

# **Formiat-Nitrit-Transporter von *Naegleria fowleri* als Wirkstoffziel**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Moira Maureen Möller**

Kiel, 2024



Erster Gutachter: Professor Dr. Eric Beitz

Zweiter Gutachter: Professor Dr. Christian Peifer

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2024

Zum Druck genehmigt: 03.05.2024



**Für meine Eltern.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Parasitäre Infektionen als globales Gesundheitsproblem.....	1
1.1.1 Malaria .....	2
1.1.2 Primäre Amöbenmeningoenzephalitis .....	2
1.2 Naegleria fowleri .....	5
1.2.1 Stand der Wissenschaft: Wirkstoffe und ihre Effektivität gegenüber <i>N. fowleri</i> ..	5
1.2.2 Metabolismus von <i>N. fowleri</i> .....	6
1.3 Membranäre Kanäle und Transporter .....	9
1.3.1 Strukturaufklärung von Membranproteinen .....	10
1.3.2 Identifikation von Wirkstoffzielen .....	10
1.4 Formiat-Nitrit-Transporter .....	11
1.4.1 Prokaryotische Formiat-Nitrit-Transporter .....	11
1.4.2 Eukaryotische Formiat-Nitrit-Transporter.....	12
1.4.3 Struktureller Aufbau der FNT .....	13
1.5 Eukaryotische FNT als Wirkstoffziel .....	15
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	18
<b>2 Material</b> .....	<b>19</b>
2.1 Plasmide, Oligonukleotide .....	19
2.1.1 Codierende DNA (NCBI GenBank®).....	19
2.1.2 Oligonukleotide (Primer).....	23
2.2 Zellstämme .....	24
2.3 Antikörper, Chemikalien, Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterialien.....	24
2.4 Nährmedien und Lösungen.....	27
2.4.1 Allgemein proteinchemische Methoden.....	27
2.4.2 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur.....	28
2.4.3 Lösungen für zellfreie Proteinsynthese.....	30
2.5 Geräte und Software.....	33
<b>3 Methoden</b> .....	<b>36</b>
3.1 Molekularbiologische Methoden .....	36
3.1.1 Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	36
3.1.2 Plasmid-Isolation .....	36
3.1.3 Bestimmung von Reinheit und Gehalt der Plasmid-DNA .....	36

3.1.4	Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA.....	36
3.1.5	Gelelektrophorese .....	37
3.1.6	Gelextraktion und PCR <i>Clean up</i> .....	38
3.1.7	Ligation .....	38
3.1.8	Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....	38
3.1.9	Sanger-Sequenzierung.....	38
3.1.10	Dauerkulturen von <i>E. coli</i> .....	38
3.1.11	Ortsgerichtete Mutagenese .....	39
3.2	Allgemeine Proteinchemische Methoden.....	41
3.2.1	Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration nach Bradford .....	41
3.2.2	SDS-PAGE .....	41
3.2.3	Coomassie- und Ponceau S-Färbung von Proteinen .....	42
3.2.4	In-Gel-Fluoreszenz .....	42
3.2.5	Western Blot .....	42
3.2.6	Protein-Konzentrierung und Entfernung von Imidazol.....	43
3.2.7	<i>Size-exclusion-chromatography</i> .....	43
3.2.8	Trichloressigsäure-Fällung .....	43
3.3	Herstellung der Transportproteine in <i>S. cerevisiae</i> .....	44
3.3.1	Chemische Transformation.....	44
3.3.2	Dauerkulturen .....	45
3.3.3	Wachstumskurven und Ermittlung von Generationszeiten.....	45
3.3.4	Proteinherstellung in <i>S. cerevisiae</i> W303 1A $\Delta$ <i>jen1</i> $\Delta$ <i>ady2</i> .....	45
3.3.5	Konfokalmikroskopie lebender Hefezellen mit GFP-Detektion .....	45
3.3.6	Isolierung der mikrosomalen Fraktion für die SDS-PAGE und Western Blot ...	46
3.3.7	Protoplastierung von <i>S. cerevisiae</i> W303 1A $\Delta$ <i>jen1</i> $\Delta$ <i>ady2</i> .....	46
3.3.8	Proteinherstellung <i>S. cerevisiae</i> NY17 .....	46
3.3.9	Isolierung sekretorischer Vesikel von <i>S. cerevisiae</i> NY17.....	47
3.4	Herstellung der Transportproteine in <i>D. discoideum</i> .....	47
3.4.1	Kultivierung von <i>D. discoideum</i> aus Sporen .....	47
3.4.2	Mediumwechsel .....	48
3.4.3	Flüssig-Schüttelkultur .....	48
3.4.4	Bestimmung Zelldichte .....	48
3.4.5	Elektroporation: Transformation von <i>D. discoideum</i> .....	48
3.4.6	<i>D. discoideum</i> -Lysat für die Western Blot-Analytik.....	48
3.5	Funktionelle Charakterisierung der Transportproteine aus dem zellbasierten System	

3.5.1	<sup>14</sup> C-Transportassay.....	49
3.5.2	Lichtstreuungsassay mit der <i>stopped flow</i> -Apparatur.....	50
3.6	Zellfreie Proteinproduktion.....	52
3.6.1	Herstellung S30-Extrakt.....	53
3.6.2	Zellfreie Proteinproduktion im Zwei-Kompartiment System.....	54
3.6.3	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC).....	54
3.6.4	Strep-Tactin™-Reinigung PfFNTG107S .....	55
3.7	Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der zellfrei hergestellten Proteine ..	55
3.7.1	Herstellung Liposomen.....	55
3.7.2	Herstellung Proteoliposomen mit der Verdünnungsmethode .....	56
3.7.3	Dichtegradientenzentrifugation .....	56
3.7.4	Herstellung Lipid-Protein-NDs mit zellfrei hergestelltem Zielprotein.....	57
3.8	Bioinformatische Methoden .....	57
3.9	Determinierung der EC <sub>50</sub> -Werte in <i>N. fowleri</i> -Trophozoiten .....	58
3.10	Fluoreszenz-Cross-Korrelations-Spektroskopie .....	58
3.11	Statistische Auswertung.....	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
4.1	Zellfreie Proteinsynthese und ND-Assemblierung mit dem Ziel der Strukturaufklärung von PfFNTG107S .....	60
4.1.1	Herstellung und Reinigung des <i>membrane scaffold protein</i> MSP1E3D1 .....	61
4.1.2	Zellfreie Proteinsynthese von PfFNTG107S.....	62
4.1.3	Versuche zur Strukturaufklärung von zellfreiem PfFNTG107S .....	64
4.2	Herstellung und Funktionalität von PfFNT im Hefesystem .....	68
4.2.1	Herstellung und Funktion von PfFNT in <i>S. cerevisiae</i> .....	68
4.2.2	Verhältnis von <i>Target</i> zu Inhibitor zur Determination kleiner IC <sub>50</sub> -Werte .....	70
4.2.3	PfFNT im Hefesystem unter <i>Stress</i> bedingungen .....	73
4.2.4	Funktionalität von PfFNT als GFP-Fusionsprotein .....	74
4.3	FNT anderer eukaryotischer Parasiten.....	76
4.3.1	Identifikation von FNT im Genom von <i>N. fowleri</i> .....	76
4.3.2	Inhibition von <i>N. fowleri</i> - und <i>E. histolytica</i> -Trophozoiten mit gegen PfFNT gerichteten Inhibitoren.....	77
4.3.3	Strukturelle Analyse von NfFNT1-3 .....	80
4.4	Herstellung und funktionelle Charakterisierung von NfFNT im Hefesystem .....	85
4.4.1	Codon-optimierte Wildtyp-NfFNT.....	87
4.4.2	Lokalisation der heterolog hergestellten NfFNT in der Hefezelle .....	91
4.5	Einfluss der Termini auf Herstellung und Funktionalität von NfFNT .....	93
4.5.1	Herstellung und Funktionalität N- und C-terminal verkürzter NfFNT .....	93

4.5.2	Herstellung und Funktionalität einfach N- oder C-terminal verkürzter NfFNT ..	96
4.6	Affinität der FNT-Inhibitoren zu heterolog hergestelltem NfFNT3.....	107
4.6.1	FCCS-Untersuchungen von FNT-haltigen Hefe-Mikrosomen .....	107
4.6.2	Herstellung von $\Delta$ NfFNT1-3 im HEK293-Zell-System .....	109
4.7	Herstellung und Funktionalität von Formiat-Nitrit-Transportern in <i>D. discoideum</i> .	111
4.7.1	Produktion von PfFNT in <i>D. discoideum</i> .....	113
4.7.2	FNT1-3 von <i>N. fowleri</i> in <i>D. discoideum</i> .....	115
4.8	Isolation Membranprotein-haltiger Vesikel aus <i>S. cerevisiae</i> NY17 .....	121
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>124</b>
5.1	Zellfreie Proteinproduktion von Membranproteinen und deren Funktionalität .....	124
5.2	Weist die Gattung <i>Naegleria</i> FNT auf? .....	125
5.2.1	Interpretation der genomischen Daten .....	129
5.3	Einfluss des Expressionssystems auf Herstellung und Funktionalität der Membranproteine.....	134
5.3.1	Codon-usage .....	139
5.4	Gerichteter Transport als Hindernis der Substrataufnahme? .....	139
5.5	Sind FNT das Wirkstoffziel der PfFNT-Inhibitoren in <i>N. fowleri</i> ? .....	141
5.6	Ausblick.....	142
5.6.1	Pull-Down-Assay <i>N. fowleri</i> -Zelllysate.....	143
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>146</b>

## Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumperoxidsulfat
AQP	Aquaporin
AX	Axenisch
<i>blast</i>	<i>Basic local alignment search tool</i>
BNITM	Bernhard-Noch-Institut für Tropenmedizin
BSA	Bovines Serumalbumin
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CF	<i>Cell-free</i>
CoA	Koenzym A
CV	<i>Column volume</i>
<i>D. discoideum</i>	<i>Dictyostelium discoideum</i>
DAPI	4',6'-Diamidin-2-phenylindol
DGZ	Dichte-Gradienten-Zentrifugation
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EhFNT	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Entamoeba histolytica</i>
EZM	Extrazellulärmatrix
FNT	Formiat-Nitrit-Transporter
FocA	<i>Formate channel</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
Glut	Glukosetransporter
HA	Hämagglutinin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HSC	<i>Hydrosulfide channel</i>
HT	Hexose-Transporter
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
LB	<i>Luria broth (E. coli-Medium nach Luria und Burrous)</i>
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MCT	Monocarboxylat-Transporter
MHK	Minimale Hemmkonzentration

MMV	Medicines for malaria venture
NCBI	National Center for Biology Information
ND	<i>Nanodisc</i>
NfFNT	Formiat-Nitrit-Transporter aus <i>Naegleria fowleri</i>
NGT	<i>Neglected tropical disease</i>
NirC	<i>Nitrite transporter</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	Primäre Amöbenmeningoenzephalitis
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	<i>Protein data bank</i>
PEG	Polyethylenglykol
Pf	<i>Plasmodium falciparum</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RKM	Rokitamycin
ROX	Roxithromycin
SD-Medium	<i>Synthetic defined</i> -Minimalmedium zur Kultur von <i>S. cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
<i>T. xx</i>	<i>Trypanosoma</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	TRIS- <i>buffered saline</i>
TE	TRIS-EDTA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TgFNT	<i>Toxoplasma gondii</i> Formiat-Nitrit-Transporter
TM	Transmembranspanne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VBD	<i>Vector borne disease</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
YNB	Yeast nitrogen base
YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i> – reichhaltiges Nährmedium zur Kultur von <i>S. cerevisiae</i>

# Zusammenfassung

## Formiat-Nitrit-Transporter von *Naegleria fowleri*: mögliches Wirkstoffziel?

*Naegleria fowleri* ist ein weltweit verbreiteter Rhizopode der Familie der *Vahlkampfiidae* und Auslöser der primären Amöbenmeningoenzephalitis, welche in 97 % der Fälle aufgrund der fehlenden kausalen Behandlungsmöglichkeit und verspäteter Diagnose tödlich verläuft. *N. fowleri* ist hauptsächlich in tropischen und subtropischen Gebieten, aber auch in wärmeren Gewässern gemäßigter Klimazonen zu finden. Bei intensivem nasalem Kontakt gelangt der Parasit über die Nasenschleimhaut entlang des olfaktorischen Nervs bis ins Gehirn und verursacht dort schwere Gewebeschäden, die den Abbau von Nervenzellmatrix einschließen. Die Inkubationszeit beträgt meist drei bis fünf Tage. Innerhalb von fünf Tagen nach Auftreten der ersten Symptome wie Fieber, Übelkeit, Kopfschmerzen und Verwirrheitszuständen tritt der Tod ein. Im Genom von *N. fowleri* wurden drei Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) identifiziert. Es wurde im Vorwege von der Arbeitsgruppe ein überlebensnotwendiger Laktat-Transporter in *P. falciparum*, einem der Erreger der Malaria, entdeckt, der bei gezielter Inhibition mit substratanalogen Inhibitoren zur Akkumulation von Milchsäure und zum Absterben des Parasiten führt. Die Ausbildung der Resistenzmutante PfFNTG107S erforderte die Optimierung der Inhibitoren. Die Aufklärung der Struktur der Resistenzmutante sollte neue Einblicke in die Struktur-Aktivitäts-Beziehung zwischen dem Inhibitor BH267.meta und PfFNTG107S liefern. Hierfür wurde die zellfreie Herstellung und Reinigung von PfFNTG107S ebenso wie die des Gerüstproteins für Nanodisc (ND) -Bildung, MSP1E3D1 etabliert. Es wurde keine Bildung von Pentameren und keine Aktivität von zellfrei hergestelltem PfFNTG107S in Proteoliposomen gefunden. Ausgewählte Inhibitoren des eukaryotischen plasmoidalen FNT führten zum Absterben von *N. fowleri*-Trophozoiten in Kultur im einstelligen mikromolaren Bereich. Die FNT von *N. fowleri* weisen eine hohe Sequenzähnlichkeit mit dem FNT von Malariaparasiten und anderen bekannten FNT wie dem prokaryotischen EcFocA auf. Zur Überprüfung, ob die Verbindungen auf die FNT von *N. fowleri* abzielen, wurden codon-optimierte offene Leserahmen von NfFNT1-3 in *Saccharomyces cerevisiae* und *Dictyostelium discoideum* exprimiert. Die konfokale Mikroskopie von NfFNT1-3 mit C-terminalen GFP-Fusionen zeigte die Lokalisation in der Plasmamembran der Hefezelle. NfFNT1-3 transportierten jedoch nicht die <sup>14</sup>C-markierten Monocarboxylate Formiat, Acetat und Laktat. Für verschiedene verkürzte Varianten von NfFNT1-3 wurde eine oligomere Proteinproduktion in Hefe, *D. discoideum* und menschlichen embryonalen Nierenzellen HEK293 gefunden. Die vielversprechendsten Varianten in Bezug auf die Herstellung im Hefesystem waren  $\Delta 1-214$ NfFNT1 $\Delta 492$ , NfFNT $\Delta 441$ ,  $\Delta 1-195$ NfFNT3. Die doppelte terminale Verkürzung von NfFNT1 transportierte Formiat bei pH 5,8 in *D. discoideum*. Die C-terminale Verkürzung von NfFNT2 und die N-terminale verkürzte Variante  $\Delta 1-195$  von NfFNT3 lagen in der SDS-PAGE als FNT-typische Pentamere vor. Im Gegensatz zu Malariaparasiten setzen *Naegleria*-Arten kein Laktat als Stoffwechselendprodukt frei. Neben Glukose werden Fettsäuren als Energiequelle bevorzugt, ebenso wie Acetat, das schließlich dem Krebszyklus zugeführt wird. Zukünftige Arbeiten könnten sich mit der Identifizierung von Substraten, die von NfFNT1-3 transportiert werden, sowie mit terminalen Verkürzungen von NfFNT befassen, um die Gengrenzen oder potenzielle Signalpeptide für den Transporter zu identifizieren. Transportstudien könnten sich auf den Export von noch nicht identifizierten Stoffwechselsubstraten konzentrieren. Mit der Identifikation von FNT in *N. fowleri* ist ein Grundstein für die *target*-basierte Wirkstoffentwicklung zur Behandlung der Primären Amöben-Meningoenzephalitis (PAM) gelegt.

# Abstract

## Formate-nitrite transporters of *Naegleria fowleri*: potential drug targets?

*Naegleria fowleri*, a globally distributed rhizopod of the *Vahlkampfiidae* family, is the causative agent of primary amoebic meningoencephalitis. 97% of the known cases are fatal due to the lack of suitable treatment. *N. fowleri* is mainly found in the tropics and subtropics but also in warmed freshwaters of temperate zones. Infection occurs by the trophozoite form through the nasal mucosa. The parasite then travels along the olfactory nerve through the cribriform plate into the brain and causes severe tissue damage and necrosis. Here, the identification of three *N. fowleri* genes encoding formate-nitrite transporters, FNT1-3, is described. Recently, the group discovered the vital lactate-releasing FNT in the malaria parasite, and a novel class of small, drug-like FNT inhibitors with nanomolar antimalarial efficiency. Attempts for structure determination of a resistance mutant G107S have been made to improve the understanding of structure-activity relationship of the small molecule BH267.meta to the membrane protein. Therefore, cellfree production of the nanodisc forming belt protein MSP1E3D1 was established, as well as the production and purification of cellfree PfFNTG107S. Unfortunately, no building of pentameric forms and no activity of cellfree produced PfFNTG107S in proteoliposomes was found. Using selected inhibitors of the eukaryotic FNT for treatment of *N. fowleri* trophozoites in culture, the parasites were killed at single-digit micromolar concentrations. NfFNT1-3 share high sequence similarity with the FNT from malaria parasites, *Toxoplasma gondii* and other known FNT like the prokaryotic EcFocA. To test whether the compounds target the *N. fowleri* FNT1-3, codon-optimized open reading frames were expressed NfFNT1-3 in *Saccharomyces cerevisiae* yeast and *Dictyostelium discoideum*. Confocal microscopy of NfFNT1-3 with C-terminal GFP fusions indicated plasma membrane localization. However, all NfFNT1-3 proteins failed to transport the <sup>14</sup>C-labeled monocarboxylates formate, acetate, and lactate. Nevertheless, different truncated variants of NfFNT1-3 showed improved protein production in yeast, *D. discoideum* and human embryonic kidney cells. The most promising variants are  $\Delta 1-214$ NfFNT1 $\Delta 492$ , NfFNT $\Delta 441$ ,  $\Delta 1-195$ NfFNT3. The NfFNT1 double truncation indicated transport of formate at pH 5,8 in *Dictyostelium discoideum*. NfFNT2 C-terminal truncation and N-terminal truncation NfFNT3 are shown as pentameric forms in the SDS-PAGE. Other than malaria parasites, *Naegleria* species do not release lactate as a metabolic end product. Besides glucose, fatty acids are preferred as an energy source as well as acetate that are eventually shuttled into the Krebs cycle. Future work will address the identification of NfFNT1-3 transported substrates, truncations of NfFNT to identify the gene borders or potential trafficking signal peptides. Transport studies might focus on export of metabolic substrates which are yet not known. The identification of FNT in *N. fowleri* is the basis for target-based drug development for the treatment of primary amoebic encephalitis.



# 1 Einleitung

## 1.1 Parasitäre Infektionen als globales Gesundheitsproblem

Parasitäre Infektionen gehören zu den größten globalen Gesundheitsproblemen. Sie haben weltweit einen signifikant erhöhenden Effekt auf Morbidität und Mortalität. Ca. 25 % der globalen Population leiden an einer parasitären Infektion (Anisuzzaman *et al.*, 2023). Unterschieden wird hierbei in durch Ektoparasiten, Helminthen und Protozoen verursachte Infektionen. Ein Großteil hiervon ist auf Lebensmittel- und vektorübertragende Krankheiten (VBD, *vector borne disease*) zurückzuführen. Faktoren wie Klimawandel, Demographie, Ernährungsgewohnheiten, erhöhtes internationales Reiseaufkommen, Urbanisierung und Industrialisierung spielen eine wesentliche Rolle in der Entstehung und Verbreitung parasitärer Infektionen (Anisuzzaman *et al.*, 2023). Zu den Protozoen gehören erstens die *Sarcodina* (Wurzelfüßler), zu denen Infektionen mit dem intestinalen Parasiten *Entamoeba* zählen und zweitens die *Ciliophora* (Wimperntierchen) unter die beispielsweise eine Infektion mit *Balantidium* fällt. Die dritte Gruppe bilden die Flagellaten, zu denen die Leishmaniose verursachenden vektorübertragenen *Leishmanien* zählen. Die vierte Gruppe stellen *Sporozoa* dar, zu denen die Malaria verursachenden, ebenfalls vektorübertragenden, *Plasmodien* gehören. Zu den vektorübertragenden Krankheitserregern gehören neben aeroben oder anaeroben Parasiten auch Bakterien und Viren, die neben Stechmücken unter anderem auch durch Fliegen, Wasserschnecken oder Zecken übertragen werden können. Laut WHO sterben jährlich ca. 700.000 Menschen an durch Stechmücken übertragende Krankheiten (Ethics and vector-borne-diseases, WHO 2020). Ein Großteil der vektorübertragenden Krankheiten ist auf dem afrikanischen Kontinent zu lokalisieren, wie z.B. die Schlafkrankheit, die nach dem Biss durch die Tsetsefliege durch *T. brucei* ausgelöst wird oder die Chagas-Krankheit, deren Erreger *T. cruzi* durch den Biss der *Triatominae* (Raubwanze) übertragen wird (Ethics and vector-borne diseases, WHO 2020). Vektorübertragene Krankheiten gelten als besonders schwer eindämmbar. Einerseits ist der physikalische oder chemische Schutz vor den als Vektor dienenden Mücken oder Fliegen schwierig. Andererseits weisen die Parasiten häufig ein großes Repertoire an variablen Genen im Genom jedes einzelnen Parasiten auf (Powell, 2019). So ist ein einzelner Parasit in der Lage verschiedene Resistenzmechanismen gegenüber dem humanen Immunsystem und bestehenden Chemotherapeutika auszubilden (Powell, 2019). Die Ausbildung von Resistenzen wird im Kontext der Malaria, aber auch bei anderen Infektionskrankheiten durch prokaryotische und eukaryotische Pathogene häufig mit Membranproteinen in Verbindung gebracht (Ecker *et al.*, 2012; Lamping *et al.*, 2007; Mishra *et al.*, 2020). Häufig unterrepräsentiert im Kontext der Infektionskrankheiten sind die vernachlässigten tropischen Krankheiten (NGT, *neglected tropical disease*). Zu diesen zählen neben der Leishmaniose, der Chagas-Krankheit und der Schlafkrankheit, die von der WHO und *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) aufgeführt werden, auch Amöben-Infektionen wie die durch *E. histolytica* verursachte Amöbenruhr oder die durch *N. fowleri* verursachte primäre Amöbenmeningoenzephalitis (PAM). Letztere werden nicht durch die WHO oder CDC, wohl aber durch *PLOS Neglected Tropical Disease* aufgeführt. Als Virulenzfaktoren der tödlichen *N. fowleri* Trophozoiten werden verschiedene in der Membran lokalisierte Proteine sowie kontaktabhängige Mechanismen im Kontext der Trophocytose<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Trophocytosis (gr. trogo = nagen). Eine Form der Endozytose, bei der eine Zelle aktiv nur einen Teil eines zellfremden Partikels aufnimmt.

diskutiert (Herman *et al.*, 2021), wenngleich bis heute sehr wenig über die Pathogenität von *N. fowleri* im Gegensatz zu den verwandten nicht pathogenen *Naegleria* Spezies bekannt ist.

### 1.1.1 Malaria

Bei Malaria handelt es sich um eine vektorübertragene Infektionskrankheit ausgelöst durch Parasiten der Gattung *Plasmodium* (Malaria Report, WHO 2023). Die fünf hierunter fallenden humanpathogenen Spezies sind: *falciparum*, *vivax*, *ovale*, *knowlesi* und *malariae* wobei *P. falciparum* der hauptsächliche Erreger ist (Poespoprodjo *et al.*, 2023). Charakteristisch für eine Malaria-Erkrankung sind die, je nach Erreger, unterschiedlich auftretenden Fieberschübe. Der Parasit befindet sich zu diesem Zeitpunkt im plasmodialen Stadium im infizierten Erythrozyten. Übertragen werden die Sporozoiten durch den Biss der weiblichen Anopheles-Mücke. Beim Wechsel des Wirtes ändert sich die Vermehrung der Parasiten von sexuell zu asexuell. Im späteren Verlauf der Infektion sind Leberzellen im Schizontenstadium und Erythrozyten im trophozytären- und Schizontenstadium befallen (Cowman *et al.*, 2016; White *et al.*, 2014). Es kommt im Erythrozyten zur Ausbildung einer parasitären Vakuole.

Ca. 40 % der Weltbevölkerung lebt in Malariagebieten (Malaria, RKI 2024). Bislang gibt es nur gegen eine parasitäre Infektion, die Malaria, einen Impfstoff. Nichtsdestotrotz ist die Malaria mit ca. 600.000 Todesfällen pro Jahr (Malaria Report, WHO 2023) eine schwer einzudämmende Erkrankung. Laut des von der WHO veröffentlichten *World malaria report* ist die Fallzahl von 2021 zu 2022 von 244 Millionen Fällen auf 249 Millionen Fälle angestiegen, wenngleich die Mortalitätsrate leicht gesunken ist und für 2022 608.000 Todesfälle in 85 verschiedenen Ländern verzeichnet sind (Malaria Report, WHO 2023). Die Hälfte der Todesfälle sind auf die afrikanischen Gebiete Nigeria, Demokratische Republik Kongo, Uganda und Mosambik konzentriert. 80 % der Todesfälle betreffen Kinder unter fünf Jahren. Die WHO *Global technical strategy for malaria* sieht bis 2030 die Reduktion der Infektionen und Todesfälle um 90 % sowie die Eliminierung von Malaria in 35 Ländern vor (Global technical strategy for Malaria 2016-2030, WHO 2021). Aktuell beinhaltet die Eliminierungsstrategie von Malaria Vektorkontrolle, Chemoprophylaxe und präventive Chemotherapie. Zusätzlich stehen seit Oktober 2021 die erste Impfung und seit Oktober 2023 ein zweiter möglicher Impfstoff zur Verfügung. Der erste RTS,S/AS01 Impfstoff zeigte in der Zulassungsstudie einen Impfschutz von 56 % (RTS,S Clinical Trials Partnership, 2015). Für den zweiten R21/Matrix-M Impfstoff wurde in der Phase III-Studie ein Impfschutz von 68 bis 75 % für Kinder zwischen fünf und 36 Monaten erzielt (Datoo *et al.*, 2024). In Abhängigkeit vom Erreger stehen einige Wirkstoffe zur Behandlung zur Verfügung. Artemisinin-basierte Therapien werden gegen *P. falciparum* eingesetzt. Die WHO verzeichnet vermehrt Berichte zur Ausbreitung von Artemisinin-Resistenzen. In Eritrea, Ruanda, Uganda und Tansania sind partielle Artemisinin-Resistenzen bestätigt. Aufgrund der vermehrten Ausbildung von Resistenzen gegenüber den bestehenden Malaria-Wirkstoffen und der eingeschränkten Wirksamkeit der Malaria-Impfstoffe ist die Entwicklung neuer Wirkstoffe gegenüber der Gattung *Plasmodium*, insbesondere *P. falciparum* erforderlich.

### 1.1.2 Primäre Amöbenmeningoenzephalitis

*N. fowleri* ist der einzig bekannte Erreger der PAM (De Jonckheere, 2014). Entdeckt wurde der Erreger der PAM erstmals in Australien durch Fowler und Carter (Fowler & Carter, 1965). Die Gattung *Naegleria* ist der Familie der Vahlkampfiidae, Ordnung der Schizopyrenida zuzuordnen. Sie stellen die größte Gruppe der Klasse Heterolobosea (Güémez & García, 2021) dar. Bezüglich der familiären Zuordnung gibt es unterschiedliche Quellen. Der Gattung *Naegleria* lassen sich 47 Spezies mit variablen Phänotypen zuordnen. Nur drei davon sind

nachweislich pathogen: *N. australiensis*, *N. italica* und *N. fowleri*. Für *N. australiensis* und *N. italica* wurde eine Infektion von Versuchstieren nachgewiesen. *N. fowleri* ist als thermophile Amöbe auf Feuchtigkeit angewiesen und bevorzugt Temperaturen bis 45 °C (Gharpure, Gleason, *et al.*, 2021). Ihr Vorkommen häuft sich in stehenden, warmen Gewässern. Nichtsdestotrotz ist *Naegleria* auf allen Kontinenten, bis auf die Antarktis, dokumentiert (Jahangeer *et al.*, 2020). Als fakultativer Parasit kommt *N. fowleri* freilebend vor, kann aber auch den Menschen befallen. Zu einer Infektion mit *N. fowleri* kommt es bei intensivem nasalem Kontakt mit kontaminiertem Wasser. So konnten beispielsweise Wasseraktivitäten wie Schwimmen, Tauchen oder Wassersport in kontaminierten Gewässern mit dem Großteil der bekannten Infektionen in Verbindung gebracht werden. Auch (religiöse) Nasenspülungen wurden schon als Quelle der Infektion identifiziert (Yoder *et al.*, 2012). Ein klinischer Report berichtet von Fällen, die durch den alleinigen Kontakt mit Leitungswasser zu einer Infektion geführt haben (Yoder *et al.*, 2012). In der Literatur sind 235 (De Jonckheere, 2011) bis 260 (Anser *et al.*, 2018) Fälle beschrieben. Eine Fallstudie aus dem Jahr 2021 (Gharpure, Bliton, *et al.*, 2021), für welche in den Datenbanken *Medline*, *EMBASE* und *Ovid Global Health* nach „*Naegleria fowleri*“, „Amöbenmeningozephalitis“ und dazugehörigen Suchbegriffen recherchiert wurde, führt zwischen 1937 und 2018 381 dokumentierte Fälle der PAM auf. Eine andere Studie berichtet von 16 Fällen pro Jahr allein in den Vereinigten Staaten (Capewell *et al.*, 2014). 223 Fälle sind außerhalb der USA aufgetreten. 145 Fälle in den USA sind durch das *Free-Living Ameba Surveillance System* der CDC von 1962 bis 2018 identifiziert. Elf Fallberichte stammen von vor 1962. Zwei Fälle aus Bangladesch (Sazzad *et al.*, 2020) und Australien (nicht publiziert) wurden durch diagnostische Tests durch das *Free-Living and Intestinal Amebas Laboratory* der CDC identifiziert. Von den insgesamt 381 identifizierten Fällen wurden 182 als gesichert, 89 als wahrscheinlich und 110 als möglich eingestuft. Die dokumentierten Fälle traten in 33 Ländern auf. Der größte Teil der gesicherten Fälle wurde mit 41 % in den USA gemeldet. Darauf folgen Pakistan mit 11 % und Mexiko mit 9 % (Gharpure, Bliton, *et al.*, 2021). Im Schnitt vergingen ca. zwei Jahre vom Auftreten eines Falls bis zu dessen Veröffentlichung. 75 % der infizierten Personen waren männlich mit einem Altersdurchschnitt von 14 Jahren. Die Sterblichkeitsrate der PAM liegt zwischen 91 und 99 % in Abhängigkeit davon, ob es sich um eine gesicherte Infektion oder um einen ungesicherten Verdachtsfall (Capewell *et al.*, 2014; Güemez & García, 2021) handelt. Diese Zahlen sind in ihrer Aussagekraft durch den Mangel konsequenter Fallberichte und nicht immer erkannter Fälle von PAM eingeschränkt zu betrachten. Einige sehen in dem gehäuften Auftreten der Infektionen mit dem thermophilen Parasiten (Visvesvara *et al.*, 2007) während der heißen Jahreszeit ein erhöhtes Risiko für vermehrte Infektionen mit den globalen Temperatur- und Klimaveränderungen zu heißeren sommerlichen Jahreszeiten (Leal dos Santos *et al.*, 2022; Maciver *et al.*, 2020).

Bei intensivem nasalem Kontakt überwinden die Trophozoiten die EZM des Wirts und gelangen entlang des olfaktorischen Riechnervs, unter Überwindung der *Lamina cribrosa* ins Gehirn. Dort vermehrt sich der Parasit und es kommt zum Abbau von Nervenzellen, die dem Parasiten als Nahrungsquelle dienen. Nach ca. fünf bis sechs bis zu maximal zwölf Tagen Inkubationszeit treten die ersten Symptome auf (Barbour & Marciano-Cabral, 2007; Visvesvara, 2010). Zu den Symptomen gehören im Frühstadium Grippe-ähnliche Symptome und im späteren Stadium Symptome einer Schädigung des zentralen Nervensystems. Die häufigsten Symptome der klinisch dokumentierten Patienten sind Fieber, Kopfschmerzen, Übelkeit/Erbrechen, mentale Einschränkungen und Nackensteifigkeit. Der Tod tritt im Schnitt fünf Tage nach Auftreten der ersten Symptome bzw. innerhalb von ca. zwei Wochen nach Infektion ein (Carter, 1970). In der Literatur werden unterschiedliche an der Virulenz der

tödlichen *N. fowleri* Trophozoiten involvierte Strukturen diskutiert. Ein Großteil der Studien an *Naegleria* konzentrieren sich auf den Unterschied zwischen den besser untersuchten nicht pathogenen Spezies wie *N. gruberi* und *N. lovaniensis* im Gegensatz zu *N. fowleri*

Die Beteiligung verschiedener Proteasen und Enzyme mit hydrolytischer Aktivität werden in der Literatur als Ursache für die Degradation der Nervenzellmatrix im Hirn diskutiert. Die Ausbildung von *food-cup*-Strukturen wird ebenfalls als Beteiligung an der Schädigung der Nervenzellen diskutiert (Sohn *et al.*, 2010). Es wird grundsätzlich zwischen kontaktabhängigen und kontaktunabhängigen Pathogenitätsfaktoren unterschieden. Zu den kontaktabhängigen werden Funktionen im Zusammenhang mit dem Zytoskelett wie auch z.B. bei *E. histolytica* (Labruyère & Guillén, 2006; Saito-Nakano *et al.*, 2021; Tavares *et al.*, 2005), *T. gondii* (Heaslip *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2007), oder *Acanthamoeba spp.* (Bouyer *et al.*, 2009; González-Robles *et al.*, 2013) diskutiert. Eine andere Studie bringt Nf-Actin mit der Adhäsion an die Wirtszelle, phagozytischer Aktivität und Zelltoxizität in Zusammenhang. Es wurde hierfür ein Unterscheid in der Expression zwischen den nicht virulenten Zysten und infektiösen Trophozoiten festgestellt. Es wurden außerdem Unterschiede im Expressionslevel von Serin- und Threoninproteasen, verschiedenen Kinasen und am Lipidmetabolismus beteiligten Proteinen festgestellt (Sohn *et al.*, 2023). Die zentrale Rolle des Lipidmetabolismus ist in vielen anderen Studien wiederzufinden und wird häufig als Besonderheit von *Naegleria* identifiziert. Weiterhin wurde ein Nfa1-Gen gefunden, was mit der Fähigkeit zur Fortbewegung und der Ausbildung der Amöbastomen in Verbindung steht (Kang *et al.*, 2005). Als kontaktunabhängiger wichtiger Virulenzfaktor wird unter anderem die Sekretion von Cystein-Protease angesehen, wie es auch schon für anderen protozoische Parasiten beschrieben wurde (McKerrow *et al.*, 2006). Hier scheint vor allem Cathepsin B eine wichtige Rolle einzunehmen (Lê *et al.*, 2022).

### 1.1.2.1 Aktuelle Behandlungsmöglichkeiten der PAM

Aufgrund des schnellen Fortschreitens der Infektion erfolgt die Diagnose meist postmortal im Rahmen einer Autopsie mittels mikroskopischer Untersuchungen der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) und durch quantitative PCR (Bellini *et al.*, 2018). Die aktuelle Behandlungsempfehlung der CDC beinhaltet den Einsatz einer Kombination von intravenös oder intrathekal verabreichtem Amphotericin B, sowie die intravenöse oder perorale Gabe von Fluconazol, Azithromycin und Rifampicin sowie peroral Miltefosin. Die Kombination zielt nicht kausal auf bestimmte Strukturen der Parasiten ab, sondern hat sich in der Praxis als die vielversprechendste Therapie erwiesen. Die intravenöse Gabe von Dexamethason hat sich ebenfalls als hilfreich erwiesen (van de Beek *et al.*, 2007). *N. fowleri* ist gegenüber Amphotericin B empfindlich. *In vitro* gemessene EC<sub>50</sub>-Werte von Amphotericin B ergaben ein Spektrum von 0,1 bis 0,5 µM (Yuan *et al.*, 2023). Allerdings variiert die minimale Hemmkonzentration (MHK) der verschiedenen Isolate von 0,026 bis 0,078 mg ml<sup>-1</sup> (Schuster & Rechthand, 1975). Aufgrund der (Nephro-)Toxizität von Amphotericin B ist der Einsatz von Formulierungen mit geringerer MHK erforderlich. So wird der Einsatz von Natriumdesoxychelate Amphotericin B mit einer minimalen Hemmkonzentration von 0,1 µg ml<sup>-1</sup> gegenüber 1 µg ml<sup>-1</sup> von liposomalen Amphotericin B empfohlen. Miltefosin als Alkylphosphocholin zeigte *in vitro* und *in vivo* (Schuster *et al.*, 2006) wachstumshemmende Effekte gegenüber *N. fowleri* und weist mit der Fähigkeit zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und Aufkonzentrierung im Hirngewebe nützliche Eigenschaften zur Behandlung der PAM auf. EC<sub>50</sub>-Werte für Miltefosin liegen in Abhängigkeit vom *N. fowleri* Stamm zwischen 15,9 bis 58,9 µM (Yuan *et al.*, 2023). Aufgrund des fulminanten Verlaufes und der fehlenden kausalen Behandlungsmöglichkeit ist ein möglichst rascher Beginn der Kombinationstherapie notwendig, um eine Überlebenschance für Patienten zu generieren.

## 1.2 *Naegleria fowleri*

*Naegleria* weist drei morphologische Stadien auf. Unter optimalen Nahrungsbedingungen liegen infektiöse Trophozoiten vor. Sie sind ca. 22 µm lang und 7 µm breit und weisen eine amöbenähnliche Form auf. Diese haben einen großen Zellkern mit einem Nukleolus, viele Mitochondrien und Nahrungsvakuolen. Sie haben eine einzelne kontraktile Vakuole, ein endoplasmatisches Retikulum, Ribosomen und membrangebundene zytoplasmatische Organellen (Siddiqui *et al.*, 2016). Hier sind Amöbastomen lokalisiert, die mit der Nahrungsaufnahme und dem Abbau der EZM in Verbindung gebracht werden (Jamerson *et al.*, 2017). Nur die Trophozoiten weisen Reproduktion, Nahrungsaufnahme und die Fähigkeit zur Ausbildung von Zysten auf. Primäre Nahrungsquelle sind Gram-positive und Gram-negative Bakterien, aber auch Algen und Hefen können als Nahrungsquelle dienen. Unter Laborbedingungen sind auch andere Kohlenstoffquellen wie Glukose verstoffwechselbar (Zyserman *et al.*, 2018). Unter suboptimalen Umgebungsbedingungen bilden die Trophozoiten kugelförmige Zysten mit einem Durchmesser von sieben bis 12 µm aus. Die Zysten sind widerstandsfähig und können physikalische und chemische Extrembedingungen überdauern. Bei fehlender Nahrung im Wasser kommt es zur Ausbildung von zwei Geißeln. Der Flagellat mit einer Größe von zehn bis 16 µm kann sich in Richtung günstigerer Umgebungsbedingungen fortbewegen.

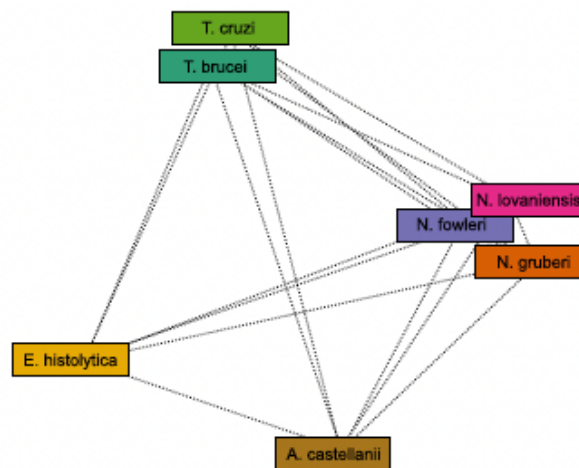
### 1.2.1 Stand der Wissenschaft: Wirkstoffe und ihre Effektivität gegenüber *N. fowleri*

Verschiedene Arzneistoffe sind *in vitro* und *in vivo* auf ihre Wirksamkeit gegenüber *N. fowleri* untersucht worden. *In vitro* zeigen Arzneistoffe, die eine Verbindung zum Lipidmetabolismus oder zur Sterol-Biosynthese aufweisen eine erhöhte Wirksamkeit auf (Zhou *et al.*, 2018). So wurde für Azole, die eine hemmende Wirkung auf die Ergosterolsynthese über die Inhibition der Sterol-14-Demethylase haben (Debnath *et al.*, 2017) und Statine mit hemmender Wirkung auf die HMG-CoA-Reduktase eine wachstumshemmende Wirkung auf *N. fowleri* Trophozoiten festgestellt. (Debnath *et al.*, 2020; Rizo-Liendo *et al.*, 2019). Itraconazol und Posaconazol beispielsweise waren mit EC<sub>50</sub>-Werten < 0,01 µM effektiver als das aktuell in der Behandlung der PAM eingesetzte Amphotericin B. Posaconazol zeigte aber eine geringe Hirnpermeabilität. Pitavastatin wies EC<sub>50</sub>-Werte zwischen 0,3 µM bis 4 µM gegenüber unterschiedlichen *N. fowleri* Stämmen auf. Der Farnesyltransferase-Inhibitor Lonafarnib, der 2022 in der EU zugelassen wurde, weist EC<sub>50</sub>-Werte zwischen 1,5 und 9,2 µM gegenüber verschiedenen Stämmen auf (Hahn & Debnath, 2020). Auch SMT-Inhibitoren wie Epiminolanosterol oder der selektive Estrogenrezeptormodulator Tamoxifen zeigen in Synergie eine wachstumshemmende Wirkung gegenüber *N. fowleri* Trophozoiten (Zhou *et al.*, 2018). Inhibitoren der Fettsäureoxidation wie Etomoxir oder Perhexilin und bekannte Arzneistoffe wie das Antikonvulsivum Valproinsäure oder der Dopaminrezeptorantagonist Thioridazin zeigten in höheren Konzentrationen in Kombination mit Miltefosin wachstumshemmende Effekte auf die Trophozoiten, wenngleich der genaue Mechanismus nicht bekannt ist (Sarin *et al.*, 2020). Cystein-Protease-Inhibitoren wie Ebselen, BYA 11-7082 und BAY 11-0785 zeigten Effekte im ein- bis zweistelligen mikromolaren Bereich. 12,5 µM Ebselen inhibierten das Wachstum der Trophozoiten vollständig, während die BAY-Varianten den gleichen Effekt bereits bei 3,12 µM zeigten (Debnath *et al.*, 2018). Auranofin, ein Arzneistoff, der bei der Behandlung der Polyarthritits Einsatz findet, zeigte EC<sub>50</sub>-Werte von 1 bis 2 µM, konnte die Blut-Hirn-Schranke überwinden und wies unter 5 µM keine Zytotoxizität gegenüber Astrozyten auf (Escrig *et al.*, 2020). Die Erkenntnisse konnten bisher noch nicht erfolgreich auf die Behandlung der PAM übertragen werden und führten nicht zu kausalen Behandlungsstrategien. Neue Wirkstoffkandidaten werden dringen benötigt.

*In vivo* konnte für Chlorpromazin ein Therapieerfolg mit 100% Wachstumshemmung der Trophozoiten und dem Überleben der Patientin im Konzentrationsbereich von 0,78 bis 12,5 µg ml<sup>-1</sup> erreicht werden (Kim, Jung, *et al.*, 2008). Makrolidantibiotika wie Rokitamycin (RKM) und Roxithromycin (ROX) zeigten bei infizierten Mäusen Überlebensraten von 80 % (RKM) bzw. 25 % (ROX) (Kim, Lee, *et al.*, 2008). Corifungin sorgte in einer Dosierung von 9 mg kg<sup>-1</sup> über 10 Tage für eine 100 %-ige Überlebensrate infizierter Mäuse (Debnath *et al.*, 2012). Das Antimykotikum Posaconazol brachte in einer Dosierung von 20 mg kg<sup>-1</sup> intravenös infizierten Mäusen verabreicht eine Überlebensrate von 33 %. In Kombination mit Azithromycin wird die Gabe von Posaconazol als vielversprechend eingestuft (Colon *et al.*, 2019). Bisher haben sich diese Therapieansätze in der Praxis noch nicht durchgesetzt.

### 1.2.2 Metabolismus von *N. fowleri*

Genomsequenzierungen von *N. fowleri* und den nicht pathogenen Spezies *N. gruberi* und *N. lovaniensis* lassen auf eine nahe Verwandtschaft zwischen den Spezies schließen. Wobei die Verwandtschaft zwischen *N. fowleri* und *N. lovaniensis* laut Genomdaten näher ist (vgl. **Abbildung 1.1**)

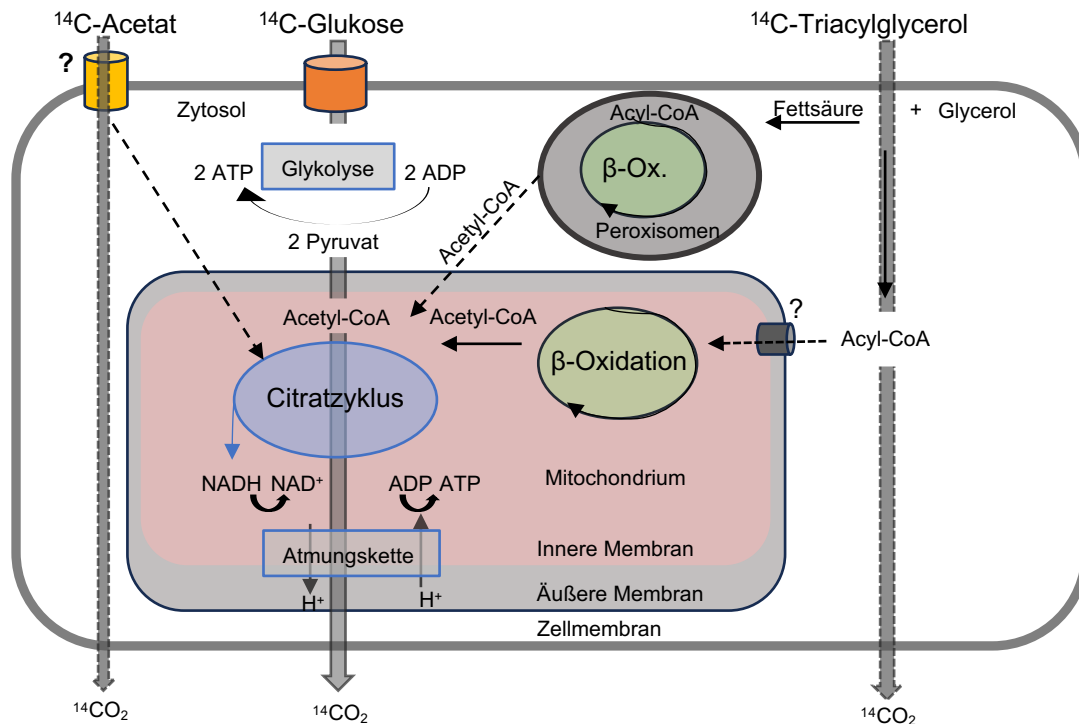


**Abbildung 1.1:** Genomähnlichkeitsnetz verschiedener einzelliger eukaryotischer Arten. Abbildung entnommen aus Liechi *et al.* (2018). Je kürzer die gestrichelte Linie, desto größer die genomische Ähnlichkeit.

Bisher ungeklärt ist, was die Pathogenität von *N. fowleri* im Gegensatz zu den anderen *Naegleria* Spezies ausmacht. In der Literatur beschriebene Genomanalysen konzentrieren sich häufig auf die Suche nach Unterschieden zwischen den nicht-pathogenen Vertretern im Gegensatz zu dem pathogenen *N. fowleri*, die die Pathogenität von *N. fowleri* erklären könnte. Bis jetzt wird angenommen, dass sich der Metabolismus nicht unterscheidet.

*N. gruberi* wird in der Literatur häufig als Modell für *N. fowleri* angesehen (Bellini *et al.*, 2018). Das Genom von *N. gruberi* (Fritz-Laylin *et al.*, 2010) liefert Hinweise auf einen anaeroben Stoffwechselweg. Bexkens *et al.*, 2018 konnten zeigen, dass weder Trophozoiten eines Laborstammes noch die eines wild lebenden Stammes, der nie mit axenischem Medium in Kontakt kam, anaerob wachsen. Somit war auch der Verlust der Fähigkeit auf anaerobes Wachstum durch viele Zellteilungen in Kulturmedium als Grund für fehlendes Wachstum unter anaeroben Bedingungen ausgeschlossen. Untersuchungen mit <sup>14</sup>C-markierten Substraten zeigten, dass Glukose in geringem Maße zu <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> verstoffwechselt. Für <sup>14</sup>C-markierte Aminosäuren wurde kein verstoffwechseltes <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> gemessen werden. <sup>14</sup>C-markierte Fettsäuren wie Ölsäure (C18:1) oder Oktansäure (C8:0) führten zu fünfmal so viel

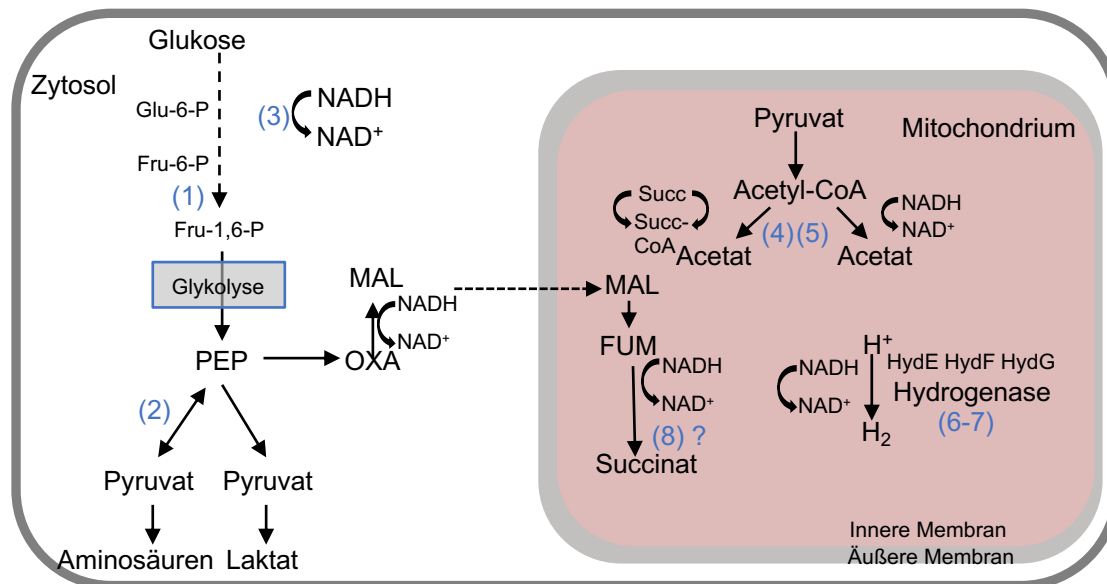
verstoffwechseltem  $^{14}\text{CO}_2$ .  $^{14}\text{C}$ -markiertes Acetat wurde 50-mal so schnell verstoffwechselt wie Glukose. Es konnte in Übereinstimmung mit der Identifikation der Gene für die Oxidation von Fettsäuren, eine Präferenz für Fettsäuren als Energiequelle durch die Trophozoiten *N. gruberi* festgestellt werden. Gleiches wird für den nahe verwandten pathogenen Parasiten *N. fowleri* angenommen, dessen Genom-Annotation die gleichen Metabolismus-Enzyme voraussagt. So sind im Genom (Liechti *et al.*, 2019; Zysset-Burri *et al.*, 2014) von *N. fowleri* eine Reihe von Glykohydrolasen, Glykosidhydrolasen, Glukosylceramidasen, Sphingomyelinphosphodiesterasen und Phospholipasen codiert. Bexkens *et al.*, 2018 sehen hier eine Übereinstimmung zu der Pathogenität von *N. fowleri*, der sich als fakultativ aerober Parasit auf sauerstoff- und lipidreiches Gewebe spezialisiert hat. So ist die weiße Hirnsubstanz reich an Myelinscheiden, welche die Axons von Nervenzellen umgeben und ca. 80 % Lipide enthalten. Acetat ist ebenfalls in Hirngewebe zu finden (Wyss *et al.*, 2011) und kann im Hinblick auf die rasche Verstoffwechselung von Acetat durch *N. gruberi* auch als potenzielle Kohlenstoffquelle für *N. fowleri* angesehen werden. Über die Acetyl-CoA-Synthase kann aus Acetat und Co-SH Acetyl-CoA generiert werden und so dem Citratzyklus zur Verfügung gestellt werden. Bisher sind keine Parasiten bekannt, die humanes Gewebe infizieren, sich aber nicht von Glukose oder Aminosäuren ernähren. Hier zeigt sich eine Besonderheit der Parasiten, denn bisher wurde auch noch für keinen eukaryotischen pathogenen Parasiten eine Präferenz für Lipide als Hauptenergiequelle gezeigt. Nichtsdestotrotz können Lipide nicht die einzige Energiequelle sein, zumal die Abwesenheit von Lipiden das Wachstum von *Naegleria* nicht zum Erliegen bringt (Bexkens *et al.*, 2018).



**Abbildung 1.2:** Hauptmetabolismuswege von *N. gruberi* Trophozoiten. *Naegleria* ist in der Lage Fettsäuren mittels  $\beta$ -Oxidation zu oxidieren und das entstehende Intermediat Acetyl-CoA dem Zitronensäurezyklus zuzuführen. Eine Carnitin-Acyl-CoA-Transferase ist bisher nicht identifiziert. Der alternative Hauptmetabolismusweg beinhaltet: Glykolyse, oxidative Decarboxylierung im Zytosol mit darauffolgendem Citratzyklus in den Mitochondrien und oxidative Phosphorylierung mittels der Atmungskette zur Generierung von ATP an der Mitochondrienmembran. Die  $^{14}\text{C}$ -Markierungen zeigen die direkte Verstoffwechselung von Acetat, Glukose und Fettsäuren zu  $^{14}\text{CO}_2$  an. Abbildung modifiziert nach Bexkens *et al.* (2018).

Eine Zusammenfassung der Metabolismuswege von *N. gruberi* (**Abbildung 1.2**) zeigt zum einen die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren über Peroxisomen und Mitochondrien mit dem Zwischenprodukt Acetyl-CoA, welches dem Citratzyklus zugeführt wird. Unbekannt ist bislang, wie die Fettsäuren unterschiedlicher Kettenlängen sich auf die beiden Zellorganellen verteilen und wie sie letztendlich in die Mitochondrien gelangen, da keine Carnitin-Acyl-CoA-Transferase bekannt ist. Die Tatsache, dass Acetyl-CoA über den Citratzyklus abgebaut wird, bringt auch die Notwendigkeit einer weiteren Kohlenstoffquelle mit sich, da die Intermediate des Citratzyklus nicht über die  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren gewonnen werden können. Die Reduktionsäquivalente des Citratzyklus werden mittels oxidativer Phosphorylierung über die Atmungskette zur ATP-Gewinnung genutzt. Eine andere Quelle für Reduktionsäquivalente, die dem Citratzyklus zugeführt werden, stellt die Glykolyse dar. Es wurde für *N. gruberi* gezeigt, dass Glukose aerob verstoffwechselt wird (**Abbildung 1.2**). Auch für *N. fowleri* wurde die notwendige enzymatische Ausstattung für die Glykolyse im Genom identifiziert. So wurde eine Glukokinase identifiziert, die die Rückdiffusion von Glukose aus der Zelle heraus durch Phosphorylierung verhindert (Milanes *et al.*, 2019). Auch lassen sich Vorhersagen für Import-assoziierte Glukose-Transporter finden (Milanes *et al.*, 2024). Auch wenn ein komplettes enzymatisches *set-up* für den aeroben glykolytischen Weg der Energiegewinnung identifiziert wurde, gibt es auch Hinweise auf alternative anaerobe Metabolismusrouten, die bisher experimentell nicht weiterverfolgt werden konnten. Der Metabolismus von *N. gruberi* und der vorhergesagte Metabolismus und die angenommenen Nahrungsquellen von *N. fowleri* im

Gehirn lassen den Schluss auf Acetat als potenzielles Substrat zu. Eine Genomsequenzierung und -annotation von 2010 (Fritz-Laylin *et al.*, 2010) sagt für *N. gruberi* die Fähigkeit zu anaerobem Metabolismus voraus, im Zuge dessen Endprodukte wie Succinat, Lactat oder Acetat entstehen würden (**Abbildung 1.3**). Auffällig ist allerdings die Abwesenheit oder fehlende Identifikation einer Laktatdehydrogenase. Die einzige im Genom vorhergesagte Laktatdehydrogenase ist spezifisch für D-Laktat und vermutlich am Abbau von bakteriellem Murein beteiligt (Oppendoes *et al.*, 2011).



**Abbildung 1.3:** Enzyme in *N. gruberi*-Trophozoiten, die in anderen Protisten mit anaerober Fermentation in Zusammenhang stehen. (1) PP<sub>i</sub>-abhängige Phosphofructokinase, (2) Pyruvatphosphatdikinase, (3) NAD<sup>+</sup>-abhängige Oxidoreduktase, (4) Acetat:Succinat-CoA-Transferase, (5) Acetyl-CoA Synthetase, (6) NADH Dehydrogenase, (7) Fe-Hydrogenase, (8) Lösliche Fumarat-Reduktase. Abbildung entnommen und modifiziert aus Fritz-Laylin *et al.* (2010)

## 1.3 Membranäre Kanäle und Transporter

Membranproteine spielen eine Schlüsselrolle in der Homöostase von einzelligen Prokaryoten, Eukaryoten und höheren Organismen. Es wird zwischen peripheren und integralen Membranproteinen unterschieden (Chou & Shen, 2007). Integrale Membranproteine sind am Transport biosynthetischer und metabolischer Substrate beteiligt oder für das Ausschleusen metabolischer Endprodukte zuständig. Es werden verschiedene Klassen der Proteine unterschieden: ABC-Transporter, Ionenkanäle, ATPasen, SLC-Transporter und Aquaporine. Periphere, membranständige, Proteine sind an der Signaltransduktion und am Aufbau des Cytoskeletts beteiligt, haben enzymatische Funktionen oder sind Teil der Zell-Zell-Kommunikation (Almén *et al.*, 2009). Membranproteine nehmen als Verbindung der Zelle zur Umgebung eine für die einzelne Zelle oder den ganzen Organismus überlebenswichtige Rolle ein. Aus diesem Grund eignen sich Membranproteine als Wirkstoffziel von Chemotherapeutika gegenüber intrinsischen Erkrankungen aber auch gegen Infektionskrankheiten, ausgelöst durch humanpathogene Bakterien, Pilze und Parasiten (Epand *et al.*, 2016; Landfear, 2010; Overington *et al.*, 2006; Sant *et al.*, 2016). Von besonderem Interesse sind Membranproteine von humanpathogenen Erregern, die strukturell keine Ähnlichkeit zu humanen Proteinen haben, um eine gezielte Adressierung des Pathogens zu erreichen und ungewollte *Off-Target*-Effekte zu verhindern.

### 1.3.1 Strukturaufklärung von Membranproteinen

Die Strukturaufklärung von Membranproteinen humanpathogener Parasiten ist vermehrt Gegenstand der Forschung geworden. Laut *protein data bank* (PDB) sind im Jahr 2024 2050 experimentell ermittelte Membran- und Zelloberflächenproteine oder-peptide mit bekannter 3D Struktur hinterlegt. Zwischen 2010 und 2014 sind 483 davon veröffentlicht worden, während es von 2015 bis 2019 536 waren (abgerufen am 28.02.2024). Die gelösten Strukturen von Membranproteinen machen damit ca. 1 % der insgesamt bekannten Proteinstrukturen der PDB aus. Die Schwierigkeit in der Strukturaufklärung von Membranproteinen besteht in der nativen Umgebung dieser und der Isolation hieraus. Aufgrund der Lage in der Biomembran besitzen Membranproteine einen hydrophoben in der Membran befindlichen Anteil der durch polare Termini, die aus der Membran herausragen, ergänzt wird. Diese amphiphile Struktur erschwert die Aufarbeitung von Membranproteinen vor der eigentlichen Strukturaufklärung erheblich. Ein Großteil (1833) der bekannten Strukturen ist mittels Röntgendiffraktometrie der Proteinkristalle gelöst worden. Ein neuerer Ansatz ist die Elektronenkristallographie. Ein kleiner Teil der Strukturen ist mittels NMR gelöst worden. Neuere Methoden greifen auf Elektronenmikroskopie- hauptsächlich Kryo-Elektronenmikroskopie (Kryo-EM) ohne die Notwendigkeit der Proteinkristallisation zurück. Die Herausforderung besteht in der Schaffung eines Umgebungsmilieus für das Protein, dass seine native Faltung ermöglicht, stabilisiert und die Bildgebung nicht maßgeblich beeinflusst. Alternative Umgebungsmilieus für Membranproteine können solche sein, die die natürliche Umgebung imitieren und damit die Stabilität fördern. Hierunter fallen Detergenzien, Nanodiscs, die als äußerlich begrenzte Lipid-Doppellayer die Biomembran nachahmen oder sogenannte Peptidiscs (Carlson *et al.*, 2018). Dem vorangehend steht die Herstellung, Solubilisierung und Reinigung des Proteins, um dieses in möglichst hoher Quantität und Reinheit zu erhalten. Während früher eher endogene Membranproteine isoliert und untersucht wurden, erfolgt die Herstellung heute häufig heterolog in Fremdorganismen. Dies bietet die Möglichkeit zur Überexpression. Aufgrund der leichten Kultivierbarkeit wird hier häufig auf prokaryotische Zellen wie *E. coli* zurückgegriffen. Als eukaryotische Expressionssysteme werden häufig Insekten- (Sf9), Hefe-, oder Säugetierzellen wie z.B. humane embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) eingesetzt. Eine Alternative, die den Einfluss einer Zelle und die Translokation oder Insertion des Proteins zur oder in die Membran umgeht, ist die zellfreie Proteinsynthese. Vorteile sind die direkte Zugänglichkeit des offenen Systems, die Variabilität und Effizienz (Schwarz, Junge, *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Identifikation von Wirkstoffzielen

Im Rahmen der Wirkstoffzielfindung und Wirkstoffoptimierung ist die Strukturaufklärung ein wertvolles Instrument zur Verbesserung der Struktur von potenziellen Modulatoren wie *small molecules*. In der Wirkstoffentdeckung wird zwischen systembasiert und *target*-basiert unterschieden (Eder *et al.*, 2014). Die *target*-basierte Wirkstoffentdeckung beinhaltet die Überprüfung einer spezifischen Hypothese, wenn die Zielstruktur bekannt ist (Swinney & Anthony, 2011). Hierzu gehört strukturbasiertes Wirkstoffdesign (SBDD *structure based drug design*) (Klebe, 2000). Die systembasierte Wirkstofffindung unterteilt in Wirkstoffe bekannter Pharmakologie, deren Wirkung in einem anderen Kontext untersucht wird und phänotypische *screenings* bei denen *Hits* identifiziert werden, die eine Wirkung auf ein biologisches System wie Zellen oder Tiere haben und damit einen bestimmten Phänotyp hervorrufen (Swinney, 2013). So wurden z.B. Antibiotika identifiziert, die als phänotypisches Merkmal das Absterben von Bakterien auslösen (Croston, 2017). Die systematische Testung von Substanzbibliotheken, die im Idealfall zu Leitstrukturen führt, brachte 2017 den *Hit* der Malariabox des *Medicines for Malaria Venture* (MMV) mit der wirksamen Substanz

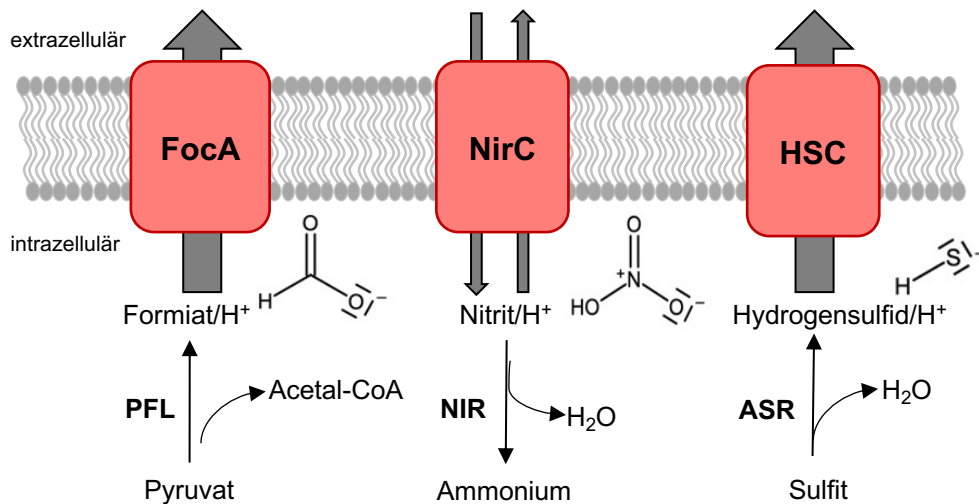
MMV007839 gegenüber dem plasmoidalen Laktattransporter PffNT (Golldack *et al.*, 2017; Hapuarachchi *et al.*, 2017).

### 1.4 Formiat-Nitrit-Transporter

Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) kommen in Mikroorganismen wie Algen, Archaeen, Bakterien oder einzelligen eukaryotischen Parasiten vor (Marchetti *et al.*, 2015). Es sind über 2200 Vertreter der FNT beschrieben. Den Großteil machen unter den Bakterien die Proteobakterien aus. Etwa 15 % der FNT sind in Archaeen und Eukaryoten wie Fungi, Alveolate, Vividriplantae zu finden (Mukherjee *et al.*, 2017). Die FNT transportieren schwache Säuren wie salpetrige Säure, Schwefelwasserstoff, Ameisensäure, Essigsäure und L-Milchsäure. Sie nehmen somit eine für den Stoffwechsel zentrale Rolle im jeweiligen Organismus ein und stellen damit das Äquivalent zu humanen Monocarboxylat-Transportern (MCT) dar. Diese übernehmen im Menschen den Transport von L-Laktat, Pyruvat und Ketonkörpern wie Acetoacetat oder  $\beta$ -Hydroxybutyrat über die Plasmamembran. Strukturell sind die FNT nicht humanen Monocarboxylat-Transportern verwandt (Halestrap & Wilson, 2012).

#### 1.4.1 Prokaryotische Formiat-Nitrit-Transporter

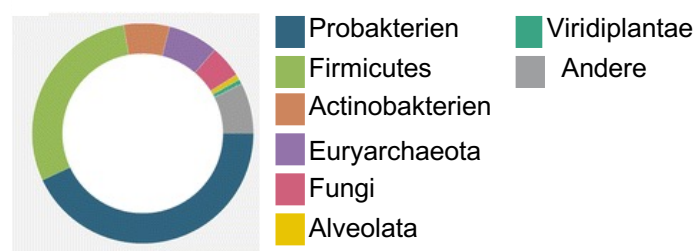
Die prokaryotischen FNT transportieren Ameisensäure/Formiat (FocA), salpetrige Säure/Nitrit (NirC) und Schwefelwasserstoff/Hydrogensulfid (HSC) über die Membran (**Abbildung 1.4**). Die erste Unterfamilie stellen die Ameisensäure transportierenden Kanäle dar, die 1994 erstmals von der Arbeitsgruppe von Gary Sawers als *formate channel* (FocA) beschrieben wurden (Suppmann & Sawers, 1994). Für Bakterien wie *E. coli*, *V. cholerae* (Waight *et al.*, 2010a) und *S. typhimurium* (Lü *et al.*, 2011) wurde auf dem gleichen Operon, auf dem auch ein Gen für eine Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) liegt, eine Codierung für ein Protein gefunden, das Ameisensäure aus der Zelle ausschleust. Die PFL katalysiert die Spaltung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat und ist Bestandteil der gemischten Säuregärung von Enterobakterien. So konnte ein direkter physiologischer Zusammenhang zwischen dem Metabolismus der Bakterien und dem Vorliegen eines Formiat-Transporters festgestellt werden. Um eine Anreicherung des Nebenproduktes Ameisensäure bzw. Formiat und die damit einhergehende zelltoxische Azidifizierung zu vermeiden, wird Ameisensäure aus der Zelle ausgeschleust. Anschließend wird Formiat durch membranständige Dehydrogenasen zu Kohlenstoffdioxid oxidiert (Suppmann & Sawers, 1994). Bei der zweiten Unterfamilie handelt es sich um Nitrit-Transporter (NirC). Diese dienen der aktiven Aufnahme von Nitrit/ $H^+$  in die Zelle. Das zelltoxische Nitrit wird über eine Nitrit-Reduktase (NIR) zu Ammonium reduziert und steht der Zelle so als Stickstoffquelle zur Verfügung. Für *S. typhimurium* wurde beispielsweise gezeigt, dass den Zellen hiermit ein Mechanismus zur Verfügung steht, das durch Makrophagen sezernierte Stickstoffmonoxid (NO) zu detoxifizieren (Das *et al.*, 2009; Rycovska-Blume *et al.*, 2015). NO kann durch Autooxidation in Nitrit umgewandelt und über den NirC in das Bakterium aufgenommen werden. Auch das NirC-Gen liegt in dem gleichen Operon wie die zugehörige NADPH-abhängige membranständige Nitritreduktase. Die dritte Unterfamilie bilden die Hydrogensulfid-Transporter (HSC), welche nach Reduktion von Sulfid zu Hydrogensulfid über die assimilatorische Sulfid-Reduktase letzteres gemeinsam mit  $H^+$  aus der Zelle ausschleusen (Czyzewski & Wang, 2012). Auch hier liegen die Gene für das metabolisierende Enzym und den Transporter im selben Operon.



**Abbildung 1.4:** Prokaryotische Familie der FNT. (A) Der Formiat-Transporter (FocA; für *formate channel* A) schleust aus der Spaltung von Pyruvat zu Acetyl-CoA anfallendes Formiat aus der Zelle raus. Der Nitrit-Transporter (NirC für *nitrite channel* C) schleust Nitrit in die Zelle, wo es zu Ammonium reduziert wird. Der Hydrogensulfid-Transporter (HSC für *hydrogen sulfide channel*) schleust zelltoxisches Hydrogensulfid aus der Zelle. PFL: Pyruvat-Formiat-Lyase, Acetyl-CoA: Acetyl-Coenzym A, NIR: Nitrit-Reduktase, ASR: Sulfit Reduktase. Modifiziert nach Lü *et al.* (2013) und Waight *et al.* (2013).

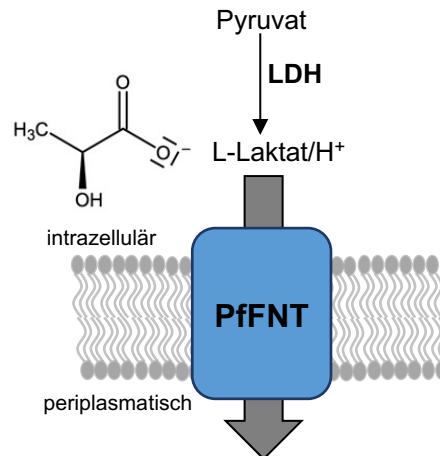
#### 1.4.2 Eukaryotische Formiat-Nitrit-Transporter

Während prokaryotische FNT ubiquitär vorkommen, ist das Auftreten eukaryotischer Proteine dieser Familie deutlich seltener vgl. *Fungi*, *Alveolata* und *Andere* (**Abbildung 1.5**). So sind ungefähr die Hälfte der eukaryotischen FNT den *Fungi* zuzuordnen. Einen kleinen Teil machen die einzelligen *Alveolata* aus. Zu der zweiten größeren Hälfte der Eukaryoten, die durch *Andere* repräsentiert wird, zählen die Protozoen wie z.B. *P. falciparum* oder *T. gondii*.



**Abbildung 1.5:** Taxonomische Verteilung von 2206 bekannten FNT. Abbildung entnommen und modifiziert nach Mukherjee *et al.* (2017).

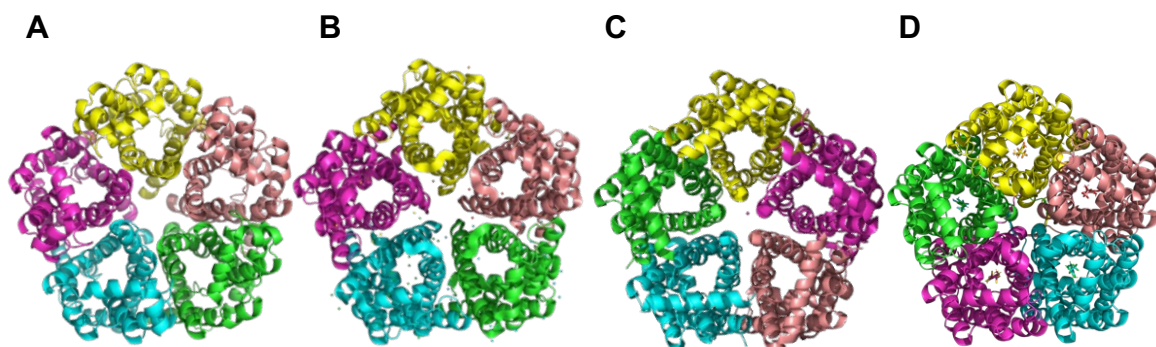
Ein gut beschriebenes Protein dieser Klasse ist der plasmodiale Laktat-Transporter PfFNT (Lü *et al.*, 2013). PfFNT verhindert die Akkumulation des zelltoxischen Stoffwechselproduktes L-Milchsäure im Parasiten (**Abbildung 1.6**). Der Parasit generiert im erythrozytären Stadium über die anaerobe Verstoffwechselung von Glukose, welche über den plasmoidalen Hexosetransporter in den Parasiten gelangt, ATP. Das dabei anfallende Pyruvat wird über eine Laktatdehydrogenase zu L-Laktat und Protonen abgebaut. Das anfallende Laktat wird gemeinsam mit einem Proton über den FNT aus dem Parasiten ausgeschleust (Marchetti *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015).



**Abbildung 1.6:** Eukaryotischer FNT. PfFNT schleust anfallendes L-Laktat aus dem Parasiten heraus.

#### 1.4.3 Struktureller Aufbau der FNT

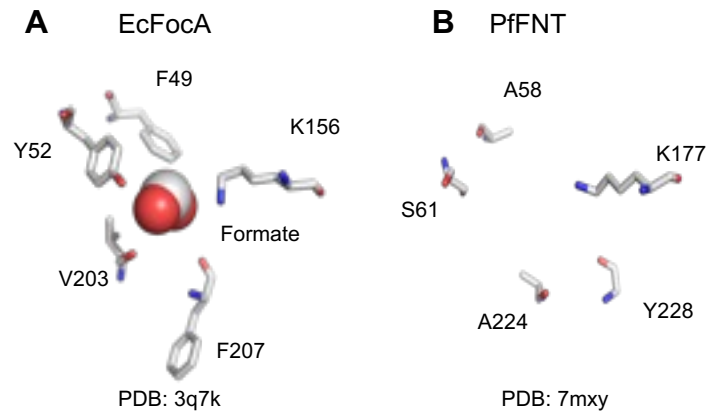
Grundsätzlich ähneln sich prokaryotische und eukaryotische FNT. Beide bilden aus fünf Protomeren Pentamere (**Abbildung 1.7**) mit einer zentralen Pore, die nicht am Substrattransport beteiligt und mit Phospholipiden gefüllt ist. Jedes Protomer besteht aus sechs Transmembranspannen und bildet eine Transportpore mit nach innen gerichteten Termini aus. Innerhalb dieser Transportpore nehmen bestimmte Aminosäuren Schlüsselpositionen im Aufbau der Transportpore und im postulierten Transportmechanismus ein (Wiechert & Beitz, 2017a).



**Abbildung 1.7:** Struktureller Aufbau der FNT. Struktur von (A) EcFocA von *E. coli* PDB: 3KCU. (B) NirC von *S. typhimurium* PDB: 4FC4. (C) HSC von *C. difficile* PDB: 3TDR. (D) FNT von *P. falciparum* mit gebundenem Inhibitor MMV007893; PDB: 7mxy.

##### 1.4.3.1 Selektivitätsfilter

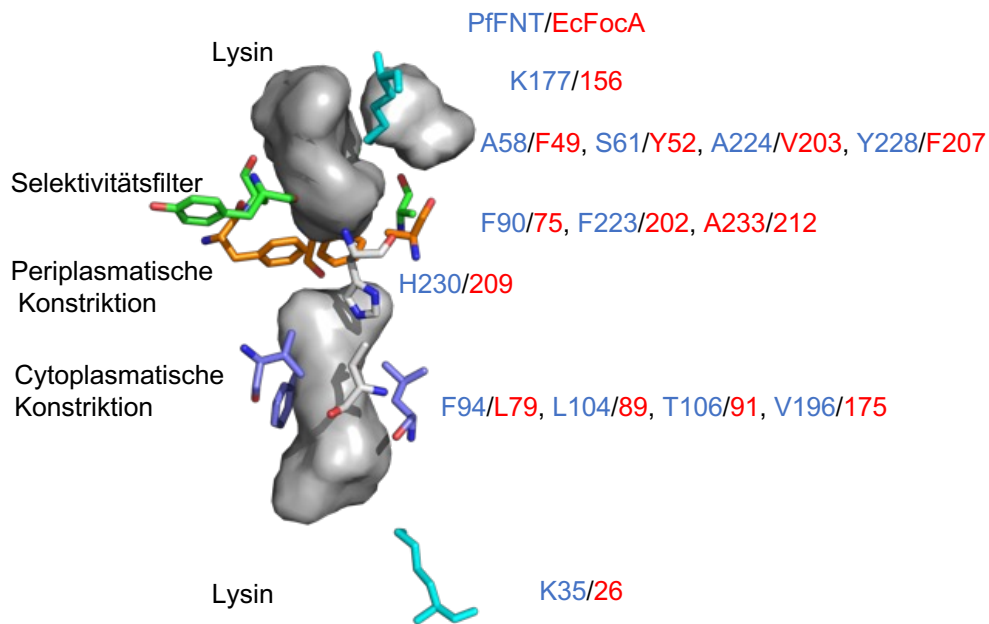
Unterschiede weisen die FNT in den Aminosäuren auf, die den Selektivitätsfilter (**Abbildung 1.8**) bilden. So wird der Selektivitätsfilter prokaryotischer FNT durch sterisch anspruchsvollere Aminosäuren gebildet, die für einen kleineren Poreneingang mit einer Fläche von ca.  $18,9 \text{ \AA}^2$  sorgen, sodass größere Substrate wie Milchsäure bzw. L-Laktat/ $\text{H}^+$  exkludiert werden und lediglich kleine Säuren wie Ameisensäure bzw. Formiat/ $\text{H}^+$  oder salpetrige Säure bzw. Nitrit/ $\text{H}^+$  passieren können (Wiechert *et al.*, 2017c). Der Selektivitätsfilter eukaryotischer FNT hingegen wird durch kurzkettrige gebildet, wodurch die Substratpassage des L-Laktats/ $\text{H}^+$  möglich wird (Erler *et al.*, 2018; Wiechert *et al.*, 2017).



**Abbildung 1.8:** Selektivitätsfilter der FNT. (A) Prokaryotischer EcFocA und (B) eukaryotischer PfFNT mit einer Filterfläche von ca. 41,2 Å<sup>2</sup>.

#### 1.4.3.2 Transportmechanismus und Schlüsselaminosäuren

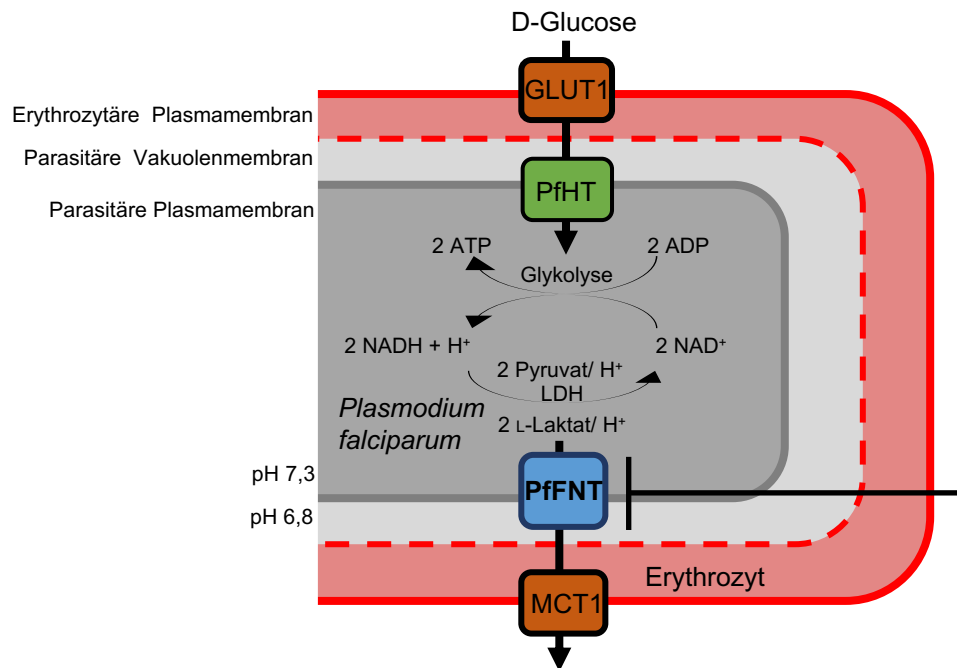
In der Arbeitsgruppe wurden die Schlüsselaminosäuren, welche die Transportpore ausbilden, identifiziert (**Abbildung 1.9**). Damit einhergehend wurde ein Transportmechanismus etabliert. In der Literatur werden mehrere Transportmechanismen diskutiert. Der *dielectric slide* Mechanismus sieht zu Beginn der Substrattranslokation eine Anziehung des negativ geladenen Substrates durch positiv geladene Lysine im Poreneingang vor. Die Dielektrizitätskonstante des Substrates sinkt in der lipophilen Umgebung der Transportpore, sodass dieses durch das umgebende Bulkwasser protoniert wird und die lipophilen Konstriktionen als ungeladenes Substrat passieren kann. Die Funktion des zentralen Histidins ist vor diesem Zusammenhang noch nicht gänzlich geklärt. Es ist aber gezeigt worden, dass das zentrale, konservierte Histidin ungeladen vorliegt und aufgrund der lipophilen Umgebung die Energiebarriere für eine Protonierung zu hoch ist (Wiechert & Beitz, 2017b, 2017a). Das zentrale Histidin ist außerdem ein Erkennungsmerkmal der FNT, da fast alle FNT ein zentrales Histidin aufweisen. Auf der anderen Seite der Pore bzw. Plasmamembran befindet sich ein weiteres positiv geladenes Lysin. Das protonierte Substrat kann das Proton wieder an das Bulkwasser abgeben und die Transportpore als Anion verlassen. Der Transport erfolgt pH-abhängig, durch einen Protonengradienten getrieben. Eine einfache Einordnung als Kanal oder Transporter ist nicht möglich, da keine Konformationsänderung wie bei einem Transporter durchlaufen wird (Bader & Beitz, 2020; Waight *et al.*, 2010).



**Abbildung 1.9:** Schlüsselaminosäuren der Transportpore der FNT. Eukaryotischer PfFNT in blau. Prokaryotischer EcFocA in rot.

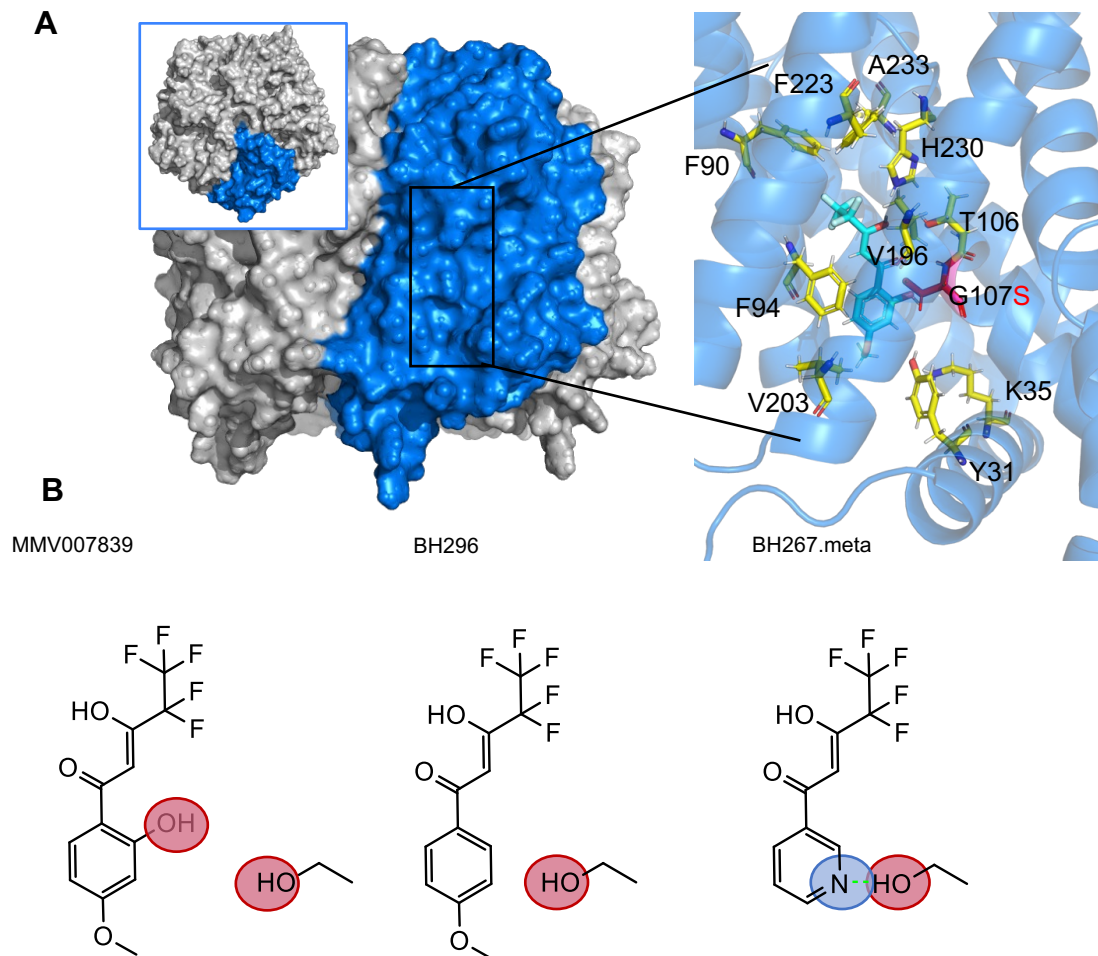
### 1.5 Eukaryotische FNT als Wirkstoffziel

Eine Inhibition des plasmoidalen Laktat-Transporters führt zur Akkumulation von L-Laktat und Protonen. Aufgrund der Übersäuerung der Vakuole stirbt der Parasiten ab (**Abbildung 1.10**). Die Inhibition des plasmoidalen Laktat-Transporter konnte unter anderem durch direkte Inhibition eines heterolog hergestellten PfFNT in Hefen und in *P. falciparum* 3D7 (Golldack *et al.*, 2017) nachgewiesen werden. Es wurde außerdem gezeigt, dass der Inhibitor den Parasiten in Trophozoitenstadium inhibiert (Davies *et al.*, 2023). In humanen Zellen wird L-Laktat über MCT1 aus dem Erythrozyten transportiert (Halestrap, 2012; Rabinowitz & Enerbäck, 2020). Der humane L-Laktat-Transporter MCT1 wird von dem PfFNT-Inhibitor aufgrund der strukturellen Unterschiede und dem Bindemodus nicht adressiert. Somit wird der plasmoidale Laktat/H<sup>+</sup>-Transporter als wertvolles Ziel potenzieller Anti-Malaria-Mittel angesehen.



**Abbildung 1.10:** Eukayrotischer FNT aus *P. falciparum*. Einordnung des PfFNT in den Metabolismus des Parasiten im erythrozytären Trophozoitenstadium. GLUT1: humaner Glukosetransporter 1; PfHT1: Hexosetransporter 1 von *P. falciparum*. LDH: Laktatdehydrogenase; PfFNT: FNT aus *P. falciparum*; MCT1: humaner Monocarboxylatransporter 1. Abbildung modifiziert nach Nerlich *et al.* (2021), Krishna (2000) und Wu *et al.* (2015).

Der Bindemechanismus des Substrat-analogen FNT-Inhibitors MMV007839 ist strukturell aufgeklärt (Peng *et al.*, 2021) (vgl. **Abbildung 1.11 A**). Die Fluoro-Alkyl-Gruppe ragt in Richtung der extrazellulären Seite in die Bindetasche hinein. Die vinyloge Säure liegt im engeren Teil der Pore auf Höhe des Threonins 106 und Valins 196. Der voluminöse aromatische Rest hat durch die Flexibilität von Phenylalanin 94 Platz in der Bindetasche. Es wurde gezeigt, dass strukturelle Veränderung am Inhibitor zur Adressierung von Resistenzmutanten des plasmoidalen Laktattransporters (Gollack *et al.*, 2017; Walloch *et al.*, 2020, 2021) möglich sind und dass diese auch *in vitro* im Parasiten adressierbar sind (Davies *et al.*, 2023). Ein Zusammenstoßen der Hydroxylgruppe der Resistenzmutante PfFNTG107S, die in die Pore hereinragt, (**Abbildung 1.11 A**) und der in ortho-Position stehenden Hydroxylgruppe des Inhibitors MMV007839 kann durch die Entfernung der Hydroxylgruppe vermieden werden.



**Abbildung 1.11:** Lage des FNT-Inhibitors in der Bindetasche und chemische Modifikation zur Umgehung der Kollision der Hydroxylgruppe der Resistenzmutante PfFNTG107S. (A) Oberflächenstruktur des PfFNT-Pentamers in grau. In blau hervorgehobenes Monomer mit Bindetasche. Bindetasche bildende Aminosäuren in gelb. MMV007839 in türkis, G107S in rot. PDB: 7mxy. Abbildung modifiziert nach Walloch *et al.* (2020).

Das Pharmakophor des Inhibitors erinnert an ein Milchsäure und ein Laktat-Molekül und befindet sich in Übereinstimmung mit dem postulierten Transportmechanismus von L-Laktat (Wiechert & Beitz, 2017a) in der Transportpore (**Abbildung 1.11 A**). Die Bindung des ursprünglichen Inhibitors MMV007839 zu der Resistenzmutante G107S, die durch den Hydroxylgruppen Zusammenstoß eine Bindung erschwert, wird durch Einfügen eines Stickstoffs an Position 3 im Aromaten und die Entfernung der Hydroxylgruppe an Position 4, mittels möglicher Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert (**Abbildung 1.11 B rechts**). BH267.meta weist gegenüber dem Wildtyp *P. falciparum* 3D7 erniedrigte  $EC_{50}$ -Werte auf, während die G107S-vermittelte Resistenz trotz verbesserter Bindung nicht vollständig behoben werden konnte.

Ein weiterer charakterisierter Vertreter ist der in *T. gondii* identifizierte FNT (Erler *et al.*, 2018; Zeng *et al.*, 2021). In *T. gondii* wurden drei TgFNT identifiziert, die pH-abhängig Formiat/ $H^+$  und L-Laktat/ $H^+$  transportieren. Der Laktat/ $H^+$ -Transport wird durch Inhibitoren, die dasselbe Pharmakophor besitzen wie die PfFNT-Inhibitoren, zum Erliegen gebracht. TgFNT1-3 weisen ebenfalls die für PfFNT postulierten Bindetasche (Golldack *et al.*, 2017) für den Inhibitor auf. Die Inhibitorbindung wird bei beiden Proteinvertretern durch den Austausch eines Glycins gegen ein Serin an Position G107S für PfFNT und eine Mutation an übereinstimmender

Position bei TgFNT1-3 herabgesetzt, sodass die resultierenden IC<sub>50</sub>-Werte nach oben verschoben waren. Die Inhibitoren weisen zum Teil eine Wirkung im nanomolaren Bereich gegenüber den heterolog in Hefen exprimierten TgFNT auf. Gegenüber den Tachyzoiten wurde EC<sub>50</sub>-Werte im einstelligen mikromolaren Bereich gemessen, die darauf hindeuten, dass die FNT-Inhibitoren die asexuelle Reproduktion von *T. gondii* blockieren (Erler *et al.*, 2018). Eine gegensätzliche Ansicht identifiziert TgFNT1 als hauptsächlichen Laktat-Transporter, dessen Abwesenheit wie auch die der anderen beiden TgFNT, das Wachstum der Trophozoiten unter Standard *in vitro* Kulturbedingungen nicht beeinflusst. Vor diesem Hintergrund wird eine Hemmung der TgFNT durch die FNT-Inhibitoren als Ursache für eine Proliferationshemmung als unwahrscheinlich angesehen (Zeng *et al.*, 2021). Die Rolle der TgFNT im Stoffwechsel der im infizierten Gehirn gebildeten Bradyzoiten ist nicht gänzlich geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass die FNT in *T. gondii in vivo* und in verschiedenen Stadien des Lebenszyklus von *T. gondii* wichtig sind (Zeng *et al.*, 2021). Eine postulierte Rolle der TgFNT liegt in der Azidifizierung der parasitären Vakuole (Huynh & Carruthers, 2022), die den Austritt des Parasiten aus der infizierten Zelle ermöglicht, wodurch der Lebenszyklus des Parasiten (Roiko *et al.*, 2014) aufrechterhalten wird. Diese Theorien zusammengenommen zeigen, dass eine *in vitro* Notwendigkeit der TgFNT nicht gegeben sein muss, während *in vivo* den TgFNT eine für den Parasiten überlebenswichtige Rolle zukommen kann. Die Komplexität der Protozoen mit unterschiedlichen morphologischen Stadien, die Notwendigkeit einer kausalen Behandlungsmöglichkeit und die Schwierigkeit ein solches Wirkstoffziel zu identifizieren, wurde an *T. gondii* veranschaulicht und lässt sich auf weitere bislang unvollständig aufgeklärte Virulenzfaktoren anderer Parasiten wie z.B. *N. fowleri* übertragen.

### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Zum besseren Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehung des plasmoidalen Laktat/H<sup>+</sup>-Transporters, PfFNT, wurde zunächst im Rahmen der Strukturaufklärung die Funktion der zellfrei hergestellten Resistenzmutante G107S untersucht. Hierzu wurde zellfreies PfFNTG107S zum einen in NDs rekonstituiert und mittels TEM-Aufnahmen visualisiert und zum anderen in Proteoliposomen zur funktionellen Charakterisierung rekonstituiert.

Weiteres Ziel der Arbeit war die Identifikation weiterer humanpathogener Erreger, die *in vivo* mit bekannten Inhibitoren des eukaryotischen FNT inhibiert werden können. Im weiteren Verlauf soll der Fragestellung nachgegangen werden, ob das vermutete *Target* der Inhibition, als FNT bestätigt werden kann. Genomanalysen sagen für *N. fowleri* das Vorliegen von FNT voraus. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird der Fragestellung nachgegangen, ob es sich tatsächlich um FNT handelt und diese mittels der bekannten Inhibitoren plasmoidaler FNT inhibiert werden können. Hierzu werden die identifizierten Proteine heterolog hergestellt und biochemisch charakterisiert. In dem Zusammenhang wird der Fragestellung nachgegangen, inwiefern FNT in *Naegleria* eine Rolle im Metabolismus einnehmen können.

## 2 Material

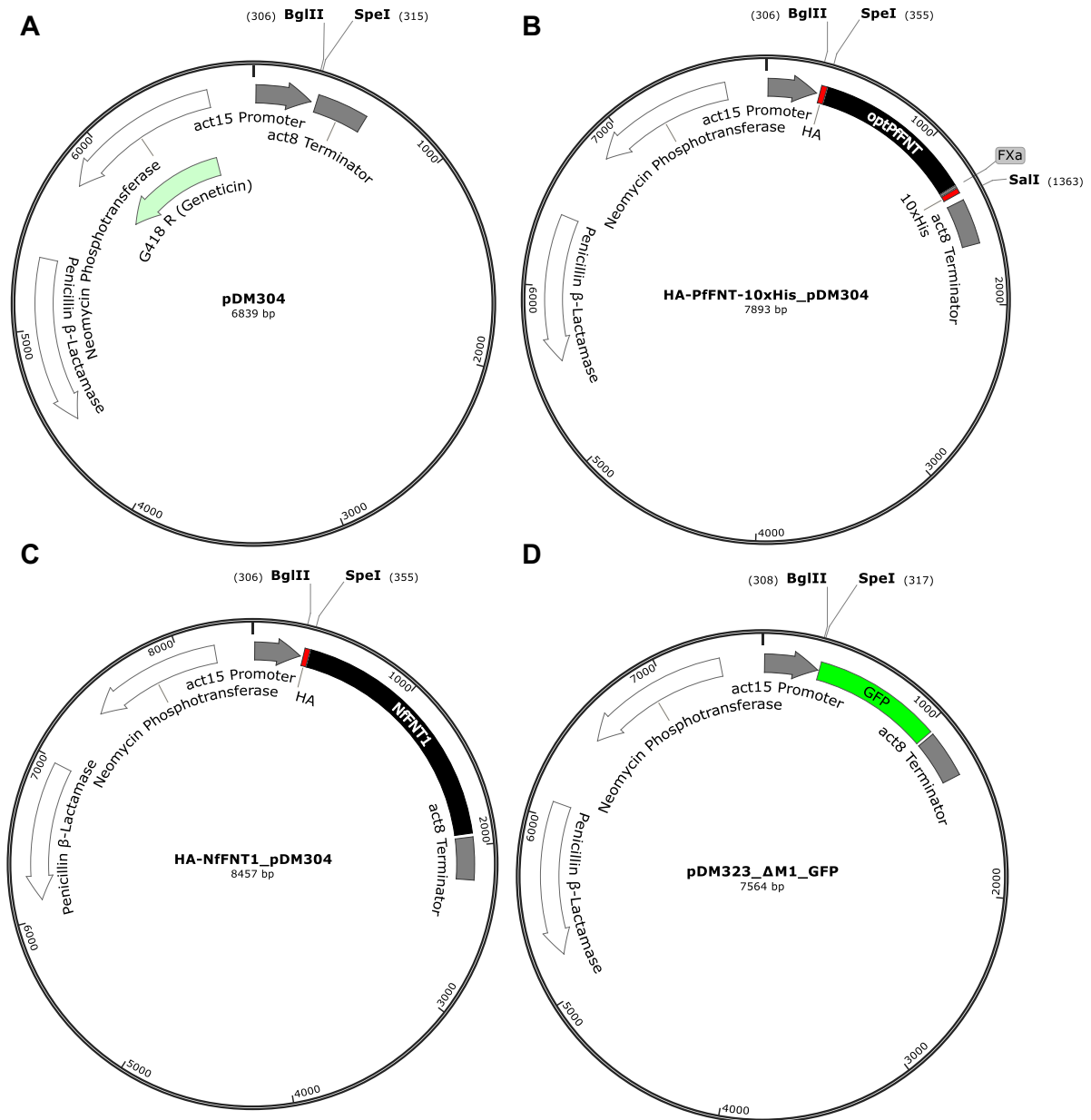
### 2.1 Plasmide, Oligonukleotide

#### 2.1.1 Codierende DNA (NCBI GenBank®)

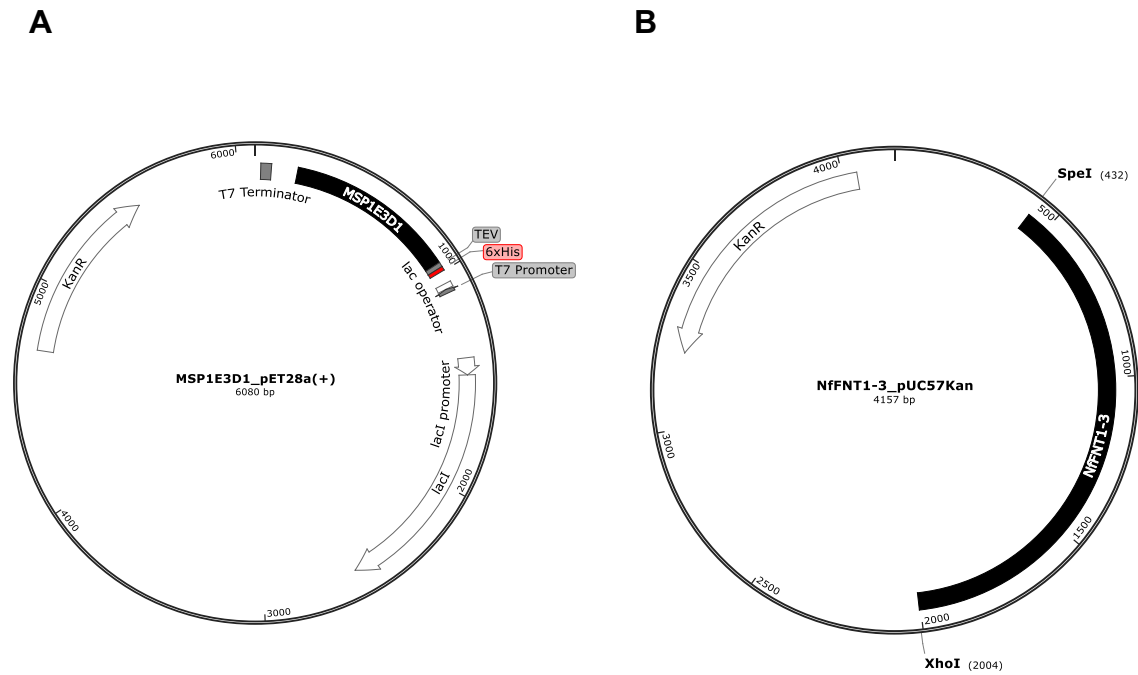
Die verwendeten codierenden DNA-Sequenzen für optNfFNT1-3 sind (**Abbildung 4.24**) zu entnehmen. Im Folgenden werden die Konstrukte als NfFNT bezeichnet ohne die Ergänzung opt für *S. cerevisiae*. Die codierenden Sequenzen für PfFNT, hAQP9 und MSP1E3D1 lagen zu Beginn dieser Arbeit als Plasmid-DNA im Arbeitskreis vor und wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Identifikationsnummern der Nukleotid- und Proteinsequenz sind **Tabelle 2.1** zu entnehmen. Die für NfFNT codierenden DNA-Sequenzen wurden basierend auf den wie in 3.8 beschrieben ermittelt und nach dem OptimumGene™-Algorithmus für *S. cerevisiae* codon-optimiert und bei GenScrip (Piscataway, USA) erworben. Die Vektorkarten wurden mit SnapGene® Viewer erstellt und sind **Abbildung 2.1**, **Abbildung 2.2**, **Abbildung 2.3**, **Abbildung 2.4**, **Abbildung 2.5** und **Abbildung 2.6** zu entnehmen.

**Tabelle 2.1:** Codierende DNA-Sequenzen (NCBI GenBank®).

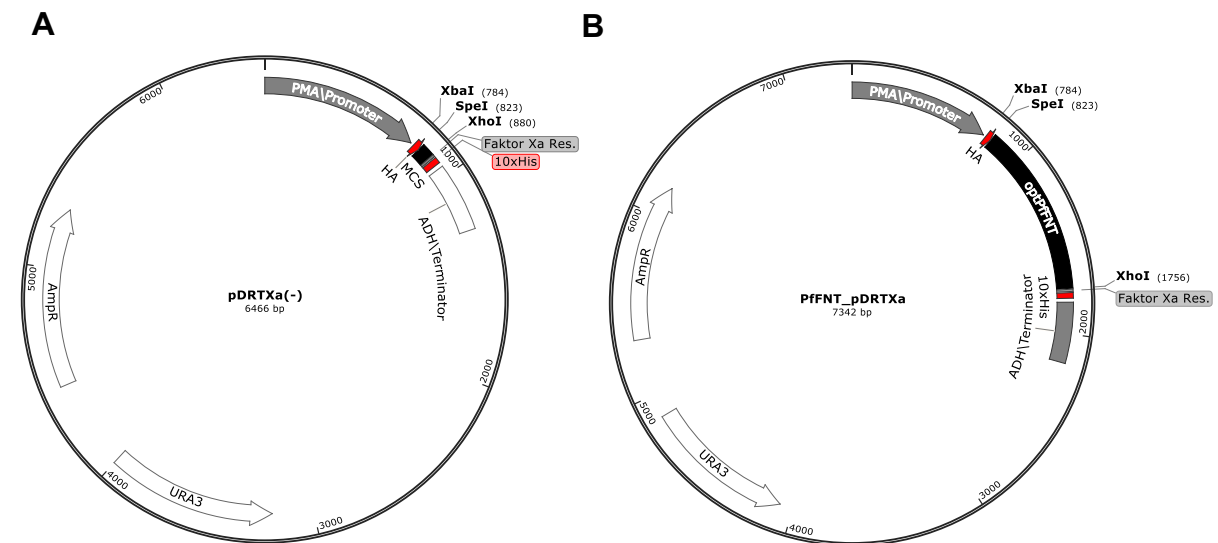
Proteinname	Beschreibung	Gene-ID	mRNA Nummer	Protein-ID
NfFNT1	<i>Uncharacterized protein</i> aus <i>Naegleria fowleri</i>	68117162	FDP41_009947	XP_044556440.1
NfFNT2	<i>Uncharacterized protein</i> aus <i>Naegleria fowleri</i>	68107404	FDP41_000186	XP_044569860.1
NFNT3	<i>Uncharacterized protein</i> aus <i>Naegleria fowleri</i>	68118529	FDP41_0011314	XP_044567097.1
PfFNT	Laktat-Transporter aus <i>Plasmodium falciparum</i>	814480	XP_001351236.1	XP_001351236.1
MSP1E3D1	<i>membrane scaffold protein</i>	GenBank		Patent: EP 2319495-A2 106 11-MAY-2011
JA365719.1				



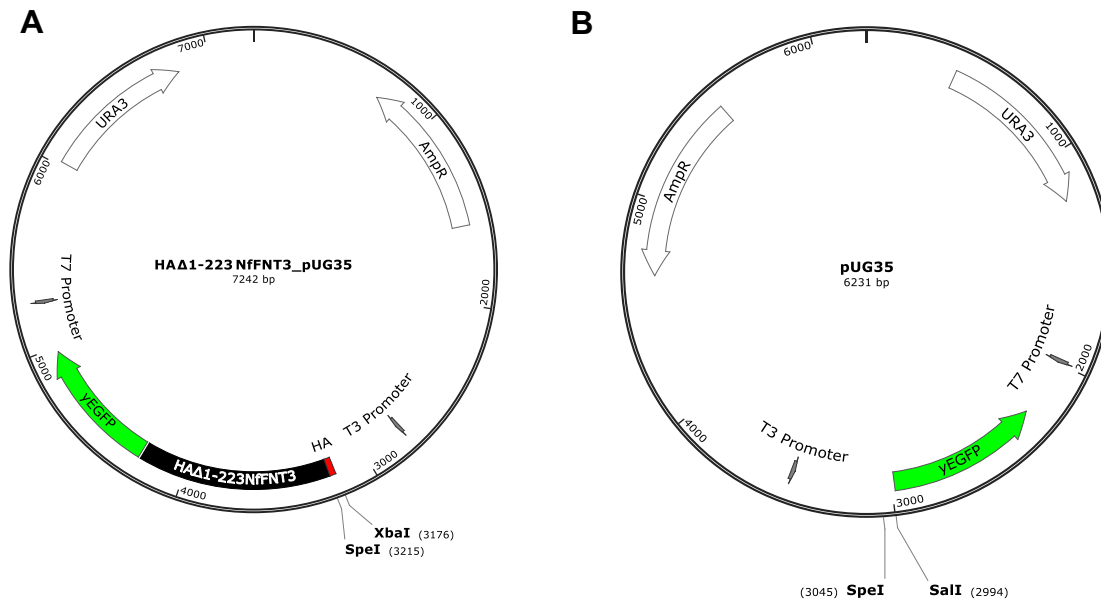
**Abbildung 2.1:** pDM-Plasmide für die Proteinherstellung in *D. discoideum* (Veltman *et al.*, 2009). (A) pDM304 Leerplasmid. (B) Beispielhaft HA-PfFNT-His<sub>10</sub> im pDM304-Vektor. (C) Beispielhaft HA-NfFNT1 im pDM304-Vektor. (D) pDM323\_ΔM1\_GFP im pDM304-Vektor mit C-terminalen GFP ohne Startmethionin.



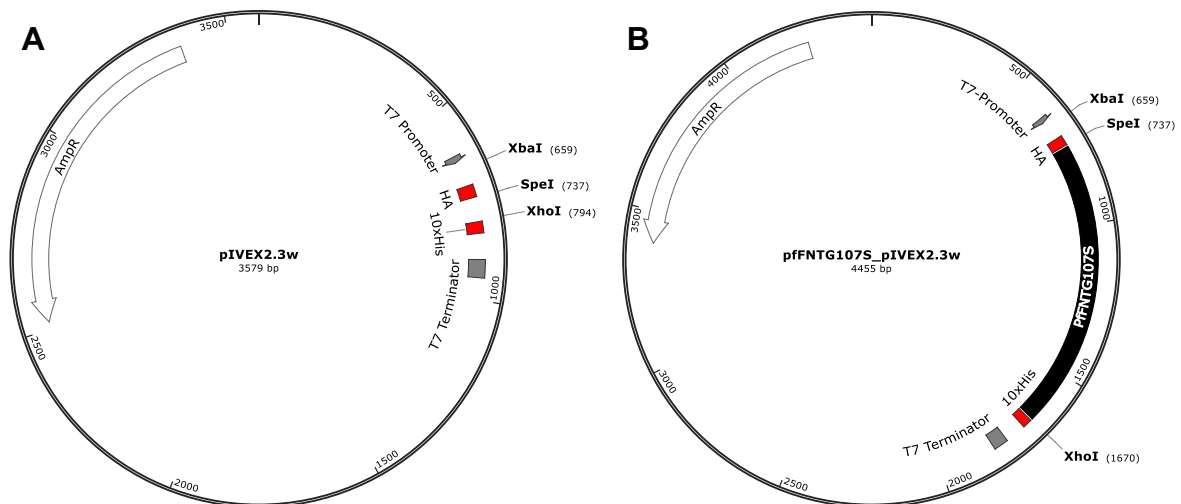
**Abbildung 2.2:** (A) pET28a(+)-Plasmid für die *E. coli* basierte Herstellung von MSP1E 3D1. (B) codonoptimiertes NfFNT1-3 im pUC57Kan-Vektor zur Plasmidamplifikation. lacI: lacI-Repressorprotein-Gen, KanR: Kanamycin-Resistenzgen, TEV: TEV-Proteaseschnittstelle.



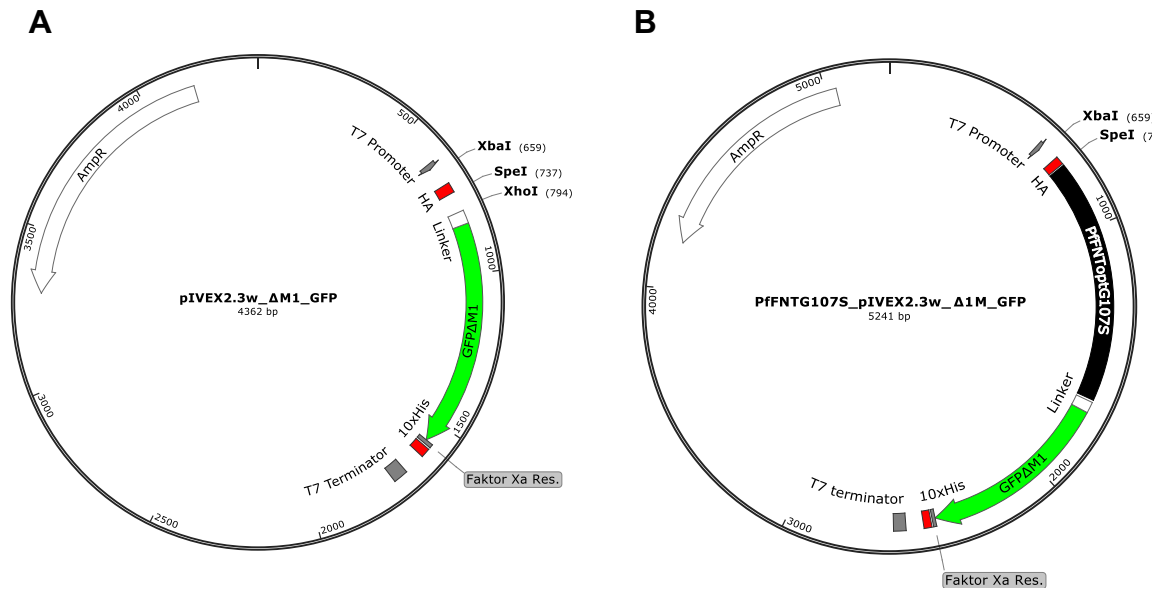
**Abbildung 2.3:** Plasmide mit dem abgewandelten pDR196 backbone, bezeichnet als pDRTXa, für die Expression rekombinanter Proteine in *S.cerevisiae*. Der abgewandelte pDR196 Vektor enthält N-terminal einen Hämagglutinin (HA)-tag, sowie C-Terminal einen 10xHis-tag mit Faktor Xa Erkennungssequenz. Beispielhaft gezeigt ist codonoptimiertes PfFNT (B) im pDRTXa (A) Vektor. AmpR: Ampicillinresistenzgen, MCS: multiple cloning site, URA3: Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase-Gen.



**Abbildung 2.4:** Die pUG35 Plasmide für die Expression rekombinanter GFP-Fusionskonstrukte in *S.cerevisiae*. Je nach Konstrukt wurde zusätzlich ein N-terminaler Hämagglutinin (HA)-tag eingefügt. Beispielhaft dargestellt ist HA- $\Delta$ 1-223NfFNT3 (B) im pUG35 Vektor (A). AmpR: Ampicillinresistenzgen, URA3: Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase-Gen.



**Abbildung 2.5:** pIVEX-Plasmide für die zellfreie Proteinsynthese. (A) Leerplasmid. (B) PfFNTG107S im zellfrei Vektor. Das Konstrukt wurde durch Klonierung N-terminal mit einem HA-tag oder einem StreptII-tag mit linker und C-terminal mit einem His<sub>10</sub>-tag versehen. AmpR: Ampicillinresistenz.



**Abbildung 2.6:** pIVEX-Plasmide mit GFP ohne Startmethionin für die zellfreie Proteinsynthese. (A) Leerplasmid. (B) PpFNTG107S in pIVEX2.3w-Vektor. AmpR: Ampicillinresistenz.

### 2.1.2 Oligonukleotide (Primer)

Für die Polymerasekettenreaktion (PCR) im Rahmen der ortspezifischen Mutagenese, Sequenzierung oder Klonierung wurden die in **Tabelle 2.2** aufgeführten Oligonukleotide verwendet. Von der komplementären Sequenz abweichende Basen sind **fett** geschrieben. Zusammenhörige Triplets beziehen sich auf die jeweilige Codierung in *frame*.

**Tabelle 2.2: Oligonukleotide**

Name	Sequenz
PMA 5'	CTC TCT TTT ATA CAC ACA TTC
ADH 3'	CAT AAA TCA TAA GAA ATT CGC
M13F_pUC57Kan 5'	TGT AAA ACG ACG GCC AG
M13R_pUC57Kan 3'	CAG GAA ACA GCT ATG ACC
SpeI-MSP1E3D1 5'	<b>TTT ACT AGT</b> AGC ACC TTT AGC AAA CTG CG
XhoI-MSP1E3D1 3'	<b>TTT CTC GAG</b> TGA CTG GGT GTT CAG TTT TTT GG
N-term_StreptII-Linker FXa 5'	TTT CTA GAA ATA ATT TTG TTT AAC TTT AAG AAG GAG ATA TAC ATA TG <b>TGG AGC CAC CCG CAG TTC GAA AAG</b> AGA CCA GCT TGT AA
N-term_StreptII-Linker FXa 3'	AA GGA TCC ACT AGT GCG GCC TTC GAT AAC CTT TTG CTT CAA ATC GTT TGG AAT CTT ACA AGC TGG TCT <b>CTT TTC GAA CTG CGG GT</b>
Δ1-155NfFNT2 5'	<b>TTT ACT AGT</b> CCA TCC CAA CCA CCA ATT GC
EcoRI NfFNT2 3'	GCA AAC CTG GGA ATT CTT CTT CCA AC
Δ1-183NfFNT2 5'	<b>TTT ACT AGT</b> AAG ACT GAA GGT GTT AG
NfFNT2Δ441 3'	<b>TTT CTC GAG</b> ATGTCTGTTTCTGTAGTCG
BstEII NfFNT2 5'	C TTC ATT GGT AAC CTA TTG C
NfFNT2Δ463 3'	<b>TTT CTC GAG</b> AGA TTG CTT GTA CTT TTC
Δ1-195NfFNT3 5'	<b>TTT ACT AGT</b> AAC CAT TTG CCA GCT CAC TCT CC
Bgl II NfFNT3 3'	GAT AAA CTT CTT AGA TCT CC
Δ1-223NfFNT3 5'	<b>TTT AC TAGT</b> AAG CAA GAA GGT ATC AGA AAG TC
NfFNT3Δ481 3'	<b>TTT CTC GAG</b> GTG ACG GTG TCT CAA GTC GTG
Bgl II NfFNT3 5'	TCG TAA ATG GAG ATC TAA GAA G
NfFNT3Δ503 3'	<b>TTT CTC GAG</b> TTG GTG AAT GTA TCT TTG
Bgl II/KpnI-Kozak-HA 5'	<b>AA AAA GAT CTG GTA CCA</b> AAA ATG TAC CCA TAC GAC GTT CCT GAC T
pDRTXa-Sall_AvrII 3'	<b>TTT CCT AGG GTC GAC</b> TGG ATCTCAGTTACTCGATCA
PfFNT_Sall_AvrII 3'	<b>T TTT CCT AGG GTC GAC</b> GTT GCG CAG TTC AAT G
HA-pDM304 5'	GAT CTG GTA CCA AAA ATG TAC C
pDM323-GFP 3'	TCC ACT GAC AGA AAA TTT GTG CC
pDM304 3'	TAT TAG ATT ATT ACA ACA ATT TG

## 2.2 Zellstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in **Tabelle 2.3** aufgeführt. Der Hefestamm W303-1A  $\Delta jen1 \Delta ady2$  wurde von M. Casal (Andrade & Casal, 2001; Casal *et al.*, 1999; Paiva *et al.*, 2004) zur Verfügung gestellt.

**Tabelle 2.3: Verwendete Zellstämme**

Zelllinie	Genotyp
<i>Escherichia coli</i>	
DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> $\phi$ 80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA</i> <i>supE44</i> λ <sup>-</sup> <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
BL 21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal dcm</i> (DE3)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
W303-1A $\Delta jen1 \Delta ady2$	<i>MATa</i> , <i>can1-100</i> , <i>ade2-1oc</i> , <i>his3-11-15</i> , <i>leu2-3,-112</i> , <i>trp1-1-1</i> , <i>ura3-1</i> , <i>jen1::kanMX4</i> , <i>ady2::hphMX4</i>
NY17	<i>MATa</i> , <i>sec6-4</i> , <i>ura3-52</i>
<i>Dictyostelium discoideum</i>	
AX2	214, <i>axeA2</i> , <i>axeB2</i> , <i>axeC2</i>

## 2.3 Antikörper, Chemikalien, Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterialien

Der S30-Extrakt und die T7-RA-Polymerase für die zellfreie Proteinproduktion wurden in Anlehnung an das Protokoll von Schwarz *et al.* (2007) in der Arbeitsgruppe produziert. Die S30-Extrakte wurden im Rahmen dieser Arbeit gemeinsam mit anderen Gruppenmitgliedern gewonnen, während die T7-RNA-Polymerase freundlicherweise von früheren Mitgliedern (Dr. Sinja Bock, Dr. Julia Holm-Bertelsen und Dr. Folkhard Helmstetter) zur Verfügung gestellt wurde. Alle am pharmazeutischen Institut der CAU verwendeten Antikörper, Chemikalien, Enzyme, Kits und Verbrauchsmaterialien sind der folgenden Liste zu entnehmen.

Antikörper
Jackson ImmunoResearch, Suffolk, UK
Peroxidase AffiniPure IgG Goat Anti-Mouse, <i>light chain specific</i> (0,2 mg ml <sup>-1</sup> , 1:5000)
Peroxidase AffiniPure IgG Goat Anti-Rabbit (0,4 mg ml <sup>-1</sup> , 1:10000)
Qiagen, Hilden
Anti-Penta-His, <i>mouse, monoclonal</i> (0,2 mg ml <sup>-1</sup> , 1:5000)
Roche, Mannheim
Anti-Hämagglutinin (Anti-HA), <i>mouse, monoclonal</i> (0,2 mg ml <sup>-1</sup> , 1:5000)
Anti-GFP, <i>mouse, monoclonal</i> Antikörper (0,4 mg ml <sup>-1</sup> , 1:10000)
Santa Cruz
GFP (FL), <i>rabbit, polyclonal</i> (0,2 mg ml <sup>-1</sup> , 1:10000)
Anti-PfFNT C-terminus, <i>rabbit</i> ,
Chemikalien
AppliChem, Darmstadt

## Material

---

Natriumdodecylsulfat (SDS), Phosphoenolpyruvat (Kaliumsalz), Streptomycinsulfat (BioChemica), Tween® 20

Avanti Polar Lipids, Alabaster, USA

1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phospho-(1'-racglycerol) (DOPG), E. coli Extract Polar, Dodecylphosphocholin (DPC)

Becton Dickinson, Heidelberg

*Bacto™ Peptone, Bacto™ Yeast Extract, Dicfo™ Yeast Nitrogen Base w/o amino acids and ammonium sulfate*

Carl Roth, Karlsruhe

Ammoniumperoxodisulfat (APS,  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), Bromphenolblau (Natriumsalz), Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ), Ammoniumsulfat  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4, \geq 99,5 \%)$ , Dithiothreitol (DTT), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Ethanol ( $\geq 99,8 \%$ ), Glycerol ROTIPURAN® ( $\geq 99,5 \%$ , wasserfrei), Glycin, 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-yl]-ethansulfonsäure (HEPES), Isopropanol ( $\geq 99,8 \%$ ), Kaliumacetat, Kaliumchlorid (KCl), Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Kaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ), Kaliumhydroxid (KOH), LB-Agar (Lennox), LB-Medium (Lennox), L-Leucin, Lithiumacetat, 2-Mercaptoethanol, Milchpulver (blotting grade, fettarm), 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS, PUFFERAN®  $\geq 99,5 \%$ ), Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ), Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Natriumhydroxid (NaOH), Orange G, L-Prolin, Rotiphorese® Gel 40 (40 %, 29:1), Rotiphorese® Blau R (Konzentrat), ROTISZINT® eco plus LSC-Universalcocktail (ggf. NPE-freie Alternative), D(+)-Saccharose ( $\geq 99,5 \%$ ), Triton™ X-100, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)

Fluka Chemie, Buchs, Schweiz

L-Alanin, L-Glutamat (Kalium-Monohydratsalz), L-Serin

Genaxxon bioscience, Ulm

Ampicillin (Natriumsalz), Agarose LE, Bovine Albumin Fraktion V (pH 7,0) (bovine serum albumin, BSA), N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin (TEMED)

Hartmann Analytics GmbH

[1- $^{14}\text{C}$ ]-Natriumacetat, [1- $^{14}\text{C}$ ]-Natriumformiat, [1- $^{14}\text{C}$ ]-Natrium-L-Laktat, [1- $^{14}\text{C}$ ]-Natrium-Propionat

J.T. Baker, München

Essigsäure, Methanol (HPLC grade), Salzsäure

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

Ethidiumbromid

Peqlab, Erlangen

peqGOLD Protein Marker III und V (prestained)

Qiagen, Hilden

Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA)

Roche, Mannheim

cOmplete™-Proteaseinhibitor-Cocktail (EDTA-frei), Transfer-DNA aus E. coli MRE600 (E. coli tRNA)

Sigma Aldrich, München

Acetylphosphat (Lithium-Kaliumsalz), Adenosin-5'-triphosphat (ATP, Dinatriumsalz), L-Arginin (Hydrochloridsalz), L-Asparagin (Monohydrat), L-Aspartat (Natrium-Monohydratsalz), Brij® 78, L-Cystein, Cytidin-5'-triphosphat (CTP, Dinatriumsalz), Desoxyribonukleinsäure aus Lachssperma (SS-DNA, Natriumsalz), d-Desthiobiotin, Dimethylsulfoxid (DMSO,  $\geq 99,8 \%$ ), Folinsäure (Calciumsalz), G418 (Geneticin Disulfat), L-Glutamin, Guanosin-5'-triphosphat (GTP, Natriumsalz), L-Histidin (Hydrochlorid-Monohydratsalz), Imidazol, L-Isoleucin, L-Lysin (Hydrochloridsalz), Magnesiumacetat (Tetrahydratsalz), L-Methionin, Penicillin G

## Material

(Natriumsalz), L-Phenylalanin, Polyethylenglykol 3350, Polyethylenglykol 8000, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, Uridin-5'-triphosphat (UTP, Trinatriumsalz), L-Valin

Thermo Fisher Scientific, Schwerte

2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat (dATP, 100 mM), 2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat (dCTP, 100 mM), 2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat (dGTP, 100 mM), 2'-Desoxythmidin-5'-triphosphat (dTTP, 100 mM), Lambda-DNA, PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, RiboLock RNase-Inhibitor (40 U µl<sup>-1</sup>)

VWR Life Science

peqGOLD Protein Marker III und V

---

### Enzyme

---

Agilent Technologies, Waldbronn

*PfuTurbo* DNA-Polymerase (2,5 U µl<sup>-1</sup>), *Pfu reaction buffer* (10x)

Carl Roth, Karlsruhe

Zymolyase-20T (≥ 20 U mg<sup>-1</sup>)

Roche, Mannheim

*Pyruvatkinase from rabbit muscle* (10 mg ml<sup>-1</sup>, ca. 200 U mg<sup>-1</sup>)

Thermo Fisher Scientific, Schwerte

Restriktionsendonukleasen und Puffer, T4-DNA-Ligase (5 U µl<sup>-1</sup>) und Puffer

---

### Kits

---

Bio-Rad, München

*Clarity™ Western ECL Substrate*, *Quick Start™ Bradford Protein Assay*

Machery-Nagel, Düren

*NucleoBond® PC 500*

Promega, Mannheim

*Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System*

Süd-Laborbedarf, Gauting

*HiYield® PCR Clean-up/Gel Extraction*

---

### Verbrauchsmaterialien

---

Beckmann Coulter, Krefeld

Ultrazentrifugengefäß (1,5 ml, PP)

Ultrazentrifugengefäße (3-23 mml, PP, dünn- und dickwandig)

Bemis, Neenah, USA

*Parafilm® M*

Bio-Rad, München

*Poly-Prep® Chromatography Columns* (2 ml Säulenvolumen, 10 ml Reservoir)

Carl Roth, Karlsruhe

Dialyseschlauch *Visking®* (14k MWCO)

Kulturstopfen ROTILABO®, 32

Eydam, Kiel

Einmalspritzen *NORM-JECT®*

Fisher Scientific, Schwerte

*Slide-A-Lyzer® Dialysis Cassettes* (10k MWCO, 3 ml)

Formedium™, Norfolk, England

HL5 Medium without Glucose

GE Healthcare, Freiburg

*Amersham™ Hybond™ 0.45 PVDF Blotting Membran*, *Whatman® Grade 3 MM Chr Blotting Paper*

*Whatman™* Glasmikrofaserfilter ohne Binder GF/C

Hellma, Jena

Quarzküvette (10 mm)

Henke-Sass Wolf, Tuttlingen

Einmalkanülen (21G, 0,8 x 40 mm)

## Material

---

Merck, Darmstadt

Zentrifugierfiltereinheiten *Amicon® Ultra-4, Ultra-15* (je *Ultracel-100* und *Ultracel-30*)

Sarstedt, Nümbrecht

Mikroreagiergefäße, PCR-Reagiergefäß *Multiply®-Pro* (0,2 ml, PP), PCR-Streifen (8-*strip opt. clear flat caps*), Pipettenspitzen, Petrischale (steril, Polystyrol, (ØxH) 92x16mm), Polystyrol-Küvetten (10 x 4 x 45 mm), Reagenz- und Zentrifugenröhrchen, Serologische Pipetten, Sterilfilter *Filtropur S* (Ø 0,2 µm und 0,45 µm)

Schott Instruments, Mainz

Glasbehälter und -kolben

Sigma Aldrich, München

Glaskügelchen, (säuregewaschen, Ø 425–600 µm)

Simport Scientific, Beloeil, Kanada

Szintillations-Flaschen Snaptwist®

---

## 2.4 Nährmedien und Lösungen

### 2.4.1 Allgemein proteinchemische Methoden

#### Molekularbiologische Methoden:

Agarosegelelektrophorese von DNA:

<b>TAE-Puffer</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Probenpuffer</b>	<b>Konzentration</b>
TRIS-Acetat, pH 8,0	40 mM	<i>Orange G</i>	0,4 %
EDTA	1 mM	Glycerol	30 %

<b>Ethidiumbromid (10 mg ml<sup>-1</sup>)</b>	<b>Menge</b>
Ethidiumbromid	1 Tabl.
<i>Aqua bidest.</i>	10 ml

#### SDS-PAGE, Western Blot und Proteinfärbung:

SDS-PAGE-Puffer:

<b>Trenngelpuffer (4x)</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Sammelgelpuffer (4x)</b>	<b>Konzentration</b>
TRIS-HCl, pH 8,8	1,5 M	TRIS-HCl, pH 6,8	0,5 M
SDS	0,4 %	SDS	0,4 %

<b>APS (10 %)</b>	<b>Menge</b>	<b>Elektrodenpuffer</b>	<b>Konzentration</b>
Ammoniumpersulfat	5 g	TRIS-HCl pH 8,2-8,6	2,5 mM
Ad 50 ml <i>Aqua bidest.</i>		Glycin	19,2 mM
		SDS	0,1 %

<b>SDS-Ladepuffer (4x)</b>	<b>Konzentration</b>
TRIS-HCl pH 6,8	250 mM
Glycerol	40 %
Bromphenolblau	0,02 %
SDS	8 %
DTT	400 mM

## Material

### Western Blot:

<b>Transferpuffer (5X)</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Transferpuffer</b>	<b>Menge</b>
TRIS-HCl pH 8,3	12,5 mM	Transferpuffer (5x)	10 ml
Glycin	96 mM	Methanol	10 ml
SDS	0,2 %	Ad 50 ml <i>Aqua bidest.</i>	
<b>TBS (10x)</b>	<b>Konzentration</b>	<b>TBST</b>	<b>Menge</b>
TRIS-HCl pH 7,6	0,2 M	TBS (10x)	100 ml
NaCl	1,35 M	Tween® 20	1 ml
Ad 1 L <i>Aqua bidest.</i>		Ad 1 L mit <i>Aqua bidest.</i>	
		<b>MTBST</b>	<b>Menge</b>
		Magermilchpulver	1,2 g
		Ad 40 ml TBST	

### Proteinfärbung:

<b>Ponceau S Färbelösung</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Coomassie-Färbelösung</b>	<b>Konzentration</b>
Ponceau S	0,1 % (w/v)	Rotiphorese® Blau R	600 ml
Essigsäure	5 % (v/v)	Konzentrat	
<i>Aqua bidest.</i>	ad 500 ml	<i>Aqua bidest.</i>	ad 1000 ml

## 2.4.2 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

Die Nährmedien wurden nach der Herstellung direkt autoklaviert. Zusätze wie Antibiotika zur Selektion oder Aminosäuren wurden erst nach dem Abkühlen zugefügt.

### Nährmedien für *E. coli*:

<b>LB-Medium</b>	<b>Menge</b>	<b>LB-Agarplatten</b>	<b>Menge</b>
LB	20 g	LB-Agar	35 g
<i>Aqua bidest.</i>	1 L	<i>Aqua bidest.</i>	1 L

Als Selektionsmarker wurden ggf. 100 µg ml<sup>-1</sup> Ampicillin oder Kanamycin hinzugegeben.

### Nährmedien für *S. cerevisiae*:

<b>YPD-Medium</b>	<b>Menge</b>	<b>SD-Medium</b>	<b>Menge</b>
Pepton	20 g	YNP	1,7 g
Hefeextrakt	10 g	Ammoniumsulfat	5 g
Glukose	20 g	Glukose	20 g
<i>Aqua bidest.</i>	1 L	Ad 1 L <i>Aqua bidest</i> pH 5,6 mit NaOH	

<b>SD-AHLW</b>	<b>Konzentration</b>
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-Medium pH 5,6	ad 1 L

Für die Herstellung von Agarplatten wurden 20 g Agar vor dem Autoklavieren hinzugegeben.

## Material

### Nährmedien für *D. discoideum*:

<b>HL5-Medium</b>	<b>Menge</b>	<b>HL5-Selektionsmedium</b>	<b>Menge</b>
HL5	11 g	HL5-Medium	0,5 L
Aqua <i>bidest.</i>	0,5 L	G418	1 % (v/v)
Glukose	1 % (m/v)		
Pen/Strep	1 % (v/v)		

Das HL5-Medium wurde nach dem Lösen der Fertigmischung direkt autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurden die entsprechende Menge 10 %-ige Glukoselösungen sowie die Antibiotika hinzugegeben. Die Glukoselösung wurde separat autoklaviert.

### Lösungen für *S. cerevisiae*:

<b>TRIS/HCl/EDTA-Puffer</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Phosphatpuffer</b>	<b>Konzentration</b>
TRIS-HCl pH 7,5	25 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 8,0	100 mM
Na <sub>2</sub> -EDTA	5 mM	NaCl	50 mM

Die Puffer wurden nach der Einstellung des pH-Wertes autoklaviert.

### Lösungen für <sup>14</sup>C-Transportassay:

#### **Messpuffer**

Puffersubstanz (jeweils 50 mM)	pH-Werte
HEPES, TRIS	6,8
MES/TRIS	5,8;
Zitronensäure/TRIS	2,8; 3,8; 4,8;

<b>Substratlösungen (10x)</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Substratlösung (5x)</b>	<b>Konzentration</b>
Substrat		10X Substratlösung	5 mM
Na-Formiat	50 mM	<i>Aqua bidest.</i>	ad 20 µl pro Probe
Na-Acetat	50 mM	<sup>14</sup> C-markiertes Substrat	0,04 – 0,08 µCi pro Probe
Na-L-Laktat	50 mM		

In einigen Experimenten wurde der Substratgradient der *gespikten* 5x-Substratlösung sowie die Gesamtaktivität variiert. Die <sup>14</sup>C-markierten Ausgangslösungen enthielten eine Aktivität von 0,1 mCi ml<sup>-1</sup> oder wurden 1:10 auf diese verdünnt.

### Lösungen für Lichtstreuungsassay:

<b>MOPS-Puffer</b>	<b>Konzentration</b>	<b>HEPES/TRIS-Puffer</b>	<b>Konzentration</b>
MOPS pH 7,2	10 – 50 mM	HEPES/TRIS pH 7,2	10 mM
NaCl	0 – 50 mM	KCl	20 mM
CaCl <sub>2</sub>	0 – 5 mM	D-Saccharose	250 mM
D-Saccharose	0 – 1,8 M		
	<b>Konzentration</b>		
<b>HEPES-Puffer</b>			
HEPES-KOH pH 5,8 – 6,8	20 mM		

## Material

Alle Lösungen für den Lichtstreuungsassay wurden filtriert ( $\varnothing$  0,2  $\mu$ m) und ggf. autoklaviert. Jeweilige Zusätze sind dem Methodenteil zu entnehmen.

Lösungen für *D. discoideum*:

Transformation:

Funktionelle Charakterisierung in *D. discoideum*:

Elektroporationspuffer:

Lösungen für  $^{14}$ CTransportassay:

<b>H50 Puffer</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Puffer A</b>	<b>Konzentration</b>
HEPES pH 7,0	20 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	67 mM
KCl	50 mM	autoklavieren	
NaCl	10 mM	<b>Puffer B</b>	<b>Menge</b>
MgSO <sub>4</sub>	1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	84 mM
NaHCO <sub>3</sub>	5 mM	autoklavieren	
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,3 mM	<b>Sörensen-Phosphat-Puffer</b>	

autoklavieren

Puffer A

**Menge**

x ml

Puffer B

x ml

$\Sigma$  1000 ml oder runterskaliert

Der Sörensen-Phosphat-Puffer pH = 6,5 wurde für Wasch- und Resuspensionsschritte bei der Gewinnung von *D. discoideum*-Zell-Lysaten für die Western Blot Analytik genutzt. Puffer A und Puffer B wurden je nach gewünschtem pH-Wert in einem definierten vorgegebenen Verhältnis gemischt. Die Wahl der Lösungen und Nährmedien für die Arbeit mit *D. discoideum* erfolgte in Anlehnung an [dictybase.org](http://dictybase.org).

### 2.4.3 Lösungen für zellfreie Proteinsynthese

Herstellung S30-Extrakt:

Die Aminosäurelösung und der Phosphatpuffer für das YPTG-Medium wurden nach Zusammengabe in einem 5 L Bioreaktor autoklaviert. Alle anderen hier aufgeführten Lösungen wurden filtriert ( $\varnothing$  0,2  $\mu$ m).

Nährmedien Fermenterkultur:

<b>YPTG-Aminosäuren</b>	<b>Menge</b>	<b>YPTG-Glukose</b>	<b>Menge</b>
Bactotrypton	80 g	Glukose-Monohydrat	99 g
Bacto-Yeast-Extract	50 g	Ad 200 ml Aqua bidest.	
NaCl	25 g		
Ad 4,5 L Aqua bidest.		<b>YPTG-Phosphatpuffer, pH 7,6</b>	
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	14,95 g
		K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	45,65 g
		Ad 250 ml Aqua bidest.	

## Material

Isolierung ribosomaler S30-Extrakt:

<b>S30-Puffer A/B (50X)</b>	<b>Konzentration</b>	<b>S30-Puffer C (50x)</b>	<b>Konzentration</b>
TRIS pH 8,2	500 mM	TRIS pH 8,2	500 mM
Kaliumchlorid	30 mM	Kaliumacetat	30 mM
Magnesiumacetat	700 mM	Magnesiumacetat	700 mM

Puffer A, B und C wurden durch 50x-Verdünnung mit *Aqua bidest.* erhalten. Puffer A wurde frisch 0,042%  $\beta$ -Mercaptoethanol zugegeben. Puffer B wurde 0,05 % (2M) DTT und Puffer C wurde 0,025 % (2M) DTT kurz vor der Verwendung zugegeben.

Lösungen:

<b>NaCl (10x)</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	4 M
Ad 10 ml <i>Aqua bidest.</i>	

Zellfreie Proteinsynthese:

<b>S30-Puffer</b>	<b>Konzentration</b>	<b>HEPES/EDTA-Puffer (24x)</b>	<b>Konzentration</b>
TRIS-HCl pH 8,2	10 mM	HEPES pH 8,0	2,4 M
Kaliumchlorid	0,6 mM	EDTA	20 mM
Magnesiumacetat	14 mM	filtrieren $\varnothing$ 0,2 $\mu$ m	
filtrieren $\varnothing$ 0,2 $\mu$ m		Lagerung $-20^{\circ}\text{C}$	
Lagerung $4^{\circ}\text{C}$			
<b>cOmplete™ (50x)</b>	<b>Menge</b>	<b>NTP-Mix (75x)</b>	<b>Konzentration</b>
cOmplete™	1 Minitablette	ATP	90 mM
<i>Aqua bidest.</i>	1 ml	GTP, CTP, UTP	Je 60 mM
Lagerung $-20^{\circ}\text{C}$		pH 7,0	
		filtrieren $\varnothing$ 0,2 $\mu$ m	
		Lagerung $-20^{\circ}\text{C}$	

### **Aminosäure-Mix (50x)**

Je 4 mM L-Arginin, L-Asparagin, L-Alanin, L-Aspartat, L-Cystein, L-Glutamat, L-Glutamin, Glycin, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Leucin, L-Lysin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Threonin, L-Tryptophan, L-Tyrosin, L-Valin

Lagerung  $-20^{\circ}\text{C}$

### **RCWMDE**

Je 16,7 mM L-Arginin, L-Cystein, L-Tryptophan, L-Methionin, L-Asparagin, L-Glutamin

Lagerung  $-20^{\circ}\text{C}$

## Material

### Weitere Lösungen:

	Konzentration		Konzentration
tRNA E. coli (40x)	40 mg/ml	Pyruvatkinase	10 mg/ml
AcP pH 7,0	1000 mM	PEP pH 7,0	1000 mM
Folsäure	19,6 mM	DTT	500 mM
Magnesiumacetat	1000 mM	Kaliumacetat	4000 mM
PEG 8000	40 % (m/v)	NaN <sub>3</sub>	10 % (m/v)

Alle Lösungen wurden in *Aqua bidest.* gelöst und insofern möglich filtriert ( $\varnothing$  0,2  $\mu$ m). Alle: Lagerung  $-20^{\circ}\text{C}$

### Proteinreinigung und Nanodisc-Assemblierung:

Um die Temperaturabhängigkeit des pH-Wertes eines TRIS-Puffers zu berücksichtigen, wurde dieser bei Raumtemperatur auf pH = 7,4 eingestellt, sodass sich bei einer Arbeitstemperatur von  $4^{\circ}\text{C}$  ein pH-Wert von 8,0 ergab (Newby *et al.*, 2009).

Proteinreinigung:

TRIS-Puffer	Konzentration
TRIS-HCl pH 7,4 – 8,9	10 – 40 mM
NaCl	100 – 300 mM
(Brij <sup>®</sup> 78	0,05 %)

Die Puffer wurden nach der Einstellung des pH-Wertes filtriert ( $\varnothing$  0,2  $\mu$ m). Zusätze für die jeweilige Verwendung sind dem Methodenteil zu entnehmen. Für die Reinigung an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose wurde Imidazol bis 500 mM zugegeben.

ND-Assemblierung:

Stocklösungen ND	Konzentration
DOPG	50 mM
DPC	10 %

PBS-Puffer:

Substanz	Konzentration
Dinatriumhydrogenphosphat pH 7,4	12 mM
NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
autoklavieren	

## Lösungen für die funktionelle Charakterisierung des zellfrei hergestellten Proteins:

Herstellung Proteoliposomen:

Liposomenpuffer	Konzentration
HEPES-KOH pH 6,8	20 mM
filtrieren Ø 0,2 µm	
β-Mercaptoethanol,	2 mM
frisch zugegeben	

Lösungen für Lichtstreuungsassay mit Proteoliposomen:

Substratpuffer	
HEPES-KOH pH 5,9-6,8	20 mM
Substrat (Na-Formiat oder Na-Acetat)	100 – 200 mM
filtrieren Ø 0,2 µm	

## 2.5 Geräte und Software

Geräte				
Agarosegelelektrophorese und Dokumentation				
				IDA Image Documentation & Analysis
				Raytest, Straubenhardt
				Mikrowelle NN-E245W
				Panasonic, Wiesbaden
				Netzgerät EPS 300
				Pharmacia Biotech, Dübendorf, Schweiz
				UV-Transilluminator
				Herolab, Wiesloch
Brutschränke & temperierbare Geräte				
				Brutschrank <i>Kelvitron® T</i>
				Heraeus, Hanau
				Brutschrank <i>Minitron</i>
				Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
				Heizblock <i>DRI-BLOCK DB-20</i>
				Techne, Cambridge, UK
				Biometra TRIO
				Analytik Jena GmbH & Co. KG, Jena
Größenausschlusschromatographie (SEC):				
				GE Healthcare, Freiburg
				SEC-System ÄKTApurifier, Flow-cell 10 mm, Fraktionssammler FRAC-950, Kontrolleinheit U-950, Detektor UV-900, Mischeinheit M-925, Pumpe P903, Ventil INV-907, Säule Superdex™ 200 10/300 GL
Isotopenlabor				
	Tri-Carb	2900TR	Liquid Szintillation	Packard Instrument Company Inc., Downers Grove, USA
	Analyzer			
Kühlschränke				
	Innovs U535	Ultratiefkühlschrank		New Brunswick Scientific GmbH, Edison, USA
	Li			
Mikroskope				
	Olympus IX50			Olympus, Nikkei, Japan
	Olympus IMT-2 (mit Canon-Kamera9			Olympus, Nikkei, Japan

## Material

ZEISS LSM 900 Axio Observer 7 invers Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy, DE
Mischer und Schüttler:	
Kolben-Orbitalschüttler <i>Certomat® MO II</i>	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer <i>IKAMAG RET-GS</i>	IKA®-Werke, Staufen
Magnetrührer <i>Variomag mono</i>	Variomag-USA, Daytona Beach, USA
Rotationsmischer für Reagenzgläser <i>TC-7</i>	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Rotator-Mixer <i>Grant-bio PTR-30</i>	Grant Instruments, Shepreth, UK
<i>Vortex-Genie 2</i>	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wippschüttler <i>WS 10</i>	Edmund Bühler, Hechingen
S30-Extrakt-Produktion/ Zellaufschluss	
<i>BIOSTAT® A plus</i>	Sartorius, Göttingen
<i>French Press cell disrupter FA-078</i>	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Wasserbad 183	GFL, Burgwedel
SDS-PAGE & Western Blot:	
Gelgießstand und Laufkammer	Peqlab, Erlangen
<i>Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell</i>	Bio-Rad, München
<i>Lumi Imager™ F1</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>ECL Chemostar</i>	Intas Science Imaging, Göttingen
Stopped-Flow-Apparatur:	Jasco, Groß-Umstadt
Küvette <i>FC-15/7.5</i> , Mischeinheit <i>SFM-2000</i> , Monochromator <i>BH-10-61 UV</i> , <i>MPS 70/2 microcompressor unit</i> , <i>PCI connector block 6221</i> , <i>Photomultiplier PMS 250</i> , Spannungsquelle <i>ALX 250</i> , UV/Vis- und Fluoreszenzspektrometer <i>MOS-200</i>	
Waagen	
Semimikrowaage Analysenwaage Sartorius Research R 200 D	Sartorius, Göttingen
Semimikrowaage Analysenwaage Cubis® MCA225S-2S00-U	Sartorius, Göttingen
Präzisionswaage PB3002-S Delta Ranger	Mettler-Toledo, Gießen
Werkbänke	
Heraguard Reinluftwerkbank	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Herasafe Biologische Sicherheitswerkbank Klasse 2 Typ H	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Zellfreie Proteinsynthese	
Zellfrei Reaktionskammer Präparativ	Beitz Lab, CAU Kiel
Zentrifugen	
<i>Ultrazentrifuge Optima™XL-80K</i>	Beckman Coulter, Krefeld
<i>Ultrazentrifugen-Rotor 50.2 Ti</i>	Beckman Coulter, Krefeld
<i>Ultrazentrifugen-Rotor SW 60</i>	Beckman Coulter, Krefeld
<i>Multifuge 1S-R Centrifuge</i>	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5420	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5424 R	Eppendorf, Hamburg
Sonstiges	
<i>BioPhotometer</i>	Eppendorf, Hamburg
<i>Digital-pH-Meter Lab850</i>	Schott Instruments, Mainz
<i>pH Elektrode Blue Line 12 pH</i>	SI-Analytics, Weilheim
<i>Gene Pulser® II Electroporation System</i>	Bio-Rad München
Einzelkanalpipetten	Gilson, Middleton, US
Pipettierhilfe <i>accu-jet® pro</i>	Brand, Wertheim

Wasserbad  
ELGA PURELAB® flex

Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel  
Veolia Water Technologies Deutschland  
GmbH, Celle

---

**Software**

---

<i>Bio-Kine Version 4.74.2</i>	BioLogic, Claix, Frankreich
<i>BioPAT® MCFS/DA Version 3.0</i>	Sartorius, Göttingen
<i>ChemDraw</i>	Revvity Signals, (früher PerkinElmer), Waltham, US
<i>Chimera Version 1.15</i>	UCSF Chimera, San Francisco, US
<i>GraphPad Prism Version 10.1.1</i>	GrapPad Software, Boston, US
<i>Lasergene 7.2.1</i>	DNASTAR®
<i>Microsoft Office Version 16.8 für MacOS</i>	Microsoft Corporation, Redmond, WA, US
<i>MoleculeSketch</i>	Stefan Dolder
<i>Photoshop® Elements 11.0</i>	Adobe Systems INC.
<i>PyMOL Molecular Graphics System Version 2.5.1</i>	Schrödinger, INC., New York, US
<i>SigmaPlot for Windows Version 11.0</i>	Systat Software, Erkrath
<i>SnapGene Viewer Version 5.1.5</i>	Insightful Sciene, GSL Biotech, San Diego, CA, US
<i>T<sub>E</sub>Xtopo, T<sub>E</sub>Xshade</i>	Prof. Dr. Eric Beitz
<i>Tsview 7</i>	Tucsen Photonics Co., Ltd, Fuzhou, China
<i>ZEN 3.2 blue edition</i>	Zeiss microscopy, DE

### 3 Methoden

#### 3.1 Molekularbiologische Methoden

##### 3.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* mit der Calciumchlorid-Methode wurde durch Anna Fuchs durchgeführt (Cohen *et al.*, 1972). *E. coli* des DH5 $\alpha$ -Stammes wurden über Nacht auf einer LB-Platte bei 37 °C inkubiert. Am Folgetag wurde eine Kolonie in 5 ml LB-Medium bei 37 °C und 200 U min<sup>-1</sup> inokuliert und am Abend zum Animpfen einer Hauptkultur genutzt. 4 ml Vorkultur wurden mit 100 ml frischem Medium über Nacht bei 20 °C und 200 U min<sup>-1</sup> kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen beim Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,4 bis 0,6 für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 2.000 g für 10 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet 2x mit 30 ml eisgekühlter 0,1 M Calciumchlorid-Lösung versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss vorsichtig resuspendiert und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen bei 2000 g und 4 °C für 10 min geerntet. Nach zweimaligem Waschen wurde das Zellpellet mit 10 ml 0,1 M kalter Calciumchlorid-Lösung mit 20 % Glycerol-Zusatz resuspendiert und 4 h auf Eis inkubiert. Die 50 bis 100  $\mu$ l Aliquots wurden bei -80 °C gelagert.

##### 3.1.2 Plasmid-Isolation

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurde ein transformierter *E. coli* Klon vom Stamm DH5 $\alpha$  am Vorabend in 5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum versetzt und über Nacht bei 37 °C rotierend bei 6 U min<sup>-1</sup> inokuliert. Diese Kultur wurde am Folgetag geerntet und nach Angaben des Herstellers mit dem *Kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification* aufgearbeitet. Die DNA wurde nach der Isolation mit einem Ethanolhaltigen Waschpuffer gewaschen und mit 50  $\mu$ l doppelt destilliertem autoklaviertem Wasser eluiert. Abweichend von den Herstellerangaben wurde auf die Zugabe von *Alkaline Protease Solution* verzichtet. Reinheit und Gehalt wurden im Anschluss bestimmt (3.1.3).

##### 3.1.3 Bestimmung von Reinheit und Gehalt der Plasmid-DNA

Zur Reinheits- und Gehaltsbestimmung der präparierten Plasmid-DNA wurde die Präparation (3.1.2) mit *Aqua bidest.* verdünnt und nach vorherigem Abzug eines *Blank*-Wertes in einer Quarzküvette am *BioPhotometer* vermessen. Da Nukleinsäuren bei 260 nm ein Absorptionsmaximum aufweisen, wurde dies für die Bestimmung der Konzentration herangezogen. Proteine mit aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan und Histidin absorbieren bei 280 nm. Es wurde das Verhältnis der Absorptionen von 260 nm zu 280 nm als kritischer Parameter für die Reinheit herangezogen. Ziel war ein Verhältnis von 1,8 bis 2,0. Zur Berechnung der DNA-Konzentration wurde folgende Formel verwendet:

$$c \text{ (}\mu\text{g ml}^{-1}\text{)} = A_{260} * 50 \text{ (}\mu\text{g * ml}^{-1}\text{)} * VF \quad (\text{Formel 3.1})$$

c: Konzentration doppelsträngiger DNA

A: Absorption  $\lambda$ = 260 nm

VF: Verdünnungsfaktor

##### 3.1.4 Restriktionsverdau doppelsträngiger DNA

Im Rahmen der Klonierung (siehe Tabelle 3.1) oder der Prüfung auf Inserts wurde sich die Anwesenheit einiger Sequenzen, die für bestimmte Restriktionsnukleasen codieren, im

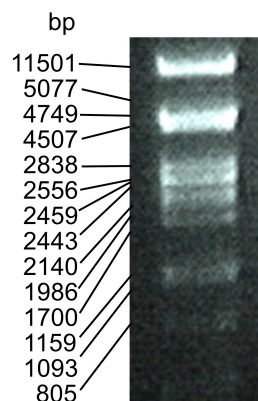
Plasmid zunutze gemacht. Hierzu wurden 1000 ng DNA mit 5 Units vom jeweiligen Restriktionsenzym sowie dem nach Herstellerangaben passenden Reaktionspuffer und ggf. doppelt destilliertem Wasser verdünnt, sodass ein Gesamtreaktionsvolumen von 10 µl vorlag, das für mind. 1 h bei 37 °C inkubiert wurde. Die Restriktionsendonukleasen verdauen die doppelsträngige DNA so, dass Fragmente mit einem Phosphat-Rest am 5'-Ende und einer Hydroxylgruppe am 3'-Ende entstehen (Pingoud & Jeltsch, 2001). Die Restriktionsenzyme wurden in Anhängigkeit zum Konstrukt gewählt.

**Tabelle 3.1:** Zusammensetzung Restriktionsverdau.

Reagenz	präparativ	analytisch
Ausgangs-DNA	entsprechend 1000 ng	Entsprechend 400 ng
Reaktionspuffer (10x)	1 µl	1 µl
Restriktionsendonuklease 1	1 µl	(jeweils) 0,2 µl
Restriktionsendonuklease 2	1 µl	
Autoklaviertes <i>Aqua bidest.</i>	ad 10 µl	Ad 10 µl

### 3.1.5 Gelelektrophorese

Die verdaute und linearisierte DNA (3.1.4) wurde dann mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Reaktionsansatz wurde mit 1 µl *OrangeG* (10x) Ladepuffer versehen und auf ein mit Ethidiumbromid versehenes 1% Agarosegel gegeben. Es wurde 0,5 g Agarose eingewogen und unter Aufkochen in 50 ml TAE-Puffer gelöst und in einem flachen Gelschlitten mit Taschenkämmen aushärten gelassen. In Anhängigkeit der erwarteten Bandengrößen variierte die Gelkonzentration, um eine bessere Auftrennung der Fragmente zu erreichen. Zusätzlich wurde ein λ-Pst-I-Marker zur Größenerkennung aufgetragen (**Abbildung 3.1**). Pro Tasche wurden 10 bis 20 µl aufgetragen. Zur Kontrolle der Linearisierung wurde unverdautes Plasmid aufgetragen. Das Gel wurde für 20 bis 30 Minuten bei 120 V und 400 mA laufen gelassen wobei die DNA-Fragmente abhängig von ihrer Größe und angetrieben von ihrer negativen Ladung von der Anode zur Kathode wanderten. Im Anschluss wurde der Gelträger auf einen UV-Tisch überführt, wo bei 366 nm die mit dem Ethidiumbromid interkalierten Banden sichtbar gemacht wurden und ggf. aus dem Gel für die weitere Verwendung ausgeschnitten wurden. Es wurde darauf geachtet, die Dauer der UV-Bestrahlung auf ein Minimum zu reduzieren.



**Abbildung 3.1:** Größenmarker: Mit *Pst* / verdaute λ-DNA (in 1%-igem Agarosegel)

### 3.1.6 Gelextraktion und PCR Clean up

Das extrahierte Gelstück (3.1.5) wurde nach Anweisung des Herstellers *Gel Extraction* mit dem *Hi Yield® Gel/PCR DNA-Fragment Extraction Kit* aufbereitet. Die aus den Agarosegelstückchen isolierte DNA wurde mit 20 µl *Aqua bidest.* eluiert. PCR-Produkte wurden mit demselben *Kit* nach Angaben des Herstellers nach *PCR Clean up* aufgereinigt.

### 3.1.7 Ligation

Nach der Extraktion der entsprechen DNA-Fragmente (3.1.6) wurden diese im Rahmen der Klonierung weiterverwendet. Hierzu wurden *Insert*-Fragment und *Vektor*-Fragment im Verhältnis 5:3 und 7:1 gemischt und mit 1 µl 10x Ligationspuffer sowie 1 µl T4-DNA-Ligase versetzt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

### 3.1.8 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*

Die Regeneration und Vervielfältigung des neu erhaltenen Plasmids erfolgt durch *E. coli* vom Stamm DH5α. Der Ligationsansatz (3.1.7) wurde vollständig auf ein Aliquot von 50 bis 100 µl chemisch kompetenter *E. coli* direkt nach dem Auftauen auf Eis gegeben. Dieser Transformationsmix wurde für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 bis 60 s. Nach zweiminütigem Abkühlen auf Eis wurden 0,9 ml LB-Medium zu dem Ansatz gegeben und für 45 bis 60 min bei 37 °C und 6 U min<sup>-1</sup> inkubiert. Die Zellen wurden für 10 s bei 13.000 g herunterzentrifugiert und in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Hiervon wurden 50 bis 100 µl auf eine LB-Platte mit entsprechendem Selektions-Antibiotikum ausplattiert. Am Folgetag konnte dann das vervielfältigte Plasmid (3.1.2) isoliert werden.

Zur Schnelltransformation chemisch kompetenter *E. coli* (3.1.1) (50 bis 100 µl) wurde aufgearbeitete Plasmid-DNA eingesetzt. Die chemisch kompetenten Zellen wurden abhängig von der Konzentration der Präparation mit 0,5 bis 1 µl DNA versetzt und mindestens 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Teil dieser Zellen (40 µl) auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert.

### 3.1.9 Sanger-Sequenzierung

Um den Erfolg einer PCR-vermittelten Mutagenese (3.1.11) oder das Vorliegen des richtigen Ausgangsgens zu überprüfen wurde nach vorangegangener Restriktionsverdau, der das Vorliegen eines Inserts bestätigte, eine Sequenzierung nach Sanger (*Sanger et al.*, 1977) durchgeführt. Die Sequenzierung wurde hier durch das Institut für Klinische Molekularbiologie der CAU in Kiel durchgeführt. Hierzu wurden 3 µl Plasmid-DNA mit 1 µl Sequenzierprimer (4,8 mM) versetzt. Die Sequenzierung dort erfolgte mithilfe eines Sequenziergerätes (Applied Biosystems™ 3730xl DNA Analyzer, Thermo Fisher Scientific). Das Prinzip der Sequenzierung nach Sanger beruht auf einer Kettenabbruchmethode bei der der Einbau von 2',3'-Dideoxyribonukleosid-5'-triphosphaten zum Abbruch der Amplifikation eines DNA-Abschnittes in einer PCR führt. Die ddNTPS geben durch Fluoreszenzmarkierung bei anschließender Kapillarelektrophorese Auskunft über die Position der DNA-Base. Die Ergebnisse wurden mithilfe von *VM-Lasergene* mit den Programmen *SeqBilder* und *SeqMan* ausgewertet.

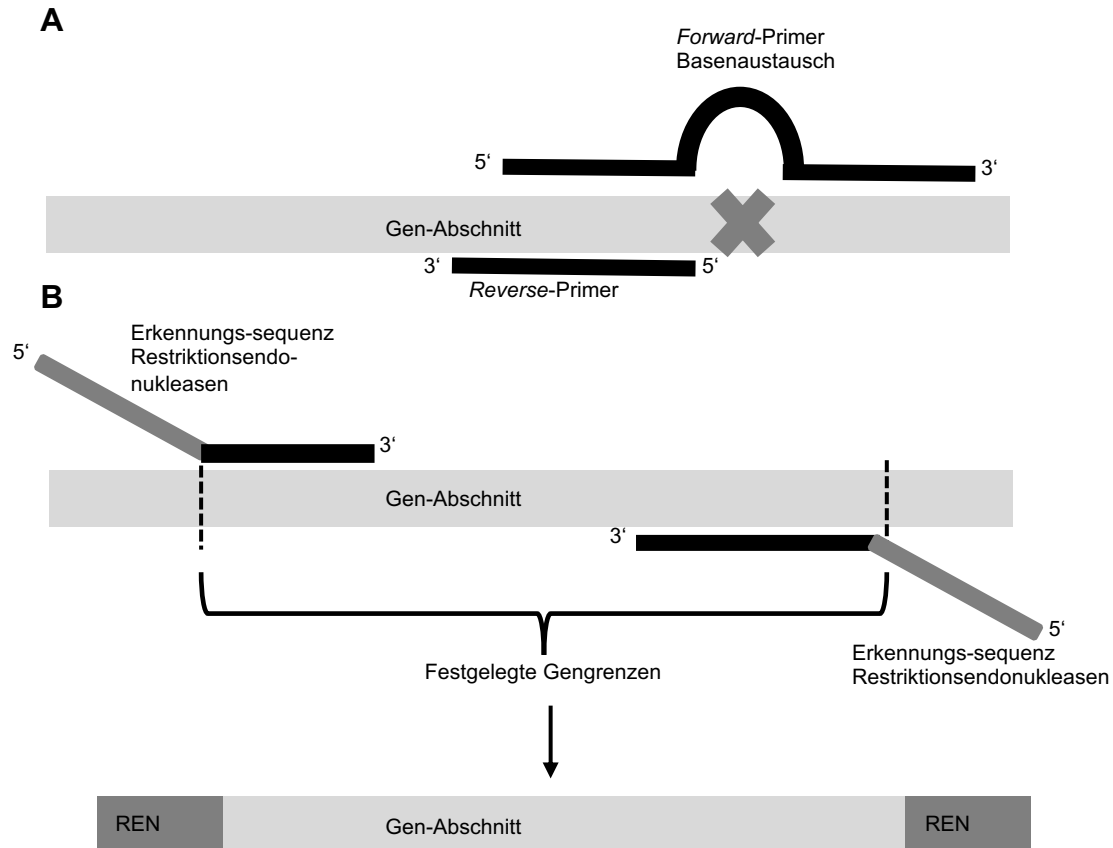
### 3.1.10 Dauerkulturen von *E. coli*

Zur Sicherung und längeren Lagerung von Plasmiden wurden Dauerkulturen von transformierten und mittels Sanger-Sequenzierung überprüften *E. coli*-Klonen angelegt. Hierfür wurde ein Klon über Nacht in LB-Medium mit entsprechendem Selektionsmarker, meist Ampicillin oder Kanamycin, über Nacht bei 37°C und 6 U min<sup>-1</sup> inkubiert. Am nächsten Tag

wurden 0,5 ml dieser Kultur mit 0,5 ml autoklaviertem Glycerol 80 % versetzt, vermischt und bei –80 °C gelagert.

### 3.1.11 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen oder Gen-Verkürzungen wurden verschiedene PCR-Methoden angewandt. Im Falle einer Punkt-Mutation wurde ein Primer-Paar zur Einführung dieser so gewählt, dass der Primer, der vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende komplementär läuft, die gewünschte veränderte Basenfolge einbringt, während der *reverse* Primer vom 3'-Ende aus gesehen komplementär bindet und stromaufwärts der Mutation ansetzt (Abbildung 3.2 oben). Für Genverkürzungen verliefen die Primer an den neuen gewünschten Gengrenzen komplementär und wiesen ein überraschendes Ende auf, dass neue Erkennungssequenzen für Restriktionsnukleasen an die Enden des neuen Genabschnitts einbrachte, um diesen später in das gewünschte Plasmid zu klonieren (Abbildung 3.2 unten). Für die Amplifikation des gewünschten Plasmides oder Gen-Abschnittes wurde die *Pfu Turbo AD-DNA-Polymerase* eingesetzt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist **Tabelle 3.2** zu entnehmen. Die Parameter Temperatur und Zeit des PCR-Programmes wurde entsprechend der *annealing*-Temperaturen der *Primer* (Formel 3.2) sowie der notwendigen Elongationszeiten für das jeweilige Plasmid oder den jeweiligen Gen-Abschnitt gewählt (**Tabelle 3.3**). Im Anschluss der PCR erfolgte ein *Dpn I* Verdau für mind. 4 h bei 37 °C. Die Restriktionsnuklease schneidet nur methylierte Erkennungssequenzen, sodass sichergestellt wurde, dass das gesamte Ausgangs-Plasmid (*template*) verdaut wird, jedoch nicht das PCR-Produkt. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produktes mithilfe des *Hi Yield® Gel/PCR DNA-Fragment Extraction Kit*. Hier wurde dem Protokoll *PCR Clean up* des Herstellers gefolgt. Das aufgereinigte Plasmid wurde mit 20 µl autoklaviertem *Aqua bidest.* eluiert und direkt zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli* genutzt (3.1.8). Einzelne Kolonien wurden zur Plasmidgewinnung kultiviert (3.1.2). Das isolierte Plasmid wurde mittels Sanger-Sequenzierung auf die erfolgreiche Mutagenese überprüft (3.1.9). Für die Verkürzung eines Gens folgte im Anschluss an die Aufreinigung (3.1.6) ein Verdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen (3.1.4) sowie eine Aufreinigung mittels eines Agarose-Gels und einer darauffolgenden Gelextraktion (3.1.5 und 3.1.6). Im Anschluss wurde das verdaut und aufgereinigte Gen-Fragment in einen mit passenden Restriktionsnukleasen verdauten Vektor ligiert (3.1.7) und anschließend zu Transformation von *E. coli* verwendet (3.1.8). Das Plasmid wurde aus einzelnen Kolonien isoliert (3.1.2) und mittels Sanger-Sequenzierung (3.1.9) überprüft.



**Abbildung 3.2:** Ortsgerichtete Mutagenese. (A) Primerdesign für den Austausch einzelner DNA-Basen. (B) Primerdesign für das Einfügen von Erkennungssequenzen zum Einfügen von Schnittstellen oder zur Gen-Verkürzung.

**Tabelle 3.2:** Zusammensetzung PCR-Ansatz

Reagenz	Volumen
Ausgangs-DNA	x µl (entsprechend 130 ng, je nach Konzentration)
10x <i>Pfu Turbo AD</i> -Puffer (10x)	5 µl
dNTPs (2,5 mM)	4 µl
Primer (25µM)	je 1,5 µl
100 % DMSO	1,5 µl
dd H <sub>2</sub> O	ad 50 µl
<i>Pfu Turbo AD</i> DNA-Polymerase	0,8 µl

$$T_M = 60 + 41 * GC - \text{Gehalt} (\%) - \frac{600}{n} \quad (\text{Formel 3.2})$$

$T_M$ : annealing-Temperatur in °C

GC-Gehalt (%): Anteil von Guanosin und Cytosin an der Primer-Sequenz in %

n: Anzahl der Basen

**Tabelle 3.3:** PCR-Temperaturprogramm

Schritt		Temperatur	Dauer
1	Denaturieren der Ausgangs-DNA	95 °C	5 min
2	16 Zyklen	Denaturieren der Ausgangs-DNA	95 °C
3*		<i>annealing</i> der Primer	$T_m$
4		Elongation	68
5	Finale Elongation	68	20 min

\*: waren unterschiedliche *annealing*-Temperauren notwendig, so wurde in den ersten 10 Zyklen mit der niedrigeren begonnen und dann für weitere 20 Zyklen die höhere Temperatur eingestellt.

\*\*: 1000 bp pro 2 min

### 3.2 Allgemeine Proteinchemische Methoden

#### 3.2.1 Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration nach Bradford

Zur Bestimmung der Gesamtprotein-Konzentration wurden 2 bis 4 µl Probe mit 798 bis 796 µl *Aqua bidest.* und 200 µl 5x Bradford-Reagenz aus dem Kit *Bio-Rad Protein Assay* versetzt. Der *blank* enthielt *Aqua bidest.* statt Probe. Nach Durchmischen und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde basierend auf einer Kalibrierung mit bovinem Serumalbumin (BSA) berechnet.

#### 3.2.2 SDS-PAGE

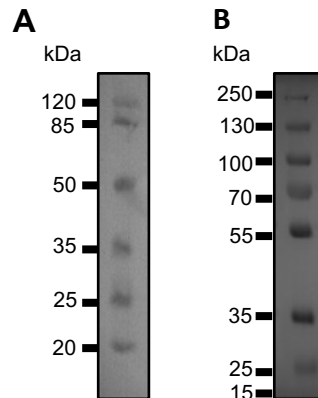
Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine vertikale diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt. Insofern nicht anders angegeben, wurden die Proteinproben mit 4x SDS-Ladepuffer 1:3 verdünnt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Alternativ wurden die Proben für 2 bis 10 min bei 60 °C inkubiert. Zwei durch Abstandshalter getrennte Glasplatten wurden in einen Gelgießstand eingespannt. Der zwischen diesen nach unten durch eine Kautschukmasse abgedichtete entstandene Hohlraum wurde zunächst mit 6 ml eines noch flüssigen Trenngels (Tabelle 3.4) gefüllt. Dieses wurde bis zur Aushärtung mit Isopropylalkohol überschichtet. Anschließend wurde das Sammelgel (Tabelle 3.4) oben hinzu pipettiert. Den Abschluss bildete ein Kamm mit 10 oder 12 Zähnen, der dem Sammelgel Taschen zum Auftragen der Proben verlieh.

**Tabelle 3.4:** Zusammensetzung Polyacrylamidgele

Zusammensetzung/Konzentration	7 %	10 %	12,5 %	Sammelgel (5 %)
ddH <sub>2</sub> O			5,25 ml	2,4 ml
Trenngelpuffer (4X)			3	
Sammelgelpuffer (4X)	-	-	-	1 ml
Rotiphorese® Gel 40			3,75 ml	0,6 ml
TEMED			10 µl	6 µl
APS (10 %)			80 µl	25 l

*Bemerkung: für je zwei Gele. Wenn nicht anders angegeben, wurde ein 12,5 %-iges Gel verwendet.*

Nach dem Aushärten der Gele wurde der Gel-Stand sowie die äußere Wanne mit Kathodenpuffer gefüllt und die Taschen gleichmäßig mit einer definierten Proteinmenge bzw. definiertem Probenvolumen befüllt. Je nach erwarteter Bandengröße und Gelkonzentration wurde der Proteinmarker gewählt. Während der 10 bis 15-minütigen Sammelphase wurde eine Spannung von 160 Volt angelegt. Anschließend wurde für 45 bis 60 Minuten die Spannung auf 200 Volt erhöht, bis der Farbstoff am unteren Rand des Gels nahezu vollständig aus dem Gel ausgetreten war.



**Abbildung 3.3:** Proteinmarker zum Größenvergleich in der SDS-PAGE: (A) peqGOLD Protein Marker III (pre-stained) in einem 12,5%-igen Polyacrylamidgel. (B) peqGOLD Protein Marker V (pre-stained) in einem 10%-igen Polyacrylamidgel.

### 3.2.3 Coomassie- und Ponceau S-Färbung von Proteinen

Zur Ladungskontrolle von Acrylamidgelen oder Western Blot Membranen wurden die Gele mit Coomassie und die Membranen mit Ponceau S angefärbt. Dafür wurde das Gel mind. 1 h bei Raumtemperatur unter Schütteln mit Coomassiefarbstofflösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 1 h bei RT auf einem Kippschüttler mit Entfärberlösung entfärbt, sodass nur proteinhaltige Bereiche im Gel gefärbt blieben. Die Dokumentation erfolgte mit einem handelsüblichen Scanner.

### 3.2.4 In-Gel-Fluoreszenz

Zur Überprüfung der In-Gel-Fluoreszenz wurde das Gel nach Beendigung der SDS-PAGE auf eine Quarzglas-Platte übertragen und mithilfe des INTASchemostar unter Verwendung der Software *ChemoStar Imager* die Fluoreszenz bei einer Anregungswellenlänge von 477 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm detektiert. Die Belichtungszeit war variabel im Bereich von 100 msec bis zu einer Sekunde.

### 3.2.5 Western Blot

Zur Überprüfung der hergestellten Proteine wurden diese auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Immundetektion erfolgte mit speziellen Antikörpern welche gegen die Affinitäts-tags der Zielproteine gerichtet waren. Es wurden zunächst Whatman®-Papiere gemeinsam mit einer zuvor für 30 s in Methanol aktivierten Membran für 5 min in Transferpuffer äquilibriert und so auf der Blotting Apparatur platziert, dass das Trenngel direkt auf der Membran platziert werden konnte. Die Proteine und der Marker wurden für 60 min bei 17 Volt auf die Membran übertragen. Anschließend wurde die Membran für 60 min unter Schütteln bei Raumtemperatur in 20 ml MTBST geblockt. Der Primärantikörper wurde in passender Verdünnung in 10 ml MTBST auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Am Folgetag wurde überschüssiger Primärantikörper durch dreimaliges

15-minütiges waschen mit TBST entfernt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit in entsprechend verdünntem Sekundärantikörper in 10 ml MTBST unter Schütteln bei Raumtemperatur für 1 h. Überschüssiger Sekundärantikörper wurde erneut durch dreimaliges 15-minütiges Waschen mit TBST entfernt. Die Entwicklung des Blots erfolgte mittels des INTASChemostar unter Verwendung der Software *ChemoStar Imager*. Die zur Chemilumineszenz benötigten ECL-Reagenzien aus dem *Kit Clarity Western ECL-Substrate* wurden erst kurz vor der Entwicklung in einer 1:1-Verdünnung zu 1 ml hinzugegeben. Der Blot wurde mit ausreichender Dauer belichtet und der Kontrast anschließend im *Imager* optimiert.

### 3.2.6 Protein-Konzentrierung und Entfernung von Imidazol

Zur Verringerung des Probenvolumens von Proteinproben wurden diese nach Herstellerangaben in einem *Amicon*<sup>®</sup>-Zentrifugierfilter bei 4 °C zentrifugiert und auf das gewünschte Endvolumen reduziert. Es wurden hierbei Filter mit einem *cut-off* von 30 kDa oder 100 kDa verwendet. Die Filtergröße richtete sich nach der erwarteten Größe des Proteins sowie nach der Mizellgröße des verwendeten Detergens insofern eines verwendet wurde. Hierdurch wurde die Aufkonzentrierung des Detergens verhindert (Strop & Brunger, 2005). Die mit Imidazol gereinigten Proteinproben wurden mit dem nötigen Volumen an TRIS-Puffer verdünnt und aufkonzentriert, bis die Endkonzentration des Imidazols bei unter 1 mM Imidazol lag.

### 3.2.7 Size-exclusion-chromatography

Proteinproben, die einer Größenausschlusschromatographie unterzogen wurden, wurden mit den in **Tabelle 3.5** aufgeführten Parametern aufgetrennt. Das Chromatographiesystem *ÄKTApurifier* wurde hierbei von der Software *Unicorn 5.2* kontrolliert. Die Säule *Superdex<sup>TM</sup> 200 10/300 GL* wurde vor Beginn der Reinigung mit mindestens zwei Säulenvolumina *Aqua bidest.* gespült und dann mit dem jeweiligen Reinigungspuffer äquilibriert. Die Proben wurden vorher für 10 min bei 10.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann mithilfe einer 1-ml-Einmalspritze mit Luer-Ansatz über einen passenden Adapter auf die Anlage geben. Die Chromatographiesäule und Fraktionssammler wurden auf 4 °C gekühlt.

**Tabelle 3.5:** Parameter für die Größenausschlusschromatographie

Parameter	Kennwert
Hochdruckalarm	1,5 MPa
Injektionsloop	500 µl
Probenauftrag	max. 500 µl
Fließmittel	TRIS-Puffer zur Reinigung SEC
Säulenvolumen	24 ml
Fließgeschwindigkeit	1,5 ml min <sup>-1</sup>
Fraktionsvolumen	500 µl

### 3.2.8 Trichloressigsäure-Fällung

Zur Präzipitation der Proteine stark verdünnter Proteinlösungen wurden diese mit Trichloressigsäure präzipitiert. Hierzu wurden 4 Teile Proteinlösung mit einem Teil TCA (100 % (m/v)) gemischt und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurde für 10 min bei 13.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sehr gründlich entfernt und das Pellet unter wiederholtem Zentrifugieren dreimal mit 875 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurde die Mischung jeweils für 5 min bei 4 °C inkubiert. Zur vollständigen Entfernung des Acetons wurde das Zellpellet im geöffnetem Eppendorfgefäß bei 70 °C im

temperierten Heizblock getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 20 µl PBS-Puffer resuspendiert.

### 3.3 Herstellung der Transportproteine in *S. cerevisiae*

Alle *S. cerevisiae*-Kulturen wurden so hergestellt, dass das Kulturvolumen jeweils einem Fünftel des Kulturgefäßes entsprach. Hefen des Stammes W303 1A  $\Delta$ *jen1*  $\Delta$ *ady2* wurden vor der Transformation in YPD-Medium und nach der Transformation in SD-AHLW-Medium inkubiert. NY17-Hefen wurden vor der Transformation ebenfalls in YPD-Medium inkubiert und nach der Transformation in SD-Medium ohne weitere Zusätze. Die Zellen wurden insofern es nicht anders angegeben ist bei 29 °C inkubiert. Flüssigkulturen wurden bei 29 °C und 220 U min<sup>-1</sup> inkubiert. Für die Bestimmung der OD<sub>600</sub> am *BioPhotometer* wurden Polystyrolküvetten verwendet. Die Bestimmung erfolgte gegen das jeweilige Medium oder Lösungsmittel als *blank*. Je nach Dichte der Zellkultur wurde eine geeignete Verdünnung gewählt. So wurde eine besonders hoch gewachsene Vorkultur 1:9 verdünnt, um die OD<sub>600</sub> zu bestimmen, während eine weniger hoch gewachsene Kultur 1:1 verdünnt wurde.

#### 3.3.1 Chemische Transformation

Für die chemische Transformation der *S. cerevisiae*, angelehnt an die Lithiumacetat/ss-carrier-DNA/PEG-Methode, wurden naive Zellen aus einem Glycerolstock auf YPD-Agarplatten ausgestrichen und für 3 bis 5 Tage bei 29 °C inkubiert. Ein einzelner Klon wurde in 5 ml YPD über inkubiert. Am nächsten Tag wurde die optische Dichte dieser Vorkultur bestimmt und 50 ml YPD-Medium so angeimpft, dass eine OD<sub>600</sub> von 0,2 bis 0,3 erreicht wurde. Diese Hauptkultur wurde für 2 bis 3 h, entsprechend einer Generationszeit der naiven Hefe, unter gleichen Bedingungen wie die Vorkultur wachsen gelassen. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 bis 0,8 wurden die Zellen bei 2000 g für 5 min bei 4 °C in einem sterilen Falcontube geerntet. Das Zellpellet wurde mit 25 ml eiskaltem autoklaviertem *Aqua bideest.* gewaschen, erneut pelletiert und in 1 ml *Aqua bideest.* resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden 100 µl dieser Zellsuspension für 30 s bei 18.000 g pelletiert und dann mit 360 µl Transformationsmix und je 0,5 µl Plasmid-DNA-Lösung (3.1.2) versetzt und resuspendiert. Das Pipettierschema für den Transformationsmix ist **Tabelle 3.6** zu entnehmen. Und wurde bei Bedarf entsprechend hochskaliert.

**Tabelle 3.6:** Zusammensetzung chemischer Transformationsmix für *S. cerevisiae*

Reagenz	Volumen
PEG 3500 (50 % (w/v))	240 µl
Lithiumacetat (1 M)	36 µl
ss-carrier-DNA*	50 µl
Autoklaviertes dd H <sub>2</sub> O	33,5 µl
Plasmid-DNA-Lösung	0,5 µl
Gesamt	360 µl

\*Die ss-carrier-DNA wurde vor jeder Benutzung 5 min aufgekocht und dann konstant auf Eis gehalten.

Die Zellen in dem Transformationsmix wurden für 30 bis 60 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie zuvor pelletiert, der Transformationsmix vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml autoklaviertem *Aqua bideest.* resuspendiert. Die

Zellsuspension wurde 1:10 verdünnt. Hiervon wurden 100 bis 200 µl auf SD bzw. SD-AHLW-Agar-Platten ausplattiert und für 3 bis 5 Tage bei 29 °C inkubiert. Die Zellen wurden alle drei bis vier Wochen auf frische Agarplatten umplattiert.

### 3.3.2 Dauerkulturen

Zur Sicherung eines naiven oder transformierten Hefeklons wurden Dauerkulturen angelegt. Hierfür wurde entweder ein einzelner Klon von einer Agarplatte in 5 ml des passenden Mediums über Nacht inkubiert oder eine zuvor schon angewachsene Kultur eines einzelnen Klons 1:1 mit autoklaviertem Glycerol 80 % versetzt gut durchmischt und bei –80 °C gelagert.

### 3.3.3 Wachstumskurven und Ermittlung von Generationszeiten

Zur Ermittlung der Generationszeit transformierter Hefeklone (Hefestamm *W303 1A Δjen1 Δady2*) wurden diese nach erfolgter Transformation (3.3.1) über Nacht in 5 ml SD-AHLW-Medium inkubiert. Am folgenden Tag wurden 100 µl dieser Zellkultur in frische 5 ml Medium überführt und wieder über Nacht inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen die OD<sub>600</sub> in einer 1:9-Verdünnung am *BioPhotometer* bestimmt. Anschließend wurde eine 25-50 ml Hauptkultur mit dieser Vorkultur so angeimpft, dass eine Start-OD von 0,2 eingestellt war. Anschließend wurde über neun bis zehn Stunden jede Stunde die OD<sub>600</sub> bestimmt. Die daraus ermittelte Generationszeit bildet das exponentielle Wachstum der Hefen ab. Zusätzlich wurde in gleicher Weise abends eine Übernachts-Hauptkultur angesetzt, die so angeimpft wurde, dass sie am nächsten Morgen zu einer bestimmten Uhrzeit eine OD<sub>600</sub> von 0,7 – 1 erreichen sollte. Die Start-OD am Abend wurde bestimmt. Nach 12 bis 16 Stunden wurde die OD erneut bestimmt. So wurde die jeweilige Generationszeit inklusive der *lag-Phase* für die überprüfte Zeitspanne ermittelt. Nach diesem Prinzip wurden laufend die Generationszeiten nahezu aller Hefeklone bestimmt.

### 3.3.4 Proteinherstellung in *S. cerevisiae* W303 1A Δjen1 Δady2

Um das gewünschte Protein in größerer Menge für Funktionsuntersuchungen herzustellen, wurde nach der Transformation (3.3.1) der *S. cerevisiae*-Zellen der jeweilige Klon für 24 h in 5 ml SD-AHLW Medium für 24 h vor inkubiert. Nach 24 h wurden 100 µl der Zellsuspension zum Animpfen von frischem SD-AHLW-Medium verwendet und auf die gleiche Weise inkubiert. Diese 5 ml-Kultur wurde am nächsten Tag zum Animpfen einer größeren Hauptkultur verwendet. Diese wurde so eingestellt, dass nach 12 und 18 h eine OD<sub>600</sub> von 0,9 bis 1,0 erreicht wurde. Beim Erreichen dieser wurden die Zellen für 5 min bei 4°C bei 4000 g geerntet, mit Wasser gewaschen und bis zur weiteren zeitnahen Verwendung auf Eis gehalten.

### 3.3.5 Konfokalmikroskopie lebender Hefezellen mit GFP-Detektion

Zur Vorbereitung der Konfokalmikroskopie wurde der zu untersuchende Hefeklon vom Stamm *W303 1A Δjen1 Δady2* kultiviert. 100 µl einer Vorkultur wurden für weitere 24 h in frischem Medium inokuliert. Mit dieser Vorkultur wurden 50 ml frisches SD-AHLW-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen bei 4000 g und 4 °C für 5 min geerntet und 2-mal mit 25 ml kaltem *Aqua bidest.* gewaschen. Im Anschluss wurde die OD<sub>600</sub> mit *Aqua bidest.* auf 50 ± 5 eingestellt und die Zellen bis zur Vermessung auf Eis gehalten. Es wurden 5 bis 10 µl Zellsuspension auf einen Objektträger. Die Konfokalmikroskopiebilder wurden von Dr. Christine Desel (Botanisches Institut, CAU Kiel) aufgenommen und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die GFP-Fusionskonstrukte wurden mit einem inversen Zeiss Axio Observer 7 Mikroskop mit konfokaler Laser Scanning Erweiterung (Zeiss LSM 900) und PA 40.0x1.4 DIC III Öl-Objektiv visualisiert. Zur Anregung

der Fluorophore wurde ein Laser der Wellenlänge 488 nm verwendet und die Fluoreszenz bei 490 bis 586 nm detektiert.

### 3.3.6 Isolierung der mikrosomalen Fraktion für die SDS-PAGE und Western Blot

Zur Isolation der mikrosomalen Fraktion wurden Hefehauptkulturen nach dem gleichen Prinzip wie bei der Proteinherstellung in *S. cerevisiae* W303 1A  $\Delta$ *jen1*  $\Delta$ *ady2* (3.3.4) oder *S. cerevisiae* NY17 (3.3.8) angesetzt und bis zum Erreichen der angestrebten OD<sub>600</sub> unter den jeweiligen Bedingungen kultiviert. 50 ml dieser Kulturen wurden bei 4000 g bei 4 °C für 5 min geerntet, mit kaltem *Aqua bidest.* gewaschen, erneut pelletiert und mit 10 ml kaltem TRIS-Puffer (25 mM TRIS-HCl, 5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 7,5) gewaschen. Das Zellpellet wurde für mind. 30 min bei –80 °C eingefroren. Nach dem Auftauen auf Eis wurde das Zellpellet mit 0,5 ml kaltem TRIS-Puffer versetzt und in ein 15 ml Falcontube mit 0,5 g säuregewaschenen Glas *beads* (Ø 0,5 mm) überführt. Die Zellen wurden 30 s auf dem Vortex-Mischer geschüttelt und danach 1 min auf Eis stehen gelassen. Dies wurde 12 bis 15-mal wiederholt. Danach wurden die Glaskügelchen und größere Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 1000 g bei 4 °C für 5 min abgetrennt. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen und auf Eis gehalten. Die verbliebenen Zelltrümmer wurden erneut mit 0,5 ml kaltem TRIS-Puffer versetzt und erneut im gleichen Vortex-Zyklus bearbeitet. Anschließend wurde auf gleiche Weise der Überstand abgetrennt und mit dem ersten 1000 g -Überstand vereinigt. Die vereinigten Überstände wurden für 5 min bei 4 °C und 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein UZ-geeignetes Eppendorfgefäß überführt. Das 10.000 g-Zelllysatspellet wurde in 100 µl Phosphat-Puffer (100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mM NaCl, pH 8,0) zur Aufbewahrung resuspendiert und die Gesamtproteinkonzentration bestimmt (3.2.1). Der Überstand wurde für 45 min bei 100.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig vom Pellet der mikrosomalen Fraktion entfernt. Im Anschluss wurde das Pellet in 100 µL Phosphatpuffer resuspendiert. Der Gesamtproteingehalt des 100.000 g-Pellets wurde ebenfalls bestimmt (3.2.1) und anteilig mit SDS-Ladepuffer versetzt und entsprechend mithilfe der SDS-PAGE (3.2.2) untersucht.

### 3.3.7 Protoplastierung von *S. cerevisiae* W303 1A $\Delta$ *jen1* $\Delta$ *ady2*

Es wurden 50 ml einer Übernacht-Hefekultur (3.3.3) bei einer OD<sub>600</sub> von  $1,0 \pm 0,1$  in einem zuvor tarierten Falcontube bei 4000 g und 4 °C für 5 min geerntet und anschließend in 3 ml MOPS-Puffer (50 mM MOPS, 0,2 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,2) für die Protoplastierung resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen erneut bei 2000 g und 4 °C für 5 min pelletiert, der Überstand sorgfältig entfernt und die Zellen für 15 min 30 °C und 140 U min<sup>-1</sup> im Waschpuffer inkubiert. Im Anschluss erfolgte der Zellwandverdau mit 100 mg BSA, 400 U Zymolase pro Gramm Pellet und 4 ml MOPS-Puffer (50 mM MOPS, 1,8 M D-Saccharose, 0,2 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 7,2) über 60 min bei 30 °C und 140 U min<sup>-1</sup>. Anschließend wurde der Überstand durch Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 2000 g abgetrennt und das Protoplasten-Pellet in 5 ml MOPS-Puffer (10 mM MOPS, 1,2 M D-Saccharose, 50 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7,2) gewaschen und anschließend in 2 ml von diesem resuspendiert und bei 4 °C gelagert. Die OD<sub>600</sub> wurde bestimmt, um die zu vermessenden Protoplasten später auf eine OD<sub>600</sub> von 4,0 einzustellen. Vor der Vermessung wurden die Protoplasten 24 bis 72 h im Kühlschrank gelagert.

### 3.3.8 Proteinherstellung *S. cerevisiae* NY17

Für die Proteinherstellung in *S. cerevisiae* vom Stamm NY17 erfolgte eine chemische Transformation der Hefezellen (3.3.1). Bei diesem Hefestamm wurden die transformierten Zellen auf SD-Agarplatten ausplattiert. Die Klone wurden für 24 bis 48 h in 5 ml SD-Medium unter gleichen Bedingungen wie in 3.3.4 inokuliert. Für eine größere Menge Protein wurden

50 bis 500 ml SD-Medium so angeimpft, dass nach 12 bis 18 h Inkubationszeit eine OD<sub>600</sub> von  $0,7 \pm 0,1$  oder  $2,0 \pm 0,2$  erreicht wurde. Die Inkubationstemperatur wurde anschließend 1 bis 2 h auf 37 °C erhöht. Nach der Wachstumsphase bei erhöhter Temperatur wurde die OD<sub>600</sub> gemessen und die Zellen für 5 min bei 4 °C und 4000 g geerntet, mit 20 ml kaltem *Aqua bidest.* und danach mit 10 ml kaltem TRIS-Puffer (25 mM TRIS-HCl, 5 mM Na<sub>2</sub>-EDTA, pH 7,2) gewaschen. Das gewaschene Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten oder bei –80 °C gelagert.

### 3.3.9 Isolierung sekretorischer Vesikel von *S. cerevisiae* NY17

Zur funktionellen Charakterisierung der von *S. cerevisiae* NY17 in Vesikeln hergestellten Proteine wurden die Zellen wie in 3.3.8 beschrieben kultiviert. Nach dem Ernten erfolgte ein Zellaufschluss wie in 3.3.6 beschrieben. Im Unterschied dazu wurden aber die erhaltenen 100.000 g-Pellets nach dem Wiegen mit täglich frisch sterilfiltriertem HEPES/TRIS-Puffer (10 mM HEPES/TRIS, 20 mM KCl, 250 D-Saccharose, pH 7,2) auf 5 bis 50 mg Membranfraktion-Feuchtgewicht pro ml eingestellt. Zusätzlich wurde die OD<sub>600</sub> bestimmt. Die resuspendierten Zelltrümmer wurden zur Homogenisierung 5-mal durch eine 25 Gauge-Kanüle gezogen. Die Vesikel wurden bis zur direkten Verwendung auf Eis gehalten. Bei der Präparation der Vesikel wurde sich an Rebbeor *et al.* (1998) orientiert.

## 3.4 Herstellung der Transportproteine in *D. discoideum*

Die Wiedereinführung der Kultivierung von *D. discoideum* im Arbeitskreis wurde im Rahmen einer Masterarbeit von Robin Hertel durchgeführt. Alle Arbeiten mit diesen Zellen erfolgten unter möglichst aseptischen Bedingungen unter der Sterilwerkbank. Flüssigkulturen in der Petrischale (Ø 10 cm) wurden bei 22 °C inkubiert. Schüttelkulturen wurden in mit einem sauerstoffdurchlässigen Styroporstopfen versehenen Schikanekolben bei gleicher Temperatur bei 150 U min<sup>-1</sup> inkubiert.

### 3.4.1 Kultivierung von *D. discoideum* aus Sporen

Zur Kultivierung von nicht transformierten *D. discoideum* AX2 Zellen wurden bei –80 °C gelagerte Sporen (von Robin Hertel im Rahmen einer Masterarbeit hergestellt) möglichst rasch in 10 ml HL5-Medium einer Petrischale ausgebracht. Das Medium enthielt zusätzlich 1 % Glukose sowie 200 *units* Penicillin pro Liter und 0,2 mg Streptomycin pro Liter. Die Zellen wurden vier bis fünf Tage inkubiert. Anschließend wurde die nun konfluent bewachsene Schale entweder gesplittet oder zum Animpfen einer Schüttelkultur verwendet. In beiden Fällen wurde das HL5-Medium vorsichtig am Rand der Schale abgesaugt. Durch Zugabe von ca. 3 bis 4 ml neuem HL5-Medium und vorsichtiges Schwenken der Petrischale wurden tote Zellen und Zelltrümmer von der Schicht konfluenter Zellen heruntergespült und ebenfalls verworfen. Die Zellen wurden durch wiederholtes rauf und runter pipettieren mit 2 ml Medium über die ganze Platte vorsichtig abgelöst. Zum Zählen wurden die Zellen 1:1000 verdünnt. Zum Animpfen einer über Nacht Schüttelkultur wurden 2 ml resuspendierter Zellen vollständig in 100 ml frisches HL5-Medium überführt. Wurde die Platte gesplittet, wurden 10 bis 1000 µl auf eine neue 10 ml HL5-Medium enthaltende Platte überführt und der Rest Zellsuspension verworfen. Die alte Platte wurden ebenfalls mit frischem Medium versehen. So wurde sichergestellt, dass alle zwei Tage eine konfluent bewachsene Platte zur Verfügung stand. Es wurde darauf geachtet, dass die Platte nicht zu dicht bewachsen war. Die Zelldichte (3.4.4) sollte zwischen  $1 \cdot 10^4$  bis  $5 \cdot 10^6$  Zellen ml<sup>-1</sup> liegen.

### 3.4.2 Mediumwechsel

Zum Wechseln vom Medium wurde das alte Medium vorsichtig am Rand der Petrischale abgesaugt und neues Medium vorsichtig hinzugegeben. Je nach Dichte oder Viabilität der Zellen wurde zwischendurch mit Medium gewaschen. Hierfür wurden die Zellen zuvor unter dem Mikroskop angeschaut. Lagen viele abgestorbene Zellen vor, wurden diese mit frischem Medium gelöst und entfernt. Waren die Zellen nach einer Elektroporation (3.4.5) noch nicht am Boden der Petrischale angehaftet, wurde auf den Waschschrift verzichtet.

### 3.4.3 Flüssig-Schüttelkultur

Um eine größere Menge Zellen zu gewinnen, wurde von einer konfluent bewachsenen Platte (3.4.1) eine Flüssigkultur über Nacht angelegt. Dafür wurden die Zellen vollständig in 100 ml HL5-Medium überführt. Die Kultur wurde für ca. 24 h bei 22 °C und 15 U min<sup>-1</sup> inkubiert. Die Zelldichte (3.4.4) betrug nach der Inkubation 2\*10<sup>6</sup> bis 5\*10<sup>6</sup> Zellen ml<sup>-1</sup>. Beim Anlegen einer Schüttelkultur von transformierten Zellen (3.4.5), wurde G418 mit einer Endkonzentration von 10 µg ml<sup>-1</sup> zugesetzt.

### 3.4.4 Bestimmung Zelldichte

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die in 2 ml resuspendierten Zellen einer konfluent bewachsenen Petrischale 1:100, die Zellen einer Flüssig-Schüttelkultur 1:10 und die Zellen für den <sup>14</sup>C-Transportassay 1:1000 verdünnt. 10 µl Zellsuspension wurden auf die vorbereitete Fuchs-Rosenthal-Zählkammer gegeben. Anschließend wurden die Zellen pro Großquadrat gezählt. Insgesamt wurden fünf der sechzehn Großquadrate ausgezählt und anschließend der Mittelwert bestimmt. Über die Verdünnung der Zellsuspension und das Volumen der Zählkammer von 3,2 µl konnte die Zellzahl pro ml berechnet werden. Zusätzlich wurde die OD<sub>600</sub> der ausgezählten Zellsuspension am *BioPhotometer* bestimmt, um eine Korrelation zwischen der OD<sub>600</sub> und der Zellzahl zu ermitteln. Im späteren Verlauf der Arbeit wurde nur die OD<sub>600</sub> gemessen.

### 3.4.5 Elektroporation: Transformation von *D. discoideum*

Die Elektroporation der *D. discoideum* Zellen erfolgte in Anlehnung an *dictybase.org techniques*.

Es wurde eine 100 ml Flüssig-Schüttelkultur (3.4.3) mit einer Zelldichte von ca. 2\*10<sup>6</sup> Zellen ml<sup>-1</sup> zu je 50 ml bei 500 g und 4 °C für 10 min geerntet. Das Zellpellet wurde 2-mal mit 25 ml eiskaltem H-50-Puffer gewaschen und anschließend jeweils in 2,2 ml eiskaltem H-50-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden kontinuierlich auf Eis gehalten. Es wurden pro Elektroporation und Konstrukt 400 µl Zellsuspension in eine sterile 10 µg Plasmid-DNA enthaltene Elektroporations-Küvette pipettiert. Die Zellen wurden bei 0,6 kV und 50 µF mit zwei Pulsen elektroporiert. Die *time* Konstante betrug zwischen 0,6 und 0,9 msec. Die Zellen wurden 5 min auf Eis gehalten und anschließend in eine 10 ml HL5-Medium enthaltene Petrischale überführt. Nach 24 h wurde der Selektionsmarker G418 in einer Endkonzentration von 10 µg ml<sup>-1</sup> hinzugegeben. Das Medium wurde alle 3 bis 5 Tage vorsichtig gewechselt und die Zellen unter dem Mikroskop dokumentiert. Abgestorbene Zellen wurden sorgfältig entfernt. Nach ca. 5 Tagen wurde von den selektierten Zellen eine Flüssig-Schüttelkultur (3.4.3) zur Proteinherstellung angelegt.

### 3.4.6 *D. discoideum*-Lysat für die Western Blot-Analytik

Zur Überprüfung der Proteinherstellung wurden Zelllysate für die Western Blot-Analytik gewonnen. Hierfür wurden 50-100 ml einer Flüssig-Schüttelkultur (3.4.3) bei 500 g und 4 °C für 10 min geerntet, mit 25 ml eiskaltem SP-Puffer (pH 6,5) gewaschen und nach dem

Waschen in 1 ml eiskaltem SP-Puffer (pH 6,5) resuspendiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für den Aufschluss wurden 4 bis 5 Zyklen Temperaturwechsel von 8 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 6 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  durchlaufen. Im Verlauf der Arbeit wurde ein Vortex-Schritt nach dem Auftauen ergänzt. Das Zellysate wurde für 15 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 10.000 g und der entstandene Überstand für 45 min bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 100.000 g zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden in 40 bis 200  $\mu\text{l}$  SP-Puffer (pH 6,5) resuspendiert. Die Proteingesamtkonzentration wurde bestimmt (3.2.1) und entsprechend mit SDS-Ladepuffer versetzt und für 30 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert.

### 3.5 Funktionelle Charakterisierung der Transportproteine aus dem zellbasierten System

#### 3.5.1 $^{14}\text{C}$ -Transportassay

Der  $^{14}\text{C}$ -Transportassay zur funktionellen Charakterisierung basiert auf der Aufnahme von anteilig  $^{14}\text{C}$ -markierten Substrat in die Hefezelle und wurde bereits in der Literatur beschrieben (Wu *et al.* 2015). Für neun bis zwölf geplante Messpunkte wurden 50 ml Hefezellkultur mit einer  $\text{OD}_{600}$  von  $1,0 \pm 0,1$  angesetzt. Die Zellen wurden für 5 min bei 4000 g und  $4^{\circ}\text{C}$  geerntet und mit *Aqua bidest.* gewaschen. Die Zellpellets wurden kontinuierlich auf Eis gehalten. Vor Beginn der Messung wurden die Hefezellen im jeweiligen Messpuffer resuspendiert und auf die gewünschte  $\text{OD}_{600}$  eingestellt. 80  $\mu\text{l}$  einer Hefezellsuspension mit einer  $\text{OD}_{600}$  von  $50 \pm 5$  entsprachen 5,6 mg Hefezellmasse.

Zur funktionellen Charakterisierung der in *D. discoideum* hergestellten Proteine wurde wie in 3.5.1 vorgegangen. Die Zellen einer *D. discoideum* Flüssig-Schüttelkultur (3.4.3) wurden nach 1 bis 2 Tagen Inkubation verwendet, wenn eine ausreichend hohe Zellzahl erreicht war. Nach Bestimmung der  $\text{OD}_{600}$  wurden die Zellen für 10 min bei 500 g und  $4^{\circ}\text{C}$  geerntet. Das Zellpellet wurde bis zur Messung auf Eis gehalten. Die Zellen wurden über die Korrelation zwischen  $\text{OD}_{600}$  und Zellzahl auf eine Zellzahl von  $1 \cdot 10^7$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  eingestellt. Als Messpuffer wurde ein genau definierter SP-Puffer verwendet. Die Messungen wurden insofern es nicht anders angegeben ist bei pH 5,8 durchgeführt. Bei der Vermessung der *D. discoideum*-Zellen wurde auf Vortex- und harsche Durchmischungsschritte verzichtet. Die Zellen wurden durch langsames Auf- und Abpipettieren durchmischt.

Soweit nicht anders angegeben, wurden entsprechend 80  $\mu\text{l}$  einer Zellsuspension mit einer  $\text{OD}_{600}$  von  $50 \pm 5$  mit einem Gradienten von 1 mM Substrat und 0,04  $\mu\text{Ci}$  Aktivität bei Raumtemperatur vermessen. Fünf bis zehn Minuten vor Beginn der Messung wurde die Zellsuspension vom Eis genommen und zum Zeitpunkt  $t = 0$  mit 5x Substratlösung versetzt. Die 5x Substratlösung bestand dabei aus nicht markiertem Substrat, das in einem Verhältnis von 1:138, resultierend in einer Gesamtaktivität von 0,04  $\mu\text{Ci}$  pro Probe, mit radioaktiv markiertem Substrat gespiked wurde. Für einzelne Proben wurden 80  $\mu\text{l}$  Zellsuspension mit 20  $\mu\text{l}$  Substratlösung versetzt. In der *batch* Methode, die für die zeitabhängige Aufnahmekurve herangezogen wurde, wurde pro Messzeitpunkt ein Überschuss von 8  $\mu\text{l}$  Zellsuspension und 2  $\mu\text{l}$  Substratlösung kalkuliert und dann alle Messzeitpunkte nacheinander aus einem Reaktionsgefäß vermessen. Insgesamt wurden je Messzeitpunkt 100  $\mu\text{l}$  Zell-Substrat-Suspension auf einen Whatman GF/C™ Filter gegeben, mit 6 bis 7 ml kaltem Wasser gespült und in 3 ml Szintillationscocktail in einem Szintillationsvial überführt. Die auf dem Filter zurückgehaltenen und gewaschenen Hefe- oder *D. discoideum*-Zellen enthalten das anteilig radioaktiv markierte aufgenommene Substrat. Die Menge des aufgenommenen Substrates variierte in Abhängigkeit des zu untersuchenden Proteins und Substrates. Nach 24 h wurden die Signale im *Tri-Carb 2900 TR Liquid Scintillation Analyzer* detektiert.  $\beta$ -Strahlung, die beim

## Methoden

Zerfall der instabilen Atome zu  $^{14}\text{N}$  entsteht, regt die Moleküle im Szintillationscocktail an. Das dabei entstehende Fluoreszenzsignal wird vom Detektor erfasst. Dem Zerfall von  $^{14}\text{C}$  wird Strahlung im Energiebereich von 4 bis 156 keV zugeordnet, also werden die *counts* pro Minute in diesem Bereich zur Auswertung einbezogen. Variable Parameter in dieser Methode waren der pH-Wert des Messpuffers, die Hefemasse oder *D. discoideum*-Zellzahl, die Substrate (Na-Formiat, Na-Acetat, Na-L-Laktat oder Na-Propionat), die Messtemperatur und die eingesetzte Radioaktivität. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Konstrukte auf ihre Fähigkeit verschiedene Monocarboxylate bei unterschiedlichen pH-Werten in unterschiedlichen Zeiträumen zu transportieren untersucht. Die Stoffmenge, die sich unter den definierten Messbedingungen in der Zelle befand, wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Aufnahme} = \frac{\text{counts}_{\text{probe}}}{\text{counts}_{\text{max}}} * \frac{n_{\text{Substrat}}}{x} \quad \text{Formel 3.3}$$

$\text{counts}_{\text{Probe}}$ : *counts* in der Probe

$n_{\text{Substrat}}$ : Stoffmenge Substrat gesamt

$\text{counts}_{\text{max}}$ : maximale Aktivität der gespikten Substratlösung

x:  $m_{\text{Hefe}}$  (Masse der eingesetzten Hefe in mg) oder Zellzahl (*D. discoideum*; 80  $\mu\text{l}$  entsprachen ca.  $1 \cdot 10^6$  Zellen.)

Die erhaltenen Messwerte wurden gegen die Zeit aufgetragen und dann exponentiell (*Exponential plateau*) oder linear gefittet. Transportraten wurden aus der initialen Steigung in den ersten 30 bis 120 s bei einem linearen *Fitting* berechnet. Andernfalls wurde der k-Wert der Exponentialgleichung herangezogen.

*Exponential plateau*:

Die Funktion beschreibt ein exponentiell ansteigendes, auf ein Maximum beschränktes Wachstum.

$$y = y_M - (y_M - y_0) * e^{-k*x} \quad \text{Formel 3.4}$$

$y_M$ : maximale Aufnahme

$y_0$ : Startpunkt der Aufnahme

k: Ratenkonstante

Gerade:

Die Funktion beschreibt einen linearen Verlauf.

$$y = m * x + b \quad \text{Formel 3.5}$$

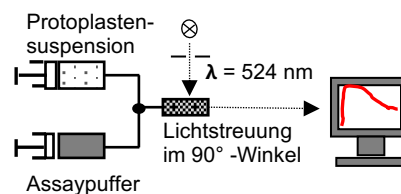
m: Steigung

b: Ordinatenabschnitt

### 3.5.2 Lichtstreuungsassay mit der *stopped flow*-Apparatur

Der Lichtstreuungsassay basiert auf der Änderung der Lichtstreuung durch Größenveränderung schwellender und schrumpfender Protoplasten, Vesikel oder Proteoliposomen in einem hyperosmolaren Puffer. Protoplasten wurden in einem MOPS-Puffer (10 mM MOPS, 50 mM NaCl, 5 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,2 M D-Saccharose, pH 7,2) vermessen.

Die Vesikel wurden in HEPES/TRIS-Puffer (10 mM HEPES/TRIS, 20 mM KCl, 250 mM D-Saccharose, pH 7,2) unter hypertonen Bedingungen vermessen. Proteoliposomen wurden in einem HEPES/KOH-Puffer (20 mM HEPES, 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 6,8) vermessen. Die gewünschten pH-Werte für die jeweilige Messung wurden durch Variation des pH-Wertes des Substratpuffers erreicht, der so eingestellt wurde, dass er im Verhältnis 1:1 den gewünschten pH-Wert lieferte. Für die Messung wurde die Protoplasten-, Vesikel- oder Proteoliposomensuspension im Verhältnis 1:1 mit einem hypertonen Substratpuffer in der Mischkammer der *stopped flow*-Apparatur gemischt. Das Streulicht wurde im 90°-Winkel zur Lichtquelle über einen definierten Zeitraum gemessen (**Abbildung 3.4**). Die Lichtstreuung wurde in Volt gegen die Zeit aufgetragen. Es wurden immer Transportprotein herstellende Hefezellen oder Vesikel bzw. Proteoliposomen sowie mit Leerplasmid transformierte Hefeprotoplasten oder Vesikel bzw. Leerliposomen, analog zum  $^{14}\text{C}$ -Transportassay (3.5.1) vermessen, um das Hintergrundsignal zu definieren. Geräteparameter sind **Tabelle 3.7** zu entnehmen.



**Abbildung 3.4:** Schematische Abbildung Messprinzip *stopped flow*-Apparatur. Die beiden Reservoirs sind zum einen mit Probe und zum anderen mit dem jeweiligen Substrat-Puffer gefüllt und werden im Verhältnis 1:1 gemischt.

**Tabelle 3.7:** Geräteparameter für Lichtstreuungsassay

Parameter	Wert
Lampe	Quecksilber/Xenon
Filter	524 nm
Mischungsverhältnis	1:1
Volumen pro Schuss	78 – 150 $\mu\text{l}$
Flussrate	8 – 16 $\text{ml s}^{-1}$ zu je 4 ml pro Probenreservoir
Start Datenerfassung	10 ms vor dem Stopp
Aufnahmeserie	Streulicht in Volt
Kanal	1
Weitere Einstellungen	<i>trigger</i>
<i>sampling period</i>	2 – 20 ms
Endzeit	variabel
Datenpunkte	variabel
Verstärker	600 – 800 mV
Output-Filter	300 $\mu\text{s}$
Photomultiplier	400 x V

Die Auswertung der aufgenommenen Kurven erfolgte mit Hilfe der Software *Bio-Kine32*® V4.74.2. Hierzu wurden 4 bis 9 Kurven gemittelt und normiert. Der Startpunkt 20 ms zum Koordinatenursprung verschoben und mit einem Multiplikationsfaktor auf den Maximalwert von

## Methoden

1 V gestaucht oder gestreckt. Die Kurve ließ sich nach dem *fitting* mit folgender zweiphasiger Exponentialgleichung beschreiben:

$$y = at + b - c_w e^{d_w * t} + c_{sol} e^{-d_{sol} t} \quad \text{Formel 3.6}$$

a: Steigung

t: Messzeit

b: Streulichtintensitätswert nach unendlicher Messzeit

$c_w$ : Amplitude Wasserausstrom

$d_w$ : Ratenkonstante Wasserausstrom

$c_{sol}$ : Amplitude Soluteinstrom

$d_{sol}$ : Ratenkonstante Soluteinstrom

Für den Soluteinstrom wurde die 1. Ableitung des zweiten Terms einzeln betrachtet:

$$y = c_{sol} * e^{-d_{sol} t} \quad \text{Formel 3.7}$$

$$y' = -d_{sol} * c_{sol} * e^{-d_{sol} t} \quad \text{Formel 3.8}$$

Bei  $t=0$  entsprach der Wert der initialen Ratenkonstante dem Soluteinstrom  $k_{sol}$ :

$$k_s = | -k_s * c_s | \quad \text{Formel 3.9}$$

Die Werte für  $c_{sol}$  und  $d_{sol}$  wurden aus der Fittingfunktion übernommen.

Die Differenz aus der Transportrate der Protoplasten mit heterolog hergestelltem Transportprotein und den mit Leerplasmid transformierten Hefezellen beschrieb die Transportrate des Soluts:

$$k_s = k_s(\text{Protein}) - k_s(\text{Leer}) \quad \text{Formel 3.10}$$

Für Funktionsuntersuchungen der in den Vesikeln der NY17 Hefen befindlichen Proteine wurden die Vesikel wie in 3.3.9 beschrieben gewonnen und im Anschluss wie oben beschrieben in einem HEPES/TRIS-Puffer (10 mM HEPES/TRIS, 20 mM KCl, 250 mM D-Saccharose, pH 7,2) vermessen und ausgewertet. Es wurden Natrium-Formiat-Gradienten im Bereich von 5 mM bis 10 mM vermessen.

### 3.6 Zellfreie Proteinproduktion

Eine weitere Möglichkeit der Proteinproduktion stellte die präparative zellfreie Proteinproduktion dar. Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an Schwarz *et al.* (2007). Es wurden alle Komponenten, die eine Zelle zur Proteinproduktion benötigt über das *continuous-exchange-cell-free*-System (CECF) zugeführt. Beim CECF liegen zwei durch eine semipermeable Membran getrennte Bereiche vor, der RM und der FM. Der *reaction mix* enthält alle für die Transkription und Translation notwendigen Komponenten. Entlang des Konzentrationsgradienten findet ein Austausch aller niedermolekularer Komponenten über eine semipermeable Membran statt. So wurden der Proteinbiosynthese über den voluminöseren *feeding mix* kontinuierlich frische Edukte zur Verfügung gestellt. Störende Nebenprodukte wie Pyrophosphat wurden auf diese Weise gleichzeitig verdünnt. Membranproteinen wurde ein geeignetes Detergens zugegeben. Alle benötigten niedermolekularen Bestandteile lagen als Stammlösungen vor und wurden nach dem Auftauen

als Mastermix (MM) zusammen pipettiert. Höhere molekulare Bestandteile wie Enzyme, Ribosomen und tRNA wurden gesondert direkt in die Reaktionskammer gegeben.

### 3.6.1 Herstellung S30-Extrakt

Ein wichtiger Bestandteil des *reaction mix* in der zellfreien Proteinsynthese stellt der S30-Extrakt dar. Dieser enthält vor allem bakterielle Ribosomen, Transkriptions- und Translationsfaktoren sowie auch die für die Proteinbiosynthese benötigte Aminoacyl-tRNA-Synthetase. Der S30-Extrakt wurde in Anlehnung an (Schwarz, Junge, *et al.*, 2007) hergestellt. Es wurde ein Glycerolstock von *E. coli* vom Stamm BL21 (DE3) über Nacht bei 37 °C Grad auf LB-Agar inkubiert. Am nächsten Morgen wurde eine Kolonie über ca. sechs bis acht Stunden in 5 ml LB-Medium bei 37 °C 6 U min<sup>-1</sup> inokuliert. Anschließend wurden 0,5 ml dieser Vorkultur zum Animpfen einer 50 ml Hauptkultur im 250 ml Kolben verwendet und über Nacht bei 37 °C und 200 U min<sup>-1</sup> inokuliert. Diese Kultur wurde am Folgetag zum Animpfen von frischem Medium verwendet. Die 5 L Medium beinhalteten autoklavierte 4,5 L YPTG-Aminosäuren bestehend aus 80 g *Bactotryptone* und 50 g *Bacto yeast extract*, 0,016 mol, 0,08 mol NaCl, 0,025 mM Polypropylenglycol 2000 sowie sterilfiltriert 100 mM Glukose-Monohydrat. Die angeimpfte Kultur wurde bei 37 °C über einige Stunden bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase unter kontinuierlicher Sauerstoffzufuhr fermentiert. Während der Fermentation wurde der pH-Wert, die Temperatur, die Luftzufuhr und die OD<sub>600</sub> dokumentiert. Die Geräteparameter während der Fermentation sowie am Ende des Fermentationsprozesses sind Tabelle 3.8 zu entnehmen. Die Zellen wurden während der exponentiellen Phase in ihrem Wachstum durch rasches Kühlen mit einer Eis-NaCl-Mischung gestoppt. Es wurde eine OD<sub>600</sub> von 2,5 bis 3,0 angestrebt. Die Zellen wurden in einem Ausschwingrotor bei 4500 g und 4 °C für 15 min geerntet. Hierbei wurde die Kultur auf 4 Teile aufgeteilt. und anschließend dreimal mit jeweils 37,5 ml S30-Puffer A gewaschen. Im letzten Schritt wurden die Zellpellets hierbei für 30 min bei 8000 g und 4 °C zentrifugiert. Die feuchten Zellpellets wurden gewogen und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei –80 °C gelagert. Für den Zellaufschluss wurden alle vier Zellpellets aufgetaut und in 110 % des Pelletgewichts an S30-Puffer B resuspendiert.

**Tabelle 3.8:** Parameter Fermentationsprozess

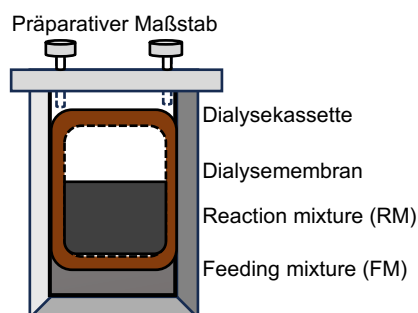
Parameter	Kennwert	
Fermentation	Temperatur	37 °C
	Rotorgeschwindigkeit	900 U min <sup>-1</sup>
	Druck Luftzufuhr	1,5 bar
	Belüftungsrate	10 vvm
Ende Fermentationsprozess	Temperatur	12 °C
	Rotorgeschwindigkeit	5 U min <sup>-1</sup>
	Druck Luftzufuhr	1,5 bar
	Belüftungsrate	5 vvm

Die resuspendierte Zellmasse wurde zu zwei Teilen vereinigt und an der *FrenchPress* durch dreimaliges Durchlaufen eines Hochdruck-Homogenisators bei ca. 20.000 psi aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde für 30 min bei 30.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt. Es wurde darauf geachtet, möglichst wenig oben schwimmende Lipide und Pellet zu überführen. Der Überstand wurde ein zweites Mal für 30 min bei 30.000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde gewonnen und durch Zugabe von 4 M NaCl-Lösung auf eine Konzentration von 0,4 M eingestellt und für 45 min bei 42 °C im bewegten Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Mischung in einem Dialyseschlauch mit 14 kDa *cut-off*

überführt und für 2 h unter Rühren bei 4 °C in einem S30-Puffer C dialysiert. Im Anschluss wurde über Nacht in frischem S30-Puffer C erneut dialysiert. Der Inhalt des Dialyseschlauches wurde am Folgetag erneut bei 30.000 g und 4 °C für 45 min zentrifugiert. Der Überstand wurde, wie am Vortag gewonnen und zu 255 µl für einen analytischen oder zu 355 µl für einen präparativen Ansatz aliquotiert. Die Aliquote wurden zügig in Flüssigstickstoff eingefroren und bei –80 °C gelagert.

### 3.6.2 Zellfreie Proteinproduktion im Zwei-Kompartiment System

Für die in-vitro Produktion größerer Proteinmengen wurde das *continous-exchange-cell-free*-System (CECF) im Zwei-Kompartiment System angelehnt an Helmstetter *et al.* (2019), Holm-Bertelsen *et al.* (2016) und Schwarz *et al.* (2007) genutzt (**Abbildung 3.5**). Hierbei wurden für den *master-mix* zuerst alle niedermolekularen Stoffe und Salze wie Natriumazid 0,05% (*m/v*), Kaliumacetat (150,8 mM), Magnesiumacetat (9,1 mM), Folinsäure (0,1 mg/ml), DTT (2 mM), PEP (20 mM), AcP (20 mM), Proteaseinhibitor (cOmplete™), PEG 8000 (2 % (*v/v*)) und HEPES (91,67 mM)/ EDTA (18,33 mM)- Puffer sowie S30-Puffer vorgelegt. Es folgten NTPs (4,8 mM ATP, 3,2 mM je GTP, UTP, CTP) sowie ein Aminosäure-Mix mit je 0,50 mM proteinogener Aminosäure und ein Zusatz von 1 mM ausgewählter Aminosäuren (RCWMDE). Bei Membranproteinen wurde 0,8 % Brij® 78 zugegeben. Der *master-mix* wurde auf den *reaction*- und *feeding-mix* aufgeteilt. Für den *reaction-mix* wurden die benötigten Enzyme wie die Pyruvatkinase (0,08 mg ml<sup>-1</sup>) und die T7-RNA-Polymerase (15 U µl<sup>-1</sup>), die *E.coli*-tRNA (0,7 mg ml<sup>-1</sup>), *RiboLock* RNase Inhibitor (0,3 U µl<sup>-1</sup>), sowie 35 % (*m/v*) S30-Extrakt und 250 ng Plasmid-DNA hinzugegeben. Die Volumina wurden mit *Aqua bidest.* so aufgefüllt, dass sich ein Verhältnis von 1 ml *reaction-mix* zu 17 ml *feeding-mix* ergab. Der *reaction-mix* wurde mit einer 1 ml Spritze und 25 Gauge-Kanüle in eine Dialysekassette (10 kDa *cut-off*) überführt. Diese war von dem *feeding-mix* in einer Reaktionskammer umgeben. Die verschlossene Kammer wurde für 20 bis 24 h in einem bewegten Wasserbad bei 30 °C inkubiert. Der *reaction mix* wurde der Dialysekassette entnommen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß auf Eis überführt. Die Kassette wurde 1x mit 1 ml vom ersten Reinigungspuffer gespült. Die Mischung wurde zur Proteinfaltung 1 h auf Eis inkubiert. Das hergestellte Protein wurde anschließend gereinigt. Die einzelnen Reinigungsfraktionen wurden im Coomassie-Gel (3.2.3) oder Western Blot (3.2.5) abgebildet. Reinigungsfraktionen wurden vereinigt, aufkonzentriert und für strukturelle und funktionelle Charakterisierung weiterverwendet.



**Abbildung 3.5:** Zellfreie Proteinsynthese im Zwei-Kompartiment-System über eine semipermeable Membran.

### 3.6.3 Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Für die Aufreinigung der zellfrei hergestellten Proteine standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung. Eine davon ist die Affinitätsreinigung über den C-terminalen His<sub>10</sub>-tag. Dieser koordiniert über Nickelionen an Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarosekügelchen, wodurch zu

reinigendes Protein immobilisiert wird. Um PfFNT-Wildtyp oder PfFNTG107S wieder zu eluieren, wurde diese Koordination durch Zusatz von 20 – 500 mM Imidazol zum TRIS/HCl-Puffer (20 mM, TRIS, 150 mM NaCl, 0,05 % Brij® 78, pH 7,4) wieder gelöst. Für die Reinigung von zellfrei hergestelltem MSP1E3D1 wurde ein TRIS-HCl-Puffer (40 mM TRIS, 300 mM NaCl, pH 8,0) verwendet. Anschließend wurde ein TRIS-HCl-Puffer mit Zusatz von TritonX-100 (1 % (v/v)) und Cholsäure (50 mM) zum Waschen verwendet. Für die Reinigung wurde der TRIS-Puffer (40 mM TRIS, 300 mM NaCl, pH 8,0) mit 20 – 500 mM Imidazol versetzt. Es wurde sich an Rues *et al.* (2017) orientiert.

Eine 50 %-ige Ni<sup>2+</sup>-NTA-Suspension, welche 0,25 bis 0,33 Volumenanteilen des RM entsprach, wurde über eine Fritte mehrfach mit dem zur späteren Reinigung verwendeten TRIS-Puffer gewaschen, anschließend mit dem gleichen Volumen TRIS-Puffer wiederaufgenommen und mit dem zellfrei hergestellten Protein bei 4 °C über Nacht unter Rotation inkubiert. Am Folgetag wurde die Suspension auf eine Fritte überführt. Über dieser entstand so eine Matrixschicht. Der Durchfluss wurde wie alle folgenden Reinigungsfraktionen aufbewahrt. Zum Waschen der Matrix wurde das 20-fache des Säulenvolumens verwendet, die Elutionsfraktionen wurden mit dem fünffachen Säulenvolumen mit imidazolhaltigem TRIS-Puffers gespült. Der Imidazolgradient wurde hierbei von 20 mM beim Waschen auf 500 mM für die letzte Elutionsfraktion erhöht. Am Ende wurde die Matrix im gleichen Säulenvolumen wie die Elutionsfraktionen in TRIS-Puffer aufgenommen.

### 3.6.4 Strep-Tactin™-Reinigung PfFNTG107S

Eine andere Möglichkeit der Affinitätsreinigung stellt die Reinigung über einen Strep-tag dar. Hierbei wird die Affinität des Strep-tags zu Streptavidin ausgenutzt. Mit einem StrepII-tag versehene Mokolküle wurden über Strep-Tactin® beschichtete Sepharose® resins immobilisiert, während andere Bestandteile nicht zurückgehalten wurden. Hierbei wurde nach Herstellerangaben nach dem Protokoll *Gravity flow column-based protein purification* gearbeitet. Das für das Probenvolumen passende Säulenvolumen wurde auf eine Fritte überführt und mit dem zweifachen Säulenvolumen mit einem TRIS-HCl-Puffer (100 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05 % Brij 78, pH 7,6) gewaschen. Die Probe wurde für 5 min bei 18.000 g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand auf die Säulenmatrix gegeben. Der Durchfluss sowie alle Reinigungsfraktionen wurden aufbewahrt. Für die Waschfraktionen wurde fünfmal das einfache Säulenvolumen an TRIS-Puffer verwendet. Für die Elutionsfraktionen wurde sechsmal das halbe Säulenvolumen eines desthiobiotinhaltigen TRIS-Puffers (2,5 – 5 mM Desthiobiotin, 100 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,05 % Brij® 78, pH 7,6) verwendet. Alle Fraktionen wurden in der SDS-PAGE (3.2.3) mit anschließendem Western Blot (3.2.5) untersucht.

## 3.7 Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der zellfrei hergestellten Proteine

Für die funktionelle Charakterisierung zellfrei hergestellter Proteine wurden diese in Liposomen rekonstituiert und in einem Lichtstreuungsassay auf ihr Schwell- und Schrumpfverhalten unter osmotischem Substratdruck untersucht (3.5.2). Hierzu wurden zuerst Liposomen hergestellt, in die dann Membranproteine rekonstituiert wurden.

### 3.7.1 Herstellung Liposomen

In dieser Arbeit wurde nur mit biologischen Lipiden zur Herstellung von Liposomen gearbeitet. Verwendet wurden hier die Lipide des Avanti *E. coli*-Lipidextrakt, die im Weiteren nur als Lipide bezeichnet werden. Für die Herstellung von Liposomen wurde die erforderliche Menge an

Lipiden, die zu einer Konzentration von  $25 \text{ mg ml}^{-1}$  in Chloroform gelöst vorlagen, unter Stickstoffbegasung getrocknet. Hierbei wurde das Reagenzglas gleichmäßig auf Eis gedreht während von oben vorsichtig Stickstoff eingeleitet wurde. An der Reagenzglaswand entstand ein gleichmäßiger Lipidfilm. Dieser wurde für 6 h unter Anlegen des Hausvakuum von  $-450$  bis  $-600 \text{ mbar}$  zur vollständigen Entfernung von Lösemittelrückständen getrocknet. Anschließend wurde das Ausgangsvolumen mit einem HEPES-KOH-Puffer (20 mM HEPES, frisch 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 6,8) wieder hergestellt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch vorsichtiges Vortexen wurde der Lipidfilm resuspendiert. Anschließend wurden die Liposomen zu  $5 \text{ mg } 200 \mu\text{l}^{-1}$  aliquotiert, in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

### 3.7.2 Herstellung Proteoliposomen mit der Verdünnungsmethode

Zur Rekonstitution eines aufgereinigten (3.6.3; 3.6.4) und aufkonzentrierten Proteins (3.2.6) in Liposomen fand die Verdünnungsmethode Anwendung. Hierbei wird bei Zugabe eines deutlichen größeren Volumens wässrigen Puffers die CMC des Detergens, in welchem sich das Protein befindet, unterschritten. Dadurch löst sich das Protein aus der Detergens-Mizelle und wird in die Liposomenmembran rekonstituiert. Pro Ansatz wurde ein Liposomenaliquot (3.7.1) unter Zusatz von  $500 \mu\text{l}$  HEPES-KOH-Puffer (20 mM HEPES, frisch 2 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 6,8) auf Eis aufgetaut. Die Mischung aus Liposomen und HEPES-Puffer wurde mit  $1,65 \mu\text{l}$  15 % Brij<sup>®</sup> 78 in ein Glasgefäß überführt und für 90 min bei 20 bis  $25^\circ\text{C}$  im *Hotspot* eines Ultraschallbads inkubiert. Hierbei wurde darauf geachtet, dass eine Transluzenz der Mischung erreicht wurde. Im Anschluss wurden  $1,65 \mu\text{l}$  15 % Brij<sup>®</sup> 78,  $100 \mu\text{g}$  Protein zugegeben und mit HEPES-Puffer auf  $1000 \mu\text{l}$  aufgefüllt und gemischt. Bei Leerliposomen wurde das durch das Protein fehlende Volumen mit HEPES-Puffer und anteilig mit 15 % Brij<sup>®</sup> 78 ergänzt. Die Mischung wurde anschließend mit einer 21 Gauge-Kanüle in 25 ml HEPES-Puffer in einem Ultrazentrifugationsröhrchen injiziert. Hierbei wurde die CMC von Brij<sup>®</sup> 78 (0,0005 %) unterschritten. Die Mischung wurde für 30 min bei RT rotierend inkubiert und anschließend für 45 min bei  $140.000 g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das Pellet wurde mit  $600 \mu\text{l}$  HEPES-Puffer durch vorsichtiges Vortexen resuspendiert und zur Erzeugung von unilamelaren (Proteo)-Liposomen mit dem liposoFast<sup>®</sup> Extruder durch 21-fache Passage einer 200 nm-Membran extrudiert. Alle Ansätze wurden mit HEPES-Puffer auf die gleiche  $\text{OD}_{600}$  eingestellt.

### 3.7.3 Dichtegradientenzentrifugation

Zur Überprüfung der erfolgreichen Rekonstitution des Zielproteins in Liposomen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Zunächst wurden  $350 \mu\text{l}$  60%-ige Saccharose-Lösung in einem Zentrifugationsröhrchen (*Seton open-top centrifuge tubes polyclear<sup>®</sup>*, 11 x 60 mm) mit  $350 \mu\text{l}$  Liposomenpräparation gemischt. Anschließend wurden jeweils  $700 \mu\text{l}$  Saccharose Lösungen in absteigender Konzentration (25 %, 20 %, 15 %, 5 %, 0 %) mit einem oben schwimmenden Korkstück übereinandergeschichtet. Der Kork wurde entfernt und die Gefäße mit HEPES-KOH-Puffer (20 mM, frisch 2mM  $\beta$ -Mercaptoethanol, pH 6,8) ohne Saccharose-Zusatz austariert. Die einzelnen Schichten wurden nach 6 h Zentrifugation bei  $4^\circ\text{C}$  und  $164.000 g$  in einem *Swing-Rotor* (Beckmann<sup>™</sup> SW60Ti, Serie E16601) in Eppendorfgefäße überführt, aufkonzentriert (3.2.8) und mittels SDS-PAGE (3.2.2) und Western Blot untersucht (3.2.5).

### 3.7.4 Herstellung Lipid-Protein-NDs mit zellfrei hergestelltem Zielprotein

Die Herstellung der NDs erfolgte in Anlehnung an die von Christian Hansen im Rahmen seiner Masterarbeit etablierten Methode. Diese Methode ist angelehnt an Bayburt *et al.*, (2002); Denisov & Sligar, (2016, 2017). Das aufgereinigte und aufkonzentrierte Protein der zellfreien Proteinsynthese (3.6.2), Lipide (50 mM DOPG in 10% DPC) und das membrane scaffold protein wurden im Verhältnis 1:60:2,5 gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Dialyse in einer Dialysekassette mit semipermeabler Membran über Nacht bei 4 °C gegen einen TRIS-HCl-Puffer (10 mM TRIS, 100 mM NaCl, pH 7,7). Der Dialysepuffer wurde nach 2 h gewechselt. Am Folgetag wurde die Mischung entnommen und in einem 100 kDa *cut-off* Amicon®-Zentrifugierfilter bei 4 °C und 2000 g auf 500 µl Gesamtvolumen aufkonzentriert. Im Anschluss wurde bei 4 °C und 10.000 g für 10 min zentrifugiert, um präzipitierte Bestandteile vor der Aufgabe in das *size-exclusion*-Chromatographiesystem abzutrennen. Die Fraktionen der SEC wurden gesammelt und einer Western Blot Analytik unterzogen.

## 3.8 Bioinformatische Methoden

### Alignments

Die Primärsequenzen der Proteine wurden nach einem *basic local alignment search tool* (*blast*), das auf einer Rückübersetzung einer Aminosäuresequenz in eine Nukleotidsequenz (*tblastn*) basierte der NCBI-Proteindatenbank Sayers *et al.*, (2022) entnommen. Die Ausgangsaminosäuresequenz war hierbei die des im Arbeitskreis gut untersuchten PfFNT. Datengrundlage war die *Reference RNA sequences (refseq\_rna) Database*. Über das Datenbank-Alignment wurden partial mRNA-Sequenzen gefunden. Die Algorithmus-Parameter waren hierbei wie folgend beschrieben. Über generelle Parameter wurde eine maximale Trefferanzahl der Suche auf 1000 festgelegt. Bakterien und Algen wurden von der Suche exkludiert. Die Signifikanzschwelle (Karlint & Altschult, 1990) wurde auf 0,05 gelegt. Die Wortgröße, die für die Übereinstimmung zugrunde liegt, wurde auf 5 gesetzt. Als Bewertungsgrundlage wurde eine BLOSUM62-Matrix ausgewählt, sie vergibt eine Punktzahl für jedes mögliche Alignment von Aminosäurepaaren in diesem Fall. Als Lückenkosten der Matrix wurden für die Entstehung 11 und für Verlängerung 1 festgelegt. Als Methode der Matrix-Anpassung wurde eine bedingte kompositorische Anpassung zugrunde gelegt (*Conditional compositional score matrix adjustment*). Weitere Alignments wurden mit den erhalten Sequenzen mit *MegAlign* nach der *ClustalW*-Methode durchgeführt und ggf. manuell bearbeitet. Die Darstellung der Alignments erfolgte mit T<sub>E</sub>Xshade im *similarity shading mode* (Beitz, 2000a).

### Proteinmodelle

Proteinstrukturen wurden von der *Protein Data Bank* (Berman *et al.*, 2000) übernommen und mit *Chimera* oder *PyMol* dargestellt. Mit den gegebenen *software tools* wurden bestimmte Bereiche des Zielproteins hervorgehoben, mutiert und zur Veranschaulichung separat dargestellt. Noch nicht gelöste Strukturen wurden anhand ihrer Sequenz mit *SWISS-MODEL* (Benkert *et al.*, 2011; Bertoni *et al.*, 2017; Bienert *et al.*, 2017; Guex *et al.*, 2009; Mariani *et al.*, 2013; Studer *et al.*, 2014, 2020, 2021; Waterhouse *et al.*, 2018) erstellt.

## Topologie Plots

Topologie Plots wurden mit T<sub>E</sub>Xtopo (Beitz, 2000b) erstellt. Die verwendeten Befehle zur Erstellung einer FNT-spezifischen Topologie wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Eric Beitz zur Verfügung gestellt.

### 3.9 Determinierung der EC<sub>50</sub>-Werte in *N. fowleri*-Trophozoiten

Die Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte wurde im Arbeitskreis von Anjan Debnath (PhD, MAS) an der University of California, Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences durchgeführt. Die Substanzen, die freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden, wurden im Arbeitskreis im Rahmen anderer Doktorarbeiten von Björn Henke synthetisiert. Substanzen mit dem Kürzel „CN“ wurden von Cornelius Nerlich im Rahmen seiner Doktorarbeit synthetisiert und auf ihre Wirksamkeit gegenüber *P. falciparum* untersucht. Die Bestimmung der EC<sub>50</sub>-Werte erfolgte in Anlehnung an Debnath *et al.*, 2020. Die Methode in Kürze beschrieben beinhaltet folgende Durchführung: Der verwendete europäische *N. fowleri* Stamm KUL wurde von der *American Type Culture Collection* erworben (#30808). Für den Assay wurden Mäuse regelmäßig mit dem Parasiten infiziert und die hoch infektiösen Trophozoiten aus den Mäusehirnen gewonnen und dann 48 h in *Nelson's Medium* unter Zusatz von 10 % FBS bei 37 °C gehalten, bevor sie in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und die Inhibitor-Testung durchgeführt wurde. Die getesteten Inhibitoren lagen mit einer Konzentration von 10 mM als DMSO *stocks* vor, die für eine erste Testung auf 50 µM verdünnt wurden. Die Trophozoiten wurden mittels eines Hemocytometers gezählt. Es wurden jeweils 0,5 µl Inhibitor als Triplikat auf eine 96-well Greiner Bio-One Cellstar white, flat bottom microplate transferiert. Und mit 10.000 Trophozoiten in 99,5 µl *Nelson's Medium* vermischt. Die Platte wurde für 48 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am Ende wurde die Entstehung von ATP-Biolumineszenz mittels eines *CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay* von Promega ermittelt. Die Lumineszenz wurde über *EnVision 2104 Multilabel Reader* (PerkinElmer) quantifiziert. Die Daten wurden von der Arbeitsgruppe um Anjan Debnath mit *GraphPadPrism 6* ausgewertet und auf Wachstumshemmung überprüft. Lag eine Wachstumshemmung von über 99 % vor, so wurden in einem zweiten Experiment die Inhibitoren so verdünnt, dass Verdünnungen bis zu 0,078 mM oder 0,0003 mM erreicht wurden. Der Assay wurde wie oben beschrieben durchgeführt und die EC<sub>50</sub>-Werte mit *GraphPadPrism 6* ermittelt.

### 3.10 Fluoreszenz-Cross-Korrelations-Spektroskopie

Die FCCS-Untersuchungen wurden im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Frank Becker und Stefan Hannus der Intana Bioscience GmbH in München durchgeführt und die Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Für die FCCS von *S.cerevisiae*-Mikrosomen wurden diese an der CAU in Kiel präpariert (3.3.6) und nach zweimaliger Zentrifugation bei 100.000 g in pelletierter Form zur weiteren Untersuchung nach München geschickt. Dort wurden die Mikrosomen von Stefan Hannus angelehnt an Jakobowska *et al.*, (2021) untersucht. Alle Experimente mit HEK-Zellen wurden von Kerrin Hansen durchgeführt.

### 3.11 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit technischen Duplikaten oder Triplikaten erhoben. Die Anzahl der biologischen Replikate ist bei dem jeweiligen Experiment gekennzeichnet. Der Fehler ist angegeben als Standardfehler des Mittelwertes unter Berücksichtigung der Anzahl an biologischen und technischen Replikaten. Wurden keine biologischen Replikate vermessen bezieht sich der Fehler auf die technischen Replikate. Die Bestimmung der Fehler von Raten erfolgte über die Abweichung der einzelnen Werte vom Mittelwert. Bei der Bestimmung der

## Methoden

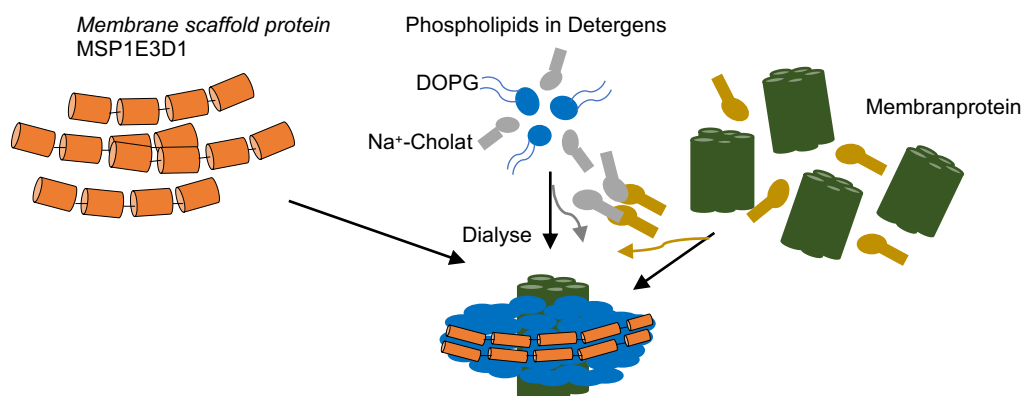
IC<sub>50</sub>-Werte wurden biologische und technische Replikate aufgenommen und jeweils die Mittelwerte normalisiert auf 100 % Aktivität. Der Standardfehler des Mittelwertes wurde in Prozent bezogen auf den normalisierten Wert angegeben.

## 4 Ergebnisse

Kurz nach Beginn dieser Arbeit wurde die erste Struktur von PfFNT (Lyu *et al.*, 2021) und kurze Zeit später eine zweite Struktur mit gebundenem MMV007839 (Peng *et al.*, 2021) veröffentlicht. Zunächst wurde die Aufklärung der Struktur der Resistenzmutante G107S (Walloch *et al.*, 2020) des plasmoidalen Laktattransporters mit gebundenem Inhibitor BH267.meta angestrebt. Zur Vermeidung und Umgehung von Resistenzen hat das Verständnis dieser und ihrer Effekte auf die Bindung von *small molecules* einen hohen Stellenwert für das spätere Wirkstoffdesign. Die Probenaufarbeitung für bildgebende Verfahren wie Transmissionselektronenmikroskopie und Cryo-Elektronenmikroskopie wurde von Christian Hansen durchgeführt. Hierfür sollten sich NDs zunutze gemacht werden, die als Lipiddoppellayer eine für ein Membranprotein natürliche Umgebung nachahmen (Denisov & Sligar, 2016). Zu Beginn dieser Arbeit wurde sich auf das zellfrei hergestellte Protein im Kontext der Strukturaufklärung konzentriert. In diesem Zusammenhang war außerdem der Nachweis der Funktionalität des zellfrei hergestellten Membranproteins von Bedeutung. Hierzu wurde das zellfrei hergestellte Protein in Proteoliposomen untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurde sich vor dem Hintergrund der FNT als potenzielles *Drug Target* mit weiteren FNT eukaryotischer humanpathogener Parasiten mit besonderem Fokus auf *N. fowleri* beschäftigt.

### 4.1 Zellfreie Proteinsynthese und ND-Assemblierung mit dem Ziel der Strukturaufklärung von PfFNTG107S

Mit dem Ziel der Strukturaufklärung wurde PfFNTG107S zellfrei im präparativen Maßstab hergestellt (3.6.2), über den C-terminalen His<sub>10</sub>-tag Affinität gereinigt (3.6.3) und im Anschluss in MSP1E3D1-DOPG-NDs rekonstituiert (3.7.4). Die ND-Assemblierung erfolgte in Anlehnung an (Rues *et al.*, 2017). Die folgenden Ergebnisse wurden in Zusammenarbeit mit Christian Hansen erzielt. Das *membrane scaffold protein* wurde aus *E. coli* oder zellfrei gewonnen und in einem definierten Verhältnis (3.7.4) mit DOPG in DPC und dem zellfrei hergestelltem Protein in Brij® 78 versetzt und gegen einen salzhaltigen Dialysepuffer dialysiert. Das Prinzip der posttranslationalen Rekonstitution eines Membranproteins in NDs ist in **Abbildung 4.1** schematisch dargestellt.

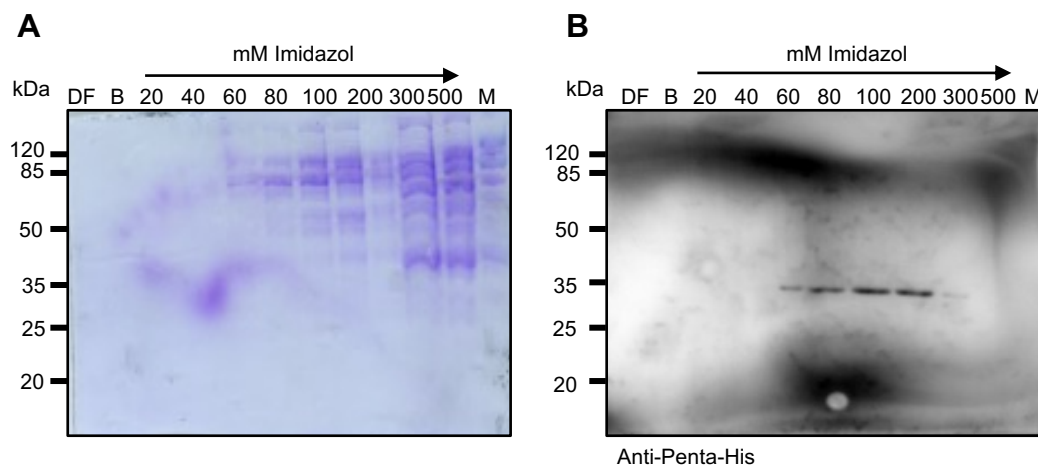


**Abbildung 4.1:** Prinzip der posttranslationalen ND-Assemblierung durch *membrane scaffold* Proteine (orange) und Phospholipide (blau) in Na<sup>+</sup>-Cholat (grau) mit einem Membranprotein (grün) aus der zellfreien Proteinsynthese in Detergenzien (ocker). Tatsächliche Größenverhältnisse wurden in der Abbildung nicht berücksichtigt.

#### 4.1.1 Herstellung und Reinigung des *membrane scaffold protein* MSP1E3D1

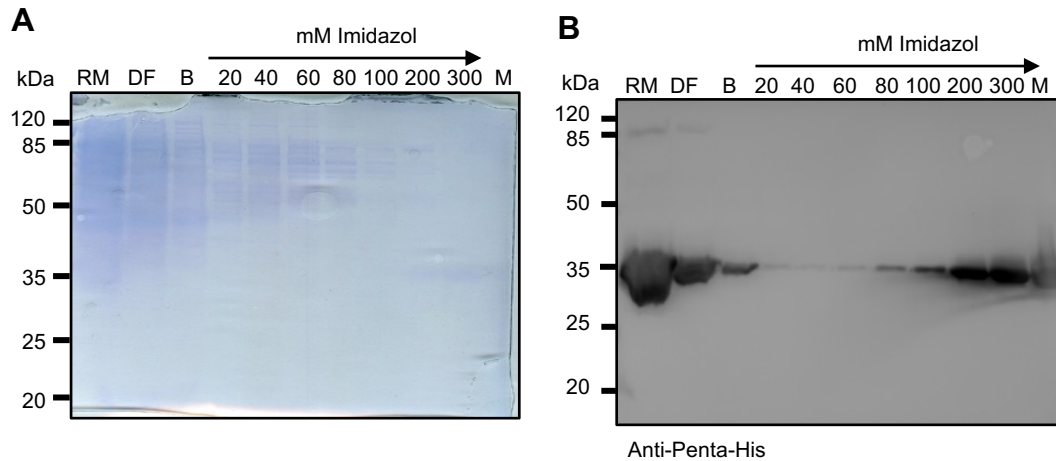
##### 4.1.1.1 Zellfreie Herstellung von MSP1E3D1

Zuerst wurde MSP1E3D1 mit Hilfe des pET-28a(+) Vektors zellfrei hergestellt (3.6.2). Die Coomassie-Färbung nach der Ni<sup>2+</sup>-Affinitätsreinigung (3.6.3) von zellfrei hergestelltem His<sub>10</sub>-MSP1E3D1 zeigte keinen Reinigungserfolg (**Abbildung 4.2 A**). In den Elutionsfraktionen 60 bis 200 mM Imidazol wurde ein Muster vieler unspezifischer Banden detektiert. (**Abbildung 4.2 A**). Die berechnete Masse des Proteins lag bei 31 kDa. Im Western Blot wurden einzelne Banden in den Reinigungsfraktionen von 60 bis 200 mM Imidazol detektiert, die mit einer Laufhöhe von ca. 33 kDa auf der für das Zielprotein zu erwartenden Höhe in der SDS-PAGE migrierten (**Abbildung 4.2 B**). In den restlichen Elutionsfraktion der Reinigung wurde kein Protein detektiert.



**Abbildung 4.2:** Zellfreie Herstellung und Reinigung von MSP1E3D1 im pET-28a(+)-Vektor. (A) Coomassie®-Brillant-Blau-Färbung des SDS-PAGE Gels (12,5%). (B) Western Blot. Die Detektion erfolgte mittels eines Anti-Penta-His-Primärantikörpers. Belichtung: 28 min. Auftragsmenge: 15 µl Reinigungsfraction. Säulenvolumen: 175 µl. DF: Durchfluss, B: MSP-Puffer B (40 mM TRIS, 300 mM NaCl, 50 mM Cholsäure, pH 8,0), M: Säulenmatrix.

Im nächsten Schritt wurde aufgrund der geringen Ausbeute und nicht zufriedenstellenden Reinigung, auf den für die zellfreie Proteinsynthese optimierten pIVEX2.3w-Vektor gewechselt. Der Reaktionsansatz wurde auf 0,5 ml halbiert. Es wurde eine Ausbeute von 100 µg ml<sup>-1</sup> gereinigtes Protein erreicht. Es wurden einzelne, wenn auch schwache Banden, in der 300 mM Imidazol Fraktion und auf der aufgetragenen Säulenmatrix detektiert. Das Zielprotein wurde erfolgreich gereinigt (**Abbildung 4.3 A**). In der Western Blot-Analytik wurden trotz geringer Gesamtproteinmenge Banden von starker Intensität gefunden. Es wurde eine Zunahme der Bandenintensität mit steigender Imidazolkonzentration beobachtet. Die im Coomassie-gefärbten Gel schwache Bande in der 300 mM Imidazolfraction wurde im Western Blot mit starker Intensität gefunden (**Abbildung 4.3 B**).



**Abbildung 4.3:** Zellfreie Herstellung und Reinigung von MSP1E3D1 in pIVEX2.3w. (A) Coomassie®-Brillant-Blau-Färbung des SDS-PAGE Gels (12,5%). (B) Western Blot. Die Detektion erfolgte mittels eines Anti-Penta-His-Primärantikörpers. Belichtung: 3,35 min. Auftragsmenge: 15 µl Reinigungsfraction. Säulenvolumen: 150 µl. RM: *reaction mix*. DF: Durchfluss, M: Säulenmatrix.

## 4.1.2 Zellfreie Proteinsynthese von PfFNTG107S

Im nächsten Schritt wurde sich auf die Produktion und Reinigung des zellfreien Zielproteins PfFNTG107S konzentriert. Die für PfFNTG107S codierende DNA im hefekompatiblen pDR196-Vektor mit zusätzlichen *tags* wurde freundlicherweise von Dr. Jana Schmidt zur Verfügung gestellt und der für PfFNTG107S codierende Abschnitt mittels der Restriktionsendonukleasen *SpeI* und *XhoI* aus dem Hefevektor in den für die zellfreie Proteinsynthese konzipierten Vektor pIVEX2.3w kloniert. Die Ergebnisse der Coomassie-Färbung (3.2.3) und Western Blot-Analytik (3.2.5) nach der IMAC von zellfrei hergestelltem PfFNTG107S (3.6.3) sind **Abbildung 4.4** zu entnehmen. Die berechnete Masse von PfFNT beträgt 34,5 kDa. Im Coomassie gefärbten Gel wurden intensive Banden knapp unter 35 kDa auf der erwarteten Laufrhöhe in der SDS-PAGE für das monomere PfFNTG107S in den Reinigungsfractionen von 60 bis 300 mM Imidazol detektiert. Knapp über 60 kDa und zwischen 80 und 120 kDa wurden Banden detektiert, die die erwartete Größe des Dimers mit ca. 68 kDa und des Trimers mit ca. 102 kDa von PfFNTG107S aufwiesen. Im Durchfluss und bei den niedrigeren Imidazolkonzentrationen war ein zusätzliches Bandenmuster sichtbar, welches vermutlich dem ribosomalen S30-Extrakt aus *E. coli* zugeordnet werden kann. Ein ähnliches Bild ergab sich im Western Blot mit Detektion gegen den C-terminal befindlichen His<sub>10</sub>-tag.

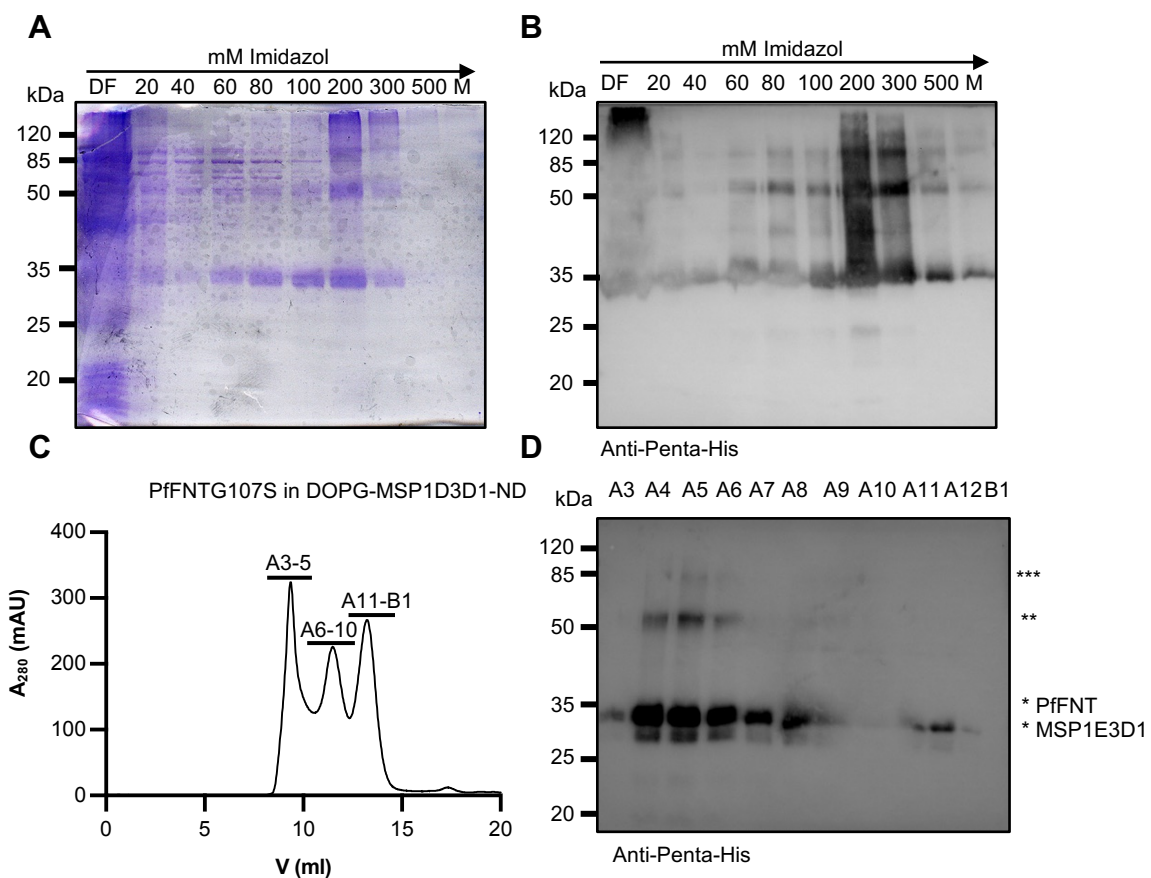
Nach erfolgreicher Herstellung und Reinigung wurde PfFNTG107S posttranslational in NDs rekonstituiert. Die Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt aufgeführt.

### 4.1.2.1 Posttranslationale Rekonstitution von zellfreiem PfFNTG107S in NDs

In der Coomassie-Färbung nach der Reinigung und im Western Blot des weiter aufbereiteten zellfreien Proteinproduktionsansatzes wurden in den 200 und 300 mM Imidazol-Reinigungsfractionen Banden über 120 kDa detektiert. Der Größe nach könnte es sich um Pentamere mit ca. 170 kDa handeln (**Abbildung 4.4 A und B**). Das aufkonzentrierte zellfrei hergestellte PfFNTG107S, die Lipide (50 mM DOPG in 10 % DPC) und das MSP1E3D1 wurden im Verhältnis 1:60:2,5 gemischt und bei Raumtemperatur inkubiert, dialysiert und zur Abtrennung von Präzipitaten zentrifugiert (3.7.4). Im Anschluss an die posttranslationale Rekonstitution des zellfrei hergestellten PfFNTG107S in MSP1E3D1-DOPG-NDs wurde eine Größenausschlusschromatographie (**Abbildung 4.4 C**) durchgeführt. Bei einem Elutionsvolumen von ca. 8 ml trat ein Aggregatpeak auf. Zwei weitere Peaks waren bei einem

## Ergebnisse

Elutionsvolumen von ca. 11 bis 12 ml und 13,5 ml zu sehen. Anschließend wurden die gesammelten Fraktionen einzeln mittels Western Blot-Analytik (**Abbildung 4.4 D**) untersucht. Es wurden PfFNTG107S-Monomer-, Dimer- und Trimerbanden sowie MSP1E3D1 im Western Blot detektiert. Die obere Bande im Bereich zwischen 25 und 35 kDa wurde dem PfFNTG107S-Monomer zugeordnet, da eine Bande auf dieser Höhe nach Reinigung des Proteins ebenfalls detektiert wurde. Mit Zunahme des Elutionsvolumens nahm die Intensität der Oligomerbanden von PfFNTG107S ab. Es waren keine Pentamerbanden im Anschluss an die ND-Assemblierung und Größenausschlusschromatographie zu detektieren. Die Annahme, dass im letzten Peak ungefüllte NDs vorlagen, wurde nach dem Western Blot nicht bestätigt, da im Verhältnis deutlich weniger MSP1E3D1 zu detektieren war als in den vorangegangenen Fraktionen. Dem Western Blot nach handelte es sich um monomeres PfFNT. Die Größenausschlusschromatographie und der Western Blot deuteten auf das Vorliegen einer inhomogenen Probe hin.

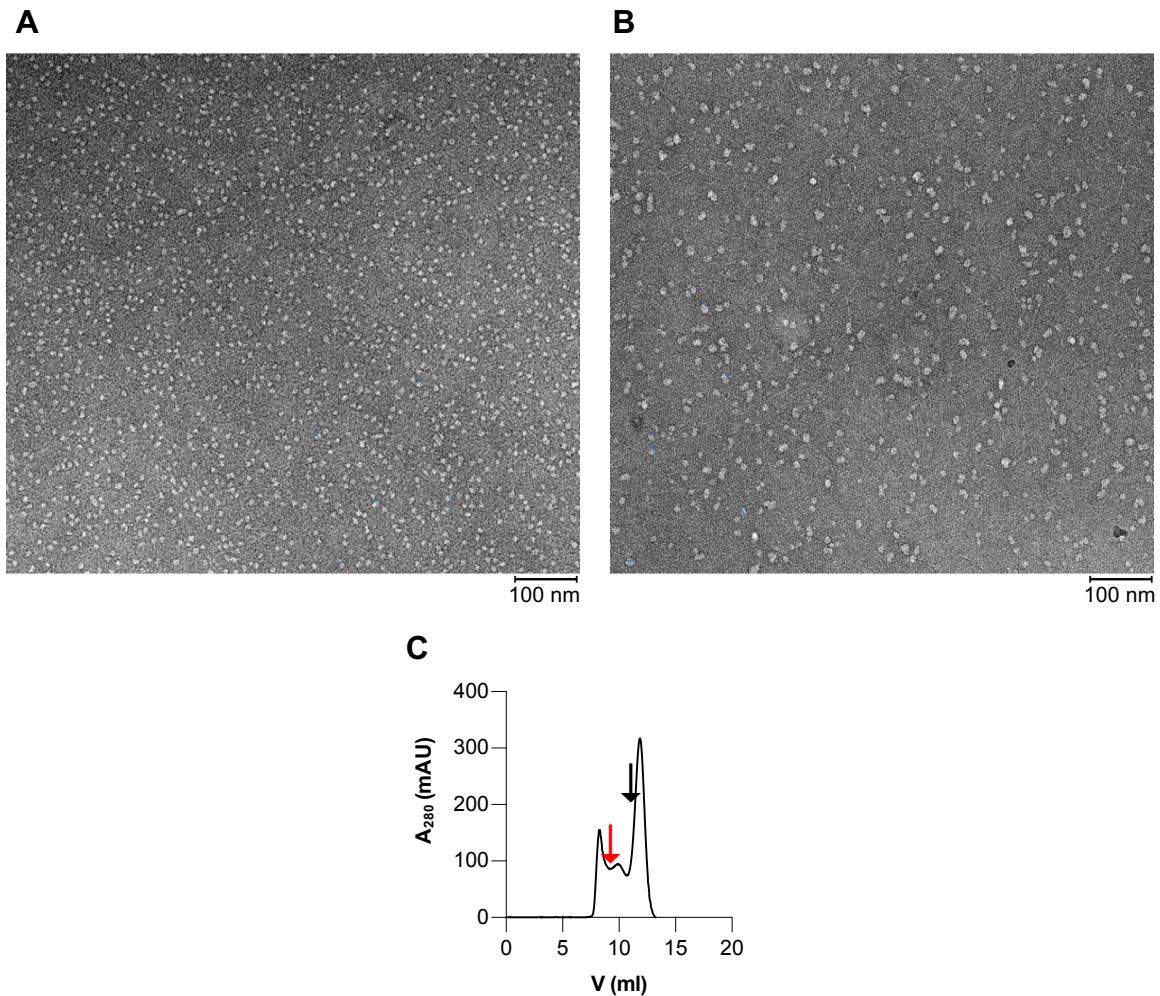


**Abbildung 4.4:** Inprozesskontrollen der ND-Assemblierung von zellfrei hergestelltem PfFNTG107S. (A) Coomassie®-Brillant-Blau-Färbung der SDS-PAGE (12,5%) nach Ni<sup>2+</sup>-NTA-Reinigung. (B) Western Blot der Reinigungsfractionen. Belichtung: 1 min. Auftragsmenge: mind. 1 µg Gesamtprotein pro lane. (C) Elutionsprofil nach Größenausschluss-Chromatographie (Flussrate 0,5 ml/min) von zellfreiem PfFNTG107S in DOPG-MSP1E3D1-NDs. (D) Western Blot der Elutionsfraktionen der Größenausschlusschromatographie. Aufgetragen sind jeweils 15 µl der Elutionsfraktion. Belichtung: 5 min. DF: Durchfluss, M: Säulenmatrix. \*\* Dimere, \*\*\* Trimere.

### 4.1.3 Versuche zur Strukturaufklärung von zellfreiem PfFNTG107S

#### 4.1.3.1 Transmissionselektronenmikroskopie

In Vorbereitung auf Kryo-EM (Cheng, 2015) wurden zur Beurteilung der Homogenität der Probe TEM-Aufnahmen generiert. Die Aufnahmen wurden am Anatomischen Institut der CAU Kiel von Dr. Philipp Arnold in Anlehnung an Arnold *et al.* (2014) aufgenommen. Dabei wurden die Proben auf ein Kupfergitter, das mit einem Kohlefilm überzogen war, aufgetragen und im Anschluss mit einer Uranylacetat-Lösung benetzt. Dies bewirkte, dass sich die Metallatome als Matrix um die zu mikroskopierenden Partikel legen (Kiselev *et al.*, 1990). TEM-Aufnahmen aus Hajek *et al.* (2019) erlaubten Aussagen über die Partikelgröße und -form sowie über den Oligomerisierungszustand von PfFNT, wobei die Auflösung meist auf 20 Å begrenzt ist (Kiselev *et al.*, 1990). In der TEM erscheinen Proteine aber auch Detergenzien durch die Probenvorbereitung hell auf dunklem Untergrund. Es wurden Fraktionen aus dem Beginn des zweiten und letzten Elutionspeak der SEC untersucht (**Abbildung 4.5 C**). Die Größenbestimmung fünf willkürlich ausgewählter Partikel ergab ein Durchmesser von  $9,5 \pm 2,9$  nm für Partikel des letzten Peaks (**Abbildung 4.5 A**) und  $11,0 \pm 3,6$  nm (**Abbildung 4.5 B**) für Partikel des zweiten Peaks. Vergleicht man die TEM-Aufnahmen mit dem Western Blot (**Abbildung 4.4 C**), so bestätigt sich die Annahme, dass es sich beim letzten Peak um PfFNT -vermutlich in Detergens- handelte, wobei eine Oligomerisierung nicht erkennbar war. Bei den größeren Partikeln handelte es sich um eine Mischung gefüllter und ungefüllter NDs. Es wurden weitere Experimente mit PfFNTG107S-GFP Fusionsproteinen und größeren MSP2N2-NDs durchgeführt, um die Fragestellung zu klären, ob PfFNTG107S in korrekter Faltungsform vorliegt. Das *membrane scaffold protein* MSP2N2 wurde gewählt, da es die Ausbildung größerer NDs (Grinkova *et al.*, 2010) ermöglicht. MSP1E3D1 bildet theoretisch NDs mit einem Durchmesser von 12-14 nm (Puthenveetil & Vinogradova, 2013) aus. Diese waren damit rein rechnerisch für das PfFNT-Pentamer mit einem Durchmesser von 8 nm und einer Höhe von 5 nm ausreichend und wurden von (Lyu *et al.*, 2021) zur Strukturaufklärung von PfFNT genutzt.



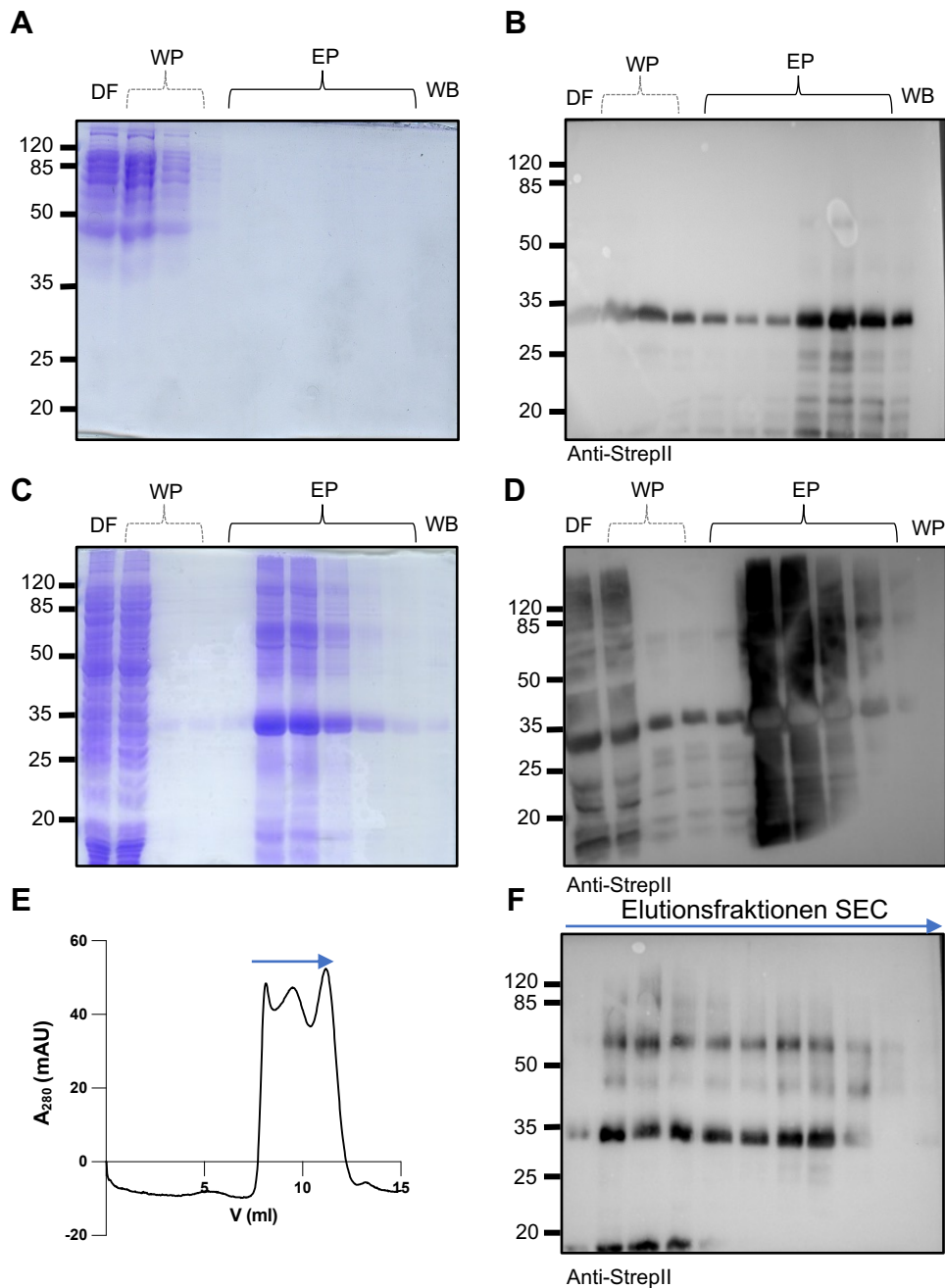
**Abbildung 4.5:** TEM-Aufnahmen und Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie von zellfreiem PfFNTG107S in DOPG-MSP1E3D1-NDs. Die TEM-Aufnahmen wurden von Dr. Philipp Arnold gemacht. (A) PfFNTG107S in Detergens und (B) in DOPG-MSP1E3D1-NDs. (C) Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie von PfFNTG107S in DOPG-MSP1E3D1-NDs. Schwarzer Pfeil: Elutionsfraktion von (A). Roter Pfeil: Elutionsfraktion von (B). Der Skalierungsbalken zeigt 100 nm.

#### 4.1.3.2 Strep-Tactin®-Reinigung von zellfreiem PfFNTG107S mit dem Ziel der Trennung von gefüllten und ungefüllten NDs

Die Trennung der gefüllten und ungefüllten NDs mittels Strep-Tactin®-Reinigung als Alternative zur Größenausschlusschromatographie wurde zunächst angestrebt, nachdem festgestellt wurde, dass sich ungefüllte und gefüllte NDs in der Größenausschlusschromatographie wider Erwarten ähnlich verhielten bzw. eine Trennung nicht möglich war. Diese Annahme wurde durch weitere Cryo-EM-Aufnahmen von Christian Hansen in Zusammenarbeit mit Jan-Hannes Schäfer (Universität Osnabrück) bestärkt. Hierzu wurde zunächst der N-terminal befindliche HA-tag mittels Klonierung gegen einen StreptII-tag ausgetauscht und Versuche zur Affinitätsreinigung mittels Strep-Tactin™ (3.6.4) des zellfrei hergestellten PfFNTG107S unternommen. Die zellfreie Proteinsynthese von PfFNTG107S nach Einführung eines N-terminalen StreptII-tags ergab mit ca. 125 µg gereinigtem Protein in der Elutionspuffer (EP)-Fraktion eine geringe Proteinausbeute mit geringem Reinigungserfolg ( $CV = 0,25$  ml mit einer Bindungskapazität von  $3 \text{ mg ml}^{-1}$ ). Es wurden Fragmente unterhalb von 25 kDa in der SDS-Page im Western Blot detektiert (**Abbildung 4.6 A und B**). Die Einführung eines *linkers* von 42 Basenpaaren zwischen den N-terminalen StreptII-tag und

## Ergebnisse

PfFNTG107S verbesserte in Kombination mit erhöhtem Säulenvolumen ( $CV = 0,5$  ml mit einer Bindungskapazität von  $3 \text{ mg ml}^{-1}$ ) den Reinigungserfolg (**Abbildung 4.6 C und D**).



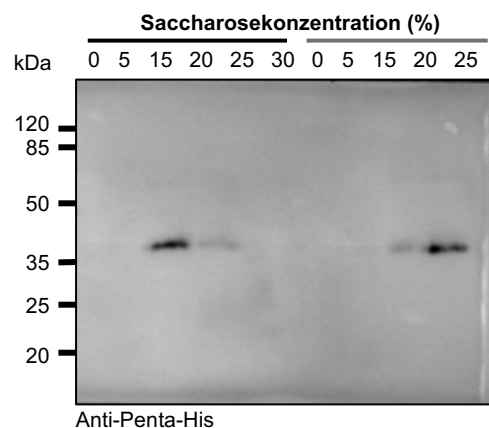
**Abbildung 4.6:** Repräsentative StreptII-Reinigung. StreptII-PfFNTG107S (A) Coomassie-Färbung eines reduzierten zellfrei Ansatzes (RM: 0,5 ml, CV: 0,25 ml) und (B) Western Blot. Auftragsmenge: ca. 5  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein. Belichtung: 30 s. StreptII-linker-PfFNTG107S (C) Coomassie-Färbung zellfrei Ansatz. RM: 0,5 ml. CV: 0,5 ml (D) Western Blot. Auftragsmenge: 0,7  $\mu\text{g}$  (WP) bis 44  $\mu\text{g}$  (DF) Gesamtprotein. Belichtung: 90 s. (E) SEC StreptII-linker-PfFNTG107S in 0,05 Brij® 78. (F) Western Blot nach SEC. Auftragsmenge: 20 bis 30  $\mu\text{l}$  Reinigungsfraction 1:1 mit Puffer verdünnt. Belichtung 2 min. DF: Durchfluss. EP: Elutionspuffer. WP: Waschpuffer.

Die Gesamtausbeute mit 360  $\mu\text{g}$  gereinigtes Protein aus der EP-Fraktion wurde ebenfalls erhöht. Der Reinigungserfolg konnte mittels SEC nicht erhöht werden. Es wurde aggregiertes Protein im ersten Elutionspeak detektiert. Potenzielle Pentamere, die evtl. durch die hohe Signalintensität in **Abbildung 4.6 D** überlagert wurden, wurden nach der SEC mit geringerer

Auftragsmenge nicht detektiert. Die Strep-Tactin®-Reinigung wurde nicht weiter optimiert, da zu diesem Zeitpunkt der Arbeit die ND-Assemblierung zur Strukturaufklärung nicht weiter verfolgt wurde.

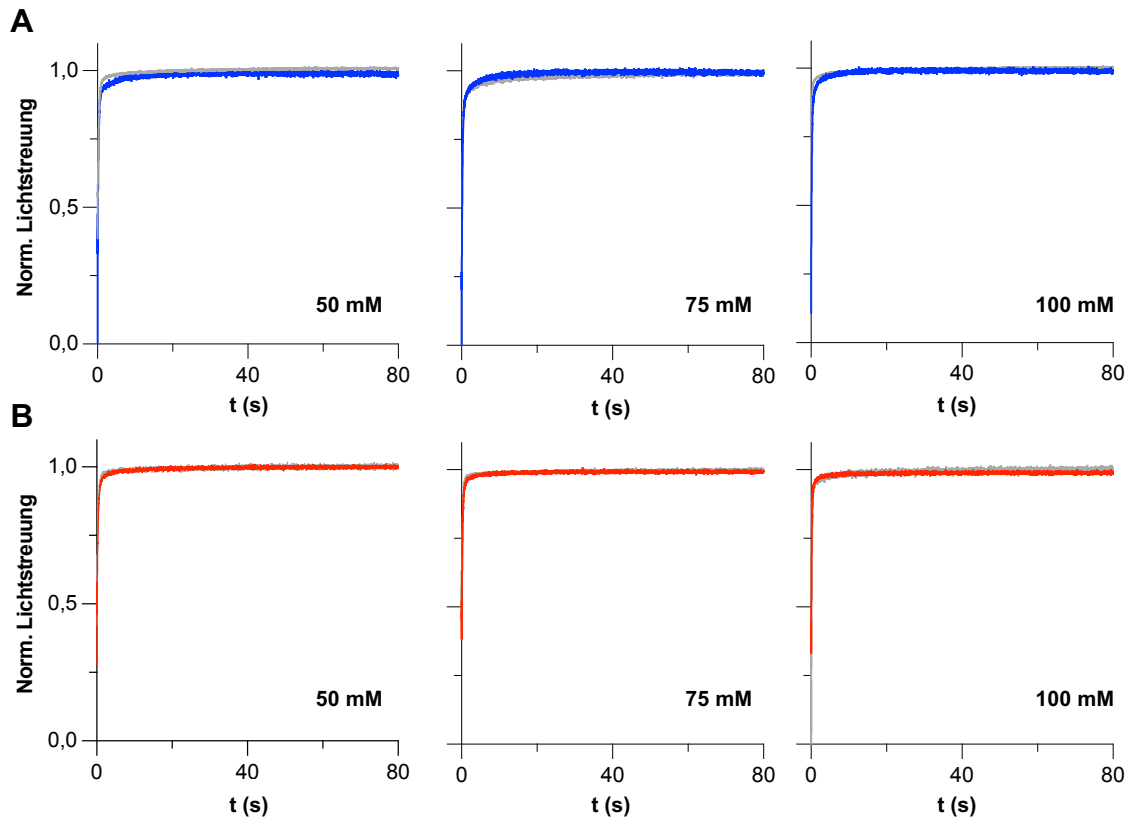
### 4.1.3.3 Rekonstitution von PfFNTG107S in Proteoliposomen

Proteoliposomen als Lipidvesikel, die eine Kompartimententrennung ähnlich einer biologischen Membran bewirken, stellen ein System dar, um den transmembranären Transport von Membranproteinen zu untersuchen (Sejwal *et al.*, 2017). Das zellfrei hergestellte Protein PfFNTG107S (3.6.2) wurde nach der Reinigung (**Abbildung 4.4 A**) und Aufkonzentrierung (3.2.6) in Liposomen (3.7.1) rekonstituiert (3.7.2). Der Erfolg der Rekonstitution wurde mittels DGZ überprüft (3.7.3). Erfolgreich rekonstituiertes Protein wurde in der 15 – 25 %-Saccharoseschicht mittels Western Blot-Analytik nachgewiesen. Zellfrei hergestelltes PfFNTG107S wurde in Proteoliposomen rekonstituiert (**Abbildung 4.7**). Im Nachweis der Rekonstitution wurden ausschließlich Monomere im Western Blot detektiert.



**Abbildung 4.7:** Exemplarisch dargestellter Western Blot der DGZ nach der Rekonstitution von zellfreiem PfFNTG107S in Proteoliposomen. Aufgetragen sind 15 µl proteinhaltige PBS-Lösung nach der TCA-Fällung. Belichtung: 90 s.

Die Funktionalität von in *S. cerevisiae* hergestelltem PfFNTG107S wurde bereits in einem <sup>14</sup>C-basierten Transportassay gezeigt (Golldack *et al.*, 2017). Für die Überprüfung der Funktionalität des zellfrei hergestellten und in Proteoliposomen rekonstituierten PfFNTG107S wurden die Proteoliposomen an der *stopped flow*-Apparatur auf ihr Schrumpf- und Schwellverhalten gegenüber eines hypersomolaren Substratpuffers untersucht. Hierzu wurden die Proteoliposomen im Verhältnis 1:1 mit hypersomolarem Substratpuffer mit einem Gradienten von 50 – 100 mM in einer Küvette gemischt. Die Veränderung der Größe der Proteoliposomen im Vergleich zu Liposomen ohne Protein über die Zeit wurde über die Streulichtintensität dokumentiert. Für PfFNTG107S wurde in Proteoliposomen kein pH-abhängiger Transport von Formiat/H<sup>+</sup> gefunden (**Abbildung 4.8**). Auch in Proteoliposomen mit zellfrei hergestelltem PfFNT-Wildtyp wurde kein Transport gemessen. Vor diesem Hintergrund wurde im weiteren Verlauf der Arbeit auf zellbasierte Expressionssysteme zurückgegriffen.



**Abbildung 4.8:** Normalisiertes Schwellverhalten von PfFNTG107S-Proteoliposomen und Leerliposomen gegenüber einem hyperosmotischen Substratpuffer. (A) Normierte Lichtstreuung der Proteo- (blau) und Leerliposomen (grau) gegenüber einem Substratgradienten von 50, 75 und 100 mM Na-Formiat bei pH 6,8 und (B) bei pH 5,9 PfFNTG107S in rot. Es wurden je Kurve 3 bis 4 technische Replikate gemittelt (N = 3 – 8).

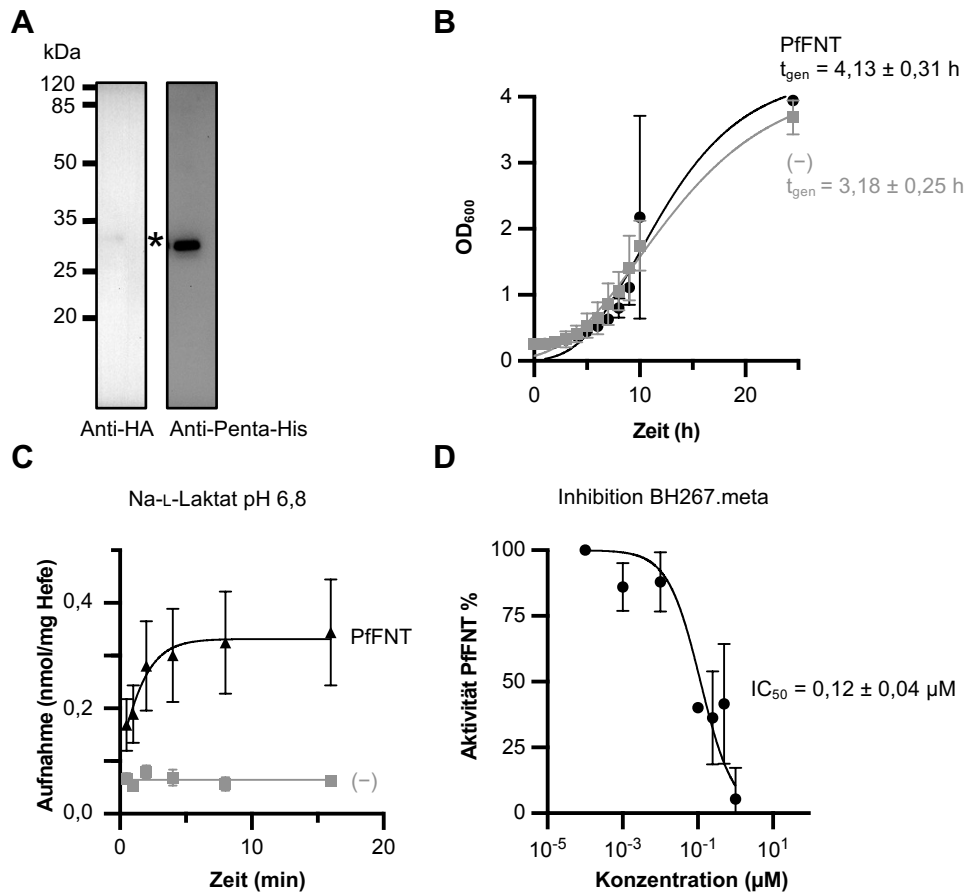
## 4.2 Herstellung und Funktionalität von PfFNT im Hefesystem

Der Ansatz der *target*-basierten Wirkstoffzielfindung wurde im Rahmen dieser Arbeit vor dem Hintergrund der Fragestellung nach weiteren inhibierbaren humanpathogenen eukaryotischen Parasiten auf *N. fowleri* erweitert (Eder *et al.*, 2014). Das *Target* potenzieller Wirkstoffe war mit dem plasmoidalen Laktattransporter PfFNT identifiziert und als Wildtyp strukturell aufgeklärt. Für experimentelle Untersuchungen an heterolog hergestelltem FNT wurde zunächst auf die heterologe Herstellung in dem bereits gut untersuchten System von *S. cerevisiae* vom Stamm W303 1A  $\Delta jen1 \Delta ady2$  (Andrade & Casal, 2001; Casal *et al.*, 1999; Paiva *et al.*, 2004) mit dem *knock-out* der endogenen Monocarboxylat-Transporter zurückgegriffen. So sollte der durch die Hefezellen ohne heterologes Membranprotein vermittelte Transport von Formiat, Acetat oder Laktat möglichst geringgehalten werden. Zur Sicherstellung der Funktionalität des Systems und zur Vergleichbarkeit erhaltener Messwerte wurde zunächst das bereits gut charakterisierte PfFNT im Hefesystem untersucht und in späteren Experimenten als Kontrolle mitgeführt.

### 4.2.1 Herstellung und Funktion von PfFNT in *S. cerevisiae*

Zunächst wurde die Herstellung von HA-PfFNT-FXa-His<sub>10</sub> als Kontrolle in der Membranfraktion überprüft. Hierzu wurden transformierte *S. cerevisiae* (3.3.1) vom Stamm W303 1A  $\Delta jen1 \Delta ady2$  kultiviert (3.3.4), mechanisch aufgeschlossen (3.3.4) und mittels Western Blot-Analytik (3.2.5) untersucht. Mit einer theoretischen berechneten Masse von 34,5 kDa für PfFNT wurde eine starke Bande auf einer Laufhöhe detektiert, die einer Masse von

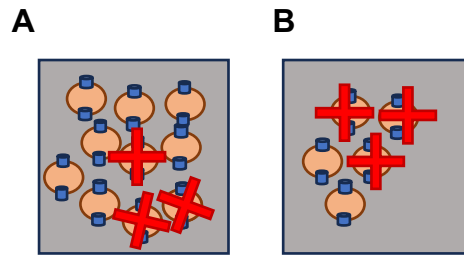
ca. 32 kDa entspricht. Die Detektion dieser Bande war sowohl mit einem gegen den am N-Terminus befindlichen HA-tag als auch mit einem gegen den am C-Terminus befindlichen His<sub>10</sub>-tag gerichteten Primärantikörper auf gleicher Höhe möglich, wenn gleich die Detektion mit dem Anti-HA-Antikörper ein wesentlich schwächeres Signal bei gleicher Auftragsmenge an Gesamtprotein lieferte (**Abbildung 4.9 A**). Für Membranproteine ist ein *gel-shifting* in der Literatur (vgl. Rath & Deber, 2013 ) beschrieben, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass es sich um das vollständig translatierte Zielprotein handelte. Eine weitere Überprüfung des Transformationserfolges war die Verfolgung der Generationszeit (**Abbildung 4.9 B**) von PfFNT herstellenden Hefen, welche im Vergleich zu mit dem Leerplasmid transformierten Hefen deutlich erhöht war. Der Unterschied ließ sich vor allem unter Berücksichtigung der *lag*-Phase erkennen, während die Hefen bei Erreichen der exponentiellen Phase kaum Unterschiede aufwiesen. Zur genaueren Charakterisierung dieses Verhaltens empfähe sich ein größerer Stichprobenumfang. Zur Sicherstellung der Vergleichbarkeit der erhaltenen Messwerte und ermittelten Transportraten und IC<sub>50</sub>-Werte wurde die Aufnahme von <sup>14</sup>C-markiertem Na-L-Laktat/H<sup>+</sup> durch PfFNT (**Abbildung 4.9 C**) sowie der IC<sub>50</sub>-Wert von BH267.meta erneut bestimmt (**Abbildung 4.9 D**). Die erhaltenen Größen für die Aufnahmerate lagen bei  $0,24 \pm 0,04 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  und der IC<sub>50</sub>-Wert bei  $0,12 \pm 0,04 \text{ }\mu\text{M}$  und waren vergleichbar mit den schon durch andere Gruppenmitglieder determinierten Werten von einer initialen Aufnahmerate von ca.  $0,2 \text{ nmol mg}^{-1} \text{ min}^{-1}$  (Wiechert *et al.*, 2017) und einem IC<sub>50</sub>-Wert von  $0,11 \pm 0,01 \text{ }\mu\text{M}$  (Walloch *et al.*, 2020).



**Abbildung 4.9:** Herstellung und funktionelle Charakterisierung von PfFNT (schwarz) im Vergleich zu mit dem Leerplasmid transformierten Hefezellen (grau). (A) Western Blot der mikrosomalen Fraktion mit gegen den am N-Terminus befindlichen HA-tag gerichteten Primärantikörper (links) und gegen den am C-Terminus befindlichen His-tag gerichteten Anti-Penta-His-Primärantikörper. Auftragsmenge: Gesamtprotein 25  $\mu$ g pro lane. Markierung: PfFNT-Monomer. (B) Wachstumskurven mit eingestellter Start-OD<sub>600</sub> von  $0,2 \pm 0,05$ . (C) Aufnahme von L-Laktat bei pH 6,8 und 1 mM Substratkonzentration. (D) Normalisierte L-Laktat-Aufnahme nach 30 s von PfFNT bei Inhibition durch BH267.meta. Die Fehler stellen S.E.M. der technischen Triplikate dar (N = 3).

#### 4.2.2 Verhältnis von Target zu Inhibitor zur Determination kleiner IC<sub>50</sub>-Werte

Die im Hefesystem erhaltenen IC<sub>50</sub>-Werte stehen nicht immer in Korrelation zu den EC<sub>50</sub>-Werten, die gegenüber *P. falciparum* Parasiten ermittelt wurden. So wurden für im Hefesystem wenig aktiv erscheinende Inhibitoren deutlich geringere EC<sub>50</sub>-Werte gegenüber kultiviertem *P. falciparum* gemessen. Im nächsten Schritt sollte ermittelt werden, ob die tendenziell höheren IC<sub>50</sub>-Werte aus dem <sup>14</sup>C-Transportassay im Hefesystem durch Variation der Messbedingungen denen des Parasiten angenähert werden können. Hierbei sollte überprüft werden, ob das Verhältnis von dem Target PfFNT zum Inhibitor zu groß ist, um bei kleinen Inhibitor-Konzentrationen eine ausreichende Inhibition zu Determination kleiner IC<sub>50</sub>-Werte erreichen. Da die Anzahl an Transportern pro Zelle gleich bleibt wird die Menge an Target über die eingesetzte Hefe-Zellzahl bzw. Hefemasse beeinflusst. Bei halbiert Hefezellzahl sind also weniger Target-Transportproteine insgesamt da, die auf die gleiche Anzahl an Inhibitormolekülen treffen (**Abbildung 4.10**). So soll der Transport von L-Laktat/H<sup>+</sup> in der Zelle durch das Target PfFNT bei gleicher Menge Inhibitor vollständig inhibiert werden. Die Molarität des Inhibitors wurde nicht beeinflusst, da das gleiche Probenvolumen (80  $\mu$ l Zellsuspension) mit veränderter Zellzahl oder Zelldichte verwendet wurde.

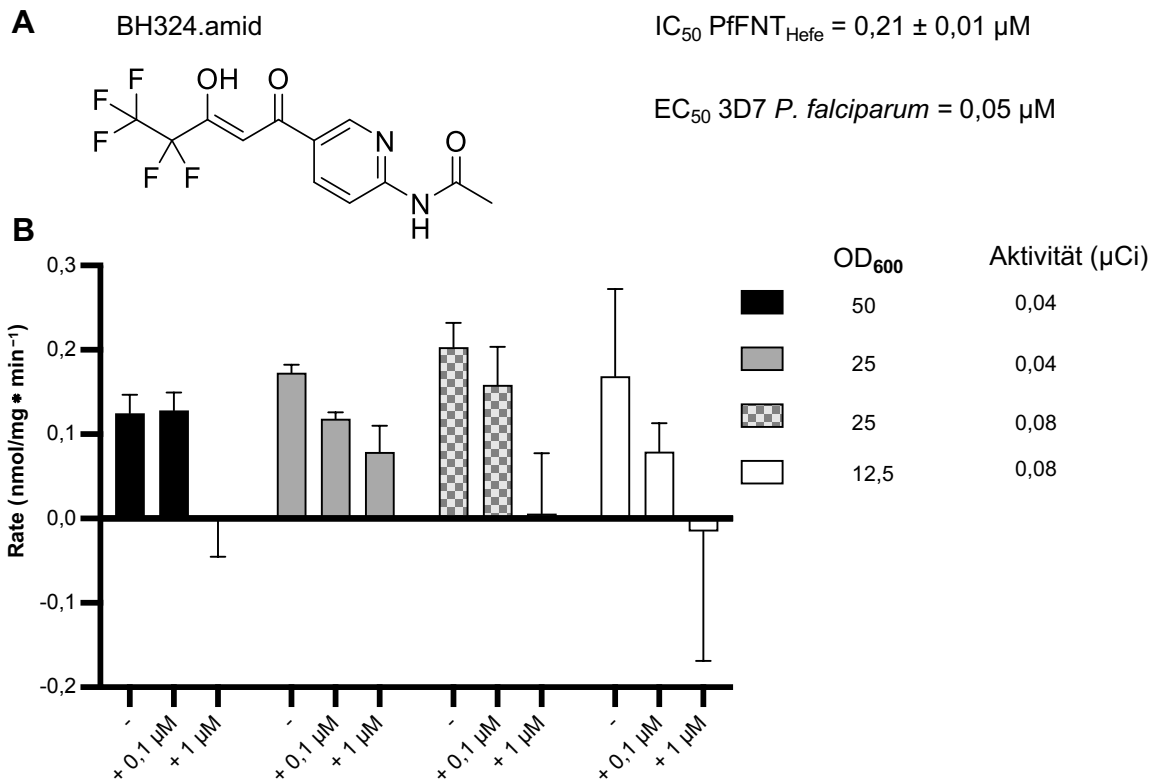


**Abbildung 4.10:** Target-Inhibitor-Verhältnis. (A) doppelte Zellzahl und (B) halbierte Zellzahl. PfFNT in blau. Gleiche Anzahl an Inhibitormolekülen: rot, Hefezelle: braun.

Für den Inhibitor BH324.amid wurde im Hefesystem durch Cornelius Nerlich ein  $IC_{50}$ -Wert von  $0,21 \pm 0,01 \mu\text{M}$  ermittelt. In *P. falciparum* 3D7-Trophozoiten wurde am BNITM ein um Faktor 4 niedrigerer Wert von  $0,05 \mu\text{M}$  ermittelt (**Abbildung 4.11 A**). Es wurde zunächst in einem Vorexperiment überprüft, ob ein Trend der Inhibition bei  $0,1$  und  $1 \mu\text{M}$  erkennbar ist. Hierzu wurde die Gesamthezezellzahl reduziert, sodass im Verhältnis mehr Inhibitormoleküle auf weniger Hefezellen im gleichen Volumen treffen. Zusätzlich wurde die Gesamtkonzentration pro Probe in einem Experiment verdoppelt, um ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis zu erhalten. Die Messzeit betrug für jeden Messzeitpunkt 30 s. Die Gesamtaufnahme an Substrat bei der jeweiligen Zelldichte und Aktivität ist in **Abbildung 4.11 B** unter „–“ dargestellt. Zur besseren Beurteilung der Gesamtaufnahme wäre für jede der Bedingungen eine vollständige Aufnahmekurve (vgl. **Abbildung 4.9 C**) notwendig gewesen, um den optimalen Messzeitpunkt für die Inhibition zu ermitteln. So wurde sich an der Aufnahmekurve von PfFNT orientiert (**Abbildung 4.9 C**), die bei 30 s am steilsten ansteigt, sodass zu diesem Zeitpunkt anzunehmen war, dass hier die Aufnahme am stärksten gewesen wäre.

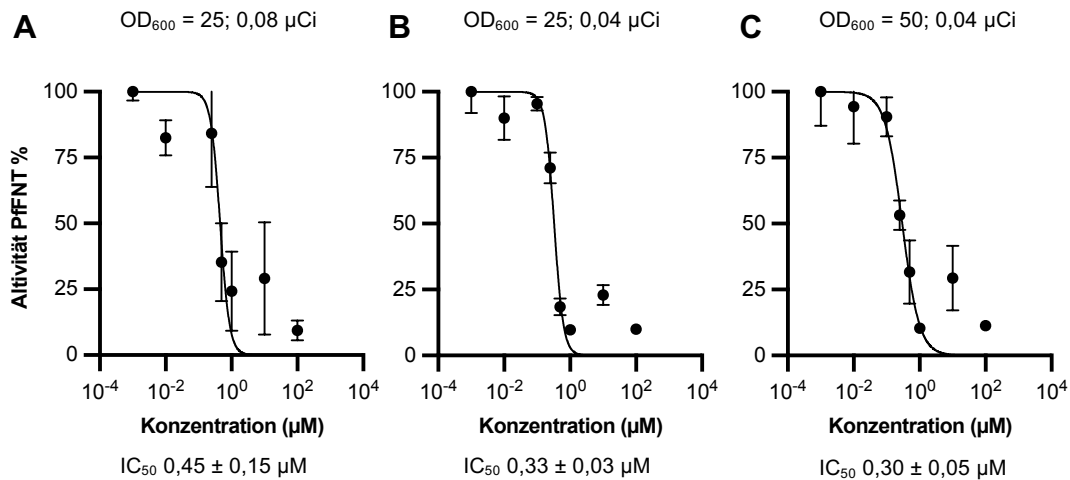
Unter den gewählten Bedingungen wurde eine dosisabhängige Inhibition des L-Laktat/ $H^+$ -Transportes zwischen  $0,1$  und  $1 \mu\text{M}$  gefunden (**Abbildung 4.11 B**). Da der im Vorfeld ermittelte  $IC_{50}$ -Wert bei  $0,21 \mu\text{M}$  lag, wurde eine vollständige Inhibition der Transportaktivität bei  $1 \mu\text{M}$  Inhibitor erwartet. Diese Annahme wurde unter allen Bedingungen außer bei einer  $OD_{600}$  von 25 und  $0,04 \mu\text{Ci}$  Gesamtaktivität bestätigt. Da der Fehler bei einer  $OD_{600}$  von 12,5 und einer Gesamtaktivität von  $0,08 \mu\text{Ci}$  sehr hoch war, wurde im nächsten Schritt diese Bedingung nicht weiter untersucht.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.11:** Inhibition von PfFNT<sub>Hefe</sub> durch BH324.amid bei unterschiedlicher OD<sub>600</sub> und Aktivität. (A) Strukturformel von BH324.amid (links) und IC<sub>50</sub>-Wert im Hefesystem sowie EC<sub>50</sub>-Wert gegenüber *P. falciparum* 3D7. Die Werte wurden freundlicherweise von Cornelius Nerlich zur Verfügung gestellt. (B) Transportraten von PfFNT<sub>Hefe</sub> ohne Inhibition (–), bei Zusatz von 0,1 µM Inhibitor und bei Zusatz von 1 µM Inhibitor. Die Transportraten wurden bei verschiedenen OD<sub>600</sub> und Kombination mit variierender Gesamtaktivität bestimmt. Die Fehler stellen S.E.M. der technischen Replikate dar (N = 3).

Eine wiederholte Determination der IC<sub>50</sub>-Werte unter variierten Bedingungen in Bezug auf Hefezellzahl und Gesamtaktivität ergab keine Erniedrigung des gemessenen IC<sub>50</sub>-Wertes bei verringerter Hefezellzahl und erhöhter Gesamtaktivität (**Abbildung 4.12 A**). Auffällig war hier die große Variabilität innerhalb der Messreihe. Es wurde kein signifikanter Unterschied (t-Test,  $P < 0,05$ ) zwischen der IC<sub>50</sub>-Wert-Bestimmung bei einer OD<sub>600</sub> von 25 und 50 gefunden (**Abbildung 4.12 B und C**). Eine Abhängigkeit des IC<sub>50</sub>-Wertes von der Hefezellzahl und der im Assay eingesetzten Gesamtaktivität wurde nicht nachgewiesen, jedoch, dass das System unter den in 3.5.1 beschriebenen Standardbedingungen reproduzierbare Werte lieferte.

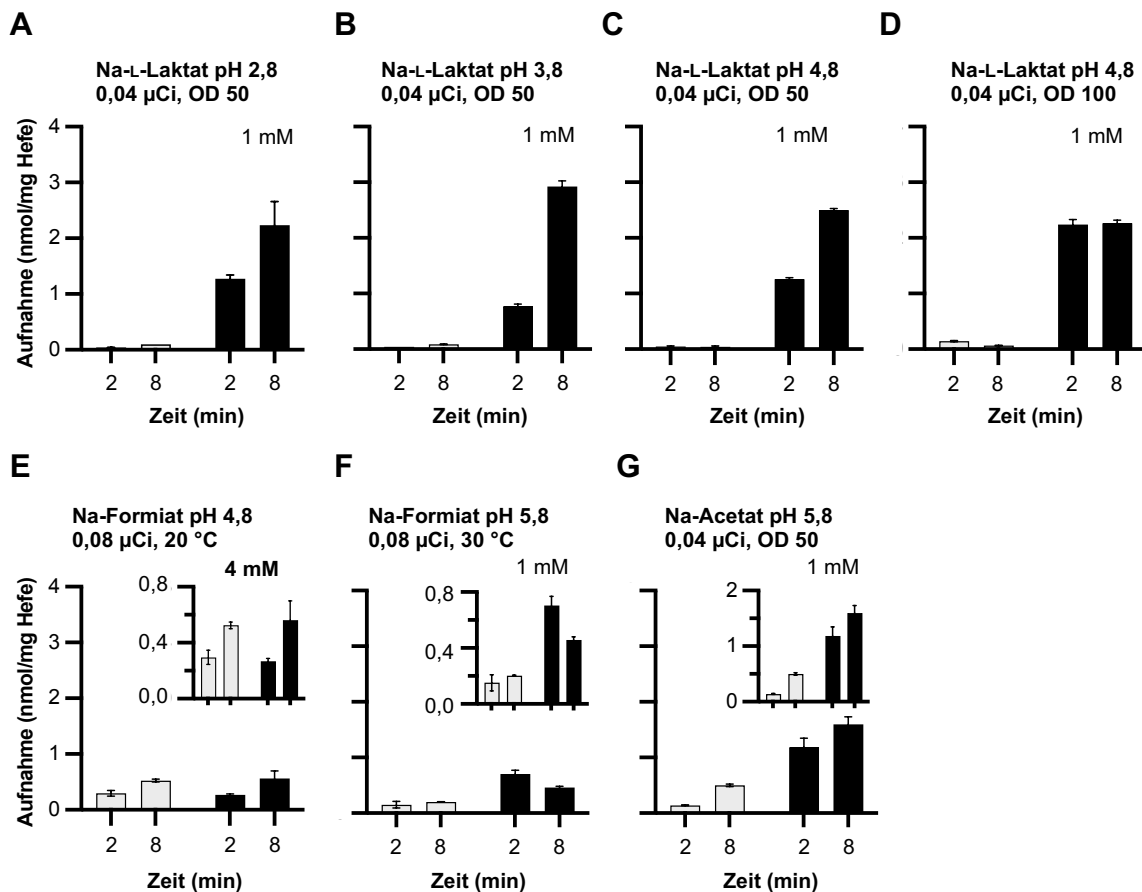


**Abbildung 4.12:** Variationen der Hefemasse und Gesamtaktivität bei der  $IC_{50}$ -Wert-Bestimmung mit BH324.amid im  $^{14}C$ -Assay mit *S. cerevisiae*. (A) Gesamthefemasse 2,8 mg normiert auf  $OD_{600}$  von 25 und Gesamtaktivität 0,08  $\mu Ci$ . (B) Gesamtaktivität 0,04  $\mu Ci$ . (C) Gesamthefemasse 5,6 mg normiert auf  $OD_{600}$  von 50 und Gesamtaktivität 0,04  $\mu Ci$ . Die Fehler stellen S.E.M. der technischen Replikate dar ( $N = 3 - 9$ ).

#### 4.2.3 PfFNT im Hefesystem unter Stressbedingungen

Zur weiteren Beurteilung des  $^{14}C$ -Assays unter Extrembedingungen für Transportuntersuchungen von heterolog hergestellten Membranproteinen wurde das bereits gut untersuchte PfFNT in *S. cerevisiae* hergestellt (3.3.4) und im  $^{14}C$ -Transportassay (3.5.1) unter Variation der Messbedingungen in Bezug auf pH-Wert, Temperatur und  $OD_{600}$  untersucht. Ziel war es hierbei herauszufinden, ob eine Variation der Testparameter oder die Kombination derer die Funktion des bereits charakterisierten Transporters beeinträchtigt und so Charakteristika liefert, die nicht dem Zielprotein, sondern den Assay-Bedingungen zuzuordnen sind. Hierzu wurde der pH-Wert um 2 bis 5 log-Einheiten gesenkt sowie die  $OD_{600}$  verdoppelt (**Abbildung 4.13 A-D**). Unter allen Bedingungen wurde ein deutlicher, sich vom Hintergrund abgrenzender Transport von Na-L-Laktat/ $H^+$  gezeigt. Auch wurde die pH-abhängige Erhöhung der Transportrate bestätigt. Je saurer die Umgebungsbedingungen, desto schneller gelangt L-Laktat/ $H^+$  über PfFNT in die Hefezelle. Bei erhöhter  $OD_{600}$  bzw. Hefezellzahl wurde keine zeitabhängige Steigerung der Aufnahme von zwei zu acht Minuten beobachtet. Unter der Annahme, dass pro Zelle die gleiche Anzahl Transportern vorliegt, liegen bei erhöhter Zellzahl im Summe mehr Transporter vor. Aus diesem Grund wurde vermutlich in der gleichen Zeit mehr Substrat in Summe aufgenommen, wenngleich jeder einzelne Transporter die gleiche Transportgeschwindigkeit beibehält. Zur genaueren Charakterisierung müssten noch weitere Experimente durchgeführt werden. Die Transportrate und Aufnahmekapazität unter den in **Abbildung 4.12** gewählten Bedingungen wäre im Vergleich interessant. Vor diesem Hintergrund könnte auch die Anzahl der Transporter quantifiziert werden, um einen Einfluss der Hefezellzahl verfolgen zu können. Des Weiteren wurde die Aktivität verdoppelt, während der Gradient des für PfFNT nicht natürlichen Substrates (Wu *et al.*, 2015) Formiat auf 4 mM erhöht wurde. Hier wurde kein signifikanter Unterschied (t-Test,  $P < 0,05$ ) von nicht herstellenden Hefen zu PfFNT beobachtet (**Abbildung 4.13 E**). Dies könnte mit der hohen Membrangängigkeit von Formiat/ $H^+$  bzw. Ameisensäure ( $pK_s$  3,75) im leicht sauren zu erklären sein. Im Vergleich dazu war die Transportrate bei einem um eine pH-Einheit erhöhten pH-Wert und bei auf 30 °C erhöhter Temperatur im Vergleich zu nicht PfFNT-herstellenden Hefen signifikant erhöht (**Abbildung 4.13 F**). Bei Messungen mit  $^{14}C$ -markiertem

Acetat wurde ein hoher Hintergrund gefunden. Die Gesamtaktivität der  $^{14}\text{C}$ -Acetat-Stocklösung war deutlich erniedrigt. Der Faktor ( $\frac{\text{Stoffmenge}}{\text{Gesamtaktivität}}$ ), der zur Berechnung der Aufnahme in  $\text{nmol mg}^{-1}$  Hefe zugrunde liegt, war durch die niedrige Gesamtaktivität erhöht. Daraus resultierten hohe Aufnahmewerte im Vergleich zu anderen Substraten. Die Aktivität der Acetat-Stocklösung war aufgrund von Verdunstung und damit unwissentlich vermehrt entnommener Aktivität im Vorfeld, erniedrigt. Zur Charakterisierung von PfFNT oder Validierung des  $^{14}\text{C}$ -Transportassays wäre die experimentelle Vertiefung dieser Beobachtungen empfehlenswert. Unter Berücksichtigung der schon im Arbeitskreis publizierten Daten zu PfFNT und dem etablierten  $^{14}\text{C}$ -Transportassay wurde hierauf verzichtet. Es wurde gezeigt, dass die Funktion von PfFNT nahezu unter allen Bedingungen erhalten bleibt. Die Verdopplung der Gesamtaktivität in Zusammenhang mit Formiat/ $\text{H}^+$  als Substrat, welches im Säuren eine erhöhte Membrangängigkeit aufweist, suggerierte, dass kein Transport vorlag. So wurde im weiteren Verlauf bei der Testung von Formiat/ $\text{H}^+$  auf die Erhöhung der Gesamtaktivität aus ökologischen und ökonomischen Gründen verzichtet.

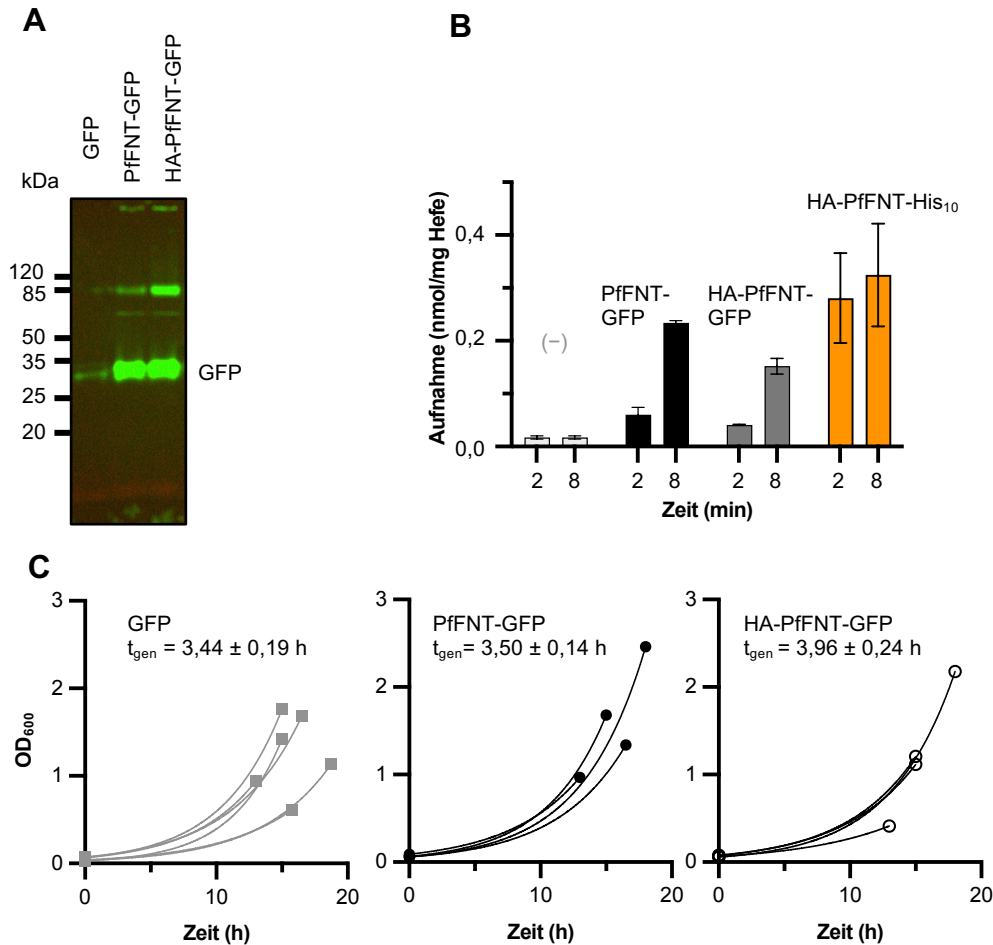


**Abbildung 4.13:** Aktivität von PfFNT unter Variation der Assay-Bedingungen. Variable Parameter: (A, B, C) pH-Wert, (D) OD<sub>600</sub>, (E) Gesamtaktivität und Substratgradient, (F) Temperatur. (G) Substratvariation zu Acetat. Grau: mit dem Leerplasmid transformierte Hefezellen. Schwarz: PfFNT. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. der technischen Replikate dar (N = 2 – 3).

#### 4.2.4 Funktionalität von PfFNT als GFP-Fusionsprotein

Im Hinblick auf neue zu charakterisierende Membranproteine, wurde der Einfluss von GFP als Fusionsprotein auf die Transportaktivität des gut charakterisierten PfFNTs ermittelt. GFP-Fusionsproteine können der Lokalisation des Proteins in der lebenden Zelle dienen. Zur

Funktionsüberprüfung von PfFNT-GFP-Fusionskonstrukten (**Abbildung 4.14**) wurden HA-PfFNT-GFP und PfFNT-GFP jeweils auf ihre Herstellung mittels In-Gel-Fluoreszenz überprüft (3.2.4). Es wurden transformierte *S. cerevisiae* (3.3.1) wie in 3.3.4 beschrieben kultiviert, mechanisch aufgeschlossen (3.3.6) und anschließend an die SDS-PAGE (3.2.2) die In-Gel-Fluoreszenz überprüft. Mit einer berechneten Masse von 26,9 kDa für yEGFP wurde eine Bande auf einer Laufhöhe, die einer Masse von ca. 32 kDa entspricht, detektiert. Für GFP ist aus der Literatur bekannt, dass es in der SDS-PAGE größer erscheint (Dong *et al.*, 2019). Die Fusionskonstrukte mit theoretisch berechneten Massen von 61,4 kDa für PfFNT-GFP und 62,6 kDa für HA-PfFNT-GFP wurden jeweils auf einer Laufhöhe von ca. 73 kDa und ca. 133 kDa detektiert (**Abbildung 4.14 A**). Auffällig war hier bei beiden Fusionskonstrukten eine starke zusätzliche Bande, die der GFP-Domäne ohne Fusion zugeordnet wurde. Grund hierfür könnte ein zweiter Translationsbeginn, bedingt durch das zweite GFP-Startmethionin im Expressionskonstrukt oder Proteolyse des Fusionskonstruktes sein (Müller-Lucks *et al.*, 2012). Zwischen dem PfFNT-GFP-Fusionsprotein mit und ohne HA-tag, welche einen Massenunterschied von 1 kDa aufweisen, war kein Unterschied zu erkennen. Die Bande bei ca. 73 kDa migrierte auf der für das Monomer zu erwartenden Laufhöhe. Die Bande bei ca. 133 kDa migrierte auf der für das Dimer annehmbaren Laufhöhe. Bei den beiden oben in der SDS-PAGE befindlichen Banden handelte es sich vermutlich um im Sammelgel verbliebene aggregierte Probe. Die Aufnahme von Na-L-Laktat/H<sup>+</sup> (**Abbildung 4.14 B**) bei pH 6,8 unterschied sich bei beiden Fusionskonstrukten deutlich vom Hintergrund. Die Aufnahme durch mit GFP fusioniertes PfFNT war insgesamt geringer und langsamer als die durch HA-PfFNT-His<sub>10</sub> und nochmal etwas geringer, wenn das GFP-Fusionskonstrukt zusätzlich einen HA-tag enthielt. Es wurde gezeigt, dass die Fusion mit GFP einen verlangsamen Einfluss auf die Transportrate hat. Da keine vollständigen Kurven aufgenommen wurden, können nur die Aufnahmeraten nach zwei Minuten und nicht die initialen Aufnahmeraten verglichen werden. Die Generationszeiten (**Abbildung 4.14 C**) der das Fusionskonstrukt herstellenden Hefen waren gegenüber der mit dem Leerplasmid transformierten Hefe leicht erhöht.



**Abbildung 4.14:** PfFNT als GFP-Fusionsprotein. (A) In-Gel-Fluoreszenz der mikrosomalen Fraktion. Auftragsmenge: gemittelt 56 µg Gesamtprotein. (B) Aufnahme von 1mM L-Laktat bei pH 6,8 von PfFNT-GFP (schwarz) und HA-PfFNT-GFP (dunkelgrau) im Vergleich zu HA-PfFNT-His<sub>10</sub> (orange) und GFP herstellende Hefen (hellgrau). Die Fehler stellen die S.E.M. der technischen Replikate dar (N = 2 – 3). (C) Generationszeiten von mit dem Leerplasmid (pUG35(-)) transformierten Hefezellen (hellgrau), PfFNT-GFP (schwarz, geschlossen), HA-PfFNT-GFP (schwarz, offen).

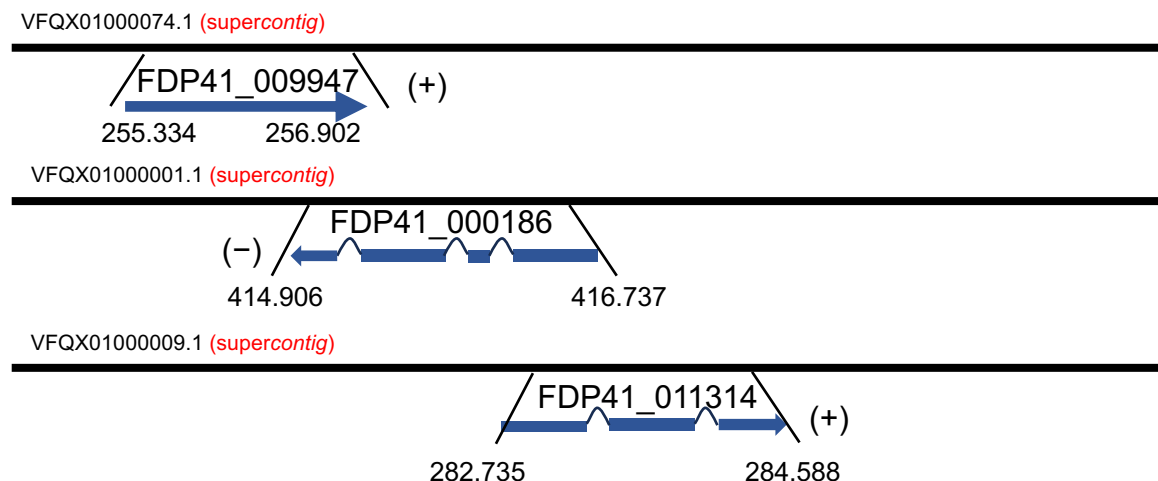
### 4.3 FNT anderer eukaryotischer Parasiten

#### 4.3.1 Identifikation von FNT im Genom von *N. fowleri*

Eine gezielte Suche nach weiteren eukaryotischen FNT im annotierten Genom (**Abbildung 4.15**) von *N. fowleri*, dem Erreger der Primären Amöben-Meningoenzephalitis (Visvesvara, 2010), führte zu drei Sequenzen mit entsprechendem Leserahmen (Liechti *et al.*, 2019). Die DNA-Sequenzen wurden nach einer NCBI-Datenbanksuche basierend auf der Aminosäuresequenz von PfFNT nach einem Protein-Nukleinsäure *basic local sequence alignmet* (tblastn) ermittelt. Es lagen zusätzliche bisher nicht veröffentlichte mRNA-Studien zu diesen Genen vor, weshalb die Sequenzen auch in Form von mRNA in *RefSeq Select RNA-Sequences* gefunden wurden. Das Gen für FDP41\_009947 mit der Lokalisation VFQX01000074.1:255.334..256.902 (+) besitzt keine Introns. Die codierende Sequenz mit der Transcript-ID FDP41\_009947\_t1 ist 1569 Basenpaare lang und führt zu einem Protein mit 522 Aminosäuren (57,01 kDa), das in der Arbeit als NfFNT1 bezeichnet wurde. Dem Gen mit der ID FDP41\_000186, im Folgenden NfFNT2 genannt, wurde ebenfalls keine Chromosomenlokalisierung zugeordnet. Die Lokalisation wird angegeben mit

VFQX01000001.1: 414.909..416.737(-). Die genomische Sequenz ist 1832 Basenpaare lang und weist drei Introns auf. Die mRNA-Sequenz mit der Transcript-ID FDP41\_000186\_t1 ist 1479 Basenpaare lange und führt zu einem Protein mit 492 Aminosäuren mit einer theoretischen Masse von 55,28 kDa. Das Gen FDP41\_011314 ist 1854 Basenpaare lang und besitzt zwei Introns. Auch hier gibt es keine Chromosomenzuordnung des Gens. Es ist lokalisiert mit VFQX01000009.1:282.735..284.588(+). Die transkribierte Sequenz FDP41\_011314\_t1 ist 1695 Basenpaare lang und codiert für ein Protein mit 564 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 63,63 kDa, das im Folgenden als NfFNT3 bezeichnet wird.

### Genomische Sequenz

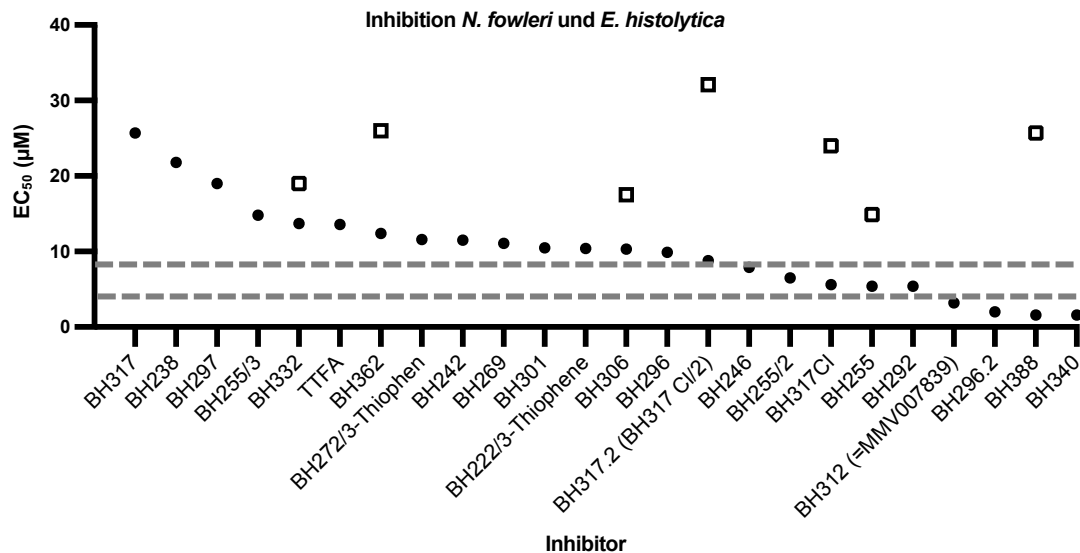


**Abbildung 4.15:** Lokalisation NfFNT-Gene. Dargestellt sind die annotierten Gene für NfFNT1-3 in der genomischen Sequenz, welche in Form eines *supercontigs* vorliegt.

### 4.3.2 Inhibition von *N. fowleri*- und *E. histolytica*-Trophozoiten mit gegen PfFNT gerichteten Inhibitoren

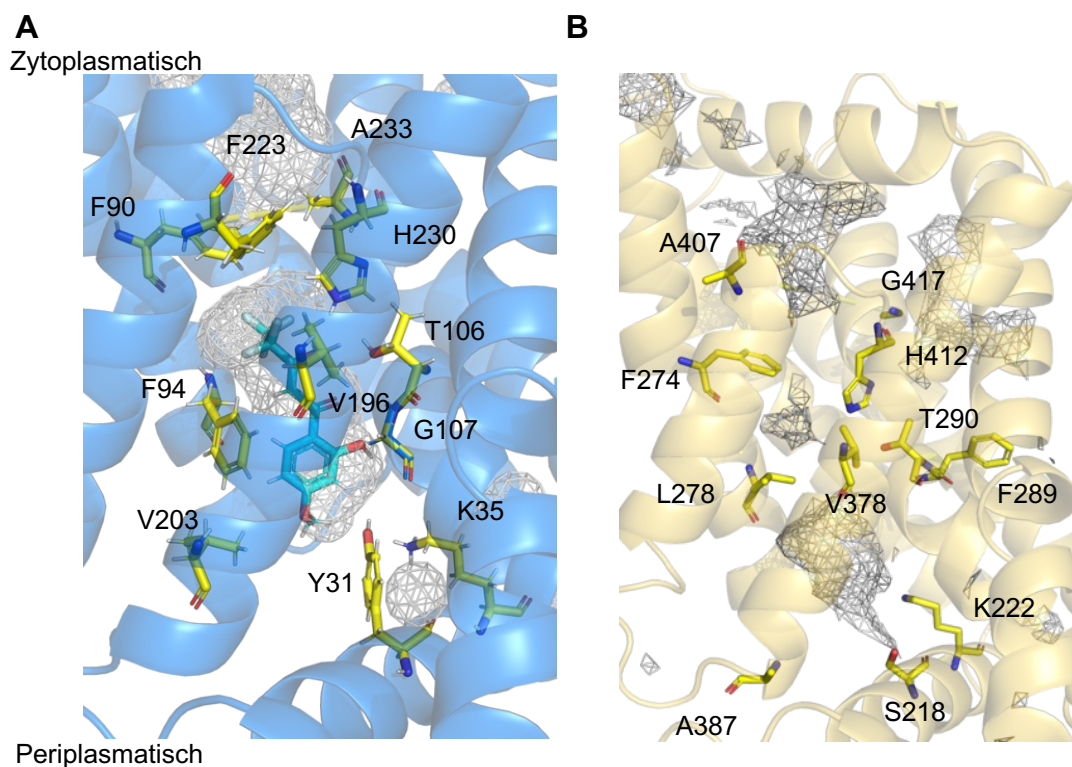
Nachdem festgestellt wurde, dass *N. fowleri*'s Genom für FNT codiert und mRNA-Daten darauf hindeuteten, dass die Transporter, die dem PfFNT so ähnlich sind, vom Parasiten auch wirklich hergestellt werden und keine genomischen Zufallstreffer sind, wurden die PfFNT-Inhibitoren auf ihre Wirkung gegenüber *N. fowleri*-Trophozoiten untersucht. Die PfFNT-Inhibitoren wurden bereits auf ihre Wirkung gegenüber heterolog in der Hefe gestelltem PfFNT und gegenüber *P. falciparum* 3D7 in Kultur am BNITM untersucht.

Das in *E. histolytica* identifizierte EhFNT wurden im Rahmen der Doktorarbeit von Dr. Folknand Helmstetter (Dissertation Folknand Helmstetter, 2019, Kiel) charakterisiert und weist als bisher einziges bekanntes eukaryotisches FNT kein zentrales Histidin auf. Die folgenden Ergebnisse wurden in Anlehnung an Debnath *et al.* (2020) von Jessica van Nyguen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Anjan Debnath erzielt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Von insgesamt 50 getesteten Inhibitoren war für 24 Inhibitoren die Determination eines EC<sub>50</sub>-Wertes gegenüber *N. fowleri* möglich (**Abbildung 4.16**). Sieben der Inhibitoren zeigten eine ausreichend wachstumshemmende Wirkung auf *E. histolytica* zur Determination von EC<sub>50</sub>-Werten, welche alle über 10 µM lagen.



**Abbildung 4.16:** Determinierte EC<sub>50</sub>-Werte von *N. fowleri*- (geschlossen) und *E. histolytica*- (offen) Trophozoiten in Kultur. Die Daten wurden von Jessica van Nyguen im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Anjan Debnath, UCSD erhoben. Die Inhibitoren wurden freundlicherweise von Björn Henke synthetisiert und als DMSO-Stocks von Cornelius Nerlich zur Verfügung gestellt. Die grau gestrichelte Linie markiert die Inhibitoren, die einen EC<sub>50</sub>-Wert kleiner 5 µM bzw. kleiner 10 µM aufwiesen.

Da die Aktivität der Inhibitoren gegen *E. histolytica* als zu gering angesehen wurde, wurde sich im weiteren Verlauf der Arbeit auf *N. fowleri* konzentriert. Zu den gegen *N. fowleri* potenteren Inhibitoren gehört auch die Leitsubstanz MMV007839 (Gollack *et al.*, 2017), welche sich durch eine Hemiketal-Struktur auszeichnet, die den Wechsel zwischen lipophiler Transport- und polarer, dem natürlichen Substrat Laktat ähnlichen, Wirkform in der PfFNT-Pore ermöglicht (Peng *et al.*, 2021). Die Bindetasche von NfFNT1-3 ist laut Model, das auf der Struktur von PfFNT basiert (PDB: 7mxy), zu großen Teilen ähnlich aufgebaut wie die des PfFNT (**Abbildung 4.17**). Der dem Lösemittel zugängliche Raum im Model von NfFNT1-3 erscheint deutlich kleiner, auch wenn die entscheidenden Bindetasche ausbildenden Aminosäuren eine ähnliche große Bindetaschen annehmen lassen. So sind in Übereinstimmung die auskleidenden Aminosäuren welche aus Phenylalanin (F90/274), Histidin (H230/412, Threonin (T106/290), Valin (V196/378) und Lysin (K35/222) bestehen gefunden worden. Im NfFNT1 ist an der Position an der im PfFNT ein Glycin (G107) ist ein Phenylalanin (F289) zu finden. Die Mutation G107S im PfFNT spielt eine entscheidende Rolle in der Ausbildung der Resistenz gegenüber der ursprünglichen Leitsubstanz MMV007839. Das Phenylalanin 289 von NfFNT1 ragt mit dem *backbone* in die angenommene Bindetasche herein, sodass davon ausgegangen wurde, dass der aromatische Rest nicht an der Bildung der Bindetasche beteiligt ist. Auch ein Serin an Position 218 vom NfFNT1 ist unterschiedlich zum Tyrosin 31 im PfFNT. Hier könnte ein möglicher Grund für die Wirkung der in para-Position modifizierten Inhibitoren gegenüber *N. fowleri* gelegen haben. Im PfFNT beeinträchtigt der aromatische Rest von Tyrosins 31 möglicherweise die Bindung von in para-Position modifizierten Inhibitoren. Ein Leucin an Position 278 vom NfFNT1 anstelle eines weiteren Phenylalanins an Position 94 im PfFNT könnte eine größere Bindetasche in NfFNT1 ermöglichen.



**Abbildung 4.17:** (A) Bindemodus von MMV008839 (cyan) in der Bindetasche (grau) vom PfFNT (blau). (B) Die Bindetasche bildenden Aminosäuren (gelb) im NfFNT1 (transparent gelb). (PDB: 7mxy)

Alle Inhibitoren weisen ein aromatisches System auf, das im Falle der Wirkform eine Substitution in para-Position trägt (**Abbildung 4.18**). Fünf der Inhibitoren weisen eine Penta-Fluor-Alkylkette, welche im PfFNT in Richtung des Zytoplasmas in die Pore hineinragt, auf (Walloch *et al.*, 2020). Zwei Inhibitoren weisen keine Hydroxylgruppe in  $\beta$ -Position zum Keton auf, sodass die Bildung eines Hemiketals nicht mehr möglich ist. Die vinyloge Säure ist vorhanden, ebenso wie eine aromatische Struktur. Mit BH296.2 zeigt ein Inhibitor mit Tri-Chlor-Substitution eine Wirksamkeit von 2  $\mu$ M gegenüber *N. fowleri*. Alle der Fluor-haltigen Inhibitoren weisen gegenüber PfFNT im Hefesystem  $IC_{50}$ -Werte von kleiner 1  $\mu$ M auf (**Abbildung 4.18**).

**Tabelle 4.1:**  $EC_{50}$ -Werte der Inhibitoren gegen *N. fowleri* und *P. falciparum* im Vergleich.

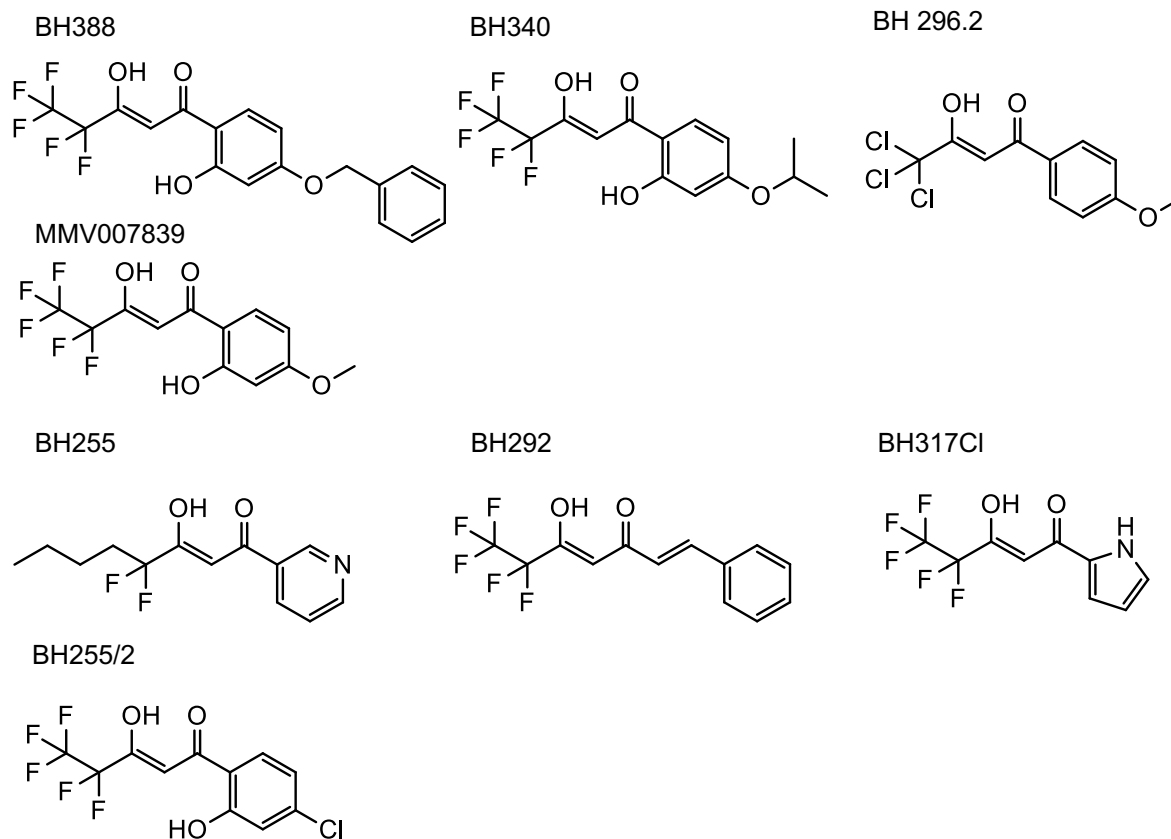
Inhibitor	KUL <i>N. fowleri</i> $EC_{50}$	3D7 <i>P. falciparum</i> $EC_{50}$ *	PfFNT <sub>yeast</sub> $IC_{50}$ **
Aktivität			
BH388	1,6		$0,88 \pm 0,03$
BH340	1,6	$0,10 \pm 0,01$	$0,40 \pm 0,01$
BH296.2	2		$1,0 \pm 0,1$
MMV007839	3,2	$0,14 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,01$
BH255	5,4	19,7	$0,36 \pm 0,05$
BH292	5,4		$0,29 \pm 0,02$
BH317CI	5,6	$0,28 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,01$
BH255/2	6,5		$0,16 \pm 0,01$

Bemerkung 4.1 alle  $EC_{50}$ - und  $IC_{50}$ -Werte sind in  $\mu$ M angegeben.

\* Bemerkung 4.2 Die  $EC_{50}$ -Werte für *P. falciparum* wurden am BNITM gemessen und von Cornelius Nerlich zur Verfügung gestellt. Die  $IC_{50}$ -Werte wurden von Dr. Andre Goldack aufgenommen.

## Ergebnisse

Für den Tri-Chlor substituierten Inhibitor konnte ein  $IC_{50}$ -Wert von  $1,0 \pm 0,1 \mu M$  determiniert werden. Gegenüber den *P. falciparum* Parasiten weisen die getesteten Inhibitoren  $EC_{50}$ -Werte von unter  $0,3 \mu M$  auf. Eine Ausnahme bildet BH255 mit einem Butylrest und einem  $EC_{50}$ -Wert von fast  $20 \mu M$ .



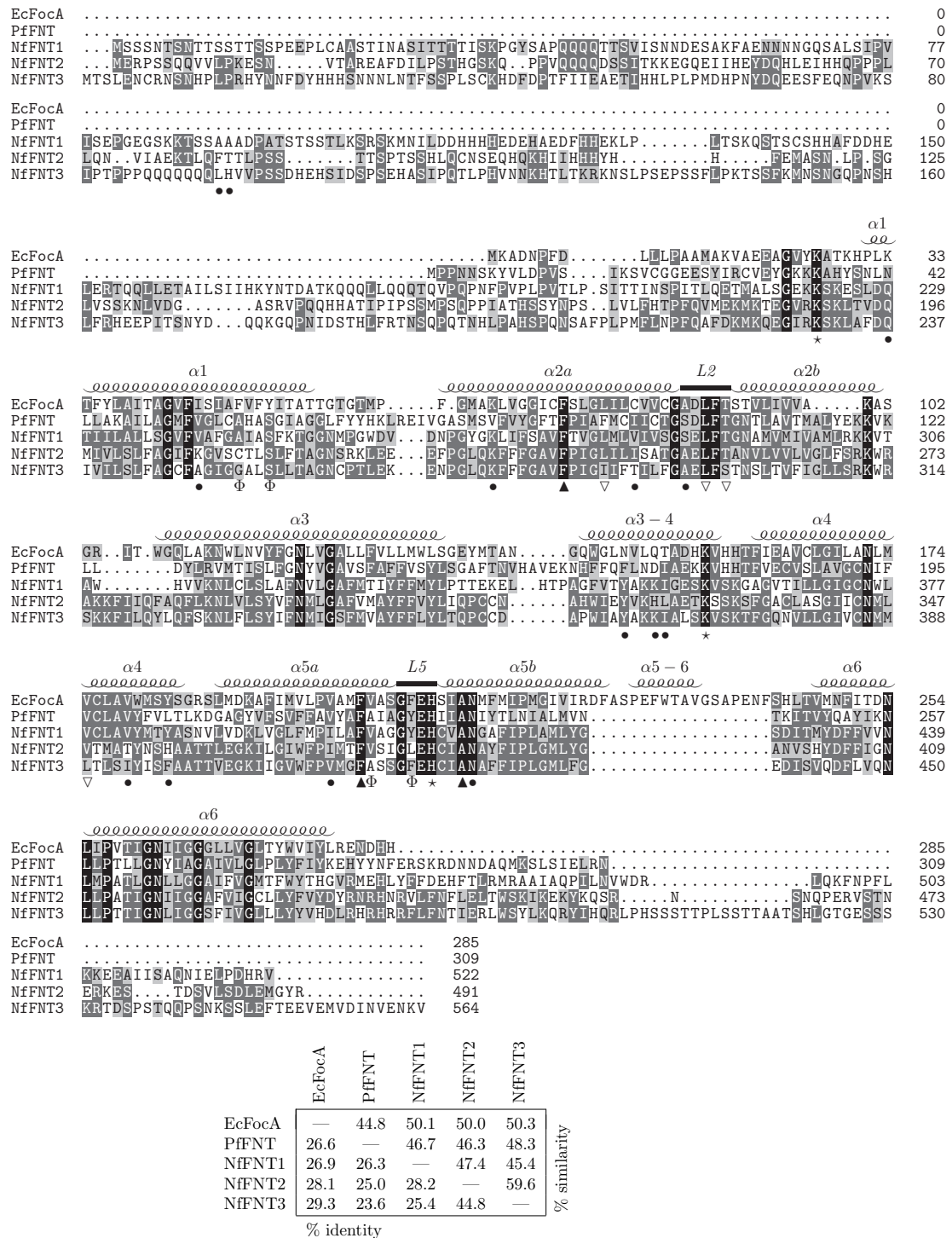
**Abbildung 4.18:** Strukturformeln der Inhibitoren mit einem  $EC_{50}$ -Wert kleiner  $5 \mu M$  (oben) bzw. kleiner  $10 \mu M$  gegen *N. fowleri* (unten).

Im Folgenden galt die Frage zu klären, ob es sich bei dem Target der Inhibitoren um FNT handelt. In dem Zuge muss auch der Fragestellung nachgegangen werden, inwiefern FNT für *N. fowleri* eine metabolische entscheidende Rolle einnehmen, sodass ihre Inhibition zur Wachstumshemmung der Parasiten führt. Es sollte außerdem untersucht werden, welche FNT-typischen Substrate NfFNT leiten und ob vor diesem Hintergrund eine Inhibition mit Milchsäure-analogen Inhibitoren realistisch erscheint.

### 4.3.3 Strukturelle Analyse von NfFNT1-3

Alle drei identifizierten NfFNT weisen für FNT typische Strukturmerkmale auf (**Abbildung 4.19**). Ein auf Basis eines ClustalW-Algorithmus (Thompson *et al.*, 1994) durchgeführtes Alignment, welches in TeXshade visualisiert wurde, zeigt im Vergleich mit dem prokaryotischen EcFocA und dem eukaryotischen PfFNT strukturelle Ähnlichkeiten der NfFNT1-3. Innerhalb der für ein FNT entscheidenden Bereiche wie den Konstriktionen, dem zentralen Histidin und den vorgelagerten Lysinen, zeigen NfFNT1-3 große strukturelle Ähnlichkeit in der Aminosäuresequenz zu anderen eukaryotischen FNT. So wurden die von Wiechert *et al.*, (2017) identifizierten Schlüsselaminosäuren der Transportpore in Übereinstimmung gefunden.

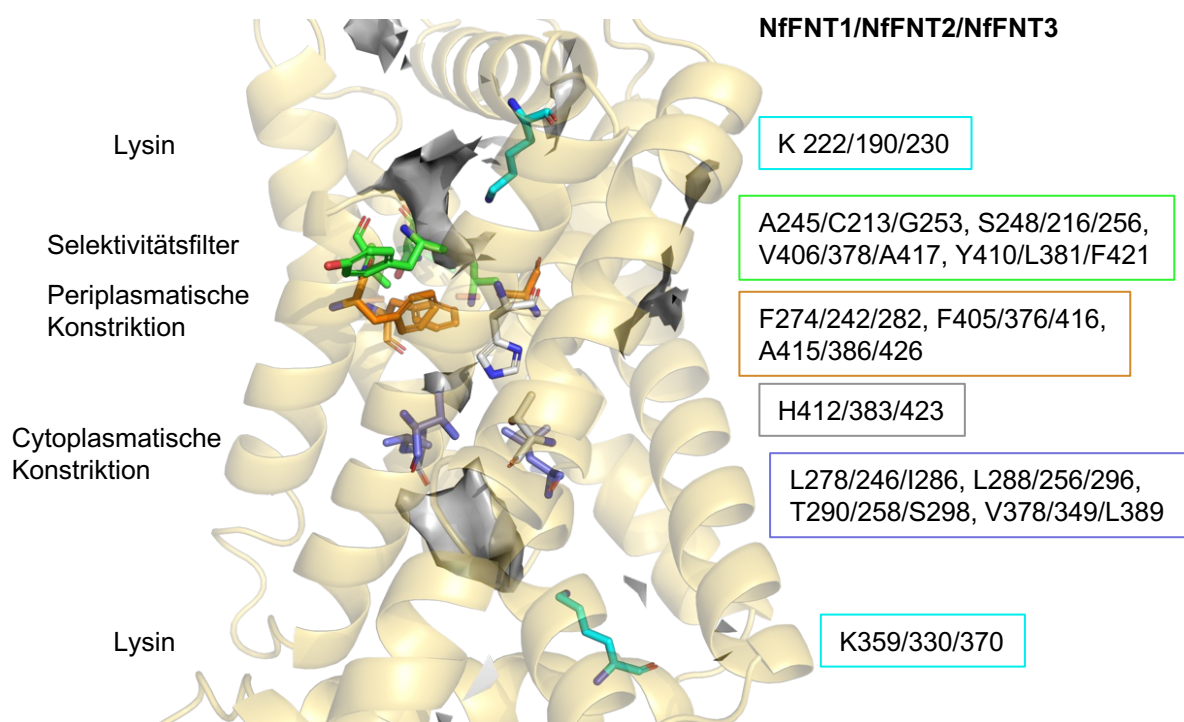
## Ergebnisse



**Abbildung 4.19:** Oben: Aminosäuresequenz ClustalW Alignment bekannter prokaryotischer FNT aus *E. coli* (EcFocA) und eukaryotischer FNT aus *P. falciparum* (PfFNT) mit potenziellen FNT aus *N. fowleri* (NfFNT1-3). Auskleidende Aminosäuren in der Transportpore (Punkte), Selektivitätsfilter (Phi  $\Phi$ ), cytosolische (offenes Dreieck) und periplasmatische/extrazelluläre Konstriktion (geschlossenes Dreieck), konservierte Aminosäuren (Stern). Färbemodus: *similarity*. Unten: Sequenzübereinstimmung und -ähnlichkeit der verschiedenen FNT. Die Aminosäuren wurden in Abhängigkeit von ihrer Ähnlichkeit umso dunkler eingefärbt.

## Ergebnisse

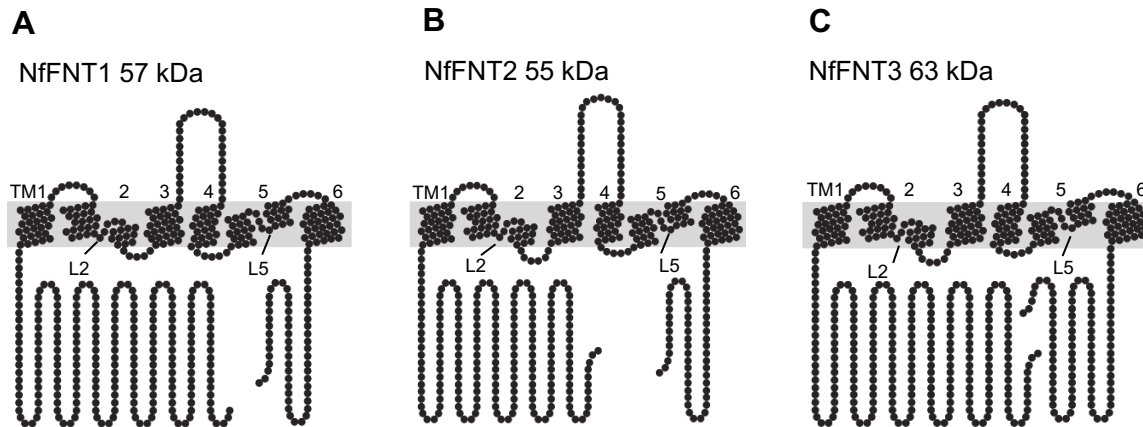
Auch die Konstriktionen bildenden Aminosäuren für die zytoplasmatische sowie die periplasmatische/extrazelluläre Konstriktion wurden in Übereinstimmung lokalisiert (vgl. **Abbildung 1.9** und **Abbildung 4.20**). Die hochkonservierten Lysine am Poreneingang und -ausgang K35<sub>PfFNT</sub> und K177<sub>PfFNT</sub>, die für die elektrostatische Anziehung des Substrates verantwortlich sind (Wiechert & Beitz, 2017a), wurden ebenfalls identifiziert. Auch das zentrale Histidin H230<sub>PfFNT</sub> wurde vorgefunden. Der Selektivitätsfilter, der Hinweise auf die Substratselektivität geben kann, wurde identifiziert und in seinem Aufbau und Porengröße zwischen dem prokaryotischen EcFocA und dem eukaryotischen PfFNT eingeordnet. Insgesamt ist die Sequenzähnlichkeit in % der NfFNT1-3 zum prokaryotischen EcFocA etwas höher als zum eukaryotischen PfFNT. Strukturmodelle auf Basis der korrigierten Cryo-Elektronenmikroskop-Struktur von PfFNT (PDB: 7mxy) (Lyu *et al.*, 2021) zeigten ein besseres *fitting*. Alle drei NfFNT weisen einen für FNT untypisch langen N- und C-Terminus auf. Im Folgenden gilt die Frage zu klären, ob die Genom-Annotation hier korrekt ist (Salzberg, 2019). Das Vorliegen eines Methionins in allen drei NfFNT an gleicher Position im Alignment (M215<sub>NfFNT1</sub>, M183<sub>NfFNT2</sub>, M223<sub>NfFNT3</sub>) könnte ein Indikator auf ein dort liegendes Startmethionin sein, was dafürspräche, dass der *open reading frame* möglicherweise erst hier beginnt. Die große Variabilität in den Termini deutet darauf hin, dass die Gengrenzen noch nicht ganz klar identifiziert sind.



**Abbildung 4.20:** Aufbau eines Protomers von NfFNT1-3. Cyan: Lysine im Poreneingang, grün: Selektivitätsfilter, orange: extrazelluläre Konstriktion, grau: zentrales Histidin und Threonin, lila: zytoplasmatische Konstriktion. Hellgelb transparent: einzelnes Protomer, hellgrau: Lösemittelzugängliche Fläche. Grenzwert: 7 Å und 3 *solvent radii* zur Visualisierung des Lösemittel-zugänglichen Raumes. Model basiert auf PDB 7mxy. Dargestellt mit PyMol Molecular Graphics.

### Topologie von NfFNT1-3

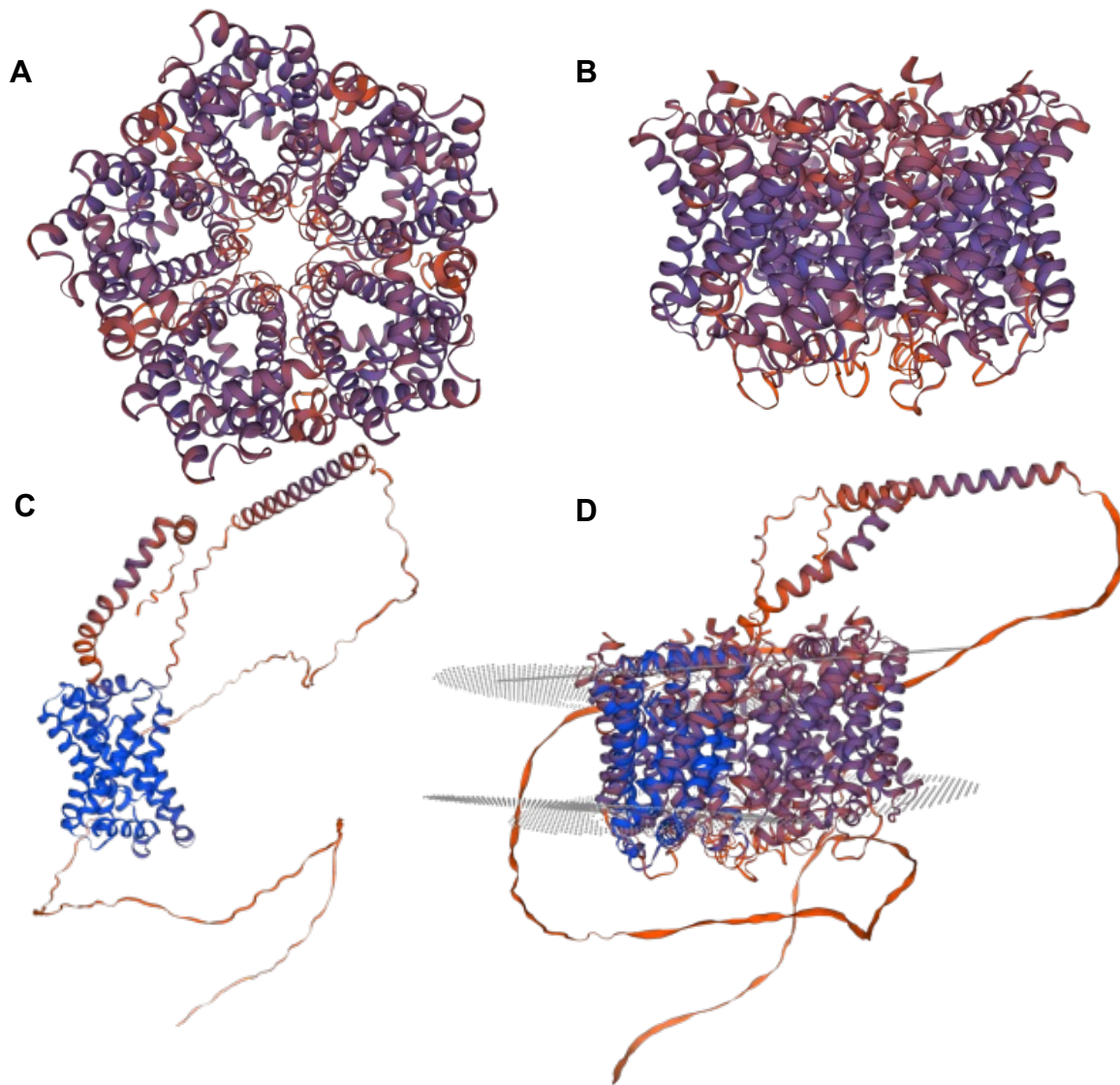
Die Übersicht der möglichen Topologie (**Abbildung 4.21**) von NfFNT1-3 zeigte, wie das Alignment, für FNT untypisch lange Termini außerhalb der Membran. Dennoch weisen die Transmembranspannen TM1 bis 6 inklusive der in der Membran liegenden *loops* L2 und L5 eine ähnliche Topologie wie bekannte FNT auf (Erler *et al.*, 2018; Dissertation Janis Rambow, 2015, Kiel).



**Abbildung 4.21:** Vorhersage der Topologie potenzieller FNT aus *N. fowleri*. Erstellt von Prof. Dr. Eric Beitz mit TeXtopo.

### AlphaFoldModelle

Die Modelle von NfFNT1-3 wurden mit *SwissModel* (3.8) erstellt. Exemplarisch ist das Modell von NfFNT1 gezeigt. Die von *AlphaFold* (**Abbildung 4.22**) vorhergesagte Struktur sagt das Vorliegen von sechs Transmembranspannen ab Position 227 voraus. Je bläulicher die Struktur eingefärbt ist, desto größer ist die Übereinstimmung zum *template* des Modells. NfFNT1 und PfFNT sind sich im Bereich der Transmembranspannen ausreichend ähnlich, um ein aussagekräftiges Modell zu erstellen, welches im Aufbau den bekannten FNT ähnelt (**Abbildung 1.7**). So wurde auch hier ein Pentamer gefunden, welches aus fünf Protomeren mit je einem Transportpfad aufgebaut ist.



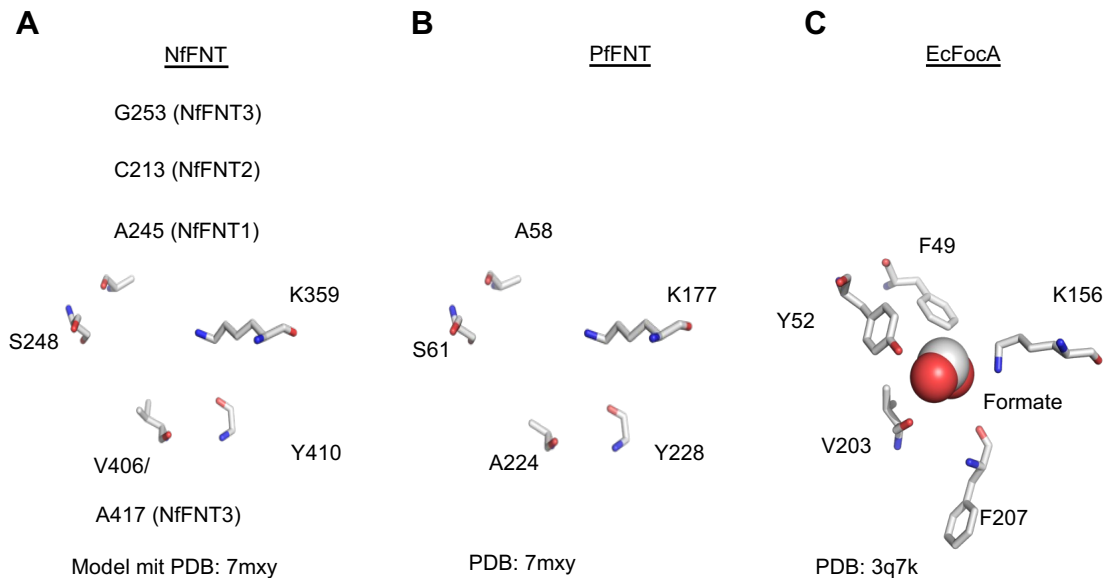
**Abbildung 4.22:** Exemplarisch das Modell von NfFNT1 erstellt mit *SwissModel* (Quelle s.o.). Vorhergesagtes Pentamer auf Basis von PfFNT (PDB 7mxy). Ansicht von (A) periplasmatischer Seite und (B) in der Seitenansicht. (C) *AlphaFold structure prediction* (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022) auf Basis von einem *pentameric formate channel* (PDB 3kly) aus *Vibrio cholerae* (Waight *et al.*, 2010b). (D) Modelle aus B und C übereinandergelegt. GMQE 0,34; QMEANDisCoGlobal:  $0,67 \pm 0,05$ . Sequenzübereinstimmung: 28,36 %.

### Selektivitätsfilter

Die Analyse der Selektivitätsfilter von NfFNT1-3 (**Abbildung 4.23**) ergab in Bezug auf den Porengrößendurchmesser eine Ähnlichkeit zum eukaryotischen PfFNT mit einer Selektivitätsfilterfläche von 41,2 Å, während einzelne Aminosäuren eher auf einer für prokaryotisch typische kleine Substrate hinweisen. Die Selektivitätsfilterfläche wurde bestimmt in dem eine Ebene durch die  $\alpha$ -Kohlenstoffatome der Aminosäuren, die den Selektivitätsfilter bilden und durch das Stickstoffatom der Seitenkette des Lysins, das im Poreneingang liegt, gezogen wurde. Lag dort kein Lysin vor, wurde das Kohlenstoffatom gewählt, welches am weitesten in das Vestibül hineinragt. Die unter Berücksichtigung der Oberfläche des Proteins freibleibende, dem Umgebungsmilieu zugängliche Fläche wurde über die Anzahl der Pixel mittels Dreisatzes über das aufgespannte Dreieck zwischen den jeweiligen Positionen

## Ergebnisse

zurückgerechnet. Insbesondere das Vorliegen eines Valins anstelle von Alanin an Position 406<sub>NfFNT1</sub> bzw. 377<sub>NfFNT2</sub> könnte für die Selektivität gegenüber größeren Substraten wie z.B. Laktat/H<sup>+</sup> verantwortlich sein (Wiechert *et al.*, 2017), wenngleich NfFNT3 an dieser Position analog zu PfFNT ein Alanin an Position 417 aufweist. Anstelle der den Porendurchmesser deutlich verengenden Aminosäuren Y52 und F49 in EcFocA liegen in NfFNT1-3 und PfFNT an dieser Stelle weniger sterisch anspruchsvolle Aminosäuren.



**Abbildung 4.23:** Selektivitätsfilter von NfFNT, PfFNT und EcFocA. (A) Selektivitätsfilter von NfFNT1-3. Abweichende Aminosäuren des jeweiligen Konstruktes in Klammern. (B) Selektivitätsfilter von PfFNT. (C) Selektivitätsfilter von EcFocA. Dargestellt mit PyMol Molecular Graphics.

### 4.4 Herstellung und funktionelle Charakterisierung von NfFNT im Hefesystem

Nach der Identifikation der Gene potenzieller NfFNT (**Abbildung 4.15**), basierend auf der NCBI-Datenbank, wurden diese in eine für *S. cerevisiae* codon-optimierte DNA-Sequenz übersetzt. Die für *S. cerevisiae* codon-optimierten NfFNT1-3 DNA-Sequenzen wurden basierend auf den ermittelten genomischen Sequenzen von NfFNT1-3 der NCBI-Datenbank erstellt und in Form von Plasmiden bei GenScript bestellt. Im Rahmen der Codon-Optimierung wurde der AT-Gehalt von 28,94 % A und 30,79 % T auf 26,55 % A und 30,62 % T im Mittel reduziert (vgl. **Tabelle 4.2**).

**Tabelle 4.2:** Basenanteile der NfFNT1-3 codierenden Wildtyp und codon-optimierten Sequenzen.

Konstrukt	Variante	Baseanteil (%)			
		A	C	G	T
NfFNT1	Codon-optimiert	25,61	24,9	18,97	30,52
	Wildtyp	28,49	23,14	19,31	29,06
NfFNT2	Codon-optimiert	26,69	24,66	17,62	31,03
	Wildtyp	29,04	20,96	17,79	32,21
NfFNT3	Codon-optimiert	27,36	26,77	15,54	30,32
	Wildtyp	29,29	22,76	15,86	31,09

Die Sequenzen sind **Abbildung 4.24** zu entnehmen. Die Plasmide wurden so konstruiert, dass das eigentliche Gen am 5'-Terminus von einer für *Spe* I und am 3'-Terminus von einer für *Xho* I codierenden Schnittstelle eingegrenzt war. Als Plasmid wurde pUC57Kan gewählt. Die

## Ergebnisse

eingrenzenden Schnittstellen wurden genutzt, um das codierende Gen mittels der Restriktionsendonukleasen *Spe* I und *Xho* I in einen geeigneten Vektor zu klonieren. Im Anschluss wurden *S. cerevisiae*-Zellen mit dem neu gewonnen Plasmid transformiert.

### optNfFNT1

```
ATGTCTTCTAGTAACACTTCCAACACCACATCTTCTACCACTTCCTCTCCAGAAGAACCATTGTGT
GCTGCTTCCACCATCAACGCATCCATCACTACCACTACCATTTCGAAGCCAGGTTACTCTGCTCCT
CAACAGCAACAACTACCTCAGTCATCTCTAACAACGATGAATCCGCCAAGTTTGCTGAAAACAAC
AATAATGGTCAATCCGCTTTGAGTATTCCAGTTATCTCCGAACCAGGTGAAGTTCCAAGAAGACT
TCAAGCGCCGCCGCTGATCCAGCTACCTCCACTTCTTCTACTCTAAAGTCTCGTTCTAAAATGAAC
ATCTTGGATGACCATCACCACCACGAAGATGAACACGCCGAAGACTTCCACCATGAAAAGTTGCC
ATTGACCTCTAAACAATCTACTTCTTGTCTCACCACGCTTTTCGACGACCACGAATTGGAAAAGAAC
TCAACAATTGTTGGAACTGCCATCTTGTCCATTATTCACAAGTATAACACCGATGCTACCAAACA
ACAACAATTACTACAACAACAAACCCAAGTTCCACAACCAAACCTTCCCAGTCCCATTGCCAGTTAC
GTTGCCATCCATCACTACCATCAACTCTCCGATTACTTTGCAAGAAACCATGGCTCTATCTGGTGA
AAAAAAGTCCAAGGAATCTTTGGACCAAACATTATCTTAGCTTTGTTGTCCGGTGTTTTCGTTGC
TTTCGGTGCTATCGCTTCTTTCAAGACCGGTGGTAACATGCCAGGTTGGGATGTGACAACCCCTG
GTTATGGTAAGTTGATCTTCTGCTGTCTTCACTGTCGGTTTGATGTTGGTCATTGTTTCTGGTT
CTGAATTATTCACCGGTAACGCTATGGTTATGATTGTCGCTATGCTGAGAAAGAAGGTTACAGCTT
GGCAGTTGTTAAGAACTTGTGCCTTTCTTTGGCTTTAATGTGTTGGGTGCCTTCATGACTATCT
ACTTTTTCATGTACTTGCCAACCACTGAAAAGGAATTGCACACTCCAGCTGGTTTCGTCACCTTACG
CTAAGAAAATTGGTGAGTCTAAGGTCTCCAAGGGTGCTGGTGTTACCATCTTATTGGGTATCGGT
TGTAAGTGGTAGTCTGTTTGGCTGTTTACATGACCTACGCCTCTAACGTTTTGGTTGATAAGTTG
GTCGGTTTGTTTCATGCCAATCTTGGCTTTTCGTTGCCGGTGTTACGAACATTGTGTTGCTAACGG
TGCTTTTCATCCCATTTGGCGATGTTATACGGTTCTGACATTACCATGTACGATTTCTTCGTTGTCAA
CTTGATGCCAGCCACTCTAGGTAACCTTGCTTGGTGCGCCATTTTTGTTGGTATGACTTTCTGGTA
CACTCACGGTGTCAGAATGGAACATTTGACTTCTTTGACGAACACTTCACTTTGAGAATGAGAGC
TGCCATTGCTCAACCAATCTTGAACGTCTGGGACAGATTGCAAAAGTTCAACCCATTCTTGAAGAA
GGAAGAAGCTATCATTTCTGCTCAAAACATTGAATTGCCAGACCACAGAGTC
```

### optNfFNT2

```
ATGGAAGACCAAGTTCCTCTCAGCAAGTTGTCTTACCAAAGGAATCAAATGTTACCGCTAGAGA
AGCTTTTCGACATCTTGCCATCTACTCACGGTTCTAAGCAACCACCAAGTTCAACAACAACAGATTCT
TTCTATCACCAAGAAGGAAGGTCAAGAAATTATTCACGAATATGATCAACATTTGGAATCCACCA
TCAACCTCCTCCATTGTTGCAAAACGTTATTGCTGAAAAGACCTTGCAATTCCTACCTTGCCCTAG
TTCCACCACCTCTCCAACCTCTTCTCACCTACAATGCAATTCTGAACAACACCAAAAAGCACATTAT
CCATCACCCTACCACTTCGAAATGGCCTCTAAGTTGCCATCTGGTTTGGTTTCTTCCAAGAA
CTTGGTTCGACGGTGCTTCTCGTGTTCACAACAACACCAACGCCACCATCCCAATCCCATCTTCCA
TGCCATCCCAACCAACCAATTGCTACCCACTCTTCTACAACCCATCTTTGGTCTTGTTCACACTC
CATTCCAAGTCATGGAAGATGAAGACTGAAGGTGTTAGAAAGTCAAAACTAACTGTTGACCAAA
TGATTGTCTTATCCTTGTTTGTGGTATCTTCAAGGGTGCTCCTGTACTTTGTCTCTCTTCACCG
CCGGTAACTCTAGAAAGTTGGAAGAAGAATTCCCAGGTTTGCAAAATCTTTTTCGGTGCTGTTT
TCCCAATCGGTTTGATCTTAATTTCTGCCACTGGTGCCGAATTATTCCTGCAACGTTTTGGTTG
TTTTGGTCGGTCTATTTTCCCGTAAGTGGAGAGCTAAAAAGTTCATCATCAATTCGCTCAATTTT
GAAGAACTTGTTTTATCCTACGTCTTCAACATGTTGGGTGCATTTGTTATGGCTTACTTCTTCGTT
TACTTGATCCAACCATGTTGTAACGCTCACTGGATTGAATACGTCAAGCATTTGGCTGAAACCAAG
AGCTCCAAATCTTTGGTGCTTGTGTTGGCCTCCGGTATTATCTGTAACATGTTAGTCACCATGGCT
ACTTACAACCTCCACGCTGCTACAACCTTTGGAGGGTAAGATTTTGGGCATCTGGTTCCCAATCAT
GACTTTGTTTTCCATTGGTTTGGAACTGTATCGCTAATGCTTACTTTATTCCATTGGGTATGTTG
TACGGAGCTAACGTCTCGCATTACGATTTCTTATTGGTAACCTATTGCCAGCTACTATCGGTAAC
ATTATTGGTGGTGCTTTTCGTTATTGGTTGTTTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
ACAGAGTTTTGTTCAACTTCTGGAATTGACGTGGTCTAAGATCAAGGAAAAGTACAAGCAATCTA
```

GAAACTCCAACCAACCAGAAAGAGTCTCTACCAACGAAAGAAAGGAATCCACTGACTCTGTCTTG  
TCTGATTTGGAAATGGGTACAGA

#### optNfFNT3

ATGACTTCTTTGGAAAAGTGTAGAAAAGTCTAACCACCCATTGCCAAGACACTACAACAAGTTTGAC  
TACCATCATCACTCTAACAACAAGTTGAACACTTTCTCTAGTCCATTGTCTTGTAAGCATGATTTTCG  
ATCCAAGTTTATCATTGAAGCTGAAAGTATTCACCACTTGCCATTACCAATGGACCACCCAAAGT  
ACGATCAAGAAGAATCCTTCGAACAAAACCCAGTCAAATCCATCCCAACCCCGCCACCTCAACAG  
CAACAACAACAATTGCACGTCGTTCCAAGCTCAGATCACGAACACTCTATTGACTCTCCATCT  
GAACACGCTTCTATCCACAAAAGTTTACCTCACGTTAACAATAAGCACACTTTGACCAAGAGAAAG  
AACTCCTTACCTTCCGAACCATCTTCTTCTCCCAAAGACCTCCTCTTTCAAGATGAAGTCCAAC  
GGTCAACCAAAATCCCATTTGTTTCAGACACGAAGAACCAATCACCTCTAACTATGACCAACAAAAG  
GGTCAACCTAACATTGATTCTACTCACTTGTTTCAGAACCAACTCTCAACCACAAACCAACCATTTG  
CCAGCTCACTCTCCACAAAATTCTGCATTCCCATTTGCCAATGTTCTTGAACCCATTCCAAGCTTTC  
GACAAGATGAAGCAAGAAGGTATCAGAAAGTCCAAGTTGGCTTTTGACCAAAATTGTTATCTTGTCT  
CTATTTGCTGGTTGTTTCGCCGGTATCGGTGGTGCCTTGTCTTGTGACCGCCGGTAACTGCCC  
AACTTTGGAAAAGGAAAATCCAGGTTTGCAAAAGTTCTTTTTCGGTGCTGTGTTCCCAATTGGTAT  
TATCTTCACTATCTTATTCGGTGCTGAATTGTTTTCCACTAACTCATTGACTGTTTTCATCGGCTTG  
TTGTCTCGTAAATGGAGATCTAAGAAGTTTATCTTGCAATACTTGCAATTCTCCAAGAAGTTGTTCT  
TATCCTACATTTTCAACATGATTGGTTCCCTCATGGTTGCTTACTTCTTCTGTACCTTACTCAACC  
ATGTTGTGATGCTCCATGGATTGCCTACGCTAAGAAGATTGCTTTGTCCAAAGTTTCCAAAACATT  
CGGTCAAAACGTCTTGTGGGTATCGTCTGTAACATGATGTTGACTTTGTGCATCTATATCTTTTT  
GCCGCCACCACCGTCGAAGGTAAGATCATCGGTGCTGGTTCCAGTTATGGGTTTCGCTTCCTC  
TGGATTTGAACATTGTATCGCTAACGCTTCTTCATTCCATTGGGTATGTTGTTTCGGTGAAGACAT  
TTCTGTCCAAGACTTCTTGGTTCAAAAGTTGTTGCCAACCACCATTTGGTAACCTAATTGGTGGTTC  
TTTCATCGTCGGTTTGTACTATACTACGTTACGACTTGAGACACCGTCACAGAAGATTCTTATT  
CAACACCATCGAGAGATTGTGGTCTTACTTGAAGCAAAGATACATTACCAAAGATTGCCACACTC  
CTCTAGCACTACTCCACTCTCATCCACCACTGCTGCTACCTCTCACCTGGGTACTGGTGAATCCT  
CCTCTAAGCGTACTGACTCCCCATCTACCCAACAACCATCCAACAAGTCTTCTTTAGAATTCACCG  
AGGAAGTTGAAATGGTTCGATATCAACGTTGAAAACAAGGTT

**Abbildung 4.24:** ORF von optNfFNT1-3. Gezeigt sind nur die codierenden Bereiche. Schnittstellen sind ggf. in 5' und 3'-Richtung ergänzend eingefügt worden.

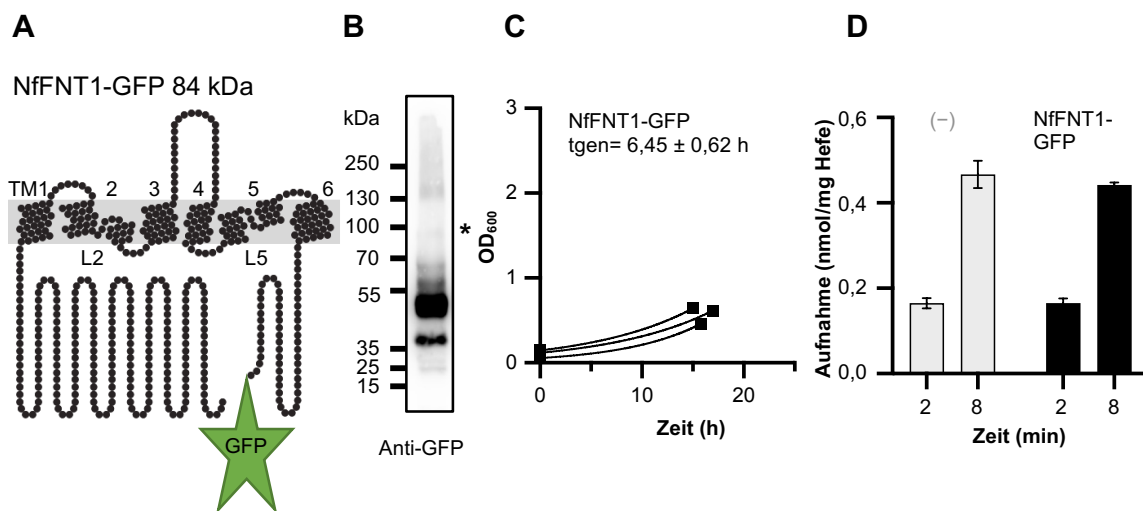
Zur Herstellung und funktionellen Charakterisierung wurden die für *S. cerevisiae* codon-optimierten für NfFNT1-3 codierenden Sequenzen in einen für die Hefe geeigneten Vektor (pDR196) kloniert (vgl. **Abbildung 2.3**, **Abbildung 2.4**). Sofern nichts anderes angegeben ist, weisen alle Konstrukte im gewählten Vektor einen N-terminalen HA-tag und einen C-terminalen His<sub>10</sub>-tag auf.

#### 4.4.1 Codon-optimierte Wildtyp-NfFNT

##### 4.4.1.1 NfFNT1

Zunächst wurde NfFNT1 als GFP-Fusionskonstrukt hergestellt. Die transformierten Hefezellen (3.3.1) vom Stamm W303 1A  $\Delta$ jen1  $\Delta$ ady2 wurden kultiviert (3.3.4), mechanisch aufgeschlossen (3.3.6) und mittels Western Blot-Analytik (3.2.5) und <sup>14</sup>C-Transportassay (3.5.1) untersucht. Im Western Blot (**Abbildung 4.25 B**) wurde bei einer theoretischen Masse des Fusionsproteins von 84 kDa eine Bande auf einer Laufhöhe einer Masse von 25 kDa detektiert. Diese wurde dem löslichen GFP mit einem Molekulargewicht von 26,9 kDa zugeordnet. Zudem wurde eine sehr prägnante Bande kurz über 35 kDa und zwei weitere Banden bei 50 kDa detektiert. Da die Detektion mit einem Primärantikörper erfolgte, der gegen das C-terminal fusionierte GFP gerichtet war, wurde angenommen, dass es sich um

Abbruchfragmente handelt. Der Abbruch erfolgte, den rechnerischen Massen nach, zwischen der 5. und 6. TM (ca. 10,7 kDa + GFP), zwischen der 4. und 5. TM (14,9 kDa + GFP) oder zwischen der 3. und 4. TM, was einer Bande bei ca. 50 kDa entsprach (20 kDa + GFP). Eine schwache Bande mit einer Laufhöhe bei knapp unter 100 kDa lief auf der zu erwartenden Höhe für das vollständig translatierte Protein. Die Generationszeit der NfFNT1-GFP herstellenden Hefen (**Abbildung 4.25 C**) war im Vergleich zu mit dem Leerplasmid transformierten Hefen (**Abbildung 4.14**) fast verdoppelt. Eine Überprüfung des Transportes von Acetat/H<sup>+</sup> bei pH 5,8 ergab keine über dem Hintergrund liegende Aufnahme (**Abbildung 4.25 D**). Die hohe Aufnahme des Hintergrundes für Acetat liegt in dem Faktor zur Berechnung begründet, der sich aus der niedrigen Gesamtaktivität der eingesetzten <sup>14</sup>C-Stock-Substratlösung ergeben hat.



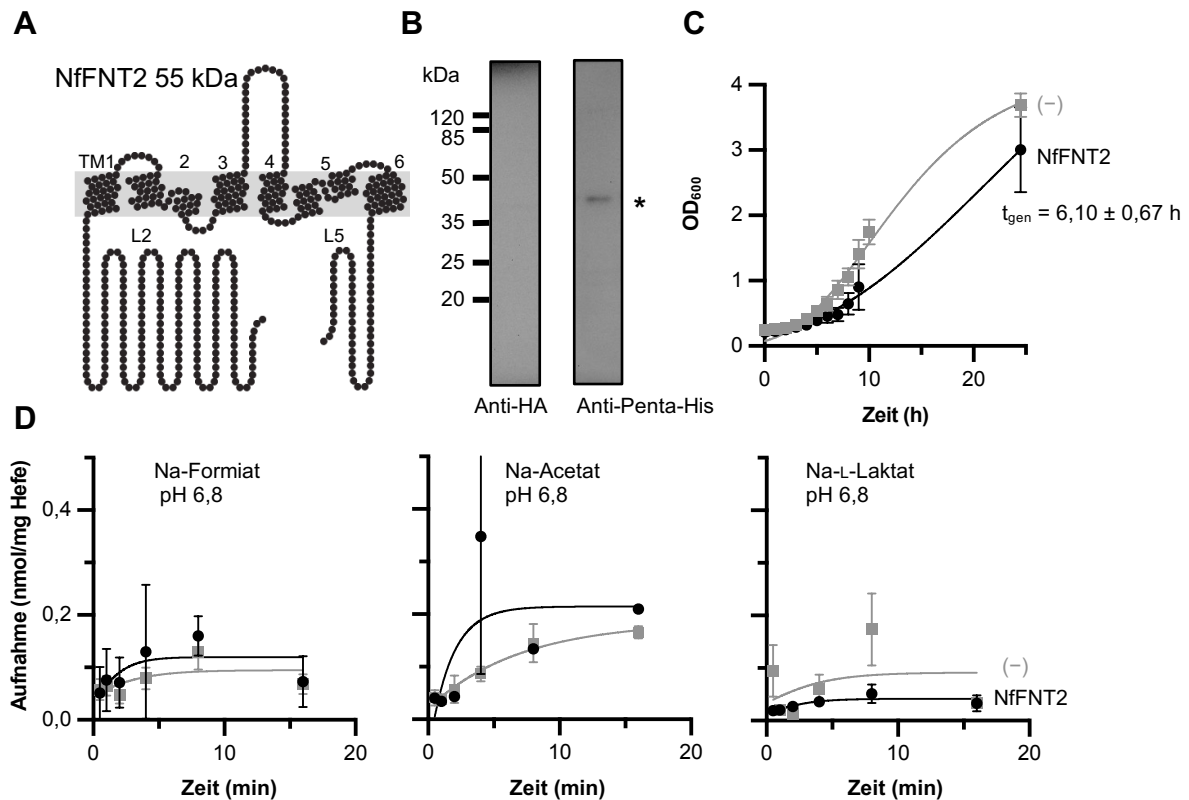
**Abbildung 4.25:** NfFNT1 als GFP-Fusionsprotein. (A) Topologie von NfFNT1 mit C-terminalem GFP dargestellt. (B) Western Blot der mikrosomalen Fraktion. Belichtung: 1 min; Acrylamidgel: 10 %; Auftragsmenge: 25 µg Gesamtprotein. (C) Generationszeit transformierter Hefezellen unter Einbeziehung der lag-Phase. (D) Aufnahme von Acetat bei pH 5,8 von NfFNT1-GFP (schwarz) im Vergleich zu mit dem Leerplasmid (pUG35(-)) transformierten Hefezellen (hellgrau). \* Markierung: Monomer. Die Fehler stellen die S.E.M. der technischen Replikate dar (N = 2 – 3).

#### 4.4.1.2 NfFNT2

Die Herstellung und Überprüfung von Funktion von HA-NfFNT2-His<sub>10</sub> zeigte in der Western Blot-Analytik (**Abbildung 4.26 B**) eine einzelne Bande mit gegen den C-terminalen His<sub>10</sub>-tag gerichteten Antikörper bei einer theoretischen Laufhöhe zwischen 35 und 50 kDa. Die Detektion mit gegen den N-terminalen HA-tag gerichteten Antikörper ergab kein Signal. Die Kalkulation des Gewichtes des theoretisch N-terminal unvollständig translatierten Proteins ergab, dass das Konstrukt bei einer Masse von mind. 33 kDa ab Beginn der ersten Transmembranspanne vorliegen könnte. Somit war mindestens der für den Transport notwendige inner-membranständige Teil des Proteins translatiert und wurde auf Funktion überprüft. Aufgrund des *gel-shifting* Verhaltens (Rath & Deber, 2013) von Membranproteinen wurde die Annahme, dass es sich um das vollständig translatierte Protein handelt, nicht verworfen. Die Generationszeit von NfFNT2 herstellenden Hefen war im Vergleich zu den mit Leerplasmid transformierten Hefen verdoppelt. Auch bei Erreichen der exponentiellen Phase verdoppeln sich die das Zielprotein herstellenden Hefen deutlich langsamer (**Abbildung 4.26 C**). Die Aufnahmekurve von Formiat/H<sup>+</sup> und Acetat/H<sup>+</sup> zeigte keinen deutlich über dem

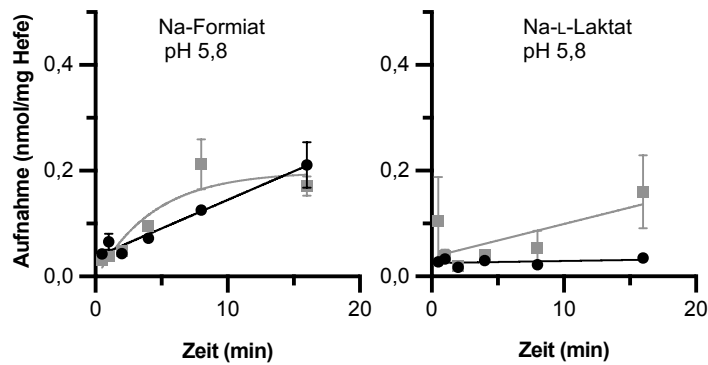
## Ergebnisse

Hintergrund liegenden Transport durch NfFNT2. Auch für Laktat/H<sup>+</sup> wurde kein Transport gefunden (**Abbildung 4.26 D**).



**Abbildung 4.26:** Herstellung und Funktion von NfFNT2. (A) Übersicht der Topologie von NfFNT2. (B) Western Blot der mikrosomalen Fraktion. Links: gegen N-terminalen Hämagglutinin-tag gerichteter Anti-HA-Primärantikörper. Rechts: gegen C-terminalen His<sub>10</sub>-tag gerichteter Anti-Penta-His-Primärantikörper. Auftragsmenge: 20 µg Gesamtprotein. Belichtung: 45 min. (C) Wachstum transformierter Hefezellen. (D) Aufnahme FNT-typischer Monocarboxylate bei pH 6,8 und einem Substratgradienten von 1 mM. Mit dem Leerplasmid transformierte Hefezellen sind hellgrau und NfFNT2 herstellende Hefezellen in schwarz dargestellt. \* Markierung: Monomer. Die Fehler stellen die S.E.M. der technischen und biologischen Replikate dar (N = 2 – 6).

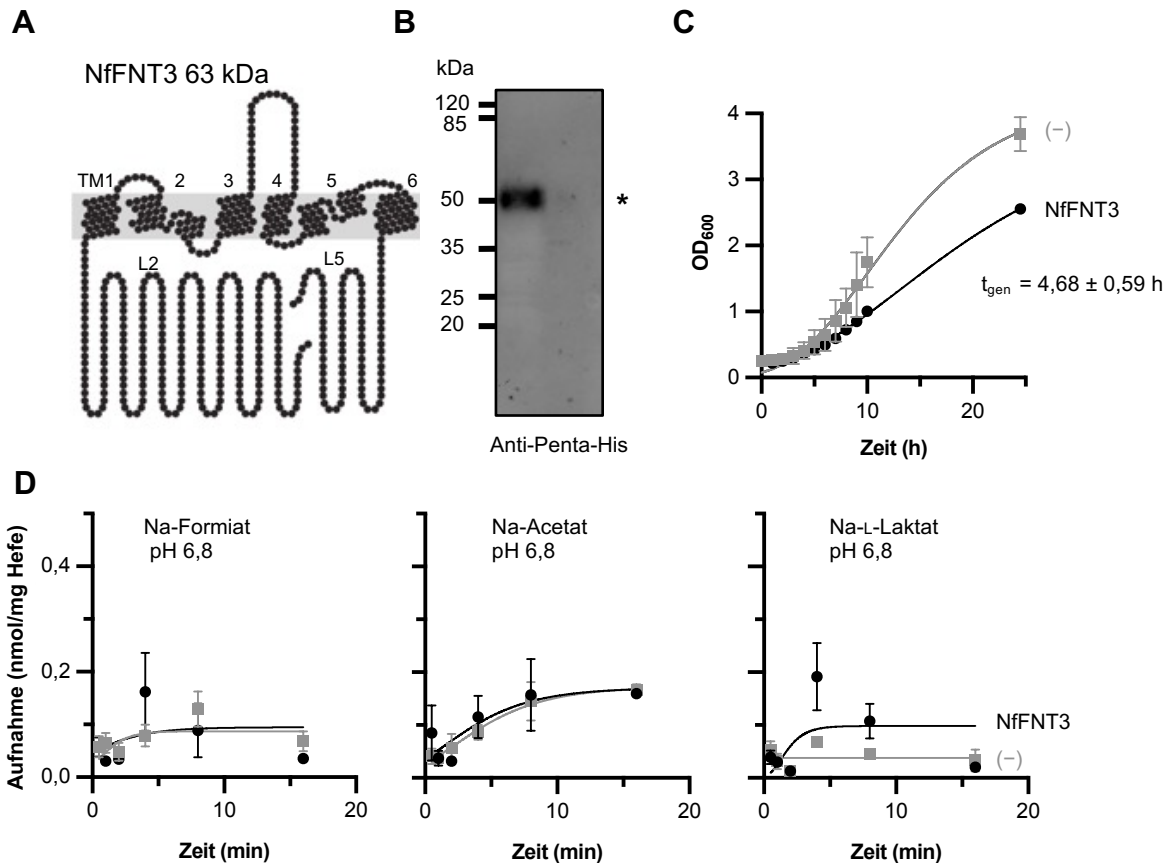
Eine Überprüfung der proteinspezifischen Aufnahme der Substrate Formiat/H<sup>+</sup> und Acetat/H<sup>+</sup> wurde bei der Erniedrigung des pH-Wertes um eine *log*-Stufe überprüft, da FNT im saureren eine höhere Transportrate aufweisen (Dissertation Marie Wiechert, 2017, Kiel). Dies wurde für NfFNT2 nicht bestätigt (**Abbildung 4.27**). Es deutete sich ein linearer Verlauf der Transportkurve von Formiat/H<sup>+</sup> bei pH 5,8 mit einer Transportrate von 0,01 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> an. Da eine sehr langsam verlaufende Exponentialkurve im ersten Teil der Kurve linear verlaufen kann, könnte es sich hier um Transport handeln. Ein linearer Kurvenverlauf ist FNT-untypisch.



**Abbildung 4.27:** Substrataufnahme von NfFNT2 bei pH 5,8. Aufnahme von Na-Formiat (links) und Na-L-Laktat (rechts) bei pH 5,8 bei einem Substratgradienten von 1 mM. Mit dem Leerplasmid transformierte Hefezellen sind in hellgrau und NfFNT2 herstellende Hefezellen in schwarz dargestellt. Die Fehler stellen die S.E.M. der technischen und biologischen Replikate dar (N = 2 – 4).

#### 4.4.1.3 NfFNT3

HA-NfFNT3-His<sub>10</sub> wurde unter Verwendung des gegen den C-Terminus gerichteten Antikörpers mittels Western Blot-Analytik bei einer theoretischen Masse von 63 kDa auf Laufhöhe von ca. 50 kDa im 10.000 g Pellet detektiert (**Abbildung 4.28 B**). Unter der Annahme, dass N-terminal Abbruchfragmente vorlagen, lag im Minimum der membranständige Bereich TM1 bis TM6 des Zielproteins mit ca. 36 kDa vor. Die Generationszeit von NfFNT3 herstellenden Hefen im Vergleich zu den mit Leerplasmid transformierten Hefen war erhöht und auch bei Erreichen der exponentiellen Phase verdoppelten sich die das Zielprotein herstellenden Hefen deutlich langsamer (**Abbildung 4.28 C**). Eine Messung der Aufnahme der Substrate Formiat/H<sup>+</sup>, Acetat/H<sup>+</sup> und L-Laktat/H<sup>+</sup> zeigte keinen Transport, der über dem Hintergrund liegt. Lediglich für L-Laktat/H<sup>+</sup> deutete sich Transport an (**Abbildung 4.28 D**). Der Transport von L-Laktat/H<sup>+</sup> ist für ein FNT bisher nicht kausal zu begründen, wenn kleinere Substrate wie Formiat/H<sup>+</sup> und Acetat/H<sup>+</sup> nicht geleitet wurden.

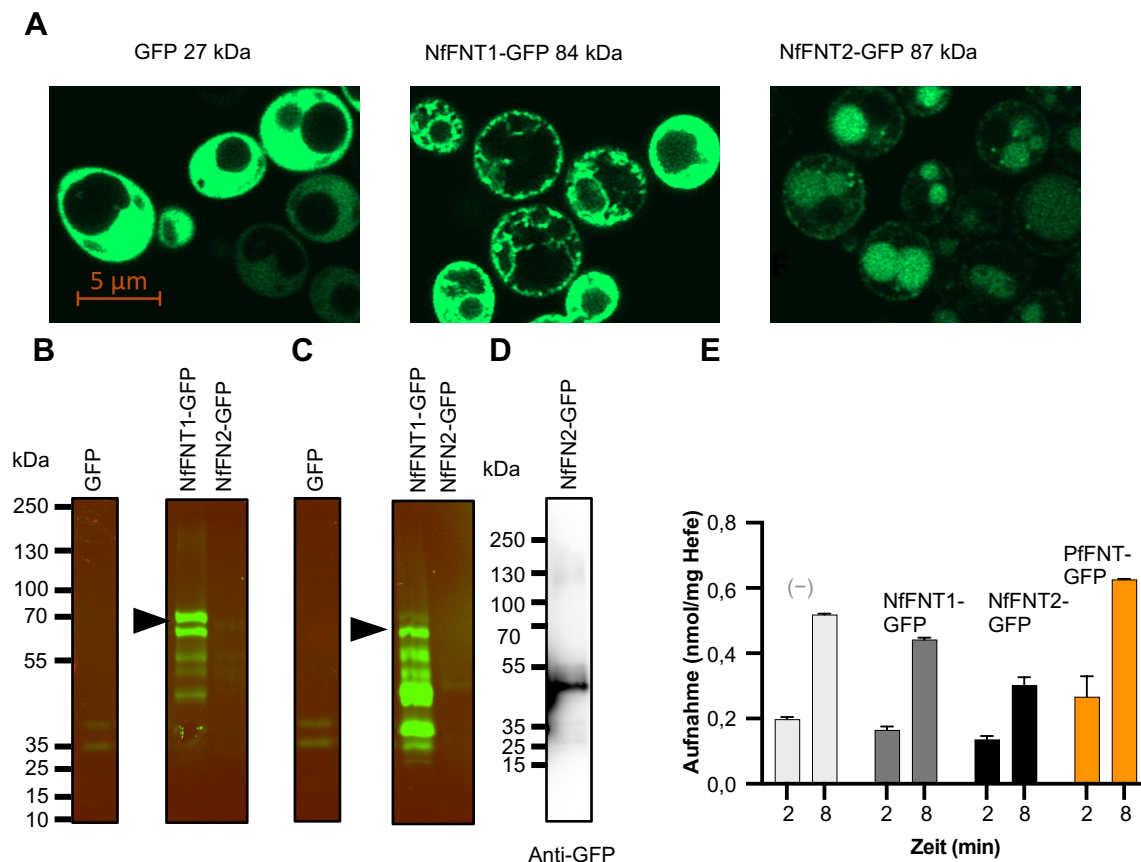


**Abbildung 4.28:** Herstellung und Funktion von NfFNT3. (A) Übersicht der Topologie von NfFNT3. (B) Western Blot 10.000 *g*-Pellet (links) und der mikrosomalen Fraktion (rechts) unter Verwendung eines gegen den C-terminalen His<sub>10</sub>-tag gerichteten Anti-Penta-His-Primärantikörper. Auftragsmenge: 20 µg Gesamtprotein. Belichtung: 45 min. (C) Wachstum transformierter Hefezellen. Die Generationszeiten wurden unter Einbeziehung der *lag*-Phase von Übernachtskulturen ermittelt. (D) Aufnahme FNT-typischer Monocarboxylate bei pH 6,8 und einem Substratgradienten von 1 mM. Mit dem Leerplasmid transformierte Hefezellen sind hellgrau und NfFNT3 herstellende Hefezellen in schwarz dargestellt. Die Fehler stellen die S.E.M. der technischen und biologischen Replikate dar (N = 2 – 3). \* Monomer.

#### 4.4.2 Lokalisation der heterolog hergestellten NfFNT in der Hefezelle

Da keine Funktion von NfFNT1 und 2 gemessen wurde, sollte im nächsten Schritt ermittelt werden, ob diese sich in der Zellmembran der Hefezelle befinden. Zur Überprüfung der Lokalisation von NfFNT1 und 2 in der Hefezelle wurden diese als GFP-Fusionsproteine hergestellt, und mittels Konfokalmikroskopie (**Abbildung 4.29 A**) untersucht (3.3.5). Für NfFNT1-GFP deutete sich, im Vergleich zu den löslichen GFP herstellenden Hefezellen, eine Lokalisation in unmittelbarer Nähe zur oder in der Plasmamembran an. NfFNT2-GFP zeigte deutlich weniger Tendenz in Richtung der Plasmamembran der Hefezelle. Es wurde eine Akkumulation, vermutlich innerhalb der Vakuole, beobachtet. Zur exakten Lokalisation empfiehlt sich eine immunologische Anfärbung der Kompartimente der Hefezelle wie z.B. eine Färbung der Kerne oder der Plasmamembran (Molecular Probes™ Handbook, 2010). Die In-Gel-Fluoreszenz (**Abbildung 4.29 B und C**) der mikrosomalen Fraktion bestätigte die Erkenntnisse der Konfokalmikroskopie. Auch lösliches GFP lässt sich über die Isolation der mikrosomalen Fraktion mittels In-Gel-Fluoreszenz nachweisen. Die Fluoreszenzintensität erscheint geringer als die des membranständigen NfFNT1-GFP. Für NfFNT1-GFP wurde eine Art Proteinleiter im Bereich zwischen 100 und 35 kDa gefunden, was wiederum für

Abbruchfragmente spricht (**Abbildung 4.25**). Für NfFNT2-GFP wurde In-Gel-Fluoreszenz in geringer Intensität nachgewiesen. Auch bei einer Inkubation der Proben bei 60 °C, die für NfFNT1-GFP deutlich klarere Banden lieferte (**Abbildung 4.29 B**) wurde eine geringe In-Gel-Fluoreszenz gefunden. Im Western Blot (**Abbildung 4.29 D**) wurde für NfFNT2-GFP eine starke Bande knapp unter der theoretischen Laufrhöhe von 55 kDa und weitere schwächere Banden kurz darüber und darunter detektiert. Die Transmembranspannen TM1-6 weisen eine theoretische Masse von 33 kDa auf. Damit entsprach die schwächste oberste Bande bei ca. 60 kDa dem Bereich der Transmembranspannen mit fusioniertem GFP. Eine Messung der Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -markierten Acetat/ $\text{H}^+$  bei pH 5,8 zeigte für keines der beiden NfFNT-GFP-Fusionskonstrukte Transport (**Abbildung 4.29 E**), während für PfFNT-GFP Transport gefunden wurde. (**Abbildung 4.14**).



**Abbildung 4.29:** Lokalisation der NfFNT1-2-GFP-Fusionskonstrukte in der Hefezelle. (A) Konfokalmikroskopie-Aufnahmen von mit dem Leerplasmid transformierten Hefezellen (links), NfFNT1-GFP herstellende (mitte) und NfFNT2-GFP herstellende Hefe (rechts). Aufnahme der Bilder mit inversem ZEISS Axio observer 7 mit LSM 900 Erweiterung. Anregungswellenlänge 488 nm. Emissionswellenlänge 490 bis 586 nm. Der Skalierungsbalken entspricht 5  $\mu\text{m}$ . In-Gel-Fluoreszenz (10 %-iges Acrylamid-Gel) der mikrosomalen Fraktion nach Denaturierung für 2 min bei 60 °C (B) und nach 30 min bei 37 °C (C). Belichtung: 100 ms. (D) Western Blot der mikrosomalen Fraktion nach Inkubation bei 37 °C mit gegen GFP gerichteten Anti-GFP-Primärantikörper (Belichtung: 6 min). Auftragsmenge: 25  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein pro *lane*. (E) Aufnahme von Na-Acetat bei pH 5,8. Die mit Leerplasmid transformierten Hefen sind in hellgrau, NfFNT1-GFP in dunkelgrau, NfFNT2-GFP in schwarz und PfFNT-GFP in orange dargestellt. Die Fehlerbalken stellen S.E.M. der technischen Replikate dar (N = 2 – 3).

## 4.5 Einfluss der Termini auf Herstellung und Funktionalität von NfFNT

### 4.5.1 Herstellung und Funktionalität N- und C-terminal verkürzter NfFNT

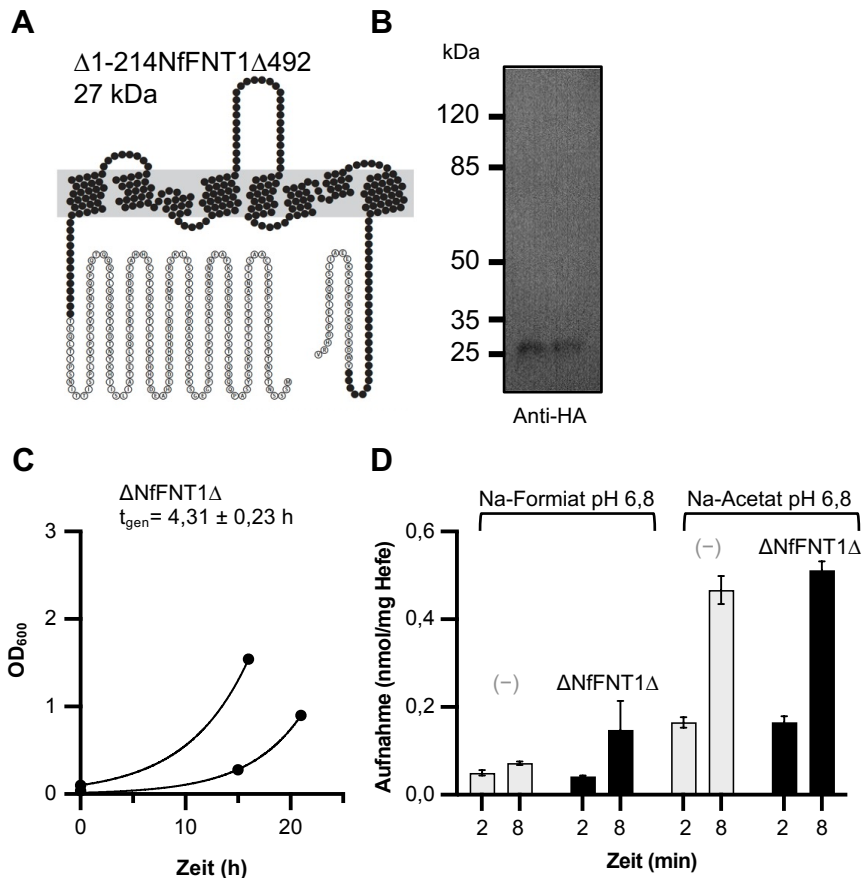
Frühere Untersuchungen von FNT anderer humanpathogener Parasiten wie z. B. von *T. gondii* haben gezeigt, dass eine Verkürzung langer Termini Einfluss auf Herstellung und Funktion der heterolog in *S. cerevisiae* W303 1A  $\Delta$ jen1  $\Delta$ ady2 hergestellten Membranproteine haben kann. So konnte für TgFNT1-3 nach Verkürzung der Termini Transport von FNT-typischen Substraten wie Formiat und L-Laktat nachgewiesen werden (Dissertation Holger Erler, 2018, Kiel; Erler *et al.*, 2018).

#### 4.5.1.1 $\Delta$ NfFNT1 $\Delta$

Im Rahmen der Masterarbeit von Robin Hertel wurde NfFNT1 N-terminal um die ersten 214 Aminosäuren und C-terminal um 31 Aminosäuren verkürzt. So blieben 13 Aminosäuren vor der ersten TM und 27 Aminosäuren nach der letzten TM übrig. Die N-terminale Verkürzung wurde so gewählt, dass die Translation an der Stelle beginnt, an der im Alignment für alle drei Konstrukte Methionine im Bereich vor der ersten TM zu finden sind. Die C-terminale Verkürzung orientiert sich an der Anzahl an Aminosäuren, die bei PfFNT auf die letzte TM folgen (**Abbildung 4.30**). Das verkürzte Konstrukt wird im Folgenden  $\Delta$ NfFNT1 $\Delta$  genannt und ist in **Abbildung 4.31 A** graphisch dargestellt. Die Transformation der Hefezellen wurde durch die Verfolgung der Generationszeit indirekt überprüft. Diese war von  $\Delta$ NfFNT1 $\Delta$  herstellenden Hefen höher als die der mit dem Leerplasmid transformierten Hefen (**Abbildung 4.31 C**). Die Herstellung wurde im Rahmen der Masterarbeit von Robin Hertel mittels Western Blot-Analytik überprüft. Es wurde eine Bande auf Laufhöhe bei knapp über 25 kDa detektiert, was der berechneten Masse des vollständig translatierten monomeren Konstruktes entspricht (**Abbildung 4.31 B**). Weder für Formiat/H<sup>+</sup> noch für Acetat/H<sup>+</sup> konnte bei pH 6,8 für die überprüften Messzeitpunkten ein sich vom Hintergrund signifikant abgrenzender Transport gemessen werden (**Abbildung 4.31 D**) (t-test,  $P < 0,05$ ).

EcFocA	.....MKADNPFD.....LPLPAAMAKVAEE	21
PfFNT	.....MPPNNSKYVLDPV.....IKSVCGGEESYIRIVE	30
NfFNT1	SHHAFDDHELEERTQQLETAIISIIHKYNTDATKQQQLQQQTQVPCPNFVPLPVTLPSITTINSPITLQETVAL	185
NfFNT2	ASNLP.SGLVSSKNLVDG.....ASRVPPQHHATIPSPSPSPPIATHSSYNPS..LVLFHTPFQVMEKYKT	217
NfFNT3	NSNGQPNSHLFRHEEPITSNYD...QQKGQPNIDSTHFRNTNSQPQTNHLPAHSPQNSAFPLPMFLNPFQAFDKYKQ	225
TM6		
EcFocA	GGCLLYGLTYWVIYLRNDHH.....	285
PfFNT	AGAIVLCPLFYTYKEHYYNFERSKRDNDNAQMSLSIELRN.....	309
NfFNT1	GGAIFVCGMTFWYTHGVRMEHLYFDEHFTLRMRAAIAQPLINWDR.....LQKFNPFLKKEEA	508
NfFNT2	GGAIFVCGCLLYFYVDYRNRHNRVLFNFLELTWSKIKKEYKQSN.....SNQPERVSTNERKES	479
NfFNT3	GGSFIVGLLLYYVHDLRHRHRRFLFNTLERLWSYKQRYIHQRLPHSSSTTPLSSTTAATSHLGTGESSSKRTDS	535

**Abbildung 4.30:** Terminale Verkürzungen NfFNT1-3. Oben: N-terminale Verkürzung „Startmethionin“. Unten: C-terminale Verkürzung in Orientierung an PfFNT. Der rote Kasten liegt über den jeweiligen Positionen.



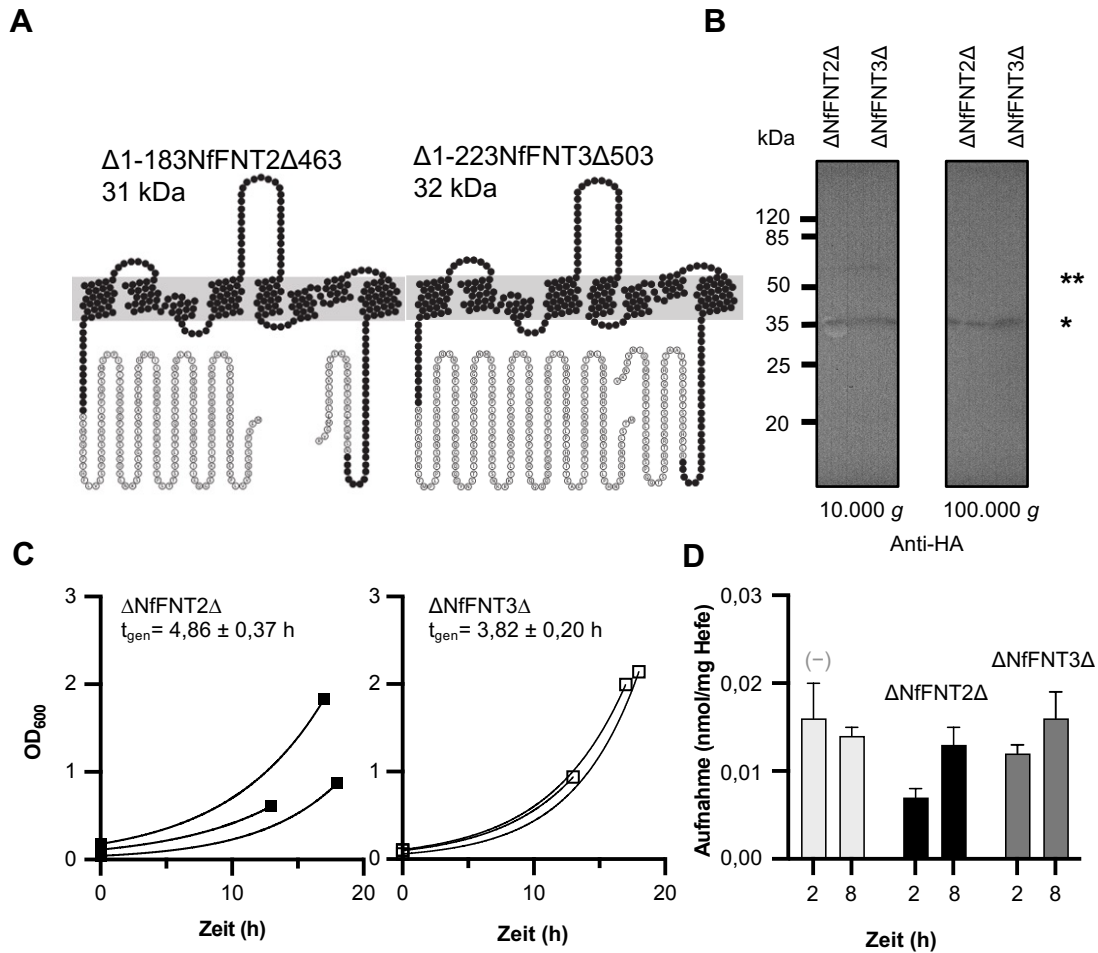
**Abbildung 4.31:** Herstellung und Funktionsuntersuchung von doppelt verkürztem NfFNT1. (A) Übersicht der Topologie des doppelt verkürzten NfFNT1. Weiß: verkürzter Bereich. (B) Western Blot (links) 10.000 *g*-Pellet (10,41  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein) und (rechts) 100.000 *g*-Pellet (18,75  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein). Belichtung: 45 min (C) Wachstum und Generationszeit unter Berücksichtigung der *lag*-Phase des Wachstums einer Übernachtskultur. (D) Funktionsuntersuchung mit  $^{14}\text{C}$ -markierten Substraten. Die Aufnahme von Na-Formiat (links) und Acetat (rechts) durch  $\Delta\text{NfFNT1}\Delta$  (schwarz) für 2 und 8 min bei pH 6,8 im Vergleich zum Hintergrund (-) (hellgrau). Die Fehler stellen die S.E.M. der technischen Replikate dar ( $N = 2 - 3$ ).

#### 4.5.1.2 $\Delta\text{NfFNT2}\Delta$ und $\Delta\text{NfFNT3}\Delta$

Die Klonierung der doppelt terminal verkürzten Konstrukte von NfFNT2 und 3 wurde ebenfalls im Rahmen der Masterarbeit von Robin Hertel durchgeführt. So wurde NfFNT2 N-terminal um 183 Aminosäuren verkürzt, sodass noch 12 Aminosäuren vor der ersten TM liegen und C-terminal um 28 Aminosäuren verkürzt, sodass 28 Aminosäuren auf TM 6 folgen. Das Konstrukt ist in **Abbildung 4.32 A** dargestellt und wird im Folgenden als  $\Delta\text{NfFNT2}\Delta$  bezeichnet. NfFNT3 wurde um 223 Aminosäuren auf die gleiche Anzahl Aminosäuren bis hin zur angenommenen ersten TM verkürzt und um 61 Aminosäuren C-terminal verkürzt, sodass wie bei  $\Delta\text{NfFNT2}\Delta$  28 Aminosäuren auf die letzte angenommene TM folgen. Die terminalen Verkürzungen orientierten sich hierbei an den Längen der Termini von PfFNT (vgl. **Abbildung 4.19**). Das Konstrukt wird im Folgenden als  $\Delta\text{NfFNT3}\Delta$  bezeichnet und ist in **Abbildung 4.32 A** graphisch dargestellt. Mittels Western Blot-Analytik wurde sowohl für  $\Delta\text{NfFNT2}\Delta$  als auch  $\Delta\text{NfFNT3}\Delta$  im 10.000 *g*-Pellet als auch in der mikrosomalen Fraktion eine Bande auf Höhe von 35 kDa detektiert. Im 10.000 *g*-Pellet wurde zusätzlich für beide Konstrukte eine Bande mit geringer Intensität zwischen 80 und 50 kDa bei ca. 60 kDa detektiert (**Abbildung 4.32 B**). Bei einem berechneten Molekulargewicht von 31 kDa für  $\Delta\text{NfFNT2}\Delta$  bzw. 32 kDa für  $\Delta\text{NfFNT3}\Delta$  befanden sich die detektierten Banden auf der erwarteten Höhe für das vollständig translatierte Protein

## Ergebnisse

als auch für ein potenzielles Dimer im 10.000 *g*-Pellet. Eine Detektion mit gegen den C-terminalen His<sub>10</sub>-tag gerichtetem Antikörper ergab kein Signal. Die Generationszeit von  $\Delta$ NfFNT2 $\Delta$  war im Vergleich leicht erhöht, während Hefen, die  $\Delta$ NfFNT3 $\Delta$  herstellen, eine ähnliche Generationszeit wie PfFNT herstellende Hefen aufwiesen (**Abbildung 4.32 C**). Im <sup>14</sup>C-Transportassay wurde für keines der beiden Konstrukte eine Aufnahme von Formiat gefunden (**Abbildung 4.32 D**).



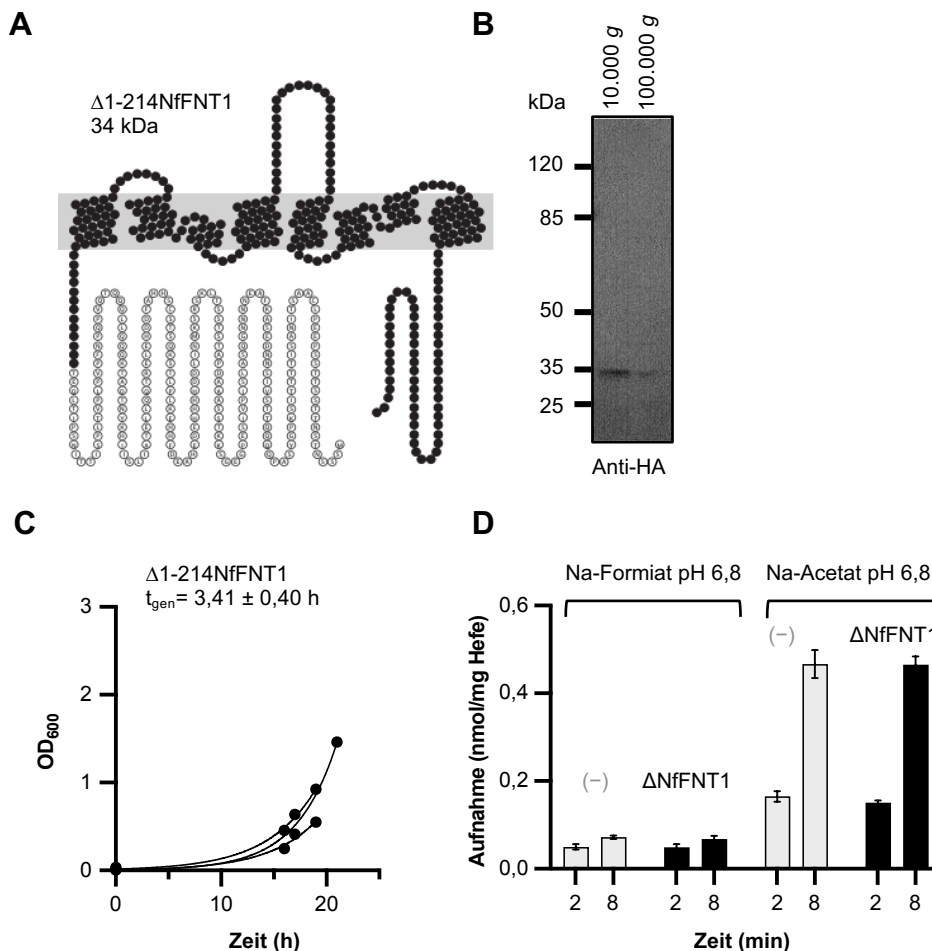
**Abbildung 4.32:** N- und C-terminal verkürztes NfFNT2 und 3. (A) Übersicht der Topologie von  $\Delta$ NfFNT2 $\Delta$  (links) und  $\Delta$ NfFNT3 $\Delta$  (rechts). Weiß: verkürzter Bereich. (B) Western Blot des 10.000 *g*-Pellets (links) und der mikrosomalen Fraktion (rechts) mit Detektion über den gegen den HA-tag gerichteten Anti-HA-Primärantikörper. Auftragsmenge: 25  $\mu$ g Gesamtprotein pro *lane*. Belichtung: 45 min. (C) Wachstum und Generationszeit von  $\Delta$ NfFNT2 $\Delta$  (links, schwarz geschlossen) und  $\Delta$ NfFNT3 $\Delta$  (rechts, schwarz offen) unter Einbeziehung der *lag*-Phase des Wachstums einer Übernachtskultur. (D) Funktionsuntersuchung von Na-Formiat bei pH 6,8 durch  $\Delta$ NfFNT2 $\Delta$  (schwarz) und  $\Delta$ NfFNT3 $\Delta$  (dunkelgrau) im Vergleich zu mit dem Leerplasmid transformierten Hefen (-) (hellgrau). Die Fehler stellen S.E.M. der technischen Replikate dar (N = 2 – 3). \* Monomer, \*\* Dimer.

#### 4.5.2 Herstellung und Funktionalität einfach N- oder C-terminal verkürzter NfFNT

Im nächsten Schritt wurden die Konstrukte jeweils entweder N- oder C-terminal verkürzt. Hierbei wurde sich vor allem auf den N-Terminus konzentriert, da der C-Terminus im Vergleich kürzer ist.

##### 4.5.2.1 $\Delta$ NfFNT1

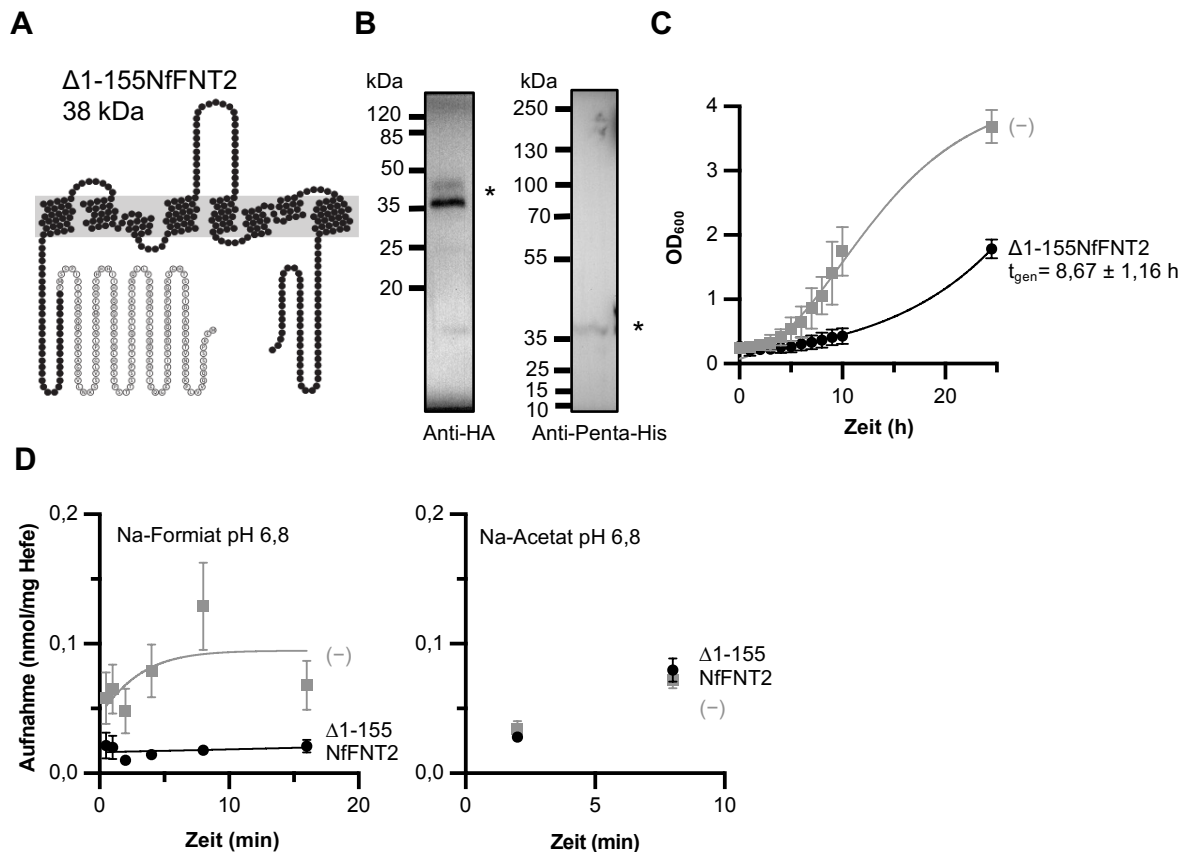
NfFNT1 wurde N-terminal um 214 Aminosäuren verkürzt, während der C-Terminus nicht verändert wurde. Das Konstrukt wird im Folgenden  $\Delta$ NfFNT1 bezeichnet und ist in **Abbildung 4.33 A** graphisch dargestellt. Die Herstellung wurde im Rahmen der Masterarbeit von Robin Hertel mittels Western Blot-Analytik überprüft und zeigt eine Bande des vollständig translatierten monomeren Konstruktes auf Laufhöhe von ca. 35 kDa mit gegen den N-terminalen tag gerichteten Antikörper (**Abbildung 4.33 B**). Die Generationszeit der  $\Delta$ NfFNT1 herstellenden Hefen war geringer als die des doppelt verkürzten  $\Delta$ NfFNT1 $\Delta$  (Vgl. **Abbildung 4.31 C** und **Abbildung 4.33 C**). Eine Funktionsüberprüfung von  $\Delta$ NfFNT1 ergab keinen Transport von Formiat/H<sup>+</sup> oder Acetat/H<sup>+</sup> bei pH 6,8 (**Abbildung 4.33 D**).



**Abbildung 4.33:** Herstellung und Funktionsuntersuchen von N-terminal verkürztem NfFNT1. (A) Übersicht der Topologie von  $\Delta$ NfFNT1. Weiß: verkürzter Bereich. (B) Western Blot. Auftragsmenge: 10.000 g-Pellet 10,41  $\mu$ g und 100.000 g-Pellet 18,75  $\mu$ g Gesamtprotein. Belichtung: 45 min (C) Wachstum und Generationszeit einer Übernachtskultur. (D) Funktionsuntersuchung mit <sup>14</sup>C-markierten Substraten. Die Aufnahme von Na-Formiat (links) und Acetat (rechts) durch  $\Delta$ NfFNT1 (schwarz) bei pH 6,8 im Vergleich zum Hintergrund (-) (hellgrau). Die Fehler stellen die S.E.M. der technischen Replikate dar (N = 2).

#### 4.5.2.2 $\Delta$ NfFNT2

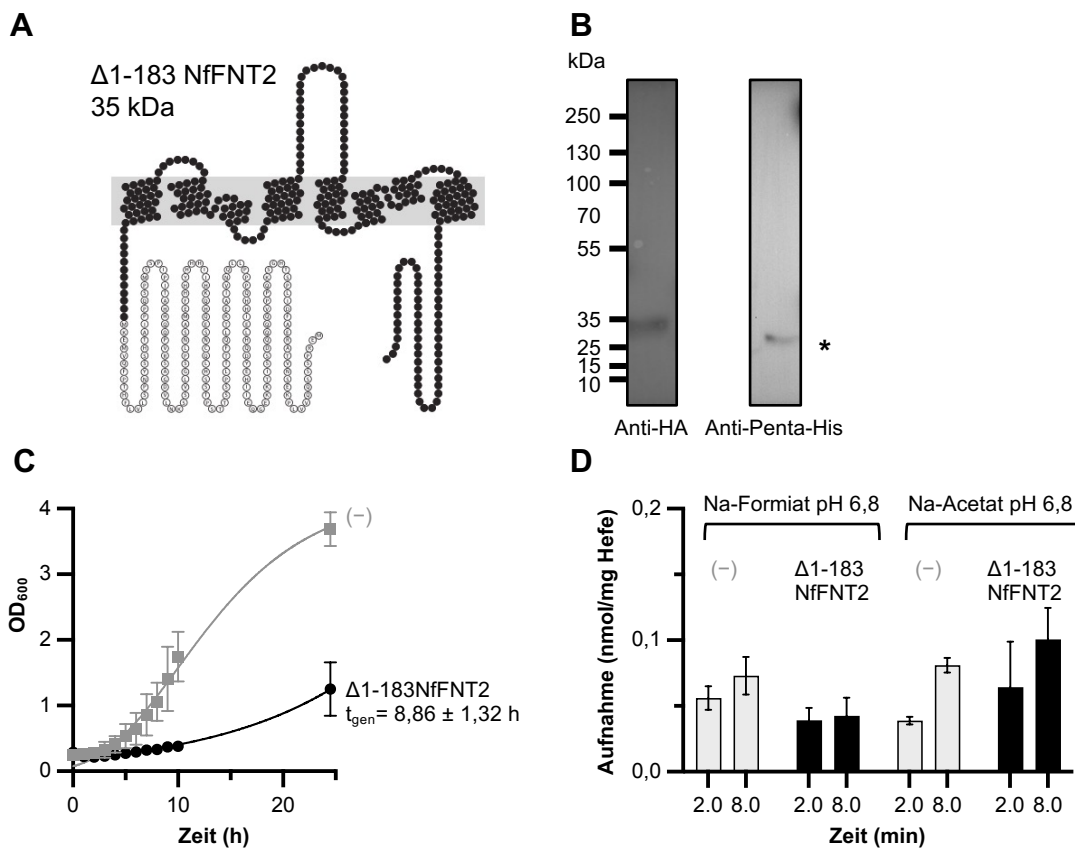
Die erste N-terminale verkürzte Variante von NfFNT2 wurde um 155 Aminosäuren verkürzt, sodass ein etwas längerer N-Terminus mit 40 Aminosäuren vor der ersten Transmembranspanne vorlag. Das Konstrukt wird im Folgenden als  $\Delta$ 1-155NfFNT2 bezeichnet und ist in **Abbildung 4.34 A** graphisch dargestellt. Es wurde mit gegen beide tags gerichteten Antikörpern eine Bande knapp über 35 kDa detektiert (**Abbildung 4.34 B**). Bei Detektion mit dem Anti-HA-Primärantikörper wurde zusätzlich ein Abbruchfragment im unteren Bereich der SDS-PAGE und eine Bande mit geringerer Intensität zwischen 38 und 50 kDa gefunden. Diese beiden Banden waren mit dem Anti-Penta-His-Primärantikörper nicht zu detektieren. Es handelte sich somit vermutlich um C-terminale Abbruchfragmente. Die Generationszeit (**Abbildung 4.34 C**) von  $\Delta$ 1-155NfFNT2 herstellenden Hefen war im Vergleich zu mit dem Leerplasmid transformierten Hefen fast verdreifacht. Für  $\Delta$ 1-155NfFNT2 wurde weder für Formiat/ $H^+$  noch für Acetat/ $H^+$  bei pH 6,8 im  $^{14}C$ -Transportassay eine Aufnahme gefunden (**Abbildung 4.34 D**).



**Abbildung 4.34:** Herstellung und funktionelle Charakterisierung von N-terminal verkürztem  $\Delta$ 1-155NfFNT2. (A) Topologie von  $\Delta$ 1-155NfFNT2. Weiß: verkürzter Bereich. (B) Western Blot der mikrosomalen Fraktion. Rechts: 10 %-iges Acrylamidgel, Denaturierung bei 60 °C für 2 min. Auftragsmenge: 20-25  $\mu$ g Gesamtprotein. Belichtung 45 min. (C) Wachstum und Generationszeit einer Übernachtskultur von  $\Delta$ 1-155NfFNT2 (schwarz) und mit dem Leerplasmid (–) (grau) transformierten Hefezellen. (D) Funktionsuntersuchung mit  $^{14}C$ -markierten Substraten. Die Aufnahme von Na-Formiat (links) und Acetat (rechts) durch  $\Delta$ 1-155NfFNT2 (schwarz) bei pH 6,8 im Vergleich zum Hintergrund (–) (hellgrau). Die Fehler stellen die S.E.M. der technischen und biologischen Replikate dar (N = 2). \* Monomer.

## Ergebnisse

Als nächstes wurde NfFNT2 N-terminal weiter verkürzt, sodass lediglich 12 Aminosäuren vor Beginn der ersten TM lagen. Dadurch wird auf die Position verkürzt, an der alle drei NfFNT ein Methionin vor der ersten Transmembranspanne aufweisen (vgl. **Abbildung 4.19**). Das Konstrukt wird im Folgenden als  $\Delta 1$ -183NfFNT2 bezeichnet und die Topologie ist in **Abbildung 4.35 A** dargestellt. Im Western Blot (**Abbildung 4.35 B**) wurde mit Antikörpern gegen den N- und C-terminalen tag jeweils eine einzelne Bande mit geringer Intensität knapp unter 35 kDa und damit auf der erwarteten Höhe für das vollständig translatierte Konstrukt gefunden. Die Generationszeit (**Abbildung 4.35 C**) war wie bei  $\Delta 1$ -155NfFNT2 im Vergleich zu den mit dem Leerplasmid transformierten Hefen nahezu verdreifacht. Für  $\Delta 1$ -183NfFNT2 wurde keine Leitfähigkeit für Formiat/ $H^+$  oder Acetat/ $H^+$  bei pH 6,8 (**Abbildung 4.35 D**) gefunden.

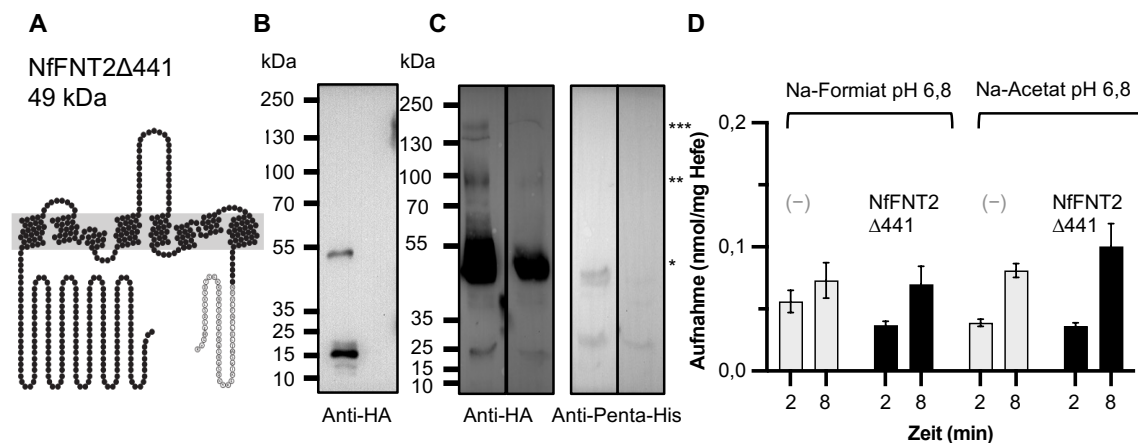


**Abbildung 4.35:** Herstellung und funktionelle Charakterisierung von N-terminal verkürztem  $\Delta 1$ -183NfFNT2. (A) Übersicht der Topologie von  $\Delta 1$ -183NfFNT2. Weiß: verkürzter Bereich. (B) Western Blot der mikrosomalen Fraktion. Auftragsmenge: 20 bis 25  $\mu$ g Gesamtprotein. Belichtung: 45 min. (C) Wachstum und Generationszeit einer Übernachtskultur von  $\Delta 1$ -183NfFNT2 (schwarz) und mit dem Leerplasmid (-) transformierte Hefezellen (grau). (D) Funktionsuntersuchung mit  $^{14}C$ -markierten Substraten. Aufnahme von Na-Formiat (links) und Acetat (rechts) durch  $\Delta 1$ -183NfFNT2 (schwarz) bei pH 6,8 im Vergleich zum Hintergrund (hellgrau). Die Fehler stellen die S.E.M. der technischen Replikate dar (N = 2 – 3). \* Monomer.

### 4.5.2.3 NfFNT2 $\Delta$

Im nächsten Schritt wurde der N-Terminus von NfFNT2 unverändert belassen, während der C-Terminus um 51 Aminosäuren verkürzt wurde, sodass fünf Aminosäuren auf die letzte TM folgten. Mit dieser Verkürzung wird der Transporter C-terminal auf die in der Membran liegende Kernregion verkürzt. Die Topologie des Konstruktes ist in **Abbildung 4.36 A** dargestellt. Das

Konstrukt wird im Folgenden als NfFNT2 $\Delta$ 441 bezeichnet. In der Western Blot-Analytik (**Abbildung 4.36 B**) wurde mit gegen den am N-Terminus befindlichen HA-tag gerichteten Antikörper im 10.000 *g*-Pellet eine Bande knapp unter 55 kDa gefunden, die auf der zu erwartenden Höhe für das vollständig translatierte Konstrukt mit 49 kDa lag. Bei 15 kDa waren einige Abbruchfragmente zu erkennen. Bei einer Detektion mit gegen beide *tags* gerichteten Antikörpern nach Inkubation des 10.000 *g*-Pellets und der mikrosomalen Fraktion mit SDS bei 60 °C wurden Banden bei ca. 50 kDa gefunden, welche auf der erwarteten Laufhöhe für das vollständig translatierte Protein mit einer berechneten Masse von 49 kDa liegen. Die Banden mit gegen den HA-tag gerichteten Antikörper waren bei gleicher SDS-PAGE-Beladung deutlich stärker. Mit beiden Antikörpern ließen sich Abbruchfragmente unter 35 kDa detektieren, während die Detektion mit dem Anti-HA-Antikörper auch Signale auf Höhe vermuteter Dimere mit ca. 98 kDa und Trimere mit ca. 147 kDa lieferte. Hierbei könnte es sich auch um das SDS-stabile in der SDS-PAGE kleiner erscheinende Pentamer mit ca. 245 kDa handeln. Die Oligomere des Konstruktes waren mit dem Anti-His-Antikörper nicht zu detektieren (**Abbildung 4.36 C**). Für NfFNT2 $\Delta$ 441 wurde kein Transport von Formiat/H<sup>+</sup> oder Acetat/H<sup>+</sup> bei pH 6,8 nachgewiesen (**Abbildung 4.36 D**).

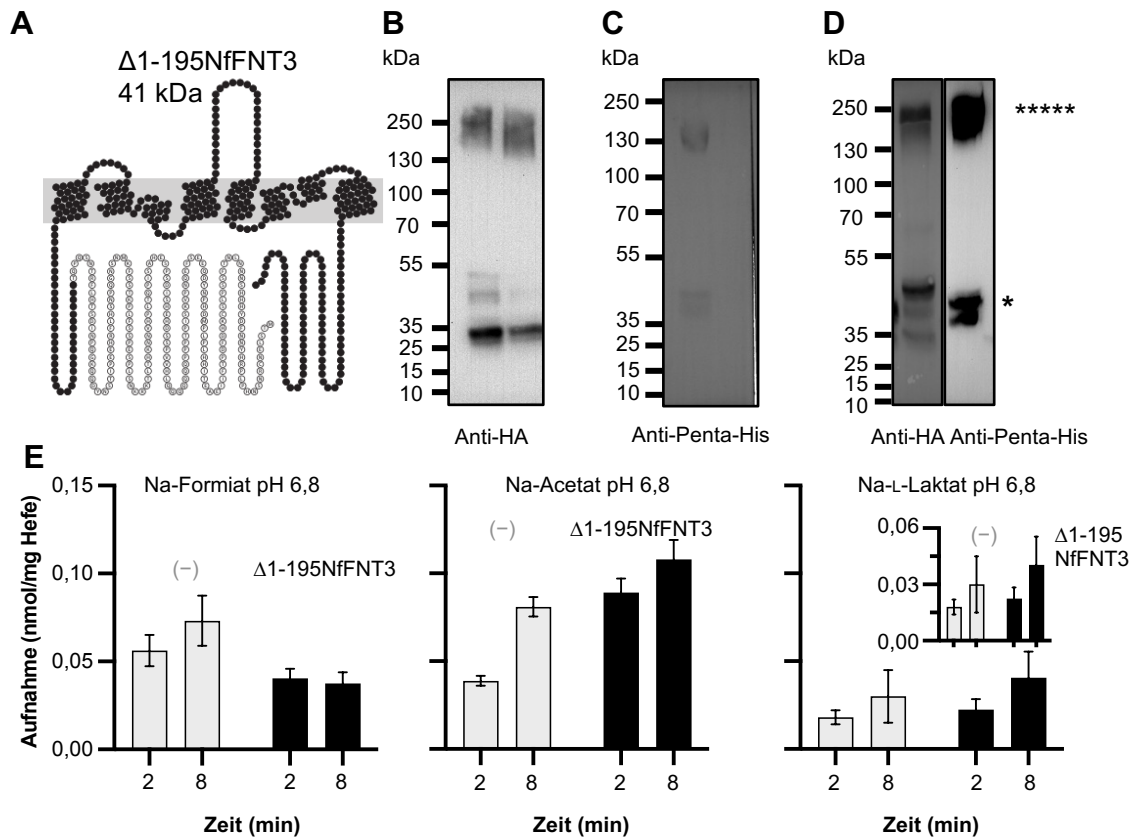


**Abbildung 4.36:** Herstellung und Funktion N-terminal verkürztem NfFNT2 $\Delta$ 441. (A) Übersicht der Topologie von NfFNT2 $\Delta$ 441. Weiß: verkürzter Bereich. (B) Western Blot des 10.000 *g*-Pellets (links) und der mikrosomalen Fraktion (rechts) mit gegen den N-terminalen HA-tag gerichteten Anti-HA-Primärantikörper. (C) Western Blot des 10.000 *g*-Pellets (jeweils links) und der mikrosomalen Fraktion (jeweils rechts) unter Verwendung eines Anti-HA-Primärantikörpers (links) und eines Anti-Penta-His-Primärantikörpers (rechts). Die Inkubation mit SDS erfolgte bei 60 °C. Gelkonzentration: 10 %. Auftragsmenge: 25  $\mu$ g Gesamtprotein. Belichtung: 45 min. (D) Funktionsuntersuchung mit <sup>14</sup>C-markierten Substraten. Die Aufnahme von Na-Formiat (links) und Na-Acetat (rechts) durch NfFNT2 $\Delta$ 441 (schwarz) bei pH 6,8 im Vergleich zum Hintergrund (hellgrau). Die Fehler stellen die S.E.M. der technischen Replikate dar (N = 2). \* Monomer, \*\* Dimer, \*\*\* Trimer oder kleiner erscheinendes Pentamer.

#### 4.5.2.4 $\Delta$ NfFNT3

In gleicher Vorgehensweise wurde NfFNT3 N-terminal verkürzt. Die Verkürzung wurde hierbei auf eine zu PfFNT vergleichbare Anzahl von 40 Aminosäuren vor der ersten TM um insgesamt 195 Aminosäuren reduziert. Die Topologie des im Folgenden als  $\Delta$ 1-195NfFNT3 bezeichneten Konstruktes ist in **Abbildung 4.37** dargestellt. Im Western Blot (**Abbildung 4.37 B-D**) wurde mit gegen den HA-tag gerichteten Antikörper im 10.000 *g*-Pellet als auch in der mikrosomalen Fraktion eine dem Pentamer entsprechende Bande auf einer Laufhöhe von ca. 205 kDa detektiert. In beiden Fraktionen war eine Abbruchbande bei ca. 35 kDa zu detektieren, welche

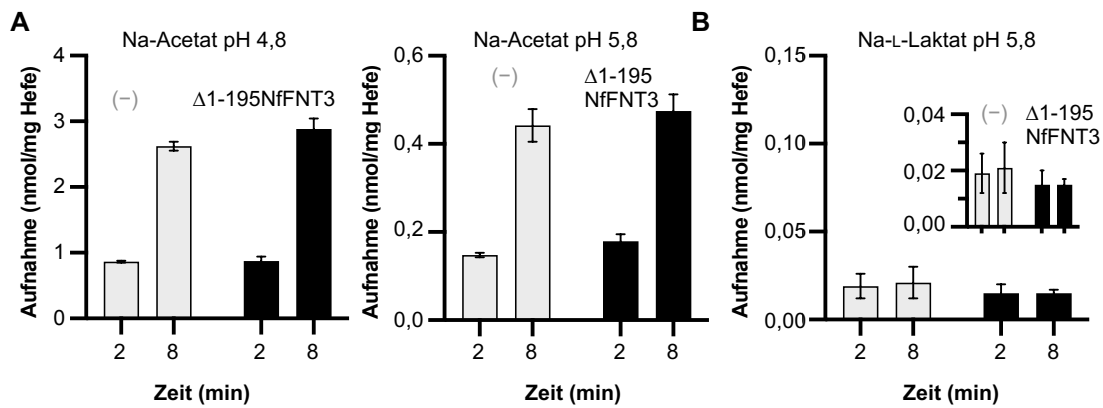
mit dem gegen den His-tag gerichteten Antikörper nicht zu sehen war. Eine bei beiden Antikörpern vorhandene wenn auch ungleich stark ausgeprägte Bande, auf einer Höhe von ca. 40 kDa wurde dem vollständig translatierten monomeren Konstrukt zugeordnet. Nach einer Inkubation der mikrosomalen Fraktion bei 60 °C wurde mit beiden Antikörpern eine dem Pentamer zuzuordnende Bande detektiert. Das Intensitätsverhältnis der Abbruchfragmente nach Inkubation mit Anti-HA-Antikörper war hier umgedreht, sodass die dem vollständigen Monomer entsprechende Bande die größte Intensität aufwies, während die mit dem Anti-Penta-His-Antikörper nicht detektierbaren Banden deutlich schwächer erschienen. Es wurde angenommen, dass das Protein zum größeren Teil vollständig translatiert vorlag und die Abbruchfragmente einen kleineren Anteil der Zielproteinmenge ausmachen. Eine mit dem Anti-His-Antikörper zu detektierende Bande deutete auf posttranslationale Modifikation N-terminaler Abbruchfragmente hin. Hier empfiehlt es sich die potenzielle posttranslationale Modifikation von NfFNT durch *S. cerevisiae* experimentell zu überprüfen. Es wurde für Formiat/H<sup>+</sup>, Acetat/H<sup>+</sup> und L-Laktat/H<sup>+</sup> kein signifikant über dem Hintergrund liegender Transport (t-Test,  $P < 0,05$ ) bei pH 6,8 gemessen (**Abbildung 4.37 E**). Aufgrund der vielversprechenden Signale in der Western Blot-Analytik wurde  $\Delta 1-195\text{NfFNT3}$  auf Transport von Acetat/H<sup>+</sup> und L-Laktat/H<sup>+</sup> bei erniedrigtem pH-Wert untersucht, da die Transportrate von FNT im leicht sauren Bereich erhöht ist. Acetat wurde ergänzend aufgrund seiner Größe und mäßiger Membrandiffusion als Alternative zu dem größeren Substrat Laktat gewählt, da es im Hinblick auf die Metabolismusstudien (1.2.2) das wahrscheinlichste Substrat für NfFNT zu sein scheint.



**Abbildung 4.37:** Herstellung und Funktionsuntersuchungen von N-terminal verkürztem  $\Delta 1-195\text{NfFNT3}$ . (A) Übersicht der Topologie von  $\Delta 1-195\text{NfFNT3}$ . Weiß: verkürzter Bereich. (B) Western Blot des 10.000 g-Pellets (links) und der mikrosomalen Fraktion (rechts). (C) Western Blot des 10.000 g-Pellets (links) und der mikrosomalen Fraktion (rechts). (D) Western Blot der mikrosomalen Fraktion nach Inkubation bei 60 °C für 2 min. Auftragsmenge 25  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein. Belichtung: 45 min. Gelkonzentration: 10 %. (E) Funktionsuntersuchungen mit  $^{14}\text{C}$ -markierten Substraten. In grau sind die mit dem Leerplasmid transformierten Hefezellen dargestellt und in schwarz  $\Delta 1-195\text{NfFNT3}$ . Die Fehler stellen S.E.M. der technischen und biologischen Replikate dar (N = 2 – 4). \* Monomer, \*\*\*\*\* Pentamer.

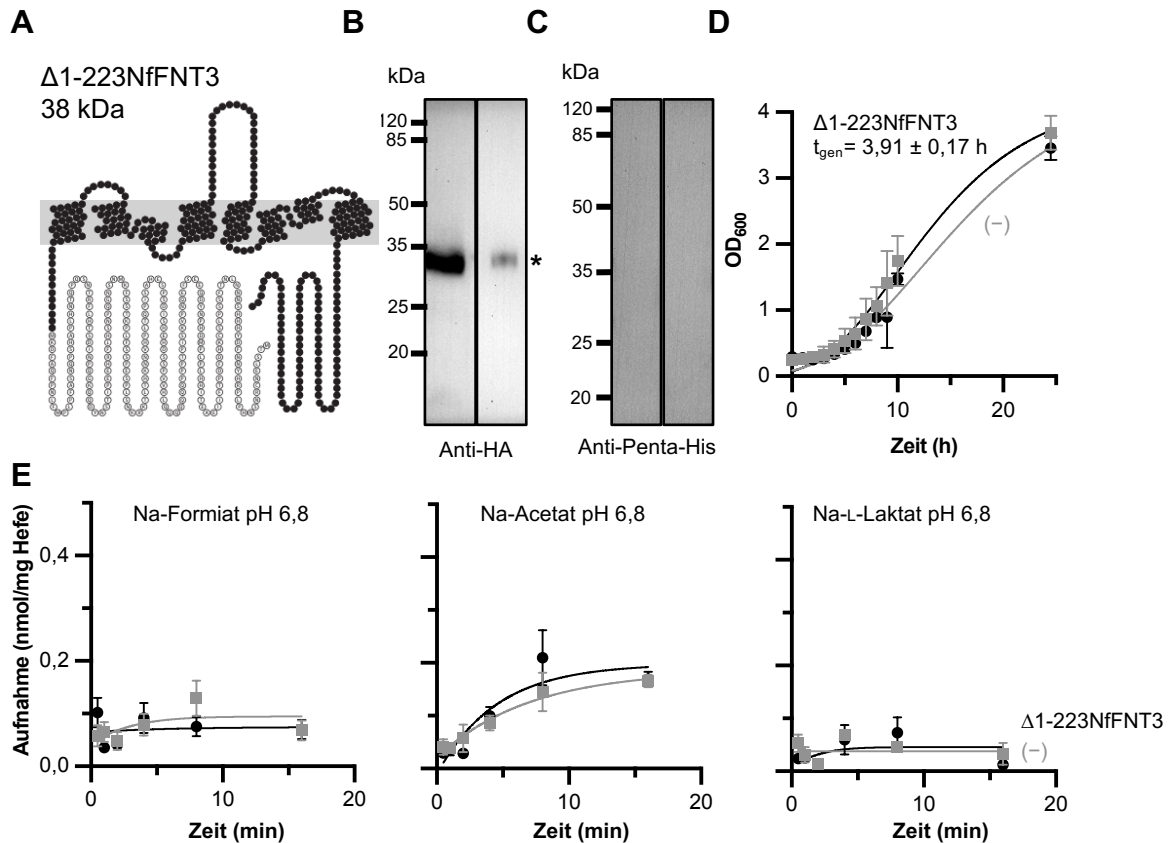
Auch bei einem um bis zu zwei log-Einheiten erniedrigtem pH-Wert wurde für  $\Delta 1-195\text{NfFNT3}$  keine Leitfähigkeit für Acetat/ $\text{H}^+$  oder L-Laktat/ $\text{H}^+$  gefunden (**Abbildung 4.38**).

## Ergebnisse



**Abbildung 4.38:** Einfluss des pH-Wertes auf die Funktion von  $\Delta 1-195\text{NfFNT3}$ . (A) Aufnahme von Na-Acetat bei pH 4,8 (links) und pH 5,8 (rechts). (B) Aufnahme von Na-L-Laktat bei pH 5,8. In grau sind die mit dem Leerplasmid transformierten Hefezellen dargestellt und in schwarz  $\Delta 1-195\text{NfFNT3}$ . Die Fehler stellen S.E.M. der technischen und biologischen Replikate dar (N = 2 – 4).

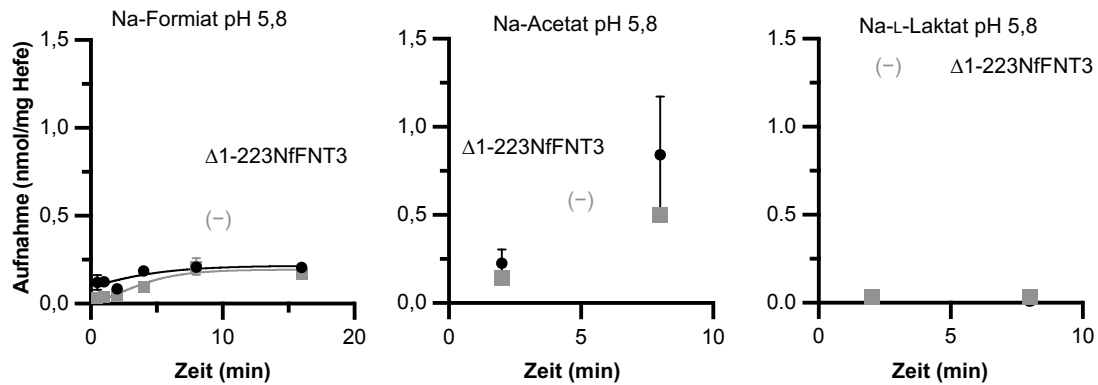
Im nächsten Schritt wurde NfFNT3 N-terminal um 223 Aminosäuren verkürzt. Die Verkürzung wurde aufgrund einer Häufung von mRNA *reads* in diesem Bereich (Herman *et al.*, 2021) gewählt und befindet sich an der Stelle, an der alle drei NfFNT im Alignment ein Methionin aufweisen. Das Konstrukt wird im Folgenden mit  $\Delta 1-223\text{NfFNT3}$  bezeichnet und ist in **Abbildung 4.39 A** graphisch dargestellt. Im Western Blot wurde mit dem gegen den HA-tag gerichteten Antikörper eine auf einer für das Konstrukt zu erwartenden Laufhöhe von knapp 35 kDa starke Bande im 10.000 g-Pellet detektiert. Auf gleicher Höhe wurde auch eine Bande in der mikrosomalen Fraktion detektiert (**Abbildung 4.39 B**). Die Detektion mit dem gegen den His-tag gerichteten Antikörper ergab kein Signal (**Abbildung 4.39 C**). Das Wachstum der  $\Delta 1-223\text{NfFNT3}$  herstellenden Hefezellen war mit dem der nicht herstellenden Hefezellen vergleichbar. Für  $\Delta 1-223\text{NfFNT3}$  wurde kein signifikant (t-Test,  $P < 0,05$ ) über dem Hintergrund liegender Transport von Formiat/ $\text{H}^+$ , Acetat/ $\text{H}^+$  oder L-Laktat/ $\text{H}^+$  gemessen (**Abbildung 4.39 E**).



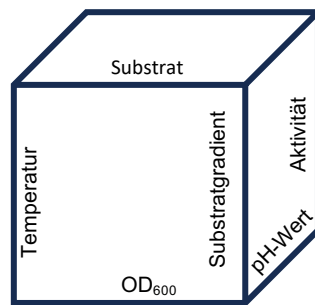
**Abbildung 4.39:** Herstellung und Funktionsuntersuchungen von N-terminal verkürztem  $\Delta 1-223\text{NfFNT3}$ . (A) Übersicht der Topologie von  $\Delta 1-223\text{NfFNT3}$ . Weiß: verkürzte Bereiche. (B) und (C) Western Blot des 10.000 g-Pellets (jeweils links) und der mikrosomalen Fraktion (jeweils rechts). Auftragsmenge: 25  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein. Belichtung: 45 min. (D) Wachstum und Generationszeit unter Berücksichtigung der lag-Phase des Wachstums einer Übernachtskultur von  $\Delta 1-223\text{NfFNT3}$  (schwarz). (E) Aufnahmekurven von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Na-Formiat (links), Na-Acetat (Mitte) und Na-L-Laktat (rechts) von  $\Delta 1-223\text{NfFNT3}$  (schwarz) und mit dem Leerplasmid (-) transformierten Hefen (grau) bei pH 6,8. \*Markierung: Monomer. Die Fehler stellen S.E.M. der technischen und biologischen Replikate dar (N = 2 – 6).

In einem weiteren Schritt wurde die Leitfähigkeit von  $\Delta 1-223\text{NfFNT3}$  für Formiat/ $\text{H}^+$ , Acetat/ $\text{H}^+$  und L-Laktat/ $\text{H}^+$  bei pH 5,8 überprüft. Auch hier wurde kein Transport gemessen (**Abbildung 4.40**). Im nächsten Schritt wurden die Bedingungen des  $^{14}\text{C}$ -Transportassays variiert, um ein eventuelles Signal von dem des Hintergrundes zu differenzieren (**Abbildung 4.41**).

## Ergebnisse



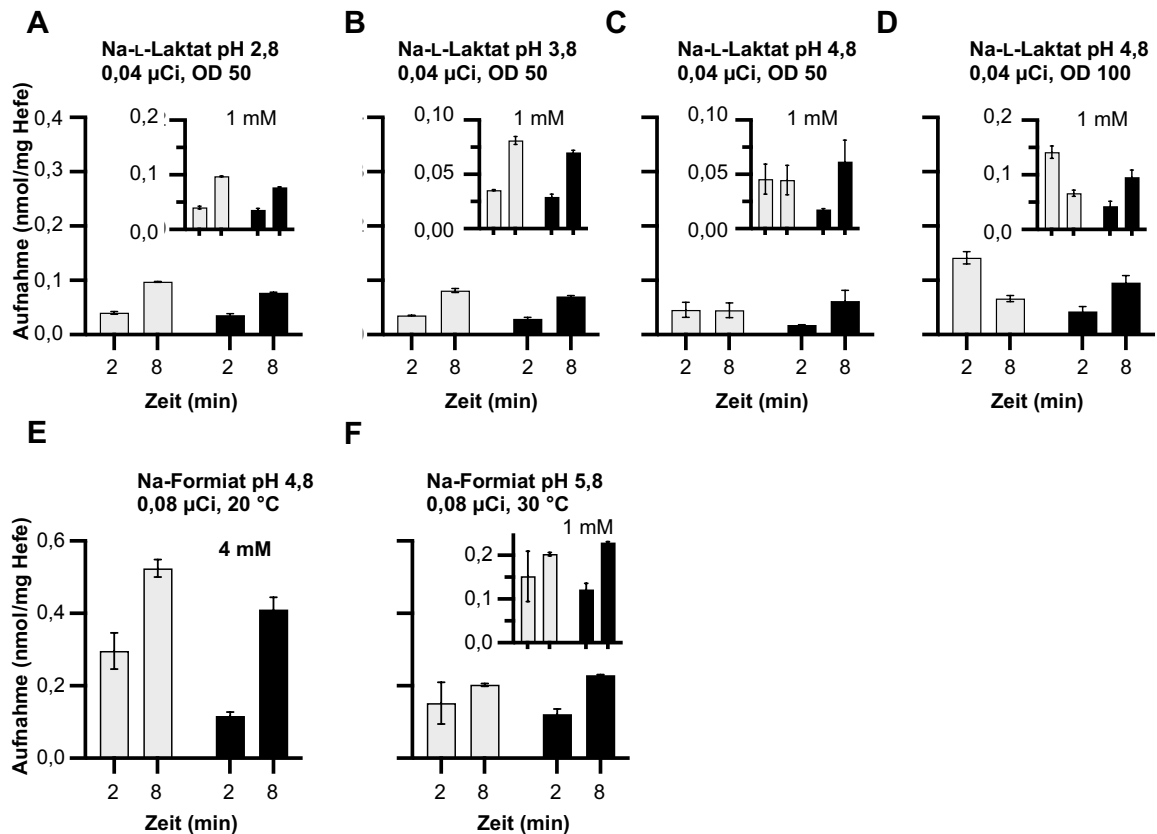
**Abbildung 4.40:** Einfluss des pH-Wertes auf die Funktion von  $\Delta 1-223NfFNT3$ . Aufnahme der FNT-typischen Substrate bei pH 5,8. In grau sind die mit dem Leerplasmid transformierten Hefezellen dargestellt und in schwarz  $\Delta 1-223NfFNT3$ . Die Fehler stellen S.E.M. der technischen Replikate (N = 2 – 6) dar.



**Abbildung 4.41:** Übersicht der variablen Parameter des  $^{14}C$ -Transportassays.

Da für Milchsäure eine deutlich geringere Membrandiffusion für *S. cerevisiae* festgestellt wurde als für Ameisen- und Essigsäure (Cassio *et al.*, 1987; Dissertation Marie Wiechert, 2017, Kiel), wurde L-Laktat mit einem  $pK_s$  von 3,8 als Substrat für Messungen im stark sauren Bereich gewählt. Formiat sollte als eines der kleineren Substrate auch einen kleineren Selektivitätsfilter wie den des prokaryotischen FocA passieren. Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt die Aufnahme von Formiat unter Erhöhung des Substratgradienten und der Temperatur betrachtet. Da sich unter keiner der gewählten Bedingungen (**Abbildung 4.42**) ein signifikant (t-Test,  $P < 0,05$ ) über dem Hintergrund liegender Transport andeutete, wurde aus ökonomischen und ökologischen Gründen darauf verzichtet, den  $^{14}C$ -Transportassay weiterhin als Testplattform für das in *S. cerevisiae* W303 1A  $\Delta jen1 \Delta ady2$  hergestellte NfFNT1-3 zu nutzen. Die gewählten Maximalbedingungen wurden zuvor mit dem bereits gut charakterisierten PfFNT überprüft. Es wurde gezeigt, dass vorhandener Transport durch das Membranprotein in der Hefezelle nicht zum Erliegen kommt und die Steigerung der Transportrate im sauren ebenfalls beobachten werden konnte (**Abbildung 4.13**). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Hefezellen das stark saure Umgebungsmilieu für den gewählten Zeitraum überstehen.

## Ergebnisse

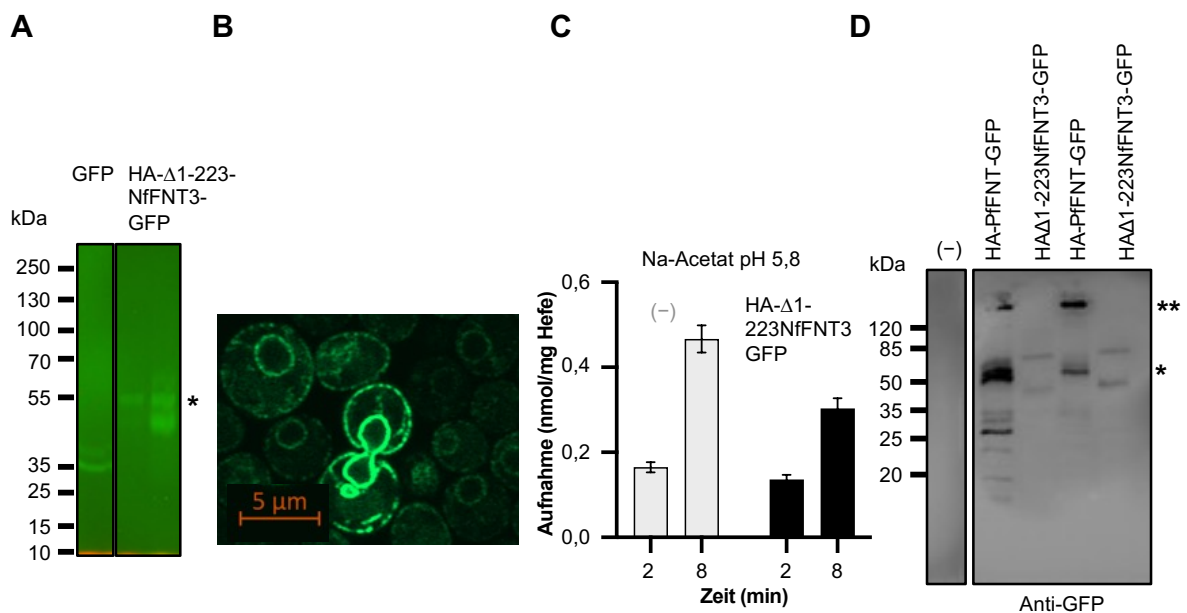


**Abbildung 4.42:** Funktionsuntersuchungen  $\Delta 1-223\text{NfFNT3}$  unter Variation der Assay-Parameter. Variable Parameter: (A, B, C) pH-Wert des Messpuffers, (D)  $\text{OD}_{600}$ , (E) Gesamtaktivität und Substratgradient, (F) Gesamtaktivität und Temperatur. Die Fehler stellen S.E.M. der technischen Replikate dar ( $N = 2 - 3$ ).

In weiteren Experimenten zur funktionellen Charakterisierung mittels der *Stopped Flow*-Apparatur der NfFNT-Konstrukte in *S. cerevisiae* wurde keine Funktionalität gefunden. Es wurden protoplastierte Hefezellen (3.5.2) auf ihr Schrumpf- und Schwellverhalten gegenüber einem hyperosmotischen Gradienten von Glycerol als ungeladenes Substrat untersucht. Auch hier wurde keine Leitfähigkeit für ein ungeladenes Substrat gefunden. Als Kontrolle wurde hAQP9 eingesetzt (Ohgusu *et al.*, 2008). Der initiale Wasserausstrom, der die Protoplasten schrumpfen lässt und die Lichtstreuung erhöht, lag für die protoplastierten NfFNT ( $\text{NfFNT2}$ ,  $\Delta 1-155\text{NfFNT2}$  und  $\Delta 1-183\text{NfFNT2}$ ) herstellenden Hefen nicht über dem des Hintergrundes. Es wurden außerdem Effekte hyperosmotischer Substratkonzentration der FNT-typischen Substrate Formiat und Acetat auf das Schwell- und Schrumpfverhalten protoplastierter NfFNT2 und NfFNT3 herstellender Hefezellen untersucht. Unter einem angelegten Substratgradienten von 300 mM konnte keine Größenzunahme der Protoplasten beobachtet werden, die auf die Aufnahme des osmotisch aktiven Substrates schließen ließ. Für die untersuchten Konstrukte NfFNT2,  $\Delta 1-155\text{NfFNT2}$ ,  $\Delta 1-183\text{NfFNT2}$  und  $\Delta 1-233\text{NfFNT3}$  wurde somit auch gegenüber unphysiologisch hohen Substratkonzentrationen keinen Transport gefunden (Abbildung nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde hier auf genauere Untersuchungen verzichtet.

Zur exemplarischen Überprüfung der Lokalisation des verkürzten Fusionskonstruktes HA- $\Delta 1-223\text{NfFNT3}$ -GFP wurden die Hefezellen mittels Konfokalmikroskopie (**Abbildung 4.43**) untersucht. In der In-Gel-Fluoreszenz wurde in der mikrosomalen Fraktion eine Bande

zwischen 55 bis 70 kDa detektiert, die auf der zu erwartenden Höhe für das Fusionskonstrukt mit ca. 65 kDa lief (**Abbildung 4.43 A**). Weiterhin waren Abbruchfragmente sichtbar, die von der Größe auf einen Abbruch zwischen der fünften und sechsten TM hindeuteten. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen deuteten auf eine Lokalisation von  $\Delta 1$ -223NfFNT3-GFP in der Plasmamembran der Hefezelle hin (**Abbildung 4.43 B**). Eine Überprüfung der Leitfähigkeit dieses Konstruktes ergab keine Leitfähigkeit für HA- $\Delta 1$ -223NfFNT3-GFP von Acetat bei pH 5,8 (**Abbildung 4.43 C**). Die Western Blot-Analytik des 10.000 g-Pellets von HA-PfFNT-GFP und HA- $\Delta 1$ -223NfFNT3-GFP wurde für HA-PfFNT-GFP eine Bande bei über 120 kDa gefunden, die auf der zu erwartenden Höhe des Dimers lief. Eine weitere starke Bande wurde kurz über 50 kDa gefunden und war damit auf der annehmbaren Höhe für das Monomer des Fusionskonstruktes mit 64 kDa. Im unteren Molekulargewicht-Bereich waren viele Abbruchfragmente von PfFNT-GFP zu erkennen (**Abbildung 4.43 D**). In der mikrosomalen Fraktion waren ebenfalls die Dimer- und Monomerbanden sowie Abbruchfragmente in geringer Intensität zu erkennen. Für HA- $\Delta 1$ -223NfFNT3-GFP waren in beiden Fraktionen jeweils zwei Banden nachzuweisen. Eine Bande migrierte zwischen 50 und 80 kDa und damit auf der erwarteten Höhe für das 65 kDa große Fusionskonstrukt. Zusätzlich wurde eine Abbruchfragmentbande unterhalb der des Fusionskonstruktes detektiert. Im Western Blot war in der 10.000 g-Fraktion von HA-PfFNT-GFP eine dem löslichen GFP zuzuordnende starke Bande kurz über 25 kDa nachweisbar. Dies ließ die Annahme zu, dass in der mikrosomalen Fraktion keine GFP-Domänen vorliegen, die auf Proteolyse der Fusionskonstrukte oder Ko-Translation von löslichen GFP hindeuteten.



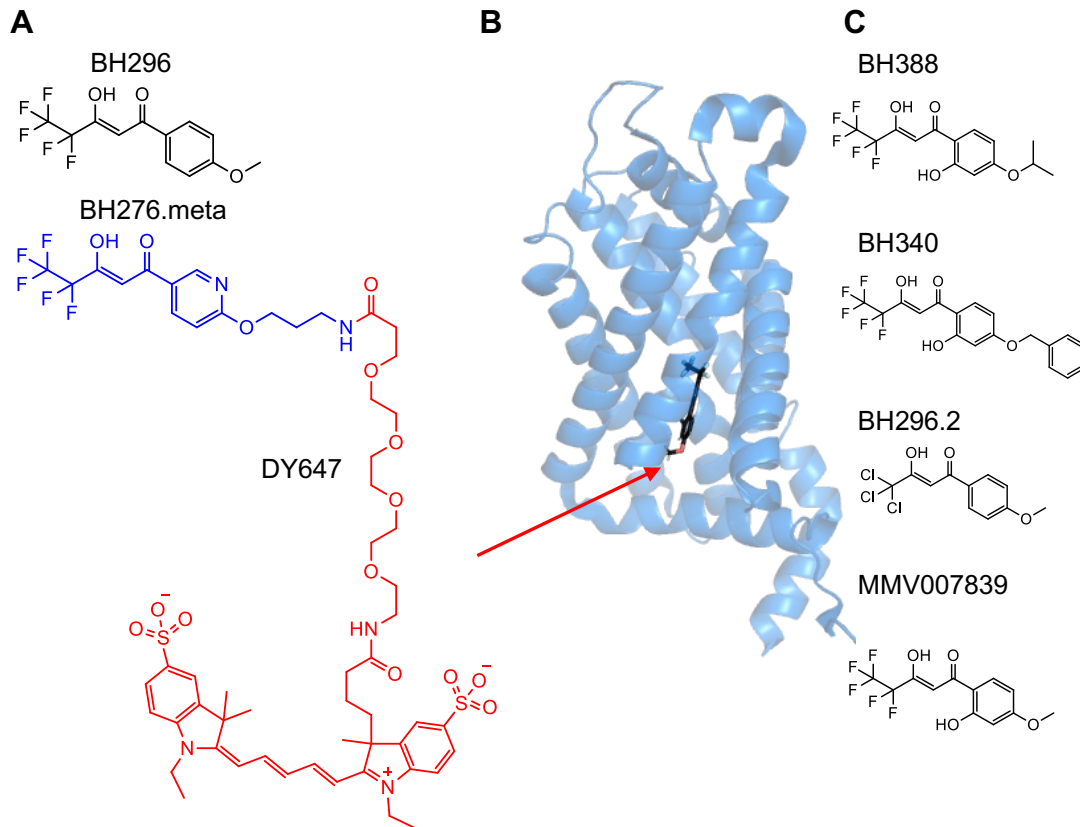
**Abbildung 4.43:** Lokalisation und funktionelle Charakterisierung von  $\Delta 1$ -223NfFNT als GFP-Fusionsprotein in der Hefezelle. (A) In-Gel Fluoreszenz des 10.000 g-Pellets (links und mitte) und der mikrosomalen Fraktion (rechts). Auftragsmenge: 25 µg Gesamtprotein. Belichtung: 100 ms. (B) Konfokalmikroskopie-Aufnahme. (C) Untersuchung der Funktionalität des  $\Delta 1$ -223NfFNT3-GFP-Fusionskonstruktes (schwarz) im Vergleich zu der mit Leerplasmid (-) transformierten Hefezelle (grau). Die Fehler stellen S.E.M. der technischen Replikate dar (N = 2 – 3). (D) Western Blot des 10.000 g-Pellets (links) und der mikrosomalen Fraktion (rechts). Auftragsmenge: 25 µg Gesamtprotein. Belichtung: 4 min. \* Monomer, \*\* Oligomer.

#### 4.6 Affinität der FNT-Inhibitoren zu heterolog hergestelltem NfFNT3

Vor dem Hintergrund der Fragestellung, ob FNT das *Target* der Inhibitoren im Assay mit *N. fowleri*-Trophozoiten sind, wurden zunächst von *S. cerevisiae* heterolog hergestellte Proteine untersucht. Für PfFNT wurde gezeigt, dass eine Limitation des Hefezell-basierten <sup>14</sup>C-Assays in der verminderten Transmembrandiffusion der Inhibitoren oder im Verhältnis von *Target* zu Inhibitor liegt. Die FCCS stellt eine direkte Methode da, um die Bindungsaffinität des Inhibitors zu dem Protein zu untersuchen. Hier wurde C-terminal mit GFP fusioniertes Δ1-223NfFNT3 sowie PfFNT-GFP als Kontrolle untersucht. Dazu wurde die mikrosomale Fraktion wie in 3.3.6 beschrieben isoliert und nach zweimaligem Zentrifugieren bei 100.000 g in pelletierter Form auf Trockeneis gekühlt und zur weiteren Untersuchung nach Martinsried zur Intana GmbH geschickt, um dort mittels FCCS auf *Targets* untersucht zu werden.

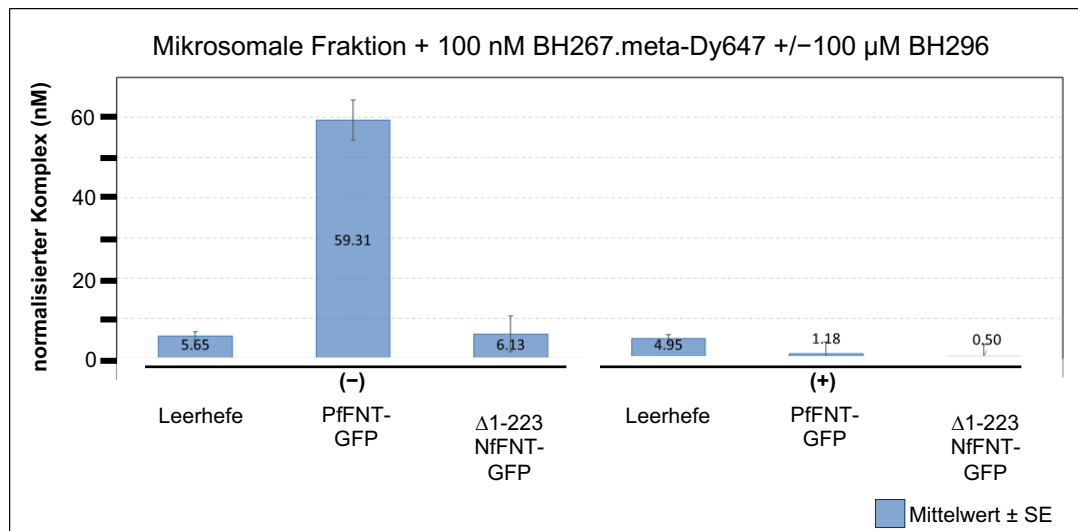
##### 4.6.1 FCCS-Untersuchungen von FNT-haltigen Hefe-Mikrosomen

Die Ergebnisse der *Fluorescence cross-correlation spectroscopy*-Messungen (FCCS) wurden freundlicherweise von Dr. Frank Becker und Stephan Hanus zur Verfügung gestellt. Angelehnt war die Messmethode hierbei an das Protokoll aus Jakobowska *et al.* (2021). Die verwendeten fluoreszenzmarkierten Inhibitoren (**Abbildung 4.44 A**) wurden im Vorfeld von Björn Henke mit einem *linker* versehen und anschließend mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY647 gekuppelt. Die mit Fluoreszenzfarbstoff gekuppelten Inhibitoren sind in para-Position modifiziert. Die gegen die *N. fowleri* Trophozoiten in Kultur wirksamen Inhibitoren weisen Unterschiede in der Modifikation der para-Position auf, während der Fluoroalkylrest und vinyloge Säure frei vorliegen. Es wurde somit davon ausgegangen, dass eine grundsätzliche Vergleichbarkeit des unveränderten Pharmakophors zwischen den gekuppelten Inhibitoren und den aktiven Inhibitoren vorliegt (**Abbildung 4.44 C**). Für die in der FCCS eingesetzten Inhibitoren (BH267.meta und BH296) wurden auf die *N. fowleri*-Trophozoiten in Kultur weniger starke wachstumshemmende Effekte gefunden (**Abbildung 4.16**). Eine Kollision des Fluoreszenzfarbstoffs mit der Bindetasche des Proteins wird durch die Polyethylenglycol-Struktur verhindert (Jakobowska *et al.*, 2021; Lyu *et al.*, 2021). Der voluminöse Fluoreszenzfarbstoff ragt aus der Bindetasche heraus und beeinträchtigt so die Bindung des Pharmakophors und des Aromaten in der Bindetasche nicht (Walloch *et al.*, 2020).



**Abbildung 4.44:** Vergleich der FNT-Inhibitoren mit Wirksamkeit gegenüber mit *N. fowleri* Trophozoiten mit den für die FCCS markierten PfFNT-Inhibitoren BH296 (schwarz) und BH267-meta mit Linker an Fluoreszenzfarbstoff (DY647) gekoppelt. (A) Kopplung BH267.meta (blau) mit DY647 (rot) und (B) Lage von MMV007839 (schwarz) in der Transportpore von PfFNT (Peng *et al.*, 2021). Abbildung modifiziert nach Jakobowska *et al.* (2021). Der rote Pfeil weist auf die modifizierte para-Position, die aus der Bindetasche herausragt. (C) Inhibitoren mit  $EC_{50}$ -Werten < 10  $\mu$ M gegen *N. fowleri*-Trophozoiten.

Für PfFNT-GFP in der mikrosomalen Fraktion von *S. cerevisiae* wurde eine spezifische Interaktion zwischen PfFNT-GFP und BH267.meta-DY647 gefunden. Diese Bindung wurde herabgesetzt, wenn PfFNT-GFP zuvor mit 100  $\mu$ M nicht fluoreszenzmarkiertem BH296 versetzt worden war (**Abbildung 4.45**). Ohne vorherigen Zusatz eines nicht markierten Inhibitors (BH296) wurde ein normalisierter Komplex von knapp 60 nM zwischen PfFNT-GFP und BH267.meta-DY647 gemessen. Als Kontrolle wurden mit dem Leerplasmid, transformierte Hefezellen verwendet. Für  $\Delta 1-223$ NfFNT3 wurde keine über dem Hintergrund liegende Bindung zu dem Inhibitor gemessen.



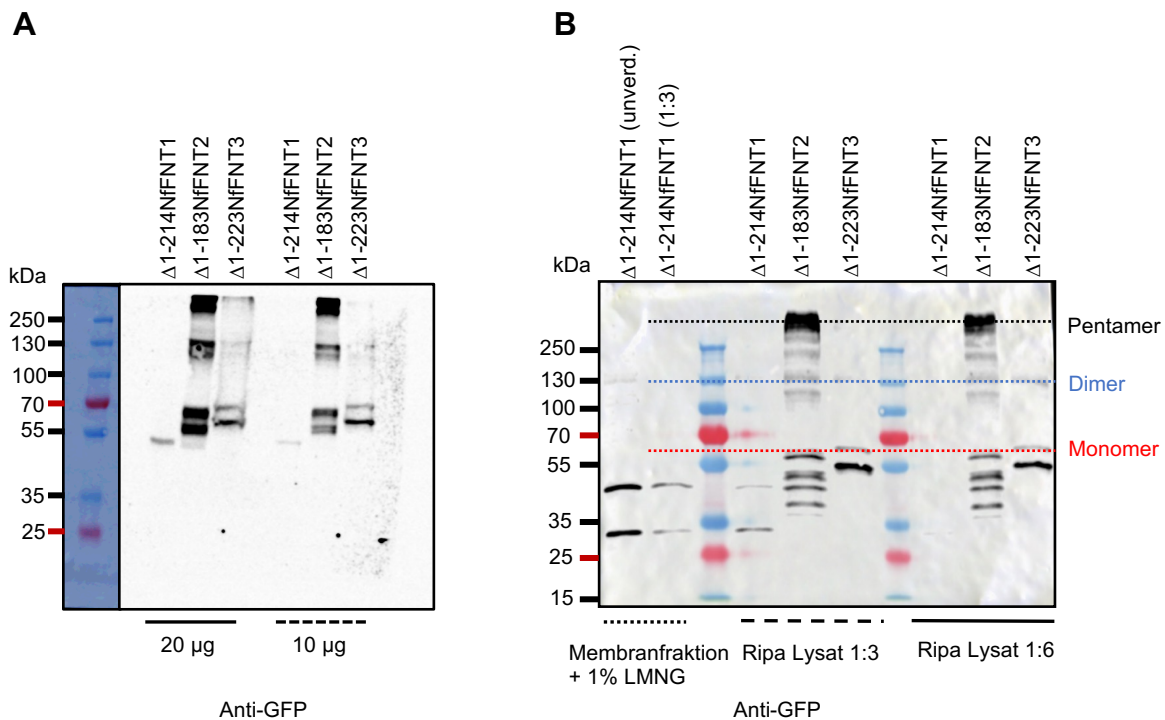
**Abbildung 4.45** Normalisierte Fluoreszenz *cross-correlation* der mikrosomalen Fraktion von *S. cerevisiae* zu 100 nM BH267.meta. Mit (+) und ohne (-) Zugabe von 100 µM BH296. Die Abbildung wurde von Kerrin Hansen zur Verfügung gestellt und leicht modifiziert.

#### 4.6.2 Herstellung von ΔNfFNT1-3 im HEK293-Zell-System

Da die Hefezellen in der Herstellung der NfFNT1-3 teilweise instabile und unvollständig hergestellte Proteine liefern, wurde im nächsten Schritt ein weiteres zellbasiertes System auf die Herstellung von NfFNT untersucht. So wurden im nächsten Schritt humane embryonale Nierenzellen der Linie 293 zur Herstellung von NfFNT1-3 gewählt, um eine potenzielle *Target*-Inhibitor-Interaktion zwischen NfFNT und FNT-Inhibitor in der Zelle zu messen. Im nächsten Schritt wurde die Affinität fluoreszenzmarkierter Inhibitoren zu den durch HEK293-Zellen hergestellten NfFNT1-3-GFP-Fusionsproteinen gemessen. Die Herstellung der N-terminal verkürzten NfFNT1-3-Konstrukte in HEK293-Zellen wurde in Anlehnung an Jakobowska *et al.* (2021) von Kerrin Hansen in Kooperation mit der Intana GmbH in Martinsried durchgeführt und die Ergebnisse freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Im Western Blot der Membranfraktion mit gegen das C-terminal fusionierte GFP gerichtetem Primärantikörper (**Abbildung 4.46 A**) wurde ohne weitere Zusätze für Δ1-214NfFNT1-GFP mit einer theoretisch berechneten Masse von 61 kDa ein Abbruchbande bei 55 kDa detektiert. Für Δ1-183NfFNT2-GFP mit einem theoretischen Molekulargewicht von 62 kDa wurden Banden detektiert, die zwischen 55 und 70 kDa auf der anzunehmenden Höhe für das vollständig translatierte Fusionsprotein in monomerer Form und knapp unter 130 kDa auf Höhe des Dimers migrierten. Eine Bande über 250 kDa wies die für das Pentamer notwendige Größe auf. Für Δ1-223NfFNT3-GFP mit einem theoretischen Gewicht von 65 kDa wurde knapp nach oben verschoben ein ähnliches Bandenmuster detektiert. Auch hier waren Banden sichtbar, die, von ihrer Größe her, dem vollständigen Monomer des Fusionskonstruktes entsprechen. Es wurde außerdem eine Dimerbande und bei größerer Gesamtproteinauftragsmenge auch eine mögliche Pentamerbande detektiert. Bei einem Zusatz von 1 % LMNG zur Membranfraktion wurde für Δ1-214NfFNT1-GFP ein weiteres Abbruchfragment zwischen 25 und 35 kDa gefunden. Im Western Blot der Membranfraktion und des Zelllysates waren für Δ1-183NfFNT2-GFP und Δ1-223NfFNT3-GFP jeweils Doppelbanden nachzuweisen, welche in den Membranfraktionen ausgeprägter waren. Ihr Vorliegen könnte durch posttranslationale Modifikation (Tan *et al.*, 2021) oder durch Abbruchfragmente zu erklären sein. In der Western Blot-Analyse eines mittels Radioimmunopräzipitation Assays (RIPA) (**Abbildung 4.46 B**) gewonnenen Zelllysates wurden für Δ1-214NfFNT1-GFP die gleichen Abbruchfragmente gefunden, während für Δ1-

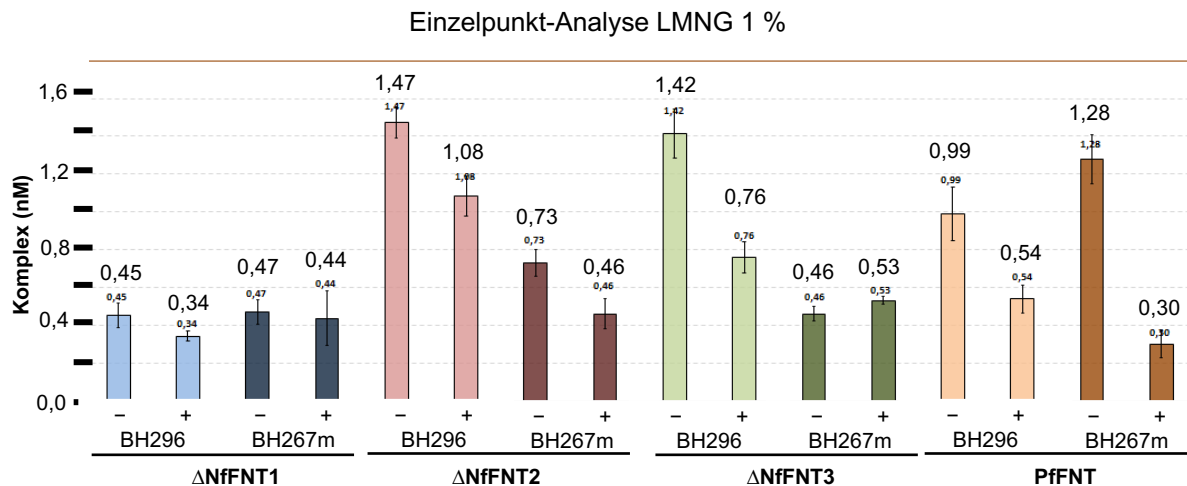
## Ergebnisse

183NfFNT2-GFP Monomer-, Dimer- und Pentamer-Banden sowie weitere Abbruchfragment-Banden detektiert wurden. Es lagen verschiedene Abbruchfragmente unterhalb der Größe des Monomers vor, aber auch zwischen 100 und 250 kDa wurden einige Banden detektiert, deren Migration keinem Oligomer des vollständig translatierten Konstruktes zuzuordnen war. Für  $\Delta 1$ -223NfFNT3-GFP wurde nach Radioimmunopräzipitation im Zelllysate eine schwache, der Größe nach dem Monomer entsprechenden Bande zwischen 55 und 70 kDa und eine weitere dem Dimer entsprechende Bande bei ca. 130 kDa detektiert. Eine deutlich stärkere Bande lag unterhalb der Größe des vollständig translatierten Konstrukts. Auch hier könnte es sich um eine sich in der posttranslationalen Modifikation unterscheidenden Variante des Proteins handeln.



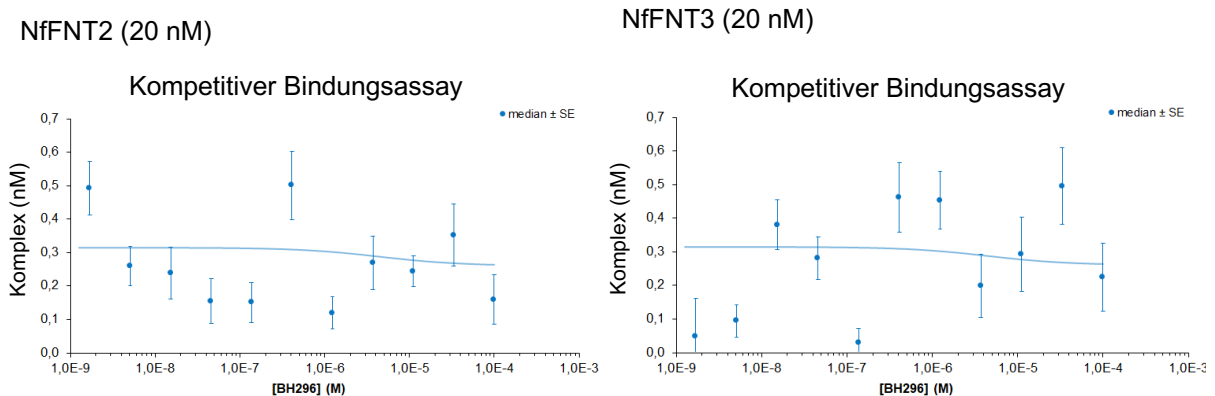
**Abbildung 4.46:** Herstellung N-terminal verkürzter NfFNT1-3-GFP-Fusionskonstrukte in HEK-Zellen. (A) Western Blot der Membranfraktion. (B) Western Blot der Membranfraktion unter Zusatz von 1 % LMNG (links), eines *Ripa* Lysates 1:3 (mitte) und 1:6 (rechts) verdünnt. Auftragsmenge: 16  $\mu$ g Gesamtprotein. Die Immundetektion erfolgte mit einem gegen GFP gerichteten Primärantikörper. Die Abbildung wurde von Kerrin Hansen zur Verfügung gestellt und leicht modifiziert. Ripa: Radioimmunopräzipitation Assay.

Unter Zusatz von 1% LMNG wurde für  $\Delta 1$ -183NfFNT2-GFP und  $\Delta 1$ -223NfFNT3-GFP eine mit PfFNT-GFP vergleichbare Komplexbildung mit BH296-DY647 gefunden (**Abbildung 4.47**).



**Abbildung 4.47:** FCCS-Einzelpunkt-Analyse der Komplexbildung zwischen fluoreszenzmarkiertem Inhibitor, PfFNT-GFP und  $\Delta$ NfFNT1-3-GFP. (-) ohne Zusatz, (+) mit Zusatz von BH296-DY647 oder BH267meta-DY647. 12 Messungen für 5 s pro well. Fehler stellen S.E.M. der technischen Replikate dar. Die Abbildung wurde von Kerrin Hansen zur Verfügung gestellt und leicht modifiziert.

Bei der Bestimmung der Affinität von BH296 zu  $\Delta$ 1-183NfFNT2-GFP und  $\Delta$ 1-223NfFNT3-GFP gegenüber 50 nM fluoreszenzmarkiertem BH296 wurde keine spezifische dosisabhängige Interaktion oder Konkurrenz gemessen (**Abbildung 4.48**). Eine Bestimmung von  $K_i$ -Werten war nicht möglich.

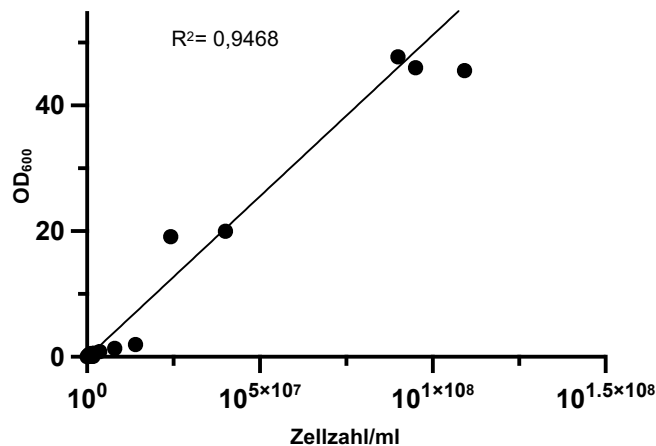


**Abbildung 4.48:** Kompetitiver Bindungsassay zur Ermittlung der Affinität von  $\Delta$ 1-183NfFNT2-GFP (links) und  $\Delta$ 1-223NfFNT3-GFP (rechts) zu BH296. Konzentration fluoreszenzmarkierter Inhibitor BH296-DY647: 50 nM. In Konkurrenz zugesetzter, nicht fluoreszenzmarkierter Inhibitor BH296: 100  $\mu$ M bis 2 nM. 12 Messungen für 5 s pro well. Fehler stellen S.E.M. der technischen Replikate dar. Die Abbildung wurde von Kerrin Hansen zur Verfügung gestellt und leicht modifiziert.

#### 4.7 Herstellung und Funktionalität von Formiat-Nitrit-Transportern in *D. discoideum*

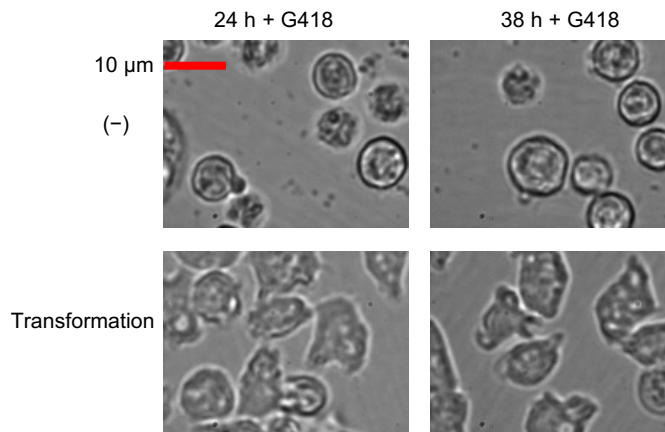
Im nächsten Schritt wurde der Einfluss des herstellenden Organismus auf *D. discoideum* als Modellorganismus für die heterologe Herstellung von Membranproteinen erweitert (Eichinger & Rivero, 2013). *D. discoideum* erwies sich als naheliegendes Expressionssystem, da zum einen eine einfache und kostengünstige Kultivierung der Amöbe möglich und zum anderen eine gewisse Ähnlichkeit zu *N. fowleri*, insbesondere in Bezug auf die Lipidbiosynthese (Fritz-Laylin *et al.*, 2010), als ebenfalls freilebender Protist gegeben ist (Eichinger *et al.*, 2005).

Zunächst wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerte Sporen (3.4.1) rasch aufgetaut und zügig in Medium ohne Selektionsmarker gegeben. Zur Prävention bakterieller Kontamination war dem Medium eine definierte Menge Penicillin-Streptomycin zugesetzt. Die ausgebrachten Zellen wurden nach 3 bis 5 Tagen *gesplittet* und je nach Bedarf zum Animpfen einer Flüssigkultur (3.4.3) für die Transformation (3.4.5) verwendet. Zur schnelleren Ermittlung der Zellzahl wurde die Korrelation zwischen der Zellzahl (3.4.4) und der  $\text{OD}_{600}$  (**Abbildung 4.49**) bestimmt. Bei einem Bestimmtheitsmaß von 0,9468 wurde die Korrelation als ausreichend angesehen, um für folgende Experimente von der  $\text{OD}_{600}$  auf die Zellzahl schließen zu können.



**Abbildung 4.49:** Korrelation zwischen  $\text{OD}_{600}$  und der mittels Zählkammer (Rosenthal) erhaltenen Zellzahl von *D. discoideum*.

Für die Herstellung von Fremdproteinen wurde sich für Plasmide entschieden, die ein Phosphotransferase-Gen enthalten, welches für die Resistenz gegenüber Geneticin verantwortlich ist. Zur Ausbildung der Resistenz ist zum einen das Vorhandensein mehrerer Kopien notwendig und zum anderen korreliert die Plasmidkopieanzahl mit dem Expressionslevel des Markers, was die Überexpression des Zielproteins begünstigt (Barth *et al.*, 1998; Early & Williams, 1987; Pang *et al.*, 1999). Die Transformation der Zellen erfolgte mittels Elektroporation (3.4.5). Das selektierte Wachstum der Zellen wurde mikroskopisch verfolgt. Es wurde beobachtet, dass Zellen ohne Plasmid die Elektroporation überstanden und bei späterer Zugabe von Selektionsmedium abstarben. Für Zellen, die mit dem für das Zielprotein codierenden Plasmid elektroporiert wurden und damit auch das notwendige Resistenzgen erhielten, wurde ebenfalls ein Absterben der nicht transformierten Zellen beobachtet. Nach mehrfachem Austauschen des Selektionsmediums unter Zugabe von frischem Medium wurden keine abgestorbenen, rundlichen Zellen mehr identifiziert. Die Zellen wurden bis zu konfluenter Bedeckung des Plattenbodens wachsen gelassen. In **Abbildung 4.50** sind exemplarisch Mikroskopieaufnahmen von transformierten *D. discoideum* Zellen mit und ohne Plasmid nach der Elektroporation und Zugabe von Selektionsmedium gezeigt. Vom Ausbringen der Sporen bis zu vollständig selektieren konfluent bewachsenen Platte vergingen ca.  $14 \pm 2$  Tage. Eine Flüssigkultur, die zur Gewinnung von Zelllysaten oder für Funktionsuntersuchungen kultiviert wurde, benötigte mindestens 24 h bis 48 h zum Erreichen einer Zellzahldichte von maximal  $4 \cdot 10^6$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$ , die einer  $\text{OD}_{600}$  von ca.  $0,15 \pm 0,05$  entsprach. So wurde sichergestellt, dass die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet wurden (Fey *et al.*, 2007).



**Abbildung 4.50:** Exemplarische Mikroskopie-Aufnahmen nach Transformation von *D. discoideum* mittels Elektroporation. Ohne Plasmid (oben) und mit Plasmid (unten). G418: Geneticin als Selektionsantibiotikum. Skalierungsbalken: 10 µm

#### 4.7.1 Produktion von PfFNT in *D. discoideum*

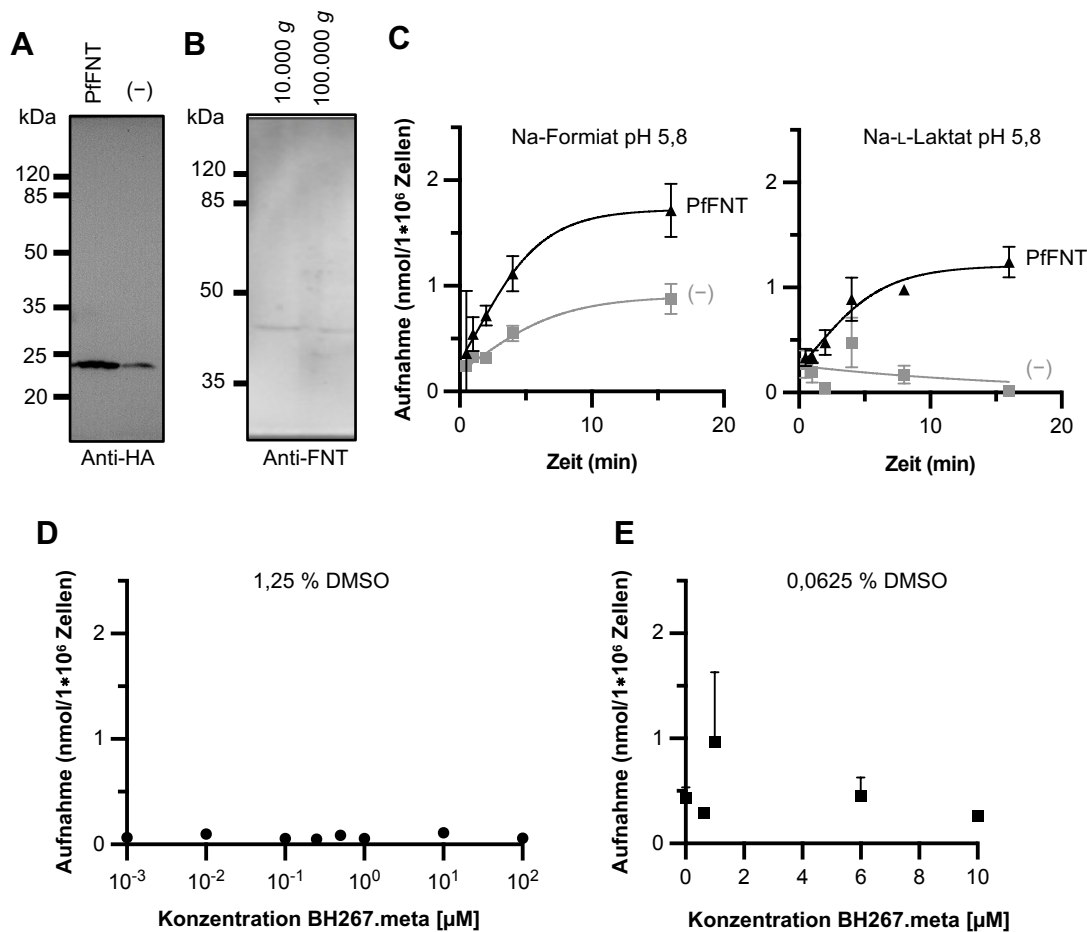
Da *D. discoideum* für Herstellungs- und Funktionsuntersuchungen von FNT im Arbeitskreis noch nicht bekannt war, wurde im Vorfeld HA-PfFNT-His<sub>10</sub> in *D. discoideum* untersucht. Durch die Klonierungsstrategie bedingt, wiesen die folgenden NfFNT-Konstrukte lediglich einen N-terminalen HA-tag auf.

Im Western Blot wurde eine unspezifische Bande knapp unter 25 kDa mit dem gegen den HA-tag (**Abbildung 4.51 A**) gerichteten Antikörper detektiert. Mit gegen den C-Terminus von PfFNT gerichtetem Primärantikörper wurde eine schwache Bande bei ca. 40 kDa detektiert (**Abbildung 4.51 B**). Auffällig war hier, dass PfFNT in *D. discoideum* hergestellt in der SDS-PAGE weniger weit migrierte als das kleiner erscheinende aus *S. cerevisiae* isolierte PfFNT. Bei pH 5,8 wurde für Formiat/H<sup>+</sup>- und L-Laktat/H<sup>+</sup>-Transport ein FNT-typisch exponentieller Kurvenverlauf gefunden (**Abbildung 4.51 C**). Der Kurvenverlauf für Laktat verlief mit einer Ratenkonstante  $k$  von 0,19 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> deutlich weniger steil als die von PfFNT bei pH 6,8 im Hefesystem (vgl. **Abbildung 4.9 C**) mit einer Ratenkonstante  $k$  von 0,57 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Ein möglicher Grund hierfür könnte darin gelegen haben, dass weniger Transporter in der Membran präsent waren.

Zur Überprüfung des PfFNT-vermittelten Transportes von Formiat/H<sup>+</sup> und L-Laktat/H<sup>+</sup> wurde im nächsten Schritt die Inhibierbarkeit des plasmoidalen Laktattransporter bestimmt. Für PfFNT ließ sich mit BH267.meta in 1,25 % DMSO kein IC<sub>50</sub>-Wert bestimmen. Die nach dem Waschvorgang verbliebende Aktivität deutete darauf hin, dass keine intakten Zellen mehr vorlagen. Die gemessene Aktivität lag unter der des Hintergrundes (vgl. **Abbildung 4.51 C**), sodass die Vermutung nahe lag, dass die Zellen nach Inkubation mit dem Inhibitor und 1,25 % DMSO nicht mehr intakt waren (**Abbildung 4.51 D**). Bei auf 0,0625 % reduzierter DMSO-Konzentration wurde bei Zellen mit DMSO- (0,430 nmol / 1\*10<sup>6</sup> Zellen) und ohne DMSO-Zusatz (0,445 nmol / 1\*10<sup>6</sup> Zellen) nach 30 Sekunden die gleiche Aufnahme an L-Laktat/H<sup>+</sup> gemessen, sodass davon ausgegangen waren, dass die Zellen unter dieser DMSO-Konzentration intakt blieben. Eine Hemmung der Aufnahme von Laktat/H<sup>+</sup> durch PfFNT bei Zusatz von BH267.meta erniedrigter DMSO-Konzentration von 0,0625 % wurde nicht gemessen (**Abbildung 4.51 E**). Mit BH267.meta wurde ein Inhibitor gewählt, der auch im wässrigen eine ausreichende Löslichkeit aufweist, weswegen eine verminderte Löslichkeit des Inhibitors als Begründung ausgeschlossen werden konnte. Die Transmembrandiffusion des Inhibitors in *D. discoideum*

## Ergebnisse

sowie die maximal tolerierte DMSO-Konzentration sollten experimentell weiter untersucht werden.

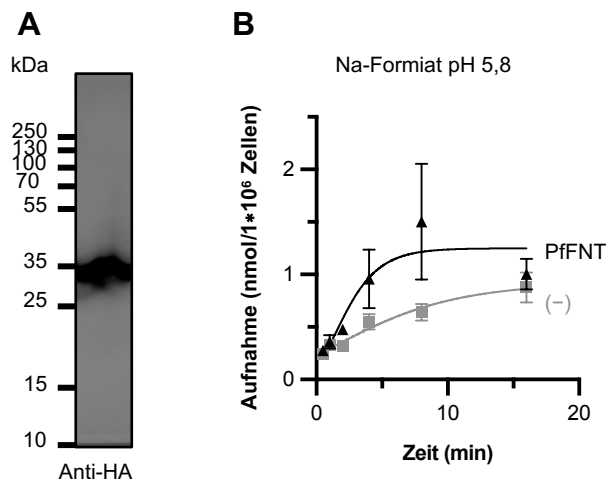


**Abbildung 4.51:** Herstellung und Funktionsuntersuchung von PfFNT in *D. discoideum*. (A) Western Blot von *D. discoideum*-Zelllysaten. (–) mit dem Leerplasmid pDM304 transformierte *D. discoideum*-Zellen. Auftragsmenge: 100 µg Gesamtprotein. Belichtung: 45 min. (B) Western Blot des Zelllysates mit gegen PfFNT gerichtetem Primärantikörper. Auftragsmenge: 100 µg Gesamtprotein. Belichtung: 20 min. (C) Aufnahmekurven von <sup>14</sup>C-markierten Substraten bei pH 5,8. (–) mit dem Leerplasmid transformierte *D. discoideum*-Zellen. (E) Determination des IC<sub>50</sub>-Wertes von BH267.meta für PfFNT in *D. discoideum* gegen Na-L-Laktat bei pH 5,8. Der Hintergrund wurde bereits abgezogen. Messzeit: 30 s. (F) Inhibition von PfFNT in *D. discoideum* bei abnehmender Konzentration von BH267.meta. Der Hintergrund wurde bereits abgezogen. (–): Aufnahme L-Laktat pH 5,8 über 30 s ohne Zusatz von DMSO und Inhibitor. Die Fehler stellen S.E.M. der technischen und biologischen Replikate (N = 2 – 6) dar.

Zusammengefasst wurde für PfFNT eine Bande mit PfFNT-spezifischem Antikörper detektiert, jedoch verlief diese auf einer Laufhöhe mit einem für PfFNT untypischen scheinbar höherem Molekulargewicht. Normalerweise kann ein *gel-shifting* von Membranproteinen in Richtung kleiner erscheinender Größen beobachtet werden. Es wurde Transport von Formiat und L-Laktat gefunden, der, dem exponentiellen Kurvenverlauf nach, FNT-typisch war. Widersprüchlich war hier, dass sich der Transport trotz intakt verbliebener *D. discoideum* Zellen nicht inhibieren ließ. Für *D. discoideum* wurden keine endogenen L-Laktat- oder Formiat-Transporter ermittelt. Die Suche nach annotierten Genen im Genom im Zusammenhang mit „formate“ ergab zwei Treffer: Eine Formiat-Dihydrofolate Ligase (fthS, DDB\_G0290397) (Journet *et al.*, 2012; Sillo *et al.*, 2008; Wiles *et al.*, 2006) und einen

Oxalat/Formiat Antiporter (DDB\_G0273195, DDB\_G0273735) (Maeda *et al.*, 2003). Im Zusammenhang mit „lactate“ wurden sechs Genprodukte gefunden. Keinem davon wurde der Transport von L-Laktat zugeschrieben. Es wurde eine D-Laktat-Dehydrogenase (DDB\_G0281101) identifiziert (Schachner *et al.*, 1984). Auch das Vorkommen von L-Laktat in der Zelle wird beschrieben. Es war in der Literatur keine Zuordnung zu einem transmembranären Transport von L-Laktat in *D. discoideum* zu finden. Das passt zu dem PfFNT-vermittelten Transport, der sich deutlich von dem des Hintergrundes abgrenzte.

Im nächsten Schritt wurde PfFNT als GFP-Fusionsprotein untersucht, um später die Lokalisation von PfFNT-GFP in *D. discoideum* bestimmen zu können. Auch potenzielle Einflüsse des Fusionskonstruktes auf Transporteigenschaften des gut charakterisierten PfFNT im neuen Expressionssystem können so gefunden werden. Im Western Blot wurde mit einem gegen GFP gerichteten Primärantikörper eine Bande bei knapp unter 35 kDa detektiert (**Abbildung 4.52 A**). Es wurde keine Bande auf der zu erwartenden Migrationshöhe für das Fusionskonstrukt detektiert. Eine Funktionsuntersuchung ergab keine konstant signifikant (t-Test,  $P < 0,05$ ) über dem Hintergrund liegende Leitfähigkeit für Formiat/ $H^+$  bei pH 5,8 (**Abbildung 4.52 B**).



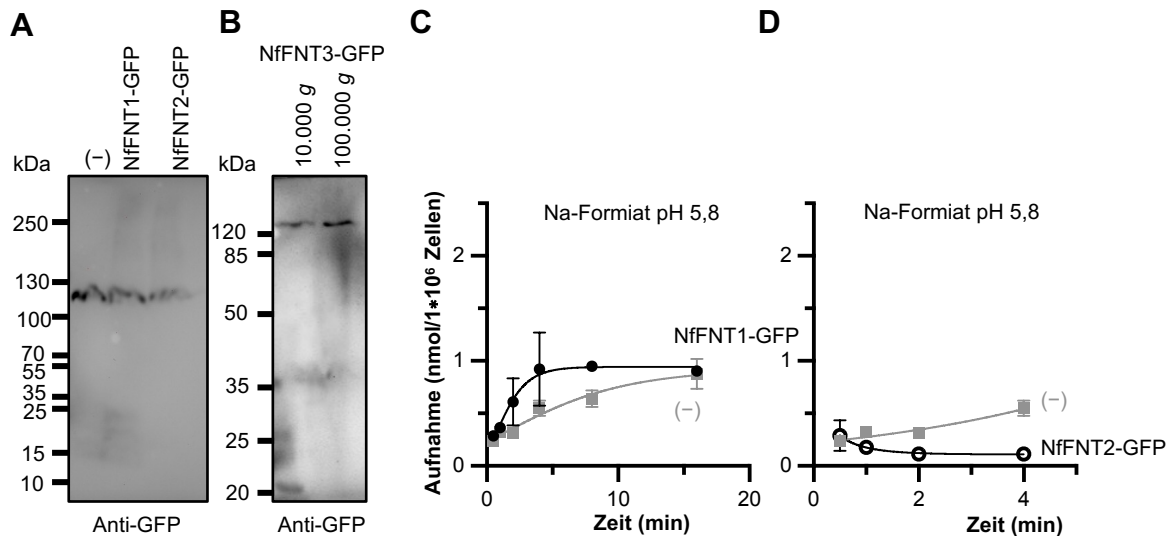
**Abbildung 4.52:** Herstellung und funktionelle Charakterisierung von PfFNT-GFP in *D. discoideum*. (A) Western Blot des Zelllysates der selektierten *D. discoideum* Zellen mit gegen den am N-Terminus befindlichen HA-tag gerichteten Primärantikörper. Auftragsmenge: 2 µg Gesamtprotein. Belichtung: 30 min. (B) Aufnahmekurve Na-Formiat bei pH 5,8. Die Fehler stellen S.E.M. der technischen und biologischen Replikate (N = 2 – 4) dar.

### 4.7.2 FNT1-3 von *N. fowleri* in *D. discoideum*

#### 4.7.2.1 NfFNT1-3 als GFP-Fusionsproteine

Parallel zu den PfFNT-GFP-Fusionskonstrukten wurden unverkürzte NfFNT1-3-GFP-Fusionskonstrukte untersucht. Im Western Blot wurde eine unspezifische Bande bei knapp über 120 kDa gefunden, die in allen Zelllysaten (**Abbildung 4.53 A und B**) zu detektieren war. Für NfFNT1-GFP waren Abbruchfragmente schwacher Intensität zwischen 15 und 25 kDa nachzuweisen (**Abbildung 4.53 A**). Weder für NfFNT1-GFP noch für NfFNT2-GFP wurde sich signifikant (t-Test,  $P < 0,05$ ) vom Hintergrund abgrenzender Transport von Formiat/ $H^+$  bei pH 5,8 gemessen (**Abbildung 4.53 C und D**). NfFNT3-GFP wurde hier nicht weiter untersucht, nachdem die Bande bei 120 kDa auch bei mit dem Leerplasmid

transformierten *D. discoideum*-Zellen gefunden wurde und somit einer unspezifischen Interaktion zwischen Zelllysate und Antikörper zugeordnet wurde.



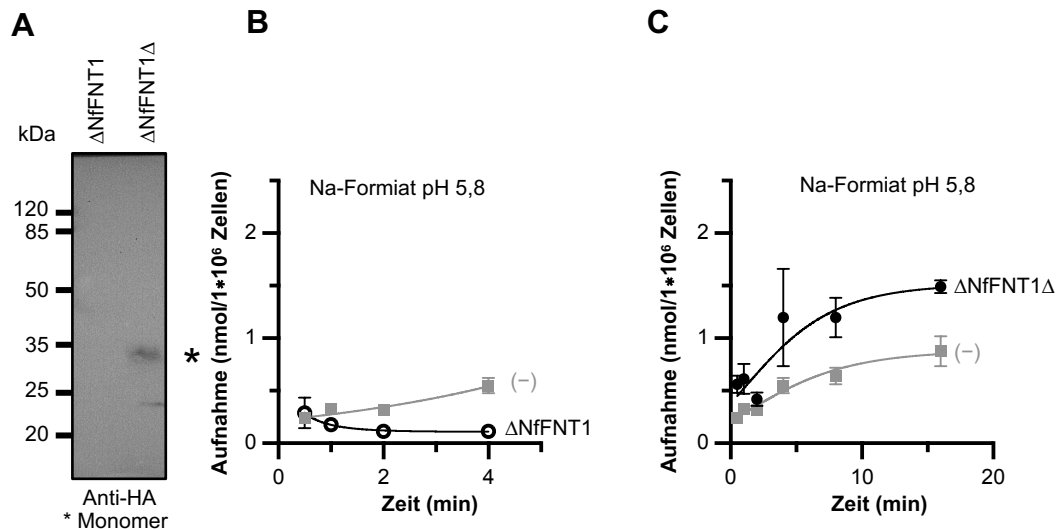
**Abbildung 4.53:** Herstellung und Funktion der NfFNT1-3-GFP Fusionskonstrukte. (A) Western Blot NfFNT1-GFP und NfFNT2-GFP. (–) mit dem Leerplasmid transformierte *D. discoideum* Zellen. Auftragsmenge 100 µg Gesamtprotein. Belichtung: 30 min. (B) Western Blot NfFNT3-GFP. Rechts: Inkubation bei 60 °C. Auftragsmenge: 50 µg Gesamtprotein. Belichtung: 30 min. Markerreste unten links. (C) und (D) Aufnahmekurven gegenüber den mit dem Leerplasmid (–) transformierten *D. discoideum*-Zellen. Aufnahme von <sup>14</sup>C-markierten Na-Formiat bei pH 5,8 durch (C) NfFNT1-GFP (schwarz geschlossen) und (D) NfFNT2-GFP (schwarz offen). Die Fehler stellen S.E.M. der technischen und biologischen Replikate (N = 2 – 3) dar.

#### 4.7.2.2 NfFNT1

Als nächstes wurden die verkürzten Varianten von NfFNT1  $\Delta 1-214$ NfFNT1 und  $\Delta 1-214$ NfFNT $\Delta 484$  in *D. discoideum* Zellen untersucht. Im Western Blot wurde eine Bande mit geringer Intensität knapp unter 35 kDa detektiert. Eine weitere Bande mit geringer Intensität lag auf Höhe mit einer Masse von knapp 25 kDa (**Abbildung 4.54 A**). Mit einer theoretisch berechneten Masse von 27 kDa für  $\Delta$ NfFNT1 $\Delta$  könnten je nach Laufverhalten oder potenzieller Proteolyse des Konstruktes beide Banden dem Monomer entsprechen. Aufgrund der unspezifischen Banden aus **Abbildung 4.51 A** war die untere Bande eher eine unspezifische Interaktion des Zelllysates mit einem der Antikörper zuzuordnen. Um eine genauere Aussage treffen zu können, ob es sich um eine unspezifische Interaktion mit dem primären Anti-HA-Primärantikörper oder dem sekundären *anti-mouse*-Antikörper handelt, waren weitere Experimente notwendig. Eine Doppelbestimmung im Vergleich mit Zelllysaten von mit dem Leerplasmid transformierter *D. discoideum*-Zellen bestätigte die Zuordnung zu der oberen Bande bei ca. 35 kDa, da hier überall die untere bei ca. 25 kDa liegende Bande auftrat. Es konnte für drei biologische Replikate beobachtet werden, dass  $\Delta$ NfFNT1 $\Delta$  aus *D. discoideum* im Western Blot größer erscheint. Für  $\Delta$ NfFNT1 wurde passend zum fehlenden Nachweis im Western Blot kein Transport von Formiat bei pH 5,8 gemessen (**Abbildung 4.54 B**). Für  $\Delta$ NfFNT1 $\Delta$  wurde ein typisch exponentieller Kurvenverlauf für die Aufnahme von Formiat gemessen (**Abbildung 4.54 C**). Auffällig war aber zum einen der langsame Anstieg der Kurve und dass für die Aufnahme nach 2 Minuten trotz mehrfacher biologischer und technischer Replikate kein signifikant über dem Hintergrund liegender Wert gemessen wurde

## Ergebnisse

(t-Test,  $P < 0,05$ ). Im Nachhinein stellte sich das als ein Problem der Abnutzung der Vakuumabdichtung im Aufbau der Messapparatur heraus.

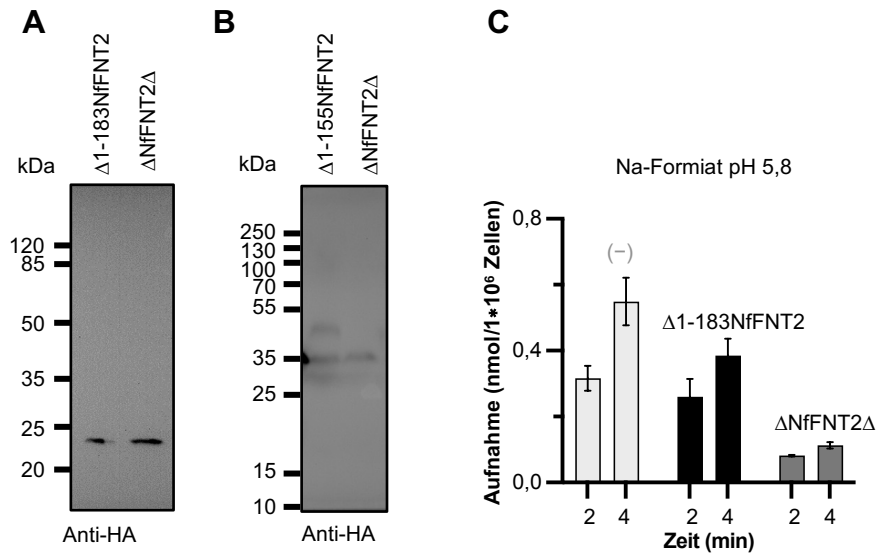


**Abbildung 4.54:** Expression und Funktion von  $\Delta$ NfFNT1 und  $\Delta$ NfFNT1 $\Delta$  in *D. discoideum*. (A) Western Blot des Zelllysates der selektierten *D. discoideum* Zellen. Auftragsmenge: 40  $\mu$ g Gesamtprotein. Belichtung: 30 min. Aufnahme von (B)  $\Delta$ NfFNT1 und (C)  $\Delta$ NfFNT1 $\Delta$  von  $^{14}$ C-markiertem Na-Formiat bei pH 5,8. (–): mit dem Leerplasmid transformierten *D. discoideum*-Zellen. Die Fehler stellen S.E.M. der technischen Replikate ( $N = 2 - 5$ ) dar.

Die Andeutung von Export durch  $\Delta$ NfFNT1 von Formiat/ $H^+$  durch den abfallenden Anteil von aktivem Substrat über die Zeit im Vergleich zum Hintergrund (**Abbildung 4.54 B** links) wurde aufgrund der fehlenden Nachweisbarkeit im Western Blot als Artefakt eingestuft (**Abbildung 4.54 A**). Möglich wäre auch, dass die Zellen beim Waschvorgang nicht intakt geblieben sind. Gleiches wurde für NfFNT2-GFP angenommen (**Abbildung 4.53 D**).

### 4.7.2.3 NfFNT2

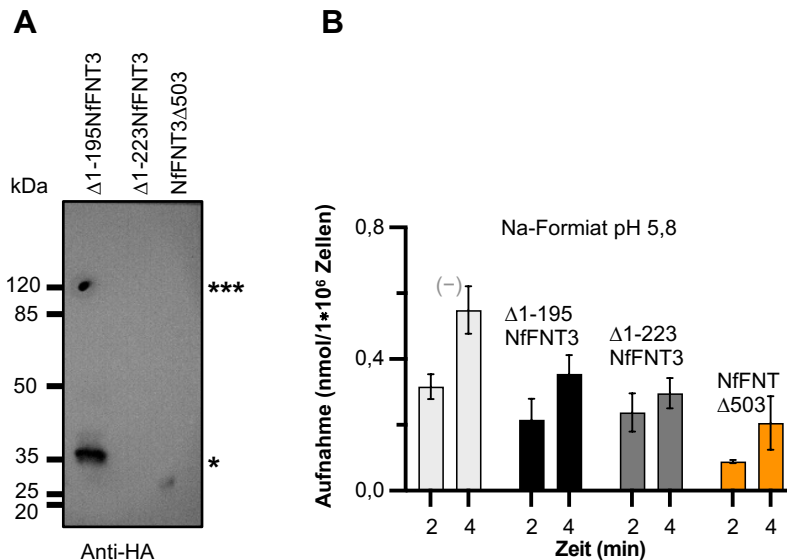
$\Delta$ 1-183NfFNT2 wurde in *D. discoideum* nicht erfolgreich hergestellt. Im Western Blot wurde eine unspezifische Bande knapp unter 25 kDa detektiert (**Abbildung 4.55 A**). Für  $\Delta$ -155NfFNT2 mit einer Größe von ca. 38 kDa wurde eine Bande knapp über 35 kDa detektiert. Es waren außerdem weitere Abbruchbanden zu erkennen. Für  $\Delta$ NfFNT2 $\Delta$  wurde nach einem zusätzlichen Vortextschritt beim Zellaufschluss eine Bande mit geringer Intensität knapp unter 35 kDa detektiert, die auf der zu erwartenden Laufhöhe für das vollständig translatierte Konstrukt lag (**Abbildung 4.55 B**). Es wurde kein Transport von Formiat/ $H^+$  bei pH 5,8 gefunden (**Abbildung 4.55 C**).



**Abbildung 4.55:** Herstellung und Funktion von  $\Delta 1-183\text{NfFNT2}$  und  $\Delta\text{NfFNT2}\Delta$  in *D. discoideum*. (A) Western Blot des Zelllysates der selektierten *D. discoideum* Zellen. Auftragsmenge 40  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein. Belichtung 30 min. (B) Western Blot nach zusätzlichem Vortexen während des Zellaufschlusses. Auftragsmenge: 40  $\mu\text{g}$ . Belichtung: 30 min. (C) Aufnahme von  $^{14}\text{C}$ -markiertem Na-Formiat. Die Fehler stellen S.E.M. der technischen Replikate ( $N = 2 - 3$ ) dar.

#### 4.7.2.4 NfFNT3

Für NfFNT3-Konstrukte in *D. discoideum*-Zellen wurde im Western Blot für  $\Delta 1-195\text{NfFNT3}$  eine starke Bande bei 35 kDa (**Abbildung 4.56 A**) detektiert. Knapp darüber befand sich noch eine zweite Bande mit deutlich geringerer Intensität, die auf der zu erwartenden Höhe für ein Membranprotein mit 41 kDa migrierte. Auffällig ist hier, dass keine unspezifische Bande bei ca. 25 kDa zu erkennen war. Eine sich andeutende Bande bei ca. 120 kDa migrierte auf der zu erwartenden Laufrhöhe des Trimers mit einer berechneten Masse von ca. 123 kDa. Für  $\Delta 1-223\text{NfFNT3}$  und  $\Delta\text{NfFNT3}\Delta$  wurde keine Herstellung nachgewiesen. Auffällig war auch hier die Abwesenheit bzw. nur die Andeutung der sonst vorhandenen unspezifischen Bande bei 25 kDa. Für keines der Konstrukte wurde Transport von Formiat/ $\text{H}^+$  bei pH 5,8 gemessen (**Abbildung 4.56 B**).



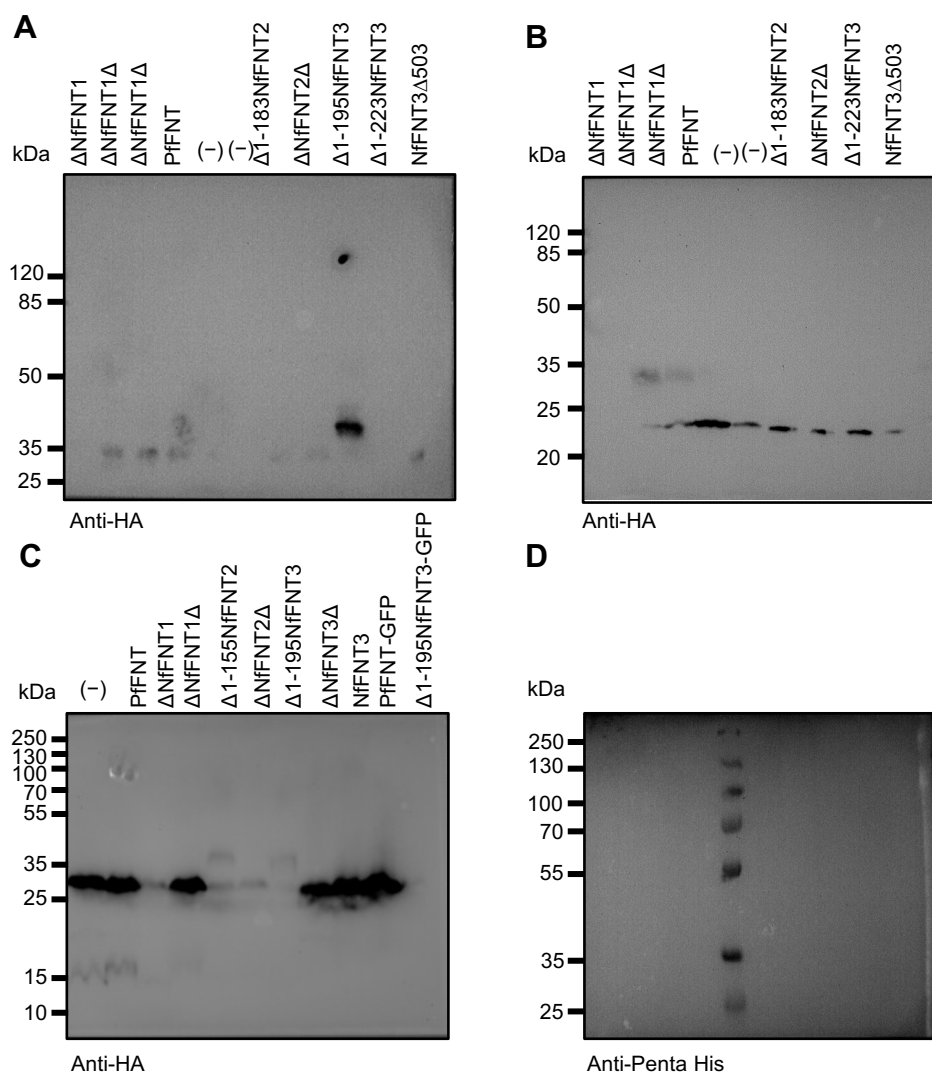
**Abbildung 4.56:** Herstellung und Funktion von  $\Delta$ NfFNT3 und NfFNT3 $\Delta$  in *D. discoideum*. (A) Western Blot des Zelllysates der selektierten *D. discoideum* Zellen. Auftragsmenge 40  $\mu$ g Gesamtprotein. Belichtung 30 min. (B) Aufnahme von  $^{14}$ C-markiertem Na-Formiat. Die Fehler stellen S.E.M. der technischen Replikate (N = 2 – 3) dar. \* Monomer, \*\*\* Trimer.

Durch den Wechsel auf das Expressionssystem von *D. discoideum*-Zellen wurde keine stabile Herstellung bzw. Nachweisbarkeit im Western Blot gefunden. Bei Transportuntersuchungen an dem bereits gut untersuchten PfFNT aus *P. falciparum* wurde vielversprechender Transport gefunden. Es wurde angenommen, dass die Plasmide in ausreichender Anzahl kopiert wurden, da die damit einhergehende Selektion über das Plasmid nachgewiesen wurde (vgl. **Abbildung 4.50**). Für die Proteine des Amöben-ähnlichen *N. fowleri* wurde keine im Vergleich zur Hefe verbesserte Nachweisbarkeit der Herstellung der Proteine im Western Blot gefunden. Für die Western Blot-Analytik wären spezifische gegen NfFNT gerichtete Antikörper von Vorteil gewesen, da die unspezifische Interaktion des *D. discoideum*-Zelllysates bei ca. 25 kDa mit dem verwendeten Primärantikörper evtl. vorhandene Signale sowohl in der Intensität als auch in Bezug auf die Laufhöhe einiger Konstrukte überlagerte. Auch mit dem gegen GFP-gerichteten Primärantikörper und anderem Sekundärantikörper traten unspezifische Signale bei ca. 120 kDa auf. Vom Ausbringen der *D. discoideum*-Sporen bis zur selektieren konfluent bewachsenen Platte vergingen 14 bis 16 Tage. Unter der Berücksichtigung, dass *D. discoideum*-Zellen nach zwei bis vier Wochen morphologische Veränderungen durch spontane Mutationen aufweisen (Fey *et al.*, 2007), war das Zeitfenster von ca. sieben Tagen, in dem die transformierten und selektierten Zellen untersucht werden konnten, für größere Messreihen an einer selektierten Platte zu schmal.

Bei vergleichenden Western Blots der beschriebenen *D. discoideum*-Proben wurde in allen Lysaten die unspezifische Bande zwischen 25 und 35 kDa gefunden (**Abbildung 4.57 B**). Wurde die SDS-PAGE so lange laufen gelassen bis die Bromphenolblau-Front aus dem Gel heraus migrierte, war die Bande nicht mehr zu detektieren (**Abbildung 4.57 A**). Nach einem zusätzlichen Vortex-Schritt waren die Banden intensiver (**Abbildung 4.57 C**). Aufgrund der Größenähnlichkeit zu PfFNT (35 kDa),  $\Delta 1-215$ NfFNT1 $\Delta 492$  (27 kDa) oder  $\Delta$ NfFNT2 $\Delta$  (31 kDa) und des *gel-shiftings* der Membranproteine ist eine Signalüberlagerung nicht auszuschließen. Für die deutlich größeren Konstrukte NfFNT3, PfFNT-GFP und  $\Delta 1-195$ NfFNT3-GFP wurde keine Bande im Bereich von 60 kDa gefunden (**Abbildung 4.57 C**). Vor diesem Hintergrund

## Ergebnisse

wurde davon ausgegangen, dass die prägnanten starken Banden auf Höhe von ca. 35 kDa der unspezifischen Bindung des Anti-HA-Antikörpers zugeordnet werden können und in einem niedriger konzentriertem Gel ein etwas anderes Migrationsverhalten aufwiesen. Die unspezifische Bande wurde in einem 12,5 %-igen Gel bei ca. 25 kDa (**Abbildung 4.57 B**) und in einem 10%-igen Gel bei ca. 35 kDa (**Abbildung 4.57 C**) gefunden. Von den Konstrukten weist nur PpFNT einen C-terminalen His<sub>10</sub>-tag auf. Unter Verwendung des Anti-Penta-His-Primärantikörpers konnte weder für PpFNT als auch für die anderen Zelllysate eine spezifische oder unspezifische Bande detektiert werden (**Abbildung 4.57 D**). Dies bestätigte die Annahme, dass die unspezifische Bande bei ca. 25 kDa im 12,5 %-igen Gel dem gegen den HA-tag gerichteten Antikörper zuzuordnen ist, der gleiche Sekundärantikörper verwendet wurde.

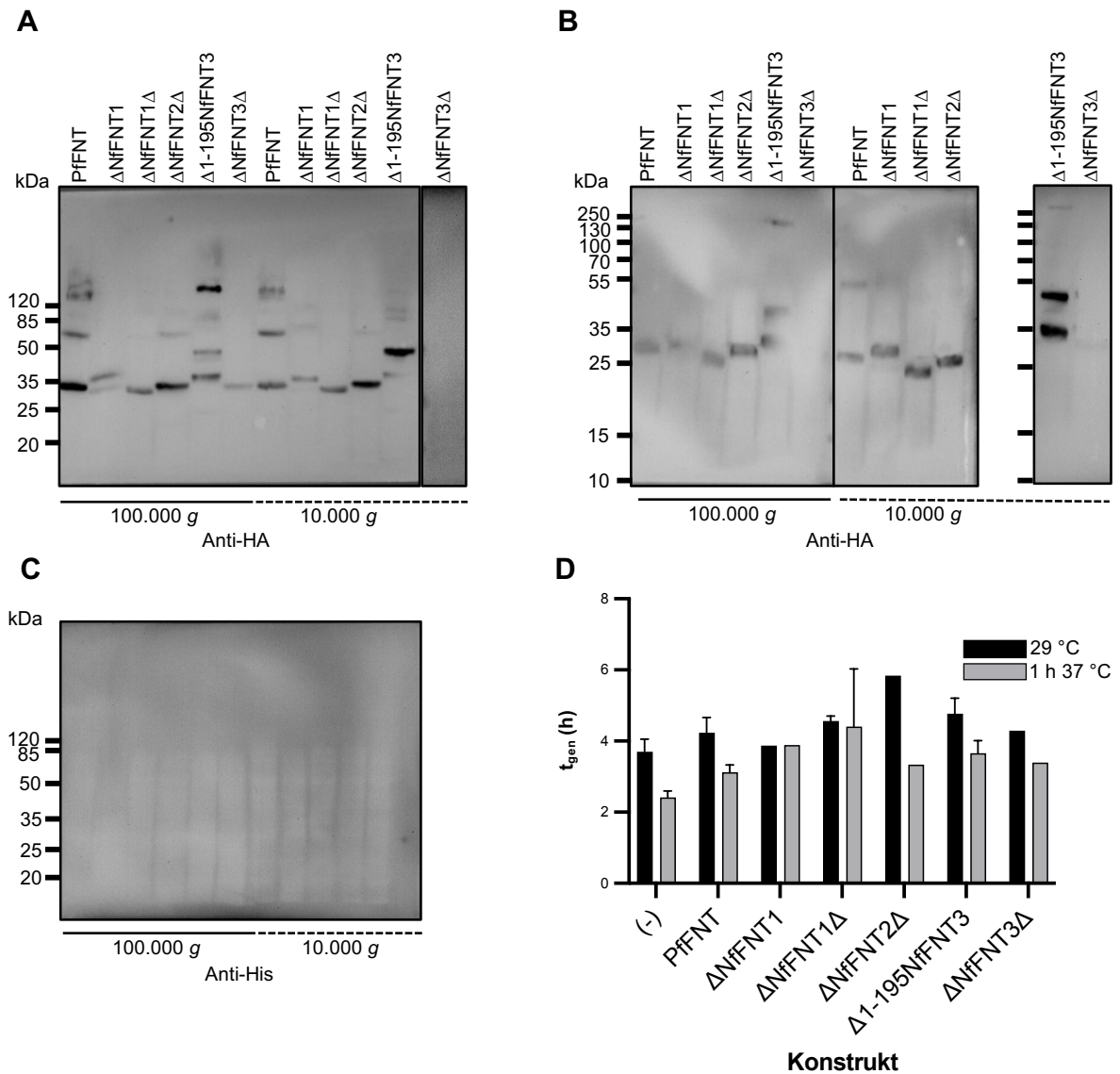


**Abbildung 4.57:** Übersicht Western Blot *D. discoideum* Zelllysate. (A) Anti-HA-Primärantikörper. Auftragsmenge: 40 µg Gesamtprotein. Belichtung: 30 min. (B) Proben von (A) Anti-HA-Primärantikörper. Auftragsmenge: 100 µg Gesamtprotein. Belichtung: 30 min. (C) Zusätzlicher Vortextschritt. Acrylamidgelkonzentration: 10 %. Anti-HA-Primärantikörper. Auftragsmenge ca. 3 µg Gesamtprotein. Belichtung 30 min. (D) Anti-Penta His Primärantikörper gegenüber 20 µl aufgetragenen *D. discoideum*-Zelllysate.

#### 4.8 Isolation Membranprotein-haltiger Vesikel aus *S. cerevisiae* NY17

Vor diesem Hintergrund wurde auf ein anderes Hefesystem gewechselt. Die Proteinherstellung erfolgte in *S. cerevisiae*-Zellen vom Stamm NY17, welcher sich durch die Bildung intrazellulärer Membranvesikel auszeichnet (Firnges *et al.*, 2001). Die Überlegung war, die Herstellung der Membranproteine in der Zelle zu steigern, da durch die Vesikelbildung mehr membranäre Gesamtoberfläche zur Verfügung steht. Die Hefen des Stamms NY17 wurden wie in 3.3.1 beschrieben transformiert und anschließend auf SD-Agar oder später in SD-Medium kultiviert (3.3.8). Nach der Forcierung der Vesikelbildung durch Erhöhung der Temperatur auf 37 °C wurde nach einer Stunde Inkubation bei 37 °C im Western Blot für alle Konstrukte eine dem vollständig translatierten Konstrukt entsprechende Monomerbande in der Membranfraktion detektiert. Betrachtet wurden hier PfFNT, sowie  $\Delta$ NfFNT1,  $\Delta$ NfFNT1 $\Delta$ ,  $\Delta$ NfFNT2 $\Delta$ ,  $\Delta$ 1-195NfFNT3 und  $\Delta$ NfFNT3 $\Delta$ . Für PfFNT,  $\Delta$ NfFNT2 $\Delta$  und  $\Delta$ 1-195NfFNT3 wurden zusätzlich Dimere und für PfFNT und  $\Delta$ 1-195NfFNT3 Trimere detektiert (**Abbildung 4.58 A**). Für  $\Delta$ 1-195NfFNT3 wurde ein Abbruchfragment bei ca. 35 kDa gefunden. Nach Inkubation der Hefen für 2 h bei 37 °C waren insgesamt weniger intensive Banden zu erkennen, sodass für folgende Proteinisolationen die Inkubation bei 37 °C für eine Stunde als ausreichend angesehen wurde. Auffällig war, dass nach zweistündiger Inkubation bei 37°C die Banden im Bereich zwischen 35 und 55 kDa im 10.000 g von  $\Delta$ 1-195NfFNT3 an Intensität zugenommen haben (**Abbildung 4.58 B**). Die Detektion mit gegen den am C-Terminus befindlichen His<sub>10</sub>-tag gerichteten Primärantikörper ergab kein Signal (**Abbildung 4.58 C**). Dies wurde auch für bereits gut untersuchte und charakterisierte Proteine beobachtet und von anderen Gruppenmitgliedern bestätigt. Parallel konnte beobachtet werden, dass die Generationszeit der Hefen bei Erhöhung der Temperatur abnahm (**Abbildung 4.58 D**).

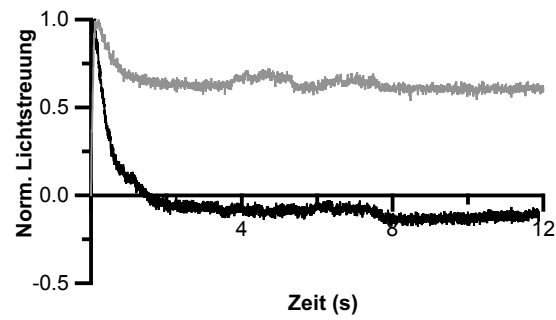
## Ergebnisse



**Abbildung 4.58:** Isolation sekretorischer Vesikel aus *S. cerevisiae* NY17. (A) Western Blot der mikrosomalen Fraktion nach 1 h (A) und 2 h (B) Inkubation bei 37 °C. Auftragsmenge 15 – 100 µg Gesamtprotein. Volumen normalisiert auf die geringste Menge. Belichtung: 30 min. (C) Western Blot der mikrosomalen Fraktion nach 1 h Inkubation. Auftragsmenge 50 – 100 µg Gesamtprotein. Belichtung: 45 min. (D) Generationszeiten unter Berücksichtigung der lag-Phase einer Übernachtskultur bei 29 °C (schwarz) und nach Erhöhung der Temperatur auf 37 °C (grau). Die Fehler stellen die S.E.M. der biologischen Replikate (N = 2 – 3) dar.

Die initiale Überprüfung der Funktionalität von in den Vesikeln befindlichem ΔNfFNT1Δ zeigte eine deutliche Abnahme der Lichtstreuung, sodass davon auszugehen war, dass das Vesikelvolumen infolge von Substrateinstrom und darauffolgendem Wassereinstrom zunahm (**Abbildung 4.59**). Zur genauen Charakterisierung und Abgrenzung von osmotischen Vorgängen aufgrund der Geschwindigkeit sollten unterschiedliche Substratgradienten und pH-Werte vermessen werden, um einen Substrat- und pH-abhängigen Transport von ΔNfFNT1Δ nachzuweisen.

## Ergebnisse



**Abbildung 4.59:** Normalisierte Lichtstreuung  $\Delta$ NfFNT1 $\Delta$ -haltiger Vesikel (schwarze Kurve) und Vesikel von mit dem Leerplasmid transformierter Hefen (hellgrau) unter einem isoosmotischen 5 mM Na-Formiat-Gradienten. Die Kurven wurden durch Mittelung von 4 – 9 Kurven erhalten und normalisiert.

## 5 Diskussion

Ziel der Arbeit war die Identifikation von FNT human-pathogener Parasiten mit dem Fokus auf *N. fowleri* und deren Eignung als Wirkstoffziel in der Behandlung der PAM. Zunächst stand unter der Prämisse der Strukturaufklärung die funktionelle Charakterisierung des zellfrei hergestellten PfFNTG107S im Vordergrund, da die Eignung von PfFNT als Wirkstoffziel und die Optimierung des Inhibitors gegenüber Resistenzmutanten gezeigt wurde (Walloch *et al.*, 2021). Als nächstes wurden die hierbei gewonnen Erkenntnisse auf NfFNT übertragen und der Transporter biochemisch charakterisiert. Hierbei wurde auf zellbasierte Systeme wie *S. cerevisiae* und *D. discoideum* zurückgegriffen und NfFNT in pentamerer Form in der Western Blot-Analytik nachgewiesen.

### 5.1 Zellfreie Proteinproduktion von Membranproteinen und deren Funktionalität

Zellfrei hergestellte Membranproteine stellen eine besondere Herausforderung in Bezug auf ihre native Konformation und Bioaktivität dar. In der vorliegenden Arbeit wurden zellfrei hergestellte lösliche Proteine (MSP1E3D1) und Membranproteine (PfFNT) untersucht, deren Synthese auf einem aus *E. coli* gewonnenem ribosomalen Extrakt basiert. Es wurde mit der zellfreien Proteinsynthese ein direkt zugängliches Protein gefunden, was unabhängig von Zellvariabilitäten gewonnen, gereinigt und mittels Western Blot-Analytik detektiert wurde. Die Verwendung von *E. coli* basierten ribosomalen S30-Extrakten ist in der Literatur mehrfach beschrieben (Gregorio *et al.*, 2019). Für zellfrei hergestellte FNT aus *E. histolytica* konnte bereits die Funktionalität nachgewiesen werden (Helmstetter *et al.*, 2019). Auch hier war Brij® 78 das gewählte Detergens. Für lösliche Proteine wie GFP wurde die erfolgreiche Herstellung und anschließende Faltung zur Ausbildung der Fluoreszenz nach zellfreier Synthese auf Basis von *E. coli*-Extrakten bereits gezeigt. Es wurde bereits gezeigt, dass eine Inhibition der Translation möglich ist. So konnte für verschiedene prokaryotische ribosomale Extrakte dosisabhängig mittels spezifischer *Target*-Inhibition, die zellfreie Herstellung von GFP inhibiert werden (Höger *et al.*, 2023). Insgesamt ist aber auch für die in dieser Arbeit zellfrei hergestellten Proteine die stabile Nachweisbarkeit im Western Blot hervorzuheben. Während zellbasierte Systeme gelegentlich Probleme in der Reproduzierbarkeit der Western Blots aufwiesen (vgl. z.B. 4.2, 4.7.1 und 4.4.1), war das zellfreie System gut reproduzierbar. Auch potenzielle Einflüsse der Biomembran einer Zelle wie beispielsweise die Überlagerung der Affinitäts-*tags* werden hier umgangen. Damit einhergehend bietet das zellfreie System auch Vorteile in der Reinigung. So sind Affinitäts-*tags* direkt nutzbar und Einflüsse der Zelle werden umgangen. Ein weiter Vorteil im Hinblick auf die Strukturaufklärung ist die direkte Zugänglichkeit des Proteins, die kein solubilisieren aus der nativen Umgebung des Membranproteins erfordert. Dieser Schritt wird in der Literatur als besonders kritisch angesehen (Martin and Sawyer, 2019). Es stellt sich die Frage nach der Funktionalität eines zellfrei hergestellten Transportproteins wie PfFNT, für welches nach der Rekonstitution in Proteoliposomen im Western Blot ausschließlich Monomere gefunden wurden. Es wurde kein pH-abhängiger (Wu *et al.*, 2015) FNT-typischer Transport in Proteoliposomen gemessen. Für PfFNTG107S wurde im zellbasierten <sup>14</sup>C-Transportassay im Hefesystem eine initiale Aufnahmerate von 0,06 nmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> für L-Laktat gezeigt (Dissertation Philipp Walloch, Kiel, 2021). Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die nicht messbare Funktionalität nicht an der Mutante PfFNTG107S selbst liegt.

Nach der zellfreien Herstellung von PfFNTG107S wurden Monomere, Dimere und Trimere nachgewiesen (**Abbildung 4.4**). Nach mehreren Aufreinigungs- oder Rekonstitutionsschritten

in NDs oder Proteoliposomen waren die Oligomere jedoch nicht mehr nachweisbar. Zunächst wurde eine eventuell verminderte Stabilität der Resistenzmutante PfFNTG107S als Grund für die fehlende Funktionalität in Proteoliposomen in Betracht gezogen. In diesem Zusammenhang hätte aber für PfFNT-Wildtyp mit der gleichen Methode eine Funktionalität nachgewiesen werden müssen. Insofern stellt sich die Frage, ob das zellfrei hergestellte Protein zum einen während des gesamten Prozesses der Aufreinigung und Rekonstitution stabil war und nicht eine potenzielle Funktion des frisch hergestellten Proteins während des Reinigungs- oder Rekonstitutionsprozesses verloren gegangen ist. Zum anderen wurde als Nachweis der Rekonstitution in Proteoliposomen die DGZ herangezogen, bei der auffällig war, dass ausschließlich Monomere im Western Blot detektiert wurden (4.1.3.3). So kann es als unwahrscheinlich angesehen werden, dass das rekonstituierte Protein als Pentamer in die Proteoliposomen integriert war. Da erste analytische Untersuchungen vor der Rekonstitution in NDs oder Proteoliposomen auf das Vorliegen von Oligomeren hindeuteten, diese aber nach der SEC oder DGZ nicht mehr nachzuweisen waren (vgl. **Abbildung 4.4** und **Abbildung 4.7**), könnte sich im weiteren Verlauf auf die Stabilität des oligomeren Zustands während der Rekonstitution in das jeweilige Untersuchungssystem konzentriert werden. Kotov *et al.* (2019) haben festgestellt, dass einige Detergenzien, die zur Solubilisierung von Membranproteinen eingesetzt werden, zur Destabilisierung und Entfaltung führen können. Dazu gehören unter anderem auch Detergenzien mit PEG-Struktur, zu denen auch das in dieser Arbeit verwendete Brij® 78 gezählt werden. Ist hier die Stabilität und Faltung zugunsten der höheren Proteinausbeute verloren gegangen und womöglich der Grund für fehlende Funktionsnachweise des zellfrei hergestellten Proteins?

Andere Quellen (Zemella *et al.*, 2015) weisen darauf hin, dass *E. coli*-basierte ribosomale Extrakte für die Synthese größerer Membranproteine weniger geeignet sind als andere Extrakte. Durch das Fehlen eukaryotischer Chaperone kann die korrekte Faltung und posttranslationale Modifikation eukaryotischer Proteine beeinflusst sein. Nichtsdestotrotz handelt es sich um eine einfache kostengünstige Methode, die hohe Proteinausbeuten liefert (Gregorio *et al.*, 2019). Zu beachten ist jedoch, dass zellfreie Proteinsynthesen auf Basis dieser Zelllysate geringere Protein-Ausbeuten liefern. Insgesamt wird die zellfreie Proteinsynthese in der Literatur als gute Alternative zur zellbasierten Herstellung beschrieben und auch offensichtliche Nachteile für die Herstellung von Membranprotein werden durch den Zusatz von Detergenzien oder anderen Membran-imitierenden Zusätzen wie Liposomen oder NDs adressiert. Eine mögliche Alternative zu dem *E. coli*-basierten ribosomalen Extrakt bieten eukaryotische Weizenkeim-, Säugetierzell-, Insektenzell- oder Helazelllysate. Zukünftig könnten zellfrei hergestellte Proteine untersucht werden, die auf Basis von eukaryotischen ribosomalen Extrakten synthetisiert werden. Für die zellfreie Proteinsynthese, die auf Extrakten aus Insektenzellen oder Säugetierzellen basiert, wird eine Proteinfaltung und posttranslationale Modifikation als Vorteil gesehen (Batista *et al.*, 2021). Diese Extrakte sollen sich für die zellfreie Herstellung von Membranproteinen eignen (Zemella *et al.*, 2015). Aufgrund der fehlenden Funktionalität von PfFNTG107S und PfFNT-Wildtyp nach der Herstellung im zellfreien System, wurde sich für die Untersuchung der uncharakterisierten NfFNT auf zellbasierte Systeme konzentriert.

## 5.2 Weist die Gattung *Naegleria* FNT auf?

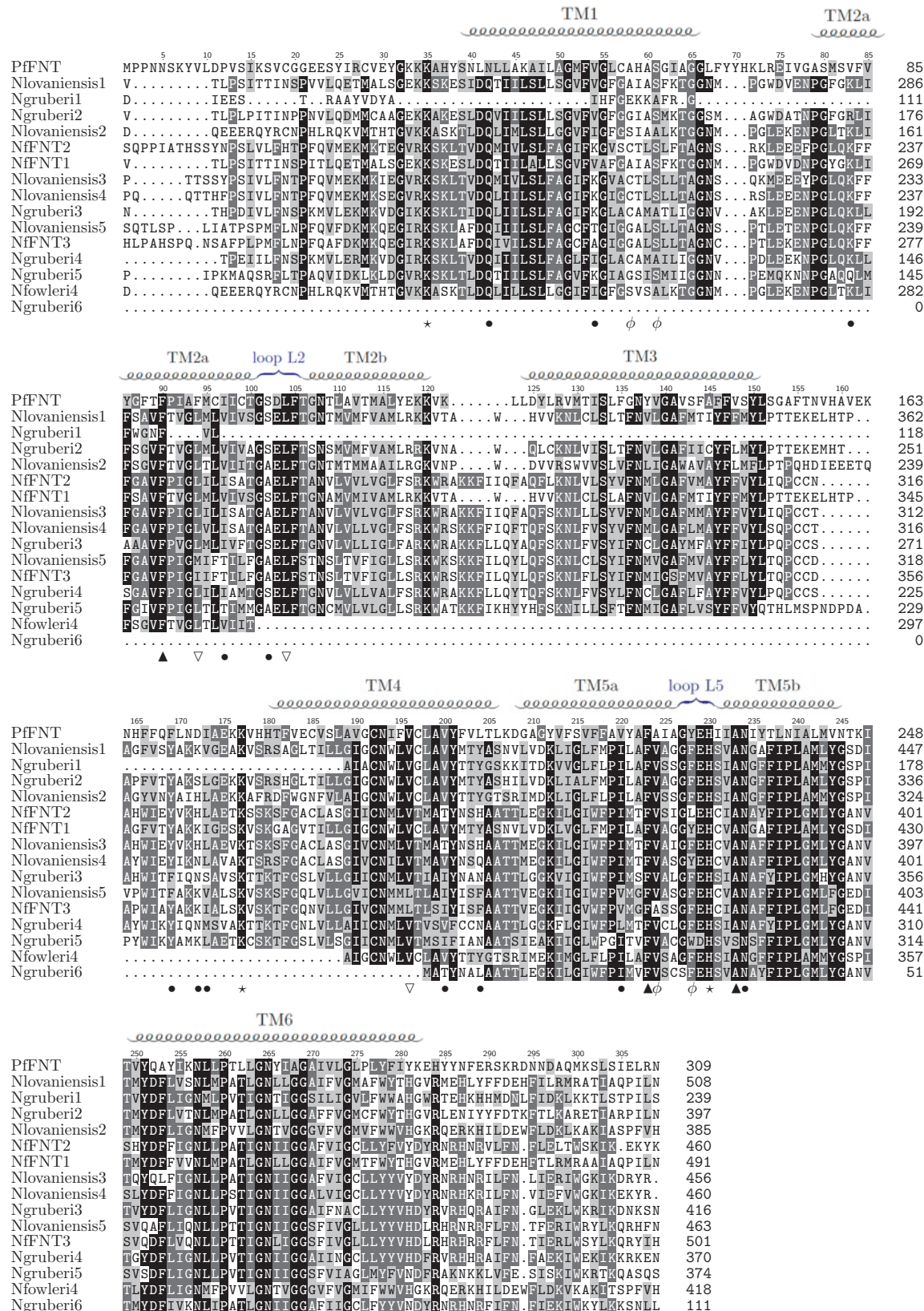
Im Rahmen dieser Arbeit mit der Fragestellung nach möglichen FNT von *N. fowleri* und ob diese durch PfFNT-Inhibitoren gehemmt werden, wurde zunächst der Fragestellung nachgegangen, ob *Naegleria* FNT aufweist und welche Rolle diese im Metabolismus einnehmen könnten. Eine Datenbanksuche mit den wie in 3.8 beschriebenen Parametern

fürte zu partial mRNA-Daten von FNT für die nicht pathogenen verwandten Spezies *N. gruberi* (Fritz-Laylin *et al.*, 2010) und *N. lovaniensis* (Liechti *et al.*, 2018). Auch für diese Spezies wurden mehrere potenzielle Transporter identifiziert (**Abbildung 5.1**). Nicht alle der vorgeschlagenen Treffer sind strukturell als potenzielle FNT einzustufen. So weisen *N. gruberi* 1 (NCBI Accession number: XM\_044685668.1) und 6 (NCBI Accession number: XM\_002668317.1) nicht die FNT-typischen sechs Transmembranspannen mit den Schlüssel-Aminosäuren der Transportpore auf und scheinen insgesamt zu klein zu sein. Das potenzielle Vorliegen der FNT in anderen *Naegleria*-Spezies kann als Stütze der Hypothese, dass *N. fowleri* FNT aufweist, angesehen werden. Ungeklärt ist bislang die physiologische Rolle der FNT in *Naegleria*. Grundsätzlich ist sehr wenig über die Spezies *N. fowleri* bekannt und nur wenige Laboratorien weltweit arbeiten mit der pathogenen Spezies. Die experimentellen Metabolismusstudien wurden an *N. gruberi* durchgeführt (Bexkens *et al.*, 2018). Es wird aufgrund der Genom-Daten davon ausgegangen, dass sich die ermittelten Stoffwechselwege auf *N. fowleri* übertragen lassen. Experimentell bestätigt ist bislang die Kultivierung der Trophozoiten in Glukose-haltigem *Nelson's Medium* sowie der Nachweis von Trophozoiten in Cerebrospinalflüssigkeit (Anser *et al.*, 2018). Die meisten Studien konzentrieren sich auf Unterschiede im Genom oder Proteom zwischen den nicht pathogenen Spezies und *N. fowleri*. Ein weiterer Ansatz liegt in der Ermittlung von Unterschieden klinisch virulenter *N. fowleri*-Stämme zu aus der freien Wildbahn isolierten *N. fowleri*-Stämmen, die bis dahin nicht mit tierischem Gewebe in Kontakt gekommen sind.

In der Literatur werden häufig an der Pathogenität beteiligte Proteine oder Enzyme diskutiert und gesucht, um diese als *Drug Target* adressieren zu können (Zysset-Burri *et al.*, 2014). Der Ansatz der FNT als Wirkstoffziel, die auch in den nicht pathogenen Arten vorkommen, steht im Gegensatz hierzu. FNT unterschiedlicher *Plasmodium*-Spezies sind *Target* der PfFNT-Inhibitoren (Davies *et al.*, 2023). Die Identifikation von FNT auf Grundlage von *tblastn*-basierten Recherchen in der NCBI-Datenbank führte in der Vergangenheit zur Identifikation von EhFNT und TgFNT1-3 (Erler *et al.*, 2018; Helmstetter *et al.*, 2019). Als weiteren Hinweis auf die potenzielle Rolle von FNT in *Naegleria* können Metabolismusstudien an *N. gruberi* angesehen werden, welche die Annahme auf Acetat als mögliches Substrat eines FNTs zulassen (Bexkens *et al.*, 2018), vgl. 1.2.2. Frühere Genomdaten liefern Hinweise auf metabolische Endprodukte anaerober Stoffwechselwege (Fritz-Laylin *et al.*, 2010), welche Substrate der FNT sein könnten. Auch eine Rolle in der Azidifizierung, wie sie für FNT in *T. gondii* vorgeschlagen wird (Roiko *et al.*, 2014), könnte für *Naegleria* in Betracht kommen. Für *T. gondii* wurde gezeigt, dass die Aktivität eines *perforin like proteins 1* (PLP1) für den Austritt des Parasiten aus der parasitären Vakuole (PV) nötig ist. Dieses PLP1 zeigt im leicht sauren pH-Bereich von 5,4 bis 6,8 eine erhöhte Aktivität. Insbesondere TgFNT1 und TgFNT2 scheinen an der Ansäuerung mittels des Transportes von Laktat und Pyruvat einhergehend mit jeweils einem Proton beteiligt zu sein. Roiko *et al.* (2014) haben gezeigt, dass auch bisher unbekannte alternative Transporter die Rolle der FNT in der Ansäuerung der PV übernehmen können. Nichtsdestotrotz ist die erhöhte Aktivität zytolytischer Proteine im sauren pH auch für andere Pathogene wie *Leishmania amazonensis* und *Trypanosoma cruzi* bekannt (Andrews *et al.*, 1990). Für *Plasmodium yoelii*-Sporozoit ist ebenfalls die Ansäuerung einer PV und das Ausschleusen der Parasiten durch PyPLP1 gezeigt worden (Risco-Castillo *et al.*, 2015). Es könnte also angenommen werden, dass auch *Naegleria* in Abhängigkeit vom morphologischen Stadium und der Notwendigkeit nach zytolytisch aktiven Proteinen, die dem Abbau von Wirtszellen, Bakterien oder Algen im Rahmen der Nahrungsaufnahme dienen, ebenfalls unter anderem FNT aufweist, die die für die Ansäuerung notwendigen Protonen mitliefern.

## Diskussion

Transkriptom-Analysen auf Basis von mRNA-Daten zeigen hohe Expressionslevel der mRNA entsprechender NfFNT codierender Sequenzen, die darauf hindeuten, dass *N. fowleri* FNT exprimiert (Herman *et al.*, 2021). Ein Alignment der mRNA im Rahmen der Masterarbeit von Robin Hertel mit der genomischen Sequenz zeigt eine fast vollständige Abdeckung der genomischen Sequenz durch die mRNA für alle drei NfFNT. Auffällig ist, dass alle drei *Naegleria*-Spezies mehrere FNT aufweisen. Dies könnte im Zusammenhang mit ihrer Anpassungsfähigkeit an unterschiedliche Habitate stehen. So können *Naegleria*-Formen in Süßwasser oder Erde vorkommen, aber auch menschliches Gewebe kann als Lebensgrundlage dienen.



**Abbildung 5.1:** ClustalW Alignment Aminosäuresequenz im Bereich der Transmembranspannen potenzieller FNT aus *Naegleria* (N) im Vergleich zu PfFNT. Auskleidende Aminosäuren in der Transportpore (Punkte), Selektivitätsfilter (Phi  $\Phi$ ), cytosolische (offenes Dreieck) und periplasmatische/extrazelluläre Konstriktion (geschlossenes Dreieck), konservierte Aminosäuren (Stern). Färbemodus: *similarity*. Je ähnlicher die Aminosäuren, desto dunkler die Färbung.

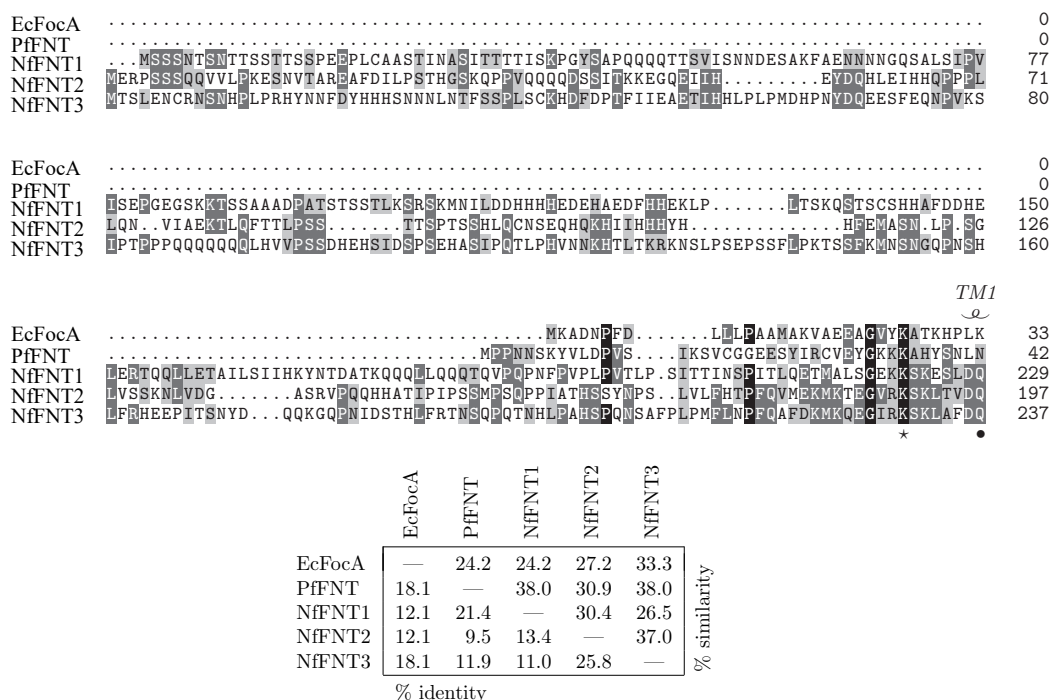
### 5.2.1 Interpretation der genomischen Daten

Während Genom-Sequenzierungen immer häufiger gelingen, ist die Annotation der Genomdaten weiterhin schwierig und fehleranfällig (Salzberg, 2019). Gerade die Annotation eukaryotischer Genome ist komplex, da die Gene zum einen weit gestreut liegen und zum anderen durch Introns unterbrochen sind. Während für Bakterien beispielsweise 90 % des Genoms protein-codierende Sequenzen sind, besteht das humane Genom beispielsweise nur zu 1,3 % aus protein-codierenden Exons (Pertea *et al.*, 2018). So ergab eine vergleichende Suche in den *RefSeq* und *Gencode human gene* Datenbanken, dass nur 27,5 % der *Gencode*-Transkripte die gleichen Introns aufwiesen wie die korrespondierenden *RefSeq* Gene (Pertea *et al.*, 2018; Salzberg, 2019). Eine Alternative zur Genomsequenzierung auf DNA-Basis kann die Sequenzierung von RNA sein. So könnte die Sequenzierung von *messenger* RNA eines Gens die Intron-Exon-Strukturen besser aufklären.

Bei den in der vorliegenden Arbeit identifizierten FNT von *N. fowleri* handelt es sich um mittels *Nanopore sequencing* (Oxford Nanopore Technology, ONT) gewonnene Daten (Liechti *et al.*, 2019), die über die *cDNA Ref Seq data bank* abgerufen wurden. Sequenzierung der dritten Generation (*third generation sequencing*, TGS) bietet im Vergleich zur Sequenzierung der zweiten Generation (*next generation sequencing*, NGS) den Vorteil, dass deutlich größere Leselängen mit bis zu zwei Millionen Basen erreicht werden (Kraft & Kurth, 2019). TGS bietet außerdem die Möglichkeit, mRNA in voller Länge zu sequenzieren und damit Exons zu identifizieren. Die Sequenzierung von mRNA liefert einen weiteren Hinweis auf tatsächlich hergestellte Proteine. Die *Nanopore* Sequenzierung basiert darauf, dass DNA oder RNA nach der Translokation von einer Helikase durch eine Proteinpore geführt wird. Diese Pore befindet sich in einer nicht leitenden Polymermembran. Wird eine Spannung angelegt, entsteht ein Ionenfluss. Dieser wird charakteristisch durch die Basen und deren Modifikationen gestört, sodass das Signal verändert wird und in eine Basenabfolge übersetzt werden kann. Mit dem für die Genomsequenzierung von *N. fowleri* verwendeten GridION Sequenzierer sind pro *flow cell* 512 Poren angeordnet, die jeweils mehrere zehntausend Moleküle nacheinander sequenzieren können. Die Genomsequenzierung führte zu ca. 9 Mb *reads* mit einer durchschnittlichen Länge von 6.658,6 bp und einem N50-Wert von 11.677 bp. Die Kerngenomdaten wurden mittels *Canu v1.7* assembliert (Koren *et al.*, 2017). Die erste Assemblierung wurde unter Verwendung der ONT-Rohdaten unter Verwendung von *Nanopolish v0.11.1* (Loman *et al.*, 2015) und *Pilon v1.22* (Walker *et al.*, 2014) poliert, um die Konsensgenauigkeit zu verbessern. Das finale Genom-Assemble beinhaltet 81 *contigs* mit einer Gesamtlänge von 29.549.925 bp. Der N50-Wert betrug 717.491 bp und somit liegen 50 % der generierten *contigs* bei mind. 717.491 bp, was eine Verbesserung der initialen Datensätze darstellt. Der ermittelte GC-Gehalt von 36,9 % ist ähnlich zu einer vorab publizierten Genomanalyse von *N. fowleri* eines anderen Stammes (ATCC 30863). Andere *Naegleria*-Spezies wie *N. lovasiensis* weisen einen ähnlichen oder leicht niedrigeren (*N. gruberi*) GC-Gehalt auf (Liechti *et al.*, 2019). Die Qualität der Assemblierung wurde mittels *Benchmarking Universal Single Copy Orthologs* (BUSCOs) (Simão *et al.*, 2015) überprüft. Nach jedem erneuten Assemblierungsschritt konnte die Anzahl der BUSCOs gesteigert und ca. 86,5 % der konservierten eukaryotischen BUSCOs (*Eukaryota* odb9) gefunden werden (Manni *et al.*, 2021). 2,3% der BUSCOs lagen fragmentiert vor. Die Genom-Daten-Assemblierung beinhaltete viele Schritte zur Verbesserung der Länge und Interpretation der *reads*. BUSCOs enthalten nur Gene, die sich über einen langen Zeitraum als orthologe Einzelkopien entwickelt haben. Das Fehlen oder Fragmentieren solcher Gene wird als sehr selten angesehen. Aus diesem Grund gilt das Vorhandensein oder Fehlen von BUSCOs als gutes Merkmal für die Genauigkeit und Vollständigkeit der Assemblierung (Liechti *et al.*, 2019).

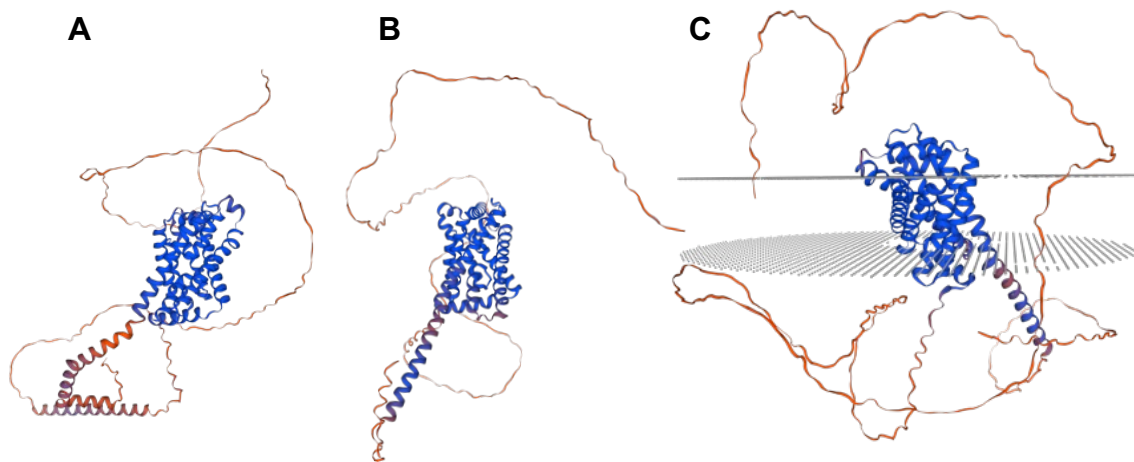
Insgesamt kann also aufgrund der vergleichbaren Anzahl der BUSCOs der *Naegleria* Spezies und der Reproduzierbarkeit der Genomdaten verschiedener *N. fowleri* Isolate von aussagekräftigen Genomdaten ausgegangen werden. Die aus der Sequenzierung erhaltenen Daten wurden im Anschluss mit verschiedenen Methoden annotiert, um eine Vorhersage für das Vorhandensein von codierenden Sequenzen treffen zu können. Auch hier konnte von Liechti *et al.*, (2019) eine mit anderen *Naegleria*-Spezies vergleichbare Anzahl an Proteinen vorhergesagt werden, die unter anderem auch zu den FNT der anderen Spezies führten (vgl. **Abbildung 5.4**). Es wurden mittels Genomsequenzierung FNT für den Stamm ATCC 30894 gefunden (Liechti *et al.*, 2019). Von der gleichen Arbeitsgruppe wurde 2014 eine Genomsequenzierung vom Stamm ATCC 30863 durchgeführt (Zysset-Burri *et al.*, 2014). Genmodelle wurden mit BRAKER1 (Hoff *et al.*, 2016) durchgeführt und greifen gleichzeitig auf bisher unveröffentlichte Daten der RNA-Sequenzierung zurück. Bei den drei identifizierten NfFNT handelt es sich um vorhergesagte Proteine auf Basis von genomischer DNA und partial mRNA-Daten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Gene transkribiert werden.

Es wurde für FNT aus *T. gondii* bereits gezeigt, dass die vorhergesagten Gengrenzen nicht zwangsläufig dem translatierten funktionellen Protein in einem heterologen Expressionssystem entsprechen (Erler *et al.*, 2018). Besonders auffällig ist auch die FNT-untypische Länge der N-Termini (**Abbildung 4.19**). Insofern ist es für die in dieser Arbeit untersuchten NfFNT1-3 nicht ausgeschlossen, dass die experimentell ermittelten Einflüsse der Termini auf die Herstellung und Funktionalität wie in 4.5 und 4.5.2 untersucht noch nicht vollständig sind und Verkürzungen an anderer Stelle einen positiven Einfluss auf die Funktionalität haben könnten. Ebenfalls bisher unberücksichtigt ist der Einfluss der Termini im Parasiten. So kann ein *trafficking-Motiv*, das für die Lokalisation und Funktion im Parasiten wichtig ist, nicht ausgeschlossen werden. Für *N. gruberi* und *N. fowleri* wurden im Zusammenhang mit der strukturellen Diversität des Golgi-Apparates (Dacks *et al.*, 2003) von Eukaryoten mehrere Membran-*trafficking* assoziierte Gene identifiziert, deren Expression in Maus-pathogenen *N. fowleri* Trophozoiten nachgewiesen werden konnte (Herman *et al.*, 2018). Für PfCRT konnte gezeigt werden, dass ein vorhandenes *trafficking-Motiv* in den Termini entfernt werden musste, um eine Lokalisation in der Zellemembran im heterolog herstellenden Organismus *X. laevis* zu gewährleisten (Martin *et al.*, 2009). Während dieser Arbeit ergab eine Suche nach der Aminosäuresequenz der N-Termini entsprechenden Strukturen, die eine Funktion auf ein Membranprotein haben können, keine Treffer. Möglich erscheint aber die durch die Genom-Annotation bedingte unwahrscheinliche Festlegung der Gengrenzen. Die N-Termini der verschiedenen NfFNT1-3 zeigen untereinander eine hohe Variabilität mit einer Spanne in der Ähnlichkeit der resultierenden Aminosäuren von 11 bis 38 % (**Abbildung 5.2**). Im Vergleich dazu ist die Ähnlichkeit der gesamten Sequenzen deutlich höher (**Abbildung 4.19**). Auffällig ist, dass NfFNT1 im Vergleich der ganzen Sequenz und im Vergleich der N-Termini zu NfFNT2 und 3 eine geringere Ähnlichkeit besitzt. Nehmen die NfFNT unterschiedliche Rollen im Metabolismus der Parasiten ein? Oder ist ihre Herstellung und Funktion innerhalb des Organismus abhängig vom morphologischem Stadium des Parasiten? Mit Beginn der ersten TM ist die Ähnlichkeit der NfFNT untereinander sowie auch gegenüber bekannter FNT wie EcFocA und PfFNT höher.



**Abbildung 5.2:** ClustalW Alignment von EcFocA, PfFNT und NfFNT1-3. Oben: Gezeigt ist der Ausschnitt der N-Termini vor Beginn der ersten Transmembranspanne. Stern: konserviertes Lysin, Punkt: porenauskleidende Aminosäure. Unten: Ähnlichkeitstabelle der gezeigten N-Termini. Zur Darstellung wurde Texshade verwendet. Färbemodus: *similarity*.

Die Veranschaulichung der Modelle von NfFNT1-3 weist ebenfalls eine hohe Variabilität im N-Terminus und die unstrukturierte Lage außerhalb der Membran auf (**Abbildung 5.3**). Vor dem Hintergrund, dass die Termini der Modelle nicht durch das *template* (PfFNT, PDB 7mxy) abgedeckt sind, ist dies nicht ungewöhnlich. Auffällig ist bei allen drei Varianten, dass die Termini abweichend zu bekannten FNT nicht auf einer Seite der Membran liegen. Alle drei Modelle sagen eine vor dem Eingang der Transportpore liegende alpha-Helix voraus.



**Abbildung 5.3:** Modell NfFNT basierend auf AlphaFold. Modelle mit Swiss Model erstellt. (A) NfFNT1. (B) NfFNT2. (C) NfFNT3 mit eingezogener Membranebene. Blau: Bereiche mit einem Konfidenzwert  $> 0,7$ . Orange: Bereiche mit geringer Übereinstimmung zum *template*, Konfidenzwert  $< 0,7$ .

## Diskussion

PfFNT	.....	0
Nlovaniensis1	MSVQNNNSAGSHSSSMSPHEE....STVVIQATTSSML.PNTSCS...STTEMSHNEDSTKFAENKNIN.NLSQQPVIS..G	72
Ngruberi1	.....	0
Ngruberi2	..MPNGN.....PND.....CTCP.....TNINNN.....IVG...	21
Nlovaniensis2	.....	0
NfFNT2	.....MERPSS.....S	7
NfFNT1	..MSSSNTSNTSSTSSPEEPLCAASTINASITTTISK.PGYSAQQQQTTSVISNNDESAKFAENNNNGQSALSIPVISEPG	82
Nlovaniensis3	.....MMRPPQQPQQDHSTNGSVLD..TIVQ	25
Nlovaniensis4	.....MHPHDKHSSSQNPLLANKDSRDVELQ..ETVA	30
Ngruberi3	.....	0
Nlovaniensis5	.....MSDDFDPTTVIIIEAETIHHLPRTS..DLPS	29
NfFNT3	.....MTSLENCRNSNHPLPRHYNNFDYHHHSNNNLNTFSSPLSCKHDFDP.TFIIIEAETIHHLPMDHPNVDQ	69
Ngruberi4	.....	0
Ngruberi5	.....	0
Nfowleri4	..MFHSSQKKTTLKLQDEFEDLEMAGSRPEYIATNNNGVSMGNTTP....LSSASVNSFSQMLVNVQTSEEDFEQTQTSSSN	78
Ngruberi6	.....	0

PfFNT	.....	0
Nlovaniensis1	EGSKTSSSTNTAVVNIPTTTIPQSTNTSSSPTSTPTNNNTTSSSLKSRKMMIAEDNHH.DENHDEPHDFHHEKLP..ASK	156
Ngruberi1	.....MPGLEKENP.GLTKLFFSGIFSVGLT..VLL	29
Ngruberi2	.....STIIDEELIRRIEEAHQ..NDPKIIQQCSTNEKTDIKPM	58
Nlovaniensis2	.....MNGQASNTQPNIEALTQRLQFYEKAIL..ALM	30
NfFNT2	QQVVLPKESNVTA.....REAFDILPSTHSGKQPPVQQQDSSITKKEGQEII..HEYDQH..EIH	65
NfFNT1	EGSKTSS.....AAADPATSTESTLKSRSKMMILDDHHH.HED.EHAEDFHHEKLP..TSK	136
Nlovaniensis3	QQSQASQLDEEIP.....TTDTKMITKMNSVILDNAPSSDQSMQLQGDAKNEVV...LEYDQHVEIH	83
Nlovaniensis4	QPVEEQQFMNSTA.....TNANVSVINASNDNTQNSDRNVEATTRKEDDEII...LEDDQH..DIH	88
Ngruberi3	..MPPPTQENTMML.....LFNNNTSTTTNNNSMNDIMQVQQQNSFGSSS.....FTNMQPIESQ	52
Nlovaniensis5	PVEIKPPPLMVPP.....HHPQVQVPSHHHHIHHNNISSCSEHSNAADCTASQ.LTFSQDTH..LSK	89
NfFNT3	EESFEQNPVKSSIP.....TPPPQQQQQQLHVVPSSDHEHSIDPSEHASIPQTLPHVNNKHTLT	130
Ngruberi4	.....MTSTICEETNTQNVQQLSTSSS.....INNTP..SD	32
Ngruberi5	.....MSINSSYSAAANPVVVDIVQEHVVDTHGKT.....	30
Nfowleri4	QRRATTNPSSNTN.....HPASSMKGGGDPKYNGGTSVEIEMEPSSSTMNGSTPN..SQ.TIENLNQRLQFYEKAIL..ALM	151
Ngruberi6	.....	0

PfFNT	.....	0
Nlovaniensis1	QSTN.....SHHAFDEHE..ERTQQ.....LLETALFSIIHKYNTDVTNQQQ.....QQQTQVPQLN	207
Ngruberi1	TGSELY...TGNTMTLMAAL..LRGK.....IN..PYDLVRNWT..TSLIFNLLG.....ALAVAYFFMY	80
Ngruberi2	QQT.....HAFEQKE..DRTQQ.....LLETALISIIQKY..QAPKQE...QPI	97
Nlovaniensis2	SNSK.....KGRMRRIEDE..LGKES.....LEDHTEAAILSSS..DQKKQEKK.....QKAEMEKKKI	82
NfFNT2	HQPPPLLQNVIAEKTLLQFTT..PSSTTSPTSSHLQCNSEQHQKHIIHHHYHHFEMASNLPSGLVSSKNLVDGASRVPPQHHATIP	149
NfFNT1	QSTSC.....SHHAFDDHE..ERTQQ.....LLETALISIIHKYNTDATKQQQLL.....QQQTQVPQPN	190
Nlovaniensis3	YKPPAILHNVTDKSLQFNTPVLPPTTQ.....SEQPQPIIHHHYHHFNHNS..QPEICEKKN...SQSNEKPTTTTS	151
Nlovaniensis4	YKPPSILHHVIADKSIQFST..PSSTTQ.....SEHQHFIIHHHYHHFTNSE..SSSRDEKKN...PLLEKQPSST	154
Ngruberi3	EKP.....IVRQQQQQIS..APESTKD.....V..DTVVVDIVVEVREKEKNVKASKESSTT...TTNANQNSGQQPV	113
Nlovaniensis5	QKHSLP...ECEQFTRSSIPFNSSTRSS.....R.IDPTIHARSSVRHEVPALNYCQQKQ...RSTTNVRGSSSLNN	154
NfFNT3	RKNSLPS...EPSSFLPKTSSFKMNSNG.....QPNSHL...FRHEEPITSNYDQQKG...QPNIDSTHLFRTN	190
Ngruberi4	T.....VETNQG.....ANIGETKKMGETNHANKRKSQ.....NQHKREETP	69
Ngruberi5	.....IIQQY.....HYHYNTDPATDVNTQPKSQP.....DAIPSVVQP	65
Nfowleri4	SNSK.....KGSRLRIEDE..LGKDT.....EENPIEAILSA..EQKKQEKK.....QKAEMEKKKI	203
Ngruberi6	.....	0

PfFNT	.....MPPNNSKYVLDPVSTKSVCGGEESYIR..VEYCKKKAHYSNLLAK	46
Nlovaniensis1	VVPLPV.....TLPSITTINSFVVLQET..ALSCEKKSKEISIDQTTIL	250
Ngruberi1	LTPAHD.....IEES.....T..RAAYVDYA.....	100
Ngruberi2	LTPPLPV.....TLPLPITNPVNLQDMCAACEKKKARESLDQVTIL	140
Nlovaniensis2	LEEQAHD.....QEEERQYRCNPHLRQKV..THTGVKKASKTLDDQLLIL	125
NfFNT2	IPSSMPSQPPIATHSSYNPSVLHTPFQVMEK..KTEGVRKSKLTVDDMIVL	201
NfFNT1	FVPLPV.....TLPSITTINSPIITLQET..ALSCEKKSKEISLDDQTTIL	233
Nlovaniensis3	ITTTTHP.....TTSSYPSTVLENTPFQVMEK..KIEGVRKSKLTVDDMIVL	197
Nlovaniensis4	ITTTTPQ.....QTTHFPSTVLENTPFQVMEK..KSEGVRKSKLTVDDQLLIL	201
Ngruberi3	IQQQIIN.....THEDIVLENSPKMVLEK..KVDGICKSKLTIIDQLLIL	156
Nlovaniensis5	STQTNSQTLSP...LIATPSPMLNPFQVFDK..KQEGIRKSKLAFDQIIL	203
NfFNT3	SQPQTNHLPASHPQ..NSAFPLPMFLNPFQAFDK..KQEGIRKSKLAFDQIIVIL	241
Ngruberi4	IYKVK.....TDEILNSPKMVLER..KVDGIRKSKLTVDDQIIL	110
Ngruberi5	TTKTKQP.....IPKMAQSRGLTPAQVIDK..KLDGVRKSKLTLDDQIIL	109
Nfowleri4	LEQQKQD.....QEEERQYRCNPHLRQKV..THTGVKKASKTLDDQLLIL	246
Ngruberi6	.....	0

**Abbildung 5.4:** Aminosäuresequenz ClustalW Alignment Bereich der N-Termini potenzieller FNT aus *Naegleria* (*N*) im Vergleich zu PfFNT. Orange hervorgehoben: Methionin vor Beginn der ersten TM.

Die große Variabilität des N-Terminus kann ein Hinweis darauf sein, dass die Festlegung der Gengrenzen in der Methodik der Datenaufarbeitung nach Liechti *et al.*, (2019) liegt (vgl. 5.2.1). So sind eventuell nah beieinander liegende Gene in einem Operon einem FNT zugeordnet worden, die nicht für einen Abschnitt des FNT selbst codieren, wohl aber für ein in Beziehung dazu stehendes Enzym wie es für einige prokaryotische FNT beschrieben ist (vgl. 1.4.1). Möglich wäre auch, dass der lange N-Terminus im Parasiten selbst eine für die Funktion oder

Lokalisation wichtige Funktion einnimmt. Auch die anderen potenziellen FNT der nicht pathogenen Spezies *N. gruberi* und *N. lovaniensis* weisen lange variable N-Termini auf.

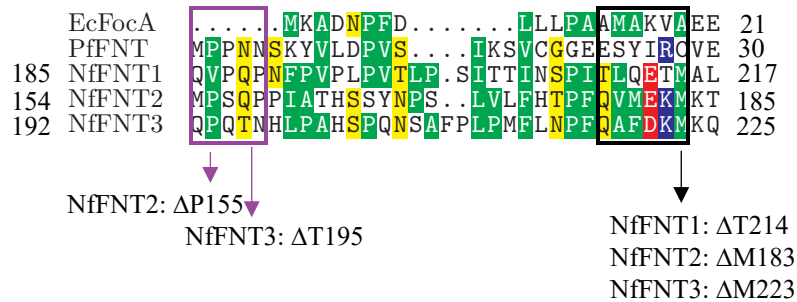
### 5.3 Einfluss des Expressionssystems auf Herstellung und Funktionalität der Membranproteine

Es wurde bereits gezeigt, dass das PfFNT-Pentamer SDS-stabil ist und in der SDS-PAGE nach der Coomassie-Färbung oder Western Blot-Analytik detektiert werden kann. Es wurde beobachtet, dass die Isolation der mikrosomalen Fraktion unterschiedliche Ergebnisse liefert. Es wurde für PfFNT beispielsweise in der Western Blot-Analytik nur die monomere Form nachgewiesen, wenngleich die vorliegenden Funktionsdaten zeigen, dass ein funktionaler Transporter in der Zellmembran lokalisiert sein muss (**Abbildung 4.9**). Im Hefesystem wurde die Herstellung und Lokalisation in der mikrosomalen Fraktion der NfFNT in *S. cerevisiae* W303 1A  $\Delta jen1 \Delta dy2$  gefunden (**Abbildung 4.29** und **Abbildung 4.43**). Es wurde kein Transport für NfFNT1-GFP,  $\Delta NfFNT1$  und  $\Delta NfFNT1\Delta$  gefunden. Auch für NfFNT2 und verkürzte Varianten sowie für NfFNT3 und Verkürzungen wurde kein signifikant, sich vom Hintergrund abgrenzender, Transport gemessen. Erste vielversprechende Messungen (**Abbildung 4.27**, **Abbildung 4.37**, **Abbildung 4.38**), die auf einen Transport hindeuteten, ließen sich nicht reproduzieren. Hätte sich ein eindeutig von dem Hintergrund abgrenzender Transport nachweisen lassen, wäre der nächste Schritt eine gezielte Inhibition des Transportes mit den im Parasiten-Assay identifizierten Inhibitoren (**Abbildung 4.16**) gewesen. Es wurde ein Einfluss der Verkürzung der Termini auf die Herstellung gefunden. So wurden für NfFNT2 und 3 in voller Länge keine Oligomere im Western Blot detektiert (**Abbildung 4.26** und **Abbildung 4.28**). Für NfFNT3 wurde der Bereich zwischen Position 195 und 223 als kritischer Bereich (**Abbildung 5.5**) für die Herstellung in der Hefe eingegrenzt. Es wurden für  $\Delta 1-195NfFNT3$  Oligomere nachgewiesen (**Abbildung 4.37**), während für  $\Delta 1-223NfFNT3$  kein Nachweis mittels C-terminal befindlicher tags möglich war (**Abbildung 4.39**). Ein möglicher Grund hierfür könnte im fehlenden *trafficking* von  $\Delta 1-223NfFNT3$  in Richtung der Membran der Hefezelle liegen oder dass der C-Terminus durch die Überlagerung von Zellmembranbestandteilen nicht zugänglich ist. Möglich wäre auch die Anlagerung des C-Terminus an die Zellmembran. Eine genaue Quantifizierung der Anzahl der Transporter ist mittels Western Blot-Analytik nicht möglich, liefert aber einen ersten Hinweis. Ein anderer Grund für die fehlende Detektierbarkeit mittels des am C-Terminus befindlichen tags kann in der fehlenden Zugänglichkeit von diesem liegen. Im Gegensatz zur Produktion von  $\Delta 1-233NfFNT3$  in Hefezellen wurden für in HEK293-Zellen hergestelltes  $\Delta 1-223NfFNT3$  im Western Blot Dimere und Pentamere (**Abbildung 4.46**) detektiert. Es wäre sinnvoll, die anderen in der Hefe untersuchten Konstrukte wie  $\Delta 1-195NfFNT3$  und  $\Delta NfFNT3\Delta$  vergleichend im HEK293-Zellsystem zu untersuchen. Die Untersuchung der von *D. discoideum* hergestellten N-terminal verkürzten Konstrukte  $\Delta 1-195NfFNT3$  und  $\Delta 1-223NfFNT3$  lieferte ähnliche Daten wie das Hefesystem. Für  $\Delta 1-195NfFNT3$  wurden Pentamere im Western Blot nachgewiesen, während  $\Delta 1-223NfFNT3$  in *D. discoideum* nicht nachzuweisen war (**Abbildung 4.56 A**). Es wurde kein Transport nachgewiesen (**Abbildung 4.56 B**). Ein Einfluss auf die Funktionalität wurde nicht einhergehend mit der veränderten Herstellung beobachtet. Weitere Untersuchungen müssten klären, ob mit einer Verkürzung bis Position 195 von NfFNT3 eine Annäherung zum tatsächlichen funktionalen FNT von *N. fowleri* stattfindet und ob diese Beobachtung auf die heterologe Herstellung und die Eigenschaften des jeweiligen Expressionsorganismus zurückzuführen ist. Reine Herstellungsstudien, die die Stabilität des Proteins oder mögliche Sollbruchstellen adressieren sollen, könnten auf die zellfreie Herstellung zurückgreifen, da hier der Einfluss der Zelle umgangen wird (Schwarz *et al.*, 2007).

Sollte mit der Verkürzung der Termini um den Bereich an Position 195 von NfFNT3 der tatsächliche Beginn der Translation eines Membranproteins gefunden sein, gilt im nächsten Schritt zu klären, ob der fehlende Funktionsnachweis durch das Protein an sich bedingt ist oder ob es an dem Einfluss der heterologen Herstellung durch die Hefe- oder *D. discoideum*-Zellen liegt. Möglich wäre auch, dass es sich bei dem angenommenen FNT um ein Protein mit anderer Funktion handelt, das keins der untersuchten Monocarboxylate leitet. Die Untersuchung der Lage des N-terminal verkürzten  $\Delta 1-223\text{NfFNT3-GFP}$  mittels Konfokalmikroskopie deutet darauf hin, dass sich das Fusionskonstrukt in der Membran der Hefezelle befindet. Es wurde jedoch im  $^{14}\text{C}$ -Transportassay ebenfalls keine Funktion gefunden (**Abbildung 4.43**). Grundsätzlich wurde die Funktionalität für FNT mit GFP-Fusion im  $^{14}\text{C}$ -Transportassay nach Herstellung in der Hefe für PfFNT-GFP nachgewiesen (**Abbildung 4.14**). Ob sich diese Beobachtung auf alle FNT übertragen lässt, kann nicht vorausgesagt werden. Auch wenn es als möglich angesehen werden kann, da das Pentamer keine Konformationsänderung durchlaufen muss, um ein Substrat passieren zu lassen, wie es z.B. bei MCT1 der Fall ist (Dissertation Anna-Lena Köpnick, 2021, Kiel). Hier hindert das fusionierte GFP den dimeren Transporter vermutlich daran von dem geschlossenen Zustand in den geöffneten überzugehen und blockiert so die Substratpassage. Die Verbesserung der Herstellung wurde für NfFNT2 bei Verkürzungen an ähnlicher Position (**Abbildung 5.5**) nicht beobachtet. So zeigte die Verkürzung von  $\Delta 1-155\text{NfFNT2}$  zu  $\Delta 1-183\text{NfFNT2}$  keine Unterschiede. Insgesamt wurden für NfFNT2-Verkürzungen nach Herstellung in der Hefe im Western Blot im Vergleich zu  $\Delta 1-155\text{NfFNT2}$  bei gleicher Auftragsmenge deutlich schwächere Signale erhalten (**Abbildung 4.34**, **Abbildung 4.35**). Die Generationszeiten der NfFNT2- und N-terminal verkürzten NfFNT2-herstellenden Hefe waren im Vergleich zu NfFNT3 oder PfFNT herstellenden Hefen deutlich erhöht. Ein Vergleich der Ähnlichkeiten der Aminosäuren (**Abbildung 5.2**) und ihrer Polarität (**Abbildung 5.5**) zwischen Position 155 bis 183 für NfFNT2 und 195 bis 223 für NfFNT3 liefert keinen Hinweis darauf, warum NfFNT2 und NfFNT3 unterschiedliche Stabilitäten in der Herstellung aufweisen. Beide weisen eine kurze Abfolge von polaren Aminosäuren (E/D-K) in der Region direkt vor dem Beginn der radikaleren Verkürzung auf. Die Verkürzung, die D-K noch aufweist, begünstigt die Herstellung von NfFNT3 in *S. cerevisiae* und *D. discoideum* vgl. **Abbildung 4.37**, **Abbildung 4.39** und **Abbildung 4.56**). Möglicherweise wird hierdurch die intrazelluläre Lokalisation der Termini sichergestellt. Auffällig ist auch der Unterschied in der Herstellung in HEK293-Zellen. Für  $\Delta 1-183\text{NfFNT2}$  wurde im Gegensatz zum Hefe- und *D. discoideum*-System eine stabilere Produktion und das Vorhandensein von Pentameren im HEK293-Zell-System beobachtet. Sowohl  $\Delta 1-183\text{NfFNT2}$  also auch  $\Delta 1-223\text{NfFNT3}$  zeigten im HEK293-Zell-System eine verbesserte Herstellung im Vergleich zum Hefesystem.

In *D. discoideum* wurden die weniger verkürzten Varianten  $\Delta 1-155\text{NfFNT2}$  und  $\Delta 1-195\text{NfFNT3}$  erfolgreich hergestellt (**Abbildung 4.55** und **Abbildung 4.56**). Dies lässt die Annahme zu, dass für die Herstellung in *D. discoideum* der Bereich zwischen Aminosäure 155 und 183 (NfFNT2) und 195 und 223 (NfFNT3) notwendig ist.

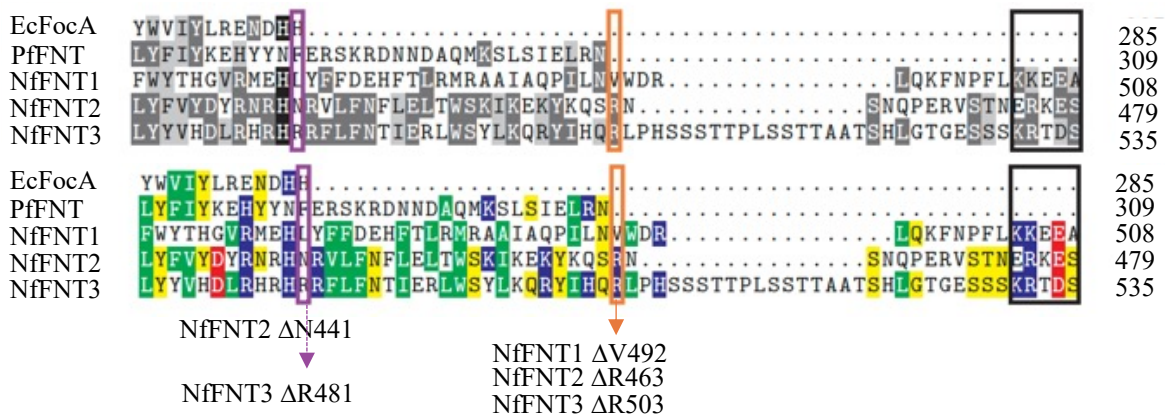
NfFNT1 konnte sowohl N-terminal als auch doppelt N- und C-terminal verkürzt durch *S. cerevisiae* hergestellt und als Monomer in isolierten Vesikeln nachgewiesen werden (**Abbildung 4.58** und **Abbildung 4.59**). Auffällig war hier die fehlende Nachweisbarkeit von Oligomeren. In HEK293-Zellen hergestelltes  $\Delta\text{NfFNT1}$  zeigte keine stabile Herstellung des vollständig translatierten Proteins. NfFNT1 sollte weiter in den markierten Bereichen verkürzt werden, um eine Aussage über den Einfluss auf die Herstellung von NfFNT1 in Abhängigkeit von den Termini treffen zu können.



**Abbildung 5.5:** ClustalW Alignment der N-terminal verkürzten Bereiche. Lila hervorgehoben: Vordere Verkürzung. Gleiche Anzahl Aminosäuren bis zum Beginn ersten Transmembranspanne wie bei PfFNT. Schwarz hervorgehoben: Verkürzung kurz vor Beginn der ersten Transmembranspanne an Position von des potenziellen Startmethionins von NfFNT1-3. Färbemodus: *hydropathy functional*. Anmerkung: Bei NfFNT2 und 3 wurde bewusst das Methionin durch Klonierung entfernt und als Startmethionin das des N-terminal befindlichen HA-tags ausgenutzt. Bei ΔNfFNT1, welches später kloniert wurde, wurde das Methionin nicht gekürzt.

Die zusätzliche Verkürzung des C-Terminus von Δ1-214NfFNT1 zu Δ1-214NfFNT1Δ492 führte in *D. discoideum* zur Nachweisbarkeit von Monomeren in der Western Blot-Analytik. Es wurde weiterhin der Transport von Formiat/H<sup>+</sup> im <sup>14</sup>C-Assay gefunden (**Abbildung 4.54**). Die Herstellung war trotz stärkerer N-terminaler Verkürzung möglich (**Abbildung 5.5**). Diese Beobachtung deckt sich mit den Beobachtungen zu den aus *S. cerevisiae* NY17 isolierten Vesikeln, steht aber im Gegensatz zu den Herstellungsuntersuchungen im HEK293-Zell-System, wo kein vollständiges Monomer detektiert wurde. Die Betrachtung des weniger N-terminal verkürzten Konstruktes und des doppelt verkürzten ΔNfFNT1Δ wäre sinnvoll, um den Einfluss des Bereiches, der sich für NfFNT3 als entscheidend herausgestellt hat, und die Ergebnisse aus dem Hefe- und *D. discoideum*-System im HEK293-Zell-System einzuordnen. Im nächsten Schritt könnte die direkte Inhibition von ΔNfFNT1Δ mit BH388 oder BH340 im *D. discoideum*-System angestrebt werden. Zusätzliche wäre eine Charakterisierung von ΔNfFNT1Δ in Bezug auf die biochemischen Eigenschaften wie pH-abhängiges Transportverhalten, Transportraten und maximale Transportkapazität sinnvoll.

Untersuchungen der C-Termini im Hefesystem zeigten für NfFNT2 eine stabile Herstellung bei einer Verkürzung an Position N441. Die Verkürzung an Position R463 hatte bei zusätzlicher N-terminaler Verkürzung an Position 1-183 keinen starken Einfluss, ließ im Western Blot aber schwach Dimere im 10.000 g-Pellet erkennen (**Abbildung 4.32**). Es wäre sinnvoll, die doppelt verkürzte Variante Δ1-183 oder Δ1-155NfFNT2Δ441 im Vergleich (**Abbildung 5.6**) zu untersuchen, um zu beobachten, ob die stabilere Herstellung bei Verkürzung des C-Terminus an Position 441 mit der Notwendigkeit des vollständigen N-Terminus einhergeht oder ob die Verkürzung über Position 463 hinaus den entscheidenden Unterschied beinhaltet. Die Klonierung des an dieser Stelle verkürzten Konstruktes NfFNT3Δ481 war im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich, sodass kein Vergleich zu NfFNT3 angestellt werden konnte. Es wurden auch für das doppelt verkürzte Konstrukt Δ1-223NfFNTΔ503 schwache Dimere im 10.000 g-Pellet im Western Blot detektiert, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die weitere Verkürzung der C-Termini die stabile Herstellung von NfFNT2 und 3 fördert.



**Abbildung 5.6:** ClustalW Alignment der C-terminal verkürzten Bereiche. Oben: Färbemodus: *similarity chemical*. Unten: Färbemodus: *hydropathy functional*. Lila hervorgehoben: stärkere Verkürzung direkt hinter der letzten Transmembranspanne. Orange hervorgehoben: Verkürzung in Anlehnung an PfFNT. Schwarz: Spiegelung des sauer/basisch-Motivs.

Die Übersicht der hergestellten und auf Funktion getesteten Konstrukte in **Tabelle 5.1** veranschaulicht, dass die aus dem jeweiligen Expressionssystem erhaltenen Ergebnisse nicht zwangsläufig mit denen anderer Expressionssysteme übereinstimmen. So wurde ΔNfFNT1 im Western Blot nach Herstellung im Hefesystem als Monomer, in HEK293-Zellen nur fragmentiert und in *D. discoideum* nicht nachgewiesen. ΔNfFNT1Δ dagegen wurde im Hefesystem und *D. discoideum*-System als Monomer nachgewiesen. Die funktionelle Charakterisierung war nur von ΔNfFNT1Δ in *D. discoideum* möglich. Δ1-183NfFNT2 wurde in der Hefe zwar erfolgreich hergestellt, jedoch war die Signalintensität bei gleicher Gesamtprotein-Auftragsmenge geringer als die der mitgeführten Kontrollen. Unter den getesteten Bedingungen war Δ1-183NfFNT2 im Hefe- und *D. discoideum*-System nicht funktional. Δ1-183NfFNT2 wurde als GFP-Fusionsprotein im HEK-Zellsystem als Pentamer nachgewiesen. In diesem System könnte eine funktionelle Charakterisierung angestrebt werden. NfFNT2Δ441 war in der Hefe als Pentamer nachzuweisen. Es wurde im <sup>14</sup>C-Assay unter den gewählten Bedingungen keine Funktion nachgewiesen. Bisher wurde NfFNT2Δ441 in anderen Expressionssystemen noch nicht untersucht. Insgesamt wurde durch die Verkürzung der Termini die Herstellung in der Hefe und auch in *D. discoideum* gesteigert. Auch wenn im Western Blot nur Monomere nachgewiesen werden können, ist das grundsätzliche Vorliegen von Pentameren, nicht ausgeschlossen. Auch das funktionale PfFNT wurde nach der Herstellung in der Hefe häufig im Western Blot nur als Monomer detektiert.

Es wurde gezeigt, dass NfFNT1-3 alle Charakteristika eines FNT aufweist (**Abbildung 4.20**) und auch die Bindung der PfFNT-Inhibitoren laut Model möglich ist (**Abbildung 4.17**). Hier wäre ein virtuelles *Docking* zur Strukturoptimierung sinnvoll, um Inhibitoren designen zu können, die besser zu den strukturellen Eigenschaften von NfFNT passen, da einige Positionen abweichende Aminosäuren aufweisen. Am wichtigsten ist jedoch die Beantwortung der Fragestellung nach der Funktionalität, nachdem die Herstellung gesteigert wurde (4.5.2.3 und 4.5.2.4) und ob ein Protein, das aussieht wie ein FNT vielleicht eine andere Funktion aufweist oder die Einschränkung der Funktionalität in dem zur Herstellung gewählten Organismus begründet liegt. In weiteren Untersuchungen könnte sich auf die Rolle von Formiat/H<sup>+</sup> für *N. fowleri* konzentriert werden, da für ΔNfFNT1Δ in *D. discoideum* Transport von Formiat/H<sup>+</sup> gefunden wurde. Die direkte Verstoffwechselung von <sup>14</sup>C-markierten Formiat durch *N. fowleri*-Trophozoiten wäre hierzu sinnvoll.

**Tabelle 5.1:** Übersicht der NfFNT-Konstrukte und Expressionssystem. x: keine Herstellung, Grün: SDS-stabile Oligomere, Orange: Funktion, nt: nicht getestet

Konstrukt	Expressionssystem			
	<i>S. cerevisiae</i>		HEK293	<i>D. discoideum</i>
	W303 1A <i>Δjen1 Δady2</i>	NY17 Vesikel		
NfFNT1-GFP	Fragmentiert Lokalisation: Zellmembran	Monomer*	nt	x
ΔNfFNT1	Monomer	Monomer	ΔNfFNT1- GFP unvollständig	x
ΔNfFNT1Δ	Monomer	Monomer	nt	Monomer
NfFNT2	Monomer	Monomer*	nt	nt
NfFNT2-GFP	Monomer, Vakuole	nt	nt	x
Δ1-183NfFNT2Δ464	Dimer	Dimer	nt	x
Δ1-155NfFNT2	Monomer	Monomer*	nt	Monomer, schwach
Δ1-183NfFNT2	Monomer	Monomer*	ΔNfFNT2- GFP Pentamer	x
NfFNT2Δ441	Pentamer	nt	x	x
NfFNT3	Monomer	nt	nt	x
Δ1-223NfFNT3Δ503	Dimer	Monomer	nt	nt
NfFNT3-GFP	nt	nt	nt	x
Δ1-195NfFNT3	Pentamer	Trimer	nt	Pentamer
Δ1-195NfFNT3-GFP	nt	Monomer*	nt	nt
Δ1-223NfFNT3	Monomer	nt	nt	x
Δ1-223NfFNT3-GFP	Monomer	nt	Pentamer	nt
NfFNT3Δ503	x*	nt	nt	x

\* Western Blot in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt

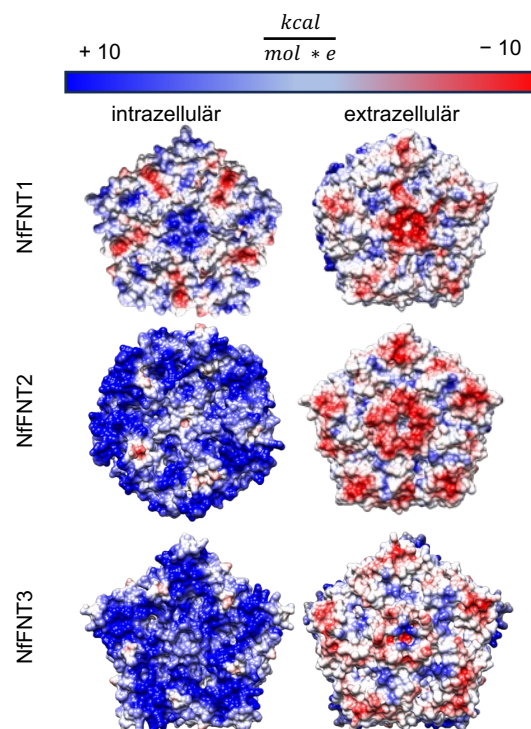
### 5.3.1 Codon-usage

In vielen Prokaryoten und Eukaryoten werden 3'-Poly-A-Sequenzen als nicht-codierende Elemente genutzt, was die heterologe Herstellung von Proteinen, die beispielsweise eine Poly-A-Codierung für mehrere Lysine hintereinander aufweisen, erschwert. So wird z. B. in Bakterien die Poly-A-Sequenz als Markierung für abzubauen mRNA genutzt (Dreyfus & Régnier, 2002). Koutmou *et al.* (2015) haben gezeigt, dass die Gesamtproteinproduktion beim Vorliegen mehrerer Lysin-Codons hintereinander variiert. So ist die Gesamtproteinproduktion in *E. coli* ( $4 \pm 0,3$ )-mal und in *S. cerevisiae* bei Nutzung von AAG<sub>12</sub> ( $3 \pm 1$ )-mal so hoch wie unter der Verwendung des AAA<sub>12</sub>-Triplets im Transkript. Koutmou *et al.* (2015) haben weiterhin gezeigt, dass die Translation von Lysinen in heterogene Peptidsequenzen, unabhängig von der Position des Lysins, gleich schnell mit Ratenkonstanten von 7-12 s<sup>-1</sup> verlaufen. Wurde direkt im Anschluss für weitere Lysine codiert, so kam es zu kinetischen Verzögerungen. Die Translationsrate nahm ab und lag für zwei AAA-Codons hintereinander ( $k_2$ ) bei 0,0003 s<sup>-1</sup>,  $k_3$  bei 0,0005 s<sup>-1</sup> und für zwei AAG-Codons aufeinanderfolgend ( $k_2$ ) bei 0,0009 s<sup>-1</sup> und  $k_3$  bei 0,015 s<sup>-1</sup> (Koutmou *et al.*, 2015). Es könnte also angenommen werden, dass Fragmente oder nicht-funktionale Proteine durch „gleitende“ und stoppende Ribosomen verursacht werden. Im codogenen Strang der für PfFNT und NfFNT codierenden Sequenzen lagen keine Poly-A-Sequenzen vor, die das „Gleiten“ von Ribosomen ermöglichen würden und aus diesem Grund im genetischen Code unterrepräsentiert sind (Koutmou *et al.*, 2015, T. J. Smith *et al.*, 2022). Vereinzelt wurden AAA-Codons als Codierung für ein Lysin genutzt. Jedoch lagen fast zu gleichen Anteilen AAA- und AAG-Codons vor. Außerdem war die Gesamtanzahl dieser Codons für PfFNT und die nicht-funktionalen FNT aus *E. histolytica*, *T. gondii* und *N. fowleri* vergleichbar. Für *T. gondii* wurde keine Anhäufung der Codons im Bereich der Termini festgestellt, die auf DNA-Ebene bzw. durch die Codonnutzung die fehlende Funktion des Proteins durch fehlerhafte oder unvollständige Translation erklären würde. Auch einige der humanen Monocarboxylat-Transporter MCT2-12 zeigten in der Arbeitsgruppe nach Herstellung in der Hefe keine Funktion. Da der MCT das humane Äquivalent zum FNT darstellt und für den Transport für Laktat im Menschen verantwortlich ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch MCT 1,4,5,6,11 und 12 einer Sequenzanalyse mit dem Fokus auf Poly-A-Codons unterzogen. Es wurden auch hier keine Poly-A-Sequenzen oder Auffälligkeiten in der Basensequenz im Gegensatz zum funktionalen MCT1 gefunden. Auch wenn eine Fragmentierung oder teilweise unvollständige Translation bei einigen FNT-Konstrukten in der Western Blot-Analytik zu beobachten war, so sind für den Funktionsnachweis mit dem sensiblen <sup>14</sup>C-Assay nur einige wenige intakte, in der Membran befindliche Proteine notwendig. Auch in der für PfFNT codierenden Sequenz sind mehrere AAA-Codons zu finden und auch eine Fragmentierung als GFP-Fusionsprotein ist zu beobachten (**Abbildung 4.43**). So kann die in der in-Gel-Fluoreszenz beobachtete Fragmentierung nicht der einzige Grund für eine fehlende Funktion sein. Beides hat keinen grundlegend funktionshemmenden Einfluss auf PfFNT (**Abbildung 4.14**). So stellt sich eher die Frage nach der tatsächlichen Lokalisation der heterolog hergestellten Proteine in der Hefezelle und auch potenzielle posttranslationale Modifikationen, die *N. fowleri* möglicherweise in anderer Art als *S. cerevisiae* auslöst (Tillery *et al.*, 2021).

### 5.4 Gerichteter Transport als Hindernis der Substrataufnahme?

Den Strukturmodellen nach liegen im Poreneingang der NfFNT positiv geladene Lysine, die für die elektrostatische Anziehung des negativ geladenen Substrates sorgen könnten. Das Coulomb-Oberflächenpotenzial zeigt auf extrazellulärer Seite insgesamt weniger positive als negative Ladungen, die die Substratanziehung bedingt (**Abbildung 5.7**). Auffällig ist aber bei

allen drei NfFNT die Konzentration von positiver Ladung im Bereich des Poreneingangs auf intrazellulärer Seite. Da in den  $^{14}\text{C}$ -Transportassays der NfFNT-herstellenden Zellen der von extrazelluläre nach intrazellulär gerichtete Transport untersucht wurde, ist es möglich, dass die positive Ladung auf extrazellulärer Seite nicht ausreicht um das negativ geladene Substrat anzuziehen oder, dass dieses von der negativen Ladung sogar abgestoßen wird. Sollte die Funktion der NfFNT weniger im Import von Substraten als im Export von Stoffwechselendprodukten aus der Zelle liegen, ist die intrazelluläre Seite des Membranproteins von größerer Bedeutung. Tatsächlich ist auf dieser Seite der Anteil der positiven Ladung laut den Modellen deutlich höher als auf extrazellulärer Seite. Weitere Funktionsstudien könnten sich auf den Export konzentrieren. Dies kann sowohl im  $^{14}\text{C}$ -Assay im Rahmen eines Effluxassays adressiert werden als auch in Zellen, deren Export-Möglichkeit von Stoffwechselendprodukten auf endogenem Weg blockiert wird, sodass nur über das Fremdprotein exportiert werden kann. Beachtet werden sollte bei dieser Annahme, dass die Modelle, auf deren Grundlage das Coulomb-Oberflächenpotenzial basiert, die Struktur von PfFNT (PDB: 7mxy) zugrunde liegt und eventuelle Einflüsse oder potenzielle *gating*-Mechanismen der Termini unberücksichtigt bleiben. Die Beobachtung der „*positive inside rule*“ wurde allerdings auch schon bei anderen FNT gemacht. Auch EcFocA weist beispielsweise eine höhere intrazelluläre positive Ladung auf. Dennoch reicht die Anziehung des positiv geladenen Lysins im Vestibül des Poreneingang - auch auf extrazellulärer Seite - aus bzw. überwiegt in Bezug auf die Substratattraktion die negative Gesamtladung und zieht das negativ geladene Substrat in den Poreneingang, wo es gemeinsam mit einem Proton den Transportpore passiert (1.4.3.2).



**Abbildung 5.7:** Coulomb-Oberflächenpotenzial der NfFNT-Modelle (7mxy). Die Termini sind im Model unberücksichtigt. Positiv: blau, negativ: rot. Die Darstellung erfolgte mit *Chimera*.

### 5.5 Sind FNT das Wirkstoffziel der PfFNT-Inhibitoren in *N. fowleri*?

Bisher ist der genaue Mechanismus und Verlauf des Abbaus der EZM nach Infektion mit *N. fowleri*-Trophozoiten noch nicht geklärt. Die Sekretion von Proteasen und Enzymen mit hydrolytischer Funktion sind wichtige Faktoren in der Pathogenität und Virulenz anderer eukaryotischer Parasiten. Sie sind an der Degradation von Proteinen der EZM, Lyse der Wirtszellen oder Invasion dieser durch intrazelluläre Parasiten beteiligt. Es werden außerdem verschiedene an oder in der Membran lokalisierte Strukturen in ihrer Beteiligung an der Pathogenität diskutiert (Zysset-Burri *et al.*, 2014). In der Literatur wird häufig nach Unterschieden im Expressionslevel von an der Pathogenität beteiligten Genen und daraus resultierenden Proteinen oder Enzymen durch die pathogene Art *N. fowleri* und die nicht pathogenen Arten *N. gruberi* und *N. lovaniensis* gesucht. Ein weiterer Ansatz ist die Suche nach Unterschieden im Proteom schwach und hoch pathogener Trophozoiten. Hierdurch soll die Anzahl an falsch positiven *Hits* reduziert werden. So wurde von einer Arbeitsgruppe aus der Schweiz zusätzlich zur Genomanalyse von *N. fowleri* das Proteom unterschiedlich pathogener Trophozoiten untersucht. Zysset-Burri *et al.* (2014) haben festgestellt, dass, je nachdem in welchem Medium sich die Trophozoiten befanden, sie eine unterschiedliche Virulenz aufwiesen. So waren Trophozoiten in *Nelson's* Medium oder PYNFH mit Leber-Zelllysät supplementiert hoch pathogen, während Trophozoiten in PYNFH-Medium ohne weitere Zusätze eine geringere *in-vitro*-Proliferation und eine geringere Pathogenität gegenüber Mäusen zeigten. Hier konnten 22 hochregulierte Proteine, die im Zusammenhang mit der Pathogenität zu stehen scheinen, und 21 runterregulierte Proteine identifiziert werden. Interessanterweise handelt es sich bei dem größten Teil der herunterregulierten Proteine um an der Atmungskette und Proteinbiosynthese beteiligte Enzyme. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Trophozoiten im Verlauf einer Infektion auf eine andere Energiegewinnung als die anaerobe Glykolyse mit anschließender Atmungskette zurückgreifen. Im Gegensatz zu der Suche nach Unterschieden zwischen nicht-pathogenen Spezies und Unterschieden im Proteom verschieden pathogener *N. fowleri* selbst, steht der Ansatz der FNT als *Drug Target*, dessen genomische Information alle drei Spezies tragen. Genetisch gesehen ist *N. gruberi* von *N. fowleri* etwas weiter entfernt als *N. lovaniensis* (Liechti *et al.*, 2018), aber dennoch gibt das Genom (Liechti *et al.*, 2019) Hinweise auf ähnliche Metabolismus-Eigenschaften aller drei Arten. Metabolismus-Studien zu *N. gruberi* konnten zeigen, dass *N. gruberi* das enzymatische *set-up* für aerobe sowie für anaerobe Energiegewinnung aufweist. Genomanalysen sagen die gleichen Fähigkeiten für *N. fowleri* voraus. Es gibt allerdings keine Hinweise auf L-Laktat als Stoffwechsel-Endprodukt. Für anaerobe Stoffwechselwege scheint die Entstehung von Ethanol und D-Laktat wahrscheinlich. Die Metabolismusstudie an *N. gruberi* lässt es wahrscheinlich erscheinen, dass die FNT von *Naegleria* weniger am Ausschleusen von Stoffwechselendprodukten wie L-Laktat beteiligt sind, sondern eher an der Aufnahme von beispielsweise Acetat, was zum einen ein bekanntes Substrat der FNT ist und zum anderen von *Naegleria* direkt verstoffwechselt werden kann. Hier kann auch ein Zusammenhang zum pathogenen *N. fowleri* hergestellt werden, der Acetat-reiche weiße Hirnsubstanz degradieren kann und Acetat potenziell als Nahrungsquelle nutzt. Diese Annahmen zu der Rolle der FNT in der Aufnahme von Acetat als Energiequelle für den Parasiten stehen im Gegensatz zu den Bedingungen, denen die inhibierten Trophozoiten in der Testung der Inhibitoren ausgesetzt waren. Die Trophozoiten eines klinisch pathogenen Isolates wurden in *Nelson's* Medium unter aeroben Bedingungen kultiviert. Inwiefern hier FNT eine Rolle in der Zufuhr von Energiequellen oder im Ausschleusen von Stoffwechselendprodukten spielen könnten, ist mit den bisherigen bekannten Erkenntnissen zu *N. fowleri* oder *N. gruberi* nicht zu erklären. So kann die Aufnahme von Acetat ausgeschlossen werden, da Glukose als ausreichende

Energiequelle zur Verfügung steht und in Anwesenheit von Sauerstoff auf aerobem Weg mittels Glykolyse über den Citratzyklus und anschließende Atmungskette verstoffwechselt wird. Somit ist auch eine Rolle im Ausschleusen von Stoffwechselendprodukten als unwahrscheinlich anzusehen. Reine zytotoxische Effekte könnten ein Grund für das Absterben der Trophozoiten sein. Für die ursprüngliche Leitsubstanz der Inhibitoren MMV007839 ist die Zytotoxizität im Rahmen des *drug design* von MMV007839 gegenüber PfFNT überprüft worden. So wurde die Zellüberlebensrate und -proliferation von HEK293 und HepG2-Zellen überprüft (Wallock *et al.*, 2021). Das Resultat waren EC<sub>50</sub>-Werte um etwa 10 µM. Damit liegt der EC<sub>50</sub>-Wert etwa fünf bis zehnmal höher für Inhibitoren, die EC<sub>50</sub>-Werte um 1,6 µM gegenüber den Trophozoiten aufwiesen, während er 100-mal höher ist als der für das gesicherte PfFNT-*Target*. Es gilt also die Frage zu klären, ob die Effekte der Inhibitoren kausal bestimmten Strukturen zuzuordnen sind und wenn ja, welche oder inwiefern ein FNT unter den betrachteten Bedingungen für einen Trophozoiten essenziell ist. Fraglich ist auch, ob das Vorhandensein von drei potenziellen FNT im Zusammenhang mit den drei unterschiedlichen morphologischen Stadien der Parasiten steht. Interessant wäre, ob die Trophozoiten beispielsweise auch unter anaeroben Bedingungen zu kultivieren sind und welche Wirkung die Inhibitoren in einem *set-up* haben, in dem das Auftreten anaerober Stoffwechselprodukte wahrscheinlicher ist.

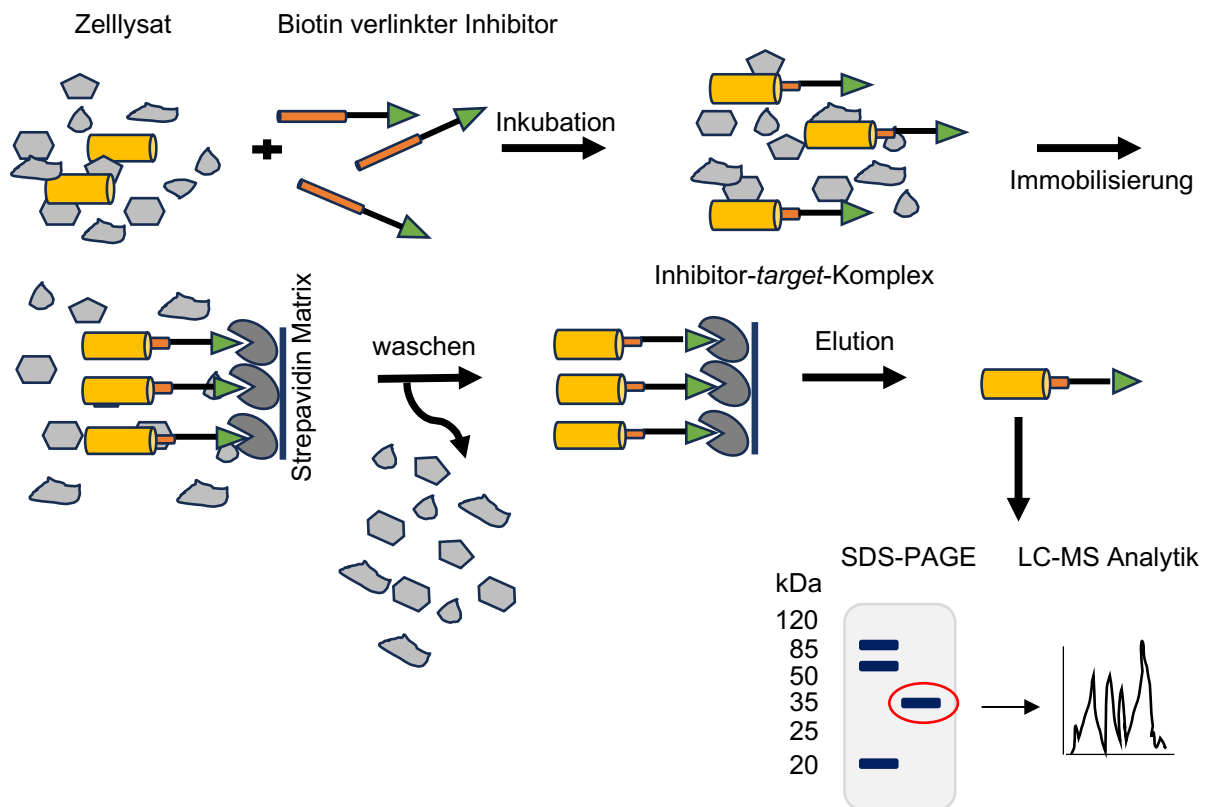
### 5.6 Ausblick

FNT stellen aufgrund ihrer strukturellen Unterschiede zu humanen Monocarboxylat-Transportern ein gutes Wirkstoffziel in humanpathogenen eukaryotischen Parasiten dar. Eine Infektion mit *N. fowleri* ist zwar selten, verläuft aber in ca. 97% der Fälle tödlich. Insofern ist die Notwendigkeit einer kausalen Behandlungsstrategie unabdingbar und durch adressierbare FNT gegeben. Im Rahmen dieser Arbeit kann nicht abschließend beurteilt werden, ob die NfFNT das *Target* der Inhibition durch bekannte FNT-Inhibitoren darstellen. Die Rolle der FNT im Metabolismus von *N. fowleri* kann aufgrund bisher uneindeutiger Funktionsnachweise nicht zugeordnet werden. Somit wurde der heterolog hergestellte Transporter im Hefesystem nicht auf mögliche Inhibition mittels der PfFNT-Inhibitoren untersucht und keine direkte Wirkung der Inhibitoren auf das Protein nachgewiesen. Die erfolgreiche Herstellung einzelner Konstrukte in verschiedenen Expressionssystemen zeigte jedoch das Vorliegen FNT-typischer Pentamere und die Membranlokalisation dieser. Die vielversprechenden PfFNT-Inhibitoren können sich über ihre Affinität gegenüber dem FNT zunutze gemacht werden und auf ihre Wirkung gegenüber weiteren eukaryotischen humanpathogenen Parasiten untersucht werden. Auch wenn die Frage nach der Rolle der FNT im Metabolismus von *N. fowleri* im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden konnte, so liefert sie eine Grundlage, auf welcher der Stoffwechsel von *Naegleria* auf FNT-Substrate untersucht werden kann und inwiefern diese als Nährstoff oder Stoffwechselprodukt eine für den Parasiten überlebenswichtige Rolle einnehmen. Gerade im Hinblick auf bekannte Substanzen wie Sterol-14-methylase inhibierende Azole (Debnath *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2023), HMG-CoA-Reduktase-hemmende Statine (Debnath *et al.*, 2020), Chlorpromazin (Kim *et al.*, 2008), pflanzliche Terpene (Rajendran *et al.*, 2023) und andere Arzneistoffe wie das Makrolidantibiotikum Rokitamycin (Kimet *et al.*, 2008), die auf ihre Wirkung gegenüber *N. fowleri* *in vitro* und letztere auch *in vivo* getestet wurden und in der Literatur als vielversprechende Wirkstoffe mit EC<sub>50</sub>-Werten im mikromolaren Bereich eingestuft werden, können die getesteten FNT-Inhibitoren mit EC<sub>50</sub>-Werten um und unter 10 µM als wertvolle Errungenschaft angesehen werden. Die Inhibitoren weisen eine wachstumshemmende Wirkung gegenüber *N. fowleri*-Trophozoiten auf. Von Vorteil ist, dass die gegen PfFNT gerichteten Inhibitoren strukturell auf

kein bislang bekanntes humanes *Target* abzielen. Somit wären die PfFNT-Inhibitoren in Bezug auf *N. fowleri* auch interessant, wenn sie ein anderes *Target* adressieren sollten.

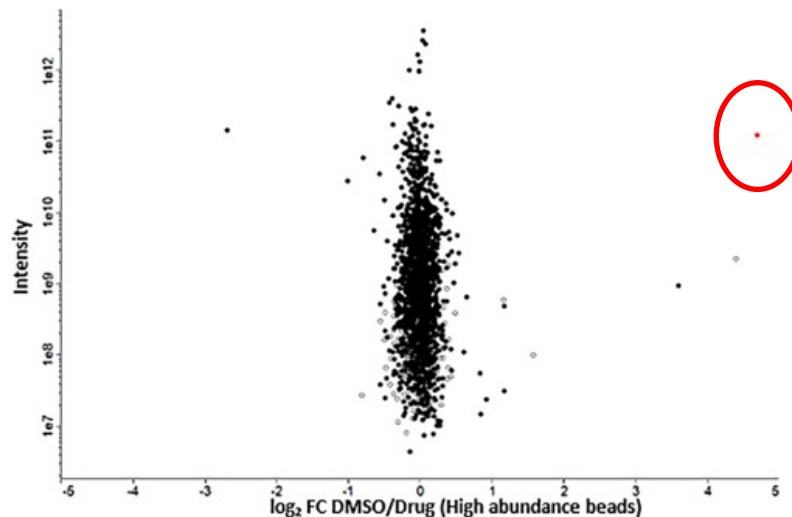
### 5.6.1 Pull-Down-Assay *N. fowleri*-Zelllysats

Eine Möglichkeit, die gegen *N. fowleri* wirksamen PfFNT-Inhibitoren zu nutzen wäre, andersherum nach dem *Target* der Inhibition zu schauen, wenn der theoriebasierte Ansatz nicht zum FNT führt. Grundsätzlich wäre eine Möglichkeit zur *Target*-Identifikation ein *Pull-Down*-Assay in dem an den Inhibitor gebundene Proteine „gefischt“ werden könnten. Hierbei könnten die Inhibitoren beispielsweise mittels Biotinylierung markiert werden und so einer Streptavidin-Reinigung zugänglich gemacht werden. Das an den Inhibitor gebundene Protein könnte so aus dem Zelllysats isoliert werden und mittels anschließender SDS-PAGE und Massenspektrometrie charakterisiert werden. Auf diesem Weg könnte das *Target* der Inhibitoren identifiziert werden.



**Abbildung 5.8:** Prinzip Biotin Pull-Down-Assay aus *N. fowleri* Zelllysats. Gelb = *Target*-Protein, Orange = Inhibitor, Hellgrau = Zelllysats *N. fowleri*, Grün = Biotin, Dunkelgrau = Streptavidin-Matrix.

Eine ähnliche Vorgehensweise, die eine Kombination eines *Pull-Downs* mittels eines *small molecules* und anschließender Massenspektrometrie beschreibt, wurde von Milne *et al.*, (2022) und R. J. Smith *et al.*, (2023) veröffentlicht. Hier wurde eine Methode entwickelt, um ein Protein zu identifizieren, welches ein *Target* eines bekannten Inhibitors von *P. falciparum* ist. Der compound DDD01510706 ist ein Inhibitor der plasmoidalen Lysyl-tRNA-Synthetase (PfKRS1) mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 0,015  $\mu$ M und einem  $EC_{50}$ -Wert gegenüber *P. falciparum* 3D7 von 0,27  $\mu$ M (Baragaña *et al.*, 2019).

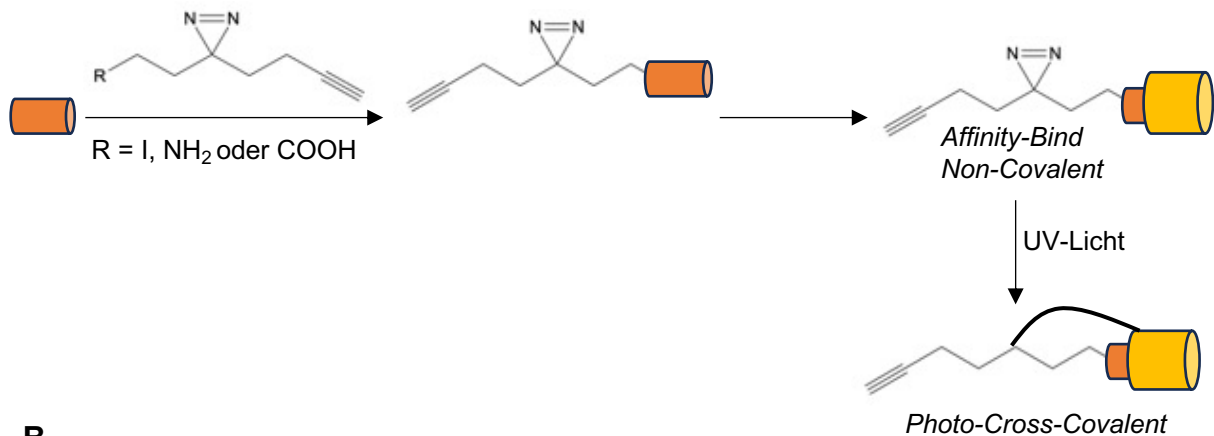


**Abbildung 5.9:** Graphische Darstellung des kompetitiven *Pull Down Assays* nach R. J. Smith *et al.* (2023). Abbildung aus gleicher Quelle entnommen. Der Graph wurde mit Perseus generiert und zeigt den  $\log_2$  fold-change von Proteinen, die an den verlinkten immobilisierten Inhibitor gebunden sind und entweder mit DMSO oder dem Inhibitor DDD01510706 behandelt wurden. Proteinintensität auf der y-Achse ( $\log_{10}$  Skala). Das angenommene *target*, die Lysyl-tRNA-Synthetase (KRS), ist in Rot gezeigt.

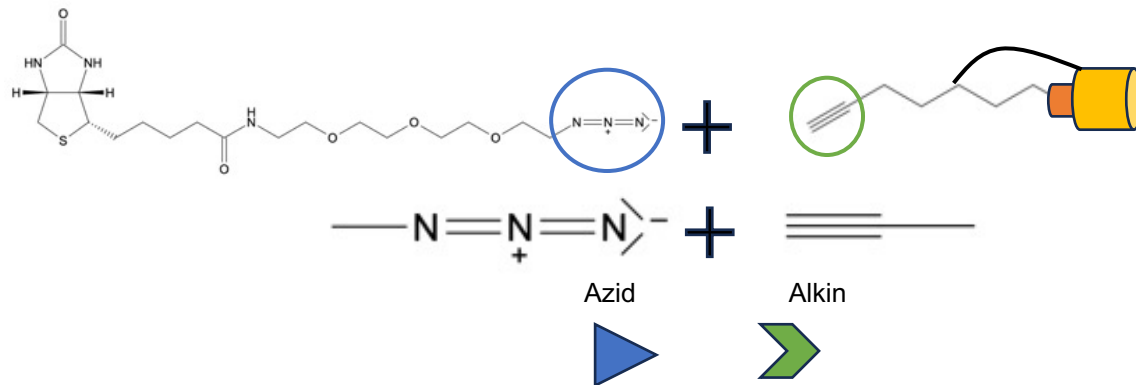
Das Verhältnis von gebundenem *Target* nach Inkubation mit DMSO zu *Target* nach Inkubation mit kompetitivem Inhibitor ist erwartungsgemäß höher und kristallisiert sich im Perseus-Plot heraus. Die nicht spezifisch gebundenen Bestandteile des plasmoidalen Zelllysates erscheinen als zentrale Wolke.

Zu beachten ist die Potenz des *small molecules*, dass zur Bindung des Proteins verwendet werden soll. R. J. Smith *et al.*, (2023) empfehlen eine Potenz im nanomolaren Bereich, die mit dem im Protokoll verwendeten Inhibitor ( $EC_{50}$  = von 270 nM) gegeben war. Zu beachten ist außerdem, dass die Affinität des Inhibitors durch Hinzufügen eines *linkers* nicht um mehr als die zehnfache Potenz verändert wird. Im Fall der FNT-Inhibitoren sind keine  $EC_{50}$ -Werte im nanomolaren Bereich gegenüber *N. fowleri* gemessen worden, was aufgrund der geringeren Potenz zu einer erhöhten Anzahl an falsch positiven *Hits* führen könnte. Andererseits ist eine Membran-Assoziation des Zielproteins wahrscheinlich, was die Aufbereitung des Zelllysates mit Fokus auf Membranbestandteile möglich macht. Einen weiteren Vorteil bietet die Kenntnis über die Struktur-Wirkungs-Beziehung des Proteins und Inhibitors. So ist bereits bekannt, welche Position des FNT-Inhibitors mit einem *linker* versehen werden kann, ohne die Affinität von diesem zum Zielprotein deutlich zu verringern. Diese Strategie kann auch auf andere Zelllysate eukaryotischer humanpathogener Parasiten mit potenziellem FNT angewendet werden, um das Zielprotein zu identifizieren und charakterisieren. Hier könnte über einen minimalistischen Diaryl-*Linker* mit freiem Alkin (Li *et al.*, 2013) im ersten Schritt durch UV-Licht eine kovalente (E. Smith & Collins, 2015) Bindung an das Zielprotein erreicht werden und im zweiten Schritt mittels Klick-Chemie (Kolb *et al.*, 2001) ein Affinitäts-*tag* eingebracht werden. Hierdurch könnte die möglicherweise zu geringe Affinität des Inhibitors zum Protein umgangen werden und der Verlust des Proteins bei der Aufreinigung minimiert werden. Natürlich muss auch hier bedacht werden, dass es sich um einen durch die kovalente Bindung erzwungenen falsch positiven *Hit* handeln kann. Ist aber das Zielprotein bekannt, könnte die zu niedrige Affinität durch Optimierung oder Anpassung der Inhibitorstruktur verbessert werden.

**A**



**B**



**Abbildung 5.10:** Schematische Darstellung von (A) UV-Licht induzierter kovalenter Bindung von verlinktem Inhibitor an Zielprotein. (B) Biotinylierung des Komplexes mittels Klick-Chemie. Abbildung modifiziert nach (Lang *et al.*, 2019). Orange: Inhibitor, Gelb: Zielprotein.

Ein weiterer Schritt im Rahmen der *Target*-Identifikation der Inhibitoren könnte die Lokalisation von fluoreszenzmarkierten Inhibitoren in kultivierten Trophozoiten sein. So könnten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, an oder in welchen Strukturen sich der Inhibitor konzentriert. Zur Klärung der Fragestellung, ob die identifizierten mRNA-Transkripte tatsächlich zur Translation von FNT führen, die im Metabolismus von *N. fowleri* eine so entscheidende Rolle einnehmen, dass ihre Inhibition zum Absterben des Parasiten führt, wäre eine Möglichkeit die Expression der Gene zu unterbinden. Hierbei müsste der Einfluss des fehlenden Proteins auf das Wachstum des Parasiten mit und ohne *knock-out* der NfFNT beobachtet werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Almén, M. S., Nordström, K. J. V., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2009). Mapping the human membrane proteome: A majority of the human membrane proteins can be classified according to function and evolutionary origin. *BMC Biol.*, **7**, 50. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-50>
- Andrade, R. P., & Casal, M. (2001). Expression of the lactate permease gene *JEN1* from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet. Biol.*, **32**, 105–111. <https://doi.org/10.1006/fghi.2001.1254>
- Andrews, N. W., Abrams, C. K., Slatin, S. L., & Griffith, G. (1990). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: Evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell*, **61**, 1277–1287. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90692-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90692-8)
- Anisuzzaman, Hossain, Md. S., Hatta, T., Labony, S. S., Kwofie, K. D., Kawada, H., Tsuji, N., & Alim, Md. A. (2023). Chapter two - food- and vector-borne parasitic zoonoses: Global burden and impacts. *Adv. Parasitol.*, **120**, 87–136. <https://doi.org/10.1016/bs.apar.2023.02.001>
- Anser, H., Khatoon, H., Saeed Khan, S., Imam, S., & Hasan, A. (2018). A review on global distribution of primary amoebic meningoencephalitis (PAM) caused by *Naegleria fowleri*-the brain eating amoeba. *RADS J. pharm. pharm. sci.*, **6**, 95–100. <https://jpps.juw.edu.pk/index.php/jpps/article/view/218/161>
- Arnold, P., Himmels, P., Weiß, S., Decker, T. M., Markl, J., Gatterdam, V., Tampé, R., Bartholomäus, P., Dietrich, U., & Dürr, R. (2014). Antigenic and 3D structural characterization of soluble X4 and hybrid X4-R5 HIV-1 Env trimers. *Retrovirology*, **11**, 42. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-11-42>
- Bader, A., & Beitz, E. (2020). Transmembrane facilitation of lactate/H<sup>+</sup> instead of lactic acid is not a question of semantics but of cell viability. *Membranes*, **10**, 1–12. <https://doi.org/10.3390/membranes10090236>
- Baragaña, B., Forte, B., Choi, R., Hewitt, S. N., Bueren-Calabuig, J. A., Pisco, J. P., Peet, C., Dranow, D. M., Robinson, D. A., Jansen, C., Norcross, N. R., Vinayak, S., Anderson, M., Brooks, C. F., Cooper, C. A., Damerow, S., Delves, M., Dowers, K., Duffy, J., ... Gilbert, I. H. (2019). Lysyl-tRNA synthetase as a drug target in malaria and cryptosporidiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **116**, 7015–7020. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814685116>
- Barbour, S. E., & Marciano-Cabral, F. (2001). *Naegleria fowleri* amoebae express a membrane-associated calcium-independent phospholipase A<sub>2</sub>. *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell. Biol. Lipids*, **1530**, 123–133. [https://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00069-X](https://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00069-X)
- Barth, C., Fraser, D. J., & Fisher, P. R. (1998). Co-insertional replication is responsible for tandem multimer formation during plasmid integration into the *Dictyostelium* genome. *Plasmid*, **39**, 141–153. <https://doi.org/10.1006/plas.1997.1326>
- Batista, A. C., Soudier, P., Kushwaha, M., & Faulon, J. (2021). Optimising protein synthesis in cell-free systems, a review. *Eng. Biol.*, **5**, 10–19. <https://doi.org/10.1049/enb2.12004>
- Bayburt, T. H., Grinkova, Y. V., & Sligar, S. G. (2002). Self-assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. *Nano Lett.*, **2**, 853–856. <https://doi.org/10.1021/nl025623k>

- Beitz, E. (2000a). T<sub>E</sub>Xshade: shading and labeling of multiple sequence alignments using LaTeX2<sub>ε</sub>. *Bioinformatics*, **16**, 135–139. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.2.135>
- Beitz, E. (2000b). T<sub>E</sub>Xtopo: shaded membrane protein topology plots in LaTeX2<sub>ε</sub>. *Bioinformatics*, **16**, 1050–1051. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.11.1050>
- Bellini, N. K., Santos, T. M., da Silva, M. T. A., & Thiemann, O. H. (2018). The therapeutic strategies against *Naegleria fowleri*. *Exp. Parasitol.*, **187**, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.02.010>
- Benkert, P., Biasini, M., & Schwede, T. (2011). Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*, **27**, 343–350. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N., & Bourne, P. E. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Bertoni, M., Kiefer, F., Biasini, M., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci. Rep.*, **7**, 10480. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8>
- Bexkens, M. L., Zimorski, V., Sarink, M. J., Wienk, H., Brouwers, J. F., De Jonckheere, J. F., Martin, W. F., Opperdoes, F. R., van Hellemond, J. J., & Tielens, A. G. M. (2018). Lipids are the preferred substrate of the protist *Naegleria gruberi*, relative of a human brain pathogen. *Cell Rep.*, **25**, 537–543.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.055>
- Bienert, S., Waterhouse, A., De Beer, T. A. P., Tauriello, G., Studer, G., Bordoli, L., & Schwede, T. (2017). The SWISS-MODEL repository-new features and functionality. *Nucleic Acids Res.*, **45**, D313–D319. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132>
- Bouyer, S., Rodier, M. H., Guillot, A., & Héchard, Y. (2009). *Acanthamoeba castellanii*: Proteins involved in actin dynamics, glycolysis, and proteolysis are regulated during encystation. *Exp. Parasitol.*, **123**, 90–94. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2009.06.006>
- Brouwer, M.C., McIntyre, P., Prasad, K. & van de Beek, D. (2007). Corticosteroids for acute bacterial meningitis. *Cochrane Database Syst. Rev.*, **2015**, CD004405. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004405.pub5>
- Capewell, L. G., Harris, A. M., Yoder, J. S., Cope, J. R., Eddy, B. A., Roy, S. L., Visvesvara, G. S., Fox, L. A. M., & Beach, M. J. (2014). Diagnosis, clinical course, and treatment of primary amoebic meningoencephalitis in the United States, 1937-2013. *J. Pediatr. Infect. Dis. Soc.*, **4**, e68–e75. <https://doi.org/10.1093/jpids/piu103>
- Carlson, M. L., Young, J. W., Zhao, Z., Fabre, L., Jun, D., Li, J., Li, J., Singh Dhupar, H., Wason, I., Mills, A. T., Beatty, J. T., Klassen, J. S., Rouiller, I., & Duong, F. (2018). The peptidisc, a simple method for stabilizing membrane proteins in detergent-free solution. *eLife*, **7**, e34085, <https://doi.org/10.7554/eLife.34085.00110>
- Carter, R. F. (1970). Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.*, **100**, 217–244. <https://doi.org/10.1002/path.1711000402>

- Casal, M., Paiva, S., Andrade, R. P., & Gancedo, C. (1999). The lactate-proton symport of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by JEN1. *J. Bacteriol.*, **181**, 2620–2623. <https://doi.org/10.1128/jb.181.8.2620-2623.1999>
- Cassio, F., Leao, C., & Van Uden, N. (1987). Transport of lactate and other short-chain monocarboxylates in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 509–513. <https://doi.org/10.1128/aem.53.3.509-513.1987>
- Cheng, Y. (2015). Single-particle cryo-EM at crystallographic resolution. *Cell*, **161**, 450–457. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.03.049>
- Chou, K. C., & Shen, H. Bin. (2007). MemType-2L: A web server for predicting membrane proteins and their types by incorporating evolution information through Pse-PSSM. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **360**, 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.06.027>
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., & Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: Genetic transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA\*. *Prot. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, **69**, 2110–2114. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.8.2110>
- Colon, B. L., Rice, C. A., Guy, R. K., & Kyle, D. E. (2019). Phenotypic screens reveal posaconazole as a rapidly acting amebicidal combination partner for treatment of primary amoebic meningoencephalitis. *J. Infect. Dis.*, **219**, 1095–1103. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy622>
- Cowman, A. F., Healer, J., Marapana, D., & Marsh, K. (2016). Malaria: biology and disease. *Cell*, **167**, 610–624. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.07.055>
- Croston, G. E. (2017). The utility of target-based discovery. *Expert Opin. Drug Discov.*, **12**, 427–429. <https://doi.org/10.1080/17460441.2017.1308351>
- Czyzewski, B. K., & Wang, D. N. (2012). Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature*, **483**, 494–497. <https://doi.org/10.1038/nature10881>
- Dacks, J. B., Davis, L. A. M., Sjögren, Å. M., Andersson, J. O., Roger, A. J., & Doolittle, W. F. (2003). Evidence for golgi bodies in proposed “golgi-lacking” lineages. *Biol. Lett.*, **270**, S168–S171. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0058>
- Das, P., Lahiri, A., Lahiri, A., & Chakravorthy, D. (2009). Novel role of the nitrite transporter NirC in *Salmonella* pathogenesis: SPI2-dependent suppression of inducible nitric oxide synthase in activated macrophages. *Microbiology*, **155**, 2476–2489. <https://doi.org/10.1099/mic.0.029611-0>
- Datoo, M. S., Dicko, A., Tinto, H., Ouédraogo, J. B., Hamaluba, M., Olotu, A., Beaumont, E., Ramos Lopez, F., Natama, H. M., Weston, S., Chemba, M., Compaore, Y. D., Issiaka, D., Salou, D., Some, A. M., Omenda, S., Lawrie, A., Bejon, P., Rao, H., ... Valea, I. (2024). Safety and efficacy of malaria vaccine candidate R21/Matrix-M in african children: A multicentre, double-blind, randomised, phase 3 trial. *The Lancet*, **403**, 533–544. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)02511-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)02511-4)
- Davies, H., Bergmann, B., Walloch, P., Nerlich, C., Hansen, C., Wittlin, S., Spielmann, T., Treeck, M., & Beitz, E. (2023). The *Plasmodium* lactate/H<sup>+</sup> transporter PfFNT is essential and druggable *In Vivo*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **67**, e00356-32. <https://doi.org/10.1128/aac.00356-23>

- De Jonckheere, J. F. (2011). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect. Genet. Evol.*, **11**, 1520–1528. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.023>
- De Jonckheere, J. F. (2014). What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Exp. Parasitol.*, **145**, S2–S9. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.011>
- Debnath, A., Calvet, C. M., Jennings, G., Zhou, W., Aksenov, A., Luth, M. R., Abagyan, R., Nes, W. D., McKerrow, J. H., & Podust, L. M. (2017). CYP51 is an essential drug target for the treatment of primary amoebic meningoencephalitis (PAM). *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **11**, e0006104. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0006104>
- Debnath, A., Hahn, H. J., Abagyan, R., Podust, L. M., Roy, S., & Ali, I. K. M. (2020). HMG-CoA reductase inhibitors as drug leads against *Naegleria fowleri*. *ACS Chem. Neurosci.*, **11**, 3089–3096. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00428>
- Debnath, A., Nelson, A. T., Silva-Olivares, A., Shibayama, M., Siegel, D., & McKerrow, J. H. (2018). In vitro efficacy of ebselen and BAY 11-7082 against *Naegleria fowleri*. *Front. Microbiol.*, **9**, 414. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00414>
- Debnath, A., Tunac, J. B., Galindo-Gómez, S., Silva-Olivares, A., Shibayama, M., & McKerrow, J. H. (2012). Corifungin, a new drug lead against *Naegleria*, identified from a high-throughput screen. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **56**, 5450–5457. <https://doi.org/10.1128/AAC.00643-12>
- Denisov, I. G., & Sligar, S. G. (2016). Nanodiscs for structural and functional studies of membrane proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **23**, 481–486. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3195>
- Denisov, I. G., & Sligar, S. G. (2017). Nanodiscs in membrane biochemistry and biophysics. *Chem. Rev.*, **117**, 4669–4713. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00690>
- Dong, J., Ding, X., & Wang, S. (2019). Purification of the recombinant green fluorescent protein from tobacco plants using alcohol/salt aqueous two-phase system and hydrophobic interaction chromatography. *BMC Biotechnol.*, **19**, 86. <https://doi.org/10.1186/s12896-019-0590-y>
- Dreyfus, M., & Ré Gnier, P. (2002). Minireview the poly(A) tail of mRNAs: Bodyguard in eukaryotes, scavenger in bacteria. *Cell*, **111**, 611–613. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01137-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01137-6)
- Early, A. E., & Williams, J. G. (1987). Two vectors which facilitate gene manipulation and a simplified transformation procedure for *Dictyostelium discoideum*. *Gene*, **59**, 99–106. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90270-8](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90270-8)
- Ecker, A., Lehane, A. M., Clain, J., & Fidock, D. A. (2012). PfCRT and its role in antimalarial drug resistance. *Trends Parasitol.*, **28**, 504–514. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.08.002>
- Eder, J., Sedrani, R., & Wiesmann, C. (2014). The discovery of first-in-class drugs: Origins and evolution. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **13**, 577–587. <https://doi.org/10.1038/nrd4336>
- Eichinger, L., & Rivero, F. (2013). *Dictyostelium discoideum* protocols. *Methods Mol. Biol.*, **983**. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-302-2>

- Eichinger, L., Pachebat, J. A., Glöckner, G., Rajandream, M.-A., Sucgang, R., Berriman, M., Song, J., Olsen, R., Szafranski, K., Xu, Q., Tunggal, B., Kummerfeld, S., Madera, M., Konfortov, B. A., Rivero, F., Bankier, A. T., Lehmann, R., Hamlin, N., Davies, R., ... Kuspa, A. (2005). The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *Nature*, **435**, 43–57. <https://doi.org/10.1038/nature03481>
- Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., & Magarvey, N. A. (2015). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 980–987. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.018>
- 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**, 17622–17630. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003801>
- Escrig, J. I., Hahn, H. J., & Debnath, A. (2020). Activity of auranofin against multiple genotypes of *Naegleria fowleri* and its synergistic effect with amphotericin B *In Vitro*. *ACS Chem. Neurosci.*, **11**, 2464–2471. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.0c00165>
- Fey, P., Kowal, A. S., Gaudet, P., Pilcher, K. E., & Chisholm, R. L. (2007). Protocols for growth and development of *Dictyostelium discoideum*. *Nat. Protoc.*, **2**, 1307–1316. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.178>
- Firnges, M. A., Lin, J. T., & Kinne, R. K. H. (2001). Functional asymmetry of the sodium-D-glucose cotransporter expressed in yeast secretory vesicles. *J. Membr. Bio.*, **179**, 143–153. <https://doi.org/10.1007/s002320010044>
- Fowler, M., & Carter, R. F. (1965). Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: A preliminary report. *Br. Med. J.*, **2**, 734–742. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5464.734-a>
- Fritz-Laylin, L. K., Prochnik, S. E., Ginger, M. L., Dacks, J. B., Carpenter, M. L., Field, M. C., Kuo, A., Paredes, A., Chapman, J., Pham, J., Shu, S., Neupane, R., Cipriano, M., Mancuso, J., Tu, H., Salamov, A., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S., ... Dawson, S. C. (2010). The genome of *Naegleria gruberi* illuminates early eukaryotic versatility. *Cell*, **140**, 631–642. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.032>
- Gharpure, R., Bliton, J., Goodman, A., Ali, I. K. M., Yoder, J., & Cope, J. R. (2021). Epidemiology and clinical characteristics of primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: A global review. *Clin. Infect. Dis.*, **73**, e19–e27. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa520>
- Gharpure, R., Gleason, M., Salah, Z., Blackstock, A. J., Hess-Homeier, D., Yoder, J. S., Ali, I. K. M., Collier, S. A., & Cope, J. R. (2021). Geographic range of recreational water-associated primary amebic meningoencephalitis, United States, 1978-2018. *Emerg. Infect. Dis.*, **27**, 271–274. <https://doi.org/10.3201/eid2701.202119>
- Golldack, A., Henke, B., Bergmann, B., Wiechert, M., Erler, H., Blancke Soares, A., Spielmann, T., & Beitz, E. (2017). Substrate-analogous inhibitors exert antimalarial action by targeting the *Plasmodium* lactate transporter PfFNT at nanomolar scale. *PLoS Pathog.*, **13**, e1006172. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006172>

- González-Robles, A., Salazar-Villatoro, L., Omaña-Molina, M., Lorenzo-Morales, J., & Martínez-Palomo, A. (2013). *Acanthamoeba royreba*: Morphological features and *in vitro* cytopathic effect. *Exp. Parasitol.*, **133**, 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2013.01.011>
- Gregorio, N. E., Levine, M. Z., & Oza, J. P. (2019). A user's guide to cell-free protein synthesis. In *Methods Protoc.*, **2**, 1–34. <https://doi.org/10.3390/mps2010024>
- Grinkova, Y. V., Denisov, I. G., & Sligar, S. G. (2010). Engineering extended membrane scaffold proteins for self-assembly of soluble nanoscale lipid bilayers. *Protein Eng. Des. Sel.*, **23**, 843–848. <https://doi.org/10.1093/protein/gzq060>
- Güémez, A., & García, E. (2021). Primary amoebic meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: Pathogenesis and treatments. *Biomol.*, **11**, 1320. <https://doi.org/10.3390/biom11091320>
- Guex, N., Peitsch, M. C., & Schwede, T. (2009). Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. *Electrophor.*, **30**, S162–S173. <https://doi.org/10.1002/elps.200900140>
- Hahn, H. J., & Debnath, A. (2020). In vitro evaluation of farnesyltransferase inhibitor and its effect in combination with 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase inhibitor against *Naegleria fowleri*. *Pathogens*, **9**, 689. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090689>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00375>
- Halestrap, A. P. (2012). The monocarboxylate transporter family—structure and functional characterization. *IUBMB Life*, **64**, 1–9. <https://doi.org/10.1002/iub.573>
- Halestrap, A. P., & Wilson, M. C. (2012). The monocarboxylate transporter family—role and regulation. *IUBMB Life*, **64**, 109–119. <https://doi.org/10.1002/iub.572>
- Hapuarachchi, S. V., Cobbold, S. A., Shafik, S. H., Dennis, A. S. M., McConville, M. J., Martin, R. E., Kirk, K., & Lehane, A. M. (2017). The malaria parasite's lactate transporter PfFNT is the target of antiplasmodial compounds identified in whole cell phenotypic screens. *PLoS Pathog.*, **13**, e1006180. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006180>
- Heaslip, A. T., Dzierszinski, F., Stein, B., & Hu, K. (2010). TgMORN1 is a key organizer for the basal complex of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.*, **6**, e1000754. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000754>
- Hellen, C. U. T. (2018). Translation termination and ribosome recycling in eukaryotes. *Cold Spring Harb. Protoc.*, **10**, a032656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032656>
- Helmstetter, F., Arnold, P., Höger, B., Petersen, L. M., & Beitz, E. (2019). Formate–nitrite transporters carrying nonprotonatable amide amino acids instead of a central histidine maintain pH-dependent transport. *J. Biol. Chem.*, **294**, 623–631. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006340>
- Helmstetter, F. (2019). Untersuchung der Abhängigkeit der Funktionalität von Formiat-Nitrit-Transportern vom zentralen Histidin. Dissertation. Kiel.

- Herman, E. K., Greninger, A., van der Giezen, M., Ginger, M. L., Ramirez-Macias, I., Miller, H. C., Morgan, M. J., Tsaousis, A. D., Velle, K., Vargová, R., Záhonová, K., Najle, S. R., MacIntyre, G., Muller, N., Wittwer, M., Zysset-Burri, D. C., Eliáš, M., Slamovits, C. H., Weirauch, M. T., ... Dacks, J. B. (2021). Genomics and transcriptomics yields a system-level view of the biology of the pathogen *Naegleria fowleri*. *BMC Biol.*, **19**, 142. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01078-1>
- Herman, E. K., Yiangou, L., Cantoni, D. M., Miller, C. N., Marciano-Cabral, F., Anthonyrajah, E., Dacks, J. B., & Tsaousis, A. D. (2018). Identification and characterisation of a cryptic golgi complex in *Naegleria gruberi*. *J. Cell Sci.*, **131**, jcs213306. <https://doi.org/10.1242/jcs.213306>
- Hoff, K. J., Lange, S., Lomsadze, A., Borodovsky, M., & Stanke, M. (2016). Braker1: Unsupervised RNA-seq-based genome annotation with GeneMark-ET and augustus. *Bioinformatics*, **32**, 767–769. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv661>
- Höger, B., Peifer, C., & Beitz, E. (2023). Cell-free production of fluorescent proteins for the discovery of novel ribosome-targeting antibiotics. *J. Microbiol. Methods*, **213**, 106814. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106814>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2016.06.008>
- Huynh, M. H., & Carruthers, V. B. (2022). *Toxoplasma gondii* excretion of glycolytic products is associated with acidification of the parasitophorous vacuole during parasite egress. *PLoS Pathog.*, **18**, e1010139. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010139>
- Jahangeer, M., Mahmood, Z., Munir, N., Waraich, U. e. A., Tahir, I. M., Akram, M., Ali Shah, S. M., Zulfqar, A., & Zainab, R. (2020). *Naegleria fowleri*: Sources of infection, pathophysiology, diagnosis, and management; a review. In *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **47**, 199–212. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13192>
- Jakobowska, I., Becker, F., Minguzzi, S., Hansen, K., Henke, B., Epalle, N. H., Beitz, E., & Hannus, S. (2021). Fluorescence cross-correlation spectroscopy yields true affinity and binding kinetics of plasmodium lactate transport inhibitors. *Pharmaceuticals*, **14**, 757. <https://doi.org/10.3390/ph14080757>
- Jamerson, M., Schmoyer, J. A., Park, J., Marciano-Cabral, F., & Cabral, G. A. (2017). Identification of *Naegleria fowleri* proteins linked to primary amoebic meningoencephalitis. *Microbiology*, **163**, 322–332. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000428>
- Journet, A., Klein, G., Brugière, S., Vandenbrouck, Y., Chapel, A., Kieffer, S., Bruley, C., Masselon, C., & Aubry, L. (2012). Investigating the macropinocytic proteome of *Dictyostelium* amoebae by high-resolution mass spectrometry. *Proteomics*, **12**, 241–245. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100313>

- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, **596**, 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kang, S. Y., Song, K. J., Jeong, S. R., Kim, J. H., Park, S., Kim, K., Kwon, M. H., & Shin, H. J. (2005). Role of the Nfa1 protein in pathogenic *Naegleria fowleri* cocultured with CHO target cells. *Clin. Vaccine. Immunol.*, **12**, 873–876. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.7.873-876.2005>
- Karlint, S., & Altschult, S. F. (1990). Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 2264–2268. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.6.2264>
- Kim, J. H., Jung, S. Y., Lee, Y. J., Song, K. J., Kwon, D., Kim, K., Park, S., Im, K. II, & Shin, H. J. (2008). Effect of therapeutic chemical agents in vitro and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **52**, 4010–4016. <https://doi.org/10.1128/AAC.00197-08>
- Kim, J. H., Lee, Y. J., Sohn, H. J., Song, K. J., Kwon, D., Kwon, M. H., Im, K. II, & Shin, H. J. (2008). Therapeutic effect of rokitamycin in vitro and on experimental meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **32**, 411–417. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.05.018>
- Kiselev, N. A., & Sherman, M. B. (1990). Negative staining of proteins. *Electron Microsc. Rev.*, **3**, 43–72. [https://doi.org/10.1016/0892-0354\(90\)90013-i](https://doi.org/10.1016/0892-0354(90)90013-i)
- Klebe, G. (2000). Recent developments in structure-based drug design. *J. Mol. Med.*, **78**, 269–281. <https://doi.org/10.1007/s001090000084>
- Kolb, H. C., Finn, M. G., & Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew. Chem.*, **40**, 2004–2021. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010601\)40:11%3C2004::aid-anie2004%3E3.0.co;2-5](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11%3C2004::aid-anie2004%3E3.0.co;2-5)
- Köpnick, A.-L., (2021). Fusion of human monocarboxylate transporter 1 with basigin and expression in *S. cerevisiae*: Is basigin more than a chaperone? Dissertation. Kiel.
- Koren, S., Walenz, B. P., Berlin, K., Miller, J. R., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2017). Canu: Scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Res.*, **27**, 722–736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>
- Kotov, V., Bartels, K., Veith, K., Josts, I., Subhramanyam, U. K. T., Günther, C., Labahn, J., Marlovits, T. C., Moraes, I., Tidow, H., Löw, C., & Garcia-Alai, M. M. (2019). High-throughput stability screening for detergent-solubilized membrane proteins. *Sci. Rep.*, **9**, 10379. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46686-8>
- Koutmou, K. S., Schuller, A. P., Brunelle, J. L., Radhakrishnan, A., Djuranovic, S., & Green, R. (2015). Ribosomes slide on lysine-encoding homopolymeric stretches. *Elife*, **4**, e05534. <https://doi.org/10.7554/eLife.05534.001>
- Kraft, F., & Kurth, I. (2019). Long-read sequencing in human genetics. *Med. Genet.*, **31**, 198–204. <https://doi.org/10.1007/s11825-019-0249-z>

- Krishna, S., Woodrow, J. C., Burchmore, S. J. R., Saliba, J. K. & Kirk, K. (2000). Hexose transport in asexual stages of *Plasmodium falciparum* and kinetoplastidae. *Parasitol. Today*, **16**, 516–521. [https://doi.org/10.1016/S0169-4758\(00\)01762-2](https://doi.org/10.1016/S0169-4758(00)01762-2)
- Labruyère, E., & Guillén, N. (2006). Host tissue invasion by *Entamoeba histolytica* is powered by motility and phagocytosis. *Arch. Med. Res.*, **37**, 252–257. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2005.10.005>
- Lamping, E., Monk, B. C., Niimi, K., Holmes, A. R., Tsao, S., Tanabe, K., Niimi, M., Uehara, Y., & Cannon, R. D. (2007). Characterization of three classes of membrane proteins involved in fungal azole resistance by functional hyperexpression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, **6**, 1150–1165. <https://doi.org/10.1128/EC.00091-07>
- Landfear, S. M. (2010). Transporters for drug delivery and as drug targets in parasitic protozoa. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **87**, 122–125. <https://doi.org/10.1038/clpt.2009.116>
- Lang, W., Yuan, C., Zhu, B., Pan, S., Liu, J., Luo, J., Nie, S., Zhu, Q., Lee, J. S., & Ge, J. (2019). Expanding the “minimalist” small molecule tagging approach to different bioactive compounds. *Org. Biomol. Chem.*, **17**, 3010–3017. <https://doi.org/10.1039/c8ob03175d>
- Lê, H. G., Kang, J. M., Vö, T. C., & Na, B. K. (2022). *Naegleria fowleri* cathepsin B induces a pro-inflammatory immune response in BV-2 microglial cells via NF-κB and AP-1 dependent-MAPK signaling pathway. *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 8388. <https://doi.org/10.3390/ijms23158388>
- Leal dos Santos, D., Chaúque, B. J. M., Virginio, V. G., Cossa, V. C., Pettan-Brewer, C., Schrekker, H. S., & Rott, M. B. (2022). Occurrence of *Naegleria fowleri* and their implication for health - a look under the one health approaches. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, **246**, 114053. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2022.114053>
- Lee, S. H., Hayes, D. B., Rebowski, G., Tardieux, I., & Dominguez, R. (2007). Toxofilin from *Toxoplasma gondii* forms a ternary complex with an antiparallel actin dimer. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 16122–16127. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705794104>
- Li, Z., Hao, P., Li, L., Tan, C. Y. J., Cheng, X., Chen, G. Y. J., Sze, S. K., Shen, H. M., & Yao, S. Q. (2013). Design and synthesis of minimalist terminal alkyne-containing diazirine photocrosslinkers and their incorporation into kinase inhibitors for cell- and tissue-based proteome profiling. *Angew. Chem.*, **52**, 8551–8556. <https://doi.org/10.1002/anie.201300683>
- Liechti, N., Schürch, N., Bruggmann, R., & Wittwer, M. (2018). The genome of *Naegleria lovaniensis*, the basis for a comparative approach to unravel pathogenicity factors of the human pathogenic amoeba *N. fowleri*. *BMC Genom.*, **19**, 654. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4994-1>
- Liechti, N., Schürch, N., Bruggmann, R., & Wittwer, M. (2019). Nanopore sequencing improves the draft genome of the human pathogenic amoeba *Naegleria fowleri*. *Sci. Rep.*, **9**, 16040. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52572-0>
- Loman, N. J., Quick, J., & Simpson, J. T. (2015). A complete bacterial genome assembled de novo using only nanopore sequencing data. *Nat. Methods*, **12**, 733–735. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3444>

- Lü, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Wacker, T., Andrade, S. L. A., & Einsle, O. (2013). The formate/nitrite transporter family of anion channels. *Biol. Chem.*, **394**, 715–727. <https://doi.org/10.1515/hsz-2012-0339>
- Lü, W., Du, J., Wacker, T., Gerbig-Smentek, E., Andrade, S. L. A., & Einsle, O. (2011). pH-dependent gating in a FocA formate channel. *Science*, **332**, 352–354. <https://doi.org/10.1126/science.1199098>
- Lyu, M., Su, C., Kazura, J. W., & Yu, E. W. (2021). Structural basis of transport and inhibition of the *Plasmodium falciparum* transporter PfFNT. *EMBO Rep.*, **22**, e51628. <https://doi.org/10.15252/embr.202051628>
- Maciver, S. K., Piñero, J. E., & Lorenzo-Morales, J. (2020). Is *Naegleria fowleri* an emerging parasite? *Trends Parasitol.*, **36**, 19–28. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.008>
- Maeda, M., Sakamoto, H., Iranfar, N., Fuller, D., Maruo, T., Ogihara, S., Morio, T., Urushihara, H., Tanaka, Y., & Loomis, W. F. (2003). Changing patterns of gene expression in *Dictyostelium* prestalk cell subtypes recognized by in situ hybridization with genes from microarray analyses. *Eukaryot. Cell*, **2**, 627–637. <https://doi.org/10.1128/EC.2.3.627-637.2003>
- Manni, M., Berkeley, M. R., Seppey, M., Simão, F. A., & Zdobnov, E. M. (2021). BUSCO Update: Novel and streamlined workflows along with broader and deeper phylogenetic coverage for scoring of eukaryotic, prokaryotic, and viral genomes. *Mol. Biol. Evol.*, **38**, 4647–4654. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab199>
- Marchetti, R. V., Lehane, A. M., Shafik, S. H., Winterberg, M., Martin, R. E., & Kirk, K. (2015). A lactate and formate transporter in the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Nat. Commun.*, **6**, 6721. <https://doi.org/10.1038/ncomms7721>
- Mariani, V., Biasini, M., Barbato, A., & Schwede, T. (2013). IDDT: a local superposition-free score for comparing protein structures and models using distance difference tests. *Bioinformatics*, **29**, 2722–2728. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt473>
- Martin, R. E., Marchetti, R. V., Cowan, A. I., Howitt, S. M., Bröer, S., & Kirk, K. (2009). Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science*, **325**, 1680–1682. <https://doi.org/10.1126/science.1175667>
- Martin, J. & Sawyer, A. (2019). Elucidating the structure of membrane proteins. *Biotechniques*, **66**, 167–170. <https://doi.org/10.2144/btn-2019-0030>
- McKerrow, J. H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P., & Sajid, M. (2006). Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, **1**, 497–536. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100151>
- Milanes, J. E., Kwain, S., Drawdy, A., Dodson, L., Monaghan, M. T., Rice, C. A., Dominy, B. N., Whitehead, D. C., & Morris, J. C. (2024). Glucose metabolism in the pathogenic free-living amoebae: Tempting targets for treatment development. *Chem. Biol. Drug Des.*, **103**, e14377. <https://doi.org/10.1111/cbdd.14377>

- Milanes, J. E., Suryadi, J., Abendroth, J., Van Voorhis, W. C., Barrett, K. F., Dranow, D. M., Phan, I. Q., Patrick, S. L., Rozema, S. D., Khalifa, M. M., Golden, J. E., & Morris, J. C. (2019). Enzymatic and structural characterization of the *Naegleria fowleri* glucokinase. *J. Antimicrob. Chemother.*, **63**, e02410-18. <https://doi.org/10.1128/AAC>
- Milne, R., Wiedemar, N., Corpas-Lopez, V., Moynihan, E., Wall, R. J., Dawson, A., Robinson, D. A., Shepherd, S. M., Smith, R. J., Hallyburton, I., Post, J. M., Dowers, K., Torrie, L. S., Gilbert, I. H., Baragaña, B., Patterson, S., & Wyllie, S. (2022). Toolkit of approaches to support target-focused drug discovery for *Plasmodium falciparum* lysyl tRNA synthetase. *Infect Dis.*, **8**, 1727–1974. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.2c00364>
- Mishra, M., Panda, S., Barik, S., Sarkar, A., Singh, D. V., & Mohapatra, H. (2020). Antibiotic resistance profile, outer membrane proteins, virulence factors and genome sequence analysis reveal clinical isolates of enterobacter are potential pathogens compared to environmental isolates. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **10**, 54. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00054>
- Mukherjee, M., Vajpai, M., & Sankararamakrishnan, R. (2017). Anion-selective formate/nitrite transporters: Taxonomic distribution, phylogenetic analysis and subfamily-specific conservation pattern in prokaryotes. *BMC Genom.*, **18**, 560. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3947-4>
- Müller-Lucks, A., Bock, S., Wu, B., & Beitz, E. (2012). Fluorescent in situ folding control for rapid optimization of cell-free membrane protein synthesis. *PLoS One*, **7**, e42186. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042186>
- Nerlich, C., Epalle, N. H., Seick, P., & Beitz, E. (2021). Discovery and development of inhibitors of the plasmodial FNT-type lactate transporter as novel antimalarials. In *Pharmaceuticals* (Vol. 14, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ph14111191>
- Newby, Z. E. R., O'Connell, J. D., Gruswitz, F., Hays, F. A., Harries, W. E. C., Harwood, I. M., Ho, J. D., Lee, J. K., Savage, D. F., Miercke, L. J. W., & Stroud, R. M. (2009). A general protocol for the crystallization of membrane proteins for X-ray structural investigation. *Nat. Protoc.*, **4**, 619–637. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.27>
- Ohgusu, Y., Ohta, K., Ishii, M., Katano, T., Urano, K., Watanabe, J., Inoue, K. & Yuasa, H. (2008). Functional characterization of human aquaporin 9 as a facilitative glycerol carrier. *Drug. Metab. Pharmacokinet.*, **23**, 279–284. <https://doi.org/10.2133/dmpk.23.279>
- Opperdoes, F. R., De Jonckheere, J. F., & Tielens, A. G. M. (2011). *Naegleria gruberi* metabolism. *Int. J. Parasitol.*, **41**, 915–924. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.04.004>
- Overington, J. P., Al-Lazikani, B., & Hopkins, A. L. (2006). How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 993–996. <https://doi.org/10.1038/nrd2199>
- Paiva, S., Devaux, F., Barbosa, S., Jacq, C., & Casal, M. (2004). Ady2p is essential for the acetate permease activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **21**, 201–210. <https://doi.org/10.1002/yea.1056>
- Pang, K. M., Lynes, M. A., & Knecht, D. A. (1999). Variables controlling the expression level of exogenous genes in *Dictyostelium*. *Plasmid*, **41**, 187–197. <https://doi.org/10.1006/plas.1999.1391>

- Peng, X., Wang, N., Zhu, A., Xu, H., Li, J., Zhou, Y., Wang, C., Xiao, Q., Guo, L., Liu, F., Jia, Z. J., Duan, H., Hu, J., Yuan, W., Geng, J., Yan, C., Jiang, X., & Deng, D. (2021). Structural characterization of the *Plasmodium falciparum* lactate transporter PfFNT alone and in complex with antimalarial compound MMV007839 reveals its inhibition mechanism. *PLoS Biol.*, **19**, e3001386. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001386>
- Pertea, M., Shumate, A., Pertea, G., Varabyou, A., Breitwieser, F. P., Chang, Y. C., Madugundu, A. K., Pandey, A., & Salzberg, S. L. (2018). Chess: A new human gene catalog curated from thousands of large-scale RNA sequencing experiments reveals extensive transcriptional noise. *Genome Biol.*, **19**, 208. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1590-2>
- Pingoud, A., & Jeltsch, A. (2001). Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 3705–3727. <https://doi.org/10.1093/nar/29.18.3705>
- Poespoprodjo, J. R., Douglas, N. M., Ansong, D., Kho, S., & Anstey, N. M. (2023). Malaria. *Lancet*, **402**, 2328–2345. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)01249-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)01249-7)
- Powell, J. R. (2019). An evolutionary perspective on vector-borne diseases. *Front. Genet.*, **10**, 1266. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01266>
- Puthenveetil, R., & Vinogradova, O. (2013). Optimization of the design and preparation of nanoscale phospholipid bilayers for its application to solution NMR. *Proteins*, **81**, 1222–1231. <https://doi.org/10.1002/prot.24271>
- Rabinowitz, J. D., & Enerbäck, S. (2020). Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. *Nat Metab.*, **2**, 566–571. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0243-4>
- Rajendran, K., Ahmed, U., Meunier, A. C., Shaikh, M. F., Siddiqui, R., & Anwar, A. (2023). Natural terpenes inhibit the cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* causing primary amoebic meningoencephalitis in the human cell line model. *ACS Chem. Neurosci.*, **14**, 4105–4114. <https://doi.org/10.1021/acscchemneuro.3c00258>
- Rambow, J. (2015). Characterization of PfFNT-a lactate transporter in *Plasmodium falciparum*. Dissertation. Kiel.
- Rath, A., & Deber, C. M. (2013). Correction factors for membrane protein molecular weight readouts on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **434**, 67–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.11.007>
- Rebbeor, J. F., Connolly, G. C., Dumont, M. E., & Ballatori, N. (1998). ATP-dependent transport of reduced glutathione in yeast secretory vesicles. *Biochem. J.*, **334**, 723–729. <https://doi.org/10.1042/bj3340723>
- Risco-Castillo, V., Topçu, S., Marinach, C., Manzoni, G., Bigorgne, A. E., Briquet, S., Baudin, X., Lebrun, M., Dubremetz, J. F., & Silvie, O. (2015). Malaria sporozoites traverse host cells within transient vacuoles. *Cell Host Microbe*, **18**, 593–603. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.10.006>
- Rizo-Liendo, A., Sifaoui, I., Reyes-Batlle, M., Chiboub, O., Rodríguez-Expósito, R. L., Bethencourt-Estrella, C. J., Nicolás-Hernández, D. S., Hendiger, E. B., López-Arencibia, A., Rocha-Cabrera, P., Piñero, J. E., & Lorenzo-Morales, J. (2019). In vitro activity of statins against *Naegleria fowleri*. *Pathogens*, **8**, 122. <https://doi.org/10.3390/pathogens8030122>

- RKI, (2024). Malaria. Infektionsschutz RKI-Ratgeber. Berlin, Deutschland. Robert Koch-Institut.
- Roiko, M. S., Svezhova, N., & Carruthers, V. B. (2014). Acidification activates *Toxoplasma gondii* motility and egress by enhancing protein secretion and cytolytic activity. *PLoS Pathog.*, **10**, e1004488. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004488>
- RTS,S, Clinical Trials Partnership (2015). Efficacy and safety of RTS,S/AS01 malaria vaccine with or without a booster dose in infants and children in Africa: Final results of a phase 3, individually randomised, controlled trial. *Lancet*, **386**, 31–45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60721-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60721-8)
- Rues, R.-B., Gräwe, A., Henrich, E. & Bernhard, F. (2017). Heterologous Gene Expression in *E. coli*: Methods and Protocols. *Methods Mol. Biol.*, **1586**, 219–312. <http://doi.org/10.1007/978-1-4939-6887-9>
- Rycovska-Blume, A., Lü, W., Andrade, S., Fendler, K., & Einsle, O. (2015). Structural and functional studies of NirC from *Salmonella typhimurium*. *Methods Enzymol.*, **556**, 475–497. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.12.034>
- Saito-Nakano, Y., Wahyuni, R., Nakada-Tsukui, K., Tomii, K., & Nozaki, T. (2021). Rab7D small GTPase is involved in phago-, trogocytosis and cytoskeletal reorganization in the enteric protozoan *Entamoeba histolytica*. *Cell. Microbiol.*, **23**, e14267. <https://doi.org/10.1111/cmi.13267>
- Salzberg, S. L. (2019). Next-generation genome annotation: We still struggle to get it right. In *Genome Biol.*, **20**, 92. <https://doi.org/10.1186/s13059-019-1715-2>
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **74**, 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
- Sant, D. G., Tupe, S. G., Ramana, C. V., & Deshpande, M. V. (2016). Fungal cell membrane—promising drug target for antifungal therapy. *J. Appl. Microbiol.*, **121**, 1498–1510. <https://doi.org/10.1111/jam.13301>
- Sarin, M. J., Tielens, A. G. M., Verbon, A., Sutak, R., & Van Hellemond, J. J. (2020). Inhibition of fatty acid oxidation as a new target to treat primary amoebic meningoencephalitis. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **64**, e00344-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00344-20>
- Sayers, E. W., Bolton, E. E., Brister, J. R., Canese, K., Chan, J., Comeau, D. C., Connor, R., Funk, K., Kelly, C., Kim, S., Madej, T., Marchler-Bauer, A., Lanczycki, C., Lathrop, S., Lu, Z., Thibaud-Nissen, F., Murphy, T., Phan, L., Skripchenko, Y., ... Sherry, S. T. (2022). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.*, **50**, D20–D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>
- Sazzad, H. M. S., Luby, S. P., Sejvar, J., Rahman, M., Gurley, E. S., Hill, V., Murphy, J. L., Roy, S., Cope, J. R., & Ali, I. K. M. (2020). A case of primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in Bangladesh. *Parasitol. Res.*, **119**, 339–344. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06463-y>
- Schachner, E., Aschhoff, H.-J., & Kersten, H. (1984). Specific changes in lactate levels, lactate dehydrogenase patterns and cytochrome b<sub>559</sub> in *Dictyostelium discoideum* caused by queuine. *Eur. J. Biochem.*, **139**, 481–487. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08031.x>

- Schuster, F. L., Guglielmo, B. J., & Visvesvara, G. S. (2006). In-vitro activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free-living amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp., and *Naegleria fowleri*. *J. Eukaryot. Microbiol.*, **53**, 121–126. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00082.x>
- Schuster, F. L., & Rechthand, E. (1975). In vitro effects of amphotericin B on growth and ultrastructure of the amoeboflagellates *Naegleria gruberi* and *Naegleria fowleri*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, **8**, 591–605. <https://doi.org/10.1128/aac.8.5.591>
- Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frölich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2007b). Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat. Protoc.*, **2**, 2945–2957. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.426>
- Schwarz, D., Klammt, C., Koglin, A., Löhr, F., Schneider, B., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2007a). Preparative scale cell-free expression systems: New tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods*, **41**, 355–369. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.001>
- Sejwal, K., Chami, M., Baumgartner, P., Kowal, J., Müller, S. A., & Stahlberg, H. (2017). Proteoliposomes - A system to study membrane proteins under buffer gradients by cryo-EM. *Nanotechnol. Rev.*, **6**, 57–74. <https://doi.org/10.1515/ntrev-2016-0081>
- Sharma, V., Madia, V. N., Tudino, V., Nguyen, J. V., Debnath, A., Messori, A., Ialongo, D., Patacchini, E., Palenca, I., Basili Franzin, S., Seguella, L., Esposito, G., Petrucci, R., Di Matteo, P., Bortolami, M., Saccoliti, F., Di Santo, R., Scipione, L., Costi, R., & Podust, L. M. (2023). Miconazole-like scaffold is a promising lead for *Naegleria fowleri*-specific CYP51 Inhibitors. *J. Med. Chem.*, **66**, 17059–17073. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.3c01898>
- Siddiqui, R., Ali, I. K. M., Cope, J. R., & Khan, N. A. (2016). Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. *Acta Trop.*, **164**, 375–394. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.009>
- Sillo, A., Bloomfield, G., Balest, A., Balbo, A., Pergolizzi, B., Peracino, B., Skelton, J., Ivens, A., & Bozzaro, S. (2008). Genome-wide transcriptional changes induced by phagocytosis or growth on bacteria in *Dictyostelium*. *BMC Genom.*, **9**, 291. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-291>
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, **31**, 3210–3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>
- Smith, E., & Collins, I. (2015). Photoaffinity labeling in target-and binding-site identification. *Future Med. Chem.*, **7**, 159–183. <https://doi.org/10.4155/fmc.14.152>
- Smith, R. J., Milne, R., Lopez, V. C., Wiedemar, N., Dey, G., Syed, A. J., Patterson, S., & Wyllie, S. (2023). Chemical pulldown combined with mass spectrometry to identify the molecular targets of antimalarials in cell-free lysates. *STAR Protoc.*, **4**, 102002. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.102002>
- Sohn, H. J., Kim, J. H., Kim, K., Park, S., & Shin, H. J. (2023). De novo transcriptome profiling of *Naegleria fowleri* trophozoites and cysts via RNA Sequencing. **12**, 174. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020174>

- Sohn, H. J., Kim, J. H., Shin, M. H., Song, K. J., & Shin, H. J. (2010). The *Nf-actin* gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Parasitol. Res.*, **106**, 917–924. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1760-y>
- Strop, P., & Brunger, A. T. (2005). Refractive index-based determination of detergent concentration and its application to the study of membrane proteins. *Protein Sci.*, **14**, 2207–2211. <https://doi.org/10.1110/ps.051543805>
- Studer, G., Biasini, M., & Schwede, T. (2014). Assessing the local structural quality of transmembrane protein models using statistical potentials (QMEANBrane). *Bioinformatics*, **30**, i505–i511. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu457>
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumieny, R., Haas, J., & Schwede, T. (2020). QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. *Bioinformatics*, **36**, 1765–1771. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>
- Studer, G., Tauriello, G., Bienert, S., Biasini, M., Johnner, N., & Schwede, T. (2021). ProMod3 - A versatile homology modelling toolbox. *PLoS Comput. Biol.*, **17**, e1008667. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1008667>
- Suppmann, B., & Sawers, G. (1994). Isolation and characterization of hypophosphite-resistant mutants of *Escherichia coli*: identification of the FocA protein, encoded by the pfl operon, as a putative formate transporter. *Mol. Microbiol.*, **11**, 965–982. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00375.x>
- Swinney, D. C. (2013). Phenotypic vs. target-based drug discovery for first-in-class medicines. *Clin. Pharmacol. Ther.*, **93**, 299–301. <https://doi.org/10.1038/clpt.2012.236>
- Swinney, D. C., & Anthony, J. (2011). How were new medicines discovered? *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 507–519. <https://doi.org/10.1038/nrd3480>
- Tan, E., Chin, C. S. H., Lim, Z. F. S., & Ng, S. K. (2021). HEK293 cell line as a platform to produce recombinant proteins and viral vectors. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>
- Tavares, P., Rigother, M. C., Khun, H., Roux, P., Huerre, M., & Guillén, N. (2005). Roles of cell adhesion and cytoskeleton activity in *Entamoeba histolytica* pathogenesis: A delicate balance. *Infect. Immun.*, **73**, 1771–1778. <https://doi.org/10.1128/iai.73.3.1771-1778.2005>
- The Molecular Probes® Handbook*. A Guide to fluorescent probes and labeling technologies. (2010). *molecular probes*, **11**. ISBN-13: 978-0982927915
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Tillery, L., Barrett, K., Goldstein, J., Lassner, J. W., Osterhout, B., Tran, N. L., Xu, L., Young, R. M., Craig, J., Chun, I., Dranow, D. M., Abendroth, J., Delker, S. L., Davies, D. R., Mayclin, S. J., Calhoun, B., Bolejack, M. J., Staker, B., Subramanian, S., ... Van Voorhis, W. C. (2021). *Naegleria fowleri*: Protein structures to facilitate drug discovery for the deadly, pathogenic free-living amoeba. *PLoS One*, **16**, e0241738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241738>

- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Zidek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res.*, **50**, D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Veltman, D. M., Akar, G., Bosgraaf, L., & Van Haastert, P. J. M. (2009). A new set of small, extrachromosomal expression vectors for *Dictyostelium discoideum*. *Plasmid*, **61**, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2008.11.003>
- Visvesvara, G. S. (2010). Free-Living amebae as opportunistic agents of human disease. *J. Neuroparasitology*, **1**, N100802. <https://doi.org/10.4303/jnp/N100802>
- Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *Pathog. Dis.*, **50**, 1–26. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x>
- Waight, A. B., Czyzewski, B. K., & Wang, D. N. (2013). Ion selectivity and gating mechanisms of FNT channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **23**, 499–506. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2013.05.007>
- Waight, A. B., Love, J., & Wang, D. N. (2010). Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 31–38. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1740>
- Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C. A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S. K., & Earl, A. M. (2014). Pilon: An integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*, **9**, e112963. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963>
- Walloch, P., Hansen, C., Priegann, T., Schade, D., & Beitz, E. (2021). Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-ones potently inhibit FNT-type lactate transporters from all five human-pathogenic *Plasmodium* species. *ChemMedChem*, **16**, 1283–1289. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000952>
- Walloch, P., Henke, B., Häuer, S., Bergmann, B., Spielmann, T., & Beitz, E. (2020). Introduction of scaffold nitrogen atoms renders inhibitors of the malarial L-lactate transporter, PfFNT, Effective against the Gly107Ser resistance mutation. *J. Med. Chem.*, **63**, 9731–9741. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00852>
- Walloch, P. (2021). Charakterisierung und Inhibition humaner und plasmoidaler Lactat-Transporter unter besonderer Berücksichtigung der Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-one. Dissertation. Kiel.
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.*, **46**, W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- White, N. J., Pukrittayakamee, S., Hien, T. T., Faiz, M. A., Mokuolu, O. A., & Dondorp, A. M. (2014). Malaria. *Lancet*, **383**, 723–735. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)60024-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60024-0)

- WHO (2020) Ethics and vector-borne diseases: WHO guidance. *WHO guidelines*, Geneva, Switzerland: World Health Organization, **ISBN**: 978 92 4-001273 8
- WHO (2021) Full evidence report in the RTS,S/AD01 malaria vaccine. *Background Paper*. Geneva, Switzerland, World Health Organization. [https://www.who.int/news-room/events/detail/2021/10/04/default-calendar/sage\\_meeting\\_october\\_2021](https://www.who.int/news-room/events/detail/2021/10/04/default-calendar/sage_meeting_october_2021)
- WHO (2022). World malaria report 2022. WHO global report, Geneva, Switzerland: World Health Organization, **ISBN**: 978 92 4 006489 8
- Wiechert, M. (2017). Transportmechanismus und Selektivität der Formiat-Nitrit-Transporter. Dissertation. Kiel.
- Wiechert, M., & Beitz, E. (2017a). Formate-nitrite transporters: Monoacids ride the dielectric slide. *Channels*, **11**, 365–367. <https://doi.org/10.1080/19336950.2017.1329999>
- Wiechert, M., & Beitz, E. (2017b). Mechanism of formate–nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *EMBO J.*, **36**, 949–958. <https://doi.org/10.15252/embj.201695776>
- Wiechert, M., Erler, H., Golldack, A., & Beitz, E. (2017c). A widened substrate selectivity filter of eukaryotic formate-nitrite transporters enables high-level lactate conductance. *FEBS J.*, **284**, 2663–2673. <https://doi.org/10.1111/febs.14117>
- Wiles, N. S., Eristi, C. M., Joyce, B. R., & Rutherford, C. L. (2006). Identification and purification of a DNA-binding protein interacting with the promoter of 5'-nucleotidase in *Dictyostelium discoideum*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **445**, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.11.008>
- Wu, B., Rambow, J., Bock, S., Holm-Bertelsen, J., Wiechert, M., Soares, A. B., Spielmann, T., & Beitz, E. (2015). Identity of a *Plasmodium* lactate/H<sup>+</sup> symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat. Commun.*, **6**, 6284. <https://doi.org/10.1038/ncomms7284>
- Wyss, M. T., Magistretti, P. J., Buck, A., & Weber, B. (2011). Labeled acetate as a marker of astrocytic metabolism. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **31**, 1668–1674. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2011.84>
- Yoder, J. S., Straif-Bourgeois, S., Roy, S. L., Moore, T. A., Visvesvara, G. S., Ratard, R. C., Hill, V. R., Wilson, J. D., Linscott, A. J., Crager, R., Kozak, N. A., Sriram, R., Narayanan, J., Mull, B., Kahler, A. M., Schneeberger, C., Da Silva, A. J., Poudel, M., Baumgarten, K. L., ... Beach, M. J. (2012). Primary amebic meningoencephalitis deaths associated with sinus irrigation using contaminated tap water. *Clin. Infect. Dis.*, **55**, e79–e85. <https://doi.org/10.1093/cid/cis626>
- Yuan, A., Fong, H., Nguyen, J. V., Nguyen, S., Norman, P., Cullum, R., Fenical, W., & Debnath, A. (2023). High-throughput screen of microbial metabolites identifies F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase inhibitors as new leads for *Naegleria fowleri* infection. *ACS Infect. Dis.*, **9**, 2622–2631. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.3c00437>
- Zemella, A., Thoring, L., Hoffmeister, C., & Kubick, S. (2015). Cell-Free Protein Synthesis: Pros and cons of prokaryotic and eukaryotic systems. *ChemBioChem.*, **16**, 2420–2431. <https://doi.org/10.1002%2Fcbic.201500340>

- Zeng, J. M., Hapuarachchi, S. V., Shafik, S. H., Martin, R. E., Kirk, K., van Dooren, G. G., & Lehane, A. M. (2021). Identifying the major lactate transporter of *Toxoplasma gondii* tachyzoites. *Sci. Rep.*, **11**, 6787. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-86204-3>
- Zhou, W., Debnath, A., Jennings, G., Hahn, H. J., Vanderloop, B. H., Chaudhuri, M., Nes, W. D., & Podust, L. M. (2018). Enzymatic chokepoints and synergistic drug targets in the sterol biosynthesis pathway of *Naegleria fowleri*. *PLoS Pathog.*, **14**, e1007245. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007245>
- Zyserman, I., Mondal, D., Sarabia, F., McKerrow, J. H., Roush, W. R., & Debnath, A. (2018). Identification of cysteine protease inhibitors as new drug leads against *Naegleria fowleri*. *Exp. Parasitol.*, **188**, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2018.03.010>
- Zysset-Burri, D. C., Müller, N., Beuret, C., Heller, M., Schürch, N., Gottstein, B., & Wittwer, M. (2014). Genome-wide identification of pathogenicity factors of the free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *BMC Genom.*, **15**, 496. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-496>

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Dissertation abgesehen von der Beratung durch den Betreuer nur mit den hier angegebenen Quellen und Hilfsmitteln selbstständig verfasst habe. Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft entstanden. Ich versichere des Weiteren, dass mir noch kein akademischer Grad entzogen wurde. Diese Arbeit wurde noch in keinem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt und ist in Teilen bereits veröffentlicht worden:

### Posterbeitrag:

Möller, M., Nguyen, J.V., Debnath, A. & Beitz, E. (2023). Formate-Nitrite-Transporter of *Naegleria fowleri*: potential drug targets? 10<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists 2023, Hamburg, Deutschland.

**Moira Maureen Möller**

Kiel, den 26.03.2024



## Danksagung

Ich möchte mich gerne bei Prof. Dr. Eric Beitz für die Möglichkeit bedanken in seinem Arbeitskreis und insbesondere an diesem spannenden Thema geforscht haben zu dürfen. Ein großes Dankeschön auch für deine stets offene Tür und deine Unterstützung.

Ein großes Dankeschön gilt auch all den guten Seelen im pharmazeutischen Institut. Susanne, Thomas, Jan-Philipp, Kalle, Dirk. Vielen Dank, dass ihr euch sofort kümmert, wenn das Fledermausgehör irgendwelche hohen Pieptöne ortet oder um all die anderen Dinge, bei denen wir ohne euch aufgeschmissen wären.

Dr. Christine Desel gilt mein Dank für die Unterstützung bei den Aufnahmen der konfokalmikroskopischen Bildern.

Thanks a lot to Dr. Anjan Debnath for testing all the compounds on the parasites in culture. I hope those cooperation goes on.

Bei Anna Fuchs und Björn Henke bedanke ich mich für die technische Unterstützung. Vielen Dank Anna, dass du in den letzten Wochen noch so viel für mich kloniert hast. Björn danke ich für all seine Hilfe bei den Inhibitoren und die immer verlässliche Unterstützung in der Lehre.

Hier möchte ich mich auch bei den Assistenten des fünften Semesters bedanken. Vielen Dank, dass wir uns immer so gut aufeinander verlassen konnten, den Rücken freigehalten haben und die vielen guten Praktikumsgeschichten.

Besonders möchte ich mich bei meinem Arbeitskreis bedanken. Ich bin jeden Tag gerne zur Arbeit gekommen und ihr wart daran nicht ganz unschuldig. Mit euch gab es stets was zu lachen und der Bürosport war es immer wert länger zu bleiben. Christian danke ich besonders für seine gewissenhafte Einarbeitung und dass er ein guter Gegenpol zu meiner ungeduldigen Art war. Danke für deine Geduld und auch, dass ihr mich immer so unfassbar gut aufs Korn genommen habt. Unvergessen wird deine Oskarreife Vorstellung in meiner zweiten Woche bleiben... Jana und Katha danke ich fürs Einarbeiten, insbesondere ins Isotopenlabor, euer immer offenes Ohr und das Teilen eurer Erfahrungen. Meinem Laborpartner Nathan möchte ich auch für seine allgegenwärtige Hilfsbereitschaft und die Zusammenarbeit danken. Sehr gefreut habe ich mich über die Triathlon-Crew, die sich zusammengefunden hat. Ich hoffe auf eine Wiederholung und danke Malte für seine Nachsicht im Schwimmtraining. Ein danke auch an „liebe Alle“ aus dem Soziraum, mit euch wurden die Mittagspausen zum Tageshighlight und danke, dass ihr mich gelegentlich auch mal zum Pause machen gezwungen habt.

Liebe Ina, lieber Eike, liebe Charlotte und liebe Alle vom Heidkatenhof, ich danke euch für die schöne Zeit und die tolle Gemeinschaft auf dem Hof. Es war gut zu wissen, dass die Pferde bei euch immer top versorgt waren und ich auch spontan um Hilfe bitten konnte. Ich bin immer gerne gekommen.

Bei meinen Freunden möchte ich mich dafür danken, dass ihr noch immer meine Freunde seid, obwohl ich im letzten Jahr so sehr abgetaucht bin, dass wir uns kaum gesehen haben. Liebe Annika, liebe Anna, danke, dass ihr immer da seid und ich mich zu 100 % auf euch verlassen kann, wenn die Hütte mal so richtig brennt. Liebe Cathia, danke, dass du dich, wenn ich mal nicht konnte um Petri gekümmert hast und für die vielen schönen Wochenenden und so viel mehr. Auf dass davon jetzt wieder mehr möglich ist. In diesem Zuge möchte ich mich

## Danksagung

auch bei deinen Eltern Ute und Bernd bedanken. Vielen Dank, dass auch ihr immer unterstützt habt und ich so oft bei euch willkommen bin.

Ein riesen-riesengroßes Dankeschön an meine Korrekturleser:innen Maïke, Cornelius, Malte, Anna-Lena und Basti! Ihr habt auf jeden Fall was gut bei mir und habt wirklich wahnsinnig doll geholfen.

Lieber Basti, ich kann kaum in Worte fassen, wie dankbar ich dir bin und wie sehr du mir geholfen und den Rücken freigehalten hast. Auch dir danke ich für die Einarbeitung ins Labor und die tolle Zeit im Arbeitskreis und die langen S30-Extrakt-Tage! Noch viel glücklicher bin ich aber, dass du an meiner Seite bist und das gemeinsam mit mir durchgehalten hast. Danke für die vielen Abende, die du mich mit spontanen Tanzeinlagen aufgemuntert hast und all die anderen Unternehmungen und Lacher. Danke, dass du mich und meine Macken mit deinen ergänzt. Auf alles was noch kommt, wofür ich nicht die Worte habe.

Zuletzt möchte ich mich noch ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir immer so bedingungslos den Rücken freigehalten haben und es mir überhaupt erst ermöglicht haben, es bis hierhin zu schaffen. Ihr seid die besten! Auch hierfür habe ich kaum die richtigen Worte. Ohne euch wäre so vieles nicht möglich gewesen und es tut gut zu wissen, dass ihr immer da seid, an mich glaubt und ein Zuhause bereithaltet. Vielen Dank auch für die stets offene Telefon-Hotline wenn ich auf dem Weg zum Stall bin. Lieber Papa, vielen Dank für alles in den letzten 30 Jahren was nicht in Worte zu fassen ist und ganz aktuell, dass du dich so gut um Kurt kümmerst und er bei euch so gut aufgehoben ist. Liebe Mama, vielen Dank für deine bedingungslose Unterstützung und das Vorleben deiner anpackenden, überschwänglichen und positiven Art. Euch ist diese Arbeit gewidmet. Ich hab euch lieb.