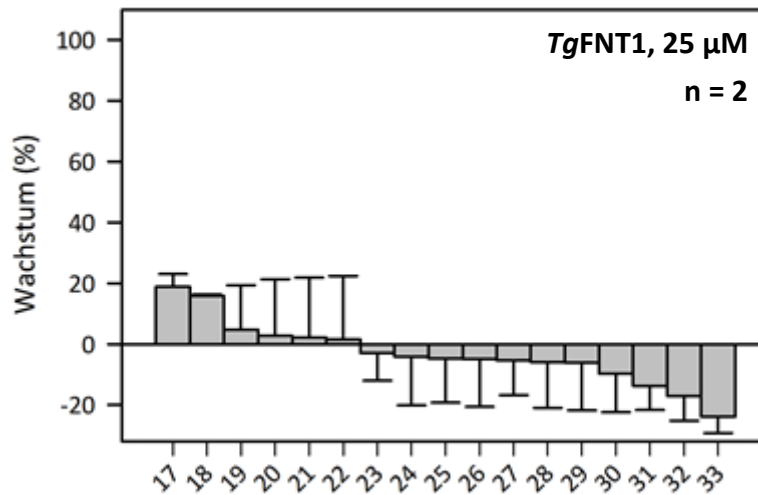
Zusätzlich dazu wurden 33 Analoga (Abb. A2), die im Arbeitskreis bereits vorhanden waren, auf ihre *TgFNT* Hemmwirkung überprüft. Die Verbindungen wurden von Björn Henke und André Gollmack synthetisiert und charakterisiert. Diese besitzen zum einen dasselbe Pharmakophor wie MMV007839 und zum anderem wurde die Wirkung dieser Verbindungen auf *PfFNT* bereits untersucht. Im ersten phänotypischen Assay wurden die genannten Substanzen bei 25  $\mu\text{M}$  Inhibitor-Konzentration an *TgFNT1* exprimierenden Hefen getestet (Abb. 4.38).



**Abb. 4.38.1** Hemmung von *TgFNT1* exprimierenden Hefen durch MMV007839 (BH-312) und verschiedene Analoga (1-16) bei 25  $\mu\text{M}$  im phänotypischen Wachstumsassay mit L-Laktat-Selektionsmedium. Die erhaltenen Werte des Mediums ohne Hefen sowie von nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. 0,25 % L-Laktat, 20 mM MES, pH: 6,0.



## Ergebnisse

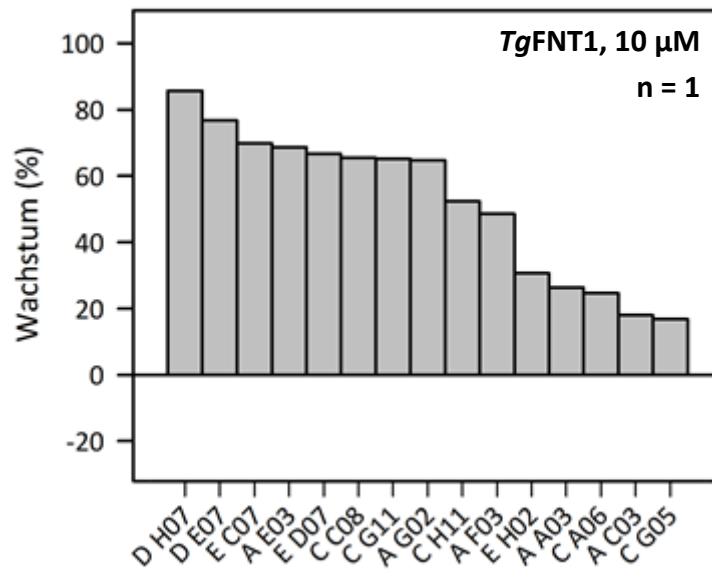


**Abb. 4.38.2** Hemmung von *TgFNT1* exprimierenden Hefen durch MMV007839 (BH-312) und verschiedene Analoga (17-33) bei 25 µM im phänotypischen Wachstumsassay mit L-Laktat-Selektionsmedium. Die erhaltenen Werte des Mediums ohne Hefen sowie von nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. 0,25 % L-Laktat, 20 mM MES, pH: 6,0.

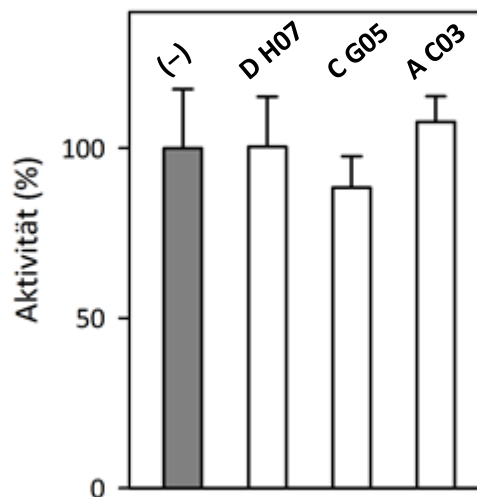
Hierbei zeigte die Originalsubstanz eine Hemmung des Wachstums von *TgFNT1* exprimierenden Hefen von 76,5 % ± 11,8 %. Zwanzig der insgesamt dreiunddreißig Verbindungen zeigten sogar eine bessere Hemmung. MMV007839 und vier besser wirkende Analoga wurden zur weiteren Charakterisierung der Hemmung von *TgFNTs* ausgewählt. Die Ergebnisse der weiteren Charakterisierung sind unter 4.3.2 beschrieben.

Als zweite Substanzbibliothek wurden fünfzehn Verbindungen aus der *Pathogen Box* verwendet, die eine nachgewiesene Hemmwirkung auf *T. gondii* Parasiten besitzen. Der Wirkmechanismus ist dabei allerdings unbekannt. Die Strukturformeln aller getesteten Verbindungen sind im Anhang dieser Arbeit einzusehen (Abb. A3). Das zweite Screening umfasste also die fünfzehn *Pathogen Box*-Substanzen und wurde laut Empfehlung der Herausgeber bei 10 µM durchgeführt. Das Assay ergab für vier der insgesamt 15 Verbindungen ein Hemmwirkung von größer als 60 %. Die besten Verbindungen waren A C03 mit 82,0 % und C G05 mit 83,2 % Hemmwirkung (Abb. 4.39). Eine direkte Wirkung auf die L-Laktat-Aufnahme von *TgFNT1* exprimierenden Hefen konnte im <sup>14</sup>C-Aufnahmeassay jedoch nicht bestätigt werden (Abb. 4.40).

## Ergebnisse



**Abb. 4.39** Hemmung von *TgFNT1* exprimierenden Hefen durch 15 Substanzen aus der Pathogenbox bei 10  $\mu\text{M}$  im phänotypischen Wachstumsassay mit L-Laktat-Selektionsmedium. Die erhaltenen Werte des Mediums ohne Hefen sowie von nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. 0,25 % L-Laktat, 20 mM MES, pH: 6,0.

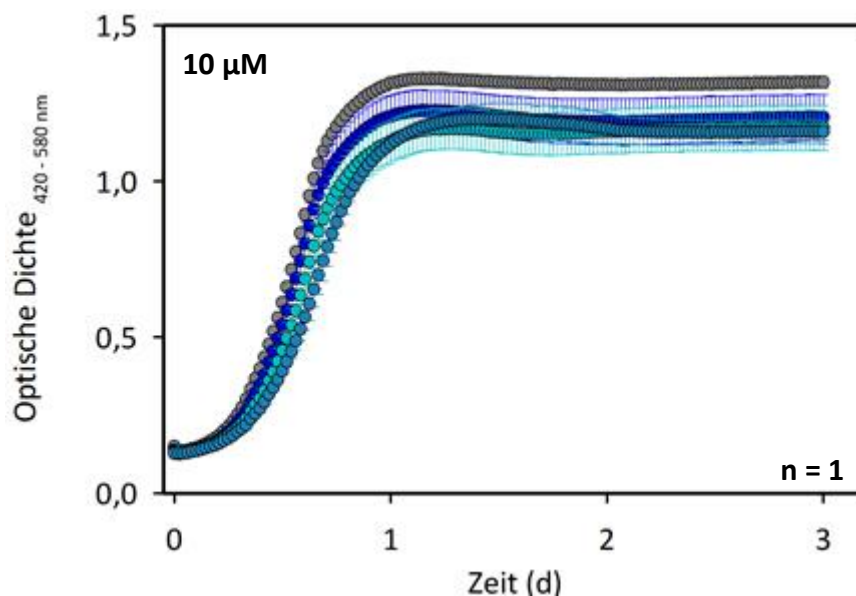


**Abb. 4.40** Hemmung der L-Laktat-Aufnahme von *TgFNT1* exprimierenden Hefen im  $^{14}\text{C}$ -Aufnahmeassay durch die Substanzen D H07, C G05 und A C03 (weiße Balken) bei 12,5  $\mu\text{M}$  bezogen auf ungehemmte Kontrollhefen (grauer Balken). Die Substanz D H07 diente als nicht hemmende Kontrolle. Es ist keine signifikante Hemmung der Aufnahme erkennbar (t-Test).

Gradient: 1 mM L-Laktat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -L-Laktat; pH: 6,8.

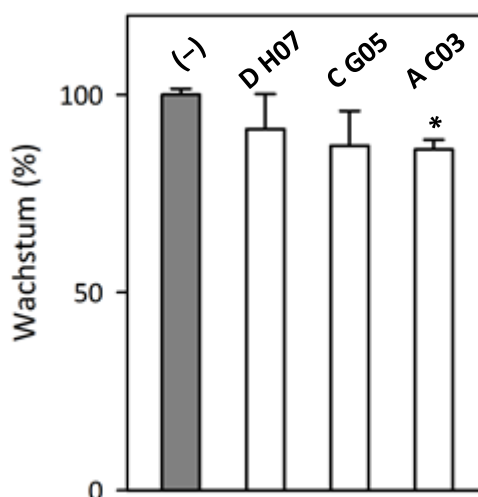
## Ergebnisse

Um unspezifische oder toxische Effekte auf die Hefe selbst auszuschließen, wurde ein weiterer Wachstumsassay mit Hefen durchgeführt, die kein FNT exprimieren (Abb. 4.41). Das Nährmedium wurde dafür von L-Laktat auf Glukose als Kohlenstoffquelle umgestellt. Es wurde also nur der Effekt der Substanzen auf das generelle Wachstum der Hefe unabhängig von der Expression und Hemmung eines FNTs untersucht. Die aufgenommenen Wachstumskurven zeigten für beide Substanzen ein etwas geringeres Plateau als die ungehemmten Hefen. Nach Berechnung und Vergleich der AUC konnte nur für A C03 eine leichte, aber dennoch signifikante Hemmung des Wachstums um  $13,9\% \pm 2,5\%$  festgestellt werden (Abb. 4.42). Zu beachten bei diesem Assay ist jedoch, dass das Hefewachstum im Glukosemedium generell größer ist und mögliche zytotoxische Effekte in der verwendeten Inhibitor-Konzentration dadurch nicht ganz so deutlich zu erkennen sein könnten. Im L-Laktatmedium ist das Wachstum generell langsamer. Wenn also neben dem Selektionsdruck noch eine weitere, das Wachstum beeinflussende Komponente dazukommt, könnte dies mehr ins Gewicht fallen. Eine toxische Wirkung auf die Hefezellen konnte also nicht ausgeschlossen werden. Abschließend lassen die Ergebnisse auf eine unspezifische oder sogar toxische Wirkung der *Pathogen Box*-Substanzen schließen. Eine Wirkung über die direkte Hemmung von *TgFNT1* konnte nicht gezeigt werden.



**Abb. 4.41** Testung der Toxizität der im Screening eingesetzten Verbindungen A C03 (hellblau), C G05 (cyan) und D H07 (blau) auf nicht transformierte Hefezellen bei 10 µM durch einen Wachstumsassay in glukosehaltigem Medium. Als Kontrollen diente das Wachstum ungehemmter Hefen (grau).

## Ergebnisse

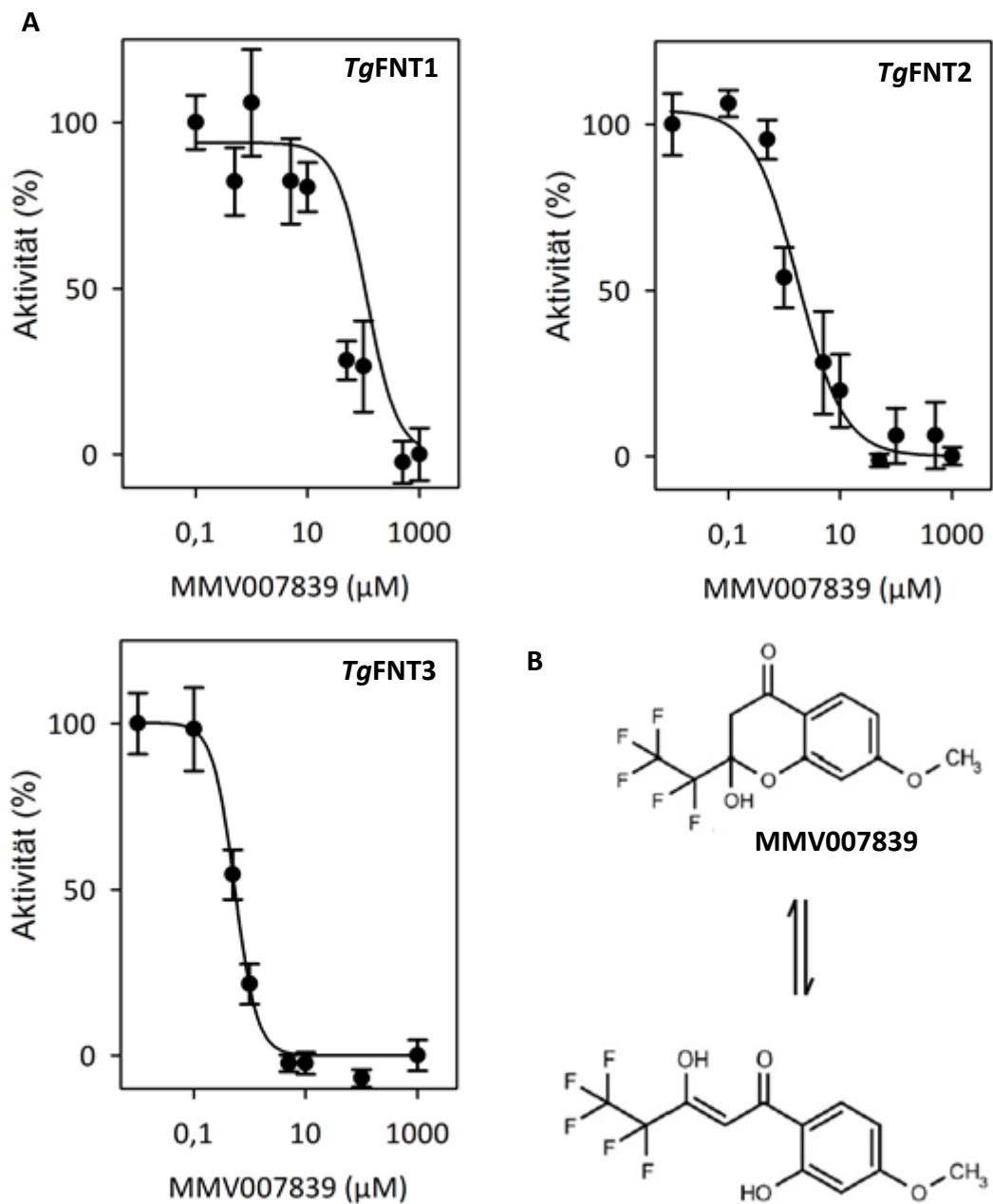


**Abb. 4.42** Wachstumshemmung nicht transformierter Hefezellen durch D H07, C G05 und A C03 bei 10  $\mu$ M in glukosehaltigen Medium. Die Werte der Aktivität wurden aus den AUCs der Wachstumskurven berechnet. Als Kontrolle dienten ungehemmte Hefen (grauer Balken). Nur für A C03 ist ein statistisch signifikanter Unterschied erkennbar (\* t-Test;  $p = 0,046$ ).

### 4.3.2 Hemmung der Substrataufnahme durch MMV007839 und ausgewählte Analoga im direkten $^{14}\text{C}$ -Aufnahmeassay

Nach dem Screening wurde zunächst die Wirkung der *Malaria Box* Verbindung MMV007839 (BH-312) auf *TgFNT1-3* untersucht. Hierbei konnte im Gegensatz zu den *Pathogen Box*-Verbindungen eine direkte Hemmwirkung auf die *TgFNTs* über die L-Laktat-Aufnahme im  $^{14}\text{C}$ -Aufnahmeassay mit *TgFNT* exprimierenden Hefen festgestellt werden (Abb. 4.43 A). Die Hemmung lag insgesamt im unteren mikromolaren Bereich, wobei sich *TgFNT2* mit 1,94  $\mu\text{M}$  und *TgFNT3* mit 0,55  $\mu\text{M}$  besser hemmen ließen als *TgFNT1* mit 28,8  $\mu\text{M}$ . Die Auswahl weiterer Verbindungen erfolgte aufgrund der Screening-Ergebnisse, aber auch aufgrund der Lipophilie der Verbindungen. André Golldack hat experimentell festgestellt, dass die Hydroxylgruppe in  $\beta$ -Stellung zum Carbonyl essentiell für die Wirkung ist. Die Fluoralkylkette kann bis zum Propyl verlängert beziehungsweise bis zum Methyl verkürzt werden, ohne dass die Verbindung an Wirkung verliert. Mehr Variabilität ist am Aromaten möglich, wobei eine erhöhte Lipophilie der Reste, wie zum Beispiel eine Propoxygruppe anstatt einer Methoxygruppe, die Wirkung am Parasiten erhöht (156). Deshalb wurden aus den im phänotypischen Screening erfolgreichen Verbindungen drei zur Hemmung von *TgFNT1-3* mit

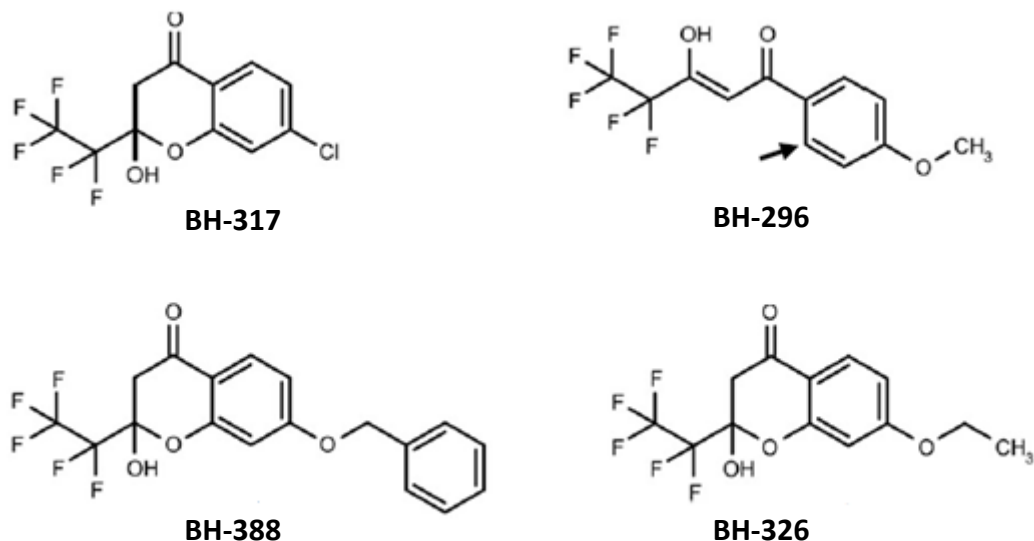
## Ergebnisse



**Abb. 4.43 A:** Konzentrationsabhängige Hemmung der L-Laktataufnahme von *TgFNT1-3* im Hefesystem durch den Inhibitor MMV007839. Gradient: 1 mM L-Laktat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -L-Laktat; pH: 6,8 **B:** Strukturformel des Inhibitors MMV007839. Die zyklische, hemiketale 2-Hydroxy-Chromanon-Form liegt im dynamischen Gleichgewicht mit der offenen, vinylogenen Carbonsäure-Form vor.

## Ergebnisse

erhöhter Lipophilie ausgewählt. Anstatt der bei MMV007839 vorhandenen Methoxygruppe am Aromaten besitzen die ausgewählten Verbindungen ein Chloratom (BH-317, Nr. 28 im Screening), einen Phenylrest (BH-388, Nr. 30 im Screening) und eine Ethoxygruppe (BH-326, Nr. 33 im Screening) (Abb. 4.44). MMV007839 besitzt außerdem eine zyklische, hemiketale Form und liegt im dynamischen Gleichgewicht mit einer offenen, vinylogenen Carbonsäure-Form vor (Abb. 4.43B) (156). In der geschlossenen Form ist die Verbindung ungeladen und kann so lipophile Membranen passieren. Als vinylogene Carbonsäure kann die Verbindung auch dissoziiert und geladen vorliegen. Der Wechsel zwischen diesen beiden Formen ermöglicht dem Inhibitor ein schnelles Passieren von mehreren Membranen. Er besitzt also ein internes *prodrug*-Prinzip. An *P. falciparum*-Parasiten konnte gezeigt werden, dass ein Verhindern der zyklischen Form die Wirkung vermindert, obwohl sich der  $IC_{50}$  am Protein im Hefesystem nur wenig unterscheidet. Dies wurde mit der Verbindung BH-296 getestet, da hier eine phenolische Hydroxylgruppe fehlt und so der Ringschluss nicht mehr möglich ist (156) (Abb. 4.44).



**Abb. 4.44** Strukturformeln der weiteren verwendeten Inhibitoren mit demselben Pharmakophor wie MMV007839. Das dynamische Gleichgewicht der zyklischen, hemiketalen Form und der vinylogenen Carbonsäure-Form gilt auch für BH-317, BH-388 und BH-326. Da bei BH-296 die phenolische Hydroxylgruppe fehlt (schwarzer Pfeil), liegt diese Verbindung nur in der offenen vinylogenen Carbonsäure-Form vor.

## Ergebnisse

Im phänotypischen Screening auf *TgFNT*-Inhibition hat die Substanz BH-296 (Nr. 18 im Screening) eine vergleichbare Wirkung wie MMV007839 gezeigt. Aufgrund dieser vergleichbaren Wirkung und der ausschließlich offenen Form der Verbindung wurde auch BH-296 zur weiteren Testung an *TgFNT*1-3 ausgewählt.

Für alle *TgFNT*s konnte eine Hemmung durch die Inhibitoren festgestellt werden, wobei *TgFNT*1 insgesamt am schlechtesten anspricht mit  $IC_{50}$ -Werten im zweistelligen mikromolaren Bereich. *TgFNT*2 und *TgFNT*3 wurden von einigen Inhibitoren sogar im nanomolaren Bereich gehemmt (Tab. 4.5). Die weiteren Aufnahmekurven sind im Anhang in den Abbildungen A4-A6 gezeigt.

**Tab. 4.5:**  $IC_{50}$ -Werte der *TgFNT*1-3 Inhibitoren im Hefesystem

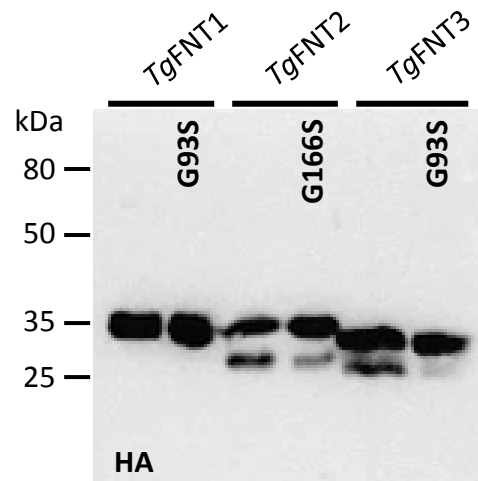
Inhibitor	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)		
	<i>TgFNT</i> 1	<i>TgFNT</i> 2	<i>TgFNT</i> 3
MMV007839	28,8 $\pm$ 10,5	1,94 $\pm$ 1,05	0,55 $\pm$ 0,08
BH-296	56,0 $\pm$ 3,3	6,14 $\pm$ 4,59	3,00 $\pm$ 1,54
BH-317	13,0 $\pm$ 2,4	0,92 $\pm$ 0,27	0,65 $\pm$ 0,08
BH-326	22,3 $\pm$ 2,4	0,57 $\pm$ 0,13	0,59 $\pm$ 0,08
BH-388	24,0 $\pm$ 3,0	4,78 $\pm$ 0,84	2,59 $\pm$ 0,08

### 4.3.3 Bestätigung der intrazellulären Bindestelle der Inhibitoren

Um die für *PfFNT* beschriebene Bindestelle an der extrazellulären Seite der Transportpore des Proteins für die *TgFNT*s zu bestätigen, wurde jeweils eine Punktmutation von Glycin nach Serin an Stelle 93 (*TgFNT*2: 166) eingeführt. Diese Mutation entspricht der gefundenen Resistenz-Mutation in *PfFNT*, die dazu führte, dass der Inhibitor an Affinität einbüßte und den  $IC_{50}$ -Wert um das 250fache nach oben verschob (156). Die größere Aminosäure Serin ragt im Vergleich zum Glycin mehr in die Transportpore hinein und gibt dem Inhibitor weniger Platz zur erfolgreichen Bindung und die Affinität erniedrigt sich. Imitiert man also diese Resistenz-Mutation bei den *TgFNT*s und es kommt dadurch zur Erniedrigung der Inhibitor-Affinität, kann auf dieselbe Bindestelle wie bei *PfFNT* geschlossen werden. Zunächst wurden die entsprechenden Kodons durch PCR in die kodierenden DNA-Sequenzen

## Ergebnisse

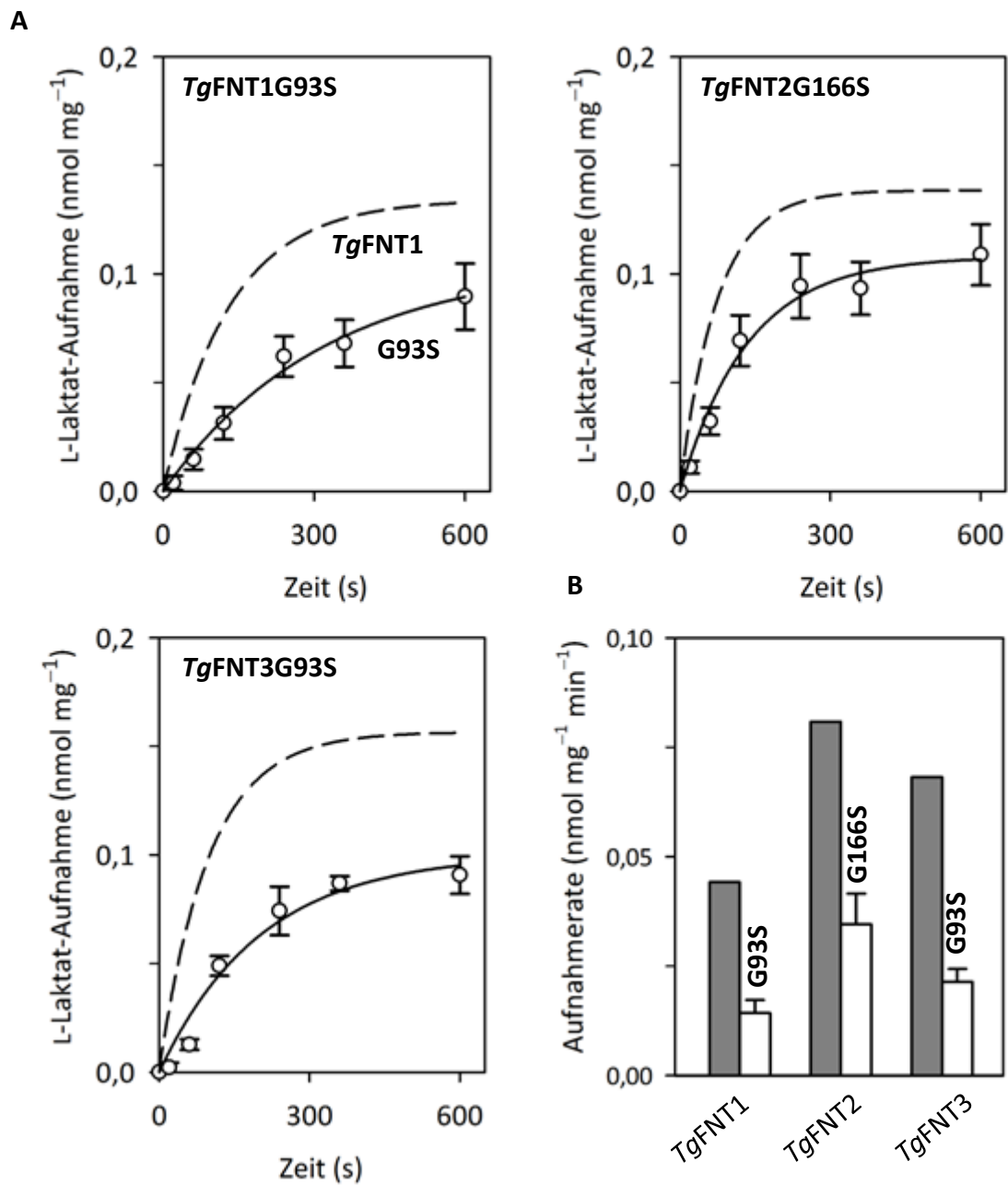
eingeführt, um die gewünschte Punktmutation im Protein zu generieren. Hefen wurden mit diesen Konstrukten transformiert und die erfolgreiche Expression mittels Western Blot festgestellt. Hierbei dienten die nicht mutierten Konstrukte als Kontrolle (Abb. 4.45).



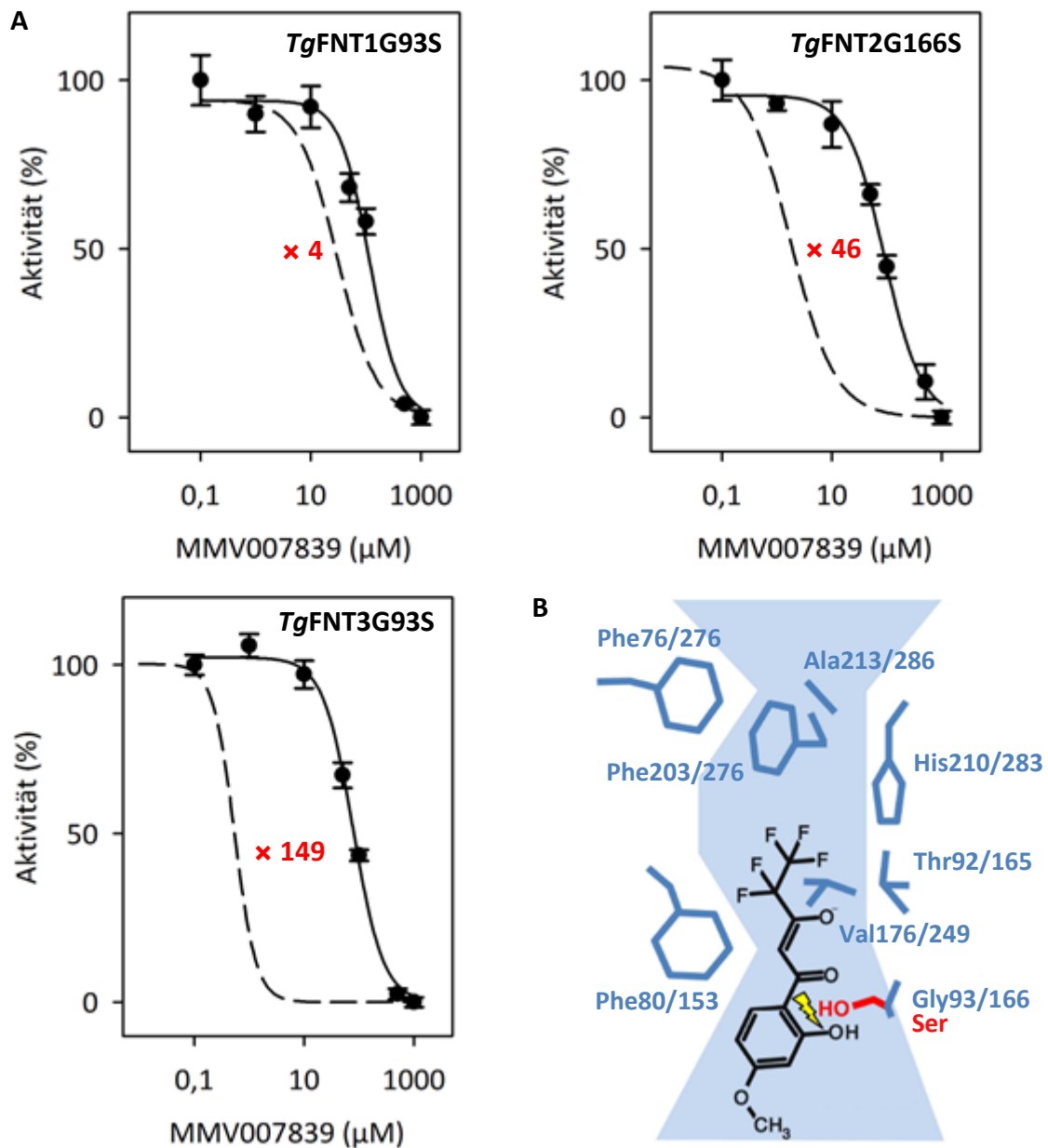
**Abb. 4.45** Western Blot der Glycin zu Serin mutierten *TgFNT* Konstrukte *TgFNT1G93S* (30,3 kDa), *TgFNT2G166S* (29,9 kDa) und *TgFNT3G93S* (30,0 kDa). Zum Vergleich der Expression wurden die nicht mutierten Konstrukte mit aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen den N-terminalen Hemagglutinin-*tag* (HA). Auftragsmenge: 25  $\mu$ g Gesamtprotein.

Die eingeführte Mutation führte bei allen drei mutierten *TgFNTs* zu einer etwa um die Hälfte reduzierten L-Laktat-Aufnahme, die aber noch ausreichen würde um eine physiologische Transportfunktion zu gewährleisten (Abb. 4.46). Diese Reduktion der Aufnahme war zuvor auch schon bei *PfFNT* beobachtet worden (156). Nun wurden konzentrationsabhängige Hemmkurven der mutierten *TgFNTs* mit Inhibitor MMV007839 aufgenommen und der  $IC_{50}$ -Wert wurde ermittelt (Abb. 4.47). Hierbei kam es bei allen drei *TgFNTs* tatsächlich jeweils zur Erniedrigung der Inhibitor-Affinität um das 4fache bei *TgFNT1G93S* ( $108,0 \pm 8,1 \mu$ M), das 46fache bei *TgFNT2G166S* ( $88,8 \pm 13,4 \mu$ M) und das 149fache bei *TgFNT3G93S* ( $82,0 \pm 7,9 \mu$ M) im Vergleich zu den nicht mutierten Konstrukten. Die Bindung des Inhibitors an *TgFNT1* wurde durch die Mutation am wenigsten beeinflusst. Das Ergebnis bestätigt dennoch die für *PfFNT* postulierte, intrazelluläre Bindestelle des Inhibitors bei allen drei *TgFNTs* durch die Resistenz-Punktmutation von Glycin zu Serin.





**Abb 4.46 A:** L-Laktat-Aufnahme (○) von TgFNT1-3-Glycin-zu-Serin Konstrukten in Hefezellen im Vergleich zur Aufnahme in nicht mutierten TgFNT1-3 (gestrichelte Linie). **B:** Aufnahmeraten von L-Laktat (weiße Balken) der TgFNT1-3-Glycin-zu-Serin Konstrukte berechnet aus den Aufnahmekurven. Zum Vergleich sind Aufnahmeraten der nicht mutierten TgFNT1-3 aufgetragen (graue Balken). Gradient: 1 mM L-Laktat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$  <sup>14</sup>C-L-Laktat; pH: 6,8



**Abb. 4.47 A:** Konzentrationsabhängige Hemmung der L-Laktat-Aufnahme von TgFNT1-3 Glycin zu Serin Konstrukten im Hefesystem durch den Inhibitor MMV007839. Zum Vergleich sind die Hemmkurven der nicht mutierten Konstrukte mit aufgetragen (gestrichelte Linie).

Gradient: 1 mM L-Laktat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -L-Laktat; pH: 6,8 **B:** Seitenansicht auf die intrazelluläre Seite der TgFNT-Transportpore mit postulierter Bindestelle der offenen Form von MMV007893 und Einfluss der Glycin zu Serin Punktmutation (rot). Modifiziert nach

(156).

#### **4.4 Lokalisation und Hemmung der *TgFNTs* in *Toxoplasma gondii* Parasiten**

Um auch *in-vivo*-Informationen über die im Hefesystem biochemisch charakterisierten Formiat-Nitrit-Transporter aus *T. gondii* zu bekommen, wurden in Kooperation mit dem Institut für Molekulare Parasitologie der Humboldt-Universität in Berlin weitere Versuche an lebenden Parasiten durchgeführt. Alle in diesem Kapitel aufgeführten Experimente und Ergebnisse wurden von Bingjian Ren unter Betreuung von Dr. Nishith Gupta durchgeführt und generiert.

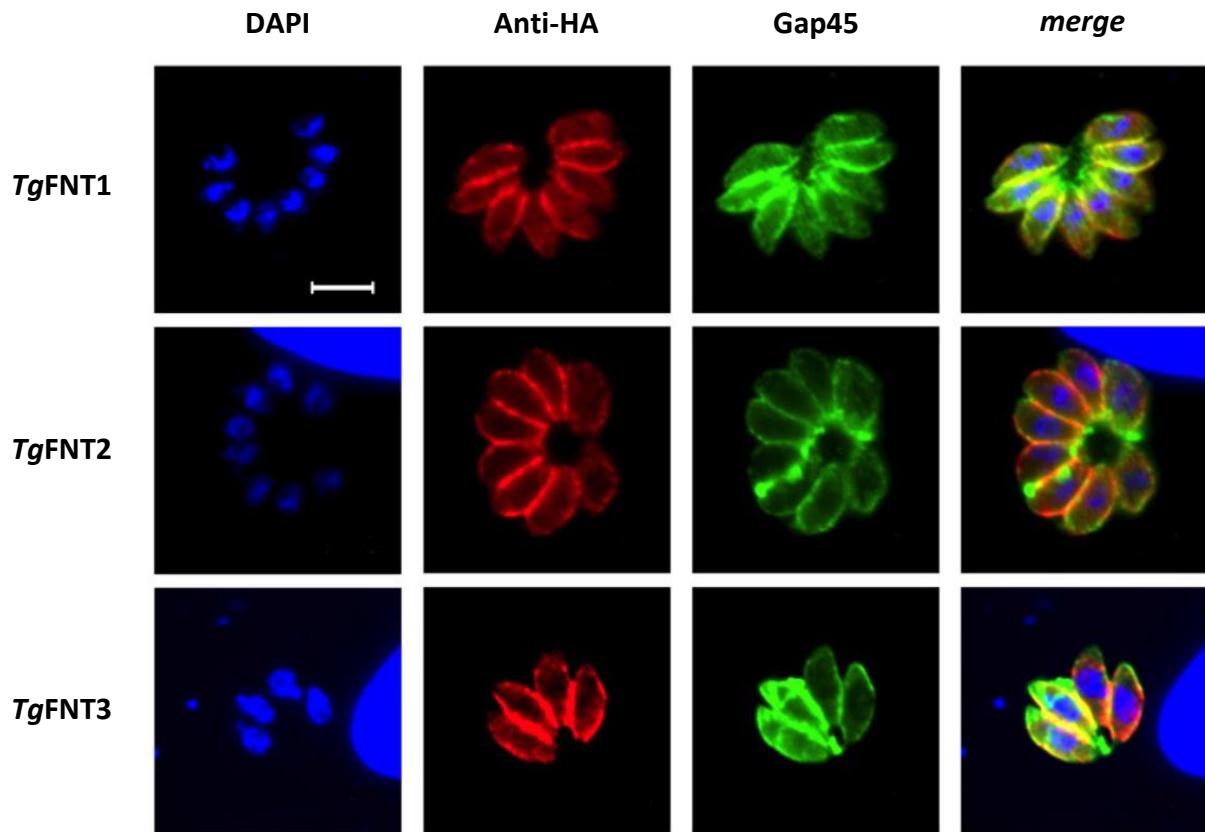
##### **4.4.1 Lokalisation der *TgFNTs* in der Plasmamembran von *T. gondii* Parasiten**

Durch ektopische Expression der *TgFNT1-3*-Konstrukte mit einem C-terminalen Hemagglutinin-Epitop (HA) in intrazellulären *T. gondii*-Tachyzoiten wurde über Immunofluoreszenz die Lokalisation der Transporter im Parasiten überprüft. Zunächst wurden die kodierenden Sequenzen über *Nsi* I / *Pac* I in den Expressionvektor pGRA1-UPKO kloniert und über Elektroporation in Tachyzoiten eingebracht. Die Expression der *TgFNT*-HA-Fusionsproteine geschah am UPRT-Lokus unter der Kontrolle von regulierenden *TgGRA1*-Elementen. Gleichzeitig wurde ein Marker des inneren Membrankomplexes *TgGap45*, der sich direkt unter dem Plasmalemma befindet, exprimiert (208). Die Immunofärbung mit Antikörpern gerichtet gegen das Hemagglutinin-Epitop resultierte in einer Lokalisation von *TgFNT1-3* und *TgGap45* an gleicher Stelle (Abb. 4.48). Dies war ein Hinweis darauf, dass alle drei *TgFNTs* peripher in der Membran des Parasiten lokalisiert sind und somit ihre Rolle als L-Laktat oder Acetat-Transporter übernehmen können.

##### **4.4.2 Hemmung von *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten mit *TgFNT*-Inhibitoren**

Um die Effektivität der im Hefesystem charakterisierten *TgFNT1-3*-Inhibitoren zu testen und so Hinweise darauf zu bekommen, ob die Transporter essentiell sind für das Überleben der Parasiten wurden Plaque-Assays mit *T. gondii*-Tachyzoiten durchgeführt (3.6.4). Mit dieser Art von Assay war es möglich den lytischen Zyklus der Tachyzoiten nachzuempfinden. Die auf einer HFF-Zell-Monolayer kultivierten Parasiten bilden nach Lyse der Wirtszelle sogenannte Plaques. Anhand der Größe dieser Plaques kann die allgemeine Fitness der Parasiten abgeleitet werden (209). Wurden die Tachyzoiten mit einer Inhibitor-Konzentration von 100  $\mu$ M versetzt, waren im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keine Plaques sichtbar. Das Wachstum der Parasiten wurde also vollständig gehemmt. Bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M und 1  $\mu$ M waren jeweils Plaques erkennbar (Abb. 4.49 A). Durch Bildanalysen wurden

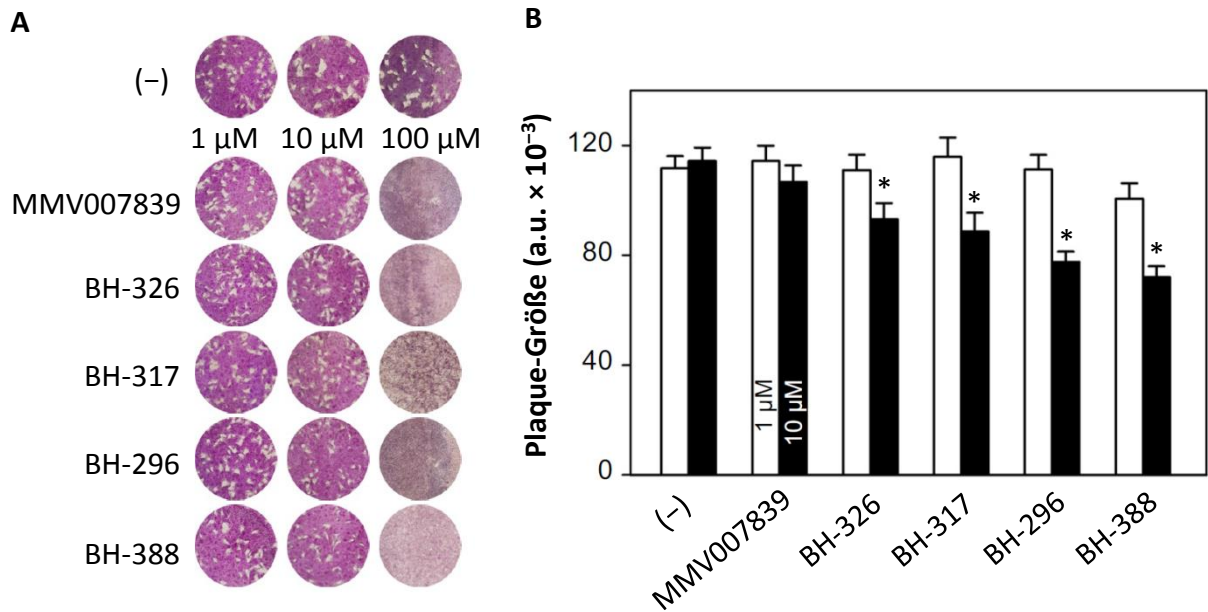
## Ergebnisse



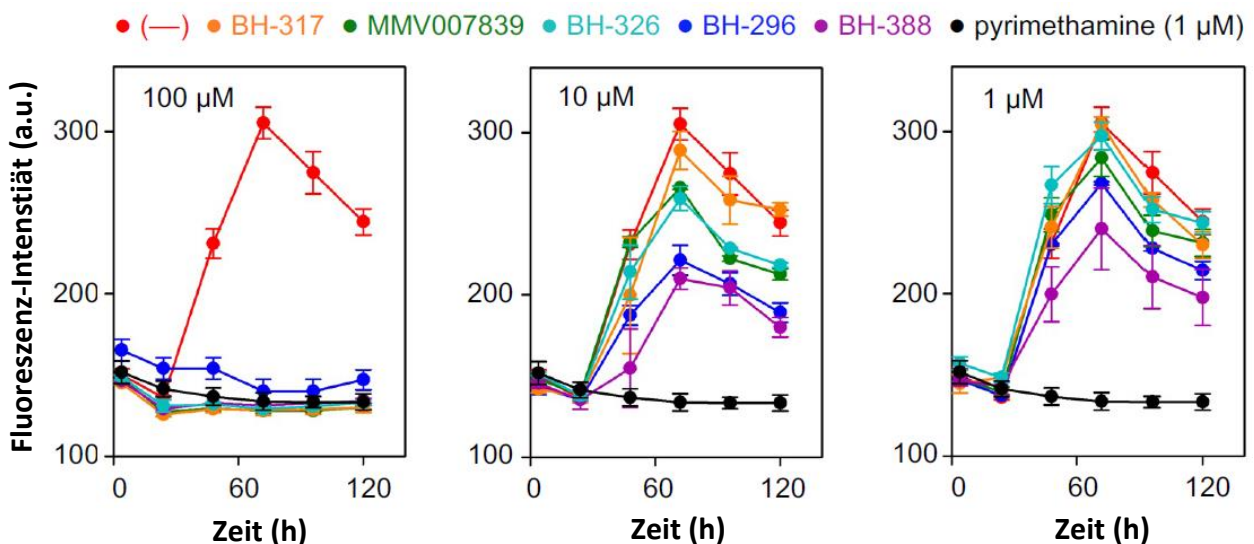
**Abb. 4.48** Immunofärbung von *TgFNT1-3-HA*-Fusionsproteinen in intrazellulären *T. gondii* Tachyzoiten. Die Detektion erfolgte über Antikörper gerichtet gegen das Hemagglutinin-Epitop (HA, rot). Der Zellkern der Tachyzoiten (DAPI, blau) und der innere Membrankomplex direkt unter der Plasmamembran (Gap45, grün) wurden gegengefärbt. Die gelbe Färbung im übereinandergelegten Bild (*merge*) zeigt die Lokalisation der *TgFNTs* in der Plasmamembran. Der weiße Balken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

die Größen der Plaques berechnet und konnten so miteinander verglichen werden. Daraus resultierte eine signifikante Hemmung des Parasitenwachstums bei 10  $\mu\text{M}$  durch alle Inhibitoren außer der originalen *Malaria Box*-Verbindung MMV007839. Dabei erzielten BH-296 und BH-388 den besten Effekt gegen die Parasiten. Bei 1  $\mu\text{M}$  war hingegen keine Hemmung des Wachstums durch keinen der Inhibitoren mehr erkennbar (Abb. 4.49 B). Um die Wirkung der Hemmstoffe besser zu erfassen, wurden Versuche mit YFP exprimierenden Tachyzoiten durchgeführt. Die Fluoreszenz-Intensität von YFP korreliert hierbei mit der Replikationsrate der Parasiten und ist deshalb ein genaueres Verfahren, um das Wachstum der Parasiten beziehungsweise deren Hemmung zu messen (114). Bei diesem Experiment bestätigten sich die Ergebnisse der Plaque-Assays (Abb. 4.50).

## Ergebnisse



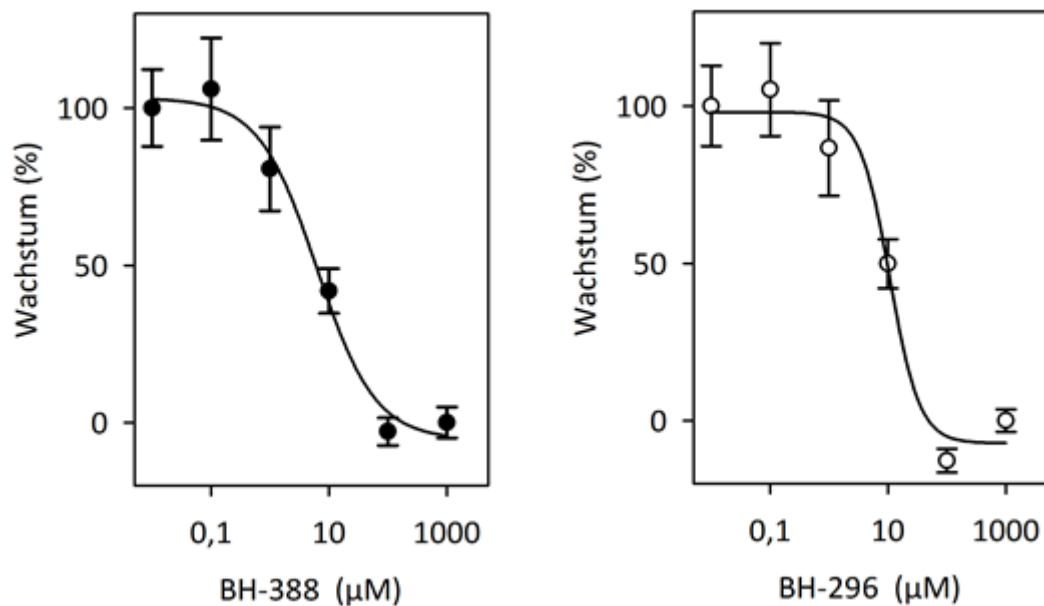
**Abb. 4.49 A:** Wachstum von *T. gondii*-Tachyzoiten im Plaque-Assay, die mit FNT-Inhibitoren versetzt wurden (1 µM, 10 µM, 100 µM). Die Größe der gebildeten Plaques korreliert mit der allgemeinen Fitness der Parasiten. Als Kontrolle diente DMSO (-). **B:** Berechnung der Plaque-Größe anhand von Bildanalysen bei 1 µM (weiße Balken) und 10 µM (schwarze Balken) Inhibitor-Konzentration (\* t-Test;  $p < 0,05$ ).



**Abb. 4.50** Effekt der Inhibitoren (100 µM, 10 µM, 1 µM) auf die Replikation der Parasiten bestimmt über die Fluoreszenz-Intensität von YFP exprimierenden *T. gondii*-Tachyzoiten. Der Farbcode der Kurven ist in obiger Legende erklärt. Als Positivkontrolle diente Pyrimethamin (1 µM), als Negativkontrolle diente DMSO (-).

## Ergebnisse

Bei 100  $\mu\text{M}$  konnte eine volle Hemmung der Replikation festgestellt werden, während MMV007839 bei 10  $\mu\text{M}$  nur noch wenig effektiv war. Bei 1  $\mu\text{M}$  hemmte keiner der Inhibitoren das Wachstum. Der Vorteil des YFP-Replikations-Assays ist die Möglichkeit einer Bestimmung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes für die Inhibitoren. Für alle fünf Inhibitoren ist also eine konzentrationsabhängige Hemmkurve zur Ermittlung des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes erstellt worden. Dabei erzielten BH-296 und BH-388 mit  $\text{IC}_{50}$ -Werten von  $9,8 \mu\text{M} \pm 1,8 \mu\text{M}$  und  $5,8 \mu\text{M} \pm 2,4 \mu\text{M}$  wieder den besten Effekt (Abb. 4.51), während die anderen drei Inhibitoren etwas weniger effektiv waren (Tab. 4.6). Zusammenfassend zeigen alle *TgFNT*-Inhibitoren einen hemmenden Effekt auf die asexuelle Replikation von *T. gondii*-Tachyzoiten. Die Potenz der Hemmstoffe liegt passend zu den Werten aus den hefebasierten Experimenten im niedrigen mikromolaren Bereich. Formiat-Nitrit-Transporter scheinen also essentiell für das Überleben der Parasiten zu sein.



**Abb. 4.51** Konzentrationsabhängige Hemmung der Replikation von *T. gondii* Tachyzoiten durch die *TgFNT*-Inhibitoren BH-388 (schwarze Kreise) und BH-296 (weiße Kreise). Dies wurde über die Messung der Fluoreszenz von YFP bestimmt (Anregung 485 nm, Emission 528 nm). Werte der Kontrollen mit DMSO wurden abgezogen.

**Tab. 4.6:** IC<sub>50</sub>-Werte der Wachstumshemmung von *T. gondii*-Tachyzoiten

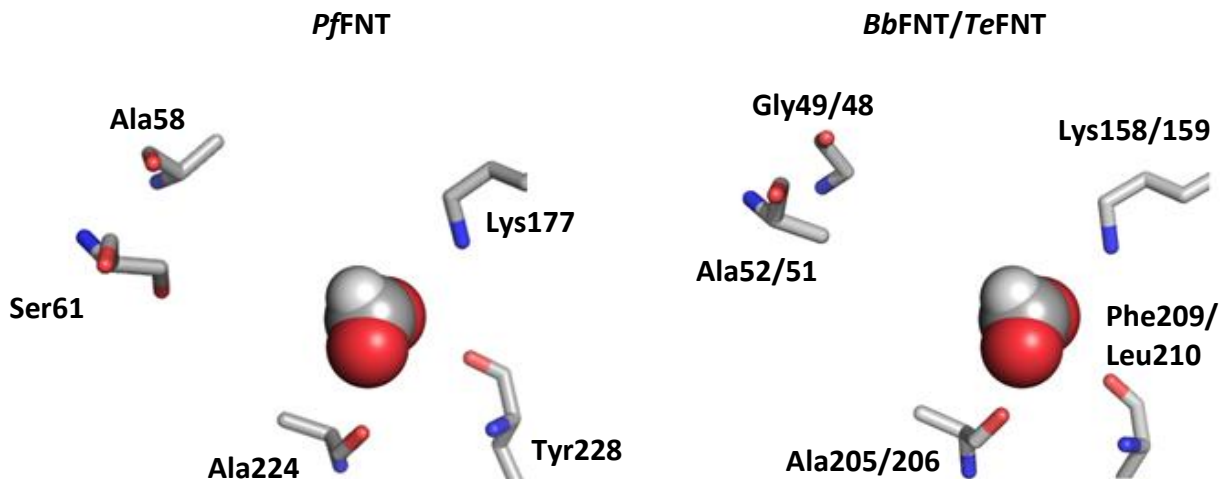
Inhibitor	Parasiten-Wachstum
	IC <sub>50</sub> (µM)
MMV007839	47,1 ± 33,6
BH-296	9,8 ± 1,8
BH-317	15,8 ± 3,1
BH-326	23,4 ± 1,2
BH-388	5,8 ± 2,4

Die weiteren Aufnahmekurven sind im Anhang in Abbildung A7 gezeigt.

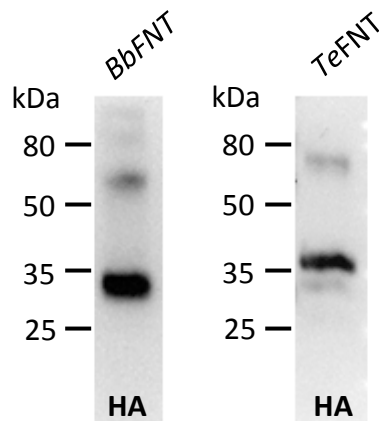
## 4.5 Biochemische Charakterisierung der Formiat-Nitrit-Transporter aus *Babesia bovis* und *Theileria equi* im Hefesystem

### 4.5.1 Expression und funktionelle Charakterisierung von *BbFNT* und *TeFNT*

Die Parasiten der Gattung *Babesia* und *Theileria* gehören auch zur Familie der *Apicomplexa* und sind verwandt mit dem Malaria-Erreger *P. falciparum*. Ähnlich der Malaria führt eine Infektion mit Parasiten der Gattung *Babesia* oder *Theileria* zu einer tödlichen Erkrankung mit Fieberschüben (210). Eine Babesiose oder Theileriose beim Menschen tritt seltener auf als Malaria, da der Parasit zum einem nicht durch Mücken, sondern durch Zecken übertragen wird und zum anderen nur bestimmte Tierarten als Zwischenwirt genutzt werden. So befällt *Babesia bovis* hauptsächlich Kühe und verwandte Arten (211) und *Theileria equi* vor allem Pferde und verwandte Arten (212). Eine Infektion des Menschen mit dem Erreger ist aber trotzdem möglich und es sind auch einige Fälle beschrieben (213). Im Genom von *Babesia*- und *Theileria*-Parasiten konnte wie beim Malaria-Erreger jeweils nur ein einziger Formiat-Nitrit-Transporter gefunden werden. Da die Parasiten wie die Malaria-Erreger Erythrozyten befallen und dort allein auf Glykolyse angewiesen sind, kann auch hier von einer essentiellen Rolle der FNTs beim Ausschleusen von L-Laktat ausgegangen werden (211, 212). Die FNTs aus *Babesia* / *Theileria* sind ähnlich zum *PfFNT* aus *P. falciparum* mit einer Sequenz-ähnlichkeit von 50-53 % und Sequenzidentität von 30-36 %. Schaut man sich den Selektivitätsfilter der beiden FNTs an, fällt auf, dass auch dieser dem *PfFNT* sehr ähnlich ist



**Abb. 4.52** Aufsicht auf die Transportpore von *PfFNT*, *BbFNT* und *TeFNT* von der extrazellulären Seite aus. Die fünf gezeigten Aminosäuren bilden den Selektivitätsfilter und diskriminieren die Fläche der Transportpore. Zum Größenvergleich ist das Kalottenmodell eines Formiat-Moleküls gezeigt.

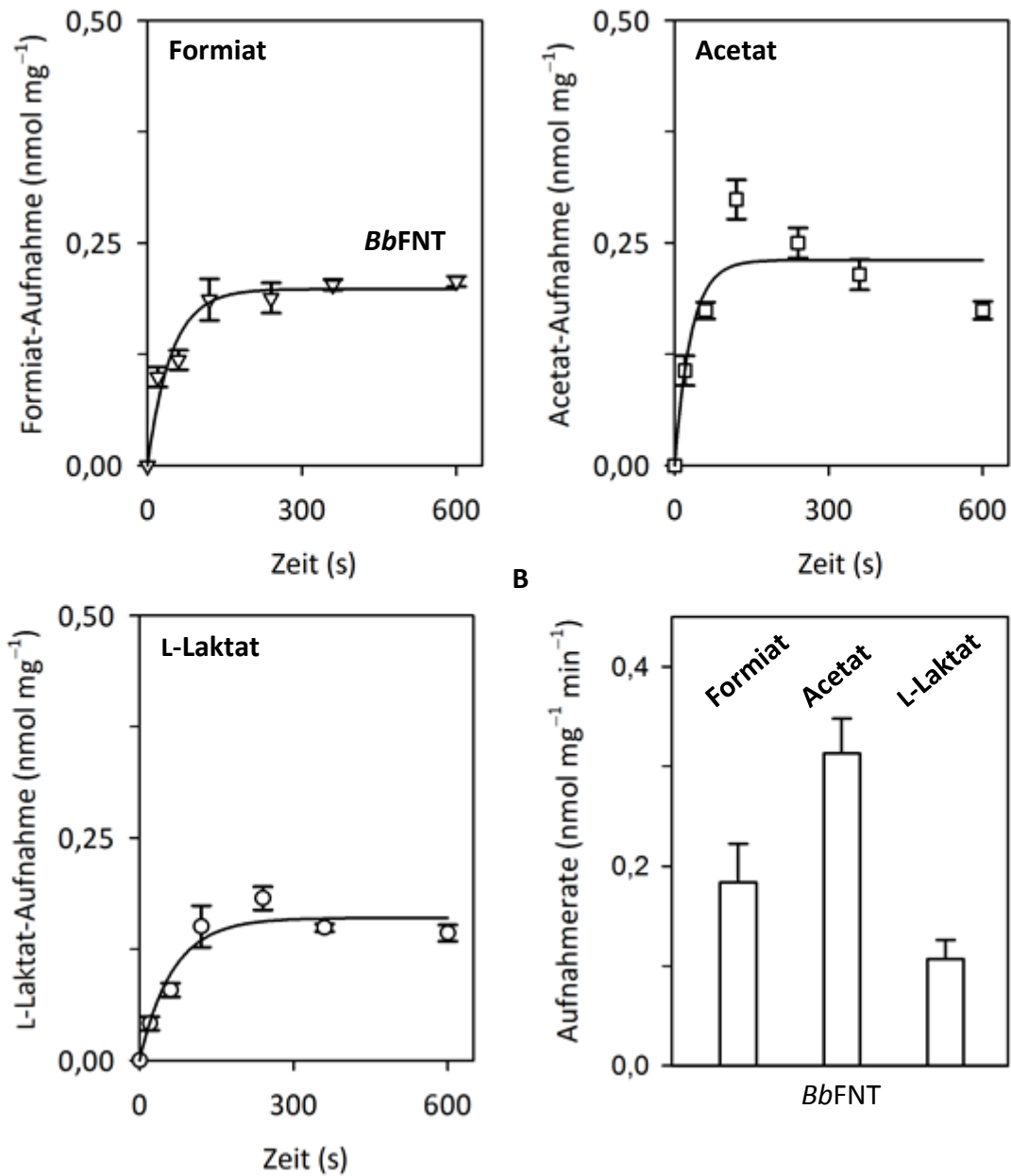


**Abb. 4.53** Western Blot nach Aufschluss von *BbFNT* (30,0 kDa) und *TeFNT* (30,2 kDa) exprimierenden Hefen und Detektion der Proteine mit Antikörpern gerichtet gegen den N-terminalem Hemagglutinin-*tag* (HA). Auftragsmenge: 25 µg Gesamtprotein.

und kleinere Aminosäuren besitzt wie Glycin und Alanin (Abb. 4.55). Demnach ist also von einer L-Laktat-Leitfähigkeit auszugehen, die auch in den physiologischen Kontext passt. Um die beiden FNTs zu untersuchen, wurden die kodierenden Sequenzen von *BbFNT* und *TeFNT* synthetisiert (Genscript®) und über *Spe I* / *Xho I* in den Hefevektor pDRTxa kloniert. Die Expression wurde mittels Western Blot überprüft (Abb. 4.53) und die Funktion beider Transporter mit dem <sup>14</sup>C-Substrat-Aufnahmeassay nachgewiesen (Abb. 4.54, Abb. 4.55).

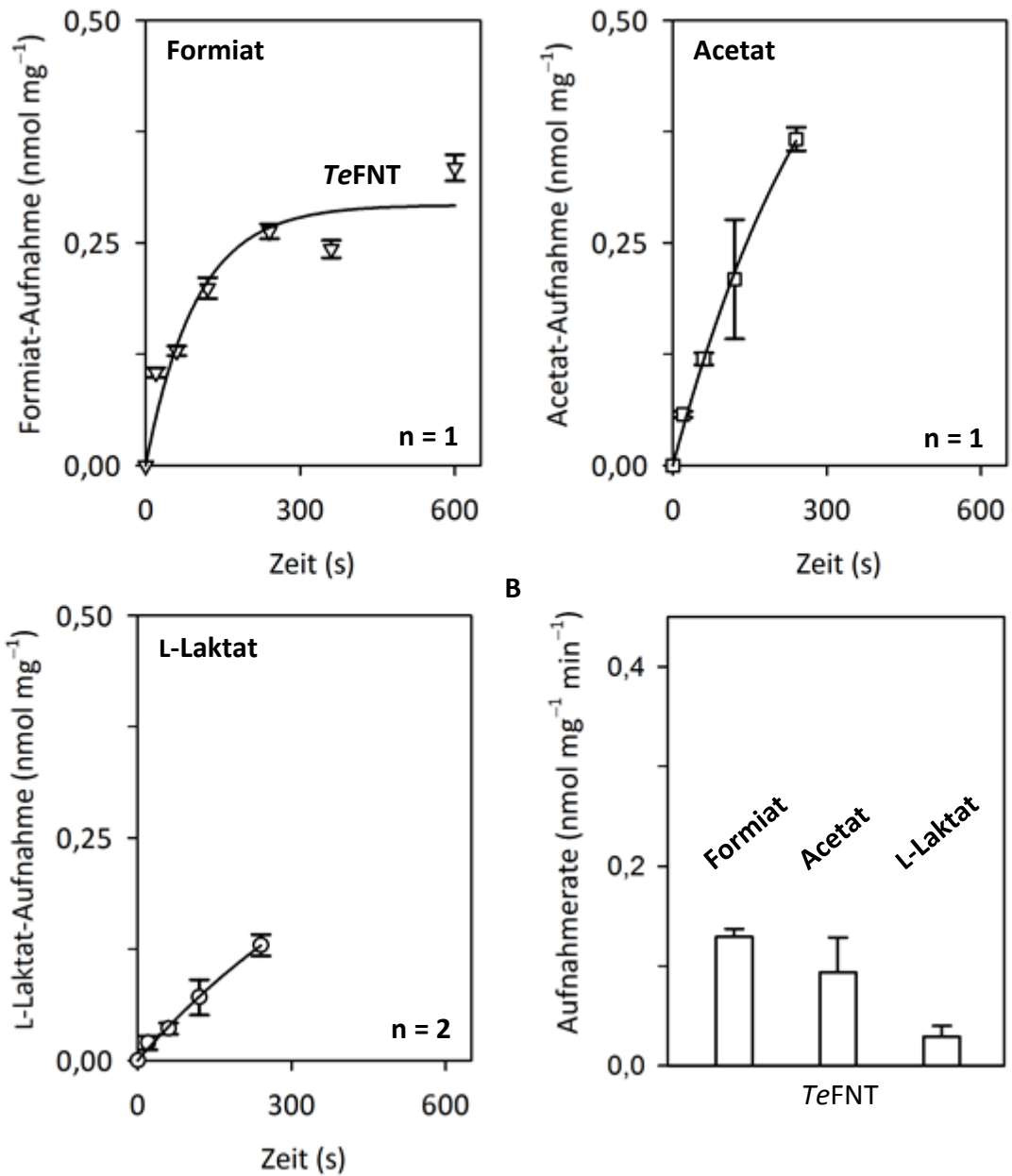


A

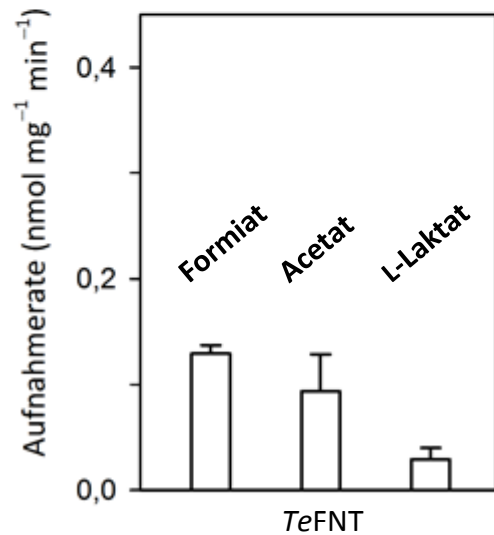


**Abb. 4.54 A:** Aufnahmekurven für Formiat (Δ), Acetat (□) und L-Laktat (○) von in Hefe hergestelltem *BbFNT* (schwarze Linie). Die Werte der nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. **B:** Aufnahmeraten von *BbFNT* (weiße Balken) für die verschiedenen Substrate berechnet aus den Aufnahmekurven. Gradient: 1 mM Substrat mit 0,04 μCi <sup>14</sup>C-Substrat; pH: 6,8.

A



B



**Abb. 4.55 A:** Aufnahmekurven für Formiat ( $\Delta$ ), Acetat ( $\square$ ) und L-Laktat ( $\circ$ ) von in Hefe hergestelltem TeFNT (schwarze Linie). Die Werte der nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen. **B:** Aufnahmeraten von TeFNT (weiße Balken) für die verschiedenen Substrate berechnet aus den Aufnahmekurven. Gradient: 1 mM Substrat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -Substrat; pH: 6,8.

## Ergebnisse

Beide FNTs zeigen eine stabile Expression in der Hefe und sowohl *BbFNT* als auch *TeFNT* leiten die Substrate Formiat, Acetat und das im physiologischen Kontext relevante L-Laktat. Zusammenfassend konnte die Leitfähigkeit des größeren Substrats L-Laktat für zwei weitere eukaryotische Formiat-Nitrit-Transporter bestätigt werden.

### 4.5.2 Einfluss der natürlichen Resistenz von *BbFNT* auf den Inhibitor MMV007839

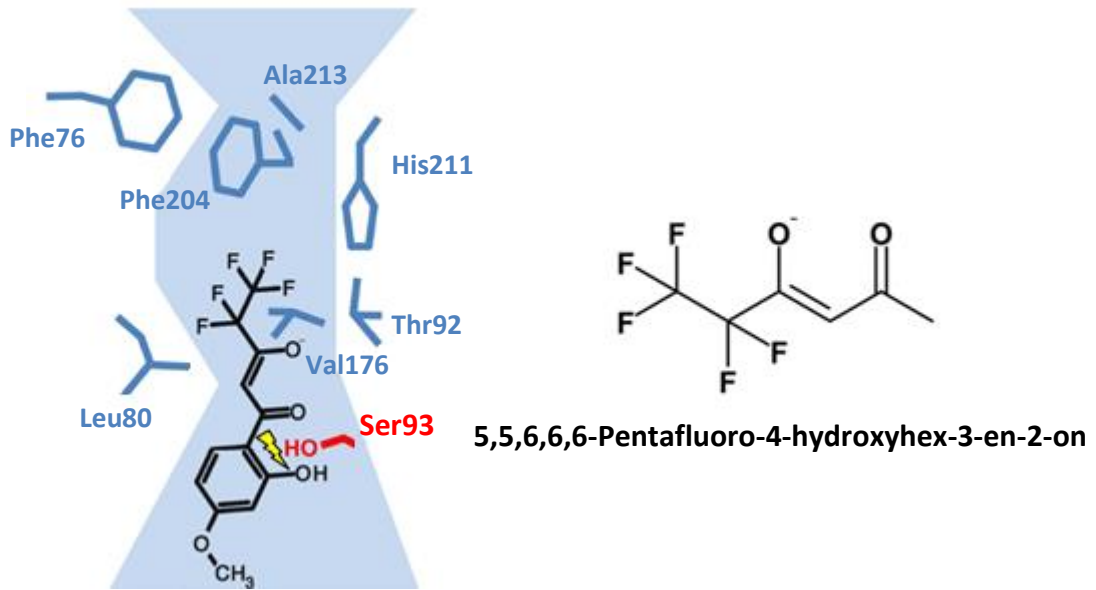
Interessant an der Proteinsequenz von *BbFNT* ist die Aminosäure-Position 93, die der Position 106 im *PfFNT* entspricht. Es fällt auf, dass *BbFNT* hier ein Serin anstelle eines Glycins aufweist (Abb. 4.56).

PfFNT	EESYIRCVVEYGGKKKAHYSNLNLLAKAILAGMFVGLCAHASGIAGGLFY	69
TeFNT	EDNYEYLVKIAEKKVKGPVLHLFLKAILGGWFAGLGGHAAFVLAASY	59
BbFNT	GDAYKVAIDTGIYKKSCPIYTLVKKAMGGYFAALGGHAAMVLA.SYY	59
PfFNT	I AFMCI ICTGSDDLFTGNTLAVTMAIYEKKVKLLDYLRVMTISLFGNYV	139
TeFNT	SALLAIIFTGTDLYTGNMTSFTFTLYKKRIDPVQFGCKILVSLFGNYV	125
BbFNT	GALLCIVFTGIDLVTISNCMNAFLAYSQRQVTLFQYLTRMGTSLLGNYC	125

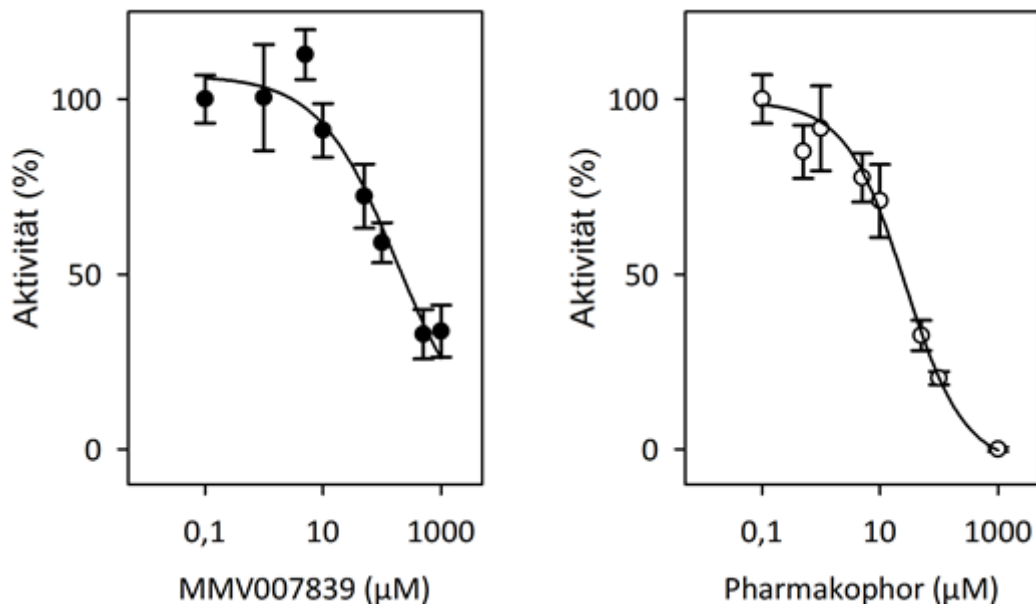
**Abb. 4.56** Proteinsequenz-Alignment von *PfFNT* und der FNTs aus *Theileria equi* und *Babesia bovis*. Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt, ähnliche Aminosäuren sind grau unterlegt. Die Position der *PfFNT* Resistenz-Mutation ist rot markiert. Das Alignment wurde von Prof. Dr. Eric Beitz mit TeXshade unter Verwendung des ClustalW Algorithmus erstellt (204).

Dies würde einer natürlichen Resistenz gegenüber dem gefundenen FNT-Inhibitor MMV007839 entsprechen, da sich durch diese Punktmutation in *PfFNT* resistente Parasiten gebildet hatten (156). Bei *TeFNT* ist hier wiederum ein Glycin zu finden und sollte so sensitiv für den Inhibitor sein. Um dies näher zu untersuchen, wurde zunächst der  $IC_{50}$ -Wert für die Hemmung von *BbFNT* mit dem Inhibitor MMV007839 gemessen (Abb. 4.58). Die aufgenommene konzentrationsabhängige Hemmkurve der L-Laktat-Aufnahme zeigte einen  $IC_{50}$ -Wert von  $155,1 \mu M \pm 70,4 \mu M$ . *BbFNT* spricht also um ein Vielfaches schlechter auf den Inhibitor an als *PfFNT*. Dies gibt einen Hinweis auf die natürliche Resistenz gegenüber der Verbindung. Um die prinzipielle Funktionalität des Inhibitors zu bestätigen und die Rolle des Serins näher zu beleuchten, wurden weitere Versuche durchgeführt. Schaut man sich die postulierte intrazelluläre Bindestelle des Inhibitors an, wird deutlich, dass der aromatische Ring mit dem Serin „kollidiert“ (Abb. 4.57). Nach den Ergebnissen von André Golldack sind

## Ergebnisse



**Abb. 4.57 A:** Seitenansicht auf die intrazelluläre Seite der *BbFNT* Transportpore mit postulierter Bindestelle der offenen Form von MMV007893 und Einfluss des Serins (rot). Modifiziert nach (156). **B:** Strukturformel des Pharmakophors 5,5,6,6,6-Pentafluoro-4-hydroxyhex-3-en-2-on.



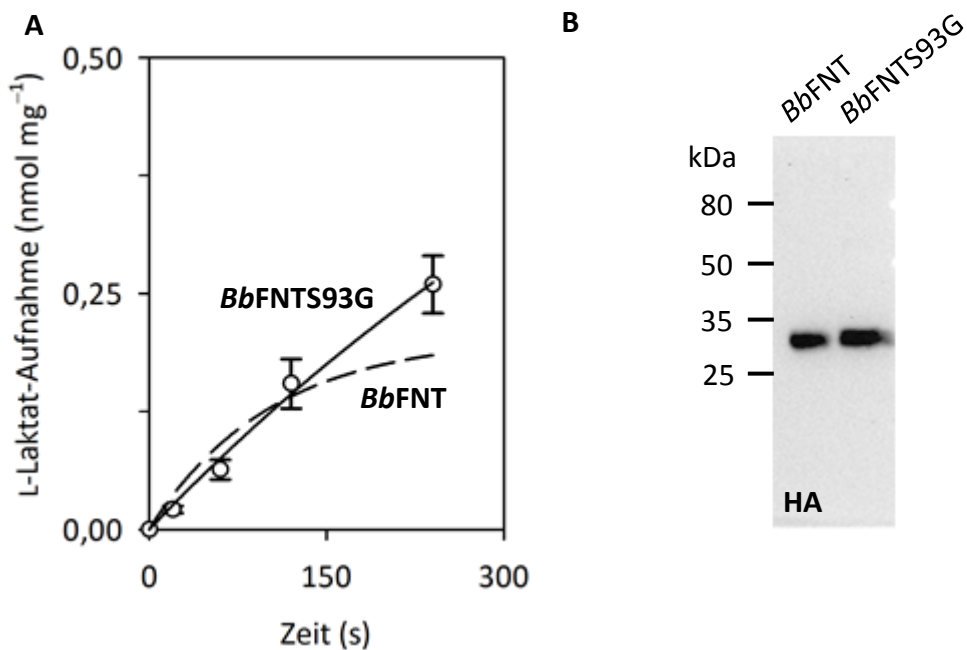
**Abb. 4.58** Konzentrationsabhängige Hemmung der L-Laktataufnahme von *BbFNT* im Hefesystem durch Inhibitor MMV007839 (schwarze Kreise) und des Pharmakophors 5,5,6,6,6-Pentafluoro-4-hydroxyhex-3-en-2-on (weiße Kreise). Gradient: 1 mM L-Laktat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -L-Laktat; pH: 6,8.

## Ergebnisse

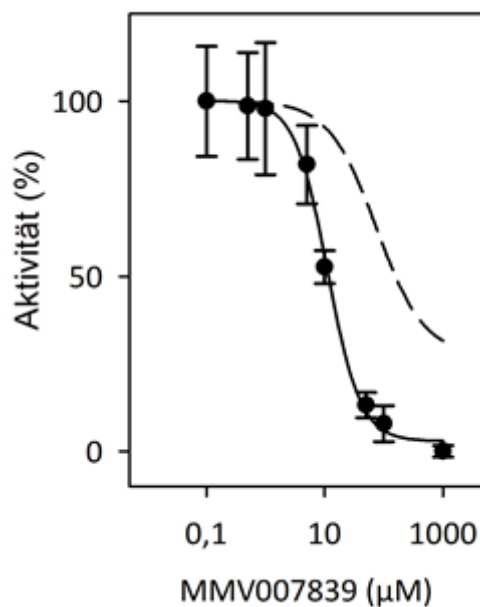
die Fluoralkylkette und die vinyloge Carbonsäure essentiell für die Wirkung (156). Würde man also nur dieses „Pharmakophor“ der Verbindung ohne den aromatischen Ring einsetzen, wäre eine Sensitivität und Umgehung der Resistenz zu erwarten. Für *PfFNT* hat das Pharmakophor einen  $IC_{50}$ -Wert von  $1,9 \mu\text{M}$  im Hefesystem erreicht (156). Eine Affinität zum Transporter war also vorhanden, wurde durch das Fehlen der Lipophilie des aromatischen Ring jedoch abgeschwächt. Es wäre also möglich, dass der Inhibitor MMV007839 prinzipiell in der Lage ist, *BbFNT* zu hemmen. Der niedrige  $IC_{50}$ -Wert wäre dann nur durch die Resistenz des Serins an Position 93 begründet. Ist dies der Fall, wäre für das Pharmakophor also wie bei *PfFNT* auch eine Hemmung im niedrigen mikromolaren Bereich zu erwarten. Die Messung der konzentrationsabhängigen Hemmung der L-Laktat-Aufnahme für das Pharmakophor 5,5,6,6,6-Pentafluoro-4-hydroxyhex-3-en-2-on ergab auch tatsächlich eine stärkere Wirkung mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $23,6 \mu\text{M} \pm 7,4 \mu\text{M}$  (Abb. 4.58). Um die Theorie weiter zu bestätigen, wurde eine Punktmutation von Serin nach Glycin an Stelle 93 durchgeführt. Die Expression dieses Konstruktes in der Hefe war stabil und die Leitfähigkeit für das Substrat L-Laktat vergleichbar mit der nicht mutierten Variante (Abb. 4.59). Die Mutation erhöhte die Sensitivität des Inhibitors MMV007839 um das 13fache mit einem  $IC_{50}$ -Wert von  $12,2 \mu\text{M} \pm 1,2 \mu\text{M}$  (Abb. 4.60). *BbFNT* ist also durch das Serin 93 von Natur aus resistent gegenüber dem Inhibitor, die Änderung zum Glycin stellt die Sensitivität wieder her. Die Ergebnisse von *BbFNT* und *TgFNT1-3* untermauern die wichtige Bedeutung dieser Serin- beziehungsweise Glycin-Position für die Affinität der FNT-Inhibitoren an anderen eukaryotischen FNTs. Die gemessenen  $IC_{50}$ -Werte für *BbFNT* sind in Tabelle 4.7 zusammengefasst.

**Tab. 4.7:**  $IC_{50}$ -Werte der Hemmung von *BbFNT* und *BbFNTS93G*

Inhibitor	$IC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	
	<i>BbFNT</i>	S93G
MMV007839	$155,1 \pm 70,4$	$12,2 \pm 1,2$
Pharmakophor	$23,6 \pm 7,4$	---



**Abb. 4.59 A:** L-Laktat-Aufnahme (o) des *BbFNTS93G*-Konstruktes in Hefezellen im Vergleich zu nicht mutierten *BbFNT* (gestrichelte Linie). **B:** Western Blot von *BbFNT* (30,0 kDa) und *BbFNTS93G* (30,0 kDa) exprimierenden Hefen und Detektion mit Antikörpern gerichtet gegen den N-terminalen Hemagglutinin-tag (HA). Auftragsmenge: 25 µg Gesamtprotein.



**Abb. 4.60** Konzentrationsabhängige Hemmung der L-Laktat-Aufnahme der *BbFNTS93G*-Mutante im Hefesystem durch den Inhibitor MMV007839 im Vergleich zum nicht mutierten *BbFNT* (gestrichelte Linie). Gradient: 1 mM L-Laktat mit 0,04 µCi <sup>14</sup>C-L-Laktat; pH: 6,8

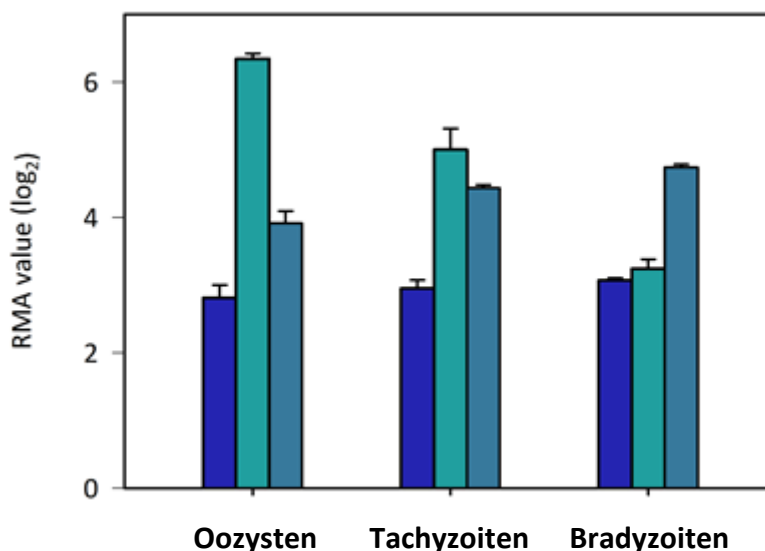
## 5 Diskussion und Ausblick

### 5.1 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, Formiat-Nitrit-Transporter aus *T. gondii* zu identifizieren und biochemisch zu charakterisieren. Außerdem sollte ihre Bedeutung im Energiestoffwechsel und ihre Eignung als potentielles Wirkstoffziel beleuchtet werden.

#### 5.1.1 Expression von *TgFNT1-3* in *Toxoplasma gondii*-Parasiten

Anhand bioinformatischer Genom-Analyse konnten drei Gene in *T. gondii* identifiziert werden, die jeweils für einen Formiat-Nitrit-Transporter kodieren. Die Amplifikation der Konstrukte aus *T. gondii* cDNA von Tachyzoiten des Stammes NTE Typ II war nur für *TgFNT1* und *TgFNT2* möglich, *TgFNT3* konnte daraus jedoch nicht amplifiziert werden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass *TgFNT3* in bestimmten *T. gondii*-Stämmen gar nicht exprimiert wird oder nur in bestimmten Entwicklungsstadien des Parasiten vorkommt. Fritz *et al.* zeigten anhand einer Transkriptom-Analyse vorhandene Transkriptions-Level für alle drei *TgFNTs* in Oozysten, Tachyzoiten und Bradyzoiten (Abb. 5.1).



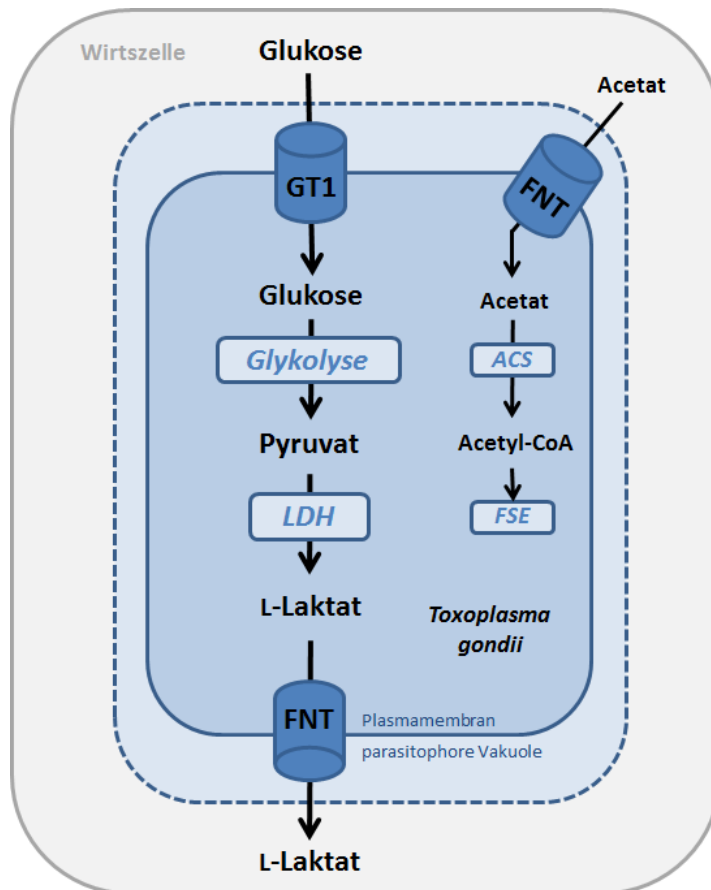
**Abb. 5.1** Expressionsprofil von *TgFNT1* (blau), *TgFNT2* (cyan) und *TgFNT3* (hellblau) in den verschiedenen Entwicklungsstadien des *Toxoplasma gondii*-Stammes ME4 Typ II. Die Transkriptom-Analyse wurde nach zweitägiger (Oozysten) oder viertägiger (Tachyzoiten, Bradyzoiten) *in-vitro*-Kultur durchgeführt. Transkript-Level sind angegeben als normalisierte *Robust Multi-array Average* (RMA)-Werte ( $\log_2$ ). Modifiziert nach (214).

Prinzipiell werden *TgFNT1-3* also in allen Entwicklungsstadien exprimiert. Für den Stamm RH Typ I konnten anhand von Transkriptom-Daten aus der Datenbank ToxoDB Expressionslevel in *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten für alle drei *TgFNTs* gezeigt werden (Abb. 4.2). Schaut man sich die ToxoDB-Daten auf Protein-Ebene an, gibt es für *TgFNT1* und *TgFNT2* Nachweise zur Herstellung des Proteins in *T. gondii* anhand von Massenspektrometrie-Daten aus verschiedenen Experimenten und Entwicklungsstadien. *TgFNT3* konnte bisher nicht massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Um Aussagen aus den bisher bekannten Daten ableiten zu können, ist zu beachten, dass verschiedene *T. gondii*-Stämme in verschiedenen Entwicklungsstadien für verschiedene Experimente genutzt wurden. Die erhobenen Daten sind also inkonsistent, was den untersuchten *T. gondii*-Stamm angeht. So sind zum Beispiel kaum Daten zum Stamm NTE Typ II in der Datenbank ToxoDB zu finden, sodass die Fragestellung, ob *TgFNT3* in *T. gondii*-Tachyzoiten dieses Stammes nicht hergestellt wird, experimentell weiter untersucht werden müsste.

### **5.1.2 FNTs aus *Toxoplasma gondii* leiten im Energiestoffwechsel relevante Substrate**

Die Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung der kodon-optimierten *TgFNT*-Konstrukte in Hefezellen zeigten, dass nach Verkürzung alle drei *TgFNTs* funktionell waren. Die Monocarboxylat-Anionen Formiat, Acetat und L-Laktat wurden von allen drei FNTs transportiert. Insbesondere die Leitfähigkeit der Substrate Acetat und L-Laktat macht deutlich, dass die *TgFNTs* eine physiologisch wichtige Rolle im Energiestoffwechsel übernehmen können, indem sie wichtige Metabolite und Nährstoffe ein- oder ausschleusen (Abb. 5.2). Durch das Fehlen anderer Monocarboxylat-Transporter wie der MCT-Familie in eukaryotischen Parasiten (154) kann angenommen werden, dass in *T. gondii* in der Glykolyse gebildetes L-Laktat über die drei charakterisierten Formiat-Nitrit-Transporter ausgeschleust wird. Die Anwesenheit von drei FNT-Isoformen erscheint auf den ersten Blick redundant, deckt sich aber mit der zuvor beschriebenen Plastizität des Erregers im Energiestoffwechsel (132, 135, 215). Um herauszufinden, ob die drei FNTs mittels möglicher Regulationen verschiedene Funktionen übernehmen oder bei bestimmten Stoffwechsel-Lagen, wie zum Beispiel einer Azidifizierung des Zytosols, jeweils hochreguliert werden, bedarf es weiterer Untersuchungen. Auch wenn die Glykolyse in *T. gondii*-Tachyzoiten nicht essentiell zu sein scheint, weisen die Ergebnisse dieser Arbeit zur Hemmung des Wachstums von *T. gondii*-Tachyzoiten mit *TgFNT*-Inhibitoren auf eine essentielle Bedeutung des L-Laktat-Transportes





**Abb. 5.2** Die postulierte Funktion der FNTs im Energiestoffwechsel von *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten. Glukose wird über den Glukose-Transporter (GT1) aufgenommen und im Rahmen der Glykolyse zu L-Laktat umgewandelt. L-Laktat wird über einen Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) ausgeschleust. Acetat dient als alternative Nährstoffquelle und kann über Formiat-Nitrit-Transporter aufgenommen werden. LDH: Laktat-Dehydrogenase, ACS: Acetyl-CoA-Synthetase, FSE: Fettsäure-Elongation. Modifiziert nach (134, 135).

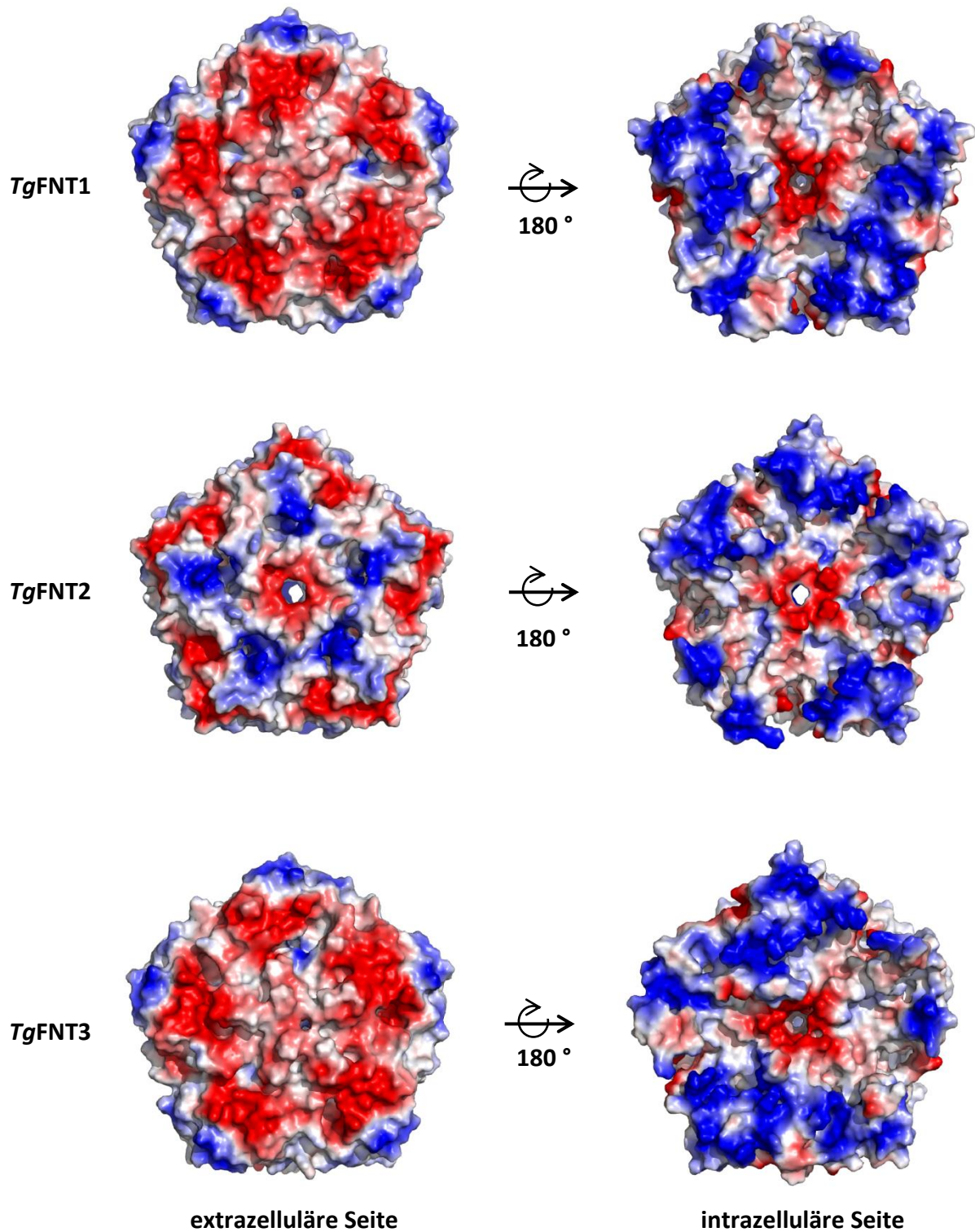
im Parasiten hin. Dies muss jedoch noch mit FNT-*knockout*-Studien an *T. gondii* bestätigt werden. Interessant wäre auch, den Effekt der Inhibitoren auf die bradyzoite Form zu evaluieren, dessen Metabolismus schlechter untersucht ist als der Metabolismus der tachyzoiten Form (134). Diskutiert wird die Abwesenheit eines funktionierenden Citratzyklus und daher einer größeren Rolle der Glykolyse in Bradyzoiten. Die Enzyme Pyruvat-Kinase und Laktat-Dehydrogenase (LDH2) sind deutlich höher reguliert als in Tachyzoiten, was in einer größeren Produktion von L-Laktat resultiert (216). Die Hemmung des L-Laktat Transportes über FNTs könnte hier also eine noch größere Bedeutung haben und die Inhibitoren könnten somit eine größere Wirkung gegen die eingekapselte Form erzielen. Experimente mit der bradyzoiten Form von *T. gondii* sollten daher in Betracht gezogen werden, um

möglicherweise eine Grundlage zur Entwicklung von Arzneistoffen gegen die chronische Infektion zu erhalten.

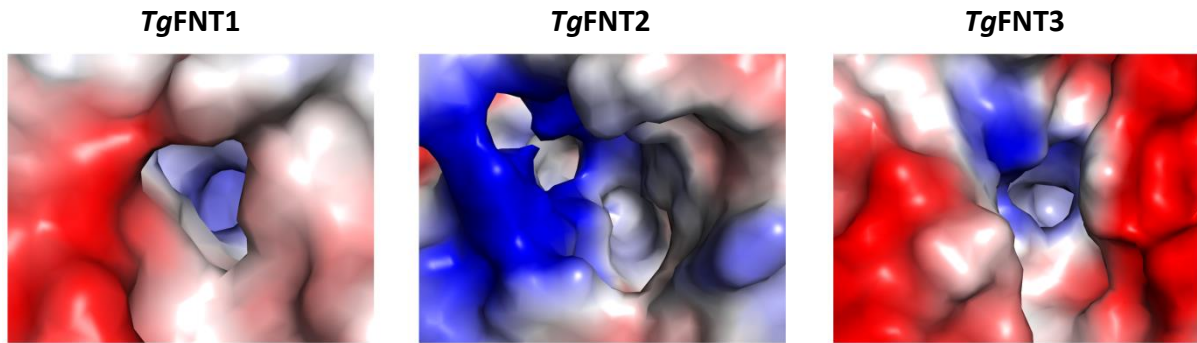
Ob der Import von Acetat als alternative Nährstoffquelle über die FNTs, insbesondere bei Abwesenheit von Glukose oder *knockout* des Glukose-Transporters *TgGT1*, eine kritische Rolle einnimmt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht werden. Diese Arbeit bildet aber eine Grundlage zur näheren Untersuchung der Stoffwechselwege im Energiestoffwechsel von *T. gondii* und der Evaluation der Bedeutung des Transportes von Nährstoffen und Stoffwechselendprodukten über die Plasmamembran zum Überleben des Parasiten.

### 5.1.3 Ist der Transportmechanismus auf beide Transportrichtungen anwendbar?

Anhand der gezeigten erhöhten L-Laktat-Leitfähigkeit bei einem pH-Wert von 4,8 konnte der Mechanismus eines Protonen-Symports für alle drei *TgFNTs* bestätigt werden. Dies entspricht dem in unserer Arbeitsgruppe zuvor gezeigtem Transport-Mechanismus von *EcFocA* und *PfFNT* (182). Das Anion wird elektrostatisch von einem Lysin am Poreneingang angezogen, vom Bulkwasser protoniert und kann ungeladen die lipophilen Engstellen passieren. Ein entsprechendes Lysin ist bei allen drei *TgFNTs* am extrazellulären Poreneingang (K157/K230) vorhanden. Anhand der Ergebnisse ist davon auszugehen, dass die FNTs in beiden Parasiten L-Laktat auf die gleiche Weise transportieren. Die Messung der Substratleitfähigkeit geschah im Hefesystem von der extrazellulären in die intrazelluläre Richtung und entspricht so einem Import. Dies ist für das Substrat Acetat die physiologisch relevante Richtung. Für das im Stoffwechsel als Endprodukt anfallende L-Laktat ist jedoch der Export entscheidend. Um den Transport-Mechanismus auf die Export-Richtung übertragen zu können, müsste auf der intrazellulären Seite auch eine entsprechende positive elektrostatische Anziehung vorhanden sein. Schaut man sich die elektrostatische Verteilung an, fällt auf, dass die Protein-Oberfläche der drei *TgFNTs* von der extrazellulären Seite aus negativer geladen ist als auf der intrazellulären Seite (Abb. 5.3). Lediglich die Poreneingänge sind positiv geladen, um dort entsprechend das Substrat-Anion anziehen zu können (Abb. 5.4). Dass diese Anziehung des Anions stark genug ist, um einen Transport des Substrates zu gewährleisten, konnte anhand der im Hefesystem generierten Ergebnisse dieser Arbeit bewiesen werden. Schaut man sich nun die intrazelluläre Seite an, zeigt diese insgesamt eine größere Verteilung von positiver Ladung um die Poreneingänge herum und sorgt so möglicherweise für eine stärkere An-



**Abb. 5.3** Elektrostatik der erstellten *TgFNT*-Modelle (PDB 3Q7K) von der extra- und intrazellulären Seite aus. Positive (blau) und negative (rot) Ladungsverteilungen sind jeweils farbig dargestellt. Berechnet und visualisiert mit PyMOL Molecular Graphics System über die Funktion *vaccum electrostatics*. Die Termini sind in der Berechnung nicht berücksichtigt.



**Abb. 5.4** Elektrostatische Oberfläche der Poreneingänge der erstellten *TgFNT*-Modelle (PDB 3Q7K) von der extrazellulären Seite aus. Positive (blau) und negative (rot) Ladungsverteilungen sind jeweils farbig dargestellt. Berechnet und visualisiert mit PyMOL Molecular Graphics System über die Funktion *vaccum electrostatics*.

ziehung der Anionen als die Poreneingänge der extrazellulären Seite (Abb. 5.3). Der Mechanismus sollte also auch auf den Export von Substraten anwendbar sein, muss aber durch entsprechende Experimente an umgekehrt orientiertem Protein bestätigt werden. Dies ließe sich durch Einbau des Proteins in Proteoliposomen realisieren. Julia Holm-Bertelsen aus unserer Arbeitsgruppe konnte für zellfrei hergestelltes *PfFNT* eine uniforme, *outside-in*-Orientierung in Proteoliposomen feststellen (217). Wäre dies für die *TgFNTs* ebenfalls nachweisbar, könnte so der Transport in die Export-Richtung überprüft werden. Eine weitere Möglichkeit wäre ein hefebasierter Effluxassay mit radioaktiv-markierten Substraten. Diese Methode wurde für *PfFNT* schon erfolgreich von Janis Rambow aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt (154). Hierbei werden die Hefen vorher mit radioaktiv-markiertem Substrat für eine bestimmte Zeit beladen, abzentrifugiert und entsprechend der Efflux über die Zeit gemessen. Der Puffer für die Efflux-Messung enthält dabei kein beziehungsweise weniger Substrat, um einen nach außen gerichteten Gradienten zu erzeugen.

#### 5.1.4 Wird der *TgFNT*-Substrattransport über die langen Termini reguliert?

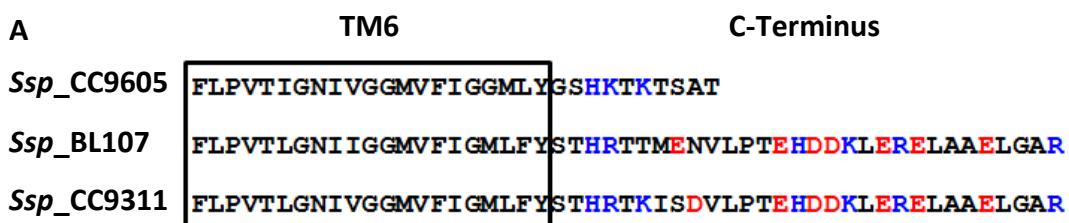
Da die unverkürzten Konstrukte ein anderes Transportverhalten gezeigt haben als die verkürzten Konstrukte, kann ein möglicher Einfluss der Termini diskutiert werden. Hierbei sind jedoch viele Faktoren zu berücksichtigen. Mit Blick auf den Western Blot kann die Fragmentierung, die bei den unverkürzten, kodon-optimierten Konstrukten auftrat, auf eine unzureichende Herstellung des Proteins in der Hefe geschlossen werden. Die Menge an Protein mit richtiger Größe war dann nicht ausreichend vorhanden, um eine Funktionalität

zu gewährleisten. Wurde der Terminus verkürzt, wurden die Konstrukte in der Hefe stabil hergestellt und die Transporter wurden funktionell. Die Änderung des Transportverhaltens wäre so mit einer stabilen Expression in der Hefe begründet und eine mögliche Regulation durch die Termini wäre damit ausgeschlossen. Allerdings war *TgFNT3* trotz Fragment-Banden funktionell und zeigte sogar höhere Transportraten als die verkürzte Variante. Auch der Vergleich von *TgFNT1* mit der um 17 Aminosäuren verkürzten Form spricht gegen die Fragmentierung als Grund zur Änderung des Transportverhaltens. *TgFNT1Δ294-ter* zeigte trotz stabiler Expression auf dem Western Blot die gleiche Funktion wie die unverkürzte Form. Auch war der 10x-His-tag bei diesem Konstrukt nicht mehr detektierbar, was für eine Interaktion des Terminus mit der Kernregion sprechen könnte. Die Fragmentierung gibt so zwar einen Hinweis auf eine stabile Expression der Konstrukte in der Hefe, scheint aber nicht der einzige Faktor zu sein, um die Funktionalität zu begründen.

Ein weiterer Faktor für die Änderung des Transportverhaltens könnte die Anzahl der Transporter sein, die über korrektes *trafficking* zur Membran gebracht werden. Sind dort nicht genügend Transporter vorhanden, kann kein Transport der Substrate über die Membran stattfinden. Auch wird der direkte Vergleich der Transportraten zwischen den verschiedenen Proteinen erschwert, da man nicht mit Sicherheit sagen kann, wie viele Transporter in der Membran vorhanden und so für den Transport verantwortlich sind. Allein über einen Western Blot lassen sich darüber keine Aussagen machen. Hier wäre eine Methode zur Quantifizierung der in der Membran vorhandenen Proteine sinnvoll. Die im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich durchgeführte Methode unter Verwendung eines *Snorkel-tags* lieferte kein stabiles Fusionsprotein und ist somit nicht zur Quantifizierung geeignet. Man könnte versuchen den *Snorkel-tag* N-terminal einzuführen, um zu sehen ob dies zu einem stabileren Produkt führt. Alternativ könnte man zur Quantifizierung Antikörper gegen die Aminosäure-Sequenz eines der extrazellulären *loops* oder einen der Termini generieren. Dies würde eine Quantifizierung über die Durchflusszytometrie beziehungsweise FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) möglich machen. Ohne die Information der Quantifizierung der in der Membran vorhandenen Proteine kann man zu einer möglichen Regulation über die Termini keine Aussagen machen, es schließt diese gleichzeitig aber auch nicht aus. Aus physiologischer Sicht würde eine Regulation prinzipiell Sinn machen, da zwei Substrate in verschiedene Richtungen transportiert werden müssen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten keine großen Unterschiede in der Transportrate der drei zur Kernregion verkürzten *TgFNTs*. Auch die Substratselektivität unterschied sich nicht. Würde man annehmen, dass eine Regulation stattfindet, könnten die Termini die Transportrate der *FNTs* verlangsamen oder den Transport ganz unterbinden. Eine Untersuchung der Direktionalität wäre hier ebenfalls interessant. Die Frage ist nun, wie solch eine Regulation realisiert sein könnte. In der Literatur ist für *FocA* ein pH-abhängiges, N-terminales *gating* beschrieben worden. Dies konnte jedoch durch direkte <sup>14</sup>C-Aufnahme-Assays an *EcFocA* von unserer Arbeitsgruppe widerlegt werden (181). Der von der Arbeitsgruppe Einsle beobachtete Transportverlust ab pH 5,1 war in der Verwendung von elektrophysiologischen Methoden begründet, die nur elektrogenen Transport erfassen (138).

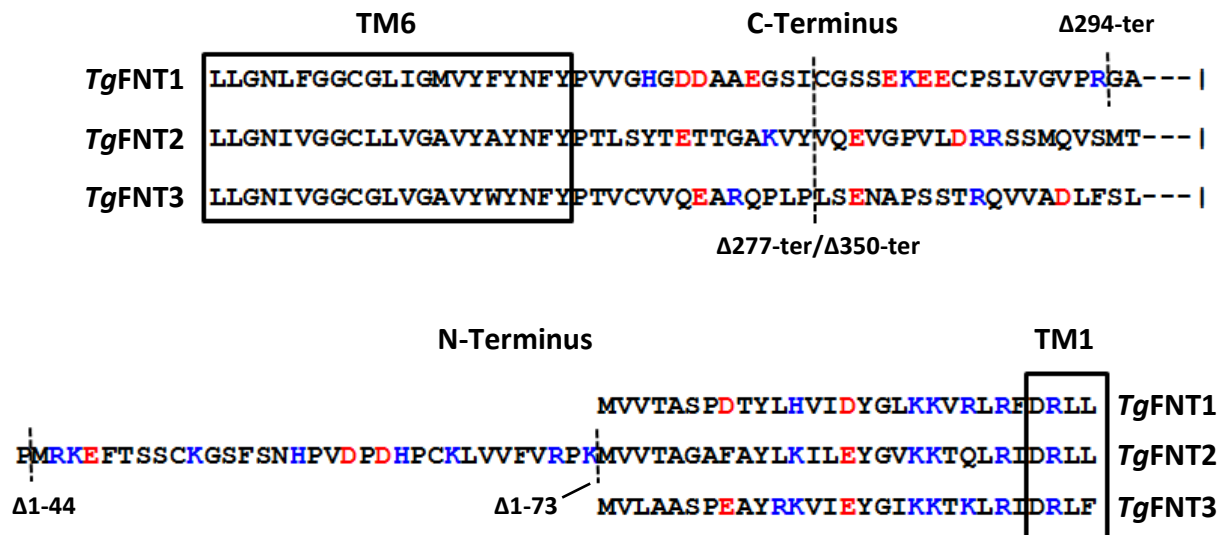
Als einziger weiterer *FNT*-Vertreter, bei dem ein *gating*-Mechanismus diskutiert wird, ist der Nitrit-Transporter *NitM* aus dem *Synechococcus sp.*-Stamm CC9331 beschrieben worden (151). Für dieses *FNT* wurde eine Nitrit-Leitfähigkeit festgestellt, die bei Verkürzen des C-Terminus nicht mehr vorhanden ist. Es wurde eine in Cyanobakterien konservierte, sehr hydrophile Aminosäure-Sequenz als Ursache für das *gating* vorgeschlagen. Bei dem Cyanobakterien-Stamm CC9605 fehlt diese hydrophile Sequenz von Natur aus und dieser Transporter leitet ebenfalls kein Nitrit (Abb. 5.5).



**Abb. 5.5** Position von geladenen Aminosäuren am C-Terminus von *NitM* Formiat-Nitrit-Transportern aus verschiedenen *Synechococcus*-Arten. Positiv geladene Aminosäuren (blau) und negativ geladene Aminosäuren (rot) sind jeweils farblich markiert. Modifiziert nach (151).

Schaut man sich die entsprechenden Positionen der *TgFNT*-Termini an, so erkennt man bei *TgFNT1* auch eine ähnliche hydrophile Sequenz (EK<sup>+</sup>EE<sup>-</sup>) direkt zwischen den beiden Schnittstellen. Dieser Bereich hat sich in dieser Arbeit als wichtig für die Änderung des Transportverhaltens herausgestellt. Bei *TgFNT3* und *TgFNT2* ist solch eine Sequenz nicht zu

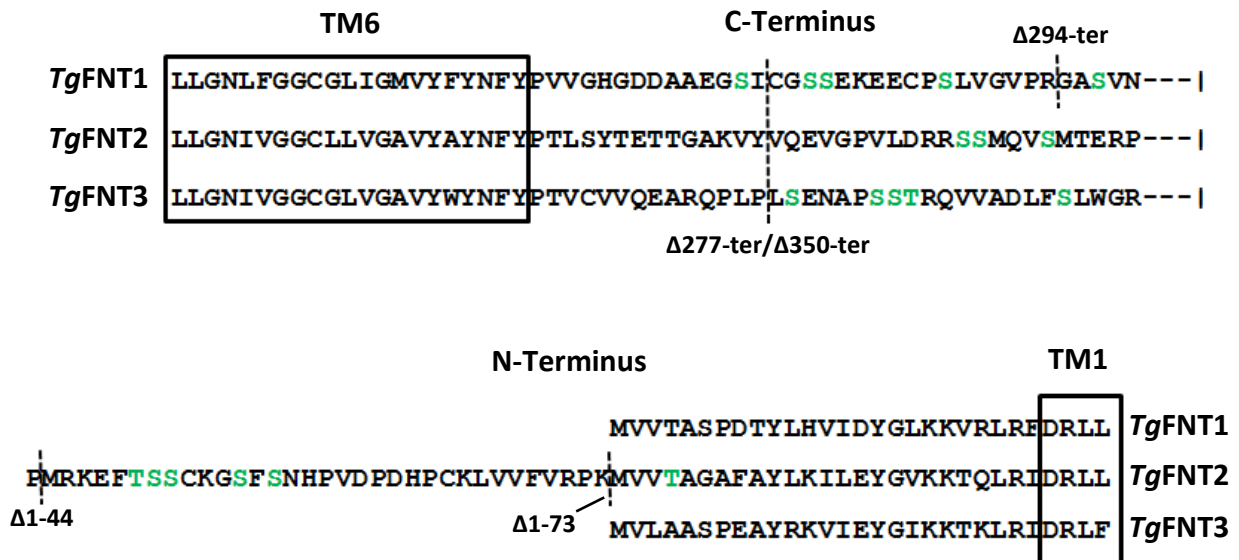
erkennen. Auch der N-Terminus von *TgFNT2* weist zwischen den entscheidenden Schnittstellen nur vereinzelt hydrophile Aminosäuren auf (Abb. 5.6).



**Abb. 5.6** Position von geladenen Aminosäuren am C- und N-Terminus von *TgFNT1-3* aus *Toxoplasma gondii* unter Einbeziehung der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Verkürzungen (gestrichelte Linien). Das Alignment wurde unter Verwendung des ClustalW-Algorithmus erstellt. Positiv geladene Aminosäuren (blau) und negativ geladene Aminosäuren (rot) sind jeweils farblich markiert.

Bei *TgFNT3* ist allerdings auffällig, dass am Ende des C-Terminus recht viele Glutaminsäure-Sequenzen vorhanden sind, die solch eine Hydrophilie hervorrufen könnten. Durch Mutation von Aminosäuren der Termini zu unpolaren Sequenzen wäre solch eine Regulation der drei *TgFNTs* experimentell nachweisbar. Allerdings würde man eher davon ausgehen, dass eine Regulation der *TgFNTs* wie bei den *FNTs* der Cyanobakterien als konservierte Sequenz vorliegt. Die Termini der *TgFNTs* sind untereinander sehr variabel und es sind kaum konservierte Sequenzen zu erkennen. Außerdem stellen polare Aminosäuren in den Terminus-Regionen die intrazelluläre Lokalisation der Termini in Proteinen sicher (169, 170). Die Anwesenheit hydrophiler Aminosäuren in den Terminus-Regionen ist also nichts Ungewöhnliches in Membranproteinen. Deshalb scheint ein *gating*-Mechanismus über hydrophile Aminosäuren in *TgFNTs* unwahrscheinlich.

Um weitere mögliche verantwortliche Aminosäuren für eine Regulation zu entdecken, wäre der für *TgFNT1* ausgemachte Bereich von 17 Aminosäuren interessant, in dem eine Transportänderung beobachtet wurde. Hier gibt es zwar keine auffälligen konservierten Aminosäure-Sequenzen zwischen den drei *TgFNTs*, es lassen sich allerdings mehrere potentielle Phosphorylierungs-Stellen nachweisen. (Abb. 5.7).



**Abb. 5.7** Position möglicher phosphorylierbarer Aminosäuren (grün) am C- und N-Terminus von *TgFNT1-3* aus *Toxoplasma gondii* im Bereich der im Rahmen dieser Arbeit erstellten Verkürzungen (gestrichelte Linien). Das Alignment wurde unter Verwendung des ClustalW-Algorithmus erstellt.

Die Aminosäuren Serin, Tyrosin und Threonin sind mögliche Phosphorylierungsstellen von Proteinen und können so der Regulation dienen. Auch in der 29 Aminosäuren langen Sequenz zwischen den Schnittstellen am N-Terminus von *TgFNT2* sind potentielle Phosphorylierungsstellen vorhanden. In der Datenbank ToxoDB sind anhand von Massenspektrometrie-Daten nachgewiesene Phosphorylierungsstellen für *TgFNT1* und *TgFNT2* angegeben. Diese Stellen liegen ausschließlich im C-Terminus, jedoch ist für keine der 17 Aminosäuren eine Phosphorylierung experimentell nachgewiesen. Interessant ist aber, dass innerhalb der eingegrenzten 17 Aminosäuren am C-Terminus bei allen drei *TgFNTs* ein potentielles Motif für die im Wachstum von *T. gondii*-Tachyzoiten relevante Proteinkinase A vorhanden ist (*TgFNT1*: SEK, *TgFNT2*: RRS, *TgFNT3* STR) (218, 219). Auch in



der eingegrenzten N-Terminus-Sequenz von *TgFNT2* gibt es solche Proteinkinase A-Motive (SCK, KGS). Durch Mutation der potentiell phosphorylierten Aminosäuren zum Alanin um die Phosphorylierung zu verhindern sowie einer Mutation zur Asparaginsäure um die Phosphorylierung zu simulieren, könnte eine mögliche Regulation experimentell untersucht werden. Auch andere Kinasen könnten in den herausgestellten Bereichen für eine Phosphorylierung verantwortlich sein, wie die Caseinkinase I (DRRS, DLFS) oder die Proteinkinase C (SEK, SCK) (219).

Zusammenfassend bedarf es weiterer Untersuchungen, ob es einen möglichen *gating*-Mechanismus in Formiat-Nitrit-Transportern gibt. In den strukturell verwandten Aquaporinen sind indes *gating*-Mechanismen beschrieben worden. Beim Aqy1 aus *Pichia pastoris* verdeckt zum Beispiel ein Tyrosin im N-Terminus (Y31) die Transportpore (220). Im Aqp B aus *Dictyostelium discoideum* ist ein Tyrosin (Y231) im *loop* D für den *gating*-Mechanismus verantwortlich (221). Bei den *TgFNTs* sind Tyrosine jedoch nur im C- und N-Terminus von *TgFNT2* vorhanden. Aber auch *gating* durch Phosphorylierung ist in Aquaporinen beschrieben. Der Kanal SoPIP2;1 aus der Spinatpflanze öffnet sich durch ein phosphoryliertes Serin (S115) im *loop* B und ein phosphoryliertes Serin (S274) im C-Terminus (222). Am Beispiel der Aquaporine kann man erkennen, dass einzelne Aminosäuren für das *gating* verantwortlich sein können. Daher sollten die Aminosäuren in den eingekreisten Bereichen der aufgetretenen Transportänderung in den *TgFNTs* einzeln untersucht werden.

### 5.1.5 Identifikation der *TgFNT*-Selektivitätsfilter

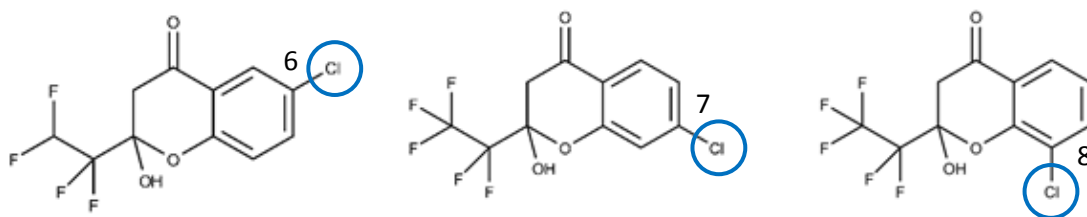
Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die für *TgFNT1-3* aufgestellten Selektivitätsfilter-Modelle (Abb. 4.1.9). Mittels chemischer Modifikation der Cysteine mit verschiedenen großen Reagenzien ließen sich die Unterschiede im Filterdurchmesser zwischen den drei *TgFNTs* experimentell nachweisen. *TgFNT1* war hierbei nicht sensitiv für das große Molekül pCMBS, die Leitfähigkeit von Formiat und L-Laktat ließ sich jedoch durch das kleinere MMTS vollständig hemmen. Die L-Laktat-Leitfähigkeit von *TgFNT2* und *TgFNT3* ließ sich hingegen mit dem größeren pCMBS vollständig hemmen, was für eine breitere Filterregion als bei *TgFNT1* spricht. Bestätigt werden konnte dies mit dem Nachweis einer Formiat-Leitfähigkeit trotz Hemmung mit MMTS. Diese Verbindung führte zu einer künstlichen Verkleinerung der Filterregion und zur Änderung des Selektivitätsprofils von *TgFNT2* und *TgFNT3*. An der extrazellulären Seite ist der Transportpfad von *TgFNT1* also entsprechend schmaler als der

Transportpfad der anderen beiden *TgFNTs*. Die chemische Modifikation wurde außerdem mit dem ebenfalls größeren Molekül MTSES durchgeführt. Dies führte zu einer Hemmung von *TgFNT2* und *TgFNT3*, jedoch nicht von *TgFNT1* und somit konnten die Ergebnisse der pCMBS-Hemmung prinzipiell bestätigt werden. Insgesamt war die Hemmung aber schlechter als mit pCMBS, was auf eine unvollständige Reaktion von MTSES mit den Cysteinen schließen lässt. Da eine kovalente chemische Bindung gebildet werden muss, könnte die Reaktionszeit von 30 min nicht ausgereicht haben. Um das Selektivitätsfilter-Modell auf einem anderen Weg zu bestätigen, könnten die Cysteine im Protein durch Punktmutation in voluminösere Aminosäuren verändert werden, sodass eine Verkleinerung des Filterdurchmessers zustande kommt, die wiederum über den <sup>14</sup>C-Aufnahemassay messbar ist. Der engere Transportpfad kann auch auf der intrazellulären Seite beobachtet werden. Die getesteten *TgFNT*-Inhibitoren hatten im Hefesystem auf *TgFNT1* mit einem IC<sub>50</sub>-Wert im zweistelligen mikromolaren Bereich insgesamt eine schwächere Wirkung als auf *TgFNT2* und *TgFNT3* (Tab. 4.5). Die Inhibitoren binden schlechter an *TgFNT1*, da auch intrazellulär der Transportpfad schmaler zu sein scheint und die Inhibitoren dadurch ihre Bindestelle schlechter erreichen können. *TgFNT2* und *TgFNT3* sind hingegen besser durch die Hemmstoffe erreichbar, weil der Transportpfad weiter zu sein scheint. Dies zeigt, dass die auf der extrazellulären Seite gemachten Beobachtungen durch die chemischen Modifikationen auch für die intrazelluläre Seite gelten.

### 5.1.6 Entwicklung und Optimierung von *TgFNT*-Hemmstoffen

Die erfolgreiche Hemmung der drei Formiat-Nitrit-Transporter durch den *PfFNT*-Inhibitor MMV007839 und vier Analoga konnte im Rahmen dieser Arbeit im Hefesystem sowie an *T. gondii*-Tachyzoiten gezeigt werden. Die getesteten *TgFNT*-Inhibitoren erreichten im Hefesystem IC<sub>50</sub>-Werte im unteren mikromolaren bis oberen nanomolaren Bereich (Tab. 4.5). Der zuvor für *PfFNT* gezeigte Bindemodus an der intrazellulären Seite des Proteins konnte durch Erhöhung des IC<sub>50</sub>-Wertes von MMV007839 an den Glycin-zu-Serin-Mutanten bestätigt werden. Anhand der Ergebnisse sowie der Ergebnisse des phänotypischen Screenings lassen sich ähnliche Struktur-Wirkungs-Beziehungen des Inhibitors wie bei *PfFNT* ableiten. Die Fluoralkylkette ließ sich ohne erheblichen Wirkungsverlust zu einem gewissen Grad verkürzen oder verlängern. Auch die Methoxyruppe am Aromaten ließ sich durch größere Substituenten wie einem Benzyl (BH-388) ersetzen. Beim Ersetzen der

Methoxygruppe durch ein Chloratom kam es zur besseren Wirksamkeit. Interessanterweise war die Position des Chlor-Substituenten bei den *Tg*FNTs variabel (Abb. 5.8), wohingegen bei *Pf*FNT nur die Substitution in Position 7 zu einer Erhöhung der Wirkung führte. Ist das Chlor-Atom in Position 6 oder Position 8 verringerte sich die Affinität im Vergleich zu MMV007839 bei *Pf*FNT in den zweistelligen mikromolaren Bereich (Dissertation André Gollmack). Bei *Tg*FNT wirkten diese Verbindungen im phänotypischen Screening besser als MMV007839. Dies müsste durch Aufnahme eines  $IC_{50}$ -Wertes im direkten Transport-Assay bestätigt werden.



**Abb. 5.8** MMV007839-Analoga mit Chlor-Substituenten am Aromaten in verschiedenen Positionen (blauer Kreis).

An *T. gondii*-Tachyzoiten ergaben sich für die im Rahmen dieser Arbeit näher untersuchten Inhibitoren (Abb. 4.39, Abb. 4.40)  $IC_{50}$ -Werte im zweistelligen mikromolaren Bereich (Tab. 4.6). Ähnliche Werte wurden auch für die Hemmung von *Tg*FNT1 durch diese Verbindungen im Hefesystem erhalten. Dies lässt darauf schließen, dass *Tg*FNT1 das hauptsächliche Ziel der Substanzen im Parasiten ist und so eine größere Bedeutung im Stoffwechsel besitzt als die anderen beiden *Tg*FNTs. Allerdings lassen sich die generierten  $IC_{50}$ -Werte nicht ohne weiteres vergleichen, da die Substanzen erst einmal das Zytosol des Parasiten erreichen und dabei mehrere Membranen durch Diffusion oder aktiven Transport überwinden müssen, um ihre intrazelluläre Bindestelle zu erreichen. Dazu gehört auch die Membran der Wirtszelle. Die Verbindungen dürfen außerdem nicht durch Enzyme des Parasiten oder der Wirtszelle inaktiviert werden. Deshalb sind für die  $IC_{50}$ -Werte im Parasiten neben der Affinität zum Zielprotein weitere Faktoren verantwortlich. André Gollmack konnte an *Pf*FNT bereits zeigen, dass kleine strukturelle Unterschiede an den Verbindungen nur einen kleinen Effekt auf den  $IC_{50}$ -Wert im Hefesystem haben können, jedoch einen großen Effekt auf die Wirkung der Verbindungen auf die Parasiten.

Die *TgFNT*-Inhibitoren sind mit Wirkung im zweistelligen mikromolaren Bereich nicht als potente Inhibitoren gegen *T. gondii*-Parasiten anzusehen, dennoch zeigen die Ergebnisse die wichtige Bedeutung von Formiat-Nitrit-Transportern in den Parasiten durch die Hemmung des L-Laktat-Transportes. Die FNTs aus *Toxoplasma* sind demnach potentielle neue Wirkstoffziele, um neue Arzneistoffe gegen diesen Parasiten zu finden. Da allerdings Unterschiede in der Wirkung zwischen isoliertem Protein und Wirkung am Parasiten auftraten, ist es ebenso wichtig große Screenings an lebenden Parasiten durchzuführen, um neue Substanzen oder Grundstrukturen zu entdecken. Das Screening der *Pathogen Box*-Substanzen, die eine nachgewiesene Wirkung gegen *T. gondii*-Parasiten zeigen, ergab keine wirksamen, neuen Grundstrukturen gegen *TgFNTs* im Hefesystem. Die gezeigte Hemmung der Verbindungen A C03 und C G05 im phänotypischen Assay konnte durch direkte Hemmung des Proteins im Aufnahmeassay mit radioaktiv-markierten Substraten nicht bestätigt werden. Die beobachtete Hemmung ist wahrscheinlich auf unspezifische oder toxische Effekte zurückzuführen. In der Tat kam es mit der Substanz A C03 zu einer signifikanten Hemmung von Hefezellen, die kein FNT-Protein herstellten (Abb. 4.38). Obwohl noch drei weitere Substanzen eine mögliche Hemmwirkung aufwiesen, wurden diese im Rahmen dieser Arbeit nicht mittels direktem Transportassay untersucht. Durch ein Screening der Substanzen mit dieser Methode könnten die Ergebnisse des phänotypischen Assays bestätigt werden. Auch könnten die gesamten 400 Substanzen der *Pathogen Box* auf mögliche Wirkung gegen die *TgFNTs* gescreent werden, um neue Grundstrukturen zu erhalten.

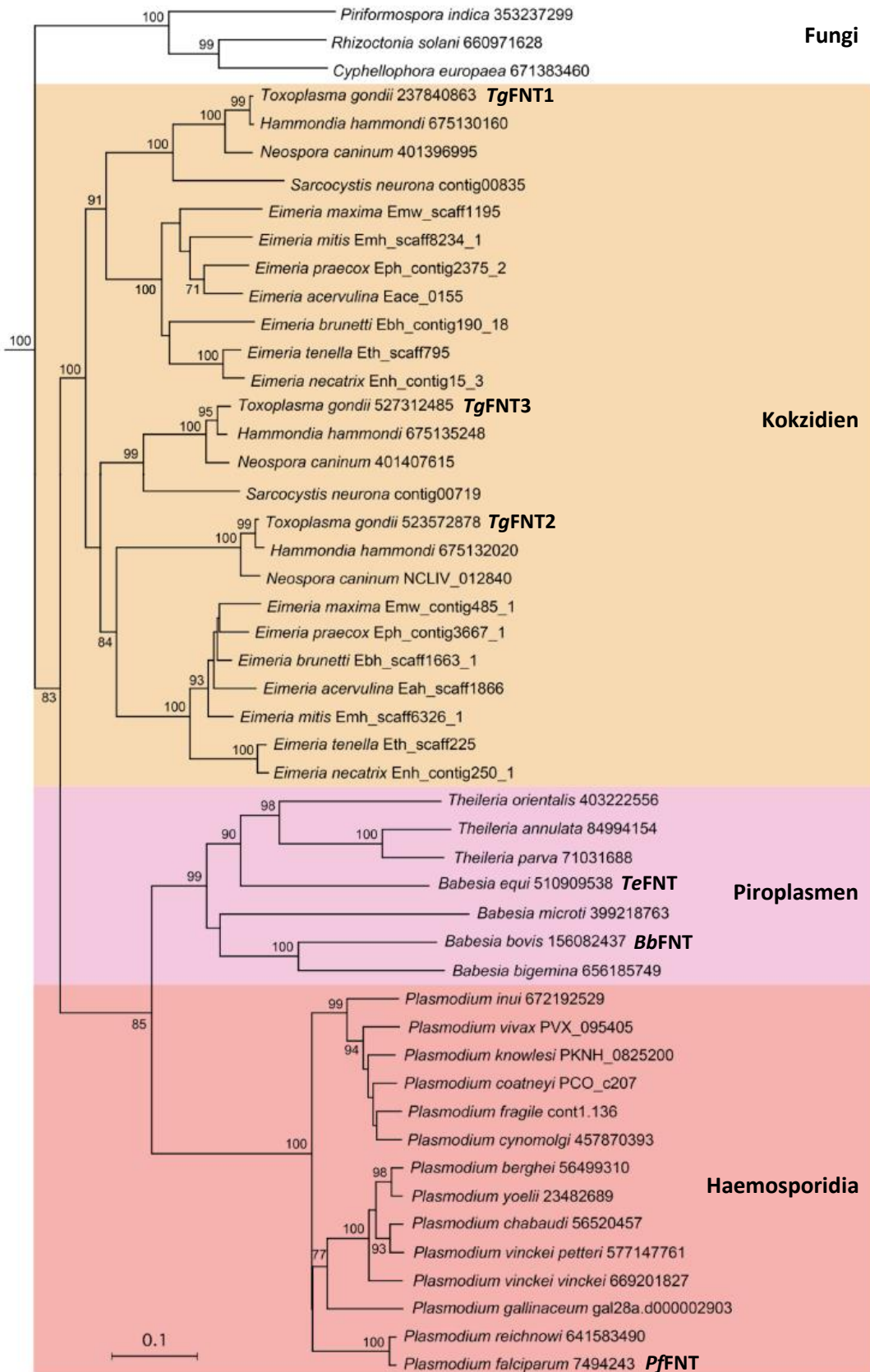
Die Frage, die sich auf der Suche nach neuen Wirkstoffen stellt ist, wie ein optimaler Wirkstoff gegen Parasiten aussehen würde. Ein großer Vorteil von Hemmstoffen gegen Membranproteine ist, dass sie peripher, also außerhalb des Parasiten wirken. Dies verringert die Möglichkeit einer Verstoffwechslung beziehungsweise einer Entgiftung der Verbindung durch den Parasiten auf dem Weg zu seinem Wirkstoffziel. Auch sind die Möglichkeiten einer sich bildenden Mutation hier geringer, da die Transportproteine nur begrenzt verändert werden können. Die physiologische Funktion muss immer noch gewährleistet sein. Im besten Fall ist der Hemmstoff spezifisch für den Parasiten, potent genug, um geringe Dosen verabreichen zu können, und schnell wirksam. Dies erhöht insgesamt die Wirksamkeit und verringert außerdem eventuelle Nebenwirkungen und macht die Verbindung zu einem

sicheren Arzneistoff für den Patienten. Membranproteine wie Kanäle und Transporter stellen demnach gute Wirkstoffziele dar und sollten bei der Suche nach neuen, potenten Wirkstoffen berücksichtigt werden (223). Gegen *T. gondii* sind bisher keine gegen Membranproteine wirksamen Verbindungen verfügbar (106). Als einziger experimenteller Hemmstoff für einen Membrantransporter ist die Verbindung C3361 zu nennen. Diese inhibiert den Glukose-Transporter TgGT1 mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 82 µM, zeigt jedoch keinen inhibitorischen Effekt auf *T. gondii*-Tachyzoiten. Die in dieser Arbeit beschriebenen TgFNT-Inhibitoren sind also die ersten Hemmstoffe mit Wirkung gegen ein peripheres Membranprotein aus *T. gondii*. Ein Nachteil der gefundenen Verbindungen ist allerdings, dass sie intrazellulär am Protein binden und so dem Stoffwechsel des Parasiten ausgeliefert sind. Es bedarf also weiterer Forschung um einen optimalen Wirkstoff gegen *T. gondii* zu finden.

### 5.1.7 Übertragung der Ergebnisse auf andere Vertreter der Familie Apicomplexa

Die funktionelle Charakterisierung von zwei weiteren Formiat-Nitrit-Transportern aus der Familie der Apicomplexa macht deutlich, dass sich die Ergebnisse auf weitere FNT-Orthologe dieser Familie pathogener Parasiten übertragen lassen. Die FNTs in diesen Eukaryoten scheinen sich evolutionär zur Leitfähigkeit von größeren Substraten wie Acetat und L-Laktat entwickelt zu haben. Dies geschah aufgrund des im Vergleich zu Prokaryoten veränderten Stoffwechsels. In Parasiten der Familie Apicomplexa ist im Rahmen der Glykolyse vor allem die Laktat-Dehydrogenase aktiv, die zur Bildung von L-Laktat führt. Dieses Stoffwechsel-Endprodukt wird dann über einen Formiat-Nitrit-Transporter ausgeschleust. Das Modell des Selektivitätsfilters der FNTs konnte so auch für die Piroplasmen *B. bovis* und *T. equi* bestätigt werden, die auch auf die Glykolyse im Energiestoffwechsel angewiesen sind. Zusammen mit den Ergebnissen dieser Arbeit sind nun aus allen drei Unterfamilien der Apicomplexa FNT-Orthologe charakterisiert worden (Abb. 5.9), die im Rahmen des physiologischen Kontexts auch als Acetat-Laktat-Transporter bezeichnet werden könnten. Interessant ist, dass der gefundene PffFNT-Inhibitor auch andere FNTs der Familie Apicomplexa hemmen kann. So konnte die intrazelluläre Bindung des FNT-Inhibitors MMV007839 in dieser Arbeit nicht nur für die FNTs aus *T. gondii* gezeigt werden. Auch für das FNT aus *Babesia bovis* konnte diese Bindung nach Mutation von Serin zu Glycin (Position 107 in PffFNT) nachgewiesen werden. Die Übertragung der Hemmung auf die weiteren noch nicht charakterisierten FNTs ist dem-

## Diskussion und Ausblick



**Abb. 5.9** Phylogenetischer Stammbaum der FNTs aus der Familie Apicomplexa unterteilt in Kokzidien, Piroplasma und Haemosporidia. *Babesia equi* entspricht *Theileria equi*. Zum Vergleich sind drei FNTs aus Pilzen (Fungi) mit aufgetragen. Entnommen aus (137).

nach sehr wahrscheinlich. Die Verbindung MMV007839 ist damit eine attraktive Grundstruktur zur Hemmung von FNTs aus pathogenen Parasiten der Familie Apicomplexa, um darauf aufbauend neue Wirkstoffe zu generieren. Für eine hohe Affinität muss die Struktur jedoch für jedes FNT einzeln optimiert werden. Zu beachten ist hierbei auch die natürliche Resistenz der FNTs aus *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* und *Babesia microti* gegen den gefundenen FNT-Inhibitor.

### 5.2 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine essentielle Bedeutung der Formiat-Nitrit-Transporter im Energiestoffwechsel von *T. gondii* hin. Dies legt den Grundstein für weitere Untersuchungen des Stoffwechsels und der Rolle unterschiedlicher Nährstoffe und Transporter, mit denen dieser weltweit erfolgreiche Parasit auf verschiedenste Stoffwechsel-Lagen reagieren kann. Um den Energiestoffwechsel weiter zu beleuchten, könnten Experimente mit radioaktiv-markierten Substraten wie  $^{14}\text{C}$ -Glukose oder  $^{14}\text{C}$ -Acetat an *T. gondii*-Parasiten sowie an *TgFNT-knockout*-Parasiten durchgeführt werden. Dies würde Einblicke in die entstehenden Stoffwechsel-Endprodukte geben, die durch Verstoffwechslung dann ebenfalls radioaktiv-markiert sind. Dadurch könnte der L-Laktat-Export sowie der Acetat-Stoffwechsel unter Einbeziehung der Bedeutung der FNTs evaluiert werden. Die Generierung der *knockout*-Parasiten könnte zum Beispiel traditionell über homologe Rekombination oder über eine CRISPR/Cas9-Methode durchgeführt werden. Ist dies nicht erfolgreich, könnte die essentielle Bedeutung der *TgFNTs* über das Einführen der MMV007839-resistenten Serin-zu-Glycin-Mutation in den Parasiten nachgewiesen werden. Das Wachstum der resistenten Parasiten sollte durch die Mutation bei Behandlung mit MMV007839 nicht gehemmt werden und würde *off-target*-Effekte der Verbindung ausschließen. Dadurch könnte auch die Bedeutung der einzelnen *TgFNTs* im Transport untersucht werden, sodass die Frage der Redundanz geklärt werden könnte.

Um den Transportmechanismus der *TgFNTs* näher zu beleuchten, könnte die Direktionalität der Transporter weiter evaluiert werden. Da im Rahmen dieser Arbeit nur die Import-Richtung untersucht wurde, wäre der Export für die verschiedenen Substrate interessant. Auch eine mögliche Regulation über die Termini könnte untersucht werden, wobei zunächst der Fokus auf der Quantifizierung der in der Membran eingebauten Transporter liegen sollte.

Um neue Arzneistoffe gegen die Toxoplasmose zu finden, kann die Verbindung MMV007839 weiter optimiert werden. Eine Möglichkeit wäre hier der Einfluss der Chlor-Substituenten weiter zu evaluieren, da diese sich im phänotypischen Screening erfolgreich gezeigt haben. Allerdings muss die Diskrepanz der Affinität der Wirkstoffe im Hefesystem und in Parasitenkultur beachtet werden, sodass die Entwicklung möglichst die an Parasiten generierten Daten mit einbezieht. So haben sich lipophile Reste wie ein Benzyl als vorteilhaft für das Passieren der Membranen gezeigt. Außerdem wäre eine Umgehung der Resistenz-Mutation ebenfalls interessant, falls diese auch in *T. gondii*-Parasiten auftritt. André Gollmack hat in seiner Dissertation hierfür einen *linker* vorgeschlagen, der das Pharmakophor vom aromatischen System trennt, um so die durch das Serin entstandene Kollision mit der Hydroxylgruppe zu umgehen. Da der Bindemodus bisher nur experimentell über die Mutationsstelle und ansonsten über Modelle ermittelt wurde, wäre eine Kristallstruktur der *TgFNTs* nützlich, um direkte Struktur-Wirkungs-Beziehungen aufstellen zu können. Insbesondere eine Co-Kristallisation von Protein und Inhibitor wäre hier sinnvoll, da anhand der gewonnenen Kristallstruktur-Daten auch die Bindung des Inhibitors am Protein nachgewiesen werden kann. In unserem Arbeitskreis wird aktuell versucht *PfFNT* zu kristallisieren, bisher aber ohne Erfolg (217). Zu beachten ist hierbei, dass die Kristallisation von Membranproteinen eine große Herausforderung darstellt, da die Löslichkeit über Detergenzien gewährleistet werden muss. Bisher sind nur fünf Kristallstrukturen von prokaryotischen FNTs vorhanden (142, 143, 153, 166, 167). Mit der Kristallisation von *PfFNT* würde man die Struktur des ersten eukaryotischen FNTs aufklären.

Eine weitere vielversprechende Möglichkeit zur Entdeckung neuer Wirkstoffe stellt das Screening von großen Substanzbibliotheken mittels phänotypischen Wachstumsassay dar. Als Beispiel wäre hier die *Pathogen Box* mit 400 Verbindungen zu nennen. In unserem Arbeitskreis ist seit kurzem allerdings auch die TCAMS (*Tres Cantos antimalarial compound set*)-Substanzbibliothek vorhanden, die 13.533 Verbindungen mit nachweislicher Wirkung gegen den Malaria-Erreger *P. falciparum* enthält (224). Die Verbindungen dieser großen Substanzbibliothek werden von Anna Meier aus unserem Arbeitskreis auf eine *PfFNT*-Hemmung getestet. Wird anhand dieses Screenings eine neue Leitstruktur gefunden, könnte diese auch auf die *TgFNTs* übertragen werden.



## 6 Zusammenfassung

*Toxoplasma gondii* ist ein weltweit vorkommender, pathogener Parasit der Familie Apicomplexa. Er gilt als erfolgreichster Parasit, infiziert nahezu alle Wirbeltiere und kann sich auf verschiedene Umwelteinflüsse und Zellkompartimente einstellen. Dies spiegelt sich auch im komplexen Stoffwechsel des Parasiten wider. Die sich schnell teilende tachyzoite Form des Parasiten generiert hauptsächlich Energie über die Glykolyse unter Produktion des Endproduktes L-Laktat. Wird dies nicht ausgeschleust, kommt es zur toxischen Akkumulation und zum Absterben des Parasiten. Alternativ zur Glukose kann der Parasit jedoch auch andere Kohlenstoffquellen wie Acetat verstoffwechseln, die über die Membran aufgenommen werden müssen. In dieser Arbeit konnten drei Formiat-Nitrit-Transporter aus *Toxoplasma gondii* als Monocarboxylat / Protonen-Symporter charakterisiert werden, die in der Plasmamembran von Tachyzoiten lokalisiert sind. Alle drei leiteten die Substrate Formiat, Acetat und L-Laktat. Der Transport war hierbei abhängig vom Protonengradienten und konnte über 2-Hydroxy-Chromanone im unteren mikromolaren Bereich gehemmt werden. Auch konnte die Wirkung dieser Verbindungen auf das Wachstum von *Toxoplasma gondii*-Tachyzoiten im gleichen Konzentrationsbereich gezeigt werden. Dies wies auf eine essentielle Bedeutung des L-Laktat-Transportes hin. Auch der Import des alternativen Nährstoffes Acetat konnte über die Formiat-Nitrit-Transporter realisiert werden. Weiterhin konnte durch chemische Modifikation an kritischen Aminosäuren, die für die Selektivität des Transportes entscheidend sind, der Selektivitätsfilter dieser Transporter identifiziert werden. Dieser bestimmte die Sensitivität der Proteine hinsichtlich der Substrat-Leitfähigkeit und Inhibitor-Affinität.

Durch Charakterisierung zweier weiterer Formiat-Nitrit-Transporter aus den Piroplasmen *Babesia bovis* und *Theileria equi* konnten die Ergebnisse auf die Familie der Apicomplexa übertragen werden. Auch diese leiteten die Substrate Formiat, Acetat und L-Laktat.

Dies zeigte eine evolutionäre Entwicklung der wohl ursprünglich prokaryotischen FNTs hinsichtlich ihrer Substrat-Selektivität, um eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel klinisch relevanter eukaryotischer Parasiten zu erfüllen.

## 7 Summary

*Toxoplasma gondii* is a globally prevalent apicomplexan parasite. The most successful pathogenic parasite has the ability to infect virtually all nucleated vertebrate cells and can adapt to many different environmental influences. This is reflected by the unique and complex metabolic architecture of the parasite. The fast-growing tachyzoite stage catabolizes glucose via glycolysis to yield L-lactate as a major endproduct. If L-lactate is not exported it results in toxic accumulation and death of the parasite. Additionally, the parasite is able to utilize acetate as a carbon source if glucose is not available. This nutrient has to be transported across the plasma membrane into the parasite. In this work, three *Toxoplasma gondii* formate-nitrite transporters were reported to be monocarboxylate / proton-symporters, which are located at the plasma membrane of the tachyzoite stage. All three transported formate, acetate and L-lactate. The transport was dependent on the proton motive force and could be selectively blocked in a micromolar range using 2-hydroxy-chromanones. Likewise it could be shown that these compounds inhibit the growth of *Toxoplasma gondii*-tachyzoites in a similar concentration range. This indicated a critical role of L-lactate export. It was also shown, that the import of the alternative nutrient acetate could be carried out by these formate-nitrite-transporters. Further, by chemically modification of critical amino acid residues which determine the selectivity of substrate transport a selectivity filter in these transporters could be identified. This filter discriminates the sensitivity towards substrate transport and inhibitor affinity.

Additionally, by characterization of two piroplasm formate-nitrite-transporters from *Babesia bovis* and *Theileria equi* the generated results could be transferred to the Apicomplexa family of pathogenic parasites. These proteins also transported formate, acetate and L-lactate.

This showed the evolution of initially prokaryotic transporters with respect to substrate selectivity to fulfill a critical role in the energy metabolism of clinically important eukaryotic parasites.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Flegr, J., Prandota, J., Sovičková, M., and Israili, Z. H. (2014) Toxoplasmosis--a global threat. Correlation of latent toxoplasmosis with specific disease burden in a set of 88 countries. *PLoS ONE* **9**, e90203
2. Petersen, E., and Schmidt, D. R. (2003) Sulfadiazine and pyrimethamine in the postnatal treatment of congenital toxoplasmosis: What are the options? *Expert Rev Anti Infect Ther* **1**, 175-182
3. Nicolle, C., and Manceaux, L. (1908) Sur une infection à corps de Leishman (ou organismes voisins) du gondi. *C R Hebd Seances Acad Sci* **147**, 763-766
4. Splendore, A. (1908) Un nuovo protozoa parassita de' conigli. incontrato nelle lesioni anatomiche d'une malattia che ricorda in molti punti il Kala-azar dell' uomo. *Nota preliminaire pel Rev Soc Sci Sao Paulo* **3**, 109-112
5. Nicolle, C., and Manceaux, L. (1909) Sur un protozoaire nouveau du gondi. *C. R. Hebd Seances Acad Sci* **148**, 369-372
6. Splendore, A. (1910) Nota sopra il Kalaazar, ibidem, idem, seduta del 7 settembre. Sopra un nuovo protozoo parassita de' conigli, *Toxoplasma cuniculi*. *III nota preliminare Rev Soc Sci Sao Paulo* **5**, 167
7. Sabin, A. B., and Olitsky, P. K. (1937) *Toxoplasma* and obligate intracellular parasitism. *Science* **85**, 336-338
8. Sabin, A. B., and Ruchman I. (1942) Characteristics of the *Toxoplasma* neutralizing antibody. *Proc Soc Exp Biol Med* **51**, 1-6
9. Castellani, A. (1914) Note on certain Protozoa-like bodies in a case of protracted fever and splenomegaly. *J Trop Med* **17**, 113-114
10. Fedorovitch, A. I. (1916) Hémoparasites trouvés dans un cas de fièvre chronique. *Ann Inst Pasteur* **30**, 249-250
11. Chalmers, A. J., and Kamar, A. (1920) *Toxoplasma pyrogenes castellani*. *J Trop Med* **23**, 45
12. Janků, J. (1923) Pathogenesa a pathologická anatomie tak nazvaného vrozeního kolombu žluté skvrany voku normálné velikem a microphthalmickém s nalezem

## Literaturverzeichnis

- parasitu v sítnici.: [Pathogenesis and pathologic anatomy of the “congenital coloboma” of the macula lutea in an eye of normal size, with microscopic detection of parasites in the retina]. *Čas Lék Česk* **62**, 1021-1138
13. Torres, C. M. (1927) Morphologie d'un nouveau parasite de l'homme, *Encephalitozoon chagasi*, n. sp., observé dans un cas de méningo-encéphalomyélite congénitale avec myosite et myocardite. *C R Soc Biol* **97**, 1787-1790
  14. Levaditi C., Schoen R., and Sanchis Bayarri V. (1928) L'encéphalo-myélite toxoplasmique chronique du lapin et de la souris. *C R Soc Biol* **99**, 37-40
  15. Lange, C. de (1929) Klinische und pathologisch-anatomische Mitteilungen über Hydrocephalus chronicus congenitus und acquisitus. *Ztschr f d ges Neurol u Psychiat* **120**, 433-500
  16. Wolf, A., and Cowen, D. (1937) Granulomatous encephalomyelitis due to an Encephalitozoon (encephalitozoic encephalomyelitis): a new protozoan disease of man. *Bull Neurol Inst N Y* **6**, 306-371
  17. Wolf, A., and Cowen, D. (1938) Granulomatous encephalomyelitis due to a protozoan (Toxoplasma or Encephalitozoon): II identification of a case from the literature. *Bull Neurol Inst N Y* **7**, 266-290
  18. Wolf, A., Cowen, D., and Paige, B. H. (1939) Human toxoplasmosis: Occurrence in infants as an encephalomyelitis certification by transmission to animals. *Science* **89**, 226-227
  19. Wolf, A., Cowen, D., and Paige, B. H. (1939) Toxoplasmic encephalomyelitis III. A new case of granulomatous encephalitis due to protozoan. *Am J Pathol* **15**, 657-694
  20. Pinkerton H., and Weinman D. (1940) *Toxoplasma* infection in man. *Arch Pathol* **30**, 374-392
  21. Wolf, A., Cowen, D., and Paige, B. H. (1940) Toxoplasmic encephalomyelitis. IV Experimental transmission of the infection to animals from a human infant. *J Exp Med* **71**, 187-214
  22. Pinkerton, H., and Henderson, R. G. (1941) Adult toxoplasmosis: a previously unrecognized disease entity simulating the typhus-spotted fever group. *J Am Med Assoc* **116**, 807-814

## Literaturverzeichnis

23. Sabin, A. B. (1941) Toxoplasmic encephalitis in children. *J Am Med Assoc* **116**, 801-807
24. Sabin, A. B. (1942) Toxoplasmosis. A recently recognized disease of human beings. *Adv Pediatr* **1**, 1-53
25. Cowen, D., Wolf, A., and Paige, B. H. (1942) Toxoplasmic encephalomyelitis. VI Clinical diagnosis of infantile or congenital toxoplasmosis; survival beyond infancy. *Arch Neurol Psychiat* **48**, 689-739
26. Paige, B. H., Cowen, D., and Wolf, A. (1942) Toxoplasmic encephalomyelitis. V Further observations of infantile toxoplasmosis; intrauterine inception of the disease; visceral manifestations. *Am J Dis Child* **63**, 474
27. Sabin, A. B. (1939) Biological and immunological identity of *Toxoplasma* of animal and human origin. *Proc Soc Exp Biol* **41**, 75-80
28. Sabin, A. B., and Feldman, H. A. (1948) Dyes as microchemical indicators of a new immunity phenomenon affecting a protozoan parasite (*Toxoplasma*). *Science* **108**, 660-663
29. Beverley, J. K. A. (1959) Congenital transmission of toxoplasmosis through successive generations of mice. *Nature* **183**, 1348-1349
30. Weinman, D., and Chandler, A. H. (1954) Toxoplasmosis in swine and rodents. Reciprocal oral infection and potential human hazard. *Proc Soc Exp Biol Med* **87**, 211-216
31. Gustafson, P. V., Agar, H. D., and Cramer, D. I. (1954) An electron microscope study of *Toxoplasma*. *Am J Trop Med Hyg* **3**, 1008-1021
32. Goldman, M., Carver, R. K., and Sulzer A. J. (1958) Reproduction of *Toxoplasma gondii* by internal budding. *J Parasitol* **44**, 161-171
33. Sheffield, H. G., and Melton, M. L. (1968) The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* **54**, 209-226
34. Frenkel, J. K., and Friedlander, S. (1951) Toxoplasmosis. Pathology of neonatal disease, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Public Health Service Publication U S Govt Printing Office, Washington D C* **140**, 1-150
35. Frenkel, J. K. (1956) Pathogenesis of toxoplasmosis and of infections with organisms resembling *Toxoplasma*. *Ann N Y Acad Sci* **64**, 215-251

## Literaturverzeichnis

36. Wanko, T., Jakobs, L., and Gavin, M. A. (1962) Electron microscope study of *Toxoplasma* cysts in mouse brain. *J Protozool* **9**, 235-242
37. Jacobs, L., Remington, J. S., and Melton, M. L. (1960) A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J Parasitol* **46**, 23-28
38. Jacobs, L., Remington, J. S., and Melton, M. L. (1960) The resistance of the encysted form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* **46**, 11-21
39. Desmots, G., Couvreur, J., Alison, F., Baudelot, J., Gerbeaux, J., and Lelong, M. (1965) Etude épidémiologique sur la toxoplasmose: De l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la fréquence de l'infection humaine. *Rev Fr Etud Clin Biol* **10**, 952-958
40. Hutchison, W. M. (1965) Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature* **206**, 961-962
41. Frenkel, J. K., Dubey, J. P., and Miller, N. L. (1969) *Toxoplasma gondii*: Fecal forms separated from eggs of the nematode *Toxocara cati*. *Science* **164**, 432-433
42. Sheffield, H. G., and Melton, M. L. (1969) *Toxoplasma gondii*: Transmission through feces in absence of *Toxocara cati* eggs. *Science* **164**, 431-432
43. Dubey, J. P., Miller, N. L., and Frenkel, J. K. (1970) Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* **56**, 447-456
44. Dubey, J. P., Miller, N. L., and Frenkel, J. K. (1970) The *Toxoplasma gondii* oocyst from cat feces. *J Exp Med* **132**, 636-662
45. Dubey, J. P., Miller, N. L., and Frenkel, J. K. (1970) *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. *J Am Vet Med Assoc* **157**, 1767-1770
46. Hutchison, W. M., Dunachie, J. F., Siim, J. C., and Work, K. (1970) Coccidian-like nature of *Toxoplasma gondii*. *Br Med J* **1**, 142-144
47. Sheffield, H. G., and Melton, M. L. (1970) *Toxoplasma gondii*: The oocyst, sporozoite, and infection of cultured cells. *Science* **167**, 892-893
48. Hutchison, W. M., Dunachie, J. F., Work, K., and Siim, J. C. (1971) The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii*, in the domestic cat. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **65**, 380-399
49. Ferguson, D. J., Hutchison, W. M., Dunachie, J. F., and Siim, J. C. (1974) Ultrastructural study of early stages of asexual multiplication and

## Literaturverzeichnis

- microgametogony of *Toxoplasma gondii* in the small intestine of the cat. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol* **82**, 167-181
50. Dubey, J. P., and Beattie, C. P. (1988) *Toxoplasmosis of animals and man*, CRC Press, Boca Raton, Fla.
51. Dubey, J. P. (2006) Comparative infectivity of oocysts and bradyzoites of *Toxoplasma gondii* for intermediate (mice) and definitive (cats) hosts. *Vet Parasitol* **140**, 69-75
52. Frenkel, J. K., Ruiz, A., and Chinchilla, M. (1975) Soil survival of toxoplasma oocysts in Kansas and Costa Rica. *Am J Trop Med Hyg* **24**, 439-443
53. Hunter, C. A., and Sibley, L. D. (2012) Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. *Nat Rev Microbiol* **10**, 766-778
54. Prestrud, K. W., Åsbakk, K., Oksanen, A., Näreaho, A., and Jokelainen, P. (2010) *Toxoplasma gondii* in the Subarctic and Arctic. *Acta Vet Scand* **52**, S7
55. Miller, M. A., Grigg, M. E., Kreuder, C., James, E. R., Melli, A. C., Crosbie, P. R., Jessup, D. A., Boothroyd, J. C., Brownstein, D., and Conrad, P. A. (2004) An unusual genotype of *Toxoplasma gondii* is common in California sea otters (*Enhydra lutris nereis*) and is a cause of mortality. *Int J Parasitol* **34**, 275-284
56. McCabe, R. E., Brooks, R. G., Dorfman, R. F., and Remington, J. S. (1987) Clinical spectrum in 107 cases of toxoplasmic lymphadenopathy. *Rev Infect Dis* **9**, 754-774
57. WHO (2017) *Global tuberculosis report 2017*, World Health Organization, Geneva, Switzerland
58. Remington, J. S. (1974) Toxoplasmosis in the adult. *Bull N Y Acad Med* **50**, 211-227
59. Greenlee, J. E., Johnson, W. D., Campa, J. F., Adelman, L. S., and Sande, M. A. (1975) Adult toxoplasmosis presenting as polymyositis and cerebellar ataxia. *Ann Intern Med* **82**, 367-371
60. Cunningham, T. (1982) Pancarditis in acute toxoplasmosis. *Am J Clin Pathol* **78**, 403-405
61. Montoya, J. G., Jordan, R., Lingamneni, S., Berry, G. J., and Remington, J. S. (1997) Toxoplasmic myocarditis and polymyositis in patients with acute acquired toxoplasmosis diagnosed during life. *Clin Infect Dis* **24**, 676-683

## Literaturverzeichnis

62. McCannel, C. A., Holland, G. N., Helm, C. J., Cornell, P. J., Winston, J. V., and Rimmer, T. G. (1996) Causes of uveitis in the general practice of ophthalmology. UCLA Community-Based Uveitis Study Group. *Am J Ophthalmol* **121**, 35-46
63. Kijlstra, A., and Petersen, E. (2014) Epidemiology, pathophysiology, and the future of ocular toxoplasmosis. *Ocul Immunol Inflamm* **22**, 138-147
64. Burnett, A. (1998) Multiple cases of acquired toxoplasmosis retinitis presenting in an outbreak. *Ophthalmology* **105**, 1032-1037
65. Holland, G. N. (1999) Reconsidering the pathogenesis of ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol* **128**, 502-505
66. McConkey, G. A., Martin, H. L., Bristow, G. C., and Webster, J. P. (2013) Toxoplasma gondii infection and behaviour - location, location, location? *J Exp Biol* **216**, 113-119
67. Markovitz, A. A., Simanek, A. M., Yolken, R. H., Galea, S., Koenen, K. C., Chen, S., and Aiello, A. E. (2015) Toxoplasma gondii and anxiety disorders in a community-based sample. *Brain Behav Immun* **43**, 192-197
68. Fond, G., Boyer, L., Schürhoff, F., Berna, F., Godin, O., Bulzacka, E., Andrianarisoa, M., Brunel, L., Aouizerate, B., Capdevielle, D., Chereau, I., Coulon, N., D'Amato, T., Dubertret, C., Dubreucq, J., Faget, C., Lançon, C., Leignier, S., Mallet, J., Misdrahi, D., Passerieux, C., Rey, R., Schandrin, A., Urbach, M., Vidailhet, P., Llorca, P. M., Leboyer, M., Bazin, N., Blanc, O., Chereau-Boudet, I., Chesnoy-Servanin, G., Danion, J. M., Deloge, A., Denizot, H., Dorey, J. M., Fluttaz, C., Fonteneau, S., Gabayet, F., Giraud-Baro, E., Jarroir, M., Lacelle, D., Laouamri, H., Le Gloahec, T., Le Strat, Y., Metairie, E., Offerlin-Meyer, I., Peri, P., Pires, S., Portalier, C., Ramet, L., Roman, C., Tessier, A., Tronche, A. M., Vaillant, F., Vehier, A., Vilà, E., Yazbek, H., and Zinetti-Bertschy, A. (2018) Latent toxoplasma infection in real-world schizophrenia: Results from the national FACE-SZ cohort. *Schizophr Res*
69. Weiss, L. M., and Dubey, J. P. (2009) Toxoplasmosis: A history of clinical observations. *Int J Parasitol* **39**, 895-901
70. Luft, B. J., and Remington, J. S. (1992) Toxoplasmic encephalitis in AIDS. *Clin Infect Dis* **15**, 211-222



## Literaturverzeichnis

71. Derouin, F., Sarfati, C., Beauvais, B., Garin, Y. J., and Larivière, M. (1990) Prevalence of pulmonary toxoplasmosis in HIV-infected patients. *AIDS* **4**, 1036
72. Oksenhendler, E., Cadranel, J., Sarfati, C., Katlama, C., Datry, A., Marche, C., Wolf, M., Roux, P., Derouin, F., and Clauvel, J. P. (1990) Toxoplasma gondii pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Med* **88**, 18N-21N
73. Herskovitz, S., Siegel, S. E., Schneider, A. T., Nelson, S. J., Goodrich, J. T., and Lantos, G. (1989) Spinal cord toxoplasmosis in AIDS. *Neurology* **39**, 1552-1553
74. Renoult, E., Georges, E., Biava, M. F., Hulin, C., Frimat, L., Hestin, D., and Kessler, M. (1997) Toxoplasmosis in kidney transplant recipients: Report of six cases and review. *Clin Infect Dis* **24**, 625-634
75. Desmonts, G., and Couvreur, J. (1974) Toxoplasmosis in pregnancy and its transmission to the fetus. *Bull N Y Acad Med* **50**, 146-159
76. Thalhammer, O. (1973) Prevention of congenital toxoplasmosis. *Neuropadiatrie* **4**, 233-237
77. Mitchell, C. D., Erlich, S. S., Mastrucci, M. T., Hutto, S. C., Parks, W. P., and Scott, G. B. (1990) Congenital toxoplasmosis occurring in infants perinatally infected with human immunodeficiency virus 1. *Pediatr Infect Dis J* **9**, 512-518
78. Minkoff, H., Remington, J. S., Holman, S., Ramirez, R., Goodwin, S., and Landesman, S. (1997) Vertical transmission of toxoplasma by human immunodeficiency virus-infected women. *Am J Obstet Gynecol* **176**, 555-559
79. Vogel, N., Kirisits, M., Michael, E., Bach, H., Hostetter, M., Boyer, K., Simpson, R., Holfels, E., Hopkins, J., Mack, D., Mets, M. B., Swisher, C. N., Patel, D., Roizen, N., Stein, L., Stein, M., Withers, S., Mui, E., Egwuagu, C., Remington, J., Dorfman, R., and McLeod, R. (1996) Congenital toxoplasmosis transmitted from an immunologically competent mother infected before conception. *Clin Infect Dis* **23**, 1055-1060
80. Desmonts, G., and Couvreur, J. (1974) Congenital toxoplasmosis. A prospective study of 378 pregnancies. *N Engl J Med* **290**, 1110-1116
81. Koppe, J. G., Loewer-Sieger, D. H., and Roeber-Bonnet, H. de (1986) Results of 20-year follow-up of congenital toxoplasmosis. *Lancet* **327**, 254-256

## Literaturverzeichnis

82. Wilson, C. B., Remington, J. S., Stagno, S., and Reynolds, D. W. (1980) Development of adverse sequelae in children born with subclinical congenital Toxoplasma infection. *Pediatrics* **66**, 767-774
83. Harker, K. S., Ueno, N., and Lodoen, M. B. (2015) Toxoplasma gondii dissemination: A parasite's journey through the infected host. *Parasite Immunol* **37**, 141-149
84. Zhang, K., Lin, G., Han, Y., and Li, J. (2016) Serological diagnosis of toxoplasmosis and standardization. *Clin Chim Acta* **461**, 83-89
85. Remington, J. S., Miller, M. J., and Brownlee, I. (1968) IgM antibodies in acute toxoplasmosis. I. Diagnostic significance in congenital cases and a method for their rapid demonstration. *Pediatrics* **41**, 1082-1091
86. Desmonts, G., Naot, Y., and Remington, J. S. (1981) Immunoglobulin M-immunosorbent agglutination assay for diagnosis of infectious diseases: Diagnosis of acute congenital and acquired Toxoplasma infections. *J Clin Microbiol* **14**, 486-491
87. Burg, J. L., Grover, C. M., Pouletty, P., and Boothroyd, J. C. (1989) Direct and sensitive detection of a pathogenic protozoan, Toxoplasma gondii, by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **27**, 1787-1792
88. Sabin, A. B., and Warren, J. (1942) Therapeutic Effectiveness of Certain Sulfonamides on Infection by an Intracellular Protozoon (Toxoplasma). *Exp Biol Med (Maywood)* **51**, 19-23
89. Eyles, D. E., and Coleman, N. (1953) Synergistic effect of sulfadiazine and daraprim against experimental toxoplasmosis in the mouse. *Antibiot Chemother (Northfield)* **3**, 483-490
90. GARIN, J. P., and Eyles, D. E. (1958) Le traitement de la toxoplasmose expérimentale de la souris par la spiramycine. *Presse Med* **66**, 957-958
91. Chang, H. R., Rudareanu, F. C., and Pechère, J. C. (1988) Activity of A-56268 (TE-031), a new macrolide, against Toxoplasma gondii in mice. *J Antimicrob Chemother* **22**, 359-361
92. Fernandez-Martin, J., Leport, C., Morlat, P., Meyohas, M. C., Chauvin, J. P., and Vilde, J. L. (1991) Pyrimethamine-clarithromycin combination for therapy of

## Literaturverzeichnis

- acute Toxoplasma encephalitis in patients with AIDS. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 2049-2052
93. McMaster, P. R., Powers, K. G., Finerty, J. F., and Lunde, M. N. (1973) The effect of two chlorinated lincomycin analogues against acute toxoplasmosis in mice. *Am J Trop Med Hyg* **22**, 14-17
94. Araujo, F. G., and Remington, J. S. (1974) Effect of clindamycin on acute and chronic toxoplasmosis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* **5**, 647-651
95. Chang, H. R., Comte, R., and Pechère, J. C. (1990) In vitro and in vivo effects of doxycycline on Toxoplasma gondii. *Antimicrob Agents Chemother* **34**, 775-780
96. Dahl, E. L., Shock, J. L., Shenai, B. R., Gut, J., DeRisi, J. L., and Rosenthal, P. J. (2006) Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 3124-3131
97. Perea, E. J., and Daza, R. M. (1976) The effect of minocycline, doxycycline and oxytetracycline on experimental mouse toxoplasmosis. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* **69**, 367-372
98. Gutteridge, W. E. (1989) Antimalarial drugs currently in development. *J R Soc Med* **82 Suppl 17**, 63-6; discussion 66-8
99. Araujo, F. G., Huskinson, J., and Remington, J. S. (1991) Remarkable in vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone 566C80 against tachyzoites and tissue cysts of Toxoplasma gondii. *Antimicrob Agents Chemother* **35**, 293-299
100. Romand, S., Pudney, M., and Derouin, F. (1993) In vitro and in vivo activities of the hydroxynaphthoquinone atovaquone alone or combined with pyrimethamine, sulfadiazine, clarithromycin, or minocycline against Toxoplasma gondii. *Antimicrob Agents Chemother* **37**, 2371-2378
101. Torres, R. A., Weinberg, W., Stansell, J., Leoung, G., Kovacs, J., Rogers, M., and Scott, J. (1997) Atovaquone for salvage treatment and suppression of toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. Atovaquone/Toxoplasmic Encephalitis Study Group. *Clin Infect Dis* **24**, 422-429
102. Koo, L., and Young, L. H. (2006) Management of ocular toxoplasmosis. *Int Ophthalmol Clin* **46**, 183-193
103. Lopez, J. S., Smet, M. D. de, Masur, H., Mueller, B. U., Pizzo, P. A., and Nussenblatt, R. B. (1992) Orally administered 566C80 for treatment of ocular

## Literaturverzeichnis

- toxoplasmosis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Ophthalmol* **113**, 331-333
104. Fung, H. B., and Kirschenbaum, H. L. (1996) Treatment regimens for patients with toxoplasmic encephalitis. *Clin Ther* **18**, 1037-56; discussion 1036
105. Neville, A. J., Zach, S. J., Wang, X., Larson, J. J., Judge, A. K., Davis, L. A., Vennerstrom, J. L., and Davis, P. H. (2015) Clinically Available Medicines Demonstrating Anti-Toxoplasma Activity. *Antimicrob Agents Chemother* **59**, 7161-7169
106. Duffy, S., Sykes, M. L., Jones, A. J., Shelper, T. B., Simpson, M., Lang, R., Poulsen, S.-A., Sleebs, B. E., and Avery, V. M. (2017) Screening the Medicines for Malaria Venture Pathogen Box across Multiple Pathogens Reclassifies Starting Points for Open-Source Drug Discovery. *Antimicrob Agents Chemother* **61**
107. Montazeri, M., Sharif, M., Sarvi, S., Mehrzadi, S., Ahmadpour, E., and Daryani, A. (2017) A Systematic Review of In vitro and In vivo Activities of Anti-Toxoplasma Drugs and Compounds (2006-2016). *Front Microbiol* **8**, 25
108. Spangenberg, T., Burrows, J. N., Kowalczyk, P., McDonald, S., Wells, T. N. C., and Willis, P. (2013) The open access malaria box: A drug discovery catalyst for neglected diseases. *PLoS ONE* **8**, e62906
109. Spalenka, J., Escotte-Binet, S., Bakiri, A., Hubert, J., Renault, J.-H., Velard, F., Duchateau, S., Aubert, D., Huguenin, A., and Villena, I. (2018) Discovery of New Inhibitors of *Toxoplasma gondii* via the Pathogen Box. *Antimicrob Agents Chemother* **62**
110. Soldati, D., and Boothroyd, J. C. (1993) Transient transfection and expression in the obligate intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. *Science* **260**, 349-352
111. Kim, K., Soldati, D., and Boothroyd, J. C. (1993) Gene replacement in *Toxoplasma gondii* with chloramphenicol acetyltransferase as selectable marker. *Science* **262**, 911-914
112. Soldati, D., and Boothroyd, J. C. (1995) A selector of transcription initiation in the protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. *Mol Cell Biol* **15**, 87-93
113. Donald, R. G., Carter, D., Ullman, B., and Roos, D. S. (1996) Insertional tagging, cloning, and expression of the *Toxoplasma gondii* hypoxanthine-xanthine-

## Literaturverzeichnis

- guanine phosphoribosyltransferase gene. Use as a selectable marker for stable transformation. *J Biol Chem* **271**, 14010-14019
114. Gubbels, M.-J., Li, C., and Striepen, B. (2003) High-throughput growth assay for *Toxoplasma gondii* using yellow fluorescent protein. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 309-316
115. Kim, K., and Weiss, L. M. (2004) *Toxoplasma gondii*: The model apicomplexan. *Int J Parasitol* **34**, 423-432
116. Wu, Y., Sifri, C. D., Lei, H. H., Su, X. Z., and Wellems, T. E. (1995) Transfection of *Plasmodium falciparum* within human red blood cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 973-977
117. Wu, Y., Kirkman, L. A., and Wellems, T. E. (1996) Transformation of *Plasmodium falciparum* malaria parasites by homologous integration of plasmids that confer resistance to pyrimethamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1130-1134
118. Crabb B.S., and Cowman A.F. (1996) Characterization of promoters and stable transfection by homologous and nonhomologous recombination in *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7289-7294
119. Shen, B., Brown, K. M., Lee, T. D., and Sibley, L. D. (2014) Efficient gene disruption in diverse strains of *Toxoplasma gondii* using CRISPR/CAS9. *mBio* **5**, e01114-14
120. Sullivan, W. J., Chiang, C. W., Wilson, C. M., Naguib, F. N., el Kouni, M. H., Donald, R. G., and Roos, D. S. (1999) Insertional tagging of at least two loci associated with resistance to adenine arabinoside in *Toxoplasma gondii*, and cloning of the adenosine kinase locus. *Mol Biochem Parasitol* **103**, 1-14
121. Kicska, G. A., Tyler, P. C., Evans, G. B., Furneaux, R. H., Kim, K., and Schramm, V. L. (2002) Transition state analogue inhibitors of purine nucleoside phosphorylase from *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **277**, 3219-3225
122. Kicska, G. A., Tyler, P. C., Evans, G. B., Furneaux, R. H., Schramm, V. L., and Kim, K. (2002) Purine-less death in *Plasmodium falciparum* induced by immucillin-H, a transition state analogue of purine nucleoside phosphorylase. *J Biol Chem* **277**, 3226-3231

## Literaturverzeichnis

123. McKee, R. W., Ormsbee, R. A., Anfinsen, C. B., Geiman, Q. M., and Ball, E. G. (1946) Studies on malarial parasites: VI. The chemistry and metabolism of normal and parasitized (*P. knowlesi*) monkey blood. *J Exp Med* **84**, 569-582
124. Ohsaka, A., Yoshikawa, K., and Hagiwara, T. (1982) <sup>1</sup>H-NMR spectroscopic study of aerobic glucose metabolism in *Toxoplasma gondii* harvested from the peritoneal exudate of experimentally infected mice. *Physiol Chem Phys* **14**, 381-384
125. Yang, S., and Parmley, S. F. (1997) *Toxoplasma gondii* expresses two distinct lactate dehydrogenase homologous genes during its life cycle in intermediate hosts. *Gene* **184**, 1-12
126. MacRae, J. I., Sheiner, L., Nahid, A., Tonkin, C., Striepen, B., and McConville, M. J. (2012) Mitochondrial metabolism of glucose and glutamine is required for intracellular growth of *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe* **12**, 682-692
127. Oppenheim, R. D., Creek, D. J., MacRae, J. I., Modrzynska, K. K., Pino, P., Limenitakis, J., Polonais, V., Seeber, F., Barrett, M. P., Billker, O., McConville, M. J., and Soldati-Favre, D. (2014) BCKDH: The missing link in apicomplexan mitochondrial metabolism is required for full virulence of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium berghei*. *PLoS Pathog* **10**, e1004263
128. Woodrow, C. J., Penny, J. I., and Krishna, S. (1999) Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* expresses a high affinity facilitative hexose transporter. *J Biol Chem* **274**, 7272-7277
129. Joet, T., Eckstein-Ludwig, U., Morin, C., and Krishna, S. (2003) Validation of the hexose transporter of *Plasmodium falciparum* as a novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 7476-7479
130. Verlinde, C. L., Hannaert, V., Blonski, C., Willson, M., Périé, J. J., Fothergill-Gilmore, L. A., Opperdoes, F. R., Gelb, M. H., Hol, W. G., and Michels, P. A. (2001) Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs. *Drug Resist Updat* **4**, 50-65
131. Ganapathy-Kanniappan, S., and Geschwind, J.-F. H. (2013) Tumor glycolysis as a target for cancer therapy: Progress and prospects. *Mol Cancer* **12**, 152
132. Blume, M., Hliscs, M., Rodriguez-Contreras, D., Sanchez, M., Landfear, S., Lucius, R., Matuschewski, K., and Gupta, N. (2011) A constitutive pan-hexose permease

- for the Plasmodium life cycle and transgenic models for screening of antimalarial sugar analogs. *FASEB J* **25**, 1218-1229
133. Blume, M., Rodriguez-Contreras, D., Landfear, S., Fleige, T., Soldati-Favre, D., Lucius, R., and Gupta, N. (2009) Host-derived glucose and its transporter in the obligate intracellular pathogen *Toxoplasma gondii* are dispensable by glutaminolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12998-13003
134. Nitzsche, R., Zagoriy, V., Lucius, R., and Gupta, N. (2016) Metabolic Cooperation of Glucose and Glutamine Is Essential for the Lytic Cycle of Obligate Intracellular Parasite *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **291**, 126-141
135. Jacot, D., Waller, R. F., Soldati-Favre, D., MacPherson, D. A., and MacRae, J. I. (2016) Apicomplexan Energy Metabolism: Carbon Source Promiscuity and the Quiescence Hyperbole. *Trends Parasitol* **32**, 56-70
136. Ramakrishnan, S., Docampo, M. D., MacRae, J. I., Ralton, J. E., Rupasinghe, T., McConville, M. J., and Striepen, B. (2015) The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* depends on the synthesis of long-chain and very long-chain unsaturated fatty acids not supplied by the host cell. *Mol Microbiol* **97**, 64-76
137. Marchetti, R. V., Lehane, A. M., Shafik, S. H., Winterberg, M., Martin, R. E., and Kirk, K. (2015) A lactate and formate transporter in the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Nat Commun* **6**, 6721
138. Lu, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Wacker, T., Andrade, S. L. A., and Einsle, O. (2013) The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biol Chem* **394**, 715-727
139. Suppmann, B., and Sawers, G. (1994) 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. *Mol Microbiol* **11**, 965-982
140. Knappe, J., and Sawers, G. (1990) A radical-chemical route to acetyl-CoA: The anaerobically induced pyruvate formate-lyase system of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev* **6**, 383-398
141. Leonhartsberger, S., Korsa, I., and Böck, A. (2002) The molecular biology of formate metabolism in enterobacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol* **4**, 269-276

## Literaturverzeichnis

142. Lu, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Gerbig-Smentek, E., Einsle, O., and Andrade, S. L. A. (2012) The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13254-13259
143. Waight, A. B., Love, J., and Wang, D.-N. (2010) Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 31-37
144. Lu, W., Du, J., Wacker, T., Gerbig-Smentek, E., Andrade, S. L. A., and Einsle, O. (2011) pH-dependent gating in a FocA formate channel. *Science* **332**, 352-354
145. Stephenson, M., and Stickland, L. H. (1932) Hydrogenlyases: Bacterial enzymes liberating molecular hydrogen. *Biochem J* **26**, 712-724
146. Beyer, L., Doberenz, C., Falke, D., Hunger, D., Suppmann, B., and Sawers, R. G. (2013) Coordination of FocA and pyruvate formate-lyase synthesis in *Escherichia coli* demonstrates preferential translocation of formate over other mixed-acid fermentation products. *J Bacteriol* **195**, 1428-1435
147. Das, P., Lahiri, A., Lahiri, A., and Chakravorty, D. (2009) Novel role of the nitrite transporter NirC in *Salmonella* pathogenesis: SPI2-dependent suppression of inducible nitric oxide synthase in activated macrophages. *Microbiology (Reading, Engl)* **155**, 2476-2489
148. Rycovska-Blume, A., Lu, W., Andrade, S., Fendler, K., and Einsle, O. (2015) Structural and Functional Studies of NirC from *Salmonella typhimurium*. *Methods Enzymol* **556**, 475-497
149. Clegg, S., Yu, F., Griffiths, L., and Cole, J. A. (2002) The roles of the polytopic membrane proteins NarK, NarU and NirC in *Escherichia coli* K-12: Two nitrate and three nitrite transporters. *Mol Microbiol* **44**, 143-155
150. Beckham, K. S. H., Potter, J. A., and Unkles, S. E. (2010) Formate-nitrite transporters: Optimisation of expression, purification and analysis of prokaryotic and eukaryotic representatives. *Protein Expr Purif* **71**, 184-189
151. Maeda, S.-I., Murakami, A., Ito, H., Tanaka, A., and Omata, T. (2015) Functional Characterization of the FNT Family Nitrite Transporter of Marine Picocyanobacteria. *Life (Basel, Switzerland)* **5**, 432-446
152. Paiva, J. B. de, Leite, J. L., da Silva, L. P. M., Rojas, T. C. G., Pace, F. de, Conceição, R. A., Sperandio, V., and da Silveira, W. D. (2015) Influence of the major nitrite



- transporter NirC on the virulence of a Swollen Head Syndrome avian pathogenic *E. coli* (APEC) strain. *Vet Microbiol* **175**, 123-131
153. Czyzewski, B. K., and Wang, D.-N. (2012) Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature* **483**, 494-497
154. Wu, B., Rambow, J., Bock, S., Holm-Bertelsen, J., Wiechert, M., Soares, A. B., Spielmann, T., and Beitz, E. (2015) Identity of a Plasmodium lactate/H(+) symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat Commun* **6**, 6284
155. Elliott, J. L., Saliba, K. J., and Kirk, K. (2001) Transport of lactate and pyruvate in the intraerythrocytic malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Biochem J* **355**, 733-739
156. Golldack, A., Henke, B., Bergmann, B., Wiechert, M., Erler, H., Blancke Soares, A., Spielmann, T., and Beitz, E. (2017) Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the Plasmodium lactate transporter PffNT at nanomolar scale. *PLoS Pathog* **13**, e1006172
157. Hapuarachchi, S. V., Cobbold, S. A., Shafik, S. H., Dennis, A. S. M., McConville, M. J., Martin, R. E., Kirk, K., and Lehane, A. M. (2017) The Malaria Parasite's Lactate Transporter PffNT Is the Target of Antiplasmodial Compounds Identified in Whole Cell Phenotypic Screens. *PLoS Pathog* **13**, e1006180
158. Halestrap, A. P., and Meredith, D. (2004) The SLC16 gene family-from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *Pflugers Arch* **447**, 619-628
159. Halestrap, A. P. (2013) The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Mol Aspects Med* **34**, 337-349
160. Unkles, S. E., Symington, V. F., Kotur, Z., Wang, Y., Siddiqi, M. Y., Kinghorn, J. R., and Glass, A. D. M. (2011) Physiological and biochemical characterization of AnNitA, the Aspergillus nidulans high-affinity nitrite transporter. *Eukaryotic cell* **10**, 1724-1732
161. Wang, Y., Li, W., Siddiqi, Y., Symington, V. F., Kinghorn, J. R., Unkles, S. E., and Glass, A. D. M. (2008) Nitrite transport is mediated by the nitrite-specific high-affinity NitA transporter and by nitrate transporters NrtA, NrtB in Aspergillus nidulans. *Fungal Genet Biol* **45**, 94-102

162. Rexach, J., Fernández, E., and Galván, A. (2000) The *Chlamydomonas reinhardtii* Nar1 gene encodes a chloroplast membrane protein involved in nitrite transport. *Plant Cell* **12**, 1441-1453
163. Mariscal, V., Moulin, P., Orsel, M., Miller, A. J., Fernandez, E., and Galvan, A. (2006) Differential regulation of the *Chlamydomonas* Nar1 gene family by carbon and nitrogen. *Protist* **157**, 421-433
164. Yamano, T., Sato, E., Iguchi, H., Fukuda, Y., and Fukuzawa, H. (2015) Characterization of cooperative bicarbonate uptake into chloroplast stroma in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 7315-7320
165. Deloménie, C., Foti, E., Floch, E., Diderot, V., Porquet, D., Dupuy, C., and Bonaly, J. (2007) A new homolog of FocA transporters identified in cadmium-resistant *Euglena gracilis*. *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 455-461
166. Wang, Y., Huang, Y., Wang, J., Cheng, C., Huang, W., Lu, P., Xu, Y.-N., Wang, P., Yan, N., and Shi, Y. (2009) Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature* **462**, 467-472
167. Lu, W., Schwarzer, N. J., Du, J., Gerbig-Smentek, E., Andrade, S. L. A., and Einsle, O. (2012) Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 18395-18400
168. Falke, D., Schulz, K., Doberenz, C., Beyer, L., Lilie, H., Thiemer, B., and Sawers, R. G. (2010) Unexpected oligomeric structure of the FocA formate channel of *Escherichia coli*: A paradigm for the formate-nitrite transporter family of integral membrane proteins. *FEMS Microbiol Lett* **303**, 69-75
169. Heijne, G. von, and Gavel, Y. (1988) Topogenic signals in integral membrane proteins. *Eur J Biochem* **174**, 671-678
170. Beckwith, J. (2013) The Sec-dependent pathway. *Res Microbiol* **164**, 497-504
171. Smart, O. S., Neduelil, J. G., Wang, X., Wallace, B. A., and Sansom, M. S. (1996) HOLE: A program for the analysis of the pore dimensions of ion channel structural models. *J Mol Graph* **14**, 354-60, 376
172. Lu, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Gerbig-Smentek, E., Einsle, O., and Andrade, S. L. A. (2012) The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13254-13259

## Literaturverzeichnis

173. Agre, P., King, L. S., Yasui, M., Guggino, W. B., Ottersen, O. P., Fujiyoshi, Y., Engel, A., and Nielsen, S. (2002) Aquaporin water channels--from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol (Lond)* **542**, 3-16
174. Park, J. H., and Saier, M. H. (1996) Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J Membr Biol* **153**, 171-180
175. Saier, M. H., Eng, B. H., Fard, S., Garg, J., Haggerty, D. A., Hutchinson, W. J., Jack, D. L., Lai, E. C., Liu, H. J., Nusinew, D. P., Omar, A. M., Pao, S. S., Paulsen, I. T., Quan, J. A., Sliwinski, M., Tseng, T. T., Wachi, S., and Young, G. B. (1999) Phylogenetic characterization of novel transport protein families revealed by genome analyses. *Biochim Biophys Acta* **1422**, 1-56
176. Casal, M., Cardoso, H., and Leão, C. (1996) Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, Engl)* **142 ( Pt 6)**, 1385-1390
177. Busch, W., and Saier, M. H. (2002) The transporter classification (TC) system, 2002. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **37**, 287-337
178. Feng, Z., Hou, T., and Li, Y. (2012) Concerted movement in pH-dependent gating of FocA from molecular dynamics simulations. *J Chem Inf Model* **52**, 2119-2131
179. Rycovska, A., Hatahet, L., Fendler, K., and Michel, H. (2012) The nitrite transport protein NirC from *Salmonella typhimurium* is a nitrite/proton antiporter. *Biochim Biophys Acta* **1818**, 1342-1350
180. Waight, A. B., Czyzewski, B. K., and Wang, D.-N. (2013) Ion selectivity and gating mechanisms of FNT channels. *Curr Opin Struct Biol* **23**, 499-506
181. Wiechert, M., and Beitz, E. (2017) Mechanism of formate-nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *EMBO J* **36**, 949-958
182. Wiechert, M., and Beitz, E. (2017) Formate-nitrite transporters: Monoacids ride the dielectric slide. *Channels (Austin)* **11**, 365-367
183. Khademi, S., O'Connell, J., Remis, J., Robles-Colmenares, Y., Miercke, L. J. W., and Stroud, R. M. (2004) Mechanism of ammonia transport by Amt/MEP/Rh: Structure of AmtB at 1.35 Å. *Science* **305**, 1587-1594
184. Csanady, L., and Mindell, J. A. (2008) The twain shall meet: channels, transporters and things between. Meeting on Membrane Transport in Flux: the Ambiguous Interface Between Channels and Pumps. *EMBO Rep* **9**, 960-965

## Literaturverzeichnis

185. Krantz, B. A., Finkelstein, A., and Collier, R. J. (2006) Protein translocation through the anthrax toxin transmembrane pore is driven by a proton gradient. *J Mol Biol* **355**, 968-979
186. Wiechert, M., Erler, H., Gollmack, A., and Beitz, E. (2017) A widened substrate selectivity filter of eukaryotic formate-nitrite transporters enables high-level lactate conductance. *FEBS J* **284**, 2663-2673
187. Beitz, E. (2006) Subfamily logos: Visualization of sequence deviations at alignment positions with high information content. *BMC Bioinformatics* **7**, 313
188. Beitz, E., Wu, B., Holm, L. M., Schultz, J. E., and Zeuthen, T. (2006) Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 269-274
189. Grote, A., Hiller, K., Scheer, M., Münch, R., Nörtemann, B., Hempel, D. C., and Jahn, D. (2005) JCat: A novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic Acids Res* **33**, W526-31
190. Brown, M., Stafford, L. J., Onisk, D., Joaquim, T., Tobb, A., Goldman, L., Fancy, D., Stave, J., and Chambers, R. (2013) Snorkel: An epitope tagging system for measuring the surface expression of membrane proteins. *PLoS ONE* **8**, e73255
191. Dong, X., Stothard, P., Forsythe, I. J., and Wishart, D. S. (2004) PlasMapper: A web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic Acids Res* **32**, W660-4
192. Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S., and Brown, A. J. (1997) Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP): A reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading, Engl)* **143 ( Pt 2)**, 303-311
193. Plattner, F., Yarovinsky, F., Romero, S., Didry, D., Carlier, M.-F., Sher, A., and Soldati-Favre, D. (2008) Toxoplasma profilin is essential for host cell invasion and TLR11-dependent induction of an interleukin-12 response. *Cell Host Microbe* **3**, 77-87
194. Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 2110-2114
195. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467

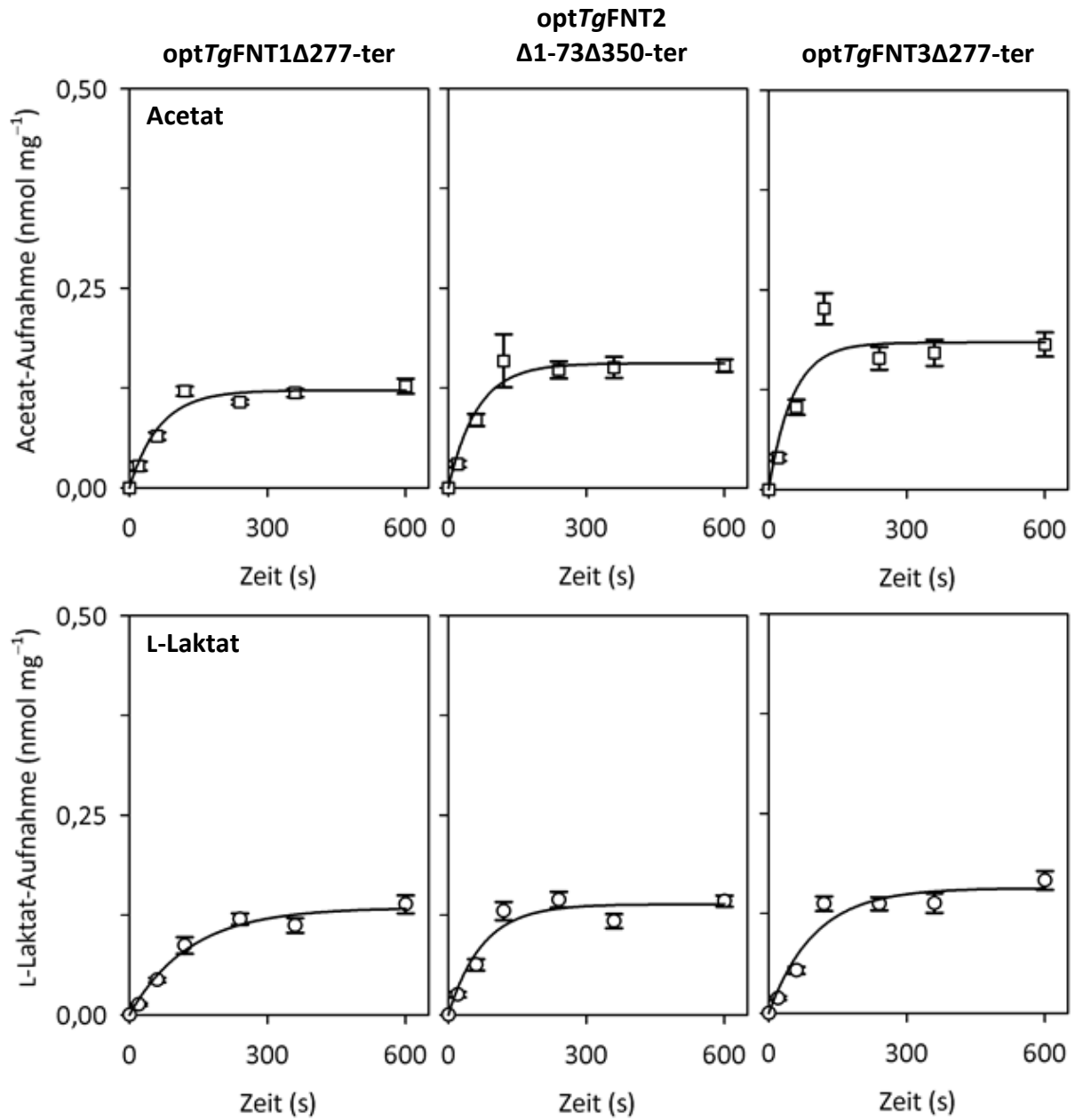
## Literaturverzeichnis

196. Gietz, R. D., Schiestl, R. H., Willems, A. R., and Woods, R. A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355-360
197. Soares-Silva, I., Paiva, S., Diallinas, G., and Casal, M. (2007) The conserved sequence NXXS/THXS/TQDXXXT of the lactate/pyruvate:H(+) symporter subfamily defines the function of the substrate translocation pathway. *Mol Membr Biol* **24**, 464-474
198. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254
199. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
200. Gültekin, H., and Heermann, K. H. (1988) The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem* **172**, 320-329
201. Gupta, N., Zahn, M. M., Coppens, I., Joiner, K. A., and Voelker, D. R. (2005) Selective disruption of phosphatidylcholine metabolism of the intracellular parasite *Toxoplasma gondii* arrests its growth. *J Biol Chem* **280**, 16345-16353
202. Hartmann, A., Hellmund, M., Lucius, R., Voelker, D. R., and Gupta, N. (2014) Phosphatidylethanolamine synthesis in the parasite mitochondrion is required for efficient growth but dispensable for survival of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem* **289**, 6809-6824
203. Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Gallo Cassarino, T., Bertoni, M., Bordoli, L., and Schwede, T. (2014) SWISS-MODEL: Modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* **42**, W252-8
204. Beitz, E. (2000) TEXshade: Shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon. *Bioinformatics* **16**, 135-139
205. Beitz, E. (2000) T(E)Xtopo: Shaded membrane protein topology plots in LAT(E)X2epsilon. *Bioinformatics* **16**, 1050-1051
206. Behnke, M. S., Wootton, J. C., Lehmann, M. M., Radke, J. B., Lucas, O., Nawas, J., Sibley, L. D., and White, M. W. (2010) Coordinated progression through two

- subtranscriptomes underlies the tachyzoite cycle of *Toxoplasma gondii*. *PLoS ONE* **5**, e12354
207. Gustafsson, C., Govindarajan, S., and Minshull, J. (2004) Codon bias and heterologous protein expression. *Trends Biotechnol* **22**, 346-353
208. Fréchal, K., Polonais, V., Marq, J.-B., Stratmann, R., Limenitakis, J., and Soldati-Favre, D. (2010) Functional dissection of the apicomplexan glideosome molecular architecture. *Cell Host Microbe* **8**, 343-357
209. Arroyo-Olarte, R. D., Brouwers, J. F., Kuchipudi, A., Helms, J. B., Biswas, A., Dunay, I. R., Lucius, R., and Gupta, N. (2015) Phosphatidylthreonine and Lipid-Mediated Control of Parasite Virulence. *PLoS Biol* **13**, e1002288
210. Stahl, W., Jackson, R., Turek, G., and Gaafar, H. A. (1978) Babesiosis: Malaria mimic. *Am J Med Technol* **44**, 572-574
211. Bock, R., Jackson, L., Vos, A. de, and Jorgensen, W. (2004) Babesiosis of cattle. *Parasitology* **129 Suppl**, S247-69
212. Ueti, M. W., Palmer, G. H., Scoles, G. A., Kappmeyer, L. S., and Knowles, D. P. (2008) Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. *Infect Immun* **76**, 3525-3529
213. Kjemtrup, A. M., and Conrad, P. A. (2000) Human babesiosis: An emerging tick-borne disease. *Int J Parasitol* **30**, 1323-1337
214. Fritz, H. M., Buchholz, K. R., Chen, X., Durbin-Johnson, B., Rocke, D. M., Conrad, P. A., and Boothroyd, J. C. (2012) Transcriptomic analysis of toxoplasma development reveals many novel functions and structures specific to sporozoites and oocysts. *PLoS ONE* **7**, e29998
215. Nitzsche, R., Günay-Esiyok, Ö., Tischer, M., Zagoriy, V., and Gupta, N. (2017) A plant/fungal-type phosphoenolpyruvate carboxykinase located in the parasite mitochondrion ensures glucose-independent survival of *Toxoplasma gondii*. *J. Biol. Chem.* **292**, 15225-15239
216. Denton, H., Roberts, C. W., Alexander, J., Thong, K. W., and Coombs, G. H. (1996) Enzymes of energy metabolism in the bradyzoites and tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol Lett* **137**, 103-108

217. Holm-Bertelsen, J., Bock, S., Helmstetter, F., and Beitz, E. (2016) High-level cell-free production of the malarial lactate transporter PffNT as a basis for crystallization trials and directional transport studies. *Protein Expr Purif* **126**, 109-114
218. Treeck, M., Sanders, J. L., Elias, J. E., and Boothroyd, J. C. (2011) The phosphoproteomes of *Plasmodium falciparum* and *Toxoplasma gondii* reveal unusual adaptations within and beyond the parasites' boundaries. *Cell Host Microbe* **10**, 410–419
219. Keshava Prasad, T. S., Goel, R., Kandasamy, K., Keerthikumar, S., Kumar, S., Mathivanan, S., Telikicherla, D., Raju, R., Shafreen, B., Venugopal, A., Balakrishnan, L., Marimuthu, A., Banerjee, S., Somanathan, D. S., Sebastian, A., Rani, S., Ray, S., Harrys Kishore, C. J., Kanth, S., Ahmed, M., Kashyap, M. K., Mohmood, R., Ramachandra, Y. L., Krishna, V., Rahiman, B. A., Mohan, S., Ranganathan, P., Ramabadran, S., Chaerkady, R., and Pandey, A. (2009) Human Protein Reference Database--2009 update. *Nucleic Acids Res* **37**, D767-72
220. Fischer, G., Kosinska-Eriksson, U., Aponte-Santamaría, C., Palmgren, M., Geijer, C., Hedfalk, K., Hohmann, S., Groot, B. L. de, Neutze, R., and Lindkvist-Petersson, K. (2009) Crystal structure of a yeast aquaporin at 1.15 angstrom reveals a novel gating mechanism. *PLoS Biol* **7**, e1000130
221. Bülow, J. von, Golldack, A., Albers, T., and Beitz, E. (2015) The amoeboidal *Dictyostelium* aquaporin AqpB is gated via Tyr216 and aqpB gene deletion affects random cell motility. *Biol Cell* **107**, 78-88
222. Törnroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfalk, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., Neutze, R., and Kjellbom, P. (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* **439**, 688-694
223. Meier, A., Eler, H., and Beitz, E. (2018) Targeting Channels and Transporters in Protozoan Parasite Infections. *Front Chem* **6**, 88
224. Gamo, F.-J., Sanz, L. M., Vidal, J., Cozar, C. de, Alvarez, E., Lavandera, J.-L., Vanderwall, D. E., Green, D. V. S., Kumar, V., Hasan, S., Brown, J. R., Peishoff, C. E., Cardon, L. R., and Garcia-Bustos, J. F. (2010) Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* **465**, 305-310

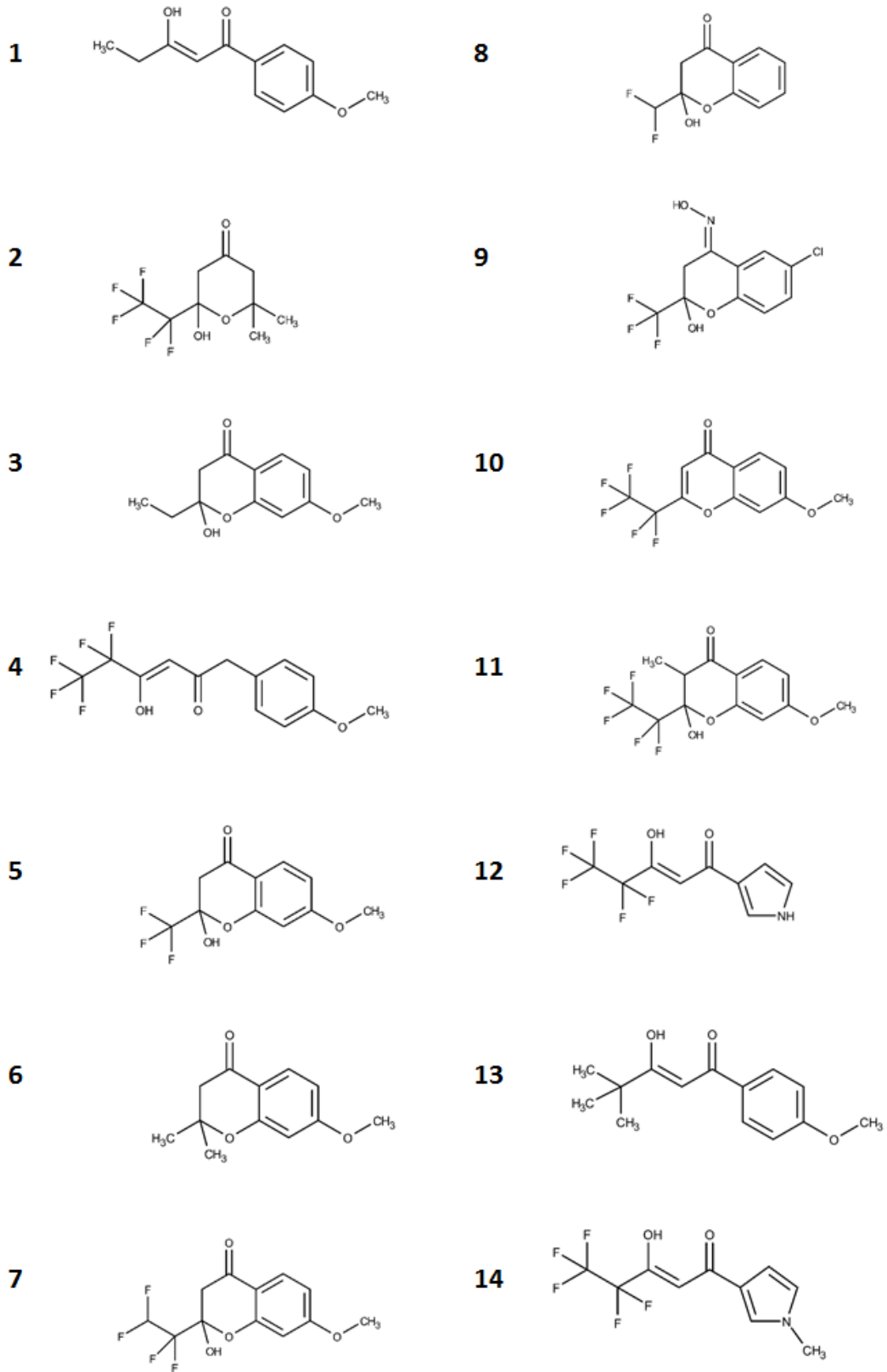
## Anhang



**Abb. A1** Aufnahmekurven für Acetat (□) und L-Laktat (○) von in Hefe hergestellten *optTgFNT1Δ277-ter*, *optTgFNT2Δ1-73Δ350-ter*, *optTgFNT3Δ277-ter* über 10 min. Die Werte der nicht exprimierenden Kontrollhefen wurden abgezogen.

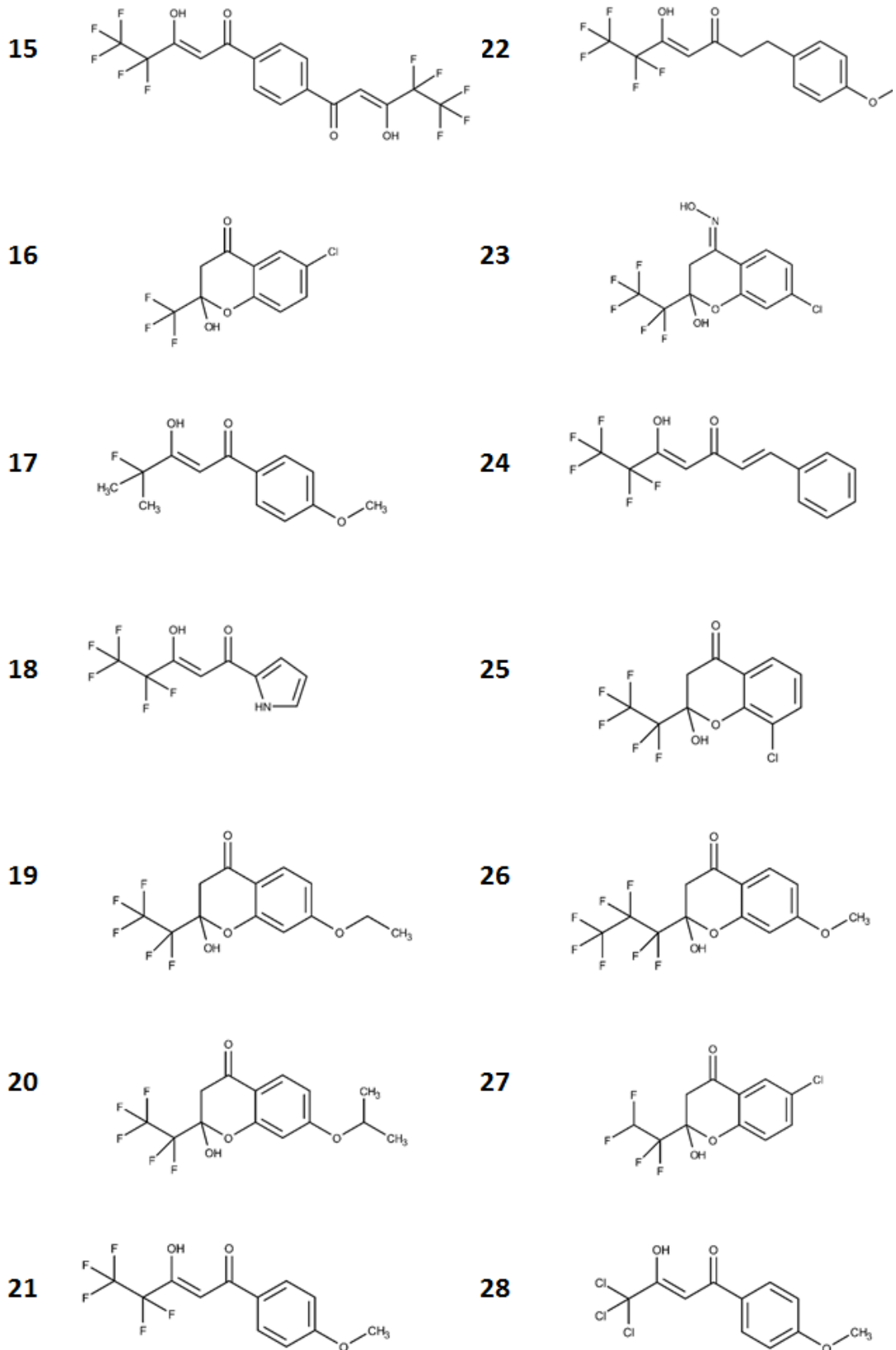


## Anhang



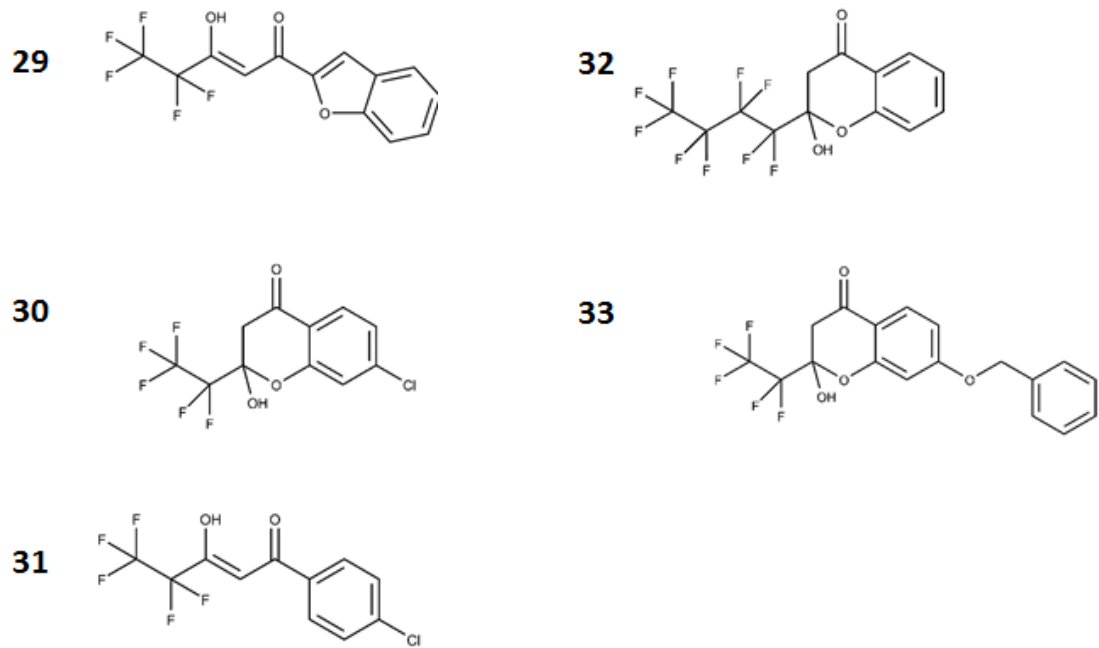
**Abb. A2** Strukturformeln der im Screening 1 verwendeten Analoga von MMV007839 mit der entsprechenden laufenden Nummerierung (1-33). Wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.

## Anhang



**Abb. A2** Strukturformeln der im Screening 1 verwendeten Analoga von MMV007839 mit der entsprechenden laufenden Nummerierung (1-33). Wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.

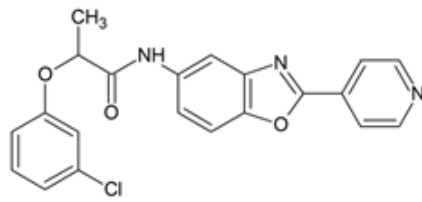
Anhang



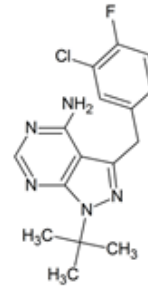
**Abb. A2** Strukturformeln der im Screening 1 verwendeten Analoga von MMV007839 mit der entsprechenden laufenden Nummerierung (1-33).

Anhang

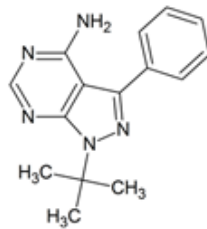
A A03



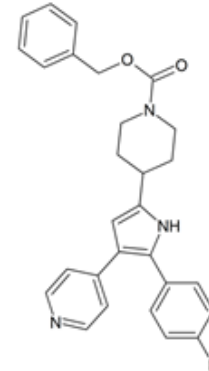
C A06



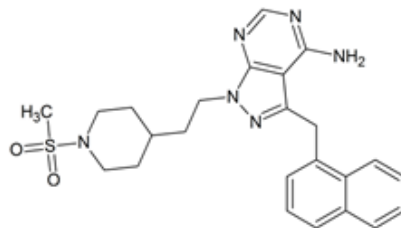
A C03



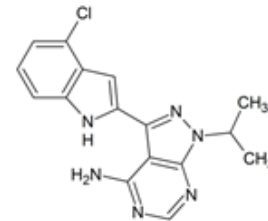
C C08



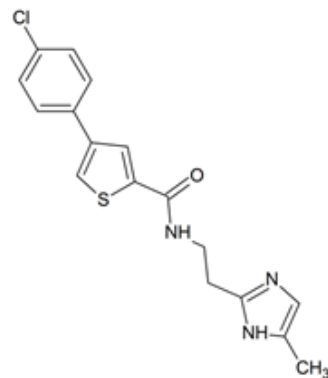
A G02



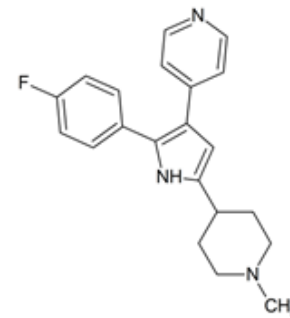
C G05



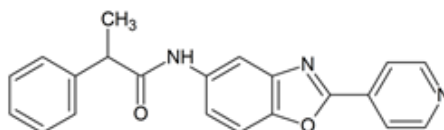
A E03



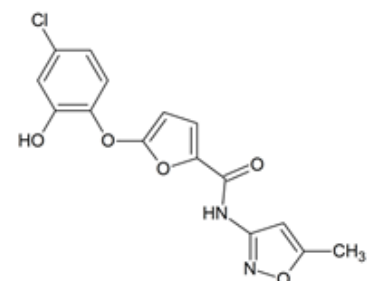
C G11



A F03

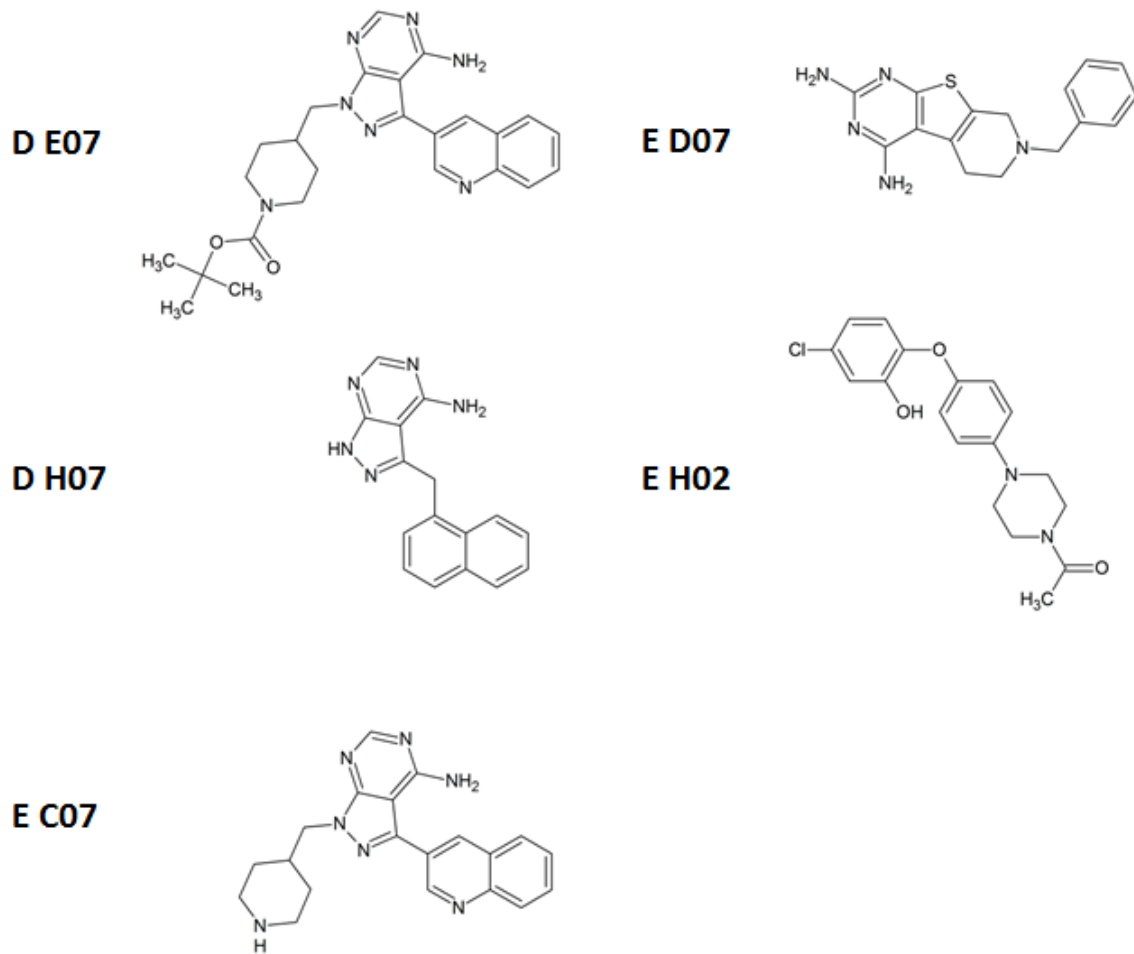


C H11



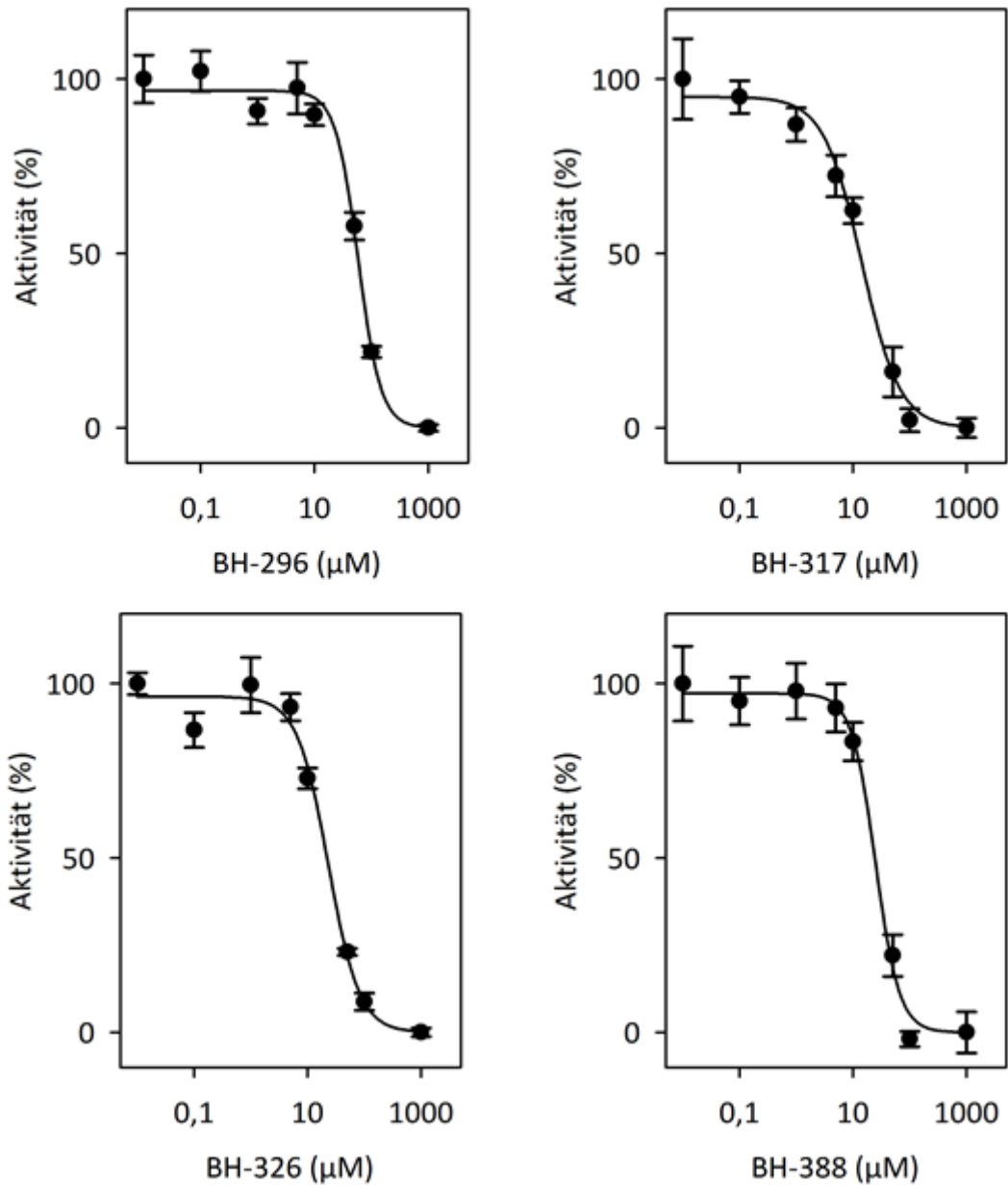
**Abb. A3** Strukturformeln der im Screening 2 verwendeten *Pathogen Box*-Substanzen. Wird auf der nächsten Seite fortgesetzt.

## Anhang

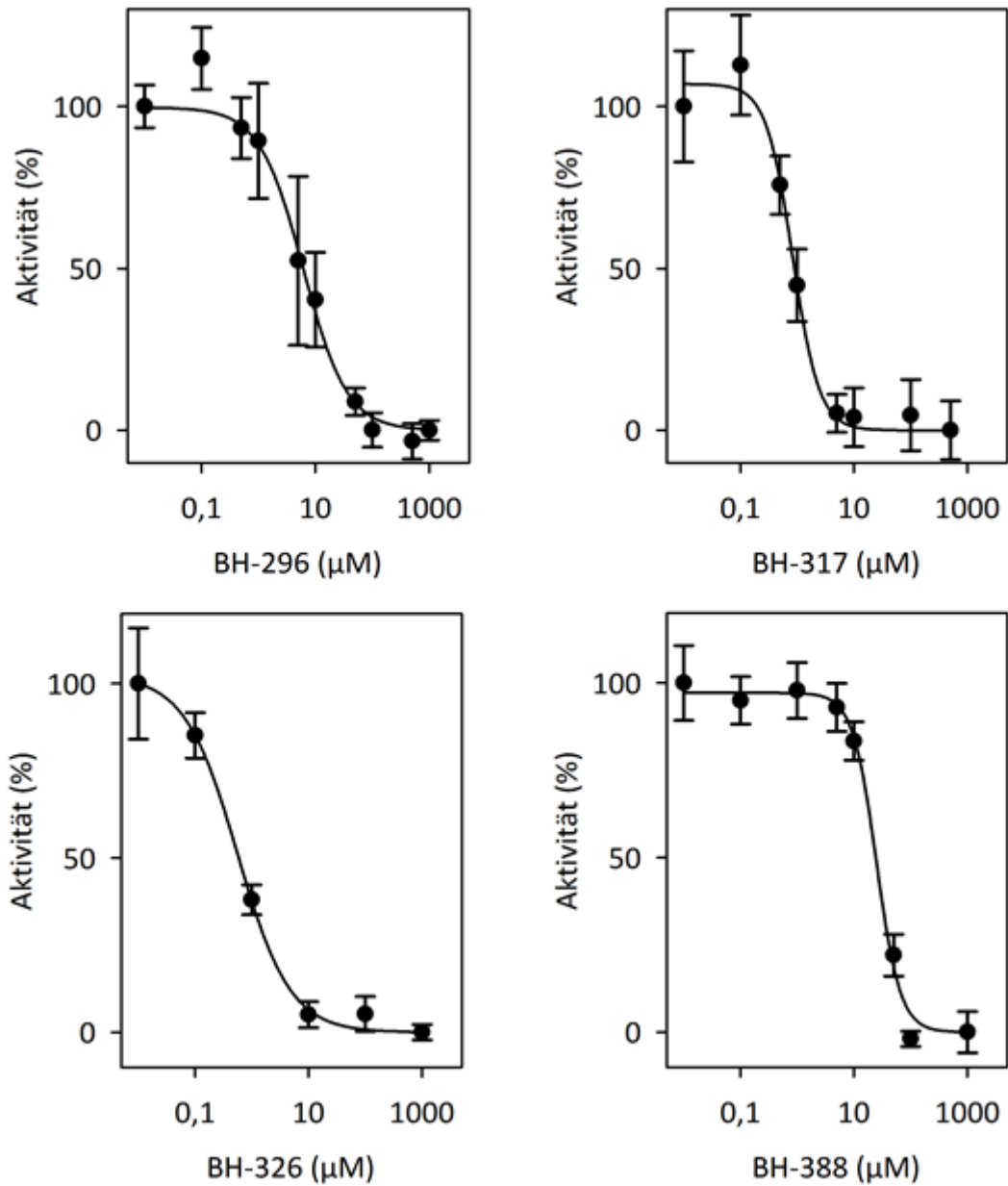


**Abb. A3** Strukturformeln der im Screening 2 verwendeten *Pathogen Box*-Substanzen. Der erste Buchstabe gibt die entsprechende 96-Well-Mikrotiterplatte (A-F) an, die Kombination aus Buchstabe und Zahl (z.B. A03) die genaue Position der Verbindung auf der Platte. 14 Substanzen wirken nachweislich gegen *Toxoplasma gondii*-Parasiten, die Substanz A E03 wurde durch einen Pipettierfehler versehentlich getestet und wirkt gegen *Plasmodium falciparum*-Parasiten. Die Substanz A G03 wurde deshalb im Screening nicht getestet.

Anhang

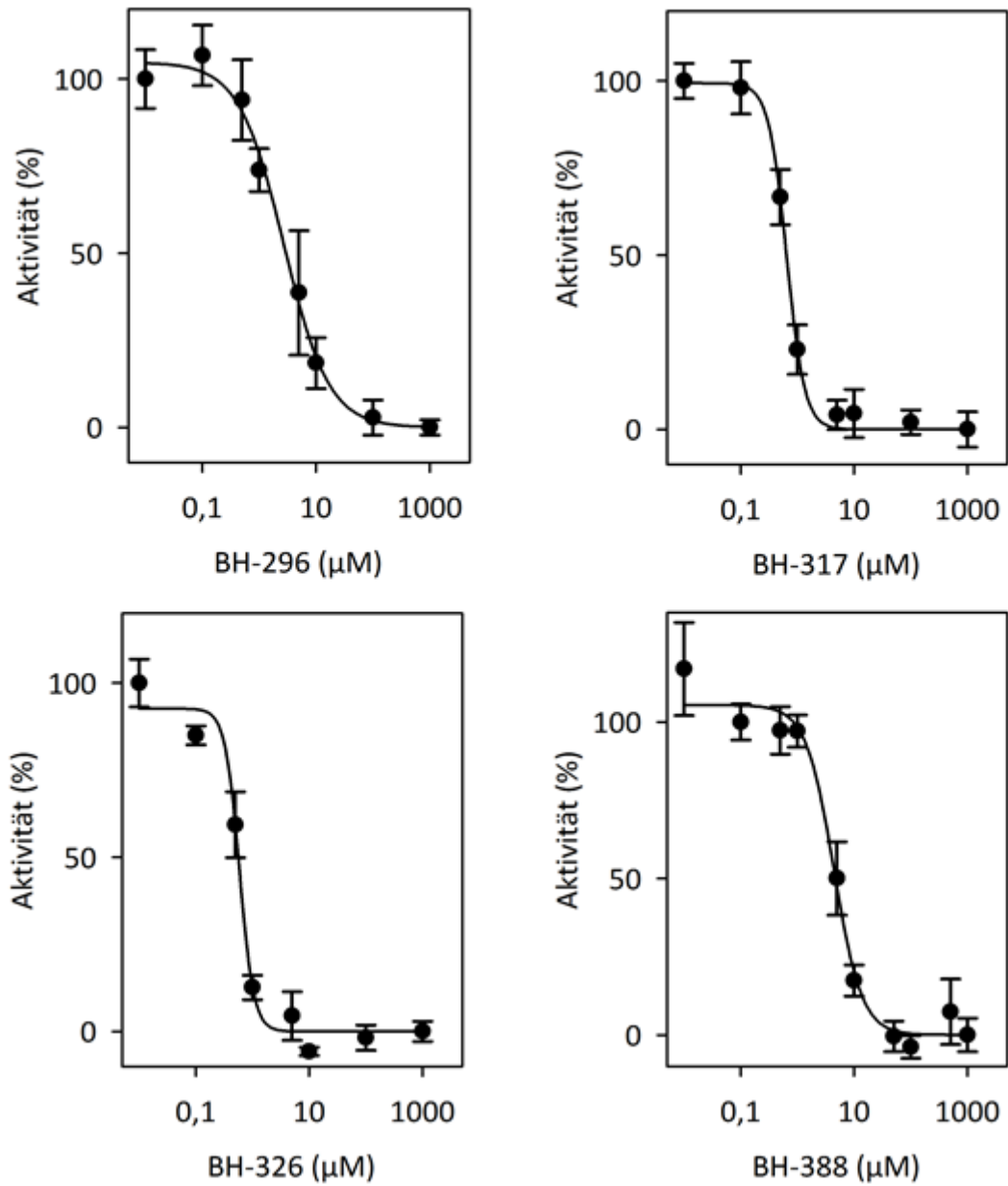


**Abb. A4** Konzentrationsabhängige Hemmung der L-Laktataufnahme von *TgFNT1 $\Delta$ 276-ter* im Hefesystem durch verschiedene MMV007839-Analoga. Gradient: 1 mM L-Laktat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -L-Laktat; pH: 6,8



**Abb. A5** Konzentrationsabhängige Hemmung der L-Laktataufnahme von *TgFNT2 $\Delta$ 1-73 $\Delta$ 350-ter* im Hefesystem durch verschiedene MMV007839-Analoga. Gradient: 1 mM L-Laktat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -L-Laktat; pH: 6,8

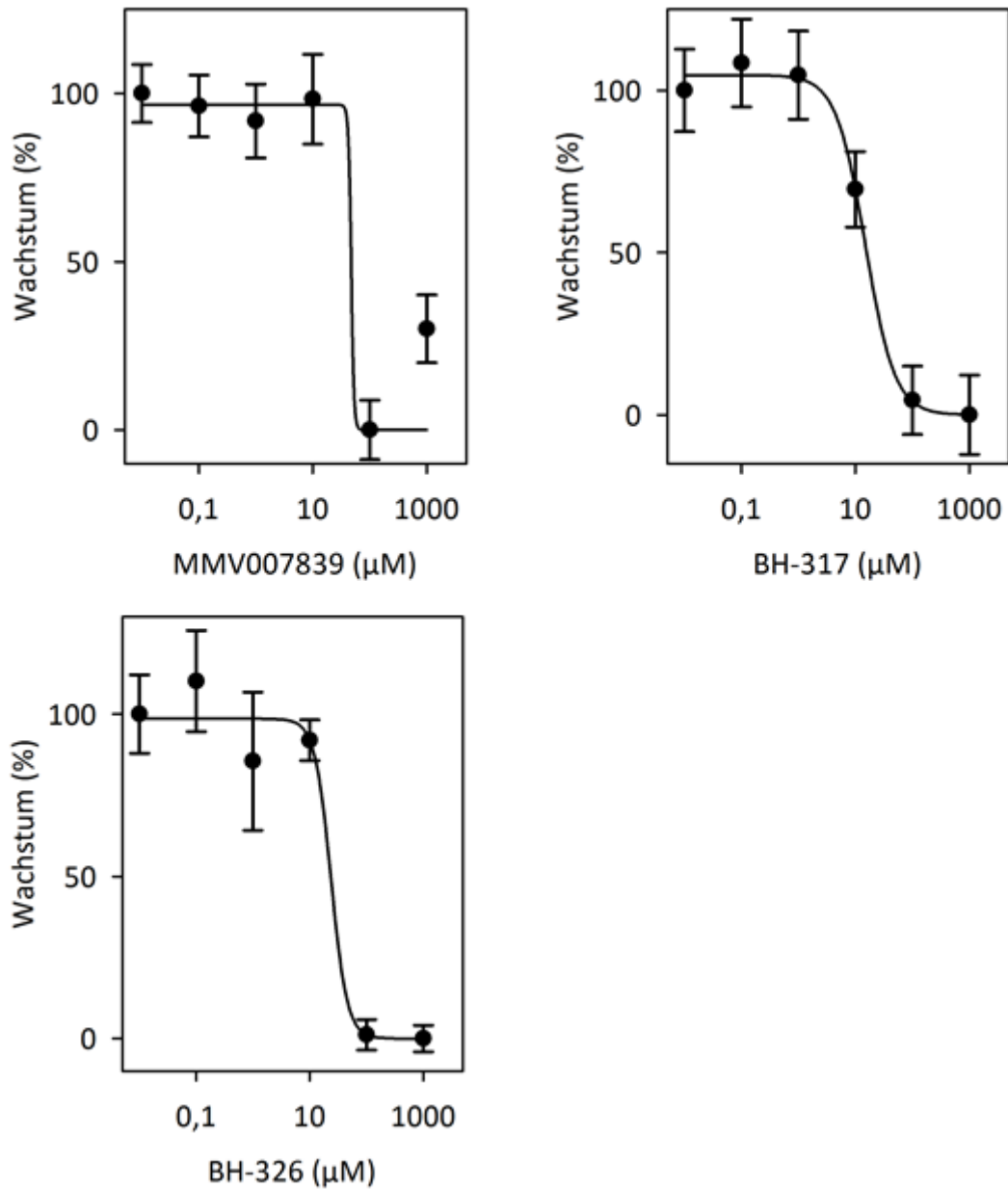
Anhang



**Abb. A6** Konzentrationsabhängige Hemmung der L-Laktataufnahme von *TgFNT3Δ276-ter* im Hefesystem durch verschiedene MMV007839-Analoga. Gradient: 1 mM L-Laktat mit 0,04  $\mu\text{Ci}$   $^{14}\text{C}$ -L-Laktat; pH: 6,8



## Anhang



**Abb. A7** Konzentrationsabhängige Hemmung der Replikation von *T. gondii*-Tachyzoiten durch verschiedene MMV007839-Analoga. Dies wurde über die Messung der Fluoreszenz von YFP bestimmt (Anregung 485 nm, Emission 528 nm). Werte der Kontrollen mit DMSO wurden abgezogen. Die Messungen wurden von Bingjian Ren unter Betreuung von Dr. Nishith Gupta am Institut für Molekulare Parasitologie in Berlin durchgeführt.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, selbstständig verfasst habe und keine weiteren Quellen und Hilfsmittel als die hier angegebenen verwendet habe. Die Dissertation wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt.

Ein Teil dieser Arbeit wurde unter den folgenden Titeln publiziert:

A. Gollmack, B. Henke, B. Bergmann, M. Wiechert, H. Erler, A. Blancke Soares, T. Spielmann, E. Beitz

„Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the *Plasmodium* lactate transporter PfFNT at nanomolar scale.“

*PLoS Pathog.* **2017**, 13, e1006172.

M. Wiechert, H. Erler, A. Gollmack, E. Beitz

„A widened substrate selectivity filter of eukaryotic formate-nitrite transporters enables high-level lactate conductance.“

*FEBS J.* **2017**, 284, 2663-2673.

H. Erler, B. Ren, N. Gupta, E. Beitz

„The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* harbors three druggable FNT-type formate and l-lactate transporters in the plasma membrane.“

*J. Biol. Chem.* **2018**, 293, 17622-17630.

Ich erkläre, dass die hier vorliegende Arbeit gemäß den Grundsätzen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft erstellt wurde.

Holger Erler

Kiel, November 2018

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name	Holger Erler
Geburtsdatum	19.12.1988
Geburtsort	Flensburg
Staatsangehörigkeit	deutsch

## Schulausbildung

Juni 2008	Allgemeine Hochschulreife, Fachgymnasium Technik am Schützenpark, Kiel
-----------	------------------------------------------------------------------------

## Studium und Approbation als Apotheker

Oktober 2009 bis November 2013	Studium der Pharmazie, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Januar 2014 bis Juni 2014	Pharmazeut im Praktikum, Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Kiel
Juli 2014 bis Dezember 2014	Pharmazeut im Praktikum, Apotheke am Markt, Gettorf
Februar 2015	Approbation als Apotheker

## Promotion

seit April 2015	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Eric Beitz
-----------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## Weiterbildung

seit April 2015	Fachapotheker für Pharmazeutische Analytik
-----------------	--------------------------------------------

## Danksagung

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist unter der Leitung von Prof. Dr. Eric Beitz am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel angefertigt worden. Bei Ihm möchte ich mich für die Aufnahme in den Arbeitskreis, das sehr interessante Promotionsthema sowie die stets offene Tür für Fragen und Diskussionen bedanken. Außerdem danke ich Ihm für die Unterstützung und die vertrauensvolle Zusammenarbeit.

Bei Dr. Nishith Gupta und Bingjian Ren möchte ich mich für die durchgeführten Experimente an den *Toxoplasma gondii*-Parasiten und die unkomplizierte Kooperation bedanken.

Ein großer Dank geht an Dr. Marie Wiechert und Dr. André Golldack ohne dessen Vorarbeit und Unterstützung Teile dieser Arbeit nicht entstanden wären.

Bei Janis möchte ich mich für die gute Einarbeitung insbesondere in das Isotopenlabor bedanken. Mein Dank gilt auch hier Marie und André für alle Fragen hinsichtlich des Strahlenschutzes und der <sup>14</sup>C-Aufnahmeassays.

Hendrik Harms möchte ich für die Hilfe beim Pipettieren der Substanzen aus der *Pathogen Box* danken sowie der Unterstützung bei der Durchführung der phänotypischen Screenings.

Vielen Dank an Manuela, Anna Fuchs und Björn für die tolle Unterstützung im Laboralltag. Ihr wart immer eine große Hilfe!

Dem gesamten Arbeitskreis und allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich für das tolle und hilfsbereite Arbeitsklima danken! Die vielen lustigen Gesprächsrunden in der Mittagspause haben mich so manchen frustrierenden Tag vergessen lassen. Auch die vielen Erlebnisse mit euch außerhalb des Instituts haben sehr viel Spaß gemacht. Auch für die zwei Siege beim Instituts-Fußball-Turnier möchte ich mich bei allen Mitspielern unserer Mannschaft und bei den Fans bedanken.

Bei Julia HB, Tine, Felix, Björn, Ahmad, Anna und Annika möchte ich mich für die schöne und lustige Zusammenarbeit bei der Betreuung des fünften Semesters bedanken. Außerdem danke ich Sven für die vielen Reparaturen an den betagten HPLC-Geräten.

Bei Julia vB, Julia HB, Marie, Monja, Tine und André möchte ich mich für die gute Einarbeitung in diverse Labormethoden, die Unterstützung bei Problemen und das sehr nette Arbeitsklima insbesondere in meinem ersten Jahr bedanken.

Bei Philipp möchte ich mich für die vielen schönen Gespräche in den Kaffeepausen sowie für die vielen Unternehmungen außerhalb des Instituts bedanken. Die Reisen nach Irland, Schottland und zu den „Mannschaftstreffen“ werde ich immer gut in Erinnerung behalten!

## Danksagung

Bei Anna und Malte bedanke ich mich ebenfalls für die tolle Reise nach Schottland, die in der Schreibphase eine sehr gute Ablenkung gewesen ist. Auch haben die Schottland-Abende und Pub-Besuche mit euch sehr viel Spaß gemacht! Außerdem möchte ich euch noch für eure stetige Hilfsbereitschaft danken.

Folknand danke ich für die musikalische Untermalung des Labors und das Abspielen so mancher Laborklassiker. Außerdem für seine Kreativität und die vielen fachlichen Gespräche. Die *Lab Meet Boys* und Andrés starke *performance* als Robbie „nanomolar!“ Williams werden mir ebenfalls gut in Erinnerung bleiben.

Björn möchte ich für seine jederzeit hilfsbereite Unterstützung bei der Semesterbetreuung und im Laboralltag insbesondere beim Sequenzieren danken. Außerdem danke ich Ihm für die gemeinsamen Konzertbesuche.

Bei Tine und Marie möchte ich mich für die mentale Unterstützung in der Schreibphase bedanken, wodurch ihr mich wieder auf den richtigen Weg gebracht habt.

Bei Philipp, Malte und Patrick möchte ich mich für die Tee- und Kaffeeversorgung während der Schreibphase bedanken.

Ich bedanke mich bei Marie, Anna und Lea für das gewissenhafte Korrekturlesen meiner Arbeit. Eure Korrekturen und Verbesserungsvorschläge haben mir sehr geholfen! Bei Lea möchte ich mich außerdem für das kurzfristige Korrigieren und Verbessern meines Probevortrages bedanken.

Bei Monja möchte ich mich für die schönen Gartenpartys und beim gesamten Arbeitskreis für das gelegentliche Feierabend-Bier im Gutenberg oder bei einem von euch zu Hause bedanken. Daraus ergaben sich immer schöne Gespräche und sehr lustige Abende! Es hat Spaß gemacht mit euch!

Julian danke ich für die schönen Auszeiten in München und die immer lustigen Gespräche privater und fachlicher Natur. Außerdem danke ich Ihm für die legendären Lernabende mit sehr hohem Teekonsum und die tolle Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit.

Der Crew der MS Bounty danke ich für die tolle Ablenkung vom Arbeitsalltag durch all die vielen tollen Erlebnisse in den letzten Jahren. Ihr seid die Besten!

Bei meiner Mutter und meinem Bruder möchte ich mich für die bedingungslose Unterstützung und Hilfsbereitschaft auf meinem gesamten Lebensweg bedanken. Ohne euch wäre dieser Weg nicht möglich gewesen!

**Vielen Dank!**