

**Expression und Reinigung des
plasmodialen Laktattransporters (*PfFNT*) zur
Strukturaufklärung**

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

vorgelegt von

Philipp Georg Hajek

Kiel 2019

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Eric Beitz

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Axel Scheidig

Tag der mündlichen Prüfung:

19. März 2019

Zum Druck genehmigt:

19. März 2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 Malaria	1
1.2 Formiat-Nitrit-Transporter	5
1.3 Formiat-Nitrit-Transporter <i>PfFNT</i> - neuartiges Wirkstofftarget in der Malariatherapie	7
1.4 Strukturaufklärung neuartiger Wirkstofftargets in der Malariatherapie.....	10
1.4.1 Gewinnung von Membranproteinen mit <i>Pichia pastoris</i>	10
1.4.2 Reinigung und Kristallisation von Membranproteinen	13
1.5 Zielsetzung dieser Arbeit.....	16
2 Material	17
2.1 Enzyme, Chemikalien, Kits, Material.....	17
2.2 Geräte	20
2.3 Plasmide.....	22
2.4 Codierende DNA Sequenzen	22
2.5 Sequenzierprimer.....	22
2.6 <i>E. coli</i> -Stämme	23
2.7 <i>P. pastoris/ Komagataella phaffii</i> -Stämme	23
2.8 Antikörper	23
2.9 Puffer, Medien, Lösungen.....	23
2.9.1 Molekularbiologie	23
2.9.2 Proteinchemie.....	24
3 Methoden	29
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	29

3.1.1	Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA.....	29
3.1.2	Konzentrationsbestimmung von DNA.....	29
3.1.3	Restriktionsverdau	29
3.1.4	Ligation.....	30
3.1.5	Agarose-Gel-Elektrophorese	30
3.1.6	Transformation von <i>E. coli</i>	31
3.1.7	Schnelltransformation von <i>E. coli</i>	31
3.1.8	Dauerkulturen von <i>E. coli</i>	31
3.1.9	Transformation von <i>P. pastoris</i>	32
3.1.10	Dauerkulturen von <i>P. pastoris</i>	33
3.2	Proteinchemische Methoden	33
3.2.1	Proteingewinnung aus <i>P. pastoris</i>	33
3.2.2	Proteinproduktion im Kleinmaßstab.....	33
3.2.3	Proteinproduktion im 5-Liter Fermenter	33
3.2.4	Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus <i>P. pastoris</i> -Schüttelkultur	34
3.2.5	Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus <i>P. pastoris</i> im Fermentermaßstab ...	35
3.2.6	Solubilisierung der Membranproteine aus <i>P. pastoris</i>	36
3.2.7	Nickel-Affinitätschromatographie (Nickelreinigung)	37
3.2.8	Größenausschlusschromatographie	39
3.2.9	Proteinquantifizierung	39
3.2.10	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
3.2.11	Westernblot	40
3.2.12	Proteinaufkonzentrierung.....	41
3.3	Präparation von Proteoliposomen.....	41
3.3.1	Extrusion der Liposomen	42
3.3.2	Funktionsmessung mittels <i>Stopped-Flow</i>	42

3.3.3	Funktionsuntersuchung durch Inhibitorbindung	43
3.3.4	Transmissionselektronenmikroskopie von Proteinen.....	44
3.4	Kristallisationsansätze	44
4	Ergebnisse	47
4.1	Fermentierung von <i>P. pastoris</i> zur Gewinnung von präparativen Mengen <i>PfFNT</i> .	47
4.2	Optimierung des Zellaufschlusses und der Isolierung der mikrosomalen Fraktion von <i>P. Pastoris</i>	48
4.3	Expression von stabilen <i>PfFNT</i> Pentameren	49
4.4	Detergenzscreening für die Solubilisierung	51
4.5	Solubilisierung von <i>PfFNT</i> mit verschiedenen DDM-Konzentrationen	52
4.6	Reinigung und Stabilisierung von <i>PfFNT</i>	54
4.7	Vergleich Solubilisierung von <i>PfFNT</i> mit DDM und LDAO	56
4.8	Maximierung der Solubilisierungsausbeute mit LDAO	57
4.9	Stabilisierung von LDAO solubiliertem <i>PfFNT</i> mit verschiedenen Detergenzien..	59
4.10	Ausbeute von <i>PfFNT</i> mit verschiedenen Stabilisierungsdetergenzien.....	61
4.11	Untersuchung der Stabilisierungsbedingungen von <i>PfFNT</i> in LDAO	62
4.12	Überprüfung der Funktion des in <i>P. pastoris</i> hergestellten und gereinigten <i>PfFNTs</i> .	64
4.12.1	<i>PfFNT</i> Pentamer dargestellt durch TEM Aufnahmen.....	64
4.12.2	<i>PfFNT</i> -Funktionsüberprüfung in Proteoliposomen mit Lichtstreuung.....	67
4.12.3	Faltungskontrolle durch Bindung eines Inhibitors an <i>PfFNT</i>	69
4.13	Kristallisationsscreenings mit <i>PfFNT</i>	70
4.13.1	Kristallisationsscreening.....	72
4.13.2	<i>Grid-Screen</i>	76
4.13.3	Kristallisationsansätze im Mikroliter-Maßstab	78
4.13.4	Nicht-kristallines Wachstum	79
4.14	Röntgendiffraktometrische Untersuchung	80

5	Diskussion	82
5.1	Große Mengen <i>PfFNT</i> mit <i>Pichia pastoris</i>	82
5.2	Isolation von stabilem und funktionellem <i>PfFNT</i>	83
5.2.1	Solubilisierung.....	83
5.2.2	Mit DDM und LDAO zum stabilen Pentamer	85
5.2.3	Proteinreinigung für die Kristallisation	86
5.2.4	Detergenzieneinfluss auf die Größenausschlusschromatographie.....	88
5.3	Funktionelles <i>PfFNT</i> für die Strukturaufklärung.....	89
5.4	Eignung des gereinigten <i>PfFNT</i> für die Kristallisation	92
6	Ausblick.....	95
7	Zusammenfassung	97
8	Summary.....	98
9	Quellenverzeichnis.....	99

Abkürzungsverzeichnis

Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AQP	Aquaporin
<i>Aqua bidest.</i>	gereinigtes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i>
BLU	<i>Bioluminescence units</i>
bp	Basenpaar
Brij78®	Polyoxyethylen (20) stearylether
BSA	Bovines Serum Albumin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfonat
CMC	Kritische Mizellbildungskonzentration
CSC	kritische Solubilisierungskonzentration
DDM	n-Dodecyl-β-D-Maltopyranosid
DM	n-Decyl-β-D-Maltopyranosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FC 12	Fos-Cholin 12
FNT	Formiat-Nitrit-Transporter
FocA	<i>formate channel</i>
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonsäure
His	Histidin
KBE	Koloniebildende Einheit
LDAO	n-Dodecyl-N,N-Dimethyl-N-oxid
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MMG	Decyl Maltose Neopentyl Glycol
MMV	<i>medicines for malaria venture</i>

OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SD-Medium	<i>synthetic defined medium</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
TBS	TRIS- <i>buffered saline</i>
TBST	TBS-Puffer mit Tween 20 [®]
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembranspanne
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U min ⁻¹	Umdrehung pro Minute
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i>
β-OG	n-Octyl- β-D-Glucopyranosid

1 Einleitung

1.1 Malaria

Malaria ist eine der bedeutendsten Infektionskrankheiten der Welt und stellt insbesondere in tropischen und subtropischen Gebieten [1] ohne adäquate medizinische Behandlung eines der größten gesundheitlichen Risiken dar.

Ausgelöst wird Malaria durch Protozoen der Gattung Plasmodium, die durch einen Stich der weiblichen Anopheles Mücke in den menschlichen Organismus übertragen werden. Zurzeit werden mit *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi* fünf humanpathogene Arten gezählt [2]. Darunter stellt *P. falciparum* als Erreger der schwersten Krankheitsform der *Malaria tropica*, den vorherrschenden Malaria-Überträger dar [3].

Mit der Blutmahlzeit der weiblichen Anopheles Mücke werden infektiöse Sporozoitien auf den humanen Organismus übertragen. Im sogenannten Leberstadium proliferiert der Leberschizont zu Merozoiten. Innerhalb von fünf bis acht Tagen kann es in den Hepatozyten zu einer 30.000-fachen Vermehrung der Merozoiten kommen [4]. Mit Aufplatzen der Hepatozyten werden die Merozoiten in die Blutbahn entlassen und können dort die Erythrozyten befallen [5, 6]. Im erythrozytären Stadium kommt es zur asexuellen Vermehrung der Merozoiten. In dieser intraerythrozytären Phase ernährt sich der Parasit hauptsächlich von Glucose und Hämoglobin der menschlichen Wirtszelle. Durch die starke Vermehrung kommt es zum Aufplatzen der Erythrozyten und Freisetzen der Merozoiten. Folgend werden erneut neue Erythrozyten infiziert. Pro Zyklus kommt es zu einer sechs bis 20-fachen Vermehrung der Merozoiten [7]. Innerhalb von sechs bis acht Tagen nach Infektion und ab einer Parasitenzahl von 100.000 Merozoiten treten erste typische Krankheitssymptome, wie Fieberschübe und unspezifische Symptome wie Kopf- und Muskelschmerzen und allgemeines Unwohlsein auf [7, 8]. Im unbehandelten Zustand kann eine Malaria Infektion je nach Erreger im erythrozytären Stadium über Monate andauern und zu wiederkehrenden Symptomen führen. Bei schwereren Krankheitsverläufen können Symptome wie Anämie, Acidose, akute Atemnot und schwere Multiorganschäden auftreten. Im Fall der zerebralen Malaria kann es zu komatösen Zuständen kommen und bis zum Tod des Patienten führen [9, 10].

Einleitung

Einige der Merozoiten im erythrozytären Stadium wandeln sich in diesem Zyklus in die sexuelle Form, den Gametozyten um und dienen so der Weiterverbreitung durch erneute Aufnahme der weiblichen Anopheles-Mücke bei einer Blutmahlzeit (Abbildung 1-1) [8].

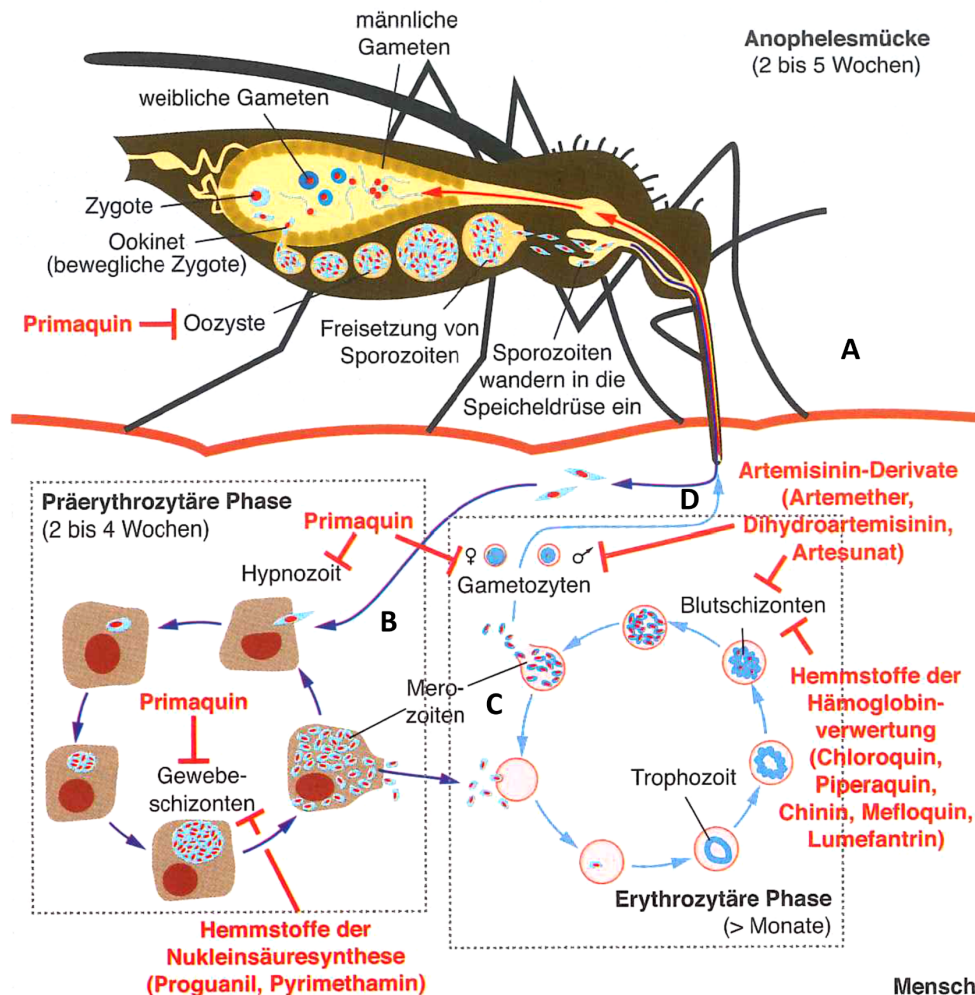


Abbildung 1-1: Lebenszyklus von *P. falciparum* im menschlichen Körper und der Anopheles-Mücke. Abbildung entnommen aus [11]. (A) Beginn des Zyklus mit der Infektion des Menschen mit infektiösen Sporozoiten durch einen Stich der Anopheles-Mücke, (B) Einfallen der Sporozoiten in Leberzellen, dortige Vermehrung und Aufplatzen der Leberschizonten, (C) Befall der Erythrozyten mit Merozoiten, Beginn des asexuellen Zyklus. Ein Teil der Parasiten wandelt sich in die sexuelle Form, in Gametozyten um (D) Wiederaufnahme der Parasiten durch die Blutmahlzeit einer Anopheles-Mücke und Ausbildung neuer infektiöser Sporozoiten.

Zur Behandlung der Malaria werden eine Reihe von Arzneistoffen, häufig zur Umgehung von Resistenzen in Kombination eingesetzt. In Tabelle 1-1 und Abbildung 1-1 werden die aktuell eingesetzten Verbindungen nach Angriffsphasen im Erreger geordnet dargestellt [11–13].

Tabelle 1-1: Wirkstoffe zur Therapie der Malaria geordnet nach Angriffspunkt im Erreger [11, 12]

Angriffsphase im Erreger	Wirkmechanismus	Wirkstoff
Erythrozytäre Phase - Blutschizont	Hemmung der Hämpolymerisation	Chloroquin Piperaquin
	Hemmung der Verschmelzung von Hämoglobinviskeln mit der Nahrungsvakuole der Plasmodien	Chinin Mefloquin Lumefantrin
	Hemmung des mitochondrialen Elektronentransfers	Artemether Dihydroartemisinin Artesunat
	Hemmung des Folsäurestoffwechsels	Proguanil Pyrimethamin Sulfadoxin
Präerythrozytäre Phase (Leberstadium) / Gewebeschizont	Hemmung des mitochondrialen Elektronentransfers	Atovaquon
Präerythrozytäre Phase (Leberstadium), Oozyste	Hemmung des mitochondrialen Elektronentransfers	Primaquin
Präerythrozytäre und Erythrozytäre Phase	Hemmung der Proteinbiosynthese	Doxycyclin Tetracyclin

In den letzten 50 Jahren wurde gegen Infektionen der Malaria Tropica das 4-Aminochinolon Chloroquin sowie die Antifolate Sulfadoxin und Pyrimethamin als Mittel der Wahl verwendet [14]. Chloroquin hemmt im Parasiten die Hämpolymerisation, sodass es zum Vorliegen von freiem Häm in der Zelle kommt [15]. Durch das frei vorliegende Häm kommt es zur Schädigung von Enzymen und der Membran von *P. falciparum* [16, 17]. In Folge eines starken Fehlgebrauchs führte es zu einer nahezu weltweiten Resistenzentwicklung von *P. falciparum* gegen Chloroquin. Die entstandene Resistenz wird zum einen auf das *Multidrug Resistance Protein 1 (PfMRP1)* und auf den Chloroquin-Resistenztransporter (*PfCRT*) zurückgeführt [18,

Einleitung

19]. Durch Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) in den Proteinen oder durch vermehrte Expression kommt es zu einem erhöhten Export von Chloroquin aus der Nahrungsvakuole und folgend zum Wirkverlust [20, 21].

Die in Kombination verwendeten Antifolate hemmen die Bildung der Folsäure, die einen essentiellen Baustein der Biosynthese von Nukleotiden darstellt.

Der Wirkstoff Sulfadoxin inhibiert die Aktivität der Dihydropteroat Synthetase (*PfDHPS*). Die Antifolate Proguanil und Pyrimethamin hemmen dagegen die Aktivität der Dihydrofolat-Reduktase (*PfDHFR*) und die bifunktionale Dihydrofolat-Reduktase/Thymidylat Synthase [22]. In *P. falciparum* und auch in *P. vivax* konnten für die Antifolate Resistenzen nachgewiesen werden [23], sodass diese nur noch in Kombination mit zusätzlichen Wirkstoffen zum Einsatz kommen sollen.

Nach aktueller Empfehlung der WHO kommen für die Behandlung unkomplizierter Malaria Tropica-Infektionen Kombinationen aus Artemisininderivaten und Arylaminoalkoholen bzw. Antifolaten zum Einsatz [24].

Der Wirkmechanismus der Artemisininderivate ist bisher nicht gänzlich aufgeklärt. Es wird postuliert, dass die sarkoplasmatische Ca^{2+} ATPase (*PfATP6*) gehemmt wird und zusätzliche freie Sauerstoffradikale den mitochondrialen Elektronentransfer hemmen [25, 26]. Die kombinierte Verwendung der Artemisininderivate wird empfohlen, da auch hier in *P. falciparum* Resistenzen identifiziert wurden, die mit einer Mutation des Kelch(K13)-Gens assoziiert werden [27].

Eine weitere duale Therapieoption steht mit den beiden Wirkstoffen Atovaquon und Proguanil zur Verfügung [24]. In Form des Fertigarzneimittels Malarone® wird diese Kombination darüber hinaus als Standby Therapie und Prophylaxe bei Reisen in Risikogebiete der *Malaria tropica* verwendet [28].

Das Naphthochinonderivat Atovaquon stellt einen potenten Inhibitor des mitochondrialen Elektronentransports dar [29]. Bei alleiniger Anwendung wurden bei *P. falciparum* rapide auftretende Resistenzen beobachtet, die auf Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) im Cytochrom b (*PfCytb*) zurückzuführen sind [30, 31]. Um die Entwicklung von Resistenzen zu umgehen, kommt die Kombination von Atovaquon mit Proguanil zum Einsatz [31].

Einleitung

Als weitere Wirkstoffklasse werden Antibiotika in der Chemotherapie gegen Malaria eingesetzt. Es wird postuliert, dass deren Antimalaria-Aktivität auf die Hemmung der Proteinbiosynthese der Apikoplasten-Organelle zurückzuführen ist [32, 33]. Nach Empfehlung der WHO werden Antibiotika, wie Doxycyclin und Tetracyclin nur in Kombination mit Artemisininderivaten oder Chinin zur Prophylaxe oder Behandlung einer unkomplizierten *Malaria tropica* Infektion angewendet [24, 33].

Alle Wirkstoffklassen zusammengefasst wird festgestellt, dass auftretende Resistenzen eine der Hauptproblematiken in der effektiven Therapie von Malaria Erkrankungen darstellt [34]. Es gilt daher die Entwicklung neuer Wirkstoffe unter besonderer Berücksichtigung neuer Wirkstofftargets voranzutreiben [33].

1.2 Formiat-Nitrit-Transporter

Proteine der Formiat-Nitrit Transporter Familie (FNT) kommen ausschließlich in Bakterien, Algen, Amöben und Apikomplexa vor [35]. FNTs sind Membranproteine, die monovalente Anionen, wie Chlorid, Nitrit und schwache Säuren durch die Zellmembran leiten [35–37]. Dabei weisen sie die gleiche physiologische Funktion wie die humanen Monocarboxylattransporter auf, unterscheiden sich aber in Struktur und Transportmechanismus von diesen [36]. Zurzeit existieren fünf FNT Kristallstrukturen von FocA aus *E. coli*, *Vibrio cholerae* und *Salmonella typhimurium*, von NirC aus *Salmonella typhimurium* und FNT3/HSC aus *Clostridium difficile* [38–41].

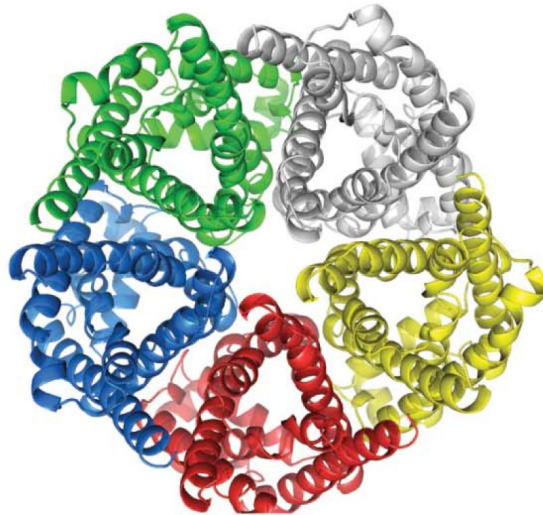


Abbildung 1-2: Struktur des *E. coli* FocA-Pentamers. Abbildung entnommen aus [38]

Auf Basis der vorhandenen Kristallstrukturen der FNT-Familie wurden verschiedene Gemeinsamkeiten zwischen diesen abgeleitet. Bei jeder der bekannten Strukturen, handelt es sich um Membranproteine, die aus sechs Transmembranspannen bestehen. Die Transmembranspannen zwei und fünf bestehen aus zwei Halbhelices, die mittig über einen *loop* verbunden sind. Die Termini ragen in den Intrazellulärraum [35]. Alle FNTs sind Homopentamere und weisen eine Höhe von 48 Å und einen Durchmesser von 80 Å auf [38, 42]. Die sich ausbildende Zentralpore ist dabei nicht für die Leitfähigkeit verantwortlich, sondern mit Lipiden oder Detergenzienmolekülen gefüllt (Abbildung 1-2) [35]. Die fünf Homopentamere sind identisch aufgebaut. Substrate werden über eine Pore in jedem Protomer geleitet. Die Pore weist innerhalb der Membran zwei Konstriktionen auf, die den hydrophoben Transportpfad, von dem hydrophilen Extrazellulärraum trennen. Die Konstriktionen werden durch die Halbhelices der Transmembranspannen TM2 und TM5 gebildet [35, 39, 43, 44].

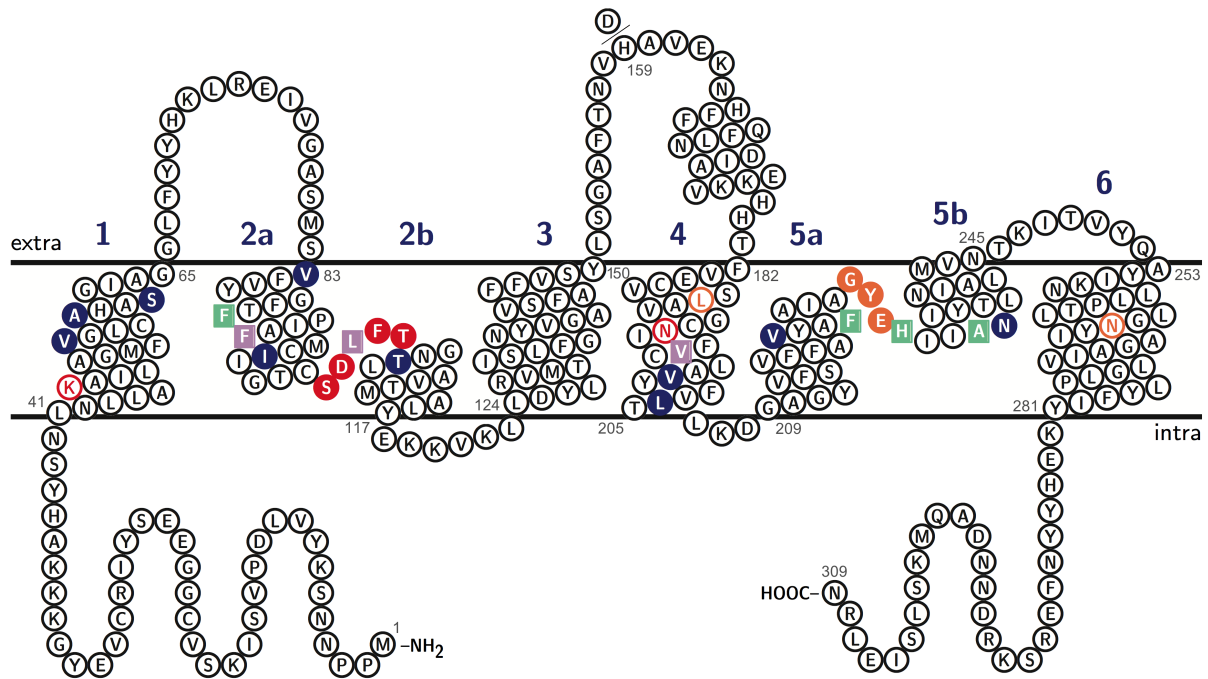


Abbildung 1-3: Topologieplot von *PfFNT* mit sechs Transmembranspannen und mit zwei Halbhelices der Transmembranspanne zwei und fünf. Die in grün und violett dargestellten Aminosäuren zeigen die für die Konstriktion verantwortliche Position. Die in rot und orange dargestellten Aminosäuren zeigen die Verbindung der Halbhelices. Entnommen aus [36].

Mit der Charakterisierung des Laktattransporters (*PfFNT*) des Malaria Erregers *P. falciparum* durch unsere Arbeitsgruppe sowie der Arbeitsgruppe von Kieran Kirk wurde kürzlich der erste eukaryotische Formiat-Nitrit-Transporter identifiziert [36, 37].

1.3 Formiat-Nitrit-Transporter *PfFNT* - neuartiges Wirkstofftarget in der Malariatherapie

Neben der Identifizierung eines neuen FNTs wurde mit *PfFNT* auch ein valides neuartiges Wirkstofftarget für die Malariatherapie entdeckt.

PfFNT spielt im Energiestoffwechsel von *P. falciparum* eine essentielle Rolle. Nach Infektion der Erythrozyten durch Plasmodien, steigt der zelluläre Glucosebedarf bis auf das 75-fache an [45, 46]. Der erhöhte erythrozytäre Glucosebedarf erklärt sich über die starke Vermehrung der Plasmodien in der erythrozytären Phase. Glucose wird durch den humanen Hexosetransporter aus dem Blut in den Erythrozyten aufgenommen [47].

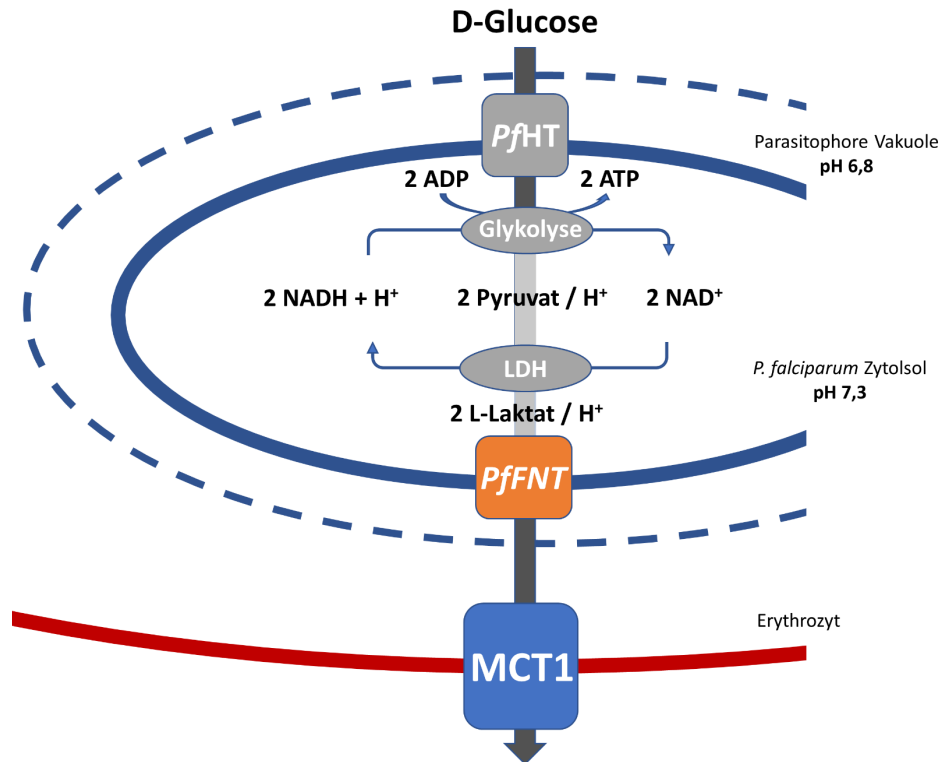


Abbildung 1-4: Energiestoffwechsel von *P. falciparum* im erythrozytären Stadium, modifiziert nach [36]: D-Glucose wird über den plasmodialen Hexosetransporter (PfHT) in das Cytosol aufgenommen und mittels Glykolyse zu zwei Mol Adenosintriphosphat, zwei Mol Laktat und Protonen verstoffwechselt. Der Export von L-Laktat erfolgt mit zwei Protonen über PfFNT in die parasitophore Vakuole. Aus dem Erythrozyten wird L-Laktat über den humanen Monocarboxylattransporter 1 (MCT1) ausgeschleust.

Über den *New Permeability Pathway* gelangt anschließend die Glucose in die parasitophore Vakuole [48, 49] und kann über den plasmodialen Hexosetransporter PfHT in den Parasiten importiert werden. [50, 51]. Durch den in diesem Stadium nicht funktionellen Zitratzyklus im Energiestoffwechsel von *P. falciparum* [52] werden aus einem Mol Glucose, wie in Abbildung 1-4 gezeigt, nur sehr ineffektiv zwei Mol Laktat, zwei Mol Protonen und zwei Mol ATP generiert. Das als Abbauprodukt der Energiegewinnung anfallende Laktat wird über einen Laktat-Protonen-Symport exportiert. Im Folgenden wird Laktat durch den Monocarboxylattransporter MCT1 über die Erythrozytenplasmamembran ausgeschleust [53, 54]. Der Laktat-Export ist für den Parasiten essentiell, um intraparasitäre Übersäuerung, osmotischen Stress und eine Veränderung des Redoxstatus zu vermeiden [55]. Durch die starken strukturellen Unterschiede zwischen dem humanen Monocarboxylattransporter (MCT) und Formiat-Nitrit-Transportern sowie die essentielle Bedeutung im Energiestoffwechsel von *P. falciparum*, stellt PfFNT ein neues valides Wirkstofftarget gegen Malaria-Tropica-Infektionen dar [36]. Phloretin, Furosemid und Zimtsäurederivate sind

Einleitung

bekannte FNT-Inhibitoren. Diese weisen allerdings IC_{50} -Werte im millimolaren Bereich auf [36, 55, 56]. Ausgehend von der *Malaria-Box*, einer frei zugänglichen Substanzsammlung mit 400 Substanzen mit Antimalaria-Wirkung, konnten in unserer Arbeitsgruppe kürzlich ein neuer *Pf*FNT-Inhibitor (MMV007839) mit deutlich stärkerer Affinität im nanomolaren Bereich identifiziert werden [57, 58].

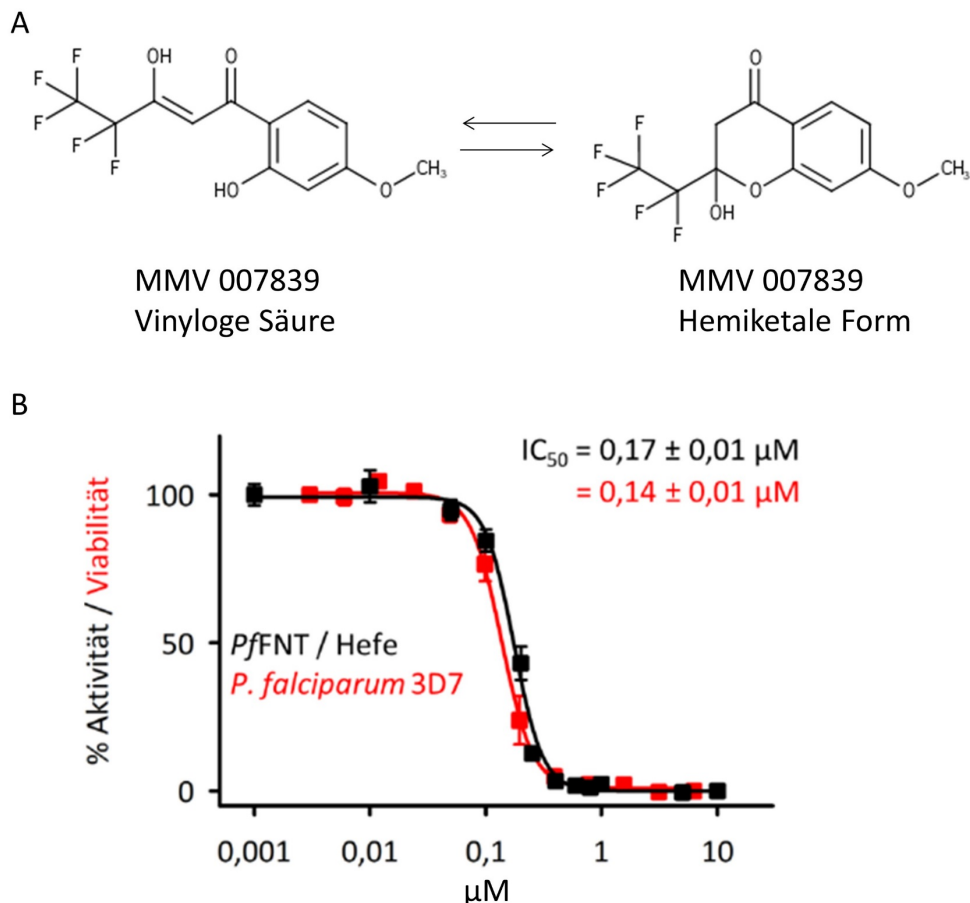


Abbildung 1-5: (A) *Pf*FNT-Inhibitor MMV007839 in offenkettiger Form einer vinylogen Carbonsäure und in der geschlossenen hemiketalen Form. (B) Bestimmung der IC_{50} -Werte von MMV007839 für die *Pf*FNT-Hemmung in Hefe (schwarz) und die Viabilität von *P. falciparum* Parasiten (rot). Entnommen aus [57].

MMV007839 ist chemisch ein Hemiketal. Es wird postuliert, dass der Inhibitor in der geschlossenen lipophilen Form die Membran des Erythrozyten und des Parasiten passiert. In der offenen Form, einer vinylogen Carbonsäure, kommt es zur Bindung an der zytoplasmatischen Seite von *Pf*FNT (Abbildung 1-5). Im Hefe-basierten Aufnahmeassay unter Verwendung von ^{14}C -radioaktivmarkierter Substrate wurde für MMV007839 ein IC_{50} -Wert von 170 ± 10 nM ermittelt und im Parasiten ein IC_{50} -Wert von 140 ± 10 nM (Abbildung 1-5) [57]. Erste Resistenzen wurden allerdings auch für MMV007839 selektiert. Nach kontinuierlicher

Einleitung

Inkubation von *P. falciparum* mit einer sublethalen dreifachen IC₅₀-Konzentration des Inhibitors, kam es zum Austausch von Glycin107 zu einem Serin im zytoplasmatischen Eingangsbereich. Für die PfFNT Mutante G107S wurde ein vielfach höherer IC₅₀-Wert von $21 \pm 1 \mu\text{M}$ im hefe-basierten Aufnahmeassay und von $35 \pm 4 \mu\text{M}$ in der Parasitenkultur ermittelt [57].

1.4 Strukturaufklärung neuartiger Wirkstofftargets in der Malariatherapie

Wie in Kapitel 1.1 beschrieben, ist die Entwicklung neuer Wirkstoffe zur Therapie von Malaria Erkrankungen dringend notwendig. In Kapitel 1.3 wird in diesem Kontext mit dem plasmodialen Laktattransporter (PfFNT) ein vielversprechendes neues Wirkstofftarget und zusätzlich ein erster Inhibitor vorgestellt. Allerdings kündigt sich auch hier, wie bei bereits verwendeten Wirkstoffen in der Therapie, die Ausbildung von Resistenzen an.

Um Resistenzbildungen zu umgehen oder neue Wirkstoffe zu entwickeln, ist im Rahmen des *modern drug designs* die Kenntnis des Wirkstofftargets in atomarer Auflösung von besonderem Interesse. Eine Vielzahl der Targetstrukturen im menschlichen Organismus aber auch in Pathogenen wie *P. falciparum* sind Proteine und im speziellen Membranproteine [59, 60]. Die Kristallisation von Proteinen stellt hier eine schon viele Jahre etablierte, dennoch keinesfalls triviale Methode zur Strukturaufklärung dar.

1.4.1 Gewinnung von Membranproteinen mit *Pichia pastoris*

Für die rekombinante Herstellung großer Mengen eukaryotischer Membranproteine, wie im hier beschriebenen Fall des plasmodialen Laktattransporters (PfFNT), ist die Auswahl des Expressionssystems von besonderem Interesse. Eine sehr gängige Methode große Menge an Membranprotein zu produzieren, ist die rekombinante Expression in einem *E. coli* Expressionssystem. Unkomplizierte gentechnologische Manipulation und einfache Kultivierungsbedingungen sprechen für das prokaryotische System. Allerdings ist hier zu bedenken, dass bakterielle Systeme durch fehlende Proteinfaltungskontrollen sowie fehlenden posttranslationalen Modifikationen und unspezifischen Lipideinbettungen nicht immer optimale Bedingungen für die Expression von Membranproteinen darstellen [61]. Besser geeignete Alternativen, insbesondere für die Expression von aus Eukaryoten stammenden Membranproteinen, stellen Systeme basierend auf *Pichia pastoris* [62–65], *Saccharomyces cerevisiae* [66, 67] oder *Spodoptera frugiperda* Insektenzellen [68] dar. Neben den auf Zellen basierenden Expressionssystemen, bietet sich auch ein zellfreies

Einleitung

Expressionssystem zur Herstellung von Membranproteinen an [69]. Beim Einsatz zellfreier Expressionssysteme sind allerdings auch fehlende zelluläre Sicherungssysteme zu bedenken [69]. Der in Kapitel 1.3 beschriebene plasmodiale Laktattransporter (*PfFNT*) wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits vielfach in einem auf *E. coli* basierenden zellfreien Expressionssystem hergestellt [70, 71].

Im Folgenden soll *P. pastoris* als vielversprechende Alternative vorgestellt werden. *P. pastoris* ist eine Hefe aus der Familie der Saccharomycetaceae und wurde 1995 als *Komagatella phaffii* neu klassifiziert. In der Biotechnologie und auch in dieser Arbeit wird der Name *Pichia pastoris* weiterhin verwendet.

Erstmalige Erwähnung von *P. pastoris* in der Proteinproduktion fand 1969 statt. *P. pastoris* wird hier als Organismus beschrieben, der Methanol als einzige Kohlenstoffquelle für den Energiestoffwechsel verwenden kann [72, 73]. Im Folgendem kam der methylorophe Organismus als gut verfügbare und im Großmaßstab zu hohen Zelldichten wachsende Proteinquelle in der Tiermast zum Einsatz [74]. Die Entwicklung als System für die rekombinante Proteinexpression erfolgte durch den US Konzern Phillips Petroleum in Kooperation mit dem Salk Institute Biotechnology/Industrial Associates, Inc. (CA) und wird heute als Marke von Invitrogen™ kommerziell vertrieben [63].

P. pastoris metabolisiert Methanol im ersten Schritt durch die Alkoholoxidasen (*AOX1* & *2*) unter Oxidation zu Formaldehyd unter Bildung von Peroxiden. Zur Umgehung der Toxizität findet die Reaktion in den Peroxysomen der Hefe statt [75].

Die Regulation des hauptverantwortlichen *AOX1*-Gens unterliegt einem zweistufigen Prozess. Mit Methanol wird die Reaktion induziert, während Glucose oder Glycerol zu einer Repression des *AOX1*-Gens führen [76]. Mit der Erweiterung des Genabschnitts der *AOX1* um die Basensequenz des Zielproteins, kann der Mechanismus des induzierbaren *AOX1*-Promotors für die rekombinante Proteinherstellung genutzt werden. Mit der Zufuhr von Glucose oder Glycerol als Kohlenstoffquelle wird nur eine geringe Transkription der *AOX1* erreicht. Für Expression von rekombinanten Proteinen wird daher zunächst Glucose oder Glycerol zum Anwachsen der Zellkultur genutzt und anschließend durch Zugabe von Methanol die Transkription von *AOX1* und des Zielproteins induziert. Neben der *AOX1* wird ebenfalls die *AOX2* exprimiert. Mit einer 10–20-fach geringeren Aktivität wird diese aber nicht zur

Einleitung

rekombinanten Proteinexpression verwendet [77]. Neben der *AOX1* & 2 stehen weitere induzierbare Promotoren zur Verfügung [78].

Für die rekombinante Proteinexpression können kommerziell mehrere *P. pastoris*-Stämme erworben werden. Dazu zählen unter anderem der Wildtyp-Stamm X-33, der Histidin-auxotrophe Stamm GS115 [78, 79], der *AOX1* Knockout Stamm KM71 sowie KM71H, die Protease-Knockout Stämme SMD1168 und SMD1168H [78] sowie der für diese Arbeit verwendete Adenin-auxotrophe Stamm PichiaPink™.

PichiaPink™ weist eine *ADE2*-Deletion auf. *ADE2* codiert für die Phosphoribosylaminoimidazol Carboxylase. Diese katalysiert die *de novo* Biosynthese der Purinnukleotide.

Als *ade2* auxotropher Stamm, kann PichiaPink™ nicht vollständig auf Adenin-Mangelmedien wachsen. Diese Besonderheit wird zur Selektion von Klonen nach der Transformation des Expressionsvektors genutzt [80]. Die Integration der linearisierten Plasmid-DNA in die genomische DNA erfolgt über homologe Rekombination. Das Plasmid weist das fehlende *ADE2*-Gen in gekürzter Form auf. Erst nach erfolgreicher Integration und vielfacher Kopie der DNA ist vollständiges Wachstum auf Adenin-Mangelmedien möglich. Neben der Selektion auf Adenin-Mangelmedien ist zusätzlich eine Farbselektion mit Vollmedien möglich. Bei vorhandener *ADE2*-Deletion akkumulieren rot gefärbte Purin Vorstufen in der Vakuole des Organismus, sodass zwischen pink- und grau-farbenden Klonen selektiert werden kann [80]. Neben der Selektion kann über die Färbung der Klone indirekt auf das Expressionslevel des Zielproteins geschlossen werden [81, 82]. Nach erfolgreicher Selektion wird die Proteinexpression der einzelnen Klone in Schüttelkulturen überprüft und Klone aus der Kultur mit der höchsten Proteinausbeute erneut selektiert.

Für die Expression von großen Mengen Protein bietet sich die Produktion im Großmaßstab im Fermenter an. Vorteilhaft ist dabei vor allem, die Kontrolle der Produktionsparameter wie Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffsättigung des Mediums sowie die Zufuhr der Kohlenstoffquelle, insbesondere von Methanol [83]. Unter entsprechend optimalen Bedingungen können Zellmassen von $> 200 \text{ g l}^{-1}$ produziert werden [83].

P. pastoris stellt durch Kombination aus leichter Handhabung, geringen Kosten und posttranslationalen Modifikationen ein interessantes und immer häufiger genutztes Expressionssystem für eukaryotische Membranproteine dar [84, 85].

Einleitung

Zur Gewinnung von reinem Protein schließt sich an die erfolgreiche Expression des Zielproteins der Prozess der Proteinisolierung an. Im Fall von Membranproteinen schließt das die Isolierung der Plasmamembranen und die anschließende Solubilisierung des Proteins mit Detergenzien aus der Lipidumgebung der Membranen ein. Eine Vielzahl an Detergenzien steht dabei zur Auswahl [86]. Dabei stellen Amid-Oxid-Detergenzien wie Dimethyldodecylamin *N*-Oxid (LDAO), Glucosid-Detergenzien wie Octyl β -D-Glucopyranosid (β -OG) und Maltosid-Detergenzien wie *n*-Dodecyl β -D-Maltosid (DDM) die am häufigsten verwendeten Detergenzien dar [87, 88]. Die Auswahl des passenden Detergens zur Solubilisierung ist sowohl für die Proteinausbeute und Stabilität [89–92] als auch für die spätere Kristallisation (1.4.2) von entscheidender Bedeutung [86].

1.4.2 Reinigung und Kristallisation von Membranproteinen

Die Röntgenkristallographie ist bis heute die erfolgreichste Methode der Strukturanalyse von Membranproteinen [93]. Die Zahl der aufgeklärten Strukturen nimmt stetig zu und hat sich im letzten Jahrzehnt nahezu verdreifacht [94].

Nichtsdestotrotz zeigt sich mit 857 aufgeklärten Membranproteinstrukturen (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc> - Stand Januar 2019) gegenüber 147.708 insgesamt aufgeklärten Proteinstrukturen [93] eine klare Herausforderung bei der Strukturaufklärung von Membranproteinen.

Der Flaschenhals bei der Aufklärung entsteht hier schon zu Beginn durch die hohen Anforderungen an die gereinigte Proteinprobe.

Für die Kristallisation von Membranproteinen werden hohe Konzentrationen von gereinigtem und nativ vorliegendem Protein, üblicherweise 5-15 mg ml⁻¹, benötigt [95]. In Kapitel 1.4.1 wurden schon verschiedene Expressionssysteme zur Herstellung solch hoher Konzentrationen angesprochen und *P. pastoris* als interessantes System vorgestellt.

Zur Gewinnung von reinem Protein wird nach der erfolgreichen Expression der Prozess der Proteinisolierung angeschlossen. Im Fall von Membranproteinen schließt das die Isolierung der Plasmamembranen und die anschließende Solubilisierung des Proteins mit Detergenzien aus der Lipidumgebung der Membran ein. Die Reinigung umfasst in der Regel mehrere Phasen. Häufig stellt eine Metall-Affinitäts-Chromatographie (IMAC) einen effizienten und kostengünstigen ersten Reinigungsschritt dar. Hierbei wird das zu isolierende Protein von

Einleitung

weiteren Bestandteilen des Gesamtprotein-Solubilisats abgetrennt [96, 97]. Die Weitere Reinigung erfolgt häufig durch Größenausschlusschromatographie (SEC). Anhand des Chromatogramms können Informationen über den Reinigungsgrad und den Oligomerisierungszustand des Proteins ermittelt werden. Hier wird auch der zentrale Einfluss des stabilisierenden Detergens auf Bindung und Elution deutlich. Die Homogenität der Proteinfraktion kann durch Veränderung des Oligomerisierungszustandes stark beeinflusst werden [98, 99]. Zusätzlich oder alternativ zur Größenausschlusschromatographie kann auch die Methode der Ionen-Austausch-Chromatographie verwendet werden. An diesem Reinigungsschritt ist, genauso wie mit der Metall-Affinitäts-Chromatographie ein Puffertausch für ein weiteres Detergens oder ein Aufkonzentrierungsschritt möglich [100]. Zum Entfernen von überschüssigen Detergenzien kann final ein Dialyseschritt durchgeführt werden [86, 100].

Die Auswahl des geeigneten Detergens zur Solubilisierung ist sowohl für die Proteinausbeute und Stabilität [89–92] als auch für die spätere Kristallisation von entscheidender Bedeutung [86, 101]. Eine generelle Regel für die Auswahl geeigneter Detergenzien existiert dabei nicht [86]. Die am häufigsten verwendeten Detergenzien stellen die Amid-Oxid-Detergenzien wie Dimethyldodecylamin *N*-Oxid (LDAO), Glucosid-Detergenzien wie Octyl β -D-Glucopyranosid (β -OG) und Maltosid-Detergenzien wie *n*-Dodecyl β -D-Maltosid (DDM) dar [87, 88]. Durch ein ideales Detergens wird das gesamte Protein aus den Lipidmembranen solubilisiert und liefert über den gesamten Reinigungs- und Kristallisationsprozess einen stabilen Protein-Detergens-Komplex. Nicht zwingend muss ein Detergens über den gesamten Prozess beibehalten werden. So bietet sich die Möglichkeit ein harsches Solubilisierungsdetergens gegen ein mildes Detergens zur Stabilisierung im nachfolgenden Reinigungsprozess auszutauschen [99]. Entstehende Mischmizellen können dabei vorteilhaft bei der Kristallisation sein [102]. Bereits erfolgreich aufgeklärte Strukturen zeigen, dass der Wechsel zu Detergenzien mit kürzeren lipophilen Kohlenstoffketten die Auflösung der Struktur verbessern kann [103, 104].

Vor anschließenden Kristallisationsversuchen wird die Funktionalität des gereinigten Proteins überprüft. Im Fall von Membranproteinen stellt dies eine besondere Herausforderung dar. Als integrale Membranbestandteile setzen diese häufig keine Substrate um, anhand dessen eine Funktionsprüfung durchgeführt werden kann. Vielmehr kann diese über eine Leitfähigkeit physiologischer Substrate charakterisiert werden [105–108]. Leitfähigkeitsmessungen des

Einleitung

gereinigten Proteins können nach Integration in künstlichen Membranen durchgeführt werden [109]. Alternative Funktionsuntersuchungen sind über die spezifische Bindung von Inhibitoren denkbar. Im Fall des vorgestellten plasmodialen Laktattransporters *PfFNT* ist dies durch bereits charakterisierte Inhibitoren ein Ansatzpunkt [57].

Für die letztendliche Kristallisation des Proteins werden das *Vapor-diffusion*-Verfahren [95, 110], das *microbatch*-Verfahren [111] und die *In-Meso*-Kristallisation [112] unterschieden. Neben der klassischen Röntgenkristallographie wurde im zurückliegenden Jahrzehnt auch die *single-particle cryo electron microscopy* (Cryo EM) etabliert [113].

Das in dieser Arbeit verwendete *Vapor diffusion*-Verfahren unterteilt sich in die Kristallisation nach dem *hanging-drop* und *sitting-drop* Ansatz. Bei beiden Ansätzen wird das gereinigte Protein normalerweise zunächst 1:1 mit Kristallisationspuffer versetzt. In einem abgeschlossenen Raum wird durch Dampfdiffusion eine Übersättigung mit Protein herbeigeführt. Durch die entstandene Übersättigung kann es zur Bildung von Kristallisationskeimen kommen und zum Wachsen einer Kristallstruktur. Der Kristallisationspuffer setzt sich aus einem Präzipitanten, wie Salzen, organischen Lösungsmitteln oder langkettigen Polymeren und pH-Wert-stabilisierenden Puffersubstanzen zusammen. Hinzugefügte Additive können dabei die Ausbildung von Kristallisationskeimen unterstützen oder das Kristallwachstum fördern [95]. Neben der passenden Zusammensetzung des Kristallisationspuffers haben unter anderem Proteinkonzentration, das stabilisierende Detergens und die Umgebungstemperatur des Kristallisationsansatzes eine entscheidende Wirkung auf die Bildung von Kristallisationskeimen.

Der Prozess der Kristallbildung wird in einem zweidimensionalen Phasendiagramm schematisch dargestellt werden (Abbildung 1-6). Die beeinflussbaren Parameter bilden die Proteinkonzentration und variable Parameter, die sich auf die Zusammensetzung des Kristallisationspuffers, den pH-Wert sowie die Temperatur beziehen. Unterteilt wird das Phasendiagramm in die Phasen der Über- und Untersättigung, Präzipitationszone, Kristallisationszone und in eine metastabile Zone. Im Fall der Untersättigung kommt es zu keiner Proteinkristallisation auf Grund der zu geringen Proteinkonzentration, während im Fall der hohen Übersättigung das Protein in der Präzipitationszone präzipitiert. Zur Kristallbildung kommt es in der Kristallisationszone, in der Proteinübersättigung und Kristallisationsbedingungen zur spontanen Kristallkeimbildung führen. In der metastabilen

Einleitung

Zone kommt es zum Wachstum oder zur Stabilisierung des Kristalles aber zu keiner Kristallkeimbildung.

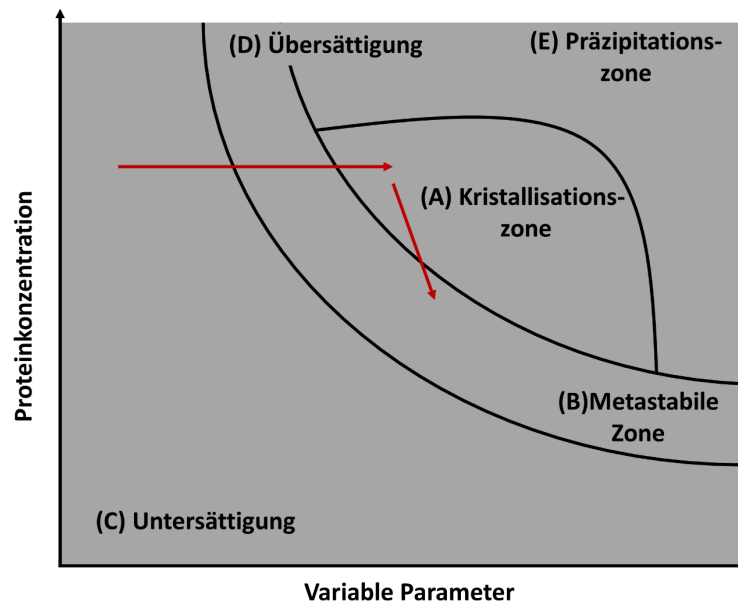


Abbildung 1-6: Schematische Darstellung der Kristallisationsphasen in Abhängigkeit der Proteinkonzentration und variablen Parameter wie Kristallisationspuffer, pH-Wert und Temperatur. Durch Veränderung der Proteinkonzentration und der variablen Parameter werden verschiedene Phasen der Kristallisation erreicht. Beispielhafte Darstellung durch die roten Pfeile. Abbildung abgeleitet von [114].

Die ersten Kristallisationsansätze werden in der Regel mit einem *initial-screen* durchgeführt. Auf diese Weise kann im Kleinmaßstab eine große Auswahl an Kristallisationspuffer und weiteren variablen Parametern getestet werden.

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es den plasmodialen Laktattransporter *PfFNT* für spätere Strukturaufklärungsversuche herzustellen und zu reinigen. Dabei sollte die Expressionsmethode mit *P. pastoris* und die Isolierung des reinen Proteins in der Arbeitsgruppe etabliert werden. Während der Isolierung sollte der Einfluss verschiedener Detergenzien auf die Ausbeute und Stabilität des Proteins überprüft und dieser auch in Bezug auf die Kristallisation untersucht werden.

Die Aufklärung der Struktur des plasmodialen Laktattransporters *PfFNT* ist für die weitere Untersuchung von Wirkmechanismen schon charakterisierter Inhibitoren sowie Identifikation neuer Therapiepfade in der durch viele Resistenzen geprägten Malariatherapie von großer Bedeutung.

Material

2 Material

2.1 Enzyme, Chemikalien, Kits, Material

Anatrace, Maumee, USA

n-Octyl- β -D-Glucopyranoside (β -OG), n-Decyl- β -D-Maltopyranoside (DM),

n-Dodecyl-n- β -D-Maltopyranoside (DDM), Dodecyl-N,N-Dimethylamine-N-Oxide (LDAO),

Popular Detergent Kit, Pentaethylene Glycol Monoethyl, Fos-Cholin 12 (FC 12)

AppliChem, Darmstadt

Calciumacetat, Magnesiumchlorid, Zinkacetat, Natriumlaurylsulfat,

Natriumlactat

Avanti Polar lipids, Alabaster, USA

E. coli Polar Lipid Extract Powder

Becton, Dickinson and Company, Heidelberg

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

Bacto™ Pepton

Beckman Coulter, Krefeld

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

26,3 ml und 70 ml Centrifuge Bottles Polycarbonate

Bio-Rad, München

Bio-Rad Protein Assay, Poly-Prep Chromatography columns, Clarity™ ECL Westernblotting Substrates

Material

GE Healthcare, Freiburg

PD-10 Desalting Columns, Q Sepharose Fast Flow, PD MidiTrap G-25, HisTrap excel 1 ml, Blotting Membranes, Amersham™ Hybond™ 0.45

PVDF, Whatman Chromatography Paper 3MM

Genaxxon BioScience, Ulm

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

Jena Bioscience, Jena

Membrane HTS96™

J.T. Baker, München

Ethanol, Methanol, Isopropanol, Essigsäure, Salzsäure, Schwefelsäure

Merck Chemicals, Darmstadt

Amicon Ultra-4, PLTK Ultracel-PL Membran, 30 kDa und 100 kDa,

Amicon Ultra-15, PLTK Ultracel-PL Membran, 30 kDa und 100 kDa

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromid

Molecular Dimensions, Suffolk, UK

MemGold™, MemGold2™, MemTrans™

New England BioLabs GmbH, Frankfurt

OneTaq®DNA Polymerase

Oxoid, Basingstoke, USA

Agar bacteriological

Peqlab, Erlangen

PeqGOLD Prestained Protein Marker III

Material

Promega, Mannheim

Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System

Qiagen, Hilden

Ni-NTA-Agarose

Roth, Karlsruhe

LB-Medium, Milchpulver blotting grade, Rotiphorese® Blau R, Rotiphorese®Gel 40, 2-

Mercaptoethanol, Dialysierschlauch Visking, Natriumazid, alle weiteren nicht aufgeführten Chemikalien

Sartorius, Göttingen

Cellulose-Acetat Filter 0,2 µm

Sigma Aldrich, München

Biotin, Brij78®, Natriumformiat, Lithiumacetat, Eisensulfat Heptahydrat, Imidazol, 6-Aminocaprylsäure, CHAPS, Cobaltchlorid, Magnesiumacetat, Natriumiodid, Zinkchlorid, Polyoxyethylenglycol 8000, Polyoxyethylenglycol 2000, Polypropylenglycol 2000, Harnstoff,

L-Asparagin, L-Arginin, L-Cystein, L-Glutamin, L-Lysin, L-Phenylalanin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Aspartat, Adenin, Uracil, L-Thyrosin, L-Tryptophan, L-Threonin, L-Alanin, L-Glutamat, L-Prolin, L-Serin

Coomassie G250, *Glassbeads* (säuregewaschen)

Süd-Laborbedarf, Gauting

Hi Yield®Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit

Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Restriktionsendonukleasen, dNTPs, T4-DNA-Ligase

Material

2.2 Geräte

Beckman Coulter, Krefeld

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

DNA Sequencer CEQ™ 8000

Bio-Rad, München

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

BioSpec Products, Bartlesville, USA

Beadbeater

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf

BioPhotometer, Centrifuge 5424 R, Innova U535

GE Healthcare, Freiburg

Äkta Purifier 10, Superdex 200 10/300 GL

Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

Wasserbad

Greiner Bio-One, Frickenhausen

Deckglas rund silikonisiert 18 mm Stärke 2, ComboPlate 24 Well vorgefettet,

96 Well Microplate PS µClear Chimney Well

Heraeus Holding, Hanau

Multifuge 1S-R, Kelvitron T (Brutschrank)

Infors HT, Bottmingen

Brutschrank Minitron

Jasco, Gross-Umstadt

Stopped-Flow BioLogic: Software BioKine Ver 4.42, Küvette

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

Mischeinheit SFM-300 & SFM 2000, UV/Vis-und Fluoreszenzspektrometer MOS-200, Monochromator

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

Material

Keison International, Essex, UK

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

PerkinElmer, Waltham, USA

Fluorimeter LS 55

Peqlab, Erlangen

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

Roche Diagnostics, Mannheim

Bild-Dokumentationssystem Lumi Imager™ F1

Savant Instruments, Farmingdale, USA

Vakuumentrifuge DNA SpeedVac®DNA 110

Sartorius AG, Göttingen

BIOSTAT®APlus

Scientific Industries, Bohemia, USA

Vortex®-Genie 2

Schott Instruments, Mainz

Digital-Labor-pH-Meter Lab 850

2.3 Plasmide

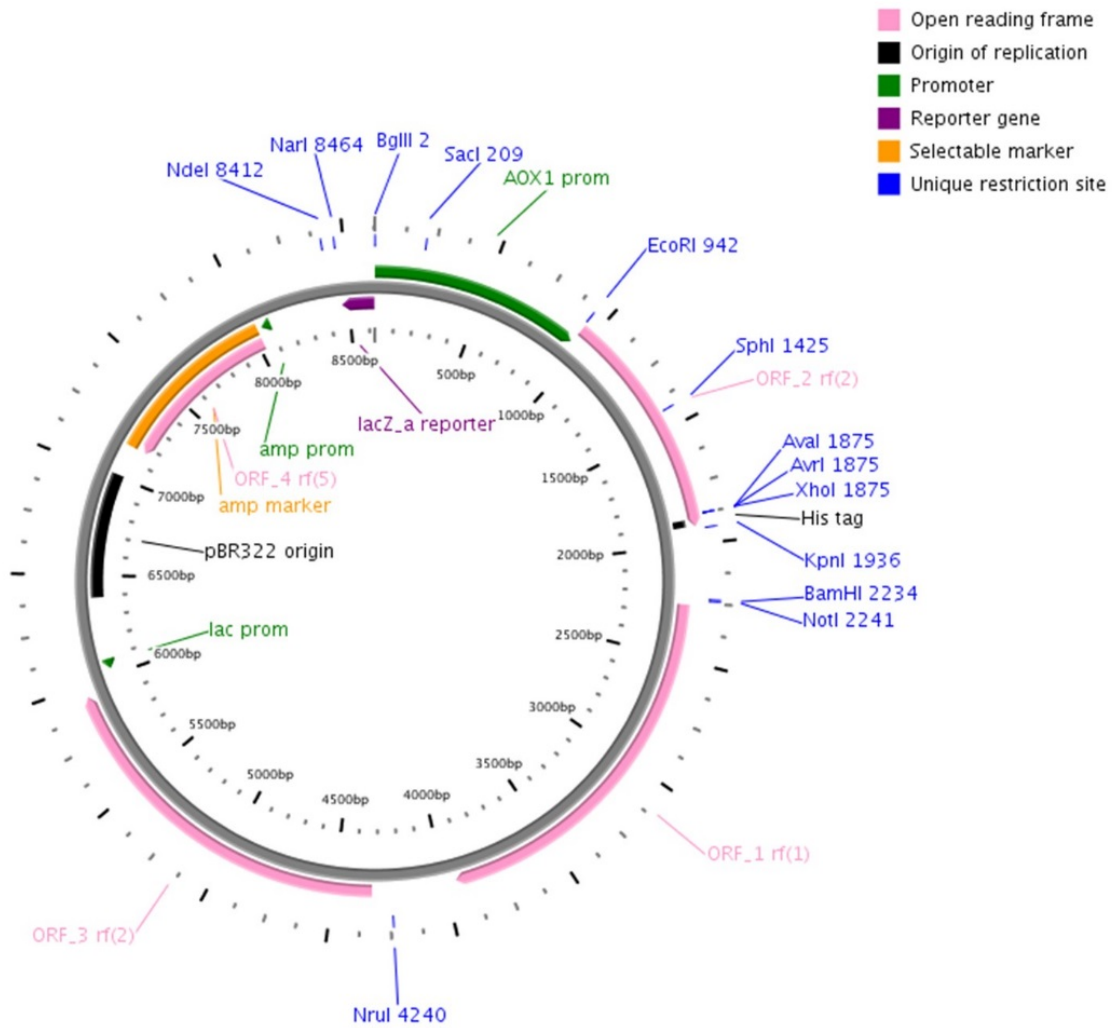


Abbildung 2-1: pPink_FXa_His_opt. PffNT. Abbildung erstellt durch PlasMapper [115].

2.4 Codierende DNA Sequenzen

Name	Beschreibung	Gene ID
PffNT	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>P. falciparum</i>	814480

2.5 Sequenzierprimer

Bezeichnung	Sequenz	Sinn
AOX1	CGA CTG GTT CCA ATT GAC AAG C	s
CYC1	GGA GGG CGT GAA TGT AAG CG	as

2.6 *E. coli*-Stämme

Name	Genotyp
DH5α	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>

2.7 *P. pastoris/ Komagataella phaffii*-Stämme

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

2.8 Antikörper

Primärantikörper	Beschreibung	Verdünnung
Penta His	monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen 5 x Histidin gerichtet; Qiagen	1:5000 in MTBST

Sekundärantikörper	Beschreibung	Verdünnung
Anti-Maus	polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen die leichte Seitenkette des Maus IgG, Meerrettich-Peroxidase konjugiert; Jackson ImmunoResearch, UK	1:5000 in MTBST

2.9 Puffer, Medien, Lösungen

2.9.1 Molekularbiologie

Agarose-Gel-Elektrophorese

TAE-Puffer:

40 mM Tris-Acetat, pH 8,0

1 mM EDTA

Aqua bidest.

Ethidiumbromid (10 mg ml⁻¹):

1 Tablette Ethidiumbromid

10 ml *Aqua bidest.*

Material

10 x Probenpuffer (Orange G):

0,4 % Orange G

30 % Glycerol

100 mM EDTA

Aqua bidest.

***E.Coli* Medien:**

LB-Medium:

20 g LB-Medium (Lennox)

1 l *Aqua bidest.*

ggf. Ampicillin 100 µg/ml

ggf. Kanamycin 40 µg/ml

LB-Agar:

35 g LB-Agar

1 l *Aqua bidest.*

ggf. Ampicillin 100 µg/ml

ggf. Kanamycin 40 µg/ml

2.9.2 Proteinchemie

***P. pastoris* Medien:**

YPD:

20 g Pepton

10 g Hefeextrakt

20 g Glucose

ad 1 l *Aqua bidest.*

SD-Medium:

1,7 g YNB

5 g Ammoniumsulfat

20 g Glucose

ad 1 l *Aqua bidest.*

YPD-Platten:

20 g Oxoid Agar

1 l YPD Medium

SD-Platten:

20 g Oxoid Agar

1 l SD Medium

Material

BMGY:

1 % Hefeextrakt
2 % Pepton
1,34 % YNB
1 % Glycerol
100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 6,0

BMMY:

1 % Hefeextrakt
2 % Pepton
1,34 % YNB
0,5 % Methanol
100 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄, pH 6,0

P. pastoris Spurenelemente:

6,0 g Kupfersulfat Pentahydrat
0,08 g Natriumiodid
3,0 g Mangansulfat Dihydrat
0,2 g Natriummolybdat Dihydrat
0,02 g Borsäure
0,5 g Kobaltchlorid
20,0 g Zinkchlorid
65,0 g Eisen(II)sulfat Heptahydrat
0,2 g Biotin
5,0 ml Schwefelsäure
ad 1 l *Aqua bidest.*

Antifoam:

Polypropylenglycol 2000
50 % Aqua bidest.

YPDS:

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

P. pastoris-Fermentations-Medium:

53,4 ml Phosphorsäure 85 %ig
1,86 g Calciumsulfat
36,4 g Kaliumsulfat
29,8 g Magnesiumsulfat Heptahydrat
8,26 g Kaliumhydroxid
80,4 ml Glycerol
ad 2 l *Aqua bidest.*

Material

Glycerol für Fermentation:

116 ml Glycerol 86 %ig
2,5 ml *P. pastoris* Spurenelemente
Ad 200 ml *Aqua bidest.*

Methanol für Fermentation:

395 ml Methanol
5 ml *P. pastoris* Spurenelemente

Salzsäure für Fermentation:

16,7 ml Salzsäure 37 %ig
Ad 200 ml *Aqua bidest.*

Ammoniumhydroxid für Fermentation:

200 ml Ammoniumhydroxid 25 %ig

Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *P. pastoris*:

Puffer B:

25 mM Tris-HCl, pH 7,5
5 mM EDTA
Aqua bidest.

Puffer M:

100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 8,0
50 mM NaCl
Aqua bidest.

Solubilisierung *P. pastoris*:

Solubilisierungspuffer:

20 mM Tris, pH 7,8 (4 °C)
200 mM NaCl
10 % Glycerol
Detergens (Tabelle 3-1)
Aqua bidest.

Material

Reinigungspuffer:

Protein-Reinigungspuffer:

20 mM Tris-HCl, pH 7,8

200 mM NaCl

10 % (V/V) Glycerol

Detergens (Tabelle 3-2)

Aqua bidest.

Protein-Reinigungspuffer für die

Kristallisation:

20 mM Tris-HCl, pH 7,8

50 mM NaCl

2,5 % (V/V) Glycerol

Detergens (Tabelle 3-2)

Aqua bidest.

SDS-PAGE:

Trenngelpuffer 4x:

1,5 M Tris, pH 8,8

0,4 % SDS

Aqua bidest.

Sammelgelpuffer 4x:

1,5 M Tris-HCl, pH 6,4

0,4 % SDS

Aqua bidest.

Kathodenpuffer:

25 mM Tris-HCl, pH 8,2-8,6

192 mM Glycin

0,1 % SDS

Aqua bidest.

SDS-Ladepuffer 4x:

25 mM Tris-HCl, pH 6,8

40 % Glycerol

0,02 Bromphenolblau

8 % SDS

40 mM DTT

Aqua bidest.

Entfärbelösung:

10 % Eisessig

30% Ethanol

Aqua bidest.

Material

Westernblot:

TBS 10 x:

0,2 M Tris-HCl, pH 7,6

1,35 M NaCl

Aqua bidest.

TBST:

100 ml TBS 10 x

1 ml Tween 20

ad 1000 ml Aqua bidest.

M-TBST:

3 % Milchpulver in TBST

Transferpuffer 5 x:

5 mM Tris, pH 8,3 (nicht eingestellt)

38,4 mM Glycin

0,0075 SDS

20 % Methanol

Aqua bidest.

Liposomen

Liposomenpuffer:

5 mM HEPES, pH 6,8 (4 °C)

5 mM MES, pH 6,8 (4 °C)

200 mM Saccharose

100 mM Kaliumchlorid

Gradientenlösung:

5 mM HEPES, pH 6,8 (4 °C)

5 mM MES, pH 6,8 (4 °C)

200 mM Saccharose

100 mM Kaliumchlorid

400 mM L-Laktat als Natriumsalz

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren wurde das *Wizard® Plus SV Minipreps* DNA Purification System verwendet. Hierzu wurde eine Kolonie in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin als Selektionsantibiotikum überführt und über Nacht rotierend bei 37 °C inkubiert. 4 ml der Übernachtskultur wurden zur Isolierung von Plasmid-DNA nach Herstellerangaben eingesetzt. Abweichend von den Herstellerangaben wurde keine alkalische Protease hinzugesetzt sowie zur Elution 50 µl statt 100 µl *Aqua bidest.* verwendet.

3.1.2 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Proben wurde mit Hilfe von Absorptionsmessungen bei 260 und 280 nm mit dem BioPhotometer vorgenommen. Die Konzentration wurde mit folgender Formel ermittelt.

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

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

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

Die Reinheit wurde über das Verhältnis von $A_{260 \text{ nm}}$ zu $A_{280 \text{ nm}}$ ermittelt. Eine hohe Absorption bei 280 nm weist auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin. Ab einem Verhältnis von 1,8-2,0 wurde von einer ausreichenden Reinheit ausgegangen.

3.1.3 Restriktionsverdau

Für einen Verdau von 1 µg DNA wurden 5-8 U des Restriktionsenzym eingesetzt. Der Ansatz wurde bei 37 °C für 3 h in einem kompatiblen Puffer inkubiert. Es wurde ein Gesamtvolumen von 10-20 µl verwendet.

Für einen zeitgleichen Verdau mit zwei Enzymen wurde ein für beide Restriktionsenzyme kompatibler Puffer eingesetzt.

Methoden

3.1.4 Ligation

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit T4-DNA-Ligase und zugehörigem Puffer durchgeführt. Es wurde ein Insert-Vektor-Verhältnis von 3 : 1 oder 7 : 1 eingesetzt und der Ansatz für 30 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert.

Gegebenenfalls wurden im Vorhinein nicht passend ligierbare Strangüberhänge mit T4-DNA-Polymerase und Desoxynukleotiden aufgefüllt.

3.1.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde zur Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten verwendet.

Es wurde ein Agarosegel aus 50 ml TAE-Puffer und 1 % Agarose hergestellt. Zum Lösen der Agarose wurde der TAE-Puffer in einer Mikrowelle aufgeköcht. Verdunstete Flüssigkeit wurde durch *Aqua bidest.* ersetzt. Zur späteren Detektion der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde 1 µl Ethidiumbromid (10 mg ml⁻¹) hinzugefügt.

Das Aushärten des Gels erfolgte in einer Gießform, die anschließend in die mit TAE-Puffer gefüllte Laufkammer überführt wurde. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 1 : 10 mit Ladepuffer versetzt und in die Taschen einpipettiert. Als Größenvergleich wurde der λ-DNA-Pst-I Marker verwendet.

Die größenabhängige elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte bei 120 V über einen Zeitraum von 30 min. Durch Interkalation von Ethidiumbromid konnten die DNA-Fragmente bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm detektiert werden.

Zur weiteren Verwendung wurden einzelne Fragmente mit einem Skalpell herausgeschnitten und mit dem Hi Yield® Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit gereinigt.

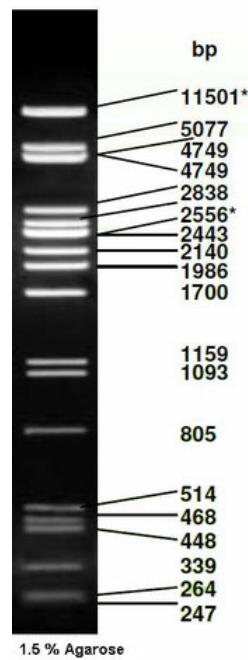


Abbildung 3-1: Mit *Pst*-I verdaute λ -DNA für die Agarose-Gel-Elektrophorese, verdaut mit *Pst* I.

3.1.6 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden zu 100 μ l dieser Zellen ligierte Plasmide hinzupipettiert und für 30 min auf Eis, 1 min bei 42 °C und weitere 2 min auf Eis inkubiert. Folgend wurden die Zellen mit 900 μ l LB-Medium vermischt und 45 min rotierend bei 37 °C erneut inkubiert.

Im Anschluss wurde die Zellsuspension für 30 s bei 13.000 *g* zentrifugiert und das entstandene Pellet mit 100 μ l des Überstandes resuspendiert. Die Zellsuspension wurde daraufhin auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.7 Schnelltransformation von *E. coli*

Es wurden 0,2 μ l der Minipräparation von Plasmid-DNA auf angetaute chemisch kompetente *E. coli*-Zellen pipettiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden 40 μ l der Zellsuspension auf einer ampicillinhaltigen LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.8 Dauerkulturen von *E. coli*

E. coli-Dauerkulturen wurden aus 1 ml frischer Übernachtskultur vermischt mit 500 μ l 80 %igem Glycerol zur Kryoprotektion hergestellt und bei -80 °C gelagert.

Methoden

3.1.9 Transformation von *P. pastoris*

Für die Transformation wurden am Vortag 10 µg Plasmid-DNA mit *Spe I*, wie in 3.1.3 beschrieben, über Nacht bei 37 °C linearisiert.

Der Verdau wurde mit 12 µl eiskalter 100 mM EDTA-Lösung (pH 8,0) und 13 µl *Aqua bidest.* gestoppt und anschließend mit 6,2 µl 3 M Natriumacetat und 155 µl eiskaltem 100 %igen Ethanol präzipitiert. Es folgte eine zweimalige Zentrifugation bei 13.500 U min⁻¹ für 15 min bei 4 °C und Waschen des Pellets mit eiskaltem 70 %igen Ethanol. Das erhaltene DNA-Pellet wurde zur weiteren Verwendung in 10 µl *Aqua bidest.* resuspendiert.

Mit frisch herangewachsenen *P. pastoris*-Zellen von Kolonien des pPink™-Stammes 1 wurden zunächst 10 ml YPD Medium inokuliert und diese Vorkultur für 8-24 h bei 30 °C und 200 U min⁻¹ inkubiert. Die Vorkultur wurde zum Animpfen einer Hauptkultur verwendet, die über Nacht ebenfalls bei 30 °C und 200 U min⁻¹ bis zur Ziel-OD₆₀₀ von 1,3 bis 1,5 inkubiert wurde.

Die Zellen wurden bei 1.500 g für 5 min bei 4 °C geerntet und anschließend mit 250 ml eiskaltem *Aqua bidest.* gewaschen. Es folgte ein weiterer Ernte- und Waschschriff mit 50 ml eiskaltem *Aqua bidest.* Anschließend wurde die Zellmasse in 10 ml eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert und erneut bei 1.500 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und in 300 µl 1 M Sorbitol resuspendiert. Die resuspendierten, nun elektrokompetenten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bis zu 8 h auf Eis gelagert.

Für die Transformation wurden 80 µl der elektrokompetenten Zellen und die zuvor linearisierte DNA in eine eiskalte Elektroporationsküvette mit einem Elektrodenabstand von 0,2 cm pipettiert, für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend elektroporiert. Hierfür wurden ein Widerstand von 200 Ω, eine Spannung von 2 kV und eine Kapazität 25 µF eingestellt. Nach erfolgter Elektroporation wurde die Zellen in der Küvette mit 1 ml eiskaltem YPDS Medium vermischt und für 2-12 h bei 30 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden 100 µl und 300 µl der Zellsuspension auf SD-Agarplatten ausgestrichen und für 3-10 Tage bei 30 °C inkubiert. Die weißen Klone wurden erneut auf SD-Agar ausgestrichen und inkubiert. Auf erfolgreiche Transformation und Integration in die genomische DNA wurde durch eine *colony*-PCR mit den Primern *AOX1* und *CYC1* überprüft.

Methoden

3.1.10 Dauerkulturen von *P. pastoris*

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

3.2 Proteinchemische Methoden

3.2.1 Proteingewinnung aus *P. pastoris*

Die Herstellung von PfFNT in *P. pastoris* wurde mit dem PichiaPink™ Expressionssystem durchgeführt. Es wurde der pPink HC-Vektor mit einem 10-fachen His-tag und einer Faktor Xa-Protease-Schnittstelle und der kodierenden DNA für PfFNT zwischen den Schnittstellen *EcoR* I und *Kpn* I (2.3) verwendet.

Die eingesetzte transformierten *P. pastoris*-Zellen wurde von Dr. Julia Holm-Bertelsen übernommen.

3.2.2 Proteinproduktion im Kleinmaßstab

Aus einer Vorkultur wurden 200 ml BMGY in einem 1-Liter Erlenmeyerkolben auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 2 bei 30 °C und 220 U min⁻¹ inkubiert. Die Zellen wurden bei 1.500 g für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 40 ml BMMY resuspendiert und in einem 500 ml Erlenmeyerkolben in keimreduzierter Umgebung überführt. Die Zellen wurden erneut bei 30 °C und 220 U min⁻¹ inkubiert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch die Zugabe von BMMY. Durch das Vorhandensein von Methanol als einzige Kohlenstoffquelle wurde der AOX1-Promotor aktiviert und somit das Ablesen des Zielgens. Die Inkubation erfolgte für weitere 32-48 h. Nach 24 h wurde erneut Methanol mit einer Zielkonzentration von 0,5 % im Medium hinzugeben. Final wurden die Zellen bei 1.500 g für 10 min geerntet und bei -80 °C eingefroren.

3.2.3 Proteinproduktion im 5-Liter Fermenter

Zunächst wurden zweimal je 50 ml BMGY Medium mit einer vollen Impföse mit Klonen einer frischen Platte angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 220 U min⁻¹ bis zu einer OD₆₀₀ von 25-35 inkubiert. Diese dienten im folgendem zum Animpfen des Fermentations-Mediums über den Vier-Wege-Zugang des Fermenters.

Methoden

Als Medium für den Fermentationsprozess wurde *P. pastoris*-Fermentations-Medium hergestellt. Des Weiteren wurden Glycerol 50 % (V/V) mit 1,2 % *P. pastoris* Spurenelementen, 1 M HCl, 25 %ige Ammoniumhydroxidlösung, Methanol mit 1,2 % PTM *tracesalts* vorbereitet und über einen Vier-Wege-Zugang an den Fermenter angeschlossen.

Das *P. pastoris*-Fermentations-Medium wurde mit der Ammoniumhydroxidlösung auf pH 5,0 eingestellt. Zu 2000 ml Medium wurden über das Septum 8,7 ml *P. pastoris* Spurenelemente hinzugegeben und das Medium auf 30 °C aufgeheizt. Anschließend erfolgte das Animpfen des Fermentations-Mediums mit den Übernacht-Kulturen.

Während des Fermentationsprozesses wurden 30 °C Mediumtemperatur, pH 5,0 und eine Mindestsauerstoffsättigung von 30 %, bezogen auf eine System-Kalibrierung, angestrebt. Zu Beginn des Prozesses diente zunächst Glycerol aus dem Medium als Kohlenstoffquelle. Nach Verbrauch des initial zugegeben Glycerols aus dem Medium wurden 200 ml Glycerol in einer Flussrate von 30 ml h⁻¹ zugeführt. Bei sofortiger Umsetzung von Glycerol durch *P. pastoris*-Zellen konnte durch Unterbrechung der Glycerolzufuhr ein sofortiger starker Anstieg der Sauerstoffkonzentration im Fermenter beobachtet werden (Sauerstoffspikes). Auf diese Weise wurde durch regelmäßige Unterbrechung der Glycerolzufuhr der Verbrauch bestimmt und angepasst.

Die Induktion mit Methanol wurde mit einer Flussrate von 3 ml h⁻¹ begonnen und schrittweise auf bis zu 9 ml h⁻¹ gesteigert. Die Induktionsphase dauerte bis zu 48 h. Der Methanol Verbrauch wurde ebenfalls durch Sauerstoffspikes überprüft.

Final wurden die Zellen bei 4.000 g für 10 min bei 4 °C abzentrifugiert und bei -80 °C eingefroren. Das erhaltene Zellpellet wird in dieser Arbeit als „feuchte Zellmasse“ bezeichnet.

Während des gesamten Prozesses wurden nach Bedarf Salzsäure und Ammoniumhydroxid zur pH-Regulierung und *Antifoam* hinzugefügt sowie die Temperatur mittels Kühlelement und Heizmanchette konstant gehalten.

3.2.4 Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *P. pastoris*-Schüttelkultur

Für die Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *P. pastoris*-Zellen wurden 2 g der eingefrorenen Zellmasse aus 3.2.2 für 20 min bei Raumtemperatur aufgetaut, mit 2 ml

Methoden

eiskaltem Puffer B sowie der gleichen Menge eiskaltem säuregewaschenen Glaskügelchen versetzt und auf Eis für weitere 20 min aufgetaut.

Die Zellruptur wurde durch 12 x 30 s vortexen mit jeweils 60 s Pause auf Eis durchgeführt und die Zelltrümmer im Anschluss bei 1.000 *g* für 5 min abgetrennt. Die säuregewaschenen Glaskügelchen wurden mit 1 ml Puffer B gewaschen und erneut durch Zentrifugation abgetrennt. Die vereinigten Überstände wurden anschließend bei 10.000 *g* für 5 min zentrifugiert.

Der erhaltene Überstand wurde in Ultrazentrifugen-Vials überführt und bei 100.000 *g* für 45 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 100 µl Puffer M resuspendiert.

3.2.5 Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *P. pastoris* im Fermentermaßstab

Es wurden 80 g gefrorene, feuchte *P. pastoris*-Zellmasse auf Eis für 8-12 h bei 4 °C Umgebungstemperatur aufgetaut. Die aufgetaute Zellmasse wurde zusammen mit 200 g eiskalten säuregewaschenen Glaskügelchen in die Mischkammer eines speziellen Mischers, dem sogenannten *Beadbeater* eingefüllt und mit eiskaltem Puffer B aufgefüllt, sodass ein möglichst geringes Luftvolumen in der Mischkammer verblieb.

Es wurde 12 x 30 s unter Eiskühlung durch automatisches Rühren des *Beadbeaters* gerührt und zwischen jedem Rührvorgang 60 s pausiert. Der Überstand wurde in sechs 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt.

Zum Waschen der säuregewaschenen Glaskügelchen wurde die Mischkammer erneut mit eiskaltem Puffer B befüllt und 1 x 30 s gerührt. Mit dem Überstand wurden die sechs Zentrifugenröhrchen auf 50 ml aufgefüllt.

Es folgte die Zentrifugation der Überstände bei 5.000 *g* für 10 min bei 4 °C. Der erhaltene Überstand wurde erneut in vier Ultrazentrifugen-Gefäße überführt und bei 100.000 *g* für 45 min zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden mit jeweils 2 ml eiskaltem Protein-Reinigungspuffer resuspendiert.

Die so gewonnene mikrosomale Fraktion wurde zur Solubilisierung von Membranproteinen weiterverwendet.

3.2.6 Solubilisierung der Membranproteine aus *P. pastoris*

Die Solubilisierung der Membranproteine erfolgte mit Detergenzien. Es wurden die Detergenzien CHAPS, DDM, LDAO, β -OG und FC12 (Abbildung 3-2) in den Konzentrationen nach Tabelle 3-1. getestet. Die mikrosomale Fraktion (3.2.5) wurde mit Solubilisierungspuffer versetzt, sodass die Gesamtproteinkonzentration 5-10 mg ml⁻¹ betrug. Unter stetigem Rühren mittels Rührkern wurden die Solubilisierungsansätze für 12-16 h bei 4° C inkubiert [100, 116]. Solubilierte Membranen und Membranproteine wurden anschließend durch Zentrifugation bei 200.000 g für 45 min bei 4 °C isoliert.

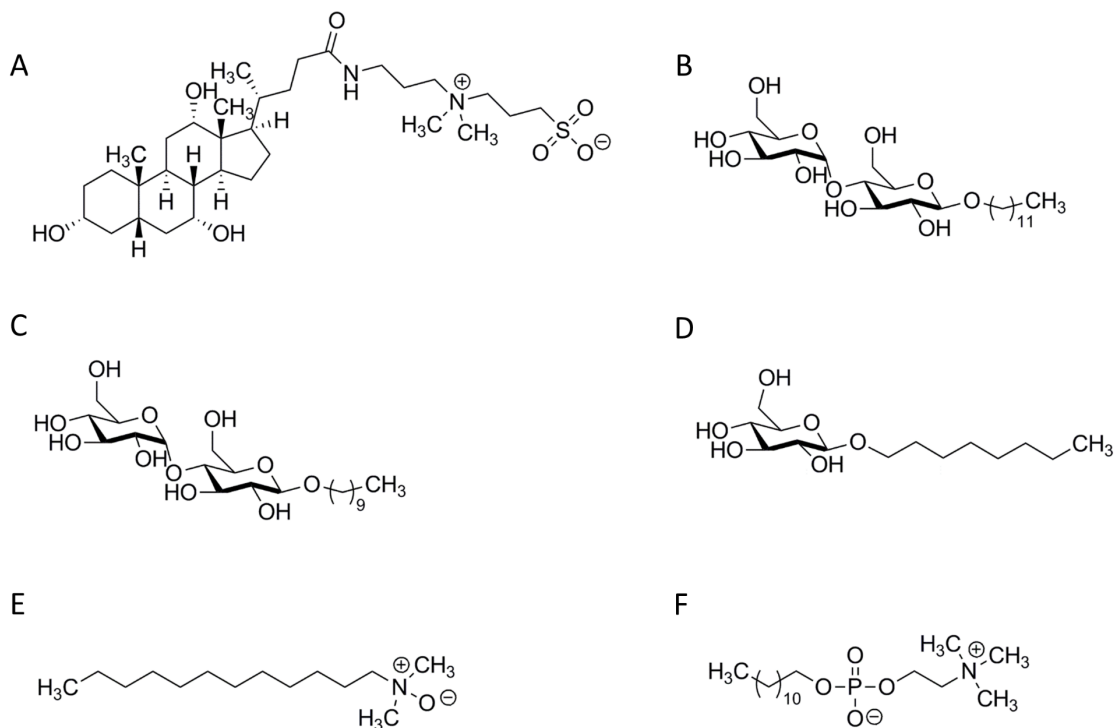


Abbildung 3-2: Strukturformeln der eingesetzten Detergenzien für Proteinsolubilisierung und -stabilisierung. (A) CHAPS, (B) DDM, (C) DM, (D) β -OG, (E) LDAO, (F) FC 12. Die Darstellung der Detergenzmoleküle wurde mit ChemDraw® erstellt.

Tabelle 3-1: Solubilisierungsdetergenzien und eingesetzte Detergenzkonzentrationen

Solubilisierungsdetergens	Eingesetzte Konzentration (%)
CHAPS	9
DDM	1
LDAO	4,5
β -OG	8
FC12	0,7

3.2.7 Nickel-Affinitätschromatographie (Nickelreinigung)

Für die Isolierung des Zielproteins per Nickel-Affinitätschromatographie wurden 500 μ l Ni^{2+} -Nitrilotriessigsäure (NTA)-*beads* (1000 μ l Ni^{2+} -*bead-slurry* 50 %) für eine ursprünglich eingesetzte Zellmasse von 80 g *P. pastoris*-Zellen verwendet.

Der *slurry* wurde in *Poly-Prep*[®] *Chromatography Columns* einpipettiert und mit dem 20-fachen Säulenvolumen der Ni^{2+} - NTA-*beads* mit detergenschaltigem Reinigungspuffer gespült. Anschließend wurden die Ni^{2+} -NTA-*beads* in das Proteinsolubilisat überführt und zur Verminderung von unspezifischen Bindungen Imidazol für eine Endkonzentration von 10 mM hinzupipettiert. Zur Ausbildung der Nickelbindung an das Protein über den sechsfach Histidin-*tag* des Proteins (Abbildung 3-3) erfolgte eine Inkubation rotierend über Nacht bei 4 °C.

Die Reinigung erfolgte mit einem imidazolhaltigen Nickelreinigungspuffer mit dem gewünschten Detergens (Tabelle 3-2) bei 4 °C. Für die weitere Verwendung des Proteins für Kristallisationsansätze und Stabilitätsuntersuchungen wurde das Detergens getauscht oder die Detergenzkonzentration auf die zwei- bis zehnfache CMC gesenkt. Die Detergenzien und eingesetzten Konzentrationen (Tabelle 3-2) wurden in Anlehnung an [100] ausgewählt.

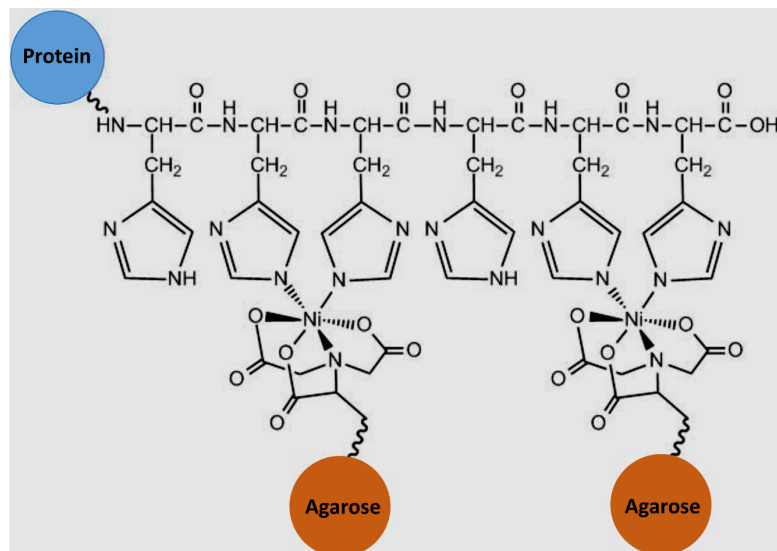


Abbildung 3-3: Komplexbildung zwischen dem sechsfach-Histidin-tag des Proteins und Nickel-NTA-beads. Die Abbildung wurde modifiziert nach [117].

In allen Fällen wurde zunächst das Proteinsolubilisat von den Ni²⁺-NTA-beads abgetrennt und ein Waschschritt mit dem 20-fachen Säulenvolumen mit 20 mM imidazolhaltigen Nickelreinigungspuffer durchgeführt. Anschließend wurde mit fünffachem Säulenvolumen und ansteigenden Imidazolkonzentrationen eluiert. Mit den Waschschritten konnte der Detergenzienwechsel durchgeführt werden, indem ein Nickelreinigungspuffer mit einem neuen Detergens verwendet wurde.

Tabelle 3-2: Kritische Mizellbildungskonzentrationen und eingesetzte Detergenzkonzentrationen

Detergens	CMC (%)	Eingesetzte Konzentration in %
CHAPS	0,49	1,0
DDM	0,0087	0,05
DM	0,087	0,17
LDAO	0,023	0,27
β-OG	0,53	1,17
Fos Cholin 12	0,047	0,14

3.2.8 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie wurde an der Äkta Purifier 10 mit einer Superdex™ 200 10/300 GL bei 4 °C durchgeführt. Als Fließpuffer wurde, wenn nicht anders angegeben, ein Puffer mit 20 mM Tris, 200 mM NaCl und 10 % Glycerol (V/V) bei pH 7,8 (4°C) mit einer Detergengkonzentration wie in Tabelle 3-2 angegeben verwendet.

Die Superdex™-Säule wurde auf 20 % (V/V) Ethanol gelagert und vor der Verwendung jeweils mit dem zweifachen Säulenvolumen *Aqua bidest.* und anschließend mit Fließpuffer gespült.

Das zuvor auf 500 µl aufkonzentrierte (3.2.12) und per Nickel-Affinitätschromatographie gereinigte Protein wurde vor der Injektion bei 10.000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert und anschließend über eine 500 µl Probenschleife in die Chromatographiesäule injiziert.

Die Fließgeschwindigkeit lag je nach Druckbelastung der Chromatographiesäule bei 0,35-0,5 ml min⁻¹. Die Detektion erfolgte durch Messung der Absorption, wenn nicht anders angegeben bei 280 nm. Es wurden 500-µl-Fraktionen mittels eines Fraktionssammlers gesammelt.

3.2.9 Proteinquantifizierung

Zur Proteinquantifizierung wurde der Bio-Rad-Protein-Assay verwendet. Dabei wurden konzentrationsabhängig zwischen 0,8-10 µl Proteinprobe eingesetzt und in einem 1,5-ml-Vial auf 800 µl mit *Aqua bidest.* aufgefüllt und mit 200 µl Bradford-Reagenz vermischt. Bei der Negativkontrolle wurde in gleicher Weise verfahren, allerdings wurde die Proteinprobe durch den eingesetzten Proteinpuffer ersetzt. Beide Ansätze wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 595 nm vermessen. Die Absorption sollte im Lambert-Beerschen Bereich ($A = 0,2-0,8$) liegen. Andernfalls wurde die Proteinprobe verdünnt. Bei einer vorherigen Kalibrierung wurden verschiedene Konzentrationen von BSA eingesetzt.

3.2.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinproben wurde die diskontinuierliche SDS-PAGE eingesetzt. Hierzu wurden 5 %ige Acrylamid-Sammelgele und 10 %ige sowie 12,5 %ige Acrylamid-Trenngele verwendet.

Die Gele wurden nach folgendem Schema (Tabelle 3-3) zwischen zwei Glasplatten gegossen:

Tabelle 3-3: Zusammensetzung der Polyacrylamid-Gele

Sammelgel	5 %	Trenngel	10 %	12,5 %
Sammelgelpuffer	2,4 ml	Trenngelpuffer	3,0 ml	5,25 ml
Aqua bidest.	1 ml	Aqua bidest.	6,0 ml	3 ml
Acrylamid 40 %	0,6 ml	Acrylamid 40 %	3,0 ml	3,75 ml
TEMED	6 μ l	TEMED	10 μ l	10 μ l
APS	25 μ l	APS	80 μ l	80 μ l

Die Proteinproben wurden mit SDS-Ladepuffer versetzt und für 30 min bei 37 °C bzw. für 20 min bei 60 °C inkubiert. Als Größenmarker wurde, wenn nicht anders angegeben, der peqGold Prestained Protein Marker III verwendet. In die Ladetaschen des Acrylamid-Gels wurden bis zu 45 μ l Probenvolumen eingefüllt. Die Apparatur wurde mit Kathodenpuffer befüllt. Zunächst wurden die Proben im Sammelgel bei 150-170 V konzentriert und dann im Trenngel bei 160-200 V aufgetrennt. Die Auftrennung erfolgte, bis die Bromphenolblaubande des Ladepuffers aus dem Gel herausgelaufen war.

Die Trenngele wurde für einen Westernblot weiterverwendet oder mit Coomassie (Rotiphorese® Blau R) eingefärbt.

3.2.11 Westernblot

Mittels *semi-dry*-Elektrotransfer wurden die zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine bei 17 V für 60 min auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurden Whatman®-Chromatography-Papiere für 5 min in Transferpuffer inkubiert sowie eine PVDF-Membran für 20 bis 60 s in Methanol aktiviert. Anschließend wurde die PVDF-Membran zusammen mit den Whatman®-Chromatography-Papieren für die restliche Zeit mit inkubiert.

Auf der Anode der Westernblot-Apparatur wurden drei Whatman®-Chromatography-Papiere, PVDF-Membran, das Trenngel aus der SDS-PAGE (3.2.10) und drei weitere Whatman®-Chromatography-Papiere aufgeschicht.

Nach erfolgtem Transfer wurde zur Absättigung freier Bindestellen die PVDF Membran für 60 min in 3 %iger MTBST bei Raumtemperatur inkubiert, über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper inkubiert und anschließend mit dem Sekundärantikörper für 60 min bei

Methoden

Raumtemperatur geschüttelt. Nach jeder Antikörperinkubation folgten drei 15-minütige Waschschrte mit TBST. Anschließend wurde die Membran mit ECL entwickelt und die entstandene Chemielumineszenz am Lumi Imager F1™ detektiert.

3.2.12 Proteinaufkonzentrierung

Proteinsolubilisate wurden zur Injektion in den 500 µl-loop der Äkta Purifier 10 und für die Kristallisationsansätze aufkonzentriert (3.2.12). Dies wurde mit Amicon-Ultra-Aufkonzentrierungsröhrchen mit 30 oder 100 kDa *cut-off*-Filter durchgeführt. Dabei wurde der Filter zunächst mit 1,5 ml Reinigungspuffer benetzt und bei 5.000 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Proteinsolubilisat auf die Filtermembran pipettiert und durch Zentrifugation unter gleichen Bedingungen auf das gewünschte Volumen aufkonzentriert.

3.3 Präparation von Proteoliposomen

Für die Herstellung der Proteoliposomen wurden in Anlehnung an [105] in einem Reagenzglas 25 mg polare *E. coli*-Lipide in 1 ml Chloroform gelöst, mit Stickstoff begast und anschließend bei Unterdruck (400 mbar) evaporiert. Es wurde darauf geachtet, dass sich ein dünner Lipidfilm an der Wandung des Reagenzglases ausbildete. Der Lipidfilm wurde im Anschluss mit 500 µl 2 mM β-Mercaptoethanol in 1 x Liposomenpuffer unter Schütteln rehydratisiert. Die so aufbereiteten Lipide wurden zu je 100 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Herstellung unilamellarer Vesikel wurden je 100 µl der aufbereiteten Lipide auf Eis aufgetaut und mit 10 µl 1 x Liposomenpuffer versetzt. Im Folgenden wurden diese mit Stickstoff begast für und 60-90 min im Ultraschallbad behandelt.

Zu den 110 µl Lipidansatz wurden 100 µl Protein, gewähltes Stabilisierungsdetergens mit der finalen Konzentration (Tabelle 3-2) und Liposomenpuffer hinzugegeben, sodass ein Endvolumen von 1 ml entstand. Die Zubereitung wurde gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Zubereitung mit einer 23G-Kanüle in das 25-fache Volumen Liposomenpuffer überführt und so die Detergenskonzentration weit unter die kritische Mizellbildungskonzentration verringert. Es folgte eine weitere Inkubation für 20 min bei Raumtemperatur.

Methoden

Final wurden die Proteoliposomen bei 140.000 *g* für 45 min bei 4 °C zentrifugiert und in 1 ml Liposomenpuffer resuspendiert. Um eine Adsorption von Lipiden an Gefäßwänden zu minimieren, wurden mit Ausnahme der Zentrifugation ausschließlich Glasgeräte verwendet. Als Negativkontrolle wurden in gleicher Weise hergestellte Liposomen ohne Protein (Leerliposomen) verwendet.

3.3.1 Extrusion der Liposomen

Die fertigen Proteo- und Leerliposomen wurden 20-mal durch eine 0,4- μ m-Membran extrudiert, um eine gleichmäßige und unilamellare Größenverteilung für die Funktionsmessung zu erreichen.

Im Anschluss wurde die OD₆₀₀ bestimmt und Proteo- und Leerliposomen mit Liposomenpuffer auf die gleiche optische Dichte verdünnt.

3.3.2 Funktionsmessung mittels *Stopped-Flow*

Zur Funktionsmessung wurden *PfFNT*-Proteoliposomen und zum Vergleich aus der gleichen Lipidcharge hergestellte Leerliposomen an der *stopped-flow*-Apparatur (Tabelle 3-4) vermessen. Dabei wurden zu jeder Messung 75 μ l Probe und 75 μ l Substratpuffer gemischt, sodass ein nach innen gerichteter Gradient von 200 mM L-Laktat entstand. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von bis zu 80 s, bei der die Änderung der Lichtstreuung in Bezug auf die Änderung der Liposomengröße bei 546 nm gemessen wurde.

Die außen anliegende hohe Substratkonzentration führte osmotisch bedingt initial zu einem schnellen Schrumpfen der Liposomen. Anschließend kam es zu einem langsamen Substrateinstrom, osmotisch gefolgt von Wasser, sodass die Proteoliposomen wieder anschwellen.

Tabelle 3-4: Einstellungen und Eigenschaften für die *Stopped-Flow*-Messungen

Xe/Hg Lampe	100 W
Totzeit	1,0 ms
Flussrate	16 ml/s
Photomultiplier	400 V
Outputfilter	300 μ s
Temperatur	20 °C

Bei Proteoliposomen konnte so über den Messzeitraum ein leichtes Anschwellen durch das Sinken der Lichtstreuung gesehen werden. Im Vergleich dazu sollten intakte Leerliposomen diesen Effekt nicht zeigen. Die Messungen wurden an das Protokoll von [44] für *EcFocA* angepasst durchgeführt.

3.3.3 Funktionsuntersuchung durch Inhibitorbindung

Hergestelltes Protein wurde durch Ni^{2+} -Affinitätschromatographie (3.2.7) gereinigt und anschließend mit einem 10 mM Überschuss des *PfFNT*-Inhibitors BH697 (Abbildung 3-4) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Nickelreinigungspuffer und folgende Puffer für die Funktionsuntersuchung wurden mit 1 % DMSO verwendet. Nach erfolgter Inkubation wurde der Ansatz durch Größenausschlusschromatographie (3.2.8) gereinigt, um überschüssigen Inhibitor abzutrennen. Dabei wurde bei zwei Wellenlängen detektiert: Bei 280 nm für das Protein und bei 490 nm für den Inhibitor BH697.

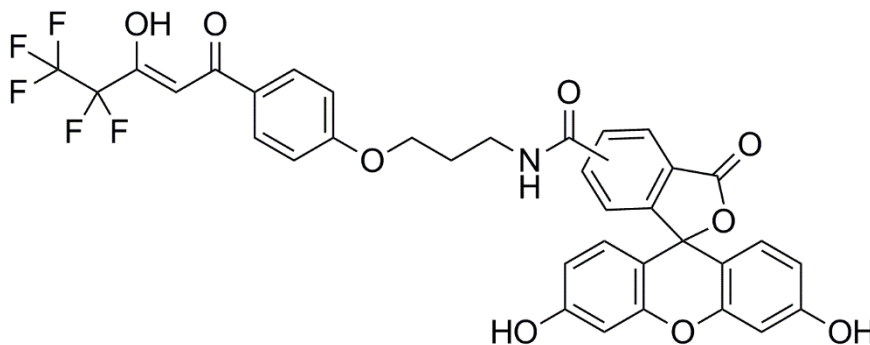


Abbildung 3-4: *PfFNT*-Inhibitor BH697

Die Fraktionen des Protein-Inhibitor-Komplexes wurden gesammelt und aus diesem Eluat wurden innerhalb von 24 h zu unterschiedlichen Zeitpunkten jeweils 0,5-ml injiziert. Mit der erneuten Reinigung wurde zwischenzeitlich vom Protein abdiffundierter Inhibitor abgetrennt. Zur Auswertung wurde die Veränderung des Anteils des proteingebundenen Inhibitors betrachtet. Von jeder Reinigung wurden die Integrale der 490 nm-Inhibitor-Fraktion und der 280 nm-Protein-Fraktion gebildet und diese zueinander ins Verhältnis gesetzt.

3.3.4 Transmissionselektronenmikroskopie von Proteinen

Die Analyse von in *P. pastoris* hergestellten PffNT erfolgte durch die Transmissionselektronenmikroskopie mit Negativkontrastierung nach der *single-droplet*-Methode [118–120] und wurde in Anlehnung an das von Arnold *et al.* beschriebene Protokoll durchgeführt [121]. Die Proteinproben wurden auf einem Kohlefilm überzogenen Kupfer-*grid* (*continuous carbon grids, 400 mesh, thin*) aufgetragen. Der Kohlefilm wurde zuvor mittels negativer Glimmentladung im Plasma hydrophilisiert. Die Kontrastierung erfolgte anschließend durch zweimaliges Eintauchen in eine Uranyl-Acetat-Lösung (1 % m/V). Die behandelten *grids* wurden bei Raumtemperatur für eine Minute getrocknet und anschließend in ein JOEL 1400 Plus Elektronenmikroskop überführt, das bei 100 kV Beschleunigungsspannung arbeitet. Die Bilder wurden mit einer TVIPS F416 Digitalkamera aufgenommen (Bildgröße 2048 x 2048 Pixel, 50.000-fache Vergrößerung, Auflösung von 4,58 Å/Pixel). Einzelne Partikel wurden ausgewählt, ausgerichtet und summiert mit der EMAN2-Software [122]. Zur weiteren Bearbeitung wurden die Proteinpartikel-Abbildungen vereinzelt (*boxer-tool*) und zu referenzfreien Klassensummen verrechnet (*e2projectmanager.py.*) Die Anleitung der TEM-Analyse sowie die Bildanalyse erfolgte durch Dr. Philipp Arnold (Anatomisches Institut, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel).

3.4 Kristallisationsansätze

Die Fraktionen der Größenausschlusschromatographie (3.2.8), die gereinigtes Protein enthielten, wurden vereinigt und wie in 3.2.12 beschrieben auf eine Proteinkonzentration von mindestens 10 mg ml⁻¹ aufkonzentriert. Während der Aufkonzentrierung wurde die Natriumchlorid- und Glycerolkonzentration auf 50 mM und 2,5 % (V/V) gesenkt. Der PffNT-Inhibitor MMV007839 wurde für die Kristallisation nach der Nickelreinigung mit dem ersten Spülpuffer in einer Konzentration von 10 mM hinzugegeben und über einen Zeitraum von 10 min inkubiert. Überschüssiger Inhibitor wurde während der Reinigungsschritte abgetrennt.

Die Proteinproben wurden im European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Hamburg mit einem Pipettierroboter (Mosquito) oder im eigenen Labor manuell angesetzt. Für die per Pipettierroboter angesetzten Proben wurden Platten der Firma Swissci und kommerzielle Kristallisationskits der Firmen Molecular Dimensions, Jena Bioscience und Hamilton Research verwendet (Tabelle 3-5). Für jede getestete Bedingung wurden nach dem *sitting drop*

Methoden

Verfahren Kristallisationspuffer und Proteinsolubilisat im Verhältnis 1 : 1 verwendet. Das jeweilige Volumen betrug 100 µl. Als Negativkontrolle wurde der proteinfreie, in gleicherweise behandelte Stabilisierungspuffer mit angesetzt.

Im eigenen Labor wurden mit Silikonöl vorgefettete *24-well-plates* (ComboPlate 24 Well vorgefettet, Greiner Bio-One) sowieso silikonisierte Deckgläschen (Greiner Bio-One) verwendet. Es wurde nach dem *hanging drop* Verfahren vorgegangen. Dabei wurde 1 ml Kristallisationspuffer in eine Vertiefung der *24-well-plate* pipettiert und 1 µl des Puffers wieder entnommen und auf ein silikonisiertes Deckgläschen gegeben. In diesen Tropfen wurde 1 µl des Proteinsolubilisats hineinpipettiert. Hierbei sollten die beiden Lösungen sich durch Diffusion vermischen. Mit dem nach innen hängenden Tropfen wurde das Deckgläschen auf den Silikonörling gedrückt und so die Vertiefung gasdicht verschlossen, sodass sich eine gleichmäßige Kammersättigung ausbilden konnte.

Sowohl manuell als auch automatisierte Kristallisationsansätze wurden bei 19 °C inkubiert und regelmäßig auf Kristallwachstum überprüft.

Tabelle 3-5: Verwendete kommerziellen Screens und eigene Screens für PfFNT

Molecular Dimensions	MemGold™
	MemGold2™
	MemTrans™
Jena Bioscience	Membrane HTS96™
Eigenherstellung EMBL Hamburg	<i>grid screen</i>

4 Ergebnisse

4.1 Fermentierung von *P. pastoris* zur Gewinnung von präparativen Mengen PffNT

Für die Kristallisation von Membranproteinen werden große Mengen an Protein benötigt. Empfehlenswert ist eine Mindestmenge von 1-2 mg in einer Konzentration von 10 mg ml⁻¹ [100].

Die Proteinproduktion wurde daher vom 100 ml-Kolben-Maßstab auf einen 5-Liter-Fermenter Maßstab vergrößert. Innerhalb der ersten 24 h nach Inokulieren von 2 Liter Medium mit 100 ml *P. pastoris* Vorkultur kam es zum starken Zellwachstum. Ermittelt wurde dies durch Bestimmung der Zellmasse nach Zentrifugation von 10 ml Zellkultur und durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀). In Abbildung 4-1-1 A und B zeigt sich in beiden Fällen eine kurze *lag*-Phase zwischen Animpfen und den ersten 10 h der Wachstumsphase, gefolgt von einem starken exponentiellen Wachstum in der *log* Phase.

Nach 24 h wurde ein Wachstumsplateau mit einer OD₆₀₀ der Zellkultur von OD₆₀₀ > 300 und einem Zellgewicht von 2,4 g 10 ml⁻¹ (Abbildung 4-1) erreicht. Die maximale Zufuhr von Glycerol bis zur Sättigung lag bei 30 ml h⁻¹.

Innerhalb der ersten 24-stündigen Wachstumsphase kam es zu keiner Proteinexpression. Erst nach langsamem und kontinuierlichem Einleiten von Methanol wurde die Proteinexpression induziert. Die maximale Zufuhr von Methanol bis zur Sättigung wurde bei 9 ml h⁻¹ ermittelt. Der Westernblot in Abbildung 4-1 C zeigt für die gezogenen Proben nach 18 und 24 h kein Signal für PffNT. 42, 50 und 68 h nach Beginn der Proteininduktion konnten in der Intensität zunehmende Banden für das PffNT-Monomer bei 35 kDa detektiert werden. Es wurden je Bande 30 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Insgesamt konnten aus einem Ansatz im 5-Liter-Fermenter mit 2 Liter Medium nach 68 h 460 ± 50 g feuchte *P. pastoris* Zellmasse geerntet werden.

Ergebnisse

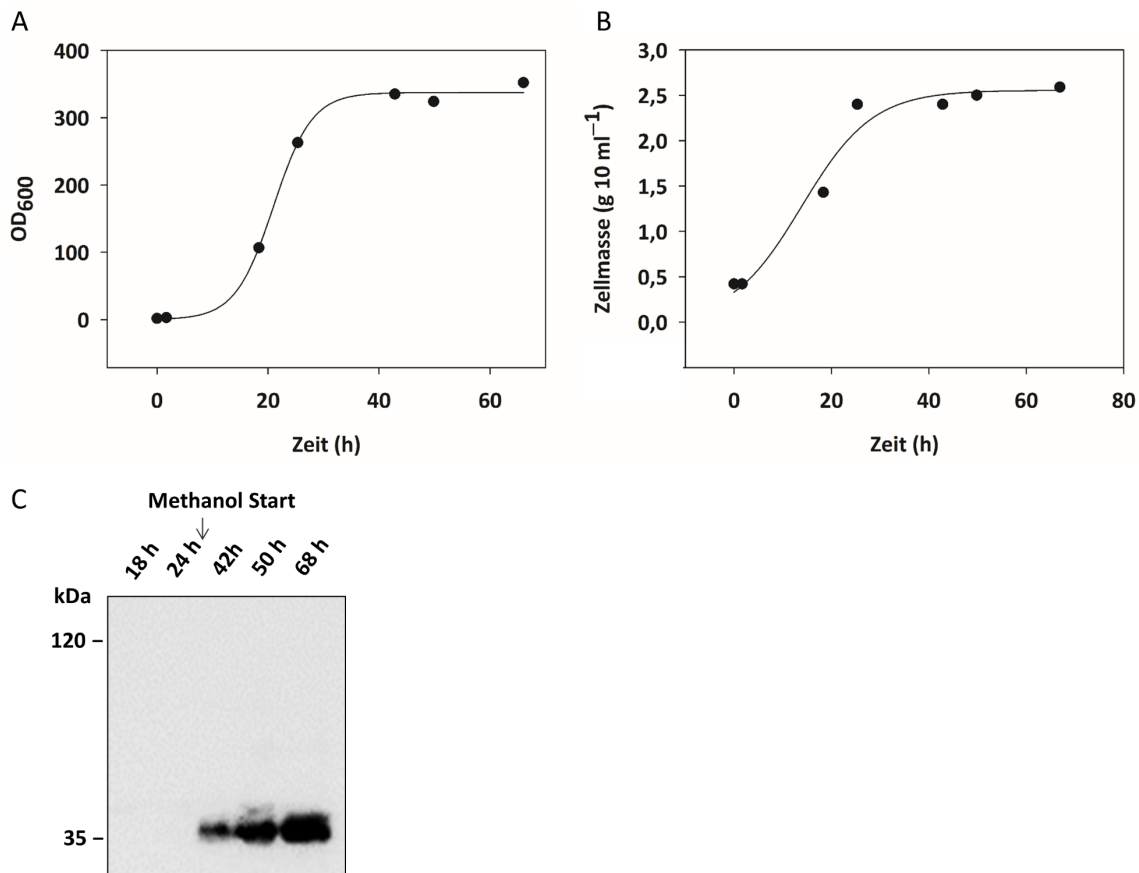


Abbildung 4-1: Wachstum von *P. pastoris* Zellen über 68 h und Westernblot von PpfNT zur Kontrolle der Proteinexpression während der Fermentation. (A) Sigmoidal gefittete Kurve der optischen Dichte (OD₆₀₀) der *P. pastoris* Zellkultur, (B) sigmoidal gefittete Kurve der Zellmasse aus 10 ml Kultur der *P. pastoris* Zellkultur, (C) Westernblot der gezogenen Proben während der Fermentation. Die Inkubation der Proben mit SDS erfolgte bei 60° C, 20 min. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Zur Detektion wurde ein monoklonaler α-His-Antikörper 1 : 5000 in MTBST verwendet.

4.2 Optimierung des Zellaufschlusses und der Isolierung der mikrosomalen Fraktion von *P. Pastoris*

Mit dem Ziel möglichst große Mengen des in *P. pastoris* exprimierten Proteins PpfNT zu erhalten, wurde der Zellaufschluss mit der anschließenden Isolierung der mikrosomalen Fraktion untersucht. Die feuchten *P. pastoris* Zellen wurden mechanisch aufgeschlossen und die mikrosomale Fraktion gewonnen. Es wurden für den Aufschluss 5 g, 40 g und 80 g feuchte Zellmasse verwendet. Aus den drei Aufschlüssen wurden die mikrosomalen Fraktionen (3.2.4) gewonnen. Für den ersten Zentrifugationsschritt bei 1.000 g wurde die Zellsuspension auf ein Verhältnis von 1:10, 1:20 und 1:50, bezogen auf die feuchte Zellmasse mit Zellaufschlusspuffer verdünnt. Der Aufschluss von 5 g feuchter Zellmasse wurde in dieser

Ergebnisse

Untersuchung nur auf ein Verhältnis von 1:50 verdünnt. Für den zweiten Zentrifugationsschritt bei 10.000 *g* wurde der Überstand aus der ersten Zentrifugation verwendet. Es wurden je 30 μ g Gesamtprotein (3.2.9) mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot-Analyse untersucht.

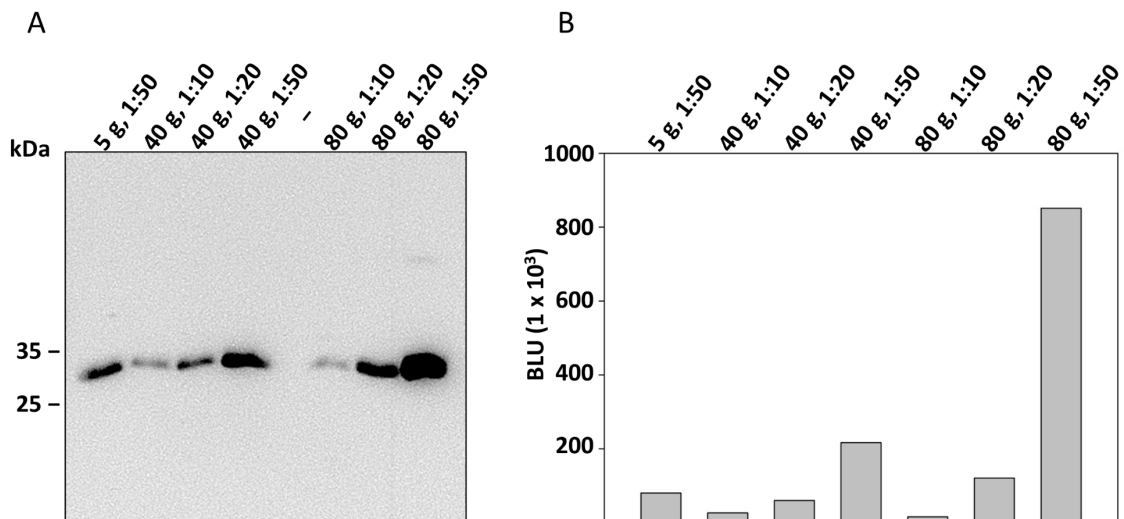


Abbildung 4-2: (A) Westernblot der auf 30 μ g Gesamtprotein eingestellten mikrosomalen Fraktionen, ausgehend von unterschiedlichen Zellmassen und Verdünnungen. Verwendet wurde ein monoklonaler α -His-Antikörper 1:5000 in MTBST. Inkubation der Proben bei 60 °C, 20 min. (B) Quantifizierung der Signalintensitäten am Lumi Imager F1™.

Die Westernblot-Analyse zeigt, dass mit steigendem Einsatz feuchter Zellen für den Zellaufschluss die Proteinausbeute zunimmt. Der Einsatz von größeren Zellmengen erhöht die Effektivität des für den Zellaufschluss verwendeten *BeadBeater*. Die maximale Verdünnung von 1 g feuchter Zellen zu 50 ml Zellaufschlusspuffer zeigt hier die höchste Proteinausbeute.

4.3 Expression von stabilen *PfFNT* Pentameren

In Voruntersuchungen zur Expression von *PfFNT* wurde von Dr. Julia Holm-Bertelsen gezeigt, dass in der Schüttelkultur hergestelltes *PfFNT* auch unter stark denaturierender SDS-Inkubation für die SDS-Page ein stabiles Pentamer aufweist.

Es wurde *PfFNT* aus der mikrosomalen Fraktion (3.2.5) von aufgeschlossenen *P. pastoris* Zellen bei 37 °C, 50 °C und 60 °C mit SDS inkubiert und mittels SDS-PAGE (3.2.10) aufgetrennt und per Westernblot-Analyse (3.2.11) untersucht.

Ergebnisse

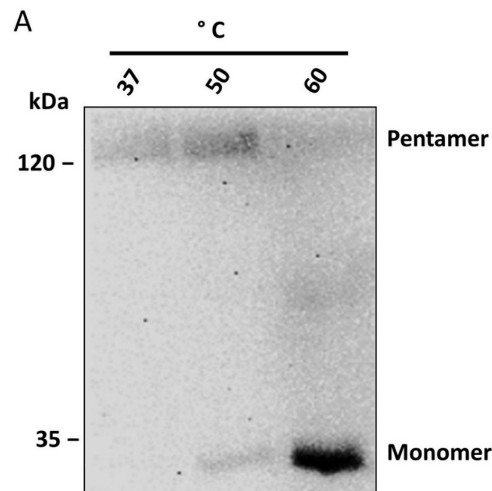


Abbildung 4-3: Westernblot aus *P. pastoris* gewonnenem PfFNT. Die Inkubation vor der SDS-PAGE erfolgte bei 37°C, 50°C und 60 °C. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Verwendet wurde ein monoklonaler α -His-Antikörper 1 : 5000 in MTBST. Der Westernblot wurde von Dr. Julia Holm-Bertelsen angefertigt.

Der Westernblot in Abbildung 4-3 zeigt, dass je nach vorheriger Inkubationstemperatur, auf verschiedenen Laufhöhen Signale für PfFNT detektiert werden konnten. Bei einer für Membranproteine intensiven Inkubation bei 60 °C für 20 min zeigt sich auf Laufhöhe von 35 kDa eine PfFNT Monomer-Bande, während unter milderer Inkubationsbedingungen von 50 °C sowohl eine schwache Pentamerbande oberhalb von 120 kDa als auch eine schwache Monomerbande bei 35 kDa zu sehen ist. Bei einer vergleichsweise milden Inkubation bei 37°C für 30 min wird nur eine schwache Pentamerbande detektiert.

Das in den Lipidmembranen isolierte PfFNT-Pentamer weist demnach eine hohe Stabilität auf. Durch Inkubation mit SDS bei 37 °C für 30 min und Auftrennung per SDS-PAGE kommt es nicht zum Zerfall des PfFNT-Proteinkomplexes. Daher wurde auch im Folgenden diese Inkubation standardmäßig durchgeführt.

Für die in dieser Arbeit folgenden Reinigungsschritte, können durch Anwendung milder Inkubationsbedingungen für SDS-PAGE und Westernblot Aussagen über die Stabilität des isolierten PfFNTs getroffen werden.

Zur Qualitätskontrolle des im Fermenter hergestellten PfFNTs wurden die Membranen isoliert und per Westernblot-Analyse untersucht.

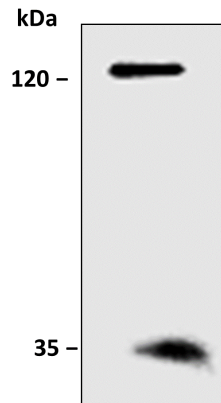


Abbildung 4-4: Westernblot von im Fermenter hergestellten *PfFNT*. Die Inkubation vor der SDS-PAGE erfolgte bei 37 °C für 30 min. Es wurden jeweils 30 µg Gesamtprotein pro Spur aufgetragen. Verwendet wurde ein monoklonaler α-His-Antikörper 1:5000 in MTBST.

Abbildung 4-4 zeigt eine Bande auf Laufhöhe der Größe des *PfFNT* Pentamers oberhalb von 120 kDa. Der Westernblot bestätigt so die Expression eines stabilen *PfFNT* Pentamers. Die Detektion einer weiteren Bande bei 35 kDa weist auf einen leichten Zerfall des Pentamers während der Inkubation mit SDS hin.

4.4 Detergenzscreening für die Solubilisierung

Für die Ermittlung geeigneter Detergenzien zur Solubilisierung von *PfFNT* aus den Lipidmembranen wurde ein *Screening* mit gängigen Solubilisierungsdetergenzien durchgeführt [100]. Zur Solubilisierung (3.2.6) wurde die mikrosomale Fraktion mit einer Konzentration von 5-10 mg ml⁻¹ Gesamtprotein verwendet. Als Detergenzien wurden DDM (1 %), CHAPS (9 %), β-OG (8 %), FC 12 (0,7 %) und LDAO (0,5 %) verwendet. Zur Abtrennung des solubilisierten Proteins von nicht solubilierten Bestandteilen wurde im Anschluss bei 100.000 g zentrifugiert und das Solubilisat per SDS-PAGE aufgetrennt und durch Westernblot-Analyse untersucht.

Ergebnisse

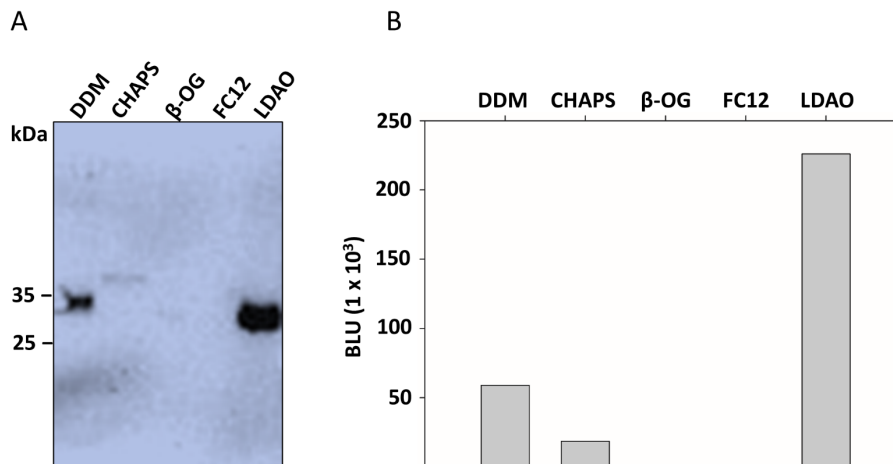


Abbildung 4-5: A: Westernblot der auf 30 μ g Gesamtprotein eingestellten Proteinsolubilisat-Fractionen. Die verwendeten Proben wurden für 20 min bei 60 °C inkubiert. Verwendet wurde ein monoklonaler α -His-Antikörper 1 : 5000 in MTBST. B: Quantifizierung der Signalintensitäten am Lumi Imager F1™.

Die Westernblot-Analyse in Abbildung 4-5 zeigt, dass nur LDAO, DDM und CHAPS *PfFNT* aus den Membranen solubilisieren konnte. Durch die Quantifizierung der Westernblot-Signale wird deutlich, dass mit LDAO ungefähr das Vierfache an Protein gegenüber DDM und ungefähr das Zehnfache an Protein gegenüber CHAPS aus den Lipidmembranen solubilisiert werden konnte. β -OG und FC 12 zeigten kein Signal für *PfFNT*. DDM und LDAO erweisen sich demnach als die aussichtsreichsten Solubilisierungsdetergenzien für den Herstellungs- und Reinigungsprozess von *PfFNT* mit *P. pastoris* für spätere Kristallisationsversuche.

4.5 Solubilisierung von *PfFNT* mit verschiedenen DDM-Konzentrationen

Das Detergenzscreening (4.4) zeigte, dass DDM eines der geeigneten Detergenzien zur Solubilisierung von *PfFNT* aus der Lipidmembran ist. Im Vergleich zu LDAO zeigte sich aber eine geringere Solubilisierungskraft. Auf Grund der milden Solubilisierungseigenschaften wurde zunächst DDM weitergehend untersucht [123].

Ergebnisse

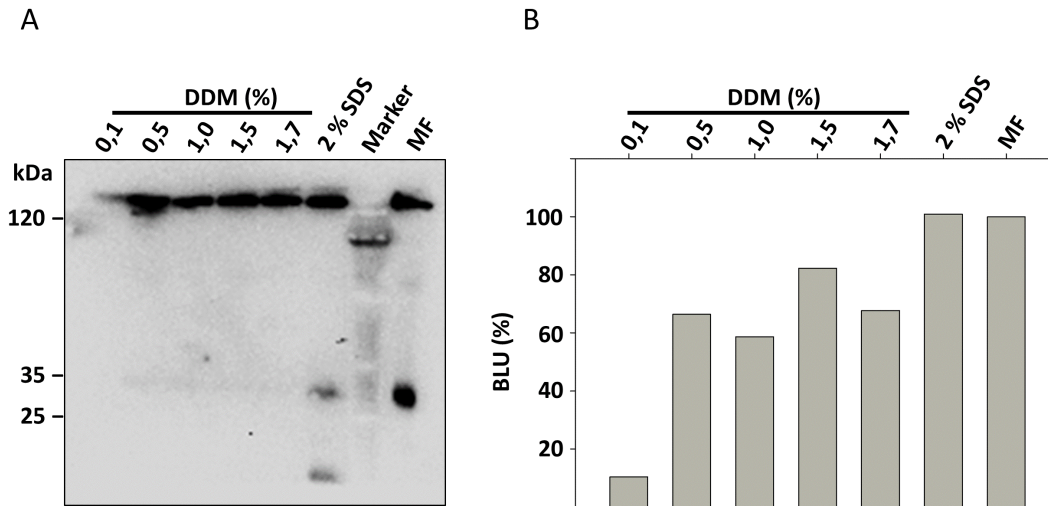


Abbildung 4-6: A: Westernblot der auf 30 µg Gesamtprotein eingestellten Proteinsolubilisate und der mikrosomalen Fraktion. Die verwendeten Proben wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert. Verwendet wurde ein monoklonaler Penta-His-Antikörper 1:5000 in MTBST. B: Quantifizierung der Signalintensitäten am Lumi Imager F1™. Die BLU der Membranfraktion wurde als Referenzwert auf 100 % gesetzt.

Um die geeignete Detergensenkonzentration zu ermitteln, wurde *PffNT* aus der mikrosomalen Fraktion mit verschiedenen DDM-Konzentrationen solubilisiert und wie schon zuvor mittels SDS-PAGE aufgetrennt und per Westernblot-Analyse untersucht. Es wurden 0,1 % (10 x CMC), 0,5 % (50 x CMC), 1 % (100 x CMC), 1,5 % (150 x CMC), 1,7 % (170 x CMC) DDM verwendet. Zusätzlich wurde zum Vergleich eine mit 2 %iger SDS-Lösung solubilisierete Probe und die mikrosomale Fraktion mit aufgetrennt. SDS gilt als ein stark solubilisierendes aber denaturierendes Detergens [91] und wurde deshalb gemeinsam mit der mikrosomalen Ausgangsfraktion zum Vergleich verwendet.

Die Analyse zeigt in Abbildung 4-6, dass DDM zwischen 0,5 %-1,7 % DDM vergleichbare Solubilisierungsstärken aufweist. Für die geringste Konzentration von 0,1 % konnte nur ein schwaches Signal detektiert werden.

Vergleichend zur Solubilisierungskraft der SDS-Lösung und zur Ausgangsmenge von *PffNT* in der mikrosomalen Fraktion konnte mit einer DDM-Konzentration von 0,5 %-1,7 % zwischen 60 % und 82 % *PffNT* und mit 0,1 % DDM nur 10 % *PffNT* solubilisiert werden.

Ergebnisse

Da sich die Ergebnisse der Untersuchung der Solubilisierungskonzentrationen von DDM mit der Konzentrationsempfehlung der Literatur von 1 % DDM decken, wurde im Folgenden mit der empfohlenen Konzentration solubilisiert [100].

Des Weiteren zeigt Abbildung 4-6 bei allen DDM-Solubilisaten deutliche Signale oberhalb von 120 kDa. Mit DDM solubiliertes *PfFNT* liegt, wie in 4.3 beschrieben, als stabiles Pentamer vor.

4.6 Reinigung und Stabilisierung von *PfFNT*

Die mit DDM gewonnenen Protein-Solubilisate aus der Solubilisierung von *PfFNT* mit verschiedenen DDM-Konzentrationen (4.5) wurden vereinigt und im nächsten Schritt durch Ni^{2+} -Affinitätschromatographie (3.2.7) gereinigt.

Nach der Bindung des Proteins an Ni^{2+} -NTA-*beads* und Abtrennung des Puffers wurde ein Detergenzienwechsel durchgeführt. Hier wurden die Detergenzien β -OG, CHAPS und FC 12 und zum Vergleich DDM verwendet. Die Detergenzien dienten hier der Stabilisierung des Proteins und wurden in Konzentrationen der 2-5-fachen CMC verwendet (Tabelle 3-2).

Während der Nickelreinigung konnte mit allen vier Detergenzien *PfFNT* stabilisiert werden und mit 300 mM und 400 mM Imidazol von den Ni^{2+} -NTA-*beads* bei einer Laufhöhe oberhalb von 120 kDa als Pentamer eluiert werden (Abbildung 4-7 A-D). Wie die Quantifizierung in Abbildung 4-6 A zeigt, konnte mit 0,14 % FC 12 die größte Menge an *PfFNT* isoliert werden. Des Weiteren konnte nur mit FC 12 eine nahezu vollständige Elution von den Ni^{2+} -NTA-*beads* erfolgen. Mit DDM, CHAPS und β -OG konnte im Vergleich zu FC 12 weniger als die Hälfte eluiert werden, da ein Großteil des Proteins auf den Ni^{2+} -NTA-*beads* verblieb (Abbildung 4-7).

Deshalb wurde im folgenden Abschnitt 4.7 nach der Solubilisierung der Isolierungsprozess von *PfFNT* mit einem Detergenzienwechsel auf FC 12 durchgeführt.

Ergebnisse

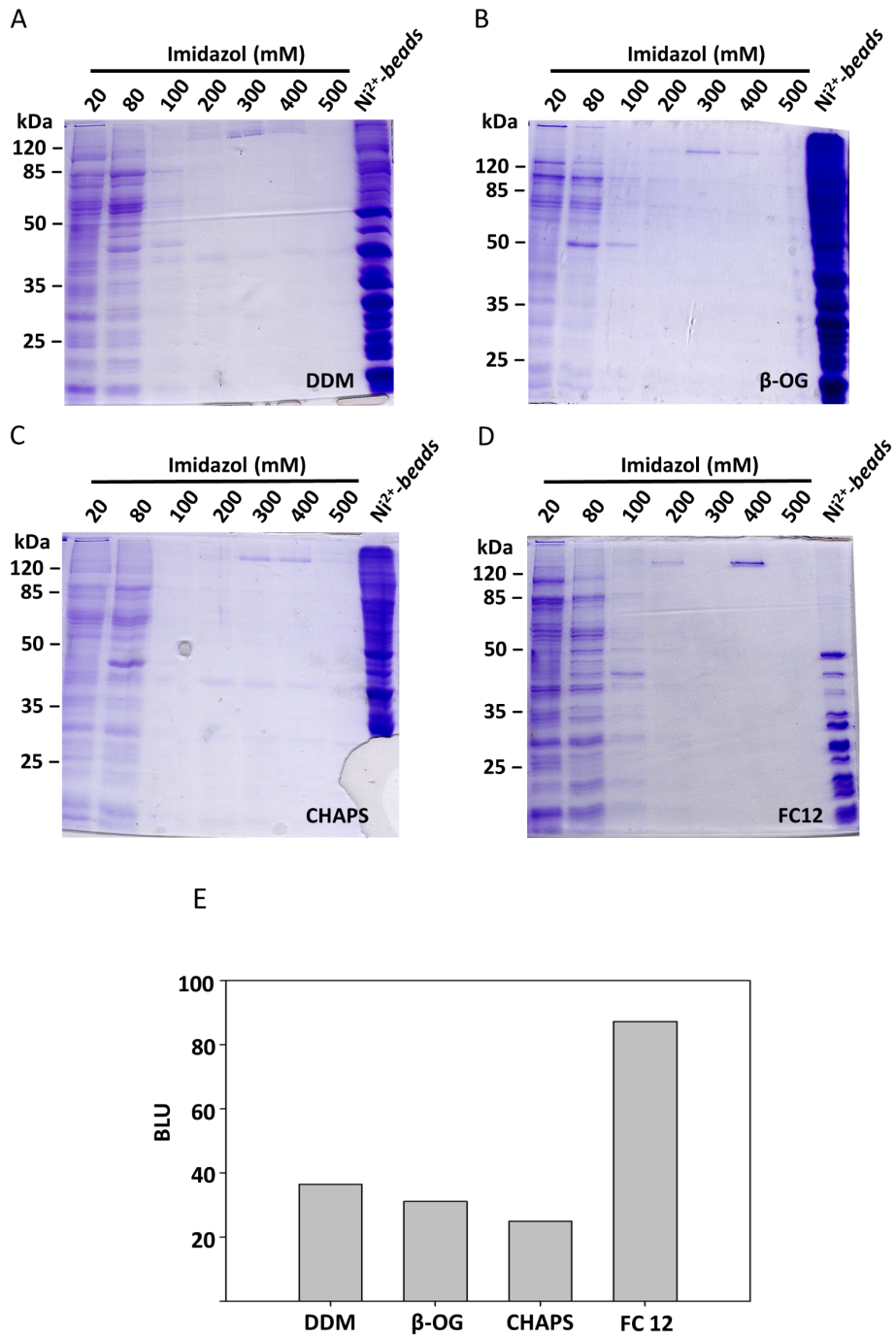


Abbildung 4-7: A-D: Coomassie gefärbte SDS-Gele der Nickelreinigung mit Detergenzienwechsel von DDM zu (A) DDM, (B) β -OG, (C) CHAPS und (D) FC12. E: Quantifizierung der PfFNT Signalintensitäten der 300 mM und 400 mM Imidazol-Banden der Coomassie gefärbten SDS-PAGE Gele der Nickelreinigung am Lumi Imager F1™.

4.7 Vergleich Solubilisierung von PfFNT mit DDM und LDAO

Neben DDM wurde im Detergenzscreening (4.4) LDAO als vergleichsweise stärkstes Solubilisierungsdetergens ermittelt. Im Folgenden wurde deshalb LDAO im direkten Vergleich zu DDM untersucht.

Für die dargestellten Proteinreinigungen wurde die gleiche Menge *P. pastoris*-Zellmasse verwendet. Es wurde zum Vergleich mit 1 % DDM sowie 0,5 % LDAO solubilisiert und ein Detergenzienwechsel auf 0,14 % FC 12, wie in Kapitel 4.6, während der Ni²⁺-Reinigung durchgeführt. Mit dem Ziel große Mengen reines Protein zu isolieren wurden anschließend jeweils die 300 mM und 400 mM-Imidazol-Elutionsfraktionen der Nickelreinigungen vereinigt und mittels Größenausschlusschromatographie weiter gereinigt.

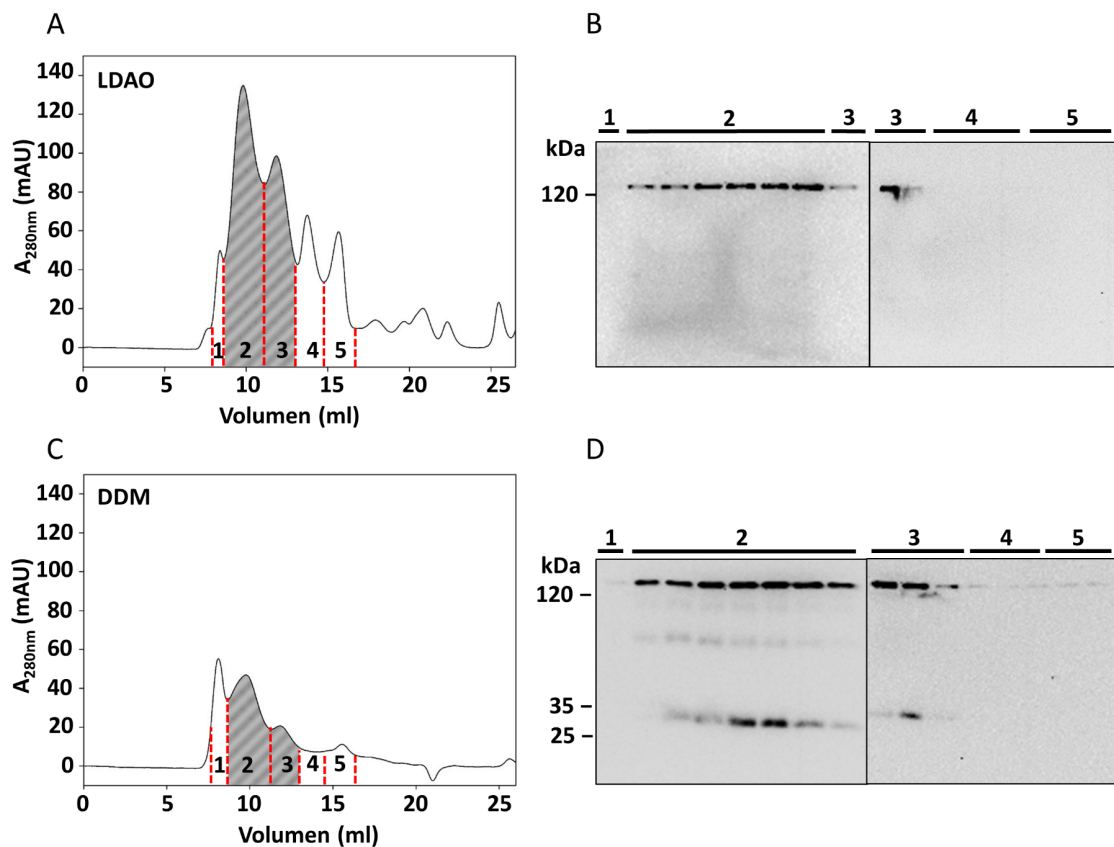


Abbildung 4-8: Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie der 400 mM Imidazol Elutionsfraktionen der Nickelreinigungen. (A) Solubilisierung mit 0,5 % LDAO und Stabilisierung mit 0,14 % FC12, AUC der schraffierten Fläche 394 mAU ml. (C) Solubilisierung mit 1 % DDM und Stabilisierung mit 0,14 % FC12, AUC der schraffierten Fläche 121 mAU ml. (B und D) Westernblot der gesammelten Fraktionen der Gelfiltrationsreinigung mit Zuordnung der Signale zu markierten Peaks in den Chromatogrammen. Probeninkubation für 30 min bei 37 °C. Detektion der Signale über einen monoklonalen Penta-His-Antikörper 1 : 5000 in MTBST.

Ergebnisse

Im Detergenzscreening (4.4) wurde für LDAO eine deutlich höhere *PfFNT* Solubilisierungsausbeute gezeigt. Bezugnehmend auf dieses Ergebnis wurde während der Reinigung mit LDAO im Vergleich zu DDM als Solubilisierungsdetergens und dem anschließenden Detergenzienwechsel auf FC 12 (Abbildung 4-8) eine deutlich höhere *PfFNT*-Reinigungsausbeute mit LDAO erwartet. Zum verbesserten Vergleich der erzielten Ausbeuten wurde hier nach der Nickelreinigung der weitere Reinigungsschritt der Größenausschlusschromatographie angeschlossen.

Der Vergleich der beiden Solubilisierungsdetergenzien zeigte in den Chromatogrammen der Größenausschlusschromatographie (Abbildung 4-8: A, C) ein identisches Peakmuster.

Die zwei Westernblots (Abbildung 4-8: B, D) bestätigten dazu die Elution des *PfFNT*-Pentamers in den zwei ineinander überlaufenden Peaks 2 und 3 (Abbildung 4-8: A, C) nach einem Fließvolumen von 8,7-13 ml auf der Laufhöhe von über 120 kDa. Die Ausbildung eines idealen monodispersen Peaks für *PfFNT* ist hier nicht erfolgt. Neben den *PfFNT*-Signalen stellt Peak 1 in Abbildung 4-8 A und C einen typischen Proteinaggregat-Peak dar, während Peak 4 und 5 weitere Proteinbestandteile beinhaltet, die durch die Nickelreinigung nicht abgetrennt wurden. Weitere Oligomerisierungszustände von *PfFNT* können aber auf Grund fehlender Detektionssignale im Westernblot ausgeschlossen werden.

Wie erwartet war die *PfFNT* Ausbeute gemessen an den *PfFNT* Peak 2 und 3 im Fall der LDAO Solubilisierung mit einer AUC von 394 mAU ml (Abbildung 4-8: A) dreifach höher als bei der DDM-Solubilisierung mit einer AUC von 121 mAU ml (Abbildung 4-8: C).

LDAO wurde daher im Folgendem als Solubilisierungsdetergens weiter untersucht.

4.8 Maximierung der Solubilisierungsausbeute mit LDAO

In der dargestellten Reinigung wurde *PfFNT* mit 1,12 %, 2,25 % und 4,5 % LDAO solubilisiert und anschließend per Nickelreinigung (Abbildung 4-9) und Größenausschlusschromatographie (Abbildung 4-10) weiter mit 0,27 % LDAO gereinigt. Für die Quantifizierung der *PfFNT*-Reinigungsausbeute wurde die AUC aus den Chromatogrammen der Größenausschlusschromatographie für den *PfFNT*-Peak zwischen 8,7 ml und 13 ml gebildet. Abbildung 4-9 zeigt im Coomassie-Gel in den 300 mM, 400 mM und 500 mM Imidazol-

Ergebnisse

Elutionsfraktionen ein stabiles *PfFNT* Pentamer oberhalb von 120 kDa. Abbildung 4-10 zeigt, dass mit steigender LDAO Konzentration die *PfFNT*-Ausbeute zunimmt. Gegenüber der geringsten Konzentration mit 1,12 % LDAO konnte die Ausbeute mit 2,25 % um 40 % und mit 4,5 % um 50 % gesteigert werden. Zur Maximierung der Ausbeute wurde im Folgenden 4,5 % LDAO zur Solubilisierung verwendet.

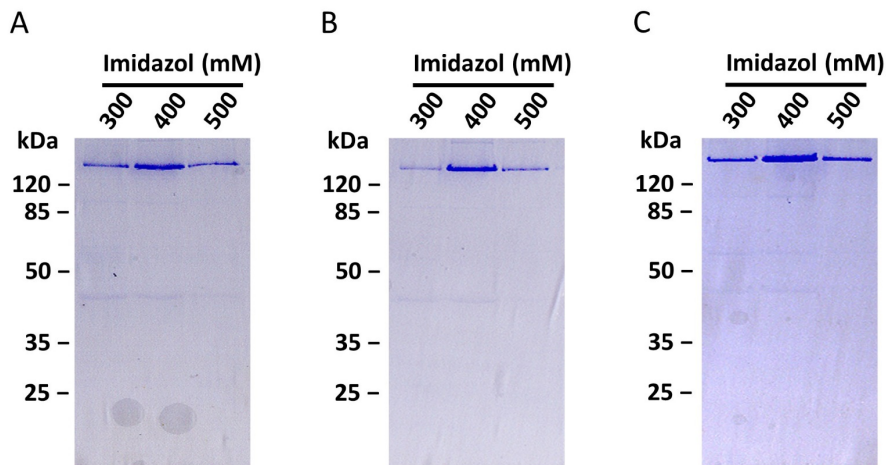


Abbildung 4-9: Coomassie-Gele der Nickelreinigung der mit verschiedenen LDAO-Solubilisierungskonzentrationen solubilisierten *PfFNT* Reinigungsansätze. Elutionsfraktionen der 300 mM, 400 mM und 500 mM Imidazol Elutionsfraktionen von (A) 1,12 %, (B) 2,25 %, (C) 4,5 % LDAO Solubilisierungskonzentration.

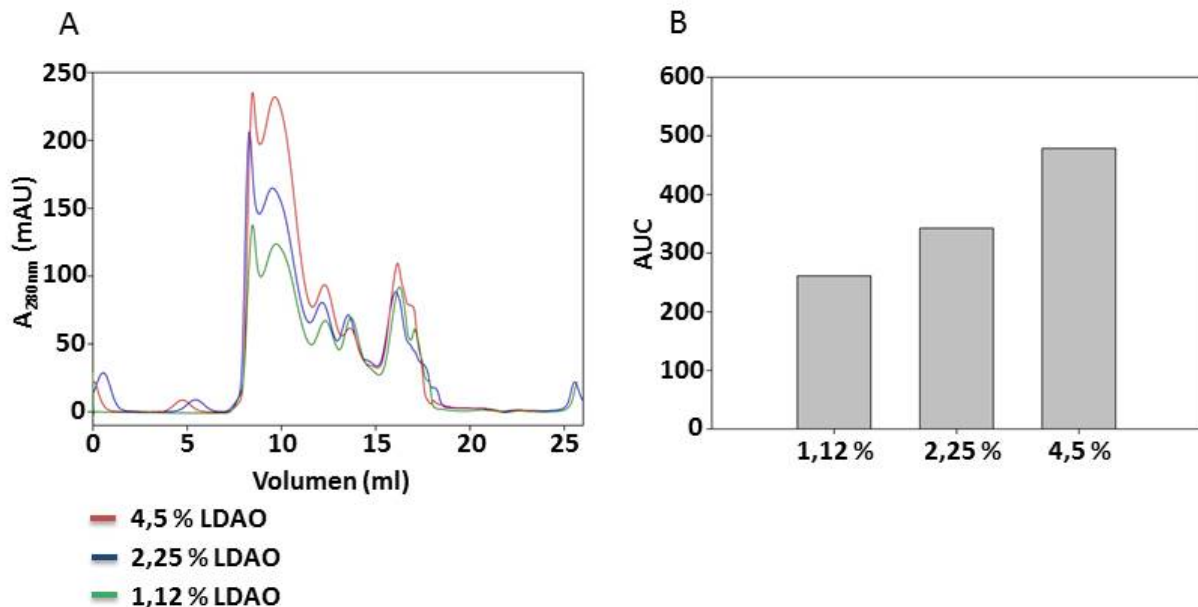


Abbildung 4-10: A: Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie der *PfFNT* Elutionsfraktionen der Nickelreinigungen mit 1,12 %, 2,25 % und 4,5 % LDAO solubilisierten *PfFNT*. B: Auftragung der AUC des *PfFNT* Peaks der Größenausschlusschromatographie.

4.9 Stabilisierung von LDAO solubilisiertem *PfFNT* mit verschiedenen Detergenzien

Im LDAO-Solubilisierungsscreening zeigte sich, dass mit 4,5 % LDAO die größte *PfFNT*-Ausbeute erzielt wurde. Mit dem Ziel, große Mengen stabiles *PfFNT* zu isolieren, wurde ausgehend von 80 g *P. pastoris*-Zellen *PfFNT* mit 4,5 % LDAO solubilisiert und anschließend während der Nickelreinigung (Abbildung 4-11) und Größenausschlusschromatographie (Abbildung 4-12) ein Detergenzienwechsel durchgeführt. Zur Stabilisierung wurden LDAO, FC12, DM, β -OG und DDM eingesetzt.

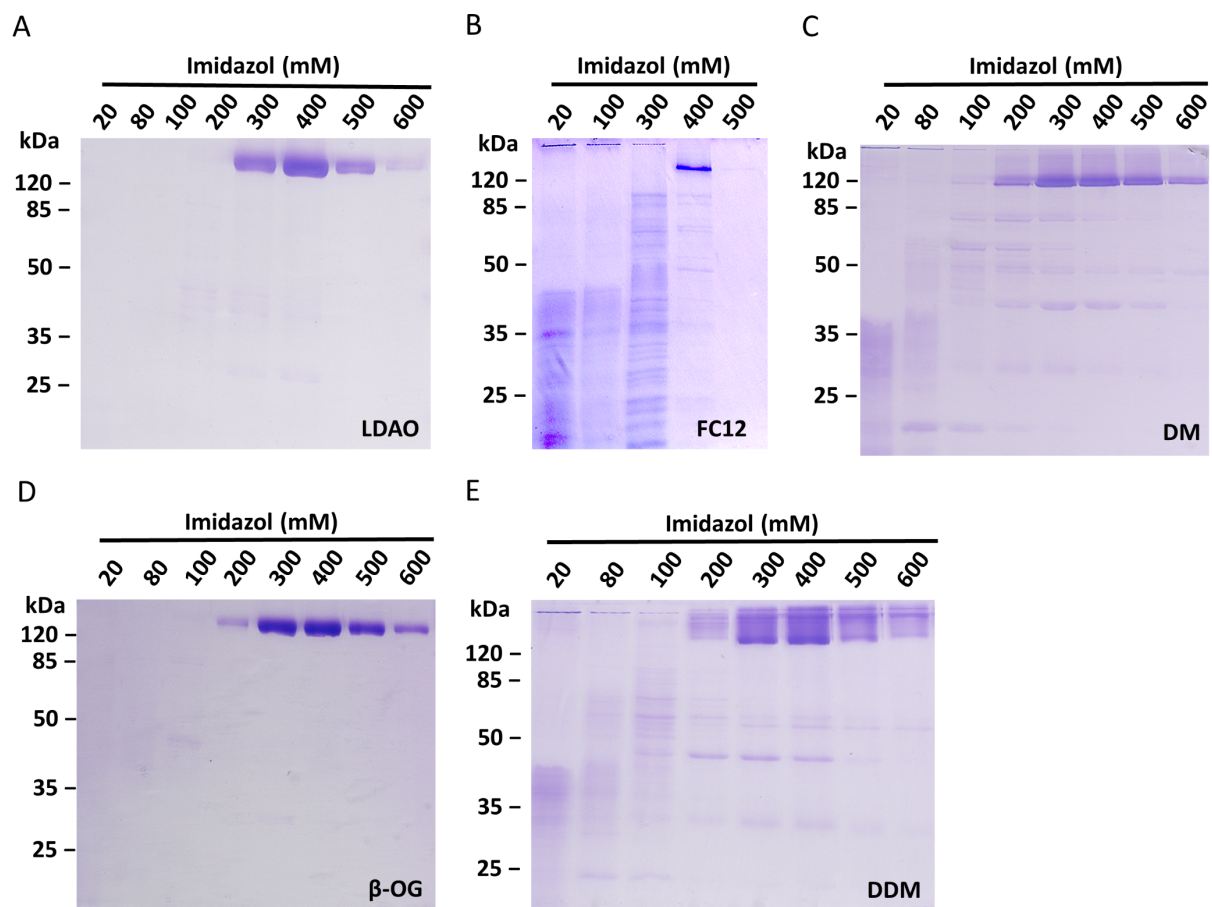
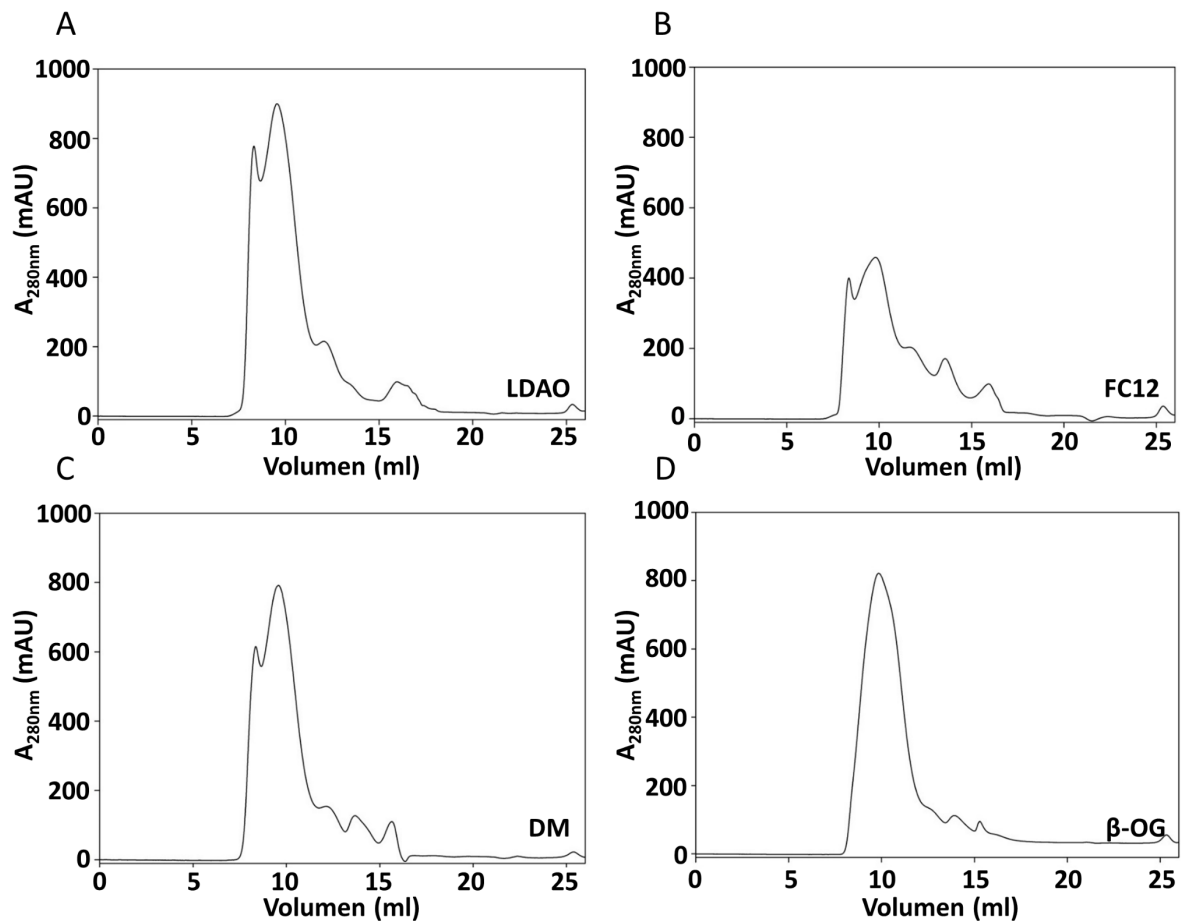


Abbildung 4-11 Coomassie gefärbten SDS-PAGE Gele der *PfFNT* Elutionsfraktionen der Ni^{2+} -Reinigung mit Wechsel des Stabilisierungsdetergens (A) 0,27 % LDAO, (B) 0,14 % FC12, (C) 0,174 % DM (D) 1,17 % β -OG, (E) 0,05 % DDM.

Abbildung 4-11 zeigt die Elutionsprofile der Nickelreinigung für alle verwendeten Detergenzien. In jedem Fall, bis auf FC 12, wird ab 200 mM Imidazol *PfFNT* oberhalb von 120 kDa eluiert. Im Fall der Reinigung mit FC 12 wird nur bei 400 mM Imidazol *PfFNT* oberhalb von 120 kDa eluiert. Weitere schwache Proteinbanden werden nur bei DM und DDM unterhalb von 50 kDa ermittelt. Ein Zerfall des Proteins in Monomere wird nicht beobachtet. Zur weiteren Isolierung von *PfFNT* wurden im folgenden Reinigungsschritt die gesammelten

Ergebnisse

und aufkonzentrierten *Pf*FNT-Elutionsfraktionen durch Größenausschlusschromatographie gereinigt. Bei allen fünf getesteten Detergenzien zeigt sich in Abbildung 4-12 eine Elution von *Pf*FNT zwischen 8-13 ml. Die Peakmuster der Chromatogramme A (LDAO), B (FC12) und C (DM) weisen einen identischen Verlauf auf.



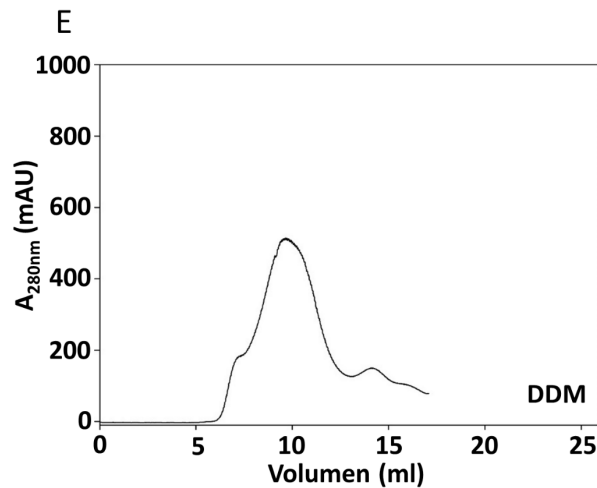


Abbildung 4-12: Größenausschlusschromatographie der *PffNT* Elutionsfraktionen der Ni²⁺-Reinigung mit Wechsel des Stabilisierungsdetergens (A) 0,27 % LDAO, (B) 0,14 % FC12, (C) 0,174 % DM (D) 1,17 % β -OG, (E) 0,05 % DDM.

Die Auftrennung erfolgte hier mit einem beginnenden Aggregatpeak, einem folgenden Hauptpeak und einem weiteren kleineren nicht klar abgetrennten Nebenpeak. Bei den Chromatogrammen D (β -OG) und E (DDM) zeigten sich leicht abgewandelte Peakmuster. Unter Stabilisierung mit β -OG (D) wurde ein nahezu einzelner Peak für *PffNT* eluiert.

Mit DDM zeigte sich auch im Bereich von 8,0 ml und 13 ml ein einzelner Peak. Weiterhin vorhanden war die Aggregatschulter, wie in A, B und C nach 7,5 ml Elutionsvolumen.

Mit allen fünf Detergenzien ließ sich *PffNT* während der Nickelreinigung und der anschließenden Größenausschlusschromatographie reinigen und stabilisieren. Die Elution von *PffNT* in Form eines monodispersen Peaks wurde nur mit β -OG erreicht.

4.10 Ausbeute von *PffNT* mit verschiedenen Stabilisierungsdetergenzien

Die Ausbeuteberechnung erfolgte aus den Reinigungen von *PffNT* aus *P. pastoris*, bezogen auf 80 g Zellmasse. Es wurde mit 4,5 % LDAO solubilisiert und im Folgenden mit den Detergenzien LDAO, FC 12, β -OG, DDM und DM *PffNT* stabilisiert. Wie in Abbildung 4-13 zu sehen ist, ließ sich nach der Größenausschlusschromatographie mit LDAO und DM stabilisierten *PffNT* eine gemittelte Proteinmenge von 1,4 mg isolieren. Mit β -OG und DDM wurde eine gemittelte Proteinmenge von 1,2 mg und mit FC 12 nur knapp 0,4 mg isoliert. Für Kristallisationsscreenings werden Proteinkonzentrationen größer 10 mg ml⁻¹ empfohlen [100]. Ausgehend von diesen Ausbeuten konnten nach Aufkonzentrierung diese erreicht und für Kristallisationsansätze verwendet werden.

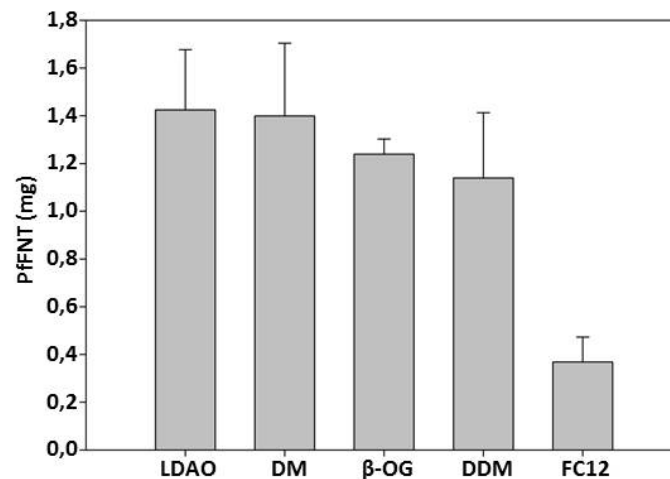


Abbildung 4-13: Gemittelte Ausbeute in mg von *PffNT*, gewonnen aus 80 g *P. pastoris* Zellen. Die Solubilisierung erfolgte mit 4,5 % LDAO und die Stabilisierung mit 0,27 % LDAO, 0,17 % DM, 1,17 % β -OG, 1,17 % β -OG, 0,05 % DDM, 0,14 % FC12. Die ermittelten Werte wurden in zwei bis drei unabhängigen Reinigungen ermittelt. Die Abweichungen sind als S.E.M. angegeben.

4.11 Untersuchung der Stabilisierungsbedingungen von *PffNT* in LDAO

Die Solubilisierung mit 4,5 % LDAO und Reinigung mit 0,27 % LDAO von *PffNT*, ausgehend von 80 g *P. pastoris*, ohne weiteren Detergenzienwechsel zeigte mit 1,4 mg hohe Ausbeuteerfolge. Die empfohlene LDAO-Konzentration zur Stabilisierung des Proteins von 0,27 % [100] entspricht der 12-fachen CMC [124]. Für spätere Kristallisationsversuche war eine möglichst niedrige Detergenzkonzentration von Interesse, die dem ein- bis dreifachen der CMC entspricht. Dadurch sollten Leermizellen vermieden und das Auftreten von Phasenseparation während des Kristallisationsprozesses reduziert werden [100]. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Detergenzkonzentration zur Stabilisierung von *PffNT* bis zu der Konzentration der dreifachen CMC von 0,07 % [124] gesenkt werden konnte, ohne den Protein-Detergen-Komplex zu destabilisieren. Es wurde während der Nickelreinigung in drei Ansätzen mit 0,27 % (12 x CMC), 0,14 % (6 x CMC) und 0,07 % LDAO (3 x CMC) gereinigt und die Proteinelution der 400-mM-Imidazolfraktion per SDS-PAGE aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt und die Proteinbanden quantifiziert.

Ergebnisse

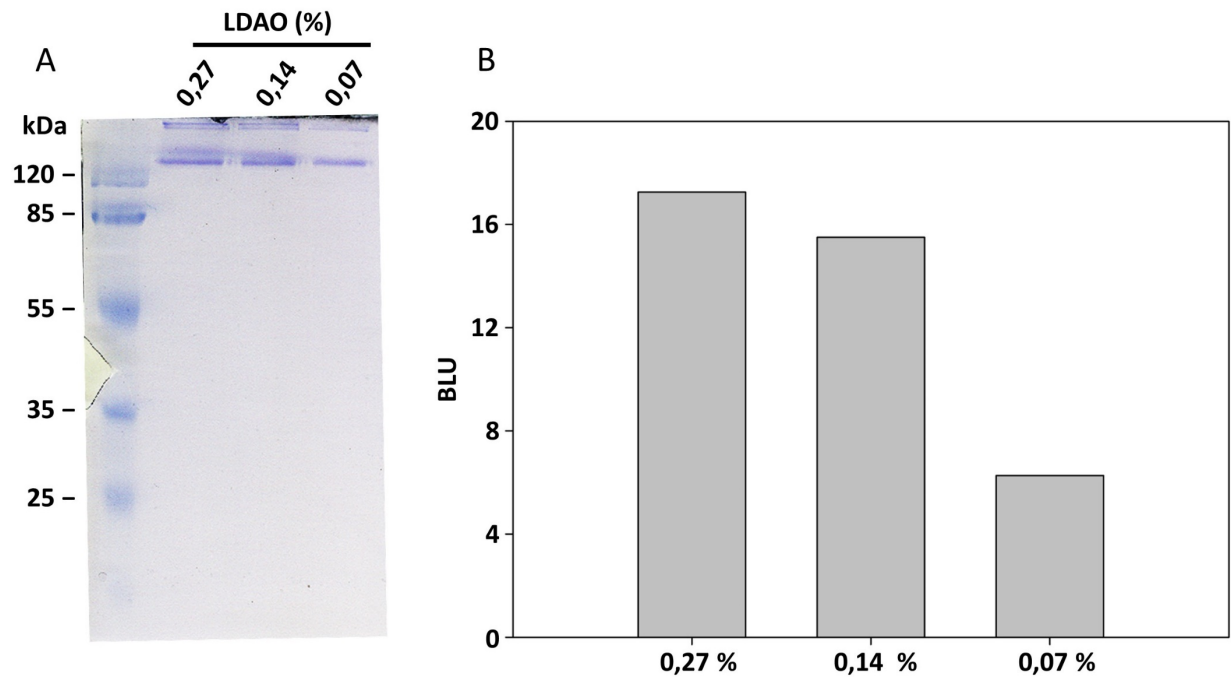


Abbildung 4-14: (A) Coomassie gefärbtes SDS-PAGE-Gel der 400 mM Imidazol Elutionsfraktionen der Nickelreinigung mit verschiedenen LDAO-Konzentrationen zur *PffNT* Stabilisierung. (B) Quantifizierung der *PffNT* Signalintensitäten der drei mit 0,27 %, 0,14 % und 0,07 % LDAO stabilisierten Fraktionen am Lumi Imager F1™.

Abbildung 4-14 A zeigt im Coomassie gefärbten SDS-PAGE-Gel bei allen drei Detergenzkonzentrationen eine klar sichtbare einzelne Bande oberhalb 120 kDa, das in allen drei Fällen auf die Isolation eines stabilen *PffNT*-Pentamer hinweist. Die Intensität der Banden nimmt mit sinkender Detergenzkonzentration ab (Abbildung 4-14 B). Die Protein-Fractionen stabilisiert mit 0,27 % und 0,14 % LDAO zeigen eine ähnliche Bandenintensität, während die mit 0,07 % LDAO um 65 % geringer gegenüber 0,27 % LDAO ausfällt.

Die Untersuchung zeigte, dass für die Stabilisierung von *PffNT* eine geringere LDAO-Konzentration verwendet werden konnte. Unter Berücksichtigung der verringerten Ausbeute, wurde in dieser Arbeit allerdings 0,27 % LDAO zu Stabilisierung weiter eingesetzt. Für die weiteren verwendeten Detergenzien wurde die Verringerung der Konzentration der Stabilisierungsdetergenzien nicht getestet.

4.12 Überprüfung der Funktion des in *P. pastoris* hergestellten und gereinigten PffNTs

Korrekte Faltung und Funktion des Proteins sind Grundvoraussetzungen für die Strukturaufklärung. Deshalb wurden diese durch die Aufnahme von L-Laktat in Proteoliposomen an einer *Stopped-Flow*-Apparatur (3.3.2) und durch Testung der Bindung eines PffNT-Inhibitors an PffNT im Vergleich zur Bindung an zellfrei hergestelltes PffNT und an Bovines Serum Albumin (BSA) über eine auf Größenausschlusschromatographie basierende Methode (3.3.3) untersucht. Darüber hinaus wurde mittels transmissionselektronenmikroskopischer Aufnahmen (TEM) (3.3.4) die Bildung des PffNT-Pentamers überprüft.

4.12.1 PffNT Pentamer dargestellt durch TEM Aufnahmen

Zur Kontrolle der Homogenität und Ausbildung des PffNT-Pentamers wurden negativ kontrastierte transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (3.3.4) von gereinigtem PffNT stabilisiert mit den Detergenzien DM, DDM, LDAO und β -OG erstellt. Aufnahmen mit FC 12 wurden nicht erstellt. Die Transmissionselektronenmikroskopie ermöglicht eine schnelle Visualisierung von gereinigtem PffNT und soll hier als Qualitätskontrolle und weitere Überprüfung der Ausbildung und Stabilisierung des PffNT Pentamers dienen.

Ein klarer Hintergrund ohne Ausbildung von Leermizellen und kontrastreiche Aufnahmen konnten nur mit dem Detergens DM aufgenommen werden. Abbildung 4-15 A zeigt hier die Hintergrundaufnahme mit DM-haltigen Reinigungspuffer und Abbildung 4-15 B die Aufnahmen von gereinigtem PffNT mit DM stabilisiert. Mit DDM, LDAO (Abbildung 4-15: C, D) und β -OG (persönliche Mitteilung von Dr. Philipp Arnold) konnten nur deutlich kontrastärmere Aufnahmen erhalten werden.

Ergebnisse

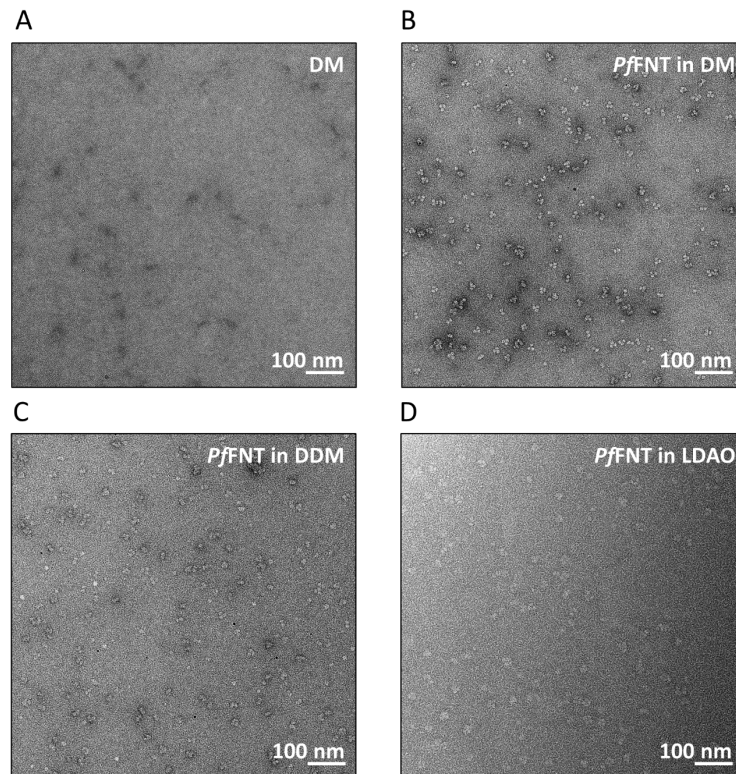


Abbildung 4-15: (A) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen des Reinigungspuffers mit 0,17 % DM. Aufnahmen von 0,1 mg ml⁻¹ PfFNT mit (B) 0,17 % DM (C) 0,05 % DDM und (D) 0,27 % LDAO stabilisiert.

Durch die Analyse der Aufnahmen wurden PfFNT als Pentamer gefunden und darüber hinaus PfFNT als Multimer des Pentamers.

Abbildung 4-16 A zeigt in fünffacher Vergrößerung PfFNT Pentamere mit 0,17 % DM stabilisiert. Zur Verbesserung der Auflösung wurden Klassensummen gebildet und in zehnfacher Vergrößerung dargestellt (Abbildung 4-16 B). Diese zeigen PfFNT mit einem in der Aufsicht gemessenen Durchmesser von 9 nm und der morphologischen pentameren Form bestehend aus fünf Homo-Monomeren und der charakteristischen Zentralpore. Abbildung 4-17 A zeigt zusammengelagerte PfFNT Pentamere. Durch Klassensummen sind in Abbildung 4-17 B jeweils drei zusammengelagerte Pentamere zu sehen, die mit der Größe von 9 nm mit einzelnen PfFNT Pentameren übereinstimmen. Um die Partikel zu vereinzeln, wurde Imidazol bis zu 600 mM hinzugegeben. Mögliche Wechselwirkungen der 6x-His-tags konnten allerdings nicht aufgelöst werden.

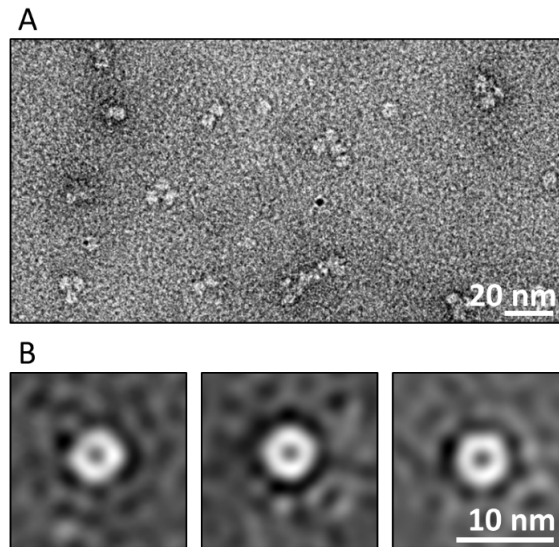


Abbildung 4-16 : Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ PfFNT mit 0,17 % DM stabilisiert. (A) Fünffache Vergrößerung der Aufnahme. (B) Darstellung von Klassensummen einzeln gesammelter PfFNT Pentamere in zehnfacher Vergrößerung.

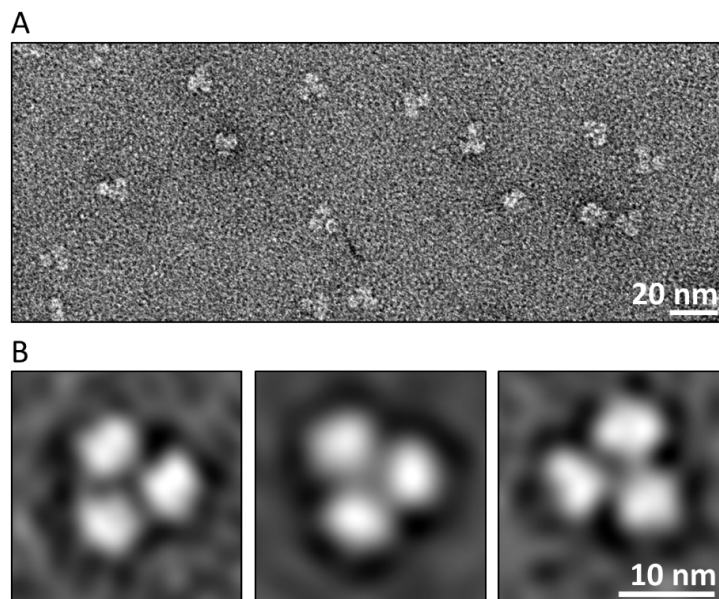


Abbildung 4-17: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ PfFNT mit 0,17 % DM solubilisiert. (A) Fünffache Vergrößerung der Aufnahme. (B) Darstellung von Klassensummen zusammengelagerter PfFNT Pentamere in zehnfacher Vergrößerung.

Insgesamt wird durch die TEM-Aufnahmen gezeigt, dass die Expression von PfFNT in *P. pastoris* und die anschließende Reinigung stabile, aber teilweise zusammengelagert Pentamere mit einem Durchmesser in Aufsicht von 9 nm hervorbringt.

4.12.2 *PfFNT*-Funktionsüberprüfung in Proteoliposomen mit Lichtstreuung

Die Funktionsuntersuchung wurde für *PfFNT* stabilisiert mit LDAO, DM, DDM, β -OG (Abbildung 4-18) und FC 12 (Abbildung 4-19) durchgeführt. Für FC 12 stabilisiertes *PfFNT* wurden die Liposomen abweichend mit einem 20 mM HEPES-Puffer bei pH 6,8 (4°C) hergestellt. Die Funktionsuntersuchung wurde mit einem 20 mM L-Laktatgradienten und einem 20 mM HEPES-Puffer bei pH 6,8 (4°C) durchgeführt. Zur Überprüfung der Transportfunktion wurde die Veränderung der Lichtstreuung in Abhängigkeit der Proteoliposomengröße gemessen. Als Substrat wurde das für *PfFNT* physiologische Substrat L-Laktat verwendet. Zur Messung wurde die Liposomensuspension in der *stopped-flow* Apparatur (3.3) mit dem gleichen Volumen an Gradientenpuffer schnell vermischt, sodass außerhalb der Liposomen ein 200 mM L-Laktatgradient entstand.

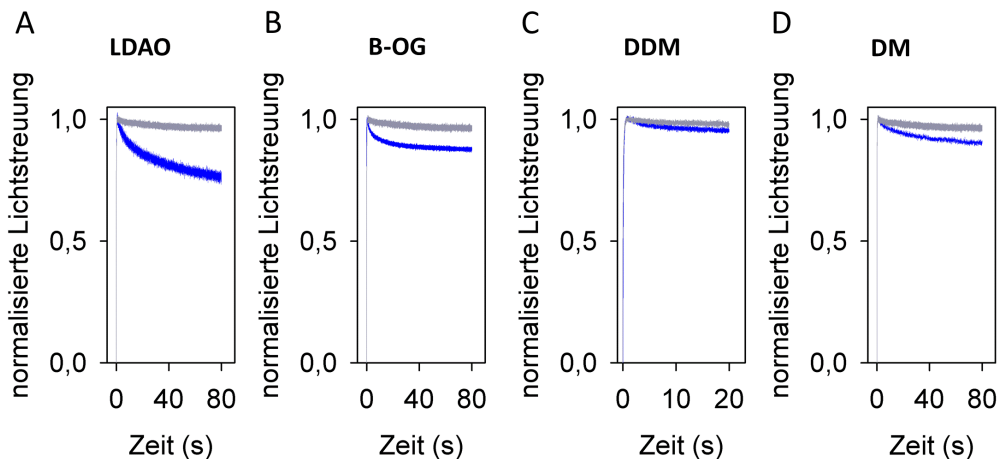


Abbildung 4-18: Lichtstreuukurven der *PfFNT*-Proteoliposomen (blau) und leeren Liposomen (grau) gegen einen 200 mM Laktat Gradienten. *PfFNT* stabilisiert mit (A) β -OG, (B) LDAO, (C) DM, (D) DDM. Aufnahme der Lichtstreuukurve von *PfFNT* stabilisiert mit DDM (D) erfolgte nur über 20 s.

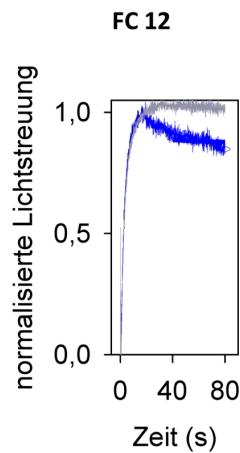


Abbildung 4-19: Lichtstreuukurven der *PffNT*-Proteoliposomen (blau) und leeren Liposomen (grau) gegen einen 20 mM Laktat Gradienten. *PffNT* stabilisiert mit FC 12.

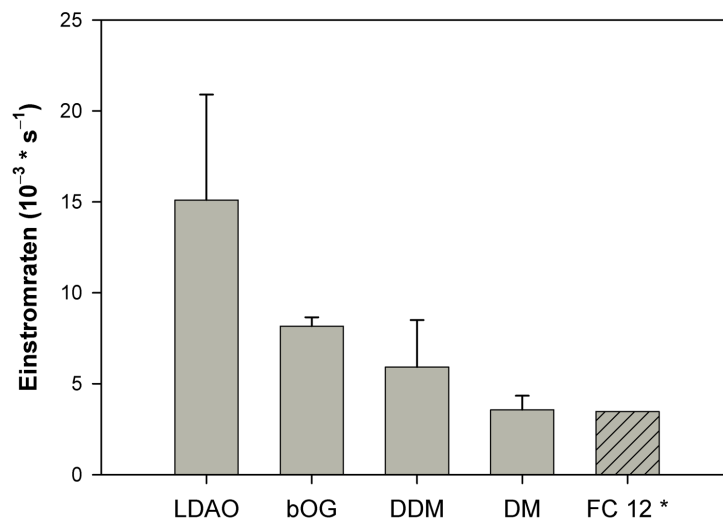


Abbildung 4-20: Vergleich der Laktat Einstromraten von *PffNT*-Proteoliposomen. *Die Proteoliposomen mit FC 12 stabilisiertem *PffNT* wurden in einem 20 mM HEPES Puffer pH 6,8 (4 °C) hergestellt und in statt mit einem 200 mM L-Laktat-Gradienten mit einem 20 mM L-Laktat-Gradienten aufgenommen. Die angegebenen Werte wurden durch drei bis vier Messungen ermittelt. Die Abweichungen sind als S.E.M. angegeben.

In allen fünf Varianten konnte eine Leitfähigkeit für *PffNT* gezeigt werden. Dabei unterschieden sich die Einstromraten je nach verwendeten Stabilisierungsdetergens.

Die höchsten Einstromraten zeigten Proteoliposomen mit *PffNT*, das zuvor mit LDAO und β -OG stabilisiert wurde. Mit DDM und DM wurden 50 % bzw. 25 % der Einstromraten von β -OG und LDAO verzeichnet (Abbildung 4-20). Für FC 12 stabilisiertes *PffNT* wurde die L-Laktat Einstromrate von ($3,5 \cdot 10^{-3} s^{-1}$) bestimmt. Ein direkter Vergleich der Einstromraten zwischen

Ergebnisse

stabile Plateauphase über 24 h aus. Die Bindung des Inhibitors an BSA wurde im Vergleich zu *PfFNT* innerhalb des Messzeitraums zu 80 % gelöst (Abbildung 4-22 B).

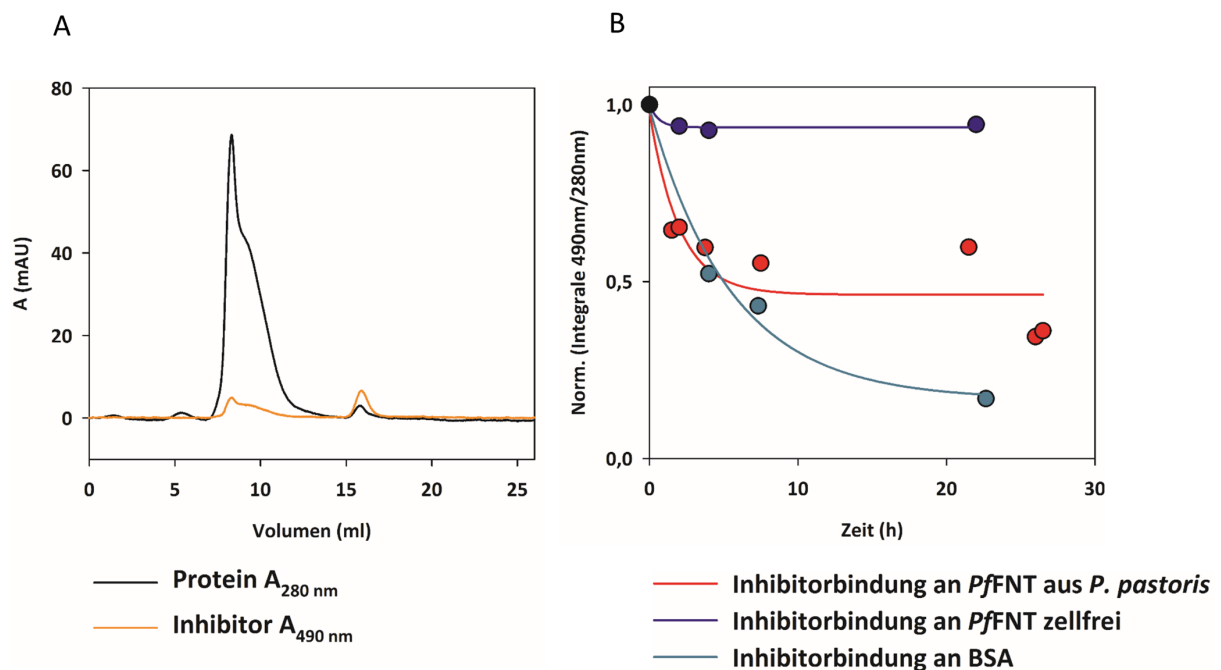


Abbildung 4-22: Über Größenausschlusschromatographie ermittelte Dissoziation des *PfFNT*-Inhibitors BH697 von in *P. pastoris* exprimiertem *PfFNT* (rot). Im Vergleich zellfrei exprimiertes *PfFNT* (blau) und als Negativkontrolle BSA (grün). (A) Chromatogramm der Trennung des *PfFNT*-Inhibitor-Komplexes von freiem Inhibitor zum Zeitpunkt null. (B) Inhibitorbindung an in *P. pastoris* exprimiertes *PfFNT* (rot), zellfrei exprimiertes *PfFNT* (blau) und BSA (grün) über einen Zeitraum von 24 h. Dargestellt durch die in Verhältnis zueinander gestellten Integrale der Absorption von 490 nm und 280 nm.

4.13 Kristallisationsscreenings mit *PfFNT*

Für die folgenden Kristallisationsansätze wurde gereinigtes *PfFNT*, wie in Kapitel 4.9 beschrieben, verwendet.

Zur Ermittlung passender Kristallisationsbedingungen wurden zunächst Kristallisationsscreenings in Zusammenarbeit mit dem *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) in Hamburg durchgeführt. Für die Kristallisationsansätze wurde mit verschiedenen Detergenzien (Tabelle 4-1) stabilisiertes und zuvor mit einem 100 kDa cut-off Filter auf 50 bis 100 μ l aufkonzentriertes *PfFNT* verwendet. Mit der Aufkonzentrierung wurde durch vorheriges Verdünnen der Proteinfraction die Natriumchloridkonzentration auf 50 mM und die Glycerolkonzentration auf 2,5 % (V/V) gesenkt (2.9.2 - Reinigungspuffer für die Kristallisation). In Tabelle 4-2 werden die verwendeten Stabilisierungsdetergenzien, Proteinkonzentrationen

Ergebnisse

und Inhibitorzusätze für die folgenden Kristallisationsansätze aufgeführt. Die erhaltenen Hits werden im Kapitel (4.13.1) dargestellt. Im Weiteren wurde für LDAO stabilisiertes *PfFNT* die Co-Kristallisation mit dem *PfFNT*-Inhibitor MMV007839 unter den *Screening*-Bedingungen getestet. Mit den zwei besten Kristallisationsbedingungen aus dem *Screening* mit LDAO stabilisiertem *PfFNT* wurde ein *Gridscreen* durchgeführt (4.13.2).

Ausgehend von den acht ermittelten Bedingungen wurde versucht die Kristallisation von LDAO stabilisiertem *PfFNT* manuell im 1 µl Maßstab im eigenen Labor zu reproduzieren (4.13.3).

Tabelle 4-1: Eingesetzte Detergenzien und Konzentrationen zur Stabilisierung

Stabilisierungsdetergens	Eingesetzte Konzentration in %
LDAO	0,27
FC 12	0,14
DDM	0,05
DM	0,17
β-OG	1,17

Tabelle 4-2: Kristallisationsansätze

Kapitel	Protein	Kristallisationsscreen	Detergens	Konzentration mg ml ⁻¹	Inhibitor- zusatz
4.13.1	<i>PfFNT</i>	MD MemGold™	LDAO	14	–
		MD MemGold2™			
		JB Membrane HTS96™			
4.13.1	<i>PfFNT</i>	MD MemGold™	FC 12	8	–
		MD MemGold2™			
		JB Membrane HTS96™			
4.13.1	<i>PfFNT</i>	MD MemGold™	DM	14	–
		MD MemGold2™			
		JB Membrane HTS96™			
4.13.1	<i>PfFNT</i>	MD MemGold™	β-OG	25	–
		MD MemGold2™			
		MD MemTrans™ JB Membrane HTS96™			

Ergebnisse

4.13.1	<i>PfFNT</i>	MD MemGold™ MD MemGold2™ JB Membrane HTS96™	DDM	23	-
4.13.1	<i>PfFNT</i>	MD MemGold™ MD MemGold2™ JB Membrane HTS96™	LDAO	14	MMV007839
4.13.2	<i>PfFNT</i>	<i>grid screen</i>	LDAO	37	-
4.13.3	<i>PfFNT</i>	-	LDAO	37	-

4.13.1 Kristallisationscreening

Folgend werden *Screening*-Kristallisationsbedingungen gezeigt, unter denen Kristallwachstum detektiert wurde. Die Sortierung erfolgt nach Kristallformen.

Tabelle 4-3: Kristallisationspufferbedingungen mit Bildung hexaedrisch geformten Kristalle

Nr.	Detergens	Salz	Puffer	pH	Präzipitant	Wachstum
1	LDAO	0,15 M Na- Formiat	0,1 M HEPES	7,2	18 % (m/V) PEG 3350	Tag 7
2	LDAO	0,1 M KCl	0,02 M Tris	7,0	20 % (m/V) PEG 4000	ab Tag 3
3	DM	0,05 M NaCl	0,1 M Na-Citrat	5,5	26 % (m/V) PEG 400	ab Tag 28
4	β-OG	0,15 M NaCl	0,05 M Na-Citrat	5,6	10 % (m/V) PEG 3350	ab Tag 7
5*	LDAO	0,2 M NaCl	0,025 M HEPES	7,5	13 % (m/V) PEG 4000	ab Tag 14
6*	LDAO	0,1 M KCl	0,02 M Tris	7,0	20 % (m/V) PEG 4000	ab Tag 3
7*	LDAO	0,1 M LiCl	0,01 M Tris	7,5	15 % (m/V) PEG 4000	ab Tag 7

(* *PfFNT* Inhibitor wurde zur Co-Kristallisation während der Reinigung zugesetzt)

Ergebnisse

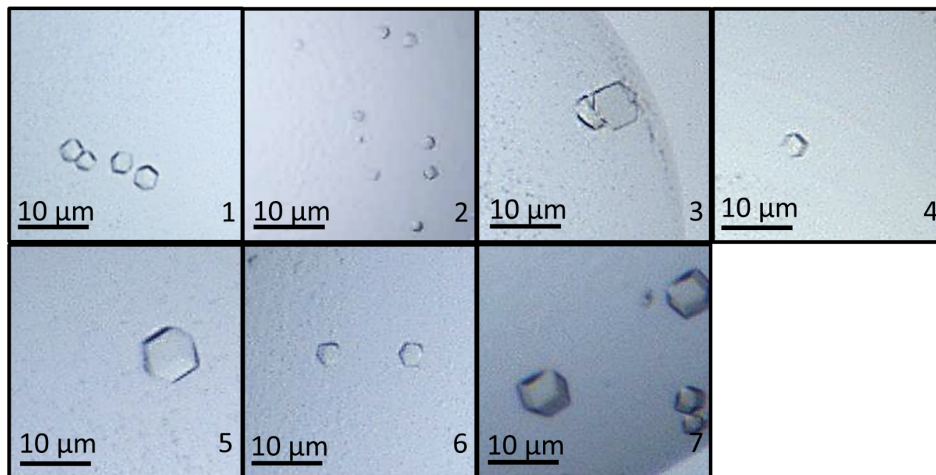


Abbildung 4-23: Fotografien von hexaedrisch geformten Kristallen aus dem Kristallisationscreening mit *PfFNT* unter den in Tabelle 4-3 aufgeführten Bedingungen.

Unter den Kristallsationsbedingungen 1-7 (Tabelle 4-3) sind aus LDAO, β -OG und DM-stabilisiertem *PfFNT* hexaedrische Kristalle ab einem Zeitraum von 3-28 Tagen gewachsen. Die Kristallgrößen liegen zwischen 1-5 μm . Die größten Kristalle sind mit 5 μm Kantenlänge unter Zusatz des *PfFNT*-Inhibitors MMV007839 gewachsen.

Gemeinsamkeiten unter den Pufferbedingungen liegen in der ähnlichen Salzzusammensetzung mit einwertigen Kationen (Na^+ , Li^+ , K^+) und Chlorid und Formiat als Anionen, einem neutralen pH-Wert, sowie einem hochmolekularem PEG-Anteil von 10-20 %. Mit DDM und β -OG stabilisiertem *PfFNT* bildeten sich unter Pufferbedingung 3 und 4 mit einem sauren pH-Wert von 5,5 bzw. 5,6 ebenfalls hexaedrische Kristalle.

Tabelle 4-4: Kristallisationspufferbedingung mit Bildung mikrokristalliner Strukturen

Nr.	Detergens	Salz	Puffer	pH	Präzipitant	Wachstum
8	FC 12	-	0,1 M MES	6,0	11 % (m/V) PEG 20000	ab Tag 55

Ergebnisse

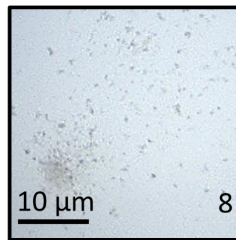


Abbildung 4-24: Fotografien von Mikrokristallen aus dem Kristallisationsscreening mit *PffNT* unter den in Tabelle 4-4 aufgeführten Bedingungen.

Unter Bedingung 8 (Tabelle 4-4) sind Kristalle im Nanometermaßstab gewachsen. Es zeigt sich eine sandartige Struktur. Mit FC 12 stabilisiertem *PffNT* konnte nur unter dieser Bedingung erst ab Tag 55 eine kristalline Struktur detektiert werden.

Tabelle 4-5: Kristallisationspufferbedingungen mit Bildung abgerundeter kristalliner Strukturen

Nr.	Stabilisierungs-Detergens	Salz	Salz	Puffer	pH	Präzipitant	Wachstum
9	LDAO	0,1 % (m/V) NaN ₃	0,36 M NaCl	0,15 M Na ₃ PO ₄	7,0	9,9 % (m/V) PEG 4000	ab Tag 3
10	DM	-	-	-	-	35 % (m/V) PEG 600	ab Tag 7
11	β-OG	-	-	0,1 M Na-Citrat	5,5	10 % (m/V) PEG 2000	ab Tag 1
12*	LDAO	0,15 M Na- Formiat	-	0,1 M HEPES	7,2	18 % (m/V) PEG 3350	ab Tag 7

(* *PffNT* Inhibitor wurde zur Co-Kristallisation während der Reinigung zugesetzt)

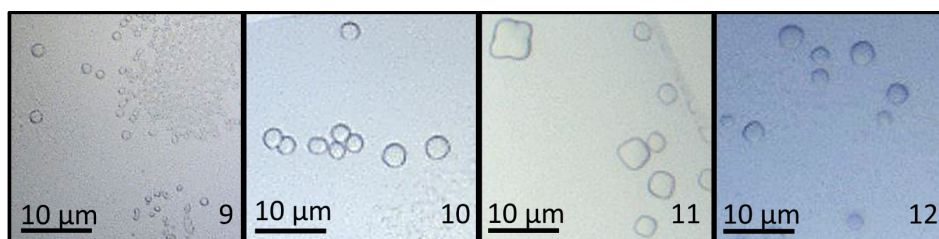


Abbildung 4-25: Fotografien von abgerundeten Kristallstrukturen aus dem Kristallisationsscreening mit *PffNT* unter den in

Tabelle 4-5 aufgeführten Bedingung.

Ergebnisse

Unter den Bedingungen 9-11 sind abgerundete Kristallstrukturen ab einem Zeitraum von einem bis sieben Tagen gewachsen. Die Gemeinsamkeiten dieser Bedingungen liegen erneut bei einem hohen Anteil an hochmolekularem PEG zwischen 9,9-18 %. Auffällig ist hier das Wachstum von abgerundeten Kristallen unter Bedingung 12. Da unter gleichen Pufferbedingungen mit LDAO stabilisierten PfFNT ohne Inhibitorzusatz hexaedrisch geformte Kristalle wuchsen.

Tabelle 4-6: Kristallisationspufferbedingungen mit Bildung unspezifischer kristalliner Strukturen

Nr.	Stabilisierungs-Detergens	Salz	Salz	Puffer	pH	Präzipitant	Wachstum
13	LDAO	-	-	-	-	35 % (m/V) PEG 600	Tag 7
14	LDAO	0,05 M Na-Citrat	0,12 M KCl	0,08 M Bis-Tris	6,0	14 % (m/V) PEG 4000	Tag 7
15	LDAO	0,15 M NaCl	-	0,1 M Tris	8,0	13 % (m/V) PEG 6000	Tag 3
16	LDAO	0,02 M Na-Citrat	-	0,08 M Na ₃ PO ₄	6,2	18 % (m/V) PEG 2000	Tag 3
17	LDAO	0,1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	-	0,1 M HEPES	7,5	12 % (m/V) PEG 4000 22 % (m/V) Glycerol	Tag 56
18*	LDAO	0,05 M Na-Citrat	0,12 M KCl	0,08 M Bis-Tris	6,0	14 % (m/V) PEG 4000	Tag 7
19	DDM	0,1 M NaCl	0,15 M NH ₄ SO ₄	0,01 M MES	6,5	19 % (m/V) PEG 1000	Tag 14
20	DDM	-	-	-	-	35 % (m/V) PEG 600	Tag 7

Ergebnisse

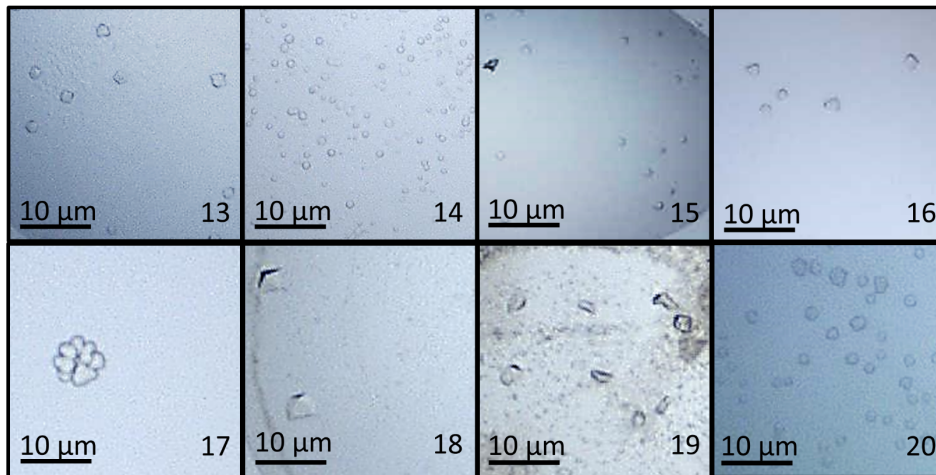


Abbildung 4-26: Fotografien von unspezifischen Kristallstrukturen aus dem Kristallisationsscreening mit PffNT unter den in Tabelle 4-6 aufgeführten Bedingungen.

Unter den Bedingungen 13-20 werden zusammengefasst alle Bedingungen aufgeführt, unter denen es zur Bildung kristalliner Strukturen kam, die aber keiner Form direkt zugeordnet werden können.

Zusammenfassend haben die *Screenings* der verschiedenen Kristallisationspuffer gezeigt, dass mit LDAO stabilisiertem PffNT und einem Kristallisationspuffer mit neutralem pH-Wert, einem Natriumsalzzusatz mit Chlorid oder Formiat als Anion und der Zusatz von hochmolekularem PEG die Kristallisation von scharf abgegrenzten hexaedrisch geformten Kristallen fördert. Die Co-Kristallisation des PffNT-Inhibitors MMV07839 hat das Wachstum größerer Kristalle begünstigt.

4.13.2 Grid-Screen

Abgeleitet von Ergebnissen des Kristallisationsscreenings des mit LDAO stabilisierten Proteins, wurde ausgehend von den besten Kristallisationsbedingungen eins und fünf (Tabelle 4-3) ein *Grid Screen* durchgeführt. Der PffNT Inhibitor wurde in diesem *Screening* nicht zugesetzt.

Unter Bedingung 1 wurden die Konzentrationen von Na-Formiat, HEPES, PEG 3350 sowie der pH-Wert variiert und unter Bedingung 3 die Konzentration von NaCl, HEPES, PEG 4000 sowie der pH-Wert variiert (Tabelle 4-8).

Tabelle 4-7: Kristallisationsbedingungen für den *grid screen*

	1 - 10	Ausgangsbedingungen
A	0,025M HEPES pH 7,5 0,2M Natriumchlorid 10-20 % PEG 4000	
B	0,025M HEPES pH 7,5 0,05-0,4M Natriumchlorid 13 % PEG 4000	MemGold™ screen Nummer B6:
C	0,025M HEPES pH 7-8 0,2M Natriumchlorid 13 % PEG 4000	0,2M Natriumchlorid, 0,025M HEPES pH 7,5 13 % PEG 4000
D	0,025-0,15 M HEPES pH 7,5 0,2 M Natriumchlorid 13 % PEG 4000	
E	0,15 M Natriumformiat 0,1 M HEPES pH 7-8 18 % PEG 3350	
F	0,15 M Natriumformiat 0,025-0,15 M HEPES pH 7,2 18 % PEG 3350	MemGold™ Nummer D10 0,15 M
G	0,025-0,3 M Natriumformiat 0,1 M HEPES pH 7,2 18 % PEG 3350	Natriumformiat, 0,1 M HEPES pH 7,2 18 % PEG 3350
H	0,15 M Natriumformiat 0,1 M HEPES pH 7,2 13-22 % PEG 3350	

Tabelle 4-8: Optimierte Kristallisationsbedingungen mit LDAO

Nr.	Salz	Salz 2	Puffer	pH	Präzipitant	Wachstum ab
21	0,4 M NaCl	-	0,025 M HEPES	7,5	13 % (m/V) PEG 4000	Tag 3
22	0,15 M Na- Formiat	-	0,1 M HEPES	7,2	13,8 % (m/V) PEG 3350	Tag 3
23	0,15 M Na- Formiat	-	0,1 M HEPES	7,2	13 % (m/V) PEG 3350	Tag 3

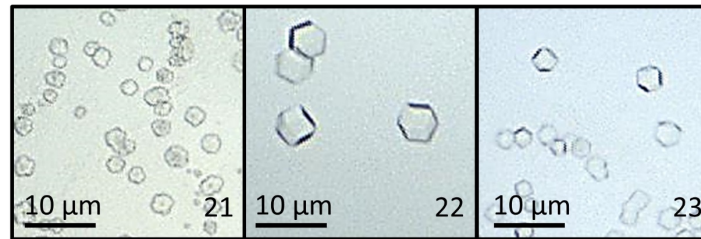


Abbildung 4-27: Fotografien des Kristallisationsansatzes unter den in Tabelle 4-8 aufgeführten Bedingung.

Die Reduktion des PEG-Anteils auf 13 % (m/V) der Kristallisationsbedingung 1 (Tabelle 4-3) führte zu einer deutlichen Verbesserung des Kristallwachstums und der Kristallform. Wie in Abbildung 4-27 Bild 22 und 23 zu sehen ist, kommt es zur Ausbildung scharf umrissener hexaedrischer Kristalle. Die Größe der gewachsenen Kristalle liegt hier ohne Co-Kristallisation des *PfFNT*-Inhibitors zwischen 3-5 µM.

Die Veränderung von Kristallisationsbedingung 5 (Tabelle 4-3) hat im *Grid-Screen* zu keiner Verbesserung der Kristallgröße und -form geführt. Wie in Abbildung 4-27 Bild 21 zu sehen ist, entstanden im *Grid-Screen* nur unspezifische verwachsene Strukturen. Die zuvor gesehenen klaren hexaedrischen Kristallstrukturen konnten nicht reproduziert werden.

Die im *Grid Screen* gefundenen Kristallisationsbedingungen sollten im weiteren Verfahren helfen vom Nanoliter-*Screening*-Maßstab in den Mikrolitermaßstab zu gelangen und so größere Kristalle zu erhalten.

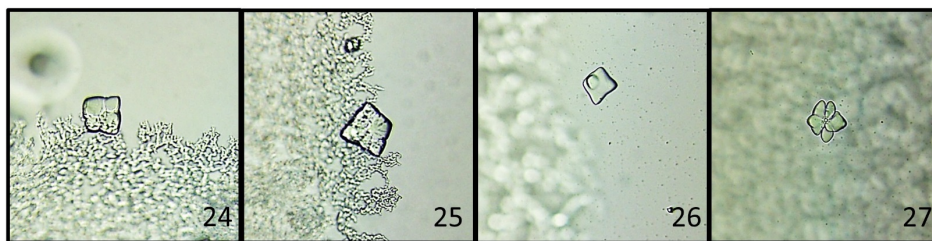
4.13.3 Kristallisationsansätze im Mikroliter-Maßstab

Ausgehend von den erfolgreichen Pufferbedingungen aus dem Kristallisationsscreening mit LDAO stabilisierten *PfFNT* (Tabelle 4-3 bis 4-6) wurden im Mikrolitermaßstab Kristallisationansätze angefertigt und anschließend bei 19 °C gelagert.

Kristallartige Strukturen sind nur unter den in Tabelle 4-9 aufgeführten Bedingungen gewachsen.

Tabelle 4-9: Kristallisationsbedingungen für eigene Ansätze im Mikrolitermaßstab

Nr.	Stabilisierungs- detergens	Salz	Salz 2	Puffer	pH	Präzipitant	Wachstum
24,	LDAO	0,05 M	0,12 M	0,08 M	6,0	14 % (m/V)	ab Tag 13
25		Na-Citrat	KCl	Bis-Tris		PEG 4000	
26,	LDAO	0,1 M	-	0,1 M	7,5	12 % (m/V)	ab Tag 11
27		(NH ₄) ₂ SO ₄		HEPES		PEG 4000 22 % (m/V) Glycerol	

**Abbildung 4-28: Fotografie des Kristallisationsansatzes unter den in Tabelle 4-9 aufgeführten Bedingungen. Der Maßstab wurde nicht ermittelt.**

Vergleichend zu den gewachsenen Strukturen unter gleichen Bedingungen (Tabelle 4-6, Abbildung 4-26, Nr. 14 und 17), bildeten sich hier verwachsene Strukturen aus. Das Wachstum erfolgte 10 Tage später im Fall von Ansatz Nr. 24 und Nr. 25 und 45 Tage früher im Fall von Ansatz Nr. 26 und Nr. 27 als im *Screening*.

Auffällig war die plättchenartige Struktur bei den Ansätzen Nr. 24, Nr. 25 und Nr. 27 sowie die tetrapodale Struktur bei Ansatz Nr. 26 (Tabelle 4-9, Abbildung 4-28).

4.13.4 Nicht-kristallines Wachstum

Neben eindeutigem Kristallwachstum wurden weitere Wachstumseffekte auf den Kristallisationsplatten detektiert, die hier exemplarisch dargestellt werden (Abbildung 4-29).

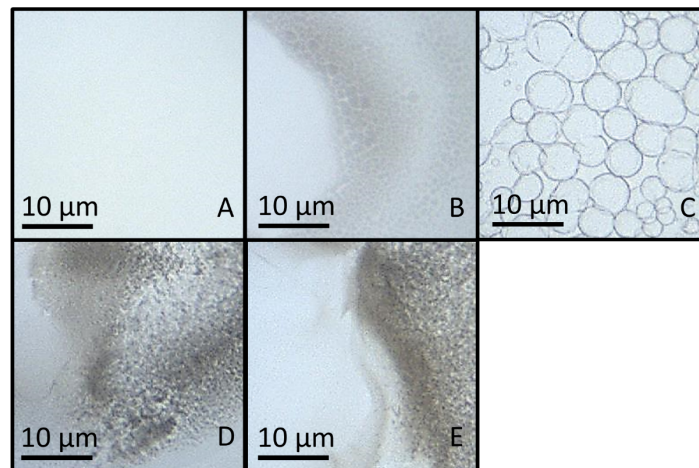


Abbildung 4-29: Fotografien der Kristallisationsansätze von PpFNT. (A) klarer Tropfen, (B) Phasenseparation 1, (C) Phasenseparation 2, (D) Präzipitation, (E) Präzipitation.

Abbildung 4-29 A zeigt einen „klaren Tropfen“, eine Kristallisationsplatte ohne jegliches Wachstum. Unter B und C ist in beiden Fällen Phasenseparation zu sehen. Dabei zeigen sich unter B kleinste graue und weiße mosaikartige Strukturen und unter C tropfenartige Phasenseparation. Unter D und E sind verschiedene Formen von Präzipitaten zu sehen. Dabei zeigt sich unter D und E eine braune bis graue amorphe Struktur.

4.14 Röntgendiffraktometrische Untersuchung

Die unter den in Tabelle 4-10 aufgeführten Kristallisationsbedingungen gewachsenen Kristalle wurden von Prof. Dr. Axel Scheidig und Felix Helfrich, Abteilung „Strukturbiologie“ am Zoologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, von den Kristallisationsplatten isoliert und in flüssigen Stickstoff überführt sowie röntgendiffraktometrisch untersucht.

Die röntgendiffraktometrische Untersuchung der isolierten Kristalle an der P14 Beamline im European Molecular Biology Laboratory (EMBL) in Hamburg zeigte kein Proteinstreumuster. Anhand des fehlenden Streumusters wird vermutet, dass es sich bei den untersuchten Kristallen um Detergenzienkristalle handelt oder das Protein eine starke Fehlordnung aufweist.

Tabelle 4-10: Kristallisationsbedingungen der durch Röntgendiffraktometrie untersuchten Kristalle

Nr.	Stabilisierungs- detergens	Salz	Salz 2	Puffer	pH	Präzipitant	Wachstum
16	LDAO	0,02 M Na- Citrat	-	0,08 M Na ₃ PO ₄	6,2	18 % (m/V) PEG 2000	ab Tag 3
22	LDAO	0,15 M Na-Formiat	-	0,1 M HEPES	7,2	13,8 % (m/V) PEG 3350	ab Tag 7
23	LDAO	0,15 M Na-Formiat	-	0,1 M HEPES	7,2	13 % (m/V) PEG 3350	ab Tag 7
24, 25	LDAO	0,05 M Na- Citrat	0,12 M KCl	0,08 M Bis-Tris	6,0	14 % (m/V) PEG 4000	ab Tag 7
26, 27	LDAO	0,1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	-	0,1 M HEPES	7,5	12 % (m/V) PEG 4000 22 % (m/V) Glycerol	ab Tag 56

5 Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war, den plasmodialen Laktattransporter *PfFNT* in großen Mengen rekombinant herzustellen und für die strukturelle Aufklärung zu reinigen. Im Folgenden sollen die Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert werden.

5.1 Große Mengen *PfFNT* mit *Pichia pastoris*

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *P. pastoris* ein geeignetes Expressionssystem für die Herstellung großer Mengen *PfFNT* im Fermenter ist. Durch die Gewinnung der mikrosomalen Fraktion konnte aus der feuchten Zellmasse ein stabiles Pentamer in den Zellmembranen isoliert und durch die Westernblot-Analyse detektiert werden.

Unter Berücksichtigung des beschriebenen zweiphasigen Fermentationsprozesses (3.2.3) wurden in dieser Arbeit vergleichbare Zellmassen von 200-250 g l⁻¹ für *P. pastoris* beschriebene Fermentationsprozesse erreicht [83, 125]. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von Methanol nach 24 h Fermentation. Die Glycerolzufuhr wurde daraufhin gestoppt. Zur Maximierung der Zell- und Proteinausbeuten wurden für jede Phase die maximale Glycerol- und Methanolzufuhr pro Stunde ermittelt. Entgegengesetzt der Induktions- und Repressionstheorie der *AOX1* (1.4.1) [76], die in dieser Arbeit streng verfolgt wurde, wird in [126] gezeigt, dass auch eine parallele Zufuhr von Glycerol und Methanol zur Steigerung des Zellwachstums während der Induktion möglich ist. Nach 96 h Fermentationsprozess konnte dort aber nur eine Zellmasse von 125 g l⁻¹ ermittelt werden. Diese Möglichkeit sollte vor allem dann genutzt werden, wenn während der ersten Wachstumsphase ohne Methanolzufuhr keine ausreichenden Zelldichten erreicht wurden. So konnte zur Expression von *PfFNT* nach 24 h Zellwachstum schon fast die finale Zelldichte von 200 g l⁻¹ gemessen werden. Während in [126] nach 24 h Fermentationsprozess lediglich eine Zelldichte von 30 g l⁻¹ erreicht wurde. Hier zeigt sich, dass für meinen Fermentationsprozess die Abwandlung der Induktionsphase keine Relevanz hat. Zur Steigerung der *PfFNT*-Ausbeute wäre es eher denkbar, den Prozess der Induktion um weitere 12 bis 24 h fortzuführen, statt nach 44 h Methanolzufuhr und 68 h Gesamtfermentationsdauer den Prozess zu beenden. Limitierend zu betrachten sind aber vor allem während des verlängerten Fermentationsprozesses entstehende toxische Stoffwechselprodukte, die das Zellwachstum und in die Proteinexpression behindern. Im Vergleich zur Herstellung in der Schüttelkultur ermöglicht der Fermenter deutlich größere Kulturansätze und eine genaue Überwachung und

Diskussion

Steuerung der Prozessparameter, wie Sauerstoffsättigung, Temperatur, pH-Wert sowie Glycerol- und Methanolzugabe. Nichtsdestotrotz zeigen Untersuchungen, dass Teilautomatisierungen, wie Messung der Sauerstoffsättigung und Methanolkonzentration, auch im kleineren Maßstab möglich sind [127, 128]. Die erreichten Zelldichten von einer maximalen $OD_{600} = 120$ zeigten aber die Limitation im Bereich der Masse und folgend auch der Ausbeute.

5.2 Isolation von stabilem und funktionellem PfFNT

5.2.1 Solubilisierung

Der Weg von den isolierten Lipid-Membranen bis zu einem reinen Protein-Detergens-Komplex umfasst einen vielfältigen Reinigungsaufwand. Der zu Beginn entscheidende Prozess der Solubilisierung des Proteins aus der Lipidumgebung der Zellmembran, stellt einen kritischen Arbeitsschritt dar. Das Finden des passenden Detergens ist dabei essentiell. Für die Solubilisierung von PfFNT wurden nicht-ionische und zwitter-ionische Detergenzien getestet. Dabei konnten gute Solubilisierungsergebnisse mit dem zwitter-ionischen Detergens LDAO und dem nicht-ionischen Detergens DDM erreicht werden. Mit dem ebenfalls zwitter-ionischen Detergens CHAPS wurden nur sehr geringe Ausbeuten erreicht. Mit β -OG und FC 12 konnte PfFNT nicht aus den Zellmembranen isoliert werden.

Bei der Auswahl der passenden Solubilisierungsdetergenzien wird versucht anhand der Ladung, der Größe der Kopfgruppe und der Länge der Alkylkette die Solubilisierungsstärke und Stabilisierungseigenschaft vorauszusagen (Abbildung 5-1). Dabei gelten nicht-ionische Detergenzien mit großen hydrophilen Kopfgruppen und langen lipophilen Alkylketten, wie das hier verwendete DDM mit einer Maltosid-Kopfgruppe und einer C12-Kohlenstoffkette als besonders „mild“ und nicht denaturierend [129, 130]. SDS mit einer geladenen Kopfgruppe gilt hingegen als ein sehr „harsches“ Detergens mit sehr großen Solubilisierungsausbeuten bei Membranproteinen, dem aber ein stark denaturierender Effekt entgegensteht [90].

Mit Verkürzung der Kohlenstoffkette nimmt der Denaturierungseffekt zu. Zwitterionische Detergenzien nehmen hier eine Zwischenposition in dieser Theorie ein. Auf Grund der intramolekularen ausgeglichenen Ladung werden Effekte der nicht-ionischen „milden“ und ionischen „harschen“ Detergenzien kombiniert, sodass ein verbesserter Solubilisierungserfolg und gleichzeitig ein weniger stark denaturierender Effekt postuliert wird [90].

Diskussion

Bei der Solubilisierung von PfFNT konnten ähnliche Effekte beobachtet werden. Von den zwei nicht-ionischen Detergenzien wurde DDM als geeignetes Detergens ermittelt. β -OG mit einer vergleichsweise kurzen C8-Kohlenstoffkette und einem einfach-Glucoserest als hydrophile Kopfgruppe wies hier eine zu geringe Solubilisierungskraft auf, um die Membranen aufzulösen.

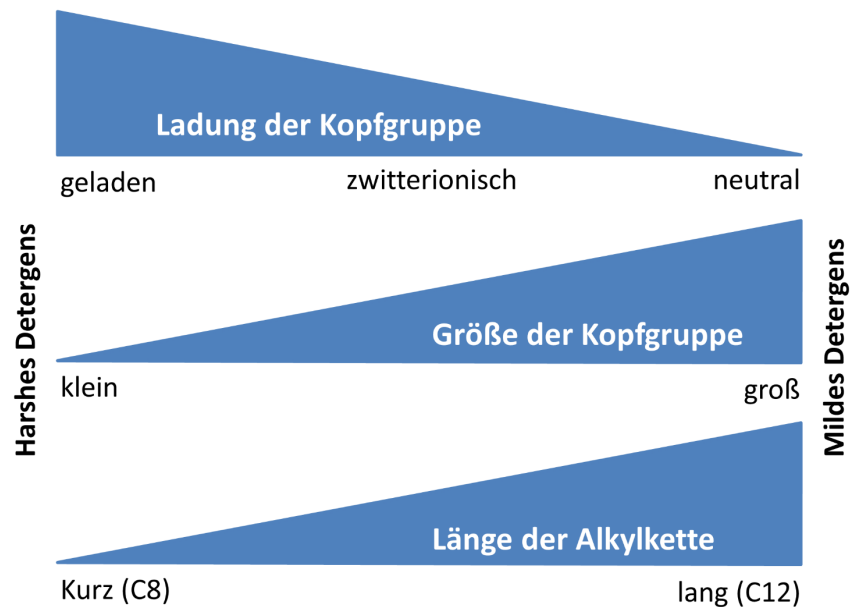


Abbildung 5-1: Einordnung von Detergenzien nach ihrer Struktur der hydrophilen Kopfgruppe, der Länge der lipophilen Alkylkette und möglicher Ladungen. Abbildung modifiziert nach [116].

Die längere lipophile C12-Kohlenstoffkette und der hydrophile zweifach-Glucoserest von DDM zeigte hier entscheidende Vorteile. Das zwitter-ionische Detergens LDAO mit einer C12-Kohlenstoffkette zeigte in meinen Untersuchungen die größten Solubilisierungsausbeuten. Dies kann laut der vorgestellten Postulate, im Vergleich zur Ausbeute mit DDM, auf die vorhandene ausgeglichene Ladung im Molekül bei unveränderter Kohlenstoffkettenlänge zurückgeführt werden.

Nichtsdestotrotz kann für die Auswahl des Detergens für die Solubilisierung keine generelle Regel oder Empfehlung getroffen werden. Für jedes Membranprotein sollten Detergenzien daher individuell getestet werden. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Solubilisierung zunächst mit möglichst milden Detergenzien mit langer C12 Kohlenstoffkette sinnvoll ist. Der Einfluss einer möglichen Ladung des verwendeten Detergens sollte individuell genauso getestet werden, da die Ladung das Risiko von Denaturierungseffekten erhöht. Bezogen auf

Diskussion

die Solubilisierungsausbeute von *PfFNT* zeigte sich die ausgeglichene Ladung von LDAO allerdings als sehr vorteilhaft.

5.2.2 Mit DDM und LDAO zum stabilen Pentamer

Neben der Findung des passenden Detergens ist die Menge des eingesetzten Gesamtproteins bei der Solubilisierung von großer Bedeutung. In dieser Arbeit wurde bezogen auf 5-10 mg ml⁻¹ Gesamtprotein in der mikrosomalen Fraktion verschiedene Solubilisierungskonzentrationen im Bezug auf die kritische Solubilisierungskonzentration (CSC) für DDM und LDAO getestet und Stabilitätsuntersuchungen per Westernblot-Analyse durchgeführt.

Eine genaue Untersuchung der CSC, neben der Optimierung der Solubilisierungsausbeuten, ist auch in Bezug auf die Proteinstabilität von Bedeutung. Während es bei zu niedrigen Detergenkonzentrationen nicht zur Auflösung der Membran und zur Ausbildung des gewünschten Protein-Detergens-Komplexes kommt, kann eine zu hohe Konzentration zur Bildung von Lipid-Detergens-Komplexen führen (Abbildung 5-2) [116]. Denaturierungs- und Aggregationseffekte werden durch Herauslösen von strukturerhaltenen Lipiden am Protein in Folge beschrieben [131, 132].

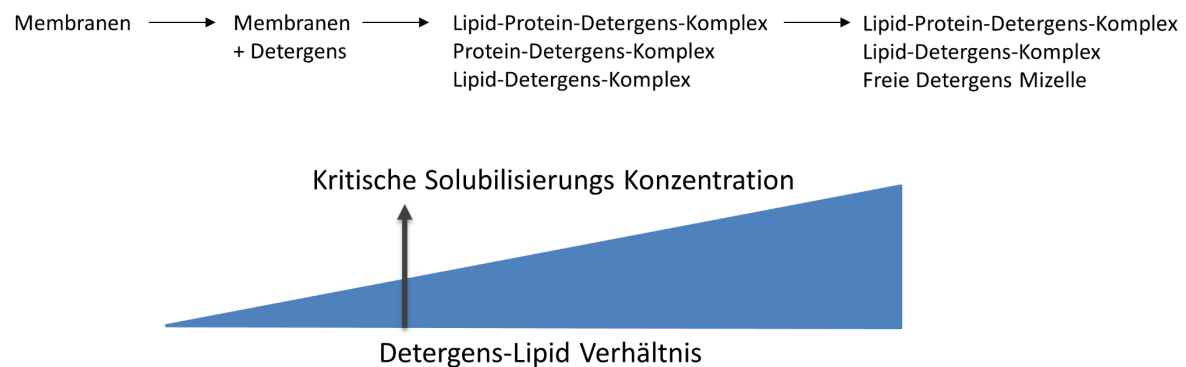


Abbildung 5-2: Solubilisierung von Membranproteinen mit Detergenzien. (A) Detergens bindet an Lipid-Membranen, (B) Detergens löst Lipide der Membranen an und solubilisiert Proteine und Lipide, (C) zusätzlich können zu Proteinen und Lipiden strukturerhaltene Lipide der Proteine solubilisiert werden. Abbildung modifiziert nach [116].

Mit DDM konnte in Konzentrationen zwischen 0,5 %-1,7 % *PfFNT* in gleichbleibender Stärke solubilisiert werden und in der Westernblot-Analyse ein stabiles Pentamer detektiert werden. Mit einem 0,1 %igen DDM-Solubilisierungspuffer konnten keine Erfolge mehr erzielt werden. Das lässt darauf schließen, dass erst ab 0,5 % die kritische-Solubilisierungskonzentration

Diskussion

(CSC) überschritten wurde. Eine weitere Steigerung der Detergengkonzentration führt nach Überschreiten der CSC zu keiner verbesserten Ausbeute (Abbildung 4-6).

Für LDAO konnten mit Erhöhung der Detergengkonzentration bis zu 4,5 % ansteigende Solubilisierungsausbeuten für *PfFNT* erzielt werden. Die CSC für LDAO liegt nach diesen Untersuchungen bei $\geq 4,5$ % (Abbildung 4-8,Abbildung 4-9) .Der Theorie der CSC folgend wäre eine weitere Erhöhung der Detergengkonzentration denkbar. Wie schon für DDM konnte für alle getesteten Konzentrationen ein stabiles Pentamer detektiert werden. Die Inkubation mit dem denaturierenden Detergens SDS stellt hier eine geeignete In-Prozess-Kontrolle für die Stabilität von *PfFNT* dar. Dabei wird davon ausgegangen, dass kleine Konformationsänderungen der Monomere während des Solubilisierungsprozesses ausreichen, um stabilisierende Wechselwirkungen zwischen den Monomeren herabzusetzen. Es kommt in Folge zum Zerfall des Pentamers, wie es auch für *EcGlpF* und *HsAQP4* beschrieben wurde [133, 134].

Mit den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch die Solubilisierung mit DDM und LDAO ein stabiles *PfFNT*-Pentamer isoliert werden konnte.

5.2.3 Proteinreinigung für die Kristallisation

PfFNT konnte erfolgreich mit *P. pastoris* hergestellt werden und mit LDAO und DDM aus den Lipid-Membranen solubilisiert werden. Mit dem Ziel hochgereinigtes Protein für die Kristallisation zu isolieren, wurden nach der Solubilisierung per Nickelreinigung und Größenausschlusschromatographie weitere Reinigungsschritte angefügt. Während der Nickelreinigung wurde die Detergengkonzentration gesenkt. Im Vergleich zur Solubilisierung wird zur Stabilisierung des Protein-Detergens-Komplexes nur eine geringe Detergengkonzentration zwischen der 2-5-fachen CMC benötigt. Gleichzeitig wurde die Effektivität eines Detergenzientausches mit weiteren Detergenzien während der Nickelreinigung untersucht. Ziel des Tausches war es, neue stabilisierende Detergenzien für die späteren Kristallisationsansätze zu ermitteln. Reinigungs- und Stabilisierungserfolge wurden dabei anhand der Elutionssignale im Coomassie-gefärbten Gel der SDS-PAGE der Nickelreinigung und anhand der Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie beurteilt.

Diskussion

Eine einzelne scharfe Pentamerbande in der SDS-PAGE und ein monodisperser Peak im Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie stellte dabei den höchsten angestrebten Reinheits- und Stabilitätsgrad dar.

5.2.3.1 Nickelreinigung und Detergenzientausch

Für DDM solubilisiertes *PfFNT* wurde ein Wechsel mit den Detergenzien CHAPS, β -OG und FC 12 sowie DDM als Kontrolle durchgeführt. Im Vergleich dazu wurde mit LDAO solubilisierten *PfFNT* ein Wechsel mit den Detergenzien DM, DDM, β -OG und FC 12 durchgeführt.

Die im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel gesehenen Pentamerbanden zeigen die Stabilisierung des *PfFNT*-Pentamers während der Nickelreinigung mit den getesteten Detergenzien CHAPS, β -OG und FC 12 sowie DDM. Eine vollständige Auflösung des Nickel-Protein-Komplexes bis zu einer Imidazolkonzentration von 500 mM war allerdings nur mit FC 12 möglich (Abbildung 4-7).

Mit LDAO solubiliertem *PfFNT* konnte sowohl durch die Reinigung mit LDAO als auch durch einen Detergenzienwechsel zu DM, DDM, β -OG und FC 12 eine Stabilisierung des *PfFNT*-Pentamers erfolgen. Im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel zeigte sich für die Reinigung mit LDAO, DM, DDM und β -OG eine vergleichbare Elution von *PfFNT* zwischen 300-600 mM Imidazolkonzentration. FC 12 zeigt dagegen auch hier eine einzelne auffällig intensive Pentamer-Bande bei 400 mM Imidazolkonzentration (Abbildung 4-11).

Sowohl DDM als auch LDAO solubilisiertes *PfFNT* konnte während der Nickelreinigung im Oligomerisierungszustand des Pentamers stabilisiert werden. Die Elution einer isolierten Bande im Coomassie-gefärbten SDS-Page-Gel nach dem Detergenzienwechsel zu FC 12 lässt für beide Solubilisierungsdetergenzien darauf schließen, dass der Austausch nur mit FC 12 funktioniert hat.

Eine Erklärung für die Beobachtung kann darin liegen, dass der Wechsel des Detergens während der Nickelreinigung nicht zum kompletten Austausch, sondern viel mehr zur Ausbildung von Mischmizellen führte. Das bedeutet, dass neben dem Solubilisierungsdetergens LDAO bzw. DDM das Stabilisierungsdetergenz den Protein-Detergenz-Komplex nur weiter ergänzt und stabilisiert hat. Nach Einordnung der Detergenzstärke nach Abbildung 5-1 bilden β -OG, DM und DDM als nicht-ionische

Diskussion

Detergenzien in der Reihenfolge aufsteigend milde Detergenzien. Der Theorie folgend werden die ausgebildete LDAO-Mizelle bzw. DDM-Mizelle, ohne sie aufzubrechen, ergänzt. FC 12 dagegen als zwitterionisches Detergens mit großer Kopfgruppe und einer C12 Alkylkette gilt vor allem im Vergleich durch die Ladung als starkes und „harsches“ Detergens, das so deutlich leichter vorhandene Mizellhüllen aufbrechen kann.

Die beobachteten Effekte bestätigen die weit verbreitete Methode des Detergenzienwechsels während der Nickelreinigung. Es wird aber auch deutlich, dass der vollständige Austausch nicht mit jedem Detergens möglich ist und dessen Solubilisierungsstärke maßgeblichen Einfluss hat. Der Vergleich zu Protein-Reinigungsprozessen zur Strukturaufklärung anderer FNTs zeigt, dass der Austausch des Detergens während der Reinigung maßgeblichen Einfluss auf die Kristallisation haben kann. Zur Aufklärung der FNT Strukturen von *E. coli* FocA und *V. cholerae* FocA sowie *C. difficile* HSC erfolgte auch während der Nickelreinigung ein Detergenzienwechsel von dem Solubilisierungsdetergens DDM zu β -OG [38, 39, 41].

5.2.4 Detergenzieneinfluss auf die Größenausschlusschromatographie

Die Chromatogramme der Größenausschlusschromatographie zeigen bis auf mit β -OG stabilisiertes PfFNT keine monodispersen Peaks. Die Ausbildung einer reinen Proteinfraktion mit β -OG bildet eine hervorragende Grundlage für die folgenden Kristallisationsansätze. In Bezug auf die ineinander überlaufenden Peaks mit den anderen vier Detergenzien wird in Abbildung 4-8 dazu beispielhaft in der Westernblotanalyse gezeigt, dass im 1. Hauptpeak und im kleinen 2. Nebenpeak PfFNT als Pentamer eluiert wurde. Die Frage stellt sich, was zu der Aufspaltung des Chromatogramms in zwei ineinander überlaufende Peaks führt.

Ein Erklärungsmodell ist die Zusammenlagerung von mehreren Pentameren. Die im Rahmen der Funktionsuntersuchung erstellten TEM-Aufnahmen von gereinigtem und mit DM stabilisierten PfFNT zeigen neben reinen pentameren Strukturen auch teilweise Multimerisierungen von drei Pentameren (Abbildung 4-16,Abbildung 4-17). Denkbar ist nach diesem Erklärungsmodell, dass der erste Hauptpeak drei zusammengelagerte Pentamere und der zweite Peak die reinen Pentamere darstellt. Die in beiden Peaks per Westernblot-Analyse dargestellten Pentamere unterstützen diese Theorie. Es wird davon ausgegangen, dass das stabilisierte Pentamer die Inkubation mit SDS bei 37 °C übersteht, die Wechselwirkungen zwischen den multimeren Pentameren aber aufgelöst werden. Die Stabilisierung mit dem ungeladenen Detergens DM spricht gegen eine ladungsbedingte, ionische Wechselwirkung

zwischen den einzelnen Pentameren. Auch mit der Bildung einer Mischmizelle aus DM und dem zwitterionischen Solubilisierungsdetergens LDAO, wie in Kapitel 5.2.3.1 postuliert, spricht auf Grund des inneren Ladungsausgleichs des Aminoxids gegen eine ionische Wechselwirkung. Denkbar ist vielmehr die Ausbildung von unspezifischen van-der-Waals Wechselwirkungen [135]. Für die weitere Klärung der Multimerisierung sind weiterführende Untersuchungen nötig. Bekannt ist eine Multimerisierung der tetrameren Struktur des humanen Membranproteins AQP4 [136]. Beschrieben wird hier die Ausbildung einer orthogonalen Anordnung der Tetramere (*orthogonal arrays of particles*) über hydrophobe intermolekulare Wechselwirkungen des N-Terminus. Die Multimerisierung bildet sich hier allerdings schon in der Zellmembran aus. Die Funktion dieser Multimerisierung ist bisher noch nicht bekannt [137].

5.3 Funktionelles PfFNT für die Strukturaufklärung

Bisher wurde der Weg der Gewinnung von möglichst großen und reinen Mengen PfFNT diskutiert. Neben der Inprozesskontrolle durch die Detektion des PfFNT-Pentamers wurde das gereinigte Protein durch drei weitere Funktionalitätstests untersucht. Durch Rekonstitution von PfFNT in Liposomen wurde die Transportfunktion mit Veränderung der Lichtstreuung in Abhängigkeit der Proteoliposomengröße gemessen. Untersucht wurde PfFNT in Abhängigkeit des stabilisierenden Detergens LDAO, β -OG DDM, DM und FC 12. L-Laktat wurde als physiologisches Substrat eingesetzt. Mit allen stabilisierenden Detergenzien konnte Substrattransport detektiert werden. Maßgebliche Unterschiede ergeben sich aber in der Transportrate. Mit LDAO und β -OG stabilisiertem PfFNT werden die höchsten Aufnahmeraten ermittelt. Die Raten für DDM und DM wurden um 50 % bzw. 75 % niedriger ermittelt. Der Vergleich der Transportraten für FC 12 stabilisiertes PfFNT ist nicht möglich, da dieser Funktionstest in einem anderen Rekonstitutionspuffer und einem 10-fach geringeren 20 mM L-Laktat Gradienten vermessen wurde.

Die unterschiedlich hohen Raten weisen auf eine deutlich verbesserte Rekonstitution von LDAO und β -OG stabilisierten PfFNT im Vergleich zu DDM und DM hin. Dabei sollte der Einfluss der verschiedenen großen Mizellhüllen der unterschiedlichen Detergenzien keinen maßgeblichen Einfluss ergeben. Durch die 25-fache Verdünnung bei der Rekonstitution von PfFNT in die Liposomen sollte nach Herstellungsprozess der Einfluss der Stabilisierungsdetergenzien nivelliert werden [105]. Des Weiteren wurden als Vergleich

Diskussion

Leerliposomen mit gleicher Konzentration an Detergens hergestellt und vermessen, um Detergens-bedingte Störeffekte und durchlässige Liposomen auszuschließen. Aus den verschiedenen Einstromraten kann also geschlossen werden, dass LDAO und β -OG *PfFNT* besser stabilisieren und dass daher ein größerer Anteil an funktionellem Protein in die Liposomen rekonstituiert werden konnte.

Neben der Messung der Leitfähigkeit mit L-Laktat in Liposomen rekonstituiertem *PfFNT* wurde als weitere Stabilitätsuntersuchung die Bindung des *PfFNT*-Inhibitors BH697 an *PfFNT* getestet. Es wurde die Bindung an gereinigtes und mit LDAO stabilisiertes *PfFNT* im Vergleich zu in Brij78 stabilisiertem zellfrei hergestelltem *PfFNT* untersucht.

Mit diesem Test konnte erstmals in unserer Arbeitsgruppe die isolierte Bindung eines Inhibitors an gereinigtes *PfFNT* untersucht und erste Etablierungsschritte für diese Methode durchgeführt werden. Vorherige Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe haben eine mehrstündige Inhibition von *PfFNT* nach kurzzeitiger Inhibitor-Inkubation im Hefe-basierten Radioaktiv-Aufnahme-Assay gezeigt [57]. In dieser Arbeit konnte die stabile Bindung des Inhibitors an *PfFNT* aus zwei verschiedenen Expressionssystemen über einen Zeitraum von 24 h nachgewiesen werden. Der in Abbildung 4-21 gezeigte initiale Abfall des Signalverhältnisses zwischen Protein und Inhibitor ($A_{280\text{ nm}}/A_{490\text{ nm}}$) von 45 % bei zellulär hergestelltem und 5 % bei zellfrei hergestelltem *PfFNT* kommt wahrscheinlich durch die schnelle Auflösung von unspezifischen Bindungen zwischen Inhibitor und Protein-Detergens-Komplex zustande, die im 10 mM-Inhibitor-Überschuss neben der spezifischen Bindung an *PfFNT* ausgebildet wurden. Vergleichsweise zeigt die Inhibitorbindung an BSA, bei der ausschließlich von unspezifischen Wechselwirkungen ausgegangen wird, mit 80 % Abfall des Signals eine nahezu gänzliche Auflösung der Inhibitorbindung im Messzeitraum, ohne Ausbildung einer Plateauphase. Der Nachweis der spezifischen und langanhaltenden Bindung des Inhibitors bestätigt für LDAO stabilisiertes *PfFNT* eine funktionelle und richtig gefaltete Binderegion im Protein. Der direkte Vergleich mit zellfrei hergestelltem Protein bestätigt zusätzlich die spezifische Bindung von BH697 an *PfFNT*. Da die Untersuchung zur Inhibitorbindung mit *PfFNT* nach der Nickelreinigung durchgeführt wurde, kann die Untersuchung als Endkontrolle der Proteinisolierung genutzt werden. Fehlfaltungen während Proteinproduktion und mögliche Proteinstabilisierung während des Solubilisierungs- und Reinigungsprozesses werden so mit untersucht. Des Weiteren unterstützt der Nachweis der

Diskussion

langanhaltenden Bindung des Inhibitors die Theorie der Ausbildung einer irreversiblen kovalenten Bindung zwischen *PfFNT* und dem Pharmakophor des Inhibitors [57, 138], die vor allem unter Berücksichtigung der pharmakokinetischen Aspekte in der möglichen Arzneimittelentwicklung von großer Bedeutung sein kann. Übertragen auf eine antiplasmodiale Therapie kann bei der Ausbildung einer kovalenten Bindung von einer irreversiblen Hemmung von *PfFNT* ausgegangen werden. Massenspektroskopische Untersuchungen unter der Leitung von Prof. Dr. Andreas Tholey am Institut für Experimentelle Medizin der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel sprechen allerdings gegen die Theorie der Ausbildung einer kovalenten Bindung. Des Weiteren ist der Nachweis einer langanhaltenden aber auch für die Bindung des Inhibitors im Hinblick auf Co-Kristallisationsversuche im Rahmen der Strukturaufklärung von großem Interesse.

Als dritte Qualitätskontrolle diente die Aufnahme von negativ kontrastierten TEM-Bildern. In Kapitel 5.2.3.1 wurden schon die Multimerisierung des *PfFNT* Pentamers diskutiert. Im Rahmen der Funktionsanalytik ist vor allem die bildliche Darstellung der pentameren Struktur von großem Interesse. So konnte hier mit den fünf Protomeren und der Zentralpore der pentamere Oligomerisierungszustand klar erkannt werden (Abbildung 4-16). Dabei zeigte der gemessene Durchmesser von 9 nm eine vergleichbare Größe zu anderen Formiat-Nitrit-Transportern mit 8 nm Durchmesser in der Aufsicht (Abbildung 5-3) [38, 42].

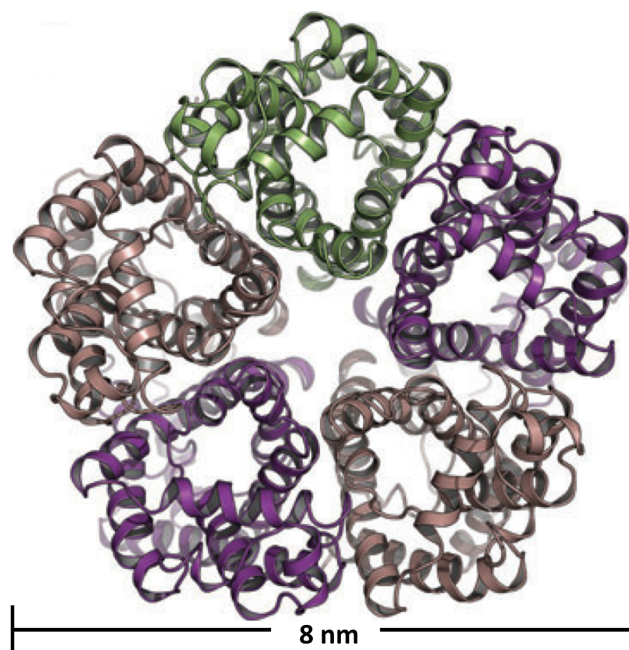


Abbildung 5-3 Aufsicht auf die FNT-Struktur aus *S. typhimurium* mit Angabe des Durchmessers. **Abbildung modifiziert nach [35, 38]**

Mit der Darstellung durch TEM-Aufnahmen konnte erstmals eine Visualisierung von gereinigtem PffFNT außerhalb der antikörperbasierenden Detektion in der Westernblot-Analyse gezeigt werden und der Vergleich des Durchmessers in der Aufsicht zu anderen FNTs gezogen werden.

5.4 Eignung des gereinigten PffFNT für die Kristallisation

Mit der Herstellung von PffFNT in *P. pastoris* und der anschließenden Reinigung konnte die Grundvoraussetzung für die Kristallisation etabliert werden. Es konnten große Mengen (> 10 mg/ml) reines PffFNT gewonnen werden. Mit der Stabilisierung mit β -OG konnte sogar ein monodisperser Peak im Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie erreicht werden. Die vorher gezeigten und diskutierten Funktionstests haben die Funktionalität und das Vorliegen des Proteins in nativer Form bestätigt. Mit dem gereinigten und mit verschiedenen Detergenzien stabilisierten PffFNT, wurden initial automatisierte Kristallisationspufferbedingungen gescreent. Die Auswahl der Bedingung wurde dabei durch kommerziell erhältliche Screenings abgebildet (Tabelle 4-2).

Die im *Screening* entstandenen Kristalle zeigen zunächst eine heterogene Zusammensetzung von Pufferbedingungen und Kristallformen. Durch die Sortierung nach Kristallformen zeigten sich aber Gemeinsamkeiten innerhalb der Kristallisationspufferbedingungen. Eine wiederkehrende Ausbildung scharfkantiger, hexaedrischer Kristalle (Abbildung 4-23) wurde unter Zusatz von Alkalisalzen mit Chlorid und Formiat als Anion sowie hohen Anteilen an hochmolekularem PEG bei neutralem pH-Wert gesehen. Ausnahmen bildeten zwei Bedingungen mit leicht saurem pH-Wert (Tabelle 4-3).

Können diese hexaedrischen Kristalle Proteinkristalle sein, die für die Strukturaufklärung von PffFNT Bedeutung sind? Eine endgültige Klärung dieser Frage muss die röntgendiffraktometrische Untersuchung liefern. Anhand der vorhandenen Informationen sollen aber Indizien dafür diskutiert werden.

Falsch-positive Ergebnisse im *Screening* sind durch Wachstum von Detergenzien- oder Salzkristallen denkbar. Vor allem durch vorherige Aufkonzentrierung kann es zur Akkumulation von Leer-Mizellen des Detergens im Proteinsolubilisat kommen. Der Einsatz eines 100 kDa *cut-off* Filters sollte dies aber verhindern (4.13), da Leermizellen der verwendeten Detergenzien diesen *cut-off* überwinden. Durch Zusatz einer identisch

Diskussion

behandelten proteinfreien Negativkontrolle, sollte dieses Risiko minimiert werden. Außerdem zeigte sich hier Wachstum gleichartiger Kristalle sowohl mit LDAO und DM als auch β -OG stabilisiertem *PfFNT*. Das Wachstum eines Detergenzienkristalls kann daher sehr wahrscheinlich ausgeschlossen werden, da davon ausgegangen wird, dass die unterschiedlichen Strukturen der Detergenzienmoleküle auch zu unterschiedlichen Kristallformen führen. Des Weiteren wurde durch Co-Kristallisation mit dem *PfFNT*-Inhibitor MMV007839 verstärktes Wachstum gegenüber gleichen Wachstumsbedingungen ohne Inhibitor gesehen. In dieser Kombination ist es möglich, dass die spezifische Bindung des Inhibitors an *PfFNT* die Proteinstruktur stabilisierte und so die Kristallbildung positiv beeinflusst wurde [139, 57]. Bei gleichzeitiger Betrachtung der Dissoziationsuntersuchungen (4.12.3) zeigte sich auch, dass eine ausreichend langanhaltende und starke Bindung zwischen *PfFNT* und Inhibitor für den Zeitraum zwischen Inhibitorbindung und Kristallisationsansatz ausgebildet wurde. Zunächst kann auf Basis dieser Informationen von der Bildung von Proteinkristallen ausgegangen werden.

Im Vergleich zu Kristallisationspufferbedingungen der bisher aufgeklärten FNT-Protein-Strukturen zeigen sich Parallelen. Der Kristall des N-terminal gekürzten *E. coli* FocA wurde in einer Mischmizelle aus β -OG und DDM, bei neutralem pH-Wert, hohem PEG-Anteil und mit Natriumchlorid oder Natriumformiat kristallisiert [38]. Besonders auffällig ist hier der Zusatz von Natriumchlorid und Natriumformiat. Natriumsalzzusätze sind in Kristallisationspuffern zunächst nichts ungewöhnliches, da diese die Löslichkeit des Proteins durch Stärkung der hydrophoben Wechselwirkungen (*salting out*) senken und so den Kristallisationsprozess begünstigen [140]. Im Fall der Formiat-Nitrit-Transporter stellen Formiat und Chlorid aber auch Substrate dar und können als solche den Kristallisationsprozess positiv beeinflussen [35, 141]. Genauso beinhalten die Kristallisationspuffer anderer FNTs, dessen Struktur schon aufgeklärt wurde, auch entsprechende Substratzusätze. Im Fall des *Vibrio cholerae* FocA wurde Natriumformiat [39] und bei *Clostridium difficile* mit dem HS^- -Transporter Natriumsulfit [41] zugesetzt.

Des Weiteren konnten im *Screening* Mikrokristalle mit FC 12 stabilisiertem *PfFNT* gesehen werden. Hier kam es allerdings nur unter einer Bedingung, bei leicht saurem pH-Wert von 6,0 und erneut großen hochmolekularem PEG-Anteil erst nach 55 Tagen zu mikrokristallinem Wachstum. Eine Erklärung für die in Anzahl und Größe geringe Ausbeute kann durch einen

Diskussion

Vergleich der eingesetzten Proteinkonzentrationen gegeben werden. Für alle Kristallisationsansätze, außer mit FC 12 wurden Proteinkonzentrationen $> 14 \text{ mg ml}^{-1}$ eingesetzt (Tabelle 4-2), während mit dem Detergiezienwechsel zu FC 12 nur eine Ausbeute von 8 mg ml^{-1} erreicht werden konnte. Einen positiven Effekt kann die Ausbildung von Mikrokristallen bei der Verwendung als Impfkristall für erneute Kristallisationsansätze haben. Durch die Zugabe eines Impfkristalls kann hier die kritische Kristallbildungsphase umgangen werden und direktes Wachstum am Impfkristall gefördert werden [142].

Neben den hexaedrischen Kristallen und den Mikrokristallen wurden abgerundete und keiner eindeutigen Form zuordenbare Kristalle gesehen. Durch die sehr heterogenen Pufferbedingungen konnte keine Zuordnung erfolgen.

Obwohl eine Reihe von Pufferbedingungen für die Kristallisation des gereinigten *PfFNT* mit vielversprechenden Kristallformen ermittelt werden konnten, ist es bisher nicht gelungen einen Proteinkristall zu isolieren und Strukturdaten zu ermitteln. Als problematisch hat sich in dieser Arbeit vor allem die Maßstabsvergrößerung der Kristallisationsansätze gezeigt. Die im *Screening* entstandenen Kristallformen, vor allem die besprochenen hexaedrisch geformten Kristalle konnte im größeren $1 \mu\text{l}$ -Maßstab nicht in dieser Form reproduziert werden. Aus allen getesteten Bedingungen konnten daher nur Kristalle aus fünf verschiedenen Kristallisationsbedingungen röntgendiffraktometrisch untersucht werden. Für diese fünf Kristalle konnte allerdings kein Proteinstreumuster detektiert werden.

Das zunächst nüchtern wirkende Ergebnis kann an dieser Stelle aber nicht als Endpunkt der Strukturaufklärung gesehen werden. Da nur eine geringe Auswahl der Kristalle auf Grund der schwierigen Reproduktion untersucht wurde, kann mit den weiteren vielversprechenden Kristallen eine Optimierung der Bedingungen vorgenommen werden, um ein Streumuster zu erhalten.

6 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in *P. pastoris*-Zellen große Menge *PfFNT* exprimiert und eine geeignete Reinigungsmethode für *PfFNT* etabliert werden. Die Funktionalität des gereinigten Proteins wurde in drei unabhängigen Funktionsassays bestätigt. Des Weiteren wurden Untersuchungen zur Strukturaufklärung durch die Kristallisation nach der *vapor-diffusion*-Methode durchgeführt und erste Kristallisationsbedingungen ermittelt.

Für das Ziel, die Struktur von *PfFNT* zu ermitteln, stellt die etablierte Expressions- und Reinigungsmethode eine vielversprechende Basis dar. Auf den ermittelten ersten Kristallisationsbedingungen kann zukünftig aufgebaut werden. Zur Optimierung der Kristallkeimbildung und des Kristallwachstums, kann der stabilisierende Effekt der Detergenzien in Bezug auf eine möglichst niedrige eingesetzte Konzentration überprüft werden. Die Ausbildung kleiner stabiler Protein-Detergens-Komplexe erhöht die Kontaktflächen zwischen den einzelnen Protein-Detergens-Komplexen für die Kristallisation. Außerdem können in diesem Zusammenhang weitere Detergenzien wie beispielweise die Maltose-Neopentyl-Glycol Analoga bezüglich der Kristallisation getestet werden [143]. Des Weiteren kann zur besseren Detektion von Proteinkristallen schon im *Screening*-Maßstab mit Einführen eines fluoreszierenden Tryptophans durch eine Punktmutation mit UV-Licht-Bestrahlung zwischen Protein- und Salzkristall oder Detergenzienkristall unterschieden werden. Ein ähnlicher Effekt kann durch die Co-Kristallisation mit dem fluoreszierenden *PfFNT*-Inhibitor BH697 erreicht werden.

Für die Kristallisation kann außerdem eine manuelle Maßstabsvergrößerung vom *Screening*-Nanolitermaßstab in den Mikrolitermaßstab etabliert werden. Die Maßstabsvergrößerung könnte ein größeres Kristallwachstum bewirken und die Isolierung des Kristalls für die röntgendiffraktometrischen Untersuchung erleichtern. Alternativ können weiterhin im Nanolitermaßstab beispielweise *Crystal Direct*TM-Platten getestet werden. Der Vorteil liegt in der automatisierten Kristallisierung und röntgendiffraktometrischen Untersuchung.

Alternativ kann statt der klassischen Röntgenkristallographie auch die in den letzten Jahren immer mehr etablierte Kryoelektronenmikroskopie zur Strukturaufklärung genutzt werden. Als Voruntersuchung können die für diese Arbeit bereits erstellten TEM-Aufnahmen mit DM

Ausblick

als stabilisierendes Detergens für *Pf*FNT herangezogen werden, da diese im Vergleich zu LDAO, β -OG und DDM nur geringe Hintergrundsignale lieferten [144].

7 Zusammenfassung

Mit der Entdeckung und Charakterisierung des plasmodialen Laktattransporters (*PfFNT*) wurde kürzlich ein valides, neues Wirkstofftarget zur Therapie der Malaria identifiziert, die eine der größten gesundheitlichen Risiken in den tropischen und subtropischen Gebieten der Welt darstellt.

PfFNT wurde im Rahmen dieser Arbeit mit *Pichia pastoris* in einem eukaryotischen Expressionssystem im 2-Liter-Fermentermaßstab hergestellt, um große Mengen Protein für die Strukturaufklärung durch Röntgenkristallographie zu gewinnen. Dabei sollte vor allem der Einfluss von Detergenzien auf Reinigung, Stabilität und Kristallisation des Proteins untersucht werden. Mit *P. pastoris*-Zellen konnten erfolgreich mehrere Milligramm *PfFNT* hergestellt und durch Nickelaffinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt werden. Zur Solubilisierung von *PfFNT* aus den Lipidmembranen der *P. pastoris*-Zellen waren DDM und LDAO die geeignetesten Detergenzien. Mit LDAO konnten dabei deutlich größere Ausbeuten erzielt werden. Während der Nickelaffinitätschromatographie wurde das Solubilisierungsdetergens zur Stabilisierung gegen DM, DDM, β -OG und FC 12 ausgetauscht. Durch weitere Reinigung per Größenausschlusschromatographie wurde *PfFNT* mit allen getesteten Stabilisierungsdetergenzien inklusive LDAO im nativen Oligomeresierungsstatus eines Pentamers isoliert, wie transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt haben. Das hergestellte Protein war funktionell, wie die Untersuchungen in Proteoliposomen in einer *stopped-flow*-Apparatur bestätigt haben. Des Weiteren wurde die Langzeitbindung eines *PfFNT*-Inhibitors über 24 h gezeigt.

Mit initialen Kristallisationsscreenings konnten erste Kristallisationsbedingungen mit allen vorher genannten Stabilisierungsdetergenzien ermittelt werden.

Das in dieser Arbeit beschriebene Protokoll für die Produktion von *PfFNT* in *P. Pastoris*-Zellen und die anschließende Reinigung liefert funktionelles und hoch gereinigtes Protein und stellt mit den daraus initial ermittelten Kristallisationsbedingungen eine hervorragende Grundlage für die zukünftige Aufklärung der Proteinstruktur dar

8 Summary

With the discovery and characterization of the plasmodial lactate transporter (*PfFNT*) a valid new drug target was recently identified for the treatment of malaria, one of the major health risks in tropical and subtropical regions of the world.

In this work, *PfFNT* was produced in an eukaryotic expression system using *Pichia pastoris* at a two-liter fermenter scale to obtain large amounts of protein for structure elucidation by X-ray crystallography. In particular, the influence of detergents on the purification, stability and crystallization of the protein was investigated. With *P. pastoris* cells, several milligrams of *PfFNT* could be successfully produced and purified by nickel-affinity-chromatography and size exclusion chromatography. DDM and LDAO were the most suitable detergents for solubilisation from lipid membranes of *P. pastoris* cells. With LDAO, significantly higher yields could be achieved. During nickel-affinity-chromatography, solubilization detergents were changed for stabilization with DM, DDM, β -OG and FC 12. By further purification using size exclusion chromatography, *PfFNT* was isolated with all tested stabilization detergents including LDAO in the native oligomerization state of a pentamer, as confirmed by transmission electron microscopy. The produced protein was functional, as investigations in proteoliposomes in a stopped-flow apparatus confirmed. Furthermore, the long-term binding of a *PfFNT* inhibitor over 24 hours was shown. Initial crystallisation screenings revealed first crystallization conditions with all previously mentioned stabilization detergents.

The protocol described in this thesis for production of *PfFNT* in *P. Pastoris* cells and the subsequent purification provides functional and highly purified protein. Together with initially determined crystallization conditions it represents an excellent basis for future elucidation of the protein structure.

9 Quellenverzeichnis

1. Gamo F-J (2014). Antimalarial drug resistance. *Drug Discov. Today Technol.* **11**, 81–88.
2. Kantele A & Jokiranta TS (2011). Review of cases with the emerging fifth human malaria parasite, *Plasmodium knowlesi*. *Clin. Infect. Dis.* **52**, 1356–1362.
3. World Health Organization (2018) World malaria report, Genf.
4. Hiepe T, Lucius R, Gottstein B (2006) Allgemeine Parasitologie: mit den Grundzügen der Immunologie, Diagnostik und Bekämpfung, 1st edn. Parey.
5. Lainson R & Killick-Kendrick R (1997). Percy Cyril Claude Garnham, C. M. G. 15 January 1901- 25 December 1994. *Biogr. Mem. Fellows R. Soc.* **43**, 173–192.
6. Cowman AF & Crabb BS (2006). Invasion of red blood cells by malaria parasites. *Cell.* **124**, 755–766.
7. Simpson JA, Aarons L, Collins WE, Jeffery GM & White NJ (2002). Population dynamics of untreated *Plasmodium falciparum* malaria within the adult human host during the expansion phase of the infection. *Parasitology.* **124**(3), 247–263
8. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA & Dondorp AM (2014). Malaria. *Lancet* **383**, 723–735.
9. Miller LH, Baruch DI, Marsh K & Doumbo OK (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature* **415**, 673–679.
10. Taylor TE, Borgstein A, Molyneux ME (1993). Acid-base status in paediatric *Plasmodium falciparum* malaria. *Q. J. Med.* **86**(2), 99-109.
11. Pollermann J & Schubert-Zsilavec M (2018). Malaria - Verbreitung, Therapie, Wirkstoffe in der Pipeline. *Pharmakon* **6**, 212–218.
12. Cui L, Mharakurwa S, Ndiaye D, Rathod PK & Rosenthal PJ (2015). Antimalarial drug resistance. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **93**, 57–68.
13. Parker JL & Newstead S (2012). Current trends in α -helical membrane protein crystallization. *Protein Sci.* **21**, 1358–1365.

14. White NJ & Nosten F (2007). Artemisinin-based combination treatment of falciparum malaria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **77**, 181–192.
15. Slater AFG & Cerami A (1992). Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* **355**, 167.
16. Goldberg DE, Slater AF, Cerami A & Henderson GB (1990). Hemoglobin degradation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**, 2931–2935.
17. Yayon A, Timberg R, Friedman S & Ginsburg H (1984). Effects of chloroquine on the feeding mechanism of the intraerythrocytic human malarial parasite *plasmodium falciparum* 1. *J. Protozool.* **31**, 367–372.
18. Foote SJ, Kyle DE, Martin RK, Oduola AMJ, Forsyth K, Kemp DJ & Cowman AF (1990). Several alleles of the multidrug-resistance gene are closely linked to chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Nature* **345**, 255.
19. Su X-z, Kirkman LA, Fujioka H & Wellems TE (1997). Complex polymorphisms in an ~330 kDa Protein are linked to chloroquine-resistant *P. falciparum* in southeast Asia and Africa. *Cell.* **91**, 593–603.
20. Ecker A, Lehane AM, Clain J & Fidock DA (2012). PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol.* **28**, 504–514.
21. Mohammed A, Ndaro A, Kalinga A, Manjurano A, Mosha JF, Mosha DF, van Zwetselaar M, Koenderink JB, Mosha FW, Alifrangis M, Reyburn H, Roper C & Kavishe RA (2013). Trends in chloroquine resistance marker, Pfcrt-K76T mutation ten years after chloroquine withdrawal in Tanzania. *Malar. J.* **12**, 415.
22. Srivastava IK & Vaidya AB (1999). A Mechanism for the Synergistic Antimalarial Action of Atovaquone and Proguanil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1334–1339.
23. Peterson DS, Milhous WK & Wellems TE (1990). Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in *Plasmodium falciparum* malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 3018–3022.
24. World Health Organisation (2015) Guidelines for the treatment of malaria, 3rd edn.

25. Eckstein-Ludwig U, Webb RJ, van Goethem IDA, East JM, Lee AG, Kimura M, O'Neill PM, Bray PG, Ward SA & Krishna S (2003). Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature* **424**, 957.
26. Li W, Mo W, Shen D, Sun L, Wang J, Lu S, Gitschier JM & Zhou B (2005). Yeast model uncovers dual roles of mitochondria in action of artemisinin. *PLoS Genet.* **1**(3), e36.
27. Ariev F, Witkowski B, Amaratunga C, Beghain J, Langlois A-C, Khim N, Kim S, Duru V, Bouchier C, Ma L, Lim P, Leang R, Duong S, Sreng S, Suon S, Chuor CM, Bout DM, Ménard S, Rogers WO, Genton B, Fandeur T, Miotto O, Ringwald P, Le Bras J, Berry A, Barale J-C, Fairhurst RM, Benoit-Vical F, Mercereau-Puijalon O & Ménard D (2013). A molecular marker of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* **505**, 50.
28. Deutsche Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG) e.V. (2019) Malariaempfehlungen: Prophylaxe und Therapie.
29. Srivastava IK, Rottenberg H & Vaidya AB (1997). Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J. Biol. Chem.* **272**, 3961–3966.
30. Fivelman QL, Butcher GA, Adagu IS, Warhurst DC & Pasvol G (2002). Malarone treatment failure and *in vitro* confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malar. J.* **1**, 1.
31. Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K & Cheng Q (2000). Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome b that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2100–2108.
32. Dahl EL & Rosenthal PJ (2008). Apicoplast translation, transcription and genome replication. *Trends Parasitol.* **24**, 279–284.
33. Ridley RG (2002). Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. *Nature* **415**, 686–693.
34. World Health Organization (2010) Global report on antimalarial drug efficacy and drug resistance, Genf.

35. Lü W, Du J, Schwarzer NJ, Wacker T, Andrade SLA & Einsle O (2013). The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biol. Chem.* **394**, 715–727.
36. Wu B, Rambow J, Bock S, Holm-Bertelsen J, Wiechert M, Soares AB, Spielmann T & Beitz E (2015). Identity of a Plasmodium lactate/H⁺ symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat. Commun.* **6**, 6284.
37. Marchetti RV, Lehane AM, Shafik SH, Winterberg M, Martin RE & Kirk K (2015). A lactate and formate transporter in the intraerythrocytic malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Nat. Commun.* **6**, 6721.
38. Wang Y, Huang Y, Wang J, Cheng C, Huang W, Lu P, Xu Y-N, Wang P, Yan N & Shi Y (2009). Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature* **462**, 467–472.
39. Waight AB, Love J & Wang D-N (2009). Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **17**, 31–37.
40. Lü W, Schwarzer NJ, Du J, Gerbig-Smentek E, Andrade SLA & Einsle O (2012). Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from Salmonella typhimurium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 18395–18400.
41. Czyzewski BK & Wang D-N (2012). Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature* **483**, 494–497.
42. Falke D, Schulz K, Doberenz C, Beyer L, Lilie H, Thiemer B & Sawers RG (2010). Unexpected oligomeric structure of the FocA formate channel of Escherichia coli. *FEMS Microbiol. Lett.* **303**, 69–75.
43. Lü W, Du J, Wacker T, Gerbig-Smentek E, Andrade SLA & Einsle O (2011). pH-dependent gating in a FocA formate channel. *Science* **332**, 352–354.
44. Waight AB, Czyzewski BK & Wang D-N (2013). Ion selectivity and gating mechanisms of FNT channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 499–506.
45. McKee RW, Ormsbee RA, Anfinsen CB, Geiman QM & Ball EG (1946). Studies on Malarial Parasites. *J. Exp. Med.* **84**, 569–582.

46. Roth EF, Raventos-Suarez C, Perkins M & Nagel RL (1982). Glutathione stability and oxidative stress in *P. falciparum* infection in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **109**, 355–362.
47. Mueckler M, Caruso C, Baldwin S, Panico M, Blench I, Morris H, Allard W, Lienhard G & Lodish H (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* **229**, 941–945.
48. Desai SA & Rosenberg RL (1997). Pore size of the malaria parasite's nutrient channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2045–2049.
49. Desai SA, Krogstad DJ & McCleskey EW (1993). A nutrient-permeable channel on the intraerythrocytic malaria parasite. *Nature* **362**, 643–646.
50. Krishna S, Woodrow CJ, Burchmore RJS, Saliba KJ & Kirk K (2000). Hexose transport in asexual stages of plasmodium falciparum and kinetoplastidae. *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* **16**, 516–521.
51. Woodrow CJ, Penny JI & Krishna S (1999). Intraerythrocytic plasmodium falciparum expresses a high affinity facilitative hexose transporter. *J. Biol. Chem.* **274**, 7272–7277.
52. van Dooren GG, Stimmler LM & McFadden GI (2006). Metabolic maps and functions of the Plasmodium mitochondrion. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**, 596–630.
53. Poole RC & Halestrap AP (1994). N-terminal protein sequence analysis of the rabbit erythrocyte lactate transporter suggests identity with the cloned monocarboxylate transport protein MCT1. *Biochem. J.* **303**, 755–759.
54. Deuticke B (1982). Monocarboxylate Transport in Erythrocytes. *J. Membr. Biol.* **70**, 89–103.
55. Elliott JL, Saliba KJ & Kirk K (2001). Transport of lactate and pyruvate in the intraerythrocytic malaria parasite, Plasmodium falciparum. *Biochem. J.* **355**, 733–739.
56. Cranmer SL, Conant AR, Gutteridge WE & Halestrap AP (1995). Characterization of the Enhanced Transport of L- and D-Lactate into Human Red Blood Cells Infected with Plasmodium falciparum suggests the presence of a novel saturable lactate proton cotransporter. *J. Biol. Chem.* **270**, 15045–15052.

57. Gollmack A, Henke B, Bergmann B, Wiechert M, Erler H, Blancke Soares A, Spielmann T & Beitz E (2017). Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the Plasmodium lactate transporter PfFNT at nanomolar scale. *PLOS Pathog.* **13**(2), e1006172.
58. Hapuarachchi SV, Cobbold SA, Shafik SH, Dennis ASM, McConville MJ, Martin RE, Kirk K & Lehane AM (2017). The malaria parasite's lactate transporter PfFNT is the target of antiparasmodial compounds identified in whole cell phenotypic screens. *PLOS Pathog.* **13**, e1006180.
59. Rask-Andersen M, Almén MS & Schiöth HB (2011). Trends in the exploitation of novel drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 579–590.
60. Arinaminpathy Y, Khurana E, Engelman DM & Gerstein MB (2009). Computational analysis of membrane proteins. *Drug Discov. Today* **14**, 1130–1135.
61. Opekarová M & Tanner W (2003). Specific lipid requirements of membrane proteins—a putative bottleneck in heterologous expression. *Biochim. Biophys. Acta* **1610**, 11–22.
62. Cregg JM, Cereghino JL, Shi J & Higgins DR (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol. Biotechnol.* **16**, 23–52.
63. Cereghino JL & Cregg JM (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 45–66.
64. Long SB, Campbell EB & Mackinnon R (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* **309**, 897–903.
65. Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R & Kjellbom P (2006). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* **439**, 688–694.
66. Jidenko M, Nielsen RC, Sørensen TL-M, Møller JV, Le Maire M, Nissen P & Jaxel C (2005). Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 11687–11691.
67. Pedersen BP, Buch-Pedersen MJ, Morth JP, Palmgren MG & Nissen P (2007). Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature* **450**, 1111–1114.

68. Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB & Gouaux E (2007). Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH. *Nature* **449**, 316–323.
69. Schwarz D, Junge F, Durst F, Frölich N, Schneider B, Reckel S, Sobhanifar S, Dötsch V & Bernhard F (2007). Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems. *Nat. Protoc.* **2**, 2945–2957.
70. Holm-Bertelsen J, Bock S, Helmstetter F & 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.
71. Helmstetter F, Arnold P, Höger B, Petersen LM & Beitz E (2018). Formate-nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids instead of a central histidine maintain pH-dependent transport. *J. Biol. Chem.* **294**(2), 623–631.
72. Ogata K, Nishikawa H & Ohsugi M (2014). A Yeast Capable of Utilizing Methanol. *Agric. Biol. Chem.* **33**, 1519–1520.
73. Ellis SB, Brust PF, Koutz PJ, Waters AF, Harpold MM & Gingeras TR (1985). Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast Pichia pastoris. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 1111–1121.
74. Wegner G (1990). Emerging applications of the methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **87**, 279–283.
75. Roa M & Blobel G (1983). Biosynthesis of peroxisomal enzymes in the methylotrophic yeast Hansenula polymorpha. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **80**, 6872–6876.
76. Inan M & Meagher MM (2001). Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of Pichia pastoris. *J. Biosci. Bioeng.* **92**, 585–589.
77. Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B & Harvey LM (2005). Heterologous protein production using the Pichia pastoris expression system. *Yeast* **22**, 249–270.
78. Ahmad M, Hirz M, Pichler H & Schwab H (2014). Protein expression in Pichia pastoris. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 5301–5317.
79. Schutter K de, Lin Y-C, Tiels P, van Hecke A, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouzé P, van de Peer Y & Callewaert N (2009). Genome sequence of the recombinant protein production host Pichia pastoris. *Nat. Biotechnol.* **27**, 561–566.

80. Du M, Battles MB & Nett JH (2012). A color-based stable multi-copy integrant selection system for *Pichia pastoris* using the attenuated ADE1 and ADE2 genes as auxotrophic markers. *Bioeng. Bugs.* **3**, 32–37.
81. Marx H, Mecklenbräuker A, Gasser B, Sauer M & Mattanovich D (2009). Directed gene copy number amplification in *Pichia pastoris* by vector integration into the ribosomal DNA locus. *FEMS Yeast Res.* **9**, 1260–1270.
82. Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S & Khanna N (2001). Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **21**, 71–80.
83. Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C & Cregg JM (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 329–332.
84. Byrne B (2015). *Pichia pastoris* as an expression host for membrane protein structural biology. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **32**, 9–17.
85. Hedfalk K (2013). Further advances in the production of membrane proteins in *Pichia pastoris*. *Bioeng. Bugs.* **4**, 363–367.
86. Wiener MC (2004). A pedestrian guide to membrane protein crystallization. *Methods* **34**, 364–372.
87. Newstead S, Ferrandon S & Iwata S (2008). Rationalizing alpha-helical membrane protein crystallization. *Protein Sci.* **17**, 466–472.
88. Raman P, Cherezov V & Caffrey M (2005). The Membrane Protein Data Bank. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 36.
89. Helenius A & Simons K (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **415**, 29–79.
90. Seddon AM, Curnow P & Booth PJ (2004). Membrane proteins, lipids and detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 105–117.
91. Le Maire M, Champeil P & Møller JV (2000). Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta* **1508**, 86–111.

92. Garavito RM & Ferguson-Miller S (2001). Detergents as tools in membrane biochemistry. *J. Biol. Chem.* **276**, 32403–32406.
93. Berman HM (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235–242.
94. White S (2019) Membrane Proteins of known 3D Structure. <http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/>.
95. Chayen NE & Saridakis E (2008). Protein crystallization. *Nat. Methods* **5**, 147–153.
96. Hemdan ES & Porath J (1985). Development of immobilized metal affinity chromatography. *J. Chromatogr. A.* **323**, 255–264.
97. Hemdan ES & Porath J (1985). Development of immobilized metal affinity chromatography. *J. Chromatogr. A.* **323**, 265–272.
98. Sonoda Y, Newstead S, Hu N-J, Alguel Y, Nji E, Beis K, Yashiro S, Lee C, Leung J, Cameron AD, Byrne B, Iwata S & Drew D (2011). Benchmarking membrane protein detergent stability for improving throughput of high-resolution X-ray structures. *Structure* **19**, 17–25.
99. Casey JR & Reithmeier RA (1993). Detergent interaction with band 3, a model polytopic membrane protein. *Biochemistry.* **32**, 1172–1179.
100. Newby ZER, O’Connell JD, Gruswitz F, Hays FA, Harries WEC, Harwood IM, Ho JD, Lee JK, Savage DF, Miercke LJW & Stroud RM (2009). A general protocol for the crystallization of membrane proteins for X-ray structural investigation. *Nat. Protoc.* **4**, 619–637.
101. Tate CG. Practical Considerations of Membrane Protein Instability during Purification and Crystallisation. In *heterologous expression of membrane proteins: Methods and protocols*. (Mus-Veteau I, ed), pp. 187–203. Totowa, NJ. Humana Press.
102. Chiu ML, Tsang C, Grihalde N & MacWilliams MP (2008). Over-expression, solubilization, and purification of G protein-coupled receptors for structural biology. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* **11**, 439–462.
103. Sonoda Y, Cameron A, Newstead S, Omote H, Moriyama Y, Kasahara M, Iwata S & Drew D (2010). Tricks of the trade used to accelerate high-resolution structure determination of membrane proteins. *FEBS Lett.* **584**, 2539–2547.

104. Fischer G, Kosinska-Eriksson U, Aponte-Santamaría C, Palmgren M, Geijer C, Hedfalk K, Hohmann S, Groot BL de, Neutze R & Lindkvist-Petersson K (2009). Crystal structure of a yeast aquaporin at 1.15 angstrom reveals a novel gating mechanism. *PLoS Biol.* **7**, e1000130.
105. Borgnia MJ, Kozono D, Calamita G, Maloney PC & Agre P (1999). Functional reconstitution and characterization of AqpZ, the E. coli water channel protein. *J. Mol. Biol.* **291**, 1169–1179.
106. Lévy D, Gulik A, Bluzat A & Rigaud J-L (1992). Reconstitution of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Biochim. Biophys. Acta* **1107**, 283–298.
107. Venema K, Quintero FJ, Pardo JM & Donaire JP (2002). The arabidopsis Na⁺/H⁺ exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na⁺ and K⁺ transport in reconstituted liposomes. *J. Biol. Chem.* **277**, 2413–2418.
108. Levy D, Seigneuret M, Bluzat A & Rigaud JL (1990). Evidence for proton countertransport by the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase during calcium transport in reconstituted proteoliposomes with low ionic permeability. *J. Biol. Chem.* **265**, 19524–19534.
109. Eytan GD (1982). Use of liposomes for reconstitution of biological functions. *Biochim. Biophys. Acta* **694**, 185–202.
110. Delmar JA, Bolla JR, Su C-C & Yu EW (2015). Crystallization of membrane proteins by vapor diffusion. *Meth. Enzymol.* **557**, 363–392.
111. Chayen NE, Shaw Stewart PD, Maeder DL & Blow DM (1990). An automated system for micro-batch protein crystallization and screening. *J. Appl. Crystallogr.* **23**, 297–302.
112. Caffrey M & Cherezov V (2009). Crystallizing membrane proteins using lipidic mesophases. *Nat. Protoc.* **4**, 706–731.
113. Cheng Y (2015). Single-Particle Cryo-EM at crystallographic resolution. *Cell.* **161**, 450–457.
114. Chayen NE (2004). Turning protein crystallisation from an art into a science. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**, 577–583.

115. Dong X, Stothard P, Forsythe IJ & Wishart DS (2004). PlasMapper. *Nucleic Acids Res.* **32**, W660-4.
116. Privé GG (2007). Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods* **41**, 388–397.
117. Russel D, Pajkovic, G, Chang, H & Astatke M (2005) Comparison of His-detector™ nickel-NTA enzyme conjugates with other methods for the detection of His-tagged fusion proteins in western blots. Internetdokument:
<https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.20.5.LB67-b>
118. Harris JR (1969). Some negative contrast staining features of a protein from erythrocyte ghosts. *J. Mol. Biol.* **46**, 329–335.
119. Harris JR (1991). Negative staining-carbon film technique. *J. Electron Microsc. Tech.* **18**, 269–276.
120. Harris R. Negative Staining of Thinly Spread Biological Particulates. In *electron microscopy methods and protocols*. (Nasser Hajibagheri MA, ed), pp. 13–30. Totowa, NJ. Humana Press.
121. Arnold P, Himmels P, Weiß S, Decker T-M, Markl J, Gatterdam V, Tampé R, Bartholomäus P, Dietrich U & Dürr R (2014). Antigenic and 3D structural characterization of soluble X4 and hybrid X4-R5 HIV-1 Env trimers. *Retrovirology* **11**, 42.
122. Tang G, Peng L, Baldwin PR, Mann DS, Jiang W, Rees I & Ludtke SJ (2007). EMAN2. *J. Struct. Biol.* **157**, 38–46.
123. Stetsenko A & Guskov A (2017). An overview of the top ten detergents used for membrane protein crystallization. *Crystals*. **7**, 197.
124. Herrmann KW (1962) *J. Phys. Chem.* **66**, 292.
125. Brady CP, Shimp RL, Miles AP, Whitmore M & Stowers AW (2001). High-level production and purification of P30P2MSP1(19), an important vaccine antigen for malaria, expressed in the methylotropic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr. Purif.* **23**, 468–475.

126. Files D, Ogawa M, Scaman CH & Baldwin SA (2001). A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. *Enzyme Microb. Technol.* **29**, 335–340.
127. Villatte F, Hussein AS, Bachmann TT & Schmid RD (2001). Expression level of heterologous proteins in *Pichia pastoris* is influenced by flask design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 463–465.
128. Guarna MM, Lesnicki GJ, Tam BM, Robinson J, Radziminski CZ, Hasenwinkle D, Boraston A, Jervis E, MacGillivray RTA, Turner RFB & Kilburn DG (1997). On-line monitoring and control of methanol concentration in shake-flask cultures of *Pichia pastoris*. *Biotechnol. Bioeng.* **56**, 279–286.
129. Lund S, Orłowski S, Foresta B de, Champeil P, Le Maire M & Møller JV (1989). Detergent structure and associated lipid as determinants in the stabilization of solubilized Ca²⁺-ATPase from sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **264**, 4907–4915.
130. Fleming KG, Ackerman AL & Engelman DM (1997). The effect of point mutations on the free energy of transmembrane alpha-helix dimerization. *J. Mol. Biol.* **272**, 266–275.
131. D Ferguson A, Welte W, Hofmann E, Lindner B, Holst O, Coulton JW & Diederichs K (2000). A conserved structural motif for lipopolysaccharide recognition by prokaryotic and eukaryotic proteins. *Structure* **8**, 585–592.
132. Jones MR (2007). Lipids in photosynthetic reaction centres. *Prog. Lipid Res.* **46**, 56–87.
133. Cymer F & Schneider D (2010). A single glutamate residue controls the oligomerization, function, and stability of the aquaglyceroporin GlpF. *Biochemistry* **49**, 279–286.
134. Kitchen P, Conner MT, Bill RM & Conner AC (2016). Structural Determinants of Oligomerization of the Aquaporin-4 Channel. *J. Biol. Chem.* **291**, 6858–6871.
135. Roth CM, Neal BL & Lenhoff AM (1996). Van der Waals interactions involving proteins. *Biophys. J.* **70**, 977–987.

136. Nicchia GP, Pisani F, Sparaneo A, Mola MG, Basco D, Rossi A, Svelto M & Frigeri A (2013). Aquaporin-4 orthogonal arrays of particles from a physiological and pathophysiological point of view. *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal* **2**, 143–154.
137. Crane JM & Verkman AS (2009). Determinants of aquaporin-4 assembly in orthogonal arrays revealed by live-cell single-molecule fluorescence imaging. *J. Cell. Sci.* **122**, 813–821.
138. Singh J, Petter RC, Baillie TA & Whitty A (2011). The resurgence of covalent drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 307–317.
139. Hassell AM, An G, Bledsoe RK, Bynum JM, Carter HL, Deng S-JJ, Gampe RT, Grisard TE, Madauss KP, Nolte RT, Rocque WJ, Wang L, Weaver KL, Williams SP, Wisely GB, Xu R & Shewchuk LM (2007). Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **63**, 72–79.
140. Hofmeister F (1888). Zur Lehre von der Wirkung der Salze. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **24**, 247–260.
141. Müller I (2017). Guidelines for the successful generation of protein-ligand complex crystals. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **73**, 79–92.
142. Bergfors T (2003). Seeds to crystals. *J. Struct. Biol.* **142**, 66–76.
143. Cho KH, Husri M, Amin A, Gotfryd K, Lee HJ, Go J, Kim JW, Loland CJ, Guan L, Byrne B & Chae PS (2015). Maltose neopentyl glycol-3 (MNG-3) analogues for membrane protein study. *Analyst* **140**, 3157–3163.
144. Gewering T, Januliene D, Ries AB & Moeller A (2018). Know your detergents. *J. Struct. Biol.* **203**, 242–246.

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.

Des Weiteren versichere ich, dass mir bisher kein akademischer Grad entzogen wurde.

Ein Teil dieser Arbeit wurde unter dem folgenden Titel zur Publikation eingereicht:

Philipp Hajek, Annika Bader, Folknand Helmstetter, Björn Henke, Philipp Arnold, Eric Beitz

„Cell-free and yeast-based production of the malarial lactate transporter, *PfFNT*, delivers comparable yield and protein quality”

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

Philipp Georg Hajek

Kiel, März 2019

