

Plasmodiale Formiat-Nitrit-Transporter:  
Biophysikalische Charakterisierung und  
Entwicklung eines phänotypischen  
Wirkstoff-Screenings

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Anna Lina Meier

Kiel 2020



Erster Gutachter:

Professor Dr. Eric Beitz

Zweite Gutachterin:

Professorin Dr. Birgit Classen

Tag der mündlichen Prüfung:

23.03.2020

Zum Druck genehmigt:

03.04.2020



„Und es gibt weder einen Talisman noch ein Zauberschwert, die nur halb so mächtige Waffen  
wären wie die **Wahrheit.**“

Aus „Der Engelsturm“ von Tad Williams



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	V
1 Einleitung .....	1
1.1 Malaria .....	1
1.2 Therapie der Malaria und Resistenzentwicklung.....	4
1.3 <i>Tres Cantos antimalarials set</i> (TCAMS) Substanzbibliothek .....	6
1.4 Phänotypisches Screening in Hefezellen .....	7
1.5 Formiat-Nitrit-Transporter und erste Inhibitoren .....	9
1.6 FNTs aus humanpathogenen Plasmodien.....	13
1.7 Zielsetzung.....	15
2 Material .....	17
2.1 Chemikalien, Enzyme, Kits, Material .....	17
2.2 Geräte.....	19
2.3 Plasmid und kodierende DNA-Sequenzen.....	21
2.4 Oligonukleotide ( <i>primer</i> ) .....	22
2.5 <i>E. coli</i> -Stamm .....	22
2.6 <i>S. cerevisiae</i> -Stamm.....	22
2.7 Antikörper .....	22
2.8 Nährmedien, Puffer, Lösungen .....	23
2.8.1 Molekularbiologie.....	23
2.8.2 Proteinchemie .....	24
2.8.3 Testung von Inhibitoren .....	26
2.9 Software .....	26
3 Methoden.....	27
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	27
3.1.1 Agarose-Gel-Elektrophorese .....	27
3.1.2 DNA-Isolierung aus Agarosegelen .....	27
3.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA .....	28

3.1.4	Restriktionsverdau .....	28
3.1.5	Ligation .....	29
3.1.6	<i>E. coli</i> Transformation.....	29
3.1.7	<i>E. coli</i> Schnelltransformation.....	29
3.1.8	<i>S. cerevisiae</i> Transformation.....	29
3.1.9	<i>E. coli</i> -Flüssigkulturen .....	31
3.1.10	<i>S. cerevisiae</i> -Flüssigkulturen.....	31
3.1.11	Plasmid-Isolierung aus Bakterienzellen .....	32
3.1.12	<i>E. coli</i> -Dauerkulturen .....	32
3.1.13	<i>S. cerevisiae</i> -Dauerkulturen .....	33
3.1.14	DNA-Sequenzierung.....	33
3.2	Proteinchemische Methoden .....	35
3.2.1	Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus <i>S. cerevisiae</i> .....	35
3.2.2	Proteinisolierung nach Kushnirov.....	35
3.2.3	Proteinisolierung mit einem Dounce-Homogenisator.....	36
3.2.4	Proteinquantifizierung nach Bradford .....	36
3.2.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	37
3.2.6	Western Blot .....	38
3.2.7	Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau.....	39
3.2.8	Proteinfärbung mit Ponceau S .....	39
3.3	Methoden zur Testung von Inhibitoren.....	40
3.3.1	Biophysikalischer Assay.....	40
3.3.2	Phänotypischer Resazurin-Assay .....	41
3.3.3	Phänotypischer Assay mit Trübungsmessung.....	41
3.4	Datenanalyse Methoden .....	43
4	Ergebnisse .....	45
4.1	Methodenentwicklung des Wachstums-Resazurin-Assays.....	45
4.1.1	L-Laktatkonzentration .....	46
4.1.2	pH-Wert .....	48
4.1.3	Einfluss der Trübung auf das Signal .....	49
4.1.4	Initiale Optische Dichte .....	51
4.1.5	Resazurin-Konzentration.....	52
4.1.6	Auswahl der Kontrollen .....	52
4.1.7	Gesamtvolumen des Assay .....	53



4.1.8	Assaydauer .....	56
4.1.9	Einfluss von Schütteln auf den Assay .....	58
4.1.10	Kreuz-Kontamination verhindern .....	59
4.1.11	Direktmessung vs. Differenzmessung.....	60
4.1.12	Linearität und Empfindlichkeit der Messung.....	62
4.1.13	Zusammenfassung der Methodenentwicklung.....	64
4.2	Screening der TCAMS Substanzen .....	65
4.2.1	Ergebnisse im Wachstums-Resazurin Assay .....	66
4.2.2	Ergebnisverifizierung im biophysikalischen Assay.....	66
4.3	Ähnlichkeit der FNTs humanpathogener Plasmodien .....	68
4.3.1	Klonierung und Proteinexpression .....	68
4.3.2	Wachstumsverhalten der mit den FNTs transformierten <i>S. cerevisiae</i> -Zellen...	73
4.3.3	Aufnahme von L-Laktat.....	75
4.3.4	Hemmung des <i>S. cerevisiae</i> -Wachstums durch Inhibitoren.....	77
4.3.5	Hemmung der L-Laktat-Aufnahme durch Inhibitoren .....	87
4.4	Versuche zur Umgehung der Resistenz .....	88
5	Diskussion und Ausblick.....	91
5.1	Methodenentwicklung .....	91
5.2	TCAMS Screening.....	94
5.3	Vergleich der FNTs humanpathogener Plasmodien.....	98
5.3.1	Proteinexpression .....	98
5.3.2	Transport von L-Laktat .....	99
5.3.3	Hemmbarkeit der Transporter .....	106
5.4	Umgehung der Resistenz? .....	111
5.5	Ausblick.....	112
6	Zusammenfassung .....	115
7	Summary.....	116
8	Literaturverzeichnis.....	117
9	Anhang.....	129
	Eidesstattliche Erklärung .....	139



# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ACT	<i>Artemisinin-based combination therapy</i>
AHLW	Adenin Histidin Leucin Tryptophan
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>Aqua bidest.</i>	Doppelt destilliertes Wasser
bp	Basenpaar
dem. Wasser	Demineralisiertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	Elektrochemilumineszenz
FNT	Formiat-Nitrit-Transporter
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HT	HEPES-Tris
LB	<i>lysogenic broth</i>
LiAc	Lithiumacetat
MCS	<i>Multiple cloning site</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
M-TBST	Milchpulver in <i>tris buffer saline with Tween 20</i>
NaOH	Natriumhydroxid
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pf</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
<i>Pk</i>	<i>Plasmodium knowlesi</i>
<i>Pm</i>	<i>Plasmodium malariae</i>
<i>Po</i>	<i>Plasmodium ovale</i>
<i>Pv</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	<i>revolutions per minute</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

SD	<i>synthetic defined</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfate
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
SS-DNA	<i>salmon sperm</i> oder <i>single-stranded DNA</i>
StA	Standardabweichung
TBS	<i>tris buffer saline</i>
TBST	<i>tris buffer saline with Tween 20</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Vgl.	vergleiche
WHO	<i>World health organisation</i>
YPD	<i>yeast peptone dextrose</i>
z. B.	Zum Beispiel

Die in dieser Doktorarbeit erwähnten Unternehmens-, Produkt- oder Markenbezeichnungen können Marken oder eingetragene Markenzeichen der jeweiligen Eigentümer sein. Die Wiedergabe von Marken- und/oder Warenzeichen in dieser Doktorarbeit berechtigt nicht zu der Annahme, dass diese als frei von Rechten Dritter zu betrachten seien. Alle erwähnten Marken- und/oder Warenzeichen unterliegen uneingeschränkt den länderspezifischen Schutzbestimmungen und den Besitzrechten der jeweiligen eingetragenen Eigentümer.

# 1 Einleitung

## 1.1 Malaria

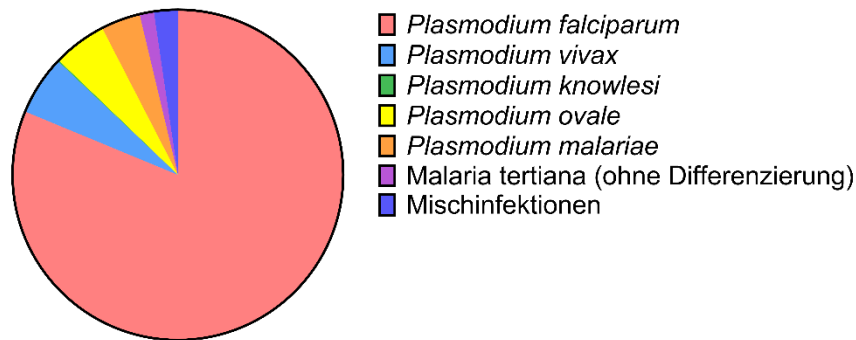
Malaria ist seit Menschengedenken ein Begleiter des Menschen. Schon im Römischen Kaiserreich waren unterschiedliche Malaria-Formen bekannt [1]. In vielen Ländern der Welt gehört Malaria so zum Leben dazu wie die Grippe hierzulande [2]. Dennoch ist Malaria einer der Gründe aus denen viele Länder unter Armut leiden und Armut sowie mangelnde Bildung sind ein großes Problem bei der Bekämpfung der Malaria [3–5].

Im Jahr 2018 gab es ungefähr 228 Millionen Fälle von Malaria-Erkrankungen, das sind ca. 3 Millionen weniger als im Vorjahr. Auch die Anzahl der Todesfälle fiel um 11 000 Tote auf ca. 405 000. Obwohl dies eine Verbesserung zu dem Vorjahr bedeutet, konnte der Stand von 2014 mit 217 Millionen Fällen noch nicht wieder erreicht werden. Die wichtigsten Ursachen hierfür sind schlechte Gesundheitsversorgung, Armut, unzureichende Krankheitsdiagnostik, Resistenzen der Anopheles-Mücke gegen Insektizide und am gravierendsten von allen Resistenzen des Erregers selbst gegen die meisten Chemotherapeutika. Diese Resistenzen sind bisher bei drei der fünf bekannten humanpathogenen Malariaerreger, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax* und *Plasmodium malariae* aufgetreten. Bei *Plasmodium knowlesi* und *Plasmodium ovale* sind noch keine Resistenzen bekannt. In Afrika wurden im Jahr 2018 99,7 % aller Malariafälle von *P. falciparum* ausgelöst, während in Amerika und Südostasien bis zu 75 % aller Fälle von *P. vivax* verursacht wurden. Infektionen mit *P. knowlesi* sind bisher vor allem in Malaysia aufgetreten, wo die Anzahl der Erkrankten in den letzten zwei Jahren auf mehr als 4 000 angestiegen ist. *P. malariae* und *P. ovale* spielen weltweit eher untergeordnete Rollen [6, 7].

In Deutschland sieht die Verteilung etwas anders aus, siehe Abbildung 1.1. Hier auftretende Malaria-Fälle sind üblicherweise auf einer Fernreise erworben. Infektionen mit *P. knowlesi*, *ovale* und *malariae* kommen deutlich häufiger vor als bei der Betrachtung der weltweiten Fälle. Nur 81 % sind von *P. falciparum* ausgelöst, während 1,4 % Infektionen mit *P. vivax* oder *P. ovale* ohne genauere Differenzierung darstellen. In 2,3 % der Fälle wurden Mischinfektionen angegeben.

## Einleitung

**Gemeldete Malaria-Fälle nach Erregerspezies, Deutschland, 2018**



n = 859

Abbildung 1.1: Gemeldete Malaria-Fälle nach Erregerspezies, Deutschland, 2018, modifiziert nach dem Robert-Koch-Institut [8].

Es gibt vier Formen der Malariaerkrankung, die *Malaria tropica*, *Malaria tertiana*, *Malaria quartana* und *Malaria quotidiana*. *Malaria tropica* wird vom *P. falciparum* ausgelöst und gilt als die schwerste Infektion mit den meisten Todesfällen. In Tabelle 1.1 sind die Erreger, ihre Malaria-Formen und die jeweiligen Fieberzyklen angegeben [9].

Tabelle 1.1: Plasmodienart, ausgelöste Krankheit und Fieberzyklus.

Plasmodienart	Krankheit	Fieberzyklus
<i>P. falciparum</i>	<i>Malaria tropica</i>	48 h, asynchron
<i>P. vivax</i>	<i>Malaria tertiana</i>	48 h, synchron
<i>P. knowlesi</i>	<i>Malaria quotidiana</i> oder auch zoonotische Malaria	24 h, synchron
<i>P. ovale</i>	<i>Malaria tertiana</i>	48 h, synchron
<i>P. malariae</i>	<i>Malaria quartana</i>	72 h, synchron

Die Inkubationszeiten variieren je nach Erreger von 7 (*P. falciparum*) bis 40 (*P. malariae*) oder mehr Tagen. Bei der *Malaria tertiana* und *quartana* kann es zusätzlich zu Rückfällen nach Monaten oder auch Jahren kommen. Für die *Malaria tertiana* liegt dies an dem Vorkommen von Hypnozoiten, bei *Malaria quartana* kommen okkulte Blutformen vor [10]. Hypnozoite sind eine Schlafform von *P. vivax*, sie kommen nur in Leberzellen vor [11].

In Abbildung 1.2 ist der Lebenszyklus der Plasmodien dargestellt. Der Lebenszyklus läuft in drei Stadien ab, A außerhalb der Erythrozyten, B im Erythrozyten und C die Sporogonie im Moskito. Der Zyklus beginnt bei (1), wenn der Moskito Blut bei einem Menschen saugt und dadurch Sporozoiten injiziert. Diese wandern in die Leber und infizieren hier

## Einleitung

Leberparenchymzellen (2). Der Erreger liegt geschützt in der parasitophoren Vakuole vor und entwickelt sich zum Schizonten (3) welcher sich in Merozoiten teilt. Zeitgleich entstehen bei der *Malaria tertiana* Hypnozoite, welche mehrere Monate in Leberzellen überdauern können. In (4) werden immer wieder Merozoiten in den Blutkreislauf abgegeben. Der Erreger kann so Erythrozyten infizieren (5). Hier entsteht über einen Trophozoiten wieder ein Schizont, welcher sich in mehrere Merozoiten teilt, die freigesetzt werden, um weitere Erythrozyten zu infizieren (6). Bei der Zerstörung der Erythrozyten und der Freisetzung der Merozoiten ins Blut kommt es zu einem Fieberanfall. Wie oben in Tabelle 1.1 dargestellt passiert dies bei allen Erregern außer *P. falciparum* immer synchron. Nach Tagen bis Wochen beginnen einige Merozoiten sich zu Gametozyten zu differenzieren (7). Diese Gametozyten haben je nach Erregerspezies unterschiedlich lange Lebensdauern, Gametozyten von *P. falciparum* können bis zu 22 Tage im Blut überdauern. Kommt es während dieser Zeit erneut zu einem Moskitostich, können beim Blutsaugen auch Gametozyten mit aufgenommen werden (8). Männliche Gametozyten heißen Mikrogametozyten, die weiblichen Makrogametozyten.

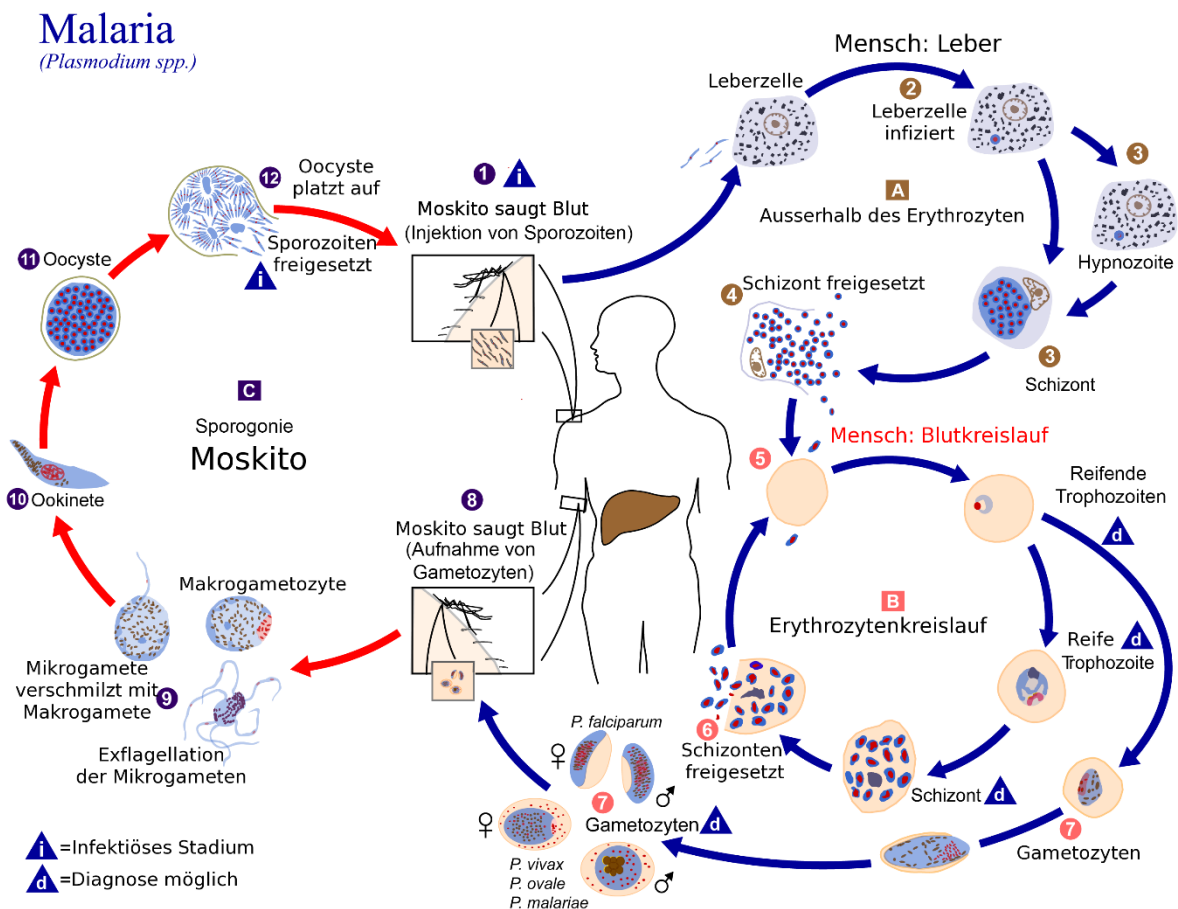


Abbildung 1.2: Lebenszyklus der Plasmodien. Im Menschen findet eine rein asexuelle Vermehrung des Erregers statt während es im Mosquito zu einer sexuellen Vermehrung kommt. [Bildquelle: Modifiziert nach Chb und Berichard; <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=8487274>, abgerufen am 20.01.2019]

## Einleitung

Im Verdauungstrakt der Mücken entwickeln sich die Gametozyten zu Gameten weiter und verschmelzen miteinander (9). Die entstehende Ookinete (10) lagert sich zwischen Epithelzellen und Basalmembran des Verdauungstraktes des Moskitos ein und wächst zur Oocyste heran (11). In der Oocyste werden dann viele neue Sporozoiten gebildet, welche zur Infektion weiterer Menschen führen können, nachdem sie in die Speicheldrüsen der Mücken gewandert sind (12) [12, 13].

Um diesen Lebenszyklus aufrecht zu erhalten benötigen die Plasmodien viele Nährstoffe zum Teil in großen Mengen wie Aminosäuren, Peptide, Zucker und Nukleotide. Der Erreger nimmt z. B. Hämoglobin aus dem Erythrozyten auf. Dieses wird in der Nahrungsvakuole zu Häm, Peptiden und Aminosäuren abgebaut. Die letzten beiden werden weiterverwendet, während Häm, welches in hohen Konzentrationen toxisch für den Organismus ist, zum unlöslichen, nicht toxischen Hämozoin umgewandelt wird. Dieses wird aufgrund seiner schwarz-braunen Färbung auch als das Malaria-Pigment bezeichnet [14, 15].

Um Glykolyse zur Energiegewinnung betreiben zu können, wird Glukose zunächst über den humanen Glukose Transporter 1 (GLUT-1) in den Erythrozyten aufgenommen und gelangt von dort über den *P. falciparum* Hexose Transporter (*PfHT*) in den Erreger. Während der Glykolyse entsteht nun zunächst über mehrere Stufen Pyruvat, welches weiter zu Laktat reduziert wird. Laktat wird dann durch den *P. falciparum* Formiat-Nitrit-Transporter (*PfFNT*) aus dem Parasiten in den Erythrozyten transportiert. Der humane Monocarboxylat-Transporter 1 (hMCT1) transportiert Laktat dann weiter ins Blut [16–19].

Nukleotide können auf unterschiedlichen Wegen erhalten werden. Für das *P. falciparum* sind vier equilibrierende Nukleosidtransporter, ENT1-4, bekannt welche vor allem für die Aufnahme von Adenin oder Adenosin sorgen. Aus diesen können wiederum über den *salvage pathway* die benötigten Nukleotide gebildet werden. Die Nukleotide aus Pyrimidinbasen werden über eine *de novo* Synthese erhalten [20–22].

Zusätzlich werden noch viele weitere Ionen und Spurenelemente benötigt. Diese Stoffwechsel- und Transportwege sind überlebenswichtig für den Erreger und stellen somit Angriffspunkte für eine antimalarische Therapie dar, dazu Kapitel 1.2.

## 1.2 Therapie der Malaria und Resistenzentwicklung

Die derzeit effektivste Methode Malaria zu behandeln besteht darin eine Infektion zu vermeiden. Hierzu wird mit einer Kombination aus physikalischer Prävention (Moskitonetze und Insekten-Abwehr-Spray) zusammen mit einer medikamentösen Malariaprophylaxe gearbeitet [6, 23, 24]. Zusätzlich gibt es Bemühungen einen Impfstoff gegen Malaria zu entwickeln [25, 26].



## Einleitung

Wenn Vorsorgemaßnahmen versagen, oder schlicht nicht zur Verfügung stehen, muss die Malariaerkrankung therapiert werden. Die Weltgesundheitsorganisation, kurz WHO, empfiehlt in ihrer Leitlinie für die Therapie von Malaria (*Guidelines for the treatment of malaria*) von 2015, dass eine unkomplizierte Malaria ausgelöst durch *P. falciparum* mit der Artemisinin-basierten Kombinations-Therapie (ACT) behandelt werden sollte [27]. Artemisinin sowie seine Derivate wie Artesunat und Artemether, führen zu oxidativem Stress durch ihre intramolekulare Peroxid-Struktur und binden auch an eine sarkoplasmatische, endoplasmatische Calcium ATPase (kurz SERCA oder PfATP6) [28]. Sie greifen damit den Blutschizonten sowie den Gametozyten an und töten diese ab. Durch die Kombination mit Substanzen, welche die Entgiftung von Häm in der Nahrungsvakuole hemmen wie Lumefantrin oder Chloroquin-Derivate, können die meisten Erregerstämme abgetötet werden [29, 30].

Eine unkomplizierte Malaria ausgelöst durch *P. vivax*, *ovale*, *malariae* oder *knowlesi* kann in Gebieten mit Chloroquin-sensitiven Erregern zusätzlich zur ACT auch noch mit Chloroquin behandelt werden. Um Hypnozoite von *P. vivax* abzutöten ist bisher als einzige Substanz Primaquin bekannt. Primaquin wirkt vermutlich über einen Eingriff in die mitochondriale Atmungskette der Plasmodien und zeigt damit eine Wirkung auf die Gametozyten, die Oozyste, Gewebeschizonten und Hypnozoite [31, 32].

Bei einer komplizierten Malaria wird Artesunat intravenös oder intramuskulär gegeben, bevor die Therapie einer unkomplizierten Malaria eingesetzt wird. Für die Entscheidung, ob Chloroquin eingesetzt werden kann oder nicht muss der Erreger zunächst auf seine Sensitivität getestet werden.

Die Therapie der Malaria ist auf ungefähr zehn Substanzen beschränkt und eine Monotherapie heutzutage kaum noch wirksam [7, 33]. Die eingesetzten Substanzen sind durch den weitverbreiteten Einsatz immer mehr von Resistenzen gezeichnet. Deshalb ist es notwendig neue und resistenzunempfindliche Wirkstoffe zu entwickeln, sowie neue Wirkorte (*targets*) zu identifizieren. Die zur Verfügungstellung von Wirkstoffbibliotheken sowie der Einsatz von Screening Methoden kann die Forschung in diesem Bereich vorantreiben. So konnten für PfHT, PfFNT, PfENT1 und PfATP4 (eine P-Typ Natrium ATPase) auf diese Weise mögliche neue Wirkstoffe gefunden werden und diese als *targets* identifiziert werden [34–38].

Die Forschung an einer ganzen Vielzahl von Krankheitserregern, sowohl aus dem Reich der Prokaryoten, als auch der Eukaryoten hat gezeigt, dass es in der Regel vier Möglichkeiten gibt, durch die der Erreger eine Resistenz gegen eine bestehende Therapie erreichen kann [39, 40].

## Einleitung

Die erste Möglichkeit ist ein Efflux des Medikaments aus der Zelle und damit eine Verringerung der Konzentration am Wirkort. Ein prominentes Beispiel sind hierbei Chloroquin und der Chloroquin-Resistenz-Transporter, sowie weitere *multi-drug-resistance*-Transporter [41, 42].

Die zweite Möglichkeit stellt eine enzymatische Inaktivierung des Wirkstoffes dar. Dies geschieht zum Beispiel bei der Inaktivierung von Penicillin durch Penicillinase [43].

Die dritte Möglichkeit ist eine Verhinderung der Aufnahme des Medikaments, also der Zellpermeabilität. So kann in gramnegative Bakterien eine Strukturveränderung ihrer Porine auftreten, welche ein Eindringen der Antibiotika zum Wirkort verhindert [40].

Die vierte und letzte Möglichkeit ist eine Veränderung des Wirkortes, sodass keine Bindung zwischen dem *target* und dem Arzneistoff mehr stattfinden kann. Dieses Ausbilden der Resistenz ist für den Erreger häufig schwierig, weil eine Mutation auch Einfluss auf die normale Funktion des jeweiligen Proteins haben kann. Ein Beispiel hierfür ist die Mutation in der Substratbindetasche der Dihydrofolsäurereductase im Malariaerreger, welche zu einer Resistenz gegen Cycloguanil, der Wirkform von Proguanil, geführt hat [44].

Die Wirkung von Substanzen, welche zunächst in den Erreger aufgenommen werden und dort an einem *target* wirken, kann durch alle vier Resistenzmechanismen abgeschwächt oder verhindert werden. Erstrebenswert ist es deshalb, eine Substanz zu finden, welche entweder von außen am Plasmodium wirkt oder sogar an einer infizierten humanen Zelle. Dadurch ist die einzige Möglichkeit, eine Resistenz auszubilden die Veränderung des Wirkortes. Es gibt sogenannte *new permeability pathways*, NPP, welche einmal durch die Anpassung humaner Proteine an die Bedürfnisse des Malariaerregers zustande kommen, zusätzlich gibt es Hinweise, dass auch parasitäre Proteine in die Erythrozytenmembran eingebaut werden [45–47]. Dies könnte möglicherweise ein wünschenswertes neues *target* sein. Ebenso gut kann auch eine Substanz sein, welche von außen an einem Protein auf der Parasitenmembran wirkt, also für eine Wirkung nicht in den Erreger hineinmuss.

### 1.3 *Tres Cantos antimalarials set* (TCAMS) Substanzbibliothek

Es gab viele Bemühungen in den letzten Jahren, um die Therapie der Malaria zu verbessern. Am wichtigsten dabei sind die Projekte, die unentgeltlich Substanzbibliotheken für Forschergruppen zur Verfügung stellen, allen voran die Malaria Box der *Medicines for Malaria Venture* (MMV) welche in unserer Arbeitsgruppe von Dr. André Gollack getestet wurde, siehe auch Kapitel 1.5 [36]. Die Malaria Box war aus Substanzen dreier unterschiedlicher Institutionen, dem *St. Jude Children's Research Hospital*, Novartis und GlaxoSmithKline (GSK) zusammengestellt worden [48, 49].

Die TCAMS Substanzbibliothek von GSK stellte dabei den größten Anteil mit 13.533 Substanzen. Diese Bibliothek wurde durch Screening von GSKs gesamter Substanzbibliothek von fast 2 Millionen Substanzen hinsichtlich eines therapeutischen Effektes am Parasiten *P. falciparum* erhalten. Dabei zeigten 13.533 Substanzen eine Hemmung des Stoffwechsels von mindestens 80 % bei einer eingesetzten Konzentration von 2  $\mu\text{M}$ . Im Screening wurde ein Assay zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität verwendet. Diese wurde hierbei über die Aktivität der Laktatdehydrogenase gemessen. Zusätzlich wurden die Zellen auf ihre Zytotoxizität an humanen HepG2 Zellen und im Luciferase Reporter Assay getestet, wobei ca. 2.000 Substanzen auffällig waren [50–52].

### 1.4 Phänotypisches Screening in Hefezellen

Der Begriff des Phänotyps wurde im frühen zwanzigsten Jahrhundert geprägt und beschreibt vor allem das Erscheinungsbild eines Organismus. Ein Unterschied im Phänotyp beschreibt zudem das Verhalten des identischen Genotyps auf verschiedene Umwelteinflüsse. Ein phänotypisches Screening untersucht das Verhalten eines bekannten und gegebenenfalls auch modifizierten Organismus auf vorher festgelegte Veränderungen der Umwelt. Untersuchte Veränderungen sind dabei z. B. Änderungen der Wachstumsbedingungen durch die Zugabe von Nährmedien unterschiedlichster Art oder auch verschiedener Substanzen, die dem Organismus schaden können. Letztere spielen in der pharmazeutischen Forschung wohl die größte Rolle [53–55]. Sehr einfach messbar ist zum Beispiel der Einfluss auf das Wachstum eines Organismus. Dies kann zum Beispiel durch Messung der Zellzahl oder durch Zusetzen eines Wachstumsindikators abgeschätzt werden. Weitere Möglichkeiten wären das direkte Zählen von Zellen unter dem Mikroskop, sowie das Bestimmen der Masse eines Zellpellets.

Das Gegenstück zum phänotypischen Screening ist das *target-based* Screening. Bei diesem wird ein *target* außerhalb seines normalen Systems getestet. Die Wirkung auf den gesamten Organismus kann dabei nicht abgeschätzt werden. Außerdem bietet dieser Ansatz nicht die Möglichkeit neue *targets* zu entdecken. Bei der Identifizierung neuer Medikamente gegen eine bestimmte Krankheit, also einen bestimmten Phänotypen, kann es dennoch sinnvoll sein dem phänotypischen Screening einen *target-based* Ansatz anzuschließen. So kann häufig ein noch unbekannter Wirkmechanismus aufgeklärt werden [56, 57].

Bezüglich der Bioverfügbarkeit sind Treffer aus phänotypischen Screenings von Vorteil für die weitere Medikamentenentwicklung. Treffer stellen dabei Substanzen dar, welche eine Wirkung gezeigt haben. Je nach Modell und Screening musste die Substanz schon Membranen überwinden, um zum Wirkort zu gelangen. Außerdem musste die Substanz bei den meisten Methoden in größtenteils wässrigen Medien gut lösbar sein. So ist die Bioverfügbarkeit der Treffer

## Einleitung

aus phänotypischen Screenings häufig besser als bei anderen Methoden. Allerdings kann es viel Zeit beanspruchen den Reaktionsmechanismus aufzuklären, welcher für die weitere Entwicklung gefragt ist. Beim *target-based* Ansatz ist der Reaktionsmechanismus simpel zu erkennen, jedoch müssen häufig mehrere *targets* getestet werden, bevor eine vielversprechende Substanz dabei ist [56–59].

Die in dieser Arbeit entwickelte Screening Methode stellt ein *Crossover* eines Phänotypischen Screenings mit einem *target-based* Ansatz dar. So wurde als *target* der rekombinant in *Saccharomyces cerevisiae* exprimierte Formiat-Nitrit-Transporter aus *P. falciparum* in einem phänotypischen Wachstums-Assay eingesetzt.

*Saccharomyces cerevisiae* (im folgenden *S. cerevisiae*) hat als Modell-Organismus einige Vorteile. So wird es gemeinhin als sicher eingestuft (GRAS, *generally recognized as safe*, FDA [60]) und ist preiswert, sowohl in der Beschaffung, als auch im Einsatz. Zusätzlich zeichnet sie sich durch eine hohe genetische Formbarkeit aus und ist damit in der Lage Fremd-Proteine zu exprimieren. Da *S. cerevisiae* selbst ein Eukaryot ist, bietet sie sich für die Untersuchung eukaryotischer Proteine an.

Es gibt zwei verschiedene Arten von phänotypischen Assays, die „*rescue*“ Assays und die Substitutions-Assays. Bei den „*rescue*“ Assays gibt es eine Unterteilung zwischen den letalen Expressions- und den Transaktivierungsassays. Bei den letalen Expressionsassays wird ein Protein exprimiert, welches tödlich für die Hefezelle ist. Durch den Einsatz von Inhibitoren dieses Proteins wird ein Überleben der Hefezelle wieder sichergestellt. Bei den Transaktivierungsassays wird das *target*-Protein zusammen mit einem zweiten Protein exprimiert. In der Kombination führen diese zu einem Untergang der Zelle. Die Hemmung des *target*-Proteins führt auch hier zur Rettung der Zelle. Der Vorteil dieser „*rescue*“ Assays ist, dass falsch positive Ergebnisse nicht vorkommen. Bei einem Substitutionsassay wird ein essenzielles hefeeigenes Proteinanalogon durch das zu untersuchende ersetzt. Bei einer Hemmung dieses Proteins kann die Hefezelle dann nicht mehr überleben. Die hier entwickelte Methode zählt zu den Substitutionsassays [56, 61, 62].

Typischerweise setzt man als Kohlenstoffquelle für *S. cerevisiae* Glukose ein. Durch den Metabolismus der Glukose wird Energie gewonnen. Der in der entwickelten Methode wichtige Stoffwechsel-Weg der Hefe ist der L-Laktat-Stoffwechsel, welcher in Abbildung 1.3 dargestellt ist. Der verwendete *S. cerevisiae*-Stamm hat keine eigenen Monocarboxylat-Transporter (JEN1 und ADY2) mehr, vgl. Kapitel 2.6 [63, 64]. Er ist also nicht in der Lage dieses geladene Substrat aufzunehmen. Anstelle der hefeeigenen wird der plasmodiale Formiat-Nitrit-Transporter, kurz FNT, rekombinant exprimiert. Die Glukose wird durch L-Laktat als einzige

## Einleitung

Kohlenstoffquelle abgelöst, welches also als Substrat zur Energiegewinnung dient. L-Laktat kann über den FNT aufgenommen und über die Laktatdehydrogenase unter Bildung von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu Pyruvat oxidiert werden. Pyruvat wird dann mit dem Pyruvatdehydrogenase-Komplex wieder unter Bildung von  $\text{NADH} + \text{H}^+$  zu Acetyl-Coenzym A. Dieses kann dann im Citrat-Zyklus weiterverwendet werden, um Energie in Form von ATP zu generieren [65]. Wird der FNT mit einem Inhibitor gehemmt, kann kein L-Laktat aufgenommen werden. So entsteht auch kein ATP und dem Modellorganismus fehlt Energie. Die *S. cerevisiae*-Zelle stirbt. Eine ähnliche Methode wurde schon von Wu *et al.* 2015 beschrieben [16].

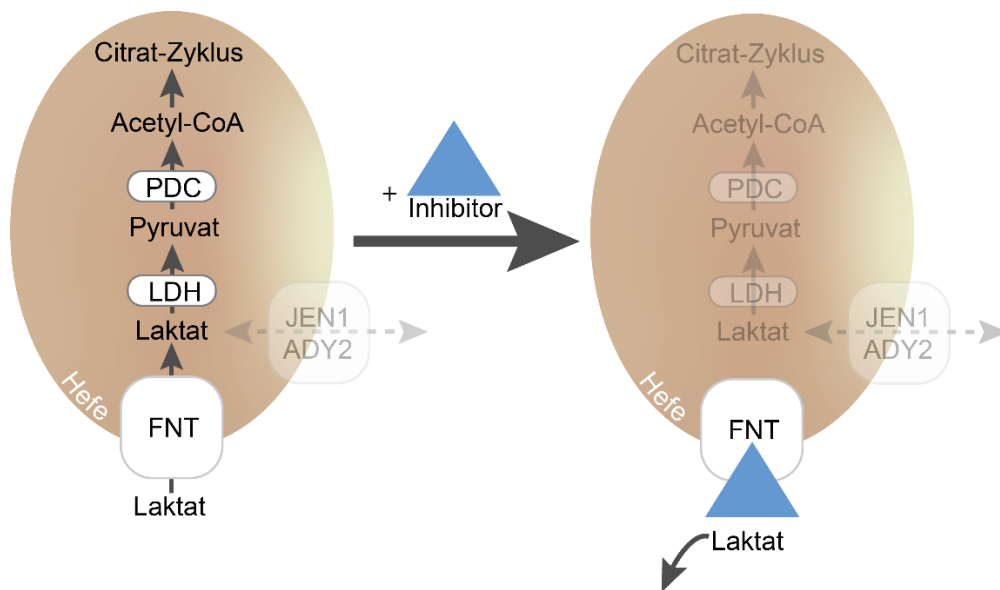


Abbildung 1.3: L-Laktat-Stoffwechsel von *S. cerevisiae* vor und nach Zugabe eines Inhibitors für den FNT. Die hefe-eigenen Monocarboxylat-Transportergene JEN1 und ADY2 sind deletiert (transparent). Nach Zugabe des Inhibitors wird die L-Laktat-Aufnahme unterbunden und es kann kein Stoffwechsel mehr stattfinden. FNT = Formiat-Nitrit-Transporter; LDH = Laktatdehydrogenase; PDC = Pyruvatdehydrogenase-Komplex; Erstellt mit Adobe Illustrator 19.

Nur durch die Änderung der Kohlenstoffquelle ist es so möglich in *S. cerevisiae*-Zellen neue Inhibitoren für *P. falciparum* Formiat-Nitrit-Transporter in einem phänotypischen Assay zu identifizieren.

### 1.5 Formiat-Nitrit-Transporter und erste Inhibitoren

Formiat-Nitrit-Transporter, kurz FNT, sind wichtig für den Stoffwechsel des Malaria-Erregers, wie in Kapitel 1.1 und 1.4 bereits erwähnt. Sie gehören zur Familie der Monocarboxylat-Transporter. Dabei gehören Monocarboxylate wie Formiat, Laktat, Acetat, Fluoracetat und Pyruvat, sowie anorganische Anionen wie Nitrit, Chlorid, Hydrogensulfid und Hypophosphit zu seinen Substraten [66–68]. Für jeden Vertreter der Gattung Plasmodium ist nur ein einziger FNT bekannt, im Gegensatz zum Beispiel zur Gattung Toxoplasma, welche von Dr. Holger Eler in unserem Arbeitskreis untersucht wurde und welche über drei FNTs verfügt [16, 17, 69].

## Einleitung

Beim Transport der Substrate durch ein FNT von extrazellulär nach intrazellulär kommt es zunächst zu einer Anziehung dieser durch Lysin an Position 177 am Poreneingang. Dann folgen zwei hydrophobe Engstellen, die vom Substrat passiert werden können, sobald dieses vom vorliegenden Wasser protoniert wurde und damit ungeladen ist. Während dieses Vorganges nimmt die Azidität des Substrates immer weiter ab. Sobald beide Engstellen passiert sind, nimmt die Azidität wieder zu und das Proton wird wieder abgespalten. Dieser Transport funktioniert theoretisch in beide Richtungen, physiologisch spielt aber nur der Export eine Rolle. Dieser Transportmechanismus konnte in unserem Arbeitskreis durch Dr. Marie Wiechert aufgeklärt und von Dr. Folkhard Helmstetter bestätigt werden [70–73].

Laut einer BLAST-Suche (*basic local alignment search tool*, durchgeführt am 20.01.2020 auf <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) mit der Aminosäure-Sequenz von PfFNT über das *National Center for Biotechnology Information* ist kein humanes Protein bekannt, welches eine ähnliche Proteinstruktur mit mehr als 34 % Aminosäuren-Übereinstimmung aufweist. Diese Suche ergab nur zwei unterschiedlicher Proteine. Das eine Protein sind verschiedene Isoformen des Mukosa-assoziierte lymphatisches Translokationsprotein 1 (MALT1). Dabei handelt es sich um eine Paracaspase, ein Vertreter der Cysteinproteasen. Der übereinstimmende Bereich deckt 14 % der FNT Aminosäuresequenz ab. Bei dem zweiten Protein handelt es sich um die  $\beta$ -Untereinheit des humanen Choriongonadotropins. Hier deckt der übereinstimmende Bereich 18 % des FNT ab. Es gibt also im Menschen kein strukturell FNT-ähnliches Protein mit ausreichender Sequenzanalogie. In anderen einzelligen Eukaryoten, Bakterien und auch einer Gattung der Archaeen gibt es hingegen viele Vertreter der FNT, die auch eine hohe Ähnlichkeit aufweisen [74, 75]. Die Funktions-verwandte Transporter-Familie aus dem Menschen sind die *solute carrier* Proteine (SLC), welche ebenfalls Monocarboxylat-Transporter sind. Der wichtigste Vertreter dieser Gruppe stellt wohl der SLC16A1 oder auch hMCT1 dar, welcher für den Laktattransport aus der Muskelzelle und dem Erythrozyten verantwortlich ist [76, 77]. Eine weitere BLAST-Suche ergab, dass es keine MCT-ähnlichen Proteine in irgendeinem einzelligen humanen Parasiten gibt (Stand: 24.12.2019).

Eine Kristallstruktur eines eukaryotischen FNT ist noch nicht bekannt. Für das *Salmonella typhimurium* FocA, ein bakterieller Vertreter der Familie, ist eine Kristallstruktur bekannt [78]. So kann im Vergleich über die Sequenz des Proteins auf die Sekundärstruktur geschlossen werden. Lipophile Aminosäuren befinden sich eher in der Plasmamembran, während hydrophile Aminosäuren häufiger in den *loops* zu finden sind [79, 80]. Eukaryotische FNTs bestehen ebenfalls aus 6 Transmembran Helices. Vom Arbeitskreis publizierte Ergebnisse zeigen, dass das *P. falciparum* FNT in der Quartärstruktur als Homopentamer vorliegt, als Artefakte waren auch weitere Oligomere erkennbar [16, 81].

## Einleitung

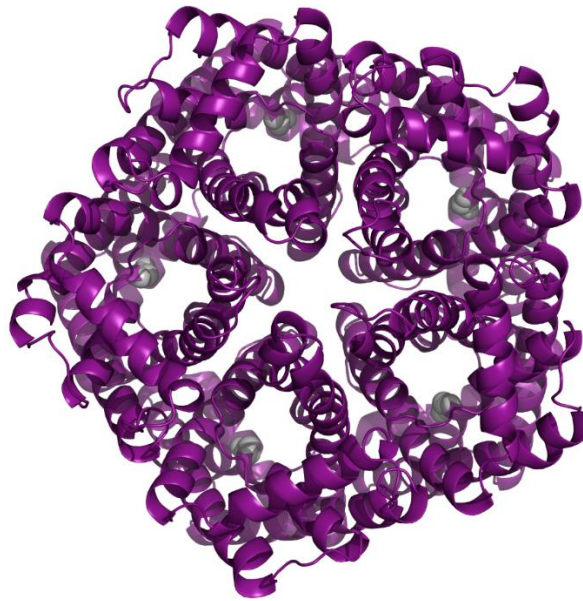


Abbildung 1.4: Modell der Quartärstruktur des *P. falciparum* FNT basierend auf dem Hydrosulfit Kanal (PDB ID: 3TDR). Dargestellt ist das Homopentamer in lila, sowie die forcierte Mutation G107S in grau. Erstellt mit PyMOL.

Diese Pentamer-Struktur ist auch schon von anderen Vertretern der FNT Familie bekannt [67, 81, 82]. In Abbildung 1.4 ist ein Modell dieser Quartärstruktur dargestellt. Der Substrat-Transport findet dabei nicht durch die zentrale Pore, sondern durch die Pore jedes Protomers statt [71, 82].

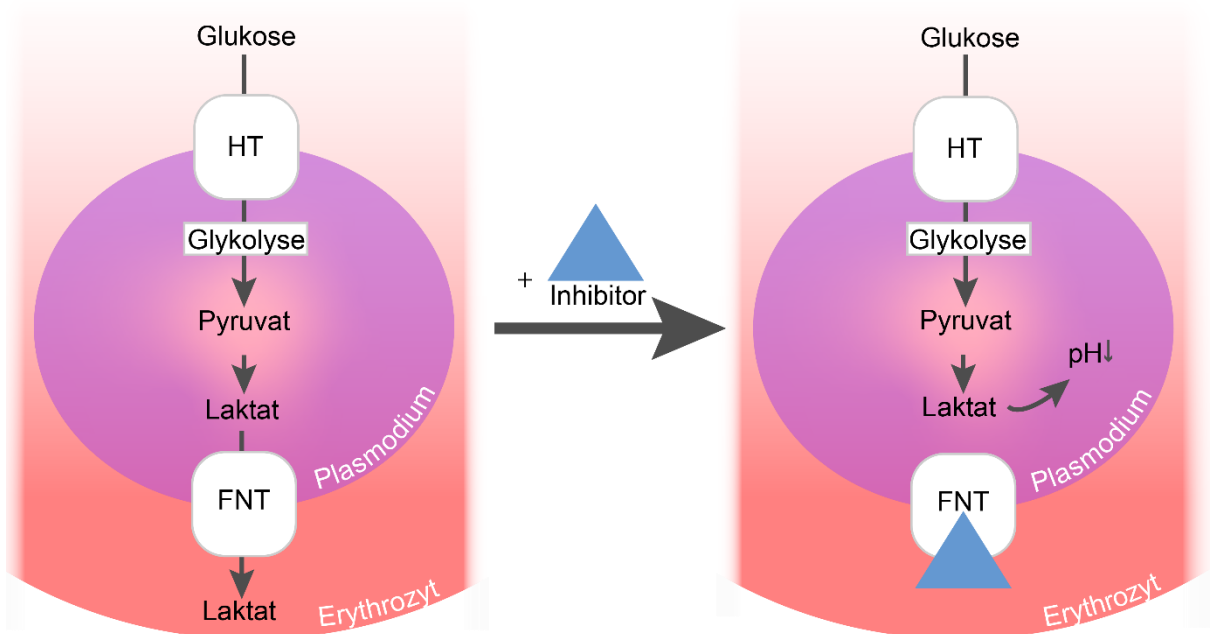


Abbildung 1.5: Kohlenstoff-Stoffwechsel im Plasmodium ohne und mit Zusetzen eines Inhibitors. HT = Hexose-Transporter; FNT = Formiat-Nitrit-Transporter; Erstellt mit Adobe Illustrator 19.

Das in der Gattung Plasmodium wichtige FNT-Substrat ist L-Laktat. Wie schon in Kapitel 1.1 kurz erklärt, wird über den Hexose-Transporter Glukose aus dem Erythrozyten aufgenommen,

## Einleitung

vgl. Abbildung 1.5. Nach der Umwandlung zu L-Laktat muss dieses den Erreger wieder verlassen und tut dies über den FNT. Beim Einsetzen eines Inhibitors des FNT kann L-Laktat demnach nicht mehr hinaus transportiert werden. Es kommt zu einer Akkumulation im Erreger und zu einem Sinken des pH-Wertes. Zusätzlich konnte ein Anschwellen von Erreger und Erythrozyt gezeigt werden, was möglicherweise osmotische Gründe hat. Nach erfolgreicher Hemmung stirbt der Malaria-Erreger ab. Bevor die Identität des FNT geklärt war, gab es bereits erste bekannte Inhibitoren des Proteins. Substanzen wie Phloretin, Furosemid und Cinnamat-Derivate hemmen den Transporter mit einem  $IC_{50}$ -Wert im unteren mikromolaren Bereich [16–19].

Erst der Einsatz von Screening-Methoden führte zu der Entdeckung der ersten Inhibitoren des *P. falciparum* FNT im nanomolaren Bereich. Dr. André Gollmack führte in unserem Arbeitskreis ein biophysikalisches Screening von Substanzen aus der Malaria-Box durch und entdeckte dabei zwei, welche im Hefe-System einen  $IC_{50}$ -Wert im mittleren nanomolaren Bereich aufwiesen, MMV007839 und MMV000972 siehe in Abbildung 1.6. Im Folgenden wird MMV007839 nur noch mit dem arbeitskreisinternen Namen BH-312 genannt. Ähnliche Werte wurden an *P. falciparum* erhalten. Inzwischen gibt es im Arbeitskreis eine ganze Bibliothek mit Strukturanaloga der im Screening gefundenen Substanzen [36, 37, 48].

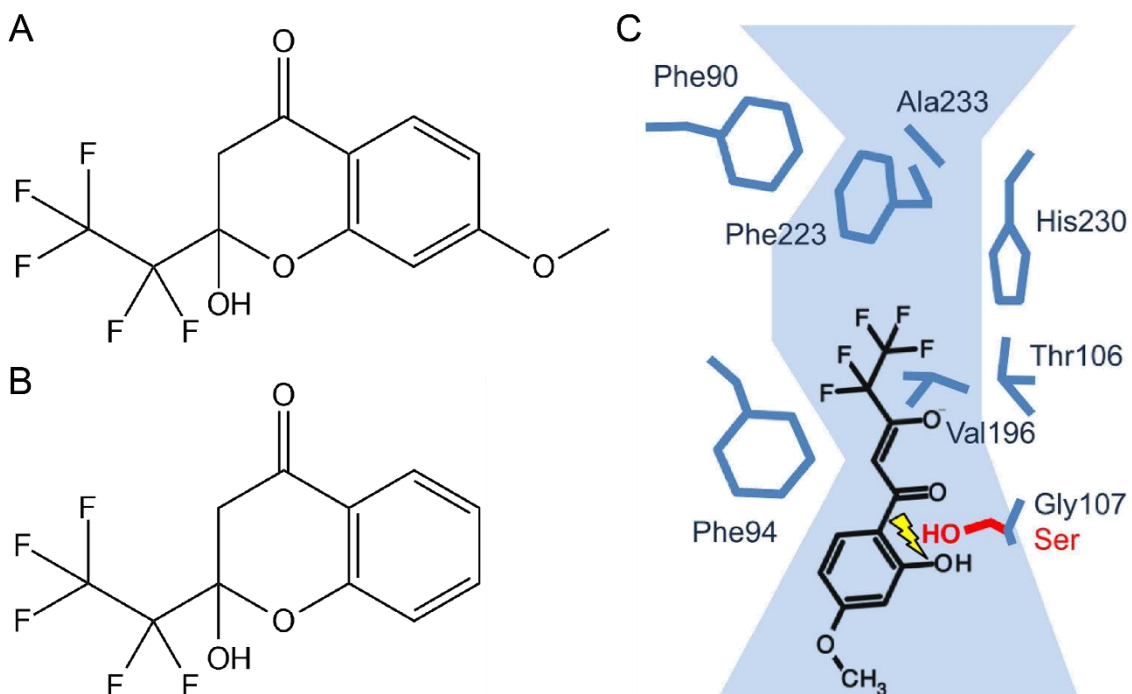


Abbildung 1.6: Strukturformeln von BH-312 (A) und MMV000972 (B), beide in der vermuteten Transportform. Erstellt mit ChemDraw. (C) Postulierter Bindemodus von MMV007839. In Rot dargestellt die Mutation G107S. Erstellt von Dr. André Gollmack [36]

Bei der Behandlung von Parasiten mit subletalen Konzentrationen von BH-312 konnte eine Ein-Punkt-Mutation selektiert werden. An Aminosäure-Position 107 war ein Glycin gegen ein



größeres Serin ausgetauscht worden, vgl. Abbildung 1.6. Dies gab erste Hinweise über den Mechanismus der Hemmung. Position 107 liegt am Transportpfad von L-Laktat und Dr. André Gollack postulierte dann den Bindemodus wie in Abbildung 1.6 (C) angegeben [36].

Die beidem im Screening von Dr. André Gollack gefundenen Substanzen zeigten in anderen Tests von van Voorhis *et al.* 2016 eine ausgeprägte Plasmaprotein-Bindung, sowie Interaktion mit Glutathion und sind deshalb nicht die besten Kandidaten für weitergehende Arzneimittel-Entwicklung [49]. Da aufgrund der starken Resistenzbildung in der Malariatherapie dringend neue *targets* gebraucht werden, ist eine Suche nach weiteren hochpotenten PfFNT-Inhibitoren wichtig. Außerdem stellt der FNT aufgrund seiner wichtigen Rolle im Kohlenstoff-Stoffwechsel und seines Fehlens im menschlichen Organismus ein *drug target* dar, welches eine gute Ergänzung für die bereits bekannten ist. Zu diesen *targets* zählen, wie in Kapitel 1.2 beschrieben, die Hämoglobinverwertung, die Atmungskette, die Erzeugung oxidativen Stresses und die sarkoplasmatische, endoplasmatische Calcium ATPase.

### 1.6 FNTs aus humanpathogenen Plasmodien

Es gibt fünf bekannte humanpathogene Plasmodien, *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* und *P. knowlesi*. Von allen fünf sind auch FNT bekannt, die, außer PfFNT bisher noch nicht untersucht wurden. Die Ähnlichkeit und Identität der Aminosäuren in den Sequenzen sind in Tabelle 1.2 dargestellt.

Tabelle 1.2: Vergleich der Ähnlichkeit der Proteinsequenzen der FNTs humanpathogener Plasmodien. In Rot dargestellt die Anzahl der Aminosäuren, die identisch sind in %. In Blau die Anzahl der Aminosäuren, die ähnlich sind in %. Erstellt von Prof. Dr. E. Beitz mit TEXshade [83]

	PfFNT	PvFNT	PkFNT	PmFNT	PoFNT	
PfFNT	–	85,0	84,7	84,1	86,0	% der ähnlichen Aminosäuren
PvFNT	73,7	–	95,4	86,6	87,6	
PkFNT	72,8	90,5	–	88,6	88,6	
PmFNT	72,4	78,2	78,9	–	89,6	
PoFNT	74,6	79,8	79,8	82,1	–	
	% der gleichen Aminosäuren					

Es zeigt sich, dass mindestens 72,4 % der vorhandenen Aminosäuren gleich sind. Besonders bei den FNTs aus *P. vivax* und *P. knowlesi* zeigt sich eine hohe Identität mit 90,5 % gleichen Aminosäuren. Tatsächlich zeigen die Sequenzen von *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. malariae* und *P. ovale* größere Übereinstimmungen untereinander als diese vier mit *P. falciparum*. Ähnliche

## Einleitung

Aminosäuren sind sogar mehr als 84,1 % vorhanden. Auch hier zeigen *P. vivax* und *P. knowlesi* die größte Übereinstimmung mit 95,4 %. Die Unterschiede zwischen *P. falciparum* FNT und den anderen vieren ist hier nicht mehr so ausgeprägt. Ein Alignment der Sequenzen ist in Abbildung 1.7 dargestellt.

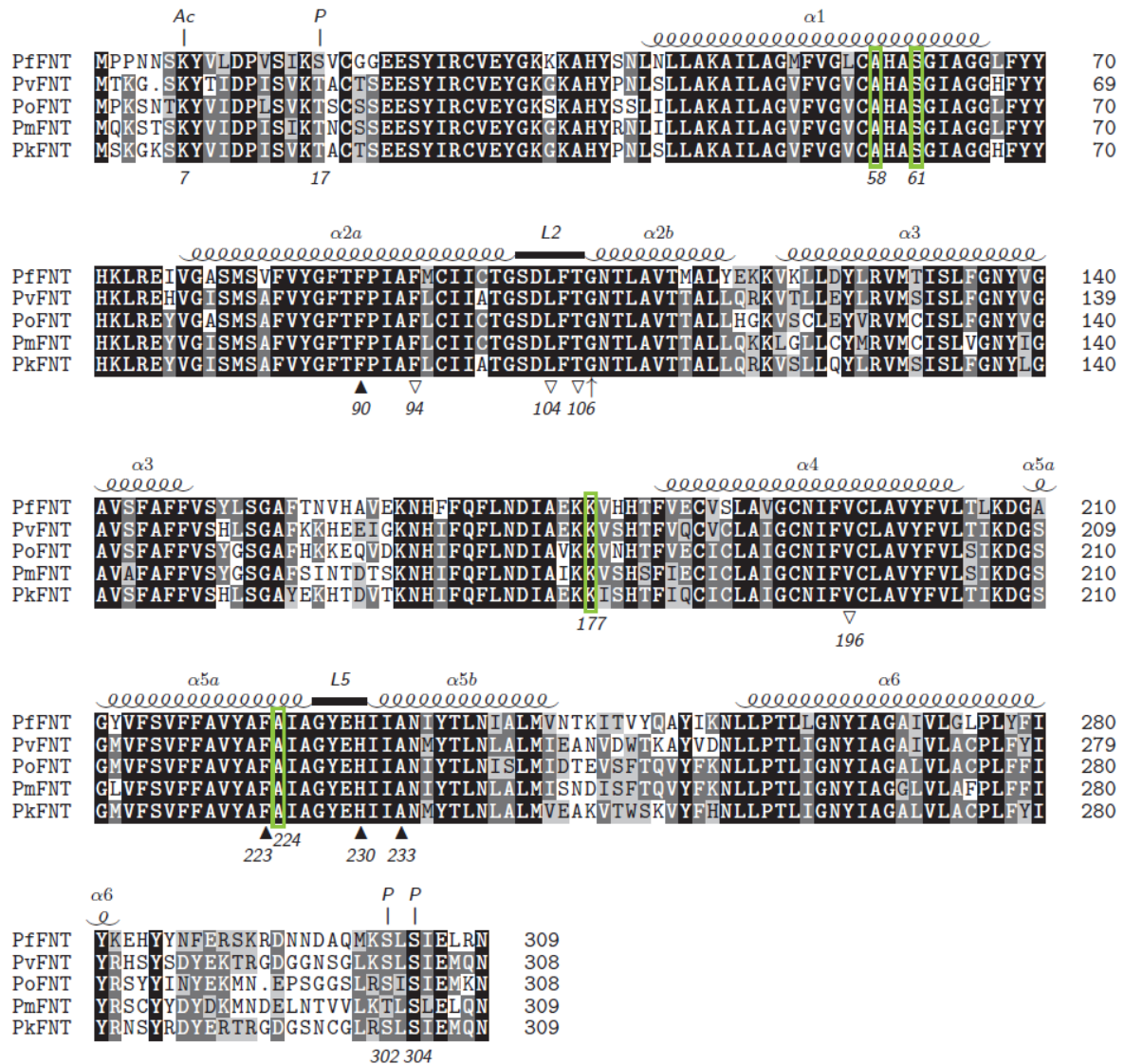


Abbildung 1.7: Alignment der Proteinsequenzen der FNTs humanpathogener Plasmodien. Grün hervorgehoben sind Aminosäuren im Poreneingang des Proteins, während die konstriktionsbildenden Aminosäuren mit einem Dreieck markiert sind. Mit einem Pfeil ist die Mutationsstelle G107S markiert. Auch hypothetische Phosphorylierungs-(P) und Acetylierungsstellen (Ac) sind markiert. Schwarz mit weißer Schrift bedeutet eine genaue Übereinstimmung der Aminosäure, je heller der Grauton, desto niedriger die Ähnlichkeit. Weiß mit schwarzer Schrift stellt eine unähnliche Aminosäure dar. Erstellt von Prof. Dr. E. Beitz mit TEXshade [83]

Dabei zeigt sich in den markierten Transmembran-Helix Domänen eine hohe Ähnlichkeit. Unterschiede bestehen vor allem am N- und am C-Terminus und in den *loops*. Die mit Dreiecken markierten konstriktionsbildenden Aminosäuren sind konserviert. Auch die grün hervorgehobenen Aminosäuren im Poreneingang stimmen überein. Zur besseren Verdeutlichung ist in Abbildung 1.8 die tertiäre Struktur des *P. falciparum* FNT abgebildet. Weiße Bereiche zeigen

## Einleitung

hier die Übereinstimmung an, je dunkler der Rotton, desto stärker sind die Unterschiede zu den FNTs der anderen humanpathogenen Plasmodien.

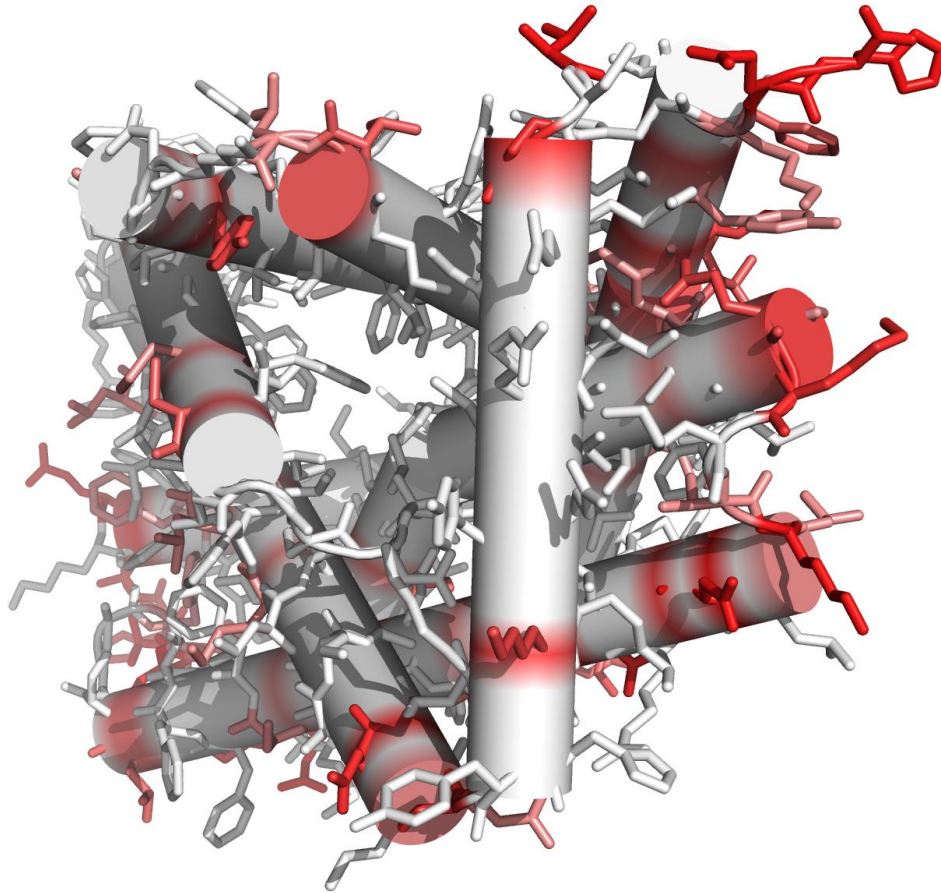


Abbildung 1.8: Modell der tertiären Struktur des *P. falciparum* FNT basierend auf dem Hydrosulfit Kanal (PDB ID: 3TDR). Weiße Bereiche zeigen identische Aminosäuren an im Vergleich mit den FNTs der anderen humanpathogenen Plasmodien. Die rote Farbe zeigt die Bereiche an, in denen ein Unterschied besteht. Erstellt mit PyMOL von Prof. Dr. Eric Beitz.

Auch hier ist zu erkennen, dass vor allem im Transportpfad keine Unterschiede der Proteine zu sehen sind. Aufgrund der Ähnlichkeit der Sequenz könnte man erwarten, dass es auch keine Unterschiede in der L-Laktatleitfähigkeit zwischen den FNTs gibt. Schaut man sich zudem den von Golldack *et al.* 2017 postulierten Bindemodus des Inhibitors BH-312 an, siehe Abbildung 1.4, ist zu sehen, dass die hypothetisch für die Hemmung des FNT wichtigen Aminosäuren alle konserviert sind. So liegt die Vermutung nahe, dass auch in der Hemmbarkeit keine großen Unterschiede zu finden sind.

### 1.7 Zielsetzung

Da in der Therapie der Malaria dringend neue Substanzen und auch neue *targets* benötigt werden, bestand das erste Ziel der Arbeit darin eine Methode zu entwickeln, mit der die TCAMS-Substanzbibliothek am *P. falciparum* FNT getestet werden kann. Die Substanzbibliothek wurde freundlicherweise von GSK zur Verfügung gestellt. Dieses Screening sollte im

## Einleitung

Anschluss an die Methodenentwicklung dann durchgeführt werden. Es sollte eine Substanz gefunden werden, welche nicht den gleichen Bindemodus aufweist, wie die schon bekannten Substanzen. Aus diesem Grund wurde mit der Resistenzmutante G107S von *PfFNT* gearbeitet. Das Ziel dabei war eine Substanz zu finden, welche außen am Transporter bindet und nicht zunächst aufgenommen werden muss. Da die Resistenzmutante an Aminosäure-Position 107 verändert ist, welche intrazellulär im L-Laktat-Transportpfad liegt, können nur Substanzen wirken, welche von der Aminosäure-Veränderung nicht beeinträchtigt werden. Ein großer Vorteil davon ist, dass der Malaria-Erreger nicht so viele Möglichkeiten hat eine Resistenz zu entwickeln, wenn die Substanz nicht aufgenommen werden muss, um wirken zu können. Von den vier in Kapitel 1.2 genannten Resistenz-Mechanismen bringt einzig die Veränderung des *target* einen Effekt, da die Substanz außerhalb des Erregers wirkt. Zusätzlich sollte diese neue Substanz einen niedrigeren halbmaximalen Hemmwert haben, als für die Resistenzmutante bisher bekannte Substanzen. Zu Beginn dieser Arbeit wies die beste inhibitorische Substanz BH-296 einen  $IC_{50}$ -Wert von 2,7  $\mu$ M im Hefesystem auf. Aus diesem Grund wurde als Grenze im Screening eine gleichstarke oder bessere Hemmung gewählt. Die Entwicklung solch eines Assays ist auch für die Zukunft sinnvoll, um weiterer Inhibitoren von L-Laktat-Transportern zu finden.

Das weitere Ziel war die erstmalige Untersuchung der FNT der anderen humanpathogenen Malaria-Erreger, *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. ovale* und *P. malariae*. Diese sollten zunächst hinsichtlich ihrer L-Laktatleitfähigkeit mit *PfFNT* verglichen werden. Im Anschluss sollten die im Arbeitskreis bekannten Substanzen an allen FNT-Vertretern getestet werden, um Unterschiede und Ähnlichkeiten in der Hemmbarkeit festzustellen. So sollten Informationen über die generelle Eignung der FNTs als *drug target* der humanpathogenen Malaria insgesamt gewonnen werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien, Enzyme, Kits, Material

*Applichem GmbH, Darmstadt*

Natriumlaurylsulfat, Natrium-L-Laktat, Tween 20

*Becton Dickinson GmbH, Heidelberg*

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

*Beckman Coulter, Krefeld*

GenomeLab DTCS-Quick Start Kit

*Bio-Rad, München*

Bio-Rad Protein Assay, Clarity ECL Westernblotting Substrates

*Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe*

Agar-Agar Kobe I, Ammoniumsulfat, Ammoniumperoxodisulfat, Bromphenolblau, Dimethylsulfoxid, 1,4-Dithiothreitol, Natrium-Ethyldiamintetraessigsäure, Glukose-Monohydrat, Glycerol (wasserfrei), Glycin, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, L-Leucin, LB-Agar (Lennox), LB-Medium (Lennox), Lithiumacetat, 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, Milchpulver (*blotting grade*), Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, Natriumhydroxid, Ponceau S, Rotiphorese Gel 40, Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

*GE Healthcare, Freiburg*

Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent, Amersham Hybond P 0.45 PVDF Blotmembran, Whatman Grade 3MM Chr Blotting Paper, Whatman Grade GF/C Glass Micro-fiber Filter (25 mm circle)

*Genaxxon BioScience, Ulm*

Agarose LE, Ampicillin (Natriumsalz), N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

*GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München*

Tres Cantos Antimalarial Set (TCAMS) wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

*J.T. Baker, München*

Ethanol, Methanol, Isopropanol, Essigsäure, Salzsäure

## Material

*Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig*

<sup>14</sup>C-Natrium-L-Laktat

*Merck KGaA, Darmstadt*

Filterplatte Durapore Membrane opaque plates 0,45 µm

*MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich*

Ethidiumbromid

*neoLab Migge GmbH, Heidelberg*

Mikrotestplatte 96-well klar F-Boden

*PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen*

PeqGOLD Prestained Protein Marker III

*PerkinElmer, Inc., Rodgau*

Microscint-20 Scintillationscocktail

*Promega Corporation, Mannheim*

Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System

*Roche Diagnostics, Mannheim*

Anti HA 12CA5 mouse monoclonal antibody

*Sigma Aldrich Chemie, Steinheim*

Adenin, Coomassie Brilliant Blau G250, Dimethylsulfoxid, *glass beads (acid-washed)*, L-Lysin, L-Histidin, L-Tryptophan, Polyethylenglykol 3015-3685, Resazurin Natriumsalz, *sperm nuclei from salmon (SS-carrier DNA)*

*Süd-Laborbedarf, Gauting*

Hi Yield PCR Clean-up/Gel-Extraction Kit

*Thermo Fischer Scientific, Schwerte*

Glycogen, λ-DNA, Orange G, Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase, T4 Ligase Puffer

*VWR International GmbH, Hannover*

Snaptwist Scintillationsvials, Makroküvetten, Eppendorf-Gefäße, Pipettenspitzen

*Zinsser Analytik GmbH, Frankfurt*

Quicksafe A Scintillationscocktail

## 2.2 Geräte

*B. Braun Biotech International, Melsungen*

Certomat MO Laborschüttler

*Beckman Coulter, Krefeld*

Optima XL-80K Ultrazentrifuge mit Rotor 50.2 Ti; DNA Sequenzer CEQ 8000

*Binder GmbH, Tuttlingen*

Brutschrank, Wärmeschrank

*Bio-Rad, München*

PowerPac 200 SDS-PAGE Netzteil; Trans-Blot SD *Semi-Dry Transfer Cell*

*Edmund Bühler, Hechingen*

Wippschüttler WS-10

*Elysia & Raytest GmbH, Straubenhardt*

Gel-Dokumentationssystem IDA

*Eppendorf AG, Hamburg*

BioPhotometer; Centrifuge 5424 R

*Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel*

Wasserbad

*H+P Labortechnik, München*

Variomag MONO Magnetrührer

*Hereaus Holding, Hanau*

Biofuge Pico Zentrifuge; Kelvitron T; Multifuge 1S-R Centrifuge, HERAguard Reinluftwerkbank,  
*Function Line* UT12 Trockenschrank

*IKA-Werke GmbH & CO. KG, Staufen*

Ikamag Ret-GS; IKA RW 20 Rührwerk

*Ilmvac GmbH, Ilmenau*

MPC 101 Z Membranpumpe Typ 400171 chemiefest

## Material

*Infors HT, Bottmingen, Schweiz*

Minitron Inkubationsschüttler

*Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern*

Kern ABS 120-4 Analysenwaage

*Mettler-Toledo, Gießen*

Balance MS205DU Präzisionswaage; PB3002-S DeltaRange Präzisionswaage

*New Brunswick Scientific GmbH, Nürtingen*

Innova U535 Upright Freezer

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

Bioscreen C Automated Microbiology Growth Curve Analysis System

*Panasonic Deutschland, Hamburg*

NN-E245W Mikrowelle

*Perkin-Elmer, Langenfeld*

TRI-CARB 2000TR Liquid Scintillations Analyzer; MicroBeta Trilux 1450 LSC und *Luminescence Counter*

*PeqLab, Erlangen*

*Perfect Spin 24 Plus* Mikrozentrifuge; *Perfect Spin 24R* Mikrokühlzentrifuge; *Primus PCR-Blöcke*; *S62C* Heizblock; *SDS-Gelgießstand* und *Gelträger*

*Pharmacia Biotech, Piscataway, USA*

EPS 300 Elektrophorese Netzteil

*Roche Diagnostics, Mannheim*

Lumi-Imager F1

*Savant Instruments, Farmingdale, USA*

Vakuumzentrifuge DNA SpeedVac DNA 110

*Scientific Industries, Bohemia, USA*

Vortex-Genie 2

*Schott Instruments, Mainz*

Digital-Labor-pH-Meter Lab 850



## Material

Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz

Tecan Infinite F50; Tecan Infinite F200

Techne, Duxford, Großbritannien

Dri-Block DB-2D

Thermo Fischer Scientific, Schwerte

E1-ClipTip Mehrkanalpipette; Compact Digital MicroPlate Shaker

VWR International GmbH, Hannover

Puranity TU 6 IV/UF Wasseraufbereitungssystem

Zirbus Technology GmbH, Bad Grund

Dampfsterilisator LTA 32/25

### 2.3 Plasmid und kodierende DNA-Sequenzen

Zur heterologen Genexpression von FNT-Varianten wurde ein Plasmid verwendet, das alle notwendigen Gene und Promotoren für Amplifikation in *E. coli* und Expression in *S. cerevisiae* enthielt (Abbildung 2.1).

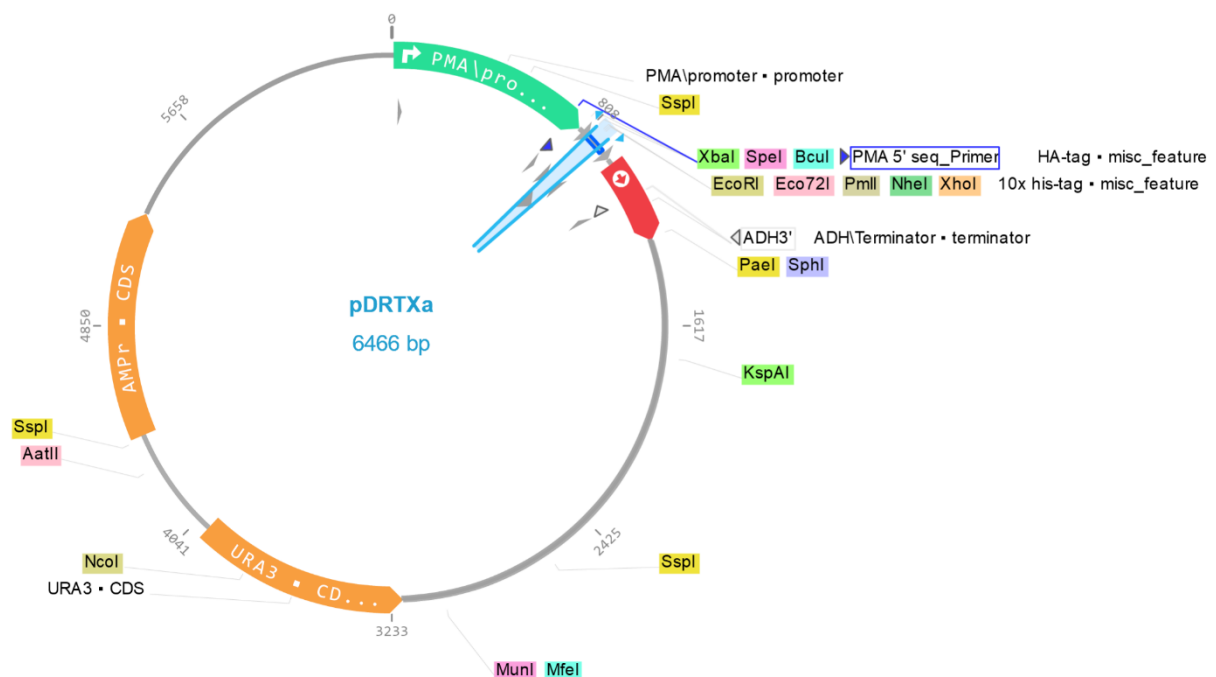


Abbildung 2.1: Verwendetes Plasmid zur heterologen Expression von FNT Varianten: blau: MCS für FNT, orange: AMP<sup>r</sup> für Amplifikation in *E. coli*, grün: PMA-Promotor, rot ADH-Terminator. Zusätzlich sind alle vorhandenen Schnittstellen dargestellt. Erstellt mit Genome Compiler unter <https://designer.genomecompiler.com/app>

## Material

Proteinname	Beschreibung	Größe	GeneDB ID
PfFNT	FNT aus <i>P. falciparum</i>	930 bp	PF3D7_0316600
PfFNT G107S	Resistenzmutante des FNT aus <i>P. falciparum</i>	930 bp	
PvFNT	FNT aus <i>P. vivax</i>	942 bp	PVP01_0823500
PoFNT	FNT aus <i>P. ovale</i>	942 bp	PocGH01_08031900
PmFNT	FNT aus <i>P. malariae</i>	945 bp	PmUG01_08039500
PkFNT	FNT aus <i>P. knowlesi</i>	945 bp	PKNH_0825200

[Quelle: PlasmoDB, abgerufen unter <https://plasmodb.org> am 21.01.2020]

### 2.4 Oligonukleotide (*primer*)

Name	Sequenz (5' – 3')
PMA 5'	AAT CGT TGG TAG ATA CGT TGT
ADH 3'	CAT AAA TCA TAA GAA ATT CGC

### 2.5 *E. coli*-Stamm

Der verwendete *E. coli*-Stamm war DH5 $\alpha$  mit dem Genotypen F-  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* ( $r_{K-}$ ,  $m_{K+}$ ) *phoA supE44*  $\lambda$ - *thi-1 gyrA96 relA1*.

### 2.6 *S. cerevisiae*-Stamm

Der *S. cerevisiae*-Stamm war von M. Casal zur Verfügung gestellt worden. Dabei handelt es sich um W303-1A mit dem Genotyp  $\Delta$ *jen1*  $\Delta$ *ady2* MAT $\alpha$ , *can1-100*, *ade2-1*, *his3-11-15*, *leu2-3,-112*, *trp1-1-1*, *ura3-1*, *jen1::kanMX4*, *ady2::hphMX4*.

### 2.7 Antikörper

Name	Beschreibung	Verdünnung
Anti-HA	Monoklonaler Primär-Antikörper aus der Maus gegen eine Teilsequenz des Hämagglutinin (YPYDVPDYA) gerichtet (von Roche)	1:5.000
Anti-Penta-His	Monoklonaler Primär-Antikörper aus der Maus gegen fünf Mal Histidin gerichtet (von Qiagen)	1:5.000

## Material

Anti-Maus      Polyklonaler Sekundärantikörper aus der Ziege gegen die Seitenkette des Maus IgG, konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase (von Jackson Immuno Research)      1:5.000

## 2.8 Nährmedien, Puffer, Lösungen

### 2.8.1 Molekularbiologie

#### *Agarose-Gelelektrophorese*

TAE-Puffer		Ethidiumbromid-Lösung (10 mg · ml <sup>-1</sup> )	
Tris-Acetat, pH 8,0	40 mM	Ethidiumbromid	1 Tablette
EDTA	1 mM	<i>Aqua bidest.</i>	10 ml
<i>Aqua bidest.</i>			

#### 10 x Probenpuffer (Orange G)

10 x Probenpuffer (Orange G)	
Orange G	0,4 %
Glycerol	30 %
EDTA	100 mM
<i>Aqua bidest.</i>	

#### *Nährmedien*

Alle Nährmedien wurden nach der Herstellung bei 121 °C für 20 min autoklaviert, außer es ist anders angegeben.

LB Medium		LB Agarplatten	
LB-Medium (Lennox)	20 g	LB-Agar	35 g
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l	<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l
Ggf. Ampicillin	100 µg · ml <sup>-1</sup>	Ggf. Ampicillin	100 µg · ml <sup>-1</sup>
YPD Medium		YPD Agarplatten	
Peptone	20 g	YPD Medium	1 l
Hefeextrakt	10 g	NaOH	0,1 g
Glukose	20 g	Agar	20 g
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l		

## Material

### SD Medium

<i>yeast nitrogen base</i>	1,7 g
Ammoniumsulfat	5 g
Glukose	20 g
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l

### SD AHLW Agarplatten

SD Medium	1 l
Agar	20 g
Nach abkühlen auf ca. 60 °C:	
Adenin	25 mg · ml <sup>-1</sup>
L-Histidin	20 mg · ml <sup>-1</sup>
L-Leucin	100 mg · ml <sup>-1</sup>
L-Tryptophan	10 mg · ml <sup>-1</sup>

### SD AHLW Medium

SD Medium (abgekühlt)	1 l
Adenin	25 mg · ml <sup>-1</sup>
L-Histidin	20 mg · ml <sup>-1</sup>
L-Leucin	100 mg · ml <sup>-1</sup>
L-Tryptophan	10 mg · ml <sup>-1</sup>

### 1 % L-Laktatmedium

<i>yeast nitrogen base</i>	1,7 g
Ammoniumsulfat	5 g
<i>Aqua bidest.</i>	850 ml
Nach Abkühlen:	
L-Laktat	10 g
Adenin	25 mg · ml <sup>-1</sup>
L-Histidin	20 mg · ml <sup>-1</sup>
L-Leucin	100 mg · ml <sup>-1</sup>
L-Tryptophan	10 mg · ml <sup>-1</sup>
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l

## 2.8.2 Proteinchemie

### *Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus S. cerevisiae*

Extraktionspuffer B		Puffer M	
Tris	25 mM	Natriumphosphat	100 mM
EDTA	5 mM	Natriumchlorid	50 mM
pH 7,5 mit HCl einstellen		pH 8,0 mit HCl einstellen	
20 min autoklavieren		20 min autoklavieren	

## Material

### SDS-PAGE

SDS-Ladepuffer (4x)		Trenngelpuffer (4x)	
Tris	0,25 M	Tris	1,5 M
Glycerol	40 %	SDS	0,4%
Bromphenolblau	0,02 %	pH 8,8	
SDS	8%	<i>Aqua bidest.</i>	
DTT	0,4 M		
<i>Aqua bidest.</i>			

Sammelgelpuffer (4x)		APS (10%)	
Tris	0,5 M	Ammoniumpersulfat	5 g
SDS	0,4 %	<i>Aqua bidest.</i>	ad 50 ml
pH 6,8			
<i>Aqua bidest.</i>			

Kathodenpuffer (10 x)		Kathodenpuffer (1x)	
Glycin	1,92 M	Kathodenpuffer (10x)	100 ml
Tris	0,25 M	<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l
SDS	1 %		
pH 8,2 – 8,6 mit HCl einstellen			
<i>Aqua bidest.</i>			

### Western Blot

Transferpuffer (5x)		Transferpuffer (1x)	
Glycin	0,96 M	Transferpuffer (5x)	10 ml
Tris	0,125 M	Methanol	10 ml
SDS	0,2 %	<i>Aqua bidest.</i>	30 ml
<i>Aqua bidest.</i>			

TBS (10x)		TBST (1x)	
Natriumchlorid	1,37 M	TBS (10x)	100 ml
Tris	0,2 M	Tween 20	1 ml
pH 7,6 mit HCl einstellen			
<i>Aqua bidest.</i>			
		<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l

## Material

### M-TBST

---

Milchpulver	3 %
-------------	-----

*blotting grade*

TBST (1x)

### Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau und Ponceau S

Färber-Lösung		Entfärber-Lösung	
Coomassie Brilliant Blau R250	0,25 g	Eisessig	10 ml
Eisessig	10 ml	Methanol 50 %	90 ml
Methanol 50 %	90 ml		

### Ponceau S Lösung

---

Ponceau S	1 g
Essigsäure	15 ml
<i>Aqua bidest.</i>	35 ml

### 2.8.3 Testung von Inhibitoren

HT-Puffer (HEPES/TRIS)		Resazurin Stamm-Lösung	
HEPES	50 mM	Resazurin-Na	3 mg · ml <sup>-1</sup>
Tris	50 mM	<i>Aqua bidest.</i>	
pH 6,8 mit HCl einstellen			
<i>Aqua bidest.</i>	ad 1 l		

## 2.9 Software

Für diese Arbeit wurde die Microsoft Office Suite verwendet. Diese Arbeit wurde mit Microsoft Word geschrieben und erste Datenauswertungen, sowie Tabellendarstellungen wurden mit Microsoft Excel vorgenommen. Die Statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit GraphPad Prism. Abbildungen wurden mit Adobe Photoshop und Adobe Illustrator modifiziert. Strukturformeln wurden mit ChemDraw Ultra 12 erstellt. Die Darstellung von Proteinen erfolgte mit PyMOL. Gerätespezifische Software ist hier nicht angegeben, wenn sie nur zur Aufnahme der Daten verwendet wurde und keine Auswertung damit durchgeführt wurde.

## 3 Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese wurde zur Größenauftrennung von DNA verwendet. Dazu wurde 0,5 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben eingewogen und in 50 ml 1 x TAE-Puffer gelöst. Der Erlenmeyerkolben wurde in einer Mikrowelle erhitzt, bis ca. 10 g Wasser verdampft waren. Dieser Verlust wurde mit Wasser aufgefüllt und anschließend 1 µl Ethidiumbromid-Lösung zugesetzt. Der Gießstand wurde zusammengebaut und die Agarose-Lösung nach Umschwenken hineingegossen. Nach Aushärten des Gels für ca. 30 min konnte dieses in die Apparatur eingesetzt werden, und wurde komplett mit TAE-Puffer bedeckt. Nach Entfernen der Kämme wurden 20 µl der mit 10 % Orange G versetzten Proben in die ausgesparten Taschen eingefüllt. Zusätzlich wurden 5 µl DNA-Größenmarker ( $\lambda$ -DNA verdaut mit Pst I) in eine Tasche gefüllt. Anschließend wurde die Apparatur mit einer Spannungsquelle verbunden. Eine Spannung von 120 V bei 400 mA wurde eingestellt und 30-40 Minuten aufrechterhalten. Anschließend konnte durch Anregung mit UV-Licht das Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, sichtbar gemacht werden. Einerseits konnte so DNA über ihre Größe identifiziert werden (zum Beispiel nach erfolgtem Restriktionsverdau, siehe 3.1.4), andererseits konnte die gewünschte DNA isoliert werden (3.1.2).

#### 3.1.2 DNA-Isolierung aus Agarosegelen

Gewünschte DNA-Fragmente konnten direkt nach der Agarose-Gel-Elektrophorese (siehe 3.1.1) aus dem Gel gewonnen werden, um diese weiter zu verwenden. Dazu wurde mit UV-Licht der Wellenlänge 360 nm das interkalierte Ethidiumbromid angeregt und mit einem Skalpell DNA-Fragmente der gewünschten Größe so knapp wie möglich ausgeschnitten. Im Anschluss wurde das HiYield® PCR *Clean-up/ Gel Extraction*-Kit nach der folgenden Anleitung verwendet. Um die DNA aus dem Gel zu gewinnen, musste dieses zuerst verflüssigt werden. Dies geschah durch Zugabe von 500 µl DF-Puffer, welcher chaotrope Salze enthält, die zusätzlich zum Auflösen der Gelstruktur auch Enzyme denaturieren. Das Ganze wurde 10-15 min lang bei 60 °C unter regelmäßigem Durchmischen erhitzt. Sobald das Gel wieder verflüssigt war, wurde es zum Abkühlen auf Eis gestellt. Die DNA wurde dann über eine Glasfaser-Säule gebunden und der DF-Puffer eluiert. Dann wurde mit 400 µl W1-Puffer gewaschen. Es wurde 30 s bei 14.000-16.000 g zentrifugiert und der Durchfluss entsorgt. Es folgten zwei weitere Waschschriffe, bei denen jeweils 600 µl *Wash*-Puffer zugegeben wurde und nach 1 min warten erneut 30 s bei 14.000-16.000 g zentrifugiert wurde, um den Durchfluss jedes Mal zu

entsorgen. Im Anschluss wurden Säule und *collection tube* noch 6 min offen bei 14.000-16.000 g zentrifugiert, um jeden Rest Ethanol zu verdampfen, der vom *Wash*-Puffer noch auf der Säule sein könnte. Nun wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß gesteckt und 20 µl *Aqua bidest.* auf den Filter der Säule gegeben. Nach 5 min Einwirkzeit wurde dann ein letztes Mal mit 14.000-16.000 g für 2 min zentrifugiert, um die DNA in das Eppendorfgefäß zu überführen. Anschließend konnte eine Konzentrationsbestimmung des Fragmentes durchgeführt werden (3.1.3) und dieses anschließend verwendet werden.

### 3.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde über die Eigenabsorption der Nukleinsäuren gemessen. In eine Quarzküvette wurden 4 µl DNA und 96 µl *Aqua bidest.* gegeben und gut vermischt. Mit einem Photometer wurde nach Messen eines *Aqua bidest. blank* die Absorption bei 260 und 280 nm gemessen. Über den Messwert bei 260 nm konnte mithilfe der Verdünnung und des Korrekturfaktors F die DNA-Konzentration bestimmt werden.

$$c = \text{Abs}_{260 \text{ nm}} \cdot F \cdot \text{Verdünnung}$$

Der Korrekturfaktor F entspricht 0,04 für Doppelstrang-DNA und 0,02 für Einzelstrang-DNA. Über den Quotienten Q konnte dann im Anschluss die Reinheit bestimmt werden.

$$Q = \frac{\text{Abs}_{260 \text{ nm}}}{\text{Abs}_{280 \text{ nm}}}$$

Verunreinigungen mit Proteinen würden beispielsweise bei 280 nm absorbieren. DNA einer Reinheit  $1,8 < Q < 2$  konnte für die Weiterverwendung verwendet werden.

### 3.1.4 Restriktionsverdau

Zur Identifikation und zur Trennung von DNA-Fragmenten wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Um die DNA an den gewünschten Stellen zu schneiden wurden je 0,5 µl der passenden Restriktionsenzyme in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben, zusammen mit 1 µl des für alle Restriktionsenzyme passenden Zehnfach-Puffers. War ein gleichzeitiger Verdau mit mehreren Restriktionsenzymen aufgrund von Star-Aktivität nicht möglich, wurden die Verdaue nacheinander durchführen. Es wurden je mindestens 500 ng der gewünschten DNA eingesetzt. Anschließend wurde mit *Aqua bidest.* auf 10 µl aufgefüllt. Das Eppendorfgefäß wurde bei 37 °C für 30 min in einem Heizblock inkubiert. Die Restriktionsenzyme binden nun an ihren Erkennungssequenzen und führen dort zu einem Abbruch. Das Ergebnis des Restriktionsverdaus konnte mithilfe einer Agarose-Gel-Elektrophorese (siehe 3.1.1) überprüft werden. Benötigte DNA-Abschnitte konnten anschließend isoliert (siehe 3.1.2), sowie ihre Konzentration bestimmt werden (siehe 3.1.3).



### 3.1.5 Ligation

Um gewünschte DNA-Abschnitte, also Gene in einen Vektor einzubringen, wurde zuerst 1 µl T4-Ligase-Puffer in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Es wurde mit unterschiedlichen Verhältnissen zwischen dem *insert*, also dem zu inserierenden DNA-Abschnitt, und dem Vektor gearbeitet, wobei immer mehr *insert* als Vektor verwendet wurde. Verwendete Verhältnisse waren 5:3 oder 7:1. Es wurde 1 µl T4-Ligase zugegeben und der Ansatz entweder 10 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert, je nachdem wann weitergearbeitet werden sollte. Die T4-Ligase sorgt dafür, dass kompatible Enden ligiert werden. Um das Ergebnis zu überprüfen, wurde zunächst eine *E. coli* Transformation durchgeführt (siehe 3.1.6) und nach erfolgter Isolierung des Plasmids aus den Bakterienzellen (siehe 3.1.9) anschließend über einen Restriktionsverdau und Agarose-Gel-Elektrophorese überprüft (siehe 3.1.4 und 3.1.1)

### 3.1.6 *E. coli* Transformation

Um mit hoher Effizienz kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes DH5α mit Plasmid-DNA zu transformieren, wurde ein Eppendorf-Gefäß mit diesen Zellen zunächst auf Eis gestellt. Sobald diese anfangen aufzutauen wurde die Plasmid-DNA oder 10 µl eines Ligationsansatzes, hinzugegeben und auf Eis gelagert. Nach 30 min wurde das Eppendorf-Gefäß für max. 1 min bei 42 °C erwärmt, damit die Plasmid-DNA aufgenommen werden konnte. Danach wurde für 2 min auf Eis gelagert. Es wurden 900 µl LB-Medium dazu pipettiert und dann 50 min unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Um die Zellen vom Medium zu trennen wurde 30 s lang bei 15.000 rpm zentrifugiert und 900 µl vom Überstand verworfen. 30 µl der verbleibenden Suspension wurden auf einer LB Amp-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus gewachsenen Kolonien konnten nach weiterer Vermehrung in einer Flüssigkultur (siehe 3.1.9) das Plasmid isoliert werden (siehe 3.1.11).

### 3.1.7 *E. coli* Schnelltransformation

Kompetente *E. coli*-Zell-Aliquote (Calciumchlorid-Methode, durchgeführt von Anna Fuchs) wurden auf Eis angetaut. Es wurden 0,2 µl der DNA dazugegeben und bei weiteren 30 min auf Eis die DNA-Aufnahme gewährleistet. Im Anschluss wurden 30 µl dieser Suspension auf einer LB Amp-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Auch diese gewachsenen Kolonien konnten in einer Flüssigkultur vermehrt (siehe 3.1.9) und anschließend weiterverwendet werden.

### 3.1.8 *S. cerevisiae* Transformation

Zur Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen mit Plasmid-DNA, wurde mit der Methode nach Gietz *et al.* gearbeitet [84]. Hierzu wurde der *S. cerevisiae*-Stamm auf einer YPD-Platte

## Methoden

ausgestrichen. Diese Platte wurde für 3-5 Tage bei 29 °C inkubiert. Sobald die Kolonien darauf Stecknadelkopf-Größe erreicht hatten, wurde eine davon mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in 5 ml YPD-Flüssigmedium in ein Reagenzglas gegeben. Dies wurde über Nacht bei 29 °C und 200 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Optische Dichte bei 600 nm, OD<sub>600</sub>, festgestellt. Zunächst wurde ein *Blank* nur mit YPD-Medium gemessen. Dann wurden 100 µl Hefesuspension und 900 µl frisches YPD-Medium gemischt und im Biophotometer bei 600 nm vermessen. Es wurde eine Hauptkultur mit einer Start-OD<sub>600</sub> von 0,2 angesetzt. Folgende Formel wurde verwendet:

$$\text{einzusetzendes Volumen} = \frac{\text{Gesamtvolumen} \cdot \text{Start-OD}_{600}}{\text{gemessene OD}_{600}}$$

Diese Kulturen wurden in einem Erlenmeyerkolben des 5- bis 10-fachen Volumens angesetzt. Es wurde erneut bei 29 °C und 200 rpm geschüttelt, bis eine OD<sub>600</sub> von ca. 0,6 erreicht war, die Kultur sich also noch in der Exponentiellen Phase befand. Diese Kultur wurde in ein 50 ml *falcon tube* überführt und die Zellen bei 4 °C, 2.500 g in 5 min pelletiert. Das Medium wurde verworfen, die Zellen mit 25 ml *Aqua bidest.* gewaschen und das Zellpellet in 1 ml *Aqua bidest.* aufgenommen. Diese Suspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, 30 s bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun wurden die Zellen erneut resuspendiert. Für 5 Transformationsansätze wurde mit 0,5 ml resuspendiert, für bis zu 10 Transformationsansätze mit 1,0 ml. Anschließend wurden je 100 µl dieser Suspension pro Transformationsansatz in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt, diese erneut bei Höchstgeschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand verworfen. Es wurde der Transformationsmix für die Anzahl der Transformationsansätze plus eins hergestellt und dann auf Eis gelagert. Die Zusammensetzung des Transformationsmix ist in Tabelle 3.1 zu finden. Lithiumacetat wurde dabei verwendet, um die Plasmid-Aufnahme zu ermöglichen. Polyethylenglykol erhöht die Effizienz der Plasmid-Aufnahme. Die *salmon sperm* Einzelstrang carrier-DNA wurde zugegeben, um einerseits das Plasmid vor Nukleasen zu schützen und andererseits ein Binden der Plasmid-DNA an die Zellwand zu vermindern.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des Transformationsmix für eine Transformation

Reagenz	Volumina in µl
PEG 3500 50% w/v	240
LiAc 1,0 M	36
Gekochte SS-carrier DNA	50
<i>Aqua bidest.</i>	34
Gesamt	360

## Methoden

Das Gesamtvolumen des Transformationsmix wurde jedem Transformationsansatz zugesetzt und 0,8 µl Plasmid-DNA zugegeben, die aus einer Plasmid-Isolierung (siehe 3.1.11) gewonnen wurde. Die noch vorliegenden Hefe-Pellets wurden resuspendiert und die Eppendorf-Gefäße bei 42 °C für 45-60 min einem Hitzeschock unterworfen, um eine Aufnahme der Plasmid-DNA zu verbessern. Die Transformationsansätze wurden bei Höchstgeschwindigkeit 20 s lang zentrifugiert und der Transformationsmix vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Zum Resuspendieren wurde 1,0 ml *Aqua bidest.* in jedes Eppendorf-Gefäß gefüllt. Um die Zellsuspension auf Selektionsplatten mit SD AHLW-Agar, auszustreichen wurden die Transformationsansätze 1:20 verdünnt. Dies wurde dann mit einem vorher vorbereiteten Glas-Drigalskispatel verstrichen. Die Platten wurden dann für 3-5 Tage bei 28 °C inkubiert. Von den Kolonien konnten dann Flüssigkulturen erstellt werden (siehe 3.1.10).

### 3.1.9 *E. coli*-Flüssigkulturen

Um eine *E. coli*-Flüssigkultur zu erstellen wurde eine Kolonie in 5 ml LB Amp-Medium in einem Reagenzglas über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der verwendete DNA-Vektor kodiert unter anderem für eine Ampicillin-Resistenz, sodass nur *E. coli*-Zellen, die diesen Vektor tragen, wachsen können. Diese konnten dann weiterverwendet werden, um beispielsweise das Plasmid zu isolieren (3.1.11).

### 3.1.10 *S. cerevisiae*-Flüssigkulturen

*S. cerevisiae*-Kulturen wurden in Vollmedium, sowie Selektionsmedium mit Glukose oder L-Laktat kultiviert. Für Kulturen über 5 ml wurde ein Erlenmeyerkolben des 5-10-fachen Volumens verwendet. So wurde ein ausreichender Sauerstoffeintrag gewährleistet.

Als Vollmedium wurde YPD-Medium verwendet. Hier findet keine Selektion statt, es können also alle verwendeten Hefezellen darauf wachsen. Für eine Vorkultur wurde eine Hefe-Kolonie von einer Platte aufgenommen und in 5 ml Flüssigmedium in ein Reagenzglas gegeben. Dieses wurde über Nacht bei 29 °C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag konnte davon eine Hauptkultur erstellt werden. Diese wurde wieder bei 29 °C schüttelnd inkubiert.

Nach einer Transformation können die Hefezellen auf Selektionsmedium wachsen. Sie erhalten durch das Plasmid das Gen URA3, welches für Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase kodiert. Dieses Gen ist beim verwendeten Hefestamm deletiert. Nun ist die Hefezelle wieder in der Lage ohne Zusatz von Uracil oder Uridin zu wachsen. Bei Verwendung des Glukose-haltigen Selektionsmediums können Kulturen analog zum YPD-Medium verwendet werden. Um vergleichbare Ergebnisse zu erzielen wurden für Biophysikalischer Assays (3.3.1) zwei Vorkulturen hintereinander erstellt, bevor eine Hauptkultur angesetzt wurde.

Bei Verwendung des L-Laktat-haltigen Selektivmediums verlängern sich die Generationszeiten der transformierten Hefen um ein Vielfaches (vgl. Kapitel 4.3.2). Für die Energiegewinnung aus L-Laktat benötigt die Hefezelle deutlich mehr Zeit und die erste Vorkultur aus einer Hefekolonie benötigt 4 bis 7 Tage, um anzuwachsen. Danach konnte ungefähr alle zwei Tage eine neue Kultur angefertigt werden. Um die Hefen in der exponentiellen Wachstumsphase zu halten wurde eine Vorkultur ab einer  $OD_{600}$  von 0,2 verdünnt. Für den phänotypischen Assay, siehe 3.3.2 und 3.3.2, wurden Zellen bis zu einer  $OD_{600}$  von 1 eingesetzt. Die Kultur wurde auf die jeweils benötigte  $OD_{600}$  eingestellt.

### 3.1.11 Plasmid-Isolierung aus Bakterienzellen

Um Plasmid-DNA aus *E. coli*s zu isolieren wurde zunächst eine *E. coli*-Flüssigkultur mit dem gewünschten Plasmid angefertigt (3.1.9). Die 5 ml-Kultur wurde zunächst bei 14.000 g pelletiert. Anschließend wurde das Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System-Kit unter folgender Durchführung verwendet. Zu dem Zell-Pellet wurden 250 µl *cell resuspension solution* zugegeben und dieses durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Dann wurden 250 µl *cell lysis solution* zugesetzt und durch viermaliges Invertieren des Eppendorf-Gefäßes vermischt. Hiermit wurden die *E. coli*-Zellen alkalisch lysiert. Anschließend wurde die Lösung wieder neutralisiert indem 350 µl *neutralization solution* zugegeben wurde und erneut durch viermaliges Invertieren des Eppendorf-Gefäßes vermischt. Ein weißer Niederschlag bildet sich, welcher vor allem aus Zellwand-Bestandteilen besteht. Dieser wurde durch Zentrifugation (10 min, 14.000 g) abgetrennt. Eine Kieselgel-Säule wurde in ein *collection tube* gesteckt und der Überstand auf die Säule gegeben. Die DNA bindet nun an die Säule und durch erneutes Zentrifugieren bei 14.000 g in einer Minute kann die Lösung entsorgt werden. Es folgen zwei Waschschriffe, zunächst mit 750 µl *wash solution*, welcher man zuvor Ethanol zugesetzt hat. Der Überstand wurde bei 14.000 g und einer Minute zentrifugiert und verworfen. Dann wurde nochmal mit 250 µl *wash solution* gewaschen. Um die Säule zu trocknen wurde dann nochmal zwei Minuten bei 14.000 g zentrifugiert, es sollte keine *wash solution* zurückbleiben. Anschließend wurde die Säule in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gesteckt, es wurden 50 µl *Aqua bidest.* auf die Säule gegeben und 2 min einwirken gelassen. Danach wurde bei 14.000 g für 1 min zentrifugiert und die Säule verworfen. Es können DNA-Konzentration und Reinheit bestimmt werden (3.1.3), und die Plasmid-DNA für Transformationen genutzt werden (3.1.6, 3.1.7, 3.1.8). Die Plasmid-DNA wurde bei 4 °C gelagert.

### 3.1.12 *E. coli*-Dauerkulturen

Um Plasmide innerhalb von *E. coli*-Zellen zu speichern, wurden Dauerkulturen erstellt. Aus diesen konnten jederzeit Plasmide isoliert werden. Dazu wurde zunächst eine *E. coli*-

Flüssigkultur über Nacht inkubiert. Von dieser wurde 1 ml abgenommen und mit 0,5 ml 80% sterilisiertem Glycerol in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß versetzt. Der Zusatz von Glycerol stabilisiert die gefrorenen Bakterien, verhindert, dass ihre Zellmembranen Schaden nehmen und hält die Zellen am Leben. Nach Mischen kann das Eppendorf-Gefäß mehrere Jahre bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 3.1.13 *S. cerevisiae*-Dauerkulturen

Um Plasmide innerhalb von *S. cerevisiae* zu speichern, wurde zunächst eine Flüssigkultur im benötigten Medium angelegt (3.1.10). Von dieser wurden dann 0,5 ml Hefesuspension mit 0,5 ml 80 % sterilisiertem Glycerol versetzt. Nach Mischen der Suspension kann diese mehrere Jahre bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 3.1.14 DNA-Sequenzierung

Um Genabschnitte auf ihre Richtigkeit zu überprüfen und Mutationen aufzudecken, wurden diese zunächst über die Polymerasekettenreaktion, PCR, vervielfältigt und nach einer Ethanol-Fällung und -Reinigung über eine Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die PCR wurde zunächst das einzusetzende Volumen  $V$  der DNA-Lösung errechnet, welches eingesetzt werden sollte. Dafür war Kenntnis über die Größe des DNA-Abschnittes in Basenpaaren (bp) nötig, sowie die Konzentration  $c$  der DNA-Lösung in  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Es wurden 55 fmol DNA eingesetzt und das Volumen  $V$  mit folgender Formel berechnet. 0,66 ist dabei der Umrechnungsfaktor von der Basenpaar-Anzahl zur Stoffmenge.

$$V = \frac{55 \text{ fmol} \cdot \text{bp} \cdot 0,66}{c \cdot 1000}$$

Für das Vorheizen der Probe im PCR-Block wurde zunächst das errechnete Volumen  $V$  in ein PCR-Eppendorf-Gefäß pipettiert und auf 9,5  $\mu\text{l}$  mit *Aqua bidest.* aufgefüllt. Nach 5 min wurde die Probe auf Eis gestellt und 1,5  $\mu\text{l}$  *primer* dazu pipettiert. Für jeden *primer* wurde ein eigener Ansatz verwendet. Dann wurden noch 2  $\mu\text{l}$  DTSC (aus dem GenomeLab DTCS-Kit) dazugegeben und zum Mischen vorsichtig auf- und abpipettiert. Dann wurde die Probe zurück in den PCR-Block gestellt und das Programm, siehe Tabelle 3.2, fortgeföhren.

## Methoden

Tabelle 3.2: PCR-Programm, welches für die Amplifikation verwendet wurde.

	Programmschritt	Temperatur	Dauer
	Deckel aufheizen	86 °C	
	Temperatur halten	86 °C	∞
	Probe vorheizen	86 °C	5 min
	Deckel aufheizen	96 °C	
	Temperatur halten	96 °C	∞
30 Zyklen	Denaturierung	96 °C	20 s
	<i>primer</i> -Hybridisierung	50 °C	20 s
	Elongation	60 °C	4 min
	Deckel abkühlen		
	Lagerung	8 °C	∞

Während der Denaturierung wird die zunächst doppelsträngig vorliegende DNA in ihre Einzelstränge getrennt. Jetzt können die *primer* an komplementäre Sequenzen binden, dieser Vorgang nennt sich auch *primer*-Hybridisierung. Danach fängt die enthaltene Polymerase an, ab dem *primer* die fehlenden Basen einzusetzen. Nach Ablauf der 30 Zyklen war genug DNA vorhanden, um diese sequenzieren zu können.

Zur Fällung und Reinigung der DNA wurde zunächst ein Mastermix für die Stopp-Lösung erstellt, siehe Tabelle 3.3. Es wurde zu jedem PCR-Produkt 5 µl Stopp-Lösung zugefügt und gründlich gemischt. Das enthaltene Natriumacetat säuert die Lösung an und hält die DNA protoniert, was zu einer Verringerung der Löslichkeit führt. Die enthaltenen Natriumionen verringern die Hydrathülle der DNA und führen zum sogenannten Aussalzen. Das Polymer Glykogen dient als Fällungshilfe.

Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Mastermix der Stopp-Lösung für eine Probe.

	pH	Konzentration	Volumen
Natriumacetat	5,2	3 M	2 µl
Di-Natrium-EDTA	8,0	100 mM	2 µl
Glycogen		20 mg · ml <sup>-1</sup>	1 µl

Der Ansatz wurde auf Eis mit 60 µl –20 °C kaltem Ethanol gemischt. Es wurde 15 min bei 13.500 rpm und 4 °C zentrifugiert, bis ein Pellet sichtbar war. Die Zugabe des reinen Ethanols führt zum Überschreiten des Löslichkeitsproduktes der DNA und zu ihrem Ausfallen. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen. Im Anschluss wurden 200 µl 70 % (V/V)

Ethanol von  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , zugegeben und vorsichtig umgeschwenkt. Dann wurde für 5 min bei 13.500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Das Pellet wurde getrocknet, indem es bei geöffnetem Deckel für mindestens 30 min in einer Vakuumzentrifuge zentrifugiert wurde, bis keine Flüssigkeit mehr zu sehen war. Im Anschluss wurde das Pellet in 30  $\mu\text{l}$  SLS (aus dem GenomeLab DTCS-Kit) resuspendiert.

Die Proben wurden von Björn Henke mit der Kapillar-Gelelektrophorese aufgetrennt und Spektren bereitgestellt, welche anschließend analysiert werden konnten.

### 3.2 Proteinchemische Methoden

#### 3.2.1 Isolierung der mikrosomalen Fraktion aus *S. cerevisiae*

Um die Expression der gewünschten Proteine und Translokation in Membranen zu überprüfen, wurde die mikrosomale Fraktion aus transformierten *S. cerevisiae*-Zellen isoliert. Dazu wurde eine 100 ml Kultur der entsprechenden Hefe auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 1 anwachsen gelassen (vgl. 3.1.10). Die Zellen wurden in einem 50 ml *falcon* bei 3000 rpm und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min lang pelletiert. Im Anschluss wurden sie einmal mit 50 ml kaltem, *Aqua bidest.* und einmal mit 10 ml kaltem Extraktionspuffer B gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets 30 min bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml Extraktionspuffer B resuspendiert und zusätzlich 0,5 g *glass beads* zugegeben. Mit den *glass beads* wurden die Zellen mechanisch aufgeschlossen. Dazu wurde ein *falcon* mindestens zehnmal für 30 s gevortext und zwischendurch für eine Minute auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden Zellbruchstücke und *glass beads* bei 1.000 g,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 5 min abgetrennt. Der Überstand wurde in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Auf das Pellet wurden erneut 0,5 ml Extraktionspuffer B gegeben und das Vortex-Schema nochmal durchgeführt. Es wurde bei denselben Bedingungen zentrifugiert und die Überstände vereint. Zentrifugation bei 1.000 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 5 min trennte grobe Zelltrümmer ab. Der Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dieses wurde dann bei 10.000 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min lang zentrifugiert. Das Pellet wurde für die weitere Analytik verwendet. Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugen-Röhrchen überführt und in der Ultrazentrifuge bei 100.000 g und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. So wurde die mikrosomale Fraktion gewonnen. Auch dieses Pellet wurde für die weitere Analytik verwendet. Die Pellets wurden in 100  $\mu\text{l}$  Puffer M für 5-10 min auf Eis solubilisiert. Dann wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford (3.2.4) bestimmt.

#### 3.2.2 Proteinisolierung nach Kushnirov

Um Proteine durch alkalische Lyse zu isolieren, wurde mit der Methode nach Kushnirov gearbeitet [85]. Es wurde auch eine zweite abgewandelte Variante dieses Aufschlusses verwendet.

## Methoden

Bei der ersten Variante wurden transformierte *S. cerevisiae*-Zellen in 5 ml SD AHLW-Medium über Nacht auf eine OD<sub>600</sub> von 1-2 anwachsen gelassen. Die Zellen wurden bei 2.500 rpm und 4 °C in 5 min pelletiert und der Überstand verworfen. Sie wurden einmal mit 5 ml *Aqua bidest.* gewaschen und der Überstand entfernt. Die Zellen wurde in 100 µl *Aqua bidest.* und 100 µl 0,2 M NaOH resuspendiert. Nach 5 min Inkubation wurde erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Probe konnte nun mit 50 µl einfachem SDS versetzt, 3 min gekocht und zentrifugiert werden. 6 µl des Überstandes konnten nun in der Gelelektrophorese verwendet werden (siehe 3.2.5).

Für die zweite Variante wurde eine 100 ml Kultur über Nacht auf eine OD<sub>600</sub> von 1 anwachsen lassen. Diese wurde bei 4.000 g und 4 °C in 5 min pelletiert und einmal mit 50 ml *Aqua bidest.*, einmal mit 10 ml Extraktionspuffer B gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das *S. cerevisiae*-Zellpellet 30 min bei –80 °C gelagert. Im Anschluss wurde es mit 250 µl *Aqua bidest.* und 250 µl 0,2 N NaOH resuspendiert und nach 5 min zentrifugiert (1.000 g, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde bei 10.000 g und 4 °C in 5 min zentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration konnten die Extrakte mit SDS versetzt und in der SDS-PAGE verwendet werden, (3.2.5).

### 3.2.3 Proteinisolierung mit einem Dounce-Homogenisator

Um Proteine mit einem Dounce-Homogenisator aus transformierten *S. cerevisiae*-Zellen zu isolieren wurde zunächst eine 100 ml Kultur über Nacht auf eine OD<sub>600</sub> von 1 wachsen gelassen. Die Zellen wurden bei 4.000 g und 4 °C in 5 min pelletiert und einmal mit 50 ml *Aqua bidest.*, einmal mit 10 ml Extraktionspuffer B gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet 30 min bei –80 °C gelagert und anschließend mit 0,5 ml Extraktionspuffer B resuspendiert. Dann wurde die Suspension in den Dounce-Homogenisator überführt. Der Stößel des Dounce-Homogenisators wurde in ein IKA Rührwerk eingespannt und 7 min bei Stufe 8 laufengelassen. Der Dounce-Homogenisator wurde währenddessen mit Eis gekühlt und auf und ab bewegt. Im Anschluss wurde einmal bei 1.000 g und dieser Überstand bei 10.000 g jeweils bei 4 °C und für 5 min zentrifugiert. Jedes Pellet wurde danach mit 100 µl Puffer M resuspendiert und der Gesamtproteingehalt mittels Bradford (3.2.4), bestimmt. Die Proben wurden dann mit SDS versetzt und in der SDS-PAGE (3.2.5) verwendet.

### 3.2.4 Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Proteinkonzentration muss bestimmt werden, um den gleichen Gesamtproteingehalt jeder Probe in den Geltaschen zu gewährleisten. Hierzu wurde das Bio-Rad Protein Assay Kit verwendet. Alle Lösungen konnten direkt in Plastik-Küvetten hergestellt werden. Es wurde zunächst ein *blank* angefertigt aus 200 µl Bradford-Reagenz und 800 µl Puffer M. Für die Proben



## Methoden

wurden ebenfalls 200 µl Bradford-Reagenz und zusätzlich 0,8-8 µl Proteinsuspension aus der Isolierung verwendet. Die Proteinsuspension wurde gemäß Lambert-Beerschem-Gesetz in Puffer M auf ein Gesamtvolumen von 800 µl verdünnt.

Alle Lösungen wurden nach 5 Minuten Inkubationszeit bei 595 nm am Biophotometer vermessen. Das Bradford-Reagenz zeigt ohne Protein eine rote Farbe mit einem Absorptionsmaximum bei 470 nm. Bei Anwesenheit von Protein bindet es an die kationischen und unpolaren Seitenketten der Proteine und bildet einen blauen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 595 nm. Unter Berücksichtigung der Verdünnung kann der Proteingehalt anhand einer Kalibriergerade berechnet werden. Die Absorption sollte im kalibrierten Bereich liegen.

### 3.2.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Um Proteine ihrer Größe nach zu trennen und im Anschluss zu detektieren wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, kurz SDS-PAGE, durchgeführt.

Die Proben wurden – sofern nicht anders angegeben – vor der Verwendung 1:3 mit vierfachem SDS-Ladepuffer versetzt und 30 min lang bei 37 °C inkubiert. Die Proben konnten dann bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden. Das SDS denaturiert die Proteine und sorgt dafür, dass diese nach außen hin alle negativ geladen sind. So ist eine Auftrennung der Größe nach überhaupt möglich.

Die Gele wurden in der Zusammensetzung aus Tabelle 3.4 in einem kleinen Becherglas zusammengegeben.

Tabelle 3.4: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel jeweils für 2 Gele

	Trenngel	Sammelgel
	12,5 %	5 %
<i>Aqua bidest.</i> in ml	5,25	2,4
4x Trenngelpuffer in ml	3	
4x Sammelgelpuffer in ml		1
Rotiphorese 40 in ml	3,75	0,6
TEMED in µl	10	6
APS in µl	80	25

Rotiphorese 40 enthält Acrylamid und Bisacrylamid, ersteres wird durch freie Radikale polymerisiert, letzteres sorgt für die nötigen Quervernetzungen. In der SDS-PAGE ist APS die Quelle für freie Radikale, während TEMED diese stabilisiert.

Die Proben wurden kurz abzentrifugiert und benötigte Volumina des Überstandes in die Taschen pipettiert. Die Volumina wurden berechnet durch die mit Bradford (3.2.4) bestimmten

Gesamtproteingehalte. Für einen Vergleich der Expressionslevel sollte von jeder Expressionsprobe der gleiche Gesamtproteingehalt verwendet werden, optimal waren 20 bis 30 µg Gesamtprotein. Um die Größen der getrennten Fragmente bewerten zu können, wurden 3 µl des Protein-Größen-Marker pEqGOLD Protein Marker III eingesetzt.

Eine Spannung von 160 V wurde für 10 bis 15 min während der Sammelphase, gefolgt von 200 V für ca. eine Stunde zum Trennen der Proben angelegt. Durch das Anlegen der Spannung wandern die durch das SDS negative geladenen, denaturierten Proteine von der Kathode zur Anode. Kleine Proteine wandern schneller durch die Poren des Gels als große. Anhand des Größenmarkers lässt sich dann eine genauere Aussage über die Größe des Proteins treffen. Das Gel wurde im Anschluss entweder im Western Blot (3.2.6) verwendet oder mit Coomassie (3.2.7) gefärbt.

### 3.2.6 Western Blot

Zur sensitiven Detektion von spezifischen Proteinen wurde das Western Blot-Verfahren in einer *Semi-Dry*-Apparatur verwendet. Zuvor in Gelen nach der Größe getrennte Proteine (3.2.5) wurden hierbei auf eine PVDF-Membran übertragen. Pro Gel wurden dazu 6 Whatman-Papiere und eine PVDF-Membran eingesetzt. Die Membran wurde zunächst in Methanol für 20 bis 60 s eingelegt, um sie zu aktivieren, das heißt die Hydratisierbarkeit zu erhöhen. Im Anschluss wurde sie dann mit den Whatman-Papieren für 5 min in Transferpuffer gelagert. In Abbildung 3.1 ist der Aufbau des Blot-Sandwich dargestellt. Es wurde eine Spannung von 17 V für eine Stunde angelegt. Erneut wandern die negativ geladenen Proteine von der Kathode zur Anode und somit vom Gel auf die PVDF-Membran.

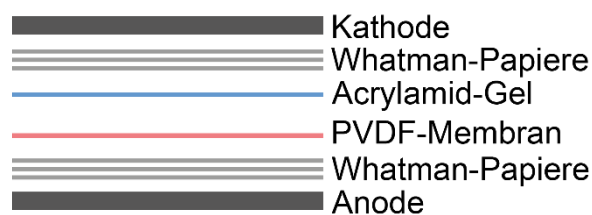


Abbildung 3.1: Aufbau des Blot-Sandwich. Erstellt mit Adobe Illustrator

Anschließend wurden die freien Bindestellen auf der Membran geblockt, durch Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur in 20 ml 3 % M-TBST. Zwei verschiedene Antikörper wurden in dieser Arbeit als Erst-Antikörper verwendet, einer gegen einen fünffach Histidin *tag* und einer gegen einen Hämagglutinin *tag*. Alle verwendeten Proteine waren mit beiden *tags* versehen. Nach Entfernen des M-TBST wurde die PVDF-Membran mit 10 ml frischem M-TBST versetzt, welches den Erst-Antikörper in der benötigten Verdünnung enthielt. Es wurde unter konstantem Schütteln über Nacht bei 4 °C inkubiert, während der Primär-Antikörper an sein Epitop

bindet. Im Folgenden wurde der Antikörper entfernt und die PVDF-Membran sechsmal mit ca. 10 ml TBST gewaschen, dreimal davon kurz, dreimal für 15 Minuten. Im Anschluss wurden 10 ml 3 % M-TBST mit dem Sekundär-Antikörper zur PVDF-Membran gegeben. Nun bindet der Sekundär-Antikörper an den Primär-Antikörper, verstärkt damit das Signal und macht durch die an ihn gekoppelte Meerrettich-Peroxidase eine Detektion mit Luminol möglich. Nach Inkubation von einer Stunde bei Raumtemperatur unter konstantem Schütteln, wurde die Membran wieder dreimal kurz und dreimal für 15 Minuten mit 10 ml TBST gewaschen.

Zur Detektion wurde das ECL-Reagenz frisch gemischt, dabei wurden ECL 1 und ECL 2 in gleichen Teilen zusammengegeben. Diese enthalten einerseits ein Peroxid, sowie andererseits Luminol. Mit einer Pipette wurde die Lösung auf der Membran verteilt, sodass alle Stellen, an welche der Zweit-Antikörper gebunden hatte, damit benetzt wurden. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation der Luminol-Dianionen durch Peroxide, dabei wird blaues Licht emittiert. Dann wurde die Membran im Lumi-Imager unter Lichtausschluss und einer langen Belichtungszeit fotografiert. Es wurde auch eine Aufnahme unter Lichteinstrahlung gemacht, um die Markerbanden sichtbar zu machen. Beide Fotos konnten später in Photoshop übereinandergelegt werden. Um die Gesamtmenge an aufgetragenem Protein auf der Membran zu überprüfen kann diese noch mit Ponceau S gefärbt werden (3.2.8).

### 3.2.7 Proteinfärbung mit Coomassie Brilliant Blau

Zur Überprüfung der Gesamtmenge an aufgetragenem Protein im Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blau gearbeitet, welches sich an basische Seitenketten von Aminosäuren anlagert und deshalb zu einer unspezifischen Färbung führt. Das nach der SDS-PAGE (3.2.5) erhaltene Gel wurde unter Schütteln für eine Stunde mit Färber-Lösung behandelt. Dann wurde es zweimal mit Wasser gewaschen und im Anschluss mit Entfärber-Lösung versetzt, welche alle 15 min ausgetauscht wurde. Nach einer weiteren Stunde wurde noch 10 bis 20 min mit Wasser entfärbt und das Gel dann fotografiert.

### 3.2.8 Proteinfärbung mit Ponceau S

Bereits mit Antikörper versetzte Membranen konnten im Anschluss, um die Gesamtmenge an aufgetragenem Protein zu überprüfen, mit Ponceau S Lösung angefärbt werden. Dazu wurden 1 ml Ponceau S Lösung und 9 ml *Aqua bidest.* zu der Membran gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die überschüssige Farbe mit *Aqua bidest.* abgewaschen und eine Fotografie aufgenommen.

### 3.3 Methoden zur Testung von Inhibitoren

#### 3.3.1 Biophysikalischer Assay

Der biophysikalische Assay wurde einerseits verwendet, um  $IC_{50}$ -Werte von Inhibitoren, sowie die zeitabhängige L-Laktataufnahme der FNT der humanpathogenen Plasmodien zu bestimmen. Für beides wurde eine *S. cerevisiae*-Kultur, welche mit dem zu untersuchenden Genabschnitt transformiert war, in SD AHLW auf eine  $OD_{600}$  von 1 anwachsen gelassen. 200 ml Kultur reichten für ca. 50 Proben. Die Hefezellen wurden in einem 50 ml *falcon* pelletiert und einmal mit 50 ml *Aqua bidest.* gewaschen. Dann wurden die Hefezellen noch mindestens 30 min auf Eis gelagert, um ihre Teilungsrate herabzusetzen. Direkt vor der Messung wurden sie mit HT-Puffer versetzt und eine  $OD_{600}$  von  $50 \pm 5$  eingestellt. Bei jeder Messung wurden 80  $\mu$ l Hefesuspension verwendet, sowie 20  $\mu$ l radiomarkierte Substratlösung. Die Substratlösung wies eine Natrium-L-Laktat-Konzentration von 5 mM, sowie eine Aktivität an aktivem Natrium-L-Laktat von 0,04  $\mu$ Ci pro Probe auf. Zur Ermittlung der maximalen Aktivität wurden 3 zusätzliche Ansätze hergestellt.

Bei Inkubation der Hefesuspension mit hemmenden Konzentrationen des Inhibitors kommt es zu einer Hemmung des FNTs und somit zu verringerten L-Laktat-Transport gegenüber nicht-inhibierten FNTs. Durch Zugabe der L-Laktatlösung wird ohne Inhibitor und bei nicht-hemmenden Inhibitorkonzentrationen L-Laktat durch den FNT transportiert. Dadurch gelangt radiomarkiertes L-Laktat in die Hefezelle. Bei hemmenden Inhibitorkonzentrationen kann L-Laktat nicht durch den Transporter transportiert werden, es gelangt also kein oder weniger L-Laktat in die Hefezelle.

##### 3.3.1.1 Einzelfilter-Assay

Für eine  $IC_{50}$ -Bestimmung wurde der Inhibitor, wenn möglich in DMSO ansonsten in Wasser gelöst, vorgelegt. Die DMSO-Konzentration lag bei 1 %. Von jeder zu testenden Inhibitor-Konzentration wurden idealerweise drei biologische aus drei technischen Replikaten, also neun Werte aufgenommen. Die Hefesuspension wurde 10 bis 15 min mit dem Inhibitor bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 30 s mit Substratlösung versetzt. Die Aufnahme wurde mit 1 ml eiskaltem *Aqua bidest.* abgestoppt, alles auf einen *glass microfiber* Filter gegeben und nochmal mit 7 ml eiskaltem *Aqua bidest.* gewaschen. Jeder Filter wurde dann in ein Scintillationsvial gegeben, welches mit 3 ml Scintillationscocktail befüllt war. Die Hefezellen wurden vom Scintillationscocktail über Nacht aufgelöst. Die Zugabe von Scintillationscocktail wandelt dabei auch die radioaktiven Zerfälle in Lichtsignale um. Im TRI-CARB Counter wurden diese als *counts per minute* ausgezählt. Von allen Messwerten wurden die Werte der Leerhefe abgezogen. Die Werte wurden dann auf die nur mit DMSO versetzte 100 %-Kontrolle bezogen und

damit normiert. Um von den *counts* auf die Aktivität zu kommen wird mit der Molarität an eingesetztem L-Laktat multipliziert, sowie durch die vorliegende Hefemasse dividiert.

Bei der Bestimmung der Zeitabhängigkeit des L-Laktat-Transportes wurden analog den Inhibitorstudien für jeden Zeitpunkt neun Werte aufgenommen. Die Hefesuspension wurde 10 bis 15 min auf Raumtemperatur gebracht. Dann wurde jede Probe mit der Substratlösung versetzt und für unterschiedlich lange Zeiten inkubiert. Es wurden Werte bei 20 bzw. 30 s aufgenommen, sowie bei 1, 2, 4 und 8 min. Dann wurde wie oben beschrieben verfahren.

### 3.3.1.2 Filterplatten Assay

Der Filterplatten Assay kann bei sehr großen Probenzahlen als Alternative eingesetzt werden. Er wurde aus dem bekannten Assay von Dr. Holger Eler und mir übertragen. Die zeitintensive Optimierung wurde federführend von Jana Schmidt durchgeführt.

Bei der Verwendung des Filterplatten Assays wurde ähnlich verfahren wie bei den Einzelfiltern. Nur Änderungen sind hier angegeben. Die verwendeten Pipetten waren immer 8-Kanal-Pipetten, jeder Pipettierschritt wurde also für 8 Proben gleichzeitig durchgeführt. Aufwärmen sowie die Inhibitorinkubation erfolge in einer separaten 96-*well*-Platte. Es wurden 100 µl auf der separaten Platte vorgelegt. Nach Ende der Substratinkubationszeit wurde die Filter-Platte abgesaugt und dreimal direkt hintereinander mit 200 µl eiskaltem *Aqua bidest.* gespült. Die Bestimmung der maximalen Aktivität erfolgte separat in einer klaren 96-*well*-Platte. Es wurden je *well* 200 µl Microscint-20 Scintillationscocktail zugegeben und ebenfalls über Nacht inkubiert. Die Filterplatten wurde dann im MicroBeta Trilux Counter ausgezählt.

### 3.3.2 Phänotypischer Resazurin-Assay

Um eine große Anzahl an Substanzen auf ihre Hemmwirkung hin zu untersuchen wurde mit einem Phänotypischen Assay gearbeitet. Dieser Assay wurde im Laufe der Arbeit entwickelt und immer weiter optimiert, siehe dazu Kapitel 4.1. Hier ist die endgültige Fassung der Durchführung angegeben. In diesem Wachstums-Resazurin-Assay wurde ausgenutzt, dass *S. cerevisiae* in der Lage ist, mit L-Laktat als einziger Kohlenstoffquelle Energie zu gewinnen. Die *S. cerevisiae*-Zellen wurden in 1 % L-Laktatmedium angesetzt, wie in 3.1.10 beschrieben.

Für eine Messung wurden je *well* 300 µl Zellsuspension benötigt, für eine 96-*well* Platte also 30 ml. Die mit FNT transformierten *S. cerevisiae*-Zellen haben in L-Laktatmedium eine hohe Generationszeit (vgl. Kapitel 4.3.2). Da über Nacht kaum Wachstum stattfand, wurde die für den Assay benötigte Zelldichte am Abend vorher eingestellt. Am Messtag wurden die *S. cerevisiae*-Zellen dann mit L-Laktatmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0,01 eingestellt und mit 0,03 mg · ml<sup>-1</sup> Resazurin versetzt.

## Methoden

Die 96-*well*-Platten wurden mit zwei verschiedenen Schemata verwendet, siehe Abbildung 3.2. Für das TCAMS-Screening wurde Plattenlayout A verwendet, für die IC<sub>50</sub>-Bestimmung wurde Plattenlayout B verwendet.

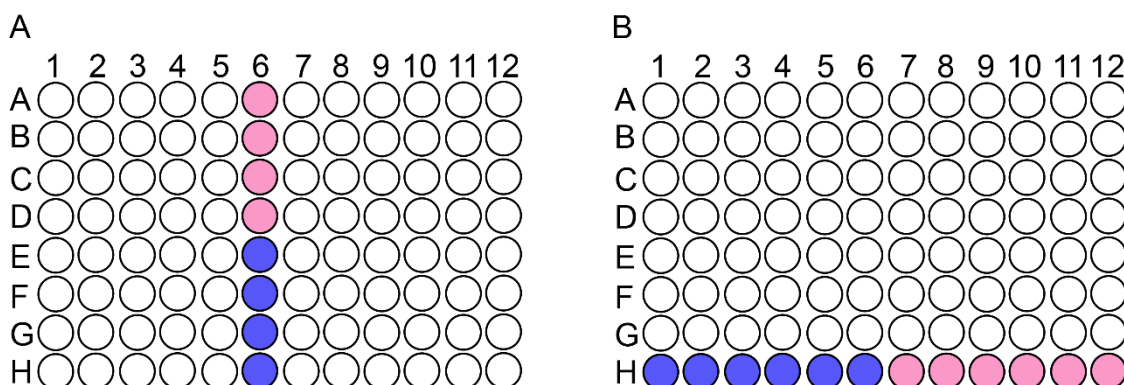


Abbildung 3.2: Plattenlayout des Wachstums-Resazurin-Assay. ● steht für Positivkontrollen mit BH-296, ● steht für Negativkontrollen mit DMSO. Layout A wurde für das TCAMS-Screening verwendet. In den ungefärbten *wells* befinden sich die Screening-Substanzen jeweils in der Konzentration 10 µM. Layout B wurde für die IC<sub>50</sub>-Bestimmung verwendet. Hier ist in Reihe A die höchste Konzentration der jeweiligen Substanz, abnehmend bis Reihe G. In den Spalten 1 bis 12 sind unterschiedliche Substanzen.

Für das TCAMS-Screening war 3 µl jeder von GSK bereitgestellten Substanzen in eine neue 96-*well* Platte überführt worden. Die Endkonzentration betrug 10 µM. Für die IC<sub>50</sub>-Bestimmung wurde ebenfalls je *well* 3 µl der entsprechenden Substanz und Konzentration vorgelegt.

Um eine Messung zu starten, wurde die entsprechend verdünnte *S. cerevisiae*-Suspension mit einer 8-Kanal-Pipette in die vorbereiteten 96-*well* Platten pipettiert. Einzelne Platten wurden mit Parafilm abgedichtet und inkubiert. Bei Durchführung mit vielen Platten wurden diese nach dem Abdichten übereinandergestapelt. Stapel von bis zu 10 Platten wurden eingesetzt, jeder Stapel fest mit Klebeband umwickelt, um Abrieb der Platten aneinander zu vermeiden. Die Platten bzw. Platten-Stapel wurden dann bei 29 °C und 500 rpm inkubiert. Nach 72 h wurden die Platten im TCAMS-Screening bei einer Absorption von 620 nm vermessen, für die IC<sub>50</sub>-Bestimmung nacheinander bei 620 nm und bei 595 nm, hier wurde im Anschluss die Differenz der Messwerte gebildet, vgl. Kapitel 4.1.11.

Jede Platte wurde nach dem Messen nochmal auf die Plausibilität der Messergebnisse überprüft. Bei allen hohen Messwerten wurde nochmal optisch geprüft, ob hier tatsächlich keine Reduktion stattgefunden hatte. *Wells*, die ein sehr starkes Wachstum zeigten und durch die Trübung ein hohes Signal aufwiesen, wurden aus der Wertung genommen. Ebenso *wells* bei denen eine Ablagerung im Messbereich zu dem hohen Signal geführt hatte.

Die Messwerte wurden dann bei jeder 96-*well* Platte auf ihre jeweiligen Kontrollen bezogen. Der Mittelwert der Negativkontrolle (Wachstum, keine Hemmung) wurde von jedem Messwert

abgezogen. Die Positivkontrolle (kein Wachstum, Hemmung) wurde als 100 %-Wert gesetzt und alle Messwerte in Bezug darauf normiert.

### 3.3.3 Phänotypischer Assay mit Trübungsmessung

Es wurden Wachstumskurven der transformierten *S. cerevisiae*-Zellen mit den verschiedenen FNTs der humanpathogenen Plasmodien aufgenommen. Als Temperatur wurden 29 °C gewählt. Das Messintervall wurde bei Messungen bis 72 h auf 30 min gestellt, bei Messungen bis 144 h auf 1 h. Es wurde mit einem ein Breitbandfilter (420 – 580 nm) gemessen. Bei einigen Messungen mit Resazurin wurde ein Filter mit 600 nm verwendet. Hier wurde wie schon in 3.3.2 beschrieben, ebenfalls mit einer  $OD_{600}$  von 0,01 je *well* in 1 % L-Laktat-Medium gestartet, wobei einige Versuchen mit Resazurin durchgeführt wurden. Es wurde ein 100-*well* Plattenformat verwendet, welches je nach Versuch ein anderes Layout aufwies.

Die Messwerte wurden normiert indem von den Werten von Wachstumskurven ohne Resazurin jeweils der Wert  $t_0$  abgezogen wurde. Bei Kurven, die mit Resazurin aufgenommen wurden, wurde von jedem Messwert der Wert bei  $t_{\text{Ende}}$  abgezogen.

Ausgewertet wurden die Daten durch Berechnung der *area under the curve* (AUC) aus den Messwerten, aber auch die aufgetragenen Messwerte über die Zeit wurden für Aussagen über das Wachstumsverhalten herangezogen.

## 3.4 Datenanalyse Methoden

Für die Analyse der Daten wurden diese zunächst in Microsoft Excel 365 Version 1911 eingetragen und Berechnungen durchgeführt. Im Anschluss wurden die Daten mit GraphPad Prism 8.3.0 graphisch dargestellt und Berechnungen wie eine AUC, sowie statistische Auswertungen vorgenommen.

Bei allen Berechnungen mit GraphPad Prism 8.3.0 wurde ein Ausreißertest durchgeführt und Ausreißer verworfen. Der Ausreißertest wurde nach der ROUT-Methode durchgeführt [86]. Diese arbeitet über die *false discovery rate* (FDR), wobei man die verwendete Wahrscheinlichkeit  $Q$  festlegt. Es wurde immer mit einem  $Q = 1\%$  gearbeitet.

## Methoden



## 4 Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse beschrieben. Zunächst erfolgt die Methodenentwicklung mit allen getesteten Parametern. Im Anschluss werden die Ergebnisse des Screenings dargestellt. Danach folgt alles, was die Ähnlichkeiten und Unterschiede der FNTs humanpathogener Plasmodien betrifft. Im Anschluss befinden sich die Ergebnisse zu den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zur Resistenzumgehung.

### 4.1 Methodenentwicklung des Wachstums-Resazurin-Assays

Um möglichst viele Substanzen gleichzeitig auf ihre Hemmwirkung des FNT testen zu können, wurde ein hefebasierter Wachstums-Assay entwickelt. Dieser basiert auf einer im Arbeitskreis schon bekannten Methode nach Wu *et al.* von 2015 [16]. Zunächst wurde getestet, was die optimale Zusammensetzung des Mediums war, um das größtmögliche Wachstum zu erzielen. Zur Erhöhung des Signal-Rausch-Verhältnisses, um verlässliche Ergebnisse zu bekommen, wurde mit dem Zellviabilitätsmarker Resazurin, auch bekannt als AlamarBlue, gearbeitet [87]. Resazurin wird in der *S. cerevisiae*-Zelle durch  $\text{NADH} + \text{H}^+$  reduziert zu Resorufin [88], siehe auch Abbildung 4.1.

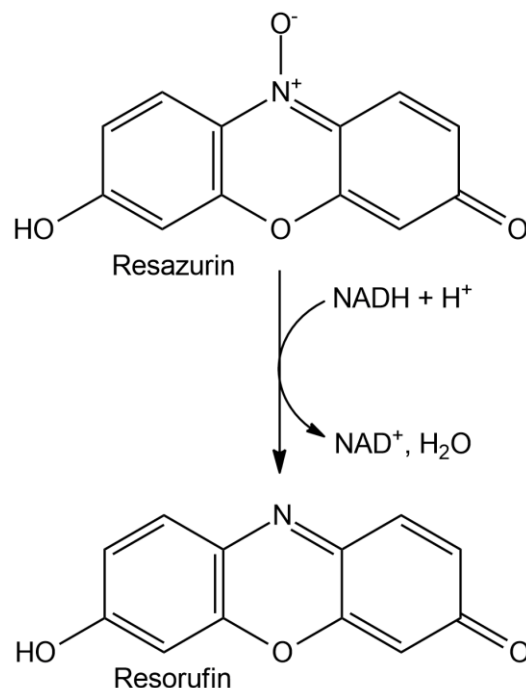


Abbildung 4.1: Umsetzung von Resazurin zu Resorufin. Erstellt mit ChemDraw.

Die zu testenden Bestandteile des Mediums waren die L-Laktatkonzentration (4.1.2) und der pH-Wert (4.1.2), sowie die initiale Optische Dichte an einzusetzender Zellmasse (4.1.4) und die Resazurin-Konzentration (4.1.5). Außerdem wurde der Einfluss einer Trübung, zum Beispiel

durch Zellwachstum, auf den Messwert getestet (4.1.3). Erst dann wurde an den weiteren Assay-Bedingungen gearbeitet. Dazu wurden geeignete Kontrollen ausgewählt (0) sowie das Gesamtvolumen eines *wells* im Assay festgelegt (4.1.7). Später wurde die Assaydauer (4.1.8) getestet, ob die 96-*well* Platten geschüttelt werden sollten (4.1.9) und wie eine Kreuz-Kontamination von *well* zu *well* verhindert werden konnte (4.1.10). Letztendlich wurden noch eine Direktmessung mit einer Differenzmessung verglichen (4.1.11) und die Linearität und Empfindlichkeit des Assay (4.1.12) bestimmt. Eine Zusammenfassung aller getesteten und ausgewählten Parameter befindet sich in Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2, welche in Kapitel 4.1.13 zu finden sind.

#### 4.1.1 L-Laktatkonzentration

Zuerst wurde die L-Laktatkonzentration bestimmt, bei welcher das höchste Zellwachstum erreicht werden konnte. Es wurden verschiedene L-Laktatkonzentrationen getestet. Dabei wurde ein Bereich um zwei bekannte Konzentrationen herum abgedeckt. Die eine ist 0,25 % [16] und die andere 2 %, welche der Glukosekonzentration in SD Medium entspricht. Die genauen getesteten Konzentrationen waren 0,1 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 %, 1,5 % und 2 %. Das L-Laktatmedium wurde wie in 2.8.1 beschrieben hergestellt, nur mit unterschiedlichen L-Laktateinwaagen und ohne Resazurin. Dieser Versuch wurde zum einen in Reagenzgläsern durchgeführt und zum anderen mit 100-*well honeycomb* Platten im Bioscreen. Im Reagenzglas wurde jeweils eine Einfachbestimmung durchgeführt, im Bioscreen wurden je Konzentration 10 *wells* mit

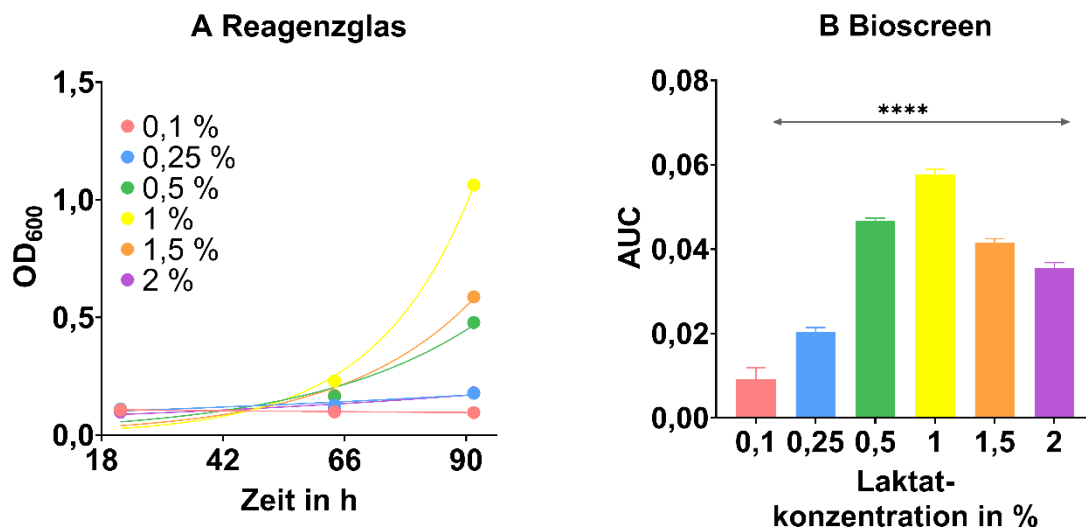


Abbildung 4.2: Testung unterschiedlicher L-Laktatkonzentrationen, um das größtmögliche Wachstum zu erzielen. (A) zeigt das Ergebnis im Reagenzglas, hier ist die gemessene OD<sub>600</sub> gegen die Zeit in h aufgetragen. (B) zeigt das Ergebnis im Bioscreen. Aufgetragen sind die errechnete AUC gegen die L-Laktatkonzentration in %. Ein *one-way ANOVA* stellte einen signifikanten Unterschied zwischen allen eingesetzten L-Laktatkonzentrationen fest ( $P < 0,0001$ ). Assaydauer 72 h. N = 1 mit 10 *wells* je Konzentration bei (B); Fehler stellen StA dar.

## Ergebnisse

300 µl befüllt. Bei beiden Versuchen wurde eine Start-OD von 0,1 eingestellt. Im Reagenzglas wurde nach ca. 22 h, nach 64 h und nach ca. 92 h die OD<sub>600</sub> am Biophotometer gemessen.

Im Bioscreen wurde eine Laufzeit über 72 h gewählt und ein Messintervall von 30 min eingestellt. In Abbildung 4.2 zeigt sich, dass sowohl bei dem Versuch im Reagenzglas als auch im Bioscreen eine L-Laktatkonzentration von 1 % das größtmögliche Wachstum erzielte. Es wurde eine weitere Messung vorgenommen, welche in 96-well Platten den Einfluss der L-Laktatkonzentration auf ungehemmte und gehemmte PffNT exprimierende *S. cerevisiae*-Zellen testen sollte. Diese Platten wurden ohne Schütteln und ohne Resazurin 72 h bei 29 °C inkubiert. Der eingesetzte Hemmstoff war BH-296 in einer Konzentration von 100 µM.

In Abbildung 4.3 zeigt sich zwar ein signifikanter Unterschied zwischen den gehemmten und den ungehemmten Zellen, jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den getesteten L-Laktatkonzentrationen. Aufgrund des niedrigen Signal-Rausch-Verhältnisses von nur 1,0 bis 1,5 wurde im späteren Verlauf eine Messung ohne Schütteln der Zellen und ohne Resazurin nicht mehr durchgeführt. Ein so niedriges Signal-Rausch-Verhältnis könnte zu Problem bei der Erkennung eines Signales führen [89]. In allen weiteren Versuchen wurde deshalb mit einer L-Laktatkonzentration von 1 % gearbeitet.

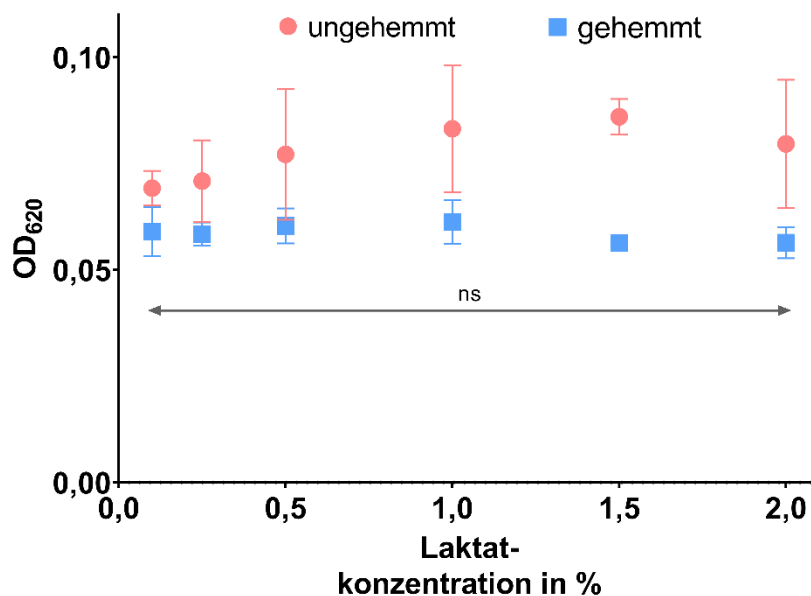


Abbildung 4.3: Testung der L-Laktatkonzentration im 96-well Assay. Die Optische Dichte bei 620 nm ist gegen die L-Laktatkonzentration in % aufgetragen. Es besteht hier kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen L-Laktatkonzentrationen. Das Signifikanzniveau zwischen den ungehemmten und den gehemmten Zellen liegt bei  $P=0,0006$ . Assaydauer 72 h. ns = nicht signifikant.  $N = 1$  mit 8 wells je Konzentration; Fehler stellen StA dar.

## Ergebnisse

### 4.1.2 pH-Wert

Es wurde der für den Assay optimale pH-Wert experimentell bestimmt. Dies wurde zunächst ohne Resazurin durchgeführt, um den pH-Wert ausfindig zu machen, welcher zum besten Wachstum der PfFNT exprimierenden Hefezellen führte. Im Anschluss wurde dieser Test nochmal mit Resazurin durchgeführt, da dieses pH-abhängig unterschiedliche Färbungen aufweist (vgl. Abbildung 4.4). Auch sollte hier das pH-Optimum für die Messung gefunden werden.



Abbildung 4.4: Färbung von Resazurin je nach pH-Wert. [Bildquelle: eigenes Foto]

Beide Messungen wurden mit dem Bioscreen mit den Methodenparametern von 29 °C und 45 h Laufzeit durchgeführt (siehe 3.3.2). Bei der ersten Messung, welche das reine Wachstum zeigen sollte, wurde mit einem Breitband-Filter gearbeitet, welcher den Wellenlängenbereich

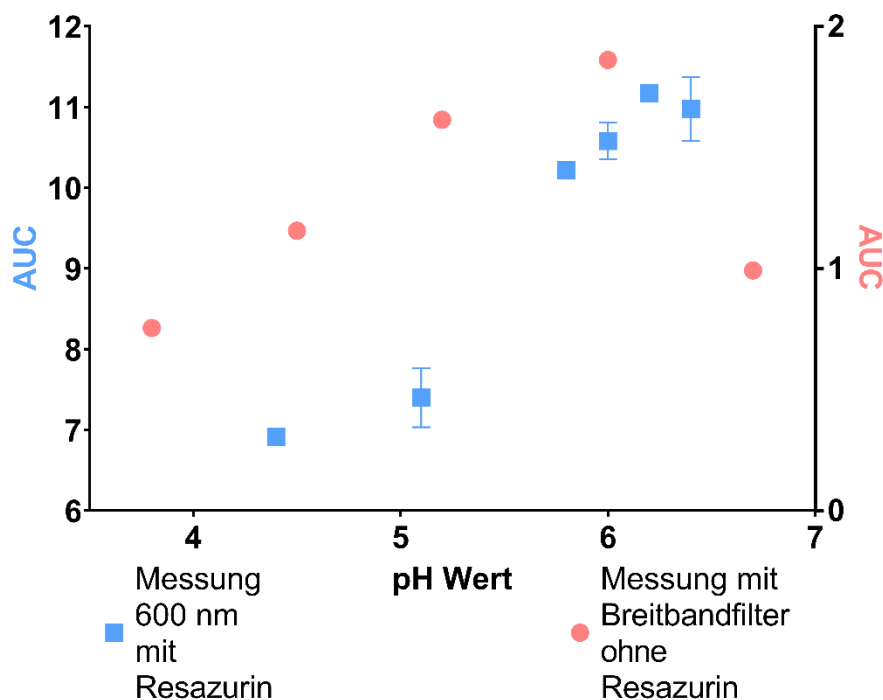


Abbildung 4.5: Abhängigkeit des Signals vom pH-Wert. ■ zeigt die Messung bei 600 nm mit Resazurin auf der linken y-Achse. ● zeigt die Messung mit dem Breitbandfilter ohne Resazurin auf der rechten y-Achsen. Assaydauer: 45 h. N = 1 mit 5-10 wells je pH-Wert; Fehler stellen StA dar.

von 420 – 580 nm durchließ. Dieser Filter wurde früher schon im Arbeitskreis für genau diese Messung eingesetzt. Hier zeigte sich ein pH-Wert von 6,0 als am besten geeignet, siehe Abbildung 4.5. Die zweite Messung mit Resazurin wurde mit einem 600 nm Filter durchgeführt. Das

Medium mit dem pH-Wert von 6,2 zeigte hier das beste Ergebnis. Im Folgenden wurde dann ein pH-Wert von 6,0-6,1 verwendet.

#### 4.1.3 Einfluss der Trübung auf das Signal

Um Zellzahlen zu bestimmen wird häufig die Optische Dichte gemessen [90]. Der Hintergrund ist, dass Teilchen in einem Lösungsmittel Licht in alle Richtungen streuen und so das Signal vermindern. Da bei 600 nm kaum andere Strukturen eine Absorption zeigen, wird diese Absorptionswellenlänge für eine Messung der Optischen Dichte verwendet. Resazurin als Zellviabilitätsmarker wird durch Zellwachstum reduziert zu Resorufin (vgl. Abbildung 4.1). Während Resazurin violett gefärbt ist und ein Absorptionsmaximum bei 600 nm zeigt, ist Resorufin rosa gefärbt und hat ein Absorptionsmaximum bei 572 nm, vgl. Abbildung 4.6 [91]. Das Absorptionsmaximum von Resazurin liegt sehr nahe bei 600 nm und so lag die Vermutung nahe, dass die Trübung einer Lösung einen Einfluss auf das Messsignal haben könnte. Um dies zu überprüfen wurden sowohl Resazurin als auch Resorufin mit unterschiedlichen Zellzahlen versetzt und gemessen.

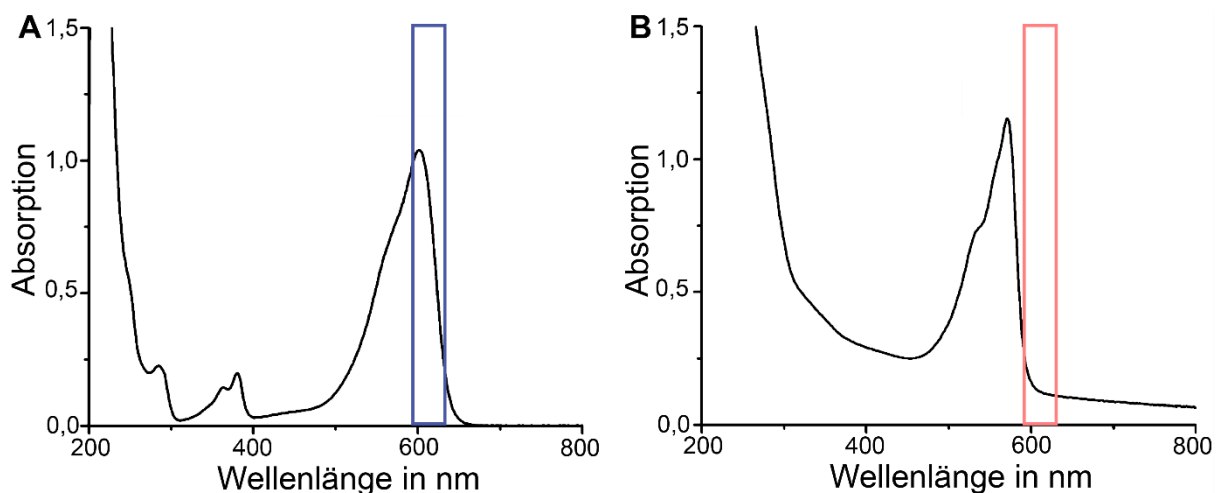


Abbildung 4.6: Absorptionsspektrum von Resazurin (A) und Resorufin (B). Der Wellenlängenbereich zwischen der Messwellenlänge 620 nm und 595 nm ist blau und rosa eingerahmt. Modifiziert nach Neufeld *et al.* [91]

Sowohl bei Resazurin als auch bei Resorufin zeigte sich ein Effekt, welcher aber unterschiedliche Ursachen hat. Resazurin wird bei großen Zellzahlen schnell reduziert und das Signal sinkt ab, siehe Abbildung 4.7. Bei der höchsten eingesetzten Optischen Dichte von 0,52 hatte schon nach 10 Minuten eine komplette Reduktion zum Resorufin stattgefunden. Hier ist das Resazurin-Signal an sich also niedriger, weil eine Reduktion stattgefunden hat. Durch die hohe Zellzahl ist die Absorption allerdings auch schon relativ hoch. Die Optische Dichte spielt also bei Resazurin in dem verwendeten Bereich nur eine untergeordnete Rolle, da die Eigenabsorption hoch genug ist. Dennoch zeigten alle Optischen Dichten miteinander verglichen einen

## Ergebnisse

signifikanten Unterschied im Signal von  $P < 0,001$  (die einzige Ausnahme bildet hier der Unterschied zwischen OD 0,10 und OD 0,13 mit  $P = 0,014$ ).

Bei Resorufin dagegen, welches mit 100 mM Natriumascorbat reduziert wurde, steigt das Messsignal an, da hier die Trübung zu einem Anstieg der Absorption führt. Die Eigenabsorption von Resorufin ist bei 620 nm zu gering und wird deshalb von der Optischen Dichte beeinflusst. Hier zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen den weit auseinanderliegenden Optischen Dichte ( $P < 0,0001$ ), während direkt benachbarte Optische Dichten keine, bzw. niedrige Signifikanz zeigen ( $P > 0,0192$ ). Das Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  wurde gewählt. Für die Optische Dichte 0,52 zeigten sich sowohl bei Resazurin als auch bei Resorufin fast identische Werte. Dies liegt daran, dass bei beiden Resazurin reduziert ist und nur die Optische Dichte an sich für das Signal verantwortlich ist.

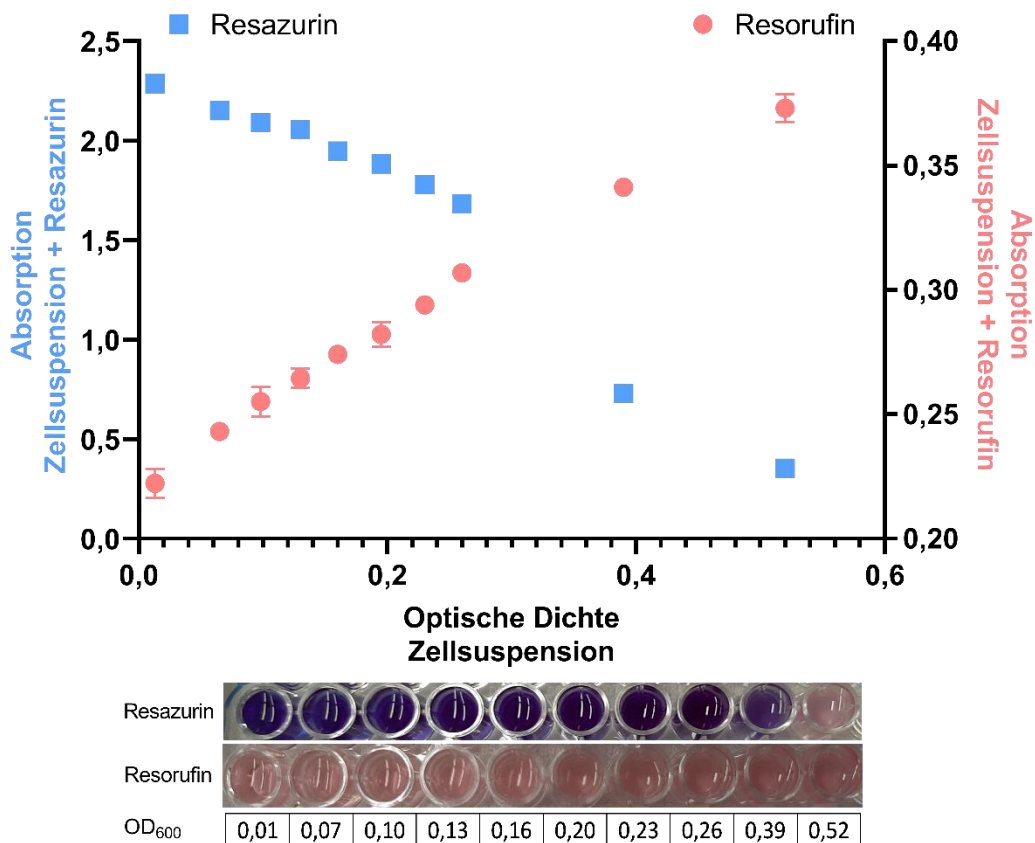


Abbildung 4.7: Der Einfluss von Zellsuspensionen verschiedener Optischer Dichten auf Resazurin und Resorufin. Oben sind die gemessenen Absorptionen bei 620 nm aufgetragen gegen die Optische Dichte bei 600 nm, auf welche die Zellsuspensionen eingestellt wurde. Dabei ist das Messsignal von Resazurin zur linken y-Achse gehörend und das von Resorufin zur rechten y-Achse. Unten ein Bild der 96-well Platte unter Angabe der vorliegenden Optischen Dichten. Angaben zur Signifikanz der Ergebnisse siehe oberhalb der Abbildung.  $N = 1$ ; Fehler stellen StA dar.

Es zeigt sich, dass es bei einer Messung bei 620 nm, wie sie hier durchgeführt wurde, zu einer Signalerhöhung des Resorufin-Signals kommt. Dies zeigt die Gefahr von falsch hohen Werten im Assay auf. Dies kann ein Problem für das Signal-Rausch-Verhältnis darstellen und damit für

eine verlässliche Detektion von nicht hemmenden Substanzen. Dies zeigt, wie wichtig es ist, jede Platte nach dem Messen auf ihre Plausibilität zu überprüfen, also sich nach Möglichkeit jedes *well* nochmal anzusehen, welches ein hohes Signal geliefert hat. Als hohes Signal wurden alle Werte größer als 0,3 angesehen. Andererseits zeigt es auch, wie wichtig es ist, dass die Zellzahl während des Assays nicht zu hoch wird. Dies wiederum wird einerseits beeinflusst durch die Assaydauer (4.1.7), andererseits durch die initiale Optische Dichte (4.1.4).

#### 4.1.4 Initiale Optische Dichte

Die Optische Dichte, bei welcher eine Messung gestartet wird, kann einen großen Einfluss auf das Ergebnis haben (vgl. Kapitel 4.1.3). Bei Petrovic *et al.* wurde mit einer Optischen Dichte von 0,01 gestartet, bei der im Arbeitskreis bekannten Methode mit ca. 0,07 [16, 92]. Es wurden initiale Optische Dichten von 0,01, 0,05 und 0,1 getestet, siehe Abbildung 4.8. Wie schon im Kapitel 4.1.3 erklärt, kann eine zu hohe initiale Optische Dichte zu einem zu hohen Messsignal des Resorufin am Ende des Assays führen.

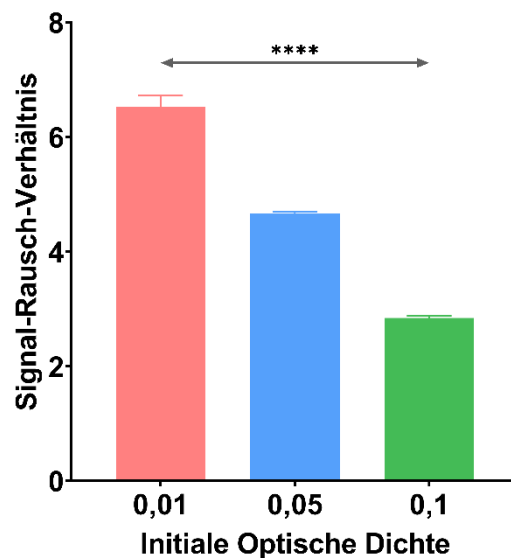


Abbildung 4.8: Einfluss der initialen Optischen Dichte auf das Signal-Rausch-Verhältnis zwischen der Positiv- und der Negativkontrolle. Positivkontrolle: gehemmte Zellen, keine Reduktion; Negativkontrolle ungehemmte Zellen, Reduktion. Assaydauer: 47h. Der Signifikanzwert ist  $P < 0,0001$  bei  $\alpha = 0,05$ .  $N = 1$ ; Fehler stellen StA dar.

Es wurde das Signal-Rausch-Verhältnis zwischen der Positivkontrolle und der Negativkontrolle bestimmt. Die Positivkontrolle besteht dabei aus gehemmten *S. cerevisiae*-Zellen, welche Resazurin nicht reduzieren. Die Negativkontrolle besteht aus ungehemmten *S. cerevisiae*-Zellen, welche Resazurin zu Resorufin reduzieren können. Es zeigte sich, dass das beste Signal-Rausch-Verhältnis bei einer initialen Optischen Dichte von 0,01 erreicht wird.

## Ergebnisse

### 4.1.5 Resazurin-Konzentration

Die einzusetzende Resazurin-Konzentration hat einen großen Einfluss auf das Ergebnis. Wenn von Anfang an zu wenig Resazurin vorhanden ist, ist das Signal der Positivkontrolle niedriger. Wenn zu viel Resazurin vorhanden ist, ist das Signal der Negativkontrolle höher, weil in der gegebenen Zeit nicht alles reduziert werden kann. Beides führt zu einem schlechteren Signal-Rausch-Verhältnis. Sangkaew *et al.* verwendeten in ihrer Methode eine Konzentration von  $0,03 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  [93]. Diese Konzentration, sowie ihre doppelte ( $0,06 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) und ihre halbierte ( $0,015 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) Konzentration wurden getestet.

Abbildung 4.9 zeigt, dass sowohl  $0,015 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  als auch  $0,03 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  zu einem guten Signal-Rausch-Verhältnis geführt haben.

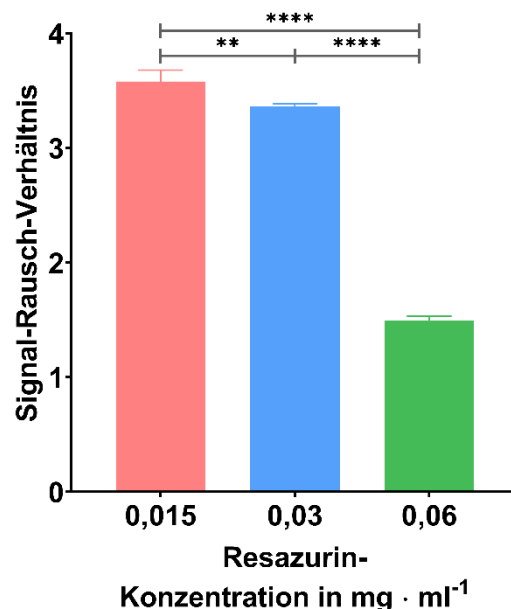


Abbildung 4.9: Getestete Resazurin-Konzentrationen. Aufgetragen wurde das Signal-Rausch-Verhältnis gegen die Resazurin-Konzentration in  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Die getesteten Konzentrationen sind  $0,015 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $0,03 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  und  $0,06 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Das Signifikanzniveau beträgt  $\alpha = 0,05$ . Der Unterschied zwischen  $0,015 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  und  $0,03 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  zeigte eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P = 0,0044$ , die anderen Irrtumswahrscheinlichkeiten liegen bei  $P < 0,0001$ . Assaydauer 47 h.  $N = 2$ ; Fehler stellen StA dar.

Es wurde dann als zu verwendende Resazurin-Konzentration  $0,03 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  gewählt, da diese ein hohes Signal-Rausch-Verhältnis lieferte und der Fehler hier niedriger als bei  $0,015 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  war. Auch in der Literatur wurde diese Konzentration schon erfolgreich eingesetzt [93]. Außerdem war hier die Gefahr geringer, dass es im weiteren Verlauf noch Probleme mit dem Signal-Rausch-Verhältnis geben könnte aufgrund einer niedrigeren Resazurin-Konzentration.

### 4.1.6 Auswahl der Kontrollen

Für den Assay wurden Negativ- und Positivkontrollen benötigt. Als Positivkontrolle (Hemmkontrolle ohne Wachstum) wurde ein Inhibitor gewählt, der sowohl PfFNT als auch dessen



## Ergebnisse

Resistenzmutante G107S hemmen konnte. Die beste bekannte Verbindung stellte BH-296 dar, siehe Abbildung 4.10. Der  $IC_{50}$ -Wert für PffNT ist  $0,14 \mu\text{M}$ , für die Resistenzmutante G107S  $2,3 \mu\text{M}$  [36]. BH-296 wurde in einer Konzentration von  $100 \mu\text{M}$  im Assay eingesetzt. Bei dieser Konzentration werden beide Proteine voll gehemmt. BH-296 wurde in DMSO gelöst. Es wurde immer 1 % des Gesamtvolumens eines *well*s als das eingesetzte Inhibitor-Volumen verwendet, bei  $300 \mu\text{l}$  Gesamtvolumen also  $3 \mu\text{l}$ .

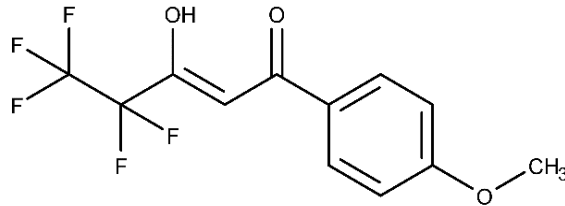


Abbildung 4.10: Strukturformel von BH-296; erstellt mit ChemDraw.

Alle verwendeten Inhibitoren waren in DMSO gelöst, daher wurden die Negativkontrollen mit 1 % des Gesamtvolumens an DMSO versetzt und stellten die ungehemmten Wachstumskontrollen dar.

### 4.1.7 Gesamtvolumen des Assay

Das Volumen, mit welchem ein *well* befüllt ist, hat einen Einfluss auf das Messsignal. Da bei 96-*well* Platten nur eine Messung von unten nach oben, bzw. von oben nach unten möglich ist, wird durch das Füllvolumen die Schichtdicke  $d$  bestimmt. Diese ist durch das Lambert-Beer'sche-Gesetz festgehalten, welches die Absorption  $A_\lambda$  als das Produkt des Absorptionskoeffizienten  $\epsilon_\lambda$ , der Stoffmengenkonzentration  $c$  und der Schichtdicke  $d$  definiert.

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d$$

Bei gleichbleibender Stoffmengenkonzentration  $c$  und Absorptionskoeffizient  $\epsilon_\lambda$ , wird mit steigender Schichtdicke  $d$  also eine steigendes Messsignal  $A_\lambda$  erwartet.

Zunächst wurde ein Test ohne Resazurin mit dem Bioscreen durchgeführt, siehe Abbildung 4.11. Die getesteten Volumina waren  $100 \mu\text{l}$ ,  $125 \mu\text{l}$ ,  $175 \mu\text{l}$ ,  $200 \mu\text{l}$ ,  $250 \mu\text{l}$  und  $300 \mu\text{l}$ . Aufgetragen ist die normierte Absorption mit dem Breitbandfilter gegen die Zeit. Hier wurde über 48 h getestet. Hier ist zu sehen, dass für die ungehemmten *S. cerevisiae*-Zellen nach 48 h noch kein Plateau erreicht ist. Die Normierung wurde durchgeführt, indem von jedem Messwert eines *well*s der Messwert bei  $t = 0 \text{ h}$  abgezogen wurde, sodass allein das Wachstum betrachtet werden konnte. Hierbei zeigte sich, dass  $300 \mu\text{l}$  wie erwartet zum höchsten Messsignal führte. Zwar nahm ab  $200 \mu\text{l}$  auch das Signal der gehemmtten *S. cerevisiae*-Zellen zu, allerdings nicht

## Ergebnisse

in dem Maße, dass der Unterschied zwischen gehemmten und ungehemmten *S. cerevisiae*-Zellen gleich blieb. Dieser stieg weiter an.

Dennoch wurde in einem zweiten Versuch nochmal der Unterschied zwischen 200  $\mu\text{l}$  und 300  $\mu\text{l}$  genauer betrachtet. Hier wurde mit Resazurin gearbeitet, allerdings wurden zwei unterschiedliche Konzentrationen getestet. Wenn mit 300  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen gearbeitet wurde, wurde immer eine Resazurin-Konzentration von  $0,03 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  eingesetzt. Dies entspricht 9  $\mu\text{g}$  die in einem *well* an Resazurin verwendet werden. Bei diesem Versuch wurde nun 200  $\mu\text{l}$  Volumen getestet, einerseits mit der gleichen Menge an Resazurin wie bei 300  $\mu\text{l}$ , also ebenfalls 9  $\mu\text{g}$  pro *well*, also  $0,045 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Andererseits wurde die gleiche Konzentration an Resazurin getestet, in diesem Fall also ebenfalls  $0,03 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  was 6  $\mu\text{g}$  Resazurin entsprach. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.12 gezeigt. Hier ist deutlich zu sehen, dass mit 300  $\mu\text{l}$  ein höheres Signal-Rausch-Verhältnis erreicht werden kann. Auch deutlich wird, dass bei 200  $\mu\text{l}$  die niedrigere Resazurin-Konzentration höhere Signal-Rausch-Verhältnisse erzielt als die höhere. Auch das wurde in Kapitel 4.1.5 schon beobachtet.

# Ergebnisse

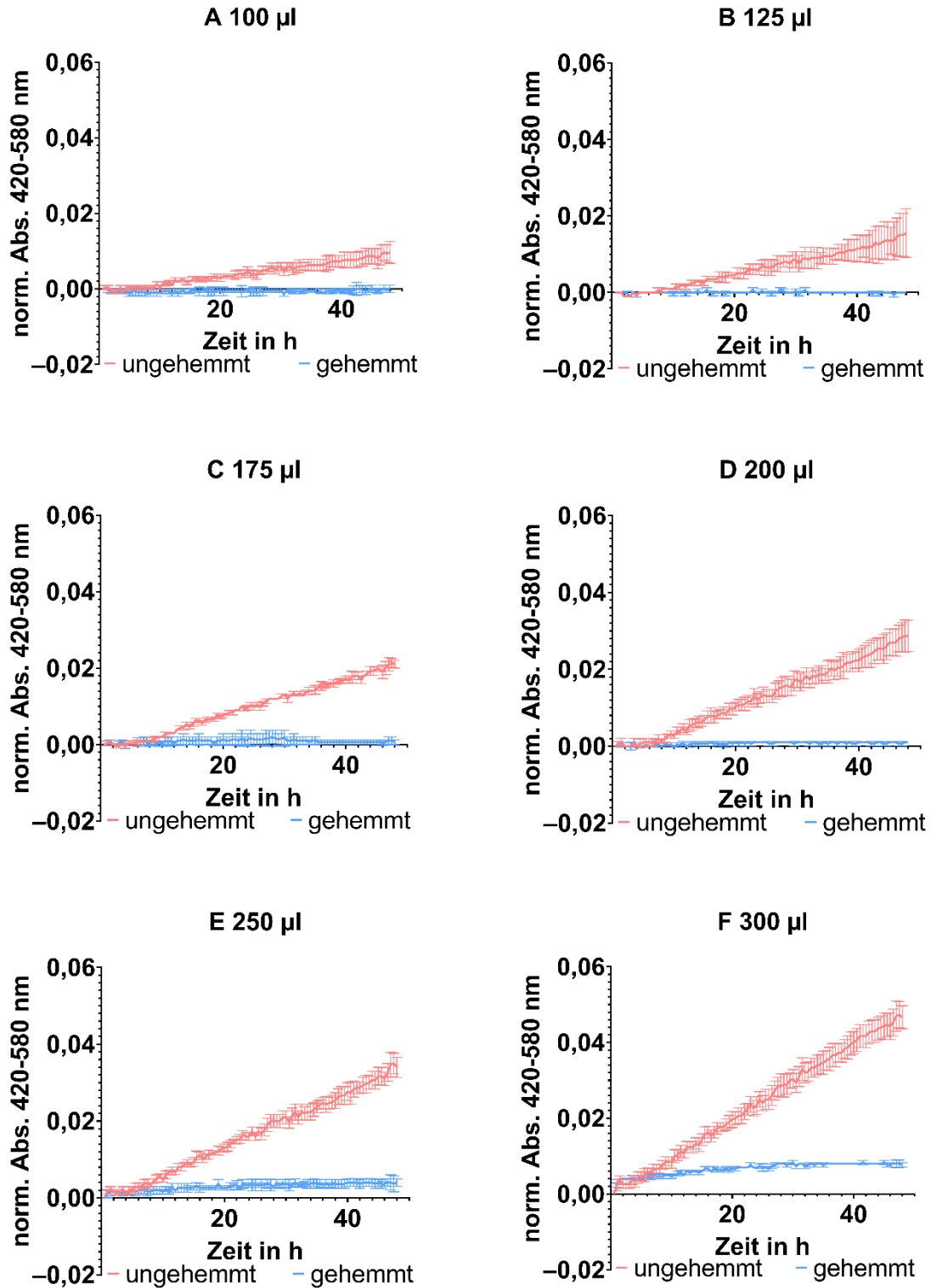


Abbildung 4.11: Test des Volumen-Einflusses auf das Messsignal. Getestete Volumina sind 100 µl, 125 µl, 175 µl, 200 µl, 250 µl und 300 µl. Aufgetragen ist jeweils das normierte Messsignal gegen die Zeit in h. Assaydauer 48 h, 29 °C, Messintervall 30 min, Filter: Breitband (420-580 nm). Das Messsignal wurde normiert durch Subtraktion des Messwertes bei t = 0 h von allen folgenden Messwerten. N = 1; Fehler stellen StA dar.

## Ergebnisse

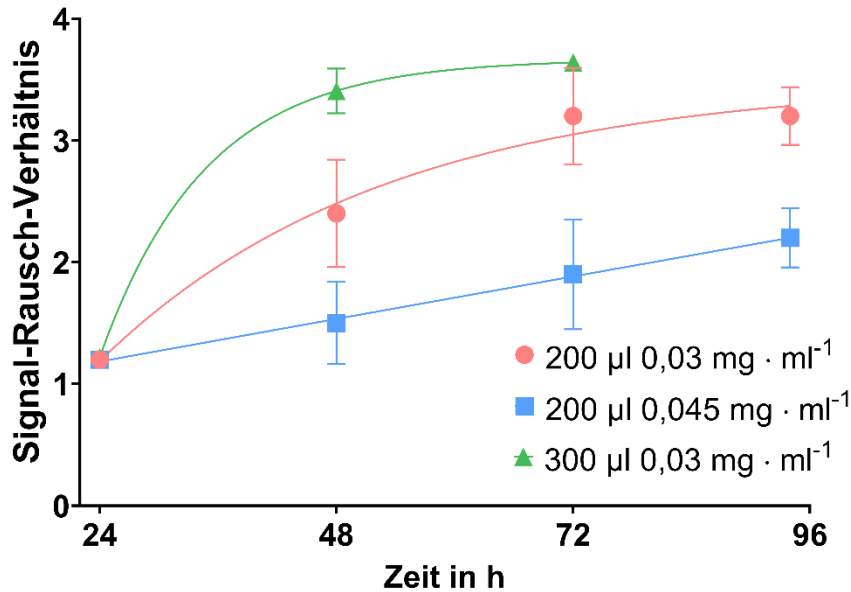


Abbildung 4.12: Einfluss des Volumens und der Resazurin-Konzentration auf das Signal-Rausch-Verhältnis. Aufgetragen ist das Signal-Rausch-Verhältnis über die Zeit in h. Bis zu 96 h wurden getestet, Wachstum bei 29 °C und 500 rpm. Die aufgetragenen Fehler entsprechen der Standardabweichung über Fehlerfortpflanzung berechnet. N = 1-4; Fehler stellen StA dar.

Es wurde deshalb mit einem Gesamtvolumen von 300 µl gearbeitet.

### 4.1.8 Assaydauer

Es wurde getestet, wie lang eine Messung dauern musste, um ein aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Für die meisten verwendeten Inhibitoren lagen keine Stabilitätsuntersuchungen vor, deshalb wurde der kurzmöglichste Zeitraum gesucht. Getestet wurde zunächst ein Zeitraum von 0 bis 144 h und später dann 24 h, 48 h und 72 h. Da der Assay zu Anfang ohne die Verwendung eines Indikators angedacht war, wurden die ersten Versuche zur Assaydauer ohne Resazurin durchgeführt.

In Abbildung 4.13 wurden auf der linken y-Achse normierte Messdaten von Resazurin-haltigen *S. cerevisiae*-Zellsuspensionen gemessen bei 600 nm gegen die Zeit aufgetragen. Diese Daten wurden normiert indem von jedem Messsignal jenes von  $t = 144$  h abgezogen wurde. Auf der rechten y-Achse wurden Daten aufgetragen, die bei einer Messung ohne Resazurin entstanden waren. Hier wurde normiert durch Subtraktion des Messsignals von  $t = 0$  h. Wie in Abbildung 4.13 ersichtlich wurde ein Zeitpunkt von 72 h gewählt. Hier war sowohl bei der Messung mit als auch bei der Messung ohne Resazurin ein Plateau fast erreicht. In Abbildung 4.14 sind die Signal-Rausch-Verhältnisse aller getesteten Proteine gegen die Zeit aufgetragen. Erst nach 48 h zeigte sich ein Signal-Rausch-Verhältnis, welches größer als drei und damit zumindest für eine qualitative Aussage geeignet ist [89]. In Abbildung 4.14 A sieht man zudem, dass es keinen Unterschied zwischen einer Messung nach 48 h und einer Messung nach 72 h gibt.

## Ergebnisse

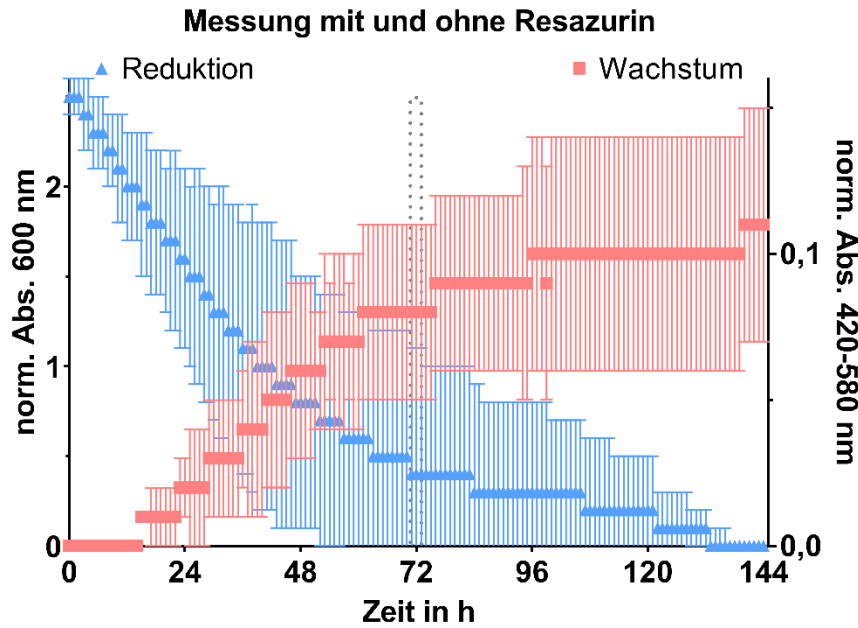


Abbildung 4.13: Wachstumsdaten aus dem Bioscreen. Einmal mit Resazurin  $\blacktriangle$ , diese Daten sind auf der linken y-Achse aufgetragen gegen die Zeit in h. Einmal ohne Resazurin  $\blacksquare$ , auf der rechten y-Achse aufgetragen gegen die Zeit in h. Im grau gepunkteten Bereich befindet sich der gewählte Messzeitpunkt von 72 h. Assaydauer 144 h, 29 °C, Messintervall 1 h, Filter: Breitband (420-580 nm) und 600 nm. Das Messsignal wurden normiert. N = 3-4; Fehler stellen StA dar.

Als nach Literaturrecherche die Idee einer Differenzmessung aufkam, konnte das Signal-Rausch-Verhältnis noch deutlich gesteigert werden. In Abbildung 4.14 B, wurde Signal-

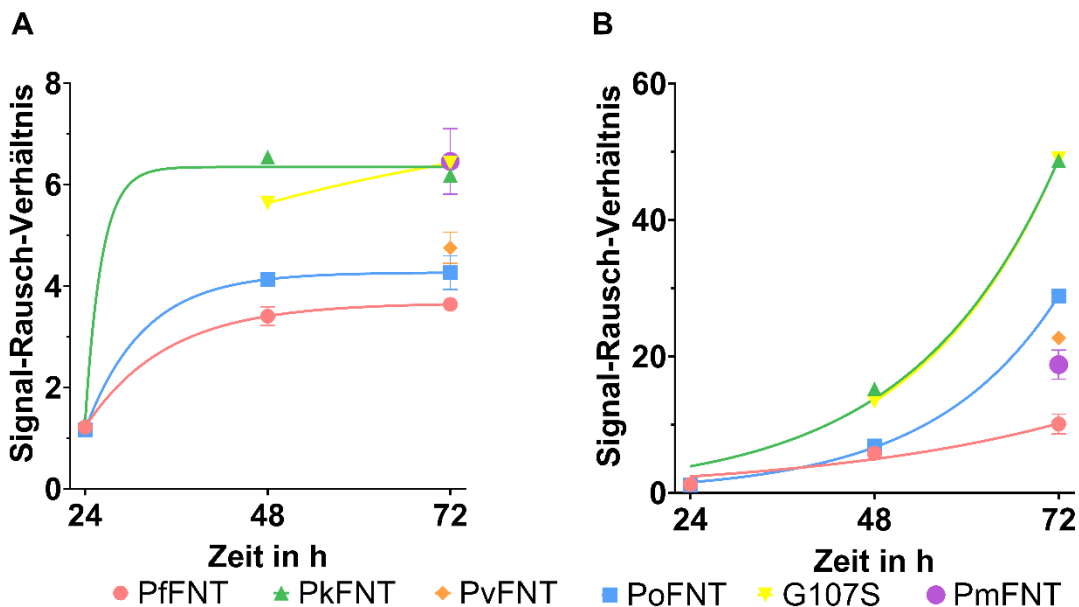


Abbildung 4.14: Signal-Rausch-Verhältnis gegen die Zeit. A zeigt das Signal-Rausch-Verhältnis aller untersuchter Proteine bei einer Messung bei 620 nm. B zeigt das Signal-Rausch-Verhältnis der Differenzmessung. Eingesetzt wurden BH-296 in 100  $\mu$ M als Positivkontrolle und DMSO als Negativkontrolle. Die gemessene Absorption der Positivkontrolle wurde geteilt durch die Absorption der Negativkontrolle. Gemessen wurde mit dem Tecan F200. N = 1-4; Fehler stellen StA dar.

Rausch-Verhältnis nach 72 h bei einer Differenzmessung (4.1.11) noch deutlich gesteigert. Hier kann man zudem vermuten, dass spätere Messzeitpunkte noch bessere Signal-Rausch-

## Ergebnisse

Verhältnisse ergeben. Diese Vermutung kann jedoch verworfen werden, da beobachtet wurde, dass auch die gehemmten *wells* einer Platte sich ganz entfärbten, wurde diese länger stehen gelassen. Zu beachten sind die unterschiedlichen y-Achsen der beiden Graphen.

### 4.1.9 Einfluss von Schütteln auf den Assay

Bei der Durchführung der ersten Versuche war noch kein Schüttler vorhanden, welcher für 96-well Platten geeignet war. Kulturen werden normalerweise geschüttelt, um die Zufuhr von Sauerstoff zu gewährleisten. Aus diesem Grund fiel eine Beobachtung auf, welche auch in Erlenmeyerkolben reproduziert werden konnte. Es zeigte sich dabei, dass es in Platten und Kolben, welche nicht geschüttelt wurden zu einer stärkeren Reduktion des Resazurin kam als in geschüttelten Kontrollen, siehe Abbildung 4.15. Kolben wurden bei 220 rpm geschüttelt, Platten bei 700 rpm, um in den kleineren Volumina die gleiche Durchmischung zu gewährleisten. Die gemessene  $OD_{600}$  bestätigt dieses Ergebnis. Für den nicht geschüttelten Kolben wurde ein Wert von 0,22 bestimmt, für den geschüttelten 0,35. Resorufin zeigt eine niedrigere Absorption bei 600 nm als Resazurin. Dieser Versuch wurde ohne Resazurin wiederholt. Hierbei wurde eine initiale Optische Dichte von 0,1 eingestellt und im Kolben 24 h bei 29 °C inkubiert. Hier wurde für den geschüttelten Kolben eine  $OD_{600}$  von 0,78 gemessen, für den nicht geschüttelten 0,20. Das Zellwachstum ist im nicht geschüttelten Kolben niedriger als im geschüttelten, was zu erwarten war. Im Kapitel 4.1.1 zeigte sich ohne Schütteln, aber mit Inhibitor zwar ein signifikanter Unterschied zwischen beidem, allerdings lag das Signal-Rausch-Verhältnis nur bei höchstens 1,5. Da nicht untersucht wurde, welche weiteren Einflüsse zu einer Verfälschung des Signals führen könnten, wurde sich für ein Schütteln der Zellen entschieden.

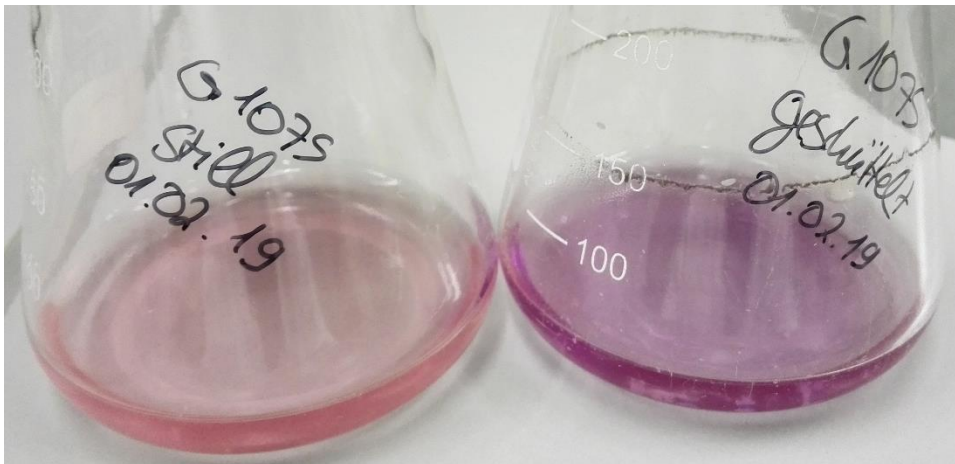


Abbildung 4.15: Vergleich geschüttelter und nicht geschüttelter Kolben

Die Ergebnisse von den Tests in den Platten zeigen beim Schütteln ein Problem auf, welches in Kapitel 4.1.10 behandelt wird.

## 4.1.10 Kreuz-Kontamination verhindern

Bei einigen Versuchen trat der Verdacht auf, dass es zu einer Kreuz-Kontamination der Lösungen von einem *well* in ein benachbartes *well* kommen könnte, siehe Abbildung 4.16.

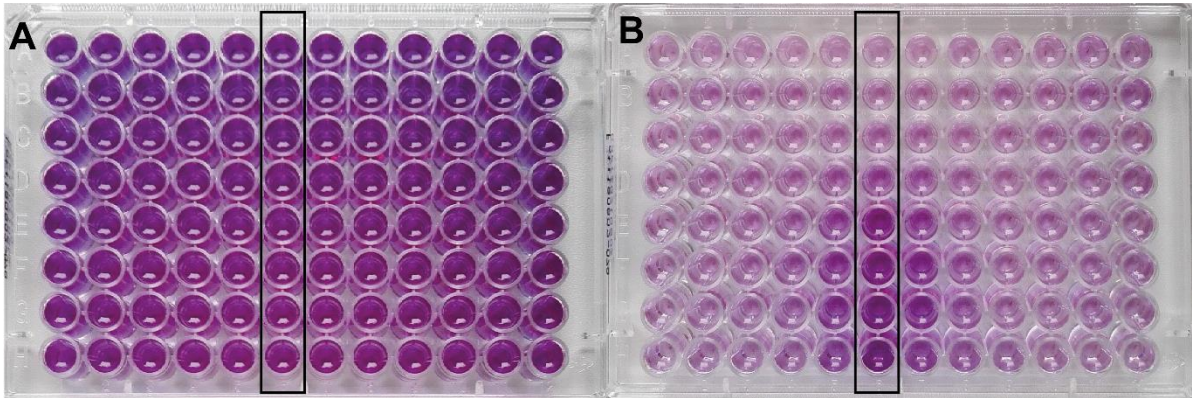


Abbildung 4.16: Kreuz-Kontamination von *well* zu *well*. Reihe 6 beider Platten ist mit einer schwarzen Umrandung hervorgehoben. In dieser befinden sich oben viermal DMSO (A – D) und unten viermal BH-296 in 100  $\mu$ M (E – H). A ist komplett mit BH-296 in 100  $\mu$ M befüllt, B mit DMSO. Die Kreuz-Kontamination ist auf beiden Platten deutlich sichtbar.

Die DMSO-Kontrollen in Platte A sind nicht mehr zu sehen, sie sollten eigentlich hell sein, zeigen aber eine dunkelviolette Färbung. Dafür scheinen DMSO-*wells* neben der Hemmkontrolle auf Platte B ebenfalls eine Hemmung aufzuweisen. Hier ist in direkt benachbarten *wells* eine dunklere Färbung zu erkennen als z. B. am Rand der Platte. Um keine verfälschten Ergebnisse zu erhalten, wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Kreuz-Kontamination zu verhindern. Vier verschiedene Varianten wurden getestet. Einmal wurde die Test-Platte wie in Abbildung 4.16 zu sehen ohne Deckel inkubiert. Zusätzlich wurde je eine Platte mit Deckel, mit Alufolie und Deckel darüber und eine mit Parafilm sowie Deckel abgedichtete. Das Ergebnis ist in Abbildung 4.17 gezeigt.

## Ergebnisse

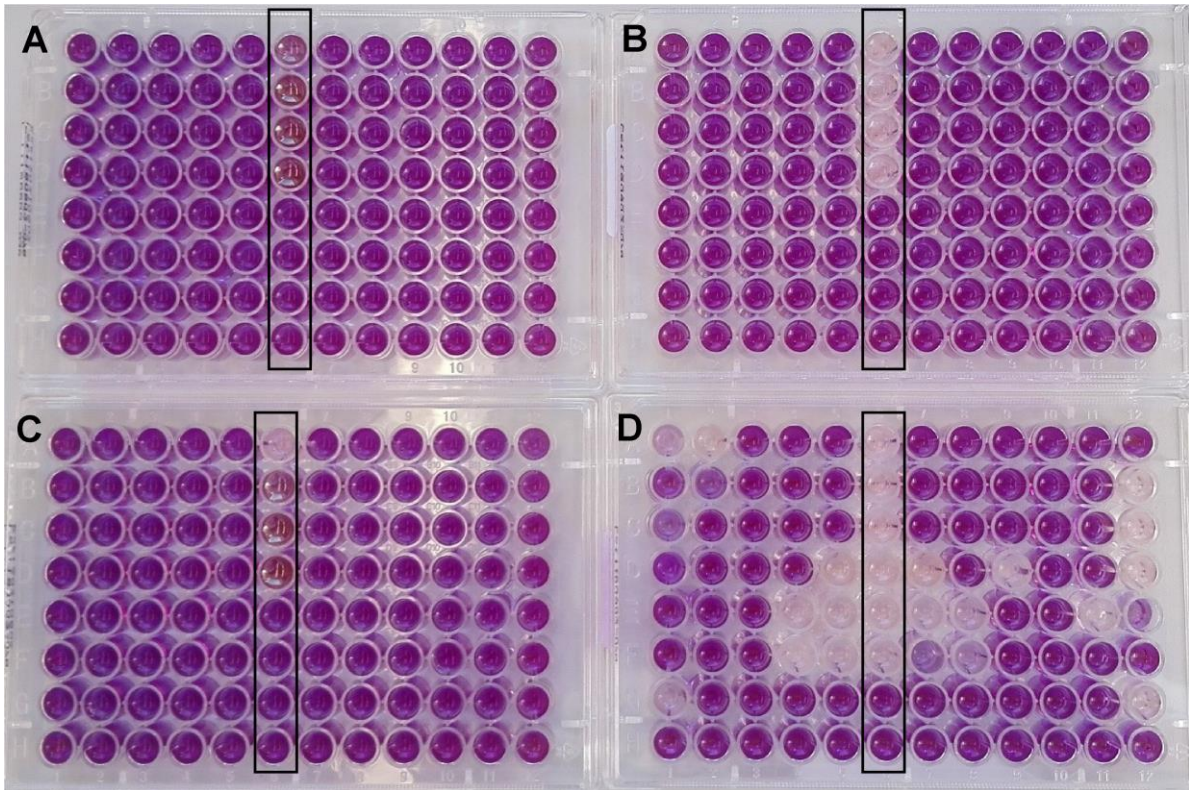


Abbildung 4.17: Testung unterschiedlicher Abdeckungen der 96-well-Platten. Alle Platten waren mit den Kontrollen in Reihe 6 befüllt und ansonsten nur mit der Hemmkontrolle. A zeigt die Platte mit Deckel, B zeigt die Platte mit Parafilm abgedichtet, C zeigt die Platte ohne Deckel und D zeigt die mit Alufolie und Deckel abgedeckte Platte.

Ein Abdecken mit Alufolie (D) führte zu einer Verschlechterung des Ergebnisses. Das Abdecken mit Deckel (A) machte keinen Unterschied im Ergebnis zu gar keiner Abdeckung (C), da der Deckel relativ lose aufliegt und so zu keiner Abdichtung führt. Dagegen zeigte das Abdichten mit Parafilm (B) die beste Abdichtung gegen Kreuz-Kontamination. Alle Platten, welche mit den üblichen Kontrollen und ansonsten nur DMSO gefüllt waren, zeigten das gleiche Bild (nicht gezeigt). Hier war keine Kreuz-Kontamination zu entdecken. Fortan wurden alle Platten mit Parafilm verschlossen, sodass keine Kreuz-Kontamination mehr stattfinden konnte.

### 4.1.11 Direktmessung vs. Differenzmessung

Es stellte sich die Frage, ob eine Differenzmessung genauere Ergebnisse liefern könnte, da ein Unterschied zwischen Positiv- und Negativkontrolle deutlicher zu erkennen ist. Die Idee kam durch Sangkaew *et al.*, welche eine ähnliche Differenzmessung durchgeführt haben und damit gute Ergebnisse erhielten [93]. Es wurde ein Referenzfilter mit 595 nm ausgewählt. In Abbildung 4.6 ist zu erkennen, dass Resazurin bei 595 nm sehr stark absorbiert, da das Maximum bei 600 nm liegt. Resorufin absorbiert dagegen kaum. Bei 620 nm absorbiert Resazurin immer noch relativ stark, Resorufin gar nicht mehr. Bildet man nun eine Differenz zwischen beiden Messwerten ergibt sich bei gehemmten Zellen, bei denen viel Resazurin vorliegt, ein großer



## Ergebnisse

Wert. Bei Resorufin dagegen wird der Wert im Vergleich sehr klein. Es sind so die Abstufungen zwischen unterschiedlichen Werten deutlich besser zu erkennen.

In Abbildung 4.18 ist beispielhaft dargestellt, in wieweit sich eine Differenzmessung im Vergleich zur Direktmessung auf das Ergebnis auswirkt. Am deutlichsten sichtbar wird dies am Signal-Rausch-Verhältnis, welches von 5 auf 27 gesteigert werden kann. Dies ist mathematisch dadurch zu erklären, dass der Wert der ungehemmten Negativkontrolle durch die Differenzmessung deutlich niedriger ist als bei den direkten Messwerten. Dieser Wert wird bei der Berechnung des Signal-Rausch-Verhältnisses als Nenner eingesetzt und führt damit zu einem höheren Ergebnis dieser Division. Für die niedrigen Konzentrationsbereiche einer quantitativen Messung, die Bestimmungsgrenze, schlägt das *International Council for Harmonisation*, kurz ICH, vor mit einem Signal-Rausch-Verhältnis von mindestens 10:1 zu arbeiten [89]. Auch für alle anderen Konzentrationsbereiche ist es wünschenswert ein möglichst großes Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten.

## Ergebnisse

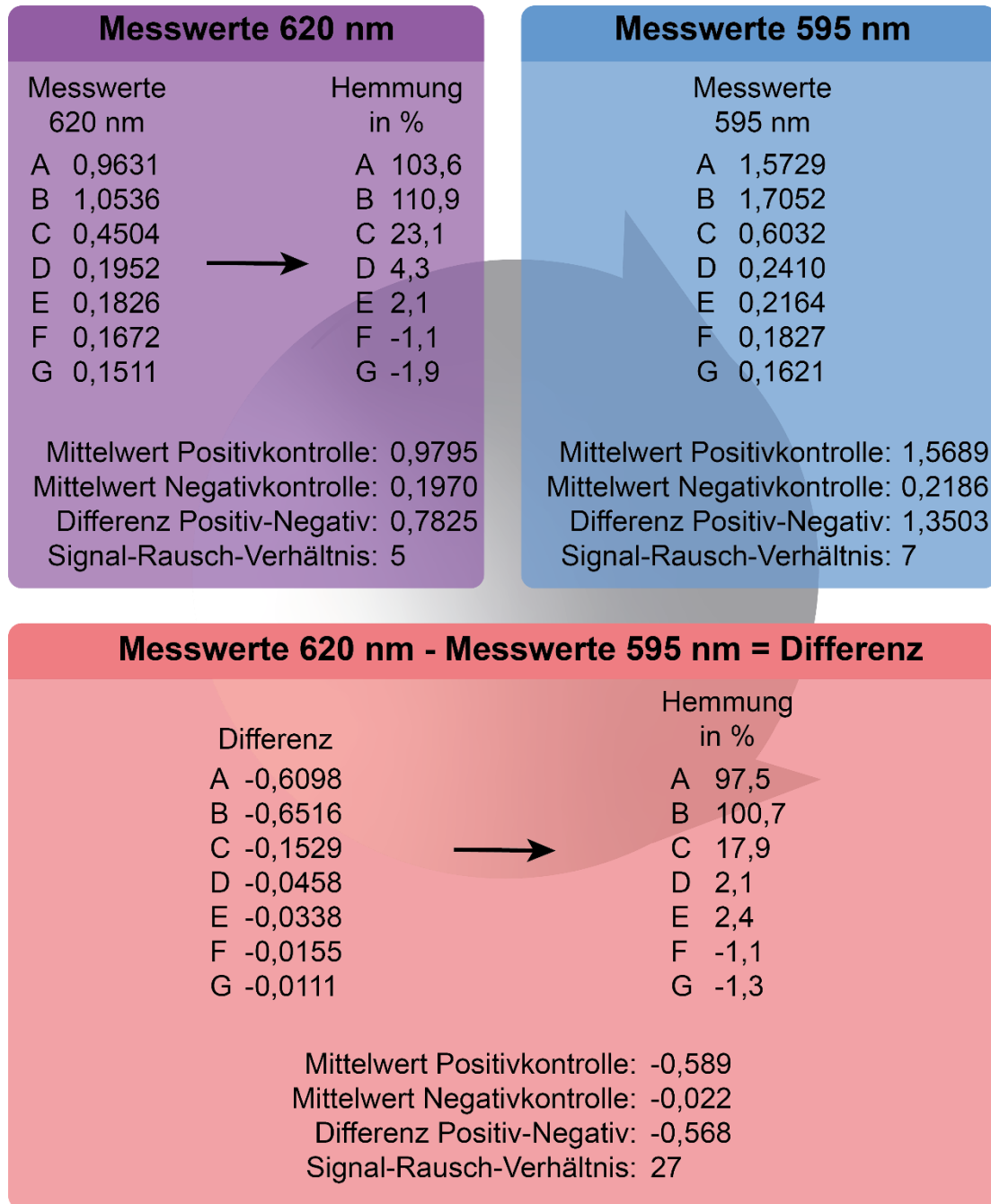


Abbildung 4.18: Direktmessung und Differenzmessung mit beispielhaftem Vergleich. Erstellt mit Adobe Illustrator

Aus diesem Grund wurde dann im Weiteren über die Differenzmessung ausgewertet.

### 4.1.12 Linearität und Empfindlichkeit der Messung

Um valide Ergebnisse zu erhalten wurde die Linearität der Absorptionsmessung mit Resazurin im verwendeten Konzentrationsbereich bestimmt. Dazu wurde eine Kalibriergerade mit verschiedenen Resazurin-Konzentrationen erstellt durch Vermessen einer Verdünnungsreihe, siehe Abbildung 4.19. Anhand dieser Kalibriergeraden wurde dann auch die Empfindlichkeit der Messung bestimmt.

## Ergebnisse

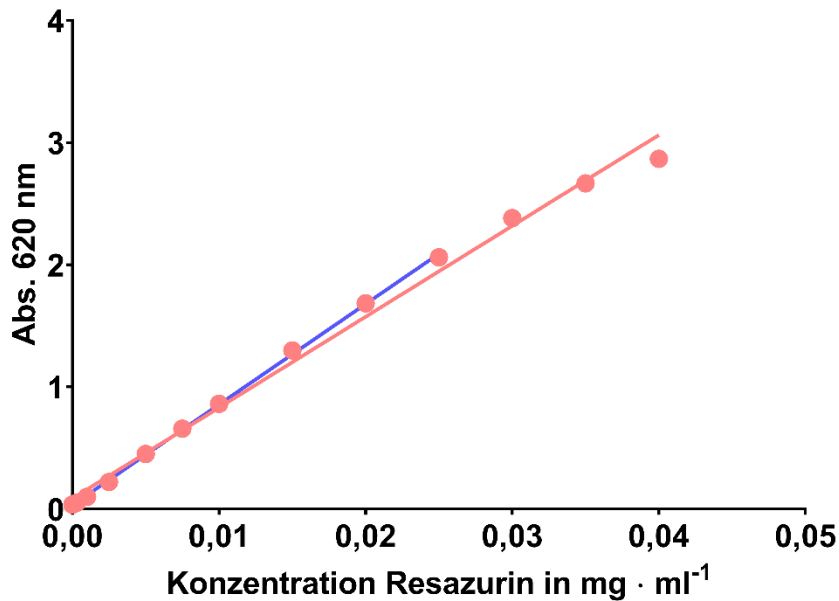


Abbildung 4.19: Kalibriergerade für Resazurin in der Direktmessung. Abs. 620 nm ist gegen die Resazurin-Konzentration in  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  aufgetragen. In Rosa die Kalibriergerade aller Werte mit einem  $R^2 = 0,9922$ . Die Geradengleichung ist  $Y = 74,38X + 0,08631$ . In Blau die Kalibriergerade aller Werte bis zur Resazurin-Konzentration von  $0,025 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Hier beträgt das  $R^2 = 0,9981$  und die Geradengleichung ist  $Y = 82,30X + 0,03212$ .  $N = 2$ ; Fehler sind so klein, dass diese in der Abbildung nicht dargestellt sind. Sie stellen die StA dar.

Es zeigte sich, dass bis zur Resazurin-Konzentration von  $0,025 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  die Linearität gegeben ist. Eine Analyse der Daten mit der Pearson-Korrelation ergab für die Messung bei 620 nm ein  $r$  von 0,9965 (KI 0,9881 bis 0,9990;  $r^2 = 0,9931$ ) mit einem P-Wert von  $<0,0001$ , also einem signifikanten Ergebnis. Für die Daten bis  $0,025 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  stieg  $r$  auf 0,9997 an, die Korrelation wurde also deutlich besser. Höhere Konzentrationen zeigen ein Abflachen des Signals, hier ist keine Linearität mehr gegeben. In der Differenzmessung sieht das Ergebnis ähnlich aus, siehe Abbildung 4.20. Hier zeigt sich ab einer Resazurin-Konzentration von  $0,02 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  ein ansteigendes Signal. Dies liegt daran, dass zwar bei 620 nm die Absorption stetig ansteigt, aber hier nur ein schwaches Abflachen zu erkennen ist. Bei 595 nm, fällt das Signal durch die größere Nähe zum Absorptionsmaximum insgesamt deutlich höher aus. Hier kommt es deutlich früher zu einem Abflachen, da scheinbar das Ende des Messbereichs erreicht ist. Die Differenz beider Messwerte wird also zunächst größer und ab  $0,02 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  wieder kleiner. Dadurch ist der biphasische Kurvenverlauf zu erklären.

## Ergebnisse

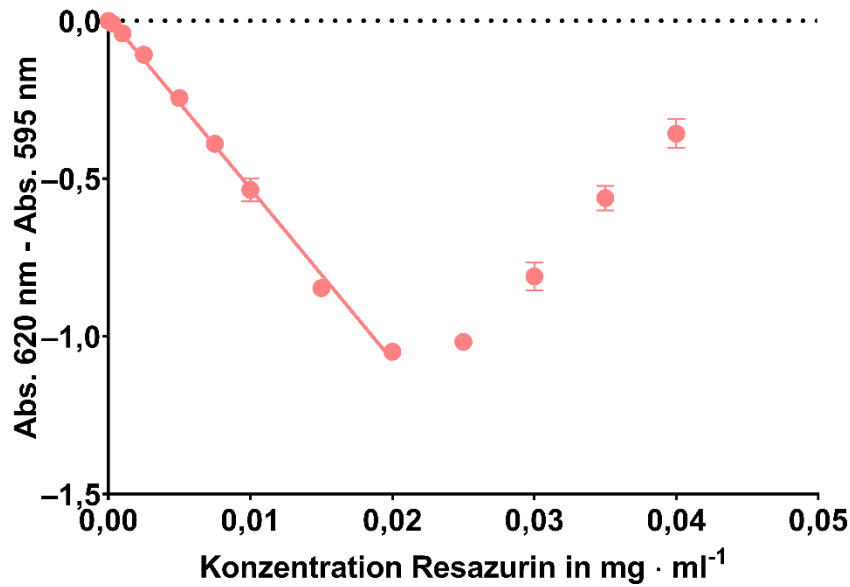


Abbildung 4.20: Kalibriergerade für Resazurin in der Differenzmessung. Die Differenz der Abs. 620 nm und 595 nm ist gegen die Resazurin-Konzentration in  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  aufgetragen. Bis zu einer Resazurin-Konzentration von  $0,02 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  ist die Linearität gegeben.  $R^2 = 0,9961$  und die Geradengleichung ist  $Y = -54,41X + 0,01244$ .  $N = 1$  mit 3-4 Replikaten; Fehler stellen StA dar.

Die Empfindlichkeit der Differenzmessung liegt bei  $-54,4 \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

### 4.1.13 Zusammenfassung der Methodenentwicklung

Tabelle 4.1: Teil 1 aller getesteten und ausgewählten Parameter

Parameter	Getestet	Ausgewählt
L-Laktatkonzentration	0,25 %	1,00 %
	0,50 %	
	0,75 %	
	1,00 %	
	1,50 %	
	2,00 %	
pH-Wert	3,8	6,0 bis 6,1
	4,4	
	4,5	
	5,1	
	5,2	
	5,8	
	6,0	
	6,2	
	6,4	
	6,7	

## Ergebnisse

Tabelle 4.2: Teil 2 aller getesteten und ausgewählten Parameter

Parameter	Getestet	Ausgewählt
Initiale Optische Dichte	0,01	0,01
	0,05	
	0,10	
Resazurin-Konzentration	0,015 mg · ml <sup>-1</sup>	0,030 mg · ml <sup>-1</sup>
	0,030 mg · ml <sup>-1</sup>	
	0,045 mg · ml <sup>-1</sup>	
	0,060 mg · ml <sup>-1</sup>	
Gesamtvolumen	100 µl	300 µl
	125 µl	
	175 µl	
	200 µl	
	250 µl	
	300 µl	
Assaydauer	24 h	72 h
	48 h	
	72 h	
Schütteln der Platten	0 rpm	500 rpm
	500 rpm	
Kreuz-Kontamination verhindern	Ohne	Parafilm und Deckel
	Nur Deckel	
	Alufolie und Deckel	
	Parafilm und Deckel	

Als Kontrollen wurden 100 µM BH-296 als Positivkontrolle gewählt, sowie 1 % DMSO als Negativkontrolle. Bei der Durchführung des Screenings wurde eine Direktmessung durchgeführt. Bei der späteren Testung der bekannten Inhibitoren an allen humanpathogenen FNTs wurde mit der Differenzmessung gearbeitet. Die Linearität war über den Messbereich hinweg gegeben.

### 4.2 Screening der TCAMS Substanzen

Mit dem entwickelten Wachstums-Resazurin-Assay wurden 12.564 Substanzen aus dem *Tres Cantos Anti-Malarial Set*, kurz TCAMS, an der Resistenzmutante *PfFNT G107S* getestet. Diese Substanzen wurden von GlaxoSmithKline (GSK) zur Verfügung gestellt. Alle Substanzen

## Ergebnisse

zeigten bereits eine Hemmwirkung gegen *P. falciparum*, unbekannt ist dabei das genaue *target* der Substanzen. Eingesetzt wurden alle Substanzen in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ , jede Substanz wurde einmal getestet. An insgesamt sieben Messtagen wurden insgesamt 150 96-*well* Platten mit dem in Kapitel 4.1 etablierten Assay untersucht.

### 4.2.1 Ergebnisse im Wachstums-Resazurin Assay

Im Wachstums-Resazurin-Assay zeigten sich 92 Substanzen, welche eine Hemmung von 100 % oder mehr aufwiesen, vgl. Abbildung 4.21. Bei einer Hemmung von mehr als 100 %

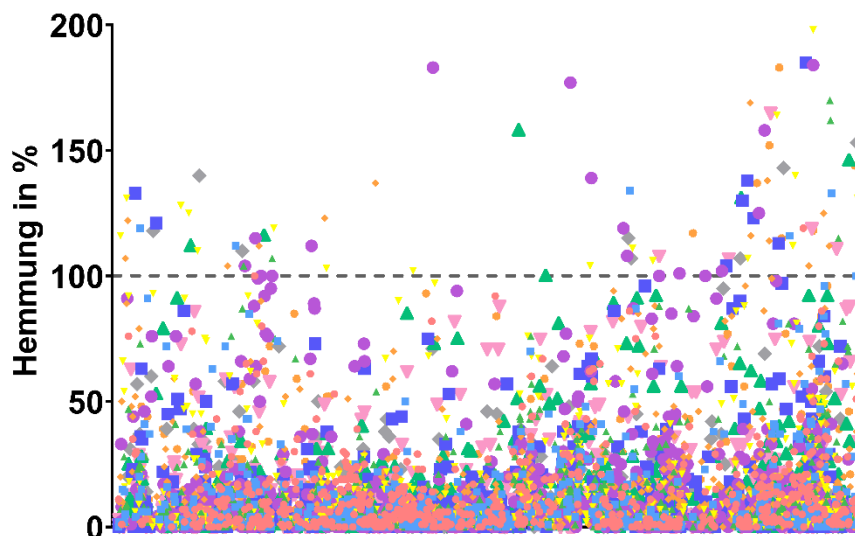


Abbildung 4.21: Die Hemmwerte aller TCAMS-Substanzen aufgetragen in Hemmung in % bezogen auf die Positivkontrolle BH-296. Der Bereich oberhalb der gestrichelten Linie zeigt alle 92 Substanzen, welche für die weitere Testung herangezogen wurden.

wurde das vorhandene Resazurin schwächer reduziert wurde als dies bei der Positivkontrolle der Fall war. Diese 92 Substanzen wurden anschließend im biophysikalischen Assay getestet, um herauszufinden, ob es sich dabei um einen Effekt gegen das getestete FNT oder lediglich gegen den Modellorganismus oder Resazurin handelt.

### 4.2.2 Ergebnisverifizierung im biophysikalischen Assay

Alle 92 Substanzen wurden doppelt im biophysikalischen Filterplatten-Assay getestet, wie in 3.3.1 beschrieben. Dabei wurde je Test zweimal BH-296 in 100  $\mu\text{M}$  als Positivkontrolle eingesetzt (12F und 12H) und auch je zweimal DMSO als Negativkontrolle (12E und 12G). Die Ergebnisse des ersten Tests sind in Tabelle 4.3 gezeigt. Angegeben sind hier die Messwerte in CPM.

## Ergebnisse

Tabelle 4.3: Hemmung von PffNT G107S in Messung 1. Die erhaltenen Daten sind in CPM angegeben. Die Platte wurde 4 Tage mit dem Scintillationscocktail inkubiert. In Grün markiert die mit BH-296 erhaltenen Messwerte, in Gelb die nur mit DMSO erhaltenen Daten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	217	232	211	214	186	209	232	229	215	167	258	225
B	243	228	241	235	230	226	242	242	200	211	208	236
C	231	233	230	258	227	201	233	235	234	237	226	199
D	226	257	273	233	204	247	215	234	221	260	225	254
E	203	296	219	235	249	230	138	240	180	198	271	227
F	270	268	234	241	197	230	230	247	205	241	243	5
G	222	207	152	224	224	180	237	235	249	236	226	238
H	183	200	214	167	160	220	227	189	203	209	215	10

Keine der getesteten Substanzen zeigte eine Hemmung von mindestens 50 % (höchstens 116 CPM) nach einmaligem Messen. Um das Ergebnis zu verifizieren wurde der Versuch wiederholt, allerdings in umgekehrtem Plattenlayout. Das umgekehrte Layout wurde gewählt um möglichen Effekten, welche die Position in der Platte auf das Ergebnis haben könnten, vorzubeugen. Auch in der Wiederholung zeigte keine der Substanzen eine Hemmung, siehe Tabelle 4.4. Hier sind die Messwerte aller Proben deutlich höher als selbst die Negativkontrolle, welche nur DMSO enthält. Im Vergleich ist allerdings zu sehen, dass die Negativ-Kontrollen in der zweiten Messung niedrigere CPM aufweisen und somit weniger L-Laktat transportiert wurde. Dennoch ist auch hier keine Substanz dabei, die einen ähnlich niedrigen Transport gezeigt hat.

Tabelle 4.4: Hemmung von PffNT G107S in Messung 2. Die erhaltenen Daten sind in CPM angegeben. Die Platte wurde 24 h mit dem Scintillationscocktail inkubiert. In Grün markiert die mit BH-296 erhaltenen Messwerte, in Gelb die nur mit DMSO erhaltenen Daten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	79	184	122	185	216	194	182	166	153	151	160	219
B	14	129	130	207	170	195	163	173	167	128	199	208
C	118	147	146	164	177	164	171	153	152	153	176	179
D	29	178	155	148	166	122	156	178	147	203	168	239
E	165	199	163	162	177	171	171	155	143	165	179	216
F	222	184	169	160	167	214	154	157	155	185	201	208
G	241	167	166	188	192	167	170	162	163	143	188	223
H	152	163	170	183	165	175	149	160	146	166	135	214

Damit lässt sich die bei allen 92 Substanzen im phänotypischen Assay beobachtete Aktivität nicht auf eine Hemmung des FNT zurückführen. Was der Grund für die falsch positiven Ergebnisse sein könnte wird in Kapitel 5.2 diskutiert.

### 4.3 Ähnlichkeit der FNTs humanpathogener Plasmodien

Die Proteingrößen der FNT der humanpathogenen Plasmodien sind in Tabelle 4.5 kurz dargestellt. In Hinsicht auf die Anzahl der Aminosäuren gibt es nur minimale Unterschiede zwischen den verschiedenen FNTs. In den folgenden Kapiteln sind die Ergebnisse der weiteren Charakterisierungen der FNTs dargestellt. Zunächst die Klonierung und Expression in *S. cerevisiae*-Zellen (4.3.1). Dann folgen die Ergebnisse, die mit dem biophysikalischen (4.3.3) und dem phänotypischen (4.3.2 und 4.3.4) Assay bezüglich der Initialen Transportrate, dem Wachstumsverhalten und der Inhibierung mit im Arbeitskreis vorhandenen Substanzen erzielt wurden.

Tabelle 4.5: Proteingrößen der FNTs humanpathogener Plasmodien in Anzahl an Aminosäuren und Kilo-Dalton (kDa). [Quelle: PlasmoDB, abgerufen unter <https://plasmodb.org> am 28.11.2019]

Protein	Aminosäure- anzahl	kDa
<i>Pf</i> FNT	309	34,5
<i>Pv</i> FNT	313	34,3
<i>Pk</i> FNT	314	34,6
<i>Pm</i> FNT	314	34,7
<i>Po</i> FNT	313	34,3

#### 4.3.1 Klonierung und Proteinexpression

Das *P. falciparum* FNT sowie dessen Mutante G107S waren im Arbeitskreis schon im Vektor pDRTXa vorhanden. Hier wurde nach der Transformation von *E. coli*-Zellen die DNA vervielfacht und nach Präparation der DNA eine Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen vorgenommen. Der Erfolg der Transformation wurde für *Pf*FNT durch einen Western Blot bestätigt, siehe Abbildung 4.22. Das Protein wurde mit einem Antikörper gegen den 10fach Histidin-*tag* nachgewiesen. Es sind die 10.000 g Fraktion, sowie die 100.000 g Fraktion aufgetragen. Man sieht bei *Pf*FNT zwei Banden, eine entspricht dem Monomer eine dem Dimer [16]. Der Leervektor pDRTXa (-), welcher nicht für ein rekombinantes Protein mit Histidin-*tag* kodiert, ist auf dem Blot als Negativkontrolle eingesetzt worden. Die Signalstärke der Banden aus der 10.000 g Fraktion und der 100.000 g Fraktion scheinen einen geringen Unterschied aufzuweisen. Aufgeschlossen wurden die Zellen hier wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben.



## Ergebnisse

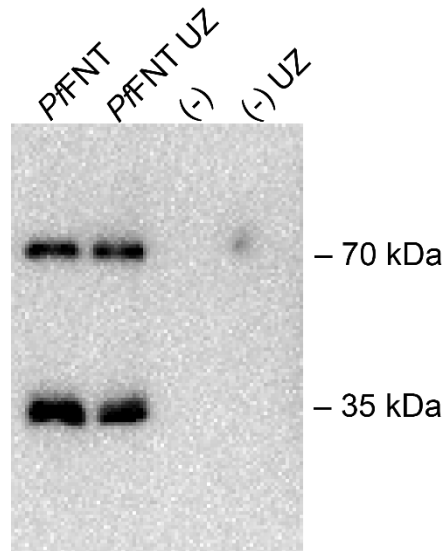


Abbildung 4.22: Western Blot von *PfFNT* und dem Leervektor. Aufgetragen sind jeweils eine 10.000 g Fraktion und die Fraktion aus der Ultrazentrifuge (UZ). Zu sehen sind für *PfFNT* die Bande des Monomers (35 kDa) und die des Dimers (70 kDa). Verwendeter Antikörper: Anti-Penta-His. Belichtungszeit: 2 min; Auftragsmenge: 30 µg

Die Expression der Resistenzmutante des *P. falciparum* FNT, G107S, ist in Abbildung 4.23 zu sehen. Als Negativkontrolle hier wieder die Proteinfraktion der mit Leervektor pDRTXa (-) transformierten und aufgeschlossenen Hefezellen. Es ist keine Dimer-Bande zu erkennen. Hier wurde zum Aufschluss der Zellen mit der Methode nach Kushnirov gearbeitet (vgl. 3.2.2). Bei diesem Versuch wurde keine Proteinkonzentration gemessen, es sollte hier aber auch kein Vergleich der Expressionslevel stattfinden.

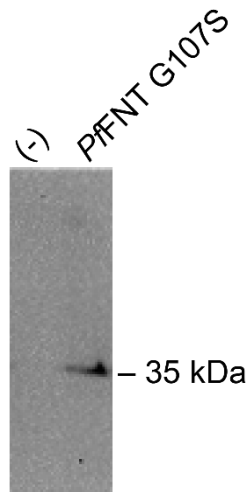


Abbildung 4.23: Western Blot von *PfFNT* G107S und dem Leervektor. Aufgetragen hier jeweils nach dem Zellaufschluss nach Kushnirov. Zu sehen ist die Bande des Monomers von *PfFNT* G107S (35 kDa). Verwendeter Antikörper: Anti-Penta-His. Belichtungszeit: 2 min

Das DNA-Fragment kodierend für *P. vivax* FNT musste zunächst in den verwendeten Vektor legiert werden. Das entsprechende Gen lag im Vektor pUC57 vor. Durch Verdau des intakten *PfFNT*-pDRTXa-Konstruktes konnte ein reines Vektor-Fragment ohne *insert* erhalten werden.

## Ergebnisse

Da die Gene kodierend für *PvFNT* und *PfFNT* von der Länge her nicht zu unterschieden sind, wurde ein Kontrollverdau mit dem Restriktionsenzym *AclI* durchgeführt. *AclI* schneidet zweimal in *PfFNT*-pDRTXa und *PvFNT*-pUC57 während in *PvFNT*-pDRTXa dreimal geschnitten wird. In Abbildung 4.24 sieht man welche DNA-Fragmente zu erwarten waren und welche nach der Klonierung auftraten. Dabei stellen Probe 1 und 2 Kontrollen dar und 3 das klonierte Konstrukt.

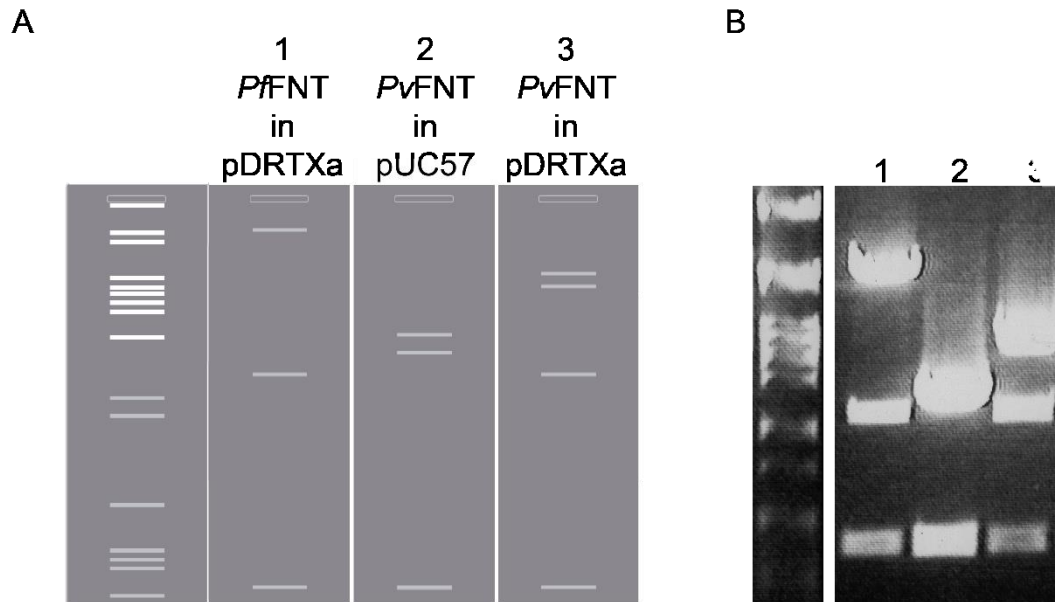


Abbildung 4.24: Kontrollverdau legierter Fragmente von *PvFNT*-DNA und Kontrollen mit *AclI*. A zeigt welche DNA-Fragmente durch den Verdau bei dem jeweiligen Konstrukt zu erwarten sind. Unter B ist die Trennung der Fragmente im Agarosegel nach dem Verdau gezeigt. 1 *PfFNT*-pDRTXa; 2 *PvFNT*-pUC57; 3 *PvFNT*-pDRTXa. Erstellt mit Genome Compiler unter <https://designer.genomecompiler.com/app>.

Das klonierte Konstrukt ist in B aufgetragen und zeigt die DNA-Fragmente, die mit diesem Verdau zu erwarten waren, siehe A von Abbildung 4.24. *PvFNT* konnte demnach erfolgreich in pDRTXa legiert werden. Andere Plasmodium FNTs wurden bereits in pDRTXa-Vektor legiert vom Hersteller bezogen. Abbildung 4.25 zeigt die erfolgreiche Proteinexpression.

## Ergebnisse

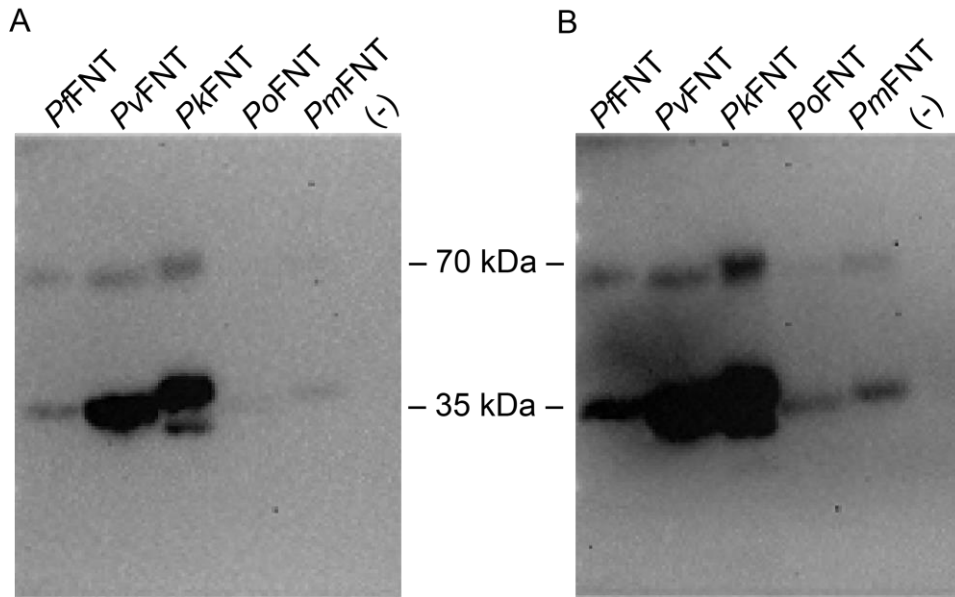


Abbildung 4.25: Western Blot der 10.000 g Fraktionen der FNTs humanpathogener Plasmodien. Unter A ist der Western Blot nach 1,5 min Belichtungszeit zu sehen. Unter B derselbe Western Blot nach 3 min Belichtungszeit. Verwendeter Antikörper: Anti-HA. Der Leervektor (-) wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Aufgetragene Proteinmenge 20 µg

Derselbe Blot ist mit zwei unterschiedlichen Belichtungszeiten gezeigt. Bei 1,5 min Belichtungszeit kann man für *PkFNT* eine Doppelbande erkennen. Die Banden von *PoFNT* und *PmFNT* sind kaum sichtbar. Nach 3 min Belichtungszeit sind auch die Banden von *PoFNT*, sowie *PmFNT* sichtbar. Es konnte demnach gezeigt werden, dass alle FNTs exprimiert wurden.

Zur besseren Beurteilung dieser Ergebnisse wurden zwei *total protein staining*-Methoden verwendet, siehe Abbildung 4.26. Es wurde im gleichen Versuch ein zusätzliches Gel zur Trennung der Proteinextrakte angefertigt, wobei die getrennten Proben im Anschluss nicht auf eine Membran übertragen wurden. Das Gel wurde stattdessen mit einer Coomassie Brilliant Blau-Lösung inkubiert. Außerdem wurde dieselbe Membran welche schon mit dem HA-Antikörper behandelt worden war, im Anschluss nochmal mit Ponceau S gefärbt, um auch einen direkten Vergleich der Gesamtproteinmengen zu haben. [94, 95].

## Ergebnisse

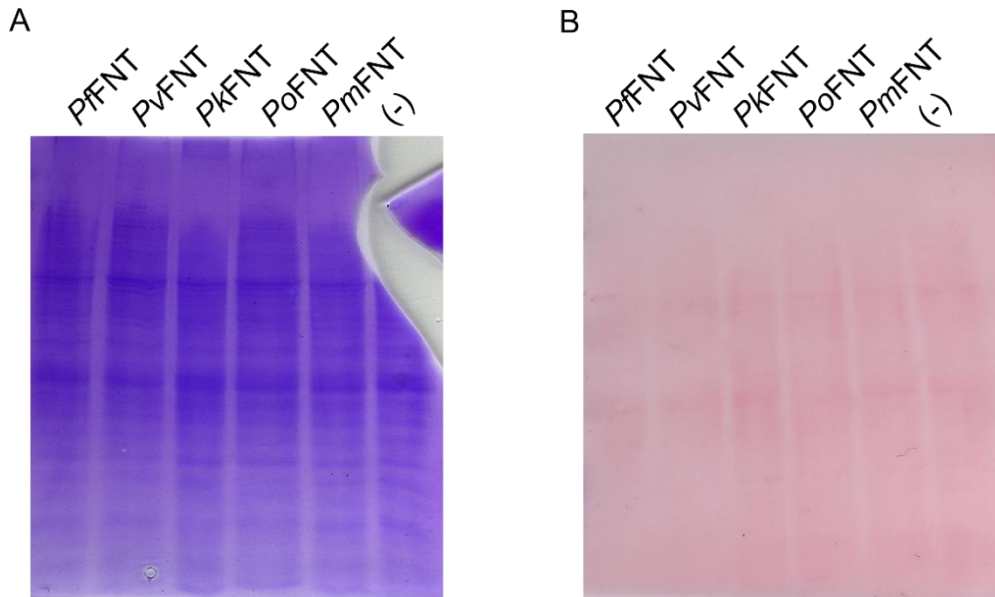


Abbildung 4.26: Kontrolle des Proteinauftrags. (A) Ein Gel wurde mit den identischen Proteinmengen beladen und direkt mit Coomassie versetzt. (B) HA-Antikörper-Membran gefärbt mit Ponceau S.

Es ist an der gleichen Farbintensität der *lanes* zu sehen, dass gleichviel Gesamtprotein in jede Geltasche gefüllt worden war.

In Abbildung 4.26 sind noch zwei weitere Blots von *PkFNT* gezeigt. Hier ist aufgrund der Abbruchfragmente zu erkennen, dass das Protein nicht komplett stabil ist.

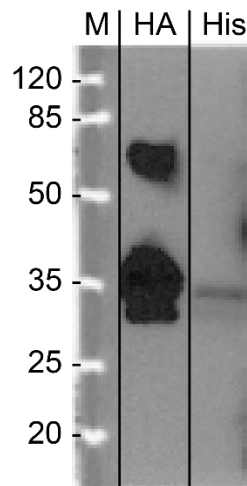


Abbildung 4.27: Expression von *PkFNT* dargestellt in zwei Western Blots. M zeigt die Markerbanden, die angegebenen Zahlen entsprechen der Proteingröße in kDa. Der mit HA gekennzeichnete Blot wurde mit dem Anti-HA-Antikörper inkubiert. Mit His gekennzeichnet der Blot, welcher mit dem Anti-His-Antikörper inkubiert wurde. Belichtungszeit: 3 Minuten; aufgetragene Gesamtproteinmenge 10 µg.

Die Proteinlösung, welche bei den gezeigten Blots verwendet wurde, entstammt demselben Ansatz. Für diese beiden Blot wurde der Proteinauftrag nicht zusätzlich überprüft, eine Bewertung dahingehend ist deshalb nicht möglich.

#### 4.3.2 Wachstumsverhalten der mit den FNTs transformierten *S. cerevisiae*-Zellen

Nach Transformation der *S. cerevisiae*-Zellen W303-1A mit Vektoren, die codierende Sequenzen für die humanpathogenen FNTs enthalten, wurden diese auf ihr Wachstumsverhalten in verschiedenen Medien untersucht.

In Glukose-haltigem SD-Medium zeigten die transformierten *S. cerevisiae*-Zellen ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten. Die Wachstumsdaten in Glukose-haltigem SD-Medium wurden von *S. cerevisiae*-Suspensionen in Erlenmeyerkolben erhalten. Die  $OD_{600}$  wurde mit dem Bio-photometer bestimmt, aus diesem Grund gibt es keine durchgängigen Messreihen. Ein direktes Ablesen der Verdopplungszeit war aus diesem Grund nicht möglich. Um diese dennoch zu bestimmen, wurde in Abbildung 4.28 die logarithmierte  $OD_{600}$  gegen die Zeit in h aufgetragen. Durch das Logarithmieren entsteht ein linearer Zusammenhang zwischen  $OD_{600}$  und der Wachstumsdauer. Aus der erhaltenen Geraden lässt sich die Steigung  $k$  ablesen. Aus  $k$  wiederum lässt sich die Verdopplungszeit berechnen. Die  $R^2$ -Werte der erhaltenen Geraden sind alle größer als 0,97 und damit ausreichend linear.

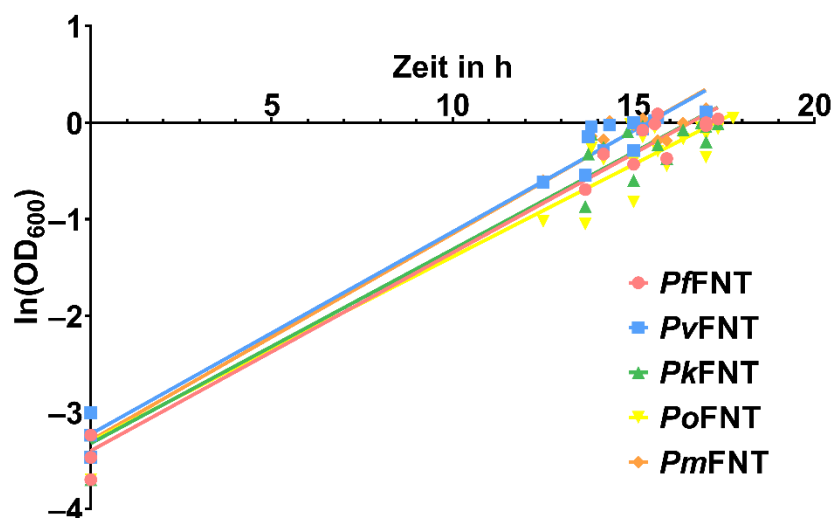


Abbildung 4.28: Halblogarithmische Darstellung des Wachstums von FNT-Hefen. Alle Messwerte sind einzeln aufgetragen. Die Daten stammen von sieben verschiedenen Messtagen.

Die Verdopplungszeiten für die fünf Proteine sind in Tabelle 4.6 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Verdopplungszeiten in SD-Medium sehr ähnlich sind.

Tabelle 4.6: Verdopplungszeiten in h der mit humanpathogenen FNTs transformierten *S. cerevisiae*-Zellen in SD-Medium.

<i>PfFNT</i>	<i>PvFNT</i>	<i>PkFNT</i>	<i>PoFNT</i>	<i>PmFNT</i>
3,4 h	3,3 h	3,4 h	3,6 h	3,2 h

## Ergebnisse

In L-Laktat-Medium zeigen die *S. cerevisiae*-Zellen ein langsames Wachstum als in Glukosehaltigem Medium. Hier wurden die Wachstumsdaten mit dem Bioscreen aufgenommen, aus diesem Grund ist eine einfachere Ermittlung der Verdopplungszeiten möglich. Die normierten Wachstumsdaten sind in Abbildung 4.29 gegen die Zeit aufgetragen. Die Verdopplungszeit wurde ermittelt für die Zeit, welche die transformierten *S. cerevisiae*-Zellen brauchten, um von einer  $OD_{420-580\text{ nm}}$  von 0,015 auf 0,03 anzuwachsen. Im Zeitraum zwischen 22 und 48 h war die Linearität für alle Kurven gegeben ( $R^2$ -Werten größer 0,99). In Abbildung 4.29 ist auch ersichtlich, dass Zellen die PfFNT exprimieren absolut eine höhere Zellzahl erreichen als Zellen, die eines der anderen FNTs exprimieren.

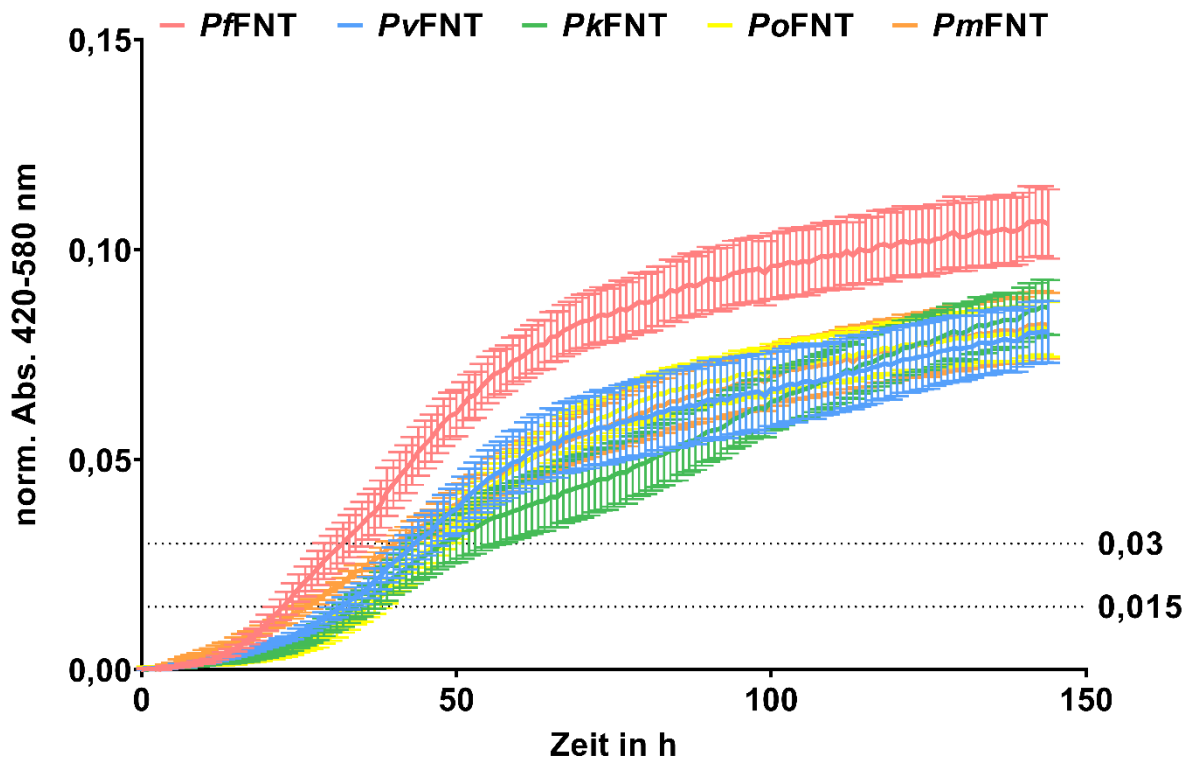


Abbildung 4.29: Wachstum der mit humanpathogenen FNTs transformierten *S. cerevisiae*-Zellen in L-Laktat-Medium. PfFNT (■), PvFNT (■), PkFNT (■), PoFNT (■) und PmFNT (■). Aufgetragen ist der Mittelwert. Normiert wurde durch Subtraktion des Messwertes bei  $t_0$  von jedem Messwert. Mit gepunkteten Linien sind die Abs.-Grenzen dargestellt, welche für die Bestimmung der Verdopplungszeit herangezogen wurden.  $N = 3$  mit 5-8 wells je Protein; Fehler stellen StA dar.

Die ermittelten Verdopplungszeiten von einer normierten Abs. von 0,015 auf 0,03 sind in Tabelle 4.7 dargestellt. Es ist im Vergleich zum Glukose-SD-Medium ein deutlicher Unterschied zwischen den Zellen zu erkennen, abhängig vom jeweils exprimierten Protein.

## Ergebnisse

Tabelle 4.7: Mediane und Mittelwerte der Verdopplungszeiten in h der mit DNA, für humanpathogene FNTs kodierend, transformierten *S. cerevisiae*-Zellen in L-Laktat-Medium. Die Werte wurden ermittelt aus den Verdopplungszeiten jeder einzelnen Kurve, die den Mittelwerten welche in Abbildung 4.29 gezeigt sind, zugrunde liegen.

	<i>Pf</i> FNT	<i>Pv</i> FNT	<i>Pk</i> FNT	<i>Po</i> FNT	<i>Pm</i> FNT
Median	5,7 h	12,0 h	9,5 h	9,0 h	17,0 h
Mittelwert	7,4 h	21,9 h	12,2 h	9,7 h	18,0 h

Es wurden sowohl die Mediane als auch die Mittelwerte angezeigt, da teilweise größere Unterschiede zwischen beiden bestehen. Aufgrund dieser Datenlage wurden zwei unterschiedliche Signifikanztests gemacht, einmal ein *one-way ANOVA*-Test, welcher mit Mittelwerten arbeitet und einmal der Kruskal-Wallis-Test, welcher Mediane zur Bewertung verwendet. Beide Tests gaben mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $<0,0001$  an, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Generationszeiten der einzelnen Proteine besteht. Im Einzelnen zeigte sich dies vor allem zwischen *Pf*FNT und *Pv*FNT ( $P = 0,0002$  im *ANOVA* und  $0,0003$  bei Kruskal-Wallis), sowie zwischen *Pf*FNT und *Pm*FNT ( $P = 0,0125$  im *ANOVA* und  $<0,0001$  bei Kruskal-Wallis).

In Kapitel 5.3.2 werden die Wachstumsdaten mit den Daten über die direkte Aufnahme von L-Laktat aus dem nächsten Kapitel verglichen.

### 4.3.3 Aufnahme von L-Laktat

Die Daten zur Aufnahme von L-Laktat wurden wie in 3.3.1 beschrieben mit dem biophysikalischen Assay aufgenommen. In diesem Fall wurde der Einzelfilter-Assay verwendet. In Abbildung 4.30 ist die Aufnahme in  $\text{nmol mg}^{-1}$  Hefe gegen die Zeit in Sekunden aufgetragen. Mit Ausnahme von *Pm*FNT ist der Kurvenverlauf für alle Proteine sehr ähnlich. Auch das Plateau, also das Aufnahmemaximum, ist bei allen Proteinen sehr nah beieinander.

## Ergebnisse

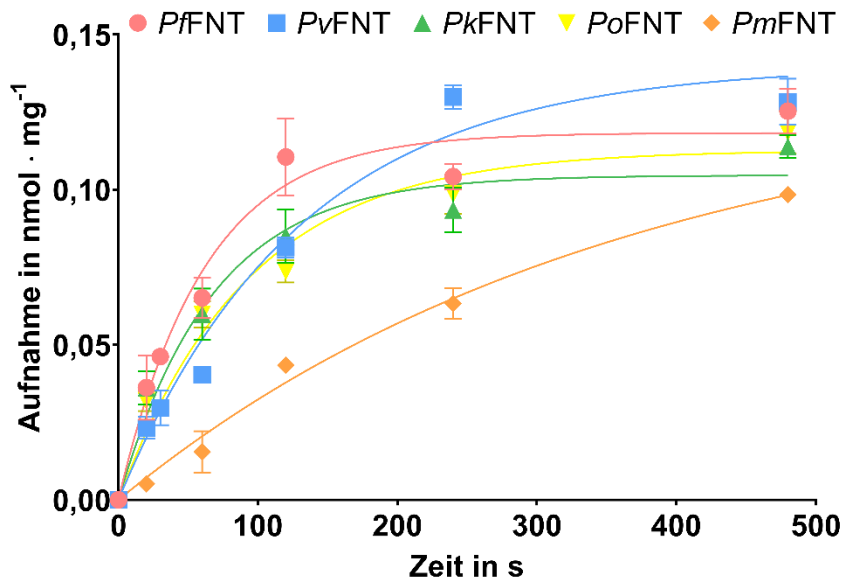


Abbildung 4.30: Aufnahme von L-Laktat durch PfFNT (●), PvFNT (■), PkFNT (▲), PoFNT (▼) und PmFNT (◆). Aufgetragene Fehler sind SEM. N = 2-7 mit jeweils drei biologischen Replikaten.

Für die Mittelwerte aller Datenpunkte der Aufnahme eines Proteins wurde ein *one-way ANOVA* durchgeführt. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Mittelwerten der unterschiedlichen Proteine festgestellt werden. Die  $R^2$ -Werte des Kurven-fitting sind in Tabelle 4.8 dargestellt.

Tabelle 4.8:  $R^2$ -Werte des Kurvenfittings.

	PfFNT	PvFNT	PkFNT	PoFNT	PmFNT
$R^2$	0,7223	0,8991	0,6500	0,7892	0,8834

Durch das *fitting* an die Messwerte konnte die initiale Transportrate aller Proteine bestimmt werden, welche die Steigung bei 0 min darstellt. Die initiale Transportrate ist in Abbildung 4.31 dargestellt. Ein *one way ANOVA* ergab, dass ein signifikanter Unterschied in der L-Laktat Aufnahmerate zwischen allen Proteinen besteht ( $P < 0,0001$ ;  $\alpha = 0,05$ ).



## Ergebnisse

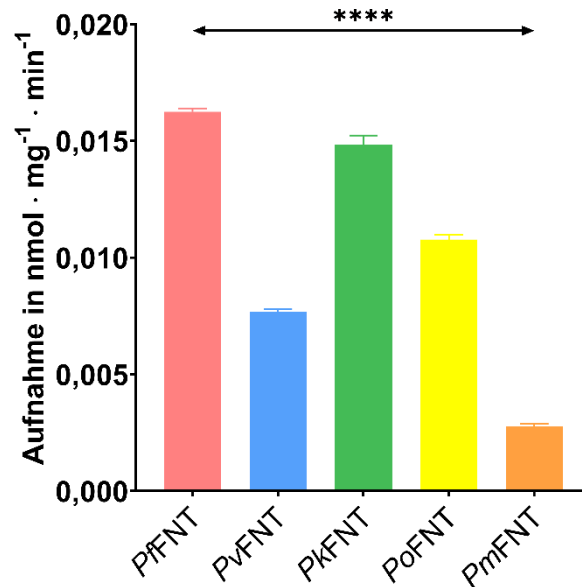


Abbildung 4.31: Initiale Transportrate für L-Laktat mit den Proteinen PfFNT (■), PvFNT (■), PkFNT (■), PoFNT (■) und PmFNT (■). Aufgetragene Fehler sind SEM.  $P < 0,0001$ ;  $\alpha = 0,05$ ;  $N = 2-7$  mit jeweils drei biologischen Replikaten.

Die FNTs aus *P. falciparum*, *vivax*, *knowlesi*, *ovale* und *malariae* zeigen ähnliche Aufnahmekurven von L-Laktat über die Zeit, aber signifikant unterschiedliche initiale Transportraten.

### 4.3.4 Hemmung des *S. cerevisiae*-Wachstums durch Inhibitoren

Im Arbeitskreis waren durch die Arbeit von André Golldack einige Inhibitoren für *P. falciparum* FNT verfügbar [96], welche nun an allen humanpathogenen FNTs, sowie der Resistenzmutante PfFNT G107S, getestet werden sollten.

Für diese Testung wurde der entwickelte Resazurin-Wachstums-Assay gewählt. Die getesteten Substanzen wurden nach ihren wichtigsten strukturellen Unterschieden in Gruppen eingeteilt. Ein Prodrug-Prinzip liegt vor, wenn ein Ringschluss möglich ist, siehe Abbildung 4.32. Dieser Ringschluss kann nur bei Substanzen stattfinden, welche die vinyloge Carbonsäure und die dazu ortho-ständige Hydroxylgruppe aufweisen. Es liegt dann eine Tautomerie zwischen dem Hemiketal und der vinylogen Säure vor.

## Ergebnisse

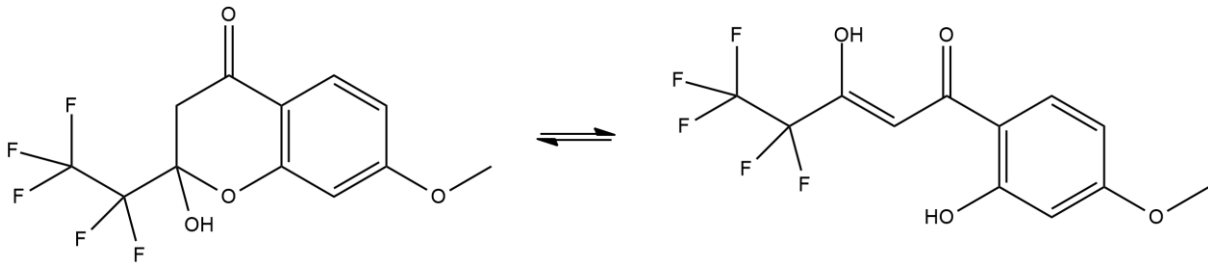
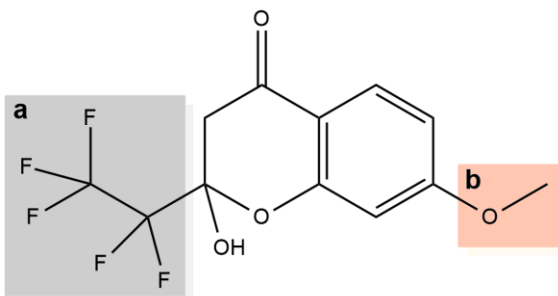


Abbildung 4.32: Das Prodrug-Prinzip; Tautomerie zwischen dem Hemiketal (links) und der vinylogenen Säure (rechts). Zum besseren Verständnis der Gruppeneinteilung ist in Abbildung 4.33 dargestellt, auf welchen Teil der Struktur sich die Einteilung jeweils bezieht.

Die Gruppen sind wie folgt:

- I. Mit Prodrug-Prinzip
  - a. Unterschiedliche (Fluor-)Alkylketten (blaugrau)
  - b. Unterschiedliche Substitution am Aromaten (orange)
- II. Fehlendes Prodrug-Prinzip:
  - a. Benzol ausgetauscht oder substituiert (gelb)
  - b. Mit Linker (blau)
  - c. Abwandlungen am Pharmakophor (grün)
- III. Andere (grau, nicht in Abbildung 4.33 gezeigt)

### I Mit Prodrug Prinzip



### II Ohne Prodrug Prinzip

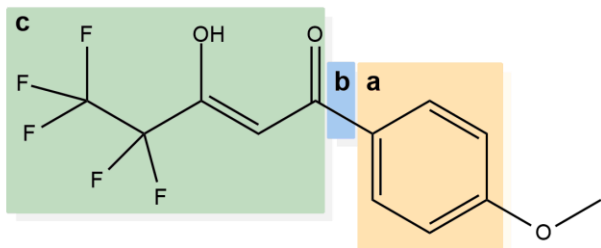


Abbildung 4.33: Gruppeneinteilung der Substanzen

In Tabelle 5.2 auf Seite 109 sind die Strukturformeln der einzelnen Substanzen einsehbar.

In Abbildung 9.1 bis Abbildung 9.10 im Anhang sind alle erhaltenen Hemmkurven dargestellt. Die Kurven wurden durch *fitting* mit der Hill-Gleichung erhalten. Auf der y-Achse ist die Hemmung in Prozent, bezogen auf die verwendeten Kontrollen gegen die logarithmierte Konzentration in  $\mu\text{M}$  aufgetragen. Bei einigen Substanzen ist eine starke Ähnlichkeit in der Hemmung der unterschiedlichen FNT zu erkennen, während bei anderen deutliche Unterschiede zu

## Ergebnisse

erkennen sind. In einigen Abbildungen fällt besonders *PvFNT* auf, welches in blau dargestellt ist und häufig den größten  $IC_{50}$ -Wert aufweist.

Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte sind in Tabelle 4.9, Tabelle 4.10 und Tabelle 4.11 aufgelistet. Da die höchste eingesetzte Konzentration 1000  $\mu\text{M}$  war, sind alle  $IC_{50}$ -Werte darüber nicht bestimmbar. Im Fall einer fehlenden Hemmung wurde der  $IC_{50}$ -Wert trotzdem extrapoliert, diese Werte dürfen allerdings als nicht mehr als eine vorsichtige Schätzung angesehen werden.

## Ergebnisse

Tabelle 4.9: IC<sub>50</sub>-Werte von PfFNT und PvFNT angegeben in µM. Die Werte sind nach ihrer Größe geordnet und alle IC<sub>50</sub>-Werte kleiner als 2 µM sind in grün gekennzeichnet, Werte über 1000 µM in orange.

PfFNT			PvFNT		
9	BH-326	0,2	13	BH-388	1,4
10	BH-362	0,3	22	BH-454	4,7
11	BH-317	0,3	18	BH-301	6,7
6	MMV000972	0,4	11	BH-317	7,6
1	BH-312	0,6	21	BH-306	8,3
18	BH-301	0,8	15	BH-317.2	9,7
13	BH-388	0,9	7	STK700988	9,9
21	BH-306	1,1	30	BH-296.2	11,1
7	STK700988	1,1	16	BH-296	11,2
15	BH-317.2	1,2	23	BH-255/2	11,2
12	BH-340	1,3	25	BH-324.2	12,6
20	BH-255/3	1,4	36	BH-301.2	13,5
17	BH-269	2,1	20	BH-255/3	14,0
23	BH-255/2	2,3	10	BH-362	17,8
16	BH-296	2,7	12	BH-340	22,0
3	STL298501	3,0	17	BH-269	25,1
5	STL298500	9,3	5	STL298500	29,2
24	BH-292	9,5	9	BH-326	34,2
36	BH-301.2	9,6	24	BH-292	35,7
28	BH-242	10,7	28	BH-242	54,3
35	BH-346	11,3	29	BH-246	79,1
29	BH-246	12,0	1	BH-312	91,5
30	BH-296.2	13,4	35	BH-346	133,2
25	BH-324.2	27,7	33	Nifluminsäure	147,3
4	STL298499	32,0	26	BH-310	202,0
2	STK806304	40,3	14	BH-262	307,3
22	BH-454	46,8	4	STL298499	319,0
19	Pharmakophor	61,4	3	STL298501	325,3
14	BH-262	81,3	19	Pharmakophor	817,2
26	BH-310	108,1	6	MMV000972	1000,0
32	BH-238	132,7	31	BH-234	1000,0
33	Nifluminsäure	141,2	37	BH-298	1129,0
37	BH-298	372,8	8	STK806381	1162,0
8	STK806381	946,0	2	STK806304	2056,0
31	BH-234	8093,0	32	BH-238	7607,0

## Ergebnisse

Tabelle 4.10: IC<sub>50</sub>-Werte von PkFNT und PoFNT angegeben in µM. Die Werte sind nach ihrer Größe geordnet und alle IC<sub>50</sub>-Werte kleiner als 2 µM sind in grün gekennzeichnet, Werte über 1000 µM in orange.

PkFNT			PoFNT		
13	BH-388	1,2	11	BH-317	1,1
11	BH-317	1,2	18	BH-301	1,2
18	BH-301	1,4	13	BH-388	1,2
21	BH-306	1,4	21	BH-306	1,3
7	STK700988	1,6	7	STK700988	1,4
15	BH-317.2	2,1	15	BH-317.2	1,4
9	BH-326	2,4	9	BH-326	2,2
12	BH-340	6,0	6	MMV000972	2,7
10	BH-362	8,4	12	BH-340	3,6
6	MMV000972	9,8	10	BH-362	3,8
5	STL298500	9,9	22	BH-454	5,3
22	BH-454	10,1	1	BH-312	6,6
20	BH-255/3	10,5	17	BH-269	9,8
17	BH-269	10,8	20	BH-255/3	9,9
23	BH-255/2	10,9	23	BH-255/2	10,2
36	BH-301.2	11,2	30	BH-296.2	10,4
16	BH-296	12,0	5	STL298500	10,4
1	BH-312	12,0	24	BH-292	11,5
35	BH-346	13,5	16	BH-296	11,6
25	BH-324.2	13,9	36	BH-301.2	13,7
28	BH-242	14,7	35	BH-346	14,0
24	BH-292	18,6	28	BH-242	14,1
30	BH-296.2	30,7	25	BH-324.2	26,9
4	STL298499	40,6	4	STL298499	44,0
29	BH-246	97,4	29	BH-246	79,1
3	STL298501	113,1	3	STL298501	103,7
14	BH-262	116,2	32	BH-238	107,5
32	BH-238	118,3	14	BH-262	113,2
33	Nifluminsäure	181,4	26	BH-310	241,3
26	BH-310	192,1	19	Pharmakophor	280,4
2	STK806304	767,0	2	STK806304	324,8
37	BH-298	776,1	33	Nifluminsäure	617,8
8	STK806381	2238,0	8	STK806381	762,3
19	Pharmakophor	6187,0	37	BH-298	886,3
31	BH-234	22809,0	31	BH-234	2852,0

## Ergebnisse

Tabelle 4.11: IC<sub>50</sub>-Werte von PmFNT und PfFNT G107S angegeben in µM. Die Werte sind nach ihrer Größe geordnet und alle IC<sub>50</sub>-Werte kleiner als 2 µM sind in grün gekennzeichnet, Werte über 1000 µM in orange.

PmFNT			G107S		
11	BH-317	1,2	18	BH-301	1,4
18	BH-301	1,3	13	BH-388	1,7
13	BH-388	1,3	7	STK700988	3,2
21	BH-306	1,4	11	BH-317	3,7
7	STK700988	1,5	21	BH-306	4,2
10	BH-362	5,2	15	BH-317.2	9,2
15	BH-317.2	5,7	22	BH-454	10,0
9	BH-326	5,8	5	STL298500	10,8
12	BH-340	7,6	36	BH-301.2	12,4
22	BH-454	10,6	23	BH-255/2	12,7
30	BH-296.2	10,8	10	BH-362	13,2
24	BH-292	11,2	28	BH-242	13,6
20	BH-255/3	11,3	9	BH-326	13,8
23	BH-255/2	11,4	20	BH-255/3	14,0
16	BH-296	11,5	16	BH-296	14,1
36	BH-301.2	12,0	35	BH-346	16,5
6	MMV000972	12,2	30	BH-296.2	18,8
35	BH-346	13,0	25	BH-324.2	21,1
28	BH-242	14,6	12	BH-340	29,8
5	STL298500	19,1	17	BH-269	34,6
17	BH-269	26,9	24	BH-292	38,7
25	BH-324.2	29,4	4	STL298499	83,4
29	BH-246	54,4	32	BH-238	87,5
1	BH-312	55,9	29	BH-246	98,5
4	STL298499	107,4	1	BH-312	124,1
3	STL298501	107,6	33	Nifluminsäure	134,4
33	Nifluminsäure	121,8	3	STL298501	143,4
14	BH-262	320,6	6	MMV000972	152,8
2	STK806304	521,4	26	BH-310	499,6
32	BH-238	654,0	14	BH-262	736,3
8	STK806381	689,3	37	BH-298	808,9
26	BH-310	947,8	19	Pharmakophor	1000,0
37	BH-298	1186,0	31	BH-234	1655,0
31	BH-234	3207,0	8	STK806381	1677,0
19	Pharmakophor	29409,0	2	STK806304	4795,0

Im Folgenden wurde untersucht, wie weit die mit dem Wachstums-Assay erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte von vorher schon bekannten Werten, welche mit dem biophysikalischen Assay gemessen wurden, vergleichbar sind [96]. Die Faktoren sind in Tabelle 4.12 angegeben. Substanzen, welche keinen genauen, zuvor ermittelten Wert haben, sind nicht mit angegeben.

## Ergebnisse

Tabelle 4.12: Vielfache der IC<sub>50</sub>-Werte aus dem Wachstums-Assay und aus dem biophysikalischen Assay angegeben als Faktoren. Mit \* markierte zeigten bei Christian Hansen unbestimmbare IC<sub>50</sub>-Werte.

Nr.	Substanz	<i>PfFNT</i>	G107S
1	BH-312	3,5	5,6
2	STK806304	*36,6	
3	STL298501	*10,0	
4	STL298499	0,7	
5	STL298500	0,2	
6	MMV000972	2,4	3,7
7	STK700988	0,2	
9	BH-326	0,8	
10	BH-362	1,2	
11	BH-317	2,5	
12	BH-340	3,3	
13	BH-388	1,0	
14	BH-262	*73,9	1,5
15	BH-317.2	4,6	
16	BH-296	19,3	5,2
17	BH-269	16,2	2,3
18	BH-301	6,7	0,2
19	Pharmakophor	32,3	123,5
20	BH-255/3	7,0	1,1
21	BH-306	6,1	0,3
22	BH-454	*15,6	
23	BH-255/2	14,4	1,1
24	BH-292	36,5	1,5
25	BH-324.2	173,1	3,3
26	BH-310	72,1	7,1
28	BH-242	1,6	
29	BH-246	10,9	
30	BH-296.2	13,4	
32	BH-238	0,6	
33	Nifluminsäure	*2,0	
35	BH-346	28,3	3,1
36	BH-301.2	60,0	12,3

## Ergebnisse

Werte größer als 1 stehen für einen dementsprechend höheren  $IC_{50}$ -Wert im phänotypischen Assay, während Werte kleiner als 1 für einen niedrigeren  $IC_{50}$ -Wert im phänotypischen Assay stehen, als im biophysikalischen Assay. Ein höherer  $IC_{50}$ -Wert bedeutet, dass eine höhere Konzentration an Substanz nötig ist, um zu einer halbmaximalen Hemmung zu führen. Bei den meisten Substanzen zeigt sich ein Faktor um die 1, einige fallen jedoch auf. Mittelwert und Median aller Faktoren von *PfFNT* sind 20,5 und 6,8. Für G107S 11,5 und 3,1. Diese großen Unterschiede zwischen Median und Mittelwert zeigen ebenfalls, dass es einige Ausnahmen gibt. Die mit Sternchen markierten Faktoren zeigten auch bei Christian Hansen teilweise unbestimmbare  $IC_{50}$ -Werte aufgrund des Fehlens höherer Konzentrationen an Inhibitor. Christian Hansen hat im Rahmen seiner Masterarbeit den Wachstums-Assay mit den hier verwendeten Substanzen ebenfalls an *PfFNT* und *PfFNT* G107S durchgeführt.

In Tabelle 4.13 ist ein Vergleich der im Wachstums-Assay erhaltenen  $IC_{50}$ -Werte aufgetragen. Jeder  $IC_{50}$ -Wert einer Substanz wurde mit dem für *PfFNT* ebenfalls im Wachstums-Assay erhaltenen  $IC_{50}$ -Wert verglichen. Der Faktor wurde durch Division des  $IC_{50}$ -Wertes von *PfFNT* durch den jeweiligen anderen  $IC_{50}$ -Wert eines humanpathogenen FNTs erhalten. In weiß-blau sind dabei Faktoren angegeben, welche einen Faktor kleiner als 1 zeigen. Dabei handelt es sich um Substanzen, welche bei *PfFNT* einen schlechteren  $IC_{50}$ -Wert aufwiesen als bei den anderen humanpathogenen FNTs. In Hellblau sind Faktoren zwischen 1 und 10 dargestellt. Faktoren zwischen 10 und 100 sind in Blau dargestellt. Alle Faktoren die größer sind als 100 dann in Dunkelblau.



## Ergebnisse

Tabelle 4.13: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von *PfFNT* G107S, *PvFNT*, *PoFNT*, *PmFNT* und *PkFNT* mit *PfFNT*. Aufgetragen ist hier der Faktor, welcher für den Unterschied steht. Weiß-blau Faktor < 1; Hellblau 1 < Faktor < 10; Blau 10 < Faktor < 100; Dunkelblau 100 < Faktor.

Nr.	Substanz	G107S	<i>PvFNT</i>	<i>PkFNT</i>	<i>PoFNT</i>	<i>PmFNT</i>
1	BH-312	Dunkelblau	Dunkelblau	Blau	Blau	Blau
2	STK806304	Dunkelblau	Hellblau	Blau	Blau	Blau
3	STL298501	Blau	Dunkelblau	Blau	Blau	Blau
4	STL298499	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
5	STL298500	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
6	MMV000972	Dunkelblau	Blau	Blau	Hellblau	Blau
7	STK700988	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
8	STK806381	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Blau	Blau
9	BH-326	Blau	Dunkelblau	Blau	Blau	Blau
10	BH-362	Blau	Blau	Blau	Blau	Blau
11	BH-317	Blau	Blau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
12	BH-340	Blau	Blau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
13	BH-388	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
14	BH-262	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
15	BH-317.2	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
16	BH-296	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
17	BH-269	Blau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Blau
18	BH-301	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
19	Pharmakophor	Blau	Dunkelblau	Dunkelblau	Hellblau	Dunkelblau
20	BH-255/3	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
21	BH-306	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
22	BH-454	Weiß-blau	Weiß-blau	Weiß-blau	Weiß-blau	Weiß-blau
23	BH-255/2	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
24	BH-292	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
25	BH-324.2	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
26	BH-310	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
28	BH-242	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
29	BH-246	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
30	BH-296.2	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
31	BH-234	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
32	BH-238	Hellblau	Blau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
33	Nifluminsäure	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
35	BH-346	Hellblau	Blau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
36	BH-301.2	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau
37	BH-298	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau	Hellblau

Dabei zeigen einige wenige Substanzen bei den anderen Proteinen bessere IC<sub>50</sub>-Werte als bei *PfFNT*, gekennzeichnet in weiß-blau. So fällt zum Beispiel BH-454 (Substanz 22) deutlich auf da es durchweg weiß-blau gekennzeichnet ist. BH-454 zeigt allerdings bei *PfFNT* einen IC<sub>50</sub> von 47 µM und bei allen anderen Proteinen zwischen 5 und 10 µM. Im biophysikalischen Assay

## Ergebnisse

ist ein Wert von 3  $\mu\text{M}$  erzielt worden. Schaut man sich zusätzlich die Kurven an (Abbildung 9.6) ist zu sehen, dass die Werte von *PfFNT* deutlich größere Fehler aufweisen. Deshalb muss man den  $\text{IC}_{50}$ -Wert als ungenau bewerten. Die besseren  $\text{IC}_{50}$ -Werte als *PfFNT* müssen durch diesen Hintergrund vorsichtig betrachtet werden. Möglicherweise liegt kein Effekt vor. STK806381 (Substanz 8), BH-296.2 (Substanz 30), BH-234 (Substanz 31) und Nifluminsäure (Substanz 33) zeigen Faktoren um 1 und aus diesem Grund auch keinen besonderen Unterschied. BH-238 (Substanz 32) zeigte im biophysikalischen Assay einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 210  $\mu\text{M}$ . Dieser wurde im phänotypischen Assay vor allem von *PfFNT* G107S mit 88  $\mu\text{M}$  leicht verbessert. Für *PvFNT* zeigt sich dagegen rechnerisch ein  $\text{IC}_{50}$  von 7600  $\mu\text{M}$ , welcher über der höchsten gemessenen Konzentration liegt und deshalb nur extrapoliert ist. Dennoch ist es sehr interessant, dass BH-238 bei *PvFNT* scheinbar so schwach hemmt, da dies einen großen Unterschied zu den anderen FNTs darstellt. BH-324.2 (Substanz 25) fällt sowohl in Tabelle 4.12 als auch in Tabelle 4.13 auf. In Tabelle 4.12 durch den höchsten Faktor der ganzen Tabelle (173,1) und in Tabelle 4.13 durch die um den Faktor 1 liegenden Ähnlichkeiten zwischen den Proteinen. Der im biophysikalischen Assay bestimmte  $\text{IC}_{50}$  liegt bei 0,16  $\mu\text{M}$ , im Wachstums-Assay waren Werte zwischen 13  $\mu\text{M}$  und 29  $\mu\text{M}$  zu finden. Bei dieser Substanz lohnt also eine nähere Betrachtung.

Die hellblau markierten Substanzen zeigen einen Unterschied zu *PfFNT* von 1- bis 10-fach. Hier sind nur ein paar besondere hervorgehoben, welche durch andere Unterschiede rausstechen. Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert von BH-262 (Substanz 14) zeigt zwar zwischen den humanpathogenen FNTs keinen nennenswerten Unterschied, hat allerdings insgesamt einen deutlich höheren  $\text{IC}_{50}$ -Wert im Wachstums-Assay (81  $\mu\text{M}$  bei *PfFNT* bis 320  $\mu\text{M}$  bei *PmFNT*) als im biophysikalischen (1,1  $\mu\text{M}$  für *PfFNT*). Bei *PfFNT* G107S passen die Werte des phänotypischen und des biophysikalischen Assay gut zusammen. Für BH-292 (Substanz 24), BH-246 (Substanz 29) und BH-301.2 (Substanz 36) zeigt sich ein sehr ähnliches Bild. Bei BH-310 (Substanz 26) zeigt sich dies noch viel deutlicher. Hier ist der Wert für *PfFNT* 72-mal größer im Wachstums-Assay als im biophysikalischen, 108  $\mu\text{M}$  statt 1,5  $\mu\text{M}$ . Von den anderen humanpathogenen FNTs fällt vor allem *PmFNT* mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 950  $\mu\text{M}$  auf.

Die Substanzen mit mäßig großem Unterschied sind mit blau markiert. Hier liegt der Faktor zwischen 10 und 100. Bei BH-362 (Substanz 10) und BH-340 (Substanz 12) liegt der im Wachstums- und im biophysikalischen Assay gemessene  $\text{IC}_{50}$ -Wert von *PfFNT* bei ungefähr 1 während *PkFNT*, *PoFNT* und *PmFNT* Werte von 3,6 bis 8,4 zeigen, also keine allzu großen Unterschiede. Für *PvFNT* und *PfFNT* G107S dagegen wurden Werte zwischen 13 und 30 ermittelt. Hier also bis zu 68-fach so hoch wie bei *PfFNT*. BH-317 (Substanz 11) und BH-269 (Substanz 17) zeigen dies in etwas abgeschwächter Form. Interessant wird dann nochmal BH-346 (Substanz 35), welche im biophysikalischen Assay einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 0,4  $\mu\text{M}$  gezeigt hat und bei

## Ergebnisse

den humanpathogenen und der Resistenzmutante Werte zwischen 11 und 17  $\mu\text{M}$  zeigt. Hier fällt *PvFNT* deutlich raus mit einem Wert von 133  $\mu\text{M}$ .

Bei einem Faktor von mehr als 100 sind die Substanzen in Dunkelblau markiert. Am spannendsten sind hier die Unterschiede, die zwischen *PfFNT*, *PkFNT*, *PoFNT* und *PmFNT* sowie *PvFNT* und der Resistenzmutante *PfFNT* G107S zu erkennen sind. Bei BH-312 (Substanz 1) liegt der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für *PfFNT* aus dem biophysikalischen Assay bei 0,17  $\mu\text{M}$  und im Wachstums-Assay bei 0,6  $\mu\text{M}$ . Es zeigt sich also ein Faktor von 3,5. Für die Resistenzmutante liegt der Faktor bei 5,6, also ebenfalls sehr nahe beieinander. Dafür zeigt *PvFNT* im Wachstums-Assay bei 92  $\mu\text{M}$  die halbmaximale Hemmung, während es im biophysikalischen Assay schon bei 0,25  $\mu\text{M}$  liegt. Dies ist ein Faktor von ca. 370, also ein deutlicher Unterschied. Die anderen humanpathogenen FNTs liegen zwischen *PvFNT* und *PfFNT*. STK806304 (Substanz 2) zeigt ein sehr ähnliches Bild, nur dass hier alle Werte insgesamt deutlich höher liegen. STL198501 (Substanz 3) zeigt für *PfFNT* einen Faktor von 10, während alle anderen Proteine davon mit Faktoren zwischen 35 und 110 abweichen. Interessant ist auch MMV00972 (Substanz 6), welches vergleichbare Werte zeigt (0,17  $\mu\text{M}$  im biophysikalischen auf bis zu 12  $\mu\text{M}$  im Wachstums-Assay), bis auf die Resistenzmutante (153  $\mu\text{M}$ ) und *PvFNT* (1000  $\mu\text{M}$ ). Dieses Bild etwas abgeschwächt zeigt sich auch für BH-326 (Substanz 9). Ein weiteres sehr interessantes Ergebnis liefert das Pharmakophor (Substanz 19), welches statt der 1,9  $\mu\text{M}$  aus dem biophysikalischen Assay für *PfFNT*, 61  $\mu\text{M}$  im Wachstums-Assay zeigt. Die anderen fünf Proteine zeigen hier Werte über 280  $\mu\text{M}$ , teilweise weit oberhalb der höchsten gemessenen Konzentration. Es wurde also für *PfFNT* G107S, *PkFNT* und *PmFNT* gar keine Hemmung festgestellt.

### 4.3.5 Hemmung der L-Laktat-Aufnahme durch Inhibitoren

Bei wichtigen Substanzen wurde auch direkt die Aktivität der FNTs für L-Laktat-Aufnahme getestet. Zunächst wurde die Aktivität des *P. falciparum* und des *P. vivax* FNT gegen BH-312 getestet. Dabei zeigten sich sehr ähnliche  $\text{IC}_{50}$ -Werte. *PfFNT* hat hier einen  $\text{IC}_{50}$  von  $0,13 \mu\text{M} \pm 0,02 \mu\text{M}$  während *PvFNT*  $0,25 \mu\text{M} \pm 0,10 \mu\text{M}$  zeigt. Die Kurven wurden in Abbildung 4.34 mit Hilfe der Hill-Gleichung gefittet.

## Ergebnisse

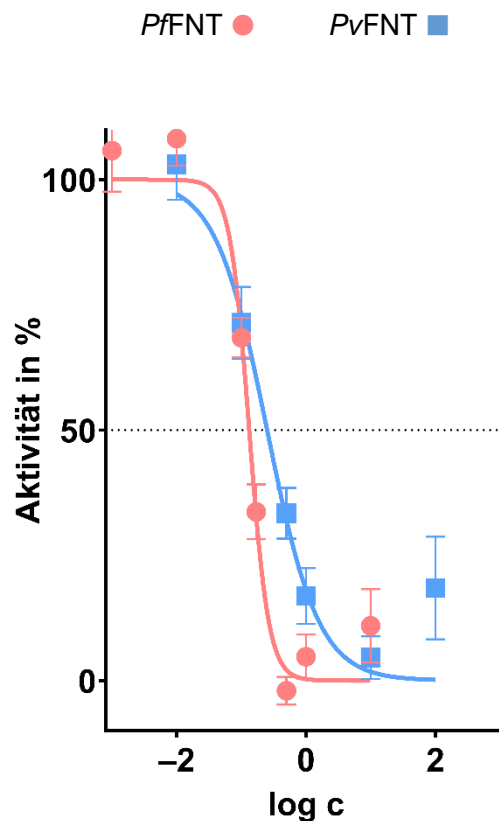


Abbildung 4.34: Aktivität des FNT gegen die logarithmierte InhibitorKonzentration von BH-312. Es wurde eine Dreifach-Bestimmung von jeweils drei Replikaten durchgeführt. Aufgetragene Fehler sind SEM.

Die  $IC_{50}$ -Werte liegen nahe beieinander, wenn auch die Kurven nicht exakt aufeinander liegen.

Nach erfolgter Klonierung und Proteinexpression zeigten die FNTs der humanpathogenen Plasmodien in Glukose-haltigem Medium ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten. In L-Laktat-haltigem Medium zeigten sich dagegen signifikante Unterschiede. *PfFNT* zeigte die kleinste Verdopplungszeit, gefolgt von *PoFNT* und *PkFNT*. *PvFNT* und *PmFNT* zeigten je nach Auswertung abwechselnd die höchste Verdopplungszeit. Die Betrachtung der initialen L-Laktat-Transportrate ergab folgendes Ergebnis, sortiert nach absteigender Rate: *PfFNT*, *PvFNT*, *PkFNT*, *PoFNT*, *PmFNT*. Bei der Hemmung des Wachstums durch bereits bekannte Substanzen fiel eine Diskrepanz der Ergebnisse auf. Eine genauere Bewertung erfolgt in Kapitel 5.3.3. Die Hemmung des L-Laktat-Transportes durch BH-312 gemessen an *PfFNT* und *PvFNT* zeigte keine großen Unterschiede.

### 4.4 Versuche zur Umgehung der Resistenz

Im Anschluss wurden zwei Substanzen, welche von André Golldack überlegt waren, auf ihre Fähigkeit die Resistenz G107S zu umgehen getestet. Für BH-346 (Substanz 35, Struktur auf Seite 109) wurde für *PfFNT* ein  $IC_{50}$ -Wert von  $0,40 \mu\text{M} \pm 0,07 \mu\text{M}$  erhalten, währenddessen zeigte die Resistenzmutante *PfFNT* G107S einen  $IC_{50}$ -Wert von  $5,28 \mu\text{M}$ . Die Angabe eines

## Ergebnisse

Fehlers wäre hier nicht aussagekräftig, da die niedrigste, gemessene Konzentration einen sehr hohen Fehler aufweist. Dieser reicht bis an 50 % Hemmung heran. Der Fehler dieses  $IC_{50}$ -Wertes muss also allgemein als groß bezeichnet werden. Die Resistenz führt also zu einer Verschlechterung des  $IC_{50}$ -Wertes um etwa das zehnfache. Mit der Substanz BH-301.2 (Substanz 36, Struktur auf Seite 109) wurde für *PfFNT* ein  $IC_{50}$ -Wert von  $0,16 \mu\text{M} \pm 0,04 \mu\text{M}$  bestimmt. Hier zeigte die Resistenzmutante einen Wert von  $1,01 \mu\text{M} \pm 0,95 \mu\text{M}$ . Hier kommt es durch die Resistenz nur zu einer Verschlechterung um das sechsfache. In Abbildung 4.35 sind die dazugehörigen Kurven zu sehen, welche ebenfalls mit der Hill-Gleichung gefittet wurden.

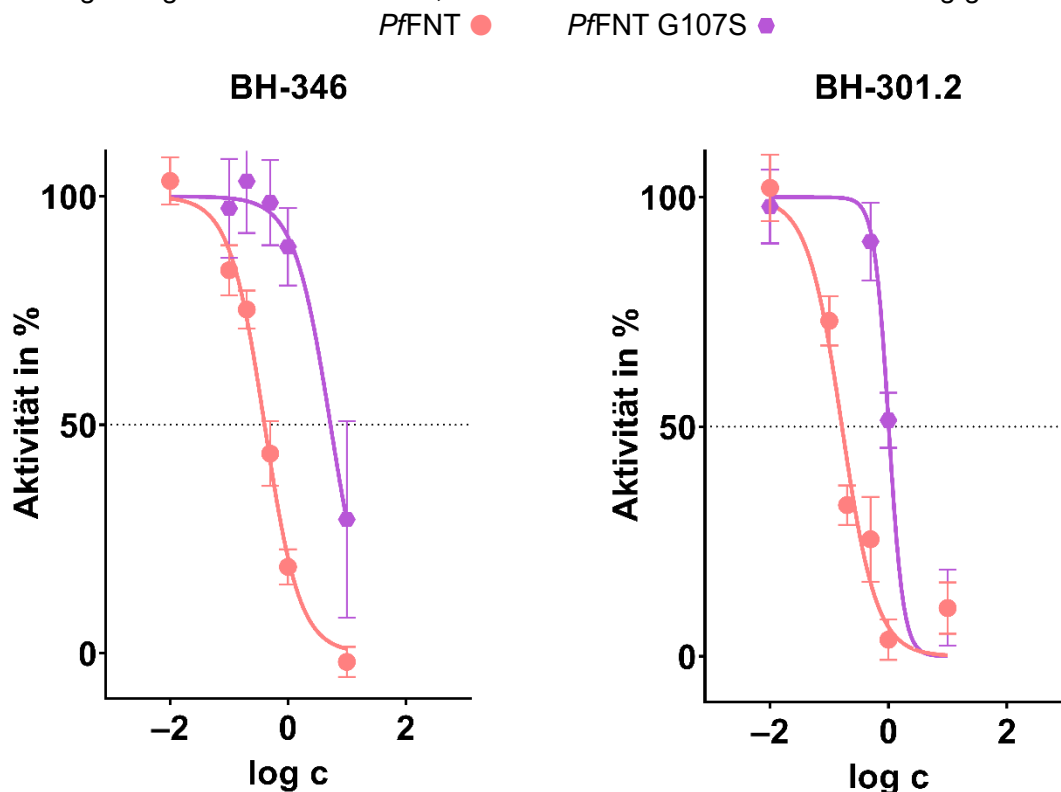


Abbildung 4.35: Aktivität des FNT gegen die logarithmierte Inhibitorkonzentration von BH-346 und von BH-301.2. Es wurde eine Dreifach-Bestimmung von jeweils drei Replikaten durchgeführt.

Zusätzlich wurden noch zwei weitere Substanzen getestet. Die verschiedenen Konzentrationen und zugehörigen Aktivitäten sind Abbildung 4.37 zu entnehmen. BH-298 (Substanz 37, Struktur auf Seite 109) wurde getestet da, hier die vinyloge Carbonsäure fehlt. Es zeigte in den eingesetzten Konzentrationen selbst bei  $1000 \mu\text{M}$  kaum eine Hemmung. Fosmidomycin (siehe

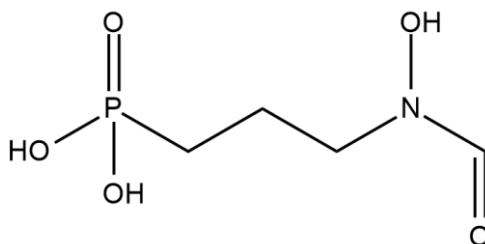


Abbildung 4.36: Strukturformel von Fosmidomycin

## Ergebnisse

Abbildung 4.36) wurde getestet wegen der strukturellen Ähnlichkeit zu L-Laktat. Mit der getesteten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  konnte keine Hemmung festgestellt werden.

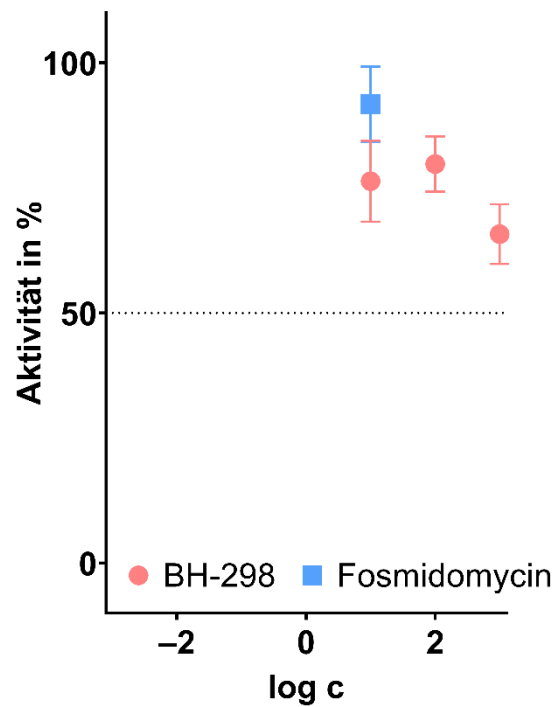


Abbildung 4.37: Halblogarithmische Auftragung der FNT Aktivität gegen die Inhibitorkonzentration, hier von BH-298 und Fosmidomycin. Fosmidomycin wurden in Wasser gelöst und gegen Wasser als Kontrolle vermessen. Angegebene Fehler sind SEM. Es wurde eine Einfachbestimmung von drei biologischen Replikaten durchgeführt.

Die in dieser Arbeit untersuchten Substanzen zur Umgehung der Resistenz zeigen einen ersten Weg in diese Richtung auf.

## 5 Diskussion und Ausblick

Diese Arbeit hatte zwei Hauptziele. Im ersten Teil sollte eine Methode entwickelt werden, mit welcher eine große Substanzbibliothek hinsichtlich ihrer Hemmung des FNT aus *P. falciparum* untersucht werden kann. Dieses Screening sollte anschließend durchgeführt werden. Im zweiten Teil der Arbeit sollten die bisher noch nicht näher untersuchten FNTs aus *P. vivax*, *P. knowlesi*, *P. ovale* und *P. malariae* auf ihre L-Laktat-Leitfähigkeit, sowie ihre Hemmbarkeit mit bereits bekannten Substanzen hin getestet und mit dem Transporter aus *P. falciparum* verglichen werden. Im letzten Teil der Arbeit wurden zwei Substanzen auf ihre Resistenzumgehung getestet.

### 5.1 Methodenentwicklung

In dieser Arbeit konnte eine Methode entwickelt werden, mit der Substanzbibliotheken bezüglich ihrer Hemmung des plasmodialen FNT getestet werden können. Als geeignete Zusammensetzung des Mediums haben sich eine L-Laktat-Konzentration von 1 % und eine Resazurin-Konzentration von  $0,03 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  gezeigt (entspricht 0,003 %). Von Wu *et al.* waren zuvor 0,25 % L-Laktat eingesetzt worden [16]. Bei den hier durchgeführten Tests zeigte sich für die L-Laktat-Konzentration, dass mehr L-Laktat zu höheren Signal-Rausch-Verhältnissen führt. Sangkaew *et al.* setzten ebenfalls  $0,03 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  Resazurin ein [93]. Taneja und Tyagi verwendeten dagegen 0,02 % Resazurin und testeten Substanzen an Mykobakterien [97]. Aus den gezeigten Daten lässt sich ersehen, dass eine leichte Reduktion der Resazurin-Konzentration noch möglich wäre, jedoch  $0,03 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  die optimalen Bedingungen für den angewandten Assay scheint.

Ein pH-Wert von 6,0 bis 6,1 zeigte im Assay das beste Ergebnis. Von Wu *et al.* wurde ein pH von 5,6 eingesetzt. Das Cytosol des Malariaerreger hat laut Rahbari *et al.* von 2017 einen pH-Wert von 7,17 [98], Kuhn *et al.* stellten 2006 7,15 als pH-Wert fest [99]. Bei van Schalkwyk *et al.* wurde 2013 dagegen 7,35 als pH-Wert publiziert [100]. Erythrozyten weisen intrazellulär laut Alonso *et al.* von 1993 einen pH von 7,33 auf [101]. Warth und Desforges stellten 1975 einen pH-Wert von 7,07-7,28 fest [102]. Der eingesetzte pH-Wert ist also niedriger als die physiologischen pH-Werte. Dies hat einen Einfluss auf die getesteten Substanzen. Die meisten davon sind vinyloge Carbonsäure, dieses Strukturelement hat einen  $\text{pK}_a$ -Wert von 3-5 [103]. Das heißt, dass die Substanzen bei den physiologischen pH-Werten stärker deprotoniert sind als bei dem verwendeten pH-Wert. Dies hat vor allem einen Einfluss auf den Transport der Substanzen in die Zelle, da nur ungeladene Substanzen über die Zellmembran transportiert werden können. So können  $\text{IC}_{50}$ -Werte im Parasiten höher ausfallen, da die Substanz dort nicht so gut in die Zelle gelangt aufgrund der Deprotonierung durch höhere pH-Werte.

Zusätzlich kann getestet werden, ob die direkte Zugabe von Resazurin tatsächlich zum besten Ergebnis führt. Castilho *et al.* konnten in Mykobakterien zeigen, dass ein Zusetzen von Resazurin nach 24 h Inkubation gefolgt von weiteren 24 h Inkubation ein gutes Ergebnis geliefert hat. Die Autoren geben allerdings auch an, dass ein nachträgliches Zufügen von Resazurin zu einer Kontamination führen kann [104]. Außerdem stellt ein späteres Hinzufügen von Resazurin ein aufwändigeres Versuchsdesign dar, welches bei Screening-Methoden zu vermeiden ist. Murray und Wigglesworth geben in ihrer Arbeit zur Hochdurchsatz-Methoden-Entwicklung und -Optimierung auf Seite 4 an, dass eine Methode „*as simple to run as possible*“ sein sollte [105]. Aus diesen Gründen ist ein Zusetzen von Resazurin direkt zum Medium die optimale Variante, um den Aufwand im Vergleich zum Nutzen möglichst gering zu halten.

Es konnte ein Einfluss der Trübung, also indirekt der Zellzahl, auf das Messergebnis festgestellt werden. Dies galt jedoch nur in einem Zellzahl-Bereich der, bei Durchführung des Assays wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, nicht auftreten würde. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits von Zalata *et al.* beschrieben. Sie mussten aufgrund der Trübung zudem auf eine aufwändigere Methode zurückgreifen. Jede Probe musste mit *n*-Butylalkohol versetzt und zentrifugiert werden, bevor der Überstand vermessen werden konnte [88]. Durch Verwenden einer niedrigen initialen Optischen Dichte kam dieses Problem im hier entwickelten Assay nicht vor. Von den getesteten initialen Optischen Dichten erwies sich die niedrigste (0,01) als beste Wahl. Ähnliche Werte wurden durch Petrovic *et al.* eingesetzt [92]. Dies ergibt Sinn, da die Positivkontrolle, bestehend aus gehemmten *S. cerevisiae*-Zellen, von vornherein einen niedrigeren Wert aufweist. Rein mathematisch gesehen wird dadurch das Signal-Rausch-Verhältnis größer. Sangkaew *et al.* setzten 0,5 bis  $1 \cdot 10^5$  Zellen pro ml ein, was ungefähr einer OD<sub>600</sub> von 0,04 bis 0,08 entspricht [93, 106]. Durch das Zusetzen von Resazurin kann der Assay mit einer niedrigeren initialen Optische Dichte durchgeführt werden. Im Vergleich dazu benötigt der Assay ohne Resazurin nach Wu *et al.* eine OD<sub>600</sub> von mindestens 0,07 [16].

Betrachtet man das reine Zellwachstum, so ist das Schütteln der Kolben zur ständigen Sauerstoffzufuhr in die Kultur wichtig, wie in Kapitel 4.1.9 gezeigt. Wie allerdings Visser *et al.* feststellen konnten, ist *S. cerevisiae* sehr wohl in der Lage unter anaeroben Bedingungen zu wachsen [107]. Bei der Oxidation von L-Laktat zu Pyruvat und der nachfolgenden Bildung von Acetyl-CoA wird kein Sauerstoff benötigt. Allerdings wird dabei NAD<sup>+</sup> verbraucht. Über die Atmungskette würde NAD<sup>+</sup> normalerweise regeneriert, die Atmungskette kann ohne Sauerstoff allerdings nicht stattfinden [108]. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass Resazurin unter anaeroben Bedingungen schneller reduziert wird. Die Vermutung liegt nahe, dass bei den nicht geschüttelten *S. cerevisiae*-Zellen weniger Sauerstoff vorliegt, die Atmungskette deshalb langsamer abläuft und mehr NADH + H<sup>+</sup> für die Reduktion des Resazurin vorhanden ist. Durch die



Reduktion des Resazurin wird wieder  $\text{NAD}^+$  gewonnen, welches der Zelle dann wieder zur Verfügung steht. Da nicht getestet wurde, welchen Einfluss die fehlende Sauerstoffzufuhr genau auf die Hemmung der Zellen hat, kann nicht einfach auf das Schütteln verzichtet werden. Dies wäre allerdings ein Ansatzpunkt für eine weitere Optimierung der Methode.

Die Kontrollen waren in Anbetracht des klar gewählten Ziels gut zu wählen. Es wurde der bis dato beste Inhibitor von P $\beta$ FNT (BH-296) als Kontrolle eingesetzt, die für die Resistenzmutante bekannt war. BH-296 wurde in der Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  eingesetzt um eine vollständige Hemmung zu gewährleisten [36].

Im Gegensatz zur Auswahl der Kontrollen war die Entscheidung, welches das für den etablierten Assay optimale Gesamtvolumen ist, deutlich schwieriger. Bei der Direktmessung zeigte sich, dass eine höhere Schichtdicke und damit ein größeres Volumen immer zu einem besseren Signal-Rausch-Verhältnis führt. Ein hohes Gesamtvolumen führt leider auch zu einer Kreuz-Kontamination der *wells*. Diese *well-to-well* Kontamination wurde bisher vor allem in der Mikrobiom-Forschung festgestellt. Minich *et al.* stellten fest, dass vor allem in benachbarten *wells* eine Kontamination auftrat, wie es auch in dieser Arbeit beobachtet werden konnte [109]. Eine Vermutung, wie es zu dieser Kontamination kommt, ist in der Publikation von Minich *et al.* und auch in einem Kommentar dazu von Walker nicht angegeben [110]. Da die *well-to-well* Kontamination in dieser Arbeit sich immer in allen benachbarten *wells* befindet, muss nicht davon ausgegangen werden, dass diese durch Verschleppungen während des Pipettierens verursacht wurden. Jede Platte wurde immer von links nach rechts pipettiert und folglich wären dann nur rechts der Kontrollen Kontaminationen zu entdecken. Da dies nicht der Fall ist, muss weiter davon ausgegangen werden, dass ein Überschwappen von *well* zu *well* stattfindet. Aus diesem Grund und auch aus Wirtschaftlichkeit wäre eine Verringerung des Gesamtvolumens durchaus wünschenswert. Zwar konnte die Kreuz-Kontamination durch den Einsatz von Parafilm weitestgehend verhindert werden, doch auch dies stellt einen Kostenfaktor und auch einen nicht unerheblichen Zeitfaktor dar. Durch Abdecken mit Parafilm wird zudem die Zufuhr von Sauerstoff unterbunden. Die Assay findet so wieder anaerob statt. Viel schwerwiegender ist, dass durch die Nutzung von Parafilm deutlich mehr Müll produziert wird. Aus diesem Grund sollte zur weiteren Optimierung des hier etablierten Assays überprüft werden, ob die Messung der Differenz nicht eine adäquate Möglichkeit bietet, das Gesamtvolumen der *wells* zu reduzieren ohne dass sich das Signal-Rausch-Verhältnis zu sehr verschlechtert.

Die Differenzmessung hat sich durch die deutliche Steigerung des Signal-Rausch-Verhältnisses als beste Variante erwiesen. Eine ähnliche Methode wurde auch schon von Sangkaew *et*

al. eingesetzt [93]. Zusätzlich zeigt die Methode im Messbereich Linearität für die Messung von Resazurin, wie für analytische Methoden durch die ICH gefordert [89].

Wie in dieser Arbeit festgestellt wurde, lässt sich die Assaydauer nur bedingt verkürzen. Ein Problem könnte dabei sein, dass über die Stabilität der Inhibitoren nicht viel bekannt ist. Aus diesem Grund wurde in Kapitel 4.1.8 eine Assaydauer gesucht, die möglichst kurz ist. Alle Substanzen, welche vor dieser Arbeit an *P. falciparum* getestet worden sind, sollten über die Assaydauer stabil sein. Die am Malariaerreger verwendete Screening-Methode weist ebenfalls eine Assaydauer von 72 h auf. So kann vermutet werden, dass wenigstens BH-312 und MMV000972, sowie alle TCAMS-Substanzen, über diesen Zeitraum bei 37 °C stabil sind [50, 111, 112]. Um Abweichungen aufgrund der Stabilität ausschließen zu können müssten Stabilitätsuntersuchungen der getesteten Inhibitoren durchgeführt werden.

Es konnte in dieser Arbeit eine Methode entwickelt werden, welche für das Screening von Substanzbibliotheken gegen rekombinant in der Hefe exprimierte Laktat-Transporter geeignet ist.

## 5.2 TCAMS Screening

Die TCAMS-Substanzbibliothek entstand 2010, als GSK ihre fast 2 Millionen Substanzen umfassende Bibliothek als mögliche neue Wirkstoffe gegen *P. falciparum* testete. Gemessen wurde die Aktivität der plasmodialen Laktat-Dehydrogenase. Der erste Durchgang ergab 19.451 Substanzen (0,98 %), welche durch weitere Wiederholungen und Ausschluss einer direkten Hemmung des Enzyms auf 13.533 Substanzen (0,68 %) reduziert wurden. Keine der Substanzen zeigte eine direkte Hemmung der Laktat-Dehydrogenase. 30 % der Substanzen zeigten keine reproduzierbare Hemmung. Bei diesen handelt es sich möglicherweise um Artefakte [50].

Das Screening der TCAMS-Substanzbibliothek, durchgeführt mit 12.564 Substanzen, ergab keine Substanz, welche die Resistenzmutante *PfFNT G107S* besser gehemmt hat als die bisherige Leitstruktur. Um sicherzustellen, dass eine Substanz gefunden wurde, welche zu einer besseren Hemmung führt, wurde die Grenze eines *hits* auf 100 % festgesetzt. Bei 100 % lag eine vollständige Hemmung der Hefe vor. Es gab jedoch *wells* welche mehr als 100 % Hemmung zeigten. Dies könnte daran liegen, dass durch die Positivkontrolle der Transport von Laktat unterbunden wird. Laktat, welches sich schon in der Hefe befindet, steht dem Stoffwechsel noch zur Verfügung. Die Hefe stirbt nicht direkt ab, sondern erst wenn dieses Laktat verbraucht ist, da kein Laktat mehr nachtransportiert wird. Solange wird also auch Resazurin reduziert. In den Experimenten wurde beobachtet, dass nur dann Resazurin nicht reduziert

wird, wenn gar keine Zellen vorliegen, unabhängig von einem Inhibitor. Dies ergibt vor dem eben genannten Hintergrund Sinn. Liegt eine Hemmung von mehr als 100 % vor, könnte dies bedeuten, dass die Hefezellen von der betreffenden Substanz abgetötet wurden. So kann weniger Resazurin reduziert werden als in der Positivkontrolle, da kein Stoffwechsel mehr stattfindet. Die gefundenen *hits* wurden direkt im biophysikalischen Assay auf die tatsächliche Transporter-Hemmung getestet. Die Hefetoxizität wurde nicht direkt getestet, deshalb kann keine genauere Aussage über diese gegeben werden. Im Weiteren wird noch diskutiert, welchen Einfluss Substanzen auf das Messsystem an sich haben können.

Es traten 92 Substanzen als falsch positive *hits* auf, dies entspricht 0,73 % der getesteten Substanzen. Diller und Hobbs schätzten die Anzahl der falsch positiven *hits* 2004 auf 10 für jeden echten *hit* unter der Annahme, dass die *hit*-Rate bei einer Substanz in 10.000 getesteten liegt [113]. Spencer fasste bereits 1998 das Ergebnis aus 56 Hochdurchsatz-Screenings zusammen und stellte dabei fest, dass eine gute *lead*-Serie ungefähr einmal alle 120.000 Substanzen auftritt. Substanz-Analoga dienen dabei als Wiederholung. Dadurch dass mehrere strukturell ähnliche Substanzen vorliegen, ist die Chance größer diese während eines Screenings zu entdecken [114].

Das Ziel des Screenings war es eine Substanz zu finden, welche einen anderen Bindemodus aufweist als die bisher bekannten Substanzen. Jedes Protein verfügt jedoch nur über wenige Stellen, an denen die Bindung von einer Substanz überhaupt möglich ist. Dies hat verschiedene Gründe. Zunächst gibt es verschiedene Bindungen, die gebildet werden können. Geladene Substanzen können Salzbrücken ausbilden, während polare Gruppen zu Wasserstoffbrückenbindungen führen. Bindungen unpolarer Gruppen werden vor allem durch hydrophobe Wechselwirkungen, van der Waals Kräfte und Aromaten-Interaktionen hervorgerufen [115]. Dabei zeigen geladene Verbindungen die höchste Bindungsstärke. Polare Gruppen liegen mit ihrer Bindungsstärke knapp oberhalb der unpolaren Gruppen. Sowohl Enthalpie als auch Entropie sind dabei wichtig, um zu beurteilen mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Bindung eingegangen wird. Für die Enthalpie, welche für den Protein-Substanz-Komplex so klein wie möglich sein sollte, spielt z. B. die Interaktion der funktionellen Gruppe der Substanz mit der Bindestelle des Proteins eine Rolle. Auch das Entfernen des Wassers von beiden Bindungspartner, sowie eine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Wassermolekülen sind hier wichtig. Im Gegensatz zur niedrigeren Enthalpie, stellt eine höhere Entropie des Protein-Substanz-Komplexes das Optimum dar. Dieser Entropiegewinn kann dabei zum Beispiel durch freiwerdendes Wasser, welches zuvor an den Bindestellen vorlag, erhalten werden. Ein Entropieverlust entsteht z. B. dadurch, dass die Flexibilität der Substanz durch das Binden verringert wird [116]. Damit die Bindung einer Substanz an ein Protein stattfinden kann, müssen sich die

funktionellen Gruppen beider Bindungspartner in räumlicher Nähe befinden [117]. Bei einer Bindestelle, welche natürlicherweise von einer Protein-Protein-Interaktion verwendet würde, sind die Bindestellen nicht zwingend nahe beieinander. Da das Protein als Bindungspartner, im Vergleich zu dem kleinen Molekül, relativ groß ist, gibt es evolutionär gesehen keinen Druck die Bindungsstellen auf engem Raum zu konzentrieren. Soll ein kleines Molekül an der gleichen Bindungsstelle binden, dann können allein durch den Größenunterschied nicht die gleichen Bindungen geknüpft werden. Mögliche Bindestellen eines Proteins, welche nicht zur Knüpfung einer bestimmten Bindung da sind, sind zufällig über das Protein verteilt [114]. Die Wahrscheinlichkeit einer passenden Konstellation ist damit gering. An Stellen im Zielprotein, welche für bestimmte Funktionen zuständig sind, ist aus diesem Grund die Wahrscheinlichkeit deutlich höher, da potenzielle Bindungsstellen hier näher beieinander liegen. Für den FNT ist eine hohe Funktionalität bisher vor allem für den Transportpfad bekannt. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass die bisher bekannten Inhibitoren an genau dieser Stelle binden [36].

Im Jahr 2010 wurden einige Publikationen und *reviews* bezüglich falsch positiver *hits* in Substanzbibliothekscreenings veröffentlicht. Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte Strukturelemente in vielen Screening-Methoden zu falsch positiven Ergebnissen führen. Die gefundenen falsch positiven *hits* wurden auf diese Strukturelemente hin untersucht. Exakt diese Strukturelemente wurden unter den falsch positiven *hits* nicht entdeckt. Ein paar Ähnlichkeiten konnten dennoch gefunden werden. Einmal die Substanz TCMDC-138102, welche ein  $\beta$ -Aminosulfon enthält, siehe Abbildung 5.1 (A). Von diesem Strukturelement wird beschrieben, dass es reaktive Retro-Michael-Alkene bildet [118]. Auch die Bildung von Aggregaten der zu testenden Substanzen, welche dann unspezifisch hemmen, wurde beschrieben [119]. McGovern *et al.* haben 2002 einige Substanzen identifizieren können, welche Aggregate bilden. Tatsächlich gibt es Ähnlichkeiten mit im Screening als falsch positive *hits* gefundenen Substanzen. Es besteht also die Möglichkeit, dass ein paar der falsch positiven *hits* aus diesem Grund auftraten. In Abbildung 5.1 (B) ist ein Beispiel für solch eine Ähnlichkeit gezeigt. [120]

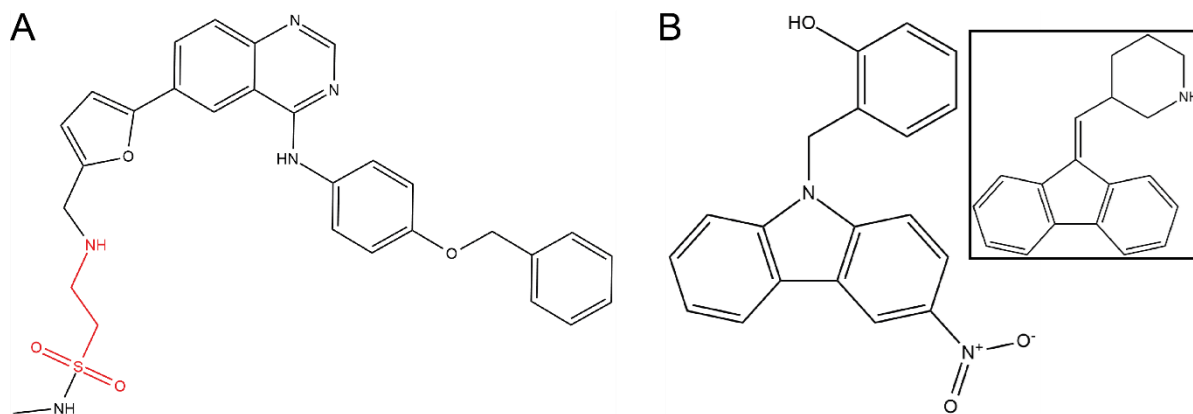


Abbildung 5.1: (A) TCMDC-138102; in rot markiert das  $\beta$ -Aminosulfon. (B) TCMDC-124344. Im schwarzen Kasten die von [120] gefundene Struktur, welche Aggregate bilden kann. Erstellt mit ChemDraw.

Von Thorne *et al.* wurde außerdem beschrieben, dass es ein Problem darstellt, wenn der Indikator für die Detektion in niedrigeren Konzentrationen eingesetzt wird als die zu testenden Substanzen, da diese so großen Einfluss auf das Ergebnis haben können. Resazurin wurde in einer Stoffmenge von ca. 120  $\mu\text{M}$  eingesetzt, während die zu testenden Substanzen in 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt wurden. Dieses Problem besteht also beim durchgeführten Assay nicht. Ein weiteres Problem, welches diskutiert wurde, stellt die Kontamination mit Staub oder ähnlichen Partikeln dar. Dies kann zu nicht reproduzierbaren, falsch positiven Ergebnissen führen [119]. Um das zu vermeiden, wurde jedes *well* im Screening auf seine Plausibilität hin überprüft. Jedes *well* indem sich Wachstum zeigte, dass jedoch ein hohes Signal aufgrund von Ablagerungen irgendeiner Art aufwies, wurde als *hit* ausgeschlossen. Dies kam 34-mal vor und entspricht damit 0,27 %.

Das in der TCAMS-Substanzbibliothek keine neue Struktur zu finden war, darf nicht dazu führen, dass die Suche nach weiteren Inhibitoren aufgegeben wird. Es gibt noch viele Möglichkeiten, wie diese Suche fortgesetzt werden kann. So gibt es einerseits den Ansatz, Grundstrukturen schon verwendeter Medikamente als „*privileged scaffold*“ zu verwenden und so neue vielversprechenden Substanzen zu identifizieren [121]. Andererseits wird diskutiert, dass keine Substanzen aus Bibliotheken aussortiert werden sollten, wenn sie bisher in noch keinem Screening eine Aktivität gezeigt haben. Bei einer statistischen Analyse der als „*dark chemical matter*“ bezeichneten Substanzen stellte sich heraus, dass diese keine niedrigere Wahrscheinlichkeit bieten ein *hit* zu sein, als noch nie getestete Substanzen [122]. Auch ein *fragment-based* Ansatz könnte sich lohnen. Hier werden vor allem kleine Strukturelemente getestet, welche im weiteren Verlauf zu größeren Molekülen ausgebaut werden. Damit konnten vor allem als schwierig beschriebene *targets* adressiert werden, wie das *Heat Shock Protein Hsp 90*. Für dieses waren bisher vor allem natürliche Makrozyklen als Inhibitoren bekannt, welche schwierig zu synthetisieren sind. Vor allem aufgrund der Größe dieser Fragmente kommt es in

phänotypischen Assays allerdings noch zu einem starken Rauschen. Zusätzlich zeigen die Fragmente vor dem Ausbau der Strukturen häufig  $IC_{50}$ -Werte im hohen mikromolaren Bereich und sind so schwierig zu identifizieren. Es gibt allerdings schon Ansätze wie dennoch ein phänotypischer Assay möglich ist. [123–125]

### 5.3 Vergleich der FNTs humanpathogener Plasmodien

Im Folgenden werden die Ergebnisse, welche in Kapitel 4.3 erhalten wurden diskutiert. Zunächst wird die Proteinexpression genauer betrachtet, dann folgen der Transport von L-Laktat und die Hemmbarkeit durch bekannte Inhibitoren.

#### 5.3.1 Proteinexpression

Wie zuvor schon in unserem Arbeitskreis gezeigt, lassen sich FNTs verschiedenster Protozoen in *S. cerevisiae*-Zellen rekombinant exprimieren und auf ihre Funktion hin untersuchen [16, 69, 71]. Die in dieser Arbeit untersuchten Proteine ließen sich ebenfalls, wie in Kapitel 4.3.1 beschrieben, in *S. cerevisiae* exprimieren. Im Western Blot der Proteine fielen vor allem die unterschiedliche Bandenstärke, als auch die Doppelbande von *PkFNT*, auf. Ein Unterschied in der Bandenstärke kann bei gleichem Gesamteiproteinauftrag auf eine variierende Proteinexpression in der *S. cerevisiae*-Zelle hinweisen [126].

Mit zwei *total protein staining*-Methoden wurde nachgewiesen, dass gleichviel Protein jeweils aufgetragen wurde [94, 95]. Dies lässt die Vermutung zu, dass *PvFNT* und *PkFNT* vermehrt exprimiert werden. Dies muss bei der Beurteilung der anderen Ergebnisse berücksichtigt werden. Allerdings sollte dabei immer beachtet werden, dass die Proteinexpression, welche im Western Blot gezeigt wurde, die gesamte Menge an Transporter-Protein anzeigt. Dieses kann sowohl in der Plasmamembran als auch in anderen Membranen der Zellorganellen lokalisiert sein. Um genauere Informationen dazu zu erhalten, könnte man zum Beispiel mit dem HA-Antikörper über Immunfärbung die Lokalisation in den unterschiedlichen Membranen überprüfen [127]. Damit können auch Unterschiede in der Transportkapazität und -rate bezüglich der Expressionslevel beurteilt werden, um die Unterschiede zwischen den FNT-Varianten noch deutlicher zu machen.

Die Doppelbande des *PkFNT* könnte auf eine post-translationale Modifizierung des Proteins hindeuten, allerdings tritt diese bei den anderen Proteinen nicht auf. In anderen Western Blot Untersuchungen des *PkFNT*, siehe Kapitel 4.3.1 auf Seite 72, deutet sich an, dass das Protein nicht komplett stabil ist. Die Bildung von Abbruchfragmente wäre eine wahrscheinlichere Erklärung für die Doppelbande. Die untere Bande würde einem Abbruch von 3-5 kDa entsprechen. Dies könnte zum Beispiel ein Abbruch des C-Terminus sein. In den hier gezeigten

Western Blots zeigt sich auch bei der Verwendung des Anti-His-Antikörpers, dass ein Abbruch stattfindet. Hier ist ebenfalls eine schwache Band unterhalb von 35 kDa zu erkennen.

### 5.3.2 Transport von L-Laktat

Um das Transportverhalten der FNT-Varianten der Malariaerreger zu testen, wurde sowohl der direkte Transport von L-Laktat (4.3.3) als auch das indirekte Zellwachstum (4.3.2) untersucht. Da ein Wachstum der Zellen in L-Laktat Medium nur möglich ist, wenn auch der Transport stattfindet, wurde auf eine mögliche Korrelation dieser Daten miteinander getestet. Sollte eine solche Korrelation vorliegen, wäre es möglich von den Daten der einen Messung auf ein Ergebnis der anderen Messung zu schließen. Bei der Verwendung von Wachstumsdaten könnte man radioaktive Abfälle vermeiden, während man andersherum vor allem Zeit sparen könnte.

Es wurden die verschiedensten Parameter aus beiden Messungen herangezogen und auf eine Korrelation getestet. So wurden zum Beispiel von den Wachstumsdaten die Verdopplungszeit in h, die Plateauhöhe des Messsignals, von einer auf die gleiche Plateauhöhe normierten Auswertung die AUC von 0-50 h in %, sowie die Zeit, nach der das halbmaximale Wachstum erreicht war, verwendet. Von der Messung der direkten Aufnahme wurde diese in  $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  und die Plateauhöhe in  $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$  verwendet. In Abbildung 5.2 ist in *heatmaps* das Ergebnis nach erfolgter Pearson-Korrelation dargestellt [128]. Der r-Wert nach Pearson-Korrelation gibt an, ob eine perfekte positive Korrelation vorliegt (Wert ist eins), gar keine Korrelation vorliegt (Wert ist null), oder eine perfekte negative Korrelation vorliegt (Wert ist minus eins). Dieser Parameter reicht allerdings noch nicht aus, um eine Bewertung durchzuführen, da die Irrtumswahrscheinlichkeit auch betrachtet werden muss. Man benötigt demnach zusätzlich den P-Wert, welcher angibt wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass das Ereignis durch Zufall entstanden ist. Schaut man sich dann zusätzlich noch den  $r^2$ -Wert an, ist ersichtlich wieviel Prozent der Werte vermutlich von den jeweils anderen abhängen.

Zwei Kombinationen für Parameter aus den Wachstumsversuchen und den Aufnahmeassays fallen dabei ins Auge. Mit  $r = 0,69$ , einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P = 0,20$ , und einem  $r^2$  von  $0,47$  könnte die Plateauhöhe der Wachstumskurve (4, D) mit der Aufnahme aus dem biophysikalischen Assay (5, E) korrelieren. Bei Betrachtung der Werte aus den Versuchen fällt auf, dass *PfFNT* bei beiden Parametern den höchsten Wert hat. Während allerdings bei den Aufnahmeleistungen (siehe Abbildung 4.31) die Werte über *PkFNT*, *PoFNT* und *PvFNT* bis zu *PmFNT* absinken, sind bei der Plateauhöhe (siehe Abbildung 4.29) alle anderen auf einem Niveau und zeigen zudem keinerlei signifikanten Unterschied. So ist also für diese beiden Parameter keine Korrelation der Messungen im Allgemeinen zu erkennen.

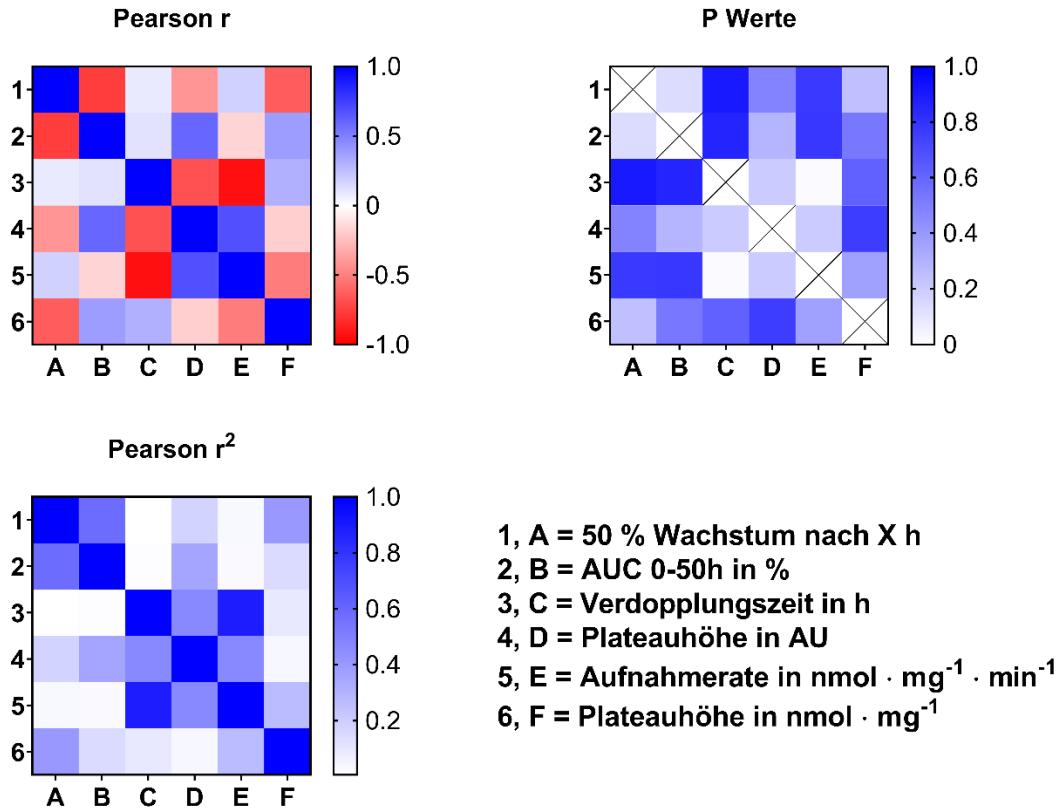


Abbildung 5.2: *heatmap* der Korrelation von Wachstums- und Aufnahmeparametern. Gezeigt ist die Korrelation für die Messungen aller FNT-Varianten zusammengefasst. Da hier die Korrelation der Methoden an sich geprüft werden soll, sind hier nicht die einzelnen FNT-Varianten dargestellt.

Die nächsten beiden Parameter sind die Aufnahme rate aus dem biophysikalischen Assay (5, E) und die Verdopplungszeit in h aus den Wachstumsdaten (3, C). Die Korrelation der Messwerte ist in Abbildung 5.3 gezeigt. Die beiden Parameter zeigen einen  $r$ -Wert von  $-0,94$ , eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $P = 0,02$  und  $r^2 = 0,89$ . Wie am negativen Wert von  $r$  erkennbar, handelt es sich hierbei, um eine negative Korrelation. Dies ergibt Sinn, da eine niedrigere Verdopplungszeit ein schnelleres Wachstum anzeigt. Wie bereits erwähnt, sinken die Werte der Aufnahme rate von *PfFNT* bis *PmFNT* ab. Bei der Verdopplungszeit (siehe Tabelle 4.7) dagegen zeigt *PfFNT* die kürzeste Zeit, gefolgt von *PoFNT*, *PkFNT* und *PvFNT*. *PmFNT* zeigt die höchste Verdopplungszeit. Die Reihenfolge von *PkFNT* und *PoFNT* sind vertauscht, alle anderen zeigen ein passendes Verhalten. Bei den Verdopplungszeiten konnte ein signifikanter Unterschied zwischen *PfFNT* und *PmFNT*, sowie *PfFNT* und *PvFNT* festgestellt werden. Bei den Aufnahme rates zeigten alle Proteine signifikante Unterschiede voneinander mit einem  $P$ -Wert von  $< 0,0001$ .



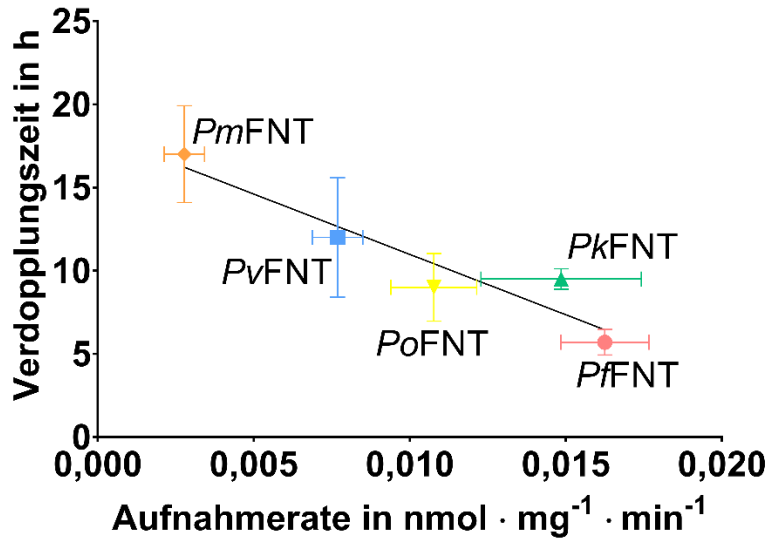


Abbildung 5.3: Korrelation der Verdopplungszeit und der Aufnahmerate verschiedener FNT-Varianten. Aufgetragene Fehler sind SEM. Die Werte stammen jeweils aus einer Dreifachbestimmung.

Zusätzlich fällt auf, dass zwischen der Zeit, welche ein Protein für das halbmaximale Wachstum braucht und der AUC nach 50 h in % eine Korrelation besteht. Diese beiden Parameter zeigen eine negative Korrelation von  $-0,76$ , sowie  $0,14$  als Irrtumswahrscheinlichkeit und ein  $r^2 = 0,58$ . Bei genauem Betrachten war diese Korrelation zu erwarten, da erstens die Zeit, die die meisten hier getesteten Protein-exprimierenden Hefen brauchten, um ihr halbmaximales Wachstum zu erreichen, knapp über 50 h lag. Diese Zeit, die die Hefen benötigen entspricht einer Wachstumsgeschwindigkeit. Je schneller eine Zelle wächst, desto größer ist die AUC, die unter ihrer Wachstumskurve entsteht. Aus diesem Grund ist eine Korrelation dieser Parameter zu erklären.

Da noch mehr Faktoren für das Wachstum einer Zelle wichtig sind, kann der Einfluss der reinen Substrat-Aufnahmerate groß oder klein sein. Dies hängt mit dem geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Stoffwechsel der Zelle zusammen. Dies kann die Substrat-Aufnahme, die Umwandlung von L-Laktat in Pyruvat über die Laktatdehydrogenase, oder ein anderer Schritt, der nicht zwingend etwas mit dem Kohlenstoff-Stoffwechsel zu tun haben muss sein [129].

Allerdings wurde von Wendell und Bisson 1993 festgestellt, dass das Wachstum von *S. cerevisiae*-Zellen von der Expression und Aktivität des hefespezifischen Glukosetransporter HXT2 abhängt [130]. Und im Jahr 2010 wurde von Runquist *et al.* postuliert, dass die Transportfähigkeit verschiedener Xylose-Transporter einen direkten Einfluss auf Xylose-gekoppeltes Zellwachstum hat [131]. Dies zeigt, dass es einige Beispiele gibt, bei denen die Korrelation zwischen der Aufnahme einer im Stoffwechsel benötigten Substanz und dem Wachstum der Zelle möglich ist.

Es gibt weitere Beobachtungen, welche sich direkt mit Stoffwechselfvorgängen beschäftigen. Zum Beispiel an chimären Hexose-Transportern aus *S. cerevisiae* von Elbing *et al.* aus dem Jahre 2004, bei der die Aufnahme von Glukose einen direkten, inversen Einfluss auf die Rate der Glykolyse gezeigt hat. Auch für den Citratzyklus gibt es ähnliche Beobachtungen von Heyland *et al.* aus dem Jahr 2009. Diese beiden Stoffwechselwege sind wichtige Schritte in der Energiegewinnung und damit im Wachstum der Zellen [132, 133].

Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten lassen noch keine endgültige Beurteilung zu, ob das Messen des einen Parameters auf den anderen Parameter schließen lässt. Weitere Tests sind nötig, um eine genauere Aussage dazu zu treffen. Es wäre z. B. denkbar weitere FNT-Vertreter aus anderen Organismen zu untersuchen, welche sich signifikant in ihrer Transportfähigkeit unterscheiden.

Schaut man sich nun die Aufnahmerate der untersuchten Proteine an, fällt auf, dass diese untereinander keine großen Unterschiede aufweisen, vgl. Abbildung 4.31. Lediglich *PmFNT* und *PfFNT* zeigen einen signifikanten Unterschied voneinander. Beim Vergleich der Aminosäuresequenzen fällt auf, dass *PmFNT*, *PoFNT*, *PkFNT* und *PvFNT* deutlich mehr gleiche Aminosäuren untereinander teilen, als sie es mit *PfFNT* tun, vgl. Tabelle 1.2. Im Vergleich mit *PfFNT* ist die höchste Übereinstimmung identischer Aminosäuren 74,6 %, während bei den anderen die niedrigste Übereinstimmung 78,2 % ist.

In den Proteinen gibt es genau 20 konservierte Aminosäuren, in denen sich *PfFNT* von den anderen vier FNTs unterscheidet. Diese sind in Tabelle 5.1 dargestellt. Zum Vergleich befindet sich das Alignment der Proteine in Abbildung 1.7 auf Seite 14. Schaut man sich zusätzlich Abbildung 5.4 an, ist zu erkennen, dass sich die unterschiedlichen Aminosäuren vor allem nahe der Termini des Proteins befinden und nicht im postulierten Transportpfad [71]. So wird vermutlich nicht durch eine Größen-, Ladungs- oder Polaritätsänderung direkt der Transport gehindert und eine andere Transportrate bedingt.

## Diskussion und Ausblick

Tabelle 5.1: Aminosäuren in *PfFNT* und den anderen humanpathogenen FNTs nach ihrer Position in *PfFNT*.

Nr.	<i>PfFNT</i>	Rest	Nr.	<i>PfFNT</i>	Rest
3	P	K	166	F	I
10	L	I	187	S	C
17	S	T	190	V	I
21	G	S	206	L	I
52	M	V	210	A	S
56	L	V	263	L	I
83	V	A	274	G	A
95	M	L	278	Y	F
114	M	T	282	K	R
117	Y	L	300	M	L

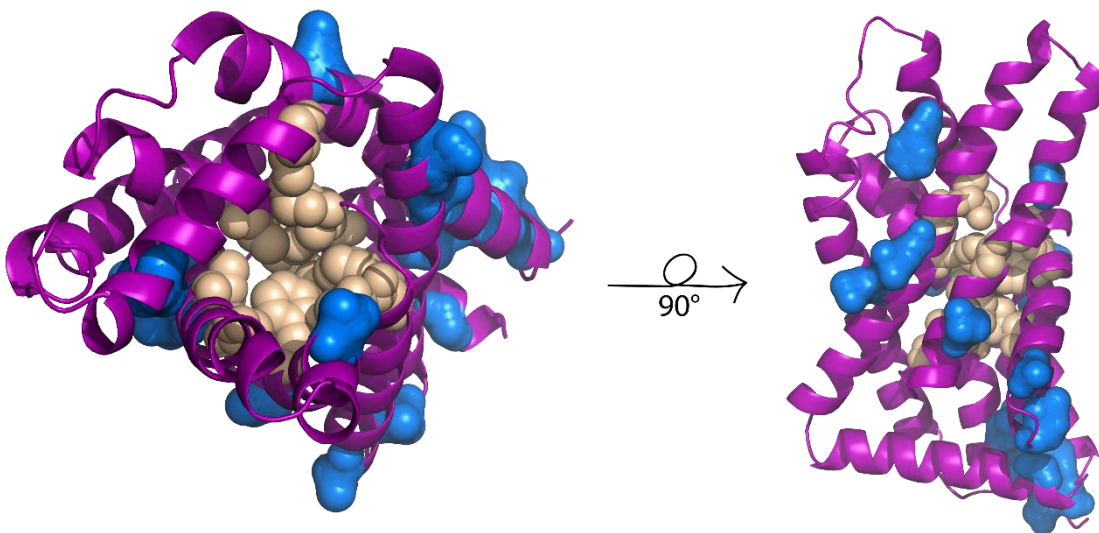


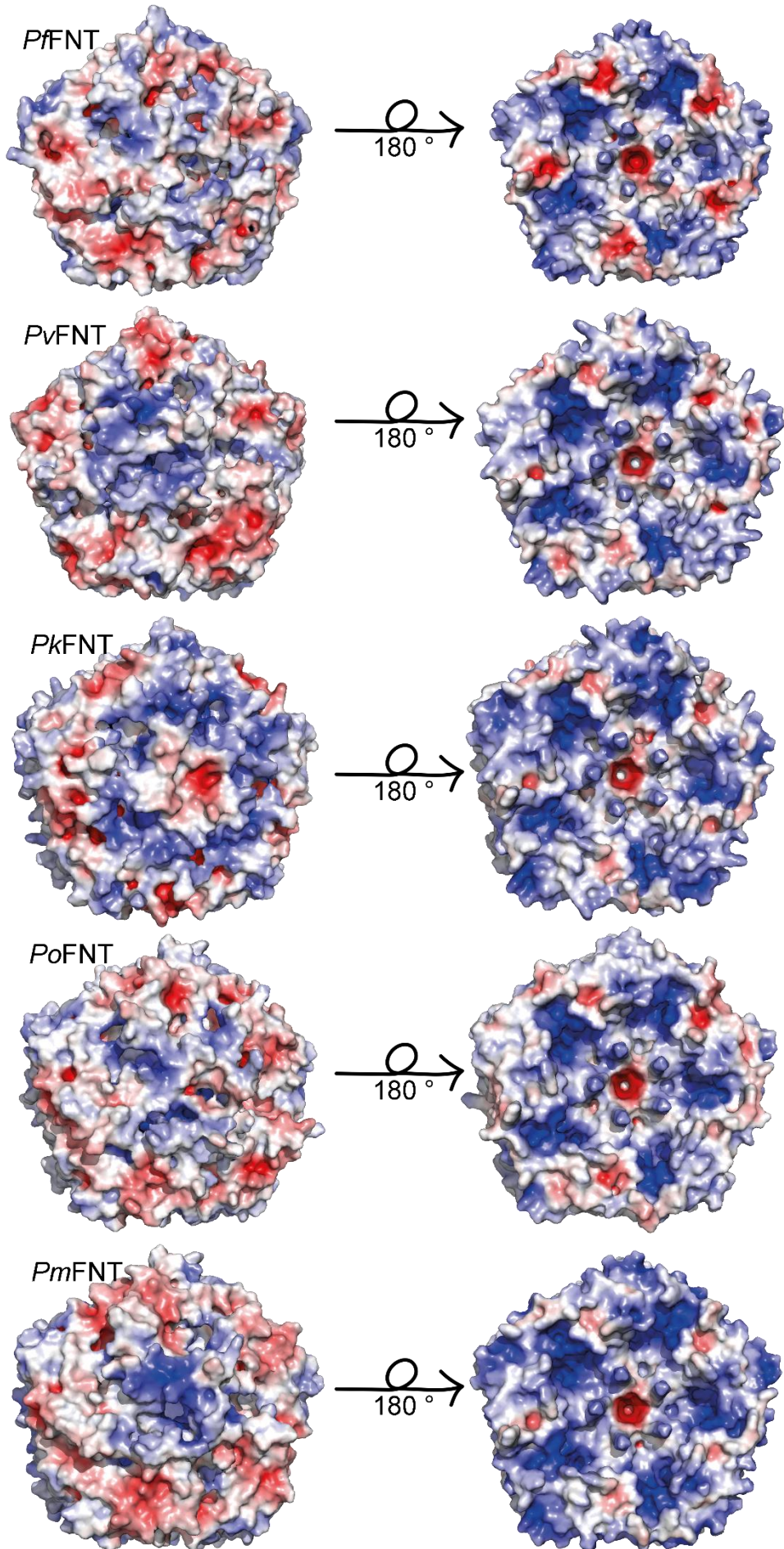
Abbildung 5.4: Modell von *PfFNT* in der Aufsicht (links) und in der Seitenansicht. In der Seitenansicht ist die extrazelluläre Seite oben und die intrazelluläre Seite unten dargestellt. In hell markiert die Aminosäuren, welche die Pore bilden. In blau markiert die Aminosäuren, welche bei allen FNTs der anderen humanpathogenen Plasmodien gleich und damit unterschiedlich zu *PfFNT* sind. Modell erstellt mit Swiss-Modell anhand des Hydrosulfit-Kanals (PDB ID: 3TDR). Abbildung erstellt mit PyMOL und Adobe Illustrator.

In Abbildung 5.5 ist die Elektrostatik aller untersuchten FNTs dargestellt. Die extrazelluläre Seite ist links dargestellt, die intrazelluläre Seite rechts. Erkennbar ist in Abbildung 5.5 vor allem, dass *PvFNT*, *PkFNT*, *PoFNT* und *PmFNT* auf der intrazellulären Seite weniger negative Ladungen aufweisen als *PfFNT*. Auf der extrazellulären Seite ist deutlich schlechter erkennbar, ob Unterschiede bestehen. Möglicherweise ist *PmFNT* auch auf dieser Seite etwas weniger mit negativen Ladungen versehen. Bei *PvFNT* und *PkFNT* scheinen mehr positiv geladene Aminosäuren auf dieser Seite vorzuliegen. Die positiven Ladungen auf der intrazellulären Seite am Poreneingang zeigen eine Übereinstimmung mit dem in unserem Arbeitskreis postulierten

## Diskussion und Ausblick

Transportmechanismus. Auch die bisher untersuchten anderen FNTs weisen auf der intrazellulären Seite mehr positive Ladung auf, als auf der extrazellulären Seite [70, 73].

Abbildung 5.5 (nächste Seite): Elektrostatik der Modelle der FNTs der humanpathogenen Plasmodien von der extra- (links) und intrazellulären Seite (rechts) aus. In Blau dargestellt ist die positive Ladungsverteilung, in Rot dargestellt die negative. Berechnet und erstellt mit PyMOL über die Funktion APBS Electrostatics. Alle Modelle wurden durch Swiss-Modell anhand des Hydrosulfit-Kanals (PDB ID: 3TDR) erstellt. Die Abbildung wurde mit Adobe Photoshop und Adobe Illustrator bearbeitet.



### 5.3.3 Hemmbarkeit der Transporter

Bei den FNTs der humanpathogenen Plasmodien zeigte sich im Transportverhalten nur ein signifikanter Unterschied zwischen *Pf*FNT und *Pm*FNT. In dieser Arbeit wurden sie auch bezüglich ihrer Hemmbarkeit durch die im Arbeitskreis von Dr. André Golldack und Björn Henke entwickelten Substanzen getestet. Diese Testung erfolgte einmal mit dem hier entwickelten Wachstums-Assay, 4.3.4, und für eine Substanz auch im biophysikalischen Assay, 4.3.5.

Die Substanz BH-312, welche aus der Malariabox stammt, wurde schon an einigen Vertretern der FNT-Familie getestet. Für den FNT aus *P. falciparum* wurde im Hefesystem ein  $IC_{50}$ -Wert von 0,17  $\mu$ M festgestellt, im Erreger selbst sogar 0,14  $\mu$ M. Für die Resistenzmutante G107S wurden im Hefesystem 21  $\mu$ M und im Erreger 35  $\mu$ M als  $IC_{50}$ -Werte publiziert [36]. In *Xenopus laevis* Oozyten wurden 0,023  $\mu$ M als  $IC_{50}$ -Werte publiziert und für die Resistenzmutante zeigten sich 1,3  $\mu$ M [37]. Weiterhin wurde festgestellt, dass *Babesia bovis* FNT mit einer Konzentration von 150  $\mu$ M halbmaximal gehemmt werden konnte [36]. Zusätzlich zeigten sich für die drei FNT-Vertreter aus *Toxoplasma gondii*  $IC_{50}$ -Werte von 29  $\mu$ M (*Tg*FNT1), 2  $\mu$ M (*Tg*FNT2) und 0,55  $\mu$ M (*Tg*FNT3) in der Hefe, während das Parasitenwachstum mit 47  $\mu$ M halbmaximal gehemmt werden konnte [69].

In dieser Arbeit konnte der  $IC_{50}$ -Wert für *Pf*FNT im biophysikalischen Assay mit 0,13  $\mu$ M bestätigt werden. Auch im Wachstums-Assay konnte eine ähnliche Konzentration ermittelt werden, welche zum halbmaximalen Wachstum führt (0,6  $\mu$ M). Dies zeigt, dass mit beiden Methoden ähnliche Werte bestimmt werden konnten.

Eine Korrelation der Werte ist in Abbildung 5.6 dargestellt. Diese Korrelation nach Pearson zeigt einen r-Wert von  $-0,96$  und damit eine negative Korrelation, welche zu erwarten ist, wenn Aktivität gegen Hemmung aufgetragen wird. Der p-Wert liegt mit 0,03 sehr niedrig und deutet damit eine signifikante Korrelation an. Und auch der Wert für  $r^2$  zeigt eine Abhängigkeit von 93 % der Werte voneinander. Hier liegt eine Korrelation der Werte vor.

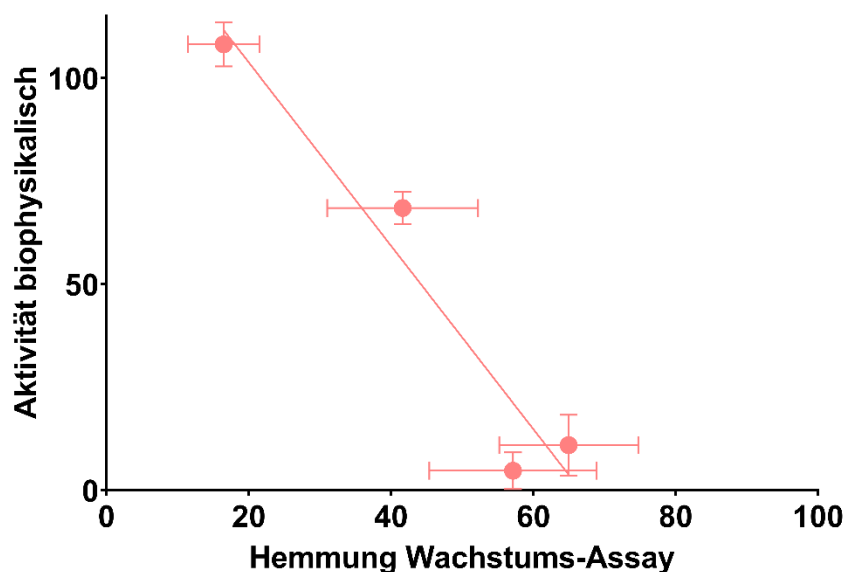


Abbildung 5.6: Korrelation der Aktivität aus dem biophysikalischen Assay mit der Hemmung aus dem Wachstums-Assay für *PfFNT* und BH-312. Aufgetragene Fehler sind SEM.

Bei der Korrelation der Daten für *PfFNT* G107S wurden die biophysikalischen Daten von Dr. André Golldack [36] mit den in dieser Arbeit ermittelten Wachstums-Assay-Daten verglichen. Auch hier ist eine Korrelation sehr wahrscheinlich ( $r = -0,94$ ;  $p = 0,06$ ;  $r^2 = 0,88$ ).

Diese Korrelation darf allerdings zunächst nur als erster Hinweis dienen, da aufgrund der in beiden Assays verwendeten unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen für die Substanzen höchstens 4 Werte-Paare herangezogen werden konnten. Für einen Korrelationskoeffizienten von  $r = 0,90$  mit einem Fehler erster Art von  $\alpha = 0,05$  und einem Fehler zweiter Art von  $\beta = 0,2$  benötigt man nach Hulley *et al.* mindestens 7 Proben [134]. Für eine sichere Korrelation müssen mehr Werte aufgenommen werden. Ein weiteres Problem bei der Korrelation von anderen Substanzen war, dass dort nur die niedrigen Inhibitor-Konzentrationen bei beiden Assays getestet waren und diese zu schnell im Rauschen verschwinden können. Aufgrund dieser Ungenauigkeit eignen sich diese Werte nicht für eine Korrelation.

Wie in Kapitel 5.1 schon erwähnt, könnten auch Stabilitätsprobleme mit den Inhibitoren eine Rolle spielen. Es ist nur für BH-312 und MMV000972 bekannt, dass diese zuvor in einem 72 h eingesetzt wurden und dort eine Aktivität zeigten. Alle anderen verwendeten Substanzen wurden nicht auf ihre Stabilität getestet.

In Tabelle 5.2 sind die Strukturformeln aller Substanzen dargestellt. Die Benennung der Gruppen ist hier erneut aufgeführt, vgl. Kapitel 4.3.4.

Die Gruppen, nach denen die Substanzen strukturell eingeteilt wurden, sind folgende:

- I. Mit Prodrug-Prinzip
  - a. Unterschiedliche Alkylketten
  - b. Unterschiedliche Aromaten Substitution
- II. Fehlendes Prodrug-Prinzip:
  - a. Benzol ausgetauscht oder substituiert
  - b. Mit Linker
  - c. Abwandlungen am Pharmakophor
- III. Andere



## Diskussion und Ausblick

Tabelle 5.2: Strukturformeln der untersuchten Substanzen. Gruppe Ia ist in blaugrau markiert, Gruppe Ib in orange, Gruppe IIa in Gelb, Gruppe IIb in blau, Gruppe IIc in grün, Gruppe III in grau und die noch nicht synthetisierte Nr. 27 ohne Farbe.

1 BH-312	2 STK806304	3 STL298501	4 STL298499
5 STL298500	7 STK700988	10 BH-362	6 MMV00972
9 BH-326	11 BH-317	12 BH-340	13 BH-388
15 BH-317.2	17 BH-269	18 BH-301	19 Pharmakophor
20 BH-255/3	21 BH-306	22 BH-454	23 BH-255/2
36 BH-301.2	24 BH-292	25 BH-324.2	26 BH-310
16 BH-296	28 BH-242	29 BH-246	30 BH-296.2
31 BH-234	32 BH-238	35 BH-346	37 BH-298
8 STK806381	14 BH-262	33 Nifluminsäure	27 BH-308*

Die Struktur-Wirkungsbeziehungen der getesteten Substanzen an *PfFNT* wurden größtenteils von Dr. André Golldack durchgeführt. In dieser Arbeit wurde ein Vergleich der bekannten Daten mit selbst ermittelten Daten aus dem Wachstums-Assay angestrebt. Es zeigt sich, dass trotz der hohen strukturellen Ähnlichkeiten Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinen zu finden sind. Da die Daten bisher nur im Wachstumsassay erhoben wurden und eine Korrelation der Daten noch nicht für alle Proteine nachgewiesen werden konnte, sollte eine weitere Testung stattfinden. Hierfür sollten ein paar der Substanzen im biophysikalischen Assay an allen FNT-Varianten getestet werden. Dann ist eine aussagekräftigere Antwort möglich.

Der spannendste Unterschied zeigte sich bei *PvFNT*, welches im Wachstums-Assay dem Verhalten der Resistenzmutante sehr ähnlich war. Im biophysikalischen Assay konnte dies allerdings nicht bestätigt werden. Ein Grund dafür könnte ein Problem mit dem Zellalter sein, welches während dieser Arbeit des Öfteren beobachtet wurde. Dabei zeigten sich Änderungen im Wachstumsverhalten, wenn die Transformation der Zellen ungefähr vor einem Monat erfolgt war. Diese Änderungen führten, unerwarteter Weise zu einem besonders schnellen Wachstum der Zellen, sobald diese in Flüssigkultur gegeben wurden. Es gibt Hinweise darauf, dass Hefezellen in Flüssigkultur, wenn die Nährstoffe knapp werden und 90-99% der Kultur gestorben sind, zu plötzlichen Wachstumsschüben neigen. Dies liegt wohl daran, dass durch den Zelluntergang wieder Nährstoffe freiwerden, welche dann von den überlebenden Hefezellen verwendet werden können [135]. Es scheint allerdings keine Informationen dazu zu geben, dass dies auch durch Lagerung auf einer Agarplatte hervorgerufen werden kann. Zusätzlich zeigte sich auch, dass je nachdem in welchem Wachstumsstadium sich die Zellen vor Assay-Beginn befanden, die 72 h Assaydauer zu kurz war, wenn sich die Zellen in der Stationären Phase oder darüber hinaus befanden. Bei diesen Zellen dauerte es besonders lange, bis sie wieder anfangen exponentiell zu wachsen. Bekannt ist, dass je älter die Zellen sind, desto häufiger kommt es zur Fehlproduktion von Proteinen, was schließlich zum Absterben führt [136]. Außerdem wurde festgestellt, dass Hefezellen im Glukosemedium ihren Stoffwechsel nach 20 h von fermentativ auf respiratorisch umstellen [137].

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen einen signifikanten Unterschied im Transportverhalten der FNTs humanpathogener Plasmodien. Auch in der Hemmung durch die getesteten Substanzen konnten Unterschiede festgestellt werden. Dies entspricht nicht der ursprünglichen Erwartung, dass aufgrund der hohen Aminosäure-Sequenzanalogie keine Unterschiede bestehen würden. Wie diese Unterschiede hervorgerufen werden muss in der Zukunft herausgefunden werden. Strukturdaten der Proteine wären eine wichtige Errungenschaft, vor allem auch mit einem der bekannten Inhibitoren. Zusätzlich kann die Mutation der Proteine an ausgewählten Stellen neue Erkenntnisse bringen, einige sind in Tabelle 5.1 dargestellt.

## 5.4 Umgehung der Resistenz?

In Kapitel 4.4 wurden zwei Substanzen getestet, die noch von Dr. André Gollmack entwickelt worden waren, um die Resistenz zu umgehen. Ihre Strukturen sind in Abbildung 5.7 A und B zu sehen.

Die Idee dabei für BH-301.2 war, dass der Stickstoff des Pyridin eine Wasserstoffbrücke zum Serin an Position 107 ausbildet und dass die Resistenz so nicht nur umgangen, sondern ausnutzt wird, siehe Abbildung 5.7 C. Die ermittelte halbmaximale Hemmkonzentration liegt mit  $1,01 \mu\text{M} \pm 0,95 \mu\text{M}$  kaum unterhalb den  $2,3 \mu\text{M} \pm 0,2 \mu\text{M}$ . Inzwischen konnte von Philipp Walloch im Arbeitskreis eine Substanz gefunden werden, welche den Stickstoff des Pyridin nicht in ortho-Stellung zur Alkylkette, sondern in meta-Stellung aufweist und somit in der Lage ist, die Resistenz zu umgehen.

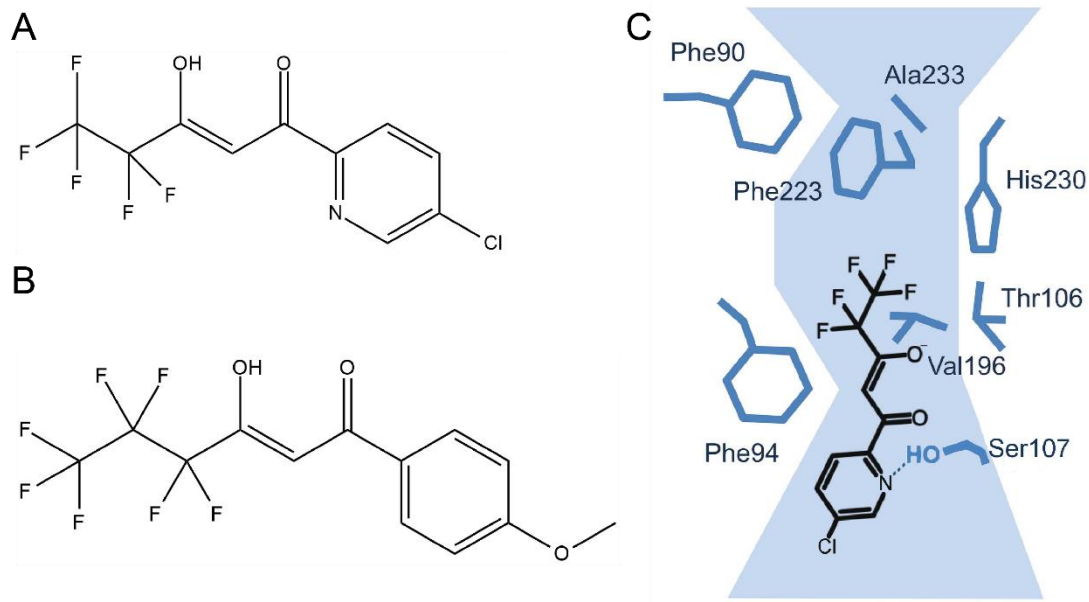


Abbildung 5.7: (A) Struktur von BH-301.2 (B) Struktur von BH-346, (C) Hypothetisches Prinzip der Resistenzumgehung mit BH-301.2. Modifiziert nach [36].

Bei BH-346 war der Ansatz, dass durch die verlängerte Fluoralkylkette das Amin in passende Nähe zur Hydroxylgruppe des Serins gelangt und somit ebenfalls zur Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen führt. Eine ähnliche Substanz (BH-362) war früher schon am *PfFNT* Wildtyp getestet worden und zeigte dort einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von  $0,25 \mu\text{M} \pm 0,02 \mu\text{M}$ . BH-362, ist allerdings nie an der Resistenzmutante getestet worden. Der strukturelle Unterschied ist, dass BH-346 die phenolische Hydroxylgruppe zum Ringschluss fehlt. Der für BH-346 ermittelte  $\text{IC}_{50}$ -Wert lag oberhalb des von BH-296. Die Strukturänderung stellt also keine Verbesserung dar.

## 5.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte eine Methode entwickelt werden mit der große Substanzbibliotheken an, zu L-Laktat-Transport befähigten, Transportern getestet werden können. Außerdem wurden die FNTs aller humanpathogenen Plasmodien erstmals charakterisiert und zeigten trotz sehr hoher Sequenzanalogie kleine Unterschiede im Transport und der Hemmbarkeit.

Um die entwickelte Methode noch simpler zu gestalten, könnten kleinere Optimierungen vorgenommen werden. So könnte nochmal mithilfe eines Inhibitors und Resazurin getestet werden, ob ein Schütteln der 96-*well*-Platten tatsächlich notwendig ist. Wenn Resazurin ohne Schütteln schneller reduziert wird und sich kein Einfluss auf die Hemmwirkung zeigt, könnte so vielleicht die Assaydauer noch verringert werden. Auch sollte erneut mit der Differenzmessung getestet werden, ob eine Reduktion des Gesamtvolumens doch möglich ist. So könnte möglicherweise auf das Versiegeln mit Parafilm verzichtet werden. Damit würde man Zeit und Geld sparen und den entstehenden Müll reduzieren.

Da sich unter den Substanzen der TCAMS-Substanzbibliothek keine fand, welche die Resistenzmutante *PfFNT* G107S besser hemmt als die bisher bekannten Substanzen, geht die Suche nach einem neuen *lead* weiter. Mit den Substanzen der TCAMS-Substanzbibliothek wurde z. B. erst eine der drei Bibliotheken getestet, aus denen die Malaria-Box zusammengestellt worden war. Neben den Substanzen von GSK, gibt es ca. 1.300 Substanzen, die von Forschern des *St. Jude Children's Research Hospital* getestet wurden und 5.200 Substanzen, die aus Novartis-Substanzbibliothek stammen. Beide Bibliotheken zeigten Aktivität gegen *P. falciparum* [48, 50, 112, 138]. An diesem Tag sind über 251 Millionen Substanzen bei PubChem registriert. Diese bieten noch sehr viel Material, das getestet werden könnte.

Um die Anzahl der falsch positiven Ergebnisse zu reduzieren könnte man versuchen, statt des durchgeführten Substitutionsassay, einen „*rescue*“ Assay zu entwickeln [56]. Eine Idee dafür wäre *PfFNT*-exprimierende Hefe zunächst in Glukose-Medium wachsen zu lassen. Als Zusatz im Glukosemedium wäre z. B. Fluoracetat möglich. Fluoracetat wird von *PfFNT* transportiert und ist tödlich für *S. cerevisiae* [71, 139]. Es wird vermutet, dass Fluoracetat zu Fluoracetyl-CoA aktiviert wird. Dieses wird dann durch die Citrat-Synthetase zu Fluorcitrat metabolisiert, welches ein Inhibitor der Aconitase ist und damit den Citrat-Zyklus hemmt [140]. Damit solch ein Assay funktionieren kann, muss weiterhin sichergestellt werden, dass außer den deletierten, hefeeigenen Monocarboxylat-Transportern *ady2* und *jen1* kein anderer Hefe-Transporter Fluoracetat transportieren kann. Der einzige Transporter, der für diesen Assay zum Transport von Fluoracetat befähigt sein darf, ist dann der FNT. Damit sollte die Hefe in diesem Medium

nicht überleben können. Wird nun ein Inhibitor für *PfFNT* zugesetzt, wird das Fluoracetat nicht mehr transportiert und das Wachstum der Hefe ist „gerettet“.

Nachdem die FNTs der humanpathogenen Plasmodien sich als strukturell ähnlich, jedoch in einigen Punkten anders gezeigt haben, sind weitere Tests zur eindeutigen Charakterisierung nötig. So zeigte sich bei den bisher untersuchten FNTs, dass die Aufnahme unterschiedlicher Substrate von der Breite des Transportpfades abhängt [71, 73]. Große Unterschiede sind hier aufgrund der Sequenzanalogie nicht zu erwarten, sollten aber aus diesem Grund umso mehr getestet werden. Auch ein genauerer Blick auf die Hemmbarkeit kann das Bild weiter aufklären. So sollte mit dem biophysikalischen Assay für jedes Protein die Hemmbarkeit wenigstens mit BH-312 getestet werden, um die erhaltenen Daten aus dem Wachstums-Assay besser beurteilen zu können. Es wurden in dieser Arbeit weitere Strukturen identifiziert, welche durch ihre unerwartete Hemmwirkung aufgefallen waren. Auch diese sollten z. B. im biophysikalischen Assay genauer untersucht werden. Zusätzlich würden Informationen über die Struktur der FNT-Proteine, z. B. durch eine Kristallstruktur oder hochaufgelöste TEM-Aufnahmen, eine deutliche Hilfe in der Beurteilung darstellen. Auch die Mutation an ausgewählten Stellen des Proteins kann helfen die Ergebnisse zu vervollständigen.

Spannend für die weitere Forschung wäre außerdem eine weitere *lead*-Struktur, um den FNT als Target zu bestärken.



## 6 Zusammenfassung

Malaria stellt mit über 200 Millionen Fällen im Jahr 2018 eine der schlimmsten Infektionskrankheiten weltweit dar. Von der *Malaria tropica*, ausgelöst durch *Plasmodium falciparum*, ist vor allem Afrika betroffen. Die vier anderen humanpathogenen Erreger – *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale* und *Plasmodium malariae* – führen im Rest der Welt vermehrt zu Infektionen. Die Behandlung wird durch eine zunehmende Resistenzbildung immer schwieriger. Es ist deshalb wichtig weitere *targets* für die Behandlung zu erschließen. Seit den neunziger Jahren werden dazu Substanzbibliotheken an vielversprechenden *targets* getestet.

Die plasmodialen FNTs sind für den Abtransport des Stoffwechselendproduktes Laktat zuständig. Wird der FNT gehemmt, stirbt der Malariaerreger ab. Der FNT zeigt sich also als neues *target* durchaus erfolgsversprechend. Zu Beginn dieser Arbeit waren schon eine Leitstruktur sowie Analoga bekannt. Um das Repertoire zu erweitern und möglichst an einem anderen Teil des Proteins zu wirken, wurde in dieser Arbeit eine phänotypische Screening-Methode entwickelt, mit der viele Substanzen in kurzer Zeit auf ihre Hemmung des FNTs getestet werden können. Dieses Screening wurde dabei an der forcierten Resistenzmutante, G107S, für die bisherige Leitstruktur durchgeführt, um eine weitere Bindungsstelle zu identifizieren.

Mit dieser Methode wurde die TCAMS-Substanzbibliothek, bestehend aus knapp 13.000 Verbindungen, getestet. Im primären Screening waren zunächst 92 Substanzen als *hits* identifiziert worden. Nach Überprüfung in einem biophysikalischen Assay, welcher direkt die Aufnahme von radioaktiv markiertem Laktat messen kann, konnte keiner der *hits* bestätigt werden. Es konnte demnach unter den getesteten 13.000 Substanzen keine gefunden werden, welche den FNT besser hemmt als die bereits bekannte Kontrolle.

Des Weiteren wurden die FNT der humanpathogenen Plasmodien miteinander verglichen. Aufgrund ihrer hohen Aminosäuren-Sequenzanalogie lag die Vermutung nahe, dass diese Transporter ähnlich transportieren. Wichtiger, dass sie ähnlich gut gehemmt werden können. Es wurde dabei gezeigt, dass vor allem der FNT aus *P. falciparum* und der aus *P. malariae* in der Transportrate einen signifikanten Unterschied aufweisen. Bei den anderen Proteinen konnte dieser signifikante Unterschied nicht festgestellt werden. Bei der Hemmung bekannter Substanzen konnten Unterschiede im Hemmprofil der Transport-Proteine festgestellt werden.

## 7 Summary

With more than 200 million cases in 2018 malaria poses one of the most dangerous infectious diseases worldwide. Malaria tropica caused by *Plasmodium falciparum* mainly threatens Africa. In the rest of the world the other four human-pathogenic malarial parasites, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium knowlesi*, *Plasmodium ovale* and *Plasmodium malariae* play a more dominant role. Increasing resistances of the parasites make successful treatment difficult, therefore new drug targets need to be identified. Since the end of the last century, compound libraries have been screened on promising targets.

The plasmodial formate-nitrite-transporter is responsible for the outward transport of the metabolic product lactate. Inhibition causes the death of the parasite, making that transporter an auspicious target. At the starting point of this work, one lead structure and some analogous were known. To increase variety in structure and maybe identify an additional binding site, a phenotypic screening method was developed in this thesis. With the established method many substances can be tested in a short amount of time for their inhibition of the plasmodial formate-nitrite-transporter. The method was not just carried out with wildtype protein, but with the enforced resistance mutant (G107S) for the known lead structure. With doing so the identification of a novel binding site was favoured.

About 13.000 substances from the TCAMS library were tested. From the primary screening 92 hits arose. None of them could be confirmed in a biophysical assay measuring the transporters direct uptake of radiolabelled lactate. Thus, screening those 13.000 substances, no new substance could be found, inhibiting the transport better than the already known control.

Furthermore, the formate-nitrite-transporter of all human-pathogenic plasmodia were compared. Arising from their high amino acid sequence similarity, a similar transport rate and inhibitory profile was suspected. Despite this, the transporter from *P. falciparum* and *P. malariae* showed significant differences in the transport rate. No significant difference was noticed for the other transporters. The inhibitory profile showed some differences between the transport proteins.



## 8 Literaturverzeichnis

1. Hassl AR (2008) Die Malaria im Römischen Kaiserreich. Eine bemerkenswerte Textstelle in den Digesten. *Wien Klin Wochenschr* 120(19-20 Suppl 4):11–14.  
doi:10.1007/s00508-008-1033-2
2. Shah S (2010) *The fever. How malaria has ruled humankind for 500,000 years*, 1. Aufl. Sarah Crichton Books/Farrar, Straus, and Giroux, New York
3. Cardona-Arias JA, Salas-Zapata WA, Carmona-Fonseca J (2019) Determinación y determinantes sociales de la malaria. Revisión sistemática, 1980-2018. *Rev Panam Salud Publica* 43:e39. doi:10.26633/RPSP.2019.39
4. Gollin D, Zimmermann C (2007) *Malaria. Disease impacts and long-run income differences (2997)*. IZA DP, Bonn
5. Worrall E, Basu S, Hanson K (2005) Is malaria a disease of poverty? A review of the literature. *Trop Med Int Health* 10(10):1047–1059. doi:10.1111/j.1365-3156.2005.01476.x
6. World Health Organization (2019) *World malaria report 2019*. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
7. World Health Organization (2018) *Antimalarial drug efficacy and drug resistance*. vom 27. April 2018
8. Robert-Koch-Institut (2019) *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2018*. Datenstand: 1 März 2019
9. Oakley MS, Gerald N, McCutchan TF, Aravind L, Kumar S (2011) Clinical and molecular aspects of malaria fever. *Trends Parasitol* 27(10):442–449.  
doi:10.1016/j.pt.2011.06.004
10. Lin JT, Bethell D, Tyner SD, Lon C, Shah NK, Saunders DL, Sriwichai S, Khemawoot P, Kuntawunggin W, Smith BL, Noedl H, Schaecher K, Socheat D, Se Y, Meshnick SR, Fukuda MM (2011) *Plasmodium falciparum* gametocyte carriage is associated with subsequent *Plasmodium vivax* relapse after treatment. *PLoS One* 6(4):e18716.  
doi:10.1371/journal.pone.0018716
11. Gural N, Mancio-Silva L, Miller AB, Galstian A, Butty VL, Levine SS, Patrapuvich R, Desai SP, Mikolajczak SA, Kappe SHI, Fleming HE, March S, Sattabongkot J, Bhatia SN (2018) In vitro culture, drug sensitivity, and transcriptome of *Plasmodium vivax* hypnozoites. *Cell Host Microbe* 23(3):395-406.e4. doi:10.1016/j.chom.2018.01.002
12. White NJ, Pukrittayakamee S, Hien TT, Faiz MA, Mokuolu OA, Dondorp AM (2014) *Malaria*. *Lancet* 383(9918):723–735. doi:10.1016/S0140-6736(13)60024-0

13. Lindner SE, Miller JL, Kappe SHI (2012) Malaria parasite pre-erythrocytic infection. Preparation meets opportunity. *Cell Microbiol* 14(3):316–324. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01734.x
14. Sigala PA, Crowley JR, Hsieh S, Henderson JP, Goldberg DE (2012) Direct tests of enzymatic heme degradation by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* 287(45):37793–37807. doi:10.1074/jbc.M112.414078
15. Sigala PA, Goldberg DE (2014) The peculiarities and paradoxes of *Plasmodium* heme metabolism. *Annu Rev Microbiol* 68:259–278. doi:10.1146/annurev-micro-091313-103537
16. Wu B, Rambow J, Bock S, Holm-Bertelsen J, Wiechert MI, Blancke Soares A, Spielmann T, Beitz E (2015) Identity of a *Plasmodium* lactate/H<sup>+</sup> symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat Commun* 6:6284. doi:10.1038/ncomms7284
17. 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. doi:10.1038/ncomms7721
18. 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(25):15045–15052. doi:10.1074/jbc.270.25.15045
19. Elliott JL, Saliba KJ, Kirk K (2001) Transport of lactate and pyruvate in the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Biochem J* 355(3):733–739. doi:10.1042/bj3550733
20. Cheviet T, Lefebvre-Tournier I, Wein S, Peyrottes S (2019) *Plasmodium* purine metabolism and its inhibition by nucleoside and nucleotide analogues. *J Med Chem* 62(18):8365–8391. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b00182
21. Mehrotra S, Bopanna MP, Bulusu V, Balaram H (2010) Adenine metabolism in *Plasmodium falciparum*. *Exp Parasitol* 125(2):147–151. doi:10.1016/j.exppara.2010.01.002
22. Krungkrai SR, Krungkrai J (2016) Insights into the pyrimidine biosynthetic pathway of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target. *Asian Pac J Trop Med* 9(6):525–534. doi:10.1016/j.apjtm.2016.04.012
23. Freedman DO (2008) Clinical practice. Malaria prevention in short-term travelers. *N Engl J Med* 359(6):603–612. doi:10.1056/NEJMcp0803572
24. Genton B, D'Acremont V (2012) Malaria prevention in travelers. *Infect Dis Clin North Am* 26(3):637–654. doi:10.1016/j.idc.2012.05.003

25. Cable J, Srikantiah P, Crowe JE, Pulendran B, Hill A, Ginsberg A, Koff W, Mathew A, Ng T, Jansen K, Glenn G, Permar S, Wilson I, Weiner DB, Weissman D, Rappuoli R (2019) Vaccine innovations for emerging infectious diseases-a symposium report. *Ann N Y Acad Sci*:1–13. doi:10.1111/nyas.14235
26. Chêne A, Gangnard S, Guadall A, Ginisty H, Leroy O, Havelange N, Viebig NK, Gamain B (2019) Preclinical immunogenicity and safety of the cGMP-grade placental malaria vaccine PRIMVAC. *EBioMedicine* 42:145–156. doi:10.1016/j.ebiom.2019.03.010
27. World Health Organization (2015) Guidelines for the treatment of malaria. World Health Organization, Geneva, Switzerland
28. Moore CM, Hoey EM, Trudgett A, Timson DJ (2011) Artemisinins act through at least two targets in a yeast model. *FEMS Yeast Res* 11(2):233–237. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00706.x
29. Slater AFG (1993) Chloroquine. Mechanism of drug action and resistance in *Plasmodium falciparum*. *Pharmacol Ther* 57(2-3):203–235. doi:10.1016/0163-7258(93)90056-J
30. Thomé R, Lopes SCP, Costa FTM, Verinaud L (2013) Chloroquine. Modes of action of an undervalued drug. *Immunol Lett* 153(1-2):50–57. doi:10.1016/j.imlet.2013.07.004
31. Mikolajczak SA, Vaughan AM, Kangwanrangsang N, Roobsoong W, Fishbaugher M, Yimamnuaychok N, Rezakhani N, Lakshmanan V, Singh N, Kaushansky A, Camargo N, Baldwin M, Lindner SE, Adams JH, Sattabongkot J, Prachumsri J, Kappe SHI (2015) *Plasmodium vivax* liver stage development and hypnozoite persistence in human liver-chimeric mice. *Cell Host Microbe* 17(4):526–535. doi:10.1016/j.chom.2015.02.011
32. Lalève A, Vallières C, Golinelli-Cohen M-P, Bouton C, Song Z, Pawlik G, Tindall SM, Avery SV, Clain J, Meunier B (2016) The antimalarial drug primaquine targets Fe-S cluster proteins and yeast respiratory growth. *Redox Biol* 7:21–29. doi:10.1016/j.redox.2015.10.008
33. Dhingra SK, Gabryszewski SJ, Small-Saunders JL, Yeo T, Henrich PP, Mok S, Fidock DA (2019) Global spread of mutant PfCRT and its pleiotropic impact on *Plasmodium falciparum* multidrug resistance and fitness. *mBio* 10(2):e02731-18. doi:10.1128/mBio.02731-18
34. Frame IJ, Deniskin R, Rinderspacher A, Katz F, Deng S-X, Moir RD, Adjalley SH, Coburn-Flynn O, Fidock DA, Willis IM, Landry DW, Akabas MH (2015) Yeast-based high-throughput screen identifies *Plasmodium falciparum* equilibrative nucleoside transporter 1 inhibitors that kill malaria parasites. *ACS Chem Biol* 10(3):775–783. doi:10.1021/cb500981y

35. Spillman NJ, Kirk K (2015) The malaria parasite cation ATPase PfATP4 and its role in the mechanism of action of a new arsenal of antimalarial drugs. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 5(3):149–162. doi:10.1016/j.ijpddr.2015.07.001
36. Gollack A, Henke B, Bergmann B, Wiechert MI, 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. doi:10.1371/journal.ppat.1006172
37. 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 antiplasmodial compounds identified in whole cell phenotypic screens. *PLoS Pathog* 13(2):e1006180. doi:10.1371/journal.ppat.1006180
38. Ortiz D, Guiguemde WA, Johnson A, Elya C, Anderson J, Clark J, Connelly M, Yang L, Min J, Sato Y, Guy RK, Landfear SM (2015) Identification of selective inhibitors of the Plasmodium falciparum hexose transporter PfHT by screening focused libraries of anti-malarial compounds. *PLoS One* 10(4):e0123598. doi:10.1371/journal.pone.0123598
39. Meier A, Erler H, Beitz E (2018) Targeting channels and transporters in protozoan parasite infections. *Front Chem* 6:88. doi:10.3389/fchem.2018.00088
40. Christaki E, Marcou M, Tofarides A (2020) Antimicrobial resistance in bacteria. Mechanisms, evolution, and persistence. *J Mol Evol* 88(1):26–40. doi:10.1007/s00239-019-09914-3
41. Howard EM, Zhang H, Roepe PD (2002) A novel transporter, PfCRT, confers antimalarial drug resistance. *J Membr Biol* 190(1):1–8. doi:10.1007/s00232-002-1019-3
42. Beringer PM, Slaughter RL (2005) Transporters and their impact on drug disposition. *Ann Pharmacother* 39(6):1097–1108. doi:10.1345/aph.1E614
43. Abraham EP, Chain E (1940) An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146(3713):837. doi:10.1038/146837a0
44. Bishop A, Birkett B (1947) Acquired resistance to paludrine in Plasmodium gallinaceum. *Nature* 159(4052):884. doi:10.1038/159884a0
45. Overman RR (1948) Reversible cellular permeability alterations in disease; in vivo studies on sodium, potassium and chloride concentrations in erythrocytes of the malarious monkey. *Am J Physiol* 152(1):113–121. doi:10.1152/ajplegacy.1947.152.1.113
46. Ginsburg H, Kutner S, Krugliak M, Ioav Cabantchik Z (1985) Characterization of permeation pathways appearing in the host membrane of Plasmodium falciparum infected red blood cells. *Mol Biochem Parasitol* 14(3):313–322. doi:10.1016/0166-6851(85)90059-3

47. Huber SM, Uhlemann A-C, Gamper NL, Durantón C, Kremsner PG, Lang F (2002) Plasmodium falciparum activates endogenous Cl<sup>-</sup> channels of human erythrocytes by membrane oxidation. *EMBO J* 21(1-2):22–30. doi:10.1093/emboj/21.1.22
48. Spangenberg T, Burrows JN, Kowalczyk P, McDonald S, Wells TNC, Willis PA (2013) The open access malaria box. A drug discovery catalyst for neglected diseases. *PLoS One* 8(6):e62906. doi:10.1371/journal.pone.0062906
49. van Voorhis WC, Adams JH, Adelfio R et al (2016) Open source drug discovery with the malaria box compound collection for neglected diseases and beyond. *PLoS Pathog* 12(7):e1005763. doi:10.1371/journal.ppat.1005763
50. Gamo FJ, Sanz LM, Vidal J, Cozar C de, Alvarez E, Lavandera JL, Vanderwall DE, Green DVS, Kumar V, Hasan S, Brown JR, Peishoff CE, Cardon LR, García-Bustos JF (2010) Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature* 465(7296):305–310. doi:10.1038/nature09107
51. Makler MT, Hinrichs DJ (1993) Measurement of the lactate dehydrogenase activity of Plasmodium falciparum as an assessment of parasitemia. *Am J Trop Med Hyg* 48(2):205–210. doi:10.4269/ajtmh.1993.48.205
52. Makler MT, Ries JM, Williams JA, Bancroft JE, Piper RC, Gibbins BL, Hinrichs DJ (1993) Parasite lactate dehydrogenase as an assay for Plasmodium falciparum drug sensitivity. *Am J Trop Med Hyg* 48(6):739–741. doi:10.4269/ajtmh.1993.48.739
53. Johannsen W (1911) The genotype conception of heredity. *Int J Epidemiol* 43(4):989–1000. doi:10.1093/ije/dyu063
54. Mahner M, Kary M (1997) What exactly are genomes, genotypes and phenotypes? And what about phenomes? *J Theor Biol* 186(1):55–63. doi:10.1006/jtbi.1996.0335
55. Houle D, Govindaraju DR, Omholt S (2010) Phenomics. The next challenge. *Nat Rev Genet* 11(12):855–866. doi:10.1038/nrg2897
56. Denny PW (2018) Yeast. Bridging the gap between phenotypic and biochemical assays for high-throughput screening. *Expert Opin Drug Discov* 13(12):1153–1160. doi:10.1080/17460441.2018.1534826
57. Swinney DC (2013) Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines. *Clin Pharmacol Ther* 93(4):299–301. doi:10.1038/clpt.2012.236
58. Ortiz D, Guiguemde WA, Hammill JT, Carrillo AK, Chen Y, Connelly M, Stalheim K, Elya C, Johnson A, Min J, Shelat AA, Smithson DC, Yang L, Zhu F, Guy RK, Landfear SM (2017) Discovery of novel, orally bioavailable, antileishmanial compounds using phenotypic screening. *PLoS Negl Trop Dis* 11(12):e0006157. doi:10.1371/journal.pntd.0006157

59. Mullard A (2015) The phenotypic screening pendulum swings. *Nat Rev Drug Discov* 14(12):807–809. doi:10.1038/nrd4783
60. U.S. Food & Drug Administration (2019) Generally recognized as safe (GRAS). <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>. Zugegriffen: 22. Dezember 2019
61. Auerbach D, Arnoldo A, Bogdan B, Fetchko M, Stagljar I (2005) Drug discovery using yeast as a model system. A functional genomic and proteomic view. *Curr Proteomics* 2(1):1–13. doi:10.2174/1570164053507790
62. Munder T, Hinnen A (1999) Yeast cells as tools for target-oriented screening. *Appl Microbiol Biotechnol* 52(3):311–320. doi:10.1007/s002530051525
63. Pacheco A, Talaia G, Sá-Pessoa J, Bessa D, Gonçalves MJ, Moreira R, Paiva S, Casal M, Queirós O (2012) Lactic acid production in *Saccharomyces cerevisiae* is modulated by expression of the monocarboxylate transporters Jen1 and Ady2. *FEMS Yeast Res* 12(3):375–381. doi:10.1111/j.1567-1364.2012.00790.x
64. Makuc J, Paiva S, Schauen M, Krämer R, André B, Casal M, Leão C, Boles E (2001) The putative monocarboxylate permeases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* do not transport monocarboxylic acids across the plasma membrane. *Yeast* 18(12):1131–1143. doi:10.1002/yea.763
65. Lodi T, Fontanesi F, Guiard B (2002) Co-ordinate regulation of lactate metabolism genes in yeast. The role of the lactate permease gene JEN1. *Mol Genet Genomics* 266(5):838–847. doi:10.1007/s00438-001-0604-y
66. Lü W, Du J, Schwarzer NJ, Wacker T, Andrade SLA, Einsle O (2013) The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biol Chem* 394(6):715–727. doi:10.1515/hsz-2012-0339
67. 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(7272):467–472. doi:10.1038/nature08610
68. Lü W, Du J, Schwarzer NJ, Gerbig-Smentek E, Einsle O, Andrade SLA (2012) The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(33):13254–13259. doi:10.1073/pnas.1204201109
69. Erler H, Ren B, Gupta N, Beitz E (2018) The intracellular parasite *Toxoplasma gondii* harbors three druggable FNT-type formate and l-lactate transporters in the plasma membrane. *J Biol Chem* 293(45):17622–17630. doi:10.1074/jbc.RA118.003801
70. Wiechert MI, Beitz E (2017) Formate-nitrite transporters. *Channels (Austin)* 11(5):365–367

71. Wiechert MI, Beitz E (2017) Mechanism of formate-nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *EMBO J* 36(7):949–958. doi:10.15252/embj.201695776
72. 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. doi:10.1016/j.pep.2016.06.008
73. Helmstetter F, Arnold P, Höger B, Petersen LM, Beitz E (2019) Formate-nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids instead of a central histidine maintain pH-dependent transport. *J Biol Chem* 294(2):623–631. doi:10.1074/jbc.RA118.006340
74. National Center for Biotechnology Information BLAST: Basic local alignment search tool. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Zugegriffen: 17. Dezember 2019
75. National Center for Biotechnology Information Taxonomy browser. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>. Zugegriffen: 18. Dezember 2019
76. Poole RC, Halestrap AP (1992) Identification and partial purification of the erythrocyte L-lactate transporter. *Biochem J* 283 (Pt 3):855–862. doi:10.1042/bj2830855
77. Juel C, Halestrap AP (1999) Lactate transport in skeletal muscle - role and regulation of the monocarboxylate transporter. *J Physiol* 517 (Pt 3):633–642. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.0633s.x
78. Lü W, Du J, Wacker T, Gerbig-Smentek E, Andrade SLA, Einsle O (2011) pH-dependent gating in a FocA formate channel. *Science* 332(6027):352–354. doi:10.1126/science.1199098
79. Rost B (1996) PHD. Predicting one-dimensional protein structure by profile-based neural networks. In: Doolittle RF (Hrsg) *Computer methods for macromolecular sequence analysis*, Bd 266. Acad. Press, San Diego, Calif., S 525–539
80. Pedersen JT, Moult J (1996) Genetic algorithms for protein structure prediction. *Curr Opin Struct Biol* 6(2):227–231. doi:10.1016/S0959-440X(96)80079-0
81. Hajek P, Bader A, Helmstetter F, Henke B, Arnold P, Beitz E (2019) Cell-free and yeast-based production of the malarial lactate transporter, PffNT, delivers comparable yield and protein quality. *Front Pharmacol* 10:375. doi:10.3389/fphar.2019.00375
82. Waight AB, Love J, Wang D-N (2009) Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nat Struct Mol Biol* 17(1):31–37. doi:10.1038/nsmb.1740
83. Beitz E (2000) TEXshade. Shading and labeling of multiple sequence alignments using LATEX2 epsilon. *Bioinformatics* 16(2):135–139. doi:10.1093/bioinformatics/16.2.135

84. Gietz RD, Schiestl RH, Willems AR, Woods RA (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11(4):355–360. doi:10.1002/yea.320110408
85. Kushnirov VV (2000) Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* 16(9):857–860. doi:10.1002/1097-0061(20000630)16:9<857::AID-YEA561>3.0.CO;2-B
86. Motulsky HJ, Brown RE (2006) Detecting outliers when fitting data with nonlinear regression – a new method based on robust nonlinear regression and the false discovery rate. *BMC Bioinformatics* 7(1):1–20. doi:10.1186/1471-2105-7-123
87. Rampersad SN (2012) Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. *Sensors (Basel)* 12(9):12347–12360. doi:10.3390/s120912347
88. Zalata AA, Lammertijn N, Christophe A, Comhaire FH (1998) The correlates and alleged biochemical background of the resazurin reduction test in semen. *Int J Androl* 21(5):289–294. doi:10.1046/j.1365-2605.1998.00126.x
89. ICH Association (2005) Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). ICH harmonised tripartite guideline. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>. Zugegriffen: 29. Dezember 2019
90. Stier TJ, Arnold W, Stannard JN (1934) A photoelectric densitometer for use with suspensions. *J Gen Physiol* 17(3):383–392. doi:10.1085/jgp.17.3.383
91. Neufeld BH, Tapia JB, Lutzke A, Reynolds MM (2018) Small molecule interferences in resazurin and MTT-based metabolic assays in the absence of cells. *Anal Chem* 90(11):6867–6876. doi:10.1021/acs.analchem.8b01043
92. Petrovic K, Pfeifer M, Parker CN, Schuierer S, Tallarico J, Hoepfner D, Movva NR, Scheel G, Helliwell SB (2017) Two low complexity ultra-high throughput methods to identify diverse chemically bioactive molecules using *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Res* 199:10–18. doi:10.1016/j.micres.2017.02.004
93. Sangkaew A, Krungkrai J, Yompakdee C (2018) Development of a high throughput yeast-based screening assay for human carbonic anhydrase isozyme II inhibitors. *AMB Expr* 8(1):1–12. doi:10.1186/s13568-018-0653-9
94. Eaton SL, Roche SL, Llaverro Hurtado M, Oldknow KJ, Farquharson C, Gillingwater TH, Wishart TM (2013) Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. *PLoS One* 8(8):e72457. doi:10.1371/journal.pone.0072457
95. Moritz CP (2017) Tubulin or not tubulin. Heading toward total protein staining as loading control in western blots. *Proteomics* 17(20). doi:10.1002/pmic.201600189



96. Golldack A (2018) Entdeckung von Inhibitoren des Lactat-Transporters aus dem Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum*. [https://macau.uni-kiel.de/servlets/MCRFileNodeServlet/dissertation\\_derivate\\_00007502/Dissertation\\_Andre\\_Golldack.pdf](https://macau.uni-kiel.de/servlets/MCRFileNodeServlet/dissertation_derivate_00007502/Dissertation_Andre_Golldack.pdf)
97. Taneja NK, Tyagi JS (2007) Resazurin reduction assays for screening of anti-tubercular compounds against dormant and actively growing *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium smegmatis*. *J Antimicrob Chemother* 60(2):288–293. doi:10.1093/jac/dkm207
98. Rahbari M, Rahlfs S, Jortzik E, Bogeski I, Becker K (2017) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dynamics in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS One* 12(4):e0174837. doi:10.1371/journal.pone.0174837
99. Kuhn Y, Rohrbach P, Lanzer M (2007) Quantitative pH measurements in *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes using pHluorin. *Cell Microbiol* 9(4):1004–1013. doi:10.1111/j.1462-5822.2006.00847.x
100. van Schalkwyk DA, Saliba KJ, Biagini GA, Bray PG, Kirk K (2013) Loss of pH control in *Plasmodium falciparum* parasites subjected to oxidative stress. *PLoS One* 8(3):e58933. doi:10.1371/journal.pone.0058933
101. Alonso A, Arrázola A, Garcíandía A, Esparza N, Gómez-Alamillo C, Díez J (1993) Erythrocyte anion exchanger activity and intracellular pH in essential hypertension. *Hypertension* 22(3):348–356. doi:10.1161/01.hyp.22.3.348
102. Warth J, Desforges JF (1975) Determinants of intracellular pH in the erythrocyte. *Br J Haematol* 29(3):369–372. doi:10.1111/j.1365-2141.1975.tb01833.x
103. Perez GV, Perez AL (2000) Organic acids without a carboxylic acid functional group. *J Chem Educ* 77(7):910. doi:10.1021/ed077p910
104. Castilho AL, Caleffi-Ferracioli KR, Canezin PH, Dias Siqueira VL, Lima Scodro RB de, Cardoso RF (2015) Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. *J Microbiol Methods* 111:119–121. doi:10.1016/j.mimet.2015.02.007
105. Murray D, Wigglesworth M (2017) HTS methods. Assay design and optimisation. In: Bittker JA, Ross NT (Hrsg) *High throughput screening methods. Evolution and refinement*. Royal Society of Chemistry, Cambridge, S 1–15
106. Song J (2012) Untersuchung einiger ungewöhnlicher Aquaporine aus *Salinispora tropica*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria tenella* und *Plasmodium falciparum*. [https://macau.uni-kiel.de/servlets/MCRFileNodeServlet/dissertation\\_derivate\\_00004363/Song\\_Diss\\_2012.pdf](https://macau.uni-kiel.de/servlets/MCRFileNodeServlet/dissertation_derivate_00004363/Song_Diss_2012.pdf)

107. Visser W, Scheffers WA, Batenburg-van der Vegte WH, van Dijken JP (1990) Oxygen requirements of yeasts. *Appl Environ Microbiol* 56(12):3785–3792
108. Hirasawa T, Ida Y, Furuasawa C, Shimizu H (2014) Potential of a *Saccharomyces cerevisiae* recombinant strain lacking ethanol and glycerol biosynthesis pathways in efficient anaerobic bioproduction. *Bioengineered* 5(2):123–128. doi:10.4161/bioe.26569
109. Minich JJ, Sanders JG, Amir A, Humphrey G, Gilbert JA, Knight R (2019) Quantifying and understanding well-to-well contamination in microbiome research. *mSystems* 4(4). doi:10.1128/mSystems.00186-19
110. Walker AW (2019) A lot on your plate? Well-to-well contamination as an additional confounder in microbiome sequence analyses. *mSystems* 4(4). doi:10.1128/mSystems.00362-19
111. Plouffe DM, Brinker A, McNamara C, Henson K, Kato N, Kuhlen K, Nagle A, Adrián F, Matzen JT, Anderson P, Nam T-G, Gray NS, Chatterjee A, Janes J, Yan SF, Trager R, Caldwell JS, Schultz PG, Zhou Y, Winzeler EA (2008) In silico activity profiling reveals the mechanism of action of antimalarials discovered in a high-throughput screen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(26):9059–9064. doi:10.1073/pnas.0802982105
112. Guiguemde WA, Shelat AA, Bouck D et al (2010) Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. *Nature* 465(7296):311–315. doi:10.1038/nature09099
113. Diller DJ, Hobbs DW (2004) Deriving knowledge through data mining high-throughput screening data. *J Med Chem* 47(25):6373–6383. doi:10.1021/jm049902r
114. Spencer RW (1998) High-throughput screening of historic collections. Observations on file size, biological targets, and file diversity. *Biotechnol Bioeng* 61(1):61–67. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(199824)61:1<61::AID-BIT11>3.0.CO;2-C
115. Roy C, Datta S (2018) ASBAAC. Automated salt-bridge and aromatic-aromatic calculator. *Bioinformatics* 14(4):164–166. doi:10.6026/97320630014164
116. Andrews PR, Craik DJ, Martin JL (1984) Functional group contributions to drug-receptor interactions. *J Med Chem* 27(12):1648–1657. doi:10.1021/jm00378a021
117. Jones G, Willett P, Glen RC (1995) Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol* 245(1):43–53. doi:10.1016/S0022-2836(95)80037-9
118. Baell JB, Holloway GA (2010) New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J Med Chem* 53(7):2719–2740. doi:10.1021/jm901137j

119. Thorne N, Auld DS, Inglese J (2010) Apparent activity in high-throughput screening. Origins of compound-dependent assay interference. *Curr Opin Chem Biol* 14(3):315–324. doi:10.1016/j.cbpa.2010.03.020
120. McGovern SL, Caselli E, Grigorieff N, Shoichet BK (2002) A common mechanism underlying promiscuous inhibitors from virtual and high-throughput screening. *J Med Chem* 45(8):1712–1722. doi:10.1021/jm010533y
121. Welsch ME, Snyder SA, Stockwell BR (2010) Privileged scaffolds for library design and drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 14(3):347–361. doi:10.1016/j.cbpa.2010.02.018
122. Muegge I, Mukherjee P (2016) Performance of dark chemical matter in high throughput screening. *J Med Chem* 59(21):9806–9813. doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01038
123. Baker M (2017) Fragment-based phenotypic screening is a hit. *Nat Rev Drug Discov* 16(4):225–226. doi:10.1038/nrd.2017.56
124. Backus KM, Correia BE, Lum KM, Forli S, Horning BD, González-Páez GE, Chatterjee S, Lanning BR, Teijaro JR, Olson AJ, Wolan DW, Cravatt BF (2016) Proteome-wide covalent ligand discovery in native biological systems. *Nature* 534(7608):570–574. doi:10.1038/nature18002
125. Blaazer AR, Orrling KM, Shanmugham A, Jansen C, Maes L, Edink E, Sterk GJ, Siderius M, England P, Bailey D, Esch IJP de, Leurs R (2015) Fragment-based screening in tandem with phenotypic screening provides novel antiparasitic hits. *J Biomol Screen* 20(1):131–140. doi:10.1177/1087057114549735
126. Hagner-McWhirter A, Laurin Y, Larsson A, Bjerneld EJ, Rönn O (2015) Cy5 total protein normalization in western blot analysis. *Anal Biochem* 486:54–61. doi:10.1016/j.ab.2015.06.017
127. Wu K, Dawe JH, Aris JP (2000) Expression and subcellular localization of a membrane protein related to Hsp30p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1463(2):477–482. doi:10.1016/S0005-2736(99)00255-2
128. Pearson K (1909) Determination of the coefficient of correlation. *Science* 30(757):23–25. doi:10.1126/science.30.757.23
129. Monod J (1949) The growth of bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol* (3):371–394
130. Wendell DL, Bisson LF (1993) Physiological characterization of putative high-affinity glucose transport protein Hxt2 of *Saccharomyces cerevisiae* by use of anti-synthetic peptide antibodies. *J Bacteriol* 175(23):7689–7696. doi:10.1128/jb.175.23.7689-7696.1993

131. Runquist D, Hahn-Hägerdal B, Rådström P (2010) Comparison of heterologous xylose transporters in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Biofuels* 3:5. doi:10.1186/1754-6834-3-5
132. Elbing K, Larsson C, Bill RM, Albers E, Snoep JL, Boles E, Hohmann S, Gustafsson L (2004) Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 70(9):5323–5330. doi:10.1128/AEM.70.9.5323-5330.2004
133. Heyland J, Fu J, Blank LM (2009) Correlation between TCA cycle flux and glucose uptake rate during respiro-fermentative growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 155(Pt 12):3827–3837. doi:10.1099/mic.0.030213-0
134. Hulley SB, Cummings SR, Browner WS (2013) *Designing clinical research*, 4. Aufl. Wolters Kluwer Health, Philadelphia
135. Fabrizio P, Battistella L, Vardavas R, Gattazzo C, Liou L-L, Diaspro A, Dossen JW, Gralla EB, Longo VD (2004) Superoxide is a mediator of an altruistic aging program in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 166(7):1055–1067. doi:10.1083/jcb.200404002
136. Naidoo N (2009) ER and aging—Protein folding and the ER stress response. *Ageing Res Rev* 8(3):150–159. doi:10.1016/j.arr.2009.03.001
137. Leupold S, Hubmann G, Litsios A, Meinema AC, Takhaviev V, Papagiannakis A, Niebel B, Janssens G, Siegel D, Heinemann M (2019) *Saccharomyces cerevisiae* goes through distinct metabolic phases during its replicative lifespan. *Elife* 8. doi:10.7554/eLife.41046
138. Meister S, Plouffe DM, Kuhen KL et al (2011) Imaging of Plasmodium liver stages to drive next-generation antimalarial drug discovery. *Science* 334(6061):1372–1377. doi:10.1126/science.1211936
139. van den Berg MA, Yde Steensma H (1997) Expression cassettes for formaldehyde and fluoroacetate resistance, two dominant markers in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13(6):551–559. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199705)13:6<551::AID-YEA113>3.0.CO;2-0
140. Harford S, Weitzman PDJ (1980) Selection for citrate synthase-deficient mutants with fluoroacetate. *FEBS Lett* 114(2):339–341. doi:10.1016/0014-5793(80)81146-X

9 Anhang

*Pf*FNT ● *Pv*FNT ■ *Pk*FNT ▲ *Po*FNT ▼ *Pm*FNT ◆ *Pf*FNT G107S ●

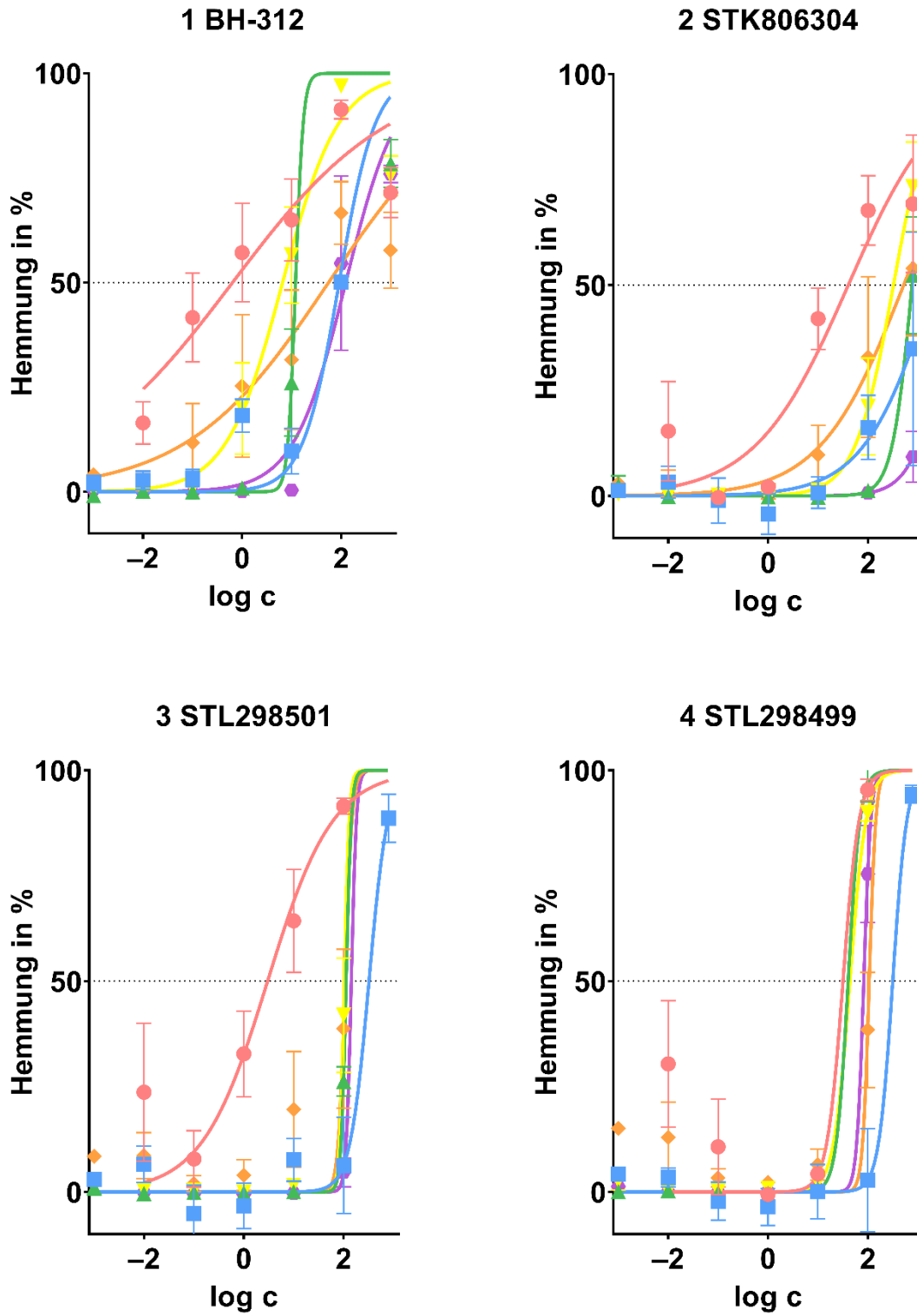


Abbildung 9.1: Hemmkurven der Gruppe Ia mit den Substanzen BH-312, STK806304, STL298501 und STL298499. Aufgetragene Daten sind n = 1-2 mit 1-2 wells je Konzentration. Aufgetragene Fehler sind SEM.

*Pf*FNT ● *Pv*FNT ■ *Pk*FNT ▲ *Po*FNT ▼ *Pm*FNT ◆ *Pf*FNT G107S ●

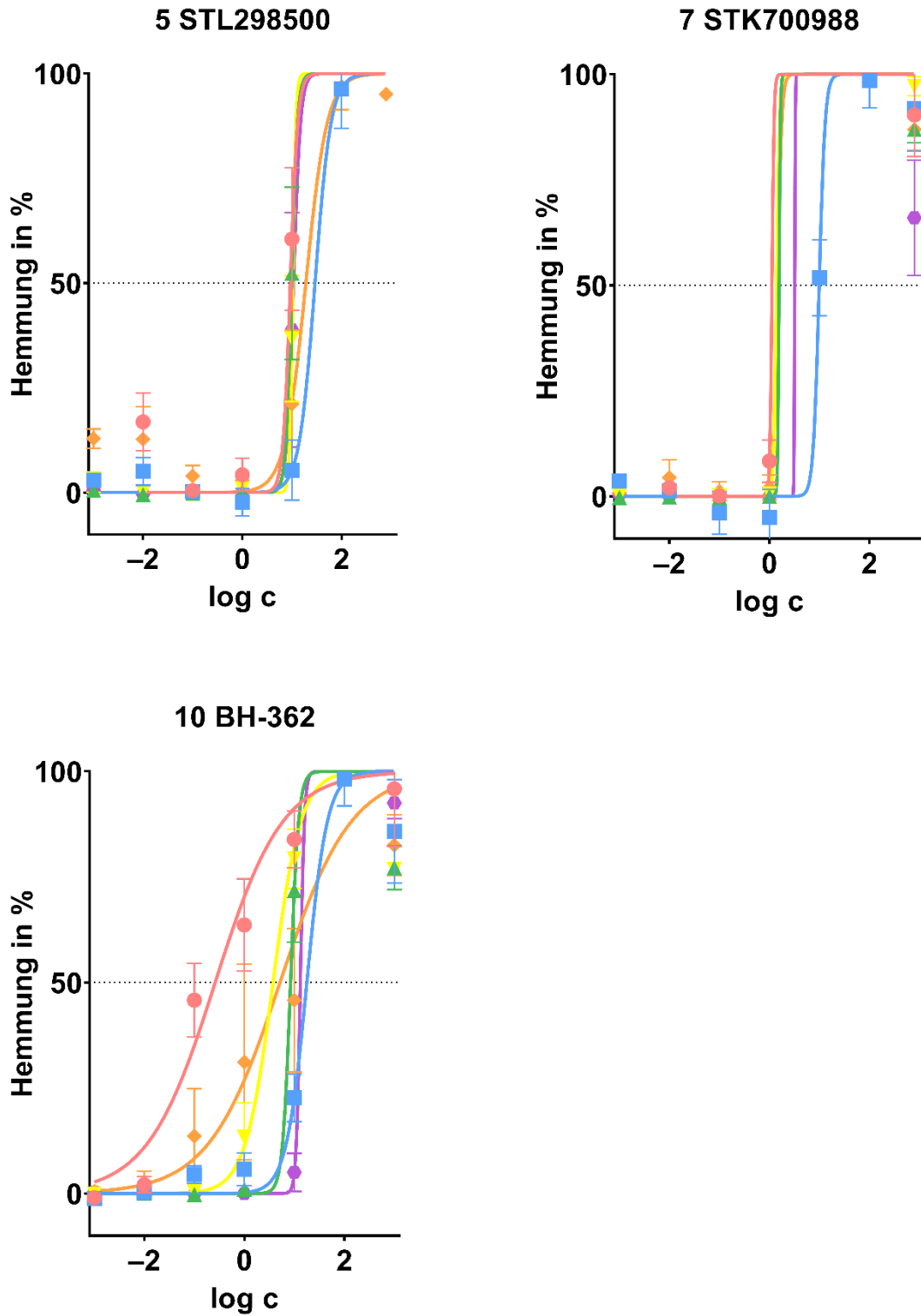


Abbildung 9.2: Hemmkurven der Gruppe Ia mit den Substanzen STL298500, STK700988 und BH-362. Aufgetragene Daten sind n = 1-2 mit 1-2 wells je Konzentration. Aufgetragene Fehler sind SEM.

*Pf*FNT ● *Pv*FNT ■ *Pk*FNT ▲ *Po*FNT ▼ *Pm*FNT ◆ *Pf*FNT G107S ●

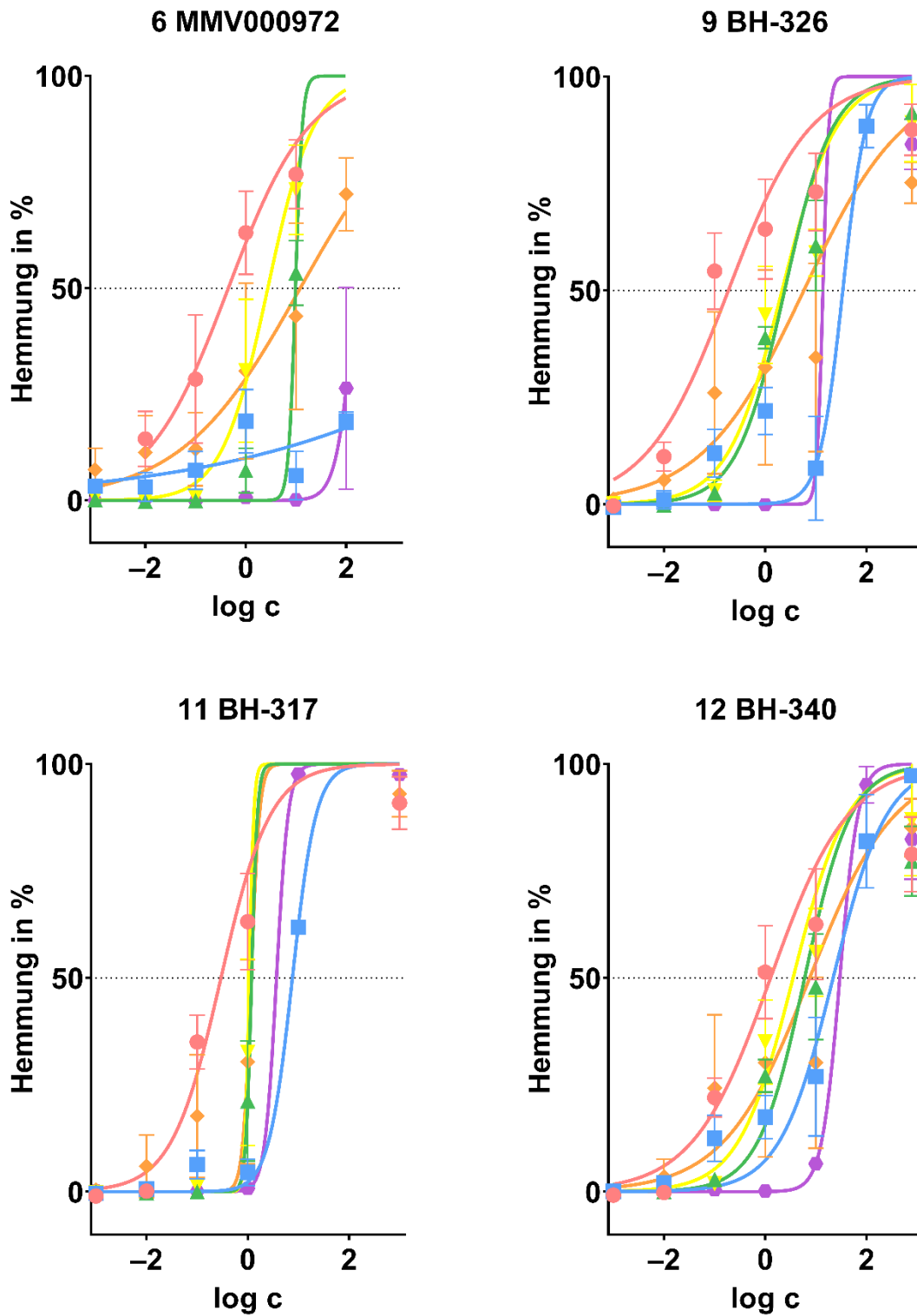


Abbildung 9.3: Hemmkurven der Gruppe Ib mit den Substanzen MMV000972, BH-326, BH-317 und BH-340. Aufgetragene Daten sind n = 1-2 mit 1-2 wells je Konzentration. Aufgetragene Fehler sind SEM.

*PfFNT* ● *PvFNT* ■ *PkFNT* ▲ *PoFNT* ▼ *PmFNT* ◆ *PfFNT G107S* ●

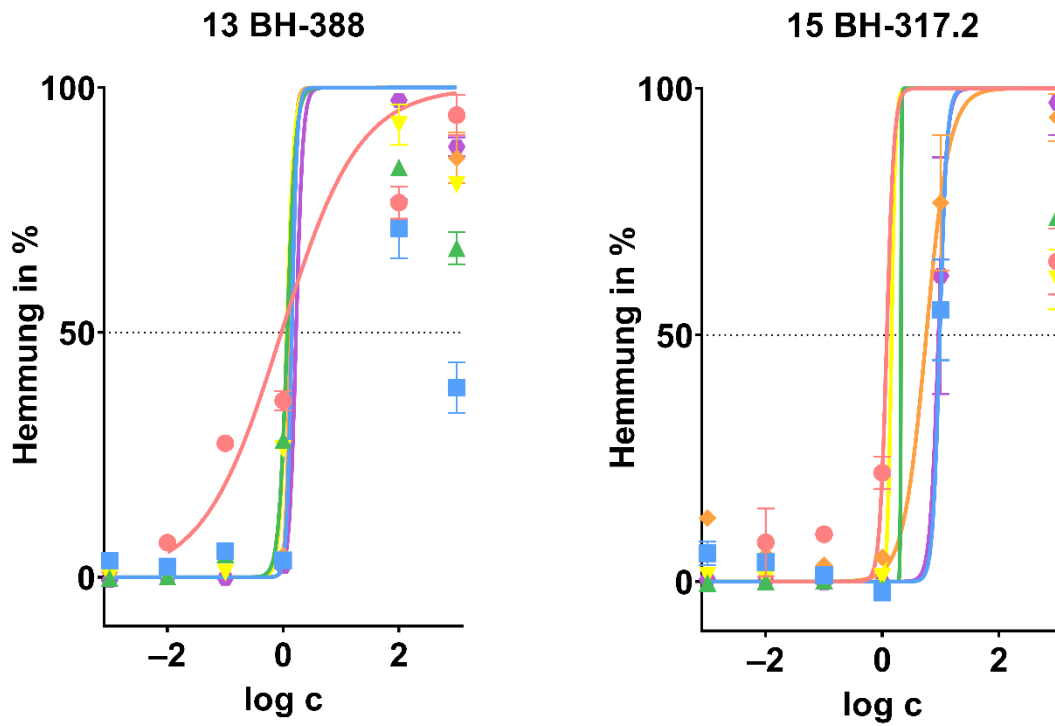


Abbildung 9.4: Hemmkurven der Gruppe Ib mit den Substanzen BH-388 und BH-317.2. Aufgetragene Daten sind n = 1-2 mit 1-2 wells je Konzentration. Aufgetragene Fehler sind SEM.



*Pf*FNT ● *Pv*FNT ■ *Pk*FNT ▲ *Po*FNT ▼ *Pm*FNT ◆ *Pf*FNT G107S ●

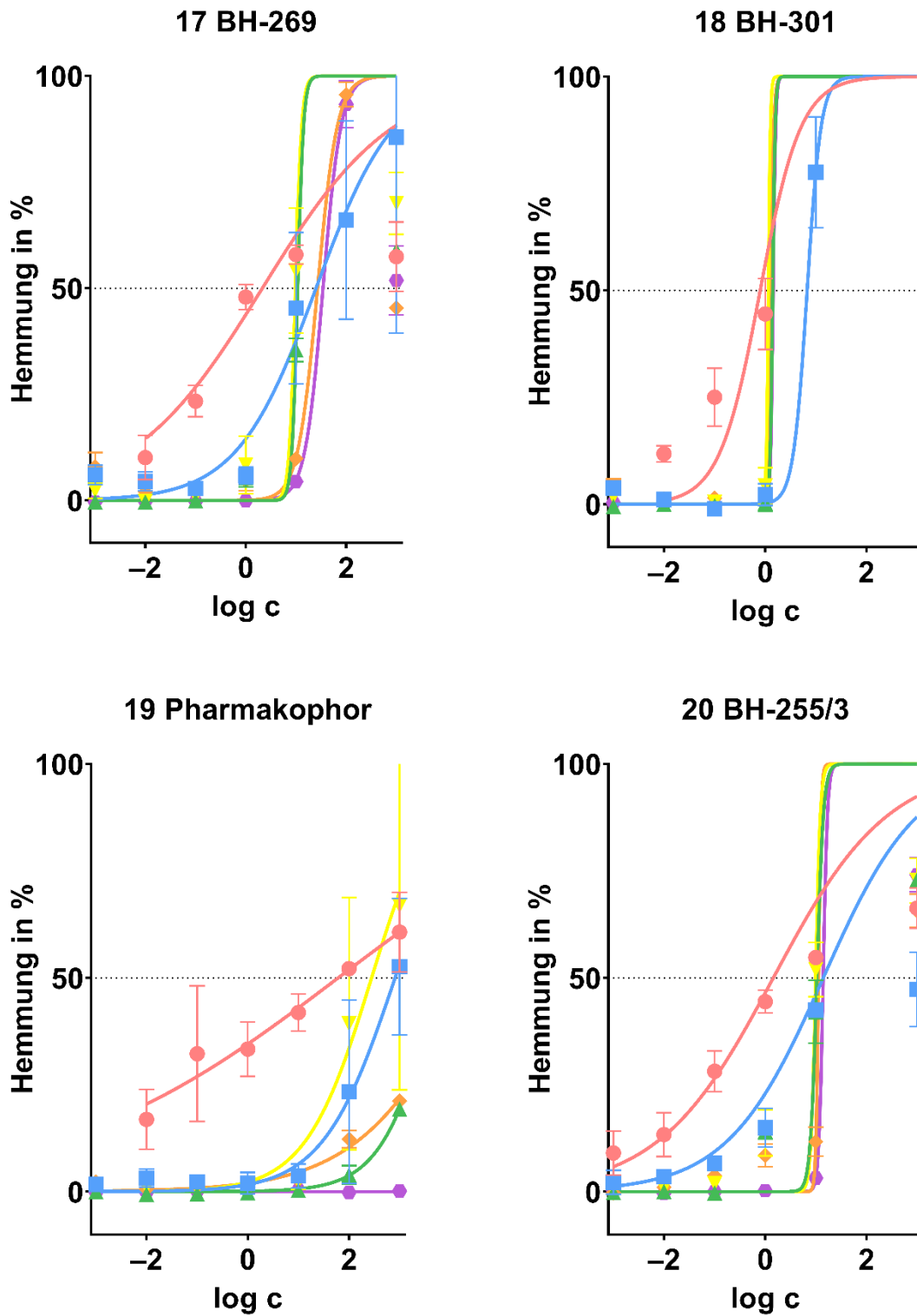


Abbildung 9.5: Hemmkurven der Gruppe IIa mit den Substanzen BH-269, BH-301, das Pharmakophor und BH-255/3. Aufgetragene Daten sind n = 1-2 mit 1-2 wells je Konzentration. Aufgetragene Fehler sind SEM.

*Pf*FNT ● *Pv*FNT ■ *Pk*FNT ▲ *Po*FNT ▼ *Pm*FNT ◆ *Pf*FNT G107S ●

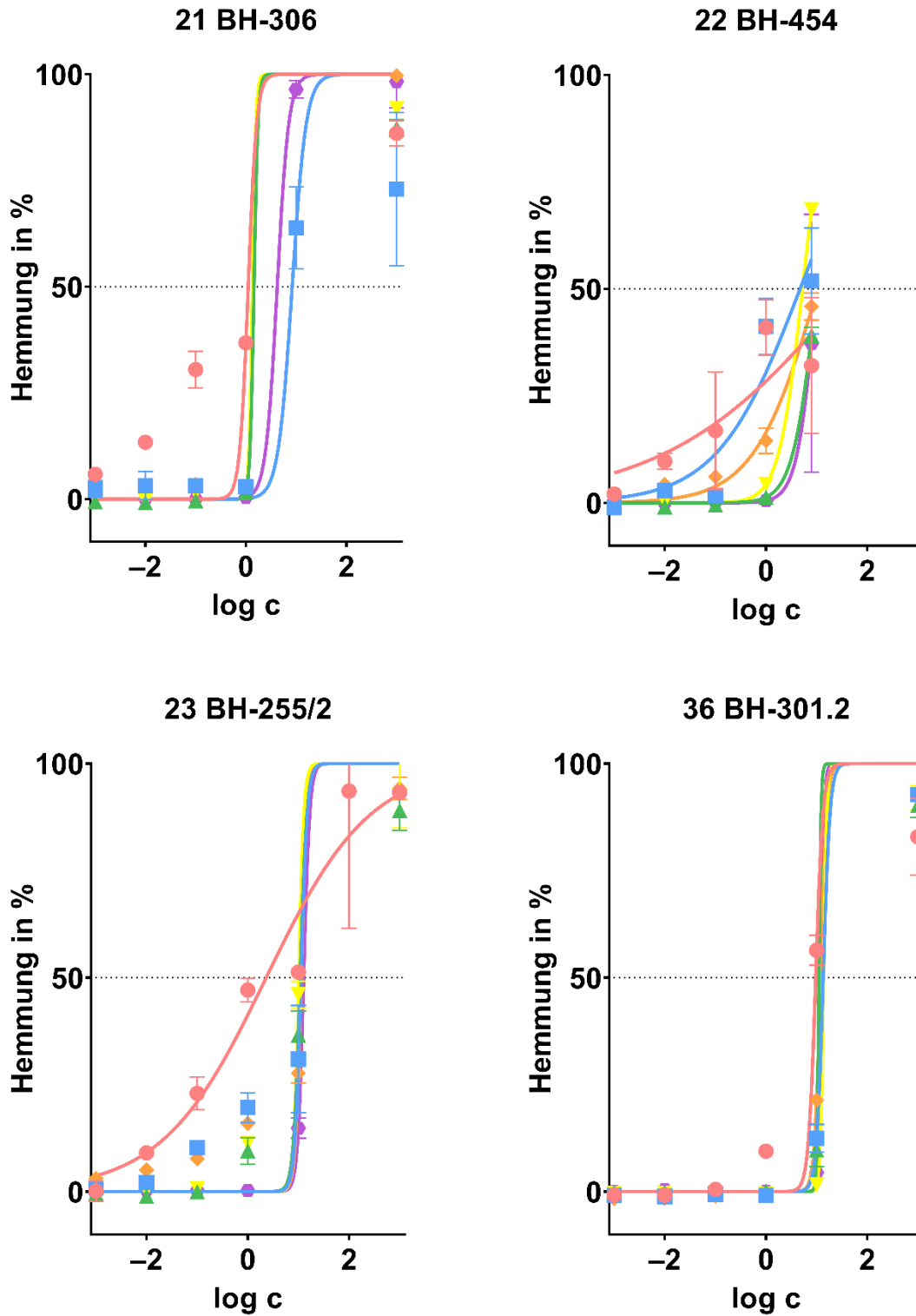


Abbildung 9.6: Hemmkurven der Gruppe IIa mit den Substanzen BH-306, BH-454, BH-255/2 und BH-301.2. Aufgetragene Daten sind n = 1-2 mit 1-2 wells je Konzentration. Aufgetragene Fehler sind SEM.

*Pf*FNT ● *Pv*FNT ■ *Pk*FNT ▲ *Po*FNT ▼ *Pm*FNT ◆ *Pf*FNT G107S ●

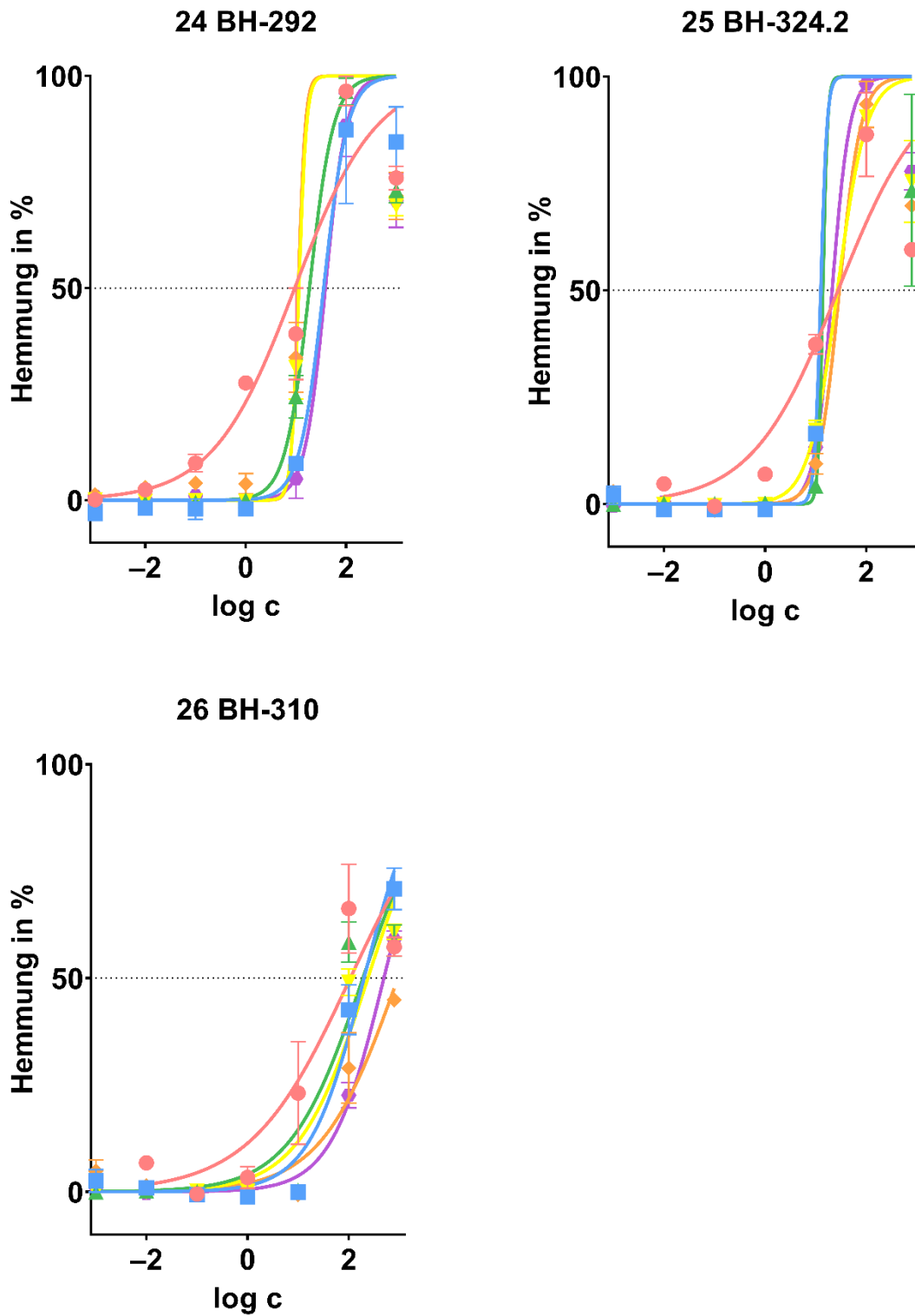


Abbildung 9.7: Hemmkurven der Gruppe IIb mit den Substanzen BH-292, BH-324.2 und BH-310. Aufgetragene Daten sind n = 1-2 mit 1-2 wells je Konzentration. Aufgetragene Fehler sind SEM.

*Pf*FNT ● *Pv*FNT ■ *Pk*FNT ▲ *Po*FNT ▼ *Pm*FNT ◆ *Pf*FNT G107S ●

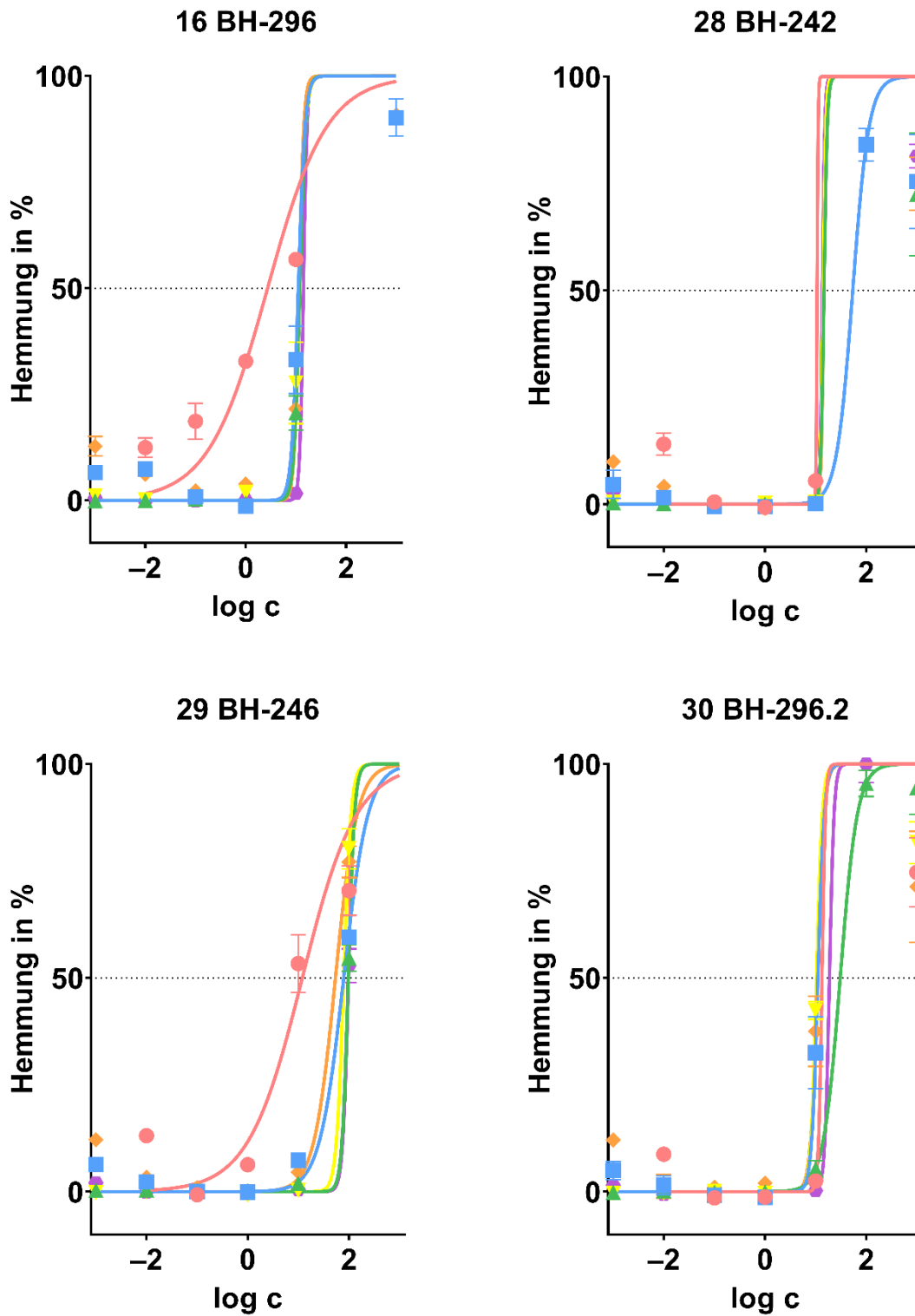


Abbildung 9.8: Hemmkurven der Gruppe IIc mit den Substanzen BH-296, BH-242, BH-246 und BH-296.2. Aufgetragene Daten sind n = 1-2 mit 1-2 wells je Konzentration. Aufgetragene Fehler sind SEM.

*Pf*FNT ● *Pv*FNT ■ *Pk*FNT ▲ *Po*FNT ▼ *Pm*FNT ◆ *Pf*FNT G107S ●

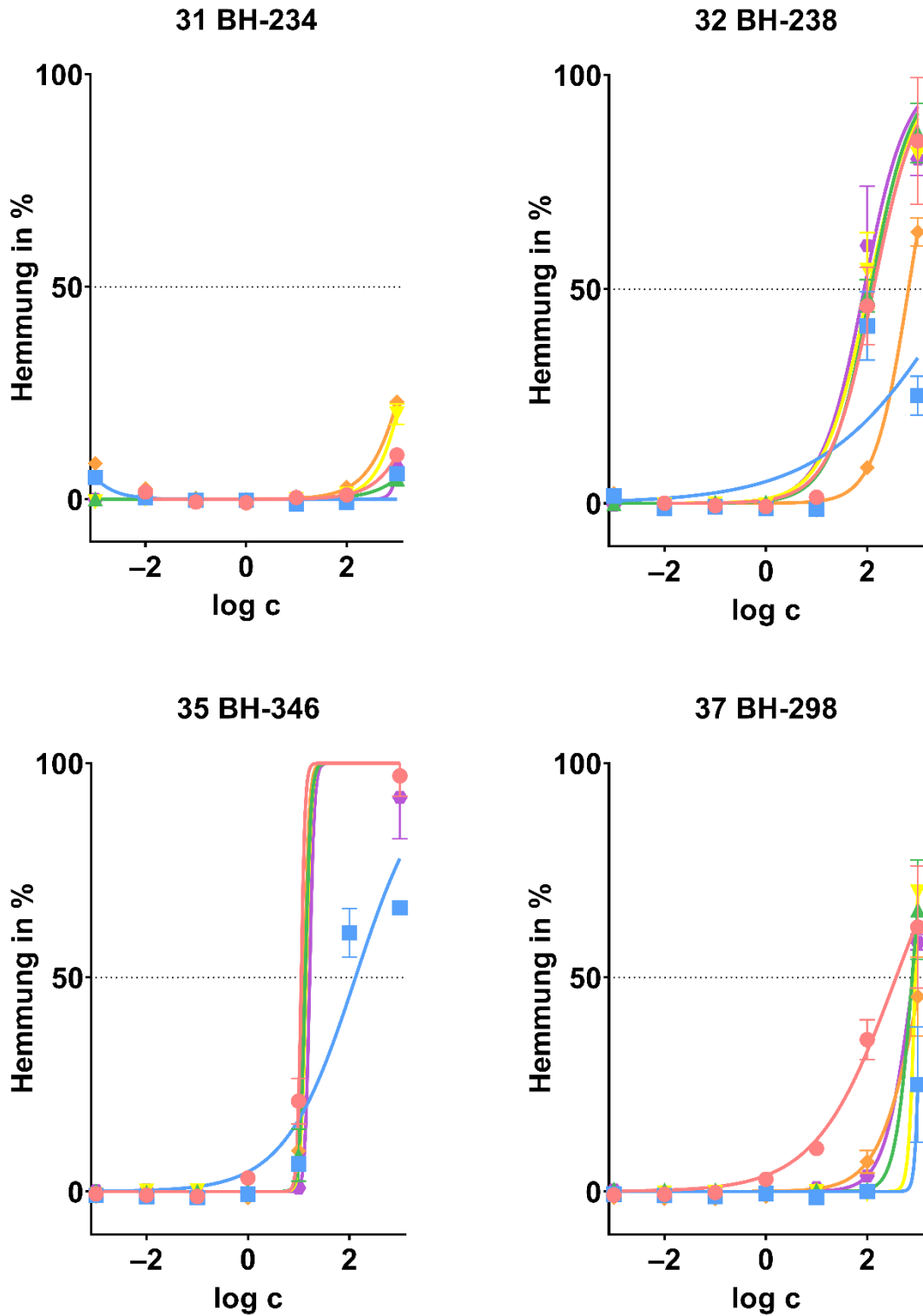


Abbildung 9.9: Hemmkurven der Gruppe IIc mit den Substanzen BH-234, BH-238, BH-346 und BH-298. Aufgetragene Daten sind n = 1-2 mit 1-2 wells je Konzentration. Aufgetragene Fehler sind SEM.

*Pf*FNT ● *Pv*FNT ■ *Pk*FNT ▲ *Po*FNT ▼ *Pm*FNT ◆ *Pf*FNT G107S ●

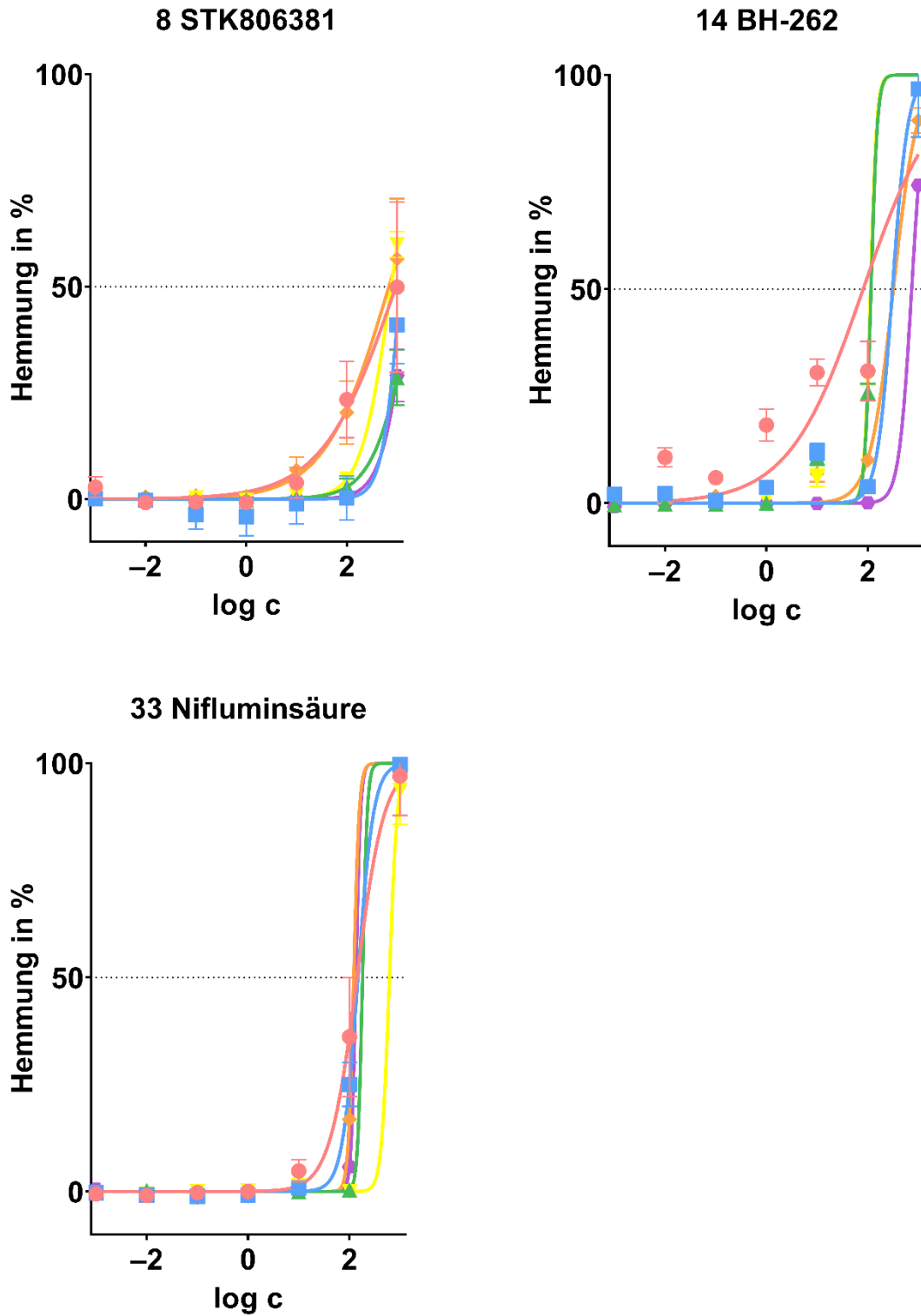


Abbildung 9.10: Hemmkurven der Gruppe III mit den Substanzen STK806381, BH-262 und Nifluminsäure. Aufgetragene Daten sind n = 1-2 mit 1-2 wells je Konzentration. Aufgetragene Fehler sind SEM.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die Abhandlung – abgesehen von der Beratung durch den Betreuer – nach Inhalt und Form eine eigenständige und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln verfasste Arbeit ist. Diese Arbeit hat weder ganz noch in Teilen schon an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen, wurde nicht veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht. Ich erkläre, dass die vorliegende Arbeit unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden ist. Außerdem versichere ich, dass mir noch nie ein akademischer Grad entzogen wurde.

Anna Lina Meier

Kiel, 2020