

Produktion funktionaler Pentamere des plasmodialen
Lactattransportproteins PfFNT zur Strukturuntersuchung
und phänotypischen Wirkstofftestung

Dissertation

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

vorgelegt von

Christian Hansen

im April 2024

Erstgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Eric Beitz
Zweitgutachter:	Prof. Dr. rer. nat. Axel Scheidig
Tag der mündlichen Prüfung:	14.05.2024
Zum Druck genehmigt am:	14.05.2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	IX
Summary	XI
1 Einleitung	1
1.1 Strukturaufklärung von Membranproteinen zur Entwicklung neuer Wirkstoffe	1
1.2 Relevanz plasmodialer Transportproteine als Targets für die Malaria-therapie	5
1.3 Der Weg zur PfFNT-Proteinstruktur und Einordnung des PfFNT	11
1.4 Fortschritte bei der Optimierung von PfFNT-Inhibitoren	15
1.5 Zielsetzung der Arbeit	19
2 Material	21
2.1 Geräte	21
2.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.3 Antikörper	22
2.4 Kits und Marker	23
2.5 Enzyme und Reaktionspuffer	23
2.6 Chemikalien	24
2.7 Lösungen, Medien und Puffer	26
2.8 DNA-Oligonukleotide und Plasmide	32
2.9 Organismen und Zelllinien	34
2.10 Software	34
3 Methoden	35
3.1 Molekularbiologische Methoden	35
3.1.1 Herstellung von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	35
3.1.2 Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	35
3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> -Zellen	35
3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion	36
3.1.5 Restriktionsverdau von Plasmiden	37
3.1.6 Agarosegelelektrophorese	38
3.1.7 Reinigung von DNA-Fragmenten	38
3.1.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	38
3.1.9 Ligation von DNA	38
3.2 Zellbasierte Proteinsynthese	39
3.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Zellen	39
3.2.2 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	39
3.2.3 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> -Zellen	39
3.2.4 Aufnahme von Hefewachstumskurven	40

3.2.5	Kultivierung der <i>S. cerevisiae</i> -Sekretionsmutante des Stamms NY17	40
3.2.6	Transformation von <i>P. pastoris</i> -Zellen	41
3.2.7	Kultivierung von <i>P. pastoris</i> -Zellen	41
3.2.8	Transfektion von HEK-Zellen	42
3.2.9	Metabolische Selektion von HEK-Zellen	43
3.2.10	Kultivierung von HEK-Zellen	43
3.3	Zellfreie Proteinsynthese	44
3.3.1	Herstellung eines S30-Zellextrakts aus <i>E. coli</i> -Zellen	45
3.3.2	Isolierung der T7-RNA-Polymerase aus <i>E. coli</i> -Zellen	46
3.3.3	Zellfreie Proteinsynthese von fluoreszierenden Proteinen	46
3.3.4	Zellfreie Membranproteinsynthese im analytischen Maßstab	48
3.3.5	Zellfreie Membranproteinsynthese im präparativen Maßstab	49
3.4	Proteinchemische Methoden	51
3.4.1	Isolierung von MSP aus Bakterienzellen durch Hochdruckhomogenisation	51
3.4.2	Isolierung der Membranfraktion aus Hefezellen	51
3.4.3	Isolierung der Membranfraktion aus HEK-Zellen	52
3.4.4	Solubilisierung von Membranproteinen	52
3.4.5	Proteinreinigung durch Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	52
3.4.6	Proteinreinigung durch Dialyse	53
3.4.7	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	53
3.4.8	Dichtegradientenzentrifugation	53
3.4.9	Proteinfällung mit Trichloressigsäure	54
3.4.10	SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Western Blot-Analyse	54
3.4.11	Blue-Native PAGE	55
3.4.12	In-Gel-Fluoreszenz-Analyse	55
3.4.13	Assemblierung von leeren Lipid-Protein-Nanodiscs	56
3.4.14	Posttranslationale Rekonstitution von Membranproteinen in Nanodiscs	56
3.4.15	Konzentrationsbestimmung von Nanodiscs	57
3.4.16	Größenausschlusschromatographie	57
3.4.17	Circulardichroismus-Spektroskopie	57
3.4.18	Dynamische Lichtstreuung	58
3.4.19	Transmissionselektronenmikroskopie mit Negativkontrastierung	59
3.4.20	Cryo-Elektronenmikroskopie	59
3.5	Funktionstestungen	60
3.5.1	Phänotypisches Wirkstoffscreening mittels Resazurin-Assay	60
3.5.2	Protoplastierung von Hefezellen	61
3.5.3	Herstellung von Proteoliposomen	62
3.5.4	Streulichtmessungen mittels Stopped-Flow-Apparatur	62
3.6	Bioinformatische Methoden	64

4	Ergebnisse	65
4.1	Produktion von funktionaler T7-RNA-Polymerase und S30-Zellextrakten	65
4.2	Mit Brij78 solubilisiertes PffNTG107S wird in hohen Ausbeuten hergestellt	67
4.3	Detergenzaustausch zu LMNG und GDN für Cryo-EM von PffNTG107S	69
4.4	Stabilitätsuntersuchungen und Größenanalyse von PffNTG107S in Detergenzien	71
4.5	PffNTG107S kann in Präsenz von GDN hergestellt und gereinigt werden	73
4.6	Detergenz-solubilisiertes PffNTG107S zeigt keine Pentamere in der Cryo-EM	77
4.7	Nanodiscs mit verschiedenen Lipidbilayerdurchmessern werden hergestellt	79
4.8	PffNTG107S wird posttranslational in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiert	83
4.9	PffNTG107S-GFP markiert Membranprotein-beinhaltende Nanodiscs	85
4.10	PffNTG107S wird posttranslational in Ecpl-Nanodiscs rekonstituiert	87
4.11	PffNT- und PfcRT-Mutanten werden in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiert	88
4.12	Produktion von PffNTG107S in HEK-Zellen	90
4.13	Kultivierung FNT-Speziesvarianten-exprimierender <i>S. cerevisiae</i> -Hefen in Lactatmedium	93
4.14	Phänotypisches Wirkstoffscreening im <i>S. cerevisiae</i> -Hefesystem	94
4.15	Kultivierung PffNT-Resistenzmutanten-exprimierender <i>S. cerevisiae</i> -Hefen	97
4.16	PffNTG107S kann im <i>S. cerevisiae</i> -Hefesystem funktional hergestellt werden	99
4.17	Verbesserungen zur PffNTG107S-Extraktion aus <i>S. cerevisiae</i> -Hefezellen	102
4.18	PffNTG107S wird im <i>P. pastoris</i> -Hefesystem im Großmaßstab hergestellt	105
4.19	Versuche zur PffNTG107S-Extraktion aus <i>P. pastoris</i> -Hefezellen	108
4.20	PffNTG107S kann aus Zellen der NY17-Sekretionsmutante extrahiert werden	110
5	Diskussion	113
5.1	Eignung der zellfreien Proteinsynthese zur oligomeren Membranproteinproduktion	113
5.2	Mögliche Modifikationen des Systems der zellfreien Proteinsynthese	116
5.3	Strukturaufklärung von in ND rekonstituierten Membranproteinen <i>via</i> Cryo-EM	118
5.4	Extraktion angereicherter Post-Golgi-Vesikel der NY17-Sekretionsmutante	123
5.5	Extraktion und Solubilisierung von Membranproteinen	127
5.6	Funktionsuntersuchungen von Transportproteinen	132
5.7	Phänotypische Assays zum Hochdurchsatzscreening von Wirkstoffkandidaten	134
5.8	Ausblick	137
	Literaturverzeichnis	XIII
	Anhang	XXXI
	Eidesstattliche Erklärung	XXXIII
	Danksagungen	XXXV

Abkürzungsverzeichnis

Bei Einheiten gelten die Vorsätze n (10^{-9}), μ (10^{-6}), m (10^{-3}), c (10^{-2}), d (10^{-1}), k (10^3) und M (10^6). Die Bezeichnung chemischer Elemente sowie von Nukleinsäuren und Aminosäuren im Ein- und Dreibuchstabencode geschieht nach der IUPAC-Nomenklatur. Als Dezimaltrennzeichen wird das Dezimalkomma und bei fünfstelligen und größeren Zahlenwerten der Punkt als Tausendertrennzeichen verwendet.

Formelzeichen und Einheiten

A	Ampere	λ	Wellenlänge
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm	m	Meter
Å	Ångström	M	Molarität
ad	auffüllen bis	m/m	Masse/Masse (%: g pro 100 g)
AS	Aminosäure(n)	m/v	Masse/Volumen (%: g pro 100 ml)
AU	Absorptionseinheit(en)	min	Minute(n)
bp	Basenpaar(e)	n	Stoffmenge
°C	Grad Celsius	Ω	Ohm
c	Konzentration	pH	pH-Wert
cfu	koloniebildende Einheit(en)	π	Kreiszahl
CV	Säulenvolumen	psi	Pfund pro Quadratzoll
d	Tag(e)	rpm	Umdrehung(en) pro min
Da	Dalton	RT	Raumtemperatur (22 °C)
D _s	Selbstdiffusionskoeffizient	s	Sekunde(n)
ϵ_{280}	molarer Extinktionskoeffizient bei 280 nm	t	Zeit
η	Viskosität	T	(absolute) Temperatur
F	Farad	τ	Zeitkonstante
g	Erdbeschleunigung	$[\theta]_{MRW}$	mittlere molare Elliptizität
g	Gramm	U	Enzymeinheit(en) (μ mol/min)
G	Gauge	ü. N.	über Nacht
h	Stunde(n)	V	Volumen
kb	Kilobasenpaar(e)	V	Volt
k _B	Boltzmann-Konstante	v/v	Volumen/Volumen (%: ml pro 100 ml)
l	Liter	Z _{Average}	durchschnittl. Partikeldurchmesser

Chemikalien, Medien und Lösungen

AcP	Acetylphosphat	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
ADP	Adenosin-5'-diphosphat	DMSO	Dimethylsulfoxid
AMP	Adenosin-5'-monophosphat	DOPG	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerol
Amp	Ampicillin	DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat	DPC	Dodecylphosphocholin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat	DTT	Dithiothreitol
BMGY	<i>Buffered Complex Glycerol Medium</i>	Ecpl	<i>E. coli Polar Lipids</i>
BMMY	<i>Buffered Complex Methanol Medium</i>	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Brij78	Polyoxyethylen-(20)-stearyl-ether	GDN	Glyco-diosgenin
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat	GDP	Guanosin-5'-diphosphat
CHS	Cholesterylhemisuccinat	GTP	Guanosin-5'-triphosphat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat	HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
ddH ₂ O	doppeltdestilliertes Wasser	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
DDM	n-Dodecyl- β -D-maltopyranosid	Kan	Kanamycin
DM	n-Decyl- β -D-maltopyranosid	LB	<i>Lysogeny Broth</i>

LDAO	n-Dodecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid	SD	<i>Synthetic Defined</i>
LMNG	2,2-Didecylpropan-1,3-bis-β-D-maltopyranosid	SDS	Natriumdodecylsulfat
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	SMA	Styrol-Maleinsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure	TAE	TRIS-Acetat-EDTA
MS(PEG) ₄	Methyl-PEG ₄ -NHS-Ester	TBS	TRIS <i>Buffered Saline</i>
M-TBST	Milchpulver in TBST	TBST	TBS + Tween 20
NTA	Nitrilotriessigsäure	TCA	Trichloressigsäure
β-OG	n-Octyl-β-D-glucopyranosid	TEMED	Tetramethylethylendiamin
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>	Tet	Tetracyclin
PEG	Polyethylenglykol	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin	UTP	Uridin-5'-triphosphat
PEP	Phosphoenolpyruvat	YPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
POPG	1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerol	YPDS	YPD + Sorbitol
PVDF	Polyvinylidenfluorid	YTPG	<i>Yeast Tryptone Phosphate Glucose</i>

Biowissenschaftliche und weitere Abkürzungen

ATP4	P-Typ ATPase 4	MDR	<i>Multidrug Resistance Transporter</i>
ATP6/SERCA	<i>Sarco-/Endoplasmic Reticulum</i> Ca ²⁺ -ATPase	MM-M	Mastermix
AQP	Aquaglyceroporin	MMV	<i>Medicines for Malaria Venture</i>
bc1	Cytochrom bc ₁ -Komplex	MP	Membranprotein
BF	<i>Blot Force</i>	mRNA	Messenger-RNA
BN	Blue-Native	MSP	<i>Membrane Scaffold Protein</i>
BSA	bovines Serumalbumin	MWCO	<i>Molecular Weight Cut-off</i>
BSG	Basigin	ND	Nanodisc
CD	Circulardichroismus	NDP	Nukleosiddiphosphat
CECF	<i>Continuous Exchange Cell-free</i>	NMR	kernmagnetische Resonanz
CMC	kritische Mizellenkonzentration	N-term	N-terminal
CRT	Chloroquin-Resistenz-Transporter	NTP	Nukleosidtriphosphat
Cryo-EM	Cryo-Elektronenmikroskopie	OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
C-term	C-terminal	<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
DLS	dynamische Lichtstreuung	<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	PDB	<i>Protein Data Bank</i>
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration	PfCRT-CQR	Chloroquin-resistenter PfCRT
EMDB	<i>Electron Microscopy Data Bank</i>	PfFNTG107S	G107S-Resistenzmutante von PfFNT
ENT	<i>Equilibrative Nucleoside Transporter</i>	PSAC	<i>Plasmodial Surface Anion Channel</i>
FBS	fetales Kälberserum	RM	Reaktionsmix
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	RNA	Ribonukleinsäure
FM	Feedingmix	<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
FNT	Formiat-Nitrit-Transporter	SAR	Struktur-Aktivitätsbeziehungen
FXa	Faktor Xa	SAXS	Kleinwinkel-Röntgenstreuung
GFP	grün fluoreszierendes Protein	SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
GLUT	Glucosetransporter	SEC	Größenausschlusschromatographie
HA	Hämagglutinin	SEM	Standardfehler des Mittelwerts
HEK	humane embryonale Nierenzellen	TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
His	Poly-His-Tag	TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
HT	Hexosetransporter	TM	Transmembranspanne
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration	tRNA	Transfer-RNA
IMAC	im. Metallchelate-Affinitätschromatographie	VRAC	<i>Volume-regulated Anion Channel</i>
MCT	Monocarboxylattransporter	WHO	<i>World Health Organization</i>

Zusammenfassung

Die von humanpathogenen Parasiten der Gattung *Plasmodium* ausgelöste Malaria ist die beim Menschen weltweit am häufigsten auftretende Infektionskrankheit. Der pentamere Formiat-Nitrit-Transporter aus *P. falciparum* (PfFNT) gehört zur mikrobiellen FNT-Proteinfamilie und vermittelt die Ausschleusung des Stoffwechselendprodukts Lactat aus dem am weitesten verbreiteten Malariaerreger. Die Blockade des FNT-Lactattransportproteins durch Malariabox-Substanzen wie MMV007839 und abgeleitete Inhibitoren in nanomolaren Konzentrationen führt zur zytotoxischen Acidifizierung und intraparasitären Lactatakkumulationen. Aufgrund der fehlenden strukturellen Ähnlichkeit zu funktionsanalogen humanen Lactattransportern wurde PfFNT als valides Wirkstofftarget für die Malariabehandlung charakterisiert. Durch subletale MMV007839-Konzentrationen wurden in *P. falciparum*-Parasitenkulturen PfFNT-Resistenzmutanten wie PfFNTG107S mit einem Aminosäureaustausch und verringerter Suszeptibilität gegenüber MMV007839 selektiert. Pentafluor-3-hydroxy-pent-2-en-1-one wie BH267.meta wurden zur Umgehung der G170S-Resistenzmutation entwickelt und stellen die Basis für einen potenziellen neuen Antimalariawirkstoff dar. In der vorliegenden Arbeit wurde ein phänotypisches Wirkstoffscreening im *Saccharomyces cerevisiae*-Hefesystem zur Hochdurchsatzinhibitortestung und Verbesserung von gegen PfFNT-Resistenzmutanten und FNT-Speziesvarianten anderer humanpathogener *Plasmodium* spp. potenten Inhibitoren validiert. Das etablierte Hochdurchsatzinhibitorscreening bietet eine Plattform zur zeit- und kosteneffizienten Analyse von Struktur-Aktivitätsbeziehungen und damit der rationalen Inhibitorweiterentwicklung. Zum übergeordneten Ziel der strukturbasierten Inhibitoroptimierung mittels Strukturuntersuchungen von hochaufgelösten PfFNT-Inhibitor-Komplexen *via* Cryo-Elektronenmikroskopie wurden zellfreie und zellbasierte Expressionssysteme zur Produktion von funktionalen PfFNT-Pentameren evaluiert. Mittels zellfreier Proteinsynthese auf Grundlage eines *Escherichia coli*-Zellextrakts konnten hohe Ausbeuten an gereinigtem und mit verschiedenen Detergenzien stabilisiertem PfFNTG107S erzielt aber in elektronenmikroskopischen 2D-Aufnahmen keine funktionalen PfFNTG107S-Pentamere verifiziert werden. Die posttranslationale Rekonstitution in Lipidbilayer-Nanodiscs wurde als Grundlage für Strukturuntersuchungen von in nativen Membranumgebungen stabilisierten PfFNT-Membranproteinen eingeführt sowie proteinchemisch und elektronenmikroskopisch analysiert. PfFNTG107S-Pentamere wurden zellbasiert durch Expression in eukaryotischen Zellsystemen (HEK-Zellen und Hefeexpressionssystemen) erfolgreich hergestellt. Dabei eigneten sich insbesondere *S. cerevisiae*- und *Pichia pastoris*-Hefesysteme zur effizienten Produktion stabiler und funktionaler PfFNTG107S-Pentamere in unterschiedlichen Maßstäben bis zu Fermenterkulturen. Die Membranproteinextraktion aus isolierten Hefemembranfraktionen wurde als kritischer und schwierig reproduzierbarer Prozessschritt identifiziert und entsprechend geringe Ausbeuten mit Detergenzien solubilisierter PfFNTG107S-Pentamere erhalten. Zur Umgehung dieser Extraktions-bedingten Limitationen wurden Post-Golgi-Vesikel in der *S. cerevisiae*-Sekretionsmutante NY17 angereichert und die Qualität der isolierten Post-Golgi-Vesikel und Integrität des enthaltenen PfFNTG107S proteinchemisch und funktional überprüft. Durch das vereinfachte Extraktionsprotokoll wird die Befähigung der verwendeten Hefezellsysteme zur qualitativen PfFNT-Pentamerproduktion für zukünftige Hochdurchsatzstrukturuntersuchungen von Membranproteinen mit gebundenen Inhibitoren zugänglich gemacht. Hochauflösende und *via* Cryo-Elektronenmikroskopie generierte Membranproteinstrukturen von BH267.meta-gebundenen PfFNT-Resistenzmutanten wie PfFNTG107S werden die Weiterentwicklung eines neuen hochaffinen und breitenwirksamen Antimalariawirkstoffes forcieren.

Summary

Malaria is caused by human-pathogenic parasites of the genus *Plasmodium* and is the most widely spread human infectious disease. The pentameric formate-nitrite transporter from *P. falciparum* (PfFNT) is a member of the microbial FNT protein family and facilitates the export of the metabolic end product lactate of this most prevalent malaria pathogen. Blocking the FNT transport protein with malaria box compounds like MMV007839 and derived inhibitors in nanomolar concentrations leads to cytotoxic acidification and intra-parasitic lactate accumulation. Due to the missing structural resemblance to function-analogous human lactate transporters, PfFNT was characterized as a valid drug target for malaria treatment. PfFNT resistance mutants such as PfFNTG107S with single amino acid exchanges and decreased susceptibility against MMV007839 were selected in *P. falciparum* parasite cultures by incubation with sublethal MMV007839 concentrations. Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-ones like BH267.meta were developed to circumvent the G107S resistance mutation and provide the basis for potential new antimalarial drugs. In the present work, a phenotypic drug screening assay in *Saccharomyces cerevisiae* yeast was validated for the high-throughput inhibitor testing and improvement of potent inhibitors against PfFNT resistance mutants and FNT species variants of other human-pathogenic *Plasmodium* spp. The established high-throughput inhibitor screening provides a platform for the time- and cost-efficient analysis of structure-activity relationships and rational inhibitor enhancements. For the superior aim of the structure-based inhibitor optimization through investigation of high-resolution PfFNT-inhibitor complex structures via cryogenic electron microscopy, cell-free and cell-based expression systems for the production of functional PfFNT pentamers were evaluated. Using cell-free protein synthesis based on an *Escherichia coli*-derived cell extract, high amounts of purified and detergent-stabilized PfFNTG107S were yielded. However, no functional PfFNTG107S pentamers could be verified in 2D images of electron microscopy analyses. The post-translational reconstitution into lipid-bilayer nanodiscs was introduced as a basis for structure determination of PfFNT membrane proteins in a native-like membrane environment and was examined using protein chemistry methods and electron microscopy. PfFNTG107S pentamers were successfully produced in a cell-based fashion, taking advantage of eukaryotic cell systems (HEK cells and yeast expression systems). Thereof, *S. cerevisiae* and *Pichia pastoris* yeast systems were highly suitable to efficiently produce stable and functional PfFNTG107S pentamers in different scales up to fermentation cultures. The extraction of membrane proteins from isolated yeast membrane fractions was identified as a critical and difficult-to-reproduce process step, resulting in low yields of detergent-solubilized PfFNTG107S pentamers. To circumvent these extraction-based limitations, post-Golgi vesicles were enriched using the *S. cerevisiae* secretion mutant NY17. The quality of the isolated post-Golgi vesicles and the integrity of PfFNTG107S contained in these vesicles were examined using protein chemistry and functional studies. The ability of the yeast cell systems for the high-quality production of PfFNT pentamers was combined with the facilitated extraction protocol, making the yeast system more convenient for future high-throughput structure investigations of inhibitor-bound membrane proteins. High-resolution membrane protein structures of BH267.meta-bound PfFNT resistance mutants like PfFNTG107S will accelerate further development of high-affinity and broadly effective antimalarials.

1 Einleitung

1.1 Strukturaufklärung von Membranproteinen zur Entwicklung neuer Wirkstoffe

Natürliche Lipidbilayermembranen stellen in lebenden Organismen eine unentbehrliche Struktureinheit dar und ermöglichen die Organisation von geordnetem Leben. Die Lipidbilayermembranen umschließen dabei einzellige Organismen sowie analog die kleinste lebende Einheit von Mehrzellern und definieren zusätzlich durch Kompartimentierung abgeschlossene Reaktionsräume innerhalb dieser Zellen. Durch die voneinander getrennten Substrukturen und Reaktionsräume auf Organismus- und Zellebene wird ein hoher Organisationsgrad erreicht, der die Entwicklung von hochkomplexen Lebensformen ermöglicht (Diekmann & Pereira-Leal, 2013). Damit wird sowohl die Spezialisierung von einzelnen Organisationseinheiten als auch ein breites Netzwerk an durch die physikalischen Barrieren getrennten biochemischen Reaktionsfolgen realisiert. Neben der Kompartimentierungsfunktion stellt die Lipidbilayermembran zudem eine Reaktionsumgebung für den regulierten Ablauf von spezifischen Reaktionen dar. Membrangebundene Enzyme katalysieren an definierten Orten effizient biochemische Reaktionen, während membrangebundene Rezeptoren für die Signalweiterleitung und damit den Informationsaustausch notwendig sind (Li et al., 2021). Zudem sind vielfältige Membranproteinklassen als Adhäsionsmoleküle an der Ausbildung von Zell-Zell-Verbindungen und Kontakten zum Zytoskelett beteiligt.

Für das Zusammenwirken von spezialisierten Zellen und verschiedenen Kompartimenten finden Stoffaustauschprozesse statt. Der Stoffaustausch über biologische Membranen ist für zahlreiche physiologische Prozesse aller mit ihrer Umgebung in Wechselwirkung stehender Organismen relevant. Ungeladene, kleine Moleküle sind dabei zumeist durch passive Diffusion zur Passage des Lipidbilayers befähigt (Shinoda, 2016). Dazu gehören unter anderem die protonierten Formen von schwachen Säuren wie L-Milchsäure, während die korrespondierenden geladenen Säureanionen (z. B. L-Lactat) in Abwesenheit von Transportproteinen oder Ionophoren kaum über die Lipidbilayermembran gelangen können (Lambert & Stratford, 1999). Auch zahlreiche ungeladene Wirkstoffmoleküle können passiv über Zellmembranen diffundieren und so an einen intrazellulären Wirkort gelangen (Cocucci et al., 2017). Die Teilchendiffusion durch die hydrophobe Membrenumgebung erfolgt dabei entlang eines Konzentrationsgradienten (Hanneschlaeger et al., 2019). Die Passage von geladenen und größeren Substanzen wird durch verschiedene Transportproteine vermittelt. Transportproteine gehören zu den integralen Membranproteinen, die im Gegensatz zu den peripheren Membranproteinen die Lipidbilayermembran durchspannen. Im Gegensatz zu der passiven Diffusion durch die Lipidbilayermembran kann der von mehr oder weniger spezialisierten Transportproteinen vermittelte Teilchenstrom reguliert werden.

Die Klassifizierung von Membranproteinen erfolgt zumeist in Transporter, Ionenkanäle, Rezeptoren und Enzyme. Die verbreiteten Membranprotein-Wirkstofftargets werden zudem spezifischer in G-Proteingekoppelte Rezeptoren, Ionenkanäle, Proteasen, Kinasen und nukleäre Hormonrezeptoren eingeteilt (Rask-Andersen et al., 2014; Oprea et al., 2018). In der biomedizinischen Fachliteratur werden die Begriffe „Transporter“ und „Kanal“ jedoch uneinheitlich und teilweise synonym verwendet. Nach Almén et al. (2009) werden Membranproteine in drei funktionellen Gruppierungen eingeteilt: Rezeptoren, „Transporter“ (Transportproteine, vereint hier echte Transporter und Kanäle) und Enzyme. Durch den Algorithmus nicht anhand ihrer vorausgesagten molekularen Funktion klassifizierte Membranproteine wurden unter „Sonstige“ zusammengefasst. Die Differenzierung zwischen Kanälen und Transportern erfolgt dabei his-

torisch bedingt auf Grundlage von postulierten Transportmechanismen (Shi, 2013). Kanäle können zum einen die erleichterte Diffusion entlang eines abfallenden Konzentrationsgradienten eines Solute vermitteln oder in Form einer Membranpumpe Solute durch Energieaufwand entgegen einem Konzentrationsgradienten bewegen. Transporter weisen hingegen eine höhere Affinität zu ihrem Substrat bzw. ihren Substraten auf und transportieren diese(s) unter Konformationsänderung über die Membran, sodass der Transporter immer nur zu einer Membranseite hin geöffnet vorliegt und sich im Gegensatz zu Kanälen keine durchgängig geöffnete Pore ausbildet.

Membranproteine sind neben physiologischen Vorgängen auch an verschiedenen pathophysiologischen Prozessen beteiligt und stellen damit einen relevanten Angriffspunkt für Wirkstoffe dar. So sind Membranproteine wie etwa Rezeptor-Tyrosinkinasen in die Regulation von Zellwachstum und damit in die Entstehung von Krebs involviert (Gschwind et al., 2004; Almén et al., 2009). Membranproteine werden dementsprechend auch als diagnostische Biomarker für die Krebstherapie eingesetzt und dienen zugleich als vielfältige Wirkstofftargets (Kampen, 2011; Gentles et al., 2015; Almasi & Hiani, 2020). Zudem bietet die Aufklärung des komplexen Netzwerks an Protein-Protein-Interaktionen unter Beteiligung von Membranproteinen weitere Ansätze für potenzielle Krebstherapien (Lin et al., 2019). Somit können von Membranproteinen vermittelte pathologische Prozesse auch durch Angreifen an einem mit diesem Membranprotein interagierenden Protein reguliert werden. Neben der Krebsentwicklung sind Membranproteine auch bei vielen Infektionskrankheiten wie bei der Infektion von Wirtszellen durch Viren involviert (McDougal et al., 1986; Elphick et al., 2004). Dabei können sowohl humane als auch vom jeweiligen Pathogen hergestellte Membranproteine als Wirkstofftargets dienen. Die Malaria ist beim Menschen die weltweit am häufigsten auftretende Infektionskrankheit mit im Laufe der letzten Dekaden stark schwankender Mortalität (Murray et al., 2012). Im folgenden Kap. 1.2 werden kurz einige aktuelle Behandlungsmöglichkeiten der Malaria zusammengefasst und der Schwerpunkt auf die Identifizierung neuer Membranproteintargets für die zukünftige Malariatherapie gelegt.

Wallin & Von Heijne (1998) sagten durch Sequenzanalysen des Genoms bakterieller Organismen und höherer Eukaryoten einen Anteil von für Membranproteine codierenden Genen von 20-30 % voraus, wobei der Membranproteinanteil mit wachsender Genomgröße zunahm. Uhlén et al. (2015) untersuchten durch quantitative Transkriptomanalyse auf Gewebe- und Organlevel das auf Grundlage von etwa 21.000 proteincodierenden Genen vorhergesagte humane Proteom auf den Anteil möglicher Membranproteine. Dabei ermittelten sie einen Anteil von 23 % für Membranproteine codierenden Genen und 4 % Genen, die für Proteine mit membrangebundenen und sezernierten Proteoformen codieren (Abb. 1.1 A). Demgegenüber ergab die Targetanalyse von 618 durch die US-amerikanische *Food and Drug Administration* (FDA) zugelassenen Wirkstoffen, dass 55 % auf Membranproteine und 4 % auf Proteine mit membrangebundenen und sezernierten Proteoformen abzielten. Dies zeigt, dass Membranproteine einen bezogen auf ihren vermuteten Anteil an den Proteomen verschiedener Organismen überproportional großen Anteil der Wirkstofftargets darstellen. Bestätigt wurde dies auch durch entsprechende Targetanalysen von Overington et al. (2006), bei denen die Adressierung mehrerer Targets durch einige Wirkstoffe berücksichtigt wird. 42 % aller in der DrugBank (Wishart et al., 2018) gelisteten Wirkstoffe interagieren nach Gong et al. (2018) mit Membranproteinen, wobei 28 % humane Membranproteine und 14 % nicht-humane Membranproteine darstellten (Abb. 1.1 B). Bei den von der FDA zugelassenen Wirkstoffen der DrugBank war der Anteil von Membranproteintargets noch höher und lag bei insgesamt etwa 54 % (Abb. 1.1 C). Darunter waren 40 % humane und 14 % nicht-humane Membranproteine.

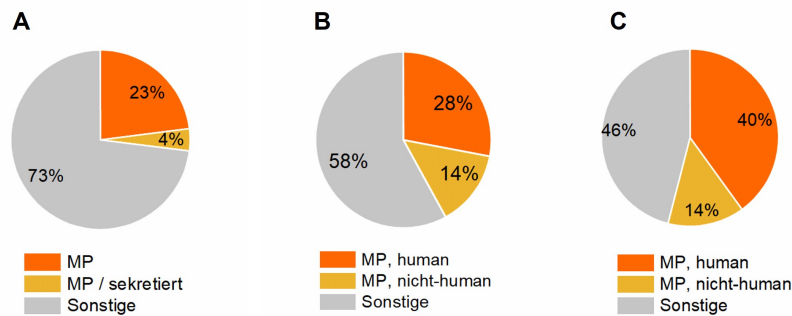


Abb. 1.1: Relevanz von Membranproteinen als Wirkstofftargets. **A** Anteil an für Membranproteine bzw. für Proteine mit membrangebundenen und sezernierten Proteoformen codierende humane Gene nach Uhlén et al. (2015). **B** Anteil von Membranproteinen als Targets von in der DrugBank gelisteten Wirkstoffen nach Gong et al. (2018). **C** Anteil von Membranproteinen als Targets von in der DrugBank gelisteten und von der FDA zugelassenen Wirkstoffen nach Gong et al. (2018). MP, Membranprotein.

Trotz der Relevanz der Membranproteine im (patho-)physiologischen Kontext und des Bedarfs an neuen Wirkstoffen für die Therapie zahlreicher Krankheiten sind viele Informationen wie beispielsweise über Membranproteinstrukturen nur begrenzt verfügbar (Oprea et al., 2018). Aufgrund von technischen Herausforderungen bei der Membranproteinsynthese und -solubilisierung sowie bei der Vorbereitung für die Strukturaufklärung waren Membranproteinstrukturen über Dekaden teilweise schwierig aufzuklären. Die erste hochauflösende Proteinstruktur (etwa 3 Å) eines integralen Membranproteins wurde 1985 für Proteinuntereinheiten des photosynthetischen Reaktionszentrums aus *Blastochloris viridis* mittels Röntgenkristallographie nach Proteinkristallisation erhalten (Deisenhofer et al., 1985). Die Strukturaufklärung von kristallisierten Membranproteinen gestaltet sich meist als schwieriger im Vergleich zu löslichen Proteinen. Neben der Produktion von mit geeigneten Detergenzien solubilisierten, stabilen Membranproteinen ist vor allem die Proteinkristallisation herausfordernd (Deniaud et al., 2010). Obwohl inzwischen zahlreiche Protokolle für die Kristallisation von Membranproteinen beschrieben sind, müssen für jedes Membranprotein in langwierigen Prozessen geeignete Kristallisationsbedingungen identifiziert werden (Newby et al., 2009). Zudem können für einige Membranproteine aufgrund der asymmetrischen Verteilung von hydrophoben und hydrophilen Bereichen sowie der Interaktion von Detergenzien oder Lipiden keine für die Röntgenkristallographie benötigten regelmäßigen Diffraktionskristalle hergestellt werden (Kermani, 2021). Neben den Kristallisationsbedingungen muss auch ein für das Membranprotein und die Proteinkristallisation geeignetes Stabilisierungsdetergenz gewählt werden, was den Strukturaufklärungsprozess weiterhin sehr zeitaufwändig macht (Privé, 2007). So wurden zunächst nur wenige einzigartige Membranproteinstrukturen jährlich neu in der mpstruc-Datenbank (*Membrane Proteins of Known 3D Structure*, Stephen White, UC Irvine) hinterlegt (Abb. 1.2 A). Im Jahr 2020 wurde die Anzahl der jährlich annotierten, einzigartigen Membranproteinstrukturen auf etwa 200 gesteigert. Bei den einzigartigen Proteinstrukturen werden mehrere Strukturen des identischen Membranproteins oder von modifizierten oder Liganden-gebundenen Strukturvarianten nur als eine Proteinstruktur berücksichtigt. Insgesamt wurden bis zum Jahr 2023 damit 1677 einzigartige Strukturen von Membranproteinen in der mpstruc-Datenbank gelistet (Stand: 01.02.2024).

Zunächst wurden die meisten Proteinstrukturen mittels Röntgenkristallographie aufgeklärt, wofür entsprechende Proteinkristalle benötigt wurden. Ab der Jahrtausendwende kam es zu einem deutlichen

Anstieg der Anzahl an mittels Röntgenkristallographie aufgeklärten Proteinstrukturen, bis ab dem Jahr 2015 jährlich durchschnittlich etwa 10.000 Proteinstrukturen mit dieser Methode in der RCSB *Protein Data Bank* (PDB) publiziert wurden (Abb. 1.2 B). Durch technische Verbesserung im Bereich der elektronenmikroskopischen Bildaufnahme und der nachfolgenden Datenverarbeitung konnten etwa ab dem Jahr 2015 immer zahlreichere Proteinstrukturen mittels hochauflösender Elektronenmikroskopie erhalten werden (Bai et al., 2015; Cheng, 2015, 2018). Dies zeigt sich in dem ab diesem Zeitpunkt nahezu exponentiellen Anstieg der mittels Elektronenmikroskopie bestimmten und in der PDB veröffentlichten Proteinstrukturen. Im Jahr 2023 wurden bereits 4582 neue 3D-Elektronenmikroskopie-Strukturen von Membranproteinen und löslichen Proteinen hinterlegt, während im selben Jahr mittels Röntgenkristallographie etwa doppelt so viele (9615) Proteinstrukturen aufgeklärt wurden. So ist die Röntgenkristallographie zwar noch immer die nach der Anzahl der gelösten Proteinstrukturen dominierende Methode, allerdings holt die Elektronenmikroskopie auch bedingt durch etablierte Hochdurchsatzprotokolle auf (Nakane et al., 2020). Mittels Elektronenmikroskopie können zudem im Gegensatz zur Röntgenkristallographie weitergehende Proteindynamiken analysiert und verschiedene Konformationszustände sowie Informationen über Molekülbewegungen erfasst werden (Nakane et al., 2020). Die Elektronenmikroskopie wird somit fortlaufend relevanter für die Strukturbiochemie und hat die Röntgenkristallographie bereits als führende Methode bei der Strukturaufklärung von großen (>100 kDa) (Membran-)Proteinen und fragilen bzw. dynamischen Proteinen abgelöst (Kühlbrandt, 2014).

Deutliche Verbesserungen konnten bei der Auflösung von Proteinstrukturen *via* Elektronenmikroskopie mittels Einzelpartikelanalyse erreicht werden (Abb. 1.2 C). Im Zeitraum von 2002-2023 konnte die gemittelte Auflösung der in der *Electron Microscopy Data Bank* (EMDB) deponierten Proteinstrukturen von 14,41 Å auf 4,14 Å und die jeweils beste erzielte Auflösung von 9 Å auf 1,19 Å optimiert werden. Dieser Durchbruch und die enorme Verbesserung der zu erzielenden Auflösungen wird mit dem Begriff *Resolution Revolution* bezeichnet (Kühlbrandt, 2014). Die verbesserte Auflösung resultiert in einem deutlichen

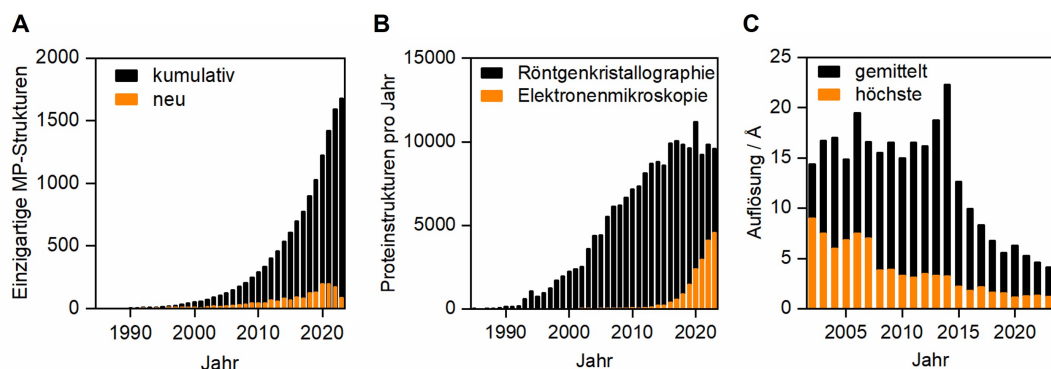


Abb. 1.2: Trends in der Strukturaufklärung von (Membran-)Proteinen. **A** Anzahl der einzigartigen Membranprotein (MP)-Strukturen in der mpstruc-Datenbank (*Membrane Proteins of Known 3D Structure*, Stephen White, UC Irvine) von 1985-2023 (Stand: 01.02.2024). Inkludiert sind in der *Protein Data Bank* (PDB) verfügbare und publizierte Strukturen, die mittels Röntgenkristallographie, Elektronenmikroskopie oder Kernresonanzspektroskopie aufgelöst wurden. Gesamtanzahl der Strukturen (kumulativ, schwarz) und in dem Jahr erstmalig publizierte Strukturen (orange). **B** Anzahl der in der *Protein Data Bank* (PDB) von 1985-2023 (Stand: 01.02.2024) pro Jahr neu hinterlegten Proteinstrukturen. Berücksichtigt werden sowohl lösliche Proteine als auch Membranproteine, deren Struktur über Röntgenkristallographie (schwarz) oder Elektronenmikroskopie (orange) aufgeklärt wurden. **C** Jährlich gemittelte (schwarz) und höchste (orange) Auflösungen der von 2002-2023 (Stand: 01.02.2024) in der *Electron Microscopy Data Bank* (EMDB) hinterlegten Proteinstrukturen, die *via* Elektronenmikroskopie mittels Einzelpartikelanalyse aufgeklärt wurden.

Informationsgewinn, da durch eine höhere Auflösung exaktere Aussagen über die Positionierungen und Ausrichtungen von Aminosäureresten gemacht werden können. Somit können mehr Informationen über mögliche Interaktionen innerhalb des Proteins und Interaktionen zwischen dem betrachteten Protein und interagierenden Substanzen wie Inhibitoren extrahiert werden. Initiale Strukturmodelle können zwar bei Auflösungen von $\leq 4 \text{ \AA}$ errechnet werden, zur genaueren Atompositionsanalyse sind aber inzwischen mittels Cryo-Elektronenmikroskopie erreichbare Auflösungen von $\leq 1,5 \text{ \AA}$ notwendig (Nakane et al., 2020; Yip et al., 2020). Es werden somit immer mehr Proteinstrukturen mittels Elektronenmikroskopie mit durchschnittlich immer besseren Auflösungen aufgeklärt, wodurch die Aussagekraft deutlich erhöht wird. Neben Fortschritten bei diesen experimentellen Methoden zur Proteinstrukturaufklärung können mit neu entwickelten Algorithmen wie AlphaFold (Jumper et al., 2021; Tunyasuvunakool et al., 2021) Strukturvorhersagen anhand von Aminosäuresequenzen berechnet werden. Dazu ist im Gegensatz zur klassischen Proteinstrukturmodellierung kein strukturähnliches Protein mit bekannter Proteinstruktur erforderlich. Obwohl mit diesem auf künstlicher Intelligenz basierten und frei zugänglichen Werkzeug bereits Proteinstrukturvorhersagen mit Auflösungen auf Atomlevel erzielt werden können, müssen die vom Algorithmus berechneten Proteinstrukturen mittels experimenteller Methoden verifiziert werden. Zudem ist die Aufklärung von Interaktionen zwischen Proteinen und interagierenden Substanzen wie beispielsweise Inhibitoren im Gegensatz zur hochauflösenden Cryo-Elektronenmikroskopie durch die Strukturberechnungen allein noch nicht möglich.

1.2 Relevanz plasmodialer Transportproteine als Targets für die Malariatherapie

Im Jahr 2022 schätzte die Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) weltweit 249 Millionen Malariainfektionen beim Menschen und insgesamt 608.000 Todesfälle, wobei 93,6 % der Malariainfektionen und 95,4 % der Malariatodesfälle auf dem afrikanischen Kontinent auftraten (WHO, 2023). 78,1 % der afrikanischen Malariatoten waren dabei Kinder im Alter von unter 5 Jahren. Die Malaria wird durch fünf humanpathogene Parasiten der Gattung *Plasmodium* (*P. falciparum*, *P. knowlewi*, *P. malariae*, *P. ovale* und *P. vivax*) ausgelöst, wobei je nach verantwortlichem plasmodialen Erreger verschieden schwerwiegende Malariaerkrankungen hervorgerufen werden. Die am weitesten verbreitete und durch unregelmäßige Fieberschübe und eine besonders hohe Mortalität charakterisierte Malariaform wird durch *P. falciparum* ausgelöst. *P. falciparum* ist auf dem afrikanischen Kontinent für fast ausnahmslos alle menschlichen Malariainfizierten verantwortlich und außerhalb von Afrika ist *P. vivax* der am meisten verbreitete humanpathogene Malariaerreger (WHO, 2023). Aufgrund der enormen Bedrohung veröffentlicht die WHO jährlich einen aktualisierten Malariareport, der über die aktuellen Entwicklungen und Herausforderungen in der Malariaverbreitung, den entsprechenden zur Verfügung stehenden Medikationen und Therapien sowie Forschungs- und Investitionsmaßnahmen informiert. In der Malariabekämpfung werden Investitionssummen von etwa 4 Milliarden US-Dollar pro Jahr zur Malariakontrolle und -eliminierung sowie zur Suche nach neuen Präventions- und Behandlungsmethoden aufgewendet (WHO, 2023). Im Malariareport des Jahres 2021 empfahl die WHO den RTS,S/AS01 (RTS,S)-Impfstoff für die Malaria-Prophylaxe von Kindern in Regionen mit mittlerer bis hoher Verbreitung von *P. falciparum* ausgelöster Malaria, wobei in einem Pilotprogramm mehr als 2 Millionen Kinder mindestens eine Impfdosis erhalten haben und die frühkindlichen Todesfälle um 13 % reduziert werden konnten (WHO, 2023). Der Impfstoff wurde im Jahr 1987 entwickelt, als erstes Malariavakzin in klinischen Studien der Phase III eingesetzt

und heute kommerziell mit dem über Fed-Batch-Fermentation in einem rekombinanten *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm hergestellten RTS,S-Antigen produziert (Laurens, 2020). Allerdings weist der daraus entwickelte RTS,S-Impfstoff nur eine geringe Effektivität auf (Olotu et al., 2013). Zur Ergänzung des Impfstoffarsenals empfahl die WHO im Oktober 2023 einen zweiten Impfstoff (R21/Matrix-M (R21)) zur Malariavorbeugung bei Kindern in Hochrisikogebieten. Dieser R21-Impfstoff stellt eine Weiterentwicklung des RTS,S-Vakzins dar und beruht auf dem identischen Antigen (Collins et al., 2017). Erste Resultate deuteten auf eine etwas höhere Effektivität im Vergleich zum RTS,S-Impfstoff der ersten Generation hin (Dattoo et al., 2024). Obwohl im Kampf gegen die Malaria somit inzwischen erste Impfstoffe zur Verfügung stehen und regional erfolgreiche Eindämmungsmaßnahmen durchgeführt werden können, ist ein stetiger Bedarf an neuen Targets und Wirkstoffen zur Malariatherapie vorhanden (Cui et al., 2015). Der hohe Verbreitungsgrad der Malaria zeigt die Notwendigkeit der Wirkstoffentwicklung zur Malariabehandlung nach erfolgter Infektion.

Zur aktuellen Standardmalariatherapie werden Kombinationstherapien mit dem Naturstoff Artemisinin und Artemisinin-Derivaten empfohlen (WHO, 2023). Diese bestehen je nach Malariaparasiten und Sensitivität des Erregerstammes aus Kombinationen von Abkömmlingen des Artemisinins wie Artesunat, Artemether und Dihydroartemisinin mit verschiedenen Aminoquinolinen oder Arylaminoalkoholen wie Lumefantrin. Dabei ist der biochemische Wirkmechanismus von Artemisinin trotz intensiver Forschung nicht genau bekannt. Es wird eine unspezifische Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies sowie eine Beeinflussung der plasmodialen Calcium-ATPase ATP6/SERCA (*Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum* Ca^{2+} -ATPase) angenommen (Eckstein-Ludwig et al., 2003; Moore et al., 2011; Kavishe et al., 2017). Ismail et al. (2016) konnten später ein breites Spektrum von mit Artemisinin interagierenden Proteinen mit derivatisierten Artemisininen markieren, während Moore et al. (2022) die Hemmung von in *S. cerevisiae* exprimiertem ATP6 aus *P. falciparum* (PfATP6) durch Artemisinin zeigten. Dies deutet auf ein mögliches breiteres Wirkspektrum und unspezifische Wirkmechanismen der Artemisinine hin. Eine große Bedrohung für die aktuelle Malariatherapie mit auf Artemisinin basierten Kombinationstherapien birgt das Auftreten von Artemisinin-resistenten *P. falciparum*-Parasiten vor allem in Südostasien (Dondorp et al., 2009). Aufgrund von Resistenzentwicklungen und der Verbreitung von multiresistenten *Plasmodium*-Erregern ist die Malariabehandlung regional nur noch stark begrenzt oder mit der aktuellen Standardmalariatherapie nicht mehr möglich (Fairhurst & Dondorp, 2016). Zhu et al. (2022) konnten ein Spektrum an Genen mit verändertem Transkriptionslevel identifizieren, das vermutlich eine frühe Anpassung von suszeptiblen Parasiten an die Gegenwart von Artemisinin darstellt. Die beobachtete Artemisininresistenz wird dabei durch verschiedene Polymorphismen im Gen vermittelt, welches für das plasmodiale Kelch13 (K13)-Protein codiert (Coppée et al., 2019). Durch Verbreitung der resistenten Pathogene droht möglicherweise wie beim ehemaligen Standardantimalariamittel Chloroquin der Wegfall von weiteren bis dahin hochwirksamen, kostengünstigen Antimalariawirkstoffen. Chloroquin und Hydroxychloroquin wurden über Dekaden effektiv zur Malariabehandlung und gegen intraerythrozytäre *Plasmodium*-Parasiten eingesetzt. Dabei verhindert Chloroquin vermutlich die Polymerisation des durch den parasitären Hämoglobinmetabolismus anfallenden zytotoxischen Häms in der Verdauungsvakuole der Parasiten und damit die Häm-Detoxifizierung (Olafson et al., 2015). Neben diesem postulierten Mechanismus werden auch andere Wirkmechanismen diskutiert, da die Chloroquintoxizität nicht spezifisch für das intraerythrozytäre Entwicklungsstadium der Plasmodien ist (Gligorijevic et al., 2008). In Folge der exzessiven Chloroquinanwendung traten innerhalb kurzer Zeiträume zunächst regional zahlreiche

Chloroquin-resistente Parasiten auf, sodass der Behandlungserfolg mit Chloroquinpräparaten rapide abnahm und Chloroquin heute nur noch in definierten Einzelfällen zur Anwendung kommt (WHO, 2023). Der Chloroquin-Resistenz-Transporter aus *P. falciparum* (PfCRT) ist mit der Resistenzbildung assoziiert, da identifizierte PfCRT-Mutationen in Chloroquin-resistenten *P. falciparum*-Parasiten zum Transport von Chloroquin über die Verdauungsvakuolenmembran und damit zur Detoxifizierung des Chloroquins führen (Martin et al., 2009).

Die fortlaufende Resistenzentstehung und -verbreitung stellt die Standardmalariatherapien für den breiten Einsatz in der Malariabehandlung somit zunehmend unter Druck, sodass ein wachsender Bedarf nach alternativen, hochwirksamen Antimalariamitteln besteht. Bei der Suche nach neuen Wirkstofftargets für die künftige Malariatherapie konnten in den vergangenen Jahren einige Substanzen identifiziert werden, die auf den Transmembrantransport von Ionen, Metaboliten oder anderen Substanzen abzielen (Meier et al., 2018). Neben Transportproteinen wird in aktueller Forschung auch ein breites Spektrum an verschiedenen weiteren Wirkstofftargets evaluiert (Tripathi et al., 2023). Im Folgenden werden einige Transportproteine als mögliche Targets für die Malariatherapie vorgestellt, die je nach Membranlokalisierung einen indirekten, peripheren oder internen Angriff durch potenzielle Antimalariamittel erlauben (Abb. 1.3). Abhängig vom Wirkort außerhalb oder innerhalb der *Plasmodium*-Parasiten werden verschiedene Anforderungen an entsprechende Wirkstoffkandidaten hinsichtlich Membrangängigkeit, Stabilität und potenziellen unerwünschten Interaktionen gestellt.

Beim indirekten Targeting werden an der Plasmamembran der infizierten Wirtszelle lokalisierte Membranproteine adressiert, die durch den intrazellulären Parasiten modifizierte oder exportierte plasmodiale Membranproteine darstellen (Desai et al., 2000). Ein viel betrachtetes Transportprotein ist der *Plasmodial Surface Anion Channel* (PSAC), der die Plasmamembran von mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten für Ionen und organische Solute permeabel macht (Ginsburg et al., 1985). Durch Modifizierung der Membranpermeabilität passt *P. falciparum* vermutlich die Wachstumsumgebung innerhalb der Erythrozyten an und stellt zugleich den Nährstoffnachschub sicher. Die Herkunft, molekulare Funktionsweise und Identität von PSAC wird in der Fachliteratur kontrovers diskutiert und es wird angenommen, dass die Passage von Ionen und Soluten über zwei differenzierte Pfade erfolgt (Bokhari et al., 2008; Desai, 2023). Zur effektiven Blockade von PSAC ist somit eine Kombination von zwei Inhibitoren notwendig. Beispielsweise weist die Substanz PRT1-20 allein einen IC_{50} -Wert bei *P. falciparum*-Parasitenkulturen von etwa $5\ \mu\text{M}$ auf, während durch Kombination von PRT1-20 mit Furosemid ein submikromolarer IC_{50} -Wert erreicht wird (Pain et al., 2016). Mit dem PSAC-Antagonisten ISPA-28 konnten hingegen IC_{50} -Werte bei *P. falciparum*-Parasitenkulturen von $56\ \text{nM}$ erzielt werden (Nguitragool et al., 2011). Dies zeigt möglicherweise die Bindung von ISPA-28 an einer oder mehreren differenzierten Bindestelle(n) des PSAC. Nguitragool et al. (2011) identifizierten zudem von *P. falciparum* codierte CLAG3-Proteine als zentrale Bestandteile des an der Erythrozytenmembran lokalisierten Transportproteins. Vermutlich sind neben CLAG-Proteinen noch weitere Proteine bei der Formierung eines funktionalen Membranproteinkomplexes involviert (Desai, 2023). Obwohl PSAC eine zentrale Rolle in der Parasitenbiologie zugeschrieben wird, sind viele Mechanismen und die Struktur des funktionalen Membranproteinkomplexes noch unverstanden und eine effektive Adressierung mit potenziellen Antimalariawirkstoffen dementsprechend schwierig. Neben plasmodialen Transportproteinen wie PSAC sind auch vom Wirtserythrozyten codierte Membranproteine für ein indirektes Targeting interessant. So wurde ein in mit *P. falciparum* infizierten Erythrozyten hochregulierter endogener Anionenkanal identifiziert (Egée et al., 2002). Weiter zeigten Prudêncio et al.

(2009) eine erhöhte Chloridleitfähigkeit des *Volume-regulated Anion Channel* (VRAC) in infizierten Leberzellen. Die Leitfähigkeit durch VRAC kann durch Tamoxifen, Clomifen und Mefloquin mit einstelligen mikromolaren IC_{50} -Werten gehemmt werden (Prudêncio et al., 2009). Der Mechanismus der Aktivierung des Anionenkanals durch die Parasiten ist genauso wie mögliche, unerwünschte Nebeneffekte durch Blockade des humanen Membranproteins und somit die tatsächliche Eignung des VRAC als Wirkstofftarget für die Malariatherapie weitgehend ungeklärt.

An der Parasitenplasmamembran lokalisierte Transportproteine des Pathogens können über peripheres Targeting angegriffen werden. In den parasitären Energiestoffwechsel involvierte und an der Parasitenmembran lokalisierte Transportproteine wie der Hexosetransporter (HT) und der Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) werden weiter unten in diesem Kapitel detaillierter hinsichtlich ihrer Validität als Wirkstofftarget besprochen. Zur Aufnahme von für die *Plasmodium*-Parasiten essenziellen Nukleinbasen und Nukleosiden sind *Equilibrative Nucleoside Transporter* (ENT) in die Parasitenmembran integriert, wobei PfENT1 der wichtigste Transporter für *P. falciparum* in der intraerythrozytären Form ist (Downie et al., 2006). Mittels hefebasierten Hochdurchsatzinhibitorscreenings konnten potente PfENT1-Inhibitoren mit IC_{50} -Werten im niedrigen nanomolaren Bereich aber nur geringer Effektivität in Parasitenkulturen gefunden werden (Frame et al., 2015). Sosa et al. (2019) identifizierten neue Chemotypen, die auch gegen Chloroquin- und Artemisinin-resistente *P. falciparum*-Stämme wirksam waren und eine hohe Spezifität für PfENT1 aufwiesen. Die hochauflösende PfENT1-Proteinstruktur in Komplex mit einem dieser Inhibitoren konnte kürzlich aufgeklärt und der Inhibitionsmechanismus offengelegt werden (Wang et al., 2023). Damit ist die Grundlage für die weitergehenden Optimierungen von PfENT1-Inhibitoren gelegt. Neben diesem für das Parasitenwachstum essenziellen Transportprotein werden auch weitere Transportproteine an der parasitären Plasmamembran exprimiert. Ein einziges Aquaglyceroporin (PfAQP) wird von *P. falciparum*-Parasiten exprimiert und leitet neben Wasser kleine, ungeladene Solute wie Glycerol für die parasitäre Glycerolipidbiosynthese und Stoffwechselendprodukte wie Harnstoff und Ammonium (Hansen et al., 2002; Beitz et al., 2004; Beitz, 2007). 2008 wurde bereits die hochauflösende PfAQP-Proteinstruktur publiziert (Newby et al., 2008), während noch keine selektiven und effektiven PfAQP-Inhibitoren identifiziert wurden (Song et al., 2012). Da *P. berghei*-Parasiten nach Knock-out des parasitären PbAQP mit einem langsameren Wachstum lebensfähig waren (Promeneur et al., 2007), wurde zwar die Relevanz von AQP für die Glycerolaufnahme ersichtlich, aber plasmodiales AQP konnte nicht als Wirkstofftarget für das Abtöten von Plasmodien bestätigt werden. Weiter vermitteln P-Typ ATPasen den Kationentransport unter ATP-Hydrolyse und der plasmodiale Vertreter PfATP4 wirkt in *P. falciparum* als Natriumpumpe und ist für die Regulation der intraparasitären Natriumkonzentration verantwortlich (Spillman et al., 2013). Die Blockade von PfATP4 ist unter intrazellulärer Natriumakkumulation und zytosolischer Alkalisierung letal für *P. falciparum*-Parasiten (Zagorska & Jaromin, 2023). Cipargamin ist ein hochpotenter PfATP4-Inhibitor mit IC_{50} -Werten bei sensitiven *P. falciparum*-Parasitenkulturen von 0,5-1,4 nM (Rottmann et al., 2010; Spillman & Kirk, 2015). Damit könnte ein Startpunkt für die Generierung von potenziellen Wirkstoffen gesetzt sein, wobei die Sequenzähnlichkeit zu anderen P-Typ ATPasen und mögliche Nebenwirkungen berücksichtigt werden müssen.

Im Parasiten an der Vakuole oder an Organellenmembranen lokalisierte Transportproteine werden über internes Targeting adressiert. Der bereits beschriebene PfCRT ist ein Beispiel für ein solches Transportprotein, welches nach Mutation zur Ausschleusung von Chloroquin aus der parasitären Verdauungsvakuole und damit als Wirkstoff-Effluxtransporter wirkt. Ein weiterer Effluxtransporter in *P. falciparum* mit unbe-

kannten physiologischen Substraten ist der *Multidrug Resistance Transporter 1* (PfMDR1), der ebenfalls in der parasitären Verdauungsvakuole lokalisiert ist (Foote et al., 1989). Potente PfMDR1-Inhibitoren hemmen das *P. falciparum*-Wachstum mit nanomolaren EC₅₀-Werten (Brunner et al., 2012, 2013). Ähnlich wie bei Inhibition von PfMDR1 könnte durch PfCRT-Inhibition die Detoxifizierung von Wirkstoffen verhindert und damit in das Parasitenwachstum eingegriffen werden. Der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierte mitochondriale Cytochrom bc₁-Komplex ist für den Aufbau eines Protonengradienten verantwortlich, der für die ATP-Synthese durch F-Typ ATPasen notwendig ist (Crofts, 2004). Atovaquon und Decoquinat sind Ubichinon-Analoga und wirken als effektive Inhibitoren des Cytochrom bc₁-Komplexes (da Cruz et al., 2012). Durch weitere Hochdurchsatzscreenings wurde TCMDC-135546 als potenter Cytochrom bc₁-Inhibitor mit einem IC₅₀-Wert für die *P. falciparum*-Wachstumshemmung von 22 nM identifiziert (Raphemot et al., 2016). Zu beachten sind bei Cytochrom bc₁-Inhibitoren allerdings aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Cytochrom bc₁-Komplexe in verschiedenen Spezies möglicherweise auftretende Nebeneffekte (Xia et al., 2013). Das potenzielle Artemisinintarget PfATP6/SERCA ist im sarkoplasmatischen endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und weist eine geringe Sequenzidentität zu SERCA aus Wirbeltieren und zu Ca²⁺-ATPasen der Plasmamembran auf (Kimura et al., 1993). Thapsigargin ist ein SERCA-Inhibitor und es konnten Chloroquin-resistente *P. falciparum*-Parasiten mit IC₅₀-Werten im nanomolaren Bereich abgetötet werden (Abiodun et al., 2013). Damit wird das Potential von entsprechenden Inhibitoren als mögliche zukünftige Antimalariawirkstoffe gezeigt. Obwohl die Wirkungsweisen von Artemisinin und weiteren in *Plasmodium* spp. agierenden Antimalariawirkstoffen weitgehend ungeklärt sind, konnten Moore et al. (2022) durch Hochdurchsatzwirkstoffscreenings im Hefesystem neue PfATP6-Inhibitoren identifizieren. Damit könnte eine zukünftige Aufklärung der Inhibitionsmechanismen erfolgen und möglicherweise verbesserte PfATP6-Inhibitoren zur Malariatherapie synthetisiert werden. Ein Hauptproblem beim internen Targeting besteht allerdings im hohen Potenzial zur Resistenzentwicklung, da die Wirkstoffaufnahme durch den Parasiten verhindert oder die Wirkstoffausschleusung forciert werden könnte. Aktuell zielt die Mehrheit der zur Verfügung stehenden Antimala-

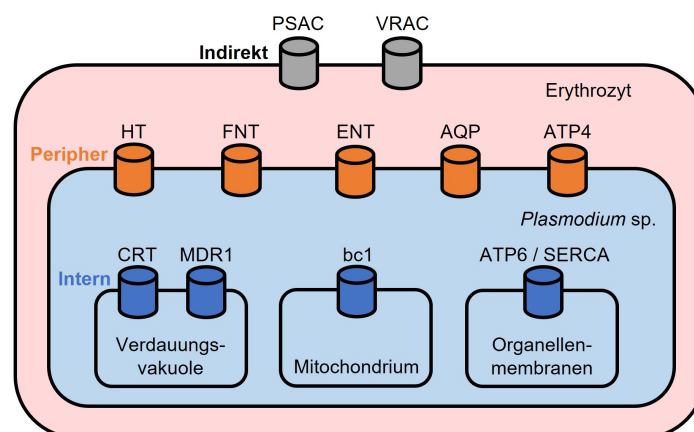


Abb. 1.3: Auswahl an Membranproteintargets für die Malariatherapie. An der Erythrozytenmembran lokalisierte Membranproteine PSAC (*Plasmodial Surface Anion Channel*) und VRAC (*Volume-regulated Anion Channel*) können über indirektes Targeting adressiert werden. In der Peripherie von *Plasmodium* spp. und an der parasitären Plasmamembran liegende Targets stellen HT (Hexosetransporter), FNT (Formiat-Nitrit-Transporter), ENT (*Equilibrative Nucleoside Transporter*), AQP (Aquaglyceroporin) und ATP4 (P-Typ ATPase 4) dar. Innerhalb des *Plasmodium*-Parasiten vorhandene, interne Targets sind ATP6/SERCA (*Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum* Ca²⁺-ATPase), bc1 (Cytochrom bc₁-Komplex), CRT (Chloroquin-Resistenz-Transporter) und MDR1 (*Multidrug Resistance Transporter 1*).

riawirkstoffe auf spezifische intraparasitäre Targets ab oder wirkt über vielfältige Mechanismen innerhalb der *Plasmodium*-Parasiten (Tripathi et al., 2023). Die drohenden oder bereits bestehenden Resistenzentwicklungen weisen auf die Notwendigkeit der verstärkten Identifizierung von neuen Wirkstofftargets in der Peripherie der Malariaparasiten hin.

Malariaparasiten wie *P. falciparum* verlassen sich zur Energiegewinnung in der intraerythrozytären Phase auf die anaerobe Glykolyse, wobei das Substrat D-Glucose vom infizierten Wirtsorganismus stammt (MacRae et al., 2013). D-Glucose wird über den erythrozytären Glucosetransporter GLUT1 (Kasahara & Hinkle, 1977) und den parasitären Hexosetransporter PfHT (Woodrow et al., 1999; Ortiz et al., 2015) in den *P. falciparum*-Parasiten aufgenommen (Abb. 1.4 A). Die Transportproteine wurden bereits umfassend charakterisiert und die Proteinstrukturen von GLUT1 (Deng et al., 2014) und PfHT (Jiang et al., 2020) hochauflösend aufgeklärt. Beide Glucosetransportproteine sind durch die mögliche Blockade des essentiellen Substratnachschiebs interessante Wirkstofftargets für potenzielle neue Antimalariawirkstoffe (Davis et al., 2016; Wei et al., 2018). Ortiz et al. (2015) konnten bereits semiselektive Hexosetransporter-Inhibitoren aus Substanzbibliotheken von unspezifizierten Antimalariawirkstoffen mit submikromolaren IC₅₀-Werten bei *P. falciparum*-Wachstumshemmung identifizieren. Mittels der aufgeklärten Transportproteinstrukturen und Aufklärung der Struktur von Hexosetransporter-Inhibitor-Komplexen konnten zudem Inhibitoraffinitäten durch Strukturmodifikationen verbessert werden, wobei die modifizierten Inhibitoren gegenüber Parasitenkulturen effektiv waren (Jiang et al., 2020; Huang et al., 2021). Da die Glucosetransportproteine allerdings humanen Ursprungs sind bzw. mit humanen Transportproteinen hohe Strukturähnlichkeiten aufweisen, wird nach alternativen Wirkstofftargets gesucht.

Pro Mol D-Glucose werden während der anaeroben Glykolyse von *P. falciparum* zwei Mol L-Lactat und zwei Mol Protonen als metabolische Endprodukte gebildet, die zur Verhinderung von zytosolischer Acidifizierung aus dem Parasiten ausgeschleust werden müssen (Cranmer et al., 1995; Elliot et al., 2001). Das dafür benötigte Transportprotein wurde trotz der guten Kenntnislage über den parasitären Energiestoffwechsel über Jahrzehnte nicht gefunden und eine pharmazeutische Adressierung dieses relevanten Transportproteins war somit unmöglich. Im Jahr 2015 wurde in der Arbeitsgruppe Beitz (Wu et al., 2015) und in einer anderen Forschungsgruppe (Marchetti et al., 2015) unabhängig voneinander ein einziges aus *P. falciparum* stammendes Gen identifiziert, welches für einen Lactat-leitenden Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) codiert. Die fehlende Verwandtschaft und ausbleibende Sequenzidentität zu humanen Monocarboxylattransportern (MCT) (Halestrap & Price, 1999) rückten den identifizierten Formiat-Nitrit-Transporter aus *P. falciparum* (PfFNT) in den Mittelpunkt für die Charakterisierung eines möglichen neuen Wirkstofftargets. Aufgrund der zum Zeitpunkt der Entdeckung auf ein Strukturmodell begrenzten PfFNT-Strukturinformationen wurde zunächst durch Substanzscreenings nach potenziellen PfFNT-Inhibitoren gesucht. In der sogenannten Malariabox der *Medicines for Malaria Venture* (MMV) werden etwa 400 Substanzen mit meist unbekanntem Target aber nachgewiesener Aktivität gegen Malariaerreger im Blutstadium zusammengefasst (Spangenberg et al., 2013). Golldack et al. (2017) identifizierten durch Screening der Malariabox mit MMV000972 und MMV007839 zwei Substanzen (Abb. 1.4 B), die heterolog in *S. cerevisiae*-Zellen exprimiertes PfFNT bei einer eingesetzten Konzentration von 10 µM vollständig blockierten. MMV007839 wies sowohl bei der Inhibition im hefebasierten biophysikalischen Radioassay als auch gegenüber *Plasmodium*-Parasitenkulturen einen IC₅₀-Wert im submikromolaren Bereich auf (Golldack et al., 2017). Mittels eines Malariabox-Screenings nach pH-verändernden Substanzen in *P. falciparum*-Parasiten wurden MMV000972 und MMV007839 von Hapuarachchi et al. (2017) als Hit-

substanzen bestätigt, wobei diese Substanzen ebenfalls den Lactattransport durch in *Xenopus*-Oozyten exprimierte PfFNT inhibierten. Durch spätere *in vivo*-Untersuchungen mit einem von der Substanz MMV007839 abgeleiteten Inhibitor konnte zudem eine hohe Potenz bei Behandlung von mit Plasmodien infizierten Mäusen gezeigt werden (Davies et al., 2023). Der Formiat-Nitrit-Transporter aus *P. falciparum* wurde zunächst weiter funktionell und strukturell charakterisiert (Kap. 1.3). Zudem zeigt sich bereits hier das Potenzial von selektiven PfFNT-Inhibitoren als mögliche neue Wirkstoffe für die zukünftige Malariatherapie und den Bedarf an weiteren Untersuchungen und strukturbasierten Optimierungen der identifizierten PfFNT-Inhibitoren (Kap. 1.4).

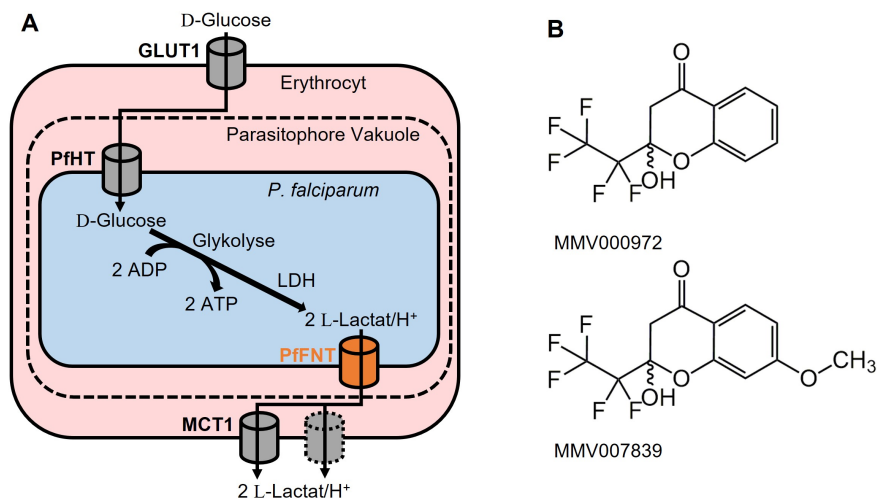


Abb. 1.4: Physiologische Bedeutung von PfFNT in *P. falciparum*-Parasiten. **A** Einordnung von PfFNT als essenzielles Lactattransportprotein in *P. falciparum*. GLUT1, Glucosetransporter 1; LDH, Lactatdehydrogenase; MCT1, Monocarboxylat-transporter 1; PfFNT, Formiat-Nitrit-Transporter aus *P. falciparum*; PfHT, Hexosetransporter aus *P. falciparum*. **B** Strukturformeln der im Malariabox-Screening als PfFNT-Inhibitoren identifizierte Substanzen MMV000972 und MMV007839.

1.3 Der Weg zur PfFNT-Proteinstruktur und Einordnung des PfFNT

Formiat-Nitrit-Transporter (FNT) bilden eine Familie mikrobieller Transportproteine und werden sowohl von gram-negativen Proteobakterien als auch von gram-positiven Bakterien, Archaeobakterien und einigen einzelligen Eukaryoten exprimiert (Mukherjee et al., 2017). In mehrzelligen Eukaryoten wurden hingegen keine FNT-Transportproteine beschrieben. FNT leiten je nach FNT-Subfamilie bidirektional schwache Säuren wie Formiat, Lactat, Pyruvat und Acetat mit einer zumeist nur geringen Substratspezifität. Diese zeigt sich auch in der Passage von Chloridionen und anderen monovalenten Anionen durch FNT-Transportproteine (Lü et al., 2013). Die erste hochauflösend aufgeklärte Proteinstruktur eines Mitglieds der FNT-Transportproteinfamilie wurde im Jahr 2009 für den Formiat-Transporter (FocA) aus *Escherichia coli* publiziert (Wang et al., 2009). In der Folge wurden mit zwei weiteren Formiat-Transportern aus *Vibrio cholera* (Waight et al., 2010) und *Salmonella typhimurium* (Lü et al., 2011) sowie dem Nitrit-Transporter (NirC) aus *Salmonella typhimurium* (Lü et al., 2012b) und dem Hydrosulfid-Ionenkanal (HSC) aus *Clostridioides* (ehemals: *Clostridium*) *difficile* (Czyzewski & Wang, 2012) vier weitere Proteinstrukturen von prokaryotischen FNT-Transportproteinen mit homopentamerer Struktur aufgeklärt. FNT-Transportproteine weisen eine starke strukturelle Ähnlichkeit zu tetrameren Kanalproteinen der Aquaglyceroporine (AQP) auf (Fu et al., 2000; Newby et al., 2008). Trotz einer deutlich unterschiedlichen

Aminosäuresequenz bilden FNT-Protomere mit sechs Transmembranspannen (TM) die Proteinfaltung der AQP-Protomere nach. Die bei Assemblierung des FNT-Homopentamers ausgebildete Zentralpore ist in der nativen Membrenumgebung analog zu den AQP mit Lipiden gefüllt und undurchlässig für Wasser und Substrate (Wang et al., 2009). Nach Strukturmodellen auf Grundlage der FocA-Proteinstruktur und Funktionsuntersuchungen ist PfFNT ebenso wie andere FNT-Transportproteine ein funktionelles Homopentamer, dessen fünf Protomere einen individuellen Transportpfad aufweisen (Wiechert & Beitz, 2017b; Wiechert et al., 2017). Eine hohe Stabilität des nativen FNT-Pentamers wird durch die teilweise Resistenz bei Inkubation mit dem denaturierenden Detergenz SDS gezeigt (Wu et al., 2015; Wiechert et al., 2017; Hajek et al., 2019). Zum Substratspektrum von PfFNT gehören neben Formiat, L-Lactat und D-Lactat auch weitere schwach saure Monocarboxylate wie Acetat und Pyruvat (Wu et al., 2015). Zu den funktionsanalogen humanen Lactattransportproteinen der Monocarboxylattransporter (MCT) weisen FNT-Transportproteine keine weitergehende Strukturähnlichkeit auf, wie durch die Strukturaufklärung von MCT1 bestätigt wurde (Wang et al., 2021). Diese strukturellen Unterschiede zu entsprechenden humanen Transportproteinen bestätigen PfFNT als potenzielles Wirkstofftarget.

Im Jahr 2021 wurde *via* Cryo-Elektronenmikroskopie die hochauflösende Proteinstruktur des PfFNT-Wildtypproteins aufgeklärt (Lyu et al., 2021; Peng et al., 2021). Das aus den fünf Protomeren gebildete PfFNT-Homopentamer (Abb. 1.5 A) mit einer zur Membranebene senkrechten, fünfgliedrigen Achse hat einen angenäherten Durchmesser von 80 Å und eine Höhe von etwa 70 Å. Jedes Protomer mit einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa weist mit sechs Transmembranspannen eine für Aquaporine typische 3+3 *invert repeat*-Struktur (Murata et al., 2000) mit einer extrazellulären Helix zwischen den Transmembranspannen TM3 und TM4 auf (Abb. 1.5 B). TM2 und TM5 sind zwei diskontinuierliche Helices, die den im Zentrum des Protomers lokalisierten Transportpfad auskleiden und jeweils an der Bildung einer hydrophoben Konstriktion an der intrazellulären und der extrazellulären Membranseite beteiligt sind. Beide im PfFNT-Transportpfad ausgebildeten Konstriktionen formieren Barrieren, die von polaren Substraten und Wasser nicht überwunden werden können. Die möglicherweise für die Ermöglichung der Substratpassage benötigte Umorientierung der Konstriktions-bildenden Aminosäure F94 (intrazelluläre Konstriktion) bzw. F90 und F223 (extrazelluläre Konstriktion) konnte durch Beobachtungen von zwei Konformationszuständen während der elektronenmikroskopischen Strukturuntersuchungen nahegelegt werden (Peng et al., 2021). Zwischen den beiden Konstriktionen befindet sich ein hochkonserviertes Histidin (H230), dem im nach Veröffentlichung der ersten FNT-Proteinstrukturen postulierten *proton relay*-Mechanismus (Lü et al., 2013) eine entscheidende Rolle für die Substratprotonierung zugeschrieben wurde. Das für den *proton relay*-Mechanismus benötigte Vorliegen eines protonierten Histidin ist in der Fachliteratur allerdings äußerst umstritten, da dieses aufgrund der Ladung in einer hydrophoben Umgebung energetisch benachteiligt ist (Lv et al., 2013; Atkovska & Hub, 2017). Außerdem wurde auch bei FNT ohne zentrales Histidin wie EhFNT aus *Entamoeba histolytica* die Substratpassage nachgewiesen (Helmstetter et al., 2019), womit die Rolle dieses Histidins in vielen FNT als rein strukturell betrachtet wird (Atkovska & Hub, 2017). In der von Peng et al. (2021) publizierte PfFNT-Struktur liegen an der zytoplasmatischen Seite zudem eine N-terminale Helix neben einem unstrukturierten N-terminalen Loop sowie eine C-terminale Helix vor. Diese zytosolischen Helices sind konserviert bei den FNT-Transportproteinen aller *Plasmodium*-Spezies und unterscheiden diese von prokaryotischen FNT (Peng et al., 2021). FNT-Transportproteine der anderen humanpathogenen *Plasmodium*-Spezies *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* und *P. knowlesi* weisen gegenüber PfFNT eine Aminosäuresequenzidentität von mindestens 72 % auf (Wallock et al., 2021).

Die für die Transportproteinfunktion essenziellen Aminosäuren des Transportpfads sind dabei hochkonserviert und Sequenzabweichungen treten vornehmlich abseits des Transportpfades in der Peripherie der FNT-Transportproteine auf.

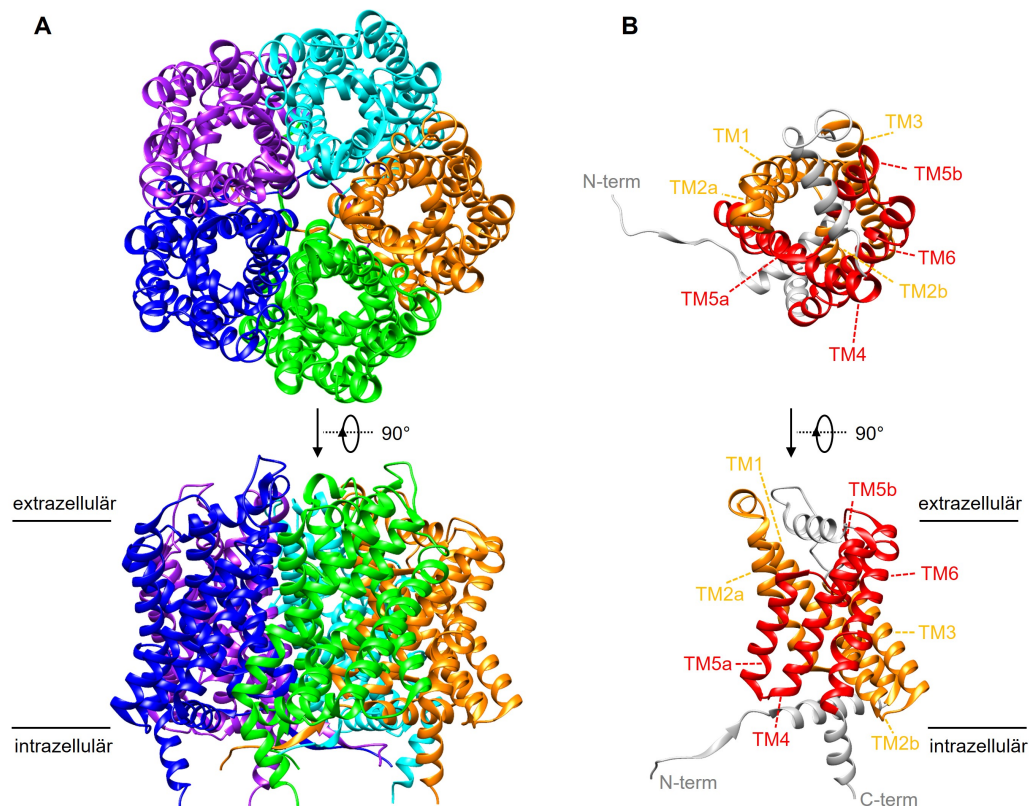


Abb. 1.5: Mittels Cryo-Elektronenmikroskopie aufgeklärte Proteinstruktur des PfFNT. **A** Struktur des PfFNT-Homopentamers in Aufsicht von extrazellulärer Seite (oben) und Seitenansicht (unten). Jedes Protomer ist in einer unterschiedlichen Farbe dargestellt. **B** Struktur eines PfFNT-Protomers in Aufsicht von extrazellulärer Seite (oben) und Seitenansicht (unten). In orange (TM1-TM3) und rot (TM4-TM6) sind jeweils die wiederholten Motive der 3+3 *invert repeat*-Struktur markiert. C-term, C-Terminus; N-term, N-Terminus; TM, Transmembranspanne. Strukturen visualisiert mittels Chimera auf Grundlage der Strukturinformationen von Peng et al. (2021) (PDB#: 7E26).

Aufgrund der sehr geringen Affinität zwischen Lactat und PfFNT wurde in den Elektronendichtekarten keine zusätzliche durch Lactat hervorgerufene Dichte aufgelöst. Durch die Strukturuntersuchungen von Peng et al. (2021) konnten trotzdem fundamentale Einsichten gewonnen und Hinweise auf den von Wiechert & Beitz (2017a) postulierten Substratleitungsmechanismus nach dem *dielectric slide*-Modell gefunden werden. Nach diesem kommt es aufgrund der elektrostatischen Anziehung des Substratanions (z. B. Lactat) durch ein Lysin im periplasmatischen Vestibül zu einer Verringerung der Substratacidität in der hydrophoberen Umgebung. Damit einhergehend wird das Substratanion durch das Bulk-Wasser protoniert, sodass das protonierte Substrat als Neutralteilchen die hydrophoben Konstriktionen passieren kann. Nach dem *dielectric slide*-Mechanismus wird somit im Gegensatz zum *proton relay*-Mechanismus kein zentrales Histidin für die Substratprotonierung benötigt.

Traditionell erfolgt die Klassifizierung von Transportproteinen nach strukturellen Begebenheiten und so wird die Diskriminierung von Transportproteinen zwischen Transportern und Kanälen im Allgemeinen sowie die Einordnung der FNT-Transportproteine im Speziellen kontrovers diskutiert. Klassische Transporter öffnen durch Konformationsänderungen zu einer Membranseite und ermöglichen damit den

Substrateintritt, während zum Substrattransport eine weitere Konformationsänderung zur Freilassung des Substrats auf der anderen Membranseite notwendig ist (Jardetzky, 1966; Shi, 2013). Bei klassischen Kanälen wie AQP hingegen kann die Porenöffnung simultan zu beiden Membranseiten hin erfolgen, wodurch die kontinuierliche Substratpassage ermöglicht wird (Fu et al., 2000; Murata et al., 2000). Während die klassische Konformationsänderung eines Transporters bei FNT-Transportproteinen aufgrund der AQP-ähnlichen rigiden Protomerstruktur (Wang et al., 2009) nicht möglich ist, legt die Auflösung einer verschlossenen PfFNT-Konformation und eines Inhibitor-gebundenen *inward open*-Zustands hingegen die strukturbasierte Einordnung von PfFNT als Transporter-ähnlich nahe (Peng et al., 2021). Aufgrund dieser gegensätzlichen Aussagen ist eine Klassifizierung der FNT-Transportproteine allein auf Grundlage von Proteinstruktur und der aktuellen Kenntnis der Proteindynamik nicht eindeutig möglich und vielmehr scheinen FNT eine Zwischenstufe zwischen Transportern und Kanälen einzunehmen.

Die jeweiligen Substrataffinitäten von PfFNT liegen in für Kanäle typischen Größenordnungen im millimolaren Konzentrationsbereich (Wu et al., 2015; Wiechert & Beitz, 2017b). Hingegen ist die Substratleitung der FNT-Transportproteine von der Protonenkonzentration abhängig (Wiechert & Beitz, 2017b; Bader & Beitz, 2020), was eine Transporter-ähnliche Funktionsweise vermuten lässt. PfFNT als Vertreter der FNT-Transportproteinfamilie weist neben einer sehr kanal-ähnlichen Proteinstruktur somit partiell Eigenschaften eines sekundär aktiven Transporters auf. Bader & Beitz (2020) schlugen daraufhin die Einordnung von Transportproteinen anhand ihrer Funktionsweise vor und bezeichneten PfFNT als funktionellen Transporter. FNT-Transportproteine erreichen durch einen Größenselektivitätsfilter und die hydrophoben Konstriktionen eine gewisse Präferenz für einige Substrate (Wiechert et al., 2017) und schließen andere Substrate aufgrund von Größe oder Ladungszustand aus. Allerdings können FNT-Transportproteine auch bei neutralem pH-Wert ein elektrogenes Anionenleck aufweisen (Lü et al., 2012a). Dieses Verhalten wird bei den *alternating access*-Monocarboxylattransportern höherer Eukaryoten durch einen zusätzlichen Protonentransfer von einem gebundenen Substrat auf ein negativ geladenes Aspartat (Geistlinger et al., 2023) ausgeschlossen, womit eine höhere Selektivität der *alternating access*-Monocarboxylattransporter gewährleistet und Anionenleckströme verhindert werden. FNT-Transportproteine stellen damit möglicherweise eine Evolutionszwischenstufe zwischen AQP-Kanälen und sekundär aktiven Transportern dar, die eine verbesserte Kontrolle der Substratpassage über Membranen von mehrzelligen Organismen ermöglicht.

Lyu et al. (2021) zeigten die Struktur des PfFNT allein und in Komplex mit dem aus der Malariabox identifizierten PfFNT-Inhibitor MMV007839. Aufgrund der begrenzten Auflösung der Proteinstruktur (2,8 Å) wurde MMV007839 allerdings in der zyklischen, hemiketalen Prodrug-Form und nicht als aktive, vinyloge Säure eingefügt, was zu einer Fehlinterpretation des Inhibitionsmechanismus führte. Peng et al. (2021) konnten dies durch Aufklärung der PfFNT-Wildtypproteinstruktur mit gebundenem MMV007839 und einer verbesserten Auflösung von 2,3 Å berichtigen sowie den von Golldack et al. (2017) postulierten Bindemechanismus als Substratanalogon bestätigen (Abb. 1.6 A, Kap. 1.4). So konnten polare Interaktionen zwischen der vinylogen Säurefunktion von MMV007839 und den Aminosäuren T106, G107 und H230 des PfFNT-Transportpfads identifiziert sowie hydrophobe Wechselwirkungen zwischen dem restlichen Molekülteil von MMV007839 und den hydrophoben Aminosäuren nahegelegt werden (Peng et al., 2021). Die Wichtigkeit dieser polaren Interaktionen und insbesondere die Identität der G107-Aminosäure für die Inhibitoraffinitäten wurde bereits durch Inhibitionsstudien mit entsprechenden PfFNT-Mutanten belegt (Golldack et al., 2017; Walloch et al., 2020; Peng et al., 2021). Genauere Einsichten könnten durch

die tatsächliche Visualisierung der Proteinstruktur der entsprechenden PfFNT-Mutanten mit gebundenem Inhibitor erlangt werden. Trotz der im Vergleich zur Röntgenkristallographie geringeren erwarteten Auflösung könnte so die Inhibitorbindestelle bestätigt werden. Zudem sind vermutlich Aussagen über die Orientierung und Konformation des Inhibitors sowie weiteres Potenzial für die Inhibitoroptimierung möglich. Abb. 1.6 B zeigt ein mittels AlphaFold auf Grundlage der Aminosäuresequenz der PfFNTG107S-Mutante generiertes Modell der Inhibitorbindestelle. Der Aminosäureaustausch an Position G107 zu einem größeren Aminosäurerest wie Serin führt u. a. zu einer sterischen Hinderung der MMV007839-Bindung.

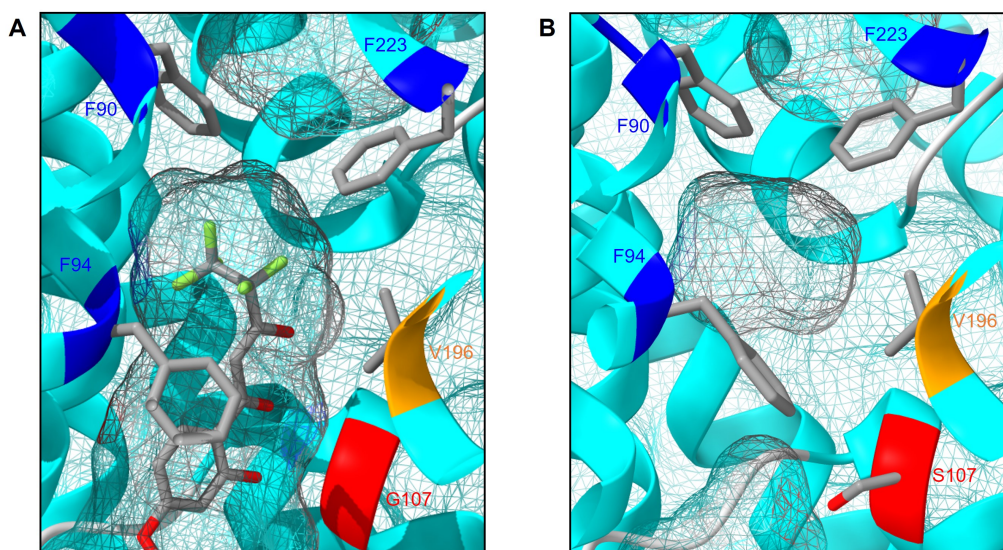


Abb. 1.6: Inhibitorbindestelle im PfFNT-Transportpfad. A Bindung von MMV007839 in der PfFNT-Inhibitorbindestelle. Visualisierung der Struktur mittels ChimeraX auf Grundlage der Strukturinformationen von Peng et al. (2021) (PDB#: 7E27). **B** Strukturvorhersage einer Mutante von PfFNT mit einem Aminosäureaustausch an Position G107 (PfFNTG107S) mittels AlphaFold auf Grundlage der PfFNTG107S-Aminosäuresequenz.

1.4 Fortschritte bei der Optimierung von PfFNT-Inhibitoren

Vor Veröffentlichung der experimentell aufgeklärten PfFNT-Proteinstruktur basierte das Konzept zum Inhibitor-Design hauptsächlich auf der Analyse von Struktur-Aktivitätsbeziehungen (*structure-activity relationships*, SAR) und auf von der verfügbaren FocA-Struktur (Wang et al., 2009) abgeleiteten PfFNT-Strukturmodellen. Durch Analyse der Beziehung zwischen chemischer Struktur der inhibierenden Substanz und der daraus resultierenden biologischen Aktivität können für die effektive Inhibition relevante Strukturparameter identifiziert und negativ beeinflussende Elemente ausgeschlossen werden. Auf Grundlage von identifizierten Hitsubstanzen und von postulierten Inhibitionsmechanismen können durch Modifizierungen der Inhibitorstruktur durch rationales Wirkstoffdesign potenziell effektivere Substanzen entwickelt werden.

Ausgehend von den beiden Hitsubstanzen aus den Malariabox-Screenings (MMV000972 und MMV007839, Abb. 1.4 B) wurden die PfFNT-Inhibitoren zunächst durch Erhöhung der Affinität zum PfFNT-Target verbessert. Für beide Substanzen wurden submikromolare IC_{50} -Werte bei der direkten PfFNT-Inhibition im hefebasierten Radioassay erhalten, während der EC_{50} -Wert der Wachstumshemmung von *P. falciparum*-Parasitenkulturen für MMV000972 um etwa eine Zehnerpotenz größer war als für MMV007839 (Hapuarachchi et al., 2017; Golldack et al., 2017). Beide Substanzen unterscheiden sich ausschließlich in

einem Methoxysubstituenten am Aromaten und die Effektivitätsdifferenz bei Wachstumshemmung der Parasitenkulturen wird vermutlich durch die abweichende Substanzaufnahme über die Parasitenplasmamembran hervorgerufen. Durch Tautomerie stehen MMV000972 und MMV007839 jeweils in einem Gleichgewicht zwischen der hemiketalen, geschlossenen Form und der entsprechenden vinylogenen Säureform (Abb. 1.7 A). Durch Entfernung der phenolischen Hydroxylgruppe und damit veränderter Ausbildung des Hemiketals konnte gezeigt werden, dass die entsprechende vinyloge Säure die aktive Bindungsform ist und PfFNT mit nahezu gleichbleibender Effektivität hemmt (Golldack et al., 2017). Demnach könnte das ungeladene Hemiketal die Transportform für die Passage der Lipidbilayermembran darstellen, während eine bei physiologischem pH-Wert negativ geladene Form des Anions der vinylogenen Säure die Bindungsform nach dem postulierten Inhibitionsmechanismus nach Golldack et al. (2017) darstellt (Abb. 1.7 B). PfFNT-Inhibitoren binden diesem Inhibitionsmechanismus zufolge von der intrazellulären Seite des an der parasitären Plasmamembran lokalisierten Transportproteins und blockieren dadurch den PfFNT-Transportpfad. Die polyfluorierte und hydrophobe Kohlenstoffkette ragt dabei tief bis zur extrazellulären Konstriktion in den ebenso hydrophoben Transportpfad hinein. Die negative Ladung des Anions der vinylogenen Säurefunktion ist dabei analog zu der negativen Ladung eines Lactatanions, während die polyfluorierte Kohlenstoffkette ein neutral geladenes, protoniertes Lactat (Milchsäure) imitieren könnte. Das Vorliegen der deprotonierten vinylogenen Säure ist dabei essenziell für die Inhibitoraktivität und stützt somit zusammen mit der Präsenz eines möglichen Milchsäureanalogons den postulierten *dielectric slide*-Transportmechanismus (Wiechert & Beitz, 2017a). Das aromatische System und mögliche aromatische Substituenten sind zum Parasitenzytosol ausgerichtet und verschließen damit die intrazelluläre Seite des Transportpfads. Durch die späteren Strukturuntersuchungen von PfFNT mit gebundenem Inhibitor MMV007839 mittels Cryo-Elektronenmikroskopie konnte der postulierte Inhibitionsmechanismus bestätigt werden (Peng et al., 2021).

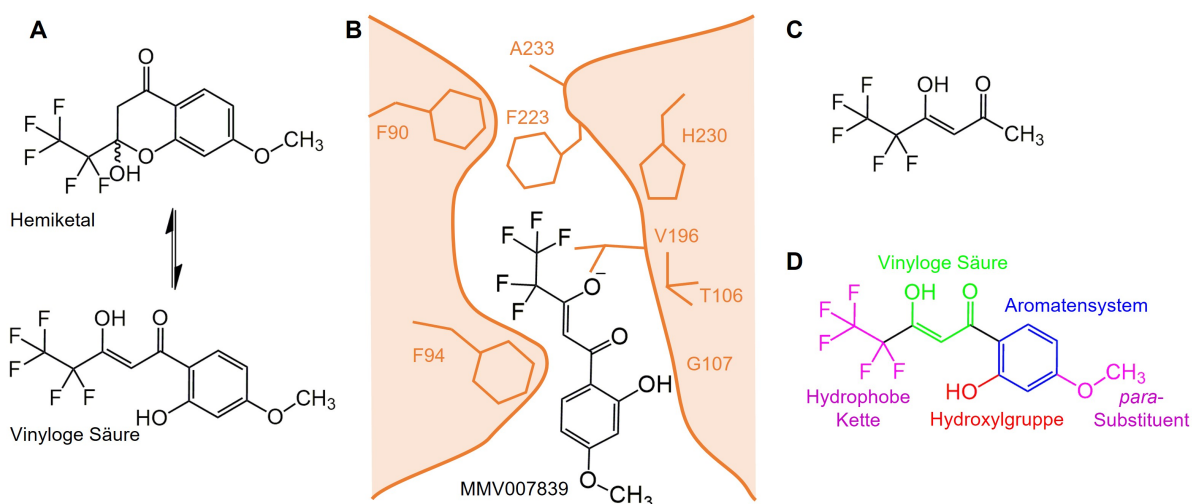


Abb. 1.7: PfFNT-Inhibition durch den Inhibitor MMV007839. **A** Tautomeres Gleichgewicht zwischen hemiketalen, geschlossener Form und vinylogener Säureform von MMV007839. **B** Von Golldack et al. (2017) postulierter PfFNT-Inhibitionsmechanismus. Das bei physiologischen pH-Wert vorliegende Anion der vinylogenen Säureform von MMV007839 bindet von intrazellulärer Seite aus in den PfFNT-Transportpfad und blockiert diesen. **C** Strukturformel des identifizierten Pharmakophors. **D** Strukturformel von MMV007839 mit den nach Nerlich et al. (2021) markierten essenziellen Strukturbestandteilen und möglichen Einheiten für potenzielle Inhibitormodifizierungen.

Mittels Analyse von Struktur-Aktivitätsbeziehungen der von MMV007839 abgeleiteten Inhibitorvarianten konnte zunächst eine erste Generation an spezifischen PfFNT-Inhibitoren dargestellt werden (Golldack et al., 2017). Über Funktionsüberprüfungen von Inhibitorvarianten konnte zudem das für die Wechselwirkung mit dem PfFNT-Target verantwortliche Pharmakophor (Abb. 1.7 C) definiert werden, welches in hefebasierten Radioassays bereits einen IC_{50} -Wert von $1,9 \mu M$ aufweist (Golldack et al., 2017). Neben der essenziellen vinylogenen Säurefunktion stellte sich durch Testung von Modifizierungen der Kettenlänge ein Pentafluorethyl-Rest als effektiv zur PfFNT-Hemmung heraus. Auf der anderen Seite lässt die Modifikation an der *para*-Position des Benzolrings weitere Möglichkeiten zur Inhibitoroptimierungen erwarten. Ein variiertes Aromatensystem und entsprechend modifizierte *para*-Substituenten können zur Erhöhung der Inhibitoraffinität zum PfFNT führen. In Abb. 1.7 D sind diese bei Nerlich et al. (2021) zusammengefassten Strukturbestandteile eines effektiven PfFNT-Inhibitors gekennzeichnet. Auf die markierte und zur Zyklisierung notwendige phenolische Hydroxylgruppe kann verzichtet werden, wenn eine ausreichende Plasmamembrangängigkeit gewährleistet wird und die Substanz die Bindestelle an der intrazellulären Seite des PfFNT-Transportpfades erreichen kann.

Durch Aussetzen von *P. falciparum*-Parasiten einer subletalen MMV007839-Konzentration wurde eine PfFNTG107S-Resistenzmutante mit einem einzigen Aminosäureaustausch selektiert, die eine geringere Anfälligkeit gegenüber MMV007839 mit IC_{50} -Werten im zweistelligen mikromolaren Bereich zeigte (Hapuarachchi et al., 2017; Golldack et al., 2017). Die PfFNTG107S-Resistenzmutante ermöglichte den selektierten Plasmodien somit eine größere Widerstandskraft gegenüber den potenziellen Antimalariawirkstoffen ohne wesentliche Einschränkung des Lactattransports (Golldack et al., 2017). Zur Umgehung dieser Resistenzmutation wurden Inhibitoren entwickelt, bei denen es zu keiner sterischen Hinderung durch das vorliegenden Serin an Position 107 (S107) kommt. Auf Grundlage des Inhibitionsmechanismus wurde vermutet, dass die phenolische Hydroxylgruppe von MMV007839 mit dem Serinrest der PfFNTG107S-Resistenzmutante kollidiert (Abb. 1.7 B). Durch Entfernung der entsprechenden Hydroxylgruppe bei Synthese von BH296 (Abb. 1.8 A) konnte nur eine Erhöhung der Effektivität gegenüber PfFNTG107S um etwa eine Zehnerpotenz und kein IC_{50} -Wert im angestrebten submikromolaren Bereich erzielt werden (Golldack et al., 2017). Zudem ist durch die fehlende Hydroxylgruppe keine Zyklisierung zur hemiketalen Transportform und damit nur eine durch die vermutlich begrenzte Transmembranpassage bedingte geringe Effektivität in *Plasmodium*-Parasitenkulturen möglich. Durch Einfügen eines Wasserstoffbrückenakzeptors in Form eines Stickstoffatoms (BH297) konnte ein submikromolarer IC_{50} -Wert für die Inhibition von PfFNTG107S im hefebasierten biophysikalischen Radioassay erzielt werden (Wallock et al., 2020). Bei Behandlung von *P. falciparum*-Parasitenkulturen wurden hingegen nur mikromolare EC_{50} -Werte erhalten, wodurch eine weitere Inhibitoroptimierung zur Generierung von gegen Parasitenkulturen effektiveren Inhibitoren notwendig war. Diese Weiterentwicklung wurde durch Synthese der Substanz BH267.meta realisiert, bei der die *para*-Methoxygruppe von BH297 entfernt wurde und sowohl im biophysikalischen Radioassay als auch in Parasitenkulturen erstmalig IC_{50} - bzw. EC_{50} -Werte im submikromolaren Bereich erhalten wurden (Wallock et al., 2020). Für die Ausbildung von potenziellen Wasserstoffbrückenbindungen zu S107 und damit die Effektivität der PfFNTG107S-Inhibition war die Positionierung des Stickstoffatoms im Heteroaromaten entscheidend (Abb. 1.8 B). Nur bei Lokalisation des Stickstoffatoms in *ortho*- oder *meta*-Position konnten submikromolare IC_{50} -Werte erzielt werden. BH267.meta zeigte in weiteren Untersuchungen nur eine geringe Zytotoxizität gegenüber humanen Zellen und eine geringe Inhibition des humanen Monocarboxylattransporters MCT1 (Wallock et al., 2021).

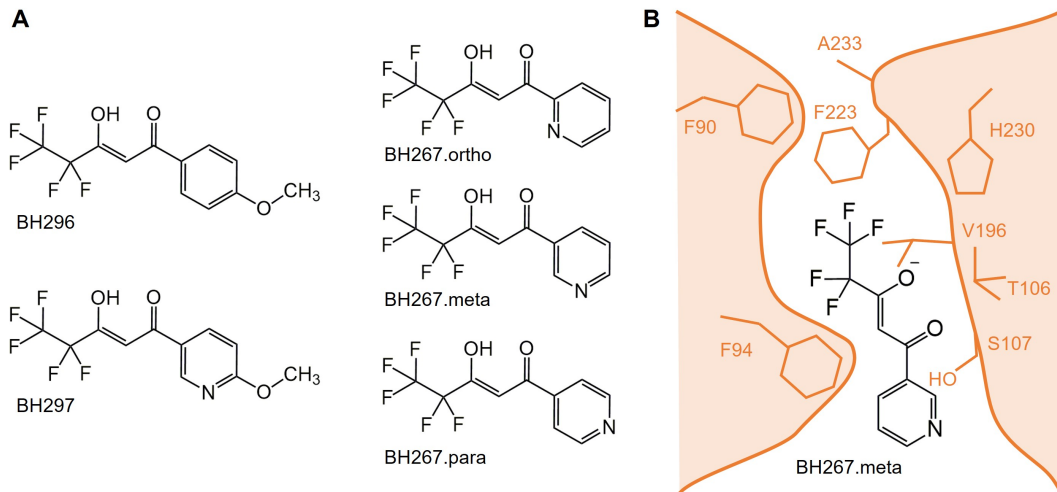


Abb. 1.8: Inhibition der PfFNTG107S-Resistenzmutante durch weiterentwickelte Inhibitoren. A Strukturformeln von einigen weiterentwickelten PfFNT-Inhibitoren. **B** Mögliche Bindung von BH267.meta an die PfFNTG107S-Resistenzmutante unter damit einhergehender Umgehung des G107S-Aminosäureaustausches.

Neben PfFNTG107S konnte nach Inkubation mit subletalen Konzentrationen von MMV007839 bzw. BH267.meta zwei weitere Resistenzmutanten (PfFNTV196L und PfFNTG21E) mit jeweils einem einzigen Aminosäureaustausch selektiert werden (Davies et al., 2023). Die Aminosäure V196 ist am Transportpfad lokalisiert und möglicherweise bei der Interaktion mit einem PfFNT-Inhibitor beteiligt (Abb. 1.7 B und Abb. 1.8 B). Hingegen ist die Resistenzwirkung des Aminosäureaustausches bei G21 und damit in der weniger charakterisierten N-terminalen Helix nicht geklärt. Möglicherweise könnte eine negative Ladung an dieser Helix die Annäherung des ebenso negativ geladenen Inhibitors aus Richtung der intrazellulären Seite erschweren (Peng et al., 2021). Diese neu aufgetretenen Resistenzmutanten konnten im hefebasierten biophysikalischen Radioassay durch BH267.meta ebenfalls mit IC_{50} -Werten im submikromolaren Konzentrationsbereich gehemmt werden. BH267.meta stellt damit eine neue Leitsubstanz und die Grundlage für weitere Inhibitoroptimierungen dar. Für die potenzielle Anwendung als Antimalariawirkstoff und zukünftige finanzielle Projektförderung wird von der MMV eine halbmaximale effektive Konzentration (EC_{50}) in Parasitenkulturen von unter 100 nM gefordert. Durch entsprechend effektive Wirkstoffe soll die Blutkonzentration der Substanz und mögliche Nebenwirkungen gering gehalten werden. BH267.meta erreicht bei *P. falciparum* 3D7-Kulturen und nicht mutiertem PfFNT einen EC_{50} -Wert von 290 nM (Walloch, 2021). Durch weitere Inhibitoroptimierung muss somit zunächst eine erhöhte Inhibitoraffinität zum PfFNT-Wildtyp und idealerweise auch zu den beschriebenen PfFNT-Resistenzmutanten erzielt werden. Außerdem sollte die chemische Stabilität und biologische Halbwertszeit von BH267.meta und von weiterentwickelten PfFNT-Inhibitoren sichergestellt werden, um den Einsatz als potenzieller Antimalariawirkstoff zu rechtfertigen. Die kürzlich veröffentlichte PfFNT-Wildtypproteinstruktur in Komplex mit MMV007839 ist wegweisend für initiale, rationale Inhibitorverbesserungen und Erhöhung der Inhibitoraffinitäten zum PfFNT-Wildtypprotein. Durch die Selektion von Resistenzmutanten wurden allerdings neue Anforderungen an einen breit wirksamen Wirkstoff gestellt. Limitiert wird die rationale Entwicklung von optimierten Inhibitoren und Wirkstoffkandidaten durch die fehlende Struktur von PfFNT-Resistenzmutanten mit der gebundenen Leitsubstanz BH267.meta und die Unkenntnis über die tatsächlichen Wechselwirkungen der Inhibitoren mit den PfFNT-Resistenzmutanten. Zur Identifizierung von sterisch beanspruchbaren

Räumen und potenziell adressierbaren PfFNT-Inhibitor-Wechselwirkungen ist die Strukturaufklärung der PfFNT-Resistenzmutanten in Komplex mit gebundenem Inhibitor von entscheidender Bedeutung.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Der PfFNT-Inhibitorbindemechanismus wurde durch Untersuchung verschiedener PfFNT-Inhibitoren an unterschiedlichen PfFNT-Mutanten sowie durch die kürzlich aufgelöste PfFNT-Wildtypproteinstruktur weitestgehend bestätigt. Ziel der vorliegenden Arbeit war eine weitergehende Forcierung der Inhibitorweiterentwicklung mittels Strukturuntersuchung der G107S-Mutante des Lactattransportproteins PfFNT (PfFNTG107S) mit gebundenem Inhibitor BH267. meta *via* hochauflösender Cryo-Elektronenmikroskopie. Dazu sollten funktionsfähige PfFNTG107S-Pentamere hergestellt und für elektronenmikroskopische Untersuchungen vorbereitet werden. Durch Ausnutzen eines *E. coli*-basierten Systems zur zellfreien Proteinsynthese sollten zunächst hohe Ausbeuten von gereinigtem PfFNTG107S und weiterer PfFNT-Resistenzmutanten in Gegenwart von Detergenzien hergestellt werden. Zur Vorbereitung der Proteinproben für nachfolgende Strukturuntersuchungen sollte die Probenqualität sichergestellt und die Proteinproben der Cryo-Elektronenmikroskopie zugeführt werden. Für die Bereitstellung einer membranähnlichen Umgebung zur Proteinstrukturaufklärung des nativen Transportproteins wurde die Nanodisctechnologie angewendet. Dazu sollten Lipid-Protein-Nanodiscs mit verschiedenen Lipidbilayerdurchmessern und Lipidkompositionen hergestellt und die Nanodiscqualität analysiert und optimiert werden. Zellfrei hergestelltes PfFNTG107S sollte in Folge posttranslational in entsprechende Nanodiscs rekonstituiert und die Rekonstitutionseffizienz durch Variation von Assemblierungsprotokollen maximiert werden. Untersuchungen zur Isolierung und Reinigung von in Nanodiscs rekonstituiertem, pentamerem PfFNTG107S *via* Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie sowie zur Aufbereitung für die Cryo-Elektronenmikroskopie sollten die Grundlage für nachfolgende Strukturuntersuchungen schaffen.

Neben dem weitgehend neuartigen System der zellfreien Membranproteinsynthese wurden konventionelle Expressionssysteme auf Grundlage von Hefesystemen (*S. cerevisiae* und *Pichia pastoris*) und Humanzellen (HEK-Zellen) zur Proteinproduktion verwendet. Die Funktionalität des in diesen eukaryotischen Expressionssystemen hergestellten PfFNTG107S-Proteins sollte durch Kultivierung in entsprechenden Selektionsmedien und mittels biophysikalischer Transportmessungen bestätigt werden. Zum weiteren Nachweis der Herstellung von funktionellen FNT-Transportproteinen diene ein auf dem Zellviabilitätsindikator Resazurin basierendes phänotypisches Hochdurchsatzwirkstoffscreening, welches zudem zur Einordnung der inhibitorischen Potenzen von entwickelten Inhibitorsubstanzen verwendet werden sollte. Mittels des Hochdurchsatzwirkstoffscreenings sollten Inhibitoren identifiziert werden, die neben PfFNT auch FNT-Transportproteine anderer humanpathogener Malariaerreger der Gattung *Plasmodium* effektiv hemmen. Zu FNT-Strukturuntersuchungen sollte PfFNTG107S aus den eukaryotischen Expressionssystemen mittels geeigneter Solubilisierungsdetergenzien extrahiert und anschließend stabilisiert werden. Zur Verbesserung der Proteinextraktionseffizienz aus *S. cerevisiae*-Hefezellen wurde die konditionelle Sekretionsmutante des *S. cerevisiae*-Stamms NY17 eingeführt und die PfFNTG107S-Extraktion aus angereicherten Post-Golgi-Vesikeln evaluiert. Die Proteinqualität der in den verschiedenen Expressionssystemen hergestellten FNT-Transportproteine sollte vergleichend sichergestellt werden. Aus den jeweiligen Membranfraktionen isoliertes PfFNTG107S sollte weiterhin stabilisiert und zu Strukturuntersuchungen mit gebundenem PfFNT-Inhibitor BH267. meta der Cryo-Elektronenmikroskopie zugeführt werden.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät und Modellbezeichnung	Hersteller
Brutschrank Kelvitron™ T	Heraeus, Hanau
Chemostar <i>Touch ECL & Fluorescence Imager</i>	INTAS Science Imaging Instr., Göttingen
Digital-Labor-pH-Meter Lab 850	Schott Instruments, Mainz
<i>Elektrophoresis Power Supply</i> EPS 300	Pharmacia Biotech, Stockholm (SE)
<i>Elektroporator</i> Gene Pulser™ II	Bio-Rad, München
→ <i>Pulse Controller</i> II	Bio-Rad, München
Extruder LiposoFast	Avestin, Mannheim
Feinwaage ABS 120-4	Kern & Sohn, Balingen
Fermenter BIOSTAT™ Aplus	Sartorius, Göttingen
Gel-Dokumentationssystem Raytest IDA	Elysia-Raytest, Straubenhardt
Gefrierbehälter Mr. Frosty™	Thermo Scientific, Schwerte
Heizblock Dri-Block DB20	Techne, Stone (GB)
Homogenisator <i>French Press Cell Disruptor</i> FA-078	Thermo Scientific, Schwerte
Inkubator Infors HT Minitron	Boston Laboratory Equipment, Woburn (USA)
Inkubator Sanyo MIR 154	Boston Laboratory Equipment, Woburn (USA)
Inkubator WTC Binder C 150	Binder, Tuttlingen
Kühlzentrifuge Multifuge 1S-R	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge PerfectSpin 24 R	Peqlab, Erlangen
Labsystems Bioscreen C	Oy Growth Curves Ab, Helsinki (FI)
Magnetheizrührer Ikmag™ Ret-GS	IKA-Werke, Staufen
<i>Microplate Reader</i> Infinite F200	Tecan Group, Männedorf (CH)
<i>Microplate Shaker</i> Compact Digital	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Mikroskop Olympus IX50 invers, mit Phasenkontrast	Olympus, Hamburg
Mikrozentrifuge PerfectSpin 24 Plus	Peqlab, Erlangen
Multikanal-Pipette E1-ClipTip™ Bluetooth™	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Orbitalschüttler Certomat™ MO II	Sartorius, Göttingen
pH-Meter SevenCompact S220-Basic	Mettler-Toledo, Gießen
Photometer BioPhotometer™ 6131	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage PB 3002-S Delta Range™	Mettler-Toledo, Gießen
Reinluftwerkband Heraguard™	Heraeus, Hanau
Rotationsrad TC-7	New Brunswick Scientific, Edison (USA)
Rotator Grant Bio PTR-30 360-degree	Keison International, Essex (GB)
SDS-PAGE-Gelgießstände und -Laufkammern	Peqlab, Erlangen
SEC-System ÄKTApurifier™ 10	GE Healthcare, Freiburg
→ Detektor UV-900, Flow-cell 10 mm, Fraktionierer Frac-950, Kontrolleinheit U-950, Mischeinheit M-925, Pumpe P-903, Säule Superdex 200 10/30 GL, Ventil INV-907	
Spectropolarimeter Jasco J-720	JASCO, Easton (USA)
Sterilbank Herasafe™	Heraeus, Hanau
Stopped-Flow-Apparatur SFM-300	BioLogic, Claix (FR)
→ Küvette FC-15/7.5, Mischeinheit SFM-2000, Monochromator BH-10-61 UV, MPS 70/2 Mikrokompressor, PCI-Konnektor 6221, Photomultiplier PMS 250, Spannungsquelle ALX 250, UV/Vis-/FL-Spektrometer MOS-200	
Thermocycler Biometra TRIO	Analytik Jena, Jena
Trans-Blot™ <i>SD Semi-Dry Transfer Cell</i>	Bio-Rad, München
Ultraschallhomogenisator Sonoplus HD 2070	Bandelin, Berlin
Ultrazentrifuge Optima™ XL-80 K	Beckman Coulter, Krefeld
→ <i>Swinging-Rotor</i> SW60 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
→ Ultrazentrifugen-Rotor Type 50.2 Ti	Beckman Coulter, Krefeld
→ Ultrazentrifugen-Rotor Type 45 Ti	Beckman Coulter, Krefeld

UV-Transluminator UVT-20 S/M	Herolab Laborgeräte, Wiesloch
Vortex-Genie™ 2	Scientific Industries, Bohemia (USA)
Wasserbad 183	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wippschüttler WS-10	Edmund Bühler, Hechingen
Zellfrei-Reaktionskammern (analytisch)	Pharmazeutisches Institut, CAU Kiel
Zellfrei-Reaktionskammern (präparativ)	Pharmazeutisches Institut, CAU Kiel
Zellhomogenisator BeadBeater™ mit 350 ml-Gefäß	Carl Roth, Karlsruhe
Zellzählkammer Fuchs-Rosenthal 0,2 mm	Marienfeld Superior, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Biofuge™ Pico	Heraeus, Hanau
Zetasizer Nano S	Malvern Panalytical, Malvern (GB)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Chromatographie-Papier Whatman™ 3MM	GE Healthcare, Freiburg
Chromatographie-Säulen Poly-Prep™	Bio-Rad, München
Dialysekassetten Slide-A-Lyzer™ (10K MWCO, 3 ml)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Dialysekassetten Slide-A-Lyzer™ (10K MWCO, 12 ml)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Dialyserschlauch Visking (14 kDa MWCO)	Carl Roth, Karlsruhe
Elektroporationsküvetten Gene Pulser™ (0,2 cm)	Bio-Rad, München
Extrusionsmembranen Nuclepore™ Track-Etched, Whatman 0,2 µm	Cytiva, Marlborough (USA)
Glasperlen (säuregewaschen, Ø 425-600 µm)	Sigma Aldrich, München
NativePAGE™-Gradientengel (4 %-16 %) Bis-Tris	Life Technologies, Darmstadt
PVDF-Membranen Amersham™ Hybond™	GE Healthcare, Freiburg
Sterilfilter Filtropur S 0.2	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter Filtropur S 0.45	Sarstedt, Nümbrecht
96-Well-Platten PS, transparenter Rundboden	Sarstedt, Nümbrecht
100-Well-Platten Honeycomb	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Zellkulturflaschen CELLSTAR™ 75 cm²	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AT)
Zellkulturflaschen CELLSTAR™ 175 cm²	Greiner Bio-One, Kremsmünster (AT)
Zentrifugalfiltereinheiten Amicon™ Ultra-4 (30 kDa)	Merck, Darmstadt
Zentrifugalfiltereinheiten Amicon™ Ultra-4 (100 kDa)	Merck, Darmstadt
Zentrifugalfiltereinheiten Amicon™ Ultra-0,5 (30 kDa)	Merck, Darmstadt
Zentrifugalfiltereinheiten Amicon™ Ultra-0,5 (100 kDa)	Merck, Darmstadt
Zentrifugentubes Ultra-Clear™ (4 ml, 11 x 60 mm)	Beckman Coulter, Krefeld

2.3 Antikörper

Die angegebene Konzentration *c* gibt die finale Antikörperkonzentration in M-TBST-Puffer an.

Antikörper	<i>c</i>	Hersteller
Primärantikörper anti-Penta-His, <i>Mouse</i> , monoklonal	40 ng/ml	Qiagen, Hilden
Primärantikörper anti-Hämagglutinin (anti-HA), <i>Mouse</i> , monoklonal	40 ng/ml	Roche Diagnostics, Mannheim
Primärantikörper anti-T7-RNA-Polymerase, <i>Mouse</i> , monoklonal	40 ng/ml	Merck, Darmstadt
Primärantikörper GFP (FL), <i>Rabbit</i> , polyklonal	20 ng/ml	Santa Cruz Biotechn., Heidelberg
Primärantikörper anti-PfFNT (gegen 15 C-terminale AS), <i>Rabbit</i>	100 ng/ml	BioGenes, Berlin
Sekundärantikörper Peroxidase AffiniPure™ Goat anti- <i>Mouse</i> IgG	80 ng/ml	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire (GB)
Sekundärantikörper Peroxidase AffiniPure™ Goat anti- <i>Rabbit</i> IgG	40 ng/ml	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire (GB)

2.4 Kits und Marker

Material	Hersteller
Bradford-Protein-Assay Quick Start™	Bio-Rad, München
<i>E. coli</i> tRNA	Roche Diagnostics, Mannheim
HiYield™ PCR Clean-up/Gel Extraction Kit	Süd-Laborbedarf, Gauting
JetPRIME™-Transfektionskit	Polyplus, Illkirch (FR)
NucleoBond™ PC 500	Macherey-Nagel, Düren
peqGOLD Protein-Marker III (Prestained)	Peqlab, Erlangen
peqGOLD Protein-Marker V (Prestained)	Peqlab, Erlangen
Proteaseinhibitor cOmplete™	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase-Inhibitor RiboLock	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Westernblotting-Substrate Clarity™ ECL	Bio-Rad, München
Wizard™ Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega, Mannheim

2.5 Enzyme und Reaktionspuffer

Material	Hersteller
BamHI-Restriktionsendonuklease (10 U/μl)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
DpnI-Restriktionsendonuklease (10 U/μl)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
EcoRI-Restriktionsendonuklease (10 U/μl)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Endo H _F -Glykosidase (1000 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Faktor Xa-Protease (1 mg/ml)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Green-Puffer (10x)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
KpnI-Restriktionsendonuklease (10 U/μl)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
OneTaq™ DNA-Polymerase (5 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
OneTaq™ Standard-Reaktionspuffer (5x)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
NcoI-Restriktionsendonuklease (10 U/μl)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Orange-Puffer (10x)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Pfu-Reaktionspuffer (10x)	Agilent Technologies, Waldbronn
Pfu Turbo-DNA-Polymerase (2,5 U/μl)	Agilent Technologies, Waldbronn
PNGase F-Glykosidase (500 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
PstI-Restriktionsendonuklease (10 U/μl)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Pyruvatkinase (10 mg/ml)	Roche Diagnostics, Mannheim
SacI-Restriktionsendonuklease (10 U/μl)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Sall-Restriktionsendonuklease (10 U/μl)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
SpeI-Restriktionsendonuklease (10 U/μl)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Tango-Puffer (10x)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
T4-DNA-Ligase (5 U/μl)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
T4-DNA-Ligase-Puffer (10x)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
TEV-Protease (10 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt a.M.
Gibco™ Trypsin-EDTA (0,05 %), phenolrot	Life Technologies, Darmstadt
XbaI-Restriktionsendonuklease (10 U/μl)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
XhoI-Restriktionsendonuklease (10 U/μl)	Thermo Fischer Scientific, Schwerte
Zymolyase 20T	Carl Roth, Karlsruhe

2.6 Chemikalien

MMV000972, MMV007839, Nifluminsäure, das Pharmakophor sowie alle PfFNT-Inhibitoren mit der Bezeichnung startend mit 'BH' wurden von Björn Henke in der Arbeitsgruppe Beitz synthetisiert.

Chemikalie	Hersteller
Acetylphosphat (Li^+/K^+ -Salz)	Sigma Aldrich, München
Adenin-Hemisulfat	Sigma Aldrich, München
Adenosin-5'-triphosphat-Hydrat (Na^+ -Salz)	Sigma Aldrich, München
Agar Bacteriological	Oxoid, Basingstoke (USA)
Agarose LE	GenaxxonBioScience, Ulm
L-Alanin	Fluka Chemie, Buchs (CH)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin (Na^+ -Salz)	GenaxxonBioScience, Ulm
Antifoam Y-30	Sigma Aldrich, München
L-Arginin-Monohydrochlorid	Sigma Aldrich, München
L-Asparagin-Monohydrat	Sigma Aldrich, München
L-Asparaginsäure-Monohydrat (Na^+ -Salz)	Sigma Aldrich, München
AZD-3965	Selleck Chemicals, Köln
Bacto TM Peptone	BD Biosciences, San Jose (USA)
Bacto TM Tryptone	BD Biosciences, San Jose (USA)
Bacto TM Yeast Extract	BD Biosciences, San Jose (USA)
D-Biotin	Carl Roth, Karlsruhe
Bis-TRIS	Carl Roth, Karlsruhe
Blasticidin	Invivogen, Toulouse (FR)
Borsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Brij TM 78	Sigma Aldrich, München
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
BSA (Albumin Fraction V)	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Calciumsulfat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat (CHAPS)	Anatrace, Maumee (USA)
Cholesterylhemisuccinat (CHS)	Sigma Aldrich, München
Cholsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Citronensäure	Carl Roth, Karlsruhe
Cobaltchlorid-Hexahydrat	Sigma Aldrich, München
Coomassie Brilliant Blue G-250	Serva Electrophoresis, Heidelberg
L-Cystein	Sigma Aldrich, München
Cytidin-5'-triphosphat (Na^+ -Salz)	Sigma Aldrich, München
n-Decyl- β -D-maltopyranosid (DM)	Anatrace, Maumee (USA)
2,2-Didecylpropan-1,3-bis- β -D-maltopyranosid (LMNG)	Anatrace, Maumee (USA)
Difco TM Yeast Nitrogen Base	BD Biosciences, San Jose (USA)
Dikaliumhydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerol (DOPG)	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth, Karlsruhe
DNA aus Lachs-Testis (Na^+ -Salz)	Sigma Aldrich, München
n-Dodecyl-N,N-dimethylamin-N-oxid (LDAO)	Anatrace, Maumee (USA)
n-Dodecyl- β -D-maltopyranosid (DDM)	Anatrace, Maumee (USA)
Dodecylphosphocholin (DPC)	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)

<i>E. coli</i> Polar Lipids (Ecpl)	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
Eisensulfat-Heptahydrat	Sigma Aldrich, München
Essigsäure	J.T.Baker, München
Ethanol	J.T.Baker, München
Ethidiumbromid	MP Biomedicals, Illkirch (FR)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
FBS Premium	PAN-Biotech, Aidenbach
Folinsäure (Ca ²⁺ -Salz)	Sigma Aldrich, München
D-Galactose	Carl Roth, Karlsruhe
Gibco™ <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt
Gibco™ <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS)	Life Technologies, Darmstadt
Gibco™ Pen-Strep (10.000 U/ml)	Life Technologies, Darmstadt
D-Glucose-Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe
L-Glutamin	Sigma Aldrich, München
L-Glutaminsäure-Monohydrat (K ⁺ -Salz)	Fluka Chemie, Buchs (CH)
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
Glyco-diosgenin (GDN)	Anatrace, Maumee (USA)
Guanosin-5'-triphosphat-Hydrat (Na ⁺ -Salz)	Sigma Aldrich, München
L-Histidin-Monohydrochlorid-Monohydrat	Sigma Aldrich, München
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth, Karlsruhe
Imidazol	Sigma Aldrich, München
L-Isoleucin	Sigma Aldrich, München
Isopropanol	J.T.Baker, München
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	AppliChem, Darmstadt
Kaliumsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Kupfersulfat-Pentahydrat	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Agar (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium (Lennox)	Carl Roth, Karlsruhe
L-Leucin	Carl Roth, Karlsruhe
Lithiumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
L-Lysin-Monohydrochlorid	Sigma Aldrich, München
Magnesiumacetat-Tetrahydrat	Sigma Aldrich, München
Mangansulfat-Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat-Hydrat	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Metformin-Hydrochlorid	MP Biomedicals, Eschwege
Methanol	J.T.Baker, München
L-Methionin	Sigma Aldrich, München
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Carl Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumcholat	Sigma Aldrich, München
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem, Darmstadt

Natrium-Formiat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumiodid	Sigma Aldrich, München
Natrium-L-Lactat	Sigma Aldrich, München
Natriummolybdat-Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen, Hilden
n-Octyl-β-D-glucopyranosid (β-OG)	Anatrace, Maumee (USA)
Orange G	Carl Roth, Karlsruhe
1-Palmitoyl-2-oleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphatidylglycerol (POPG)	Avanti Polar Lipids, Alabaster (USA)
L-Phenylalanin	Sigma Aldrich, München
Phosphoenolpyruvat (K ⁺ -Salz)	AppliChem, Darmstadt
Phosphorsäure	J.T.Baker, München
Polyethylenglykol 3350 (PEG 3350)	Sigma Aldrich, München
Polyethylenglykol 3500 (PEG 3500)	Sigma Aldrich, München
Polyethylenglykol 8000 (PEG 8000)	Sigma Aldrich, München
Ponceau S	Carl Roth, Karlsruhe
L-Prolin	Carl Roth, Karlsruhe
Q-Sepharose TM Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
Resazurin (Na ⁺ -Salz)	Sigma Aldrich, München
Roti TM -Blue	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese TM Blau R	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese TM Gel 40	Carl Roth, Karlsruhe
D-Saccharose	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure	J.T.Baker, München
Schwefelsäure	J.T.Baker, München
L-Serin	Fluka Chemie, Buchs (CH)
D-Sorbitol	Sigma Aldrich, München
Tetracyclin-Hydrochlorid	Life Technologies, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	GenaxxonBioScience, Ulm
L-Threonin	Sigma Aldrich, München
Tricin	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton TM X-100	Carl Roth, Karlsruhe
L-Tryptophan	Sigma Aldrich, München
Tween TM 20	AppliChem, Darmstadt
L-Tyrosin	Sigma Aldrich, München
Uridin-5'-triphosphat-Hydrat (Na ⁺ -Salz)	Sigma Aldrich, München
L-Valin	Sigma Aldrich, München
Zeocin	Invivogen, Toulouse (FR)
Zinkchlorid	Sigma Aldrich, München

2.7 Lösungen, Medien und Puffer

6-Aminosäure-Mix (RCWMDE)

je 16,7 mM

L-Arginin, L-Aspartat, L-Cystein, L-Methionin, L-Glutamat, L-Tryptophan

20-Aminosäure-Mix

je 4 mM

L-Alanin, L-Arginin, L-Asparagin, 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

BMGY-Medium (pH 6,0)	Dikaliumhydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat Bacto™ Peptone Bacto™ Yeast Extract Difco™ Yeast Nitrogen Base Glycerol	13,2 mM 86,8 mM 2 % (m/v) 1 % (m/v) 1,34 % (m/v) 1 % (m/v)
BMMY-Medium (pH 6,0)	Dikaliumhydrogenphosphat Kaliumdihydrogenphosphat Bacto™ Peptone Bacto™ Yeast Extract Difco™ Yeast Nitrogen Base Methanol	13,2 mM 86,8 mM 2 % (m/v) 1 % (m/v) 1,34 % (m/v) 0,5 % (v/v)
BN-Anodenpuffer (pH 7,5; HCl)	Bis-TRIS	50 mM
BN-Inkubationspuffer (pH 8,6; HCl)	TRIS Essigsäure SDS	300 mM 100 mM 1 % (m/v)
BN-Kathodenpuffer (pH 7,5; HCl)	Tricin Bis-TRIS Coomassie G-250	50 mM 15 mM 0,02 % (m/v)
4x BN-Ladepuffer (pH 7,5; HCl)	Bis-TRIS Glycerol Natriumchlorid Ponceau S	200 mM 40 % (m/v) 200 mM 0,004 % (m/v)
BN-Transferpuffer (pH 8,6; HCl)	TRIS Essigsäure	150 mM 50 mM
Dichtegradientenpuffer (pH 6,8; NaOH)	HEPES Saccharose	50 mM 0-60 % (m/v)
Entfärbelösung	Essigsäure Ethanol	10 % (v/v) 30 % (v/v)
2x FXa-Puffer (pH 8,0; HCl)	TRIS Natriumchlorid Calciumchlorid	20 mM 100 mM 4 mM
HEK-Basismedium	Gibco™ DMEM FBS Premium Gibco™ Pen-Strep (10.000 U/ml)	500 ml 50 ml 5 ml
für HEK-Kulturmedium:	5 µg/ml Blastocidin und 100 µg/ml Zeocin hinzufügen	
für HEK-Lagerungsmedium:	5 µg/ml Blastocidin, 100 µg/ml Zeocin und 10 % (v/v) DMSO hinzufügen	
für HEK-PfFNT-Selektionsmedium:	5 µg/ml Blastocidin, 100 µg/ml Zeocin, 1 µg/ml Tetracyclin, 4 mM Metformin und 0,1 µM AZD-3965 hinzufügen	
HEPES/EDTA-Puffer (pH 8,0; KOH)	HEPES EDTA	2,4 M 20 mM

500 mM-Imidazol-Puffer (pH 8,0; HCl)	TRIS Natriumchlorid Imidazol	40 mM 300 mM 500 mM
10x Kathodenpuffer (pH 8,2-8,8; HCl)	Glycin TRIS SDS	1,92 M 25 mM 1 % (m/v)
Lactatmedium (pH 6,0; NaOH)	Difco™ Yeast Nitrogen Base Ammoniumsulfat MES Natrium-L-Lactat 25 mg/l Adenin, 20 mg/l L-Histidin, 100 mg/l L-Leucin und 10 mg/l L-Tryptophan hinzufügen	0,17 % (m/v) 0,5 % (m/v) 50 mM 1 % (m/v)
LB-Agar für LB _{Kan} -Agar: für LB _{Amp} -Agar:	LB-Agar (Lennox) 50 µg/ml Kanamycin hinzufügen 100 µg/ml Ampicillin hinzufügen	3,5 % (m/v)
LB-Medium für LB _{Kan} -Medium: für LB _{Amp} -Medium:	LB-Medium (Lennox) 50 µg/ml Kanamycin hinzufügen 100 µg/ml Ampicillin hinzufügen	2 % (m/v)
Liposomenpuffer (pH 7,5 bzw. pH 6,8; NaOH)	HEPES für Gradient Na ⁺ -L-Lactat hinzufügen	20 mM 0,4 M
MSP-Puffer A (pH 8,0; HCl)	TRIS Natriumchlorid Triton™ X-100	40 mM 300 mM 1 % (v/v)
MSP-Puffer B (pH 8,9; HCl)	TRIS Natriumchlorid Cholsäure	40 mM 300 mM 50 mM
MSP-Puffer C (pH 8,0; HCl)	TRIS Natriumchlorid	40 mM 300 mM
MSP-Puffer F (pH 8,0; HCl)	TRIS Natriumchlorid Glycerol	40 mM 300 mM 10 % (v/v)
M-TBST-Puffer (pH 7,6; HCl)	TRIS Milchpulver Natriumchlorid Tween™ 20	20 mM 3 % (m/v) 135 mM 0,1 % (v/v)
ND-A-Puffer (pH 8,0; HCl)	TRIS Natriumchlorid	10 mM 100 mM
NTP-Mix (pH 7,0; NaOH)	ATP CTP GTP UTP	90 mM 60 mM 60 mM 60 mM

10x Orange G-Ladepuffer	Orange G	0,4 % (m/v)
	Glycerol	30 % (v/v)
	EDTA	100 mM
10x PBS-Puffer (pH 7,4)	Natriumchlorid	1,37 M
	Kaliumchlorid	27 mM
	Dinatriumhydrogenphosphat	100 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	18 mM
<i>Pichia</i>-Basismedium	Calciumsulfat	6,8 mM
	Kaliumsulfat	105 mM
	Magnesiumsulfat	60 mM
	Kaliumhydroxid	75 mM
	Glycerol	4 % (m/v)
	Phosphorsäure	2,25 % (v/v)
Ponceau-Färbelösung	Ponceau S	0,5 % (m/v)
	Essigsäure	30 % (v/v)
Protoplastenpuffer I (pH 7,2; NaOH)	MOPS	50 mM
	β-Mercaptoethanol	0,2 % (v/v)
Protoplastenpuffer II (pH 7,2; NaOH)	MOPS	50 mM
	Saccharose	1,8 M
	β-Mercaptoethanol	0,2 % (v/v)
Protoplastenpuffer III (pH 7,2; NaOH)	MOPS	10 mM
	Natriumchlorid	50 mM
	Saccharose	1,2 M
	Calciumchlorid	5 mM
Protoplastenpuffer IV (pH 4,5; HCl)	Citronensäure	20 mM
	Natriumchlorid	50 mM
	Saccharose	1,2 M
	Calciumchlorid	5 mM
	Solut (Na ⁺ -L-Lactat / Na ⁺ -Formiat)	0,6 M
Puffer B (pH 7,5; HCl)	TRIS	25 mM
	EDTA	5 mM
Puffer M (pH 8,0)	Dinatriumhydrogenphosphat	93,2 mM
	Natriumdihydrogenphosphat	6,8 mM
	Natriumchlorid	50 mM
Protein-Reinigungspuffer (pH 8,0; HCl)	TRIS	20 mM
	Natriumchlorid	150-300 mM
	Imidazol	0-500 mM
	entsprechendes Detergenz hinzufügen	
Protein-Solubilisierungspuffer (pH 8,0; HCl)	TRIS	20 mM
	Natriumchlorid	150-300 mM
	Glycerol	10 % (v/v)
	entsprechendes Detergenz hinzufügen	

PTM-Spurenelemente	Kupfersulfat	24 mM
	Natriumiodid	535 µM
	Mangansulfat	18 mM
	Natriummolybdat	825 µM
	Borsäure	325 µM
	Cobaltchlorid	3,85 mM
	Zinkchlorid	145 mM
	Eisensulfat	235 mM
	Biotin	820 µM
	Schwefelsäure	0,5 % (v/v)
4x Sammelgelpuffer (pH 6,8; HCl)	TRIS	0,5 M
	SDS	0,4 % (m/v)
SD-Agar (pH 5,6; NaOH)	Difco™ Yeast Nitrogen Base	0,17 % (m/v)
	Ammoniumsulfat	0,5 % (m/v)
	D-Glucose	2 % (m/v)
	Agar Bacteriological	2 % (m/v)
	für SD-AHLW-Agar: 25 mg/l Adenin, 20 mg/l L-Histidin, 100 mg/l L-Leucin und 10 mg/l L-Tryptophan hinzufügen	
SD-Medium (pH 5,6; NaOH)	Difco™ Yeast Nitrogen Base	0,17 % (m/v)
	Ammoniumsulfat	0,5 % (m/v)
	D-Glucose	2 % (m/v)
	für SD-AHLW-Medium: 25 mg/l Adenin, 20 mg/l L-Histidin, 100 mg/l L-Leucin und 10 mg/l L-Tryptophan hinzufügen	
4x SDS-Ladepuffer (pH 6,8; HCl)	TRIS	250 mM
	SDS	8 % (m/v)
	Glycerol	40 % (v/v)
	Dithiothreitol	400 mM
	Bromphenolblau	0,02 % (m/v)
1x S30-Puffer (pH 8,2; Essigsäure)	TRIS	10 mM
	Magnesiumacetat	14 mM
	Kaliumchlorid	0,6 mM
S30-Puffer A (pH 8,2; Essigsäure)	TRIS	10 mM
	Magnesiumacetat	14 mM
	Kaliumchlorid	0,6 mM
	β-Mercaptoethanol	6 mM
S30-Puffer B (pH 8,2; Essigsäure)	TRIS	10 mM
	Magnesiumacetat	14 mM
	Kaliumchlorid	0,6 mM
	DTT	1 mM
S30-Puffer C (pH 8,2; Essigsäure)	TRIS	10 mM
	Magnesiumacetat	14 mM
	Kaliumacetat	0,6 mM
	DTT	0,5 mM

T7-Puffer (pH 8,0; HCl)	TRIS EDTA Natriumchlorid Glycerol β-Mercaptoethanol	30 mM 10 mM 20 mM 5 % (m/v) 10 mM
T7-Dialysepuffer (pH 8,0; HCl)	TRIS EDTA Natriumchlorid DTT Glycerol	10 mM 1 mM 10 mM 1 mM 10 % (m/v)
50x TAE-Puffer (pH 8,0; Essigsäure)	TRIS EDTA	2 M 50 mM
1x TBS-Puffer (pH 7,4; HCl)	TRIS Natriumchlorid	50 mM 150 mM
TBST-Puffer (pH 7,6; HCl)	TRIS Natriumchlorid Tween™ 20	20 mM 135 mM 0,1 % (v/v)
Transferpuffer (pH 8,3)	TRIS Glycin SDS Methanol	5 mM 38,4 mM 0,0075 % (m/v) 20 % (v/v)
Transformationsmix	PEG 3500 Lithiumacetat DNA aus Lachs-Testis (aufgekocht)	33 % (m/v) 0,1 M 0,28 mg/ml
4x Trenngelpuffer (pH 8,8; HCl)	TRIS SDS	1,5 M 0,4 % (m/v)
Vesikelpuffer (pH 6,8; HCl)	HEPES/TRIS Saccharose Kaliumchlorid	10 mM 250 mM 20 mM
YPD-Agar	Bacto™ Peptone Bacto™ Yeast Extract D-Glucose Agar Bacteriological	2 % (m/v) 1 % (m/v) 2 % (m/v) 2 % (m/v)
YPD-Medium	Bacto™ Peptone Bacto™ Yeast Extract D-Glucose	2 % (m/v) 1 % (m/v) 2 % (m/v)
für YPDS-Medium:	1 M Sorbitol hinzufügen	

2x YTPG-Medium (pH 7,0)	Dikaliumhydrogenphosphat	52 mM
	Kaliumdihydrogenphosphat	22 mM
	Bacto™ Tryptone	1,4 % (m/v)
	Bacto™ Yeast Extract	1 % (m/v)
	Natriumchlorid	85 mM
	D-Glucose	2 % (m/v)

2.8 DNA-Oligonukleotide und Plasmide

Entsalzte und lyophilisierte DNA-Oligonukleotide wurden von Thermo Fischer Scientific (Schwerte) bezogen und entsprechend der gelieferten Anweisungen zu einer Oligonukleotid-Konzentration von 100 µM mit ddH₂O hydratisiert. Zur Sequenzierung wurden 4,8 µM-Verdünnungen eingesetzt. Die Sequenzierung von Plasmiden erfolgte nach der Sanger-Methode durch Mitarbeiter des Instituts für Klinische Molekularbiologie (IKMB) der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')	Anwendung
ADH	CATAAATCATAAGAAATTCGC	Sequenzierung
AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	Sequenzierung
CYC1	GGAGGGCGTGAATGTAAGCG	Sequenzierung
FactorXa_s	GATCGATCGAAGGTCGACTGCA	Integration FXa-Schnittstelle
FactorXa_as	GTCGACCTTCGATC	Integration FXa-Schnittstelle
cStrep-tag-PfFNT_s	TCGAGATCGAAGGTCGTGCTTGGAGCCACCCGAGTTTCGAAAAGGGTTGAC	Integration Strep-Tag
cStrep-tag-PfFNT_as	TCGAGTCAACCCTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCACGACCTTCGATC	Integration Strep-Tag
PMA	CTCTCTTTTATACACACATTC	Sequenzierung
T7-Prom	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung
T7-Term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierung

Im Folgenden sind die Vektorkarten der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Expressionsplasmide angegeben. Die zellfreie Proteinsynthese von GFP und von Membranprotein-GFP-Fusionskonstrukten wurde mit dem pIVEX2.3w_GFPΔM-Vektor (Abb. 2.1 A) bzw. mit Konstrukten inklusive Protein-codierender Sequenzen (Restriktionsschnittstellen: SphI und XhoI) realisiert. Bei diesen Konstrukten liegt das GFP zur Verringerung der Hintergrundexpression ohne Start-Methionin vor. Membranproteine ohne GFP-Fusion wurden unter Verwendung des pIVEX2.3w-Vektors (Abb. 2.1 B) synthetisiert, der eine modifizierte Version des kommerziellen pIVEX2.3-Vektors (Roche Diagnostics) ist (Müller-Lucks et al., 2012). Zur induzierbaren MSP-Proteinsynthese im *E. coli*-Expressionssystem wurden die entsprechenden codierenden Sequenzen über die angegebenen Restriktionsschnittstellen in einen pET28(+)-Vektor eingefügt (Abb. 2.1 C). Im HEK-Expressionssystem wurde der Tetracyclin-induzierbare pCGTO-Vektor verwendet, der von Dr. Nathan Epalle mit der Sequenz für einen C-terminalen Poly-His-Tag modifiziert (Abb. 2.1 D) und zur Verfügung gestellt wurde (Epalle, 2023). Zur rekombinanten Expression im *S. cerevisiae*-System wurden Protein-codierende Sequenzen in den pDRTXa-Expressionsvektor (Abb. 2.1 E) eingefügt, der durch Einführung der Sequenz für einen N-terminalen HA-Tag und einen C-terminalen Poly-His-Tag in den kommerziellen pDR196-Vektor (Addgene) entstanden ist (Wu et al., 2015). Für die Methanol-induzierte Expression in *P. pastoris*-Zellen wurden Protein-codierende Sequenzen in einen nach Holm-Bertelsen (2016) durch Einfügen eines C-terminalen Poly-His-Tags (+ FXa-Schnittstelle) modifizierten pPink_HC-Vektor (PichiaPink™-Expressionssystem, Invitrogen) kloniert (Abb. 2.1 F).

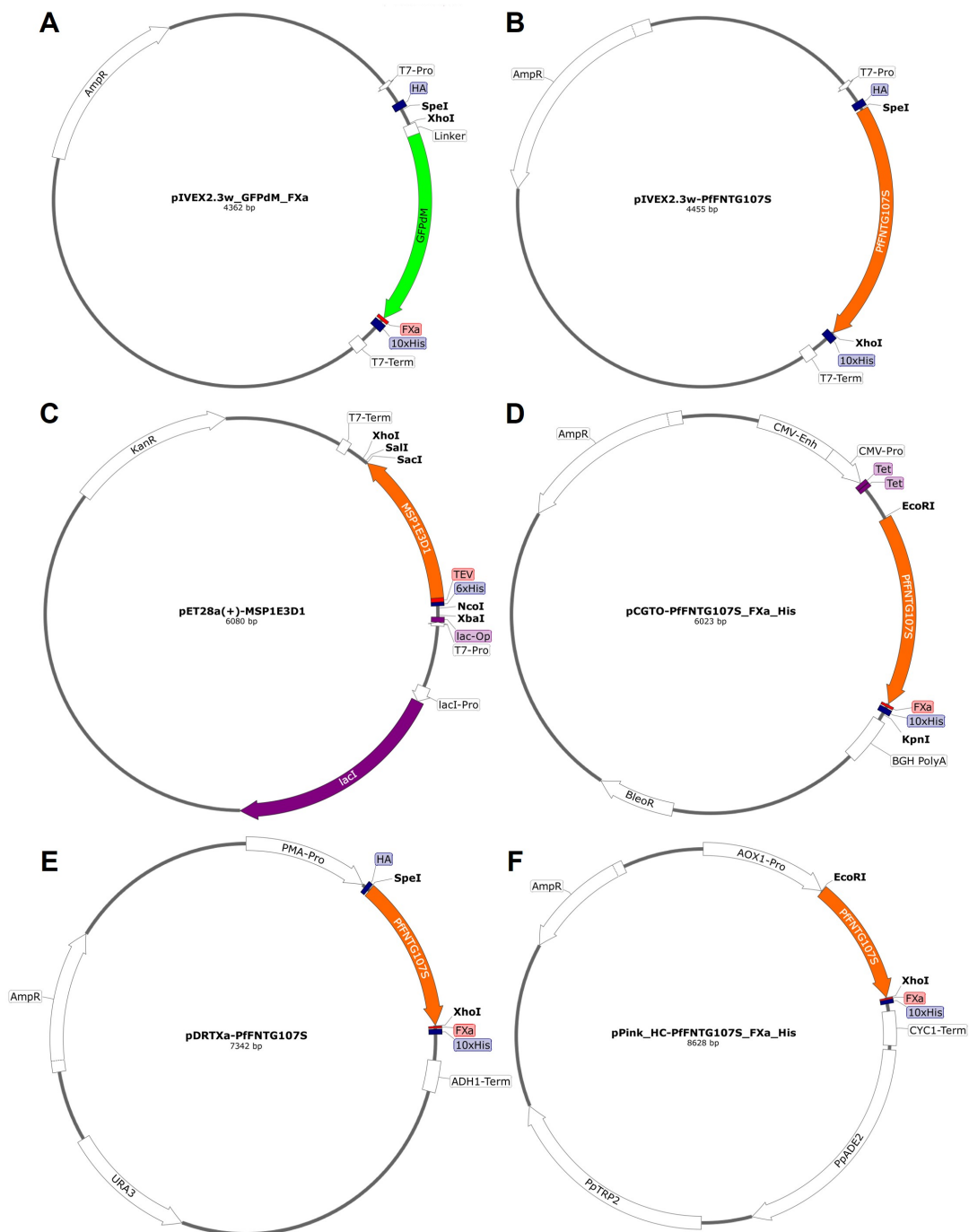


Abb. 2.1: Zur Proteinsynthese verwendete Expressionsplasmide. **A** pIVEX2.3w_GFPΔM_FXa-Vektor für die zellfreie Proteinsynthese von GFP und Membranprotein-GFP-Fusionsproteinen. **B** pIVEX2.3w-Vektor mit integrierter PfFNTG107S-Sequenz für die zellfreie Proteinsynthese. **C** pET28a(+)-Vektor mit MSP1E3D1-Sequenz für die induzierte Proteinsynthese in *E. coli*-Zellen. **D** pCGTO-Vektor mit PfFNTG107S-Sequenz zur Proteinsynthese in HEK-Zellen. **E** pDRTXa-Vektor mit Sequenz für die PfFNTG107S-Expression im *S. cerevisiae*-Hefesystem. **F** pPink_HC-Vektor für die induzierte Expression von PfFNTG107S im *P. pastoris*-Hefesystem. Relevante Selektionsmarker, Promotoren, Affinitätstags, Protease- und Restriktionsschnittstellen sind markiert. ADH1-Term, Alkoholdehydrogenase 1-Terminator; AmpR, Ampicillinresistenzgen; AOX1-Pro, Alkoholoxidase 1-Promotor; BGH PolyA, Bovine growth hormone-Polyadenylierungssequenz; BleoR, Bleomycinresistenzgen; CMV-Enh, Cytomegalovirus-Enhancer; CMV-Pro, Cytomegalovirus-Promotor; CYC1-Term, CYC1-Terminator; FXa, Faktor Xa-Proteaseschnittstelle; GFPdM, GFP ohne Start-Methionin; HA, Hämagglutinin-Tag; His, Poly-His-Tag; KanR, Kanamycinresistenzgen; lacI, lacI-Repressorproteingen; lac-Op, lac-Operator; lacI-Pro, lacI-Promotor; PMA-Pro, Phorbol-12-myristat-13-acetat-Promotor; PpADE2, Phosphoribosylaminoimidazolcarboxylasegen; PpTRP2, Anthranilsynthasegen; TEV, TEV-Proteaseschnittstelle; T7-Pro, T7-Promotor; T7-Term, T7-Terminator; Tet, Operator für *tetR*- und *tetA*-Gene; URA3, Orotidin-5'-phosphatdecarboxylasegen. Vektorkartendarstellung mittels SnapGene Viewer.

2.9 Organismen und Zelllinien

Organismus	Stamm/Zelllinie	Genotyp und Beschreibung
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	$F^- ompT hsdS_B(r_B^-, m_B^-) gal dcm$ (DE3)
<i>Escherichia coli</i>	BL21 Star (DE3)	$F^- ompT hsdS_B(r_B^-, m_B^-) gal dcm rne131$ (DE3) zur Verfügung gestellt von F. Bernhard, Frankfurt a. M.
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	$F^- \phi80lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r_K^-, m_K^+) phoA supE44 \lambda^- thi-1 gyrA96 relA1$
<i>Homo sapiens</i>	HEK-293 T-REx	immortalisierte, humane embryonale Nierenzellen, stabil transfiziert mit dem pcDNA TM 6/TR-Vektor zur Verfügung gestellt von Intana Bioscience, Martinsried
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	W303-1A $\Delta jen1 \Delta ady2$	$\Delta jen1 \Delta ady2 (MATa, can1-100, ade2-1, his3-11,15, leu2-3,112, trp1-1, ura3-1, jen1::kanMX4, ady2::hphMX4)$ zur Verfügung gestellt von M. Casal, Braga (PT)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NY17	$MATa, ura3-52, sec6-4$ zur Verfügung gestellt von P. Novick, San Diego (USA)
<i>Pichia pastoris</i>	PichiaPink TM Strain 1	$\Delta ade2$ kommerzieller Vertrieb durch Invitrogen

2.10 Software

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem L^AT_EX-Editor Texmaker verfasst und Sequenzalignments mit dem L^AT_EX-Paket TeXshade (Beitz, 2000) generiert. Chemische Strukturen wurden mit Chem3D Pro und ChemDraw Ultra erstellt und Proteinstrukturen mit UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004) visualisiert. Schematische Abbildungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit Microsoft PowerPoint angefertigt.

Programm	Version	Bezugsquelle / Entwickler
Bio-Kine	4.74.2	BioLogic
Chem3D Pro	12.0.2.1076	CambridgeSoft
ChemDraw Ultra	12.0.2.1076	CambridgeSoft
Dispersion Technology Software	5.10	Malvern Instruments
ImageJ	1.52a	National Institutes of Health
Lasergene	7.2.1	DNAStar
Mendeley	1.19.4	Mendeley Ltd.
Microsoft PowerPoint	2019	Microsoft Corp.
Origin 2020b	9.7.5.184	OriginLab Corp.
Photoshop TM Elements	11.0	Adobe Systems Inc.
SigmaPlot	11.0	Systat Software Inc.
SnapGene TM Viewer	4.3.10	GSL Biotech LLC
Tecan i-control	2.0.10.0	Tecan Group Ltd.
Texmaker	5.0.3	Pascal Brachet
UCSF Chimera	1.13.1	UCSF Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics
UCSF ChimeraX	1.7.1	UCSF Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics
Unicorn Workstation	5.20	GE Healthcare

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Herstellung von chemisch kompetenten *E. coli*-Zellen

Ein Klon des ausgewählten *E. coli*-Stamms wurde in 4 ml LB-Medium für 9 h im Rotationsrad (6 rpm) bei 37 °C inkubiert. Diese gesamte Vorkultur wurde zur Inokulation von 100 ml LB-Medium verwendet und bei 20 °C und 200 rpm für etwa 18 h inkubiert. Die Kultur wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5±0,1 für 10 min auf Eis gekühlt und dann in zwei 50 ml-Falcons durch Zentrifugation (2000 g, 10 min, 4 °C) geerntet. Die Zellpellets wurden auf Eis gehalten und in jeweils 15 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und die Zellen erneut pelletiert (2000 g, 10 min, 4 °C). Dieser Schritt wurde mit 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung wiederholt und die Zellpellets in je 5 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 20 % (v/v) Glycerol resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden zusammengegeben und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach Aliquotieren zu 100 µl wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und die Aliquots bei –80 °C gelagert. Die Transformationseffizienz der kompetenten Zellen wurde überprüft, indem eine standardisierte Transformationsreaktion (Kap. 3.1.2) mit 1 ng eines pBluescript-Vektors durchgeführt und die erhaltenen Klone ausgezählt wurden. Zur weiteren Verwendung sollten die kompetenten Zellen eine Effizienz von mindestens 1·10⁶ cfu/µg DNA aufweisen.

3.1.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen wurde Plasmid-DNA mittels Hitzeschock-Methode in Bakterienzellen eingebracht. Zu 100 µl-Aliquots von auf Eis aufgetauten kompetenten *E. coli*-Zellen (Kap. 3.1.1) wurden 10 µl eines Ligationsansatzes (Kap. 3.1.9) gegeben. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurde der Hitzeschock für 43 s bei 42 °C durchgeführt. Die Zellen wurden erneut für 2 min auf Eis gehalten und nach Hinzufügen von 900 µl LB-Medium bei 37 °C für 1 h im Rotationsrad (6 rpm) inkubiert. Nach Zentrifugation (12.000 g, 30 s, 4 °C) wurden 900 µl des Überstands entfernt, die Zellen in den restlichen 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB_{Amp}⁻ oder LB_{Kan}-Agarplatten ausgestrichen. Inkubiert wurden die Selektionsplatten bei 37 °C über Nacht und Kolonien erfolgreich transformierter Zellen in entsprechendem LB_{Amp}⁻ oder LB_{Kan}-Medium kultiviert. Für die Schnelltransformation von kompetenten *E. coli*-Zellen zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurden 100-200 ng isolierte Plasmid-DNA (Kap. 3.1.3) zu 100 µl auf Eis angetauten kompetenten *E. coli*-Zellen gegeben. Nach Inkubation auf Eis für 30 min wurde gründlich gevortext und 40 µl der Suspension auf LB_{Amp}⁻ oder LB_{Kan}-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Zur langfristigen Lagerung von *E. coli*-Zellen wurden kryokonservierte Glycerol-Dauerkulturen hergestellt. Diese wurden durch gutes Mischen von 1 ml einer *E. coli*-Übernachtkultur mit 0,5 ml 80 % (v/v) Glycerol hergestellt und bei –80 °C gelagert.

3.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen

Plasmid-DNA wurde im kleinen Maßstab aus frischen 5 ml-*E. coli*-Kulturen mit dem Wizard *Plus SV Minipreps DNA Purification System*-Kit isoliert. Grundlegendes Prinzip der Minipräparation ist die alkalische Lyse der Bakterien mit anschließender Solubilisierung von Plasmid-DNA in neutraler Lösung. Abweichend vom Herstellerprotokoll wurde zur Inaktivierung von Endonukleasen dem Bakterienlysate kei-

ne alkalische Protease-Lösung hinzugefügt. Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl ddH₂O eluiert und bei –20 °C gelagert. Für die zellfreie Proteinsynthese wurden höhere Konzentrationen und Reinheiten der Plasmid-DNA der pIVEX2.3w-Konstrukte benötigt. Dazu wurden im Rahmen einer Maxipräparation mit dem NucleoBond PC 500-Kit größere Mengen von Plasmid-DNA aus 250 ml-*E. coli*-Kulturen präpariert. 5 ml LB_{Amp}-Medium wurden mit einem *E. coli*-Klon inokuliert und 8 h oder über Nacht bei 37 °C im Rotationsrad bei 6 rpm inkubiert. Mit der Vorkultur wurde eine 250 ml-LB_{Amp}-Hauptkultur beimpft und diese über Nacht bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Die Hauptkultur wurde nach Herstellerangaben aufgearbeitet und die präzipitierte und gewaschene Plasmid-DNA in 50-100 µl ddH₂O resuspendiert. Die Plasmid-DNA wurde bei –20 °C gelagert.

3.1.4 Polymerase-Kettenreaktion

Zur spezifischen Vervielfältigung von DNA-Abschnitten sowie zur Generierung von Mutationen und Schnittstellen wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Dabei wurde für Klonierungsvorhaben entsprechende Ansätze nach Tab. 3.1 unter Verwendung der *PfuTurbo*-DNA-Polymerase mit Korrekturlesefunktion vorbereitet und das in Tab. 3.1 angegebene Temperaturprogramm gefahren. Die Annealingtemperatur ($T_{\text{Annealing}}$) sollte 3-5 °C unterhalb der Schmelztemperatur (T_M) liegen, die nach der von Chester & Marshak (1993) publizierten Chester-Marshak-Regel (1) berechnet wurde. Dabei bezeichnet %GC den prozentualen Anteil an Guanin und Cytosin und N die Gesamtanzahl der an die DNA-Template bindenden Basen.

$$T_M = (69,3 + 0,41 \cdot \%GC - \frac{650}{N})^{\circ}\text{C} \quad (1)$$

Tab. 3.1: PCR-Pipettierschema (oben) und PCR-Programm (unten) bei Verwendung der *PfuTurbo*-DNA-Polymerase. Die $T_{\text{Annealing}}$ wurde über die Chester-Marshak-Regel abgeleitet, für $t_{\text{Elongation}}$ wurde mindestens 1 min/kb eingesetzt.

Template-DNA	150 ng	
<i>Pfu</i> -Reaktionspuffer (10x)	1x	
dNTPs (2,5 mM)	0,2 mM	
Primer Sense (25 µM)	0,5 µM	
Primer Antisense (25 µM)	0,5 µM	
<i>PfuTurbo</i> -DNA-Polymerase (2,5 U/µl)	2 U	
DMSO	3 % (v/v)	
ddH ₂ O	ad 50 µl	
Reaktionsschritt	T	t
Initiale DNA-Denaturierung	95 °C	5 min
DNA-Denaturierung	95 °C	30 s
Primerhybridisierung	$T_{\text{Annealing}}$	60 s
Elongation	72 °C	$t_{\text{Elongation}}$
Terminale Elongation	72 °C	10 min
Lagerung	8 °C	∞

} 30x

Anschließend an die PCR-Reaktion wurde die methylierte Template-DNA durch Zugabe von 10 U der Restriktionsendonuklease DpnI verdaut (37 °C, Inkubation ü. N.) und die PCR-Produkte anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.1.6) aufgetrennt und nachfolgend extrahiert (Kap. 3.1.7). Zur Überprüfung von gewachsenen Kolonien auf das gewünschte Insert wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, bei der ein Teil der Kolonie als Template zur DNA-Vervielfältigung diente und mit einer Pipettenspitze in die nach Tab. 3.2 vorbereiteten Kolonie-PCR-Ansätze getaucht wurde. Es wurde das Programm für die Kolonie-PCR (Tab. 3.2) angewendet und spezifische Inserts in einem Agarosegel (Kap. 3.1.6) identifiziert.

Tab. 3.2: PCR-Pipettierschema (oben) PCR-Programm (unten) bei Verwendung der *OneTaq*-DNA-Polymerase zur Kolonie-PCR. Die $T_{\text{Annealing}}$ wurde über die Chester-Marshak-Regel abgeleitet, für $t_{\text{Elongation}}$ wurde mindestens 1 min/kb eingesetzt.

<i>OneTaq</i> -Standard-Reaktionspuffer (5x)	1x
dNTPs (2,5 mM)	0,2 mM
Primer Sense (25 µM)	0,5 µM
Primer Antisense (25 µM)	0,5 µM
<i>OneTaq</i> -DNA-Polymerase (5 U/µl)	2,5 U
ddH ₂ O	ad 50 µl

Reaktionsschritt	<i>T</i>	<i>t</i>	
Initiale DNA-Denaturierung	94 °C	5 min	
DNA-Denaturierung	94 °C	30 s	} 30x
Primerhybridisierung	$T_{\text{Annealing}}$	45 s	
Elongation	68 °C	$t_{\text{Elongation}}$	
Terminale Elongation	68 °C	5 min	
Lagerung	8 °C	∞	

3.1.5 Restriktionsverdau von Plasmiden

Restriktionsverdaue wurden zur Generierung spezifischer Überhänge für die anschließende Ligation eines DNA-Fragments in einen linearisierten Vektor (Kap. 3.1.9) sowie für die Überprüfung von präparierten Plasmiden durchgeführt und durch Typ II-Restriktionsendonukleasen katalysiert. Diese haben eine meist palindromische 6 bp-Erkennungssequenz, innerhalb dieser die Enzyme schneiden und *sticky ends* (Überhänge) oder *blunt ends* erzeugen. Die Ansätze wurden je nach Anwendungszweck nach Tab. 3.3 pipettiert und die Restriktionsverdaue bei 37 °C für 2-3 h oder über Nacht durchgeführt. Das geschnittene Plasmid wurde nach dem PCR-Clean-up-Protokoll des HiYield PCR Clean-up/Gel Extraction-Kits oder über Agarosegelelektrophorese (Kap. 3.1.6) und anschließende Gelextraktion (Kap. 3.1.7) gereinigt.

Tab. 3.3: Pipettierschema für die Restriktion von Plasmiden für Klonierungsvorhaben und für Testverdaue.

Komponente	Klonierung	Testverdau
Plasmid-DNA	1 µg	200-300 ng
Restriktionsendonuklease I (10 U/µl)	10 U	2 U
Restriktionsendonuklease II (10 U/µl)	10 U	2 U
Restriktionsendonukleasen-Puffer (10x)	1x	1x
ddH ₂ O	ad 20 µl	ad 10 µl

3.1.6 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente der Größenauftrennung von Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld. Standardmäßig wurden 1 %-ige (m/v) Agarosegele (in 1x TAE-Puffer) verwendet, die mit Ethidiumbromid (0,2 µg/ml) versetzt wurden. Das Ethidiumbromid interkalierte in Nukleinsäuren, wodurch auftretende Banden von DNA-Fragmenten am UV-Transluminator bei einer Anregungswellenlänge von 366 nm detektiert wurden. Proben wurden vor Beladung der Agarosegele mit 10x Orange G-Ladepuffer versetzt. Als Laufpuffer wurde 1x TAE-Puffer verwendet und die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei einer definierten Spannung von 120 V für 30 min. Als Größenmarker wurde virale λ -DNA eingesetzt, die zuvor mit der Restriktionsendonuklease PstI verdaut wurde.

3.1.7 Reinigung von DNA-Fragmenten

Vor der Ligation von DNA-Fragmenten (Kap. 3.1.9) wurde die DNA von Agaroseresten, Ethidiumbromid und sonstigen Verunreinigungen gereinigt. Aus dem Agarosegel ausgeschnittene DNA-Banden wurden mit dem HiYield *PCR Clean-up/Gel Extraction*-Kit nach dem Gelextraktionsprotokoll des Herstellers extrahiert. Durch Restriktionsverdau (Kap. 3.1.5) linearisierte Plasmide wurden ohne vorangegangene Agarosegelelektrophorese nach dem *PCR-Clean-up*-Protokoll des Herstellers gereinigt.

3.1.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz ist die Absorption bei der Wellenlänge von 260 nm der Nukleinsäure-Konzentration proportional, sodass die Nukleinsäure-Konzentration einer Lösung photometrisch bestimmt werden kann. Zudem wurden die Absorptionsverhältnisse $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ zur Aussage über die Reinheit der isolierten Nukleinsäuren herangezogen. DNA-Eluat aus Plasmidpräparationen (Kap. 3.1.3) wurden verdünnt und am Photometer in einer Quarzküvette gegen Wasser vermessen.

3.1.9 Ligation von DNA

Zur DNA-Ligation wurden zwei Ansätze mit verschiedenen Vektor-zu-Insert-Verhältnissen angesetzt, ohne dabei die molaren Verhältnisse von Vektor und Insert zu bestimmen (Tab. 3.4). Zur Klonierung wurden entsprechende linearisierte Vektoren und Inserts mit kompatiblen Überhängen verwendet. Die Ligationsansätze wurden für 20 min bei RT inkubiert und mit den gesamten 10 µl des Ansatzes kompetente *E. coli*-Zellen des Stamms DH5 α transformiert (Kap. 3.1.2).

Tab. 3.4: Pipettierschema für Ligationsansätze mit verschiedenen Vektor-zu-Insert-Verhältnissen. Es wurden zwei Ansätze mit verschiedenen Vektor-zu-Insert-Verhältnissen vorbereitet, wobei das molare Verhältnis nicht genauer beachtet wurde.

Vektor-zu-Insert-Verhältnis	1+7	3+5
Vektor	1 µl	3 µl
Insert	7 µl	5 µl
T4-DNA-Ligase (5 U/µl)	0,5 U	0,5 U
10x T4-DNA-Ligase-Puffer	1x	1x

3.2 Zellbasierte Proteinsynthese

3.2.1 Kultivierung von *E. coli*-Zellen

Die nach Kap. 3.1.2 transformierten *E. coli*-Stämme BL21 Star (DE3) und BL21 (DE3) wurden als Expressionsstämme für die Produktion der MSP-Proteine MSP1E3D1 und MSP2N2 zur Nanodisc-Synthese verwendet. Die Zellen vom *E. coli*-Stamm BL21 Star (DE3) mit enthaltenem pET-28a(+)-MSP1E3D1-Expressionsplasmid wurden von Dr. Frank Bernhard (Goethe-Universität Frankfurt a. M.) zur Verfügung gestellt und auf LB_{Kan}-Agar-Selektionsplatten ausgestrichen. Aus einer mit einem Klon inokulierten LB_{Kan}-Vorkultur wurde eine 500 ml-Kultur in LB_{Kan}-Medium mit zugesetzter D-Glucose (0,5 % (m/v)) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von $1,0 \pm 0,1$ bei 37 °C und 220 rpm wachsen gelassen. Durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) zu einer Endkonzentration von 1 mM wurde die unter Kontrolle des Lactose-Operons stehende MSP-Expression induziert. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde die Temperatur auf 28 °C gesenkt und die induzierten Kulturen für weitere 4 h bei 220 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (6000 g, 15 min, 4 °C) geerntet und das Zellpellet einmal mit MSP-Puffer C gewaschen. Bis zum Zellaufschluss mittels Hochdruckhomogenisation (Kap. 3.4.1) wurden die gewaschenen Zellpellets bei –80 °C gelagert.

3.2.2 Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen

Zur Transformation von *S. cerevisiae*-Zellen wurde die Lithiumacetat/ss-Carrier-DNA/PEG-Methode nach Gietz & Schiestl (2007) adaptiert. Naive Hefezellen vom Stamm W303-1A Δ jen1 Δ ady2 oder der Sekretionsmutante NY17 wurden auf YPD-Agar-Komplettmedium ausgestrichen und ein Klon zur Inokulation einer 5 ml-Vorkultur in YPD-Medium verwendet. Eine aus dieser Vorkultur auf eine Start-OD₆₀₀ von etwa 0,2 angesetzte 50 ml-YPD-Kultur wurde bei 29 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von $0,7 \pm 0,1$ inkubiert und die Zellen pelletiert (2500 g, 5 min, 4 °C). Nach zweimaligem Waschen mit sterilem ddH₂O wurden die pelletierten Zellen in 1 ml ddH₂O resuspendiert. Pro Transformationsansatz wurden 100 μ l der Zellsuspension eingesetzt und die Zellen dazu pelletiert (10.000 g, 20 s, 4 °C). Nach Zugabe von 360 μ l Transformationsmix wurde die Suspension mit etwa 300 ng Plasmid-DNA versetzt, kurz gevortext und für 45 min bei 42 °C inkubiert. Der Transformationsmix wurde durch Zentrifugation (10.000 g, 20 s, 4 °C) als Überstand entfernt und die transformierten Zellen in 1 ml sterilem ddH₂O resuspendiert. Zur Selektion wurden 100 μ l einer 1:10-Verdünnung auf SD-AHLW-Agar-Selektionsplatten ausgestrichen und bei 29 °C für 3-5 d inkubiert. Einige Transformanten wurden zur Proteinsynthese getestet (Kap. 3.2.3) und gute Expressionsklone als kryokonservierte Glycerol-Dauerkulturen gelagert. Diese wurden durch Mischen von 0,75 ml einer *S. cerevisiae*-Vorkultur mit 0,75 ml 80 % (v/v) Glycerol hergestellt und bei –80 °C gelagert.

3.2.3 Kultivierung von *S. cerevisiae*-Zellen

Transformierte *S. cerevisiae*-Zellen des Stammes W303-1A Δ jen1 Δ ady2 wurden auf SD-AHLW-Agar-Selektionsmedium ausgestrichen und mit einzelnen Klonen jeweils 5 ml SD-AHLW-Medium inokuliert. Für Expressionsansätze im Kleinmaßstab wurden 20-500 ml-SD-AHLW-Kulturen in Zellkulturkolben angesetzt und die Kulturen bei 29 °C und 220 rpm für 20-24 h inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 g, 10 min, 4 °C) geerntet und bis zur Isolierung der Membranfraktion (Kap. 3.4.2) bei –80 °C gelagert. Zur Produktion größerer Zellmassen wurden *S. cerevisiae*-Expressionskulturen im 5 l-Fermenter

angesetzt. Dazu wurden Zellen eines vorher getesteten Expressionsklons in SD-AHLW-Vorkulturen angezogen und daraus zwei 50 ml-Kulturen bis zu einer OD_{600} von $3,0 \pm 0,5$ wachsen gelassen und zur Inokulation von 2 l SD-AHLW-Medium verwendet. Dazu wurde im Fermentationsgefäß Difco YNB und Ammoniumsulfat als Bestandteile des SD-AHLW-Mediums autoklaviert und vor Inokulation das Medium durch Zugabe von D-Glucose und der entsprechenden Aminosäuren für das SD-AHLW-Medium komplettiert. Zudem wurde zur Unterbindung der Schaumbildung 3 ml Antifoam (50 % (m/v) Polypropylglycol P2000) hinzugegeben und durch Zugabe von 1 M HCl bzw. 1 M NaOH der pH-Wert auf 5,6 eingestellt. Der Fermentationsprozess wurde bei einer Temperatur von 29 °C und einer Rührergeschwindigkeit von 1000 rpm nach Kalibrierung der Sauerstoffelektrode durch Zugabe der beiden 50 ml-Kulturen gestartet. Zur Kontrolle des Zellwachstums und der Proteinsynthese wurden über ein Probenzugsystem regelmäßig Teile der Fermenterkultur entnommen und während der späten Wachstumsphase kontinuierlich (etwa 3 ml 40 % (m/v) D-Glucose/h) D-Glucose zugeführt. Nach Beendigung des Fermentationsprozesses nach 48-72 h wurden die Zellen durch Zentrifugation (4500 g, 30 min, 4 °C) geerntet, einmal mit Puffer B gewaschen und bis zum Zellaufschluss zur Membranfraktionierung (Kap. 3.4.2) bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Aufnahme von Hefewachstumskurven

Zur Aufnahme von Wachstumskurven von *S. cerevisiae*-Hefekulturen wurden die mit entsprechenden Konstrukten transformierten Zellen des Stammes W303-1A Δ jen1 Δ ady2 nach Kap. 3.2.3 aus Vorkulturen in 25 ml SD-AHLW-Medium oder Lactatmedium auf eine Start- OD_{600} von $0,05 \pm 0,01$ eingestellt, bei 29 °C und 220 rpm inkubiert und die OD_{600} in Intervallen von 12 h in Doppelbestimmung bis zum Erreichen der Stagnationsphase der Kulturen verfolgt. Zur densitometrischen, automatisierten Verfolgung des Wachstums von Zellkulturen wurde über einen Breitbandfilter (420-580 nm) die Trübung der Kulturen am Bioscreen C gemessen. Dazu wurden *S. cerevisiae*-Kulturen aus Vorkulturen in dem entsprechenden Medium auf eine errechnete OD_{600} von 0,01 eingestellt und 300 μ l dieser verdünnten Kulturen in die Kammern der 100-Well-Platten (Honeycomb) transferiert. Die Platten wurden im Bioscreen C bei 29 °C unter Schütteln (normale Geschwindigkeit, geringe Amplitude, Stopp 10 s vor Messung) inkubiert und die Trübung der Zellsuspension stündlich bis zum Erreichen der Stagnationsphase bestimmt.

3.2.5 Kultivierung der *S. cerevisiae*-Sekretionsmutante des Stamms NY17

Ein auf einer SD-Agarplatte gewachsener Klon von nach Kap. 3.2.2 transformierten und auf Proteinsynthese getesteten Zellen des *S. cerevisiae*-Stamms NY17 wurde in 5 ml SD-Medium anwachsen gelassen und aus dieser Vorkultur Expressionskulturen in 500 ml SD-Medium angesetzt. Die Kulturen wurden über Nacht bei 29 °C und 220 rpm bis zu einer OD_{600} von $0,6 \pm 0,1$ inkubiert. Zur Akkumulation von sekretorischen Post-Golgi-Vesikeln wurde die Inkubationstemperatur auf 37 °C erhöht (Walworth et al., 1989) und die Zellen für weitere 2 h bei 220 rpm kultiviert. Die Kultursuspensionen wurden schnell auf 4 °C gekühlt, um den Transport der Post-Golgi-Vesikel zur Plasmamembran zu verhindern, und die Zellen durch Zentrifugation (4500 g, 30 min, 4 °C) geerntet. Die Zellpellets wurden bei -80 °C bis zur Isolierung der Post-Golgi-Vesikel als Membranfraktion (Kap. 3.4.2) gelagert. Zur Kultivierung im Großmaßstab wurden die Zellen des Stammes NY17 analog zur Kultivierung der W303-1A Δ jen1 Δ ady2-*S. cerevisiae*-Zellen im Fermenter (Kap. 3.2.3) in 2 l SD-Medium unter stetiger D-Glucose-Zufuhr (3 ml 40 % (m/v) D-Glucose/h) bei 29 °C und 1000 rpm kultiviert. 3 h vor Beendigung des Fermentationsprozesses bei ei-

ner OD_{600} von $4,0 \pm 0,5$ wurde die Temperatur zur Anreicherung der sekretorischen Post-Golgi-Vesikel auf 37°C erhöht. Die Zellen wurden nach der Vesikel-Akkumulationsphase schnell auf 4°C gekühlt und durch Zentrifugation (4500 g , 30 min , 4°C) geerntet, einmal mit Puffer B gewaschen und die Zellpellets bis zum Zellaufschluss und zur Isolierung der sekretorischen Post-Golgi-Vesikel mit der Membranfraktion (Kap. 3.4.2) bei -80°C gelagert.

3.2.6 Transformation von *P. pastoris*-Zellen

Der linearisierte pPink-HC-Vektor mit der für das zu untersuchende Protein codierenden Sequenz wurde über Elektroporation in *P. pastoris*-Zellen eingebracht. Dazu wurden $10\text{ }\mu\text{g}$ der Plasmid-DNA mit 30 U Spel über Nacht bei 37°C verdaut (Kap. 3.1.5) und die Reaktion durch Zugabe von 20 mM EDTA gestoppt. Die linearisierte DNA wurde durch Zugabe von 300 mM Natriumacetat ($\text{pH } 5,2$) und dem doppelten Volumen an eiskaltem 99% (v/v) Ethanol präzipitiert und durch Zentrifugation (21.000 g , 15 min , 4°C) pelletiert. Nach zweimaligem Waschen des DNA-Pellets mit eiskaltem 70% (v/v) Ethanol und vollständiger Trocknung wurde die linearisierte DNA in ddH_2O rehydratisiert und bei -20°C gelagert.

Das Transformationsprotokoll von kommerziellen Zellen des *P. pastoris*-Stamms PichiaPink Strain 1 ist angelehnt an die Herstelleranweisungen zum PichiaPink-Expressionssystem (Invitrogen). Die naiven Zellen wurden auf YPD-Agar-Komplettmedium ausgestrichen, für 3-5 d bei 29°C kultiviert und einzelne Klone in 5 ml YPD-Medium inkubiert. Aus diesen Vorkulturen wurden 100 ml -YPD-Hauptkulturen bei 29°C und 220 rpm bis zu einer OD_{600} von $1,0 \pm 0,1$ wachsen gelassen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1500 g , 5 min , 4°C) geerntet und zweimal mit sterilem, eiskaltem ddH_2O und einmal mit eiskaltem 1 M Sorbitol gewaschen und in $0,3\text{ ml}$ eiskaltem 1 M Sorbitol resuspendiert. $80\text{ }\mu\text{l}$ der nun elektrokompenten Zellen wurden mit etwa $10\text{ }\mu\text{g}$ linearisierter Plasmid-DNA versetzt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten ($0,2\text{ cm}$) überführt und nach Inkubation für 5 min auf Eis durch Elektroporation (5 ms , $200\text{ }\Omega$, 2 kV , $25\text{ }\mu\text{F}$) transformiert. Nach sofortiger Zugabe von 1 ml sterilem YPDS-Medium wurde in der Elektroporationsküvette für 3 h bei 29°C ohne Schütteln inkubiert und $100\text{ }\mu\text{l}$ der Zellsuspension auf SD-Agar-Selektionsplatten ausgestrichen und für 3-7 d bei 29°C inkubiert. Die Aufnahme der Plasmid-DNA wurde über Kolonie-PCR (Kap. 3.1.4) verifiziert und nach geeigneten Expressionsklonen durch Induktion der Proteinsynthese (Kap. 3.2.7) in 25 ml -Kulturen selektiert. In der Kolonie-PCR und im Expressionstest positive Klone wurden als kryokonservierte Glycerol-Dauerkulturen bei -80°C gelagert und für die folgenden Expressionskulturen (Kap. 3.2.7) verwendet.

3.2.7 Kultivierung von *P. pastoris*-Zellen

Zellen des *P. pastoris*-Stammes PichiaPink Strain 1 wurden auf SD-Agarplatten ausgestrichen, bei 29°C für 2-4 d inkubiert und mit angewachsenen Klonen 5 ml -BMGY-Vorkulturen inokuliert. Für die Kultivierung in Schüttelkulturen wurden zunächst Expressionskulturen in $20\text{--}500\text{ ml}$ BMGY-Medium angesetzt und die Zellen bis zu einer OD_{600} von $2,0 \pm 0,5$ kultiviert. Das BMGY-Medium wurde durch Zentrifugation (1500 g , 5 min , 4°C) entfernt und die pelletierten Zellen zur Induktion der Proteinsynthese im gleichen Volumen BMMY-Medium resuspendiert und für weitere 24 h bei 29°C und 220 rpm kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000 g , 10 min , 4°C) geerntet und bei -80°C gelagert. Zur Gewinnung von großen Zellmassen wurde ein geeigneter Expressionsklon im Fermenter in 2 l *Pichia*-

Basismedium kultiviert. Dazu wurde von einer SD-Agar-Selektionsplatte je eine Impföse an Zellen in zwei 50 ml-BMGY-Medium überführt und diese Vorkulturen über Nacht bei 29 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 15-25 inkubiert. Das *Pichia*-Basismedium wurde mit 8,7 ml PTM-Spurenelementen versetzt, die Temperatur auf 29 °C und der pH-Wert mit 1 M HCl und 25 % Ammoniumhydroxid-Lösung auf 5,0 eingestellt. Zur Unterbindung der Schaumbildung wurde 3 ml Antifoam (50 % (m/v) Polypropylglycol P2000) hinzugegeben. Nach Kalibrierung der Elektroden wurde mit den beiden 50 ml-Vorkulturen beimpft und unter stetigem Rühren bei 1000 rpm inkubiert. Nach Ansteigen der Sauerstoffsättigung infolge des Verbrauches des im *Pichia*-Basismedium vorhandenen Glycerols wurden 200 ml 50 % (m/v) Glycerollösung (versetzt mit 2,4 ml PTM-Spurenelementen) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min über eine Schlauchpumpe hinzugegeben. Nach Verbrauch des supplementierten Glycerols und erneutem Anstieg der Sauerstoffsättigung wurde langsam (zunächst 3 ml/h, später bis zu 7 ml/h) 400 ml Methanol (versetzt mit 4,8 ml PTM-Spurenelementen) hinzugegeben und durch Kontrolle der Sauerstoffsättigung darauf geachtet, dass es zu keiner toxischen Akkumulation von Methanol in der Kultursuspension kam. Nach Induktion der Proteinsynthese durch die Methanolzugabe wurde die Temperatur auf 24 °C reduziert und unter stetigem Rühren bei 1000 rpm weiter kultiviert, wobei die Methanolzufuhr durch Beobachten der Sauerstoffsättigung angepasst und über den Probenzug regelmäßig Proben zur Wachstums- und Expressionskontrolle entnommen wurden. Die Zellen wurden nach vollständigem Verbrauch des Methanols durch Zentrifugation (4500 g, 30 min, 4 °C) geerntet und bei –80 °C gelagert.

3.2.8 Transfektion von HEK-Zellen

HEK-293 T-REx-Zellen wurden mit dem pcDNA6/TR-Vektor (Invitrogen) stabil transfiziert, der von Intana Bioscience (Martinsried) zur Verfügung gestellt wurde und für einen Tetracyclin (TET)-Repressor und ein Blastizidin-Resistenzgen codiert. Zur Transfektion mit dem gewünschten Vektor für die Proteinsynthese wurde das JetPRIME-Transfektionskit (Polyplus) nach Herstellerangaben verwendet. Naive HEK-293 T-REx-Zellen wurden aus einem Cyro-Stock in eine 75 cm²-Zellkulturflasche mit 12 ml HEK-Basismedium mit supplementierten Blastizidin (5 µg/ml) überführt. Die naiven Zellen wurden bis zu einer Zelldichte von etwa 2·10⁶ Zellen/ml (gezählt mit Neubauer Improved-Zählkammer) über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem luftbefeuchteten Inkubator wachsen gelassen. Zur Transfektion wurden 4 µg des pCGTO-Vektors mit inkludierter für das zu untersuchende Protein codierender Sequenz zu 244 µl im entsprechenden JetPRIME-Transfektionspuffer verdünnt, kurz gevortext und pelletiert. 6 µl JetPRIME-Reagenz wurden hinzugefügt, kurz gevortext und die DNA durch Zentrifugation pelletiert und dann bei RT für 30 min inkubiert. Der Mix wurde tropfenweise zu den naiven Zellen gegeben und dabei vorsichtig geschüttelt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ im luftbefeuchteten Inkubator kultiviert und bei Erreichen von 60-90 % Konfluenz gesplittet (Kap. 3.2.10). Zur Selektion auf das pCGTO-Plasmid wurden die Zellen in HEK-Kulturmedium (inklusive 100 µg/ml Zeocin) kultiviert. Selektierte Zellen wurden in einem metabolischen Selektions-Setup (Kap. 3.2.9) auf die Produktion von PfFNT überprüft. Zur Langzeitlagerung wurden Zellen einer konfluenten Zellkultur mit Trypsin-EDTA resuspendiert und pelletiert (600 g, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in 3 ml HEK-Lagerungsmedium resuspendiert und die Zellsuspension in zwei Cryo-Vials gegeben und in einem Mr. Frosty-Gefrierbehälter mit Isopropanol bei –80 °C über mehrere Tage eingefroren. Für die Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.2.9 Metabolische Selektion von HEK-Zellen

Zur Optimierung der Proteinausbeute aus den nach Kap. 3.2.8 transfizierten HEK-293 T-REx-Zellen wurde von Dr. Iga Jakobowska (Intana Bioscience) und Dr. Nathan Epalle auf Basis zur Inhibition von Lactattransportern nach Benjamin et al. (2018) eine Methode zur metabolischen Selektion von PfFNT-produzierenden HEK-Zellen entwickelt. Dazu wurde durch den MCT1-Inhibitor AZD-3965 (Abb. 3.1 A) die Ausschleusung des durch den Metabolismus anfallenden Lactats über MCT1 aus den Zellen verhindert (Wang et al., 2021). Durch Zugabe von Metformin wurde zudem die Verstoffwechslung von Pyruvat inhibiert, was zur Akkumulation von toxischen Lactatkonzentrationen in den HEK-Zellen führte (Abb. 3.1 B). Hingegen waren Zellen mit funktionierenden PfFNT-Lactattransportproteinen nicht auf den endogenen Lactattransporter angewiesen, können Lactat ausschleusen und wurden damit selektiert.

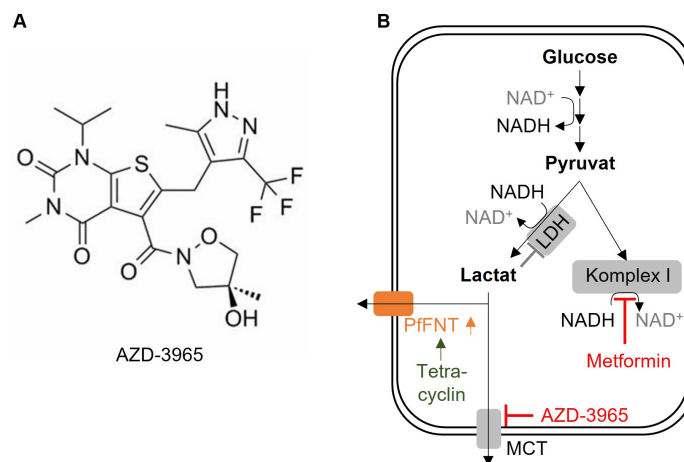


Abb. 3.1: Metabolische Selektion von PfFNT-produzierenden HEK-Zellen. **A** Strukturformel des MCT1-Inhibitors AZD-3965. **B** Schematische Darstellung des Mechanismus zur metabolischen Selektion von PfFNT-produzierenden HEK-Zellen.

Zur Kontrolle der Expression von funktionellem PfFNT in HEK-293 T-REx-Zellen wurden diese in HEK-PfFNT-Selektionsmedium (inklusive 100 µg/ml Zeocin, 5 µg/ml Blastidin, 1 µg/ml Tetracyclin, 4 mM Metformin und 0,1 µM AZD-3965) überführt. Vor Beginn des Selektionsdrucks wurde die PfFNT-Expression von transfizierten HEK-293 T-REx-Zellen durch Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin induziert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 40-60 % wurden die Zellen über Nacht inkubiert (37 °C, 5 % CO₂) und am nächsten Tag gesplittet und in HEK-PfFNT-Selektionsmedium über einen Zeitraum von 2-10 d selektiert. Während der Selektionsbedingungen wurde das Zellwachstum lichtmikroskopisch verfolgt sowie die Zellzahlen mittels Neubauer *Improved*-Zählkammer bestimmt. Für die Kultivierung der metabolisch selektierten Zellen zur Proteinproduktion wurden diese erneut gesplittet und weiter in HEK-Kulturmedium ohne weiteren Selektionsdruck auf PfFNT-Aktivität kultiviert (Kap 3.2.10).

3.2.10 Kultivierung von HEK-Zellen

Die Kultivierung von mit dem pCGTO-Plasmid transfizierten (Kap. 3.2.8) und metabolisch selektierten (Kap. 3.2.9) HEK-Zellen geschah in HEK-Kulturmedium (*Dulbecco's Modified Eagle Media* (DMEM) mit 4,5 g/l D-Glucose und L-Glutamin mit zugesetztem 10 % (v/v) FBS Premium sowie 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 5 µg/ml Blastidin und 100 µg/ml Zeocin). Der Selektionsdruck auf

DNA-Ebene wurde durch Zugabe von 100 µg/ml Zeocin aufrechterhalten. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem luftbefeuchteten Inkubator kultiviert. Das DMEM enthielt Phenolrot, welches bei Ansäuerung das Mediums gelb verfärbte und dann durch frisches DMEM ersetzt wurde. Vor Erreichen von 100 % Konfluenz (Verdopplungszeit ca. 1 d) wurden die Zellen gesplittet. Dazu wurde das HEK-Kulturmedium entfernt und die Zellen mit 5 ml *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (DPBS) gewaschen und durch Inkubation mit 1 ml 0,05 % Trypsin-EDTA (37 °C, 3-5 min) von der Oberfläche abgelöst. Die abgelösten Zellen in Trypsin-EDTA wurden in einem Volumenverhältnis von 1:8 mit HEK-Kulturmedium verdünnt, durch Auf- und Abpipettieren gemischt und zur weiteren Kultivierung in frisches HEK-Kulturmedium gegeben. Zur Produktion von größeren Zellmassen für den Zellaufschluss und die Isolierung der Membranfraktion (Kap. 3.4.3) wurden Zellen in 3-20 Zellkulturflaschen (175 cm²) kultiviert. Die Proteinsynthese wurde dabei jeweils durch Zugabe von 1 µg/ml Tetracyclin induziert und die Zellen für 1 d bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem luftbefeuchteten Inkubator kultiviert. Zur Ernte wurden die Zellen mit eiskaltem 1xPBS-Puffer von der Oberfläche abgelöst. Die durch Zentrifugation (5000 g, 10 min, 4 °C) geernteten Zellen wurden bis zum Zellaufschluss (Kap. 3.4.3) bei –80 °C gelagert.

3.3 Zellfreie Proteinsynthese

Die zellfreie Proteinsynthese wurde mit dem *Continuous Exchange Cell-free* (CECF)-Verfahren angelehnt an das von Schwarz et al. (2007a) publizierte Protokoll durchgeführt. Eine semipermeable Membran (MWCO 14 kDa) trennte mit einem Reaktionsmix (RM) und einem Feedingmix (FM) zwei Kompartimente voneinander, wobei der FM mit einem etwa 17-fach größeren Volumen als der RM angesetzt wurde (Abb. 3.2). Dadurch sollte die Entfernung von Nebenprodukten wie Pyrophosphat aus dem RM sowie die stetige Diffusion von Substraten aus dem FM in den RM gewährleistet werden. Sämtliche für die Transkription und Translation sowie für die Energiebereitstellung benötigte Komponenten wurden in den jeweiligen Ansätzen der zellfreien Proteinsynthese supplementiert. Grundlegend ist der sogenannte S30-Zellextrakt, der aus *E. coli*-Zelllysate durch Zentrifugation bei 30.000 g isoliert wurde (Kap. 3.3.1). Der 30.000 g-Zentrifugationsüberstand enthielt die für Transkription und Translation essenziellen Komponenten wie Ribosomen, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Translationsfaktoren und weitere relevante Proteine. Beim T7-Expressionssystem mit einer aus *E. coli* gewonnenen T7-RNA-Polymerase (Kap. 3.3.2) wurden die unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehenden codierenden Sequenzen transkribiert, wobei endogene *E. coli*-Promotoren durch die T7-RNA-Polymerase nicht adressiert wurden. Aus *E. coli* stammende mRNA, die möglicherweise mit der von der T7-RNA-Polymerase transkribierten mRNA konkurriert, wurde bei der Herstellung des S30-Zellextrakts weitgehend zerstört (Schwarz et al., 2007a). Aminosäuren und Nukleosidtriphosphate (NTP) wurden kontinuierlich für die Protein- bzw. RNA-Synthese verbraucht und daher supplementiert. Zur Energiebereitstellung wurden Phosphoenolpyruvat (PEP)/Pyruvatkinase und Acetylphosphat (AcP)/Acetatkinase als NTP-Regenerationssysteme eingesetzt. Acetatkinase lag bereits im S30-Zellextrakt vor und musste daher im Gegensatz zur Pyruvatkinase nicht supplementiert werden. Bei Verwendung des hier verwendeten bakteriellen S30-Zellextrakts mussten einige Aminosäuren (R, C, W, M, D, E) aufgrund von Metabolisierungsreaktionen in höheren Konzentrationen hinzugefügt werden als diese im standardmäßig verwendeten 20-Aminosäure-Mix vorlagen. Weiterhin war die Supplementierung von Folinsäure zur Synthese des initialen Formyl-Methionins essenziell. RNase- und Protease-Inhibitoren wurden zum Schutz von RNA und Proteinen in dem RM hinzugefügt. Dithiothreitol

(DTT) diente als Oxidationsschutz insbesondere für die T7-RNA-Polymerase. Polyethylenglykol (PEG) steigerte die Viskosität des Reaktionsmediums und stellte somit die Zähflüssigkeit des Zytoplasmas nach.

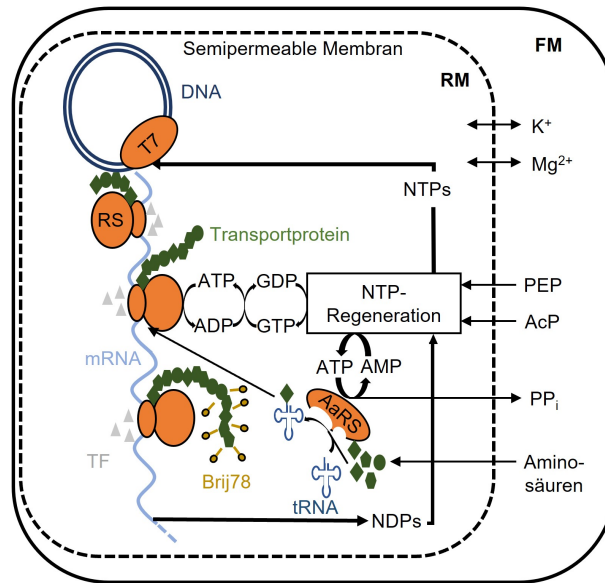


Abb. 3.2: Schematische Darstellung zur zellfreien Proteinsynthese nach dem CECF-Verfahren. AcP, Acetylphosphat; FM, Feedingmix; PEP, Phosphoenolpyruvat; PP_i, Pyrophosphat; RM, Reaktionsmix; RS, 70 S-Ribosom; T7, T7-RNA-Polymerase; TF, Translationsfaktoren. Abbildung angelehnt an Schwarz et al. (2007b).

3.3.1 Herstellung eines S30-Zellextrakts aus *E. coli*-Zellen

Der für die zellfreie Proteinherstellung grundlegende S30-Zellextrakt aus *E. coli* enthielt neben den Ribosomen weitere wichtige Bestandteile einer intakten Proteinsynthesemaschinerie wie Transkriptions- und Translationsfaktoren. Der S30-Zellextrakt wurde aus den Überständen von 5 l *E. coli*-Fermenterkulturen nach Zellaufschluss durch Zentrifugation bei 30.000 g gewonnen. Eine *E. coli* BL21 (DE3)-Kolonie wurde von einer LB-Agarplatte in 50 ml LB-Medium überführt und über Nacht inkubiert (37 °C, 200 rpm). Diese Vorkultur wurde zur Inokulation einer 5 l-Kultur im Fermenter verwendet. Die Bestandteile für 5 l 2xYTPG-Medium wurden in 4,5 l ddH₂O gelöst und mit Ausnahme von D-Glucose und den Phosphatpufferbestandteilen im Fermenter autoklaviert. D-Glucose wurde separat in 200 ml ddH₂O gelöst und sterilfiltriert und die Phosphatpufferbestandteile in 250 ml ddH₂O gelöst und separat autoklaviert. Die Komponenten wurden im Fermenter vereinigt und 500 µl Antifoam (50 % (m/v) Polypropylglycol P2000) sowie die 50 ml-Vorkultur hinzugefügt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 80 %-iger Sauerstoffsättigung bis zur exponentiellen Wachstumsphase und einer OD₆₀₀ von 2,5-3,0. Die OD₆₀₀ und die Sauerstoffsättigung wurden während der Fermentation kontrolliert. Das *E. coli*-Wachstum wurde bei Erreichen der gewünschten OD₆₀₀ durch rasches Abkühlen auf unter 14 °C gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation (4500 g, 15 min, 4 °C) geerntet. Die Zellpellets wurden dreimal mit eiskaltem S30-Puffer A gewaschen und bei –80 °C eingefroren. Die wieder aufgetauten Zellen wurden in eiskaltem S30-Puffer B resuspendiert und mittels French Press-Zellhomogenisator bei etwa 20.000 psi aufgeschlossen. Das viskose Homogenat wurde zentrifugiert (30.000 g, 30 min, 4 °C) und der zwischen Pellet und Lipidüberstand befindliche Roh-S30-Zellextrakt isoliert. Der Roh-S30-Zellextrakt wurde erneut zentrifugiert (30.000 g, 30 min, 4 °C) und die entnommene mittlere Phase mit einer finalen Konzentration von 400 mM NaCl

versetzt. Nach Inkubation im bewegten Wasserbad (42 °C, 45 min) wurde gegen 2,5 l S30-Puffer C dialysiert (MWCO 14 kDa, 4 °C). Der dialysierte S30-Zellextrakt wurde zentrifugiert (30.000 g, 30 min, 4 °C), die mittlere Phase entnommen und Aliquots bei –80 °C gelagert. Zur Qualitätsüberprüfung des S30-Zellextrakts wurde ein Magnesiumscreening mittels zellfreier GFP-Synthese (Kap. 3.3.3) durchgeführt.

3.3.2 Isolierung der T7-RNA-Polymerase aus *E. coli*-Zellen

Die für die zellfreie Proteinsynthese benötigte T7-RNA-Polymerase wurde heterolog in *E. coli* exprimiert, aus den Bakterien extrahiert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Ein Klon *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit enthaltenem pAR1219-Plasmid einer frisch ausgestrichenen LB_{Amp}-Agarplatte wurde für die Inokulation von vier 5 ml-LB_{Amp}-Vorkulturen verwendet und diese bei 37 °C im Rotationsrad (6 rpm) über Nacht inkubiert. Aus den Vorkulturen wurden vier 500 ml-LB_{Amp}-Hauptkulturen beimpft und diese bei 37 °C und 220 rpm inkubiert und bei einer OD₆₀₀ von 0,7±0,1 mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG induziert. Nach 5 h Inkubation bei 37 °C und 220 rpm wurden die Kulturen durch Zentrifugation (4500 g, 15 min, 4 °C) geerntet und die Zellpellets einmal mit 60 ml T7-Puffer gewaschen und bei –80 °C gelagert. Die Zellen wurden in 30 ml T7-Puffer mit dem French Press-Zellhomogenisator (20.000 psi, zwei Durchläufe) aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (20.000 g, 30 min, 4 °C) abgetrennt und der Überstand zur Präzipitation von Nukleinsäuren auf Eis tropfenweise zu einer Endkonzentration von 2 % (m/v) mit Streptomycinsulfat versetzt. Nach Zentrifugation (30.000 g, 30 min, 4 °C) wurde die im Überstand befindliche T7-RNA-Polymerase mittels Anionenaustausch-Affinitätschromatographie gereinigt. Dazu wurde eine Q-Sepharose-Säule gegossen und mit 2 CV T7-Puffer äquilibriert. Eluiert wurde die T7-RNA-Polymerase mit einem steigenden Gradienten von 20-500 mM NaCl in T7-Puffer in 15 ml-Fraktionen. Die Gesamtproteinkonzentrationen der 15 ml-Fraktionen wurden über A₂₈₀-Messungen ($\epsilon_{280, \text{molar}} = 141760 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) verfolgt und repräsentative Fraktionen in einer Western Blot-Analyse (Kap. 3.4.10) mit einem gegen die T7-RNA-Polymerase gerichteten Antikörper auf die Präsenz von T7-RNA-Polymerase (98,9 kDa) untersucht. Die Fraktionen, die T7-RNA-Polymerase beinhalten, wurden zusammengegeben und durch Ultrafiltration (Amicon Ultra-4 30 kDa MWCO) bis zu einer Gesamtproteinkonzentration von 4,3-8,6 mg/ml konzentriert. Nach Dialyse (14 kDa MWCO) gegen 1 l T7-Dialysepuffer über Nacht bei 4 °C wurde die T7-RNA-Polymerase zu 50 % (v/v) mit Glycerol versetzt und aliquotiert. Nach Schockfrieren in flüssigem Stickstoff wurde die T7-RNA-Polymerase (Konzentration etwa 1,5-3,0 mg/ml) bei –80 °C gelagert. Zur Überprüfung der Qualität der hergestellten T7-RNA-Polymerase wurde ein Aktivitätsscreening mittels zellfreier Synthese von mNeonGreen (Kap. 3.3.3) unter Vergleich zu einer älteren Charge T7-RNA-Polymerase durchgeführt.

3.3.3 Zellfreie Proteinsynthese von fluoreszierenden Proteinen

Analytische Zellfrei-Ansätze zur Synthese von GFP und mNeonGreen wurden zur Überprüfung der für die zellfreie Proteinsynthese bestimmten Stammlösungen sowie im Rahmen eines Magnesiumscreenings zur Bestimmung des Mg²⁺-Optimums von neu hergestellten S30-Zellextrakten (Kap. 3.3.1) sowie zur Überprüfung der hergestellten T7-RNA-Polymerase (Kap. 3.3.2) durchgeführt. Für ein Magnesiumscreening wurden analytische Ansätze mit eingestellten Mg²⁺-Konzentrationen von 10-18 mM vorbereitet und das Optimum durch den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten in einer In-Gel-Fluoreszenz-Analyse (Kap. 3.4.12) bestimmt, wobei der Mg²⁺-Gehalt von S30-Zellextrakt und S30-Puffer berücksich-

sichtigt wurde. Die analytischen Zellfrei-Ansätze wurden nach Schneider et al. (2010) in Mini-CECF-Reaktionsgefäßen mit einem RM-Volumen von 55 µl durchgeführt. Die Reaktionsgefäße wurden selbst hergestellt, indem an die Unterseite der Reaktionskammern eine hydratisierte Dialysemembran (MW-CO 14 kDa) mit einem Teflonring gespannt wurde. Die präparierten Reaktionsgefäße wurden mit der Dialysemembran nach unten in 24-Well-Platten gesteckt, die mit einem FM-Volumen von 850 µl befüllt wurden. Die analytischen Zellfrei-Ansätze wurden vorbereitet, indem zunächst ein gemeinsamer Mastermix (MM-M) pipettiert und aus diesem der Feedingmix-Mastermix (MM-F) und der Reaktionsmix-Mastermix (MM-R) hergestellt wurden. Tab. 3.5 zeigt das Pipettierschema für die Überprüfung der Stammlösungen bei einer festgelegten Magnesiumkonzentration. Für das Magnesiumscreening und zur Charakterisierung der Aktivität der T7-RNA-Polymerase wurden gemeinsame Mastermixe pipettiert, diese in verschiedene Ansätze geteilt und in diesen Ansätzen verschiedene Magnesiumkonzentrationen bzw.

Tab. 3.5: Pipettierschema für die zellfreie Proteinsynthese von löslichen Fluoreszenzproteinen im analytischen Maßstab. Der gemeinsame Mastermix (MM-M) wurde in MM-M1 und MM-M2 unterteilt und daraus der Feedingmix-Mastermix (MM-F) und der Reaktionsmix-Mastermix (MM-R) hergestellt. Die angegebenen Volumina (*V*) waren ausreichend für eine Doppelbestimmung, d. h. zwei analytische Ansätze (RM = 55 µl, FM = 850 µl). Mittels Magnesiumacetat und Kaliumacetat wurden die Mg²⁺- und K⁺-Konzentrationen eingestellt (hier: 10 mM Mg²⁺ und 290 mM K⁺).

MM-M	C_{Stamm}	C_{Soll}	V/µl
cComplete-Proteaseinhibitor	50x	1x	48,9
PEG 8000	40 % (m/v)	2 % (m/v)	122,3
20-Aminosäure-Mix	4 mM	0,5 mM	305,6
6-Aminosäure-Mix (RCWMDE)	16,7 mM	1 mM	146,7
Acetylphosphat (AcP)	1 M	20 mM	48,9
Phosphoenolpyruvat (PEP)	1 M	20 mM	48,9
NTP-Mix	75x	1x	32,6
HEPES/EDTA-Puffer	2,4 M	0,1 M	89,7
DTT	500 mM	2 mM	9,8
Folinsäure	10 mg/ml	0,1 mg/ml	24,5
Magnesiumacetat	1 M	5,1 mM	12,5
Kaliumacetat	4 M	150,8 mM	92,2
Natriumazid	10 % (m/v)	0,05 % (m/v)	12,2
MM-M			995
MM-F	C_{Stamm}	C_{Soll}	V/µl
MM-M1			915
S30-Puffer	1x	0,35x	788
20-Aminosäure-Mix	4 mM	1,05 mM	309
ddH ₂ O			ad 2250
MM-R	C_{Stamm}	C_{Soll}	V/µl
MM-M2			79,3
DNA-Template	variabel	0,023 mg/ml	variabel
T7-RNA-Polymerase	350 U/µl	15 U/µl	8,36
<i>E. coli</i> tRNA	40 mg/ml	0,7 mg/ml	3,41
Pyruvatkinase	10 mg/ml	0,08 mg/ml	1,56
RiboLock-Inhibitor	40 U/µl	0,3 U/µl	1,46
S30-Zellextrakt	1x	0,35x	68,3
ddH ₂ O			ad 195

T7-RNA-Polymerase-Aktivitäten eingesetzt. Die analytischen Ansätze wurden in Doppelbestimmungen durchgeführt, da Luftblasen zwischen RM und FM den Stoffaustausch zwischen den Kompartimenten störten und die Effizienz der Proteinsynthese stark einschränken konnten. Nach Befüllen der Vertiefungen der 24-Well-Platten mit dem FM und Pipettieren des RM auf die Dialysemembranen der Reaktionsgefäße wurden die Reaktionsgefäße so in die 24-Well-Platten-Vertiefungen gesetzt, dass die Dialysemembran in den FM eintauchten. Inkubiert wurden die mit Parafilm verschlossenen Ansätze bei 30 °C für 20-24 h im bewegten Wasserbad und zur abschließenden Faltung der Fluoreszenzproteine für 1 h bei 4 °C.

3.3.4 Zellfreie Membranproteinsynthese im analytischen Maßstab

Um geeignete Detergenzien bzw. Detergenzkonzentrationen für die zellfreie Synthese von Membranproteinen zu identifizieren, wurde zunächst ein Detergenzscreening im analytischen Maßstab durchgeführt.

Tab. 3.6: Pipettierschema für die zellfreie Proteinsynthese von Membranproteinen im analytischen Maßstab für ein Detergenzscreening. Der gemeinsame Mastermix (MM-M) wurde in MM-M1 und MM-M2 unterteilt und daraus der Feedingmix-Mastermix (MM-F) und der Reaktionsmix-Mastermix (MM-R) hergestellt. Die angegebenen Volumina (V) waren ausreichend für sieben Doppelbestimmungen, d. h. 14 analytische Ansätze (RM = 55 µl, FM = 850 µl). Mittels Magnesiumacetat und Kaliumacetat wurden die Mg^{2+} - und K^{+} -Konzentrationen eingestellt (hier: 14 mM Mg^{2+} und 290 mM K^{+}). RM und FM wurden nach Tab. 3.7 vervollständigt.

MM-M	C_{Stamm}	C_{Soll}	V/µl
cOmplete-Proteaseinhibitor	50x	1x	280,5
PEG 8000	40 % (m/v)	2 % (m/v)	701,3
20-Aminosäure-Mix	4 mM	0,5 mM	1753,1
6-Aminosäure-Mix (RCWMDE)	16,7 mM	1 mM	841,5
Acetylphosphat (AcP)	1 M	20 mM	280,5
Phosphoenolpyruvat (PEP)	1 M	20 mM	280,5
NTP-Mix	75x	1x	187,0
HEPES/EDTA-Puffer	2,4 M	0,1 M	514,3
DTT	500 mM	2 mM	56,1
Folinsäure	10 mg/ml	0,1 mg/ml	140,3
Magnesiumacetat	1 M	9,1 mM	127,6
Kaliumacetat	4 M	150,8 mM	528,7
Natriumazid	10 % (m/v)	0,05 % (m/v)	70,1
MM-M			5761
MM-F	C_{Stamm}	C_{Soll}	V/µl
MM-M1			5361
S30-Puffer	1x	0,35x	4568
20-Aminosäure-Mix	4 mM	1,05 mM	1794
ddH ₂ O			ad 13.050
MM-R	C_{Stamm}	C_{Soll}	V/µl
MM-M2			400,5
DNA-Template	variabel	0,023 mg/ml	variabel
T7-RNA-Polymerase	350 U/µl	15 U/µl	41,79
<i>E. coli</i> tRNA	40 mg/ml	0,7 mg/ml	17,06
Pyruvatkinase	10 mg/ml	0,08 mg/ml	7,80
RiboLock-Inhibitor	40 U/µl	0,3 U/µl	7,31
S30-Zellextrakt	1x	0,35x	341,3

Zu Vergleichszwecken wurde dabei auch eine Doppelbestimmung bei Solubilisierung mit 0,8 % (m/v) Brij78 durchgeführt. Es wurden Membranprotein-GFP-Fusionskonstrukte verwendet, um Informationen über die Qualität und Quantität der Syntheseprodukte der zellfreien Proteinsynthese zu erhalten. Dabei wurde das C-terminal fusionierte GFP als Faltungsindikator für die Einschätzung der Solubilisierungsumgebung verwendet (Müller-Lucks et al., 2012). Analog zu Kap. 3.3.3 wurden die analytischen Ansätze in Mini-CECF-Reaktionsgefäßen mit einem RM-Volumen von 55 µl und einem FM-Volumen von 850 µl durchgeführt. Dazu wurden zunächst die gemeinsamen Mastermixe nach Tab. 3.6 angesetzt und daraufhin auf verschiedene Ansätze aufgeteilt. In den einzelnen Ansätzen wurden verschiedene Detergenzkonzentrationen eingestellt und die Ansätze entsprechend nach Tab. 3.7 vervollständigt. Es wurden wie in Kap. 3.3.3 verfahren und analytische Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 20-24 h und die Proteinsynthese erfolgte im bewegten Wasserbad bei 30 °C. Zur abschließenden Proteinfaltung wurde anschließend für mindestens 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Proteinreinigung erfolgte im Rahmen einer analytischen Zellfrei-Reinigung mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (Kap. 3.4.5).

Tab. 3.7: Pipettierschema für ein Detergenzkonzentrationscreening mit GDN im analytischen Maßstab. Angegeben sind die Zusammensetzungen von Reaktionsmix (RM) und Feedingmix (FM) für Doppelbestimmungen (RM = 55 µl, FM = 850 µl). Die angegebenen Volumina einer 10 % (m/v)-igen GDN-Stammlösung bzw. einer 15 % (m/v)-igen Brij78-Stammlösung mussten pipettiert werden, um die entsprechende Detergenzkonzentration im Ansatz zu erzielen.

RM	0,8 % Brij78	0,03 % GDN	0,06 % GDN	0,1 % GDN	0,3 % GDN	0,6 % GDN	1 % GDN
MM-R	99,6 µl	99,6 µl	99,6 µl	99,6 µl	99,6 µl	99,6 µl	99,6 µl
Brij78 (15 %)	6,93 µl	-	-	-	-	-	-
GDN (10 %)	-	0,39 µl	0,78 µl	1,30 µl	3,90 µl	7,80 µl	13,0 µl
ddH ₂ O	ad 130 µl	ad 130 µl	ad 130 µl	ad 130 µl	ad 130 µl	ad 130 µl	ad 130 µl
FM	0,8 % Brij78	0,03 % GDN	0,06 % GDN	0,1 % GDN	0,3 % GDN	0,6 % GDN	1 % GDN
MM-F	1614 µl	1614 µl	1614 µl	1614 µl	1614 µl	1614 µl	1614 µl
Brij78 (15 %)	96 µl	-	-	-	-	-	-
GDN (10 %)	-	5,4 µl	10,8 µl	18 µl	54 µl	108 µl	180 µl
ddH ₂ O	ad 1800 µl	ad 1800 µl	ad 1800 µl	ad 1800 µl	ad 1800 µl	ad 1800 µl	ad 1800 µl

3.3.5 Zellfreie Membranproteinsynthese im präparativen Maßstab

Im präparativen Maßstab wurde die zellfreie Proteinsynthese in Maxi-CECF-Reaktoren nach dem Vorbild von Schneider et al. (2010) durchgeführt. Membranproteine wurden in Gegenwart einer zuvor im analytischen Detergenzscreening (Kap. 3.3.4) ermittelten geeigneten Detergenzumgebung hergestellt. Es wurde nach Tab. 3.8 zunächst ein gemeinsamer Mastermix vorbereitet und aus diesem der Reaktionsmix (V = 1 ml) und der Feedingmix (V = 17 ml) angefertigt. Nanodiscs zur cotranslationalen Rekonstitution von Membranproteinen als Alternative zur Detergenzsolubilisierung wurden nur im Reaktionsmix in Ansätzen ohne Detergenzien eingesetzt. Der RM wurde in eine 3 ml-Slide-A-Lyzer-Dialysekassette (10 kDa MWCO) überführt und der FM in die Maxi-CECF-Reaktoren gefüllt. Die Dialysekassette wurde aufrecht

im Maxi-CECF-Reaktor positioniert und dieser dicht verschlossen. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 20-24 h im bewegten Wasserbad. Der Reaktionsmix wurde nach der Proteinsynthese aus der Dialysekassette entnommen und für 1 h bei 4 °C zur abschließenden Proteinfaltung inkubiert. Die anschließende Proteinreinigung erfolgte mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie (Kap. 3.4.5).

Tab. 3.8: Pipettierschema für die zellfreie Proteinsynthese von Membranproteinen im präparativen Maßstab. Der gemeinsame Mastermix (MM-M) wurde in MM-M1 und MM-M2 unterteilt und daraus der Feedingmix (FM) und der Reaktionsmix (RM) hergestellt. Die angegebenen Volumina (V) mussten für einen präparativen Ansatz (RM = 1 ml, FM = 17 ml) eingesetzt werden. Mittels Magnesiumacetat und Kaliumacetat wurden die Mg^{2+} - und K^{+} -Konzentrationen eingestellt (hier: 14 mM Mg^{2+} und 290 mM K^{+}). *Nanodiscs wurden nur im Reaktionsmix und ohne Detergenzien eingesetzt.

MM-M	C_{Stamm}	C_{Soll}	V/μl
cOmplete-Proteaseinhibitor	50x	1x	360
PEG 8000	40 % (m/v)	2 % (m/v)	900
20-Aminosäure-Mix	4 mM	0,5 mM	2250
6-Aminosäure-Mix (RCWMDE)	16,7 mM	1 mM	1080
Acetylphosphat (AcP)	1 M	20 mM	360
Phosphoenolpyruvat (PEP)	1 M	20 mM	360
NTP-Mix	75x	1x	240
HEPES/EDTA-Puffer	2,4 M	0,1 M	660
DTT	500 mM	2 mM	72
Folinsäure	10 mg/ml	0,1 mg/ml	180
Magnesiumacetat	1 M	9,1 mM	163,8
Kaliumacetat	4 M	150,8 mM	678,6
Natriumazid	10 % (m/v)	0,05 % (m/v)	90
Detergenz	variabel	variabel	variabel
MM-M			variabel
FM	C_{Stamm}	C_{Soll}	V/μl
MM-M1			variabel
S30-Puffer	1x	0,35x	5950
20-Aminosäure-Mix	4 mM	1,05 mM	2338
ddH ₂ O			ad 17.000
RM	C_{Stamm}	C_{Soll}	V/μl
MM-M2			variabel
DNA-Template	variabel	0,023 mg/ml	variabel
T7-RNA-Polymerase	350 U/ μl	15 U/ μl	42,86
<i>E. coli</i> tRNA	40 mg/ml	0,7 mg/ml	17,50
Pyruvatkinase	10 mg/ml	0,08 mg/ml	8,00
RiboLock-Inhibitor	40 U/ μl	0,3 U/ μl	7,50
S30-Zellextrakt	1x	0,35x	350
Nanodiscs*	variabel	variabel	variabel
ddH ₂ O			ad 1000

3.4 Proteinchemische Methoden

3.4.1 Isolierung von MSP aus Bakterienzellen durch Hochdruckhomogenisation

Der Zellaufschluss der MSP-exprimierenden *E. coli*-Zellen erfolgte mittels Hochdruckhomogenisation am French Press-Homogenisator. Etwa 15-20 g (Feuchtmasse) Zellpellet wurden vorsichtig in ca. 50 ml MSP-Puffer C mit gelöstem cOmplete-Proteaseinhibitor resuspendiert und zur Freisetzung von MSP-Proteinen aus der Membranfraktion eine Endkonzentration von 1 % (v/v) Triton X-100 eingestellt. Die Zellen wurden mittels French Press-Homogenisator in drei Durchgängen bei etwa 20000 psi und 4 °C aufgeschlossen. Zur Abtrennung von Zellbruchstücken wurde das viskose Zellhomogenat zentrifugiert (30.000 g, 30 min, 4 °C) und der die MSP-Proteine enthaltende Zentrifugationsüberstand durch einen 0,45 µm-Filter gegeben. Der filtrierte Überstand wurde zur MSP-Reinigung in der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (Kap. 3.4.5) eingesetzt.

3.4.2 Isolierung der Membranfraktion aus Hefezellen

Zur Isolierung der Membranfraktion aus den Hefen *S. cerevisiae* und *P. pastoris* wurden die Zellen zunächst mit säuregewaschenen Glasperlen mechanisch aufgeschlossen und die mikrosomale Fraktion durch differentielle Zentrifugation geerntet. Im Kleinstmaßstab wurde dazu das Zellpellet aus 20-50 ml-Kulturen in 15 ml- oder 50 ml-Zentrifugationsröhrchen mit 0,5 ml Puffer B resuspendiert und 0,5 g säuregewaschene Glasperlen (Ø 425-600 µm) hinzugegeben. Der Aufschluss erfolgte durch zehnmaliges Vortexen für 30 s auf maximaler Stufe, wobei zwischen jedem Vortexzyklus für 1 min auf Eis gekühlt wurde. Der Überstand nach Zentrifugation (1000 g, 5 min, 4 °C) wurde gesammelt und die mit den Glasperlen pelletierten Zellbruchstücke erneut mit 0,5 ml Puffer B in zehn Zyklen gevortext. Es wurde erneut zentrifugiert (1000 g, 5 min, 4 °C), die Überstände der 1000 g-Zentrifugationen vereinigt und zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4 °C). Der 10.000 g-Zentrifugationsüberstand wurde zum Sammeln der Membranfraktion durch Zentrifugation (100.000 g, 45 min, 4 °C) eingesetzt. Die als Pellet erhaltene Membranfraktion wurde in 100 µl Puffer M aufgenommen und auf die Präsenz des zu untersuchenden Membranproteins in einer Western Blot-Analyse (Kap. 3.4.10) untersucht. Post-Golgi-Vesikel aus der NY17-Sekretionsmutante (Kap. 3.2.5) wurden analog isoliert. Die durch die 100.000 g-Zentrifugation mit der Membranfraktion pelletierten Post-Golgi-Vesikel wurden in Vesikelpuffer aufgenommen.

Größere Zellmassen aus Fermenterkulturen wurden mit dem BeadBeater-Zellhomogenisator mechanisch aufgeschlossen. Dazu wurde zu 5-80 g (Feuchtmasse) Zellpellet 200 g säuregewaschene Glasperlen (Ø 425-600 µm) gegeben und die Mischkammer vollständig mit eiskaltem Puffer B aufgefüllt. Der Aufschluss erfolgte in zehn Rührzyklen für jeweils 30 s, wobei zwischen den Zyklen für 1 min mit Eis gekühlt wurde. Nach Sedimentierung der Glasperlen wurde der Überstand gesammelt und die Glasperlen mit dem verbleibenden Zellmaterial mit eiskaltem Puffer B erneut zweimal gerührt. Die Überstände wurden zusammengegeben und mit Puffer B inklusive cOmplete-Proteaseinhibitor verdünnt, sodass pro g Zellpellet 10-50 ml Puffer vorlag. Zellbruchstücke wurden durch zweimalige Zentrifugation (5000 g, 15 min, 4 °C) pelletiert und die Zentrifugationsüberstände zum Sammeln der Membranfraktion zentrifugiert (100.000 g, 45 min, 4 °C). Die pelletierten Membranfraktionen wurden in Protein-Solubilisierungspuffer aufgenommen und bis zu Solubilisierungsversuchen (Kap. 3.4.4) bei –80 °C gelagert.

3.4.3 Isolierung der Membranfraktion aus HEK-Zellen

HEK-293 T-Rex-Zellen wurden pro 0,7-1,0 g (Feuchtmasse) Zellpellet in 2 ml eiskaltem TBS-Puffer (supplementiert mit cOmplete-Proteaseinhibitor) resuspendiert und durch Ultraschall-desintegration aufgeschlossen. Dazu wurden die Zellen in 10-15 Zyklen à 30 s bei 7,2 W mit dem Ultraschallhomogenisator aufgeschlossen, wobei zwischen jedem Zyklus für 30 s auf Eis gekühlt wurde. Zellbruchstücke wurden durch Zentrifugation (2000 g, 5 min, 4 °C) pelletiert und die Membranfraktion durch erneute Zentrifugation des 2000 g-Überstandes (100.000 g, 45 min, 4 °C) im Pellet gesammelt. Die Membranfraktion wurde in 0,5 ml TBS-Puffer (supplementiert mit cOmplete-Proteaseinhibitor) resuspendiert und die Membranfraktion in einer Western Blot-Analyse (Kap. 3.4.10) auf die Präsenz des zu untersuchenden Membranproteins überprüft und bis zu Solubilisierungsversuchen (Kap. 3.4.4) bei –80 °C gelagert.

3.4.4 Solubilisierung von Membranproteinen

Membranproteine wurden mithilfe von Detergenzien aus den nach Kap. 3.4.2 bzw. Kap. 3.4.3 isolierten Membranfraktionen extrahiert. Dazu wurde in den Solubilisierungsansätzen eine Gesamtproteinkonzentration von 2-5 mg/ml eingestellt und das entsprechende Solubilisierungsdetergenz in der gewünschten Konzentration hinzugegeben. Als Solubilisierungskontrolle dienten Ansätze mit dem anionischen und denaturierenden Detergenz SDS. Neben cOmplete-Proteaseinhibitor wurde zur Stabilisierung der solubilisierten Membranproteine 10 % (v/v) Glycerol hinzugegeben. Die Solubilisierungsansätze wurden für 3 h oder über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert oder mit einem Magnetrührkern stetig gerührt. Zur Optimierung der Durchmischung wurden abgerundete Reaktionsgefäße verwendet, die maximal zur Hälfte mit der Membransuspension befüllt wurden. Ein Membranprotein wurde als solubilisiert betrachtet, wenn es nach Zentrifugation bei 100.000 g, 45 min und 4 °C im Zentrifugationsüberstand vorlag. Solubilierte Membranproteine wurden mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (Kap. 3.4.5) entweder in Präsenz von Protein-Reinigungspuffer mit dem selben Detergenz gereinigt oder das Detergenz während der Affinitätschromatographie durch ein Stabilisierungsdetergenz ausgetauscht.

3.4.5 Proteinreinigung durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen mit Poly-His-Tag wie MSP1E3D1 und MSP2N2 sowie von Membranproteinen wie PfFNTG107S geschah mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (IMAC). Ni²⁺-NTA-Agarosebeads wurden in Poly-Prep Chromatographie-Säulen mit Imidazol-freiem Reinigungspuffer gewaschen und die gereinigten Agarosebeads mit dem filtrierten Überstand des Bakterienzellaufschlusses (Kap. 3.4.1) oder den Solubilisierungsüberständen (Kap. 3.4.4) für 2 h oder über Nacht bei 4 °C unter Rotation inkubiert. Für die MSP-Reinigung wurde die mit dem Protein-Agarosebeads-Gemisch beladene Säule mit jeweils 5 CV der MSP-Puffer A, B und C gewaschen und die MSP-Proteine in einer 20 mM- bis 500 mM-Imidazolreihe eluiert. Die Membranproteine aus den Solubilisierungsüberständen wurden durch Protein-Reinigungspuffer mit dem entsprechenden Detergenz mittels Imidazol eluiert.

Analytische Ansätze der zellfreien Proteinsynthese wurden mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie im kleinen Maßstab gereinigt. Dazu wurden für jeden Reaktionsansatz Ni²⁺-NTA-Agarosebeads für ein Säulenvolumen von 7,5 µl mit Protein-Reinigungspuffer gewaschen und zu den Reaktionsmischen aus der analytischen Zellfrei-Synthese gegeben und über Nacht bei 4 °C rotiert. Die Gemische wurden auf PCR-

DNA-Reinigungssäulen gegeben, 5 min auf der Säule inkubiert und die Durchflüsse aufgefangen. Es wurde zweimal mit jeweils 75 µl Protein-Reinigungspuffer mit 20 mM Imidazol gewaschen und anschließend nach Inkubation für 15 min mit 80 µl Protein-Reinigungspuffer mit 400 mM Imidazol eluiert. Ansätze der präparativen zellfreien Proteinsynthese wurden über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie mit einem Säulenvolumen von 150 µl aufgearbeitet. Die mit gewaschenen Ni^{2+} -NTA-Agarosebeads über Nacht bei 4 °C inkubierten Proben wurden auf Poly-Prep Chromatographie-Säulen gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Gewaschen wurde mit 3 ml Protein-Reinigungspuffer mit 20 mM Imidazol und die Elution erfolgte in einer Imidazolreihe von jeweils 750 µl Protein-Reinigungspuffer mit 40-500 mM Imidazol. Die aufgefangenen Fraktionen und die Agarosebeads wurden zur Beurteilung des Reinigungserfolgs in einem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel und in einer Western Blot-Analyse (Kap. 3.4.10) untersucht. Bei analytischen Detergenzkonzentrationsscreenings mit Membranprotein-GFP-Fusionskonstrukten wurden In-Gel-Fluoreszenz-Analysen (Kap. 3.4.12) und Western Blot-Analysen (Kap. 3.4.10) durchgeführt. Fraktionen mit dem zu untersuchenden Membranprotein wurden vereinigt, konzentriert und mittels Größenausschlusschromatographie (Kap. 3.4.16) gereinigt.

3.4.6 Proteinreinigung durch Dialyse

Nach Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie (Kap. 3.4.5) wurden niedermolekulare Bestandteile wie z. B. Imidazol mittels Dialyse entfernt. Für die Reinigung von MSP1E3D1 und MSP2N2 wurden die MSP-enthaltenen IMAC-Fraktionen zusammengegeben und eine Glycerolkonzentration von 10 % (v/v) eingestellt. Dialysiert wurde bei einem MWCO von 14 kDa gegen einen 300-fachen Überschuss an MSP-Puffer F für 3 h bei 4 °C und nochmals gegen frischen MSP-Puffer F über Nacht bei 4 °C. Entstandenes Präzipitat wurde durch Zentrifugation (18.000 g, 30 min, 4 °C) entfernt und im Überstand eine Proteinkonzentration von 80-160 µM eingestellt. Aliquots von gereinigtem MSP1E3D1 und MSP2N2 wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.4.7 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung von Gesamtproteinkonzentrationen wurde mittels der Bradford-Methode durchgeführt (Bradford, 1976). Nach Bindung des Coomassie-Farbstoffs an kationische und aromatische Aminosäuren und einem daraus resultierenden Shift der Wellenlänge des Absorptionsmaximums konnte die Proteinkonzentration anhand einer BSA-Kalibriergeraden im Konzentrationsbereich von 1-14 µg/ml bestimmt werden. Proteinproben wurden mit ddH₂O auf 800 µl verdünnt und mit 200 µl Bradford-Reagenz (Bardford Protein-Assay) versetzt. Es wurde für 5 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm gegen einen Pufferleerwert bestimmt.

3.4.8 Dichtegradientenzentrifugation

Zur Überprüfung der Rekonstitution von Proteinen in Liposomen wurde eine Dichtegradientenzentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten durchgeführt. Dazu wurde in Zentrifugentubes (Ultra-Clear) zunächst 350 µl des 60 % (m/v) Saccharose-haltigen Dichtegradientenpuffers mit dem gleichen Volumen an Liposomensuspension durchmischt. In die Zentrifugentubes wurden dann die 25 %, 20 %, 15 %, 5 % und 0 % Saccharose enthaltenen Layer geschichtet, indem 700 µl der entsprechenden Saccharose-haltigen Dichtegradientenpuffer tropfenweise auf ein Korkstück gegeben wurden.

Die so präparierten Zentrifugentubes mit Saccharosegradienten und Liposomenprobe wurden dann im Swinging-Rotor SW60 Ti zentrifugiert (164.000 g, 6 h, 4 °C) und anschließend die einzelnen Schichten des Saccharosegradienten vorsichtig abgenommen. Die isolierten Dichtefraktionen wurden bis zur TCA-Proteinfällung (Kap. 3.4.9) und anschließender SDS-PAGE (Kap. 3.4.10) bei 4 °C gelagert.

3.4.9 Proteinfällung mit Trichloressigsäure

Zur Konzentrierung von Proteinen und Liposomenproben vor der SDS-PAGE-Analyse (Kap. 3.4.10) wurden diese mit Trichloressigsäure (TCA) präzipitiert und anschließend in 1x PBS-Puffer aufgenommen. Dazu wurden vier Volumenteile Proteinlösung mit einem Volumenteil einer frisch angesetzten 100 % (m/v) TCA-Lösung versetzt und 30 min bei 4 °C inkubiert. Die durch den Wasserentzug und den hydrophoben Effekt präzipitierten Proteine wurden durch Zentrifugation (12.000 g, 10 min, 4 °C) pelletiert und anschließend dreimal mit 875 µl eiskaltem Aceton gewaschen (5 min Inkubation auf Eis, dann Zentrifugation (12.000 g, 10 min, 4 °C)). Zur vollständigen Entfernung des Acetons wurde das Pellet im Heizblock für 5 min bei 70 °C getrocknet und die Proteine anschließend in 20 µl 1x PBS-Puffer aufgenommen und für 1 h auf Eis inkubiert.

3.4.10 SDS-PAGE, Coomassie-Färbung und Western Blot-Analyse

Die Größenauftrennung von Proteingemischen im elektrischen Feld in einem Polyacrylamidgel geschah nach Denaturierung der Proteine und Homogenisierung der Proteinladung mit dem anionischen Detergenz SDS. Dazu wurden die Proteinproben mit 4x SDS-Ladepuffer versetzt und für 30 min bei 37 °C oder für 20 min bei 60 °C denaturiert. Mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgte die Größentrennung der denaturierten Proteine in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel im elektrischen Feld bei 160 V (15 min, Sammelphase) und 200 V (ca. 1 h, Trennphase). Dazu wurden selbstgegossene 5 %-ige Sammelgele und 10,0-12,5 %-ige Trenngele mit einer Größe von 9 cm x 6,5 cm verwendet, die mit einer gebrauchsfertigen Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (Rotiphorese Gel 40) und den entsprechenden Sammelgel- und Trenngelpuffern polymerisiert wurden. 5-20 µl der Proteinproben und 5 µl eines Proteingrößenmarkers wurden pro Geltasche aufgetragen.

Für die Coomassie-Färbung wurde das isolierte Trenngel für mindestens 2 h oder über Nacht mit Rotiphorese Blau R-Färbelösung unter Schütteln bei RT inkubiert. Am Folgetag wurde das komplett gefärbte Trenngel mit Entfärbelösung für etwa 2 h unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung bis zum Erscheinen von Proteinbanden entfärbt. Zur Verbesserung der Bandenschärfe wurde das Trenngel vor der Bildaufnahme für einige Stunden in Wasser bei RT geschüttelt. Die Coomassie-gefärbten Gelbilder wurden an einem handelsüblichen Scanner aufgenommen.

Zur spezifischen Detektion von Zielproteinen wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Das nach der SDS-PAGE isolierte Trenngel wurde in Transferpuffer auf eine mit Methanol aktivierte PVDF-Membran überführt und die Proteine bei 17 V für 30-45 min übertragen. Als Beladungskontrolle wurde die PVDF-Membran mit Ponceau-Färbelösung für 10 min unter Schütteln bei RT gefärbt und zur Visualisierung von Proteinbanden mit ddH₂O entfärbt. Die freien Bindestellen der PVDF-Membran wurden durch Inkubation mit M-TBST-Puffer geblockt (1 h, RT, leichtes Schütteln). Zur Detektion von Proteinen oder Affinitätstags wurde der entsprechende Primärantikörper in der unter Kap. 2.3 angegebenen Konzentration in M-TBST-Puffer hinzugegeben und bei 4 °C für 2 h oder über Nacht unter leichtem Schütteln

inkubiert. Anschließend wurde die PVDF-Membran dreimal mit TBST-Puffer für jeweils 15 min unter leichtem Schütteln gewaschen. Nach Inkubation mit dem gegen den entsprechenden Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper (Kap. 2.3) für 1 h bei RT unter leichtem Schütteln wurde erneut dreimal mit TBST-Puffer gewaschen. Zur Erzeugung von Chemilumineszenzsignalen durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte Peroxidase wurden 1 ml vorgemischte ECL-Reagenzien auf die PVDF-Membran gegeben. Die Detektion erfolgte umgehend am Chemilumineszenz-Imager bei einer Belichtungszeit von ≤ 30 min.

3.4.11 Blue-Native PAGE

Mittels Blue-Native PAGE (BN-PAGE) wurden Proteine im nativen Zustand nach Größe und Ladung getrennt, um den Oligomerisierungszustand und die Masse von nativen Proteinen und Proteinkomplexen zu ermitteln (Schägger & von Jagow, 1991; Wittig et al., 2006). Für die Blue-Native PAGE wurden die Proteinproben mit 4x BN-Ladepuffer sowie 0,05-0,5 % (m/v) Coomassie G-250 versetzt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Trennung erfolgte in einem kommerziellen NativePAGE-Gradientengel (4 %-16 %) bei 4 °C für 1 h bei 100 V und anschließend für 3-6 h bei 200 V. Das Fließmittelreservoir an der Anode wurde mit BN-Anodenpuffer und an der Kathode mit BN-Kathodenpuffer befüllt. Zur Einschätzung der Größe der Proteinkomplexe wurde neben den Proteinproben als Referenz je 5 µl Milchpulverlösung (30 mg/ml, enthält Caseine (etwa 20-25 kDa)) und BSA-Lösung (10 mg/ml, etwa 66 kDa (Monomer)) aufgetragen. Nach Beendigung des Laufes wurden die Proteine in 40 % (v/v) Ethanol mit 10 % (v/v) Essigsäure nach kurzem Köcheln in der Mikrowelle unter Schütteln für etwa 10 min fixiert. Die Entfärbung geschah durch Schütteln in 10 % (v/v) Essigsäure für 30-90 min. Zur nachträglichen Durchführung einer Western Blot-Analyse wurde das entfärbte Gradientengel für 1 h bei RT in SDS-haltigem BN-Inkubationspuffer geschüttelt. Die Proteinproben wurden unter Verwendung von BN-Transferpuffer für 1 h bei 10 V auf eine PVDF-Membran geblottet, die PVDF-Membran anschließend für 1 min in 100 % (v/v) Methanol entfärbt und zur Detektion von Proteinen wie bei Western Blot-Analyse nach SDS-PAGE (Kap. 3.4.10) verfahren.

3.4.12 In-Gel-Fluoreszenz-Analyse

Zur Beurteilung der erfolgreichen zellfreien Proteinsynthese und der korrekten Faltung von GFP bzw. Membranprotein-GFP-Fusionskonstrukten wurde die Fluoreszenz in SDS-PAGE-Gelen analysiert. GFP diente als Proteinfaltungsindikator, da fluoreszierendes GFP einen Hinweis auf eine korrekte Proteinfaltung von zellfrei hergestellten Proteinen anzeigen kann (Müller-Lucks et al., 2012). Die korrekte β -Barrel-Tertiärstruktur und die vollständige Ausbildung des Fluorophors (Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷) ist dabei Bedingung für die Fluoreszenz. Im denaturierten oder fehlgefalteten GFP ohne β -Barrel-Struktur wird die Fluoreszenz dabei durch umliegende Wassermoleküle gequencht (Enoki et al., 2004). Die GFP-Fluoreszenz ist aufgrund der durch kovalente Bindungen erzeugten Stabilität des Fluorophors auch unter denaturierenden Bedingungen detektierbar (Müller-Lucks et al., 2012) und konnte daher direkt im SDS-PAGE-Gel bei 477 nm angeregt werden (In-Gel-Fluoreszenz-Analyse). Nachfolgend konnte mit dem selben SDS-PAGE-Gel eine Western Blot-Analyse (Kap. 3.4.10) durchgeführt werden.

3.4.13 Assemblierung von leeren Lipid-Protein-Nanodiscs

Die Herstellung und Präparation von leeren Nanodiscs (ND) geschah abgewandelt nach dem Protokoll von Rues et al. (2017) mit den MSP-Proteinen MSP1E3D1 und MSP2N2. Als Lipidanteil für den Lipid-bilayer wurden dazu die anionischen Lipide 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (DOPG) und 1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylglycerol (POPG) sowie kommerzielle aus *E. coli* extrahierte polare Lipide (EcpI) eingesetzt. Es wurden entsprechende Lipid-Natriumcholat-Stammlösungen (50 mM Lipid, 200 mM Natriumcholat) in ND-A-Puffer hergestellt und diese zusammen mit dem gereinigten MSP1E3D1- und MSP2N2-Protein und einer 10 % (m/v)-Dodecylphosphocholin (DPC)-Stammlösung für die Nanodisc-Assemblierungsansätze (Tab. 3.9) verwendet. Es wurde sich an den von Rues et al. (2017) empfohlenen molaren Lipid-MSP1E3D1-Verhältnissen orientiert und Assemblierungsansätze von 3-12 ml angesetzt. Für Lipid-MSP2N2-Nanodiscs wurde ein optimales Lipid-MSP-Verhältnis angelehnt an Grinkova et al. (2010) empirisch gesucht. Die vorbereiteten Assemblierungsansätze wurden 1,5 h auf einem Rotator bei RT gemischt und in eine Slide-A-Lyzer-Dialysekassette (MWCO 10 kDa) überführt. Die Selbstassemblierung von Nanodiscs geschah durch vollständige Entfernung des Natriumcholats während der exzessiven Dialyse gegen ND-A-Puffer für insgesamt 48 h. Es wurde gegen einen 300-fachen Überschuss an ND-A-Puffer dialysiert und der ND-A-Puffer währenddessen mindestens zweimal gewechselt. Durch Zentrifugation (22000 g, 30 min, 4 °C) wurde Präzipitat entfernt und der die Nanodiscs enthaltene Zentrifugationsüberstand auf ein Volumen von 300-400 µl konzentriert (Amicon Ultra-4 (30 kDa), 6000 g, 4 °C). Die Reinigung von in dem Konzentrat vorhandenen Nanodiscs geschah mit einer Superdex 200 10/300 GL-Säule mittels Größenausschlusschromatographie (SEC, Kap. 3.4.16).

Tab. 3.9: Konzentrationsangaben für Assemblierungsansätze von leeren Nanodiscs. Die angegebenen molaren Lipid-MSP-Verhältnisse ($n_{\text{Lipid}}/n_{\text{MSP}}$) entsprechen für MSP1E3D1 den Empfehlungen aus Rues et al. (2017) und sind für MSP2N2 empirisch angenähert über Grinkova et al. (2010).

	DOPG-MSP1E3D1-ND	POPG-MSP1E3D1-ND	DOPG-MSP2N2-ND
$n_{\text{Lipid}}/n_{\text{MSP}}$	80	90	220
c_{Lipid}	6,4 mM	7,2 mM	17,6 mM
c_{MSP}	80 µM	80 µM	80 µM
c_{DPC}	0,1 % (m/v)	0,1 % (m/v)	0,1 % (m/v)

3.4.14 Posttranslationale Rekonstitution von Membranproteinen in Nanodiscs

Zur posttranslationalen Rekonstitution von Membranproteinen in Nanodiscs wurden die mit einem Detergenz solubilisierten Membranproteine in einem spezifischen Verhältnis mit MSP-Proteinen und Lipiden vereinigt, sodass sich die Nanodiscs während Entfernung des Detergenz über Dialyse um das bereits vollständig hergestellte Membranprotein bildeten. Dazu wurde stets ein molares PfFNTG107S-MSP-Verhältnis von 1:2,5 verwendet und die Lipid-Konzentration im Vergleich zu den leeren Nanodiscs verringert (vgl. Kap. 3.4.13), um die durch das Membranprotein eingenommenen Fläche während der Assemblierung zu berücksichtigen. In dieser Arbeit wurde zur posttranslationalen Rekonstitution gereinigtes und mit 0,05 % (m/v) Brij78 solubilisiertes PfFNTG107S verwendet, welches mittels präparativer zellfreier Proteinsynthese (Kap. 3.3.5) hergestellt wurde. In Tab. 3.10 sind einige der getesteten Ver-

hältnisse angegeben. Zunächst wurden die Komponenten durch Rotation für 1 h bei RT gemischt und nachfolgend zur Assemblierung in einer Slide-A-Lyzer-Dialysekassette (MWCO 10 kDa) bei 4 °C gegen 500 ml ND-A-Puffer dialysiert und der ND-A-Puffer zweimal gewechselt. Zur initialen Überprüfung der Rekonstitution wurde eine Größenausschlusschromatographie (SEC, Kap. 3.4.16) durchgeführt.

Tab. 3.10: Konzentrationsangaben für die posttranslationale Rekonstitution von PfFNTG107S in Nanodiscs. Die angegebenen Konzentrationen von PfFNTG107S beziehen sich auf das Pentamer und es wurde ein molares PfFNTG107S-MSP-Verhältnis von 1:2,5 eingesetzt.

	DOPG-MSP1E3D1-ND	Ecpl-MSP1E3D1-ND	Ecpl-MSP2N2-ND
C _{PfFNTG107S}	22 µM	5 µM	5 µM
C _{Lipid}	1,3 mM	0,35 mM	3 mM
C _{MSP}	55 µM	12,5 µM	12,5 µM
C _{DPC}	0,1 % (m/v)	0,1 % (m/v)	0,1 % (m/v)

3.4.15 Konzentrationsbestimmung von Nanodiscs

Bei bekanntem molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ_{280}) kann über Absorptionsmessungen bei einer Wellenlänge von 280 nm nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die Proteinkonzentration bestimmt werden. Die Nanodiskonzentration wurde aus der MSP-Proteinkonzentration unter der Annahme erhalten, dass aus einem Mol MSP1E3D1 bzw. MSP2N2 ein halbes Mol Nanodiscs gebildet wird. Für MSP1E3D1 wurde ein molarer Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{280, \text{MSP1E3D1}} = 27.310 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Roos et al., 2012) und für MSP2N2 von $\epsilon_{280, \text{MSP2N2}} = 39.980 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ eingesetzt.

3.4.16 Größenausschlusschromatographie

Zur weiteren Reinigung von mittels Affinitätschromatographie (Kap. 3.4.5) gereinigten Proteinproben sowie zur Homogenitätsanalyse von assemblierten Nanodiscs und Protein-Nanodisc-Komplexen wurde eine Größenausschlusschromatographie (SEC) am ÄKTApurifier mit präparativer Superdex 200 10/30 GL-Säule durchgeführt. Die Chromatographiesäule und der Fraktionssammler wurden auf 4 °C gekühlt. Vor Probeninjektion wurde die Chromatographiesäule mit zwei Säulenvolumina (CV) des entsprechenden SEC-Reinigungspuffers äquilibriert und die auf 100-400 µl konzentrierte Proteinprobe (Amicon Ultra-4 (30 kDa oder 100 kDa), 6000 g, 4 °C) zur Entfernung von Aggregaten zentrifugiert (10.000 g, 10 min, 4 °C). Von den Zentrifugationsüberständen wurden 100-400 µl der Probe in das SEC-System injiziert. Nach Injektion wurde die Flussrate auf 0,35-0,5 ml/min eingestellt und SEC-Fractionen mit einem Fraktionierungsvolumen von 500 µl aufgefangen. Die Detektion von Proteinen erfolgte bei 280 nm und von Fusionsproteinen mit C-terminalem GFP-Fluoreszenztag zusätzlich bei der GFP-Absorptionswellenlänge von 395 nm.

3.4.17 Circular dichroismus-Spektroskopie

Mittels Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie können relevante Informationen über Sekundärstrukturen von Proteinen und Nukleinsäuren erhalten werden. Moleküle mit chiralem Zentrum oder (Makro-) Moleküle mit dreidimensionaler Struktur, die eine chirale Umgebung erzeugt, absorbieren linksdrehend und rechtsdrehend zirkulär polarisiertes Licht unterschiedlich stark (Miles & Wallace, 2016). In Peptiden und Proteinen mit asymmetrischen Sekundärstrukturelementen lassen sich aus den unterschiedlichen

optischen Eigenschaften von α -helikalen Bereichen und β -Faltblättern Informationen über die Proteinssekundärstruktur und über den Faltungszustand des Proteins ableiten. CD-spektroskopische Untersuchungen wurden am Jasco J-720-Spectropolarimeter in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Grötzinger am Biochemischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Die Proben mit einer Proteinkonzentration von 100-150 $\mu\text{g/ml}$ wurden gegen den entsprechenden Reinigungs- bzw. Lagerungspuffer bei Raumtemperatur vermessen. Spektren wurden in einem Messbereich von 200-250 nm und bei einer spektralen Bandbreite von 2 nm aufgenommen. Jeweils drei Spektren bei einer Messgeschwindigkeit von 5 nm/min wurden gemittelt und die jeweiligen Pufferspektren subtrahiert. Aus den gemessenen Werten wurde die mittlere molare Elliptizität $[\theta]_{\text{MRW}}$ berechnet, indem die Elliptizität auf das Molekulargewicht und die Anzahl der Peptidbindungen des Proteins normiert wurde.

3.4.18 Dynamische Lichtstreuung

Mittels der dynamischen Lichtstreuung (DLS) können der hydrodynamische Radius und die Größenverteilung von kleinen Partikeln in einer Lösung oder einer Suspension bestimmt werden. Dazu wird die Probe mit Licht eines monochromatischen Lasers bestrahlt und das an den Partikeln der Probe gestreute Licht abhängig vom Streuwinkel detektiert. Da sich Partikel über Brownsche Molekularbewegung randomisiert und relativ zum Detektor sowie zu anderen Partikeln bewegen, kommt es zur Interferenz des gestreuten Lichts. Die dadurch erzeugten Interferenzmuster führen zu einer Fluktuation der Streulichtintensität bei definiertem Streuwinkel, da an verschiedenen Streuzentren gestreute Lichtstrahlen in Abhängigkeit von ihrer Weglängendifferenz interferieren. Diese Intensitätsfluktuationen werden im zeitlichen Verlauf aufgenommen. Die Auswertung erfolgt über eine normierte Intensitäts-Autokorrelationsfunktion, die die Selbstähnlichkeit der Intensitätsfluktuationen in Abhängigkeit vom relativen zeitlichen Abstand beschreibt und damit angibt, wie Intensitätswerte über den Funktionsverlauf miteinander korrelieren. Es wird abhängig von der Größe des betrachteten Partikels ein monoexponentieller Abfall der Autokorrelationsfunktion erhalten, der später eintritt, wenn größere Partikel zu langsameren Intensitätsfluktuationen führen. Je steiler der exponentielle Abfall zudem ist, desto monodisperser sind die streuenden Partikel. Aus dem exponentiellen Abfall bei einer hochverdünnten Lösung oder Suspension und angenommenen kugelförmigen, monodispersen Teilchen kann der Selbstdiffusionskoeffizient D_S des Partikels und damit über die Stokes-Einstein-Beziehung (2) bei Kenntnis der Viskosität des Lösungsmittels η und der absoluten Temperatur T der hydrodynamische Radius r_H bestimmt werden.

$$D_S = \frac{k_B \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r_H} \quad (2)$$

DLS-Messungen wurden am Zetasizer NanoS unter Anleitung von Dr. Christina Hopf in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Axel Scheidig am Zoologischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. 100 μl einer Probe mit einer Proteinkonzentration von 1-5 mg/ml in dem entsprechenden Detergenz-haltigen Protein-Reinigungspuffer wurden in UV-Mikroküvetten vermessen. Zur Analyse des Schmelzpunktes wurden Proteinproben im Reinigungspuffer mit einer Geschwindigkeit von 1 $^{\circ}\text{C/min}$ erhitzt und der z-Average-Durchmesser als Maß für die nach der Intensität gewichteten Partikelgröße verfolgt. Während der Proteinfaltung stieg der hydrodynamische Radius der Proteine sprunghaft an, wobei der Beginn dieses Anstiegs als Schmelztemperatur des Proteins definiert wurde.

3.4.19 Transmissionselektronenmikroskopie mit Negativkontrastierung

Mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) und Negativkontrastierung können Proteinproben untersucht und u. a. Oligomerisierungszustände der Proteine bestimmt werden. Aufnahmen am Transmissionselektronenmikroskop und die anschließenden Bildanalysen wurden von PD Dr. Philipp Arnold am Anatomischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel durchgeführt. Nanodisc- und Proteinproben wurden nach Arnold et al. (2014) auf *Continuous Carbon Grids* aufgebracht, die in Plasma hydrophilisiert wurden. Die überschüssige Probenlösung wurde abgesaugt und zur Schweratom-Negativkontrastierung 1 % (m/v) Uranylacetat hinzugefügt. Das präparierte *Continuous Carbon Grid* wurde nach Trocknung in das JOEL JEM-1400 Plus Elektronenmikroskop (Beschleunigungsspannung von 100 kV) eingeführt. Die Bildaufnahme geschah mit einer TVIPS F416-Digitalkamera bei 50.000-facher Vergrößerung (2048 x 2048 Pixel). Mithilfe der EMAN2-Bildverarbeitungssoftware (Tang et al., 2007) wurden die Bilder prozessiert und Einzelpartikel selektiert. Die Einzelpartikel wurden nach Struktur und Orientierung in Klassen eingeteilt und die Partikel einer Klasse zu referenzfreien 2D-Klassensummen verrechnet. Durch die Summierung der Einzelbilder unter Mittelung der Hintergrundsignale kam es zu einer deutlichen Kontrasterhöhung. Die Bilder der 2D-Klassensummen enthielten 128 x 128 Pixel bei einer Kantenlänge von 4,58 Å pro Pixel.

3.4.20 Cryo-Elektronenmikroskopie

Die Cryo-Elektronenmikroskopie (Cryo-EM) stellt eine mächtige Methode zur hochauflösenden Strukturaufklärung u. a. von Proteinen dar. Vor allem für die Strukturaufklärung von Membranproteinen gewinnt die Methode zur Einzelpartikelanalyse von vitrifizierten Proteinproben durch Weiterentwicklung von Präparationsmethoden und Datenverarbeitung immer weiter an Bedeutung. Die in dieser Arbeit angestellten Strukturuntersuchungen mittels Cryo-EM wurden zusammen mit Jan-Hannes Schäfer in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Arne Möller am Biologischen Institut der Universität Osnabrück durchgeführt. Mittels Größenausschlusschromatographie gereinigte Proteinproben wurden vor der Analyse mittels Cryo-EM zur Pelletierung von Aggregaten zentrifugiert (22.000 g, 30 min, 4 °C). Die Probenvorbereitung geschah nach dem von Janulien & Moeller (2021) publizierten Protokoll. Für die Cryo-EM wurden *Holey Carbon Grids* CF 1.2/1.3 200 verwendet und diese vor Verwendung mittels Glimmentladung für 45 s bei 15 mA hydrophilisiert (PELCO easiGlow). Es wurden 3 µl der Proteinproben mit einer Konzentration von 1,5-7 mg/ml (Detergenz) bzw. 0,7-2,2 mg/ml (Nanodiscs) aufgetragen und die Vitrifizierung mithilfe des Vitrobot Mark IV (Thermo Fischer) bei 100 % Luftfeuchtigkeit und 4 °C durchgeführt. Initial wurde eine Blotkraft BF20 und eine Blotzeit von 6-8 s eingestellt und ggf. an die Eisdicke angepasst. Nach dem Blotten wurde das mit Probe beladene *Grid* automatisiert in flüssigem Ethan vitrifiziert und das vitrifizierte *Grid* in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur initialen Analyse wurde eine Einzelaufnahme am Glacios Cryo-TEM-Mikroskop (Thermo Fischer) bei einer Beschleunigungsspannung von 200 kV mittels Falcon 4 direct-Elektronendetektor (Thermo Fischer) aufgenommen und die Qualität und das eiskristallfreie Frieren überprüft sowie das Elektronenmikroskop adjustiert. Zur Aufnahme eines kompletten Datensatzes wurden im *Grid* 15-20 geeignete Quadrate ausgewählt und jeweils etwa 200 1,2 µm-Löcher pro Quadrat selektiert, sodass insgesamt 3000-4000 Einzelbilder bei einer Vergrößerung von 130.000x, einer kalibrierten Pixelgröße von 0,925 Å/Pixel und einer Elektronendosis von 50 e⁻/Å² aufgenommen wurden. Die Datenaufnahme geschah automatisiert mittels der EPU-Software bei einem Defokuswert von

–0,8 μm bis –2 μm . Die Datenprozessierung wurde von Jan-Hannes Schäfer durchgeführt und erfolgte wie bei Janulien & Moeller (2021) beschrieben bis zur Einordnung der Partikel in 2D-Klassensummen via CryoSPARC 3.3.1-Algorithmus (Punjani et al., 2017).

3.5 Funktionstestungen

3.5.1 Phänotypisches Wirkstoffscreening mittels Resazurin-Assay

FNT-Inhibitoren wurden über ein phänotypisches Wirkstoffscreening im *S. cerevisiae*-Hefesystem unter Verwendung des Redox- und Zellviabilitätsindikators Resazurin gesucht. Darüber hinaus wurde die Funktionalität der in den *S. cerevisiae*-Hefezellen exprimierten FNT-Transportproteine nachgewiesen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein phänotypisches Inhibitorscreening mit verschiedenen humanpathogenen FNT-Speziesvarianten durchgeführt, dessen grundlegendes Prinzip in Abb. 3.3 veranschaulicht ist. Resazurin ist ein tiefblauer Redoxfarbstoff, der in Gegenwart von Reduktionsäquivalenten wie NADH und NADPH zum pinkenen Resorufin und über eine nachgestellte Gleichgewichtsreaktion zu Dihydroresorufin reduziert wird (Twigg (1945), Abb. 3.3 A). Resazurin ist gut membrangängig und eignet sich damit als intrazellulärer Indikator für die metabolische Funktion und die Zellviabilität verschiedener Mikroorganismen. FNT-exprimierende *S. cerevisiae*-Zellen vom Stamm W303-1A $\Delta\text{jen1 } \Delta\text{ady2}$ wurden in Lactatmedium inkubiert, in dem L-Lactat die einzige Kohlenstoffquelle darstellt. Die endogenen Monocarboxylattransporter JEN1 und ADY2 von *S. cerevisiae* sind in diesem Hefestamm ausgeknockt. Ist das Lactattransportprotein FNT nicht inhibiert, wird Lactat über diesen aufgenommen und gelangt über einen möglichen Lactat/ H^+ -Symporter in die Mitochondrien (Passarella et al., 2008). Dort wird unter Metabolisierung des Lactats NADH generiert, welches zur Reduktion des Resazurins zu Resorufin/Dihydroresorufin und damit zu einer Farbveränderung führt (Abb. 3.3 B). Bei vollständiger Inhibition

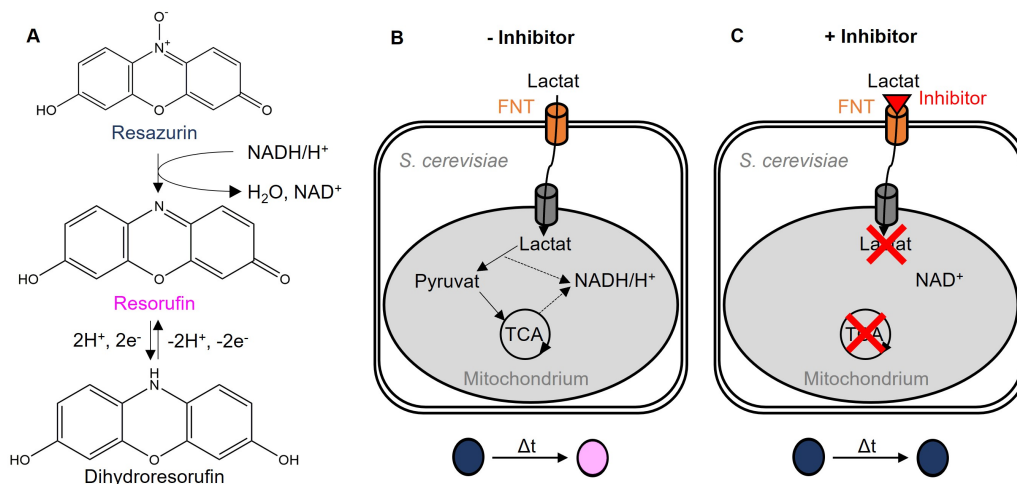


Abb. 3.3: Prinzip des phänotypischen Wirkstoffscreenings mit Resazurin-Redoxindikator. **A** Tiefblaues Resazurin wird in Gegenwart der Reduktionsäquivalente NADH oder NADPH zu pinkfarbenen Resorufin reduziert, welches im Gleichgewicht mit farblosen Dihydroresorufin steht. **B** In Abwesenheit eines FNT-Inhibitors wird Lactat über FNT in die *S. cerevisiae*-Zelle aufgenommen und gelangt über einen Transporter in die Mitochondrien. Durch enzymatische Oxidation zu Pyruvat und durch Umsatz im Citratzyklus wird NADH/H⁺ generiert. Dieses führt zur Reduktion des membrangängigen Resazurins und die damit einhergehende Farbveränderung in den Reaktionsräumen wird photometrisch verfolgt. **C** Wird der Lactatimport durch FNT-Inhibitoren vollständig unterbunden, kommt es zum Verlust des reduktiven Potentials und zum Absterben der Hefezellen. Resazurin wird aufgrund der fehlenden Reduktionsäquivalente nicht reduziert und es findet keine Farbveränderung in den Reaktionsräumen statt.

der FNT-Transportproteine kommt es hingegen zu keinem Lactateinstrom, wodurch das reduktive Potential der Zelle verloren geht und daraus der Zelltod resultiert. Durch fehlendes NADH findet zudem keine Reduktion des Resazurins und damit keine Farbveränderung statt (Abb. 3.3 C).

Das hier durchgeführte phänotypische Wirkstoffscreening ist an das von Dr. Anna Mäder in der Arbeitsgruppe etablierte Protokoll angelehnt (Meier, 2020). *S. cerevisiae*-Hefezellen vom Stamm W303-1A Δ jen1 Δ ady2 wurden nach Kap. 3.2.2 mit den entsprechenden pDRTXa-Konstrukten transformiert, die für die FNT-Speziesvarianten aus *Plasmodium falciparum* (PfFNT), *P. vivax* (PvFNT), *P. malariae* (PmFNT), *P. ovale* (PoFNT), *P. knowlesi* (PkFNT) und *P. berghei* (PbFNT) codierten. Jeweils eine einzelne Kolonie wurde von einer SD-AHLW-Agarplatte in 5 ml Lactatmedium überführt und diese Vorkultur bei 29 °C und 220 rpm inkubiert. Vor dem Start des phänotypischen Wirkstoffscreenings wurde aus dieser ersten Vorkultur eine frische Vorkultur in Lactatmedium mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angesetzt. Aus der frischen Vorkultur wurde pro 96-Well-Platte 30 ml Lactatmedium inklusive 0,03 mg/ml Resazurin inokuliert, sodass eine Start-OD₆₀₀ von 0,01 vorlag. In die Reaktionsräume der 96-Well-Platten wurden 3 µl der zu testenden und in DMSO gelösten Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen vorgelegt. Die Strukturformeln der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Substanzen sind im Anhang angegeben (Abb. 6.1). Auf jeder 96-Well-Platte wurden jeweils drei Negativkontrollen mit 1 % (v/v) DMSO und drei Positivkontrollen mit 1 mM MMV007839 (gelöst in DMSO) verwendet. 300 µl der Hefe-Resazurin-Suspension in Lactatmedium wurden in die Reaktionsräume gegeben und die 96-Well-Platten zur Verhinderung von Kreuzkontaminationen dicht mit Parafilm verschlossen. Die Inkubation erfolgte unter Schütteln auf einem *Microplate Shaker* bei 500 rpm und 29 °C. Nach 72 h wurde die Absorption von Resazurin bei einer Wellenlänge von 620 nm am *Microplate Reader* gemessen. Aus den gemittelten Absorptionswerten der DMSO-Negativkontrollen wurde der Wert für 100 % Zellviabilität und aus den gemittelten Absorptionswerten der MMV007839-Positivkontrollen der Wert für vollständige Inhibition (0 % Zellviabilität) definiert. Für jede FNT-Speziesvariante und jede Substanz wurde diejenige Substanzkonzentration als Inhibitions Grenzwert bestimmt, bei der die Zellviabilität nach der Normierung weniger als 50 % betrug. Für die drei potenten PfFNT-Inhibitoren MMV007839, BH267.meta und BH297 wurden bei Inhibition des PfFNT sigmoidale Kurven mittels der Hill-Funktion angepasst und EC₅₀-Werte anhand der gefitteten Kurven bestimmt (OriginLab Software). Das phänotypische Wirkstoffscreening wurde zur Bestätigung der ermittelten Inhibitions Grenzwerte mit jeweils zwei verschiedenen FNT-exprimierenden Klonen der FNT-Speziesvarianten durchgeführt.

3.5.2 Protoplastierung von Hefezellen

Für Streulichtmessungen an der Stopped-Flow-Apparatur (Kap. 3.5.4) wurde die Zellwand der Hefezellen durch die β -1,3-Glucanlaminaripentaohydrolase-Aktivität der Zymolyase anverdaut, um das Schrumpfen und Schwellen der entstandenen Hefeprotoplasten zu ermöglichen. Dazu wurden 50 ml *S. cerevisiae*- bzw. *P. pastoris*-Hefekulturen aus einer entsprechenden Vorkultur angesetzt und bis zu einer OD₆₀₀ von $1,0 \pm 0,1$ inkubiert. Bei *P. pastoris*-Kulturen wurde bei einer OD₆₀₀ von $0,4 \pm 0,1$ die FNT-Expression durch Wechsel auf BMMY-Medium induziert. Die Kulturen wurden in einem gewogenen Reaktionsgefäß durch Zentrifugation (2000 g, 5 min, 4 °C) geerntet, das Zellpellet auf Eis gehalten und mit 3 ml Protoplastenpuffer I gewaschen. Das trockene Pellet wurde gewogen, in 2 ml Protoplastenpuffer I resuspendiert und die Zellen bei 30 °C für 15 min bei 140 rpm geschüttelt. Zu der Zellsuspension wurden pro g Zellpellet 20 mg

Zymolyase (suspendiert zu 10 mg/ml in Protoplastenpuffer II) hinzugegeben und auf ein Volumen von 6 ml mit Protoplastenpuffer II aufgefüllt sowie 100 mg BSA dazugegeben. Die Protoplastierung erfolgte bei 30 °C für 60 min bei 140 rpm. Der Überstand nach anschließender Zentrifugation (2000 g, 5 min, 4 °C) wurde vorsichtig abgetrennt, die Protoplasten sehr vorsichtig in 5 ml Protoplastenpuffer III resuspendiert und nach erneuter Zentrifugation (2000 g, 5 min, 4 °C) das entstandene Pellet in 2 ml Protoplastenpuffer III resuspendiert. Die Protoplastensuspension wurde auf eine OD₆₀₀ von 2 bzw. 4 eingestellt und vor den Streulichtmessungen für eine Nacht bei 4 °C gelagert.

3.5.3 Herstellung von Proteoliposomen

25 mg in Chloroform suspendierte polare Lipide aus *E. coli* (Ecpl) wurden in ein Reagenzglas überführt und auf Eis unter Begasung mit Stickstoff getrocknet, bis sich ein gelblicher Lipidfilm am Reagenzglasboden bildete. Die Lipide wurden weiter in einem evakuierten Exsikkator für etwa 4 h getrocknet. Der getrocknete Lipidfilm wurde in 1 ml Liposomenpuffer mit zugesetztem β -Mercaptoethanol (2 mM) rehydratisiert und zur Verhinderung von Oxidationsreaktionen mit Stickstoff begast und mit einem Stopfen verschlossen und für 2 h bei RT inkubiert. Zum Hydratisieren des Lipidfilms wurde sehr vorsichtig gevortext und die Suspension für 10 min auf Eis inkubiert. Die entstandenen multilamellaren Liposomen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80 °C gelagert.

Zur Herstellung von unilamellaren Proteoliposomen wurden zunächst 5 mg Lipid enthaltene Lipidsuspension aufgetaut und mit 300 μ l Liposomenpuffer sowie mit 1,6 μ l 15 % (m/v) Brij78 bzw. 2,5 μ l 10 % (m/v) DDM versetzt. Die Suspension wurde in einem mit Stickstoff begasten und verschlossenen Reagenzglas im Ultraschallbad für 90 min bei RT inkubiert. Es wurde auf 1 ml mit Liposomenpuffer aufgefüllt, und das Volumen an Detergenz verdoppelt, sodass eine finale Detergenzkonzentration von 0,05 % (m/v) vorlag. Es wurde für 3 min in den Hotspots des Ultraschallbades bis zur Transluzenz der Suspension inkubiert. Das in dem Detergenz der Wahl solubilisierte Membranprotein wurde in einem molaren Lipid-zu-Protein-Verhältnis von 50:1 hinzugegeben, sehr vorsichtig für 3 s bei kleinster Stufe gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Kontrolle wurden Leerliposomen vorbereitet, bei denen in diesem Schritt kein Protein hinzugegeben wurde. Durch Zugabe von 25 ml detergenzfreiem Liposomenpuffer wurde die kritische Mizellenkonzentration (CMC) von Brij78 bzw. DDM unterschritten und das Membranprotein aus Detergenzmizellen und Detergenz-Lipid-Mischmizellen in die Liposomen überführt. Die entstandenen Proteoliposomen und Leerliposomen wurden durch Zentrifugation (140000 g, 45 min, 4 °C) im Pellet gesammelt und in 1 ml detergenzfreiem Liposomenpuffer resuspendiert. Zur Kontrolle der Rekonstitution des Membranproteins in die Liposomen wurde eine Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation (Kap. 3.4.8) durchgeführt. Zur Herstellung von unilamellaren Proteoliposomen und Leerliposomen mit homogener Liposomengröße wurde die Proben im Extruder (LiposoFast) 21 mal durch eine 0,2 μ m-Membran passagiert. Die Proteoliposomen und Leerliposomen wurden bis zur Verwendung für Streulichtmessungen (Kap. 3.5.4) bei 4 °C gelagert.

3.5.4 Streulichtmessungen mittels Stopped-Flow-Apparatur

Hefeprotoplasten (Kap. 3.5.2), Proteoliposomen (Kap. 3.5.3) sowie präparierte Post-Golgi-Vesikel aus *S. cerevisiae*-Zellen des Stamms NY17 (Kap. 3.4.2) wurden zur Überprüfung der Funktionalität des Transportproteins PfFNTG107S in Schwellungsassays an einer Stopped-Flow-Apparatur eingesetzt. Grundle-

gend hierbei ist das Schwellen und Schrumpfen der betrachteten Protoplasten bzw. Vesikel infolge des Wassereinstroms bzw. -ausstroms über die Lipidbilayermembran entlang eines osmotischen Gradienten, das zu einer größenabhängigen Änderung der Streulichtintensität führt (Abb. 3.4 A). Durch die Aufnahme von osmotisch aktiven Soluten wie Lactat oder Formiat durch funktionale Transportproteine kommt es zum passiven Einstrom von neutral geladenen Wassermolekülen über die Lipidbilayermembran und damit zum Anschwellen der Vesikel infolge des Soluteinstroms (Abb. 3.4 B).

Für hyperosmotische Messungen mit Protoplasten aus *S. cerevisiae* und *P. pastoris* wurde Protoplastenpuffer IV (enthält 0,6 M Na^+ -L-Lactat bzw. 0,6 M Na^+ -Formiat) verwendet. Es ergab sich bei einem Mischungsverhältnis von Protoplastensuspension zu Protoplastenpuffer IV von 1:1 ein Solutgradient von 0-0,3 M. Zur Inhibitionskontrolle wurde der PfFNT-Inhibitor BH267.meta in einer Konzentration von 1 μM jeweils 10 min vor der Messung zu den Protoplasten gegeben und die Suspension bis unmittelbar vor der Messung auf Eis gehalten. Proteoliposomen und Leerliposomen wurden in Liposomenpuffer bei einem pH-Wert von etwa 7 und einem resultierenden L-Lactatgradienten von 0-0,2 M vermessen. Post-Golgi-Vesikel wurden in Vesikelpuffer zu einer Membrankonzentration von 10 mg/ml aufgenommen und unmittelbar vor der Messung mittels fünfmaliger Passage durch eine 27 G-Kanüle homogenisiert und für 15 min bei RT temperiert. Die Messungen wurden gegen Vesikelpuffer mit 10 mM Na^+ -L-Lactat durchgeführt, sodass ein L-Lactatgradient von 0-5 mM vorlag. Sämtliche Streulichtmessungen wurden bei Raumtemperatur an einer Stopped-Flow-Apparatur wie in Abb. 3.4 C schematisch dargestellt durchgeführt. Jeweils eine Injektionsspritze wurde mit der Protoplastensuspension, den Proteoliposomen/Leerliposomen bzw. den Post-Golgi-Vesikeln und die andere Injektionsspritze mit dem entsprechenden solutbeinhaltenden Messpuffer beladen. Die Inhalte wurden in die entsprechenden Reservoirs überführt, aus denen während der Messungen computergesteuert ein jeweils definiertes Volumen (allgemein 150 μl im Mischungsverhältnis 1:1) in die Mischzelle gegeben wurde. Aus der Mischzelle wurde die Mischung mit einer Flussrate von 8 ml/s in eine Küvette geleitet, die von einer Quecksilber/Xenon-Lampe (100 W, Filter: 524 nm) bestrahlt wurde. Nach Durchlaufen der Küvette wurde ein Kontakt zum Trigger hergestellt und der Startpunkt der Datenerfassung (10 ms vor dem Stopp) definiert. Die Detektion des über den Photomultiplier 700-fach verstärkten Streulichtsignals (Ausgangsfiler: 300 μs) erfolgte bei einem Winkel von 90° zur Lichteinstrahlrichtung. Zum Verfolgen des Streulichtsignals wurden über 120 s 6001 Datenpunkte mit einem Sampling-Intervall von 20 ms aufgenommen. Nach Datenaufnahme wurde die Mischung aus der Küvette geleitet und eine neue Messung durch erneute Injektion aus den Reservoirs begonnen.

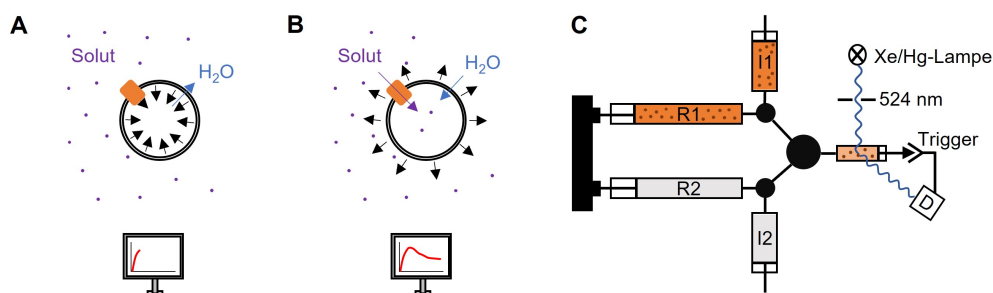


Abb. 3.4: Schematische Darstellung zum Prinzip des Schwellungsassays an der Stopped-Flow-Apparatur. **A** In einer hyperosmotischen Umgebung kommt es zunächst zu einem schnellen, passiven Wasserausstrom über die Lipidbilayermembran. Die Vesikelgröße nimmt ab und die Streulichtintensität zu. **B** Der über Transportproteine vermittelte Soluteinstrom führt zu einem Wassereinstrom. Die Vesikelgrößenzunahme resultiert in einem Abfall der Streulichtintensität. **C** Schematische Darstellung der Stopped-Flow-Apparatur. D, Detektor; I1 und I2, Injektionsspritzen; R, und R2, Reservoirs.

Zur Auswertung der Messergebnisse wurden neun Messkurven mit der BioKine-Software gemittelt, wobei zur Vergleichbarkeit der Kurven das Maximum zum Zeitpunkt der geringsten Partikelgröße auf den Wert von 1 V gesetzt wurde. Die normierten Kurven wurden einem biexponentiellen Fitting nach Gleichung (3) unterworfen. Dabei findet in der ersten Phase ein dominierender Wasserausstrom aus den Protoplasten, Liposomen oder Post-Golgi-Vesikeln in Richtung des steigenden osmotischen Gradienten statt, woraus ein Partikelschrumpfen und damit eine Vergrößerung des Streulichtsignals resultiert. In der zweiten Phase überwiegt der Wassereinstrom, der durch den Soluteinstrom entlang des chemischen Gradienten in die Partikel ausgelöst wird. Entsprechend nimmt das Streulichtsignal exponentiell bis zum Erreichen eines Gleichgewichtszustands ab. Die Werte für die Amplituden der Exponentialfunktion der ersten Wasserausstromphase (c_W) bzw. der zweiten Soluteinstromphase (c_S) und die jeweiligen Ratenkonstanten (k_W bzw. k_S) wurden dem jeweiligen Kurvenfit entnommen. Die Steigung a wurde beim Fitting gleich null gesetzt und b entsprach dem Intensitätswert, dem sich die Streulicht-Intensitätskurve im Gleichgewichtszustand annähert.

$$I(t) = a \cdot t + b - c_W \cdot e^{-k_W t} + c_S \cdot e^{-k_S t} \quad (3)$$

Wird die zweite Phase, die dem exponentiellen Abfall der Streulichtintensität infolge des Soluteinstroms entspricht, isoliert betrachtet und der entsprechende Exponentialterm einmalig differenziert, ergibt sich damit Gleichung (4), woraus die initiale Transportrate des Soluteinstroms (K_S) bei $t = 0$ nach Gleichung (5) bestimmt werden kann.

$$\frac{dI}{dt} = -k_S \cdot c_S \cdot e^{-k_S t} \quad (4)$$

$$K_S = |k_S \cdot c_S| \quad (5)$$

Zur besseren Vergleichbarkeit der Streulicht-Intensitätskurven wurde nicht die initiale Transportrate ausgewertet, sondern ein Wert für die Zeitkonstante τ herangezogen. Dieser τ -Wert entspricht dem Zeitpunkt, an dem der Abfall der Exponentialfunktion der Soluteinstromphase 63,2 % ($1 - e^{-1}$) der Amplitude beträgt und ist unabhängig von dem Amplitudenbetrag sowie mit besserer Reproduzierbarkeit zu bestimmen als die initiale Transportrate. Durch Lösen des zweiten Exponentialterms von Gleichung (3) nach τ wird mit diesem Zusammenhang ersichtlich, dass τ dem Kehrwert von k_S entspricht.

3.6 Bioinformatische Methoden

Aminosäuresequenzen von Proteinen wurden aus der NCBI-Proteindatenbank (Sayers et al., 2022) entnommen und Sequenzalignments mittels TeXshade (Beitz, 2000) dargestellt. Verfügbare Proteinstrukturen wurden aus der PDB (Berman et al., 2000) übernommen und in UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004) visualisiert. Zur Proteinstrukturvorhersage wurde der auf künstlicher Intelligenz basierende AlphaFold2-Algorithmus (Jumper et al., 2021) und die in UCSF ChimeraX (Pettersen et al., 2021) eingegebene Aminosäuresequenz eines PfFNTG107S-Protomers als Grundlage verwendet. Die Struktur wurde mittels der ColabFold-Software *via* Google Colaboratory berechnet (Mirdita et al., 2022) und die Strukturvorhersage anhand der ausgegebenen Konfidenzparameter validiert.

4 Ergebnisse

4.1 Produktion von funktionaler T7-RNA-Polymerase und S30-Zellextrakten

Die für die zellfreie Proteinsynthese benötigte T7-RNA-Polymerase wurde in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen exprimiert und in Zusammenarbeit mit Dr. Bastian Höger aus den Bakterienzellen extrahiert. Zur nachfolgenden Reinigung wurde eine Anionenaustausch-Affinitätschromatographie durchgeführt und die T7-RNA-Polymerase mit steigendem NaCl-Gradienten eluiert. Abb. 4.1 A zeigt die Western Blot-Analysen der Elutionsfraktionen und die Präsenz der T7-RNA-Polymerase durch Detektion mit einem spezifischen Antikörper. Pro NaCl-Konzentrationsstufe wurden fünf 12 ml-Fraktionen aufgefangen und die jeweils erste und dritte Fraktion der NaCl-Konzentrationsstufe auf ein SDS-PAGE-Gel aufgetragen. Die intensivsten Signale der der T7-RNA-Polymerase (98,9 kDa) zugeordneten Chemilumineszenzbanden sind ab 175 mM NaCl zu erkennen, sodass die entsprechenden 21 Fraktionen von 175 mM bis 275 mM NaCl gesammelt wurden. Analog zur hohen Bandenintensität deuteten auch A_{280} -Messungen darauf hin, dass zwischen 175 mM und 200 mM NaCl die größte Gesamtproteinmasse in dem gesammelten Konzentrationsbereich eluiert wurde. Nach Konzentrierung (30 kDa MWCO) auf ein Gesamtvolumen von etwa 15 ml und Dialyse wurde eine Gesamtproteinkonzentration von etwa 9 mg/ml bestimmt. Es wurde eine Aktivität der T7-RNA-Polymerase von 400 U/ μ l (Schwarz et al., 2007a) angenommen und ein Aktivitätsscreening mittels zellfreier Synthese von mNeonGreen durchgeführt (Abb. 4.1 B), wobei die hergestellte Charge mit einer über mehrere Jahre bei -80°C gelagerten T7-RNA-Polymerase-Charge verglichen wurde. Die fluoreszierenden Banden in der In-Gel-Fluoreszenz-Analyse zeigten die Herstellung von mNeonGreen an, wobei

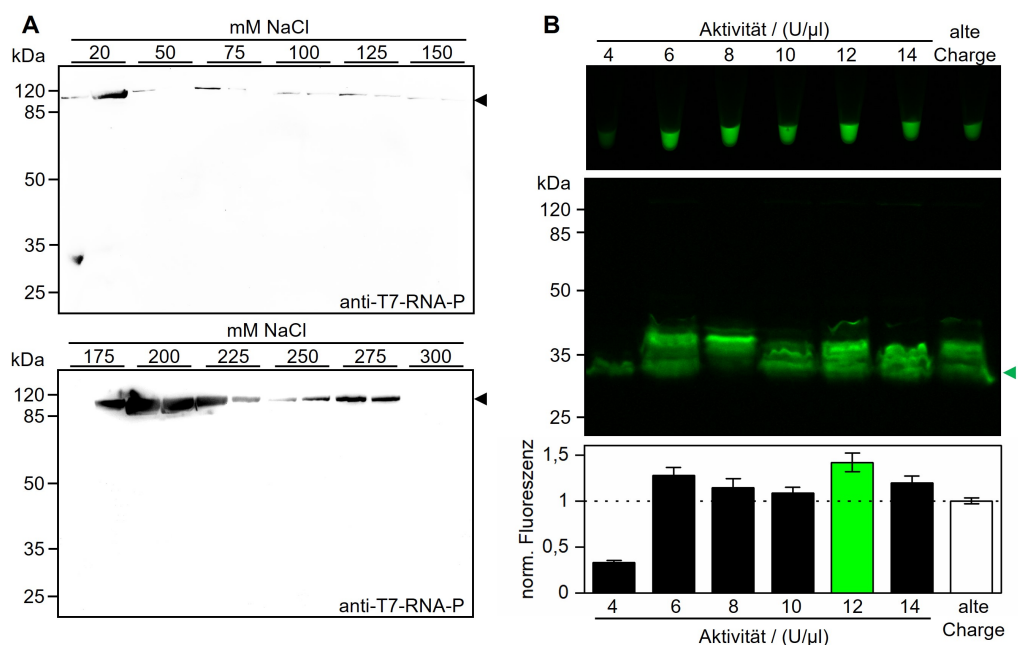


Abb. 4.1: Reinigung und Aktivitätstestung der extrahierten T7-RNA-Polymerase. **A** Western Blot-Analysen der Fraktionen der Anionenaustausch-Affinitätschromatographie mit Detektion der T7-RNA-Polymerase über einen spezifischen Antikörper (anti-T7-RNA-P). **B** Fluoreszenzanalysen zur Aktivitätsbestimmung der T7-RNA-Polymerase nach zellfreier Synthese von mNeonGreen. Belichtung der Reaktionsgefäße für 10 ms (oben) und des SDS-PAGE-Gels für 100 ms (In-Gel-Fluoreszenz-Analyse, unten). Aus der In-Gel-Fluoreszenz-Analyse bestimmte Fluoreszenzintensitäten wurden auf eine alte T7-RNA-Polymerase-Charge (12 U/ μ l) normiert. Die Fehlerbalken geben den SEM aus einer Doppelbestimmung an.

Mehrfachbanden aufgrund der nicht durchgeführten Affinitätsreinigung auftraten. Zwischen 6 U/ μ l und 14 U/ μ l und damit nahezu im gesamten getesteten Aktivitätsbereich konnten keine wesentlichen Schwankungen in der Fluoreszenzintensität des synthetisierten mNeonGreen festgestellt werden. Die Effizienz der hier isolierten T7-RNA-Polymerase war höher als die der älteren Charge, was auch mit der höheren Gesamtproteinkonzentration der aktuellen Charge erklärt werden könnte. Das Optimum lag bei einer eingesetzten Aktivität von 12 U/ μ l und einer relativen Fluoreszenzintensität von $1,4 \pm 0,1$ bezogen auf die ältere Charge. Die gewonnenen Aliquots dieser Charge ermöglichten mit der eingesetzten Aktivität von 12 U/ μ l etwa 700 präparative Ansätze der zellfreien Proteinsynthese.

Der S30-Zellextrakt wurde aus naiven *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen in Zusammenarbeit mit Dr. Bastian Höger und Moira Möller gewonnen. Abb. 4.2 A zeigt die OD₆₀₀-Wachstumskurve einer Fermenterkultur und Abb. 4.2 B die Sauerstoffsättigung als wichtigen In-Prozess-Parameter. Die Fermenterkultur zur S30-Zellextrakt-Charge CM33 wurde 186 min bis zu einer OD₆₀₀ von 3,1 inkubiert und befand sich zu diesem Zeitpunkt am Ende der exponentiellen Wachstumsphase mit einer Generationszeit von etwa 29 min. Nach Abkühlen der Fermenterkultur auf 8 °C innerhalb von 45 min wurde eine OD₆₀₀ von 3,7 gemessen. Die Sauerstoffsättigung lag während der frühen exponentiellen Wachstumsphase über 80 % und fiel zum Ende des Fermentationsprozesses auf 36 %, wodurch eine ausreichende Sauerstoffzufuhr während des Fermentationsprozesses angezeigt wurde. Nach Waschen des Zellpellets wurde eine Pelletfeuchtmasse von 30,6 g bestimmt. Final wurden etwa 18 ml des isolierten S30-Zellextrakts aliquotiert, was für etwa 50 präparative Zellfrei-Ansätze ausreichend war. Im Magnesiumkonzentrationscreening mit zellfreier GFP-Synthese wurde die S30-Zellextrakt-Charge mit einer älteren Charge verglichen (Abb. 4.2 C). Durch

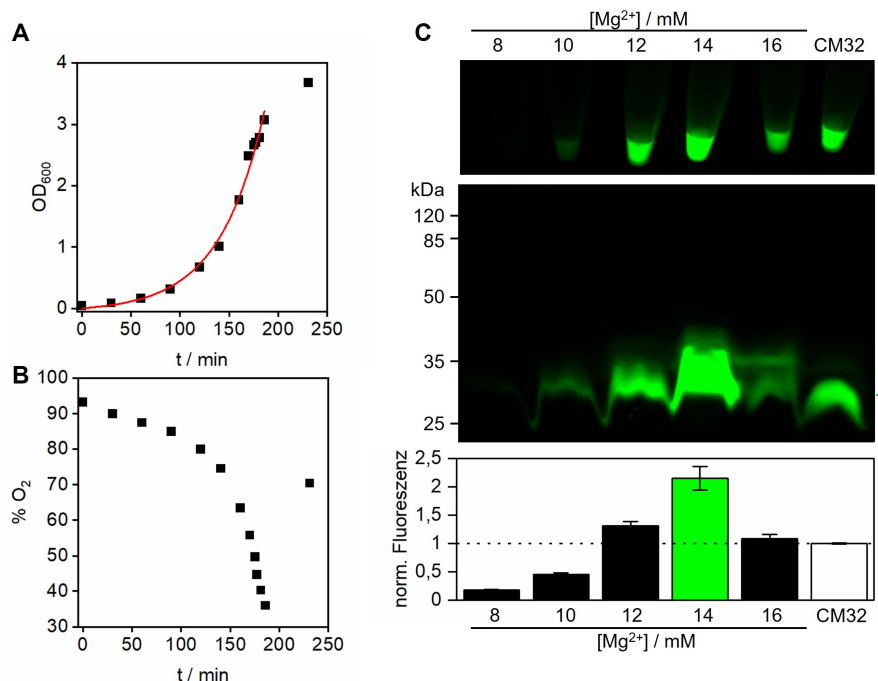


Abb. 4.2: Produktion und Aktivitätstestung der S30-Zellextrakt-Charge CM33. **A** OD₆₀₀-Wachstumskurve der *E. coli*-Fermenterkultur mit exponentiellem Kurvenfit (rot). **B** Sauerstoffsättigung der Fermenterkultur während des Fermentationsvorgangs. **C** Fluoreszenzanalysen zur Optimierung der einzusetzenden Magnesiumkonzentration durch zellfreie GFP-Synthese. Belichtung der Reaktionsgefäße für 10 ms (oben) und des SDS-PAGE-Gels für 100 ms (In-Gel-Fluoreszenz-Analyse, unten). Aus der In-Gel-Fluoreszenz-Analyse bestimmte Fluoreszenzintensitäten wurden auf die alte S30-Zellextrakt-Charge CM32 normiert. Die Fehlerbalken geben den SEM aus einer Doppelbestimmung an.

Analyse der Fluoreszenzintensitäten der Banden im SDS-PAGE-Gel wurde ein GFP-Syntheseoptimum bei einer Konzentration von 14 mM Mg^{2+} bestimmt. Bei dieser optimalen Magnesiumkonzentration wurde eine etwa 2,5-fach stärkere GFP-Fluoreszenzintensität als im Magnesiumkonzentrationsoptimum der älteren Charge bestimmt, was die hohe Qualität der hier extrahierten S30-Zellextrakt-Charge indiziert. Starke Schwankungen in den Fluoreszenzintensitäten zeigen die Wichtigkeit der Durchführung eines Magnesiumkonzentrationscreenings bei Gewinnung neuer S30-Zellextrakt-Chargen zur Gewährleistung guter Ausbeuten der zellfreien Proteinsynthese.

4.2 Mit Brij78 solubilisiertes PfFNTG107S wird in hohen Ausbeuten hergestellt

Durch die vorangegangenen Arbeiten von Dr. Sinja Bock (Bock, 2014), Dr. Annika Müller-Lucks (Müller-Lucks, 2012), Dr. Julia Holm-Bertelsen (Holm-Bertelsen, 2016) und Dr. Lea Petersen (Petersen, 2021) konnte bereits gezeigt werden, dass Brij78 ein geeignetes Detergenz für die zellfreie Synthese einiger Membranproteine ist und eine Brij78-Konzentration von 0,8-1,0 % (m/v) gute Membranproteinausbeuten ermöglicht. Auch für die zellfreie Proteinsynthese von EhFNT wurden mit Brij78 gute Proteinausbeuten erzielt und die FNT-Transportproteine mit Brij78 gereinigt und stabilisiert (Helmstetter et al., 2019). Im Rahmen dieser Arbeit wurden PfFNTG107S und andere PfFNT-Resistenzmutanten in präparativen Ansätzen der zellfreien Proteinsynthese in Gegenwart von 0,8 % (m/v) Brij78 hergestellt und im Folgenden mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Abb. 4.3 A zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel und die zugehörige Western Blot-Analyse der Fraktionen der Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie von zellfrei hergestelltem PfFNTG107S in Präsenz von 0,05 % (m/v) Brij78. PfFNTG107S wurde vor allem im Konzentrationsbereich von 40-300 mM Imidazol von der Säulenmatrix eluiert. Neben den PfFNTG107S-Monomeren entsprechenden Banden bei einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa wurden sowohl im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel als auch in der Western Blot-Analyse Banden für mögliche SDS-resistente PfFNTG107S-Dimere (ca. 68 kDa) und potenzielle höhere Oligomere detektiert (Abb. 4.3 A). In der Western Blot-Analyse war zudem eine intensive Chemilumineszenzbande entsprechend etwa des dreifachen Molekulargewichts eines PfFNTG107S-Monomers bei etwa 85 kDa zu erkennen, während möglicherweise PfFNTG107S-Pentameren entsprechende hochmolekulargewichtige Banden in der Durchflussfraktion detektiert wurden. Nach Vereinigung der IMAC-Fraktionen von 80-300 mM Imidazol und Konzentrierung (100 kDa MWCO) wurde eine Ausbeute an IMAC-gereinigten PfFNTG107S von $1,72 \pm 0,19$ mg erzielt, wobei die Ausbeuten von insgesamt fünf einzelnen präparativen Ansätzen mit je 1 ml Reaktionsmix gemittelt wurden. Zur weiteren Proteinreinigung und Homogenitätsanalyse wurde eine Größenausschlusschromatographie (SEC) durchgeführt. Die SEC-Chromatogramme der ersten Injektion der konzentrierten PfFNTG107S-Probe (Abb. 4.3 B) und der Reinjektion des Hauptpeaks A9-A10 mit der höchsten Intensität bei einem Elutionsvolumen von etwa 12 ml (Abb. 4.3 C) zeigten kaum hochmolekulare, einem Elutionsvolumen von 8-9 ml entsprechende Aggregate. Neben dem 12 ml-Hauptpeak A9-A10 lagen bei SEC-Durchführung mit 0,05 % (m/v) Brij78-haltigem Laufpuffer zusätzliche Absorptionssignale vor, die bei einem geringerem Elutionsvolumen von etwa 10 ml detektiert wurden und damit auf größere Proteinpartikel hindeuteten. Nach Sammeln und Konzentrieren (100 kDa MWCO) der dem Hauptpeak entsprechenden SEC-Fraktionen A9-A10 wurde eine aus fünf präparativen Zellfrei-Ansätzen gemittelte Ausbeute von $0,48 \pm 0,09$ mg mittels SEC gereinigtem PfFNTG107S erzielt. Zur Identifizierung der PfFNTG107S-beihaltenden SEC-Fraktionen wurden die den Absorptionssignalen entsprechen-

den Fraktionen der ersten SEC-Injektion in einer Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 4.3 D). Die intensivsten Chemilumineszenzsignale wurden in den dem Hauptpeak entsprechenden SEC-Fraktionen A9-A10 detektiert. Auch in den SEC-Fraktionen bei geringerem Elutionsvolumen wurde PfFNTG107S mit dem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper nachgewiesen. Neben den vermuteten PfFNTG107S-Monomer-Banden bei etwa 34 kDa wurden nur wenig intensive Chemilumineszenzsignale bei etwa 68 kDa in den SEC-Fraktionen A9-A10 detektiert, die dem Molekulargewicht von PfFNTG107S-Dimeren entsprechen.

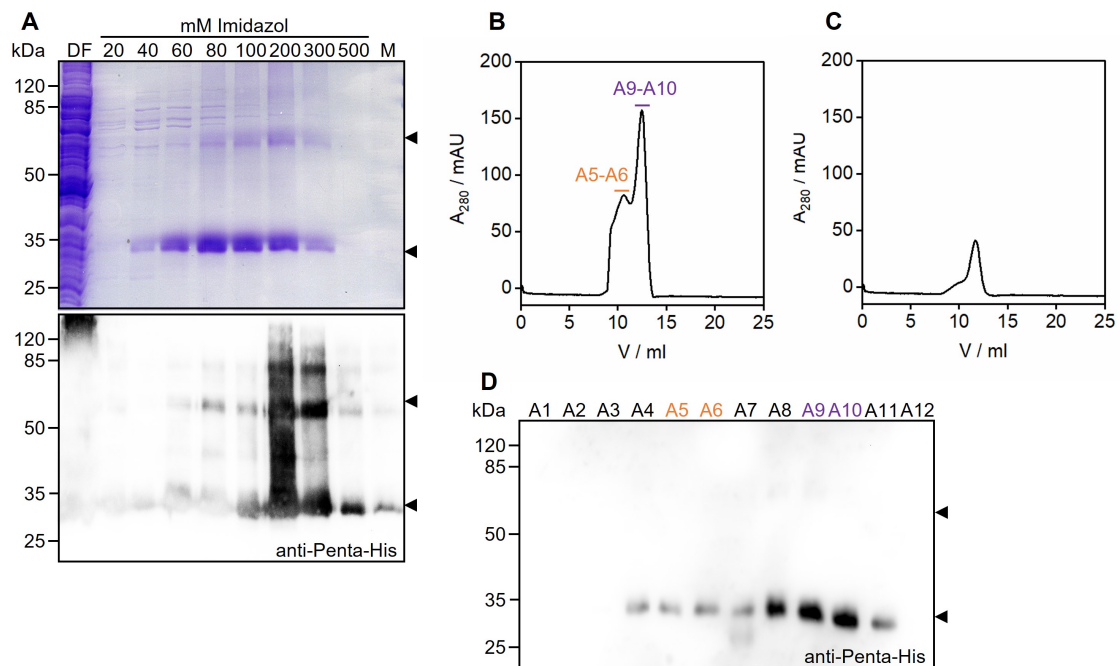


Abb. 4.3: Zellfreie Produktion von PfFNTG107S mit Brij78. **A** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel und Western Blot-Analyse der IMAC-Fraktionen und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper. Inkubation von 20 μ l der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C. DF, Durchfluss; M, Matrix. **B** SEC-Chromatogramm der ersten Injektion der konzentrierten PfFNTG107S-Probe mit 0,05 % (m/v) Brij78-haltigem Reinigungspuffer. **C** SEC-Chromatogramm der Reinjektion des Hauptpeaks A9-A10 der ersten Injektion mit 0,05 % (m/v) Brij78-haltigem Reinigungspuffer. **D** Western Blot-Analyse der SEC-Fraktionen der ersten Injektion mit 0,05 % (m/v) Brij78-haltigem Reinigungspuffer. Inkubation von 20 μ l der mit SDS versetzten SEC-Fraktionen bei 37 °C und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper.

Die dem Hauptpeak entsprechenden SEC-Fraktionen A9-A10 wurden vereint und nach Konzentrierung (100 kDa MWCO) mittels Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) mit Negativkontrastierung analysiert (Abb. 4.4 A). Es zeigte sich eine homogene Partikelgrößenverteilung ohne Proteinaggregate und die Partikel lagen vornehmlich in relativ zum *Grid* planarer Ausrichtung vor. Zur Untersuchung der Partikelgröße wurden die Durchmesser von etwa 200 Partikeln durch manuelles Ausmessen in der ImageJ-Software auf $8,4 \pm 0,4$ nm bestimmt. Die homogene Partikelgrößenverteilung und hohe Partikeldichte ermöglichten es, zur Kontrasterhöhung und Untersuchung des Oligomerisierungszustandes 2D-Klassensummen aus jeweils etwa 700 Einzelpartikeln zu generieren (Abb. 4.4 B). Die gezeigten Bilder der 2D-Klassensummen deuteten die Präsenz von möglichen PfFNTG107S-Pentameren mit einer Zentralpore an. Der in den Bildern der 2D-Klassensummen bestimmte Partikeldurchmesser von etwa 7-9 nm stimmte in etwa mit dem ermittelten Durchmesser eines PfFNT-Pentamers von etwa 8 nm überein (Peng et al., 2021). Allerdings war die Partikelgrößenbestimmung aufgrund der stark begrenzten Auflösung nur mit entsprechen-

der Ungenauigkeit möglich. Zudem konnte die in den gezeigten 2D-Klassensummenbildern angedeutete pentamere Partikelstruktur nicht durch weitere 2D-Klassensummenbilder bestätigt werden.

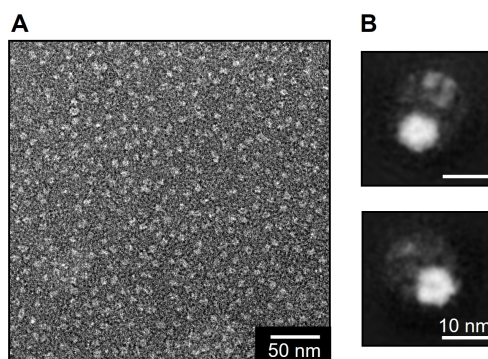


Abb. 4.4: Elektronenmikroskopische Untersuchung von mit Brij78 solubilisiertem PfFNTG107S. **A** TEM-Aufnahme mit Negativkontrastierung von mit Brij78 solubilisiertem PfFNTG107S (Skalierungsbalken: 50 nm). **B** Bilder von 2D-Klassensummen aus etwa 700 Einzelpartikeln von mit Brij78 solubilisiertem PfFNTG107S (Skalierungsbalken: 10 nm).

4.3 Detergenzaustausch zu LMNG und GDN für Cryo-EM von PfFNTG107S

Um hochauflösende Aufnahmen des zellfrei hergestellten PfFNTG107S *via* Cryo-Elektronenmikroskopie zu erhalten, sollte zunächst das Synthesedetergenz Brij78 durch ein für die Cryo-EM besser geeignetes Detergenz ersetzt werden. Hierfür boten sich das zur Strukturaufklärung von Membranproteinen weit verbreitete Detergenz LMNG sowie das immer häufiger verwendete Digitonin-Substitut GDN an. Beide Detergenzien wurden bereits für zahlreiche elektronenmikroskopische Untersuchungen von Membranproteinstrukturen verwendet und für die beiden Detergenzien sind optimierte Einfrier- und Blotbedingungen sowie das Verhalten auf den verwendeten *Holey Carbon Grids* bekannt. Brij78 hingegen ist in dem Bereich der Cryo-EM fast vollständig unbekannt und es sind kaum Erfahrungen mit dem Detergenzverhalten während des Vitrifizierens verfügbar. Im Folgenden wurden daher Versuche zum Detergenzaustausch sowohl während der Affinitätschromatographie als auch während der anschließenden Größenausschlusschromatographie unternommen (Abb. 4.5). Zunächst wurde der Austausch von Brij78 zu 0,05 % (m/v) LMNG während der IMAC durchgeführt und der Reinigungserfolg in einem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel untersucht (Abb. 4.5 A). Es wurde ein mit der PfFNTG107S-Affinitätsreinigung in Präsenz von 0,05 % (m/v) Brij78 (vgl. Abb. 4.3 A) vergleichbares IMAC-Elutionsprofil mit einer dominierenden Bande bei etwa 34 kDa erhalten, die dem Molekulargewicht des PfFNTG107S-Monomers entspricht. Zudem wurden weniger intensive höhermolekulargewichtige Banden erhalten, die mögliche SDS-resistente PfFNTG107S-Oligomere repräsentieren könnten. Diese höhermolekulargewichtigen Banden wurden auch in Western Blot-Analysen mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper analog zur IMAC in Präsenz von 0,05 % (m/v) Brij78 (vgl. Abb. 4.3 A) detektiert. PfFNTG107S wurde mit 40–300 mM Imidazol-haltigem Reinigungspuffer eluiert und in diesen IMAC-Fractionen nach Konzentrieren (100 kDa MWCO) eine Gesamtproteinausbeute von 1,00 mg erhalten. Bei dem Detergenzaustausch von 0,05 % (m/v) Brij78 zu 0,005 % (m/v) LMNG während der SEC (Abb. 4.5 B) wurde ein einziger Peak bei einem Elutionsvolumen von etwa 12 ml mit einem Maximum von etwa 160 mAU und einer leichten Schulter zu geringerem Elutionsvolumen erhalten. Während der Konzentrierung anfallende Aggregate wurden in geringen Maßen während der Zentrifugation vor Injektion pelletiert und entsprechend nicht

im SEC-Chromatogramm visualisiert. Nach SEC und Konzentrieren (100 kDa MWCO) wurde eine Gesamtproteinmasse von etwa 0,3 mg bestimmt.

Der Austausch von Brij78 zu 0,06 % (m/v) GDN (Abb. 4.5 C) während der IMAC resultierte erneut in einem zur IMAC mit Brij78-haltigem Reinigungspuffer ähnlichen Elutionsprofil mit möglichen PfFNTG107S-Monomer- und Oligomerbanden wie bei dem zuvor durchgeführten Detergenzaustausch von Brij78 zu LMNG. In den IMAC-Fractionen mit Imidazolkonzentrationen von 40-300 mM wurde nach Konzentrieren (100 kDa MWCO) eine Gesamtproteinmasse von 1,10 mg erhalten. Bei Detergenzaustausch von 0,05 % (m/v) Brij78 zu 0,006 % (m/v) GDN während der SEC (Abb. 4.5 D) wurde ein einziger Peak bei einem Elutionsvolumen von etwa 11,5 ml und einem Maximum von etwa 170 mAU erhalten. Zu kleinerem Elutionsvolumen war ebenso wie beim Austausch von Brij78 zu LMNG eine leichte Schulter zu erkennen. Es wurde nach SEC und Konzentrieren (100 kDa MWCO) eine Gesamtproteinmasse von etwa 0,3 mg bestimmt. In den SEC-Chromatogrammen war im Gegensatz zur Größenausschlusschromatographie von mit Brij78 solubilisiertem PfFNTG107S jeweils ein einzelner Peak zu erkennen, der auf größenhomogene Partikel und einen erfolgreichen Detergenzaustausch hindeutet. Bei geringeren Elutionsvolumina wurden kaum Absorptionssignale detektiert und somit nur Partikel der den möglichen PfFNTG107S-Pentameren entsprechenden Größe erhalten. Ein tatsächlicher Nachweis für den Detergenzaustausch während der IMAC oder SEC wurde an dieser Stelle nicht erbracht und so ist es möglich, dass PfFNTG107S weiterhin mit Brij78 solubilisiert oder in Mischmizellen vorlag. Detergenzkonzentrationserhöhungen während der SEC um den Faktor 10 veränderten das Elutionsprofil nicht.

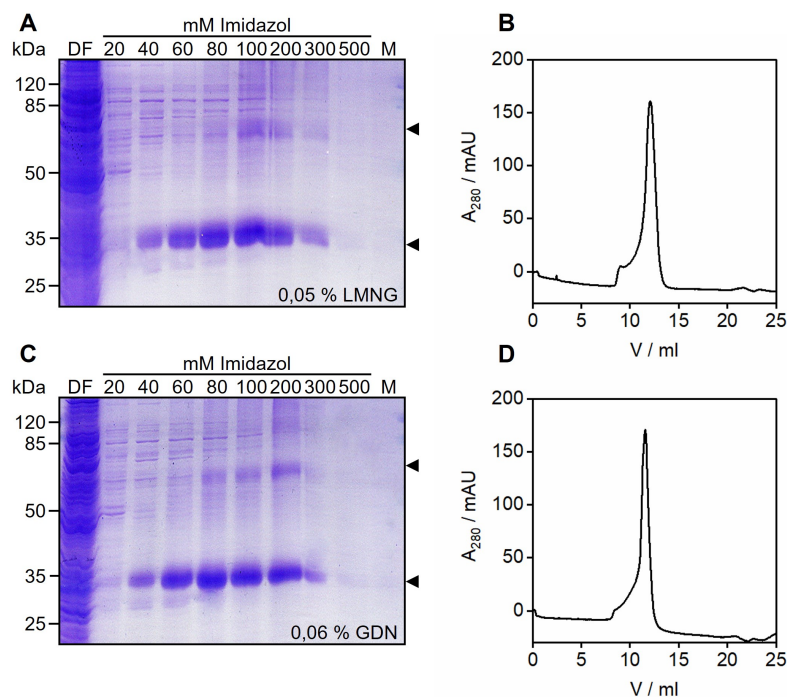


Abb. 4.5: Detergenzaustausch von Brij78 zu LMNG und GDN während IMAC und SEC. **A** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der IMAC mit 0,05 % (m/v) LMNG-haltigem Reinigungspuffer. Inkubation von 20 µl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C. DF, Durchfluss; M, Matrix. **B** SEC-Chromatogramm des Detergenzaustausches von 0,05 % (m/v) Brij78 zu 0,005 % (m/v) LMNG. **C** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der IMAC mit 0,06 % (m/v) GDN-haltigem Reinigungspuffer. Inkubation von 20 µl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C. DF, Durchfluss; M, Matrix. **D** SEC-Chromatogramm des Detergenzaustausches von 0,05 % (m/v) Brij78 zu 0,006 % (m/v) GDN.

4.4 Stabilitätsuntersuchungen und Größenanalyse von PfFNTG107S in Detergenzien

Weiterhin wurde die Stabilität des zellfrei hergestellten PfFNTG107S in verschiedenen Detergenzien untersucht. Dazu wurde in Gegenwart von 0,8 % (m/v) Brij78 synthetisiertes PfFNTG107S nach Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie mit 0,05 % (m/v) Brij78-haltigem Reinigungspuffer mittels Größenausschlusschromatographie gereinigt und jeweils die dem Hauptpeak entsprechenden SEC-Fractionen zusammengegeben, konzentriert (100 kDa MWCO) und für 7 d bzw. 14 d bei 4 °C gelagert. Nach der Lagerungszeit wurde erneut injiziert und die jeweiligen SEC-Fractionen in Western Blot-Analysen untersucht. Bei der Stabilitätsuntersuchung bei Lagerung in 0,05 % (m/v) Brij78 zeigte sich, dass das Elutionsvolumen des nach dem ersten SEC-Durchlauf isolierten Hauptpeaks A8-A10 von etwa 12 ml nach der ersten Reinjektion (Lagerung für 7 d) sowie nach der zweiten Reinjektion (Lagerung für 14 d) konstant blieb und es somit zu keiner wesentlichen Veränderung der Partikelgröße kam (Abb 4.6 A). Nach der ersten Injektion wurde in allen SEC-Fractionen mit beobachteter Absorption bei 280 nm PfFNTG107S mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper nachgewiesen (Abb. 4.6 B). In den SEC-Fractionen bei geringerem Elutionsvolumen waren neben PfFNTG107S-Monomerbanden auch weniger intensive Chemi-

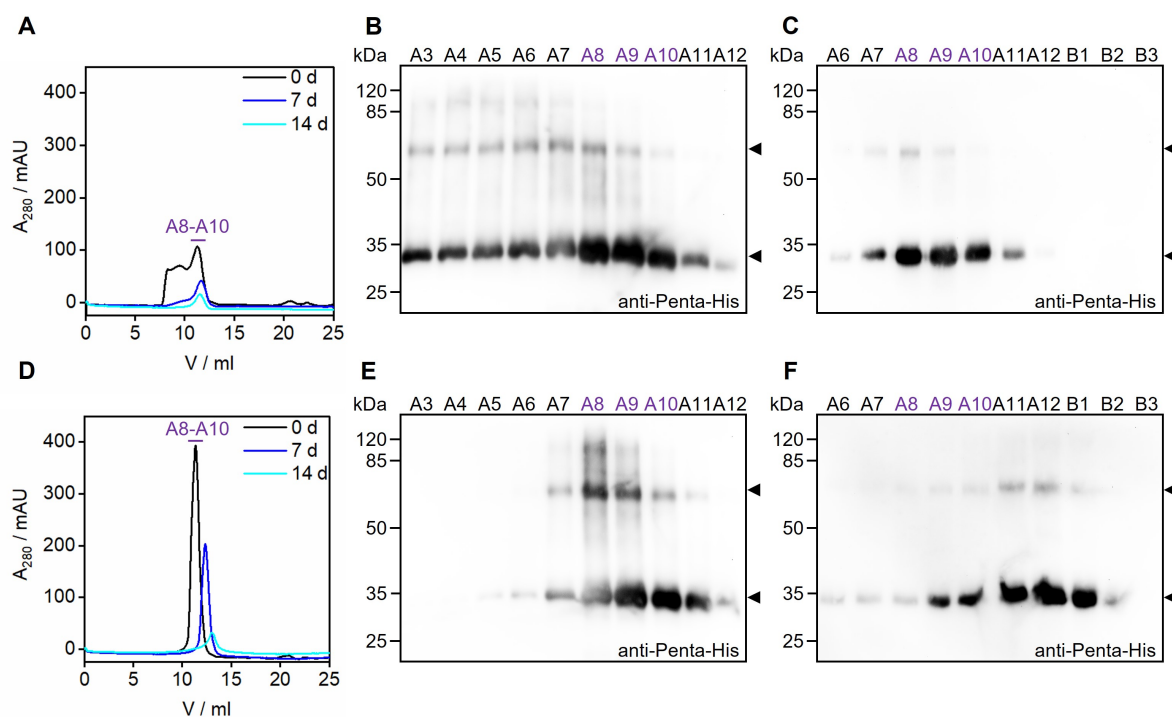


Abb. 4.6: Untersuchung der Stabilität von mit Brij78 und LMNG solubilisiertem PfFNTG107S. **A** SEC-Chromatogramme bei Solubilisierung mit 0,05 % (m/v) Brij78. Nach 7 d und 14 d wurden die dem Hauptpeak aus dem ersten SEC-Durchlauf entsprechenden Fraktionen A8-A10 reinjiziert. **B** Western Blot-Analyse der proteinbeinhaltenden Fraktionen nach dem ersten SEC-Durchlauf mit 0,05 % (m/v) Brij78. Inkubation von 20 µl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper. **C** Western Blot-Analyse der Reinjektion des Hauptpeaks nach Inkubation für 14 d bei 4 °C in 0,05 % (m/v) Brij78-haltigem Puffer. Inkubation von 20 µl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper. **D** SEC-Chromatogramme bei Solubilisierung mit 0,005 % (m/v) LMNG. Nach 7 d und 14 d wurden die dem Hauptpeak aus dem ersten SEC-Durchlauf entsprechenden Fraktionen A8-A10 reinjiziert. **E** Western Blot-Analyse der proteinbeinhaltenden Fraktionen nach dem ersten SEC-Durchlauf mit 0,005 % (m/v) LMNG. Inkubation von 20 µl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper. **F** Western Blot-Analyse der Reinjektion des Hauptpeaks nach Inkubation für 14 d bei 4 °C in 0,005 % (m/v) LMNG-haltigem Puffer. Inkubation von 20 µl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper.

lumineszenzbanden für vermutete PfFNTG107S-Dimere und für höhere Oligomere erkennbar. Nach der zweiten Reinjektion (Lagerung für 14 d bei 4 °C) wurde PfFNTG107S in den gleichen SEC-Fractionen A8-A10 wie vor der Lagerung eluiert und es wurden Banden für mögliche PfFNTG107S-Dimere sehr geringer Intensität detektiert (Abb. 4.6 C). In Abb. 4.6 D ist das SEC-Chromatogramm des Detergenzaustausches zu 0,005 % (m/v) LMNG und der jeweiligen Reinjektionen der dem Hauptpeak des ersten SEC-Durchlaufs entsprechenden SEC-Fractionen A8-A10 gezeigt. Zu erkennen war eine Verschiebung des Peakmaximums mit zunehmender Lagerungszeit zu größeren Elutionsvolumina, was auf eine zeitabhängige Verringerung der Partikelgröße hindeutet. Nach der ersten Injektion befand sich PfFNTG107S konzentriert auf wenige SEC-Fractionen im Hauptpeak und es waren in der Western Blot-Analyse sowohl PfFNTG107S-Monomere als auch mögliche Dimere sowie höhere Oligomere detektierbar (Abb. 4.6 E). Nach Lagerung in 0,005 % (m/v) LMNG für 14 d bei 4 °C wurde PfFNTG107S in einer Western Blot-Analyse analog zur Lage des entsprechenden SEC-Peaks in größeren Elutionsvolumina entsprechenden SEC-Fractionen detektiert (Abb. 4.6 F). Es wurden weiterhin PfFNTG107S-Dimeren entsprechende Banden erhalten, die möglicherweise auf die gegebene PfFNTG107S-Proteinstabilität ähnlich wie bei Lagerung in 0,05 % (m/v) Brij78 hindeutet. Möglicherweise lag eine geringere Stabilität der LMNG-Mizellen im Vergleich zu Brij78-Mizellen vor, die in einer Verringerung der Partikelgröße von mit LMNG solubilisierten PfFNTG107S nach fortlaufender Lagerung resultierte.

Zur weiteren Größen- und Stabilitätsanalyse wurde mit Brij78 und LMNG solubilisiertes PfFNTG107S mittels DLS-Messungen untersucht. Abb. 4.7 A zeigt das Größenprofil von mit 0,01 % (m/v) Brij78 solubilisiertem PfFNTG107S im Vergleich zu leeren Brij78-Mizellen. Für mit Brij78 solubilisiertes PfFNTG107S wurde ein gemittelter Partikeldurchmesser von 21,2 nm und ein Polydispersitätsindex (Lorber et al., 2012; Hughes et al., 2015) von 0,22 bestimmt. Die leeren Brij78-Mizellen wiesen einen vergleichsweise geringeren Partikeldurchmesser von etwa 8 nm auf. Bei Solubilisierung von PfFNTG107S mit 0,005 % (m/v) LMNG wurde ein deutlich kleinerer durchschnittlicher Partikeldurchmesser von 12,4 nm (Polydispersitätsindex: 0,17) ermittelt (Abb. 4.7 B). Zu beachten ist allerdings der ebenfalls deutlich geringere mittlere Durchmesser leerer LMNG-Mizellen (bei 0,005 % (m/v) LMNG) von etwa 1 nm im Vergleich zu den leeren Brij78-Mizellen und die geringe Reproduzierbarkeit der Größenbestimmung von leeren Detergenzmizellen, wobei die Mizellendurchmesser stark von der jeweiligen Detergenzkonzentration abhängig zu sein schienen. Die DLS-Messergebnisse deuten dennoch auf größere Partikeldurchmesser von mit Brij78 solubilisiertem PfFNTG107S im Vergleich zu mit LMNG solubilisiertem Membranprotein hin ohne gesicherte Aussagen über den PfFNTG107S-Oligomerisierungszustand in der jeweiligen Detergenzumgebung zuzulassen. Weitergehend wurde die thermodynamische Stabilität der mit 0,01 % (m/v) Brij78 bzw. 0,005 % (m/v) LMNG solubilisierten PfFNTG107S-Partikel durch Messung des durchschnittlichen Partikeldurchmessers in einem Temperaturgradienten von 20 °C bis 70 °C untersucht (Abb. 4.7 C). Dabei wurde für mit 0,01 % (m/v) Brij78 solubilisiertes PfFNTG107S bis zu einer Temperatur von 70 °C kein wesentlicher Anstieg des durchschnittlichen Partikeldurchmessers beobachtet. Bei der höchsten angelegten Temperatur von 70 °C lag ein durchschnittlicher Partikeldurchmesser von 86,8 nm vor, was unter dem erwarteten Durchmesser von größeren Proteinaggregaten lag und auf eine entsprechend hohe Thermostabilität der mit Brij78 solubilierten PfFNTG107S-Membranproteine hindeutete. Der durchschnittliche Partikeldurchmesser von mit LMNG solubilisiertem PfFNTG107S stieg bei Temperaturen von über 50 °C sprunghaft bis zu einem durchschnittlichen Partikeldurchmesser von >4500 nm an. Aus der Temperaturgradientenkurve konnte für mit LMNG solubilisiertes PfFNTG107S eine Schmelztemperatur von etwa

55 °C abgeleitet werden. PfFNTG107S kann den Ergebnissen zufolge mit LMNG nicht ausreichend stabilisiert werden wie mit Brij78, was die vorigen Beobachtungen zur vermutlich geringeren Stabilität von LMNG-Mizellen oder verminderten PfFNTG107S-LMNG-Interaktionen unterstützt. Mittels zellfreier Proteinsynthese in Präsenz von Brij78 hergestelltes PfFNTG107S wurde im Folgenden erst unmittelbar vor den elektronenmikroskopischen Strukturuntersuchungen in eine LMNG-Detergenzumgebung überführt und bis dahin in Gegenwart von Brij78 stabilisiert.

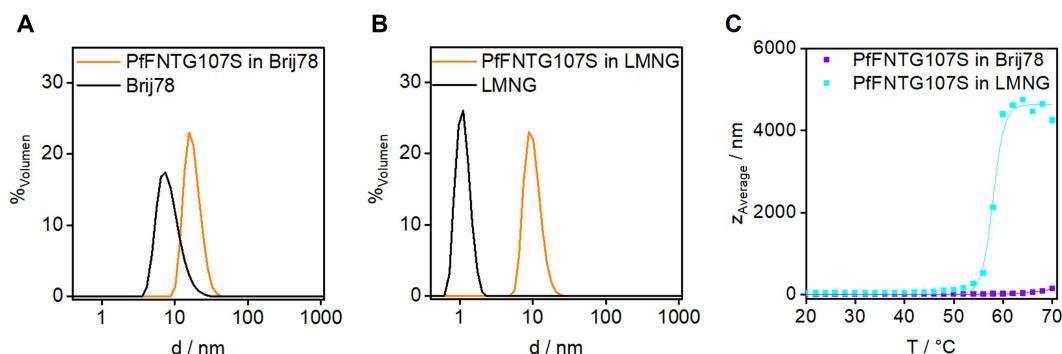


Abb. 4.7: DLS-Untersuchungen von mit Brij78 und LMNG solubiliertem PfFNTG107S. **A** Größenprofil von mit 0,01 % (m/v) Brij78 solubiliertem PfFNTG107S (orange) im Vergleich zu leeren Brij78-Mizellen (schwarz). Messungen bei Raumtemperatur. **B** Größenprofil von mit 0,005 % (m/v) LMNG solubiliertem PfFNTG107S (orange) im Vergleich zu leeren LMNG-Mizellen (schwarz). Messungen bei Raumtemperatur. **C** Temperaturgradientenkurve von mit 0,01 % (m/v) Brij78 (violett) bzw. 0,005 % (m/v) LMNG (cyan) solubiliertem PfFNTG107S. Angegeben ist der durchschnittliche Partikeldurchmesser ($z_{Average}$) in Abhängigkeit von der Messtemperatur.

4.5 PfFNTG107S kann in Präsenz von GDN hergestellt und gereinigt werden

Zur Umgehung eines Detergenzaustausches vor der Cryo-Elektronenmikroskopie wurden Versuche zur zellfreien Proteinsynthese von PfFNTG107S in Präsenz von GDN unternommen. Das in der Cryo-EM verbreitete Detergenz LMNG eignete sich nicht zur Stabilisierung von PfFNT und PfFNTG107S während der zellfreien Proteinsynthese. Aus diesem Grund wurde für die PfFNTG107S-Produktion zunächst eine geeignete GDN-Konzentration mittels der zellfreien Synthese von PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteinen gesucht. In Abb. 4.8A sind die Western Blot- und In-Gel-Fluoreszenz-Analysen jeweils eines analytischen Ansatzes des durchgeführten GDN-Konzentrationscreenings gezeigt. Als Referenz zur Beurteilung des Syntheseeffizienz diente ein analytischer Ansatz mit 0,8 % (m/v) Brij78. Im SDS-PAGE-Gel waren bei den getesteten GDN-Konzentrationen von 0,06-1 % (m/v) fluoreszierende Banden bei etwa 50 kDa deutlich erkennbar, die dem Molekulargewicht des PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteins entsprechen und eine deutlich geringere Fluoreszenzintensität als die entsprechende Fluoreszenzbande bei der Brij78-Referenz aufwiesen. Neben den 50 kDa-Banden waren Fluoreszenzbanden bei etwa 30 kDa erkennbar, die möglicherweise auf durch einen alternativen Translationsbeginn produziertes lösliches GFP hindeuten. Ebenso waren höhermolekulargewichtige Banden mit geringerer Fluoreszenzintensität erkennbar, die möglicherweise durch Oligomere des PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteins hervorgerufen wurden. In der Western Blot-Analyse unter Verwendung des gleichen SDS-PAGE-Gels waren neben den in der In-Gel-Fluoreszenz-Analyse detektierten Banden bei etwa 50 kDa zu höherem Molekulargewicht verschobene Banden mit einer im Vergleich zu den 50 kDa-Banden deutlich höheren Chemilumineszenzintensität erkennbar. Diese nicht-fluoreszierenden Banden repräsentierten möglicherweise nicht korrekt gefaltetes

PfFNTG107S-GFP, welches zur Ausbildung des GFP-Fluorophors nicht ausreichend mit GDN solubiliert wurde. Diese Ergebnisse wurden durch die jeweiligen zweiten analytischen Ansätze mit denselben Detergenzkonzentrationen bestätigt. Da die fluoreszierenden 50 kDa-Banden bei einer Konzentration von 0,3-0,6 % (m/v) GDN am intensivsten erschienen und auf eine teilweise ausreichende Solubilisierung des synthetisierten PfFNTG107S-Membranproteinanteils mit GDN hinwiesen, wurde für die folgenden präparativen Ansätze eine GDN-Konzentration von 0,5 % (m/v) verwendet. PfFNTG107S (ohne Fusion mit GFP) wurde in präparativen Ansätzen der zellfreien Proteinsynthese hergestellt und mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel und in der zugehörigen Western Blot-Analyse (Abb. 4.8 B) wurden neben den wenig intensiven Banden potenzieller PfFNTG107S-Dimere (etwa 68 kDa) die PfFNTG107S-Monomeren entsprechenden Banden bei etwa 34 kDa detektiert. Die geringere Intensität der Banden im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel wies ebenso wie die geringe Intensität der Fluoreszenzbanden des PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteins auf eine verringerte Proteinausbeute der zellfreien PfFNTG107S-Synthese mit GDN als bei Proteinproduktion mit 0,8 % (m/v) Brij78 hin. PfFNTG107S wurde mit Imidazolkonzentrationen von 60-300 mM zusammen mit einem kleinen Anteil nicht-spezifisierter Proteine eluiert. In den IMAC-Fractionen von 80-300 mM Imidazol-haltigem Reinigungspuffer wurde nach Konzentrierung (100 kDa MWCO) eine Ausbeute von $0,99 \pm 0,09$ mg Gesamtprotein und damit etwa 57 % der mit Brij78 erzielten Ausbeute von IMAC-gereinigtem PfFNTG107S erhalten.

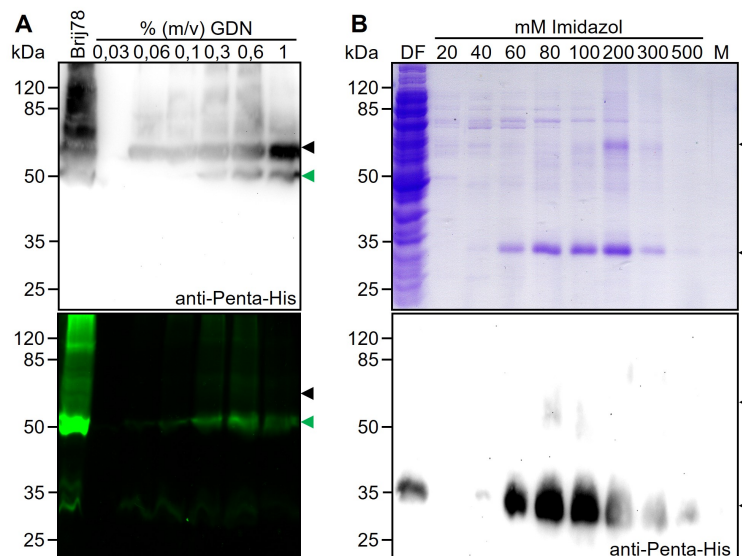


Abb. 4.8: Zellfreie Synthese von PfFNTG107S-GFP und PfFNTG107S in Präsenz von GDN. **A** Western Blot- und In-Gel-Fluoreszenz-Analyse des Detergenzkonzentrationscreenings für die zellfreie Synthese von PfFNTG107S-GFP mit GDN. Als Vergleich diente ein analytischer Ansatz mit 0,8 % (m/v) Brij78. Inkubation von 20 μl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper bzw. bei einer Belichtungszeit von 1 s (In-Gel-Fluoreszenz-Analyse). **B** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel und Western Blot-Analyse der IMAC-Fractionen der PfFNTG107S-Reinigung. Inkubation von 20 μl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper. DF, Durchfluss; M, Matrix.

Zur weiteren Reinigung über Größenausschlusschromatographie sollte zunächst eine geeignete GDN-Konzentration ermittelt werden. Abb. 4.9 A zeigt die SEC-Chromatogramme von mit 0,5 % (m/v) GDN zellfrei hergestelltem PfFNTG107S nach SEC-Reinigung in Präsenz verschiedener GDN-Konzentrationen. Ohne während des SEC-Durchlaufs vorliegendes GDN wurde kein solubiliertes Protein in den relevan-

ten SEC-Fractionen detektiert. Die Chromatogramme der SEC-Durchläufe mit 0,006 % (m/v) GDN und 0,06 % (m/v) GDN zeigten nahezu unabhängig von der verwendeten GDN-Konzentration jeweils relativ betrachtet intensive Aggregatpeaks bei einem Elutionsvolumen von etwa 8 ml sowie weitere Absorptionssignale, wobei die Maxima der beiden Absorptionskurven bei einem Elutionsvolumen von etwa 12 ml lagen. Die Western Blot-Analysen der Elutionsfraktionen der SEC-Durchläufe mit 0,006 % (m/v) GDN (Abb. 4.9 B) und 0,06 % (m/v) GDN (Abb. 4.9 C) zeigten die Präsenz von PfFNTG107S in den SEC-Fractionen mit detektierter Absorption bei 280 nm. Mit dem anti-FNT-Antikörper wurden neben den PfFNTG107S-Monomeren entsprechenden Chemilumineszenzbanden bei einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa auch auf PfFNTG107S-Dimere hinweisende Banden bei etwa 70 kDa erhalten. Bei einer GDN-Konzentration von 0,06 % (m/v) lag PfFNTG107S vergleichsweise verstärkt in den einem geringeren Elutionsvolumen entsprechenden SEC-Fractionen vor. Dies könnte auf die PfFNTG107S-Assemblierung zu größeren Partikeln bei höherer GDN-Konzentration im Vergleich zu 0,006 % (m/v) GDN hindeuten. Es wurden in den SEC-Chromatogrammen nach erneuten Durchläufen keine Unterschiede bei verschiedenen hohen GDN-Konzentrationen beobachtet und folglich eine ausreichende PfFNTG107S-Solubilisierung in Präsenz von 0,006 % (m/v) GDN angenommen. Es konnten zudem keine Unterschiede im PfFNTG107S-Oligomerisierungszustand und keine SDS-resistenten PfFNTG107S-Pentamere bei sämtlichen getesteten GDN-Konzentrationen festgestellt werden.

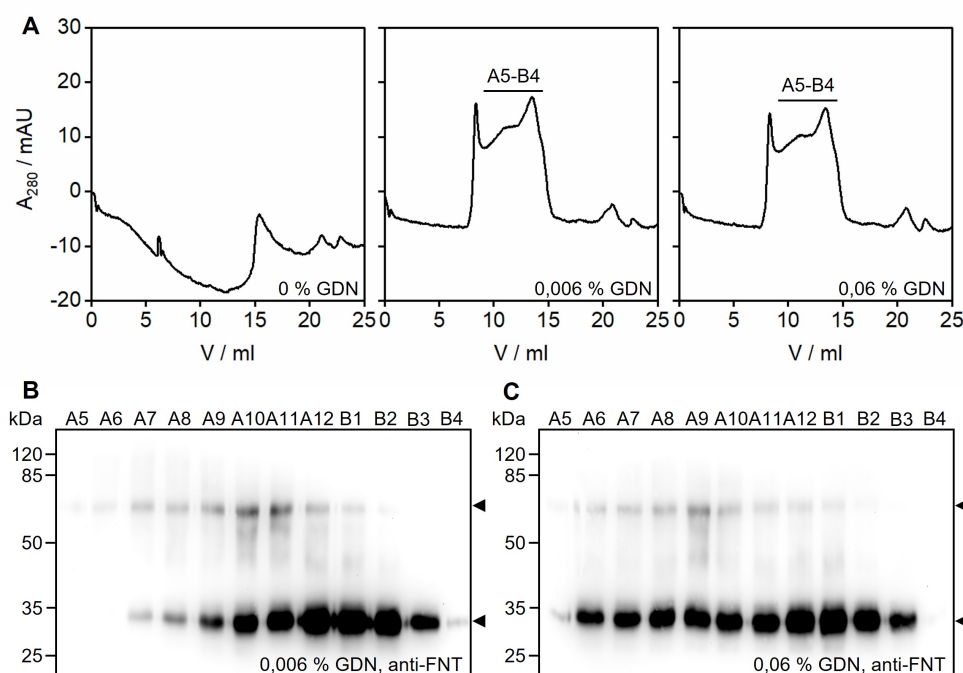


Abb. 4.9: SEC-Reinigung von mit GDN solubilisiertem PfFNTG107S. **A** SEC-Chromatogramme bei Größenausschlusschromatographie von PfFNTG107S mit Reinigungspuffer ohne GDN und mit 0,006 % (m/v) GDN bzw. 0,06 % (m/v) GDN. **B** Western Blot-Analyse der SEC-Fractionen bei Reinigung mit 0,006 % (m/v) GDN-haltigem Reinigungspuffer. Inkubation von 20 μ l der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **C** Western Blot-Analyse der SEC-Fractionen bei Reinigung mit 0,06 % (m/v) GDN-haltigem Reinigungspuffer. Inkubation von 20 μ l der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper.

Mittels Blue-Native PAGE (BN-PAGE)-Analyse wurden weitere Untersuchungen zum Oligomerisierungszustand des zellfrei in Gegenwart von GDN hergestellten PfFNTG107S durchgeführt. PfFNTG107S wurde wie zuvor in Präsenz von 0,5 % (m/v) GDN zellfrei hergestellt, über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie

und nachfolgende Größenausschlusschromatographie (Laufpuffer mit 0,006 % (m/v) GDN) gereinigt und die in Abb. 4.10 A markierten SEC-Fractionen mittels BN-PAGE-Analyse untersucht. Da kein nativer Proteingrößenmarker zur Verfügung stand, wurden zur Einschätzung des Molekulargewichts nativer Proteinoligomere Milchpulver (M_{Caseine} etwa 20-25 kDa) und Rinderserumalbumin (BSA, M_{Monomer} etwa 66 kDa, M_{Dimer} etwa 133 kDa) eingesetzt. Die markierten SEC-Fractionen wurden bei 4 °C bzw. 37 °C für 10 min mit BN-Ladepuffer inkubiert. Unter beiden Inkubationsbedingungen lagen in der Fraktion 1 möglicherweise dem Molekulargewicht von PffNTG107S-Pentameren entsprechende verschmierte Banden vor (Abb. 4.10 B). In der Fraktion 2 wurden jeweils zu kleinerem Molekulargewicht verschobene Banden beobachtet. Die genauere Bestimmung des Molekulargewichts war aufgrund der verschmierten Banden und der uneindeutigen Bandenzuordnung der Milchpulver- und BSA-Größenmarkerbanden nicht möglich. Zur Zuordnung der verschmierten Banden wurden die im BN-PAGE-Gel enthaltenen Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und PffNTG107S mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper detektiert (Abb. 4.10 C). In dieser Western Blot-Analyse wurde die im BN-PAGE-Gel beobachtete Präsenz von PffNTG107S mit unterschiedlichen Molekulargewicht in den verschiedenen SEC-Fractionen bestätigt und in der Fraktion 1 war eine größere PffNTG107S-Spezies vorhanden als in der Fraktion 2. Zur weiteren Unterstützung der Vermutung wurden mögliche PffNTG107S-Pentamere der beiden SEC-Fractionen für 10 min bei 70 °C mit BN-Ladepuffer denaturiert. Bei erneuter BN-PAGE nach Denaturierung wurden in den beiden SEC-Fractionen keine Banden im PffNTG107S-Pentameren entsprechenden Molekulargewichtsbereich erhalten. Stattdessen wurden hochmolekulargewichtige, verschmierte Banden erhalten, die auf die erfolgte PffNTG107S-Denaturierung bei erhöhter Temperatur und das Vorliegen von hochmolekularen Aggregaten hindeuten (Abb. 4.10 D).

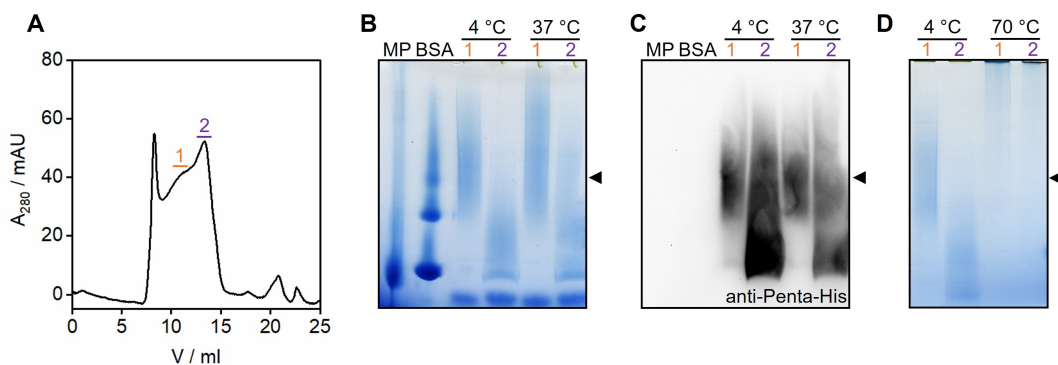


Abb. 4.10: Untersuchung des PffNTG107S-Oligomerisierungszustands mittels BN-PAGE-Analyse. **A** SEC-Chromatogramm von mit 0,006 % (m/v) GDN solubilisiertem PffNTG107S mit Markierung der in den BN-PAGE-Analysen untersuchten SEC-Fractionen. **B** BN-PAGE-Gel mit Milchpulver (MP) und BSA (ca. 66 kDa als Monomer und ca. 133 kDa als Dimer) als Größenvergleich. **C** Auf eine PVDF-Membran geblottetes BN-PAGE-Gel und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper. **D** BN-PAGE-Gel nach Inkubation der SEC-Fractionen bei 4 °C und 70 °C. Die Pfeile geben die ungefähre Lage potenzieller PffNTG107S-Pentamere an.

Es wurden somit Hinweise auf für die Transportproteinfunktion notwendige PffNTG107S-Pentamere bei Synthese und Solubilisierung in Gegenwart von GDN vermutet. Ein Nachweis der pentameren Proteinstruktur und der Funktionalität des zellfrei hergestellten PffNTG107S konnte allerdings ohne nähere elektronenmikroskopische Untersuchungen nicht erbracht werden. Dr. Nathan Epalle konnte zwar einige wenige Lichtstreuungskurven im Rahmen eines Schwellungsassays von in Liposomen rekonstituiertem und zellfrei hergestelltem PffNT an der Stopped-Flow-Apparatur aufnehmen, allerdings konnten dabei

keine auf eine Funktionalität hindeutenden Lichtstreuungskurven reproduziert werden (Epalle, 2023). Im folgenden Kap. 4.6 wird die Qualität der zellfrei in Gegenwart der Detergenzien Brij78 und GDN hergestellten PfFNTG107S-Membranproteine nach Detergenzaustausch für die Strukturaufklärung durch Analyse von elektronenmikroskopischen Aufnahmen weiter untersucht.

4.6 Detergenz-solubilisiertes PfFNTG107S zeigt keine Pentamere in der Cryo-EM

Zu Strukturaufklärungsversuchen des PfFNTG107S *via* Cryo-Elektronenmikroskopie wurden mit LMNG und GDN solubilierte Proteinproben verwendet und die elektronenmikroskopischen Daten in Zusammenarbeit mit Jan-Hannes Schäfer (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Arne Möller, Osnabrück) aufgenommen und prozessiert. Zunächst wurde zellfrei in Präsenz von Brij78 hergestelltes und IMAC-gereinigtes PfFNTG107S unmittelbar vor Durchführung der Cryo-EM an der analytischen Superose 6 5/150-Säule in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Arne Möller über Detergenzaustausch mittels SEC mit 0,005 % (m/v) LMNG solubiliert (Abb. 4.11 A). Es wurde analog zu Kap. 4.4 ein einziger Peak im SEC-Chromatogramm und nach Konzentrierung (100 kDa MWCO) der PfFNTG107S-beinhaltenden SEC-Fraktionen eine Gesamtproteinmasse von etwa 0,25 mg erhalten. Die Proteinproben mit einer Konzentration von etwa 3 mg/ml wurden auf *Holey Carbon Grids* vitrifiziert (7 s, BF 20) und im Cryo-Elektronenmikroskop analysiert. In der in Abb. 4.11 B dargestellten Cryo-EM-Aufnahme zeigte sich eine ausreichend dichte Verteilung von weitgehend größenhomogenen Partikeln ohne Vorliegen von Detergenz- oder Proteinaggregaten. Die Aufnahme wies voneinander separierte Partikel in verschiedenen räumlichen Orientierungen auf und eine vorläufige Größenbestimmung der Partikel in dieser ersten Aufnahme ergab Partikeldurchmesser von etwa 6-8 nm. Es wurde ein Datensatz aus 3414 Einzelbildern aufgenommen und über den CryoSPARC 3.3.1-Algorithmus 153.000 Partikel isoliert, die in 50 2D-Klassensummen mit jeweils 2100-4700 Partikeln eingruppiert wurden. Die generierten Bilder einer Auswahl dieser 2D-Klassensummen sind in Abb. 4.11 C dargestellt. Aufgrund der geringen Partikelgrößen und der wenigen prägnanten Strukturmerkmale konnte über den Algorithmus keine hochauflösende Proteinstruktur errechnet werden. Aus den wolkenartig-diffusen Bildern der 2D-Klassensummen konnten zunächst keine weiteren Rückschlüsse auf die PfFNTG107S-Struktur oder den Oligomerisierungszustand gezogen werden.

Aus diesem Grund wurde ein Detergenzwechsel angestrebt und in Präsenz von Brij78 zellfrei hergestelltes und mit GDN solubiliertes PfFNTG107S mittels Cryo-EM untersucht. Kurz vor dem Blotten der Proteinproben auf *Holey Carbon Grids* wurde ein SEC-Durchlauf an der Superose 6 5/150-Säule mit 0,006 % (m/v) GDN-haltigem Reinigungspuffer durchgeführt, wobei ein einziger Peak ohne detektierte Aggregate erhalten wurde (Abb. 4.11 D). Es wurde eine Gesamtproteinmasse von etwa 0,2 mg bestimmt und die Proteinproben mit einer Gesamtproteinkonzentration von etwa 1,7 mg/ml vitrifiziert (7 s, BF 20) und elektronenmikroskopisch untersucht. In den Cryo-EM-Aufnahmen wurde eine ähnlich gute Partikelverteilung wie bei PfFNTG107S-Solubilisierung mit LMNG ohne sichtbare Aggregation beobachtet (Abb. 4.11 E). Es wurde erneut ein kompletter Datensatz aus 2975 Einzelbildern aufgenommen und eine Gesamtanzahl von 127.500 Partikeln in 50 2D-Klassensummen eingruppiert. Auch in den Bildern der 2D-Klassensummen (Abb. 4.11 F) konnten keine gesicherten Aussagen über die PfFNTG107S-Struktur oder den Oligomerisierungszustand getroffen werden. In einigen prozessierten Bildern wurden zwar Strukturen mit einer augenscheinlich pentameren Partikelform und möglicherweise ausgebildeter PfFNTG107S-Zentralpore beobachtet, allerdings könnten diese visualisierten Strukturbegebenheiten

auch durch Artefakte während der Datenprozessierung ausgelöst werden. Aus den 2D-Klassensummen wurden Partikeldurchmesser von etwa 6-7 nm bestimmt, welche deutlich unter dem Partikeldurchmesser von PffNTG107S-Pentameren in GDN-Mizellen von etwa 13-15 nm lagen (Peng et al., 2021). Damit wurde das tatsächliche Vorliegen von PffNTG107S-Pentameren in GDN-Mizellen in diesen Aufnahmen als unwahrscheinlich betrachtet. Zellfrei in Präsenz von GDN hergestelltes und gereinigtes PffNTG107S konnte nicht *via* Cryo-EM untersucht werden, da vor der Vitrifizierung keine gereinigte SEC-Fraktion isoliert werden konnte. Die auf die *Holey Carbon Grids* übertragenen Proteinproben wiesen eine vergleichsweise starke Heterogenität in Partikelgröße und -form auf und konnten nicht weitergehend analysiert werden.

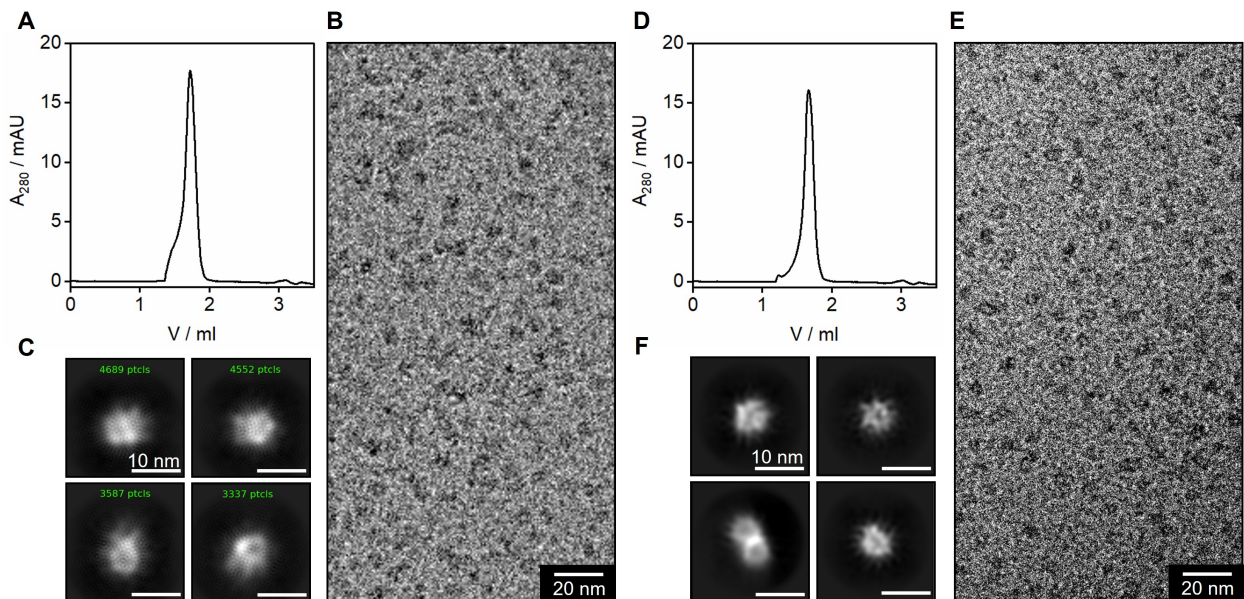


Abb. 4.11: Cryo-Elektronenmikroskopie von mit LMNG und GDN solubilisiertem PffNTG107S. **A** SEC-Chromatogramm des Detergenzaustausches zu 0,005 % (m/v) LMNG an analytischer Superose 6 5/150-Säule. **B** Cryo-EM-Aufnahme von mit 0,005 % (m/v) LMNG solubilisiertem PffNTG107S (Skalierungsbalken: 20 nm). **C** Exemplarische Bilder von 2D-Klassensummen von mit 0,005 % (m/v) LMNG solubilisiertem PffNTG107S (Skalierungsbalken: 10 nm). **D** SEC-Chromatogramm des Detergenzaustausches zu 0,006 % (m/v) GDN an analytischer Superose 6 5/150-Säule. **E** Cryo-EM-Aufnahme von mit 0,006 % (m/v) GDN solubilisiertem PffNTG107S (Skalierungsbalken: 20 nm). **F** Exemplarische Bilder von 2D-Klassensummen von mit 0,006 % (m/v) GDN solubilisiertem PffNTG107S (Skalierungsbalken: 10 nm).

Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass möglicherweise intakte PffNTG107S-Pentamere während der Vitrifizierung aufgrund der Wahl ungeeigneter Vitrifizierungsbedingungen zerstört wurden. Aus diesem Grund wurde die Größe von mit GDN solubilisiertem PffNTG107S weiter mittels DLS-Messungen und TEM-Aufnahmen mit Negativkontrastierung untersucht. Abb. 4.12 A zeigt das DLS-Größenprofil von mit 0,006 % (m/v) GDN solubilisiertem PffNTG107S im Vergleich zu leeren GDN-Mizellen. Es wurde ein durchschnittlicher Partikeldurchmesser von mit GDN solubilisiertem PffNTG107S von 20,3 nm bestimmt (Polydispersitätsindex: 0,21), während leere GDN-Mizellen einen gemittelten Durchmesser von rund 10 nm aufwiesen. Damit entsprach der Partikeldurchmesser des mit GDN solubilierten PffNTG107S ungefähr der Größe des mit 0,01 % (m/v) Brij78 solubilierten Proteins und erschien mit einem größeren Durchmesser als mit 0,005 % (m/v) LMNG solubiliertes PffNTG107S (vgl. Kap. 4.4). Dies könnte auf die ausreichende Stabilisierung von PffNTG107S durch GDN ähnlich wie durch das Synthesedetergenz Brij78 hindeuten. Bei DLS-Messungen mit Temperaturgradienten von mit 0,006 % (m/v) GDN solubilisiertem PffNTG107S wurde bis zu einer Temperatur von 70 °C und einem durchschnittlichen

Partikeldurchmesser bei 70 °C von 66,8 nm im Gegensatz zu mit LMNG solubilisiertem PfFNTG107S kein sprunghafter Anstieg des durchschnittlichen Partikeldurchmessers detektiert (Abb. 4.12 B). Es wurde eine scheinbar vergleichbare PfFNTG107S-Stabilität wie bei Solubilisierung mit Brij78 festgestellt, was auf eine ähnliche Eignung von GDN als Stabilisierungsdetergenz hindeutet. In TEM-Aufnahmen mit Negativkontrastierung wurde eine homogene Größenverteilung der mit GDN solubilisierten PfFNTG107S-Partikel ohne Detergenz- oder Proteinaggregate beobachtet (Abb. 4.12 C). Der Partikeldurchmesser betrug nach manueller Bestimmung mittels ImageJ-Software etwa 5-9 nm, womit die Partikel als zu klein für PfFNTG107S-Pentamere in Detergenzmizellen erschienen (Peng et al., 2021). Pentamere Proteinstrukturen waren in TEM-Aufnahmen mit Negativkontrastierung nicht erkennbar und die Partikel wiesen größtenteils eine kugelförmig-runde Form auf. Die mittleren Partikeldurchmesser waren hingegen größer als bei leeren GDN-Mizellen in entsprechenden TEM-Aufnahmen mit Negativkontrastierung (Gewering et al., 2018). Dies könnte auf das Vorliegen von kleineren, nicht-pentameren und vermutlich nicht-nativen PfFNTG107S-Membranproteinen in GDN-Mizellen hindeuten.

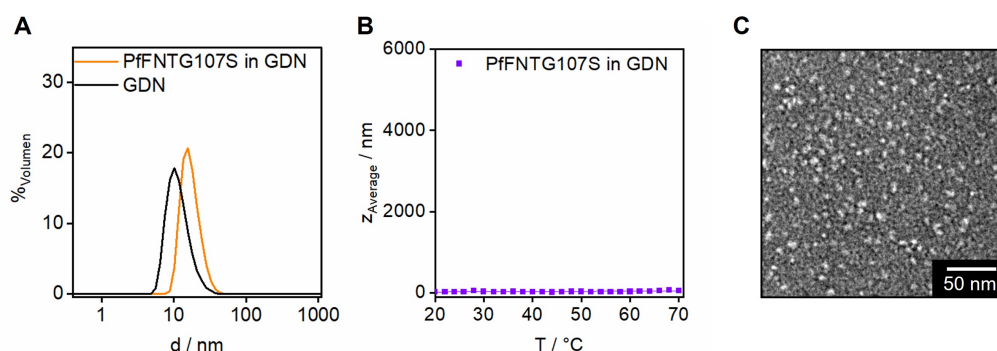


Abb. 4.12: Untersuchung der Größe und Stabilität von mit GDN solubilisiertem PfFNTG107S. **A** Größenprofil von mit 0,006 % (m/v) GDN solubilisiertem PfFNTG107S (orange) im Vergleich zu leeren GDN-Mizellen (schwarz). Messungen bei Raumtemperatur. **B** Temperaturgradientenkurve von mit 0,006 % (m/v) GDN solubilisiertem PfFNTG107S. Angegeben ist der durchschnittliche Partikeldurchmesser (z_{Average}) in Abhängigkeit von der Messtemperatur. **C** Repräsentativer Ausschnitt einer TEM-Aufnahme mit Negativkontrastierung von mit GDN solubilisiertem PfFNTG107S (Skalierungsbalken: 50 nm).

4.7 Nanodiscs mit verschiedenen Lipidbilayerdurchmessern werden hergestellt

Mit den Detergenzien LMNG und GDN solubilisiertes PfFNTG107S war u. a. aufgrund der geringen Partikelgröße nicht für weitergehende Strukturuntersuchungen geeignet. Aus diesem Grund wurde die Rekonstitution von PfFNTG107S in Lipid-Protein-Nanodiscs zur Strukturaufklärung des im Lipidbilayer integrierten Membranproteins mittels Cryo-EM angestrebt. Ergebnissen meiner Masterarbeit zufolge sind Nanodiscs mit dem MSP-Protein MSP1E3D1 und einem Außendurchmesser von etwa 12 nm zur cotranslationalen Rekonstitution vollständiger PfFNT-Pentamere bezogen auf den Lipidbilayerdurchmesser zu limitiert (Hansen, 2019). Aus diesem Grund wurden zunächst Versuche zur posttranslationalen Rekonstitution des bereits vollständig zellfrei synthetisierten PfFNTG107S in die entsprechenden Nanodiscs aus MSP1E3D1 bzw. verlängertem MSP2N2 unternommen. Zunächst wurden dazu die entsprechenden MSP-Proteine in *E. coli*-Zellen hergestellt und *via* Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel der IMAC-Fractionen der MSP1E3D1-Reinigung wies dem MSP1E3D1-Molekulargewicht entsprechende Banden bei etwa 34 kDa auf und das Zielprotein wurde mit 100-300 mM Imidazol-haltigem MSP-Puffer C eluiert (Abb. 4.13 A). Durch Western Blot-Analysen

mit einem gegen den N-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper wurde die MSP1E3D1-Identität in diesen IMAC-Fractionen zuvor in meiner Masterarbeit bestätigt (Hansen, 2019). Die entsprechenden IMAC-Reinigungsfraktionen wurden vereinigt und MSP1E3D1 konzentriert (30 kDa MWCO), wonach eine aus fünf Expressionsansätzen gemittelte Ausbeute von $9,3 \pm 0,6$ mg MSP1E3D1 pro Liter *E. coli*-Expressionskultur erzielt wurde. In der zur Reinheitskontrolle durchgeführten Größenausschlusschromatographie zeigte sich ein SEC-Chromatogramm mit Maxima bei Elutionsvolumen von etwa 12 ml und 15 ml, die auf Partikel des Durchmessers von MSP1E3D1-Dimeren und -Monomeren hindeuten könnten (Abb. 4.13 B). IMAC-gereinigtes MSP1E3D1 wurde zusammen mit dem synthetischen Lipid DOPG nach Tab. 3.9 zur Assemblierung von leeren DOPG-MSP1E3D1-Nanodiscs verwendet. Resultierende DOPG-MSP1E3D1-ND ohne rekonstituiertes Membranprotein wurden in einem SEC-Durchlauf bei einem Volumen von etwa 11,5 ml eluiert, welches ungefähr dem gleichen Elutionsvolumen der möglichen MSP1E3D1-Dimere während der SEC-Reinheitskontrolle entspricht (Abb. 4.13 C). Neben diesem dominierenden SEC-Peak wurde ein deutlich weniger intensiver Aggregatpeak bei einem Elutionsvolumen von etwa 8 ml erhalten, was auf die nahezu vollständige Assemblierung von MSP1E3D1 zu nicht-aggregierten Nanodiscs hindeutet. Nach Sammeln der Nanodisc-enhaltenen SEC-Fractionen und Konzentrieren (30 kDa MWCO) wurden pro standardmäßig präpariertem 3 ml-Assemblierungsansatz mit 240 nmol eingesetztem MSP1E3D1 finale Ausbeuten von 90-115 nmol leeren DOPG-MSP1E3D1-ND erzielt. Zur Assemblierung von Nanodiscs mit größerem Durchmesser wurde analog verlängertes MSP2N2

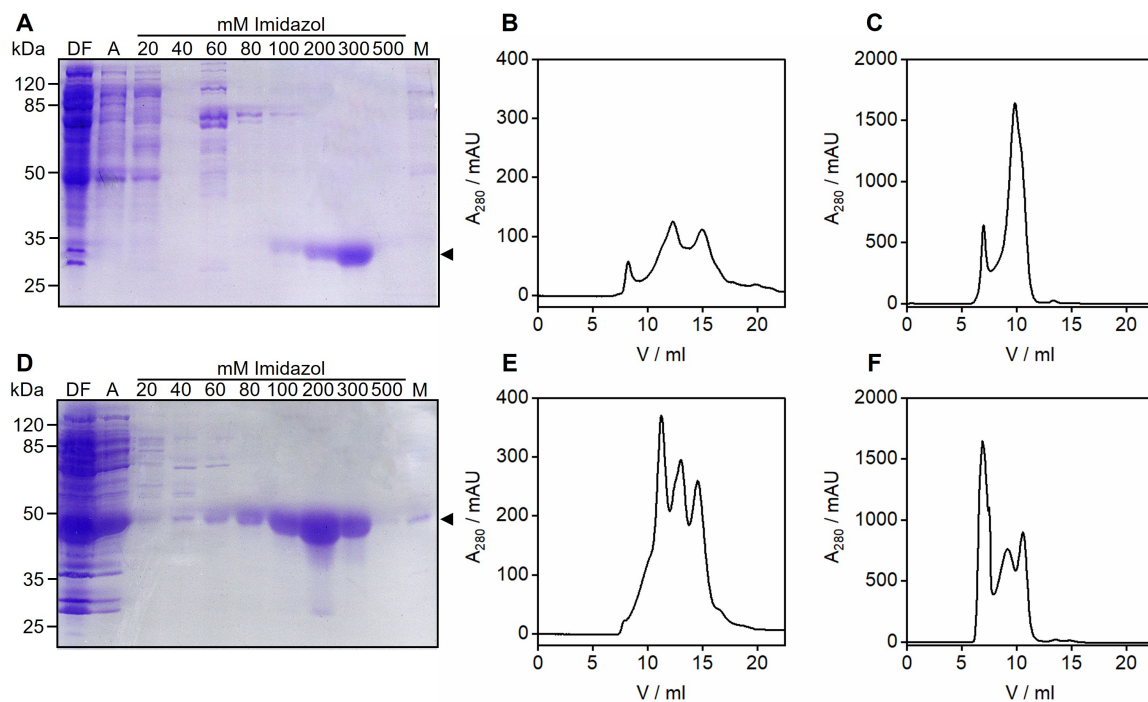


Abb. 4.13: Assemblierung von leeren DOPG-MSP1E3D1-ND und DOPG-MSP2N2-ND. **A** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der IMAC-Fractionen der MSP1E3D1-Reinigung. Inkubation von 20 μ l der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C. DF, Durchfluss; A, Waschfraktion mit MSP-Puffer A; M, Matrix. **B** SEC-Chromatogramm der MSP1E3D1-Reinigung. **C** SEC-Chromatogramm von leeren DOPG-MSP1E3D1-ND bei Assemblierung mit einem molaren DOPG-zu-MSP1E3D1-Verhältnis von 80:1. **D** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der IMAC-Fractionen der MSP2N2-Reinigung. Inkubation von 20 μ l der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C. DF, Durchfluss; A, Waschfraktion mit MSP-Puffer A; M, Matrix. **E** SEC-Chromatogramm der MSP2N2-Reinigung. **F** SEC-Chromatogramm von leeren DOPG-MSP2N2-ND bei Assemblierung mit einem molaren DOPG-zu-MSP2N2-Verhältnis von 220:1.

aus *E. coli*-Expressionskulturen isoliert und gereinigt. In dem Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel der IMAC-Fractionen wurden dominierende Banden bei etwa 50 kDa erhalten, die dem erwarteten Molekulargewicht von MSP2N2 entsprechen (Abb. 4.13 D). Die Identität der Banden wurde mittels Western Blot-Analysen mit einem gegen den N-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper bestätigt. MSP2N2 wurde mit 60-300 mM Imidazol-haltigem MSP-Puffer C eluiert und in den gesammelten Fraktionen von 80-300 mM Imidazol-haltigem MSP-Puffer C nach Konzentrierung pro Liter Expressionskultur aus drei Expressionsansätzen gemittelten Ausbeuten von $16,2 \pm 0,9$ mg gereinigtem MSP2N2 erhalten. Konzentrierte MSP2N2-Proteine wurden weiter *via* Größenausschlusschromatographie gereinigt, wobei ein SEC-Chromatogramm mit drei Maxima bei Elutionsvolumina von etwa 12 ml, 14 ml und 15,5 ml erhalten wurde (Abb. 4.13 E), was auf das anteilige Vorliegen von MSP2N2 als Dimere bzw. in verschiedenen Oligomerisierungszuständen hindeuten könnte. Nach Assemblierung von DOPG-MSP2N2-ND nach Tab. 3.9 wurde ein SEC-Chromatogramm erhalten, bei dem neben dem Aggregatpeak bei etwa 8 ml zwei Absorptionsmaxima bei Elutionsvolumina von etwa 10,5 ml (Fraktionen A6-A8) und 12,5 ml (Fraktionen A10-A11) detektiert wurden (Abb. 4.13 F). Bei sämtlichen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Assemblierungsansätzen wurden auch bei Variieren des molaren DOPG-zu-MSP2N2-Verhältnisses von 190:1 bis 400:1 keine monodispersen Partikel erhalten. Die in diesen SEC-Fractionen eluierten Partikel wurden zur Identitätsprüfung auf möglicherweise assemblierten DOPG-MSP2N2-ND weiter *via* TEM mit Negativkontrastierung untersucht.

Zunächst wurden als Referenz die Größe und Form der assemblierten leeren DOPG-MSP1E3D1-ND durch PD Dr. Philipp Arnold elektronenmikroskopisch untersucht. Abb. 4.14 A zeigt eine TEM-Aufnahme mit Negativkontrastierung, die auf eine homogene Größenverteilung und scheibenförmige Partikel hinwies. Aggregate wurden entsprechend der SEC-Resultate kaum gesichtet und die scheibenförmigen DOPG-MSP1E3D1-ND orientierten sich dabei fast ausschließlich planar auf dem *Grid*, sodass Seitenansichten nur selten auftraten. Die Partikel konnten in 2D-Klassensummen zusammengefasst und aus diesen Bildern von 2D-Klassensummen errechnet werden (Abb. 4.14 B). Die 2D-Klassensummenbilder visualisierten die erwarteten scheibenförmigen und Nanodisc-artigen Partikel, bei denen ein innerer, dunkel erscheinender Lipidbilayer vermutlich durch einen weiß erscheinenden Ring aus MSP1E3D1-Protein begrenzt wurde. Die Seitenansicht zeigte zudem deutlich die diskoidale Form der hergestellten Nanodiscs. Durch manuelles Ausmessen mittels ImageJ-Software wurde ein Außendurchmesser der DOPG-MSP1E3D1-ND von etwa 12-13 nm und eine Dicke von etwa 6,5 nm bestimmt, was den erwarteten Dimensionen von DOPG-MSP1E3D1-ND entspricht (Denisov et al., 2004). Zur Überprüfung der Integrität des MSP1E3D1-Proteinanteils der assemblierten Nanodiscs wurde ein CD-Spektrum aufgenommen (Abb. 4.14 C). Das CD-Spektrum wies den für rein helikale Proteine charakteristischen W-förmigen Kurvenverlauf mit zwei lokalen Minima bei etwa 209 nm und 222 nm auf. Dies bestätigt das Vorliegen von Nanodiscs mit MSP1E3D1 in rein helikaler Sekundärstruktur in Abwesenheit von unstrukturierten Proteinaggregaten. In den DOPG-MSP2N2-ND-Assemblierungsansätzen wurden wie oben gezeigt im SEC-Chromatogramm zwei Maxima erhalten, deren Partikel im Folgenden analysiert und differenziert wurden. Abb. 4.14 D zeigt eine TEM-Aufnahme der bei geringerem Elutionsvolumen liegenden SEC-Fractionen A6-A8. Es wurden sehr größeninhomogene Partikel mit Außendurchmessern im Bereich von 10-35 nm visualisiert. Im dazugehörigen CD-Spektrum (Abb. 4.14 E) wurde ein vom für rein helikale Proteine typischen W-förmigen Verlauf abweichender Kurvenverlauf mit einem absolutem Minimum bei etwa 209 nm erhalten, was möglicherweise auf fehlgefaltete oder unstrukturierte MSP2N2-Proteine hindeutet. In diesen Frak-

tionen lagen vermutlich nicht die erwünschten durch helikales MSP2N2 begrenzten Nanodiscs vor. In Abb. 4.14 F ist eine TEM-Aufnahme der SEC-Fractionen A10-A11 gezeigt, für die eine etwas homogenere Größenverteilung mit einigen größeren Partikeln erhalten und ein durchschnittlicher Außendurchmesser der Partikel von etwa 11-12 nm bestimmt wurde. Dieser liegt etwas unter dem Außendurchmesser von DOPG-MSP1E3D1-ND und könnte darauf hinweisen, dass ein Molekül MSP2N2 durch doppelte Windung um den Nanodiscipidbilayer dieselbe Funktion als MSP-Stützprotein wie zwei Moleküle MSP1E3D1 einnimmt. Die Partikel der SEC-Fractionen A10-A11 zeigten im CD-Spektrum einen für helikale Proteine typischen W-förmigen Kurvenverlauf mit lokalen Minima bei etwa 209 nm und 222 nm (Abb. 4.14 G). Dies deutete vermutlich auf die Präsenz von Nanodisc-ähnlichen Partikeln mit geringeren Dimensionen als dem erwarteten Außendurchmesser von DOPG-MSP2N2-ND von etwa 15-17 nm (Sligar & Denisov, 2021) hin. Durch Variation des zur Nanodiscassemblierung eingesetzten molaren Stoffmengenverhältnisses von Lipid zu MSP sollte die Herstellung der größeren DOPG-MSP2N2-ND erreicht werden. Aus diesem Grund wurde das molare DOPG-zu-MSP2N2-Verhältnis von 220:1 auf bis zu 400:1 erhöht und die Assemblierungsansätze den ansonsten identischen Inkubationsbedingungen ausgesetzt. Die Veränderungen der Stoffmengenverhältnisse führten jedoch zu keiner homogenen Größenverteilung und zu ähnlichen SEC-Chromatogrammen wie in Abb. 4.13 F gezeigt. Auch unter Verwendung des Lipids POPG wurden keine größenhomogenen MSP2N2-Nanodiscs erhalten, sodass in Folge zunächst Versuche zur posttranslationalen Rekonstitution von PfFNTG107S in DOPG-MSP1E3D1-ND unternommen wurden.

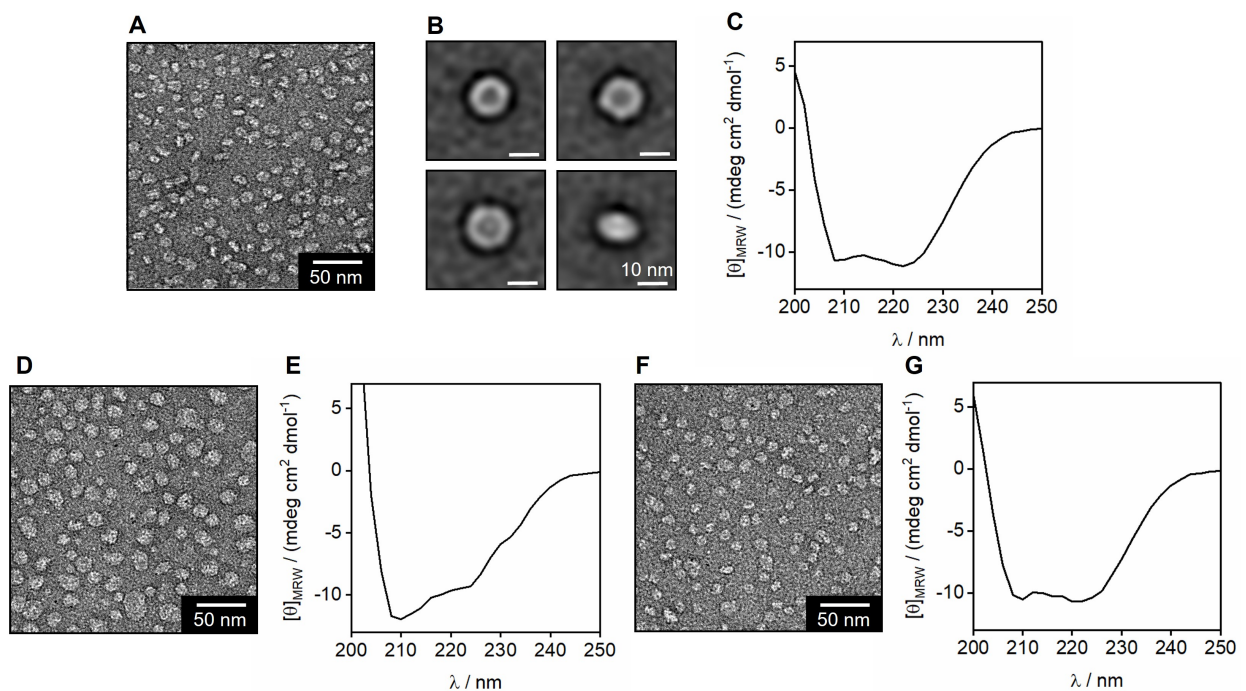


Abb. 4.14: Untersuchung von leeren DOPG-MSP1E3D1-ND und DOPG-MSP2N2-ND. **A** Repräsentativer Ausschnitt aus einer TEM-Aufnahme mit Negativkontrastierung von assemblierten DOPG-MSP1E3D1-ND (Skalierungsbalken: 50 nm). **B** 2D-Klassensummenbilder von assemblierten DOPG-MSP1E3D1-ND (Skalierungsbalken: 10 nm). **C** CD-Spektrum von DOPG-MSP1E3D1-ND. **D** Repräsentativer Ausschnitt aus einer TEM-Aufnahme mit Negativkontrastierung der SEC-Fractionen A6-A8 von DOPG-MSP2N2-ND-Assemblierungsansätzen (Skalierungsbalken: 50 nm). **E** CD-Spektrum der SEC-Fractionen A6-A8 von DOPG-MSP2N2-ND-Assemblierungsansätzen. **F** Repräsentativer Ausschnitt aus einer TEM-Aufnahme mit Negativkontrastierung der SEC-Fractionen A10-A11 von DOPG-MSP2N2-ND-Assemblierungsansätzen (Skalierungsbalken: 50 nm). **G** CD-Spektrum der SEC-Fractionen A10-A11 von DOPG-MSP2N2-ND-Assemblierungsansätzen.

4.8 PfFNTG107S wird posttranslational in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiert

Zur Stabilisierung von zellfrei hergestelltem PfFNTG107S in DOPG-MSP1E3D1-ND wurde die posttranslationale Rekonstitution des vollständig synthetisierten Membranproteins in Nanodiscs angestrebt. Mittels SEC gereinigtes und mit Brij78 solubilisiertes PfFNTG107S wurde dazu mit IMAC-gereinigtem MSP1E3D1 und mit Natriumcholat solubiliertem DOPG gemischt und während Entfernung sämtlicher Detergenzien in die sich assemblierenden Nanodiscs rekonstituiert. Abb. 4.15 A zeigt das SEC-Chromatogramm von einem posttranslationalen Rekonstitutionsansatz im molaren Verhältnis von 1:2,5:60 (PfFNTG107S:MSP1E3D1:DOPG). Es wurden neben dem Aggregatpeak zwei nicht vollständig getrennte Peaks entsprechend der SEC-Fractionen A5-A7 und A8-A10 erhalten. Um die SEC-Fractionen mit in Nanodiscs rekonstituierten PfFNTG107S-Proteinen zu identifizieren, wurden die entsprechenden SEC-Fractionen in Western Blot-Analysen untersucht (Abb. 4.15 B). In den dem Peak A5-A7 entsprechenden SEC-Fractionen wurde neben Chemilumineszenzbanden bei etwa 34 kDa, die sowohl dem Molekulargewicht des PfFNTG107S-Monomers als auch des MSP1E3D1-Proteins entsprechen, weitere Banden bei etwa 70 kDa detektiert. Diese könnten auf das Vorliegen von in Nanodiscs rekonstituiertem PfFNTG107S hindeuten, welches nach Denaturierung der Nanodiscs während der Probeninkubation vor der SDS-PAGE als SDS-resistente Dimere (ca. 68 kDa) bzw. Oligomere vorlag. Zur Bestätigung von in Nanodiscs rekonstituiertem PfFNTG107S wurden in weiteren Untersuchungen TEM-Aufnahmen mit Negativkontrastierung der SEC-Fractionen A5-A7 und A8-A10 analysiert. In Abb. 4.15 C ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme nach Negativkontrastierung der SEC-Fractionen A5-A7 dargestellt. Die Partikel zeigten möglicherweise proteinbeinhaltende Nanodiscs mit einem Durchmesser von etwa 14 nm. In den Seitenansichten

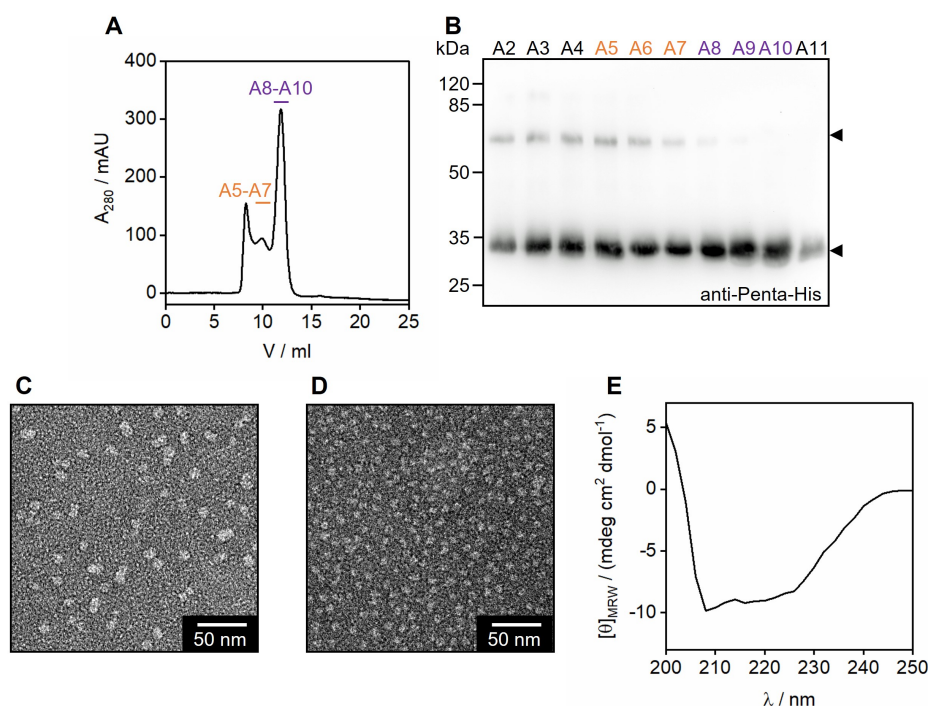


Abb. 4.15: Posttranslationale Rekonstitution von PfFNTG107S in DOPG-MSP1E3D1-ND. **A** SEC-Chromatogramm von in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiertem PfFNTG107S. **B** Western Blot-Analyse der SEC-Fractionen. Inkubation von 15 μ l der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper. **C** TEM-Aufnahme mit Negativkontrastierung der SEC-Fractionen A5-A7. **D** TEM-Aufnahme mit Negativkontrastierung der SEC-Fractionen A8-A10. **E** CD-Spektrum der SEC-Fractionen A5-A7.

der Partikel waren möglicherweise Proteinanteile erkennbar, die annähernd orthogonal aus den durch die Nanodiscipidbilayer definierten Ebenen herausragten. Hingegen waren in den SEC-Fractionen A8-A10 deutlich kleinere Partikel mit Außendurchmessern von etwa 11 nm zu erkennen (Abb. 4.15 D). Eine sichere Unterscheidung zwischen leeren und PfFNTG107S-beladenen Nanodiscs sowie möglicherweise vorhandenen PfFNTG107S-Pentameren konnte in den TEM-Aufnahmen aufgrund der begrenzten Auflösung nicht getroffen werden. Zur Integritätsprüfung von potenziellen Nanodiscs mit rekonstituiertem PfFNTG107S aufgenommene CD-Spektren der SEC-Fractionen A5-A7 (Abb. 4.15 E) zeigten einen annähernd W-förmigen Kurvenverlauf und könnten somit auf integrierte helikale PfFNTG107S-Membranproteine hinweisen. Allerdings wurden neben den typischen lokalen Minima bei 209 nm und 222 nm weitere lokale Minima erhalten, die möglicherweise auf unstrukturierte Proteinbestandteile neben vermutlich vorliegenden rein helikalen PfFNTG107S-Nanodisc-Komplexen hinweisen.

Um höher auflösende Informationen über die potenzielle Beladung von Nanodiscs mit PfFNTG107S zu erhalten, wurden die in den SEC-Fractionen A5-A7 vorhandenen Partikel nach einem weiteren SEC-Durchlauf in Zusammenarbeit mit Jan-Hannes Schäfer (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Arne Möller, Osnabrück) mittels Cryo-Elektronenmikroskopie untersucht. Abb. 4.16 A zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme von potenziell in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiertem PfFNTG107S. Neben wenigen vereinzelt Partikeln, die Nanodiscs mit einem Außendurchmesser von etwa 13 nm entsprechen könnten, wurden vor allem starke Partikelaggregationen beobachtet. Aufgrund der wenigen vereinzelt Partikel konnte keine weitergehende Analyse der Partikeldurchmesser und -strukturen unternommen werden. Da potenziell vorliegende PfFNTG107S-Nanodisc-Partikel vermutlich über die an PfFNTG107S-Membranproteinen und MSP1E3D1-Proteinen gebundenen Poly-His-Tags aggregierten, wurden Versuche zur Störung dieser unerwünschten Interaktion durch Zufügen von Imidazol durchgeführt. Dazu sollten über die Poly-His-Tags während des Blottens der Proteinproben auf die *Carbon Grids* vermittelte Interaktionen in Gegenwart von 50 mM Imidazol aufgebrochen bzw. verhindert werden. Jedoch war auch nach Imidazol-Vorbehandlung in Cryo-EM-Aufnahmen eine unverändert starke Partikelaggregation zu erkennen (Abb. 4.16 B). So wurden mit einem alternativen Probenpräparationsprotokoll Versuche zur Verhinderung von Interaktionen durch Erzwingen eines größeren Abstands zwischen den Nanodiscs unternommen. Die Abstandsvergrößerung zwischen den Nanodiscs könnte durch PEGylierung der freien Aminogruppen von MSP1E3D1

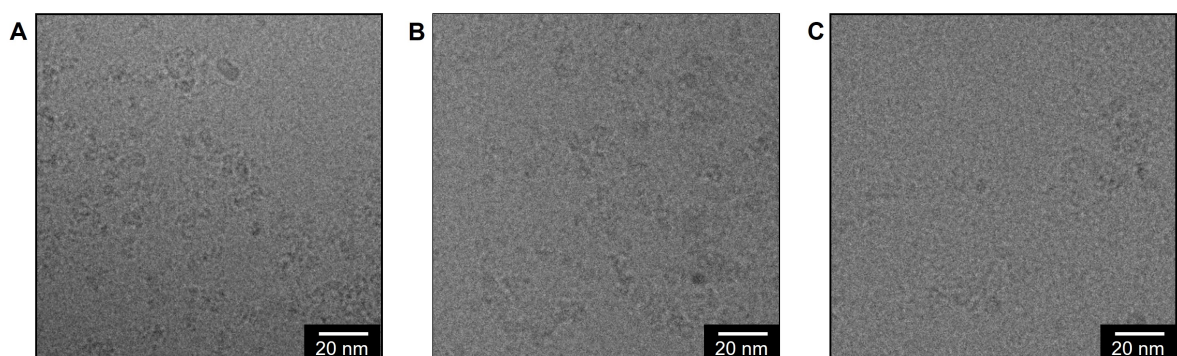


Abb. 4.16: Elektronenmikroskopische Untersuchung von potenziell posttranslational in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiertem PfFNTG107S. **A** Cryo-EM-Aufnahme der unbehandelten SEC-Fractionen A5-A7 (Skalierungsbalken: 20 nm). **B** Cryo-EM-Aufnahmen der mit 50 mM Imidazol vorbehandelten SEC-Fractionen A5-A7 (Skalierungsbalken: 20 nm). **C** Cryo-EM-Aufnahmen der SEC-Fractionen A5-A7 nach Versuch der PEGylierung (Skalierungsbalken: 20 nm).

realisiert werden. Dazu wurden die Proben vor dem Vitrifizieren für 1 h bei 4 °C mit 2 mM MS(PEG)₄ in einem HEPES/NaCl-Puffer versetzt. Allerdings konnte auch mittels PEGylierung keine wesentliche Verringerung der Partikelaggregation in den Cryo-EM-Aufnahmen erzielt werden (Abb. 4.16 C). Dies könnte durch die mangelnde Validierung der durchgeführten PEGylierungsmethode begründet werden, da kein experimenteller Nachweis für die erfolgte PEGylierung erbracht werden konnte. Damit konnten keine Untersuchungen zur PfFNTG107S-Rekonstitutionseffizienz in DOPG-MSP1E3D1-ND durchgeführt werden.

4.9 PfFNTG107S-GFP markiert Membranprotein-beinhaltende Nanodiscs

Zur Identifizierung der mit PfFNTG107S beladenen Nanodiscs wurde PfFNTG107S mit C-terminal fusioniertem GFP-Fluoreszenzindikator (PfFNTG107S-GFP) verwendet. Dazu wurden PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteine zunächst in 0,8 % (m/v) Brij78 zellfrei hergestellt, gereinigt und posttranslational in DOPG-MSP1E3D1-Nanodiscs rekonstituiert. Abb. 4.17 A zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel nach IMAC-Reinigung in Präsenz von 0,05 % (m/v) Brij78. PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteine mit dem Molekulargewicht von etwa 50 kDa wurden hauptsächlich mit 80-300 mM Imidazol-haltigem Reinigungspuffer und damit in vergleichbaren IMAC-Fractionen wie PfFNTG107S ohne GFP-Fluoreszenzindikator (vgl. Kap. 4.2) eluiert. Banden bei etwa 70 kDa wiesen auf nicht korrekt gefaltetes PfFNTG107S-GFP infolge nicht ausreichender Solubilisierung während der zellfreien Proteinsynthese hin und mögliche Fusionsproteinoligomere wurden als höhermolekulargewichtige verschmierte Banden repräsentiert. In der zugehörigen Western Blot-Analyse (Abb. 4.17 B) wurden die Banden bei etwa 50 kDa und 70 kDa ebenfalls detektiert, wobei die unteren 50 kDa-Banden jeweils deutlich intensiver erschienen. Es waren ebenso Chemilumineszenzsignale im hochmolekulargewichtigen Bereich erkennbar. Die intensiven 50 kDa-Banden wurden ebenso in der In-Gel-Fluoreszenz-Analyse (Abb. 4.17 C) registriert, während bei 70 kDa keine durch den GFP-Fusionstag hervorgerufene Fluoreszenz detektiert wurde. In den zusammengegebenen IMAC-Fractionen mit 100-300 mM Imidazol-haltigem Reinigungspuffer wurde nach Konzentrieren (100 kDa MWCO) aus 1 ml Reaktionsansatz eine Ausbeute von etwa 1,2 mg PfFNTG107S-GFP erzielt.

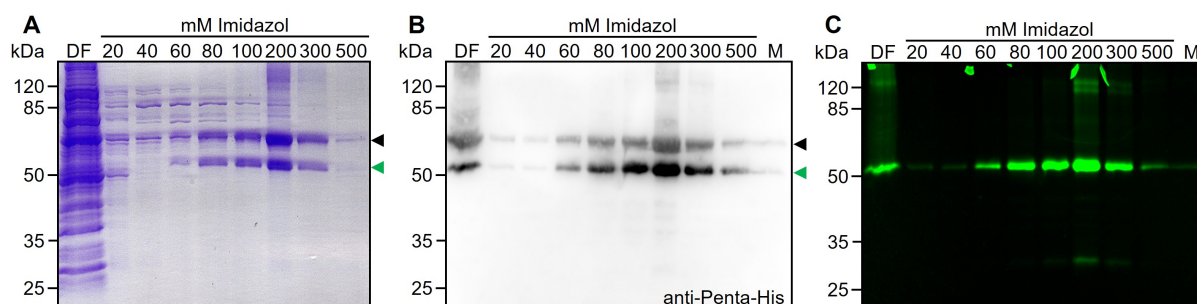


Abb. 4.17: IMAC-Reinigung des zellfrei hergestellten PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteins. **A** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der IMAC-Fractionen. Inkubation von 20 µl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C. **B** Western Blot-Analyse der IMAC-Fractionen. Inkubation von 20 µl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper. **C** In-Gel-Fluoreszenz-Analyse der IMAC-Fractionen. Inkubation von 20 µl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C und Belichtung für 2 s. DF, Durchfluss; M, Matrix.

Zur Integration des IMAC-gereinigten PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteins in DOPG-MSP1E3D1-ND wurde ein Ansatz zur posttranslationalen Rekonstitution im molaren Verhältnis von 1:2,5:60 (PfFNTG107S-GFP:MSP1E3D1:DOPG) verwendet und der Assemblierungsansatz nachfolgend der Größenausschlusschromatographie zugeführt. In Abb. 4.18 A ist eine schematische Darstellung von in Nanodiscs rekonsti-

tuierterem PfFNTG107S-GFP-Fusionsprotein gezeigt. Nanodiscs und PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteine werden durch Absorptionsmessungen bei 280 nm nachgewiesen, während die Absorptionsmessung bei 395 nm die Gegenwart von PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteinen anzeigt. Es erschienen bei Absorptionsmessung bei 280 nm analog zu den Rekonstitutionsversuchen von PfFNTG107S in DOPG-MSP1E3D1-ND (vgl. Kap. 4.8) neben dem Aggregatpeak zwei Maxima in den SEC-Fractionen A5-A7 und A8-A10 (Abb. 4.18 B). Die entsprechenden SEC-Fractionen wurden in Western Blot- und In-Gel-Fluoreszenz-Analysen untersucht (Abb. 4.18 C). Der Hauptanteil der PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteine wurde in den SEC-Fractionen A5-A7 eluiert, wobei fluoreszierende Banden bei etwa 50 kDa nur mit schwachen Anteilen und der maximalen Fluoreszenzintensität in den SEC-Fractionen A8-A9 in der In-Gel-Fluoreszenz-Analyse erschienen. Die MSP1E3D1 entsprechenden Banden bei etwa 34 kDa wurden vor allem in den SEC-Fractionen A4-A8 detektiert und weitere Banden bei etwa 27 kDa wurden vermutlich durch GFP ohne Fusion an PfFNTG107S hervorgerufen. Zur Identifizierung der mit PfFNTG107S-GFP beladenen Nanodiscs wurden die SEC-Fractionen A5-A7 und A8-A10 in das SEC-System reinjiziert und die von GFP hervorgerufene Absorption bei 395 nm registriert. Die stärkste Absorption bei 395 nm wurde in den SEC-Fractionen A5-A7 detektiert, in denen demnach die Nanodiscs mit rekonstituiertem PfFNTG107S-GFP-Fusionsprotein vorlagen (Abb. 4.18 D). Dies unterstützt die Vermutung, dass proteinbeladene Nanodiscs aufgrund der gesteigerten Partikelgröße bei einem geringeren Elutionsvolumen im Vergleich zu leeren Nanodiscs fraktioniert wurden. In den SEC-Fractionen A8-A10 wurden entgegen der Beobachtungen aus der In-Gel-Fluoreszenz-Analyse nur sehr schwache Absorptionen bei 395 nm detektiert (Abb. 4.18 E).

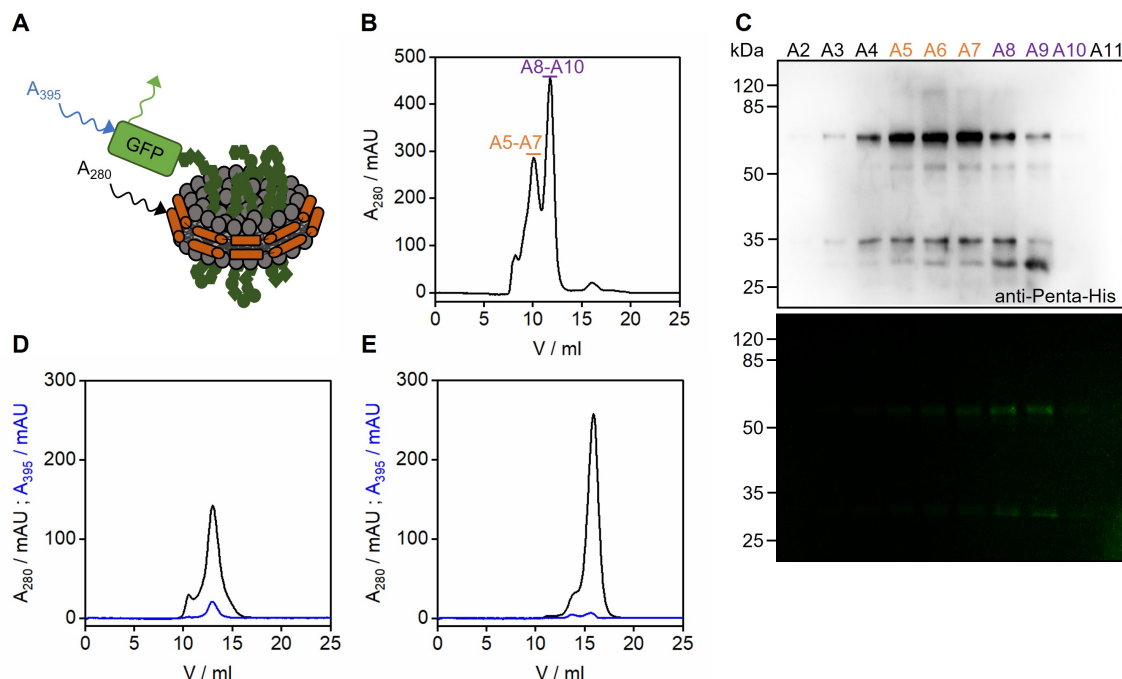


Abb. 4.18: Größenausschlusschromatographie von in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiertem PfFNTG107S-GFP-Fusionsprotein. **A** Skizze des in Nanodiscs rekonstituierten PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteins. **B** SEC-Chromatogramm von in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiertem PfFNTG107S-GFP-Fusionsprotein. **C** Western Blot- und In-Gel-Fluoreszenz-Analyse (Belichtung für 20 s) der SEC-Fractionen. Inkubation von 20 μ l der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper. **D** Reinjektion der SEC-Fractionen A5-A7 bei gleichzeitiger Detektion der durch GFP verursachten Absorption bei 395 nm. **E** Reinjektion der SEC-Fractionen A8-A10 bei gleichzeitiger Detektion der durch GFP verursachten Absorption bei 395 nm.

4.10 PfFNTG107S wird posttranslational in Ecpl-Nanodiscs rekonstituiert

Zur Verbesserung der PfFNTG107S-Rekonstitutionseffizienz wurden weitere Nanodiscs herangezogen. So sollten durch Variation des Lipidanteils ein Lipidbilayer mit differenzierten biophysikalischen Eigenschaften bereitgestellt und durch Wahl von MSP2N2 anstatt MSP1E3D1 Nanodiscs mit einem erweiterten Lipidbilayerdurchmesser hergestellt werden. Zunächst wurden dazu Versuche zur posttranslationalen Rekonstitution von zellfrei in Gegenwart von Brij78 hergestelltem PfFNTG107S in Ecpl-MSP1E3D1-ND durchgeführt. Diese beinhalten anstatt des synthetischen, anionischen Lipids DOPG eine Mischung aus kommerziell erhältlichen und aus *E. coli* extrahierten polaren Lipiden (Ecpl). Abb. 4.19 A zeigt das SEC-Chromatogramm eines Rekonstitutionsansatzes mit einem eingesetzten molaren Verhältnis von 1:2,5:70 (PfFNTG107S:MSP1E3D1:Ecpl-Lipide). Es wurde ein Hauptpeak bei einem Elutionsvolumen von etwa 11,5 ml entsprechend der SEC-Fractionen A8-A10 erhalten. Die zugehörige Western Blot-Analyse (Abb. 4.19 B) zeigte vermutlich die Präsenz von PfFNTG107S und MSP1E3D1 als Chemilumineszenzbanden bei einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa hauptsächlich in den dem Hauptpeak entsprechenden SEC-Fractionen. Nur wenig intensive Banden wurden bei etwa 70 kDa erhalten, die PfFNTG107S-Dimeren entsprechen könnten und bei einem geringeren Elutionsvolumen in den SEC-Fractionen A5-A8 vorlagen. Es wurden Versuche zur Überprüfung der Rekonstitutionseffizienz durch TEM-Aufnahmen mit Negativkontrastierung unternommen, in denen aufgrund der geringen Auflösung und der begrenzten Bildqualität nicht zwischen leeren und potenziell PfFNTG107S-gefüllten Nanodiscs differenziert werden konnte. Aus diesem Grund wurde zur Untersuchung der Rekonstitutionseffizienzen PfFNTG107S in Nanodiscs

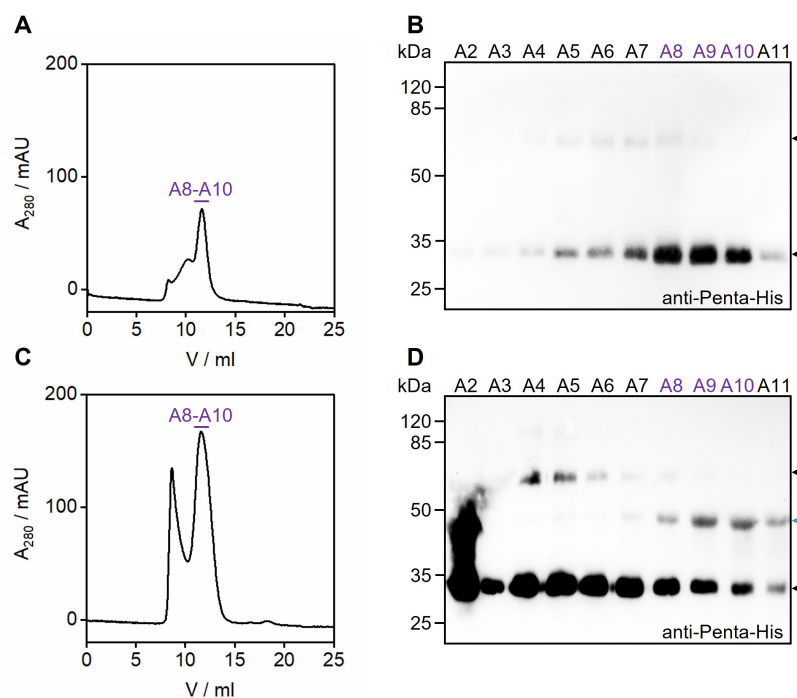


Abb. 4.19: Posttranslationale Rekonstitution von PfFNTG107S in Ecpl-MSP1E3D1-ND und in Ecpl-MSP2N2-ND. **A** SEC-Chromatogramm von in Ecpl-MSP1E3D1-ND rekonstituiertem PfFNTG107S. **B** Western Blot-Analyse von in Ecpl-MSP1E3D1-ND rekonstituiertem PfFNTG107S nach SEC. Inkubation von 20 µl der mit SDS versetzten SEC-Fractionen bei 37 °C und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper. **C** SEC-Chromatogramm von in Ecpl-MSP2N2-ND rekonstituiertem PfFNTG107S. **D** Western Blot-Analyse von in Ecpl-MSP2N2-ND rekonstituiertem PfFNTG107S nach SEC. Inkubation von 20 µl der mit SDS versetzten SEC-Fractionen bei 37 °C und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper.

mit größerem Durchmesser eingebaut. Zur posttranslationalen Rekonstitution in Ecpl-MSP2N2-ND mit erweitertem Durchmesser wurde ein Assemblierungsansatz mit einem molaren Verhältnis von 1:2,5:300 (PfFNTG107S:MSP2N2:Ecpl-Lipide) vorbereitet und nach Rekonstitutionsversuch ein SEC-Durchlauf analysiert (Abb. 4.19 C). Es wurden zwei nicht basisliniengetrennte Peaks erhalten, wobei der Peak bei einem Elutionsvolumen von etwa 8,5 ml vermutlich Aggregaten zugeordnet werden kann. Der Hauptpeak mit höherer Intensität lag entsprechend den SEC-Fraktionen A8-A10 bei etwa 11,5 ml vor. Die zugehörige Western Blot-Analyse zeigte die Gegenwart von PfFNTG107S in allen betrachteten SEC-Fraktionen als Banden bei einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa (Abb. 4.19 D). Neben diesen Banden waren potenzielle PfFNTG107S-Dimerbanden bei etwa 70 kDa in den SEC-Fraktionen zwischen dem Aggregatpeak und dem Hauptpeak zu erkennen. MSP2N2 entsprechende Banden bei etwa 50 kDa wurden ausschließlich in den dem Hauptpeak entsprechenden SEC-Fraktionen detektiert, was auf die erfolgreiche Rekonstitution eines PfFNTG107S-Anteils in Ecpl-MSP2N2-ND hindeuten könnte. Neben potenziell in Nanodiscs rekonstituiertem PfFNTG107S wurden auch mit in der Proteinprobe verbleibenden Brij78-Molekülen solubilisierter PfFNTG107S-Membranproteine in den SEC-Fraktionen A4-A6 vermutet, wodurch vermutlich eine begrenzte Rekonstitutionseffizienz gezeigt wurde. Durch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Variationen der vorliegenden Stoffmengenverhältnisse konnte keine Erhöhung der Rekonstitutionseffizienz von PfFNTG107S bei Assemblierung verschiedenartiger Nanodiscs erzielt werden.

4.11 PfFNT- und PfCRT-Mutanten werden in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiert

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Versuche zur Strukturaufklärung weiterer zellfrei hergestellter PfFNT- und PfCRT-Mutanten *via* Cryo-EM unternommen. Die entsprechenden Membranproteine wurden in Gegenwart von 0,8 % (m/v) Brij78 zellfrei hergestellt und mittels IMAC und SEC in Präsenz von 0,05 % (m/v) Brij78 gereinigt und anschließend posttranslational in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiert. Abb. 4.20 A zeigt das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel der IMAC-Fraktionen nach PfFNTV196L-Reinigung und die Elution des Proteins mit 40-300 mM Imidazol-haltigem Reinigungspuffer. Neben den PfFNTV196L-Monomeren entsprechenden 34 kDa-Banden lagen auch potenzielle Dimerbanden bei etwa 70 kDa vor. In den für die SEC vereinigten IMAC-Fraktionen von 80-300 mM Imidazol wurde eine Gesamtproteinmasse von etwa 1,5 mg erhalten. Im SEC-Chromatogramm der mit Brij78 solubilisierten Proteine wurden keine getrennten Peaks detektiert, sondern analog zur PfFNTG107S-SEC ein Maximum bei einem Elutionsvolumen von etwa 12 ml erhalten (Abb. 4.20 B). Nach Rekonstitutionsversuch in DOPG-MSP1E3D1-ND wurde ein dominierender Peak bei etwa 12 ml sowie weitere Maxima bei geringeren Elutionsvolumina erhalten (Abb. 4.20 C). Neben möglicherweise in Nanodiscs rekonstituiertem PfFNTV196L lag vermutlich auch ein Anteil nicht rekonstituierter Proteine vor. Das Elutionsprofil des IMAC-gereinigten PfFNTG21E (Abb. 4.20 D) entsprach dem PfFNTV196L-Elutionsprofil und in den IMAC-Fraktionen von 80-300 mM Imidazol-haltigem Reinigungspuffer wurden etwa 1,2 mg Gesamtproteinmasse erhalten. Während im SEC-Chromatogramm der mit Brij78 solubilisierten Proteine (Abb. 4.20 E) ein dominierender Peak bei einem Elutionsvolumen von etwa 12 ml erschien, entsprach die Lage des Maximums im SEC-Chromatogramm nach Rekonstitutionsversuch (Abb. 4.20 F) in etwa dem Elutionsvolumen des möglicherweise rekonstituierten PfFNTV196L. Die IMAC-Reinigung einer Chloroquin-Resistenzmutante des PfCRT (PfCRT-CQR) resultierte in dem in Abb. 4.20 G dargestellten Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel. PfCRT-CQR wurde mit 40-300 mM Imidazol-haltigem Reinigungspuffer eluiert und die Proteinidentität durch eine

Western Blot-Analyse bestätigt. Neben den PfCRT-CQR-Monomeren entsprechenden Banden bei einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa waren potenzielle Dimerbanden bei etwa 100 kDa sowie weitere höhermolekulargewichtige Banden zu erkennen. In den IMAC-Fractionen von 80-300 mM Imidazol lagen nach Konzentrierung (30 kDa MWCO) etwa 1,5 mg Gesamtprotein vor und das zugehörige SEC-Chromatogramm zeigte keine getrennten Peaks und ein Maximum bei einem Elutionsvolumen von etwa 10,5 ml (Abb. 4.20 H). Im SEC-Chromatogramm nach versuchter Rekonstitution in DOPG-MSP1E3D1-ND wurden bei ähnlichem Elutionsvolumen lokalisierte Maxima wie bei Rekonstitutionsversuchen der PfFNT-Resistenzmutanten erhalten (Abb. 4.20 I). Auch bei diesen Transportproteinmutanten konnte keine zellfreie Produktion von Membranproteinoligomeren sichergestellt werden und die Transportproteinrekonstitution in DOPG-MSP1E3D1-ND schien nur mit geringer Effizienz abzulaufen. Im Folgenden wurde die Membranproteinsynthese daher in verschiedenen zellbasierten Expressionssystemen durchgeführt.

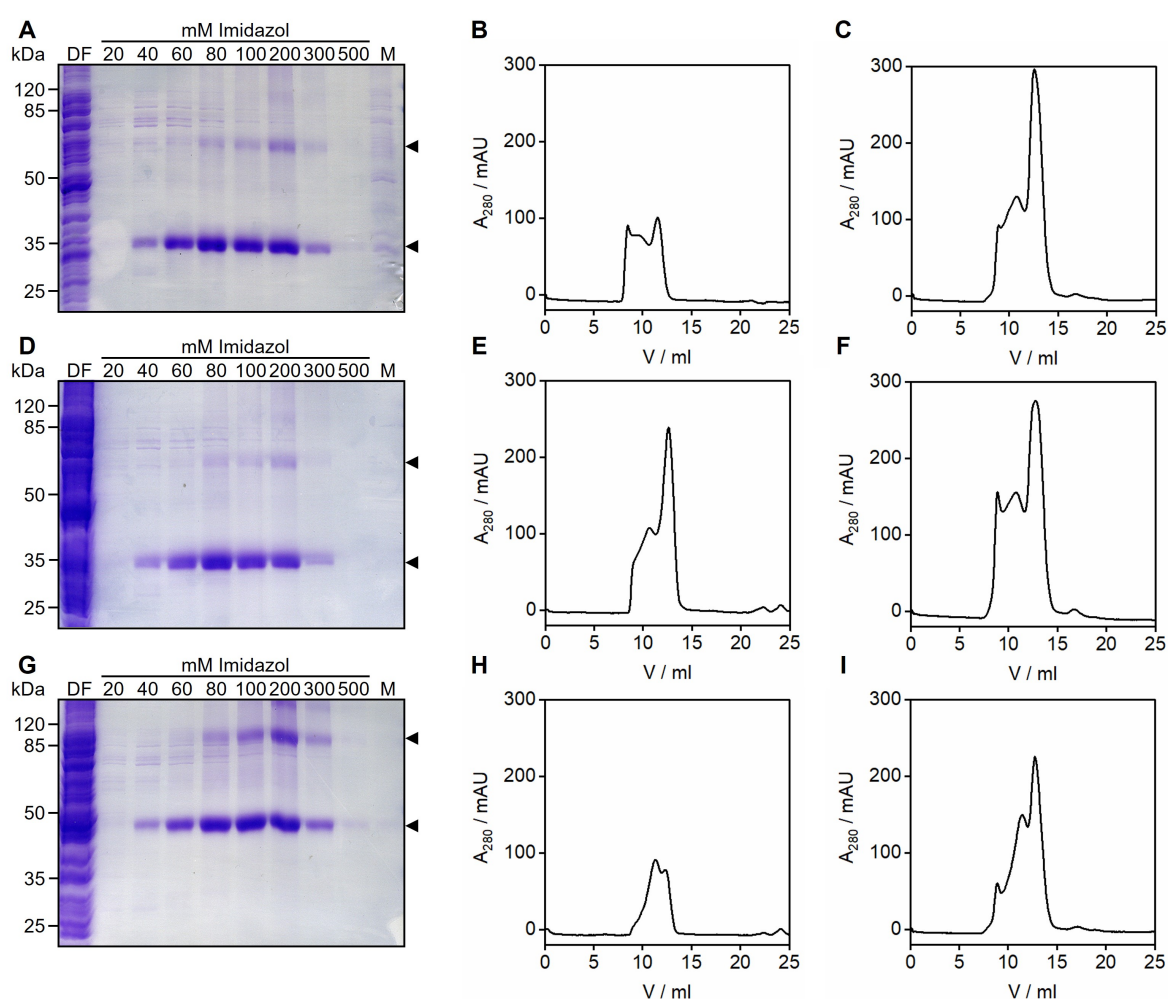


Abb. 4.20: Reinigung und posttranslationale Rekonstitution von weiteren PfFNT-Resistenzmutanten und PfCRT-CQR. **A** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der IMAC-Fractionen nach PfFNTV196L-Reinigung in 0,05 % (m/v) Brij78. Inkubation von 15 µl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C. **B** SEC-Chromatogramm von PfFNTV196L in 0,05 % (m/v) Brij78. **C** SEC-Chromatogramm von in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiertem PfFNTV196L. **D** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der IMAC-Fractionen nach PfFNTG21E-Reinigung in 0,05 % (m/v) Brij78. Inkubation von 15 µl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C. **E** SEC-Chromatogramm von PfFNTG21E in 0,05 % (m/v) Brij78. **F** SEC-Chromatogramm von in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiertem PfFNTG21E. **G** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der IMAC-Fractionen nach PfCRT-CQR-Reinigung in 0,05 % (m/v) Brij78. Inkubation von 15 µl der mit SDS versetzten Proteinproben bei 37 °C. **H** SEC-Chromatogramm von PfCRT-CQR in 0,05 % (m/v) Brij78. **I** SEC-Chromatogramm von in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiertem PfCRT-CQR.

4.12 Produktion von PfFNTG107S in HEK-Zellen

Eukaryotische HEK-Expressionssysteme sind weit verbreitet für die Produktion funktionaler Proteine verschiedener Herkunftsorganismen und so wurde z. B. das PfFNT-Wildtypprotein in HEK-Zellen hergestellt und der Strukturaufklärung zugänglich gemacht (Jakobowska et al., 2021; Lyu et al., 2021). Für die Produktion von PfFNTG107S sollte hier ein auf HEK-Zellen basierendes Expressionssystem etabliert werden, welches zur Gewährleistung von hohen PfFNTG107S-Ausbeuten die metabolische Selektion von PfFNTG107S-exprimierenden Zellen beinhaltet. Dazu wurde die in Kap. 3.2.9 vorgestellte Methode zur metabolischen Selektion unter Zusatz von Metformin und des MCT1-Inhibitors AZD-3965 verfolgt und die Validität des etablierten Selektionsmechanismus im Folgenden überprüft. Abb. 4.21 A zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen von metabolisch selektierten und induzierten HEK-Zellen nach Kultivierung unter den gegebenen Bedingungen für 16 h bzw. 72 h. Nicht-metabolisch selektierte HEK-Zellen adhärten wie erwartet bereits nach 16 h und die für 72 h kultivierten HEK-Zellen teilten sich bis zu einer Konfluenz von etwa 60-80 %. Bei metabolischer Selektion ohne Induktion der PfFNTG107S-Expression waren nach 16 h nur wenige adhärierte Zellen zu erkennen und nach Selektionsbedingungen von 72 h lagen ausschließlich abgestorbene HEK-Zellen vor. HEK-Kulturen mit metabolisch selektierten Zellen mit durch Tetracyclinzugabe induzierter PfFNTG107S-Expression wiesen nach 72 h adhärierte Zellen auf. Erste Zellteilungen hatten bereits stattgefunden und es lag eine Konfluenz von etwa 30-40 % und

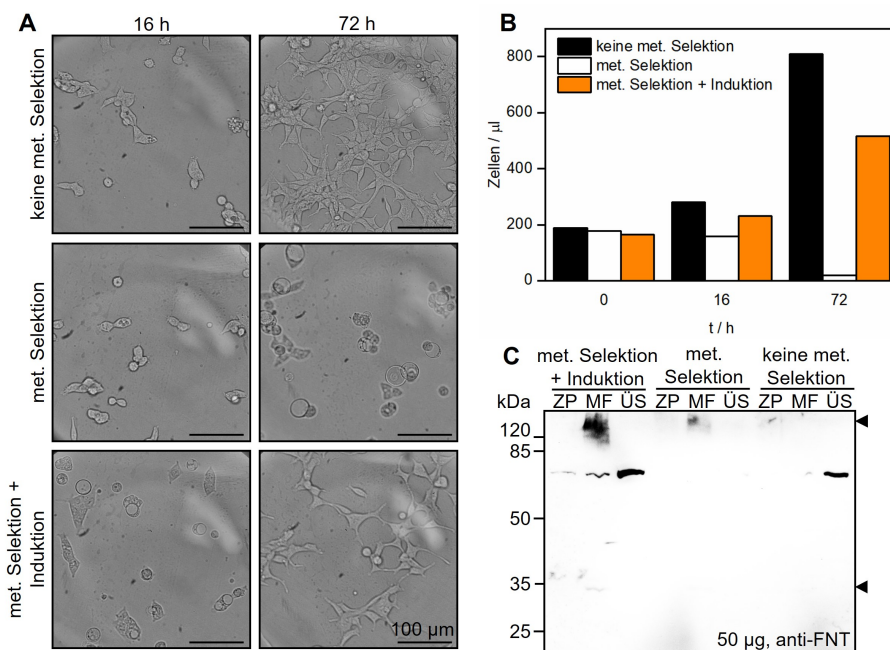


Abb. 4.21: Metabolische Selektion von PfFNTG107S-exprimierenden HEK-Zellen. **A** Lichtmikroskopische Aufnahmen von HEK-Zellen während der metabolischen Selektion. Die Bilder wurden 16 h bzw. 72 h nach Splitten der Zellen aufgenommen. Transfizierte HEK-Zellen wurden nicht-metabolisch selektiert ohne Induktion der PfFNTG107S-Expression (+ Zeocin, oben), metabolisch selektiert ohne Induktion (+ Zeocin, Metformin und AZD-3965, Mitte) oder metabolisch selektiert mit Induktion (+ Zeocin, Metformin, AZD-3965 und Tetracyclin, unten). Die Skalierungsbalken betragen 100 µm. **B** Zellzahlbestimmung der nicht-metabolisch selektierten (schwarz), metabolisch selektierten (weiß) sowie metabolisch selektierten und induzierten (orange) HEK-Zellen in einer Zellzählkammer. Es wurden zu Kultivierungsbeginn (0 h), nach 16 h und 72 h jeweils 16 Großquadrate ausgezählt und ermittelte Zellzahlen auf ein Volumen von 1 µl bezogen. **C** Western Blot-Analyse der Zellaufschlussfraktionen von metabolisch selektierten und induzierten (links), metabolisch selektierten (Mitte) sowie nicht-metabolisch selektierten (rechts) HEK-Zellen. Inkubation von 50 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 37 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. ZP, 1000 g-Zellpellet; MF, Membranfraktion; ÜS, 100.000 g-Überstand.

damit eine geringere Zelldichte als bei den nicht-metabolisch selektierten Zellen vor. Das Zellwachstum unter den drei Bedingungen wurde durch Auszählen der Zellen in einer Zellzählkammer quantifiziert (Abb. 4.21 B). Die Zellzahl der nicht-metabolisch selektierten HEK-Zellen vervierfachte sich innerhalb von 72 h von 190 Zellen/ μ l auf 809 Zellen/ μ l und entsprach damit in etwa dem erwarteten Zellwachstum bei einer Generationszeit von etwa 24 h. Metabolisch selektierte Zellen ohne induzierte PffNTG107S-Expression wiesen nach 16 h eine nahezu gleichbleibende Zellzahl von 158 Zellen/ μ l auf. Nach 72 h waren die meisten Zellen abgestorben und es wurde eine geringe Zellzahl von 18 Zellen/ μ l gezählt. Nach Induktion der PffNTG107S-Expression konnten die Zellen unter Selektionsdruck bis zu einer Zellzahl von 515 Zellen/ μ l (nach 72 h) und damit langsamer als die Zellen ohne metabolische Selektion wachsen. Das deutet auf die Herstellung von PffNTG107S als funktionales Lactattransportprotein hin, welches das Überleben der Zellen unter den gegebenen Selektionsbedingungen gewährleistet. In Abb. 4.21 C sind die in einer Western Blot-Analyse untersuchten Zellaufschlussfraktionen von metabolisch selektierten und nicht-metabolisch selektierten HEK-Zellen gezeigt. Bei metabolisch selektierten und induzierten Zellen wurde in der HEK-Membranfraktion eine hochmolekulargewichtige Bande erhalten, die dem Molekulargewicht des PffNTG107S-Pentamers entsprechen könnte. Neben dieser Bande wurde bei etwa 80 kDa eine weitere intensive Bande durch den anti-FNT-Antikörper detektiert, die vor allem im 100.000 g-Überstand vorlag. Metabolisch selektierte, nicht-induzierte Zellen zeigten eine sehr wenig intensive hochmolekulargewichtige Bande in der HEK-Membranfraktion, was auf eine nur sehr schwache Hintergrundexpression von PffNTG107S unter Selektionsbedingungen hindeuten könnte. Bei nicht-metabolisch selektierten Zellen wurde neben der vermutlich artifiziellen 80 kDa-Bande im 100.000 g-Überstand keine von PffNTG107S hervorgerufene Chemilumineszenzbande erhalten. Zusammengefasst bestätigen die hier dargestellten Ergebnisse die Funktionsweise der durchgeführten metabolischen Selektion. Durch Induktion der PffNTG107S-Expression wurde ein Lactattransportprotein zur Ausschleusung des intrazellulär anfallenden Lactats hergestellt, wodurch die Viabilität der unter Selektionsdruck stehenden PffNTG107S-exprimierenden HEK-Zellen sichergestellt wurde.

Metabolisch selektierte und induzierte HEK-Zellen wurden im Folgenden zur PffNTG107S-Produktion verwendet. Abb. 4.22 A zeigt die Western Blot-Analyse der Zentrifugationsfraktionen nach initialen Solubilisierungsversuchen. Nach Denaturierung der Solubilisierungsproben mit SDS bei 60 °C wurden dem PffNTG107S-Monomer entsprechende Banden bei etwa 34 kDa im 100.000 g-Überstand detektiert. Die intensivste Chemilumineszenzbande des Solubilisierungsüberstands lag neben dem SDS-Kontrollansatz bei dem Solubilisierungsansatz mit 1,5 % (m/v) DDM und 0,15 % (m/v) CHS vor. Im Solubilisierungsansatz mit 1 % (m/v) CHAPS, 0,5 % (m/v) DDM und 0,2 % (m/v) CHS wurde entgegen der Erfahrungen von Dr. Iga Jakobowska und anderen Mitarbeitenden der HEK-Kultivierung bei Intana Bioscience kein PffNTG107S im Solubilisierungsüberstand detektiert, sodass folgende Solubilisierungsansätze abweichend ohne CHAPS-Zusatz durchgeführt wurden. Daher sollte ein für die PffNTG107S-Solubilisierung aus Membranfraktionen besser geeignetes Detergenz gefunden werden, wozu zunächst weitestgehend erfolglose Detergenzscreenings durchgeführt wurden. Die Solubilisierungsüberstände eines Detergenzkonzentrationscreenings wurden in der in Abb. 4.22 B gezeigten Western Blot-Analyse untersucht. Dabei wurde mit einer geringen DDM-Konzentration von 0,5 % (m/v) die besten Solubilisierungsausbeuten erhalten. Dies wurde auch in mehreren Folgeversuchen mit verschiedenen Massen (150 μ g bzw. 500 μ g) von im Solubilisierungsansatz eingesetzten Gesamtprotein bestätigt. Der Kontrollansatz mit 1 % (m/v) SDS zeigte nur eine geringe Menge an solubiliertem PffNTG107S, was durch die PffNTG107S-Präzipitation

zusammen mit dem in Kälte ausfallenden SDS während der 100.000 *g*-Zentrifugation erklärt werden könnte. Der Zusatz von 1 % (m/v) Glycerol zur Proteinstabilisierung führte zu keiner höheren Ausbeute an solubilisiertem PfFNTG107S. Mit 0,5 % (m/v) DDM solubilisiertes PfFNTG107S wurde *via* IMAC mit 0,05 % (m/v) DDM-haltigem Reinigungspuffer gereinigt. Im resultierenden Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel wurden in den Elutionsfraktionen keine dem PfFNTG107S entsprechenden Banden detektiert (Abb. 4.22 C). Auch in Western Blot-Analysen wurden wenig intensive Banden in den Reinigungsfraktionen von 200-500 mM Imidazol erhalten und die entsprechenden IMAC-Fractionen konzentriert (MWCO 100 kDa) und zu initialen Rekonstitutionsversuchen in Liposomen für nachfolgende Funktionstestungen verwendet. Die konzentrierten Reinigungsfraktionen beinhalten 0,17 mg Gesamtprotein, welches zu Liposomen-Rekonstitutionsversuchen zusammen mit DDM eingesetzt wurde. Abb. 4.22 D zeigt die Western Blot-Analyse der Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation. Es wurde eine Chemilumineszenzbande bei einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa in der Fraktion mit 15 % Saccharose erhalten, was auf die erfolgreiche PfFNTG107S-Rekonstitution in den bei dieser Saccharosedichte akkumulierten Proteoliposomen hinwies. In der Fraktion mit 30 % Saccharose wurde kein Chemilumineszenzsignal detektiert, was auf die Abwesenheit von präzipitiertem PfFNTG107S im Rekonstitutionsansatz hindeutet. Die PfFNTG107S-Proteoliposomen wurden neben leeren Kontrollliposomen in Schwellungsassays an der

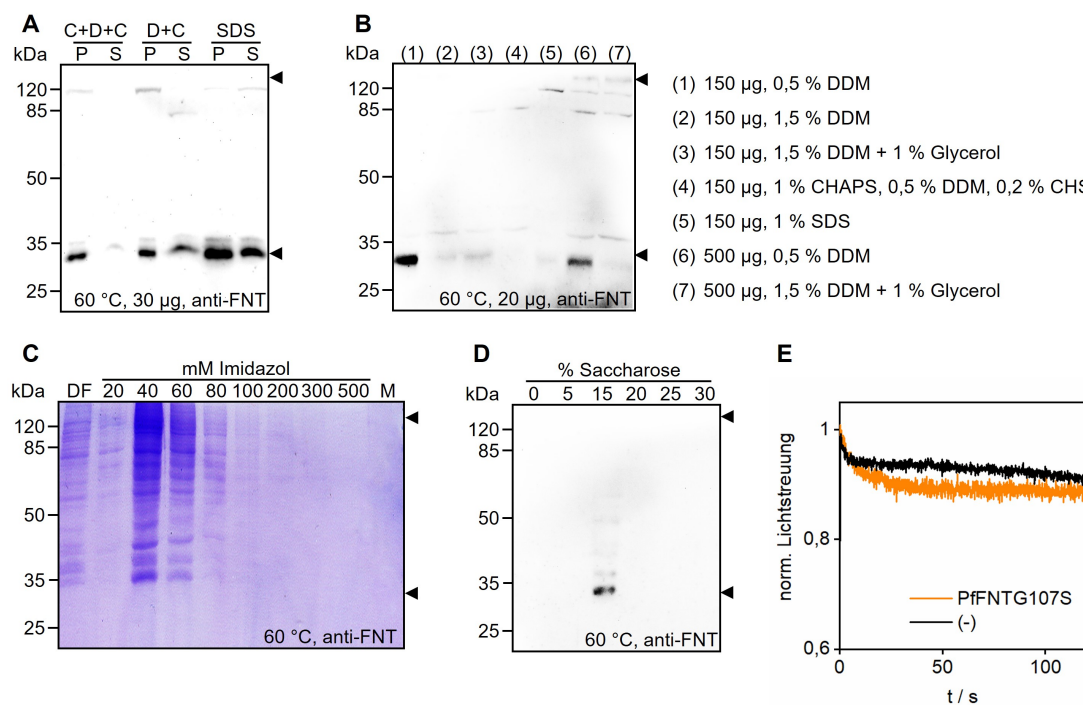


Abb. 4.22: Solubilisierung und Funktionstestung von in HEK-Zellen exprimiertem PfFNTG107S. **A** Western Blot-Analyse von Solubilisierungsversuchen mit 1 % (m/v) CHAPS + 0,5 % (m/v) DDM + 0,2 % (m/v) CHS (C+D+C), 1,5 % (m/v) DDM + 0,15 % (m/v) CHS (D+C) und 1 % (m/v) SDS. Inkubation von 30 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 60 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. P, 100.000 *g*-Pellet; S, 100.000 *g*-Solubilisierungsüberstand. **B** Western Blot-Analyse der Solubilisierungsüberstände des Detergenzkonzentrationscreenings. Es wurden die rechts angegebenen Gesamtproteinmassen und Detergenzkonzentrationen eingesetzt. Inkubation von 20 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 60 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **C** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der IMAC mit 0,05 % (m/v) DDM. DF, Durchfluss; M, Matrix. **D** Western Blot-Analyse der Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation von in Liposomen rekonstituiertem PfFNTG107S. Inkubation von 20 µl mit SDS versetzten Fraktionen bei 60 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **E** Streulichtmessungen von PfFNTG107S-Proteoliposomen an der Stopped-Flow-Apparatur. Messungen bei einem Lactatgradienten von 0 mM bis 200 mM und pH ≈ 7,0. PfFNTG107S-Proteoliposomen (orange, gemittelt aus sechs Einzelkurven) und leere Kontrollliposomen (schwarz, gemittelt aus fünf Einzelkurven).

Stopped-Flow-Apparatur eingesetzt. Abb. 4.22 E zeigt die resultierenden Streulichtkurven bei Messung gegen einen Lactatgradienten von 0 mM bis 200 mM bei einem neutralen pH-Wert von etwa 7,0. Sowohl bei den Protein-freien Kontrollliposomen als auch bei den PfFNTG107S-Proteoliposomen wurden abfallende Streulichtkurven und damit ein Anschwellen der Liposomen bzw. Proteoliposomen beobachtet, wobei die gemittelte Streulichtkurve der PfFNTG107S-Proteoliposomen einen initial leicht steileren Abfall zeigte. Das leicht schnellere Anschwellen der PfFNTG107S-Proteoliposomen wurde auch durch die kleinere τ -Zeitkonstante von 7,8 s für die PfFNTG107S-Proteoliposomen im Vergleich zu den leeren Kontrollliposomen ($\tau = 9,4$ s) ausgedrückt. Die Rekonstitutionsversuche wurden mit einer weiteren Charge von aus nicht-metabolisch selektierten HEK-Zellen extrahierten PfFNTG107S wiederholt, wobei die hier gezeigten Streulichtkurven nicht reproduziert werden konnten. Es konnte somit auch aufgrund der sehr geringen Extraktions- und Solubilisierungsausbeuten kein sicherer Funktionsnachweis des aus HEK-Zellen extrahierten PfFNTG107S-Transportproteins erbracht werden.

4.13 Kultivierung FNT-Speziesvarianten-exprimierender *S. cerevisiae*-Hefen in Lactatmedium

Da für das zellfrei und im HEK-Expressionssystem hergestellte PfFNTG107S kein fundierter Funktionsnachweis erzielt werden konnte und durch im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte elektronenmikroskopische Untersuchungen keine die Funktionalität bedingenden PfFNTG107S-Pentamere bestätigt werden konnten, wurde in Folge das in der Arbeitsgruppe Beitz etablierte *S. cerevisiae*-Hefeexpressionssystem für die Produktion von FNT-Proteinen genutzt. Die Funktionalität von in diesem Hefesystem hergestellten Membranproteinen konnte bereits insbesondere auch für PfFNT durch zahlreiche Vorarbeiten nachgewiesen werden (Wu et al., 2015; Wiechert & Beitz, 2017b; Walloch et al., 2021). Im Rahmen eines phänotypischen Wirkstoffscreenings mit FNT-Varianten aus verschiedenen *Plasmodium*-Spezies sollte eine schnelle und kostengünstige Methode zum Hochdurchsatzscreening von potenziellen FNT-Inhibitoren validiert werden. Dazu wurde zunächst die heterologe Expression der entsprechenden FNT-Speziesvarianten aus *P. falciparum* (PfFNT), *P. vivax* (PvFNT), *P. malariae* (PmFNT), *P. ovale* (PoFNT), *P. knowlesi* (PkFNT) und *P. berghei* (PbFNT) in *S. cerevisiae* Δ jen1 Δ ady2-Hefezellen mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen (Abb. 4.23 A). Zu beachten sind die möglicherweise unterschiedlichen Expressionslevel der sechs FNT-Speziesvarianten bei Kultivierung in SD-AHLW-Medium. Die Schwankungen der Chemilumineszenzintensitäten und die überdurchschnittlich starken Expressionen von PvFNT, PkFNT und PbFNT wurden auch in weiteren Expressionsansätzen und nach erneuten Zellaufschlüssen bestätigt. Neben den jeweiligen Banden der FNT-Monomere und potenzieller Translationsvarianten im Bereich von 30-37 kDa ist bei allen FNT-Speziesvarianten eine zusätzliche hochmolekulargewichtige Bande sehr geringerer Intensität zu erkennen, die auf entsprechende FNT-Pentamere mit einem Molekulargewicht >120 kDa und damit die Expression nativer FNT-Speziesvarianten hindeutet.

Das Wachstumsverhalten der sechs FNT-Speziesvarianten-exprimierenden *S. cerevisiae*-Hefekulturen in Lactatmedium mit L-Lactat als einziger Kohlenstoffquelle wurde vor Durchführung des phänotypischen Wirkstoffscreenings (Kap. 4.14) untersucht. Dies diente zudem als relevanter Funktionalitätsnachweis der FNT-Transportproteine, da die exprimierten FNT-Speziesvarianten die einzige Möglichkeit zur L-Lactataufnahme der Hefezellen des verwendeten Stamms darstellte. Sämtliche *S. cerevisiae* Δ jen1 Δ ady2-Hefekulturen mit dem entsprechenden für eine FNT-Speziesvariante codierenden DNA-Konstrukt waren

in Lactatmedium angewachsen und konnten fortwährend in Lactatmedium kultiviert werden (Abb. 4.23 B und Abb. 4.23 C). Zellen des *S. cerevisiae* Δ jen1 Δ ady2-Stamms ohne exprimiertes Lactattransportprotein konnten im Lactatmedium aufgrund der fehlenden alternativen Kohlenstoffquelle wie erwartet nicht anwachsen. Die am schnellsten wachsenden FNT-exprimierenden *S. cerevisiae*-Kulturen wiesen Generationszeiten in Lactatmedium von etwa 11 h (PfFNT) und 12 h (PbFNT) auf. Für die langsamer wachsenden *S. cerevisiae*-Kulturen wurden Generationszeiten von etwa 25 h (PvFNT), 18 h (PkFNT), 23 h (PmFNT) und 18 h (PoFNT) bestimmt. Aufgrund des in drei biologischen Replikaten reproduzierbaren differenzierten Wachstumsverhaltens könnte möglicherweise eine unterschiedlich hohe Lactatleitfähigkeit der verschiedenen FNT-Speziesvarianten vorliegen, die allerdings in dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurde. Es konnte keine Korrelation der Generationszeiten mit dem unterschiedlichen Expressionslevel der jeweiligen FNT-Speziesvariante festgestellt werden. Die FNT-exprimierenden *S. cerevisiae*-Kulturen wurden im folgenden phänotypischen Wirkstoffscreening (Kap. 4.14) eingesetzt.

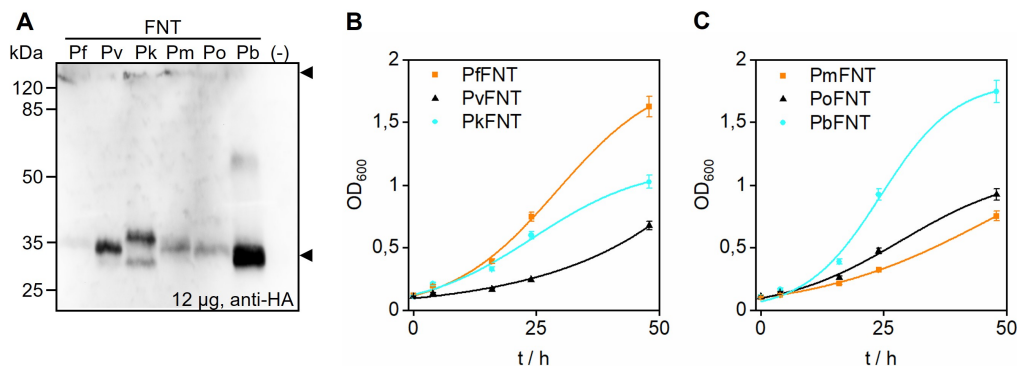


Abb. 4.23: Expression von FNT-Speziesvarianten und Wachstum in Lactatmedium. **A** Western Blot-Analyse der Membranfraktionen zum Expressionsnachweis der FNT-Speziesvarianten im *S. cerevisiae*-Expressionssystem. (-), nicht-FNT-exprimierende *S. cerevisiae* Δ jen1 Δ ady2-Zellen. Inkubation von 12 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 37 °C und Detektion mit einem gegen den N-terminalen HA-Tag gerichteten Antikörper. **B** Wachstumskurven von *S. cerevisiae* Δ jen1 Δ ady2-Zellen, die PfFNT (orange), PvFNT (schwarz) oder PkFNT (cyan) exprimierten, in Medium mit 1 % (m/v) L-Lactat. Fehlerbalken geben den SEM aus drei biologischen Replikaten an. **C** Wachstumskurven von *S. cerevisiae* Δ jen1 Δ ady2-Zellen, die PmFNT (orange), PoFNT (schwarz) oder PbFNT (cyan) exprimierten, in Medium mit 1 % (m/v) L-Lactat. Fehlerbalken geben den SEM aus drei biologischen Replikaten an.

4.14 Phänotypisches Wirkstoffscreening im *S. cerevisiae*-Hefesystem

Die Zellviabilität von FNT-exprimierenden *S. cerevisiae* Δ jen1 Δ ady2-Hefezellen bei Inkubation mit entsprechenden Testsubstanzen sollte nun zur Identifizierung von FNT-Inhibitoren herangezogen werden. Das dazu etablierte phänotypische Wirkstoffscreening wurde mit den die sechs FNT-Speziesvarianten exprimierenden *S. cerevisiae*-Hefekulturen in 1 % (m/v) Lactatmedium durchgeführt, nachdem der Zellviabilitätsindikator Resazurin (0,03 mg/ml) und die entsprechenden Testsubstanzen zu Endkonzentrationen von 0,1-300 µM in die jeweiligen Kulturansätze gegeben wurde. Eine repräsentative Screeningplatte nach Inkubation für 72 h bei 29 °C ist in Abb. 4.24 A gezeigt. Screeningplatten wurden nur ausgewertet, wenn die in der Kontrollspalte pipettierten Positiv- (1 mM MMV007839, 0 % Zellviabilität) und Negativkontrollen (1 % (v/v) DMSO, 100 % Zellviabilität) keine ausgeprägte Kreuzkontamination anzeigten. Für die getesteten Substanzen wurde jeweils die relative Zellviabilität bestimmt und eine Substanzkonzentration als Inhibitions Grenzwert bestimmt, bei der die Zellviabilität nach Normierung

auf die festgelegten Zellviabilitäten der Positiv- und Negativkontrolle $<50\%$ betrug. Für die potenten PfFNT-Inhibitoren MMV007839, BH267.meta und BH297 zur EC_{50} -Bestimmung aufgenommene PfFNT-Inhibitionskurven sind in Abb. 4.24 B gezeigt. Die bestimmten EC_{50} -Werte für die Inhibition von PfFNT lagen bei $0,07 \pm 0,01 \mu\text{M}$ (MMV007839), $0,06 \pm 0,01 \mu\text{M}$ (BH267.meta) und $0,05 \pm 0,01 \mu\text{M}$ (BH297) und damit im zweistelligen nanomolaren Bereich und unterhalb der geringsten eingesetzten Substanzkonzentration im phänotypischen Wirkstoffscreening. Die für die drei Substanzen erhaltenen EC_{50} -Werte sind vergleichbar mit den nanomolaren IC_{50} -Werten aus biophysikalischen Radioassays (Walloch et al., 2021), was die Plausibilität der mittels phänotypischen Assays erhobenen Daten unterstreicht und auf die ausreichende Stabilität der getesteten drei Substanzen nach Inkubation für 72 h im Lactatmedium hinweist. Die ermittelten EC_{50} -Werte konnten in drei biologischen Replikaten reproduziert werden.

Die Strukturformeln der in diesem Wirkstoffscreening gegen die sechs FNT-Speziesvarianten getesteten 33 PfFNT-inhibierenden Substanzen aus früheren Inhibitionsstudien sind in Abb. 6.1 im Anhang angegeben. Anhand dieser Substanzen wurde die Anwendbarkeit des phänotypischen Wirkstoffscreenings für ein Hochdurchsatzscreening evaluiert. Die im initialen Wirkstoffscreening bestimmten Inhibitionsgranzwerte für die Inhibition der untersuchten FNT-Speziesvarianten sind gesammelt in Abb. 4.24 C in Form

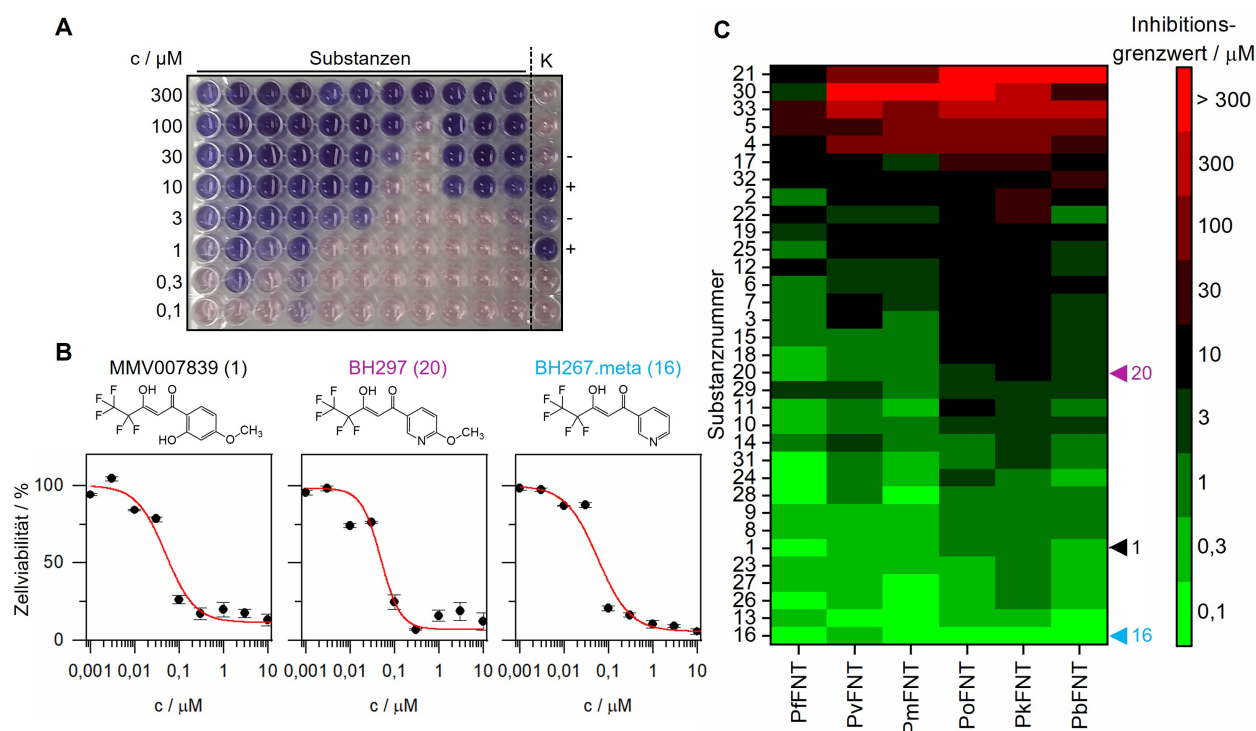


Abb. 4.24: Resultate des phänotypischen Wirkstoffscreenings gegen die FNT-Speziesvarianten. **A** Repräsentative Screeningplatte für die Bestimmung der Inhibitionsgranzwerte nach Inkubation für 72 h bei 29 °C. In die Spalten wurden die getesteten Substanzen in absteigenden Konzentrationen von 300 μM bis 0,1 μM und in eine Kontrollspalte (K) die MMV007839-Positivkontrolle (+) und die DMSO-Negativkontrolle (-) in Doppelbestimmung gegeben. Die verringerte Zellviabilität infolge potenzieller FNT-Inhibition wird durch eine tiefblaue Färbung des Zellviabilitätsindikators Resazurin angezeigt. **B** Inhibitionskurven der Substanzen MMV007839, BH297 und BH267.meta zur Bestimmung der EC_{50} -Werte für die Inhibition von PfFNT. Die Zellviabilität wurde in drei biologischen Replikaten bestimmt und die Fehlerbalken geben den SEM an. **C** Darstellung der bestimmten Inhibitionsgranzwerte aller getesteten Substanzen gegen die sechs FNT-Speziesvarianten in einer Heatmap. Die angegebene Substanznummer bezieht sich auf die für das phänotypische Wirkstoffscreening zugewiesene laufende Nummer und die zugehörigen Strukturformeln sind in Abb. 6.1 im Anhang angegeben. Der Farbcode gibt den Inhibitionsgranzwert im Konzentrationsbereich von 300 μM bis 0,1 μM an. Wenn bei keiner Substanzkonzentration eine Zellviabilität von $<50\%$ erreicht wurde, wurde als Inhibitionsgranzwert $>300 \mu\text{M}$ gesetzt. Die Pfeile kennzeichnen die Substanzen MMV007839 (1, schwarz), BH297 (20, violett) und BH267.meta (16, cyan).

einer Heatmap visualisiert. Die Substanzen MMV007839 (1), BH267.meta (16) und BH297 (20) zeigten niedrige Inhibitions Grenzwerte für die Inhibition aller getesteten FNT-Speziesvarianten und insbesondere Inhibitions Grenzwerte von $0,1\ \mu\text{M}$ bzw. $0,3\ \mu\text{M}$ für die PfFNT-Inhibition, was die zuvor bestimmten EC_{50} -Werte bestätigt und die Plausibilität der hier bestimmten Inhibitions Grenzwerte zeigt. BH297 wies neben PfFNT zudem eine hohe Potenz gegen PvFNT und PmFNT auf und war gegen die anderen FNT-Speziesvarianten und insbesondere PkFNT mit einem Inhibitions Grenzwert von $10\ \mu\text{M}$ weniger effektiv. Gegen PkFNT und PoFNT zeigten die meisten Testsubstanzen einen höheren Inhibitions Grenzwert als gegen die anderen untersuchten FNT-Speziesvarianten. Über alle Testsubstanzen betrachtet wurden für die Inhibition von PfFNT die geringsten Inhibitions Grenzwerte und damit im Mittel eine hohe Potenz erreicht, was aufgrund des Entwicklungshintergrunds zur PfFNT-Inhibition der meisten getesteten Substanzen plausibel ist. Alle untersuchten FNT-Speziesvarianten zeigten eine erhöhte Suszeptibilität sowohl gegenüber MMV007839 als auch BH267.meta, wobei BH267.meta die potenteste der getesteten Substanzen war und alle untersuchten FNT-Speziesvarianten in nanomolaren Konzentrationen effektiv inhibierte. Auch die zweitpotenteste Substanz BH268.Pyrazin (13) inhibierte alle FNT-Speziesvarianten in nanomolaren Konzentrationen und unterscheidet sich von BH267.meta nur durch ein zusätzliches Stickstoffatom und damit in einem Pyrazinring. Die Substanzen (26) und (27) unterscheiden sich nur moderat in einer Ethoxygruppe bzw. Isopropoxygruppe und wiesen für sämtliche FNT-Speziesvarianten fast identische Inhibitions Grenzwerte $\leq 1\ \mu\text{M}$ auf, was die vermutlich untergeordnete Rolle dieser Inhibitor modifikation bei der Affinitätsausbildung gegenüber den sechs FNT-Speziesvarianten anzeigt. Hingegen gehörten das Pharmakophor (30) und Nifluminsäure (33) zu den drei ineffektivsten Substanzen. Substanz (21) als einzige der getesteten Verbindung mit einer hydrophilen Gruppe in der Fluoralkylkette zeigte hohe Inhibitions Grenzwerte im mindestens zweistelligen mikromolaren Bereich und wurde als am wenigsten potente Testsubstanz identifiziert. Dies deutet auf die Fähigkeit des hier durchgeführten phänotypischen Wirkstoffscreenings hin, nicht-potent inhibierende Substanzen von potenziellen Wirkstoffkandidaten auszuschließen. Es wurde somit nachgewiesen, dass durch das hier beschriebene phänotypische Wirkstoffscreening potent inhibierende Substanzen aus einer kleinen Substanzbibliothek identifiziert werden können. Die meisten der 33 Testsubstanzen zeigten eine vergleichbare Potenz gegenüber allen untersuchten FNT-Speziesvarianten, die im Transportpfad und damit an der Inhibitorbindestelle eine konservierte Aminosäuresequenz aufweisen (Walloch et al., 2021). Inwieweit die ermittelten Inhibitions Grenzwerte mit IC_{50} -Werten aus biophysikalischen Inhibitionsmessungen korrelierten, wird anhand Abb. 5.3 durch Vergleich mit den IC_{50} -Werten der PfFNT-Inhibition diskutiert.

Nach Validierung des phänotypischen Wirkstoffscreenings anhand der FNT-Speziesvarianten wurde ein weiteres Screeningsetup zur Inhibition der in *P. falciparum*-Parasitenkulturen durch subletale Inhibitor konzentrationen selektierten PfFNT-Resistenzmutanten PfFNTG107S, PfFNTV196L und PfFNTG21E durchgeführt. Dabei sollte die Potenz der zuvor getesteten und gegen FNT-Speziesvarianten effektiven Substanzen MMV007839 (1), BH268.Pyrazin (13), BH267.meta (16) und BH297 (20) gegen die drei PfFNT-Resistenzmutanten überprüft werden. Die Inhibitorbindestellen der PfFNT-Resistenzmutanten PfFNTG107S und PfFNTV196L unterscheiden sich im Gegensatz zu den FNT-Speziesvarianten durch die Aminosäureaustausche von der Inhibitorbindestelle des PfFNT-Wildtypproteins (Abb. 1.6). Die ermittelten Inhibitions Grenzwerte sind in Abb. 4.25 zusammengefasst. Für die Inhibition von PfFNT wurden für die vier PfFNT-Inhibitoren analog zum Wirkstoffscreening gegen die FNT-Speziesvarianten niedrige Inhibitions Grenzwerte von $0,1\ \mu\text{M}$ bzw. $0,3\ \mu\text{M}$ bestimmt. MMV007839 inhibierte die PfFNTG107S-

Resistenzmutante vergleichsweise ineffektiv mit einem Inhibitions Grenzwert von 100 μM (Abb. 4.25 A). Gegen die anderen PfFNT-Resistenzmutanten wirkte MMV007839 relativ zum PfFNT-Wildtypprotein mit reduzierter Potenz aber effektiver als gegen PfFNTG107S. Hingegen konnten die Substanzen BH297 und BH267.meta den G107S-Aminosäureaustausch vermutlich weitgehend umgehen und Inhibitions Grenzwerte im einstelligen mikromolaren Bereich erzielt werden (Abb. 4.25 B und Abb. 4.25 C). Dies erscheint plausibel, da diese von MMV007839 abgeleiteten Substanzen zur effektiveren PfFNTG107S-Inhibition entwickelt und bereits erfolgreich im biophysikalischen Radioassay getestet wurden. Für die PfFNTG107S-Inhibition von BH268.Pyrazin wurde hingegen ein hoher Inhibitions Grenzwert von 30 μM bestimmt (Abb. 4.25 D), sodass die im Wirkstoffscreening gegen die FNT-Speziesvarianten festgestellte gute Performance von BH268.Pyrazin nicht auf die drei PfFNT-Resistenzmutanten übertragen werden konnte. Gegen PfFNTV196L wiesen die vier getesteten Substanzen keine Inhibitions Grenzwerte im nanomolaren Bereich auf, womit die Entwicklung neuer Substanzen zur effektiveren Adressierung der PfFNTV196L-Resistenzmutante notwendig erscheint. Etwas weniger effektiv als gegen das PfFNT-Wildtypprotein aber mindestens im einstelligen mikromolaren Bereich wirkten die vier Substanzen gegen die PfFNTG21E-Resistenzmutante, die in der Inhibitorbindestelle im PfFNT-Transportpfad keinen Aminosäureaustausch aufweist. Mit diesem Wirkstoffscreening im Kleinformat konnten somit in Abhängigkeit von strukturellen Änderungen der Inhibitorbindestelle differenzierte Inhibitions Grenzwerte ermittelt und damit variierende Potenzen der getesteten PfFNT-Inhibitoren gezeigt werden.

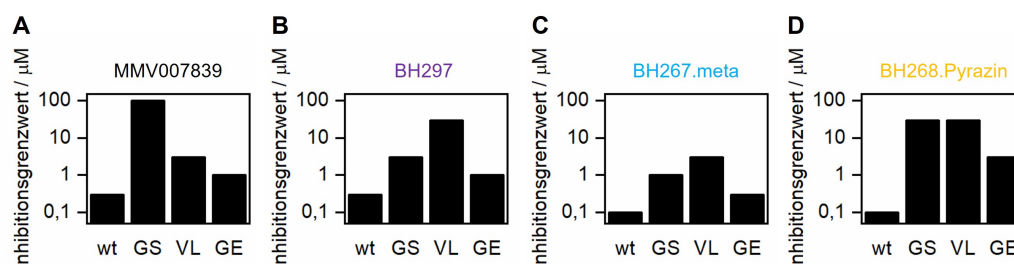


Abb. 4.25: Resultate des phänotypischen Wirkstoffscreenings gegen die PfFNT-Resistenzmutanten. **A** Inhibitions Grenzwerte von MMV007839 gegen die PfFNT-Resistenzmutanten. **B** Inhibitions Grenzwerte von BH297 gegen die PfFNT-Resistenzmutanten. **C** Inhibitions Grenzwerte von BH267.meta gegen die PfFNT-Resistenzmutanten. **D** Inhibitions Grenzwerte von BH268.Pyrazin gegen die PfFNT-Resistenzmutanten. wt, PfFNT-Wildtyp; GS, PfFNTG107S; VL, PfFNTV196L; GE, PfFNTG21E.

4.15 Kultivierung PfFNT-Resistenzmutanten-exprimierender *S. cerevisiae*-Hefen

Die Funktionalität von im *S. cerevisiae*-Hefeexpressionssystem hergestellten FNT-Transportproteinen wurde im präsentierten phänotypischen Wirkstoffscreening gezeigt, sodass dieses Expressionssystem weiter zur Proteinsynthese für Strukturuntersuchungen genutzt wurde. Zunächst wurde dazu die PfFNT-Expression und das Wachstum von Zellen analysiert, die PfFNT und die PfFNT-Resistenzmutanten PfFNTG107S, PfFNTV196L und PfFNTG21E exprimierten. Abb. 4.26 A zeigt die Western Blot-Analyse der aus *S. cerevisiae*-Hefezellen bei Kultivierung in SD-AHLW-Medium isolierten Membranfraktionen zum Expressionsnachweis der PfFNT-Resistenzmutanten. Sowohl das PfFNT-Wildtypprotein als auch die drei PfFNT-Resistenzmutanten konnten durch Chemilumineszenzbanden entsprechend eines Molekulargewichts von etwa 34 kDa nachgewiesen werden. Neben dieser dem jeweiligen Monomer entsprechenden Chemilumineszenzbande wurden auch jeweils höhermolekulargewichtige Banden detektiert, die

auf die entsprechenden PfFNT-Pentamere hindeuten. Für PfFNTG107S wurde nach Auftragung einer Gesamtproteinmasse von 25 µg eine deutlich geringere Bandenintensität erhalten als für die anderen PfFNT-Proteinproben, was auf die verminderte Expression dieser Resistenzmutante im *S. cerevisiae*-Expressionssystem zurückzuführen sein könnte. PfFNT- und PfFNTG107S-exprimierende Hefezellen wiesen mit Generationszeiten von $2,98 \pm 0,09$ h (PfFNT) bzw. $2,89 \pm 0,08$ h (PfFNTG107S) ein mit nicht FNT-exprimierenden *S. cerevisiae* Δ jen1 Δ ady2-Zellen vergleichbares Wachstum auf (Abb. 4.26 B). Ebenso verhielten sich die PfFNTV196L- ($2,91 \pm 0,11$ h) und PfFNTG21E-exprimierenden Zellen ($2,96 \pm 0,08$ h) (Abb. 4.26 C), was die mangelnde Beeinträchtigung des Zellwachstums bei Kultivierung in Glucosehaltigem SD-AHLW-Medium durch die Expression der PfFNT-Resistenzmutanten zeigte. Analog wurden bei Kultivierung von PfFNT-exprimierenden *S. cerevisiae* Δ jen1 Δ ady2-Zellen in Lactatmedium alle PfFNT-Resistenzmutanten erfolgreich synthetisiert (Abb. 4.26 D). Für sämtliche untersuchten PfFNT-Resistenzmutanten wurde eine hochmolekulargewichtige Bande erhalten, die dem Molekulargewicht der jeweiligen PfFNT-Pentamere entspricht. Für PfFNTV196L wurde bei gleichmäßiger Beladung mit 25 µg Gesamtprotein die höchste Bandenintensität erhalten. Auffallend ist die Abwesenheit von Chemilumineszenzbanden bei einem Molekulargewicht von 34 kDa, was die Stabilität der exprimierten PfFNT-Pentamere bei Zellkultivierung in Lactatmedium andeutet. Die nicht-FNT-exprimierenden Hefezellen oh-

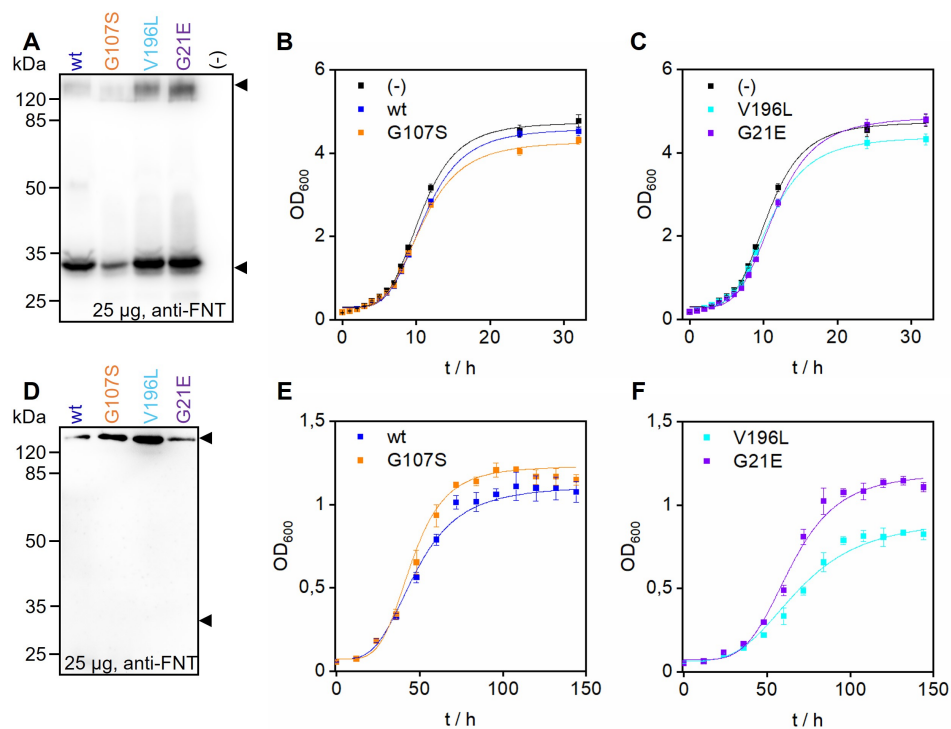


Abb. 4.26: PfFNT-Expression und Wachstumsverhalten von FNT-exprimierenden *S. cerevisiae* Δ jen1 Δ ady2-Hefezellen. **A** Western Blot-Analyse der Membranfraktionen zum Expressionsnachweis der PfFNT-Resistenzmutanten bei Kultivierung in SD-AHLW-Medium. Inkubation von 25 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 37 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **B** Wachstumskurven von PfFNT- und PfFNTG107S-exprimierenden und nicht-FNT-exprimierenden *S. cerevisiae*-Zellen in SD-AHLW-Medium. **C** Wachstumskurven von PfFNTV196L- und PfFNTG21E-exprimierenden und nicht-FNT-exprimierenden *S. cerevisiae*-Zellen in SD-AHLW-Medium. **D** Western Blot-Analyse der Membranfraktionen zum Expressionsnachweis der PfFNT-Resistenzmutanten bei Kultivierung in Lactatmedium. Inkubation von 25 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 37 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **E** Wachstumskurven von PfFNT- und PfFNTG107S-exprimierenden *S. cerevisiae*-Zellen in Lactatmedium. **F** Wachstumskurven von PfFNTV196L- und PfFNTG21E-exprimierenden *S. cerevisiae*-Zellen in Lactatmedium. (-), nicht-FNT-exprimierende *S. cerevisiae*-Zellen. wt, PfFNT; G107S, PfFNTG107S; V196L, PfFNTV196L; G21E, PfFNTG21E. Fehlerbalken geben den SEM aus drei biologischen Replikaten an.

ne Lactattransportproteine konnten im Lactatmedium mit L-Lactat als einziger Kohlenstoffquelle nicht kultiviert werden. Das Wachstum der FNT-exprimierenden Hefezellen in Lactatmedium wurde weiter analysiert, um Informationen über die Transportaktivität der PfFNT-Resistenzmutanten zu erhalten. Für PfFNT-exprimierende Hefezellen wurde eine Generationszeit von $9,4 \pm 0,1$ h und für PfFNTG107S-exprimierende Hefezellen von $8,7 \pm 0,3$ h bestimmt (Abb. 4.26 E). Eine vergleichbare Generationszeit von $8,9 \pm 0,2$ h wurde für PfFNTG21E-exprimierende Hefezellen berechnet, während eine deutlich verlängerte Generationszeit von $15,1 \pm 0,3$ h und ein Plateau mit einer verringerten OD₆₀₀ von etwa 0,8 bei PfFNTV196L-Expression erhalten wurde (Abb. 4.26 F). Dies könnte auf eine leicht geringere Lactattransportaktivität der PfFNTV196L-Resistenzmutante hindeuten, derer die verstärkte PfFNTV196L-Membranlokalisation bei Kultivierung in Lactatmedium entgegenwirkt.

4.16 PfFNTG107S kann im *S. cerevisiae*-Hefesystem funktional hergestellt werden

Zur Produktion der PfFNTG107S-Resistenzmutante im *S. cerevisiae*-Expressionssystem für Strukturuntersuchungen wurden zunächst geeignete Expressionsklone identifiziert. Dazu wurden die Membranfraktionen von mehreren mit entsprechendem DNA-Konstrukt transformierten *S. cerevisiae* Δ jen1 Δ ady2-Testkulturen in einer Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 4.27 A). Im Expressionsklonscreening wurden die Klone mit der laufenden Nummer 5 und 6 als geeignete Expressionsklone für die nachfolgende PfFNTG107S-Proteinsynthese identifiziert, die dem PfFNTG107S-Pentamer entsprechende und intensive hochmolekulargewichtige Chemilumineszenzbanden aufwiesen. Zur Extraktion der synthetisierten Membranproteine wurde die rigide Hefezellwand mit scharfkantigen Glassbeads zerstört und die Hefezellen während dieses mechanischen Zellaufschlusses homogenisiert. Da diese Aufschlussmethode die quantitative Extraktion der synthetisierten PfFNTG107S-Membranproteine nicht reproduzierbar gewährleistete und teils sehr geringe Extraktionsausbeuten erhalten wurden, wurden Optimierungsversuche durch enzymatisches Anverdauen der Hefezellwände durch Zymolyase unternommen. In Abb. 4.27 B ist die Western Blot-Analyse der Zentrifugationsfraktionen eines mechanischen Aufschlusses mit Glassbeads nach Vorinkubation mit Zymolyase gezeigt. Vor mechanischem Glassbead-Aufschluss wurde kein PfFNTG107S in den Zentrifugationsfraktionen der mit Zymolyase vorbehandelten Hefezellen detektiert. Nach der ersten Aufschlussserie (15 mal Vortexen für 30 s) wurden wenig intensive PfFNTG107S-Monomeren und -Pentameren entsprechenden Chemilumineszenzbanden im 7000 g-Zentrifugationspellet erhalten. Die zusätzliche zweite Aufschlussserie führte zu einer deutlich höheren Chemilumineszenzintensität der hochmolekulargewichtigen Bande und damit vermutlich zur verbesserten Extraktion von PfFNTG107S-Pentameren. Bei einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa lagen möglicherweise durch verschiedene PfFNTG107S-Translationsvarianten hervorgerufene Doppelbanden vor. In der durch Zentrifugation der 7000 g-Zentrifugationsüberstände gesammelten Membranfraktion wurde eine hochmolekulargewichtige Bande erhalten, die auf die Präsenz von PfFNTG107S-Pentameren in der Membranfraktion hindeutet. Durch Vorbehandlung der Hefezellen von kleinen *S. cerevisiae*-Expressionskulturen mit Zymolyase wurde die Gesamtproteinausbeute in der Membranfraktion erhöht, weshalb eine verbesserte Extraktion der Membranfraktion im Vergleich zu ohne Zellwandverdau mechanisch aufgeschlossenen *S. cerevisiae*-Hefezellen angenommen wurde.

Die Funktionalität der in *S. cerevisiae*-Hefezellen synthetisierten PfFNTG107S-Membranproteine wurde durch Schwellungsassays an der Stopped-Flow-Apparatur bestätigt. Dazu wurden PfFNTG107S-

exprimierende Hefezellen im Kleinmaßstab kultiviert und anschließend für die Schwellungsmessungen durch Zymolyase-Verdau protoplastisiert. Abb. 4.27 C zeigt die normalisierten Lichtstreuungskurven von Protoplasten, die einem Gradienten von 0-0,3 M L-Lactat bzw. Formiat ausgesetzt wurden. Zur Kontrolle wurde die PfFNTG107S-vermittelte Lactatpassage durch Zugabe von 0,1 mM BH267.meta zu den Protoplasten vollständig inhibiert. Sowohl für Schwellungsmessungen in Präsenz von L-Lactat als auch Formiat wurde ein im Vergleich zu den mit BH267.meta inhibierten Protoplasten durch den L-Lactat- bzw. Formiatimport vermitteltes Anschwellen der Protoplasten registriert. Zur Verbesserung der Signaldifferenzen wurde die Protoplastendichte auf eine OD_{600} von 4 verdoppelt, wodurch wie antizipiert ein stärkerer Streulichtkurvenabfall bei einem 0-0,3 M-L-Lactatgradienten erreicht wurde. Zur besseren Vergleichbarkeit der Solutimportvorgänge wurde aus den gefitteten Streulichtintensitätskurven bei Schwellungsmessungen von Protoplasten mit einer OD_{600} von 2 die jeweilige τ -Zeitkonstante bestimmt (Abb. 4.27 D). Bei einem 0-0,3 M L-Lactatgradienten wurde eine τ -Zeitkonstante von 89,3 s und bei einem Gradienten von 0-0,3 M Formiat ein langsamer Soluteinstrom mit einem größeren τ -Wert von 121,8 s bestimmt. Für Protoplasten mit durch 0,1 μ M BH267.meta vollständig inhibierten PfFNTG107S-Transportproteinen wurde eine deutlich erhöhte τ -Zeitkonstante von 812,1 s ermittelt, was den deutlich verlangsamten Lactatimport bei inhibierten PfFNTG107S-Transportproteinen und damit den PfFNTG107S-vermittelten Solutimport zeigt. Die aus der Streulichtintensitätskurve bei Protoplasten- OD_{600} von 4 und 0-0,3 M

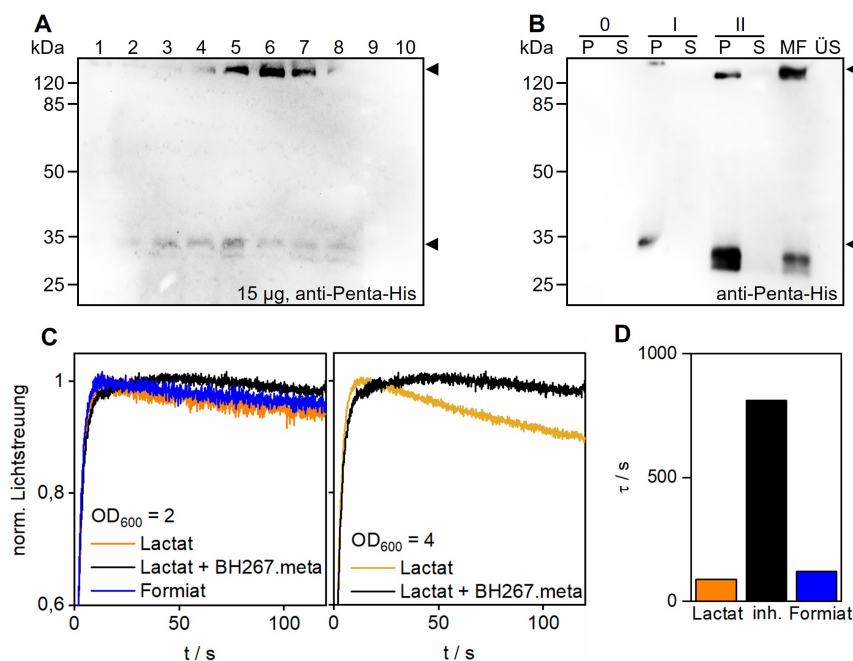


Abb. 4.27: Produktion von PfFNTG107S in *S. cerevisiae*-Kulturen und Funktionsnachweis über Schwellungsassays. **A** Western Blot-Analyse des Screenings nach PfFNTG107S-Expressionsklonen. Es wurde die Membranfraktion von zehn Expressionsklonen (1-10) zu einer Gesamtproteinmasse von 15 μ g nach Inkubation mit SDS bei 37 °C aufgetragen. Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper. **B** Western Blot-Analyse der Zentrifugationsfraktionen des Zellaufschlusses nach Vorbehandlung mit Zymolyase nach Inkubation mit SDS bei 37 °C. 0, ohne Glassbead-Aufschluss; I, nach 1. Glassbead-Aufschlussserie; II, nach 2. Glassbead-Aufschlussserie; P, 7000 g-Zentrifugationspellet; S, 7000 g-Zentrifugationsüberstand; MF, Membranfraktion; ÜS, 100.000 g-Zentrifugationsüberstand. Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper. **C** Schwellungsassay an der Stopped-Flow-Apparatur von aus PfFNTG107S-exprimierenden *S. cerevisiae*-Hefezellen generierten Protoplasten. Die Messungen erfolgten bei einem L-Lactat- bzw. Formiatgradienten von 0-0,3 M bei pH \approx 5,6 und RT. Zur vollständigen PfFNTG107S-Inhibition wurden die Protoplasten für 15 min mit 0,1 mM BH267.meta inkubiert. Links wurden die Protoplasten mit einer OD_{600} von 2 eingesetzt, rechts mit einer OD_{600} von 4. **D** Aus den gefitteten Streulichtintensitätskurven der Soluteinstromphase bei Messung mit Protoplasten- OD_{600} = 2 entnommene τ -Zeitkonstanten. inh., Lactat + BH267.meta.

L-Lactatgradienten ermittelte τ -Zeitkonstante betrug 115,2s und war damit vergleichbar mit den aus Schwellungsmessungen mit geringerer Protoplasten-OD₆₀₀ ermittelten Werten.

Aus den Kolbenkulturen der Kleinmaßstabkultivierung konnten nur geringe Gesamtproteinausbeuten extrahiert werden, sodass zur Erhöhung der erwarteten PfFNTG107S-Ausbeute *S. cerevisiae*-Kulturen im Fermenter zur PfFNTG107S-Produktion im Großmaßstab angesetzt wurden. Abb. 4.28 A zeigt das Zellwachstum einer *S. cerevisiae*-Fermenterkultur ausgedrückt durch die OD₆₀₀. Nach exponentiellem Zellwachstum in den ersten 24 h des Fermentationsprozesses bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 6 wurde bis zur Beendigung des Fermentationsprozesses bei langsamerem Zellwachstum eine OD₆₀₀ von etwa 10 erreicht. Für das aus einer 2l-Fermenterkultur gewonnene *S. cerevisiae*-Zellpellet wurde anhand der entnommenen Proben eine finale Zellfeuchtmasse von etwa 50-60 g berechnet (Abb. 4.28 B). Die berechnete Zellpelletfeuchtmasse stieg während des Fermentationsprozesses vergleichbar mit der Zelldichte an. Die PfFNTG107S-Proteinsynthese während des Fermentationsprozesses wurde durch Entnahme von Teilen der Fermenterkultur zu verschiedenen Zeitpunkten überprüft. In den entsprechenden in einer Western Blot-Analyse untersuchten Membranfraktionen (Abb. 4.28 C) wurde die PfFNTG107S-Proteinsynthese mit einem anti-FNT-Antikörper bestätigt, wobei die Intensität der PfFNTG107S-Pentameren entsprechenden hochmolekulargewichtigen Banden im Verlauf des dreitägigen Fermentationsprozesses stetig zunahm. Neben diesen hochmolekulargewichtigen Banden wurden keine PfFNTG107S-Monomerbanden bei einem Molekulargewicht von 34 kDa detektiert, was auf die kontinuierliche Assemblierung von SDS-stabilen PfFNTG107S-Pentameren hindeutet. Die Ausbeuten sowohl der aus den Fermentationsansätzen gewonnenen Zellpelletfeuchtmassen als auch der Gesamtproteinmassen variierte zwischen den einzelnen Fermentationsansätzen. Abb. 4.28 D zeigt die aus den jeweiligen Fermentationsansätzen gewonnenen Zellpelletfeuchtmassen und die in den daraus isolierten Membranfraktionen vorhandenen Gesamtproteinmassen der fünf im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *S. cerevisiae*-Fermentationsprozesse. Es wurden gemittelte Zellpelletfeuchtmassen von $23,2 \pm 4,8$ g und gemittelte Gesamtproteinmassen in den Membranfraktionen von $20,4 \pm 5,2$ mg erhalten.

In den Membranfraktionen vorhandenes PfFNTG107S sollte im Folgenden mit Detergenzien isoliert und der weiteren Proteinreinigung und Qualitätskontrolle zugänglich gemacht werden. Eine Western Blot-Analyse von Zentrifugationsfraktionen zum initialen Versuch der PfFNTG107S-Solubilisierung ist in Abb. 4.28 E dargestellt. Nach Aufschluss mittels BeadBeater-Zellhomogenisator wurden PfFNTG107S-Pentamere im Zellsuspensionspellet und in der Membranfraktion als entsprechende hochmolekulargewichtige Banden detektiert. Die isolierte Membranfraktion mit einer Gesamtproteinmasse von etwa 25 mg wurde zum initialen Solubilisierungsversuch mit 0,5 % (m/v) DDM verwendet. Nach Solubilisierung durch Rotation über Nacht wurde PfFNTG107S sowohl im 100.000 g-Pellet als auch im 100.000 g-Solubilisierungsüberstand detektiert. Im 100.000 g-Pellet wurde eine hochmolekulargewichtige Doppelbande mit einer im Vergleich zur unteren Bande deutlich intensiveren oberen Bande erhalten. Dem entgegen wurde im 100.000 g-Solubilisierungsüberstand eine leicht zu geringerem Molekulargewicht verschobene hochmolekulargewichtige Bande detektiert, die etwa der Lage der unteren Bande des 100.000 g-Pellets entspricht. Dies deutet auf die erfolgreiche Solubilisierung eines PfFNTG107S-Anteils und möglicherweise von korrekt gefalteten PfFNTG107S-Pentameren hin, während durch die obere Bande repräsentierte Proteinanteile in der Membranfraktion verblieben und nicht solubilisiert wurden. Zur Erhöhung der Solubilisierungseffektivität und der extrahierten PfFNTG107S-Ausbeuten wurden zunächst die Detergenzkonzentrationen variiert und neben dem initial eingesetzten Detergenz DDM auch das von Dr. Philipp

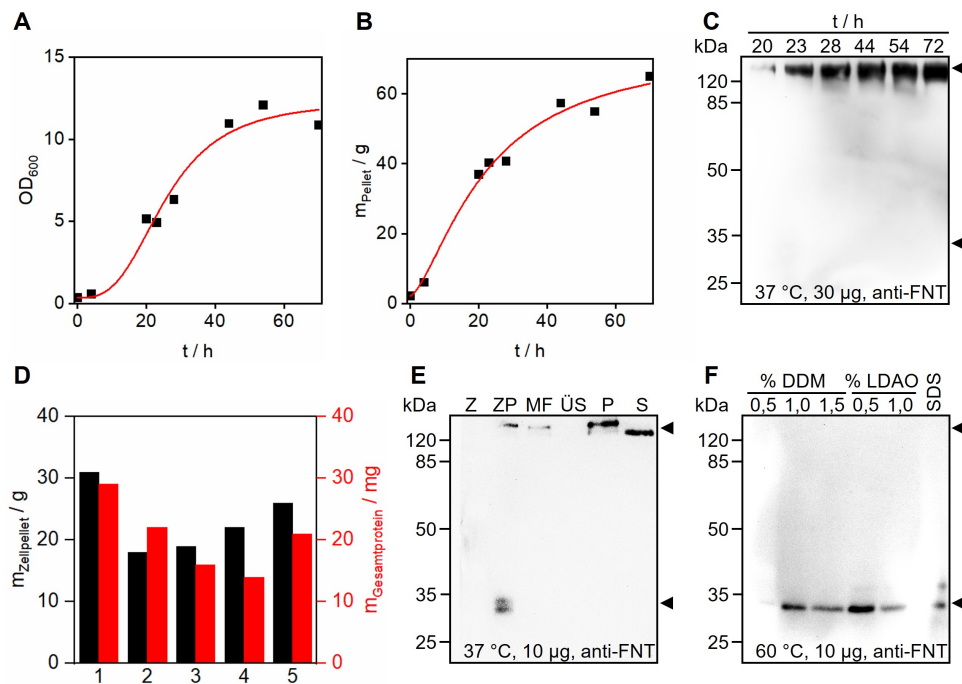


Abb. 4.28: Produktion von PfFNTG107S und Extraktion aus *S. cerevisiae*-Fermenterkulturen. **A** Wachstum einer *S. cerevisiae*-Expressionskultur repräsentiert durch die OD₆₀₀. **B** Berechnete Zellpelletmasse in einer 2l-Fermenterkultur. Aus den Zellpelletmassen der zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben wurde auf das Gesamtvolumen der Fermenterkultur hochgerechnet. **C** Western Blot-Analyse der Membranfraktionen von zu verschiedenen Zeitpunkten des Fermentationsprozesses entnommenen Proben zum PfFNTG107S-Expressionsnachweis. Inkubation von 30 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 37 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **D** Zellpelletfeuchtmassen (schwarz) und in den jeweiligen Membranfraktionen isolierte Gesamtproteinmassen (rot) von fünf Fermentationsansätzen (1-5). **E** Western Blot-Analyse der Zentrifugationsfraktionen des Zellaufschlusses (Z, 1000 g-Zellpellet; ZP, 7000 g-Zellsuspensionspellet; MF, Membranfraktion; ÜS, 100.000 g-Überstand) und nach Solubilisierung mit 0,5 % (m/v) DDM (P, 100.000 g-Pellet; S, 100.000 g-Solubilisierungsüberstand). Inkubation von 10 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 37 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **F** Western Blot-Analyse der Solubilisierungsüberstände zum initialen Detergenzscreen. Angegeben ist die Konzentration von DDM bzw. LDAO in % (m/v). Zur Solubilisierungskontrolle wurde 1 % (m/v) SDS eingesetzt. Inkubation von 10 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 60 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper.

Hajek für die PfFNT-Solubilisierung aus *P. pastoris*-Membranfraktionen (Hajek, 2019) verwendete LDAO gewählt. Abb. 4.28 F zeigt die Präsenz von PfFNTG107S in den 100.000 g-Solubilisierungsüberständen dieser Solubilisierungsversuche in einer Western Blot-Analyse. Die intensivsten Banden bei einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa nach Denaturierung der PfFNTG107S-Pentamere bei 60 °C wurden in Solubilisierungsansätzen mit 600 µg eingesetzter Gesamtproteinmasse sowie 1,0 % (m/v) DDM und 0,5 % (m/v) LDAO erhalten. Der zur Solubilisierungskontrolle aufgetragene 100.000 g-Solubilisierungsüberstand des Ansatzes mit 1 % (m/v) SDS zeigte keine vollständige Chemilumineszenzbande an, was vermutlich durch unvollständiges Übertragen auf die Blottingmembran hervorgerufen wurde und eine Quantifizierung der Solubilisierungseffizienz verhinderte. Diesen initialen Solubilisierungsergebnissen zufolge könnten sowohl DDM als auch LDAO geeignete PfFNTG107S-Solubilisierungsdetergenzien darstellen, was im Folgenden Kap. 4.17 näher untersucht wird.

4.17 Verbesserungen zur PfFNTG107S-Extraktion aus *S. cerevisiae*-Hefezellen

Zur Verbesserung der PfFNTG107S-Extraktion aus *S. cerevisiae*-Hefezellen wurde die Optimierung der Solubilisierungsbedingungen zum Ziel gesetzt. Für ein effizientes Hochdurchsatzdetergenzscreening wurde zunächst eine im Vergleich zur Western Blot-Analyse verkürzte Versuchsprotokoll angewendet, in

dem die nach Solubilisierungsversuchen erhaltenen 100.000 g-Solubilisierungsüberstände ohne elektrophoretische Größentrennung mittels Dot Blot-Analyse untersucht wurden. Abb. 4.29 A zeigt eine Dot Blot-Analyse für ein entsprechendes Detergenzscreening. Der Solubilisierungsüberstand der SDS-Solubilisierungskontrolle wies wie erwartet das intensivste Chemilumineszenzsignal auf, während ohne Detergenzzusatz nur ein sehr wenig intensives Chemilumineszenzsignal und damit kaum solubilisiertes PfFNTG107S detektiert wurde. Unter den in einer Konzentration von 1 % (m/v) getesteten Detergenzien wiesen DDM, LDAO und β -OG die intensivsten Chemilumineszenzsignale im 100.000 g-Solubilisierungsüberstand auf, was die Eignung dieser Detergenzien zur PfFNTG107S-Solubilisierung andeutet. Im 100.000 g-Pellet wurden jeweils deutlich weniger intensive Chemilumineszenzsignale als in den Solubilisierungsüberständen detektiert, wobei im Ansatz ohne Detergenzzusatz der größte relative PfFNTG107S-Anteil im 100.000 g-Pellet nachgewiesen wurde. Die Ponceau S-Färbung zeigte die gleichmäßige Beladung der verwendeten PVDF-Membran mit einer einheitlichen Gesamtproteinmasse von etwa 0,25 μ g an. Die relativen Signalintensitäten der Dot Blot-Analyse im Verhältnis zur Signalintensität der SDS-Solubilisierungskontrolle sind in Abb. 4.29 B angegeben. Für 1 % (m/v) DDM wurde die stärkste relative Intensität von 0,71 bestimmt, womit DDM in einer Konzentration von 1 % (m/v) unter den getesteten Detergenzien als effektivstes Solubilisierungsdetergenz identifiziert wurde. Dieses Ergebnis konnte durch mehrmalige Untersuchungen reproduziert werden, sodass DDM im Folgenden als bevorzug-

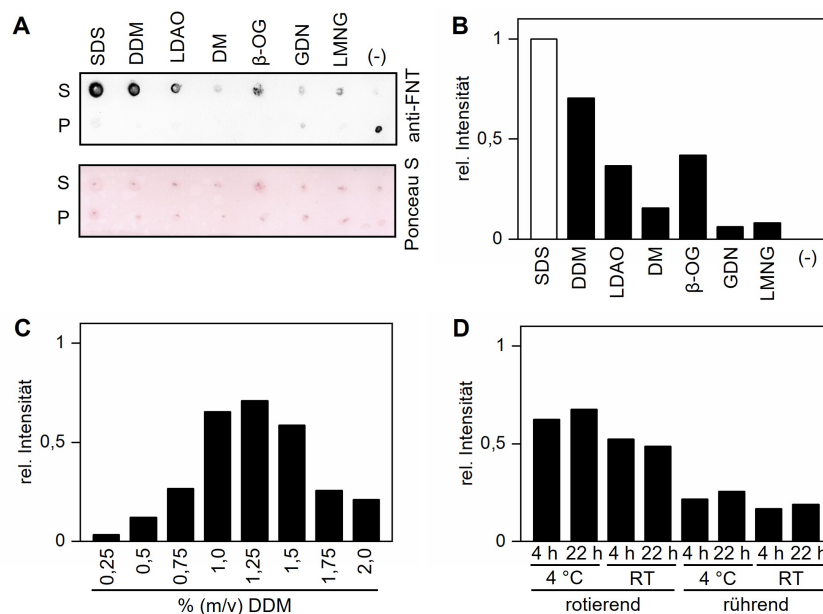


Abb. 4.29: PfFNTG107S-Solubilisierung aus *S. cerevisiae*-Membranfraktionen. **A** Dot Blot-Analyse eines Detergenzscreenings bei Solubilisierung mit jeweils 1 % (m/v) der angegebenen Detergenzien. Es wurde 0,25 μ g Gesamtproteinmasse eingesetzt und die gleichmäßige Auftragung durch Färbung der PVDF-Membran mit Ponceau S überprüft. Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. P, 100.000 g-Pellet; S, 100.000 g-Solubilisierungsüberstand; (-), ohne Detergenzienzusatz. **B** Relative Intensitäten der Dot Blot-Signale des Detergenzscreenings. Die Chemilumineszenzintensität bei Solubilisierung mit SDS wurde auf 1 und die Chemilumineszenzintensität ohne Detergenzienzusatz auf 0 normiert. Eingesetzt wurden jeweils 1 % (m/v) der angegebenen Detergenzien. (-), ohne Detergenzienzusatz. **C** Relative Intensitäten der Dot Blot-Signale des DDM-Konzentrationscreenings. Die Chemilumineszenzintensität bei Solubilisierung mit SDS wurde auf 1 und die Chemilumineszenzintensität ohne Detergenzienzusatz auf 0 normiert. Angegeben sind die DDM-Konzentrationen in %, (m/v). **D** Relative Intensitäten der Dot Blot-Signale des Methodenscreenings bei Solubilisierung mit 1 % (m/v) DDM. Die Chemilumineszenzintensität bei Solubilisierung mit SDS (4 °C, 2 h, rotierend) wurde auf 1 und die Chemilumineszenzintensität ohne Detergenzienzusatz auf 0 normiert. Die Inkubationsdauer, Inkubationstemperatur und Durchmischungsart (rotierend, rührend) sind angegeben.

tes Solubilisierungsdetergenz verwendet und im nächsten Schritt eine optimale DDM-Konzentration für die PfFNTG107S-Solubilisierung aus *S. cerevisiae*-Membranfraktionen gesucht wurde. Bei Einsatz von Membranfraktionen mit 0,5 mg Gesamtproteinmasse und DDM-Konzentrationen von 1,0-1,5 % (m/v) wurden bezogen auf die SDS-Solubilisierungskontrolle relative Intensitäten von über 0,5 bestimmt, wobei das Maximum mit einer relativen Intensität von 0,72 bei einer DDM-Konzentration von 1,25 % (m/v) vorlag (Abb. 4.29 C). Damit wurden diese DDM-Konzentrationen für diese Gesamtproteinmasse als effektiv angesehen und für weitere Solubilisierungsversuche eingesetzt. Bei geringeren DDM-Konzentrationen nahm die Solubilisierungsausbeute sehr stark ab, sodass bei 0,25 % (m/v) nur eine relative Intensität von 0,04 bestimmt wurde. Bei DDM-Konzentrationen von >1,5 % (m/v) nahm die Solubilisierungseffektivität in diesem Solubilisierungsansatz ebenfalls ab. In weiteren Solubilisierungsversuchen wurde teilweise eine höhere relative Intensität der Chemilumineszenzbanden in Western Blot-Analysen bei DDM-Konzentrationen >1,5 % (m/v) erhalten, sodass die optimale DDM-Konzentration nicht allgemeingültig festgestellt werden konnte.

Zur Optimierung der Solubilisierungsmethode wurden Solubilisierungsansätze bei verschiedenen Inkubationstemperaturen und unterschiedlichen Inkubationszeiten durch Rotation oder mittels Magnetrührkern durchmischt und die jeweiligen Solubilisierungsüberstände auf solubilisiertes PfFNTG107S untersucht (Abb. 4.29 D). Während die Änderung der Inkubationstemperatur von 4 °C auf Raumtemperatur und die Verlängerung der Inkubationszeit von 4 h auf 22 h keinen wesentlichen Einfluss auf den Anteil des solubilisierten PfFNTG107S hatten, wurde nach Rotation ein etwa um den Faktor 3 höhere Ausbeute von solubiliertem PfFNTG107S erzielt als bei Rühren der Solubilisierungsansätze mit einem Magnetrührkern. Auch in den Solubilisierungspellets der gerührten Ansätze wurden geringere relative Intensitäten detektiert als in den rotierten Ansätzen, was vermutlich durch die Adhäsion von PfFNTG107S-Membranproteinen über hydrophobe Wechselwirkungen an den Magnetrührkern hervorgerufen wurde. Dies konnte auch durch Waschen der Magnetrührkerne und Detektion von PfFNTG107S-Pentameren in Western Blot-Analysen der Waschfraktionen bestätigt werden. Aus diesem Grund wurden für sämtliche weitere PfFNTG107S-Solubilisierungsversuche rotierende Inkubationsbedingungen gewählt. Obwohl so durch Variation der Solubilisierungsbedingungen und insbesondere mit DDM einige Solubilisierungserfolge erzielt werden konnten, waren die jeweils erhaltenen PfFNTG107S-Ausbeuten für die weiterführende Proteinreinigung zu gering. In den Fraktionen von durchgeführten Testreinigungen über Affinitätschromatographie in Präsenz von DDM als Stabilisierungsdetergenz konnte nach Analyse Coomassie-gefärbter SDS-PAGE-Gele kein PfFNTG107S detektiert werden. In einigen IMAC-Fractionen wurden mittels Western Blot-Analyse sehr wenig intensive Chemilumineszenzbanden erhalten, die allenfalls PfFNTG107S-Ausbeuten im einstelligen µg-Bereich anzeigten und keine Informationen über den tatsächlichen PfFNTG107S-Reinheitsgrad ermöglichten. Es wurde vermutet, dass eine geringe Membranproteinsyntheseeffizienz der *S. cerevisiae*-Fermenterkulturen und der möglicherweise ineffiziente Zellaufschluss dafür ursächlich waren. Auch durch extensive Variation der Zellaufschlussprotokolle unter Einführung von Schritten zum Zellwandverdau durch Zymolyase (Abb. 4.27 B) oder weiterer mechanischer Zellaufschlussmethoden konnte keine Erhöhung des Ausgangsmaterials für Solubilisierungsversuche erzielt werden. Aus diesem Grund wurde in folgenden Ansätzen zur PfFNTG107S-Produktion das gut beschriebene *P. pastoris*-Hefeexpressionssystem zur Bereitstellung größerer Zellmaterialmengen angewendet.

4.18 PfFNTG107S wird im *P. pastoris*-Hefesystem im Großmaßstab hergestellt

Zunächst wurden geeignete Expressionsklone für die Produktion der PfFNTG107S-Resistenzmutante im *P. pastoris*-Expressionssystem gesucht. Dazu wurden aus Testkulturen von mit entsprechendem DNA-Konstrukt transformierten *P. pastoris*-Hefezellen extrahierte Membranfraktionen in einer Western Blot-Analyse auf PfFNTG107S-Proteinsynthese untersucht (Abb. 4.30 A). In diesem initialen Expressionsklon-screening wurden die Klone mit den laufenden Nummern 3, 5 und 8 durch semiquantitative Analyse der Signalintensitäten der dem PfFNTG107S-Pentamer entsprechenden hochmolekulargewichtigen Bande als gute Expressionsklone identifiziert. Die hochmolekulargewichtige Bande zeigte jeweils die höchste Chemilumineszenzintensität und damit die ausreichende Assemblierung von PfFNTG107S-Pentameren in den *P. pastoris*-Hefezellen an, während nur wenig intensive Chemilumineszenzbanden bei Molekulargewichten von etwa 34 kDa und 70 kDa geringe Anteile an PfFNTG107S-Monomeren bzw. -Dimeren andeuteten. In der nicht-induzierten Kontrollkultur wurden keine Chemilumineszenzbanden detektiert, was die Funktionalität der Induktion der PfFNTG107S-Proteinsynthese nachweist. In Abb. 4.30 B ist die Western Blot-Analyse der Zentrifugationsfraktionen eines mechanischen Glass bead-Aufschlusses von *P. pastoris*-Zellen gezeigt. Nach der ersten Aufschlussserie (16 mal Vortexen für 30 s) wurde wenig PfFNTG107S-Membranprotein im 7000 g-Zellsuspensionspellet detektiert, während in der selben Zentrifugationsfrak-

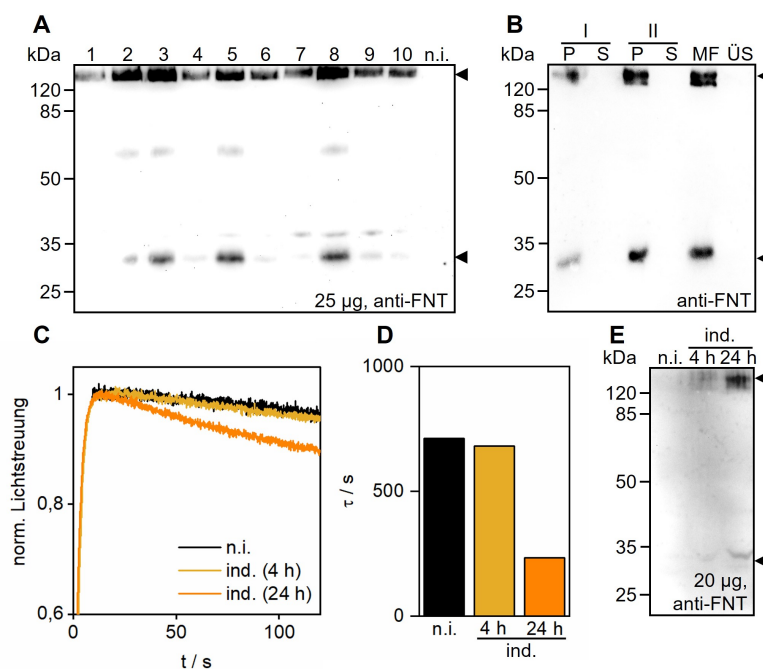


Abb. 4.30: PfFNTG107S-Produktion in *P. pastoris*-Kulturen und Funktionsnachweis über Schwellungsassays. **A** Western Blot-Analyse des PfFNTG107S-Expressionsklonscreenings. Es wurden Membranfraktionen von zehn Expressionsklonen (1-10) und einer nicht-induzierten Kontrollkultur (n.i.) zu einer Gesamtproteinmasse von 25 µg nach Inkubation mit SDS bei 37 °C aufgetragen. Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **B** Western Blot-Analyse der Zentrifugationsfraktionen des Zellaufschlusses. I, nach 1. Glass bead-Aufschlussserie; II, nach 2. Glass bead-Aufschlussserie; P, 7000 g-Pellet; S, 7000 g-Überstand; MF, Membranfraktion; ÜS, 100.000 g-Überstand. Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **C** Schwellungsassay an der Stopped-Flow-Apparatur von aus PfFNTG107S-exprimierenden *P. pastoris*-Zellen generierten Protoplasten. Die Messungen erfolgten bei einem L-Lactatgradienten von 0-0,3 M bei pH \approx 5,6 und RT. Gezeigt sind die Streulichtintensitätskurven von nicht-induzierten Zellen (n.i., schwarz) und von für 4 h (ind. (4 h), hellorange) bzw. 24 h (ind. (24 h), dunkelorange) induzierten Zellen. **D** Aus den gefitteten Streulichtintensitätskurven des Schwellungsassays berechnete τ -Zeitkonstanten der Soluteinstromphase. **E** Western Blot-Analyse der aus den im Schwellungsassay eingesetzten Protoplasten isolierten Membranfraktionen. Inkubation von 20 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 37 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper.

tion nach der anschließenden zweiten Aufschlussserie (sechsmal Vortexen für 30 s) deutlich intensivere Banden bei einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa und im höhermolekulargewichtigen Bereich erhalten wurden. Im hochmolekulargewichtigen Bereich lag eine Doppelbande vor, die möglicherweise auf das Vorliegen von verschiedenen Faltungszuständen der PffNTG107S-Pentamere hindeutet. Der hier durchgeführte mechanische Zellaufschluss im Kleinmaßstab resultierte in der Extraktion der Membranfraktion mit eingebauten SDS-stabilen PffNTG107S-Pentameren. Die Funktionalität der in *P. pastoris*-Zellen hergestellten PffNTG107S-Pentamere wurde in Schwellungsassays mit Protoplasten an der Stopped-Flow-Apparatur überprüft (Abb. 4.30 C). Ohne Induktion der PffNTG107S-Expression wurde nur ein sehr langsamer Abfall der Streulichtintensitätskurve beobachtet, der nach Induktion der PffNTG107S-Expression für 4 h nicht sichtbar steiler wurde. Nach PffNTG107S-Induktion für 24 h fand hingegen Lactatimport in die Protoplasten und damit ein deutlicher Abfall der Streulichtintensitätskurve statt, womit die Lactatleitungsfunktion der hergestellten PffNTG107S-Transportproteine nachgewiesen wurde. Zur Vergleichbarkeit der Schwellungsmessungen wurden aus den gefitteten Streulichtintensitätskurven die jeweiligen τ -Zeitkonstanten bestimmt und in Abb. 4.30 D gegenübergestellt. Bei den aus nicht-induzierten Zellen hergestellten Protoplasten wurde eine τ -Zeitkonstante von 712,2 s und nach Induktion der PffNTG107S-Expression für 4 h von 682,9 s ermittelt. Für die Protoplasten nach Induktion für 24 h wurde entsprechend des steileren Abfalls der Streulichtintensitätskurve ein geringerer τ -Wert von 235,1 s bestimmt. Die PffNTG107S-Lokalisation in den Membranfraktionen der im Schwellungsassay eingesetzten Protoplasten wurde in einer Western Blot-Analyse (Abb. 4.30 E) untersucht. Ohne und nach Induktion der PffNTG107S-Expression für 4 h war nur eine sehr wenig intensive hochmolekulargewichtige Chemilumineszenzbande zu erkennen, während nach 24 h Induktion eine intensive dem SDS-stabilen PffNTG107S-Pentamer entsprechende hochmolekulargewichtige Bande detektiert wurde. Nach der kurzen Induktionsperiode von 4 h lagen dementsprechend nur wenige PffNTG107S-Transportproteine in der Membranfraktion vor und es wurde gleichzeitig nur ein sehr langsames Anschwellen der entsprechenden Protoplasten gemessen. Nach längerer Induktionsperiode lagen mehr PffNTG107S-Transportproteine vor und es fand ein schnelleres Anschwellen der Protoplasten statt.

Zur Kultivierung von PffNTG107S-exprimierenden *P. pastoris*-Hefezellen im Großmaßstab wurde ein geeigneter Expressionsklon verwendet und dieser nach Inokulation von Vorkulturen im Fermenter kultiviert. Abb. 4.31 A stellt die OD₆₀₀-Wachstumskurve einer *P. pastoris*-Fermenterkultur dar und zeigt in den ersten etwa 24 h des Fermentationsprozesses ein exponentielles Zellwachstum der Kultur. 24 h nach Fermentationsbeginn wurde die Proteinsynthese durch langsame Zugabe von Methanol gestartet und das Zellwachstum der Kultur verlangsamte sich. Zum Ende des Fermentationsprozesses lag eine hohe Zelldichte mit einer OD₆₀₀ von etwa 80 vor. Durch Entnahme eines Teils der Kultur während des Fermentationsprozesses konnte die im zeitlichen Fermentationsverlauf vorliegende Zellmasse berechnet werden (Abb. 4.31 B). Am Ende des Fermentationsprozesses wurde eine Zellpelletfeuchtmasse von etwa 420 g erhalten, womit 4-5 Zellaufschlüssenansätze mit dem BeadBeater-Zellhomogenisator durchgeführt werden konnten. Die erfolgreiche Induktion der PffNTG107S-Expression wurde durch eine Western Blot-Analyse der isolierten Membranfraktionen von im Fermentationsverlauf entnommenen Proben angezeigt (Abb. 4.31 C). Vor Methanolzugabe in den ersten 24 h wurden durch den anti-FNT-Antikörper keine Proteine detektiert. Nach PffNTG107S-Induktion nahmen die Chemilumineszenzintensitäten der Banden bis zum Ende des Fermentationsprozesses nach 66 h kontinuierlich zu. Es wurde jeweils eine Gesamtproteinmasse von 30 μ g aufgetragen und die Proben mit SDS bei 37 °C bzw. bei 60 °C inku-

biert. Bei den bei 37 °C inkubierten Proteinproben waren neben den PfFNTG107S-Monomeren entsprechenden Banden bei einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa intensive höhermolekulargewichtige und PfFNTG107S-Pentameren zuzuordnende Banden zu erkennen. Die Banden wurden nach Denaturierung der PfFNTG107S-Pentamere durch Inkubation mit SDS bei 60 °C wie erwartet nicht detektiert. Durch Induktion der PfFNTG107S-Expression wurden in *P. pastoris*-Fermenterkulturen mit fortlaufender Kultivierungszeit SDS-stabile PfFNTG107S-Pentamere assembliert. Zur Zellhomogenisierung wurden 80 g des durch die Fermentation gewonnenen *P. pastoris*-Zellpellets mittels BeadBeater-Zellhomogenisator mechanisch aufgeschlossen. Zur Überprüfung der Effektivität des Zellaufschlusses wurden die Zentrifugationsfraktionen in einer Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 4.31 D). Im Pellet der Zentrifugation bei 1000 g wurde ein geringer PfFNTG107S-Anteil mit den größeren Zellbruchstücken pelletiert, wohingegen das intensivste Chemilumineszenzsignal im 10.000 g-Zentrifugationspellet erhalten wurde. In der Membranfraktion war hingegen nur ein wenig intensives Bandensignal erkennbar, was auf die unzureichende Isolierung der Membranfraktion mit diesem Extraktionsprotokoll hindeutete. Zur Erhöhung der PfFNTG107S-Ausbeute in der Membranfraktion wurde die homogenisierte Zellsuspension vor Zentrifugation mit verschiedenen Puffervolumina verdünnt und die Membranfraktionen durch Zentrifugation bei 100.000 g als Pellet gewonnen. Abb. 4.31 E zeigt die Western Blot-Analyse der 10.000 g-

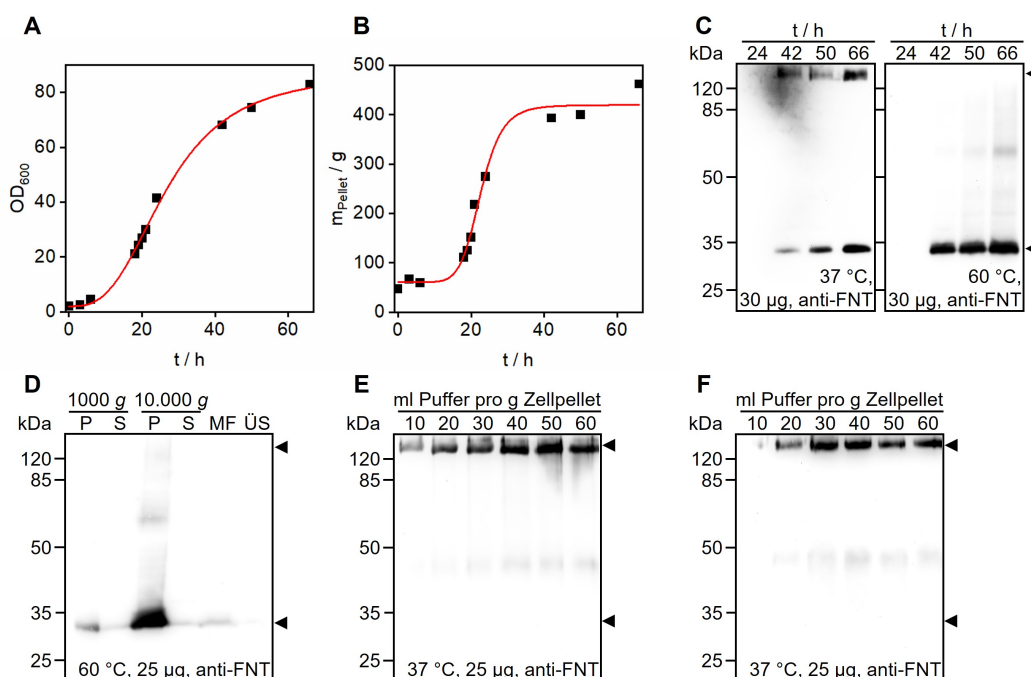


Abb. 4.31: Produktion von PfFNTG107S und Extraktion aus *P. pastoris*-Fermenterkulturen. **A** Zellwachstum einer *P. pastoris*-Expressionskultur repräsentiert durch die OD₆₀₀. **B** Berechnete Zellpelletmasse in einer 2 l-Fermenterkultur. Aus den Zellpelletmassen der zu verschiedenen Zeitpunkten entnommenen Proben wurde auf das Gesamtvolumen der Fermenterkultur hochgerechnet. **C** Western Blot-Analyse der Membranfraktionen von zu verschiedenen Zeitpunkten des Fermentationsprozesses entnommenen Proben zum PfFNTG107S-Expressionsnachweis. Nach 24 h wurde die PfFNTG107S-Proteinsynthese durch Methanolzugabe gestartet. Inkubation von 30 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 37 °C (links) bzw. 60 °C (rechts) und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **D** Western Blot-Analyse der Zentrifugationsfraktionen des Zellaufschlusses (P, Pellet; S, Überstand; MF, Membranfraktion; ÜS, 100.000 g-Überstand). Inkubation von 25 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 60 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **E** Western Blot-Analyse der 10.000 g-Zentrifugationspellets nach Verdünnung der Zellmasse mit verschiedenen Verdünnungsfaktor. Inkubation von 25 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 37 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **F** Western Blot-Analyse der Membranfraktionen nach Verdünnung der Zellmasse mit verschiedenen Verdünnungsfaktor. Inkubation von 25 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 37 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper.

Zentrifugationspellets bei verschiedenen Puffer-zu-Zellpellet-Verdünnungsfaktoren, wobei bei einer Verdünnung von 1 g Zellpellet in 50 ml Puffer das stärkste Chemilumineszenzsignal und bei geringeren Verdünnungsfaktoren eine erheblich geringere Intensität der hochmolekulargewichtigen PfFNTG107S-Pentameren entsprechenden Banden erhalten wurde. Bei den Membranfraktionen lag das intensivste Chemilumineszenzsignal bei einer Verdünnung von 1 g Zellpellet in 40 ml Puffer vor, während bei einer Verdünnung von 1 g Zellpellet auf 10 ml Puffer beinahe keine PfFNTG107S-Membranproteine detektiert wurden (Abb. 4.31 F). Da ein größerer Verdünnungsfaktor tendenziell höhere PfFNTG107S-Ausbeuten in den Membranfraktionen bewirkte, wurden bei folgenden Membranfraktionsisolierungen Verhältnisse von 40 ml Puffer pro 1 g Zellpellet eingesetzt.

4.19 Versuche zur PfFNTG107S-Extraktion aus *P. pastoris*-Hefezellen

Aus *P. pastoris*-Fermenterkulturen konnten somit größere Mengen an Membranfraktionen isoliert werden als aus *S. cerevisiae*-Fermenterkulturen mit vergleichbarem Kulturvolumen. Im nächsten Schritt sollte ein geeignetes Solubilisierungsdetergenz zur PfFNTG107S-Extraktion aus der *P. pastoris*-Membranfraktion identifiziert werden. In einem initialen Solubilisierungsversuch wurden bereits untersuchte Detergenzkonzentrationen eingesetzt und die resultierenden Solubilisierungsüberstände in einer Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 4.32 A). Bei einer eingesetzten Gesamtproteinmasse von etwa 1 mg wurde in einem Ansatzvolumen von 0,3 ml zunächst keine quantitative PfFNTG107S-Solubilisierung erreicht. Die intensivste Chemilumineszenzbande wurde bei einer DDM-Konzentration von 0,5 % (m/v) erhalten, allerdings wurde im Vergleich zur Solubilisierungskontrolle mit 1 % (m/v) SDS nur ein sehr geringer PfFNTG107S-Anteil extrahiert. Weiterhin wurden hier zur Umgehung eines späteren Detergenzaustausches Versuche zur direkten PfFNTG107S-Extraktion mit einem für die Cryo-EM geeigneten Stabilisierungsdetergenz wie LMNG oder GDN unternommen. Beide Detergenzien waren in der eingesetzten Konzentration von jeweils 1,5 % (m/v) nicht zur PfFNTG107S-Extraktion geeignet und lediglich mit 1,5 % (m/v) DDM wurden mögliche PfFNTG107S-Pentamere im Solubilisierungsüberstand detektiert (Abb. 4.32 B). Mit einer geringeren DDM-Konzentration von 1,0 % (m/v) konnte in einem weiteren Solubilisierungsversuch ebenso wie ohne Detergenzzusatz kein PfFNTG107S aus der Membranfraktion extrahiert werden (Abb. 4.32 C). Mit 2 % (m/v) SDS wurde im Solubilisierungsüberstand eine ähnlich intensive Bande erhalten wie im entsprechenden 100.000 g-Pellet, was die prinzipielle Möglichkeit der Proteinextraktion mit der gewählten Solubilisierungsmethode zeigt. Da DDM als geeignetes Solubilisierungsdetergenz ermittelt wurde und eine starke Konzentrationsabhängigkeit des Solubilisierungserfolgs vorlag, wurden DDM-Konzentrations screenings durchgeführt und die Solubilisierungsüberstände in einer Western Blot-Analyse (Abb. 4.32 D) untersucht. Die intensivsten Banden wurden bei tendenziell höheren Detergenzkonzentrationen von 1,25-1,5 % (m/v) DDM erhalten. Zur semiquantitativen Bestimmung des Anteils des solubilierten PfFNTG107S sind die relativ zur Bandenintensität der verwendeten Membranfraktion in der Western Blot-Analyse bestimmten Bandenintensitäten der Solubilisierungsüberstände in Abb. 4.32 E dargestellt. Mit 1,25 % (m/v) DDM wurde eine relative Intensität von 0,82 und mit 1,5 % (m/v) DDM eine relative Intensität von 0,71 erhalten. Demnach wurden durch diese DDM-Konzentrationen mit über 70 % ähnliche Anteile an PfFNTG107S solubiliert wie mit 1 % (m/v) SDS (rel. Intensität: 0,86).

Mit DDM wurde die Extraktion kleinerer PfFNTG107S-Ausbeuten aus *P. pastoris*-Membranfraktionen erreicht, allerdings konnten keine Aussagen über die Gesamtausbeute des extrahierten PfFNTG107S

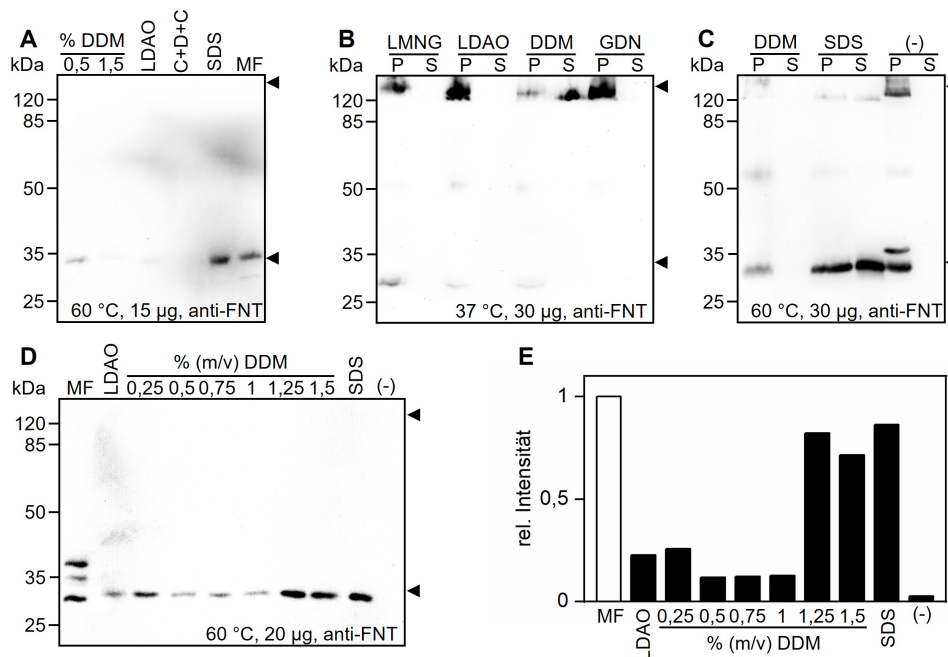


Abb. 4.32: Solubilisierung von PfFNTG107S aus *P. pastoris*-Membranfraktionen. **A** Western Blot-Analyse der Solubilisierungsüberstände des initialen Detergenzienscreenings. Angegeben ist die Konzentration von DDM in % (m/v). Weiterhin wurden 1 % (m/v) LDAO, 1 % (m/v) CHAPS + 0,5 % (m/v) DDM + 0,2 % (m/v) CHS (C+D+C) und 1 % (m/v) SDS eingesetzt. Inkubation von 15 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 60 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **B** Western Blot-Analyse der Fraktionen des Solubilisierungsscreenings. Eingesetzt wurden 1,5 % (m/v) LMNG, 4,5 % (m/v) LDAO, 1,5 % (m/v) DDM und 1,5 % (m/v) GDN. Inkubation von 30 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 37 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **C** Western Blot-Analyse der Fraktionen des Solubilisierungsscreenings. Eingesetzt wurden 1,0 % (m/v) DDM, 2 % (m/v) SDS bzw. kein Detergenz (-). Inkubation von 15 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 60 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **D** Western Blot-Analyse der Solubilisierungsüberstände des DDM-Konzentrationscreenings. Zum Vergleich wurden 1 % (m/v) LDAO, 1 % (m/v) SDS bzw. kein Detergenz (-) eingesetzt. Inkubation von 20 µg mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 60 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **E** Relative Intensität der Banden aus der Western Blot-Analyse des DDM-Konzentrationscreenings. MF, Membranfraktion; P, 100.000 g-Pellet; S, 100.000 g-Solubilisierungsüberstand.

getroffen werden. Das solubilierte PfFNTG107S sollte nachfolgend mittels Affinitätsreinigung von co-solubilierten Proteinen isoliert und so die PfFNTG107S-Ausbeute bestimmt werden. Es wurden verschiedene DDM-Konzentrationen von 0,001 % (m/v) bis 0,05 % (m/v) für die IMAC-Proteinreinigung getestet. In den Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gelen wurden unabhängig von der DDM-Konzentration in den Elutionsfraktionen keine PfFNTG107S-entsprechenden Banden erhalten. Es wurden parallel dazu Detergenzaustauschversuche zu dem für die Cryo-EM präferierten GDN während der IMAC durchgeführt. In Abb. 4.33 A ist das Coomassie-gefärbte SDS-PAGE-Gel der IMAC von mit 1,0 % (m/v) DDM aus *P. pastoris*-Membranfraktionen extrahierten PfFNTG107S in Präsenz von 0,06 % (m/v) GDN gezeigt. In den IMAC-Fractionen zwischen 80-300 mM Imidazol-haltigem Reinigungspuffer wurden keine intensiven PfFNTG107S-entsprechenden Banden erhalten und die jeweiligen IMAC-Fractionen zur weiteren Analyse zusammengegeben und konzentriert (MWCO 100 kDa). Auch in der konzentrierten IMAC-Fraktion mit einer Gesamtproteinmasse von etwa 0,1 mg konnten im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gel keine prägnanten auf PfFNTG107S hinweisende Banden visualisiert werden. In der zugehörigen Western Blot-Analyse wurden in den IMAC-Fractionen von 200-300 mM Imidazol-haltigem Reinigungspuffer sowie an der Agarosematrix schwache hochmolekulargewichtige PfFNTG107S-Pentameren entsprechende Banden detektiert. Nach Konzentrierung wurde im Konzentrat nach Inkubation mit SDS

bei 60 °C eine durch den anti-FNT-Antikörper detektierte Doppelbande erhalten, die auf PfFNTG107S-Translationsvarianten bzw. posttranslationale Modifikationen hindeuten könnte. Zur Untersuchung von möglicherweise im *P. pastoris*-Expressionssystem vorgenommenen Glykosylierungen des PfFNTG107S-Membranproteins wurde das Proteinkonzentrat mit den Glykosidasen PNGase F und Endo H_f versetzt und nach Herstelleranweisungen inkubiert. Nach erneuter Untersuchung mittels Western Blot-Analyse konnte keine Veränderung der Bandenintensitäten beobachtet werden, sodass PfFNTG107S-Glykosylierungen wahrscheinlich nicht für das Auftreten der beobachteten Doppelbanden ursächlich waren.

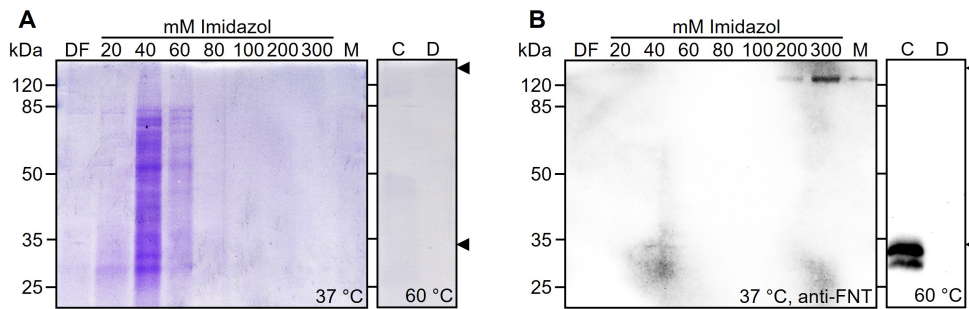


Abb. 4.33: Affinitätsreinigung von aus *P. pastoris*-Hefezellen extrahiertem PfFNTG107S. **A** Coomassie-gefärbtes SDS-PAGE-Gel der IMAC-Reinigungsfractionen von PfFNTG107S in Präsenz von 0,06 % (m/v) GDN. DF, Durchfluss; M, Matrix; C, Konzentrat der Konzentrierung (MWCO 100 kDa); D, Durchfluss der Konzentrierung. Inkubation der mit SDS versetzten Proben bei 37 °C bzw. 60 °C. **B** Western Blot-Analyse der IMAC-Reinigungsfractionen von PfFNTG107S in Präsenz von 0,06 % (m/v) GDN. DF, Durchfluss; M, Matrix; C, Konzentrat der Konzentrierung (MWCO 100 kDa); D, Durchfluss der Konzentrierung. Inkubation der mit SDS versetzten Proben bei 37 °C bzw. 60 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper.

4.20 PfFNTG107S kann aus Zellen der NY17-Sekretionsmutante extrahiert werden

Es wurde die Herstellung von PfFNTG107S als funktionale Pentamere in Hefeexpressionssystemen gezeigt. Jedoch ergaben sich Schwierigkeiten bei den PfFNTG107S-Extraktionen aus den jeweiligen Membranfraktionen, wobei die Problemursache in der mangelhaften Homogenisierung der Hefezellen während des Zellaufschlusses vermutet wurde. Zur Lösung dieses Problems wurde im Folgenden die *S. cerevisiae*-Sekretionsmutante des Stammes NY17 zur Proteinproduktion verwendet, bei der unter bestimmten Inkubationsbedingungen die Anreicherung von Post-Golgi-Vesikeln forciert werden kann (Novick et al., 1980; Walworth et al., 1989). Diese intrazellulären Post-Golgi-Vesikel sollten durch Aufbrechen der Hefezellen vereinfacht ohne Notwendigkeit eines vollständigen Homogenisierens der Zellen extrahiert werden. Dazu wurden *S. cerevisiae*-Hefezellen des Stammes NY17 mit entsprechenden PfFNTG107S-Konstrukten transformiert und einem Expressionsklonscreening unterzogen. In Abb. 4.34 A ist die Untersuchung der isolierten Membranfraktionen der auf PfFNTG107S-Produktion getesteten Expressionsklone in einer Western Blot-Analyse gezeigt. Nach Inkubation mit SDS bei 60 °C wurden keine hochmolekulargewichtigen Banden erwartet und bei dieser Inkubationstemperatur denaturierte PfFNTG107S-Pentamere als Banden bei einem PfFNTG107S-Monomeren entsprechenden Molekulargewicht von etwa 34 kDa visualisiert. Es wurden die Klone mit den laufenden Nummern 1, 9 und 10 als geeignete Expressionsklone identifiziert und für folgende Expressionskulturen verwendet. Der *S. cerevisiae* NY17-Expressionsklon 10 wurde zur Inokulation einer NY17-Fermenterkultur verwendet und der Fermentationsprozess nach Inkubation für 4 h bei 37 °C zur Anreicherung der Post-Golgi-Vesikel nach einer verkürzten Fermentationsperiode von

insgesamt 22 h beendet. Es wurde aus einer 2 Liter-Fermenterkultur eine Zellpelletfeuchtmasse von 7,0 g erhalten, die mittels BeadBeater-Zellhomogenisator mechanisch aufgeschlossen wurde. Die Western Blot-Analyse der Zellaufschlussfraktionen ist in Abb. 4.34 B gezeigt, wobei weder im 1000 g-Zellpellet noch im 10.000 g-Zentrifugationspellet PfFNTG107S detektiert wurde. In der Membranfraktion des Zellaufschlusses wurde nach Inkubation mit SDS bei 60 °C eine intensive Chemilumineszenzbande bei einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa erhalten. Nach Inkubation der Proteinproben mit SDS bei 37 °C wurde eine PfFNTG107S-Pentameren entsprechende hochmolekulargewichtige Bande in der Membranfraktion detektiert. Dies zeigt die erfolgreiche Extraktion von vermutlich PfFNTG107S-Pentamere-enthaltenen Post-Golgi-Vesikeln aus der NY17-Sekretionsmutante und deutet auf die Pelletierung dieser Vesikel zusammen mit der Membranfraktion bei 100.000 g-Zentrifugation hin. Ein Teil dieser Membranfraktion mit den isolierten Post-Golgi-Vesikeln wurde für Solubilisierungsversuche zur PfFNTG107S-Extraktion verwendet. Da die Eignung von DDM zur PfFNTG107S-Solubilisierung aus der Membranfraktion bereits gezeigt wurde, wurde entsprechend ein DDM-Konzentrationscreening durchgeführt und die jeweiligen 100.000 g-Solubilisierungsüberstände in einer Western Blot-Analyse untersucht (Abb. 4.34 C). In Solubilisierungsansätzen mit DDM-Konzentrationen von 1,25 % (m/v) und 1,5 % (m/v) wurden die besten Solubilisierungserfolge bei Vorliegen von etwa 2 mg Gesamtprotein erzielt. Es wurde bei allen eingesetzten DDM-Konzentrationen deutlich weniger PfFNTG107S als bei der SDS-Solubilisierungskontrolle solubilisiert, was auf die allgemein geringe Solubilisierungseffizienz hindeutet. Bei der Solubilisierung mit DDM wurden relativ zur Solubilisierung mit SDS zu geringerem Molekulargewicht verschobene Banden detektiert, was im Gegensatz zur SDS-Solubilisierungskontrolle auf die Extraktion von möglicherweise korrekt gefaltetem PfFNTG107S hindeutet.

Zur Untersuchung der PfFNTG107S-Orientierung in den extrahierten Post-Golgi-Vesikeln wurde ein Faktor Xa-Assay zur Orientierungs-abhängigen Entfernung der C-terminalen Poly-His-Tags genutzt. Bei Vorliegen von nativen PfFNTG107S-Pentameren in der Vesikelmembran weisen die Proteintermini entweder ins Vesikellumen oder zum umgebenden Medium. Durch Inkubation der PfFNTG107S-enthaltenen Post-Golgi-Vesikel mit Faktor Xa-Protease kann der C-terminale Poly-His-Tag durch Schneiden an der vorgelagerten Faktor Xa-Schnittstelle entfernt werden, solange die Faktor Xa-Schnittstelle zum Medium orientiert und damit für die hinzugegebene Faktor Xa-Protease zugänglich ist. Für die Entfernung der Poly-His-Tags mittels Faktor Xa-Protease wurden extrahierte Post-Golgi-Vesikel entsprechend einer Gesamtproteinmasse von 50 µg mit 2 mM Calciumchlorid und 15 µg Faktor Xa-Protease über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Mittels Western Blot-Analyse mit einem gegen den Poly-His-Tag gerichteten Antikörper wurde der Anteil der im Vergleich zu einem nicht mit Faktor Xa behandelten Kontrollansatz entfernten Poly-His-Tags und damit die präferierte PfFNTG107S-Orientierung in den Vesikelmembranen semiquantitativ bestimmt. Die entsprechende Western Blot-Analyse zum Faktor Xa-Assay von zwei unabhängigen Isolationen von Post-Golgi-Vesikeln ist neben der zur Beladungskontrolle Ponceau S-gefärbten PVDF-Membran in Abb. 4.34 D gezeigt. In den nicht mit Faktor Xa behandelten Kontrollansätzen wurden nach Denaturierung der PfFNTG107S-Pentamere bei 60 °C intensive Banden bei einem Molekulargewicht von etwa 34 kDa erhalten. Diese Chemilumineszenzintensitäten wurden als Referenz jeweils auf 100 % normiert. In den mit Faktor Xa-Protease inkubierten Ansätzen wurden weniger intensive Chemilumineszenzsignale mit einer relativen Intensität von $11 \pm 2\%$ bezogen auf den nicht mit Faktor Xa behandelten Kontrollansatz erhalten. Dementsprechend wurden vermutlich etwa 90 % der Poly-His-Tags in den Ansätzen mit zugegebener Faktor Xa-Protease entfernt. Dies deutet die mit 90 % überwiegende, erwartete

PfFNTG107S-Orientierung in den Post-Golgi-Vesikeln mit den Proteintermini zum umgebenen Medium an. Die extrahierten und PfFNTG107S-beihaltenden Post-Golgi-Vesikel wurden in Schwellungsassays an der Stopped-Flow-Apparatur eingesetzt. Erste Schwellungsmessungen deuteten auf den PfFNTG107S-vermittelten L-Lactatimport in die Post-Golgi-Vesikel hin. Durch Zusetzen von 100 μ M BH267,meta konnte der L-Lactatimport vermutlich inhibiert werden. Diese vorläufigen Ergebnisse konnten bisher nur mit einer Post-Golgi-Vesikel-Präparation erzielt und mit weiteren Präparationen nicht reproduziert werden. Diese initialen Schwellungsmessungen wurden bei einem angelegten L-Lactatgradienten von 0 mM bis 5 mM durchgeführt, während ein steilerer L-Lactatgradient von 0 mM bis 50 mM zu zahlreichen Registrierung von Messartefakten womöglich durch Zerstörung der Post-Golgi-Vesikel führte. Die hier beschriebene initiale Extraktion von Post-Golgi-Vesikeln scheint eine vereinfachte PfFNTG107S-Extraktion und nach Protokolloptimierungen Schwellungsmessungen mit natürlichen Membranvesikeln zu ermöglichen. Dies bietet die Grundlage für zukünftige und in Kap. 5.4 diskutierte PfFNTG107S-Untersuchungen.

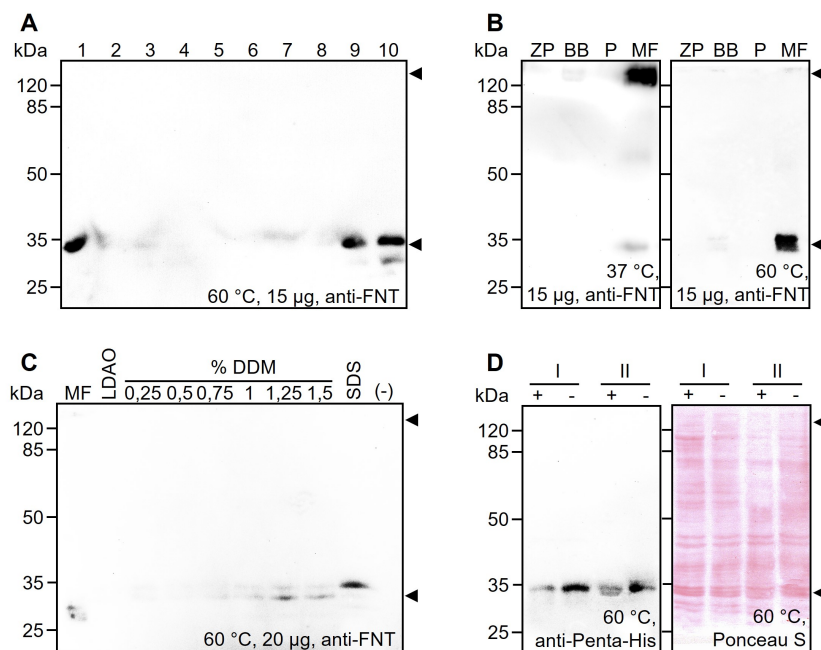


Abb. 4.34: Extraktion von Post-Golgi-Vesikeln aus der NY17-Sekretionsmutante. **A** Western Blot-Analyse der Membranfraktionen des PfFNTG107S-Expressionsklonscreenings. Es wurde die Membranfraktion von zehn Expressionsklonen (1-10) zu einer Gesamtproteinmasse von 15 μ g aufgetragen. Inkubation der mit SDS versetzten Proteinproben bei 60 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **B** Western Blot-Analyse der Zentrifugationsfraktionen des Zellaufschlusses. ZP, 1000 g-Zellpellet vor Zellaufschluss; BB, 1000 g-Zellpellet nach BeadBeater-Zellaufschluss; P, 10.000 g-Pellet; MF, Membranfraktion. Inkubation von 15 μ g mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 37 °C (links) bzw. 60 °C (rechts) und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **C** Western Blot-Analyse der Solubilisierungsüberstände zum DDM-Konzentrationscreening. Zum Vergleich wurden 1 % (m/v) LDAO, 1 % (m/v) SDS bzw. kein Detergenz (-) eingesetzt. Inkubation von 20 μ g mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 60 °C und Detektion mit einem anti-FNT-Antikörper. **D** Western Blot-Analyse und Ponceau S-gefärbte PVDF-Membran des Faktor Xa-Assays von zwei Chargen isolierter Post-Golgi-Vesikel (I und II) zur Entfernung der C-terminalen Poly-His-Tags. Inkubation von 50 μ g mit SDS versetztem Gesamtprotein bei 60 °C und Detektion mit einem gegen den C-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper. +, mit Faktor Xa-Protease; -, ohne Faktor Xa-Protease.

5 Diskussion

5.1 Eignung der zellfreien Proteinsynthese zur oligomeren Membranproteinproduktion

Die zellfreie Proteinsynthese mit *E. coli*-Zellextrakten nach dem CECF-Verfahren ermöglicht die zeiteffiziente Produktion von sowohl löslichen Proteinen als auch Membranproteinen in großen Ausbeuten. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte zellfreie Membranproteinsynthese konnten hohe Ausbeuten von IMAC-gereinigtem PfFNTG107S ($1,72 \pm 0,19$ mg/ml RM), PfFNTV196L (1,5 mg/ml RM), PfFNTG21E (1,2 mg/ml RM) und PfCRT-CQR (1,5 mg/ml RM) erzielt werden (Kap. 4.2 und Kap. 4.11). Dies deckt sich mit den erhaltenen Proteinausbeuten von zellfrei hergestelltem PfFNT von $1,4 \pm 0,3$ mg/ml RM (Hajek et al., 2019) und entspricht in etwa den erwarteten Proteinausbeuten bei Verwendung eines auf *E. coli*-Zellen basierten Zellextrakts im einstelligen Milligramm-Bereich pro ml eingesetztem Zellextrakt (Gagoski et al., 2016). Hervorzuheben ist auch die vereinfachte Reinigung *via* Affinitätschromatographie bei Verwendung der zellfreien Proteinsynthese im Vergleich zu zellbasiert hergestellten Membranproteinen. Im Reaktionsansatz der zellfreien Proteinsynthese liegen bedingt durch das Isolierungsprotokoll des Zellextrakts nur Teile des Zellproteoms und ein vernachlässigbarer Anteil an Membranfraktionen mit Membranproteinen vor (Schwarz et al., 2008; Wu & Swartz, 2008; Batista et al., 2021). Hingegen wird bei der Isolierung von Membranproteinen aus Membranfraktionen ein großes Spektrum an weiteren Membranproteinen cosolubilisiert, von denen das zu untersuchende Membranprotein während der Reinigungsschritte isoliert werden muss. Dies geschieht häufig unter Verwendung von zweischrittigen affinitätschromatographischen Reinigungsprotokollen, wie z. B. unter Ausnutzung eines zusätzlichen Streptavidin-Tags, was einen erhöhten Reinigungsaufwand und potenziell höhere Verluste des Zielproteins bedeutet. Zellfrei hergestellte Membranproteine konnten im Rahmen dieser Arbeit in Gegenwart des Synthesedetergenz (zumeist Brij78) durch eine einschrittige IMAC zu einem hohen Reinheitsgrad und sehr gut reproduzierbar isoliert werden (Kap. 4.2, Kap. 4.3, Kap. 4.5 und Kap. 4.11).

Durch die vielfältigen Manipulationsmöglichkeiten des zugänglichen Transkription-Translation-Systems können die Bedingungen zudem schnell auf spezifische Anforderungen für die effiziente Proteinsynthese angepasst werden. Dies ist insbesondere bei der Synthese von Membranproteinen relevant, da so innerhalb kürzester Zeit nach ausreichenden Synthesebedingungen wie der benötigten hydrophoben Umgebung und optimalen Detergenzkonzentrationen gesucht werden kann (Klammt et al., 2005). Im Rahmen dieser Arbeit konnte so u. a. ein GDN-Konzentrationscreening durchgeführt (Kap. 4.5) und damit eine neue Detergenzumgebung für die erfolgreiche zellfreie PfFNTG107S-Synthese identifiziert werden. Ein wesentlicher Vorteil der zellfreien Proteinsynthese von Membranproteinen in Gegenwart von Detergenzien ist der Wegfall der bei zellbasierter Membranproteinsynthese notwendigen Membranproteinextraktion aus Lipidbilayermembranen des jeweiligen Expressionsorganismus. So können Membranproteine direkt mit einem für die nachfolgenden (Struktur-)Untersuchungen geeigneten Detergenz wie z. B. mit dem für die Cryo-Elektronenmikroskopie geeigneten GDN solubilisiert werden. Zur Proteinsolubilisierung aus Membranfraktionen sind für die Cryo-EM häufig verwendete Detergenzien wie das vom Digitonin abgeleitete GDN oder LMNG meist zu mild (siehe Kap. 4.17 und Kap. 4.19), während harschere Detergenzien das zu untersuchende Membranprotein möglicherweise denaturieren bzw. nicht ausreichend stabilisieren (Privé, 2007). Auch die Anwendung der Nanodisctechnologie kann mit der zellfreien Proteinsynthese kombiniert werden, sodass Membranproteine gänzlich ohne Detergenzkontakt hergestellt und gereinigt werden kön-

nen. Dies wurde bereits in meiner Masterarbeit für die Membranproteinsynthese von PfFNT, PfCRT und eines hBSG-hMCT1-Fusionsproteins unter cotranslationaler Rekonstitution in MSP1E3D1-ND gezeigt (Hansen, 2019). Besonders bei instabilen Membranproteinen ohne ausreichend stabilisierendes und effizientes Solubilisierungsdetergenz oder bei Membranproteinkomplexen kann die direkte, cotranslationale Rekonstitution in Nanodiscs eine vielversprechende Strategie darstellen (Roos et al., 2012; Rues et al., 2016; Malhotra & Alder, 2017). Der Einsatz von Membranprotein-Nanodisc-Komplexen zur Strukturaufklärung *via* Cryo-EM wird in Kap. 5.3 näher diskutiert.

Die generelle Anwendbarkeit des Protokolls zur zellfreien Proteinsynthese auf Grundlage eines *E. coli*-Zellextrakts zur Produktion von funktionalen Proteinen wurde mittels Synthese der löslichen Fluoreszenzproteine GFP und mNeonGreen gezeigt, deren Funktionalität durch die vermittelte Fluoreszenz indiziert wird (Kap. 4.1, Kap. 4.5 und Kap. 4.9). Einige lösliche Proteine konnten bereits über zellfreie Proteinsynthese hergestellt und die Proteinstrukturen im Folgenden gelöst werden. Abe et al. (2022) konnten nach zellfreier Proteinsynthese in Kombination mit Proteinkristallisation die Struktur des 104 AS kleinen, löslichen Proteins CipA mit einer Auflösung von 2,11 Å *via* Röntgenkristallographie aufklären. Neben löslichen Proteinen ist in der Literatur auch die zellfreie Synthese einer Reihe von funktionalen Membranproteinen beschrieben. Unter den ersten mit einem zellfreien Proteinsynthese-System hergestellten Membranproteinen befinden sich vornehmlich kleine Membranproteine mit einem Molekulargewicht ≤ 50 kDa, die zumeist weniger als zehn Transmembranspannen aufweisen (Schwarz et al., 2008). Zudem konnten auch einige oligomere Membranproteine und Membranproteinkomplexe zellfrei hergestellt und deren Funktionalität nachgewiesen werden. Eines der ersten mittels zellfreier Proteinsynthese hergestellter Membranproteine war ein eukaryotischer Kaliumkanal (Rosenberg & East, 1992), der ein funktionales Tetramer bildet. Zur Ausbildung dieses Tetramers musste entsprechend die Assemblierung der vier Untereinheiten während der zellfreien Proteinsynthese realisiert werden (Tan et al., 2022). Elbaz et al. (2004) konnten zudem den funktionalen Multidrug-Transporter EmrE aus *E. coli* zellfrei herstellen, der als Dimer vorliegt und für den zudem Dimere der EmrE-Dimere beobachtet wurden. Auch wurden vereinzelte Membranproteinstrukturen unter Verwendung der zellfreien Proteinsynthese aufgeklärt. Darunter befindet sich auch die Cryo-EM-Struktur des multimeren Komplexes aus bakteriellen EpsD- und ExeD-Sekretinen mit einer Auflösung von etwa 3,5 Å, die durch zellfreie Proteinsynthese in Präsenz von Liposomen zur Sekretin-Multimerisierung gelöst wurde (Howard et al., 2019). Damit wurde gezeigt, dass prinzipiell auch größere Membranproteinkomplexe während der zellfreien Proteinsynthese bei Vorliegen einer passenden membranähnlichen Umgebung assembliert werden können. Eine derartige Membranumgebung wurde in den im Rahmen dieser Arbeit unternommenen zellfreien Syntheseansätzen nicht bereitgestellt und entsprechend mögliche Modifikationen des Systems der zellfreien Proteinsynthese werden weiter unten und in Kap. 5.2 besprochen. Für PfCRT konnte in meiner Masterarbeit gezeigt werden, dass dieses mittels zellfreier Proteinsynthese hergestellt werden kann und vermutlich sowohl in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiert als auch mit Brij78 solubilisiert in geringen Anteilen als PfCRT-Dimere vorliegt (Hansen, 2019; Petersen, 2021). Ebenso konnte für hBSG-hMCT1-Fusionsproteine die mögliche Präsenz von entsprechenden Dimeren bei zellfreier Proteinsynthese in Gegenwart von Brij78 gezeigt werden (Hansen, 2019; Köpnick, 2021). Initiale elektronenmikroskopische Untersuchungen deuteten zudem darauf hin, dass ein kleiner Anteil des hBSG-hMCT1-Fusionsproteins in DOPG-MSP1E3D1-ND rekonstituiert werden konnte. Aufgrund der geringen Auflösung konnte jedoch die tatsächliche Dimerisierung der Fusionsproteine in den Nanodiscs nicht bestätigt werden. Zudem wurden keine Funktionsnachweise der zellfrei hergestellten

Transportproteine erbracht und die Ausbildung der funktionellen Konformationen nicht bestätigt. Die humanen tetrameren Aquaporine hAQP6 und hAQP11 wurden von Dr. Sinja Bock zellfrei in Gegenwart von Brij78 hergestellt. Bei diesen Syntheseansätzen konnten allerdings jeweils nur die AQP-Protomeren entsprechenden Banden und keine AQP-Oligomere in SDS-PAGE-Analysen festgestellt werden (Bock, 2014). PfFNT als AQP-strukturähnliches aber pentameres Transportprotein konnte noch nicht sicher als zellfrei hergestelltes Pentamer nachgewiesen werden. Hajek et al. (2019) zeigten zwar 2D-Klassensummenbilder von TEM-Aufnahmen mit Negativkontrastierung mit möglichen PfFNT-Pentameren, allerdings konnte durch in der vorliegenden Arbeit getätigte elektronenmikroskopische Untersuchungen gezeigt werden, dass vermutlich auch Artefakte der Datenprozessierung das Vorliegen von Pentameren vortäuschen können (Abb. 4.11). Somit kann die Assemblierung von PfFNT-Pentameren nach zellfreier Proteinsynthese in dem angewendeten Zellfrei-System nicht verifiziert werden. Die bei Hajek et al. (2019) publizierten Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gele zeigen zwar Banden SDS-resistenter PfFNT-Pentamere bei dem aus *P. pastoris*-Hefezellen extrahierten PfFNT, nicht aber bei dem zellfrei hergestellten Membranprotein. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass auch bei zellfreier PfFNTG107S-Synthese in Gegenwart von Brij78 und GDN keine PfFNTG107S-Pentameren entsprechenden Banden observiert werden konnten (Abb. 4.3 A und Abb. 4.8 B). Die Funktionalität der zellfrei hergestellten PfFNTG107S-Transportproteine konnte zudem in durchgeführten Schwellungsassays mit Proteoliposomen nicht nachgewiesen werden. Vorliegende Limitationen bei der Funktionsuntersuchung von Transportproteinen sowie mögliche Lösungsstrategien werden in Kap. 5.6 weiter diskutiert.

Möglicherweise ist die Assemblierung von zellfrei hergestellten Proteinoligomeren aufgrund der fehlenden Lipidbilayer von Membransystemen erschwert und in Gegenwart von Detergenzien sehr ineffektiv. Viele integrale Membranproteine werden während oder unmittelbar nach der Translation in Lipidbilayermembranen eingebaut und bilden in der Lipidbilayerumgebung den korrekten und funktionalen Faltungszustand aus (Skach, 2009; Hegde & Keenan, 2022). Dies könnte vor allem auf aus mehreren Untereinheiten bzw. Protomeren bestehende Membranproteinkomplexe bzw. Membranproteinoligomere wie etwa PfFNT zutreffen und die Assemblierung der einzelnen Protomere ohne Unterstützung eines Lipidbilayers und assoziierter Chaperone erschweren oder unmöglich machen (Daley, 2008). Obwohl der genaue Mechanismus der Oligomerassemblierung weitestgehend unverstanden ist, wird vermutet, dass Membranproteinoligomere erst in der Lipidbilayermembran und möglicherweise mit Unterstützung von Chaperonen und Assemblierungsfaktoren zusammengesetzt werden (Hegde & Keenan, 2022). Die wenig intensiven Banden von potenziellen PfFNT-Dimeren und -Oligomeren (Abb. 4.3, Abb. 4.5, Abb. 4.8 und Abb. 4.20) zeigen die sehr geringe Assemblierungseffizienz bei zellfreier Proteinsynthese in Gegenwart von Detergenzien an. Es ist somit fraglich, ob sich die zellfreie Proteinsynthese ohne Bereitstellung von Liposomen oder Nanodiscs zur quantitativen Herstellung von multimeren Membranproteinen eignet. Sachse et al. (2014) fassten einige Methoden zur Bereitstellung einer Membranumgebung für die zellfreie Membranproteinsynthese zusammen. Mittels Unterstützung durch bereitgestellte Lipidbilayerumgebungen könnte die Assemblierung von Membranproteinoligomeren in korrekter Faltung forciert werden. Durch Zusatz von Liposomen zu gereinigten Komponenten eines Transkriptions-Translation-Systems können funktionelle Membranproteine zellfrei hergestellt werden (Kuruma & Ueda, 2015). Eine Variante stellt außerdem die cotranslationale Rekonstitution in Lipid-MSP-Nanodiscs während der zellfreien Proteinsynthese dar, die in meiner Masterarbeit bereits angewendet wurde (Hansen, 2019). In Kap. 5.3 wird die Eignung von in Nanodiscs rekonstituierten Membranproteinen für die Strukturaufklärung *via* Cryo-EM diskutiert.

5.2 Mögliche Modifikationen des Systems der zellfreien Proteinsynthese

PfFNT weist keine Disulfidbrücken auf und es ist nicht bekannt, dass für die Funktionalität der PfFNT-Transportproteine posttranslationale Modifizierungen notwendig sind (Peng et al., 2021). Viele Proteine hingegen benötigen für die korrekte Ausbildung der Tertiärstruktur und Funktionsausübung posttranslationale Modifizierungen wie beispielsweise Disulfidbrücken. Die Möglichkeit der Ausbildung solcher Modifizierungen ist dabei abhängig von dem verwendeten Expressionssystem und so sind z. B. prokaryotische *E. coli*-Zellen nicht zur Bildung aller posttranslationalen Modifizierungen eukaryotischer Proteine wie Glykosylierungen befähigt bzw. führen derartige Modifizierungen nur sehr ineffektiv aus (Jaffé et al., 2014; Macek et al., 2019). Für Funktions- und Strukturuntersuchungen von zellfrei hergestellten Proteinen sind ebenfalls Überlegungen über die Realisierung dieser Modifizierungen innerhalb des artifizialen Systems anzustellen. Abseits des PfFNT-Projekts wurden begleitend zu der vorliegenden Arbeit weitere (Membran-)Proteine wie beispielsweise das mit humanen MCT-Transportproteinen assoziierte Chaperon Basigin zellfrei hergestellt. Korrekt gefaltetes Basigin enthält zwei Disulfidbrücken zur Stabilisierung der jeweiligen Immunglobulin-ähnlichen Domäne (Yu et al., 2008), für deren Ausbildung aus Cysteinen ein oxidatives Milieu benötigt wird. In dem hier durchgeführten System der zellfreien Proteinsynthese wurde als Oxidationsschutz der T7-RNA-Polymerase und anderer Proteine DTT hinzugegeben, welches zusammen mit der Reduktionsaktivität des Zellextrakts ein reduktives Milieu hervorruft. Aus diesem Grund wurden initiale Versuche zur Bereitstellung von oxidativen Bedingungen durch Einführen eines Glutathion-Redoxsystems nach erfolgter Translation unternommen. Die ersten Analysen zur Mobilität von in Gegenwart verschiedener molarer Verhältnisse von reduzierten und oxidierten Glutathion inkubiertem Basigin in nicht-reduzierenden SDS-PAGE-Analysen zeigten keine Veränderung des Basigin-Faltungszustandes an. Dies erfordert weitere Untersuchungen, wobei zunächst das Zufügen verschiedener Disulfidisomerasen zur Katalyse der posttranslationalen Ausbildung bzw. Neuverknüpfung von Disulfidbrücken getestet werden sollte (Berkmen, 2012). Für photometrische Analysen zur Verifizierung der posttranslationalen Ausbildung von Disulfidbrücken könnten freie Cysteinreste mit dem Reagenz Dithionitrobenzoesäure quantifiziert werden (Kim & Swartz, 2004; Yin & Swartz, 2004).

Im Gegensatz zur Einführung von Disulfidbrücken nach erfolgter Translation und abgeschlossener zellfreier Proteinsynthese zielen andere Methoden zur Ausbildung von Disulfidbrücken auf eine Modifizierung der Oxidationsbedingungen bereits während der Translation ab. Ryabova et al. (1997) konnten mittels zellfreier Proteinsynthese einen funktionalen Antikörper unter Ausbildung von Disulfidbrücken herstellen, indem während der zellfreien Proteinsynthese verschiedene Chaperone, Proteindisulfidisomerasen sowie ein Glutathion-Redoxpaar hinzugefügt und reduzierende Komponenten wie DTT aus den Reaktionsansätzen entfernt wurden. Die erzielten Ausbeuten an funktionalen Antikörperfragmenten mit diesem modifizierten zellfreien Translation-Redoxsystem waren allerdings zunächst sehr gering. Für die zellfreie Produktion von eukaryotischen Proteinen mit drei bzw. vier Disulfidbrücken im *E. coli*-basierten System fügten Matsuda et al. (2013) den Reaktionsansätzen neben einem Glutathion-Redoxpaar zudem auch die Disulfidisomerase DsbC hinzu. Neben der Funktionalität der hergestellten eukaryotischen Proteine konnte auch die korrekte Ausbildung der Proteinstruktur gezeigt werden, was die Anwendbarkeit der zellfreien Proteinsynthese mit dem *E. coli*-basierten S30-Zellextrakt für die Produktion von Disulfidbrückenhaltigen Proteinen zeigt. Zur weiteren Optimierung wurde die Verringerung der Reduktionsaktivität des Zellextrakts durch Vorinkubation mit Iodacetamid zur Alkylierung der vorhandenen Cysteinreste vor-

geschlagen (Kim & Swartz, 2004; Goerke & Swartz, 2008). Durch Überexpression von verschiedenen Chaperonen in *E. coli* konnten zudem an Chaperonen angereicherte Zellextrakte generiert werden, die in Kombination mit einem Glutathion-Redoxsystem die zellfreie Synthese von funktionaler Lipase B aus *Candida antarctica* ermöglichten (Park et al., 2009).

Neben diesen Modifizierungen des *E. coli*-basierten Zellfrei-Systems und extraktfreien Transkription-Translation-Systemen (Shimizu et al., 2001, 2005) ist auch die Wahl eines aus anderen Organismen gewonnenen Zellextraktes möglich. Als vielseitig einsetzbar hat sich der aus eukaryotischen Weizenkeimen gewonnene Zellextrakt erwiesen, der mit dem *E. coli*-basierten Zellfrei-System vergleichbare Proteinausbeuten gewährleisten kann (Endo & Sawasaki, 2006; Shirokov et al., 2007). Für die GFP-Synthese mittels Dialysenmethode und einem Weizenkeim-Zellextrakt konnten Ausbeuten an fluoreszierenden Proteinen von bis zu 20 mg/ml Zellextrakt erreicht werden (Harbers, 2014). Die auf Grundlage dieses Zellextraktes durchgeführte zellfreie Proteinsynthese von 87 Proteinen mit N-terminalen GFP-Fusionstag und einem Molekulargewicht zwischen 32 kDa und 187 kDa resultierte in einem deutlich erhöhten Anteil vollständig hergestellter Proteine, während mittels der *E. coli*-basierten Syntheseansätze viele verkürzte Proteine produziert wurden (Gagoski et al., 2016). Mit *E. coli*-Zellextrakten wurden vor allem hochmolekulargewichtige Proteine häufig nicht vollständig hergestellt. In dieser Arbeit wurden zwar nach zellfreier Proteinsynthese mit einem *E. coli*-Zellextrakt keine vollständig assemblierten PfFNTG107S-Pentamere beobachtet, hingegen konnte die vollständige Herstellung von PfFNTG107S-Monomeren gezeigt werden (Abb. 4.3 A), die mit etwa 34 kDa ein vergleichsweise kleines Molekulargewicht aufweisen. Damit scheint der begrenzende Schritt eher die Assemblierung von PfFNTG107S-Pentameren aus den einzelnen Monomeren zu sein (Kap. 5.1). Neben dem Weizenkeim-Zellextrakt wurden inzwischen auch zahlreiche andere Zellextrakte für die zellfreie Proteinsynthese isoliert. Auch aus den drei in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zellsystemen (*S. cerevisiae*, *P. pastoris* und humane Zelllinien) wurden Zellextrakte gewonnen und deren Einsatz in der zellfreien Proteinsynthese beschrieben. Hodgman & Jewett (2013) entwickelten eine an die Isolierung bakterieller S30-Zellextrakte angelehnte Präparationsmethode eines *S. cerevisiae*-Zellextraktes zur kostengünstigen Proteinsynthese. Die erzielten Proteinausbeuten waren im Bereich von einigen µg/ml Zellextrakt verglichen mit bakteriellen Zellextrakten sehr gering. Durch Analyse des Hefestoffwechsels während der Synthesereaktionen, Optimierung der Inkubationsbedingungen und Einführen eines halbkontinuierlichen Reaktionsformats konnte das vorzeitige Abbrechen der Synthesereaktionen verhindert und die Proteinausbeuten deutlich erhöht werden (Schoborg et al., 2014). Zhang et al. (2020) etablierten kürzlich zur Erhöhung von Proteinausbeuten ein auf genetisch modifizierten *P. pastoris*-Hefezellen basierendes Zellfrei-System und erreichten in Batch-Reaktionen Ausbeuten von etwa 50 µg/ml Zellextrakt an fluoreszierendem GFP. Zellextrakte aus Hefezellen mit modifizierter Glykosylierungsmaschinerie (Wildt & Gerngross, 2005) könnten zudem zur zellfreien Synthese von posttranslational glykosylierten Proteinen genutzt werden. Es wurden bereits *P. pastoris*-Zelllinien entwickelt, die bezüglich auf N-Glykosylierungen humanisiert wurden und damit für die Synthese von glykosylierten Humanproteinen präferiert werden könnten (Hamilton et al., 2006).

Posttranslationale Glykosylierungen sind für die Funktionsausübung vieler (Membran-)Proteine entscheidend und teilweise zudem für die Ausbildung der korrekten Proteinfaltung, zur Stabilitätserhöhung gegenüber proteolytischer Degradation sowie beim intrazellulären Proteintargeting und der Regulierung von Exozytose relevant (Ohtsubo & Marth, 2006; Hanson et al., 2009; Kung et al., 2009; Solá & Griebenow, 2010). Für Membranproteine ist zudem die Steuerung von Zell-Zell-Interaktionen und Proteinerkennung

durch Proteinglykosylierungen bedeutend (Varki, 2007). Die Sicherstellung der Glykosylierung ist dabei zu einem Schwerpunkt für die zellfreie Produktion von funktionalen (Membran-)Proteinen geworden und es wurden vielfältige Methoden zur Kombination eines gekoppelten Translation-Glykosylierungssystems entwickelt (Hershow et al., 2020). So konnten Stech et al. (2017) die Vorteile der zellfreien Proteinsynthese mit der Proteinfaltungsmaschinerie und Glykosylierungsfähigkeit von eukaryotischen CHO-Zellen zur Antikörpersynthese verknüpfen. Dabei finden Proteinfaltung, Antikörperassemblierung und Glykosylierung in Mikrosomen statt, die aus Teilen des endoplasmatischen Retikulums stammen und angereichert in dem Reaktionsansatz der zellfreien Proteinsynthese vorliegen (Stech et al., 2012). Ein auf einem Humanzellextrakt basierendes System zur zellfreien Synthese wurde ebenfalls bereits publiziert (Mikami et al., 2006, 2008) und eignet sich besonders für die Produktion von hochmolekulargewichtigen Proteinen. So ist zukünftig die Produktion von Humanproteinen in von menschlichen Zelllinien abgeleiteten Zellextrakten denkbar, was insbesondere für die Analyse von posttranslationalen Modifizierungen relevant sein könnte. Durch die vielfältigen Möglichkeiten zur Abänderung des Systems der zellfreien Proteinsynthese können so die angestrebten Reaktionsbedingungen erreicht und mögliche unerwünschte Reaktionen wie spezielle posttranslationale Modifizierungen unterdrückt werden. Dies ist besonders bei artifiziellen oder destruktiven Proteinmodifizierungen sinnvoll, die durch heterologe Proteinsynthese in zellbasierten Expressionssystemen vorkommen können. Die möglicherweise im Rahmen dieser Arbeit bei PfFNTG107S-Produktion in *S. cerevisiae*- und *P. pastoris*-Hefeexpressionssystemen auftretenden Glykosylierungsreaktionen könnten so bei zellfreier Proteinsynthese umgangen werden.

5.3 Strukturaufklärung von in ND rekonstituierten Membranproteinen via Cryo-EM

Die Nanodisctechnologie stellt aufgrund zahlreicher Vorteile eine mächtige Methode zur Strukturaufklärung von Membranproteinen via Cryo-Elektronenmikroskopie dar, was auch in einem exponentiellen Anstieg der Publikationsanzahl in Zusammenhang mit Nanodiscs ausgedrückt wird (Sligar & Denisov, 2021). Zusammen mit technischen Verbesserungen bei der Probenpräparation und der Datenprozessierung führte die Etablierung der Nanodisctechnologie zur Verfügbarkeit zahlreicher hochauflösender Membranproteinstrukturen (Herzik Jr, 2020; Nakane et al., 2020). So konnte kürzlich auch die Proteinstruktur des in Humanzellen synthetisierten und posttranslational in Ecpl-MSP1E3D1-ND rekonstituierten PfFNT-Wildtypproteins via Cryo-EM aufgeklärt werden (Lyu et al., 2021). Zur Strukturaufklärung des in dieser Arbeit ebenfalls behandelten PfCRT-Membranproteins wurde die Gesamtpartikelmasse durch Vergrößerung des PfCRT mit Antigen-bindenden Fragmenten (Fab) erhöht und Bindungsassays mit in POPG-MSP1D1-ND rekonstituiertem PfCRT durchgeführt (Kim et al., 2019). Die Verwendung von Nanodiscs ermöglicht Strukturuntersuchungen via Cryo-EM ohne potenziell denaturierende Detergenzien unter Rekonstitution der Membranproteine in einer der natürlichen Zellmembran ähnlichen Membranumgebung. Zudem wird durch Abwesenheit von Detergenzien der Hintergrund der elektronenmikroskopischen Aufnahmen verringert (Gewering et al., 2018), wodurch die Bildanalyse erleichtert sowie die Eingruppierung in 2D-Klassensummen verbessert werden. Der verringerte Hintergrund der Cryo-EM-Aufnahmen von in Nanodiscs rekonstituiertem PfFNTG107S (Abb. 4.16) im Vergleich zu mit Detergenzien solubilisiertem PfFNTG107S (Abb. 4.11) konnte auch in den hier durchgeführten Untersuchungen gezeigt werden. Durch den Nanodiscanteil an der Gesamtpartikelgröße wird diese für die Strukturuntersuchungen via Cryo-EM erheblich gesteigert, was der durch die Datenprozessierung hervorgerufenen Auflösungslimitie-

rung von kleinen Proteinpartikeln entgegenwirkt (Merk et al., 2016; Fan et al., 2019). Dies ermöglicht in der Folge Strukturuntersuchungen kleinerer Membranproteine mit einem Molekulargewicht unterhalb des Größenlimits der Cryo-EM und könnte infolgedessen die Auflösung von aus kleinen Einheiten aufgebauten symmetrischen, multimeren Membranproteinen wie z. B. des pentameren PfFNT verbessern (Abb. 1.5 A). Für die hochauflösenden Cryo-EM mit Einzelpartikelanalyse wird aktuell ein nur schwierig zu unterschreitendes unteres Größenlimit auf etwa 100 kDa beziffert (Herzik Jr et al., 2019; Wentinck et al., 2022). Die sehr geringen Auflösungen der 2D-Klassensummenbilder der potenziellen nicht-pentameren und damit vermutlich kleinen (≤ 100 kDa) PfFNTG107S-Partikel (Abb. 4.6) unterstreichen diese Limitation. Außerdem sind für größere Proteine oder Proteinkomplexe meist geringere Partikeldichten und damit geringere Proteinkonzentrationen ausreichend. Dies ist besonders für Proteinproben mit geringen Proteinausbeuten wie z. B. nach Proteinextraktion aus Humanzellen (Kap. 4.12) relevant. Für mit Detergenzien solubilisierter Proteinproben wurde zum Erreichen hinreichender Partikeldichten für Strukturuntersuchungen *via* Cryo-EM hohe Proteinkonzentrationen von >2 mg/ml angestrebt (Kap. 4.6). Entsprechende Proteinausbeuten konnten im Rahmen dieser Arbeit bei zellfreier Proteinsynthese von PfFNTG107S auch nach zwei SEC-Durchläufen und Detergenzaustausch erreicht werden. Für posttranslational in Nanodiscs rekonstituiertes PfFNTG107S wurden hingegen geringere Proteinkonzentrationen von <1 mg/ml eingesetzt und ausreichende Partikeldichten in den Cryo-EM-Aufnahmen erzielt (Abb. 4.16). Allerdings lagen hauptsächlich aggregierte Nanodiscpartikel mit potenziell eingebautem PfFNTG107S vor, die weitergehende Rekonstitutions- und Strukturuntersuchungen verhinderten. Die Zusammenlagerung konnte nicht wesentlich durch Probenvorbehandlung mit Imidazol oder MS(PEG)₄ verringert werden, was die Verbesserung von Präparationsprotokollen erfordert. Die PEGylierung von Nanopartikeln wie Proteinen ist eine verbreitete biopharmazeutische Methode zur Unterbindung von unerwünschten Interaktionen und zur Abstandsvergrößerung zwischen Nanopartikeln (Roberts et al., 2002; Xu et al., 2015). Durch PEGylierung der freien Aminogruppen von Lysinen der MSP-Stützproteine könnte eine Distanzierung erreicht werden, allerdings sollten die Poly-His-Tags der MSP-Stützproteine zusätzlich vor Nanodiscassemblierung entfernt werden. Die Aggregation der Nanodiscproben wurde ausschließlich in den Cryo-EM-Aufnahmen und nicht bei Untersuchungen *via* TEM mit Negativkontrastierung von leeren Nanodiscs (Abb. 4.14) und potenziell Protein-beladenen Nanodiscs (Abb. 4.15) beobachtet. Es wird dementsprechend vermutet, dass die Aggregation bei der Probenvorbereitung für die Cryo-EM und insbesondere während der Vitrifizierung durch möglicherweise nicht-optimale Probenvorbereitungsmethoden hervorgerufen wurde. Für die Nanodiscproben wurden für initiale Vitrifizierungsversuche standardmäßig verwendete Blotparameter eingestellt, deren Optimierung zu einer besseren Probenqualität mit weniger Probenaggregationen und damit zur Einzelpartikelanalyse *via* Cryo-EM führen könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Stabilitätsuntersuchungen von zellfrei hergestellten und mit verschiedenen Detergenzien solubilisierten PfFNTG107S-Membranproteinen durchgeführt (Kap. 4.4), die die Wichtigkeit der Auswahl einer stabilisierenden, hydrophoben Umgebung zeigen. Für Strukturuntersuchungen von Membranproteinen *via* Cryo-EM ist die Bewahrung der Proteinstabilität zur Sicherstellung des korrekten Faltungszustandes und der Vermeidung von Aggregaten entscheidend. Es konnten bereits erhöhte Stabilitäten von in Nanodiscs rekonstituierten Membranproteinen im Vergleich zu mit Detergenzien solubilisierten Membranproteinen gezeigt werden (Yoshiura et al., 2010). Allerdings mehrten sich Beobachtungen über nicht mittig im Nanodisc lipidbilayer vorliegende Membranproteine und eine Tendenz zur Membranprotein-MSP-Interaktion (Hagn et al., 2018; Arkhipova et al., 2020; Can-

non et al., 2023). Dies führt zu einem Vorliegen der zu untersuchenden Membranproteine in der Lateralregion mit ungeordneten Lipidstrukturen abseits der geordneten Lipidbilayer und einer der Zellmembran ähnlichen Dicke (Bayburt et al., 2002; Bengtsen et al., 2020). Zum anderen könnten durch artifizielle Interaktionen zwischen dem zu untersuchenden Membranprotein und dem MSP-Stützprotein Strukturartefakte angereichert werden. Ähnliche Einschränkungen gelten auch bei Rekonstitution von Membranproteinen in kleinen Nanodiscs wie z. B. PfFNT-Pentamere (\varnothing 8 nm) in Ecpl-MSP1E3D1-ND (Lyu et al., 2021). Experimentell bestimmte Nanodiscdurchmesser geben die Distanz der Außenkanten der MSP-Helices und nicht den Lipidbilayerdurchmesser an (Denisov et al., 2004). Neben dem MSP-Helixedurchmesser ist zur Berechnung des zur Membranproteinrekonstitution verfügbaren regelmäßigen Lipidbilayerfläche auch die für die Lipidmoleküle zwischen Membranprotein und MSP-Stützprotein benötigte Fläche zu berücksichtigen. Durch Distanzbestimmung in den 2D-Klassensummenbildern von leeren DOPG-MSP1E3D1-ND (Abb. 4.14 B) wurde ein Lipidbilayerdurchmesser von etwa 7 nm abgeschätzt, der somit für die Rekonstitution von vollständigen PfFNT-Pentameren zu klein ist. Im Gegensatz zu meiner Masterarbeit wurden daher keine Versuche zur cotranslationalen Rekonstitution von PfFNT in bestehende MSP1E3D1-Nanodiscs unternommen (Abb. 5.1 A) (Hansen, 2019). Stattdessen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit posttranslationale Rekonstitutionsstrategien von PfFNTG107S in DOPG-MSP1E3D1-ND verfolgt (Kap. 4.8). Lyu et al. (2021) konnten bei Strukturaufklärung von PfFNT die Bildung von Ecpl-MSP1E3D1-ND um bereits vollständig hergestelltes PfFNT erreichen. Möglicherweise führt die Assemblierung der entsprechenden Nanodiscs um vollständig translatierte Membranproteine zu einer scheinbaren Vergrößerung der Nanodiscdurchmesser. Die im Supplement von Lyu et al. (2021) zu findenden 2D-Klassensummenbilder legen eine nahezu komplette Ausfüllung des von MSP1E3D1 umschlossenen Bereichs durch PfFNT-Pentamere und einen im Vergleich zu leeren Ecpl-MSP1E3D1-ND leicht vergrößerten Nanodiscdurchmesser nahe. Unterstützt wird dies durch Beobachtungen von potenziell Membranprotein-gefüllten DOPG-MSP1E3D1-ND (\varnothing etwa 14 nm, Abb. 4.15 C) mit einem größeren Außendurchmesser als leere DOPG-MSP1E3D1-ND (\varnothing etwa 12-13 nm, Abb. 4.14 A).

Durch die vermutlich auf einen Anteil der Nanodiscs begrenzte Befähigung zur Rekonstitution von Membranproteinen liegen leere Nanodiscs im Assemblierungsansatz vor. Dies kann zu Schwierigkeiten bei Strukturuntersuchen durch verstärkte Ausrichtung an den MSP-Anteilen der Nanodiscs und weniger an den rekonstituierten Membranproteinen während der Prozessierung von 2D-Klassensummen führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde damit der Nachweis der erfolgreichen PfFNTG107S-Rekonstitution in Nanodiscs erschwert. In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abb. 4.15 C) konnte potenziell rekonstituiertes PfFNTG107S aufgrund begrenzter Auflösung nur durch Beobachtung einer nicht weiter charakterisierten Proteinmasse innerhalb des Nanodisc lipidbilayers vermutet werden. Die Untersuchungen von SEC-Fraktionen mittels Western Blot-Analyse (Abb. 4.15 B) lieferten einige Hinweise auf das Vorliegen von rekonstituiertem PfFNTG107S neben leeren Nanodiscs und zeigten eine vermutlich begrenzte PfFNTG107S-Rekonstitutionseffizienz in Nanodiscs an. Diese könnte durch nicht-optimale Assemblierungsbedingungen oder durch das Vorliegen von PfFNTG107S in anderen Oligomerisierungszuständen als Pentamere begründet sein. Liegen keine Pentamere vor, ist ein nicht-nativer Zustand der Proteine mit möglicherweise nicht-lipophilen und zum Lipidbilayer ausgerichteten Bereichen gegeben. Untersuchungen mittels CD-Spektroskopie (Abb. 4.15 E) zeigen die Gegenwart von nicht-helikalen Proteinanteilen, die bei Rekonstitution nativer, helikaler PfFNTG107S-Pentamere in MSP-Nanodiscs nicht vorliegen dürften. Es ist somit davon auszugehen, dass artifizielle PfFNTG107S-Monomere und

-Oligomere nicht quantitativ in Nanodiscs eingebaut werden können. Mittels posttranslationaler Rekonstitution von PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteinen (Kap. 4.9) in Nanodiscs konnten Hinweise auf die Präsenz von rekonstituierten Membranproteinen in der SEC-Fractionen erzielt werden, in der auch durch elektronenmikroskopische Untersuchungen (Abb. 4.15 C) rekonstituierte Membranproteine vermutet wurden. Mittels Detektion der durch GFP verursachten Fluoreszenz könnten weitere Informationen über die Rekonstitution von Membranprotein-GFP-Fusionsproteinen erhalten werden (Abb. 5.1 B). Zu beachten ist die möglicherweise durch sterische Hinderung durch C-terminale GFP-Fusionstags fehlende Befähigung von PfFNTG107S-GFP-Fusionsproteinen zur Ausbildung von Pentameren, wodurch die Übertragbarkeit der Resultate auf in Nanodiscs rekonstituiertes PfFNTG107S begrenzt ist. Zur Trennung leerer Nanodiscs von mit Membranproteinen gefüllten Nanodiscs könnten die Membranprotein-Nanodisc-Komplexe mittels der am C-Terminus der Membranproteine befindlichen Poly-His-Tags über Affinitätsreinigung aus dem Assemblierungsansatz isoliert werden (Abb. 5.1 C). Membranprotein-Nanodisc-Komplexe binden nach Entfernung der Poly-His-Tags von den MSP-Stützproteinen ausschließlich über die Poly-His-Tags der rekonstituierten Membranproteine an die Säulenmatrix der Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie. Leere Nanodiscs sollten entsprechend früher als gefüllte Nanodiscs mit den nicht-bindenden Proteinen eluiert werden und damit in den für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen verwendeten IMAC-Fractionen hauptsächlich Membranprotein-Nanodisc-Komplexe vorliegen. Es wurden dazu erste Versuche

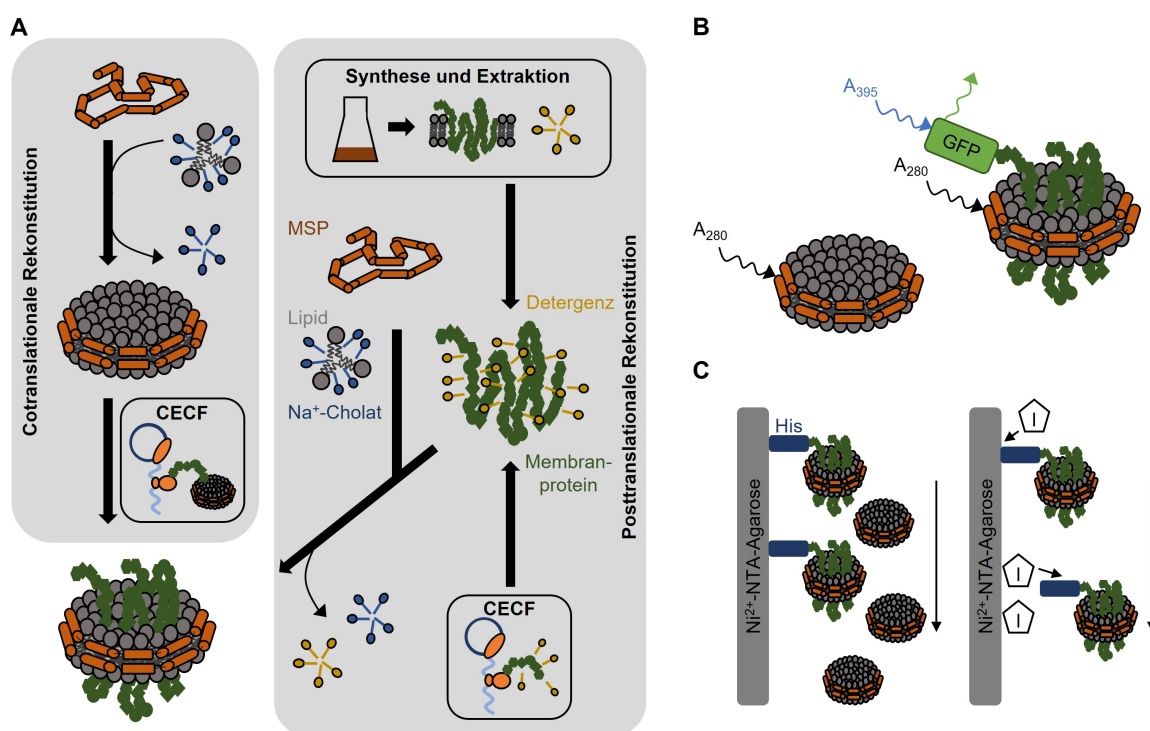


Abb. 5.1: Einsatz der Nanodisctechnologie und Isolierung Membranprotein-beladener Nanodiscs. **A** Cotranslationale Rekonstitution (links) und posttranslationale Rekonstitution (rechts) von Membranproteinen in Nanodiscs. Bei der cotranslationalen Rekonstitution werden vorgefertigte Nanodiscs als membranähnliche Umgebung während der Proteinsynthese angeboten. Bei posttranslationaler Rekonstitution wird das Membranprotein nach der zellbasierten oder zellfreien Proteinsynthese zunächst mit Detergenzien solubilisiert. Die Nanodiscassemblierung erfolgt um das vollständig translatierte Membranprotein. CECF, *Continuous Exchange Cell-free*; MSP, *Membrane Scaffold Protein*. **B** Unterscheidungsmöglichkeit von leeren und mit Membranprotein-GFP-Fusionsprotein-gefüllten Nanodiscs. Fusionsprotein-gefüllte Nanodiscs werden durch Absorptionsmessungen bei 395 nm während der Größenausschlusschromatographie detektiert. **C** Trennung von leeren und Membranprotein-gefüllten Nanodiscs. Membranprotein-gefüllte Nanodiscs werden mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie über die exklusiven Poly-His-Tags der Membranproteine von leeren Nanodiscs getrennt. His, Poly-His-Tag; I, Imidazol.

zum Entfernen der Poly-His-Tags von MSP1E3D1 mittels TEV-Protease durchgeführt und die Ergebnisse in Western Blot-Analysen mit einem gegen den N-terminalen Poly-His-Tag gerichteten Antikörper untersucht. In diesen initialen Versuchen wurde vermutlich ein Teil der Poly-His-Tags entfernt, sodass im Folgenden die Isolierung von Membranprotein-gefüllten Nanodiscs untersucht werden könnte. Zudem führt das Entfernen der Affinitätstags von Nanodiscs möglicherweise zu einer verringerten Aggregation der Membranprotein-Nanodisc-Komplexe während der Cryo-EM-Untersuchungen (Kap. 4.8).

Die Nanodiscform ist primär abhängig von der Art der inkorporierten Lipide und vom molaren Lipid-MSP-Verhältnis. Skar-Gislinge et al. (2018) zeigten, dass neben der Wahl des molaren Verhältnisses und des Lipidanteils auch die Wahl der Assemblierungsdetergenzien die äußere Form der resultierenden Nanodiscs determiniert. Zum Beispiel kommt es bei geringerer Anzahl an Lipidmolekülen pro Nanodisc zu einer eher elliptischen Form der Nanodiscs, was zu einer größeren Heterogenität und einer limitierten Partikelqualität für elektronenmikroskopische Untersuchungen führt (Skar-Gislinge et al., 2018). Dies zeigt sich auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Assemblierungsversuchen von leeren Nanodiscs. Während für MSP1E3D1-Nanodiscs mit einem kleineren Durchmesser einzelne Peaks im SEC-Chromatogramm erhalten wurden (Abb. 4.13 C), deutet die Peakbreite auf das Vorliegen von verschiedenen Partikelformen hin. Es wurden zudem Versuche zur Herstellung von Nanodiscs mit einem größeren Lipidbilayer unter Verwendung der MSP2N2-Variante unternommen (Kap. 4.7). Für diese größeren Nanodiscs wurden zwei SEC-Fraktionen getrennt (Abb. 4.13 F), von denen eine SEC-Fraktion Partikel mit dem gleichen Elutionsvolumen wie 12 nm-MSP1E3D1-Nanodiscs (Abb. 4.14 D) und die andere eine heterogenere Partikelgrößenverteilung mit vergrößerten Durchschnittsdurchmesser enthielt (Abb. 4.14 F). In der SEC-Fraktion mit den vergrößerten Partikeln lagen vermutlich nur wenige MSP2N2-Nanodiscs vor und das entsprechende CD-Spektrum (Abb. 4.14 E) deutete auf nicht-helikale Proteinbestandteile hin. Die MSP2N2-Nanodiscs konnten in diesen Assemblierungsansätzen vermutlich nicht oder nicht in ausreichender Stabilität hergestellt werden, was durch weitere Größen- und Stabilitätsanalysen *via* DLS überprüft werden könnte. Es sind somit weitere Anpassungen des eingesetzten Lipid-MSP-Verhältnisses zur effizienten Produktion von leeren MSP2N2-Nanodiscs notwendig. Für leere Nanodiscs kann das theoretische Verhältnis bei Kenntnis des Nanodisc-definierten Lipidbilayerdurchmessers und der eingenommenen Fläche eines Lipidmoleküls berechnet werden (Denisov & Sligar, 2017). In dieser Arbeit konnte durch Variation des molaren DOPG-MSP2N2-Verhältnisses von 190:1 bis zu 330:1 quantitativ keine leeren MSP2N2-Nanodiscs assembliert werden und es wurden unabhängig von dem eingesetzten Verhältnis ähnliche SEC-Chromatogramme wie in Abb. 4.13 F erhalten. Die SEC-Chromatogramme weisen auf die präferierte aber ineffiziente Assemblierung von kleineren Partikeln ohne vollständige Ausnutzung aller eingesetzten Lipidmoleküle hin. Beobachtungen von Partikeln mit kleineren als den erwarteten Partikeldurchmessern bei posttranslationaler Rekonstitution (Gao et al., 2016; Arkhipova et al., 2020) unterstreichen eine gewisse Flexibilität der Nanodiscdurchmesser. Eine genauere Partikelgrößenanalyse *via* DLS-Messungen oder Kleinwinkel-Röntgenstreuung (SAXS) könnte möglicherweise zur Verbesserung der Assemblierungsansätze genutzt werden und zukünftig zur effizienteren Assemblierung größerer MSP2N2-Nanodiscs führen. Bei der im Laufe dieser Arbeit durchgeführten posttranslationalen Rekonstitution unter Nanodiscassemblierung um vollständig translatierte Membranproteine ist das optimale molare Lipid-MSP-Verhältnis schwieriger vorherzusagen und muss meist empirisch ermittelt werden. Vermutlich führt eine Vergrößerung der Nanodiscdurchmesser von MSP2N2-Nanodiscs zudem zu einer verringerten Stabilität und Homogenität (Kap. 4.7). Sowohl eine erhöhte Stabilität als auch Homogenität

könnte durch kovalent zirkularisierte Nanodiscs erreicht werden. Einen Lösungsansatz stellt der Einsatz von weiterentwickelten MSP-Proteinen dar, die durch Inkubation mit einer Transpeptidase kovalent zirkularisiert werden und deutlich homogenere Nanodiscs generieren können (Nasr et al., 2017). Zhang et al. (2021) etablierten zudem eine vereinfachte Methode zur Ein-Schritt-Zirkularisierung von Nanodiscs mit einem Durchmesser von bis zu 100 nm mittels *SpyCatcher-SpyTag*-Technologie und konnten so die Ausbeute an zirkularisierten Nanodiscs erhöhen. Eine Alternative zu Lipid-Protein-Nanodiscs stellen Lipid-Polymer-Nanodiscs dar, die anstelle MSP-Proteinen von Styrol-Maleinsäure (SMA)-Copolymeren begrenzt werden und zudem mit verschiedenen Styrol-zu-Maleinsäure-Verhältnissen mit Durchmessern von bis zu 32 nm synthetisiert werden können (Postis et al., 2015; Craig et al., 2016).

Neben dem Nanodiscdurchmesser wurde auch der Lipidanteil der Nanodiscs unter Verwendung der anionischen Lipide DOPG und POPG sowie aus *E. coli* extrahierten polaren Lipide (Ecpl) variiert. Es konnte jedoch keine veränderte Rekonstitutionseffizienz erreicht werden (Kap. 4.10), was auf die allgemein begrenzte Rekonstitutionseffizienz von zellfrei hergestelltem PffNTG107S hindeutet. Zur Strukturaufklärung werden Membranproteinen meist in Nanodiscs mit einem Gemisch aus anionischen und neutralen Lipiden rekonstituiert. Die Verringerung der Lipidladung führt dabei möglicherweise zu einer weiteren Verringerung der Rekonstitutionseffizienz von Membranproteinen (Roos et al., 2012; Inagaki et al., 2013; Her et al., 2016). Auch auf die Funktionalität der rekonstituierten Membranproteine kann die Wahl des Lipidanteils einen Einfluss haben, da Membranproteine sowohl in der Struktur als auch in der Funktion durch die Lipidumgebung reguliert werden können (Levental & Lyman, 2023). So ist z. B. die Ligenbindung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren abhängig von der Lipidumgebung und insbesondere des Ladungszustandes der Lipide (Rues et al., 2016). Durch die Möglichkeit zur gezielten Variation der Lipidumgebung können Funktionsüberprüfungen bzw. Bindungsstudien mit in Nanodiscs eingebauten Membranproteinen in Abhängigkeit von der Lipidinteraktion durchgeführt werden. Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit allerdings ausschließlich zellfrei hergestellte Membranproteine mit nicht gesicherter Funktionalität und limitierter Befähigung zur Assemblierung von PffNTG107S-Pentameren (Kap. 5.1) in Nanodiscs eingebaut wurden, sind keine verlässlichen Aussagen über die allgemeine Rekonstitutionsbefähigung von PffNTG107S-Pentameren in die bereitgestellten Nanodiscs möglich. Zu weitergehenden Untersuchungen sollten Membranproteine mit nachgewiesenem funktionalem Faltungszustand verwendet werden. Dementsprechend wird die Extraktion von PffNTG107S aus Lipidbilayermembranen nach zellbasierter Expression in den folgenden Kap. 5.4 und Kap. 5.5 diskutiert.

5.4 Extraktion angereicherter Post-Golgi-Vesikel der NY17-Sekretionsmutante

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Eignung gut charakterisierter Hefeexpressionssysteme zur Produktion funktionaler PffNTG107S-Transportproteine gezeigt werden. Bei den durchgeführten Versuchen zur Membranproteinextraktion aus Lipidbilayermembranen wurden die Schwierigkeiten der quantitativen Extraktion und Solubilisierung von PffNTG107S aus Hefemembranen ersichtlich. Hefezellen der Spezies *S. cerevisiae* und *P. pastoris* (neuklassifiziert als *Komagataella phaffii*) weisen als Vertreter der Ordnung der Echten Hefen (Saccharomycetales) eine äußerst rigide Zellwand auf, die bei Hefeorganismen der Gattung *Saccharomyces* 15-30 % der Trockenzellmasse ausmacht (Lipke & Ovalle, 1998; Bertolo et al., 2019). Diese komplexe Zellwand stellt eine Herausforderung bei der zur quantitativen Isolierung der Membranfraktion angestrebten Zellhomogenisierung dar. Zu Membranproteinstrukturuntersuchungen

müssen für das jeweils verwendete Expressionssystem und das betrachtete Membranprotein geeignete Strategien zur Zellhomogenisierung und anschließenden Membranproteinsolubilisierung etabliert werden. Durch zahlreiche technische Fortschritte im Bereich der Cryo-EM mit Einzelpartikelanalyse und vor allem der enormen Verbesserung der in Cryo-EM-basierten Strukturuntersuchungen erzielten Auflösungen (Abb. 1.2 C) kam es zu einer regelrechten Hochphase der Membranproteinstrukturaufklärung, wodurch eine Vielzahl an vorher nicht beschriebenen Membranproteinstrukturen heute hochauflösend verfügbar sind (Bai et al., 2015; Cheng, 2018; Nakane et al., 2020). Zur Aufklärung neuer Membranproteinstrukturen erscheint die Extraktion und Solubilisierung der entsprechenden Membranproteine aus zellbasierten Expressionssystemen heute nunmehr als eine der größten verbleibenden Limitationen. Eine vereinfachte Membranproteinextraktion könnte aus präparierten intrazellulären Vesikeln gelingen, wenn Membranproteine nicht aus der an der rigiden Hefezellwand adhärenen Zellmembran isoliert werden müssen. Bei Verwendung der *S. cerevisiae*-Sekretionsmutante NY17 kann die Anreicherung von intrazellulären Post-Golgi-Vesikeln durch Kultivierung bei 37 °C durch Unterbindung der Vesikelfusion mit der Zellmembran erzwungen werden. In dieser Arbeit wurde die PfFNTG107S-Anreicherung in der die Post-Golgi-Vesikel beinhaltenden Membranfraktion unter den entsprechenden Inkubationsbedingungen gezeigt und nur ein vernachlässigbarer Anteil des Zielproteins mit größeren Zell- und Membranfragmenten pelletiert (Abb. 4.34 B). Dies steigerte die aus *S. cerevisiae*-Zellen isolierte und zu Solubilisierungsversuchen eingesetzte Membranproteinausbeute im Vergleich zur Proteinsynthese in anderen Hefezellsystemen deutlich und könnte somit die Effektivität der nachfolgenden PfFNTG107S-Extraktion erhöhen. Nach initialen Solubilisierungsversuchen (Abb. 4.34 C) konnten allerdings nur sehr geringe Solubilisierungsausbeuten unter Verwendung des Detergenz DDM erzielt werden, sodass hier zunächst Optimierungsschritte der Solubilisierungsbedingungen (Kap. 5.5) erforderlich sind.

Für sezernierte und lösliche Proteine konnte bereits gezeigt werden, dass die zielgerichtete Manipulation des sekretorischen Wegs von *S. cerevisiae*-Zellen zu höheren Extraktionsausbeuten heterolog hergestellter Proteine führte. So konnten Huang et al. (2018) die Proteinproduktionskapazitäten von in einigen genetisch optimierten *S. cerevisiae*-Stämmen hergestellten löslichen Proteinen um bis zu Faktor 5 erhöhen, was für die pharmazeutische Großproduktion von Proteinwirkstoffen oder Enzymen relevant ist. Auch die Überexpression vom an den Proteintranslokationsprozessen des sekretorischen Wegs beteiligten SEC 16 führte zu einer erhöhten Ausbeute von sezernierten löslichen Proteinen in *S. cerevisiae*-Hefezellen (Bao et al., 2017). Hou et al. (2012) zeigten die verbesserte Sekretion von zwei löslichen Proteinen in *S. cerevisiae*-Zellen durch Überexpression von am Proteintrafficking zur Plasmamembran beteiligten SNARE-Proteinen. Die bisher durchgeführten Anpassungen des sekretorischen Wegs von *S. cerevisiae*-Zellen zielten somit zumeist auf die Erhöhungen der Ausbeuten sezernierter Proteine ab und bewirkten ein verstärktes Proteintrafficking von löslichen Proteinen in Richtung Plasmamembran. Die zur erleichterten Extraktion von Membranproteinen gewünschte gegensätzliche Wirkungen, nämlich die Verhinderung des Vesikeltransports zur Zellperipherie bzw. der Vesikelfusion mit der Plasmamembran, wurde hingegen bisher kaum untersucht. Durch Anreicherung von intrazellulären Vesikeln mit zu untersuchenden Membranproteinen könnten neue Protokolle zur hocheffizienten Membranproteinproduktion in *S. cerevisiae*-Expressionssystemen etabliert werden, die Vorteile der Proteinproduktion in Hefezellen mit einer erleichterten Membranproteinextraktion kombinieren. Die Isolierung von Post-Golgi-Vesikeln ist neben den beschriebenen Extraktions-technischen Aspekten auch für die Beantwortungen wissenschaftlicher Fragestellungen interessant. Zur Untersuchung von Transportvorgängen und damit zur Aufklärung von Trans-

portmechanismen sind zahlreiche Proteinfunktionsstudien in Messsystemen mit zwei durch eine Membran getrennten Kompartimenten möglich. Eine weit verbreitete Methode ist der biophysikalische Radioassay, bei dem zumeist der Import von radioaktiv markierten Substraten über heterolog produzierte Transportproteine in verschiedene Zellsysteme durch Auszählen der aufgenommenen Aktivitäten quantifiziert wird. In der Arbeitsgruppe Beitz wird dazu ein auf *S. cerevisiae*-Zellen basierendes Expressionssystem genutzt, das sich durch die Abwesenheit von Lactatmetabolismusreaktionen und von endogenen Lactattransportern (*S. cerevisiae*-Stamm W303-1A Δ jen1 Δ ady2) besonders für Lactataufnahmemessungen eignet. Bei Untersuchungen mit PfFNT konnte die präferierte PfFNT-Orientierung in Plasmamembranen von Zellsystemen gezeigt werden, in der die Proteintermini zur zytosolischen Seite ausgerichtet vorliegen (Marchetti et al., 2015; Wu et al., 2015; Holm-Bertelsen et al., 2016). Es sind vorwiegend experimentelle Lactataufnahmemessungen möglich, bei denen der Lactatimport aus dem extrazellulären Bereich über PfFNT-Transportproteine in das Zytosol und damit entgegen der für *P. falciparum*-Parasiten physiologisch relevanten Richtung (Abb. 1.4 A) betrachtet wird. Für bidirektionale Transportproteine ist allerdings auch die Untersuchung von Substratleitungsvorgängen in entgegengesetzter Richtung zur Aufklärung von Transportmechanismen relevant. Ein solches bidirektionales Transportprotein ist PfFNT (Marchetti et al., 2015; Wu et al., 2015), aber auch andere Lactattransportproteine wie Vertreter der humanen Monocarboxylattransporter (MCT) zeigen bidirektionalen Lactattransport (Halestrap, 2013). Die Messungen der Leitfähigkeit in entgegengesetzter Richtung und damit entsprechend dem Lactatexport aus den Zellsystemen ist aufgrund experimenteller Schwierigkeiten in zellbasierten Messsystemen nur begrenzt möglich. Eine wesentliche Einschränkung ist die mangelnde Zugänglichkeit der intrazellulären Seite für Manipulationen von Substratkonzentrationen, pH-Werten oder sonstigen Parametern für Transportcharakterisierungen.

Über den sekretorischen Weg eukaryotischer Organismen zur Zellmembran transportierte Membranproteine werden zunächst cotranslational oder posttranslational in Membranen des endoplasmatischen Retikulums eingebaut (Delic et al., 2013). Nach Proteinfaltung im endoplasmatischen Retikulum und vesikulären Transport zum Golgi-Komplex werden die gefalteten und posttranslational modifizierten Membranproteine nachfolgend über Post-Golgi-Vesikel zur Plasmamembran transportiert (Idiris et al., 2010) (Abb. 5.2 A). Diese Post-Golgi-Vesikel verschmelzen mit der Plasmamembran in der Weise, dass die luminalen Seite der Post-Golgi-Vesikel der extrazellulären Seite der Plasmamembran entspricht (Delic et al., 2013). Konsequenterweise zeigt die innerhalb der zellulären Plasmamembran zum Zytosol hin gerichtete Seite von Membranproteinen bei vorhergehendem Einbau in Post-Golgi-Vesikeln ebenfalls zum Zytosol und damit gleichzeitig zum Vesikeläußeren (Abb. 5.2 B). Somit ist diese Seite der Membranproteine nach Extraktion der Post-Golgi-Vesikel aus den Zellen zugänglich, sodass in einem geeigneten Puffersystem mit zugesetzten Substraten entsprechende Importmessungen in die Post-Golgi-Vesikel durchgeführt werden können, die dem Substratexport vom intrazellulären Milieu in den extrazellulären Raum und damit der im Falle von PfFNT für *P. falciparum*-Parasiten physiologisch relevanten Richtung entsprechen. Die Verschmelzung der proteinbeladenen Post-Golgi-Vesikel mit der Plasmamembran kann beispielsweise durch konditionelle *S. cerevisiae*-Sekretionsmutanten, bei denen eine Untereinheit wie SEC 6 des für die Membranverschmelzung verantwortlichen Exozyst-Komplexes reversibel ausgeschaltet wird, unterbunden und damit die Anreicherung der Post-Golgi-Vesikel für entsprechende Funktionsuntersuchungen erzielt werden (Novick et al., 1980; Walworth et al., 1989; Morgera et al., 2012). Im Fall des Lactattransportproteins PfFNT könnte die vorherrschende Membranproteinorientierung beispielsweise zur Ansäuerung der intra-

zellulären PfFNT-Seite und damit für Untersuchungen möglicher pH-Abhängigkeiten des Lactatexports aus *S. cerevisiae*-Zellen genutzt werden. Damit könnten die für den Lactatimport in *S. cerevisiae*-Zellen durchgeführten Funktionsuntersuchungen analog auch für den Lactatexport beispielsweise durch biophysikalische Radioassays mit Post-Golgi-Vesikeln durchgeführt und folglich ein vollständigeres Gesamtbild über die PfFNT-vermittelte bidirektionale Lactatpassage gezeichnet werden. Vorteilhaft gegenüber Untersuchungen mit artifiziell hergestellten Proteoliposomen (Holm-Bertelsen et al., 2016) ist die direkte und durch die zelluläre Maschinerie assistierte Rekonstitution der entsprechenden Transportproteine in eine native Membranumgebung.

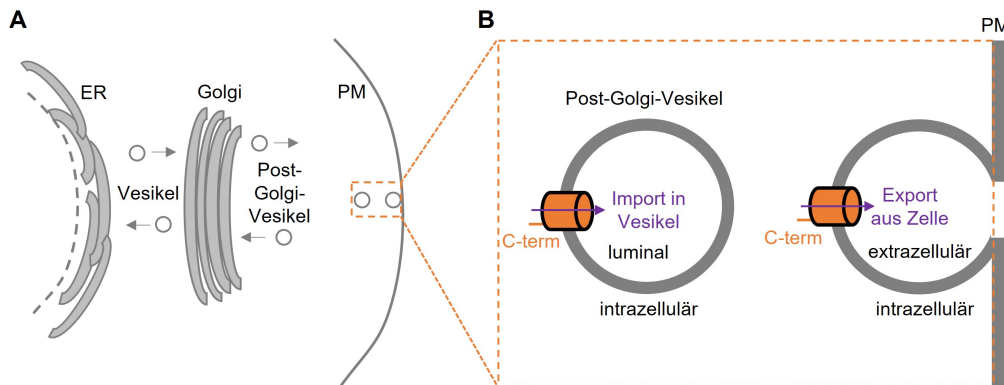


Abb. 5.2: Schematische Abbildung zur Extraktion von Post-Golgi-Vesikeln. **A** Rolle von Post-Golgi-Vesikeln im sekretorischen Weg eukaryotischer Organismen. **B** Orientierung von in Post-Golgi-Vesikeln eingebauten Transportproteinen. Der zur intrazellulären Seite der Plasmamembran ausgerichtete C-Terminus ist nach Extraktion der Post-Golgi-Vesikel aus dem Zellsystem nach außen hin gerichtet und zugänglich. Die Exportrichtung der nach Vesikelverschmelzung in die Plasmamembran eingebauten Transportproteine entspricht in Bezug auf die Post-Golgi-Vesikel der Importrichtung. C-term, C-Terminus; ER, endoplasmatisches Retikulum; Golgi, Golgi-Apparat; PM, Plasmamembran.

In der vorliegenden Arbeit wurden Post-Golgi-Vesikel aus der *S. cerevisiae* NY17-Sekretionsmutante extrahiert und die PfFNTG107S-Orientierung durch Inkubation mit FaktorXa-Protease untersucht. Die FaktorXa-Protease kann durch Schneiden an einer vorgelagerten Schnittstelle den C-terminalen Poly-His-Tag entfernen, wenn die entsprechende Schnittstelle für die Protease zugänglich ist und nicht zur luminalen Seite der Post-Golgi-Vesikel orientiert vorliegt. Im durchgeführten FaktorXa-Assay (Abb. 4.34 D) wurde gezeigt, dass nach FaktorXa-Behandlung der PfFNTG107S-beihaltenden Vesikel in der Western Blot-Analyse eine deutlich weniger intensive Chemilumineszenzbande bei Detektion mit einem gegen den Poly-His-Tag gerichteten Antikörper erhalten wurde als im Kontrollansatz ohne Inkubation mit FaktorXa-Protease. Die Bandenintensität entsprach dabei etwa 10 % bezogen auf den Kontrollansatz ohne Zugabe von FaktorXa-Protease, wonach etwa 90 % der vorliegenden PfFNTG107S-Membranproteine mit dem am intrazellulären C-Terminus lokalisierten Poly-His-Tag entsprechend der erwarteten Orientierung zur intrazellulären Seite hin ausgerichtet sind. Es wird vermutet, dass in der extrahierten Membranfraktion neben den Post-Golgi-Vesikeln weitere Membranvesikel vorliegen, die möglicherweise durch partielle Homogenisierung der Zellmembran erzeugt wurden und bei denen der Poly-His-Tag für die FaktorXa-Protease unzugänglich ist. Zum Ausschluss anderer Membranvesikel vor Transportmessungen könnte der Post-Golgi-Vesikel-Extraktionsprozess mittels sanfteren Zellaufbruchs beispielsweise durch osmotische Lyse von protoplastierten *S. cerevisiae*-Zellen harmonisiert oder Vesikelseparationschritte inkludiert werden (Walworth et al., 1989). Die verwendete *S. cerevisiae* NY17-Sekretionsmutante weist keinen Knockout der endogenen Lactattransportproteine aus *S. cerevisiae* auf, sodass bei Unter-

suchung der Lactatpassage der durch JEN1 und ADY2 (Casal et al., 2008) vermittelte Lactatimport in die Post-Golgi-Vesikel berücksichtigt werden muss. Für Messungen mit weniger Hintergrund könnten Lactattransportprotein-Knockout-Stämme analog zu dem im phänotypischen Wirkstoffscreening eingesetztem *S. cerevisiae*-Stamm W303-1A Δ jen1 Δ ady2 verwendet werden. Allerdings ist der Anteil der endogenen Lactattransportproteine in den Post-Golgi-Vesikeln vermutlich im Verhältnis zu PffNT gering und es sind folglich nur vernachlässigbare Hintergründe zu erwarten. Darauf deutet auch das in initialen Stopped-Flow-Schwellungsassays ausbleibende Anschwellen von mit 100 μ M BH267.meta inhibierten PffNTG107S-beinhaltenen Post-Golgi-Vesikeln hin. Bei Vorliegen von nicht-inhibierten PffNTG107S-Membranproteinen konnte hingegen ein durch L-Lactateinstrom vermitteltes Vesikelanschwellen detektiert werden. Diese Messungen waren aufgrund von möglicherweise durch inhomogene Partikel auftretenden Messartefakten jedoch nicht reproduzierbar und weitergehende Auswertungen nicht möglich. Dabei schienen insbesondere L-Lactatkonzentrationen >10 mM im Messpuffer zu Messartefakten und möglicherweise zur Vesikelzerstörung zu führen, sodass im Folgenden geringere L-Lactatkonzentrationen und alternative Puffersysteme eingesetzt werden sollten. Die initialen Schwellungsmessungen weisen jedoch auf die erfolgte L-Lactatpassage über in Post-Golgi-Vesikeln eingebaute PffNT-Transportproteine hin und die Extraktion der Post-Golgi-Vesikel ist grundlegend für umfassendere Funktionsuntersuchungen.

5.5 Extraktion und Solubilisierung von Membranproteinen

Durch Verwendung der *S. cerevisiae*-Sekretionsmutante des Stamms NY17 konnte ein wesentlicher Fortschritt bei der Extraktion von PffNTG107S-enthaltenden Membranfraktionen aus einem Hefeexpressionssystem erzielt werden (Kap. 4.20). Ein bedeutendes Hindernis auf dem Weg zu Proteinstruktur- und Funktionsuntersuchungen von zellbasiert synthetisierten Membranproteinen ist weiterhin die Membranproteinsolubilisierung aus extrahierten Membranfraktionen. Für Membranproteine müssen geeignete Extraktions- und Stabilisierungsdetergenzien und für jede Membranprotein-Detergenz-Kombination optimale Solubilisierungsbedingungen identifiziert werden (Stetsenko & Guskov, 2017; Kotov et al., 2019). Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedenartige Detergenzien in unterschiedlichen Konzentrationen für die effiziente PffNTG107S-Solubilisierung aus HEK- und Hefemembranfraktionen getestet. Dabei wurden zur Sicherstellung des Vorliegens von Detergenzmizellen Detergenzkonzentrationen oberhalb der jeweiligen kritischen Mizellenkonzentration (CMC) der entsprechenden Detergenzien (Tab. 5.1) eingesetzt, um in Detergenzmizellen eingebettete Membranproteine zu extrahieren.

Tab. 5.1: Kritische Mizellenkonzentrationen (CMC) der zur Solubilisierung aus Membranfraktionen verwendeten Solubilisierungsdetergenzien. Die CMC-Werte (in H₂O) wurden aus den bei Klammt et al. (2005) in mM angegebenen Werten berechnet. *CMC-Werte entsprechen den Angaben des Herstellers Anatrace (www.anatrace.com, ohne Datum).

Detergenz	CMC / % (m/v)	Referenz
CHAPS	0,15-0,53	Klammt et al. (2005)
DDM	0,0061	Klammt et al. (2005)
DM	0,087	Klammt et al. (2005)
GDN	0,0021	Anatrace*
LDAO	0,023	Anatrace*
LMNG	0,001	Anatrace*
β -OG	0,55	Klammt et al. (2005)

Sowohl bei *S. cerevisiae*- als auch bei *P. pastoris*-Membranfraktionen wurden mit dem Detergenz DDM die höchsten Ausbeuten von solubilisiertem PfFNTG107S erreicht (Abb. 4.22, Abb. 4.28 F, Abb. 4.29 B und Abb. 4.32 D). Bei Solubilisierungsversuchen von PfFNTG107S mit 0,5 % (m/v) DDM aus *S. cerevisiae*-Membranen wurde im Solubilisierungsüberstand eine zu geringerem Molekulargewicht verschobene Chemilumineszenzbande in der Western Blot-Analyse detektiert (Abb. 4.28 E), die auf die mögliche Solubilisierung von korrekt gefalteten PfFNTG107S-Pentameren und den Verbleib von potenziell fehlgefalteten PfFNTG107S-Membranproteinen in der Membranfraktion hindeutet. In der Membranfraktion nach Solubilisierungsversuchen detektiertes und vermutlich fehlgefaltetes PfFNTG107S weist eine wie insbesondere für Membranproteine beschriebene veränderte Mobilität während der elektrophoretischen Trennung mittels SDS-PAGE auf (Rath et al., 2009). Auch bei Untersuchung von *P. pastoris*-Membranfraktionen (Abb. 4.30 B und Abb. 4.32 B) wurden hochmolekulargewichtige Doppelbanden in Western Blot-Analysen vorgefunden und könnten auf die Rekonstitution von sowohl korrekt gefalteten PfFNTG107S-Pentameren als auch potenziellen PfFNTG107S-Fehlfaltungen während der Fermenterkultivierung der Hefezellen hinweisen. Unterstützt wird dies durch beobachtete Doppelbanden und zusätzliche Fragmente in der Membranfraktion einer unter Sauerstoffmangel gestressten *P. pastoris*-Fermenterkultur, dessen vermutlich nicht-native PfFNTG107S-Membranproteine mit DDM unter keinen der getesteten Solubilisierungsbedingungen extrahiert werden konnten. Durch Solubilisierung mit DDM könnte die Extraktion von nativen PfFNTG107S-Pentameren präferiert werden, womit eine angestrebte Anreicherung korrekt gefalteter PfFNTG107S-Pentamere zur anschließenden Proteinreinigung und hochauflösenden Strukturaufklärung erzielt werden würde. PfFNTG107S konnte aus *S. cerevisiae*-Membranfraktionen zudem mit geringen LDAO-Konzentrationen von 0,5 % (m/v) solubilisiert werden (Abb. 4.28 F). Im Gegensatz zur von Dr. Philipp Hajek durchgeführten PfFNT-Extraktion aus *P. pastoris*-Membranfraktionen (Hajek, 2019) erschien LDAO dabei als weniger effizientes Solubilisierungsdetergenz im Vergleich zu DDM (Abb. 4.29 B) und wurde deshalb und aufgrund der durch die zwitterionische Kopfgruppe hervorgerufenen harschen und potenziell denaturierenden Eigenschaften von der weiteren Verwendung als Solubilisierungsdetergenz ausgeschlossen. Hingegen wurde die Eignung von DDM für die PfFNT-Extraktion und -Stabilisierung zur anschließenden Strukturaufklärung von Lyu et al. (2021) und Peng et al. (2021) gezeigt und die dort beschriebenen DDM-Konzentrationen eingesetzt. Lyu et al. (2021) extrahierten PfFNT aus HEK-Membranen mit 1 % (m/v) DDM unter Zusatz von 0,1 % (m/v) CHS und Peng et al. (2021) aus Membranen von Sf9-Insektenzellen mit 2 % (m/v) DDM. Mit den aufgrund von niedrigen CMC-Werten für Cryo-EM-Strukturuntersuchungen präferierten Detergenzien LMNG und GDN (Gewering et al., 2018; Li, 2022) konnte PfFNTG107S aus Hefemembranen nicht ausreichend solubilisiert werden (Abb. 4.29 A und Abb. 4.32 B), sodass DDM als präferiertes Extraktionsdetergenz eingesetzt wurde und während nachfolgender Proteinreinigung durch LMNG oder GDN ausgetauscht werden sollte. Dabei wurden Hinweise auf die gute Eignung von GDN als PfFNTG107S-Stabilisierungsdetergenz erhalten (Abb. 4.10 und Abb. 4.12 B), was durch die Erfahrungen von Peng et al. (2021) bei der Stabilisierung von PfFNT durch GDN gestützt wird. Die Stabilisierung von verifizierten PfFNTG107S-Pentameren durch GDN nach zellbasierter Proteinsynthese konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden und sollte zunächst mit aus der *S. cerevisiae* NY17-Sekretionsmutante extrahiertem PfFNTG107S analysiert werden.

Für die schnelle Bestimmung von optimalen Solubilisierungsbedingungen wurde angelehnt an Corvest & Jawhari (2021) ein Dot Blot-basiertes Detergenzscreeningsprotokoll gewählt, bei dem zur vergleichenden Analyse der Chemilumineszenzintensitäten eine gleichmäßige Beladung mit Gesamtproteinmassen

gewährleistet werden musste. Damit ließen sich schnelle Einschätzungen der Solubilisierungseffizienzen bei gegebenen Bedingungen erreichen sowie frisch isolierte Membranfraktionen auf die Präsenz von extrahierbaren PffNTG107S-Pentameren testen (Kap. 4.17). Diese zeitverkürzte Variante ohne Größenauftrennung *via* SDS-PAGE gibt im Gegensatz zur Western Blot-Analyse zunächst keine Informationen über den Oligomerisierungszustand der solubilisierten Membranproteine und mögliche cosolubilisierter fehlgefaltete bzw. denaturierte Proteine. Trotz dieser Einschränkung wurde mit dem DDM-Konzentrationscreening (Abb. 4.29 C) die Plausibilität der erhaltenen Ergebnisse mit einer maximalen Ausbeute solubilisierter Proteine bei moderaten DDM-Konzentrationen gezeigt. So konnten auch Variationen der Solubilisierungsmethoden verglichen werden, wobei die höchsten Ausbeuten an solubilisiertem PffNTG107S durch Rotieren der Solubilisierungsansätze bei 4 °C erzielt wurden (Abb. 4.29 D). Rückschlüsse auf die PffNTG107S-Stabilität nach Proteinextraktion wurden hier allerdings nicht gezogen. Aufgrund der relativen Resistenz gegen die SDS-vermittelte Denaturierung und ausschließlicher Solubilisierung der PffNTG107S-Pentamere ohne beobachtbares Auftreten von PffNTG107S-Monomeren wird eine ausreichende PffNTG107S-Stabilität während kurzzeitiger Lagerung bei 4 °C angenommen. Die Notwendigkeit der Detergenzkonzentrationsbestimmungen wurde durch die starke Abhängigkeit der Solubilisierungseffizienz von der Detergenzkonzentration (Abb. 4.29 C und Abb. 4.32 D) gezeigt. Dabei wurde in den mit verschiedenen Membranfraktionschargen durchgeführten Bestimmungen unterschiedliche Detergenzkonzentrationsoptima erhalten. Während in einigen Untersuchungen geringere DDM-Konzentrationen von 0,5 % (m/v) die größte Solubilisierungseffizienz aufwiesen (HEK-Membranfraktion, Abb. 4.22 B), wurde PffNTG107S in anderen Solubilisierungsansätzen mit >1 % (m/v) DDM (Hefemembranfraktionen, Abb. 4.28 F, Abb. 4.29 C, Abb. 4.32 D und Abb. 4.34 C) am effizientesten solubilisiert. Vor allem bei PffNTG107S-Solubilisierung aus *S. cerevisiae*- und *P. pastoris*-Membranfraktionen konnte eine besonders starke Varianz der Detergenzkonzentrationsoptima beobachtet werden. Die Bestimmung einer optimalen Detergenzkonzentration zur Solubilisierung ist abhängig von der Gesamtproteinkonzentration, da das Detergenz-zu-Membranprotein-zu-Lipid-Verhältnis die Solubilisierungseffizienz stark beeinflusst (Kalipatnapu & Chattopadhyay, 2005). Es sollte demnach ein bestimmtes molares Verhältnis von Detergenzmolekülen zu mit diesem Detergenz extrahierbaren Membranproteinen vorliegen, da ein relativer Detergenzüberschuss beispielsweise zur Proteindenaturierung führen kann und somit die Solubilisierungseffizienz nativer Membranproteine deutlich reduziert. Auffällig sind die durchgeführten Solubilisierungsversuche aus HEK-Membranfraktionen, die abweichend von Lyu et al. (2021) mit geringer DDM-Konzentration und ohne Zusatz von CHS am meisten solubilisiertes PffNTG107S aufwiesen (Abb. 4.22). Dies könnte möglicherweise mit der geringen produzierten PffNTG107S-Proteinmenge (Abb. 4.21 C) aufgrund eines geringen Expressionslevels im verwendeten HEK-Zellsystem und geringer in den Solubilisierungsansätzen eingesetzten Membranfraktionsmassen erklärt werden.

Bei initialen Solubilisierungsversuchen aus *P. pastoris*-Membranfraktionen (Abb. 4.32) konnte ebenfalls DDM als effizientestes Extraktionsdetergenz mit je nach verwendeter Membranfraktionscharge erheblichen Schwankungen der Solubilisierungsausbeute bestimmt werden. Es wird ein wesentlicher Einfluss der Zellaufschlusseffizienz und der Extraktionsprozedur der jeweiligen Membranfraktion auf die Solubilisierungseffizienz vermutet. Das erklärt die schlechte Reproduzierbarkeit der Solubilisierungsversuche aus verschiedenen Membranfraktionschargen und begrenzt die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Solubilisierungsansätzen auch aufgrund verschiedener zugrunde liegender Gesamtproteinkonzentrationen. Dies hat eine limitierte Planbarkeit und die Notwendigkeit einer Überprüfung der Effizienz von Zellaufschluss

und Membranfraktionsisolierung zur Folge. Nach Zellaufschluss mittels BeadBeater-Zellhomogenisator konnten PfFNTG107S- und Membranfraktionsmengen in starker Abhängigkeit vom jeweiligen Puffer-zu-Zellmasse-Verhältnis extrahiert werden (Abb. 4.31 F). Dabei wurde mit einem Puffervolumen von 30-40 ml pro 1 g Zellpelletfeuchtmasse der größte relative PfFNTG107S-Anteil in der extrahierten Membranfraktion erhalten. Entsprechend dieser starken Abhängigkeit lagen in den Membranfraktionen erheblich variierende Gesamtprotein- und PfFNTG107S-Konzentrationen und damit bei Solubilisierungsversuchen unterschiedliche Detergenz-zu-Membranprotein-Verhältnisse vor. Zudem zeigt sich hier, dass die Membranfraktionsausbeute neben der Zellaufschlusseffizienz mittels BeadBeater-Zellhomogenisator auch durch die Membranfraktionsisolierungseffizienz in Abhängigkeit von der Zelldichte limitiert ist.

Unter Verwendung der *S. cerevisiae*-Sekretionsmutante NY17 konnte wie in Kap. 5.4 bereits diskutiert eine effizientere Membranfraktionsisolierung mit angereicherten Post-Golgi-Vesikeln erreicht werden (Kap. 4.20). Die PfFNTG107S-Solubilisierungsversuche aus den extrahierten Post-Golgi-Vesikeln führten hingegen zu keiner wesentlichen Verbesserung der Solubilisierungseffizienz und es wurden nur sehr geringe PfFNTG107S-Ausbeuten extrahiert (Abb. 4.34 C). Dies könnte mit dem möglichen Vorliegen von weiteren Membrankomponenten neben den Post-Golgi-Vesikeln erklärt werden, was durch Ergebnisse des durchgeführten Faktor Xa-Assays zur Bestimmung der PfFNTG107S-Orientierung (Abb. 4.34 D) unterstützt wird. Analog sollte die Membranfraktion aus HEK-Zellen aufgrund der im Vergleich zu Hefezellen fehlenden Zellwand vereinfacht extrahiert werden und damit die Grundlage für hohe Solubilisierungseffizienzen legen. Bei Solubilisierung aus HEK-Membranfraktionen wurde mit geringen DDM-Konzentrationen von 0,5 % (m/v) die größte PfFNTG107S-Solubilisierungsausbeute erzielt (Abb. 4.22 B). Der Zusatz von CHS zur Mizellenstabilisierung führte zu keiner erhöhten PfFNTG107S-Solubilisierungsausbeute, während vermutlich mit CHAPS präzipitierte PfFNTG107S-Membranproteine im Solubilisierungsspellet erhalten wurden. Dies steht entgegen der guten Solubilisierungserfolge von PfFNT-GFP-Fusionsproteinen aus HEK-Membranen mit einem Gemisch aus CHAPS, DDM und CHS (Jakobowska et al., 2021). Mittels des metabolischen Selektionsmechanismus der PfFNTG107S-exprimierenden HEK-Zellen wurde die Herstellung von funktionalem PfFNTG107S in den kultivierten HEK-Zellen nachgewiesen (Abb. 4.21), allerdings konnte eine effiziente PfFNTG107S-Extraktion auch mit SDS-Solubilisierungskontrollen nicht erreicht werden (Abb. 4.22 B). Durch die SDS-Präzipitation während des Solubilisierungsprozesses bei 4 °C wird ein daraus resultierendes Ausfallen der PfFNTG107S-Membranproteine angenommen. Die geringen Effizienzen bei PfFNTG107S-Solubilisierung aus Post-Golgi-Vesikeln und HEK-Membranfraktionen weisen möglicherweise auf geringe PfFNTG107S-Membranproteinanteile in den jeweiligen Membranfraktionen hin und erfordern die Kontrolle der jeweils vorangegangenen Prozessschritte und die Sicherstellung einer ausreichenden PfFNTG107S-Ausgangsproteinmenge in den Membranfraktionen.

Im DDM-Konzentrationscreening zur PfFNTG107S-Solubilisierung mit entsprechend der aus 4 g Zellpelletfeuchtmasse extrahierten *Pichia*-Membranfraktionen konnte bestimmt werden, dass höhere DDM-Konzentrationen von 1,25-1,5 % (m/v) zur Solubilisierung von etwa 70 % des in der Membranfraktion befindlichen PfFNTG107S führten (Abb. 4.32 E). Dies zeigt die prinzipielle Möglichkeit der PfFNTG107S-Solubilisierung bei guter Durchmischung der Solubilisierungsansätze durch Rotation über Nacht und die deutlich höhere Solubilisierungseffizienz im Vergleich zur Verwendung der aus 80 g Zellpelletfeuchtmasse extrahierten Membranfraktionen. Die kleineren Solubilisierungsansätze führten zu geringen absoluten PfFNTG107S-Ausbeuten, sodass in der nachfolgenden IMAC-Reinigung keine Elutionsfraktionen mit isoliertem PfFNTG107S erhalten wurden (Abb. 4.33 A). Mittels Western Blot-Analyse (Abb. 4.33 B) konn-

ten nur sehr geringe PfFNTG107S-Mengen in den IMAC-Fractionen und den konzentrierten Fractionen erhalten und damit die Extraktion von kleinen Mengen mit DDM stabilisierter PfFNG107S-Pentamere nachgewiesen werden. Somit wurde für weiterführende Untersuchungen nicht ausreichend PfFNTG107S extrahiert, sodass zunächst durch Skalierung der Prozessschritte eine effiziente Proteinsolubilisierung erreicht werden muss. Dazu sollte durch kleinere Solubilisierungsansätze eine Ausbeute mittels IMAC und SEC gereinigter PfFNTG107S-Pentamere von $>50\text{ }\mu\text{g}$ für Strukturuntersuchungen mittels Cryo-EM angepeilt werden. Diese benötigte Proteinmenge sollte durch kleinere *S. cerevisiae*- und *P. pastoris*-Kolbenkulturen nach effizienter Zellhomogenisierung erreicht werden. Durch sofortiges Binden solubilisierter PfFNTG107S-Pentamere an eine IMAC-Matrix könnten möglicherweise auftretende Verluste durch Haftung an die Oberfläche von Reaktionsgefäßen verringert und Verbesserungen der Solubilisierungseffizienzen erreicht werden. Eine dazu entwickelte „Teabag“-Methode (Castaldo et al., 2016) kombiniert die Membranproteinsolubilisierung in Gegenwart von Detergenzien mit der nachfolgenden affinitätschromatographischen Reinigung der extrahierten Membranproteine. Neben der Verringerung des Zeitaufwandes ist mit der „Teabag“-Methode eine Optimierung der Solubilisierungsausbeute und Qualität an extrahierten Membranproteinen zu erwarten (Hering et al., 2020).

Nach Solubilisierung der Membranproteine aus Membranfractionen ist zumeist ein Detergenzaustausch zu einem für nachfolgende Untersuchungen geeigneten Stabilisierungsdetergenz notwendig. Der Detergenzaustausch von in Gegenwart von Brij78 zellfrei hergestelltem PfFNTG107S zu LMNG und GDN wurde während Proteinreinigung mittels IMAC und SEC durchgeführt (Kap. 4.3) und weist sowohl durch die Coomassie-gefärbten SDS-PAGE-Gele als auch die SEC-Chromatogramme auf erfolgreiche Proteinreinigungen in Gegenwart von LMNG und GDN hin. Zu beachten ist das Vorliegen eines einzigen SEC-Peaks im Gegensatz zu SEC-Durchläufen ohne Detergenzaustausch in Präsenz von Brij78 (Abb. 4.3 B) und GDN (Abb. 4.9 A), was auf die erfolgte Umordnung von Detergenzmizellen während des jeweiligen Detergenzaustausches und die damit einhergehende Partikelgrößenveränderung hindeuten könnte. Der Detergenzaustausch von Brij78 zu den jeweiligen anderen Stabilisierungsdetergenzien wurde hier allerdings nicht durch weitere Untersuchungen bestätigt. Brij78 kann vermutlich aufgrund starker Interaktionen mit den zellfrei hergestellten Membranproteinen nur schwierig durch andere Stabilisierungsdetergenzien ersetzt werden (Proverbio et al., 2013), sodass eine weitergehende Überprüfung des Brij78-Austausches beispielsweise mittels MALDI-ToF-Massenspektrometrie erfolgen sollte (Chaptal et al., 2017). In den Cryo-EM-Aufnahmen wurden unter Verwendung der beiden Stabilisierungsdetergenzien LMNG und GDN vergleichbar homogene Partikelverteilungen erzielt (Abb. 4.11), während die visualisierten Partikel in Form und Größe von leeren Detergenzmizellen zu unterscheiden waren (Gewering et al., 2018). Theoretisch ist bei ausbleibendem Detergenzaustausch das Vorliegen leerer Brij78-Mizellen ohne solubilisiertes PfFNTG107S möglich, wenn die PfFNTG107S-Membranproteine während der Vitrifizierung quantitativ auf die *Holey Carbon Grids* außerhalb der selektierten $1,2\text{ }\mu\text{m}$ -Löcher übertragen wurden. Dies ist allerdings aufgrund der Beobachtung einer gleichbleibenden Partikelverteilung ohne Aggregate auch außerhalb der $1,2\text{ }\mu\text{m}$ -Löcher unwahrscheinlich, sodass vermutlich PfFNTG107S-Partikel in Detergenzmizellen in den gezeigten Cryo-EM-Aufnahmen vorlagen. Durch die zellfreie Proteinsynthese von PfFNTG107S in Gegenwart von GDN (Kap. 4.5) wurde eine Strategie zur Vermeidung eines Detergenzaustausches etabliert. Zu Strukturuntersuchungen muss allerdings hier zunächst die Assemblierung von PfFNTG107S-Pentameren verifiziert werden, was für zellfrei hergestellte PfFNTG107S-Membranproteine in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte.

5.6 Funktionsuntersuchungen von Transportproteinen

Zur Strukturaufklärung verwendete Membranproteine müssen im nativen Faltungszustand vorliegen und sollten entsprechend der zugeschriebenen Membranproteinfunktion befähigt sein. Zum Ausschluss von Proteinveränderungen oder -denaturierung während des Extraktionsprozesses aus der Membranumgebung sollte die Funktionalität eines Transportproteins in einem geeigneten Testsystem nachgewiesen werden. Da die Extraktion und Solubilisierung von PfFNTG107S aus den verwendeten Zellsystemen nicht reproduziert werden konnte, wurden zunächst Nachweise der generellen Funktionalität des in den Zellmembranen lokalisierten Transportproteins erbracht. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Funktionalität des in *S. cerevisiae*- und *P. pastoris*-Hefeexpressionssystemen hergestellten PfFNTG107S durch Protoplasten-Schwellungsassays an der Stopped-Flow-Apparatur nachgewiesen werden (Abb. 4.27 C und Abb. 4.30 C). Damit lag offenkundig funktionales PfFNTG107S in den jeweiligen Hefezellmembranen vor und die Präsenz der zur Vermittlung der Lactatpassage benötigten PfFNTG107S-Pentamere konnte über Western Blot-Analysen bestätigt werden (Abb. 4.27 B und Abb. 4.30 B). Zudem wurde die L-Lactataufnahme von *S. cerevisiae*-Protoplasten durch Zugabe des PfFNT-Inhibitors BH267 meta nahezu vollständig gehemmt, was die Aufnahme von L-Lactat durch PfFNTG107S-Transportproteine bestätigt. Eine L-Lactataufnahme konnte mit *P. pastoris*-Protoplasten erst nach einer ausreichend langen Induktionsperiode beobachtet werden, während 4 h nach Induktion noch kein durch den Substratimport hervorgerufenen Anschwellen der Protoplasten registriert wurde. Dies weist vermutlich auf die für PfFNTG107S-Expression und -Rekonstitution in die *P. pastoris*-Zellmembran benötigte Zeitspanne sowie die durch PfFNTG107S vermittelte L-Lactataufnahme hin. Möglicherweise benötigen PfFNTG107S-Trafficking an die Plasmamembran und Membranproteineinbau eine entsprechende Zeit, was auch durch die Western Blot-Analyse der Membranfraktionen (Abb. 4.30 E) bestätigt wurde. Protoplasten von nicht-induzierten bzw. für nur 4 h induzierten *P. pastoris*-Hefezellen zeigten einen vergleichbaren und nur leichten Streulichtkurvenabfall in der Substrateinstromphase (Abb. 4.30 C), für deren biexponentiellen Kurvenfit näherungsweise τ -Werte bestimmt werden konnten. Im Vergleich zu aus *S. cerevisiae*-Hefezellen generierten Protoplasten bei einem 0-0,3 M L-Lactatgradienten ($\tau = 89,3$ s) ist die τ -Zeitkonstante bei *P. pastoris*-Protoplasten und gleichen Messparametern mit 235,1 s etwa dreimal so hoch, was möglicherweise auf eine verringerte Anzahl der PfFNTG107S-Transportproteine an der *P. pastoris*-Zellmembran oder eine geringere Transportkinetik des in *P. pastoris*-Zellen hergestellten PfFNTG107S hinweisen könnte. Ebenso ist ein Einfluss einer differenzierten Protoplastengröße oder eines veränderten Schwellungsverhalten der jeweiligen Protoplasten auf die durch die Zeitkonstante τ bezifferte Kinetik denkbar, wodurch τ -Werte nur in dem identischen Zellsystem vergleichbar sind. Der Abfall bei den aus nicht-induzierten *P. pastoris*-Zellen generierten Protoplasten könnte möglicherweise auf eine leichte PfFNTG107S-Expression oder die Hintergrundexpression von weiteren Lactattransportproteinen in der *P. pastoris*-Zellmembran hinweisen. Das *P. pastoris*-Genom codiert für putative Monocarboxylattransportproteine, die möglicherweise auch die L-Lactatpassage über Plasmamembranen vermitteln können (Soares-Silva et al., 2003; de Lima et al., 2016). Trotz der potenziellen Hintergrundexpression ist eine durch die PfFNTG107S-Transportproteine vermittelte L-Lactataufnahme anhand des schnelleren Schwellungsverhaltens mit kleinerer τ -Zeitkonstante (Abb. 4.30 D) erkennbar. Durch die Transportproteinextraktion aus dem Lipidbilayermembransystem ändert sich die hydrophobe Umgebung immens, sodass die Funktionalität in dieser neuen Umgebung zur Rechtfertigung von Strukturuntersuchungen ebenfalls überprüft werden sollte. Für das mittels zellfreier Proteinsynthese hergestellte

PfFNTG107S konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Funktionalitätsnachweis durch Schwellungsassays mit Proteoliposomen erbracht werden. Zur Überprüfung der Transportfunktion von PfFNTG107S sollten Schwellungsassay an der Stopped-Flow-Apparatur mit in Liposomen rekonstituiertem PfFNTG107S durchgeführt werden. Es wurden keine Rekonstitutionen von zellfrei hergestelltem PfFNTG107S nachgewiesen und keine reproduzierbaren Lichtstreuungskurven erhalten. Da in der vorliegenden Arbeit keine gesicherten Hinweise auf zellfrei hergestellte PfFNTG107S-Pentamere *via* TEM mit Negativkontrastierung (Abb. 4.4) erhalten wurden und die tatsächliche Pentamerassemblierung nicht bestätigt wurde, ist die Funktionalität des zellfrei synthetisierten PfFNTG107S ungeklärt. Dr. Nathan Epalle und Moira Möller unternahmen im Laufe ihrer Promotionsarbeiten ebenfalls Versuche zum Nachweis des Substrattransports verschiedener zellfrei hergestellter Transportproteine unter Verwendung von Proteoliposomen. Trotz teilweise erfolgreicher Rekonstitution von PfFNT und PfFNT-GFP-Fusionsproteinen in Liposomen (Epalle, 2023) konnten keine validen Lichtstreuungskurven aufgenommen und somit keine L-Lactataufnahme durch zellfrei hergestelltes PfFNT belegt werden. Die ineffiziente PfFNT-Rekonstitution in Liposomen könnte dabei u. a. mit der nicht vollständigen Assemblierung von PfFNT-Pentameren und dem Vorliegen von artifiziellen PfFNT-Strukturen erklärt werden.

Im verwendeten HEK-Zellsystem exprimierte PfFNTG107S-Pentamere wurden hingegen in Membranfraktionen in einer Western Blot-Analyse detektiert (Abb. 4.21 C). Die Rekonstitution von mit 0,5 % (m/v) DDM solubilisierten PfFNTG107S-Membranproteinen in Liposomen wurde zudem durch Dichtegradientenzentrifugation gezeigt (Abb. 4.22 D). Die aufgenommenen Proteoliposomen-Lichtstreuungskurven konnten hingegen keine L-Lactataufnahme verifizieren und zudem nicht mit weiteren aus HEK-Zellen extrahierten Proteinchargen reproduziert werden (Abb. 4.22 E). Da auch die einem L-Lactatgradienten ausgesetzten Kontrollliposomen einen vergleichbaren Kurvenverlauf mit einem Liposomenanschwellen zeigten, wird eine mangelnde Dichtigkeit der aus Ecpl-Lipiden hergestellten leeren Liposomen und ein PfFNTG107S-unabhängiger L-Lactateinstrom vermutet. Die Liposomendichtigkeit ist entscheidend für die Funktionsüberprüfung der rekonstituierten Transportproteine und muss vor weiteren Transportmessungen neben der Rekonstitutionseffizienz untersucht werden. Es wurden u. a. Protokolle publiziert, die sich mit der Rekonstitution von AQP (Steffen et al., 2022) sowie Wasser- und Glycerolkanälen (Borgnia & Agre, 2001) zur funktionellen Charakterisierung über Schwellungsassays an einer Stopped-Flow-Apparatur befassen und entsprechend adaptiert werden könnten. Neben der Auswahl der Lipidzusammensetzung für die Liposomenherstellung könnte auch der Zusatz von Cholesterol eine Erhöhung der Dichtigkeit der Liposomenmembranen bewirken (Yang et al., 2016; Renaud et al., 2017). Aufgrund der sehr geringen extrahierten PfFNTG107S-Proteinausbeuten aus HEK-Membranfraktionen (Abb. 4.22 C) sind keine Aussagen über die Reinheit der zur Rekonstitution eingesetzten IMAC-Fractionen möglich. Die Rekonstitution von neben PfFNTG107S cosolubilisierten und ebenfalls L-Lactat-leitenden Membranproteinen in die Liposomen sollte durch weitere proteinchemische Analysen der Dichtegradientenzentrifugationsfraktionen ausgeschlossen werden.

Dr. Folkhard Helmstetter und Dr. Philipp Hajek konnten in ihren Promotionsarbeiten Lichtstreuungskurven mit Proteoliposomen ermitteln, die die Funktionalität von zellfrei hergestelltem EhFNT (Helmstetter, 2019) und aus *P. pastoris*-Membranfraktionen isoliertem PfFNT (Hajek, 2019) nahelegten. Allerdings waren die aufgenommenen Lichtstreuungskurven nicht reproduzierbar und die Messergebnisse unterschieden sich zwischen den verwendeten Transportprotein- und Liposomenchargen erheblich. Bei den Messungen an der Stopped-Flow-Apparatur ist zudem das Auftreten von Messartefakten und die damit einhergehende

schwierige Verifizierung von tatsächlichen Messkurven zu beachten. So sind insbesondere zu Messbeginn vermehrt durch Luftblasen und inhomogene Probensuspensionen hervorgerufene Messartefakte zu beobachten, die eine Auswertung der entsprechenden Lichtstreuungskurven verhindern und aufgrund von geringen Probenvolumina in einer Mittelung von weniger Lichtstreuungskurven resultieren. Die Funktionalität von zellfrei hergestellten, oligomeren Transportproteinen konnte auch aus diesen Gründen nicht verifiziert werden und es besteht vermutlich die Notwendigkeit zur Abänderung des Zellfrei-Systems (Kap. 5.1 und Kap. 5.2) und zur Verbesserung des Protokolls zur Proteoliposomenherstellung. Durch Verwendung von extrahierten Post-Golgi-Vesikeln als natürliche Membranvesikel (Kap. 5.4) mit im Zellsystem rekonstituierten Transportproteinen könnte der durchgeführte Schwellungsassay ohne den Unsicherheitsfaktor der nachträglichen, artifiziellen Rekonstitution der Transportproteine validiert werden. Zudem könnten alternative Funktionsassays für aus Membranen extrahierte Transportproteine und Inhibitorbindungsstudien einen wertvollen Hinweis auf die Ausbildung des korrekten Faltungszustandes und damit indirekt auf die potenzielle Transportproteinfunktionalität liefern (Quick & Javitch, 2007). Hajek et al. (2019) verwendeten dafür einen Fluoreszenz-markierten PfFNT-Inhibitor und verfolgten die Inhibitorbindung an das PfFNT-Proteintarget *via* Größenausschlusschromatographie. Zudem konnten Inhibitorbindungskinetiken mittels modifizierter PfFNT-Inhibitoren durch Anwendung der Biolayer-Interferometrie verfolgt werden. Thermostabilitätsuntersuchungen stellen ebenfalls eine valide Methode zur Einschätzung des Faltungszustandes von Membranproteinen dar (Alexandrov et al., 2008; Wang et al., 2015). In dieser Arbeit wurde die Funktionalität der in *S. cerevisiae*-Zellen synthetisierten FNT-Transportproteine weiter durch Anwendung eines phänotypischen Assays zum Hochdurchsatzwirkstoffscreening gezeigt (Kap. 4.14). Dies weist zusammen mit Ergebnissen von Transportmessungen im biophysikalischen Radioassay von Transportproteinen wie PfFNT (Wu et al., 2015), PfCRT (Petersen, 2021) und MCT1 (Köpnick et al., 2021) eindeutig die Befähigung des hier verwendeten *S. cerevisiae*-Expressionssystems zur Herstellung funktionaler Transportproteine nach. Die Ergebnisse des phänotypischen Wirkstoffscreenings werden im folgenden Kap. 5.7 weiter diskutiert.

5.7 Phänotypische Assays zum Hochdurchsatzscreening von Wirkstoffkandidaten

Zur Entdeckung neuer Wirkstoffkandidaten für ein identifiziertes Proteintarget ohne experimentell erhobene Strukturinformationen ist ein Hochdurchsatzwirkstoffscreening ein mächtiges Werkzeug. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dazu ein phänotypisches Wirkstoffscreening durchgeführt, welches durch spektroskopische Messungen Rückschlüsse auf die durch Resazurin indizierte Zellviabilität und damit indirekt die Potenz von möglichen FNT-Inhibitoren im *S. cerevisiae*-Hefesystem zulässt (Kap. 4.14). Es wird also nicht wie im biophysikalischen Radioassay der direkte Stoffimport, sondern mit der Zellviabilität eine aus dem Stoffimport resultierende Konsequenz betrachtet. Durch vollständige Hemmung der Lactattransportproteine kommt die Lactataufnahme von FNT-exprimierenden Hefezellen des *S. cerevisiae*-Stammes zum Erliegen, sodass intrazellulär kein reduktives Milieu aufrechterhalten werden kann und eine Verringerung der Zellviabilität resultiert (vgl. Abb. 3.3). Somit können Testsubstanzen auch ohne direkte Targetinhibition beispielsweise durch Interaktion mit dem zelleigenen Lactatstoffwechsel oder durch zytotoxische Effekte die Zellviabilität verringern und damit fälschlicherweise als positive Hits mit geringen EC₅₀-Werten bzw. Inhibitions Grenzwerten erscheinen. Dr. Anna Mäder testete eine 12.564 Moleküle umfassende Substanzbibliothek mit einem dem hier beschriebenen phänotypischen Wirkstoffscreening sehr

ähnlichen Assay auf die potenzielle PfFNTG107S-Inhibition (Meier, 2020). 92 (0,73 %) der getesteten Substanzen wiesen bei einer eingesetzten Konzentration von 10 μ M eine relative Zellviabilität von 0 % auf, in der nachfolgenden Testung im biophysikalischen Radioassay konnte hingegen keine dieser 92 Substanzen als potenter PfFNTG107S-Inhibitor bestätigt werden. Es lagen somit ausschließlich falsch-positive Hits vor und es wurde angenommen, dass die hohen eingesetzten Substanzkonzentrationen zur Verringerung der Zellviabilität ohne Lactataufnahmehemmung durch PfFNTG107S-Inhibition führten. Dies zeigt die Notwendigkeit der Verifizierung der Targetinhibition durch einen direkteren Assay nach Durchführung initialer phänotypischer Wirkstoffscreenings. Im Gegensatz dazu können die unterschiedlichen Inkubationszeiten der beiden Testsysteme einen Einfluss auf die Inhibitoridentifizierung haben. Die Testsubstanzen wurden im phänotypischen Wirkstoffscreening für 2-3 d einer Temperatur von 29 °C und damit harscheren Bedingungen ausgesetzt als im biophysikalischen Radioassay bei Raumtemperaturinkubation für einige Minuten. Testsubstanzen mit geringer Thermostabilität könnten während der Inkubationszeit zerfallen oder durch Hefezellen metabolisiert oder modifiziert werden, wodurch real geringere Substanzkonzentrationen im Reaktionsansatz vorliegen würden. Damit einhergehende Bestimmungen von zu hohen EC_{50} -Werten bzw. Inhibitions Grenzwerten im phänotypischen Wirkstoffscreening könnten dazu führen, dass entsprechende Substanzen fälschlicherweise nicht als potente FNT-Inhibitoren erfasst werden. Die gute Korrelation der mittels phänotypischen Assays bestimmten EC_{50} -Werte für die Substanzen MMV007839, BH267.meta und BH297 (Abb. 4.24 B) mit den im biophysikalischen Radioassay ermittelten IC_{50} -Werten (Walloch et al., 2021) weist auf die ausreichende Stabilität dieser drei getesteten Substanzen bei verlängerter Inkubationszeit im phänotypischen Assay hin. Weiterhin zeigt die hohe Korrelation, dass der L-Lactatimport *via* FNT-Lactattransportproteine in diesem System vermutlich der geschwindigkeitsbestimmende Parameter für den L-Lactatstoffwechsel ist und konsequenterweise die Zellviabilität limitiert. Dies wird vermutlich auch durch PfFNT-Expressionsanalysen und Wachstumsuntersuchungen von PfFNT-exprimierenden Hefezellen in Lactatmedium (Abb. 4.26) unterstützt. PfFNTV196L-exprimierende *S. cerevisiae* Δ jen1 Δ ady2-Hefezellen wiesen ein verlangsamtes Wachstum in Lactatmedium und eine intensive Chemilumineszenzbande in der Western Blot-Analyse zum PfFNT-Expressionsnachweis auf (Abb. 4.26). Möglicherweise wird eine verminderte Transportproteinaktivität bei Kultivierung in Lactatmedium durch eine verstärkte Lokalisation von PfFNTV196L an der Zellmembran zur Sicherstellung des essenziellen Substratnachschiebs ausgeglichen.

Abb. 5.3 zeigt die Korrelation der im Rahmen des phänotypischen Wirkstoffscreenings gegen FNT-Speziesvarianten erhaltenen PfFNT-Inhibitions Grenzwerte mit den von Dr. Philipp Walloch und Cornelius Nerlich im biophysikalischen Radioassay bestimmten IC_{50} -Werten bei PfFNT-Hemmung. Die Beträge der im phänotypischen Assay ermittelten Inhibitions Grenzwerte lagen tendenziell über den IC_{50} -Werten der direkten Transportmessungen aus biophysikalischen Radioassays. Dies ist insbesondere mit der Definition und Erhebung der jeweiligen Werte begründet, da der Inhibitions Grenzwert die tatsächlich eingesetzte Substanzkonzentration ist, bei der die Zellviabilität <50 % beträgt. IC_{50} -Werte wurden hingegen analog zu den EC_{50} -Werten aus Inhibitionskurven bestimmt und repräsentieren diejenige aus Inhibitionskurven abgeleitete Substanzkonzentration, bei der der Inhibitionseffekt bzw. der beobachtete Effekt genau 50 % beträgt. Neben diesem Definitionsunterschied könnten geringe Substanzstabilitäten zu Verringerungen der realen Inhibitorkonzentrationen während der Inkubationszeit führen und damit wie oben beschrieben fälschlicherweise hohe Inhibitions Grenzwerte bestimmt werden. Für einige der Testsubstanzen wie BH267.meta und andere abgeleitete PfFNT-Inhibitoren konnten durch Stabilitätsuntersuchungen limi-

tierte Pufferlagerungsstabilitäten bei Raumtemperatur gezeigt werden (Walloch, 2021). BH267.meta scheint der guten Korrelation von Inhibitions Grenzwert und biophysikalischem IC_{50} -Wert zufolge allerdings mit ausreichender Substanzstabilität vorzuliegen. Zudem könnten durch die *S. cerevisiae*-Hefezellen vermittelte Metabolisierungsreaktionen oder Substanzexportvorgänge die im Hefeorganismus und damit am intrazellulären Wirkort vorliegende Substanzkonzentration verringern. Abseits dieser potenziellen Einschränkungen ist ein allgemeiner Trend in der Korrelationsdarstellung mit tendenziell kleineren IC_{50} -Werten bei geringeren Inhibitions Grenzwerten erkennbar. Damit erscheint der phänotypische Assay als geeignet zur zeiteffizienten Einordnung der Potenz von Testsubstanzen und kann zur Identifizierung von FNT-inhibierenden Substanzen im höheren Durchsatz als mittels biophysikalischem Radioassay eingesetzt werden. Bei den potentesten PfFNT-Inhibitoren mit Inhibitions Grenzwerten von $0,1 \mu M$ wurden teils geringere Inhibitions Grenzwerte als biophysikalische IC_{50} -Werte bestimmt. Dies könnte durch eine mögliche aber nicht weiter untersuchte Zytotoxizität einiger potenter PfFNT-Inhibitoren erklärt werden.

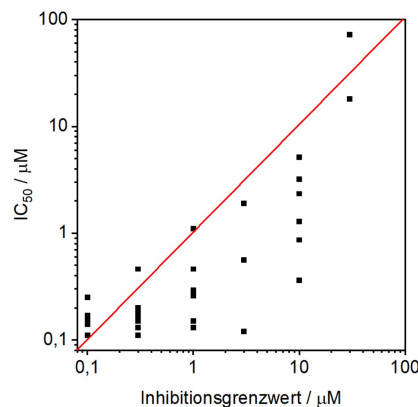


Abb. 5.3: Korrelation der Inhibitions Grenzwerte des phänotypischen Wirkstoffscreenings mit IC_{50} -Werten aus dem biophysikalischen Radioassay. Korrelation der in dieser Arbeit für die 33 Testsubstanzen erhobenen Inhibitions Grenzwerte gegen PfFNT mit den von Dr. Philipp Walloch und Cornelius Nerlich bestimmten IC_{50} -Werten bei PfFNT-Hemmung aus biophysikalischen Radioassays im *S. cerevisiae*-Hefesystem. Unterhalb der roten Linie ist der Inhibitions Grenzwert größer als der jeweilige im biophysikalischen Radioassay bestimmte IC_{50} -Wert.

Eine Strategie zum Ausschluss zytotoxischer Substanzen als falsch-positive Hits ist die Entwicklung eines Rescueassays, in dem die FNT-Inhibition zur Erhöhung der Zellviabilität und damit zur Rettung des Zellphänotyps führt (Denny, 2018). Dies könnte durch Kultivierung von FNT-exprimierenden *S. cerevisiae* $\Delta jen1 \Delta ady2$ -Hefezellen in Glucose-haltigem Medium mit zugesetztem Fluoracetat realisiert werden. Das hefetoxische Fluoracetat ist ein PfFNT-Substrat (Wiechert & Beitz, 2017b) und wird vermutlich zu Fluoracetyl-CoA aktiviert, welches durch die Citratsynthase zu Fluorcitrat metabolisiert wird und damit durch Inhibition der Aconitase zur Hemmung des Citratzyklus führt (Harford & Weitzman, 1980). Ist PfFNT im gewählten Hefezellsystem als einziges Transportprotein zur Aufnahme von Fluoracetat befähigt, würde die vollständige PfFNT-Inhibition zur Rettung des Hefezellphänotyps führen. Ein vergleichbarer Rescueassay wurde von Dr. Lea Petersen für die Identifizierung von potenziell PfCRT-inhibierenden Malariabox-Substanzen durchgeführt. Dieser Rescueassay zielte auf die Regeneration eines durch Chloroquin beeinträchtigten Phänotyps von PfCRT-exprimierenden *S. cerevisiae*-Hefezellen ab, wenn PfCRT durch einen entsprechenden Inhibitor effektiv gehemmt wird. Mit diesem Rescueassay wurden jedoch keine PfCRT-Inhibitoren der Malariabox identifiziert (Petersen, 2021). Es wurden 65 % der

Testsubstanzen als potenziell für *S. cerevisiae* stärker zytotoxisch als Chloroquin angesehen, weil diese das Hefezellwachstum stärker einschränkten als die Zugabe von Chloroquin ohne Testsubstanzen. Auf diese Weise könnten wiederum mögliche FNT-Inhibitoren mit hefetoxischen Eigenschaften identifiziert werden, die möglicherweise weniger Nebenwirkungen auf andere Zellsysteme haben. Aus diesem Grund erscheint ein wie in der vorliegenden Arbeit beschriebenes phänotypisches Wirkstoffscreening mit anschließender Targetvalidierung als präferierte Methode zur initialen Hochdurchsatztestung potenzieller FNT-Inhibitoren und könnte durch einen Rescueassay entsprechend erweitert werden.

Das durchgeführte phänotypische Wirkstoffscreening mit FNT-Speziesvarianten ermöglichte die Identifizierung von gegen eine Bandbreite von FNT-Lactattransportproteinen verschiedener *Plasmodium*-Malariaerreger potenten Wirkstoffkandidaten. Die insgesamt gegen die getesteten FNT-Speziesvarianten potenteste Substanz BH267.meta galt zu dem Zeitpunkt der Assaydurchführung als aussichtsreichste Inhibitorsubstanz für die Inhibition von PfFNT und PfFNT-Resistenzmutanten und als Ausgangspunkt für weitere Inhibitoroptimierungen (Walloch et al., 2021). Dies wird durch von Dr. Philipp Walloch mittels biophysikalischen Radioassays erzielte Resultate unterstützt, nach denen BH267.meta die PfFNT-Resistenzmutanten in nanomolaren Konzentrationen effektiv inhibierte (Walloch, 2021). Ebenso zeigt auch die hohe Korrelation der für die Malariabox-Substanz MMV007839 sowie die abgeleiteten Substanzen BH297 und BH267.meta im phänotypischen Assay ermittelten Inhibitions Grenzwerte und EC_{50} -Werte mit den im biophysikalischen Radioassay erhaltenen IC_{50} -Werten die prinzipielle Anwendbarkeit des phänotypischen Assays für die Generierung valider Resultate. Neben besonders potenten FNT-Inhibitoren wurden auch Substanzen mit geringer Effektivität gegen die sechs FNT-Speziesvarianten identifiziert. Die gegen die FNT-Speziesvarianten insgesamt wenig wirksamen Substanzen gehören zu denjenigen Molekülen, die PfFNT in nur geringen Maßen im biophysikalischen Radioassay hemmten. Aufgrund des hochkonservierten Transportpfades und damit einhergehend sehr ähnlicher Inhibitorbindestellen der sechs FNT-Speziesvarianten (Walloch et al., 2021) ist die geringe Wirksamkeit auch gegen die weiteren FNT-Speziesvarianten plausibel. Die tendenziell größeren Unterschiede der Inhibitions Grenzwerte verschiedener PfFNT-Inhibitoren gegen die PfFNT-Resistenzmutanten mit Aminosäureaustauschen in dem Transportpfad bestätigen die Substanzbindungen an der erwarteten Inhibitorbindestelle. So kann mittels des phänotypischen Wirkstoffscreenings die Effektivität von potenziellen Wirkstoffkandidaten gegen verschiedene PfFNT-Resistenzmutanten in einem ersten Schritt quantifiziert werden. Durch die Resultate aus dem phänotypischen Wirkstoffscreening konnte zudem mit BH268.Pyrazin eine neue potente Substanz zur SAR-basierten Inhibitoroptimierung identifiziert und der positive Effekt eines zweiten Stickstoffatoms des aromatischen Systems auf die Inhibitoraffinität gegen die sechs FNT-Speziesvarianten gezeigt werden. Auf Grundlage dieser Erkenntnisse konnten neue Inhibitorvarianten für die effektive Inhibition von FNT-Speziesvarianten und PfFNT-Resistenzmutanten generiert werden.

5.8 Ausblick

Die rationale Entwicklung neuer hochspezifischer und hochaffiner PfFNT-Inhibitoren ist das übergeordnete Ziel bei der Bereitstellung neuer Antimalariawirkstoffe. Dazu wird neben der Testung von potenziellen PfFNT-Inhibitoren *via* Hochdurchsatzwirkstoffscreenings die hochauflösende Strukturaufklärung von PfFNT-Resistenzmutanten mit gebundenen Inhibitoren angestrebt. Bis zur Auflösung von Inhibitorbindungsmechanismen im Atommaßstab durch Analyse experimenteller Cryo-EM-Strukturdaten

von Transportprotein-Inhibitor-Komplexen basiert die Inhibitoridentifizierung und -weiterentwicklung auf Strukturmodellen und Inhibitorscreeningmethoden. Das im Rahmen dieser Arbeit validierte phänotypische Hochdurchsatzscreening sollte zur initialen und kosteneffizienten PfFNT-Inhibitorprüfung eingesetzt werden und könnte zudem auch zur Identifizierung von potenten MCT-Inhibitoren angewendet werden. Weiterhin könnte das Testsystem zum Ausschluss von falsch-positiven Hits mit einem Rescueassay ergänzt und damit zur Identifizierung von gegen verschiedene Transportproteine mit mindestens einem zytotoxischen Substrat gerichteten Inhibitoren eingesetzt werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Überprüfung von effizienter Produktion und Extraktion sowie physiologischer Funktion nativer Membranproteinoligomere zur Strukturaufklärung herausfordernd bleibt und die Berücksichtigung mannigfaltiger Parameter notwendig ist. Dazu sind vielfältige Proteinproduktionsstrategien möglich, die initial zu mit DDM oder GDN stabilisierten PfFNT-Transportproteinen führen sollten. Zunächst könnte die Verfügbarkeit von solubilisierten PfFNTG107S-Pentameren durch zellfreie Proteinsynthese mit einem aus eukaryotischen Weizenkeimen extrahierten Zellextrakt zur Produktion höhermolekulargewichtiger Membranproteine ausgebaut werden. Durch Anbieten einer geeigneten Membranumgebung wie Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums oder Lipid-Protein-Nanodiscs während der zellfreien Proteinsynthese könnte die Ausbildung von Membranproteinoligomeren realisiert werden. Zur Rekonstitution für elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen könnten modifizierte, kovalent zirkularisierte MSP2N2-Nanodiscs verwendet und in Folge ein effektiver Selektionsmechanismus zur Diskriminierung zwischen Membranprotein-gefüllten und leeren Nanodiscs ausgenutzt werden. Dazu und zur Verminderung der Selbstaggregation sollten Nanodiscs ohne eigene Affinitätstags eingesetzt werden. Zur Kontrolle der effizienten Rekonstitution und des nativen Proteinfaltungszustandes könnten Bindungsstudien mit Fluoreszenz-markierten PfFNT-Inhibitoren sowie Funktionsüberprüfungen mit in Liposomen rekonstituierten PfFNTG107S-Pentameren durchgeführt werden.

Als vielversprechendes, eukaryotischen Expressionssystem zur zellbasierten Membranproteinsynthese erwies sich die *S. cerevisiae*-Sekretionsmutante des Stamms NY17. In extrahierten Post-Golgi-Vesikeln angereicherte Membranproteine sollten durch Optimierung der Solubilisierungsbedingungen aus den Vesikelmembranen isoliert und damit ein vereinfachtes Membranproteinextraktionsprotokoll etabliert werden. Als PfFNT-Solubilisierungsdetergenz eignet sich vermutlich insbesondere DDM, für welches je nach Vesikelpräparation geeignete Detergenzkonzentrationen zur quantitativen PfFNTG107S-Extraktion ermittelt werden sollten. Solubilierte Membranproteine können im Folgendem nach Detergenzaustausch zum PfFNTG107S-stabilisierenden GDN der Cryo-EM zugeführt oder zu diesem Zweck posttranslational in größenhomogene MSP2N2-Nanodiscs rekonstituiert werden. Durch die effektive PfFNTG107S-Extraktionsmethode könnte der Weg für eine Art Hochdurchsatzstrukturaufklärung weiterer PfFNT-Resistenzmutanten mit gebundenen Inhibitoren *via* hochauflösender Cryo-EM bereitet werden. Zudem eröffnen die extrahierten Post-Golgi-Vesikel das Potenzial zur experimentell zugänglichen Transportproteincharakterisierung durch Messung von Transportvorgängen, die einem Export aus Zellen und damit der physiologischen PfFNT-Funktion entsprechen. Dies ist besonders für bidirektionale Transportproteine relevant, die möglicherweise unterschiedliche Transportkinetiken aufweisen wie z. B. der humane Monocarboxylattransporter MCT1. Mittels der extrahierten Post-Golgi-Vesikel mit enthaltenen Transportproteinen könnte eine ausführliche Charakterisierung bidirektionaler Transportproteine durch Schwellungsassays an der Stopped-Flow-Apparatur und mittels biophysikalischer Radioassays durchgeführt werden.

Literaturverzeichnis

- Abe, S., Tanaka, J., Kojima, M., Kanamaru, S., Hirata, K., Yamashita, K., Kobayashi, A., & Ueno, T. (2022). Cell-free protein crystallization for nanocrystal structure determination. *Sci. Rep.*, 12(1), 16031.
- Abiodun, O. O., Brun, R., & Wittlin, S. (2013). In vitro interaction of artemisinin derivatives or the fully synthetic peroxidic anti-malarial OZ277 with thapsigargin in *Plasmodium falciparum* strains. *Malar. J.*, 12(1), 43.
- Alexandrov, A. I., Mileni, M., Chien, E. Y., Hanson, M. A., & Stevens, R. C. (2008). Microscale fluorescent thermal stability assay for membrane proteins. *Structure*, 16(3), 351–359.
- Almasi, S. & Hiani, Y. E. (2020). Exploring the therapeutic potential of membrane transport proteins: Focus on cancer and chemoresistance. *Cancers*, 12(6), 1624.
- Almén, M. S., Nordström, K. J., 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(1), 50.
- Arkhipova, V., Guskov, A., & Slotboom, D. J. (2020). Structural ensemble of a glutamate transporter homologue in lipid nanodisc environment. *Nat. Commun.*, 11(1), 998.
- 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).
- Atkovska, K. & Hub, J. S. (2017). Energetics and mechanism of anion permeation across formate-nitrite transporters. *Sci. Rep.*, 7(1), 12027.
- Bader, A. & Beitz, E. (2020). Transmembrane facilitation of lactate/H⁺ instead of lactic acid is not a question of semantics but of cell viability. *Membranes*, 10(9), E236.
- Bai, X.-c., McMullan, G., & Scheres, S. H. W. (2015). How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends Biochem. Sci.*, 40(1), 49–57.
- Bao, J., Huang, M., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2017). Moderate expression of SEC16 increases protein secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 83(14), e03400–16.
- Batista, A. C., Soudier, P., Kushwaha, M., & Faulon, J. (2021). Optimising protein synthesis in cell-free systems, a review. *Eng. Biol.*, 5(1), 10–19.
- Bayburt, T. H., Grinkova, Y. V., & Sligar, S. G. (2002). Self-Assembly of discoidal phospholipid bilayer nanoparticles with membrane scaffold proteins. *Nano Lett.*, 2(8), 853–856.
- Beitz, E. (2000). TeXshade: Shading and labeling of multiple sequence alignments using LaTeX2e. *Bioinformatics*, 16(2), 135–139.
- Beitz, E. (2007). Jammed traffic impedes parasite growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(35), 13855–13856.
- Beitz, E., Pavlovic-Djuranovic, S., Yasui, M., Agre, P., & Schultz, J. E. (2004). Molecular dissection of water and glycerol permeability of the aquaglyceroporin from *Plasmodium falciparum* by mutational analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101(5), 1153–1158.
- Bengtson, T., Holm, V. L., Kjølbye, L. R., Midtgaard, S. R., Johansen, N. T., Tesei, G., Bottaro, S., Schiøtt, B., Arleth, L., & Lindorff-Larsen, K. (2020). Structure and dynamics of a nanodisc by integrating NMR, SAXS and SANS experiments with molecular dynamics simulations. *eLife*, 9, e56518.

- Benjamin, D., Robay, D., Hindupur, S. K., Pohlmann, J., Colombi, M., El-Shemerly, M. Y., Maira, S. M., Moroni, C., Lane, H. A., & Hall, M. N. (2018). Dual inhibition of the lactate transporters MCT1 and MCT4 is synthetic lethal with metformin due to NAD⁺ depletion in cancer cells. *Cell Rep.*, 25(11), 3047–3058.e4.
- Berkmen, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression Purif.*, 82(1), 240–251.
- 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(1), 235–242.
- Bertolo, A. P., Biz, A. P., Kempka, A. P., Rigo, E., & Cavaleiro, D. (2019). Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): evaluation of cellular disruption processes, chemical composition, functional properties and digestibility. *J. Food Sci. Technol.*, 56(8), 3697–3706.
- Bock, S. (2014). *Zellfreie Synthese von schwer herstellbaren Proteinen*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Bokhari, A. A., Solomon, T., & Desai, S. A. (2008). Two distinct mechanisms of transport through the plasmodial surface anion channel. *J. Membr. Biol.*, 226(1-3), 27–34.
- Borgnia, M. J. & Agre, P. (2001). Reconstitution and functional comparison of purified GlpF and AqpZ, the glycerol and water channels from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98(5), 2888–2893.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254.
- Brunner, R., Aissaoui, H., Boss, C., Bozdech, Z., Brun, R., Corminboeuf, O., Delahaye, S., Fischli, C., Heidmann, B., Kaiser, M., Kamber, J., Meyer, S., Papastogiannidis, P., Siegrist, R., Voss, T., Welford, R., Wittlin, S., & Binkert, C. (2012). Identification of a new chemical class of antimalarials. *J. Infect. Dis.*, 206(5), 735–743.
- Brunner, R., Ng, C. L., Aissaoui, H., Akabas, M. H., Boss, C., Brun, R., Callaghan, P. S., Corminboeuf, O., Fidock, D. A., Frame, I. J., Heidmann, B., Bihan, A. L., Jenö, P., Mattheis, C., Moes, S., Müller, I. B., Paguio, M., Roepe, P. D., Siegrist, R., Voss, T., Welford, R. W., Wittlin, S., & Binkert, C. (2013). UV-triggered affinity capture identifies interactions between the *Plasmodium falciparum* multidrug resistance protein 1 (PfMDR1) and antimalarial agents in live parasitized cells. *J. Biol. Chem.*, 288(31), 22576–22583.
- Cannon, K. S., Sarsam, R. D., Tedamrongwanish, T., Zhang, K., & Baker, R. W. (2023). Lipid nanodiscs as a template for high-resolution cryo-EM structures of peripheral membrane proteins. *J. Struct. Biol.*, 215(3), 107989.
- Casal, M., Paiva, S., Queirós, O., & Soares-Silva, I. (2008). Transport of carboxylic acids in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32(6), 974–994.
- Castaldo, M., Barlind, L., Mauritzson, F., Wan, P. T., & Snijder, H. J. (2016). A fast and easy strategy for protein purification using teabags. *Sci. Rep.*, 6, 28887.
- Chaptal, V., Delolme, F., Kilburg, A., Magnard, S., Montigny, C., Picard, M., Prier, C., Monticelli, L., Bornert, O., Agez, M., Ravaut, S., Orelle, C., Wagner, R., Jawhari, A., Broutin, I., Pebay-Peyroula, E., Jault, J. M., Kaback, H. R., Le Maire, M., & Falson, P. (2017). Quantification of detergents complexed with membrane proteins. *Sci. Rep.*, 7, 41751.
- Cheng, Y. (2015). Single-particle cryo-EM at crystallographic resolution. *Cell*, 161(3), 450–457.
- Cheng, Y. (2018). Single-particle cryo-EM - how did it get here and where will it go. *Science*, 361(6405), 876–880.
- Chester, N. & Marshak, D. R. (1993). Dimethyl sulfoxide-mediated primer T_m reduction: A method for analyzing the role of renaturation temperature in the polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.*, 209(2), 284–290.
- Cocucci, E., Kim, J. Y., Bai, Y., & Pabla, N. (2017). Role of passive diffusion, transporters, and membrane trafficking-mediated processes in cellular drug transport. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 101(1), 121–129.

- Collins, K. A., Snaith, R., Cottingham, M. G., Gilbert, S. C., & Hill, A. V. (2017). Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. *Sci. Rep.*, 7, 46621.
- Coppée, R., Jeffares, D. C., Miteva, M. A., Sabbagh, A., & Clain, J. (2019). Comparative structural and evolutionary analyses predict functional sites in the artemisinin resistance malaria protein K13. *Sci. Rep.*, 9(1), 10675.
- Corvest, V. & Jawhari, A. (2021). Solubilization and stabilization of native membrane proteins for drug discovery. *Methods Mol. Biol.*, 2247, 257–267.
- Craig, A. F., Clark, E. E., Sahu, I. D., Zhang, R., Frantz, N. D., Al-Abdul-Wahid, M. S., Dabney-Smith, C., Konkolewicz, D., & Lorigan, G. A. (2016). Tuning the size of styrene-maleic acid copolymer-lipid nanoparticles (SMALPs) using RAFT polymerization for biophysical studies. *Biochim. Biophys. Acta*, 1858(11), 2931–2939.
- Cranmer, S. L., Conant, A. R., Gutteridge, W. E., & Halestrap, A. P. (1995). Characterization of the enhanced transport of L- and D-lactate into human red blood cells infected with *Plasmodium falciparum* suggests the presence of a novel saturable lactate proton cotransporter. *J. Biol. Chem.*, 270(25), 15045–15052.
- Crofts, A. R. (2004). The cytochrome bc1 complex: Function in the context of structure. *Annu. Rev. Physiol.*, 66, 689–733.
- Cui, L., Mharakurwa, S., Ndiaye, D., Rathod, P. K., & Rosenthal, P. J. (2015). Antimalarial drug resistance: Literature review and activities and findings of the ICEMR network. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 93(3 Suppl), 57–68.
- Czyzewski, B. K. & Wang, D.-N. (2012). Identification and characterization of a bacterial hydrosulphide ion channel. *Nature*, 483(7390), 494–497.
- da Cruz, F. P., Martin, C., Buchholz, K., Lafuente-Monasterio, M. J., Rodrigues, T., Sönnichsen, B., Moreira, R., Gamo, F.-J., Marti, M., Mota, M. M., Hannus, M., & Prudencio, M. (2012). Drug screen targeted at *Plasmodium* liver stages identifies a potent multistage antimalarial drug. *J. Infect. Dis.*, 205(8), 1278–1286.
- Daley, D. O. (2008). The assembly of membrane proteins into complexes. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 18(4), 420–424.
- Dattoo, 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., Compao, Y. D., Issiaka, D., Salou, D., Some, A. M., Omenda, S., Lawrie, A., Bejon, P., Rao, H., Chandramohan, D., Roberts, R., Bharati, S., Stockdale, L., Gairola, S., Greenwood, B. M., Ewer, K. J., Bradley, J., Kulkarni, P. S., Shaligram, U., Hill, A. V., Mahamar, A., Sanogo, K., Sidibe, Y., Diarra, K., Samassekou, M., Attaher, O., Tapily, A., Diallo, M., Dicko, O. M., Kaya, M., Maguiraga, S. O., Sankare, Y., Yalcouye, H., Diarra, S., Niamele, S. M., Thera, I., Sagara, I., Sylla, M., Dolo, A., Misidai, N., Simando, S., Msami, H., Juma, O., Gutapaka, N., Paul, R., Mswata, S., Sasamalo, I., Johaness, K., Sultan, M., Alexander, A., Kimaro, I., Lwanga, K., Mtungwe, M., Khamis, K., Rugarabam, L., Kalinga, W., Mohammed, M., Kamange, J., Msangi, J., Mwaijande, B., Mtaka, I., Mhapa, M., Mlaganile, T., Mbagi, T., Yerbanga, R. S., Samtoma, W., Sienou, A. A., Kabre, Z., Ouedraogo, W. J. M., Yarbanga, G. A. B., Zongo, I., Savadogo, H., Sanon, J., Compao, J., Kere, I., Yoni, F. L., Sanre, T. M., Ouattara, S. B., Provstgaard-Morys, S., Woods, D., Snow, R. W., Amek, N., Ngetsu, C. J., Ochola-Oyier, L. I., Musyoki, J., Munene, M., Mumba, N., Adetifa, U. J., Muiruri, C. M., Mwawaka, J. S., Mwaganyuma, M. H., Ndichu, M. N., Weya, J. O., Njogu, K., Grant, J., Webster, J., Lakhkar, A., Ido, N. F. A., Traore, O., Tahita, M. C., Bonko, M. d. A., Rouamba, T., Ouedraogo, D. F., Soma, R., Millogo, A., Ouedraogo, E., Sorgho, F., Konate, F., & Valea, I. (2024). Safety and efficacy of malaria vaccine candidate R21/Matrix-M in African children: a multicentre, double-blind, randomised, phase 3 trial. *Lancet*, 403(10426), 533–544.
- Davies, H., Bergmann, B., Walloch, P., Nerlich, C., Hansen, C., Wittlin, S., Spielmann, T., Treeck, M., & Beitz, E. (2023). The *Plasmodium* lactate/H⁺ transporter PfFNT is essential and druggable in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 67(8), e0035623.
- Davis, M. I., Patrick, S. L., Blanding, W. M., Dwivedi, V., Suryadi, J., Golden, J. E., Coussens, N. P., Lee, O. W., Shen, M., Boxer, M. B., Hall, M. D., Sharlow, E. R., Drew, M. E., & Morris, J. C. (2016). Identification of novel *Plasmodium falciparum* hexokinase inhibitors with antiparasitic activity. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60(10), 6023–6033.

- de Lima, P. B. A., Mulder, K. C. L., Melo, N. T. M., Carvalho, L. S., Menino, G. S., Mulinari, E., Castro, V. H., Reis, T. F., Goldman, G. H., Magalhães, B. S., & Parachin, N. S. (2016). Novel homologous lactate transporter improves L-lactic acid production from glycerol in recombinant strains of *Pichia pastoris*. *Microb. Cell Fact.*, 15(1), 158.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., & Michel, H. (1985). Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction center of. *Nature*, 318(6047), 618–624.
- Delic, M., Valli, M., Graf, A. B., Pfeffer, M., Mattanovich, D., & Gasser, B. (2013). The secretory pathway: Exploring yeast diversity. *FEMS Microbiol. Rev.*, 37(6), 872–914.
- Deng, D., Xu, C., Sun, P., Wu, J., Yan, C., Hu, M., & Yan, N. (2014). Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature*, 510(7503), 121–125.
- Deniaud, A., Moiseeva, E., Gordeliy, V., & Pebay-Peyroula, E. (2010). Crystallography of membrane proteins: From crystallization to structure. *Methods Mol. Biol.*, 654, 79–103.
- Denisov, I. G., Grinkova, Y. V., Lazarides, A. A., & Sligar, S. G. (2004). Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer nanodiscs with controlled size. *J. Am. Chem. Soc.*, 126(11), 3477–3487.
- Denisov, I. G. & Sligar, S. G. (2017). Nanodiscs in membrane biochemistry and biophysics. *Chem. Rev.*, 117(6), 4669–4713.
- Denny, P. W. (2018). Yeast: Bridging the gap between phenotypic and biochemical assays for high-throughput screening. *Expert Opin. Drug Discovery*, 13(12), 1153–1160.
- Desai, S. A. (2023). Unique properties of nutrient channels on Plasmodium-infected erythrocytes. *Pathogens*, 12(10), 1211.
- Desai, S. A., Bezrukov, S. M., & Zimmerberg, J. (2000). A voltage-dependent channel involved in nutrient uptake by red blood cells infected with the malaria parasite. *Nature*, 406(6799), 1001–1005.
- Diekmann, Y. & Pereira-Leal, J. B. (2013). Evolution of intracellular compartmentalization. *Biochem. J.*, 449(2), 319–331.
- Dondorp, A. M., Nosten, F., Yi, P., Das, D., Phyto, A. P., Tarning, J., Lwin, K. M., Arie, F., Hanpithakpong, W., Lee, S. J., Ringwald, P., Silamut, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Lim, P., Herdman, T., An, S. S., Yeung, S., Singhasivanon, P., Day, N. P., Lindegardh, N., Socheat, D., & White, N. J. (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N. Engl. J. Med.*, 361(5), 455–467.
- Downie, M. J., Saliba, K. J., Howitt, S. M., Bröer, S., & Kirk, K. (2006). Transport of nucleosides across the *Plasmodium falciparum* parasite plasma membrane has characteristics of PfENT1. *Mol. Microbiol.*, 60(3), 738–748.
- Eckstein-Ludwig, U., Webb, R. J., Van Goethem, I. D., East, J. M., Lee, A. G., Kimura, M., O'Neill, P. M., Bray, P. G., Ward, S. A., & Krishna, S. (2003). Artemisinins target the SERCA of *Plasmodium falciparum*. *Nature*, 424(6951), 957–961.
- Egée, S., Lapaix, F., Decherf, G., Staines, H. M., Ellory, J. C., Doerig, C., & Thomas, S. L. (2002). A stretch-activated anion channel is up-regulated by the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Physiol.*, 542(3), 795–801.
- Elbaz, Y., Steiner-Mordoch, S., Danieli, T., & Schuldiner, S. (2004). In vitro synthesis of fully functional EmrE, a multidrug transporter, and study of its oligomeric state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101(6), 1519–1524.
- Elliot, J. L., Saliba, K. J., & Kirk, K. (2001). Transport of lactate and pyruvate in the intraerythrocytic malaria parasite, *Plasmodium falciparum*. *Biochem. J.*, 355(3), 733–739.
- Elphick, G. F., Querbes, W., Jordan, J. A., Gee, G. V., Eash, S., Manley, K., Dugan, A., Stanifer, M., Bhatnagar, A., Kroeze, W. K., Roth, B. L., & Atwood, W. J. (2004). The human polyomavirus, JCV, uses serotonin receptors to infect cells. *Science*, 306(5700), 1380–1383.
- Endo, Y. & Sawasaki, T. (2006). Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17(4), 373–380.

- Enoki, S., Saeki, K., Maki, K., & Kuwajima, K. (2004). Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein. *Biochemistry*, 43(44), 14238–14248.
- Epalle, N. H. (2023). *Investigating the contribution of substrate collecting antenna to the proton/lactate cotransport (in PfFNT and MCT1)*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Fairhurst, R. M. & Dondorp, A. M. (2016). Artemisinin-resistant Plasmodium falciparum malaria. *Microbiol. Spectrum*, 4(3), E110–0013–2016.
- Fan, X., Wang, J., Zhang, X., Yang, Z., Zhang, J. C., Zhao, L., Peng, H. L., Lei, J., & Wang, H. W. (2019). Single particle cryo-EM reconstruction of 52 kDa streptavidin at 3.2 Angstrom resolution. *Nat. Commun.*, 10(1), 2386.
- Foote, S. J., Thompson, J. K., Cowman, A. F., & Kemp, D. J. (1989). Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of P. falciparum. *Cell*, 57(6), 921–930.
- Frame, I. J., Deniskin, R., Rinderspacher, A., Katz, F., Deng, S. X., Moir, R. D., Adjalley, S. H., Coburn-Flynn, O., Fidock, D. A., Willis, I. M., Landry, D. W., & Akabas, M. H. (2015). Yeast-based high-throughput screen identifies Plasmodium falciparum equilibrative nucleoside transporter 1 inhibitors that kill malaria parasites. *ACS Chem. Biol.*, 10(3), 775–783.
- Fu, D., Libson, A., Miercke, L. J., Weitzman, C., Nollert, P., Krucinski, J., & Stroud, R. M. (2000). Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*, 290(5491), 481–486.
- Gagoski, D., Polinkovsky, M. E., Mureev, S., Kunert, A., Johnston, W., Gambin, Y., & Alexandrov, K. (2016). Performance benchmarking of four cell-free protein expression systems. *Biotechnol. Bioeng.*, 113(2), 292–300.
- Gao, Y., Cao, E., Julius, D., & Cheng, Y. (2016). TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action. *Nature*, 534(7607), 347–351.
- Geistlinger, K., Schmidt, J. D., & Beitz, E. (2023). Human monocarboxylate transporters accept and relay protons via the bound substrate for selectivity and activity at physiological pH. *PNAS Nexus*, 2(2), pgad007.
- Gentles, A. J., Newman, A. M., Liu, C. L., Bratman, S. V., Feng, W., Kim, D., Nair, V. S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C. D., Diehn, M., West, R. B., Plevritis, S. K., & Alizadeh, A. A. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.*, 21(8), 938–945.
- Gewering, T., Janulienė, D., Ries, A. B., & Moeller, A. (2018). Know your detergents: A case study on detergent background in negative stain electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, 203(3), 242–246.
- Gietz, R. D. & Schiestl, R. H. (2007). High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.*, 2(1), 31–34.
- Ginsburg, H., Kutner, S., Krugliak, M., & Ioav Cabantchik, Z. (1985). Characterization of permeation pathways appearing in the host membrane of Plasmodium falciparum infected red blood cells. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 14(3), 313–322.
- Gligorijevic, B., Purdy, K., Elliott, D. A., Cooper, R. A., & Roepe, P. D. (2008). Stage independent chloroquine resistance and chloroquine toxicity revealed via spinning disk confocal microscopy. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 159(1), 7–23.
- Goerke, A. R. & Swartz, J. R. (2008). Development of cell-free protein synthesis platforms for disulfide bonded proteins. *Biotechnol. Bioeng.*, 99(2), 351–367.
- 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(2), e1006172.
- Gong, J., Chen, Y., Pu, F., Sun, P., He, F., Zhang, L., Li, Y., Ma, Z., & Wang, H. (2018). Understanding membrane protein drug targets in computational perspective. *Curr. Drug Targets*, 20(5), 551–564.

- 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(11), 843–848.
- Gschwind, A., Fischer, O. M., & Ullrich, A. (2004). The discovery of receptor tyrosine kinases: Targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, 4(5), 361–370.
- Hagn, F., Nasr, M. L., & Wagner, G. (2018). Assembly of phospholipid nanodiscs of controlled size for structural studies of membrane proteins by NMR. *Nat. Protoc.*, 13(1), 79–98.
- 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.
- Hajek, P. G. (2019). *Expression und Reinigung des plasmodialen Laktattransporters (PffNT) zur Strukturaufklärung*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Halestrap, A. P. (2013). Monocarboxylic acid transporters. *Compr. Physiol.*, 3(4), 1611–1643.
- Halestrap, A. P. & Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: Structure, function and regulation. *Biochem. J.*, 343(2), 281–299.
- Hamilton, S. R., Davidson, R. C., Sethuraman, N., Nett, J. H., Jiang, Y., Rios, S., Bobrowicz, P., Stadheim, T. a., Li, H., Choi, B.-k., Hopkins, D., Wischniewski, H., Roser, J., Mitchell, T., Strawbridge, R. R., Hoopes, J., Wildt, S., & Gerngross, T. U. (2006). Humanization of yeast to produce complex terminally sialylated glycoproteins. *Science*, 313(5792), 1441–1443.
- Hanneschlaeger, C., Horner, A., & Pohl, P. (2019). Intrinsic membrane permeability to small molecules. *Chem. Rev.*, 119(9), 5922–5953.
- Hansen, C. (2019). *Zellfreie Transportproteinsynthese mit Nanodisc-Technologie für Strukturuntersuchungen und phänotypisches Wirkstoffscreening in der Hefe*. Masterarbeit (unveröffentlicht), Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Hansen, M., Kun, F. J., Schultz, J. E., & Beitz, E. (2002). A single, bi-functional aquaglyceroporin in blood-stage Plasmodium falciparum malaria parasites. *J. Biol. Chem.*, 277(7), 4874–4882.
- Hanson, S. R., Culyba, E. K., Hsu, T.-l., Wong, C.-h., Kelly, J. W., & Powers, E. T. (2009). The core trisaccharide of an N-linked glycoprotein intrinsically accelerates folding and enhances stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106(9), 3131–3136.
- Hapuarachchi, S. V., Cobbold, S. A., Shafik, S. H., Dennis, A. S., 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(2), e1006180.
- Harbers, M. (2014). Wheat germ systems for cell-free protein expression. *FEBS Lett.*, 588(17), 2762–2773.
- Harford, S. & Weitzman, P. D. J. (1980). Selection for citrate synthase-deficient mutants with fluoroacetate. *FEBS Lett.*, 114(2), 339–341.
- Hegde, R. S. & Keenan, R. J. (2022). The mechanisms of integral membrane protein biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 23(2), 107–124.
- Helmstetter, F. (2019). *Untersuchung der Abhängigkeit der Funktionalität von Formiat-Nitrit-Transportern vom zentralen Histidin*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- 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(2), 623–631.

- Her, C., Filoti, D. I., McLean, M. A., Sligar, S. G., Alexander Ross, J. B., Steele, H., & Laue, T. M. (2016). The charge properties of phospholipid nanodiscs. *Biophys. J.*, 111(5), 989–998.
- Hering, J., Missel, J. W., Zhang, L., Gunnarsson, A., Castaldo, M., Pedersen, P. A., Ek, M., Gourdon, P., & Snijder, H. J. (2020). The rapid teabag method for high-end purification of membrane proteins. *Sci. Rep.*, 10(1), 16167.
- Hershewe, J., Kightlinger, W., & Jewett, M. C. (2020). Cell-free systems for accelerating glycoprotein expression and biomanufacturing. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 47(11), 977–991.
- Herzik Jr, M. A. (2020). Cryo-electron microscopy reaches atomic resolution. *Nature*, 587(7832), 39–40.
- Herzik Jr, M. A., Wu, M., & Lander, G. C. (2019). High-resolution structure determination of sub-100 kDa complexes using conventional cryo-EM. *Nat. Commun.*, 10(1), 1032.
- Hodgman, C. E. & Jewett, M. C. (2013). Optimized extract preparation methods and reaction conditions for improved yeast cell-free protein synthesis. *Biotechnol. Bioeng.*, 110(10), 2643–2654.
- Holm-Bertelsen, J. (2016). *Expressionssysteme zur Gewinnung von rekombinantem PfFNT zur Reinigung, Funktionsuntersuchung und Kristallisation*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- 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 Expression Purif.*, 126, 109–114.
- Hou, J., Tyo, K., Liu, Z., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2012). Engineering of vesicle trafficking improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.*, 14(2), 120–127.
- Howard, S. P., Estrozi, L. F., Bertrand, Q., Contreras-Martel, C., Strozen, T., Job, V., Martins, A., Fenel, D., Schoehn, G., & Dessen, A. (2019). Structure and assembly of pilotin-dependent and -independent secretins of the type II secretion system. *PLoS Pathog.*, 15(5), e1007731.
- Huang, J., Yuan, Y., Zhao, N., Pu, D., Tang, Q., Zhang, S., Luo, S., Yang, X., Wang, N., Xiao, Y., Zhang, T., Liu, Z., Sakata-Kato, T., Jiang, X., Kato, N., Yan, N., & Yin, H. (2021). Orthosteric–allosteric dual inhibitors of PfHT1 as selective antimalarial agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 118(3), e2017749118.
- Huang, M., Wang, G., Qin, J., Petranovic, D., & Nielsen, J. (2018). Engineering the protein secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* enables improved protein production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 115(47), E11025–E11032.
- Hughes, J. M., Budd, P. M., Grieve, A., Dutta, P., Tiede, K., & Lewis, J. (2015). Highly monodisperse, lanthanide-containing polystyrene nanoparticles as potential standard reference materials for environmental nanofate analysis. *J. Appl. Polym. Sci.*, 132(24), 42061.
- Idiris, A., Tohda, H., Kumagai, H., & Takegawa, K. (2010). Engineering of protein secretion in yeast: Strategies and impact on protein production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86(2), 403–417.
- Inagaki, S., Ghirlando, R., & Grissheimer, R. (2013). Biophysical characterization of membrane proteins in nanodiscs. *Methods*, 59(3), 287–300.
- Ismail, H. M., Barton, V., Phanchana, M., Charoensutthivarakul, S., Wong, M. H., Hemingway, J., Biagini, G. A., O'Neill, P. M., & Ward, S. A. (2016). Artemisinin activity-based probes identify multiple molecular targets within the asexual stage of the malaria parasites *Plasmodium falciparum* 3D7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 113(8), 2080–2085.
- Jaffé, S. R., Strutton, B., Levarski, Z., Pandhal, J., & Wright, P. C. (2014). *Escherichia coli* as a glycoprotein production host: Recent developments and challenges. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 30, 205–210.
- 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(8), 757.

- Janulienė, D. & Moeller, A. (2021). Single-particle cryo-EM of membrane proteins. *Methods Mol. Biol.*, 2302, 153–178.
- Jardetzky, O. (1966). Simple allosteric model for membrane pumps. *Nature*, 211(5052), 969–970.
- Jiang, X., Yuan, Y., Huang, J., Zhang, S., Luo, S., Wang, N., Pu, D., Zhao, N., Tang, Q., Hirata, K., Yang, X., Jiao, Y., Sakata-Kato, T., Wu, J. W., Yan, C., Kato, N., Yin, H., & Yan, N. (2020). Structural basis for blocking sugar uptake into the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Cell*, 183(1), 258–268.e12.
- 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., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., Back, T., Petersen, S., Reiman, D., Clancy, E., Zielinski, M., Steinegger, M., Pacholska, M., Berghammer, T., Bodenstein, S., Silver, D., Vinyals, O., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Kohli, P., & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589.
- Kalipatnapu, S. & Chattopadhyay, A. (2005). Membrane protein solubilization: Recent advances and challenges in solubilization of serotonin1A receptors. *IUBMB Life*, 57(7), 505–512.
- Kampen, K. R. (2011). Membrane proteins: The key players of a cancer cell. *J. Membr. Biol.*, 242(2), 69–74.
- Kasahara, M. & Hinkle, P. C. (1977). Reconstitution and purification of the D-glucose transporter from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 252(20), 7384–7390.
- Kavishe, R. A., Koenderink, J. B., & Alifrangis, M. (2017). Oxidative stress in malaria and artemisinin combination therapy: Pros and cons. *FEBS J.*, 284(16), 2579–2591.
- Kermani, A. A. (2021). A guide to membrane protein X-ray crystallography. *FEBS J.*, 288(20), 5788–5804.
- Kim, D. M. & Swartz, J. R. (2004). Efficient production of a bioactive, multiple disulfide-bonded protein using modified extracts of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.*, 85(2), 122–129.
- Kim, J., Tan, Y. Z., Wicht, K. J., Erramilli, S. K., Dhingra, S. K., Okombo, J., Vendome, J., Hagenah, L. M., Giacometti, S. I., Warren, A. L., Nosol, K., Roepe, P. D., Potter, C. S., Carragher, B., Kossiakoff, A. A., Quick, M., Fidock, D. A., & Mancia, F. (2019). Structure and drug resistance of the *Plasmodium falciparum* transporter PfCRT. *Nature*, 576(7786), 315–320.
- Kimura, M., Yamaguchi, Y., Takada, S., & Tanabe, K. (1993). Cloning of a Ca²⁺-ATPase gene of *Plasmodium falciparum* and comparison with vertebrate Ca²⁺-ATPases. *J. Cell Sci.*, 104(4), 1129–1136.
- Klammt, C., Schwarz, D., Fendler, K., Haase, W., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2005). Evaluation of detergents for the soluble expression of α -helical and β -barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS J.*, 272(23), 6024–6038.
- Köpnick, A.-L. (2021). *Fusion of human monocarboxylate transporter 1 with basigin and expression in S. cerevisiae: Is basigin more than a chaperone?* Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Köpnick, A.-L., Jansen, A., Geistlinger, K., Epalle, N. H., & Beitz, E. (2021). Basigin drives intracellular accumulation of L-lactate by harvesting protons and substrate anions. *PLoS One*, 26(16), e0249110.
- Kotov, V., Bartels, K., Veith, K., Josts, I., Subhramanyam, U. K., 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(1), 10379.
- Kühlbrandt, W. (2014). The resolution revolution. *Science*, 343(6178), 1443–1444.
- Kung, L. A., Tao, S. C., Qian, J., Smith, M. G., Snyder, M., & Zhu, H. (2009). Global analysis of the glycoproteome in *Saccharomyces cerevisiae* reveals new roles for protein glycosylation in eukaryotes. *Mol. Syst. Biol.*, 5, 308.

- Kuruma, Y. & Ueda, T. (2015). The PURE system for the cell-free synthesis of membrane proteins. *Nat. Protoc.*, 10(9), 1328–1344.
- Lambert, R. J. & Stratford, M. (1999). Weak-acid preservatives: Modelling microbial inhibition and response. *J. Appl. Microbiol.*, 86(1), 157–164.
- Laurens, M. B. (2020). RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): An overview. *Hum. Vaccines Immunother.*, 16(3), 480–489.
- Levental, I. & Lyman, E. (2023). Regulation of membrane protein structure and function by their lipid nano-environment. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 24(2), 107–122.
- Li, F., Egea, P. F., Vecchio, A. J., Asial, I., Gupta, M., Paulino, J., Bajaj, R., Dickinson, M. S., Ferguson-Miller, S., Monk, B. C., & Stroud, R. M. (2021). Highlighting membrane protein structure and function: A celebration of the protein data bank. *J. Biol. Chem.*, 296, 100557.
- Li, S. (2022). Detergents and alternatives in cryo-EM studies of membrane proteins. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 54(8), 1049–1056.
- Lin, C. Y., Lee, C. H., Chuang, Y. H., Lee, J. Y., Chiu, Y. Y., Wu Lee, Y. H., Jong, Y. J., Hwang, J. K., Huang, S. H., Chen, L. C., Wu, C. H., Tu, S. H., Ho, Y. S., & Yang, J. M. (2019). Membrane protein-regulated networks across human cancers. *Nat. Commun.*, 10(1), 3131.
- Lipke, P. N. & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: New structure and new challenges. *J. Bacteriol.*, 180(15), 3735–3740.
- Lorber, B., Fischer, F., Bailly, M., Roy, H., & Kern, D. (2012). Protein analysis by dynamic light scattering: Methods and techniques for students. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, 40(6), 372–382.
- Lü, W., Du, J., Schwarzer, N. J., Gerbig-Smentek, E., Einsle, O., & Andrade, S. L. A. (2012a). The formate channel FocA exports the products of mixed-acid fermentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(33), 13254–13259.
- 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(6), 715–727.
- 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(6027), 352–354.
- Lü, W., Schwarzer, N. J., Du, J., Gerbig-Smentek, E., Andrade, S. L. A., & Einsle, O. (2012b). Structural and functional characterization of the nitrite channel NirC from *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 109(45), 18395–18400.
- Lv, X., Liu, H., Ke, M., & Gong, H. (2013). Exploring the pH-dependent substrate transport mechanism of FocA using molecular dynamics simulation. *Biophys. J.*, 105(12), 2714–2723.
- 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(3), e51628.
- Macek, B., Forchhammer, K., Hardouin, J., Weber-Ban, E., Grangeasse, C., & Mijakovic, I. (2019). Protein post-translational modifications in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 17(11), 651–664.
- MacRae, J. I., Dixon, M. W., Dearnley, M. K., Chua, H. H., Chambers, J. M., Kenny, S., Bottova, I., Tilley, L., & McConville, M. J. (2013). Mitochondrial metabolism of sexual and asexual blood stages of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC Biol.*, 11, 67.
- Malhotra, K. & Alder, N. N. (2017). Reconstitution of mitochondrial membrane proteins into nanodiscs by cell-free expression. *Methods Mol. Biol.*, 1567, 155–178.

- 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.
- 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(5948), 1680–1682.
- Matsuda, T., Watanabe, S., & Kigawa, T. (2013). Cell-free synthesis system suitable for disulfide-containing proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 431(2), 296–301.
- McDougal, J. S., Kennedy, M. S., Sligh, J. M., Cort, S. P., Mawle, A., & Nicholson, J. K. (1986). Binding of HTLV-III/LAV to T4⁺ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. *Science*, 231(4736), 382–385.
- Meier, A., Erler, H., & Beitz, E. (2018). Targeting channels and transporters in protozoan parasite infections. *Front. Chem.*, 6, 88.
- Meier, A. L. (2020). *Plasmodiale Formiat-Nitrit-Transporter: Biophysikalische Charakterisierung und Entwicklung eines phänotypischen Wirkstoff-Screenings*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Merk, A., Bartesaghi, A., Banerjee, S., Falconieri, V., Rao, P., Davis, M. I., Pragani, R., Boxer, M. B., Earl, L. A., Milne, J. L. S., & Subramaniam, S. (2016). Breaking cryo-EM resolution barriers to facilitate drug discovery. *Cell*, 165(7), 1698–1707.
- Mikami, S., Kobayashi, T., Masutani, M., Yokoyama, S., & Imataka, H. (2008). A human cell-derived in vitro coupled transcription/translation system optimized for production of recombinant proteins. *Protein Expression Purif.*, 62(2), 190–198.
- Mikami, S., Masutani, M., Sonenberg, N., Yokoyama, S., & Imataka, H. (2006). An efficient mammalian cell-free translation system supplemented with translation factors. *Protein Expression Purif.*, 46(2), 348–357.
- Miles, A. J. & Wallace, B. A. (2016). Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. *Chem. Soc. Rev.*, 45(18), 4859–4872.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., & Steinegger, M. (2022). ColabFold: Making protein folding accessible to all. *Nat. Methods*, 19(6), 679–682.
- Moore, C. M., Hoey, E. M., Trudgett, A., & Timson, D. J. (2011). Artemisinins act through at least two targets in a yeast model. *FEMS Yeast Res.*, 11(2), 233–237.
- Moore, C. M., Wang, J., Lin, Q., Ferreira, P., Avery, M. A., Elokely, K., Staines, H. M., & Krishna, S. (2022). Selective inhibition of *Plasmodium falciparum* ATPase 6 by artemisinins and identification of new classes of inhibitors after expression in yeast. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 66(5), e0207921.
- Morgera, F., Sallah, M. R., Dubuke, M. L., Gandhi, P., Brewer, D. N., Carr, C. M., & Munson, M. (2012). Regulation of exocytosis by the exocyst subunit Sec6 and the SM protein Sec1. *Mol. Biol. Cell*, 23(2), 337–346.
- Mukherjee, M., Vajpai, M., & Sankaramakrishnan, R. (2017). Anion-selective Formate/nitrite transporters: Taxonomic distribution, phylogenetic analysis and subfamily-specific conservation pattern in prokaryotes. *BMC Genomics*, 18(1), 560.
- Müller-Lucks, A. (2012). *Optimierung der zellfreien Proteinsynthese durch Etablierung einer schnellen in-situ Faltungskontrolle mittels GFP-Fusion*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- 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(7), e42186.
- Murata, K., Mitsuoka, K., Hiral, T., Walz, T., Agre, P., Heymann, J. B., Engel, A., & Fujiyoshi, Y. (2000). Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407(6804), 599–605.

- Murray, C. J., Rosenfeld, L. C., Lim, S. S., Andrews, K. G., Foreman, K. J., Haring, D., Fullman, N., Naghavi, M., Lozano, R., & Lopez, A. D. (2012). Global malaria mortality between 1980 and 2010: A systematic analysis. *Lancet*, 379(9814), 413–431.
- Nakane, T., Kotecha, A., Sente, A., McMullan, G., Masiulis, S., Brown, P. M., Grigoras, I. T., Malinauskaite, L., Malinauskas, T., Miehl, J., Uchański, T., Yu, L., Karia, D., Pechnikova, E. V., de Jong, E., Keizer, J., Bischoff, M., McCormack, J., Tiemeijer, P., Hardwick, S. W., Chirgadze, D. Y., Murshudov, G., Aricescu, A. R., & Scheres, S. H. (2020). Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *Nature*, 587(7832), 152–156.
- Nasr, M. L., Baptista, D., Strauss, M., Sun, Z.-Y. J., Grigoriu, S., Huser, S., Plückthun, A., Hagn, F., Walz, T., Hogle, J. M., & Wagner, G. (2017). Covalently circularized nanodiscs for studying membrane proteins and viral entry. *Nat. Methods*, 14(1), 49–52.
- 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. *Pharmaceuticals*, 14(11), 1191.
- Newby, Z. E., O'Connell, J., Robles-Colmenares, Y., Khademi, S., Miercke, L. J., & Stroud, R. M. (2008). Crystal structure of the aquaglyceroporin PfAQP from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 15(6), 619–625.
- Newby, Z. E. R., III, J. D. O., 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. (2009). A general protocol for the crystallization of membrane proteins for X-ray structural investigation. *Nat. Protoc.*, 4(5), 619–637.
- Nguitragool, W., Bokhari, A., Pillai, A., Rayavara, K., Sharma, P., Turpin, B., Aravind, L., & Desai, S. A. (2011). Malaria parasite clag genes determine nutrient uptake channel activity on infected red blood cells. *Cell*, 145(5), 665–677.
- Novick, P., Field, C., & Scheckman, R. (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell*, 21(1), 205–215.
- Ohtsubo, K., & Marth, J. D. (2006). Review glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*, 126(5), 855–867.
- Olafson, K. N., Ketchum, M. A., Rimer, J. D., & Vekilov, P. G. (2015). Mechanisms of hematin crystallization and inhibition by the antimalarial drug chloroquine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112(16), 4946–4951.
- Olotu, A., Fegan, G., Wambua, J., Nyangweso, G., Awuondo, K. O., Leach, A., Lievens, M., Lebouilleux, D., Njuguna, P., Peshu, N., Marsh, K., & Bejon, P. (2013). Four-year efficacy of RTS,S/AS01E and its interaction with malaria exposure. *N. Engl. J. Med.*, 368(12), 1111–1120.
- Oprea, T. I., Bologa, C. G., Brunak, S., Campbell, A., Gan, G. N., Gaulton, A., Gomez, S. M., Guha, R., Hersey, A., Holmes, J., Jadhav, A., Jensen, L. J., Johnson, G. L., Karlson, A., Leach, A. R., Ma'ayan, A., Malovannaya, A., Mani, S., Mathias, S. L., McManus, M. T., Meehan, T. F., Von Mering, C., Muthas, D., Nguyen, D. T., Overington, J. P., Papadatos, G., Qin, J., Reich, C., Roth, B. L., Schürer, S. C., Simeonov, A., Sklar, L. A., Southall, N., Tomita, S., Tudose, I., Ursu, O., Vidović, D., Waller, A., Westergaard, D., Yang, J. J., & Zahoránszky-Köhalmi, G. (2018). Unexplored therapeutic opportunities in the human genome. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 17(5), 317–332.
- Ortiz, D., Guiguemde, W. A., Johnson, A., Elya, C., Anderson, J., Clark, J., Connelly, M., Yang, L., Min, J., Sato, Y., Guy, R. K., & Landfear, S. M. (2015). Identification of selective inhibitors of the *Plasmodium falciparum* hexose transporter PfHT by screening focused libraries of anti-malarial compounds. *PLoS One*, 10(4), e0123598.
- Overington, J. P., Al-Lazikani, B., & Hopkins, A. L. (2006). How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discovery*, 5(12), 993–996.
- Pain, M., Fuller, A. W., Basore, K., Pillai, A. D., Solomon, T., Bokhari, A. A., & Desai, S. A. (2016). Synergistic malaria parasite killing by two types of plasmodial surface anion channel inhibitors. *PLoS One*, 11(2), e0149214.

- Park, C. G., Kim, T. W., Oh, I. S., Song, J. K., & Kim, D. M. (2009). Expression of functional *Candida antarctica* Lipase B in a cell-free protein synthesis system derived from *Escherichia coli*. *Biotechnol. Progr.*, 25(2), 589–593.
- Passarella, S., de Bari, L., Valenti, D., Pizzuto, R., Paventi, G., & Atlante, A. (2008). Mitochondria and L-lactate metabolism. *FEBS Lett.*, 582(25-26), 3569–3576.
- 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(9), e3001386.
- Petersen, L. M. (2021). *Arzneimittelresistenz-assoziierte, protozoische Membranproteine: Untersuchungen zur Struktur und Inhibitorfindung des plasmodialen Chloroquin-Resistenz-Transporters sowie zum Pentamidin-Aufnahmemechanismus über das trypanosomale Aquaglyceroporin 2*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.*, 25(13), 1605–1612.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Meng, E. C., Couch, G. S., Croll, T. I., Morris, J. H., & Ferrin, T. E. (2021). UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. *Protein Sci.*, 30(1), 70–82.
- Postis, V., Rawson, S., Mitchell, J. K., Lee, S. C., Parslow, R. A., Dafforn, T. R., Baldwin, S. A., & Muench, S. P. (2015). The use of SMALPs as a novel membrane protein scaffold for structure study by negative stain electron microscopy. *Biochim. Biophys. Acta*, 1848(2), 496–501.
- Privé, G. G. (2007). Detergents for the stabilization and crystallization of membrane proteins. *Methods*, 41(4), 388–397.
- Promeneur, D., Liu, Y., Maciel, J., Agre, P., King, L. S., & Kumar, N. (2007). Aquaglyceroporin PbAQP during intraerythrocytic development of the malaria parasite *Plasmodium berghei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(7), 2211–2216.
- Proverbio, D., Roos, C., Beyermann, M., Orbán, E., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2013). Functional properties of cell-free expressed human endothelin A and endothelin B receptors in artificial membrane environments. *Biochim. Biophys. Acta*, 1828(9), 2182–2192.
- Prudêncio, M., Derbyshire, E. T., Marques, C. A., Krishna, S., Mota, M. M., & Staines, H. M. (2009). *Plasmodium berghei*-infection induces volume-regulated anion channel-like activity in human hepatoma cells. *Cell. Microbiol.*, 11(10), 1492–1501.
- Punjani, A., Rubinstein, J. L., Fleet, D. J., & Brubaker, M. A. (2017). CryoSPARC: Algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nat. Methods*, 14(3), 290–296.
- Quick, M. & Javitch, J. A. (2007). Monitoring the function of membrane transport proteins in detergent-solubilized form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 104(9), 3603–3608.
- Raphemot, R., Lafuente-Monasterio, M. J., Gamo-Benito, F. J., Clardy, J., & Derbyshire, E. R. (2016). Discovery of dual-stage malaria inhibitors with new targets. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60(3), 1430–1437.
- Rask-Andersen, M., Masuram, S., & Schiöth, H. B. (2014). The druggable genome: Evaluation of drug targets in clinical trials suggests major shifts in molecular class and indication. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 54, 9–26.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., & Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106(6), 1760–1765.
- Renauld, S., Cortes, S., Bersch, B., Henry, X., De Waard, M., & Schaack, B. (2017). Functional reconstitution of cell-free synthesized purified Kv channels. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.*, 1859(12), 2373–2380.
- Roberts, M. J., Bentley, M. D., & Harris, J. M. (2002). Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv. Drug Delivery Rev.*, 54(4), 459–476.

- Roos, C., Zocher, M., Müller, D., Münch, D., Schneider, T., Sahl, H. G., Scholz, F., Wachtveitl, J., Ma, Y., Proverbio, D., Henrich, E., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2012). Characterization of co-translationally formed nanodisc complexes with small multidrug transporters, proteorhodopsin and with the E. coli MraY translocase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1818(12), 3098–3106.
- Rosenberg, R. L. & East, J. E. (1992). Cell-free expression of functional Shaker potassium channels. *Nature*, 360(6400), 166–169.
- Rottmann, M., McNamara, C., Yeung, B. K., Lee, M. C., Zou, B., Russell, B., Seitz, P., Plouffe, D. M., Dharia, N. V., Tan, J., Cohen, S. B., Spencer, K. R., González-Páez, G. E., Lakshminarayana, S. B., Goh, A., Suwanarusk, R., Jegla, T., Schmitt, E. K., Beck, H. P., Brun, R., Nosten, F., Renia, L., Dartois, V., Keller, T. H., Fidock, D. A., Winzeler, E. A., & Diagana, T. T. (2010). Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria. *Science*, 329(5996), 1175–1180.
- Rues, R.-B., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2016). Co-translational formation and pharmacological characterization of beta1-adrenergic receptor/nanodisc complexes with different lipid environments. *Biochim. Biophys. Acta*, 1858(6), 1306–1316.
- Rues, R.-B., Gräwe, A., Henrich, E., & Bernhard, F. (2017). Membrane protein production in E. coli lysates in presence of preassembled nanodiscs. *Methods Mol. Biol.*, 1586, 291–312.
- Ryabova, L. A., Desplancq, D., Spirin, A. S., & Plückthun, A. (1997). Functional antibody production using cell-free translation: Effects of protein disulfide isomerase and chaperones. *Nat. Biotechnol.*, 15(1), 79–84.
- Sachse, R., Dondapati, S. K., Fenz, S. F., Schmidt, T., & Kubick, S. (2014). Membrane protein synthesis in cell-free systems: From bio-mimetic systems to bio-membranes. *FEBS Lett.*, 588(17), 2774–2781.
- 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., Tse, T., Wang, J., Williams, R., Trawick, B. W., Pruitt, K. D., & Sherry, S. T. (2022). Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Res.*, 50(D1), D20–D26.
- Schägger, H. & von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, 199(2), 223–231.
- Schneider, B., Junge, F., Shirokov, V. A., Durst, F., Schwarz, D., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2010). Membrane protein expression in cell-free systems. *Methods Mol. Biol.*, 601, 165–186.
- Schoborg, J. A., Hodgman, C. E., Anderson, M. J., & Jewett, M. C. (2014). Substrate replenishment and byproduct removal improve yeast cell-free protein synthesis. *Biotechnol. J.*, 9(5), 630–640.
- Schwarz, D., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2008). Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *Proteomics*, 8(19), 3933–3946.
- Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frölich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2007a). Preparative scale expression of membrane proteins in Escherichia coli-based continuous exchange cell-free systems. *Nat. Protoc.*, 2(11), 2945–2957.
- Schwarz, D., Klammt, C., Koglin, A., Löhr, F., Schneider, B., Dötsch, V., & Bernhard, F. (2007b). Preparative scale cell-free expression systems: New tools for the large scale preparation of integral membrane proteins for functional and structural studies. *Methods*, 41(4), 355–369.
- Shi, Y. (2013). Common folds and transport mechanisms of secondary active transporters. *Annu. Rev. Biophys.*, 42(1), 51–72.
- Shimizu, Y., Inoue, A., Tomari, Y., Suzuki, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., & Ueda, T. (2001). Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol.*, 19(8), 751–755.

- Shimizu, Y., Kanamori, T., & Ueda, T. (2005). Protein synthesis by pure translation systems. *Methods*, 36(3), 299–304.
- Shinoda, W. (2016). Permeability across lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1858(10), 2254–2265.
- Shirokov, V. A., Kommer, A., Kolb, V. A., & Spirin, A. (2007). Continuous-exchange protein-synthesizing systems. *Methods Mol. Biol.*, 375, 19–55.
- Skach, W. R. (2009). Cellular mechanisms of membrane protein folding. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 16(6), 606–612.
- Skar-Gislinge, N., Johansen, N. T., Højberg-Nielsen, R., & Arleth, L. (2018). Comprehensive study of the self-assembly of phospholipid nanodiscs: What determines their shape and stoichiometry? *Langmuir ACS J. Surfaces Colloids*, 34(42), 12569–12582.
- Sligar, S. G. & Denisov, I. G. (2021). Nanodiscs: A toolkit for membrane protein science. *Protein Sci.*, 30(2), 297–315.
- Soares-Silva, I., Schuller, D., Andrade, R. P., & Assio, F. C. (2003). Functional expression of the lactate permease Jen1p of *Saccharomyces cerevisiae* in *Pichia pastoris*. *Biochem. J.*, 376(3), 781–787.
- Solá, R. J. & Griebenow, K. A. I. (2010). Effects of glycosylation on the stability of protein pharmaceuticals. *J. Pharm. Sci.*, 98(4), 1223–1245.
- Song, J., Almasalmeh, A., Krenc, D., & Beitz, E. (2012). Molar concentrations of sorbitol and polyethylene glycol inhibit the *Plasmodium aquaglyceropori* but not that of *E. coli*: Involvement of the channel vestibules. *Biochim. Biophys. Acta*, 1818(5), 1218–1224.
- Sosa, Y., Deniskin, R., Frame, I. J., Steiginga, M. S., Bandyopadhyay, D., Graybill, T. L., Kallal, L. A., Ouellette, M. T., Pope, A. J., Widdowson, K. L., Young, R. J., & Akabas, M. H. (2019). Identification via a parallel hit progression strategy of improved small molecule inhibitors of the malaria Purine uptake transporter that inhibit *Plasmodium falciparum* parasite proliferation. *ACS Infect. Dis.*, 5(10), 1738–1753.
- Spangenberg, T., Burrows, J. N., Kowalczyk, P., McDonald, S., Wells, T. N., & Willis, P. (2013). The open access malaria box: A drug discovery catalyst for neglected diseases. *PLoS One*, 8(6), e62906.
- Spillman, N. J., Allen, R. J. W., Mcnamara, C. W., Yeung, B. K. S., Winzeler, E. A., Diagana, T. T., & Kirk, K. (2013). Na⁺ regulation in the malaria parasite *Plasmodium falciparum* involves the cation ATPase PfATP4 and is a target of the spiroindolone antimalarials. *Cell Host Microbe*, 13(2), 227–237.
- Spillman, N. J. & Kirk, K. (2015). The malaria parasite cation ATPase PfATP4 and its role in the mechanism of action of a new arsenal of antimalarial drugs. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, 5(3), 149–162.
- Stech, M., Merk, H., Schenk, J. A., Stöcklein, W. F., Wüstenhagen, D. A., Micheel, B., Duschl, C., Bier, F. F., & Kubick, S. (2012). Production of functional antibody fragments in a vesicle-based eukaryotic cell-free translation system. *J. Biotechnol.*, 164(2), 220–231.
- Stech, M., Nikolaeva, O., Thoring, L., Stöcklein, W. F., Wüstenhagen, D. A., Hust, M., Dübel, S., & Kubick, S. (2017). Cell-free synthesis of functional antibodies using a coupled in vitro transcription-Translation system based on CHO cell lysates. *Sci. Rep.*, 7(1), 12030.
- Steffen, J. H., Missel, J. W., Al-Jubair, T., Kitchen, P., Salman, M. M., Bill, R. M., Törnroth-Horsefield, S., & Gourdon, P. (2022). Assessing water permeability of aquaporins in a proteoliposome-based stopped-flow setup. *STAR Protoc.*, 3(2), 101312.
- Stetsenko, A. & Guskov, A. (2017). An overview of the top ten detergents used for membrane protein crystallization. *Crystals*, 7(7), 197.
- Tan, X. F., Bae, C., Stix, R., Fernández-Mariño, A. I., Huffer, K., Chang, T. H., Jiang, J., Faraldo-Gómez, J. D., & Swartz, K. J. (2022). Structure of the Shaker Kv channel and mechanism of slow C-type inactivation. *Sci. Adv.*, 8(11), eabm7814.

- Tang, G., Peng, L., Baldwin, P. R., Mann, D. S., Jiang, W., Rees, I., & Ludtke, S. J. (2007). EMAN2: An extensible image processing suite for electron microscopy. *J. Struct. Biol.*, 157(1), 38–46.
- Tripathi, H., Bhalerao, P., Singh, S., Arya, H., Alotaibi, B. S., Rashid, S., Hasan, M. R., & Bhatt, T. K. (2023). Malaria therapeutics: Are we close enough? *Parasites Vectors*, 16(1), 130.
- Tunyasuvunakool, K., Adler, J., Wu, Z., Green, T., Zielinski, M., Židek, A., Bridgland, A., Cowie, A., Meyer, C., Laydon, A., Velankar, S., Kleywegt, G. J., Bateman, A., Evans, R., Pritzel, A., Figurnov, M., Ronneberger, O., Bates, R., Kohl, S. A., Potapenko, A., Ballard, A. J., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Clancy, E., Reiman, D., Petersen, S., Senior, A. W., Kavukcuoglu, K., Birney, E., Kohli, P., Jumper, J., & Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature*, 596(7873), 590–596.
- Twigg, R. S. (1945). Oxidation-reduction aspects of resazurin. *Nature*, 155, 401–402.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B. M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I. M., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C. A. K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J. O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P. H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J. M., Hamsten, M., Von Feilitzen, K., Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., Von Heijne, G., Nielsen, J., & Pontén, F. (2015). Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 347(6220), 1260419.
- Varki, A. (2007). Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature*, 446(7139), 1023–1029.
- Waight, A. B., Love, J., & Wang, D.-N. (2010). Structure and mechanism of a pentameric formate channel. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 17(1), 37–37.
- Wallin, E. & Von Heijne, G. (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.*, 7(4), 1029–1038.
- Walloch, P. (2021). *Charakterisierung und Inhibition humaner und plasmodialer Lactat-Transporter unter besonderer Berücksichtigung der Pentafluoro-3-hydroxy-pent-2-en-1-one*. Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.
- 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(8), 1283–1289.
- 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(17), 9731–9741.
- Walworth, N. C., Goud, B., Ruohola, H., & Novick, P. J. (1989). Fractionation of yeast organelles. *Methods Cell Biol.*, 31, 335–356.
- Wang, C., Yu, L., Zhang, J., Zhou, Y., Sun, B., Xiao, Q., Zhang, M., Liu, H., Li, J., Li, J., Luo, Y., Xu, J., Lian, Z., Lin, J., Wang, X., Zhang, P., Guo, L., Ren, R., & Deng, D. (2023). Structural basis of the substrate recognition and inhibition mechanism of Plasmodium falciparum nucleoside transporter PfENT1. *Nat. Commun.*, 14(1), 1727.
- Wang, N., Jiang, X., Zhang, S., Wang, N., Jiang, X., Zhang, S., Zhu, A., Yuan, Y., Xu, H., Lei, J., & Yan, C. (2021). Structural basis of human monocarboxylate transporter 1 inhibition by anti-cancer drug candidates. *Cell*, 184(2), 370–383.
- Wang, Y., Huang, Y., Wang, J., Cheng, C., Huang, W., Lu, P., Xu, Y. N., Wang, P., Yan, N., & Shi, Y. (2009). Structure of the formate transporter FocA reveals a pentameric aquaporin-like channel. *Nature*, 462(7272), 467–472.
- Wang, Z., Ye, C., Zhang, X., & Wei, Y. (2015). Cysteine residue is not essential for CPM protein thermal-stability assay. *Anal. Bioanal. Chem.*, 407(13), 3683–3691.

- Wei, M., Lu, L., Sui, W., Liu, Y., Shi, X., & Lv, L. (2018). Inhibition of GLUTs by WZB117 mediates apoptosis in blood-stage Plasmodium parasites by breaking redox balance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 503(2), 1154–1159.
- Wentink, K., Gogou, C., & Meijer, D. H. (2022). Putting on molecular weight: Enabling cryo-EM structure determination of sub-100-kDa proteins. *Curr. Res. Struct. Biol.*, 4, 332–337.
- WHO (2023). *World Malaria Report 2023*. Genf (CH): World Health Organization.
- Wiechert, M. & Beitz, E. (2017a). Formate-nitrite transporters: Monoacids ride the dielectric slide. *Channels*, 11(5), 365–367.
- Wiechert, M. & Beitz, E. (2017b). Mechanism of formate–nitrite transporters by dielectric shift of substrate acidity. *EMBO J.*, 36(7), 949–958.
- Wiechert, M., Erler, H., Golldack, A., & Beitz, E. (2017). A widened substrate selectivity filter of eukaryotic formate-nitrite transporters enables high-level lactate conductance. *FEBS J.*, 284(16), 2663–2673.
- Wildt, S. & Gerngross, T. U. (2005). The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3(2), 119–128.
- Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maclejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, D., Pon, A., Knox, C., & Wilson, M. (2018). DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.*, 46(D1), D1074–D1082.
- Wittig, I., Braun, H.-P., & Schägger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nat. Protoc.*, 1(1), 418–428.
- Woodrow, C. J., Penny, J. I., & Krishna, S. (1999). Intraerythrocytic Plasmodium falciparum expresses a high affinity facilitative hexose transporter. *J. Biol. Chem.*, 274(11), 7272–7277.
- 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⁺ symporter structurally unrelated to human transporters. *Nat. Commun.*, 6, 6284.
- Wuu, J. J. & Swartz, J. R. (2008). High yield cell-free production of integral membrane proteins without refolding or detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, 1778(5), 1237–1250.
- Xia, D., Esser, L., Tang, W. K., Zhou, F., Zhou, Y., Yu, L., & Yu, C. A. (2013). Structural analysis of cytochrome bc₁ complexes: Implications to the mechanism of function. *Biochim. Biophys. Acta*, 1827(11-12), 1278–1294.
- Xu, Q., Ensign, L. M., Boylan, N. J., Schön, A., Gong, X., Yang, J. C., Lamb, N. W., Cai, S., Yu, T., Freire, E., & Hanes, J. (2015). Impact of surface polyethylene glycol (PEG) density on biodegradable nanoparticle transport in mucus ex vivo and distribution in vivo. *ACS Nano*, 9(9), 9217–9227.
- Yang, S.-T., Kreutzberger, A. J., Lee, J., Kiessling, V., & Tamm, L. K. (2016). The role of cholesterol in membrane fusion. *Chem. Phys. Lipids*, 199, 136–143.
- Yin, G. & Swartz, J. R. (2004). Enhancing multiple disulfide bonded protein folding in a cell-free system. *Biotechnol. Bioeng.*, 86(2), 188–195.
- Yip, K. M., Fischer, N., Paknia, E., Chari, A., & Stark, H. (2020). Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM. *Nature*, 587(7832), 157–161.
- Yoshiura, C., Kofuku, Y., Ueda, T., Mase, Y., Yokogawa, M., Osawa, M., Terashima, Y., Matsushima, K., & Shimada, I. (2010). NMR analyses of the interaction between CCR5 and its ligand using functional reconstitution of CCR5 in lipid bilayers. *J. Am. Chem. Soc.*, 132(19), 6768–6777.

- Yu, X. L., Hu, T., Du, J. M., Ding, J. P., Yang, X. M., Zhang, J., Yang, B., Shen, X., Zhang, Z., Zhong, W. D., Wen, N., Jiang, H., Zhu, P., & Chen, Z. N. (2008). Crystal structure of HAb18G/CD147: Implications for immunoglobulin superfamily homophilic adhesion. *J. Biol. Chem.*, 283(26), 18056–18065.
- Zagorska, A. & Jaromin, A. (2023). Antimalarials targeting the malaria parasite cation ATPase *P. falciparum* ATP4 (PfATP4). *Curr. Top. Med. Chem.*, 23(3), 214–226.
- Zhang, L., Liu, W. Q., & Li, J. (2020). Establishing a eukaryotic *Pichia pastoris* cell-free protein synthesis system. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 8, 536.
- Zhang, S., Ren, Q., Novick, S. J., Strutzenberg, T. S., Griffin, P. R., & Bao, H. (2021). One-step construction of circularized nanodiscs using SpyCatcher-SpyTag. *Nat. Commun.*, 12(1), 5451.
- Zhu, L., van der Pluijm, R. W., Kucharski, M., Nayak, S., Tripathi, J., White, N. J., Day, N. P., Faiz, A., Phyo, A. P., Amaratunga, C., Lek, D., Ashley, E. A., Nosten, F., Smithuis, F., Ginsburg, H., von Seidlein, L., Lin, K., Imwong, M., Chotivanich, K., Mayxay, M., Dhorda, M., Nguyen, H. C., Nguyen, T. N. T., Miotto, O., Newton, P. N., Jittamala, P., Tripura, R., Pukrittayakamee, S., Peto, T. J., Hien, T. T., Dondorp, A. M., & Bozdech, Z. (2022). Artemisinin resistance in the malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, originates from its initial transcriptional response. *Commun. Biol.*, 5(1), 274.

Anhang

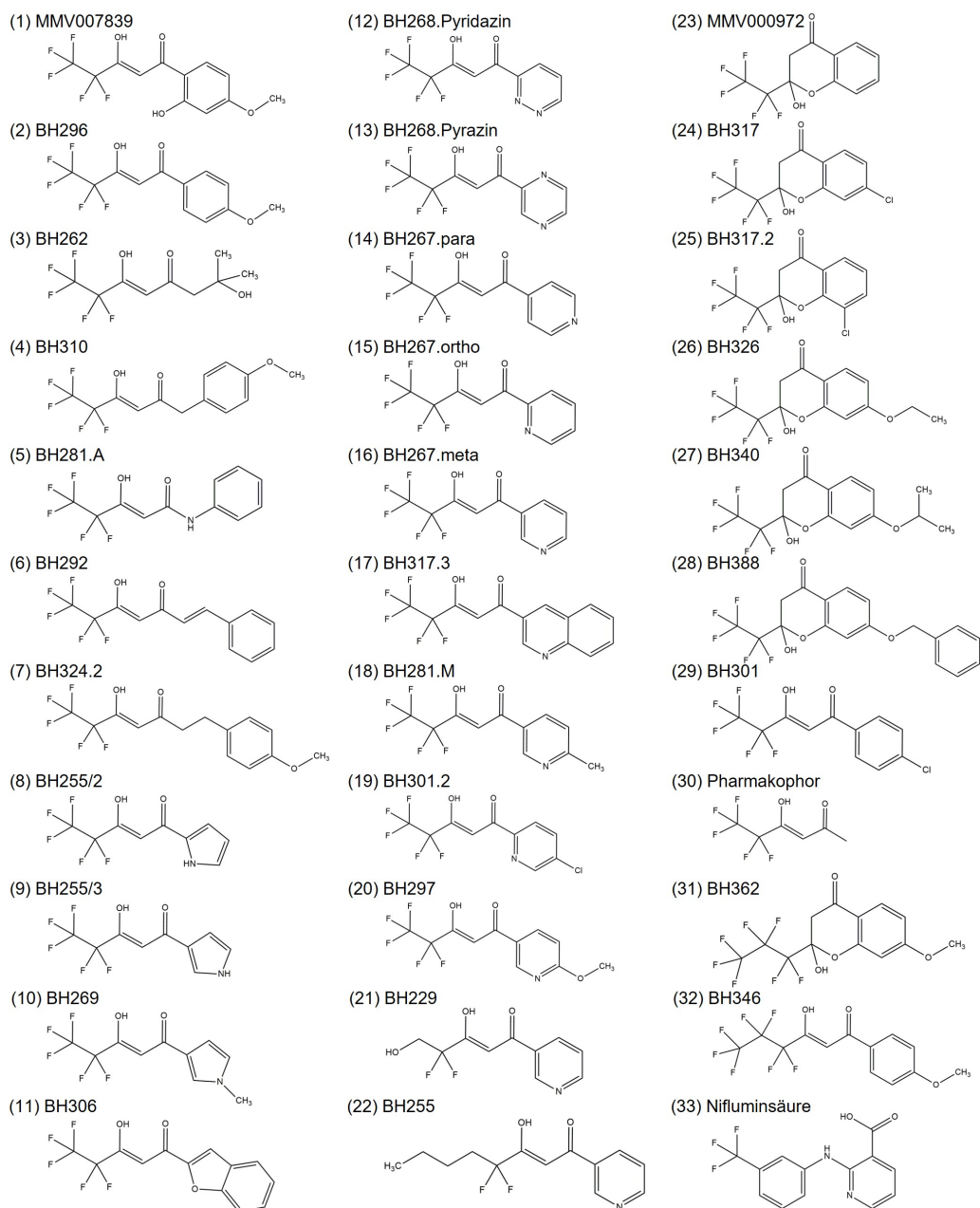


Abb. 6.1: Strukturformeln der im phänotypischen Wirkstoffscreening getesteten Substanzen. Angegeben ist die für das phänotypische Wirkstoffscreening gegen die FNT-Speziesvarianten zugewiesene laufende Nummer sowie die in der Arbeitsgruppe Beitz geführte interne Substanzbezeichnung.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit nach Inhalt und Form selbstständig unter Anleitung meines akademischen Betreuers angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle wörtlichen oder inhaltlichen übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Die vorliegende Dissertation entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Weiterhin versichere ich, dass diese Arbeit noch nicht an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat. Mir wurde noch kein akademischer Grad entzogen.

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen und Posterbeiträgen veröffentlicht:

Publikationen

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(8), 1283-1289.

Davies, H., Bergmann, B., Walloch, P., Nerlich, C., Hansen, C., Wittlin, S., Spielmann, T., Treeck, M. & Beitz, E. (2023). The *Plasmodium* lactate/H⁺ transporter PfFNT is essential and druggable in vivo. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 67(8), e0035623.

Posterbeiträge

Hansen, C. & Beitz, E. (2023). Structure determination of the malaria parasite's lactate transporter mutant PfFNT G107S with bound small molecule inhibitor. 14th EBSA Congress, Stockholm (SE)

Christian Hansen
Kiel, 15.05.2024

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit entstand am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel unter wissenschaftlicher Leitung von Eric Beitz. Eric danke ich für die Bereitstellung des interessanten wie lehrreichen Promotionsthemas, den wissenschaftlich-handwerklichen Austausch mit vielen Denkanstößen sowie den ebenso vertrauensvoll gewährten methodischen Freiraum zur Verfolgung eigener Strategien.

Zudem bedanke ich mich bei allen wissenschaftlichen Kooperationspartnern, mit deren Unterstützung Daten dieser Arbeit erhoben wurden: Jan-Hannes Schäfer und Arne Möller (Elektronenmikroskopie, Osnabrück), Philipp Arnold (Elektronenmikroskopie, Erlangen), Christina Hopf und Axel Scheidig (DLS, Kiel), Joachim Grötzinger (CD-Spektroskopie, Kiel), Frank Bernhard (Nanodiscs, Frankfurt a. M.) sowie Iga Jakobowska und Nathan Epalle für die Etablierung der HEK-Zellkultivierung. Für die grundlegenden Arbeiten am phänotypischen Assay danke ich Anna Mäder. Ich danke weiterhin Annika Jansen, Katharina Geistlinger, Bastian Höger, Moira Möller, Marc Scherwing und Maike Menzel für die gemeinsame Betreuung des 5. Semesterpraktikums. Björn Henke danke ich für die stets sehr hilfsbereite Art und für die gemeinsam mit Anna Fuchs geleistete labortechnische Unterstützung. Für die Problembehandlungen technischer Natur konnte ich mich immer auf Kalle Bock und Dirk Böhme verlassen, vielen Dank euch und allen weiteren helfenden Personen innerhalb des Instituts!

Mein großer Dank gilt insbesondere folgenden Personen in chronologischer Reihenfolge, die meine Promotionszeit - beruflich und privat - sehr bereichert haben: Zunächst danke ich Philipp für die vielen gemeinsamen Unternehmungen während der gesamten Studien- und Promotionszeit und das gewohnt sehr verlässliche und akribische Korrekturlesen meiner Arbeit. Anna-Lena, Basti und Lea danke ich für die nette Aufnahme und den fachlichen Austausch in der ersten Promotionsphase sowie für die Koch- und Spieleabende sowie die vielen weiteren gemeinsamen Unternehmungen. Die läuferischen und nicht-sportlichen Aktivitäten haben mir immer wieder frischen Aufwind gegeben. Unsere $T \rightarrow \pi$ -Gruppe wird mir als Hort sachlich geführter Diskurse in guter Erinnerung bleiben. Für die in ihrer Probezeit durch äußere Umstände herausgeforderte Nervenstärke (Sorry!) danke ich Moira genauso wie für die allvorweihnachtliche Lebkuchenhaus-Großproduktion zur Versorgung des gemeinsamen Gruppen- und Schreibbüros und natürlich für die zeiteffiziente S30-Zellextraktherstellung. Cornelius danke ich für das Korrekturlesen der Arbeit und gemeinsam mit Timo für die allzeit humorvolle Arbeitsatmosphäre. Die lockeren und manchmal wenig ernsthaften Gespräche haben den Arbeitsalltag sehr aufgelockert. An dieser Stelle möchte ich auch allen weiteren Teilnehmern der AK-internen Betriebssportrunden für die im Mittel unfallarmen Trainingseinheiten danken! Ein großer Dank gilt Maike für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie auch für die Mittagspausen-Tortellini-Versorgung. Zudem danke ich dir herzlich für die zahlreichen kulinarischen, sportlichen und sprachwissenschaftlichen Exkurse und für deine sehr angenehme Bürositznachbarschaft.

Liebe Miriam, ich danke dir für die gemeinsame und schöne Zeit sowie deine motivierende Unterstützung und unentbehrliche Ablenkung während der Schreibphase. Damit hast du einen großen Beitrag zum Verfassen dieser Arbeit geleistet! Abschließend und doch nicht zuletzt möchte ich meiner gesamten Familie für die fortwährende Unterstützung danken, die mir meinen Weg zum und durch das Studium sowie bis zum heutigen Tag ermöglicht hat. Danke euch allen!