

Aus dem DFG-Forschungszentrum für Experimentelle Biomedizin / Rudolf-Virchow-Zentrum
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Martin Lohse

**Strukturbiologische Experimente zur Charakterisierung von Rhodesain im Komplex mit
Inhibitoren im Rahmen der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung
gegen den Erreger der Schlafkrankheit**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Matthias Leyh

aus Crailsheim

Würzburg, Dezember 2009

Referentin : Prof. Dr. rer. nat. Caroline Kisker

Koreferent : Priv.-Doz. Dr. med. Peter Langmann

Dekan: Prof. Dr. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 08.03.2010

Der Promovend ist Arzt

**IN LIEBE UND DANKBARKEIT
MEINEN ELTERN KARL UND GERTRUD LEYH
GEWIDMET**

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG

1.1	Die Schlafkrankheit	01
1.2	Strukturbasierte Wirkstoffentwicklung	04
1.3	Cysteinproteasen	06
1.4	Rhodesain	09
1.5	Zielsetzung	10

2. METHODEN

2.1	Molekularbiologische Methoden der Gentechnik	12
2.2	Proteinexpression in der Hefekultur <i>Pichia pastoris</i>	21
2.3	Proteinaufreinigung	22
2.4	Proteincharakterisierung	24
2.4	Kristallisation	26
2.5	Röntgenstrukturanalyse	30

3. MATERIAL

3.1	Mikroorganismen, Kultur- und Induktionsmedien, Medienzusätze	31
3.2	Primer, Vektoren, Enzyme und Antikörper	32
3.3	Chemikalien, Lösungen, Puffer und Kristallisationsscreens	34
3.4	Geräte, Verbrauchsgegenstände, Kits und Chromatographie- materialien	38
3.5	Computersoftware, Datenbanken und Größenstandards	41

4. ERGEBNISSE

4.1	Verifizierung, Konstruktion und Mutation von Plasmiden sowie deren Transfektion	43
4.2	Rhodesain-Überexpression	55
4.3	Rhodesain-Aufreinigung	56,
4.4	Rhodesain-Charakterisierung	60

4.5	Kristallisation	63
4.6	Röntgenaufnahmen	66
5.	DISKUSSION	
5.1	Projektübersicht	68
5.2	Inhibitoren und Rhodesain	74
5.3	Rhodesain im Komplex mit Inhibitor K777 sowie K1102	77
5.4	Zukünftige Perspektiven	80
6.	ZUSAMMENFASSUNG	82
7.	TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS	83
9.	LITERATURVERZEICHNIS	87
8.	ABKÜRZUNGEN, EINHEITEN, AMINOSÄUREN, GENETISCHER CODE	93
10.	DANKSAGUNG	
11.	LEBENS LAUF	

1. EINLEITUNG

1.1 Die Schlafkrankheit

Die als Schlafkrankheit bezeichnete Afrikanische Trypanosomiasis ist eine Parasitose, welche durch Protozoen der Gattung *Trypanosoma* hervorgerufen wird (Simarro et al. 2008). *Trypanosoma brucei gambiense* kommt vor allem in West- und Zentralafrika vor und führt zu einer chronischen Form der Schlafkrankheit, während *Trypanosoma brucei rhodesiense* überwiegend in Ost- und Südafrika vorgefunden wird und die akute Form der Schlafkrankheit verursacht (Garcia et al. 2006). Unbehandelt führen beide Formen durch progressive neurologische Degeneration nahezu immer zum exitus letalis (Maudlin 2006; Checchi and Barrett 2008). Die im subsaharischen Afrika vorkommende Tsetse-Fliege ist einziger Vektor der Übertragung der Schlafkrankheit (Aksoy and Rio 2005).

Im Jahr 2006 lag Schätzungen der Weltgesundheitsorganisation zufolge die Zahl der Fälle Afrikanischer Trypanosomiasis zwischen 50000 und 700000 (WHO 2006). Um die Krankheit einzudämmen sowie die Morbidität und Mortalität zu senken, setzt die Weltgesundheitsorganisation in ihrer Strategie auf die Optimierung der Diagnostik, der Vektorkontrolle sowie der chemotherapeutischen Behandlung (WHO 2005).



Abb. 1.1: *Trypanosoma brucei rhodesiense* im Blutausstrich, Giemsa-Färbung (CDC 1970)

Trypanosoma brucei (Abb. 1.1) ist ein Flagellat, dessen Zelloberfläche von variablen Oberflächenglykoproteinen (VSG) bedeckt ist (Taylor and Rudenko 2006). Durch die Antigenvariation der VSG kann der Erreger im Wirt persistieren und sich vorangegangenen Immunantworten effektiv entziehen (Marcello et al. 2007). Daneben fungieren an VSG gebundene Immunglobuline im Rahmen einer immunevasiven Taktik als molekulare Segel, die durch die hämodynamische Strömung zum Hinterpol des Erregers transportiert und dort endozytiert werden (Engstler et al. 2007). Die Entwicklung eines Impfstoffes erscheint daher bis dato auch eher aussichtslos (Luscher et al. 2007).

Tabelle 1.1: Überblick der im Einsatz befindlichen trypanocidalen Medikamente für Erwachsene (Burri and Brun 2003; Barrett et al. 2007; Médecins-Sans-Frontières 2007).

Medikamente Applikation	Nebenwirkungen¹	Indikation: Spezies	Indikation: Phase
Pentamidinisothionat 4mg/kgKG/d i.m. für 7 – 10 d	Hypoglykämie (Prophylaxe: Glucosegabe vor Injektion)	<i>T. b. gambiense</i>	Hämolympathische Phase
Suramin Langsam i.v. Tag 1: 4-5 mg/kgKG Tag 3, 10, 17, 24, 31: 20mg/kgKG (Tagesdosis max. 1g)	Anaphylaktische Reaktion (Tag 1 ist Testdosis, bei Anaphylaxie Therapieabbruch)	<i>T. b. gambiense + rhodesiense</i>	Hämolympathische Phase
Melarsoprol i.v. über 2 h 100mg/kgKG/6h für 14 d	Reaktive Enzephalopathie (Prophylaxe: Prednisolone p.o. 1mg/kgKG/d)	<i>T. b. gambiense + rhodesiense</i>	Meningoenzephalitische Phase
Eflornithin i.v. über 2 h 100mg/kgKG/6h für 14 d	Diarrhoe, Thrombozytopenie (Nebenwirkungen in der Regel nach Therapieende reversibel)	<i>T. b. gambiense</i>	Meningoenzephalitische Phase

¹ Die Auflistung der Nebenwirkungen gibt nicht die volle Bandbreite der Nebenwirkungen wieder, sondern konzentriert sich auf einzelne, wichtige Nebenwirkungen, die relativ gesehen häufiger auftreten.

Wird der Mensch von einer mit Trypanosomen infizierten Tsetse-Fliege gestochen und der Erreger übertragen, kann sich bereits nach wenigen Tagen im Rahmen einer lokalen inflammatorischen Abwehrreaktion als erstes sichtbares Symptom eine Effloreszenz oder ein Schanker an der Inokulationsstelle bilden (Naessens et al. 2003).

1-3 Wochen nach der Infektion beginnt die hämolympathische Phase, in welcher sich der Erreger im Blut- und lymphatischen System vermehrt. Es treten rezidivierende Fieberschübe,

die ein bis sieben Tage anhalten können, eine generalisierte Lymphadenopathie, Hepatomegalie sowie Splenomegalie auf. Fakultative Begleitsymptome sind generelles Unwohlsein, Anämie, Kopfschmerz, Gewichtsverlust und Abgeschlagenheit (Sternberg 2004). Während die hämolymphatische Phase bei *Trypanosoma brucei gambiense* mehrer Monate bis Jahre andauern kann, geht sie bei einer Infektion mit *Trypanosoma brucei rhodesiense* in der Regel schon nach wenigen Wochen in die meningoenzephalitische Phase, dem Korrelat der Erregerneuroinvasion, über (Barrett et al. 2003). In dieser Phase entwickelt sich eine chronische Enzephalopathie mit komplexen, neuropsychiatrischen Symptomen wie sensorischen und motorischen Störungen sowie einer Fragmentierung des Schlaf-Wach-Rhythmus (Lundkvist et al. 2004). Unbehandelt geht die Erkrankung in die Terminalphase mit Krämpfen, Somnolenz, Gehirnödemen, Koma sowie systemischem Organversagen über und führt schließlich zum Tod (Kennedy 2004).

Zur antitrypanoiden Therapie stehen derzeit 4 Substanzen zur Verfügung (Tab. 1.1), die phasen- und speziesspezifisch eingesetzt werden (Barrett et al. 2007). Infektionen mit *T. b. gambiense* können während der hämolymphatischen Phase mit Pentamidin oder Suramin, in der meningoenzephalitischen Phase mit Melarsoprol oder Eflornithin behandelt werden. Bei Infektionen mit *T. b. rhodesiense* kann in der hämolymphatischen nur auf Suramin und in der meningoenzephalitischen Phase nur auf Melarsoprol zurückgegriffen werden (Denise and Barrett 2001). Die Substanzen Diminazen, Pafuramidinmaleat sowie Nifurtimox, welches in Kombination mit Melarsoprol vielversprechend scheint und von manchen Autoren schon als Second Line Medikament bei der meningoenzephalitischen Phase der *T. b. rhodesiense* Infektion empfohlen wird, werden derzeit noch in klinischen Studien erprobt (Stich et al. 2002; Barrett et al. 2007). Während Pentamidin in der Regel gut vertragen wird, wurde bei der Therapie mit Suramin des öfteren von schwerwiegenden Nebenwirkungen wie unter anderem anaphylaktoiden Reaktionen berichtet (Legros et al. 2002). Für die arsenhaltige Substanz Melarsoprol werden zunehmend Resistenzen beobachtet und an ihrer schwerwiegendsten Nebenwirkung, einer schnell progredienten Enzephalopathie, sterben bis zu 12% der behandelten Patienten (Stich et al. 2003; Robays et al. 2008). Eflornithin wird besser als Melarsoprol vertragen, ist allerdings in der Applikation kompliziert, teuer und nur gegen *T. b. gambiense* effektiv. Die Entwicklung neuer, wirksamer und sicherer Medikamente ist daher von essentieller Bedeutung (Legros et al. 2002; Brun and Balmer 2006).

1.2 Strukturbasierte Wirkstoffentwicklung

Die Arzneimittelforschung trug im letzten Jahrhundert mehr zum Fortschritt der Medizin bei als jeder andere Bereich der Naturwissenschaft. Die Entwicklung erfolgreicher Strategien hierin wurde insbesondere durch eine intensive interdisziplinäre und synergistische Zusammenarbeit mehrerer Fachdisziplinen ermöglicht (Drews 2000).

Während Arzneimittel anfangs hauptsächlich aus Naturstoffen abgeleitet oder aus empirischen Beobachtungen *in vivo* identifiziert wurden (drug discovery), gelang es später durch die Assoziation von bestimmten Molekülen mit spezifischen Krankheiten das Vorgehen zu rationalisieren (drug invention) (Blundell et al. 2006; Vallance and Levick 2007). Letztige Strategie, welche auch als induktives Modell bezeichnet wird, nutzt als Ausgangspunkt eine molekulare Entität (Target), die entweder ursächlich für die Krankheit erscheint oder aber zumindest eine Rolle hierin spielt (Gershell and Atkins 2003). Für infektiologische Erkrankungen werden dabei vor allem Moleküle herausgegriffen, die für die Erreger essentiell sind und bei Inhibition dessen Wachstum hemmen bzw. im Idealfall zu dessen Absterben führen (Gershell and Atkins 2003; List et al. 2007; Tonge et al. 2007). Mit dem humanen und weiteren Genomprojekten stieg die Zahl der möglichen Targets für potenzielle Medikamente enorm (Kramer and Cohen 2004).

Die Fortschritte auf dem Gebiet der Strukturbiologie insbesondere der Magnetischen Kernspinresonanzspektroskopie, der Kristallisationsrobotik, der Röntgenkristallographie sowie der Hochgeschwindigkeitsdatenverarbeitung haben die Möglichkeit geschaffen, die dreidimensionale Struktur dieser Proteine zu bestimmen und sie in der Medikamentenentwicklung einzusetzen (Hunter 1997; Drews 2000). Sie tragen dazu bei, Entitäten zu identifizieren und zu beurteilen (target selection), ein dazu passendes, potenzielles Medikament zu ermitteln (lead discovery) sowie ein potenzielles Medikament in Bezug auf Selektivität, Affinität und Stabilität zu optimieren (lead development) (van Dongen et al. 2002; Datta and Grant 2004; Blundell et al. 2006). Im Rahmen der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung (Structure-based Drug Design, SBDD) wird dabei meist mehrmals der SBDD-Zyklus aus Strukturgewinnung, Strukturanalyse, Wirkstoffsynthese und Wirkstofftestung (Abb. 1.2) durchlaufen (Rowland 2002).

Eine der herausragendsten Erfolgsgeschichten der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung stellen zweifellos die Proteaseinhibitoren in der antiretroviralen Therapie des Humanen

Immundefizienzvirus (HIV) dar (De Clercq 2007; Volarath et al. 2007). So konnte bereits 12 Jahre nachdem das Virus zum ersten Mal isoliert und beschrieben wurde, der erste HIV-1 Proteaseinhibitor von der FDA zugelassen werden (Barre-Sinoussi et al. 1983; Tavel 2000).

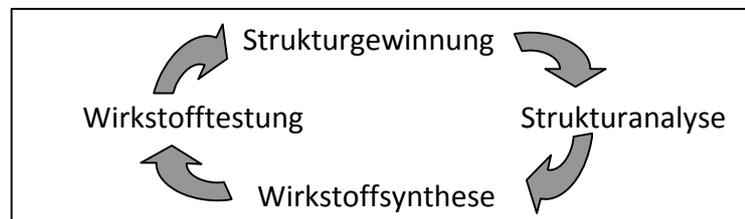


Abb. 1.2: Structure-based Drug Design Zyklus (Rowland 2002).

Während für die derzeitig zugelassenen HIV Medikamente, darunter 10 strukturbasierte Proteaseinhibitoren, ein großer und lukrativer Markt existiert und damit die Entwicklung und Forschung auf diesem Gebiet schon allein aus pekuniären Gründen weiter vorangetrieben wird, besteht nur wenig Interesse, Medikamente gegen vernachlässigte Krankheiten (neglected diseases) wie die Schlafkrankheit zu entwickeln, da diese fast ausschließlich in armen, tropischen Ländern vorkommen, welche aufgrund fehlender Kaufkraft keine finanziellen Anreize zur Durchführung komplexer Arzneimittelforschung bieten können (Wlodawer and Vondrasek 1998; Pecoul 2004; Flexner 2007).

Dessen ungeachtet wurden bereits mehrere Targetproteine zur Entwicklung von Medikamenten gegen die Erreger der Schlafkrankheit identifiziert, darunter die Trypanothion Reduktase (Linares et al. 2006), eine Dihydrofolat-reduktase (Then 2004) sowie die Cysteinprotease Rhodesain (Du et al. 2000; Werbovetz 2000). Um die Erkenntnisse dieser theoretischen Grundlagenforschung in die praktische Medikamentenentwicklung zu portieren und um andererseits die in Entwicklung befindlichen Medikamente gegen vernachlässigte Krankheiten voranzubringen, haben sich öffentlich-private Partnerschaften (public-private partnerships for product development, PD PPP) wie die *Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDI)* gebildet (Pecoul 2004; Croft 2005). An diesem Prozess zu partizipieren und die Medikamentenentwicklung gegen vernachlässigte Krankheiten wie die Schlafkrankheit zum Erfolg zu führen, liegt indes auch in der Hand der Wissenschaftler akademischer Einrichtungen (Denise and Barrett 2001).

1.3 Cysteinproteasen

Proteasen katalysieren die Hydrolyse von Peptidbindungen und spielen in vielen physiologisch und pathologisch relevanten Prozessen sowie Erregern eine essentielle Rolle (Merops 2008). Sie werden zum einen in der Enzymnomenklatur der International Union of Biochemistry and Molecular Biology nach der Reaktion der Katalyse klassifiziert und mit einer EC-Nummer versehen (IUMBM 2008). Zum anderen werden sie in der MEROPS Datenbank nach ihrer molekularen Struktur und Homologie in bisher 50 Stämme (Clans), 196 Familien mit 90 Subfamilien und über 1800 einzelne Peptidasen eingeteilt. Die Nomenklatur hierfür setzt sich aus der Abkürzung des katalytischen Typs der Protease (S = Serinprotease, C = Cysteinprotease, T = Threoninprotease, A = Aspartatprotease, G = Glutaminprotease, M = Metalloprotease, U = unbekannter katalytischer Typ) sowie weiteren arbiträren Buchstaben und / oder Zahlen zusammen (Merops 2008; Rawlings et al. 2008).

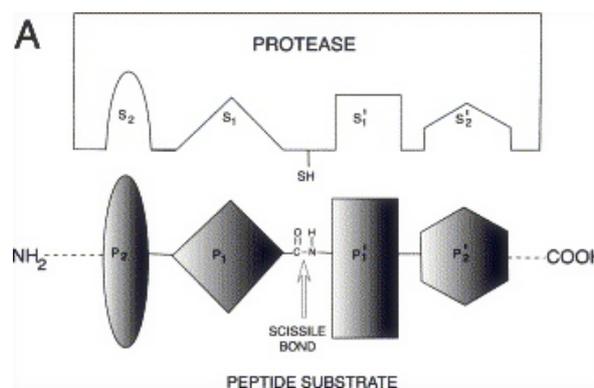


Abb. 1.3: Terminologie und Schema der Peptid-Substrat-Interaktion am Beispiel der Cysteinprotease (Sajid and McKerrow 2002)

Um von der Protease geschnitten zu werden, muss das Protein im aktiven Zentrum binden, wobei insbesondere die Aminosäuren rechts und links der Spaltstelle eine tragende Rolle einnehmen (Sajid and McKerrow 2002). In Richtung des N-Terminus werden die Aminosäuren und korrespondierenden Bindungstaschen ausgehend von der Schnittstelle als $P_1 - P_x$ bzw. $S_1 - S_x$, in Richtung des C-Terminus als $P_1' - P_x'$ bzw. $S_1' - S_x'$ bezeichnet (Abb. 1.3) (Schechter and Berger 1967).

Die katalytische Aktivität der Cysteinproteasen ergibt sich aus dem Zusammenspiel eines katalytischen Histidin- und Cysteinrests (Abb. 1.4). Cystein und Histidin bilden dabei ein präkatalytisches Ionenpaar, welches durch einen Protonentransfer von der Thiolgruppe des

Cysteins auf den Stickstoff des Histidins gebildet wird. Durch den Angriff des nukleophilen Thiolats auf den Carbonyl-Kohlenstoff der zu spaltenden Peptidbindung bildet sich ein tetraedrisches Intermediat (Abb. 1.4 A/B). Das Histidin rotiert daraufhin und ermöglicht einen Protonentransfer von dessen Imidazolring auf den Stickstoff der Peptidbindung. Es bildet sich ein acyliertes Enzym und ein C-terminales Substratstück wird abgespalten (Abb. 1.4 B/C). Anschließend attackiert ein Wassermolekül den Carbonyl-Kohlenstoff der Thioesterbindung, wodurch ein sekundärer tetraedrischer Übergangszustand hergestellt und das N-terminale Substratstück abgespalten wird. Das Enzym liegt damit wieder regeneriert und aktiv vor (Fig. 1.4 D-F) (Otto and Schirmeister 1997; Rzychon et al. 2004).

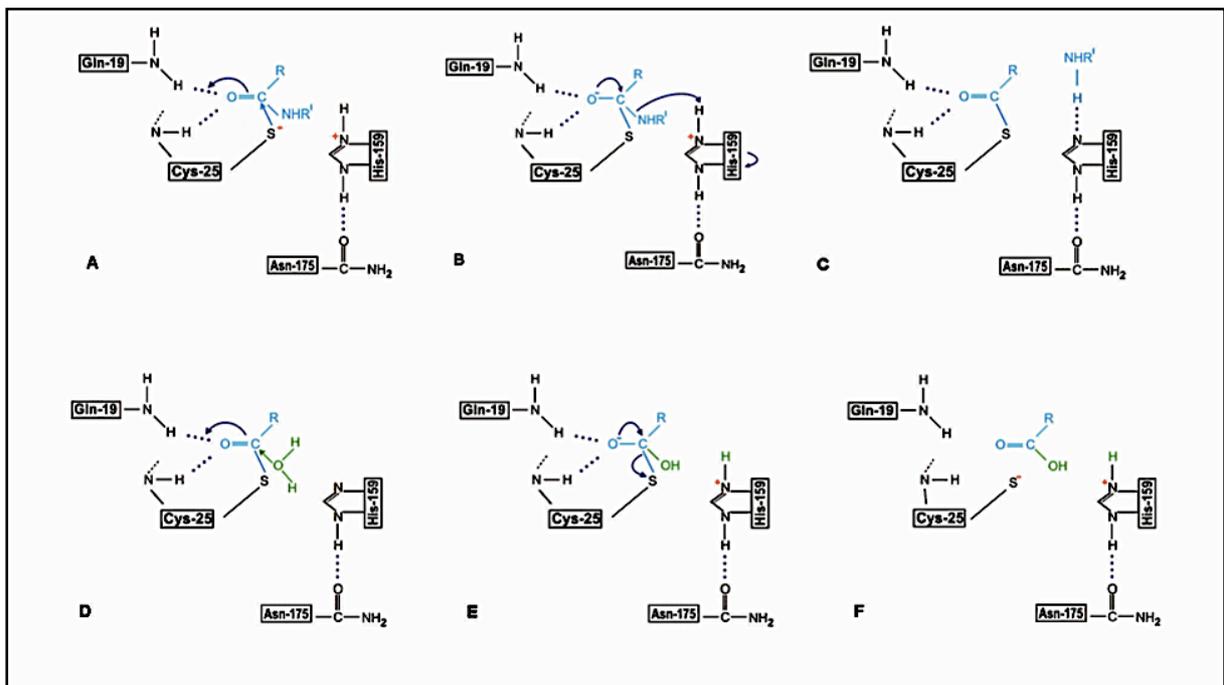
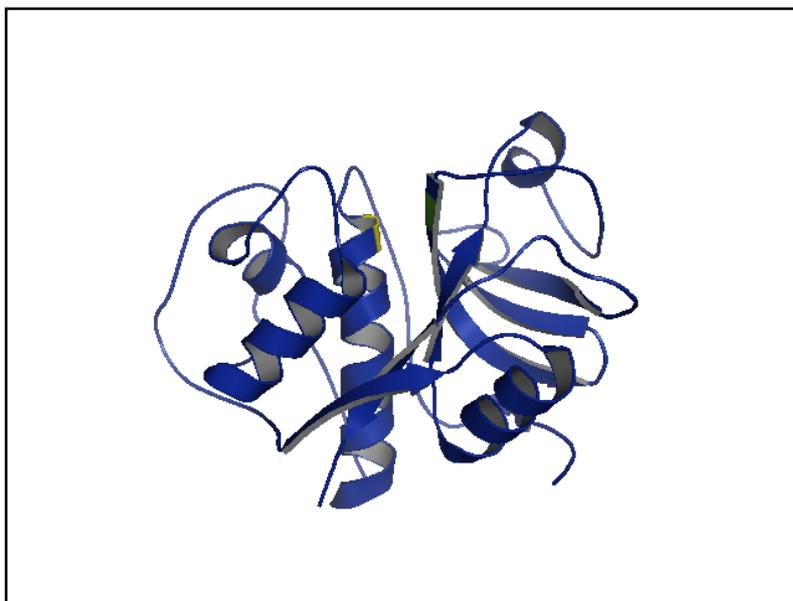


Abb. 1.4: Katalytischer Mechanismus der Cysteinproteasen am Beispiel von Papain aus *Carica Papaya* (Rzychon et al. 2004). Die Aminosäuren des Papain sind schwarz, das zu spaltende Enzym ist blau und Wasser grün dargestellt. A: Histidin und Cystein als präkatalytisches Ionenpaar. B: Primäres tetraedrisches Intermediat. C: Acyliertes Enzym und abgespaltenes C-terminales Substratbruchstück. D: Acyliertes Enzym und nukleophiler Angriff von Wasser. E: Sekundäres tetraedrisches Intermediat. F: Regeneriertes, freies Enzym und abgespaltenes N-terminales Substratbruchstück.

Die Protease Papain (C01.001) aus der Frucht der *Carica papaya* ist der Prototyp der Cysteinproteasen-Familie C1A des Clans CA, zu der unter anderem einige humane sowie auch parasitäre Cysteinproteasen gehören (Berti and Storer 1995; Merops 2008). Zum Teil sind diese Proteine vielversprechende Kandidaten zur strukturbasierten Wirkstoffentwicklung von Chemotherapeutika gegen Osteoporose, Tumoren, rheumatoide Arthritis oder Atherosklerose, bei welchen eine Überexpression bzw. gesteigerte Aktivität von

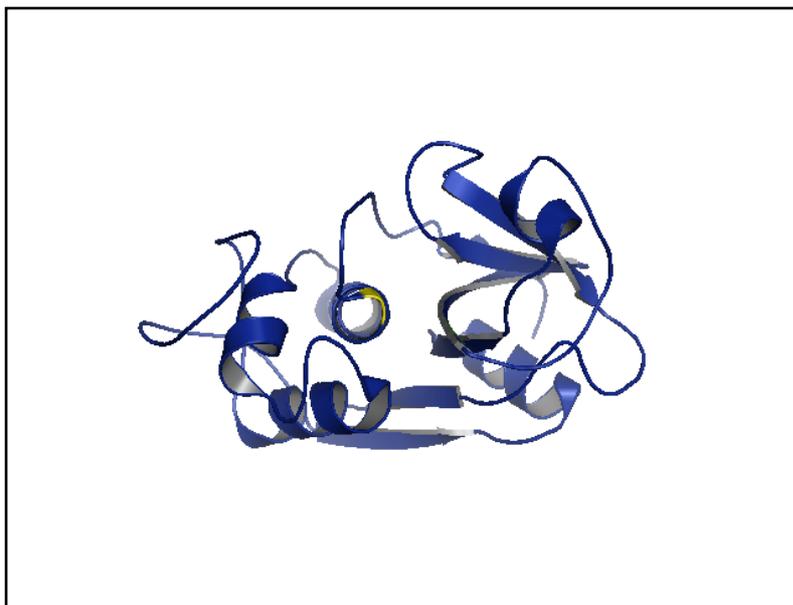
Cysteinproteasen postuliert wird, sowie von Antiparasitika (Lecaille et al. 2002; Mittl and Grutter 2006).

Papain aus *Carica papaya* ist ein Monomer, das 212 Aminosäuren enthält und ein Molekulargewicht von 23.35 kDa besitzt (Abb. 1.5). Es setzt sich aus zwei Domänen, L (Aminosäuren 10-111 und 208-212) und R (Aminosäuren 1-9 und 112-207), vergleichbarer Größe zusammen, die an ihrer Grenzfläche eine Fuge bilden, welche das aktive Zentrum beinhaltet. Drei α -Helices dominieren die L Domäne, während die R Domäne von β -Faltblättern geprägt ist. Das katalytische Cystein, Cys25, ist in der L Domäne am N-terminalen Ende der längsten α -Helix lokalisiert. Das katalytische His158 ist direkt gegenüber in einem β -Faltblatt der anderen Domäne positioniert (Kamphuis et al. 1984).



C

A



B

Abb. 1.5: Struktur von Papain bei einer Auflösung von 1.65 Å (PDB-ID:9PAP; Kamphuis et al. 1984), dargestellt mit PyMOL (DeLano 2002). α -Helices werden als Spiralen und β -Faltblattstränge als Pfeile dargestellt. A/B: Das Papainmolekül ist blau abgebildet. His158 ist grün und Cys25 gelb markiert. In B liegt das Molekül relativ zu A um 90° vertikal rotiert vor. C: His158 und Cys25 ist vergrößert abgebildet. Kohlenstoffatome sind rosa, Stickstoffatome blau und Schwefelatome gelb dargestellt.

CA1 Cysteinproteasen werden *in vivo* in der Regel mit einem N-terminalen Propeptid exprimiert, welches in umgekehrter Richtung im Vergleich zum Substrat in die Fuge hineinreicht, das aktive Zentrum verdeckt und das Enzym ohne selbst geschnitten zu werden inhibiert (Abb. 1.6). Erst nach Abspaltung des Propeptids durch andere Proteasen oder durch Autokatalyse bei saurem pH wird das Enzym aktiv (Turk et al. 2001; Wiederanders 2003).

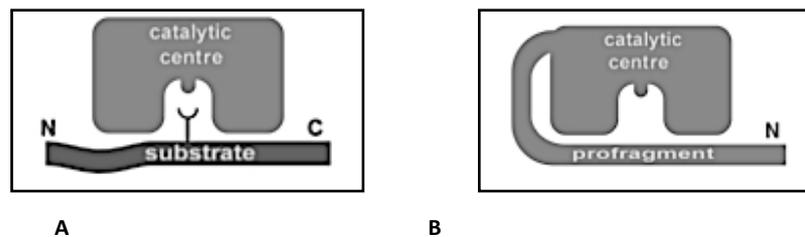


Abb. 1.6: Darstellung des Inhibitionsmechanismus des Propeptids (Rzychon et al. 2004). A: Mechanismus der Substratbindung. B: Nicht-kovalente Inhibition durch das rückwärts gebundene Propeptid.

1.4 Rhodesain

Die Cysteinprotease Rhodesain (C01.072) wurde als Target-Molekül zur Entwicklung trypanocidaler Medikamente identifiziert (Du et al. 2000). Im Gegensatz zu mehrzelligen Parasiten, bei denen Cysteinproteasen vor allem als extrazelluläre Enzyme fungieren, ist bei dem primitiven Parasiten *Trypanosoma brucei rhodesiense* das Enzym Rhodesain vor allem in den Lysosomen lokalisiert, wo es für einen Großteil der enzymatischen Aktivität zur Proteindegradation von wahrscheinlich sowohl eigenen als auch phagozytierten Wirtsproteinen verantwortlich ist (Caffrey et al. 2001; Wiederanders 2003). Cysteinproteaseinhibitoren führten im Versuch mit *Trypanosoma brucei brucei* zum Absterben des Erregers (Troeborg et al. 1999).

Im März 2008 wurde die Kristallstruktur von Rhodesain mit dem Inhibitor K777 (PDB-ID:2p7u), im April mit dem Inhibitor K11002 (PDB-ID:2p86) in der Proteindatenbank PDB hinterlegt (Abb. 1.7). Ausführliche Publikationen in Zeitschriften stehen hierzu noch aus. Die dreidimensionale Struktur von Rhodesain ist dem Papain ähnlich. Cys25 und His162 bilden das katalytische Paar.

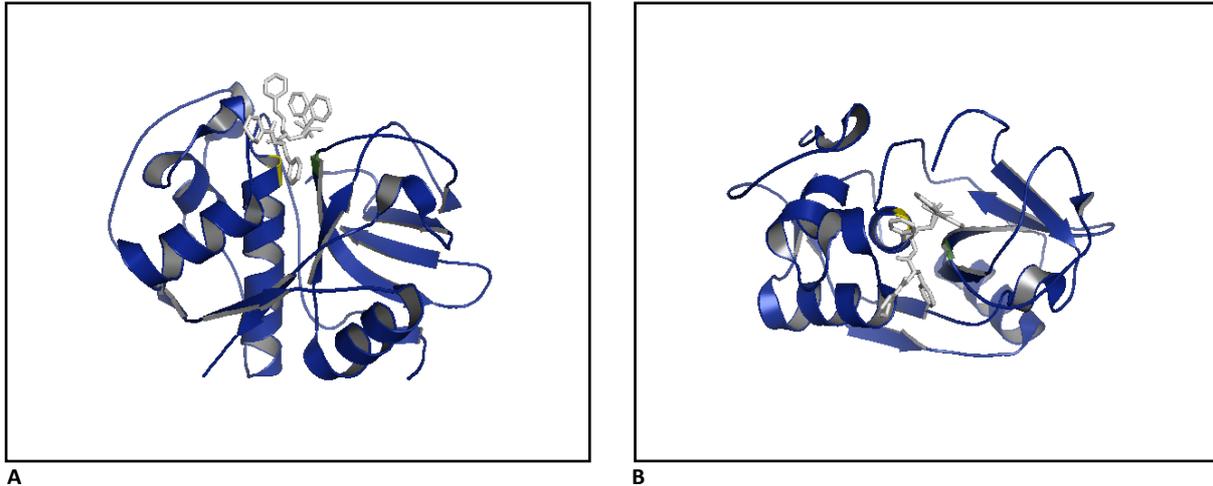


Abb. 1.7: Struktur des Rhodesains mit Inhibitor K11002 bei einer Auflösung von 1.16 Å (PDB-ID:2p86), dargestellt mit PyMOL (DeLano 2002). Rhodesain ist in blau, der Inhibitor in weiß dargestellt. Cys25 ist gelb und His162 grün markiert. In B wurde das Molekül im Vergleich zu der Abbildung A um 90° vertikal rotiert.

Es wurden bereits mehrere Inhibitoren gegen Rhodesain identifiziert und synthetisiert, welche in *in vivo* Experimenten weiter getestet und gegebenenfalls zur Optimierung und für den praktischen Medikamenteneinsatz modifiziert werden müssen (Nkemgu et al. 2003; Fujii et al. 2005; Vicik et al. 2006; Mallari et al. 2008).

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte im Rahmen der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung die Reinigung des rekombinanten Rhodesains optimiert werden, um über ausreichende Mengen des Proteins für funktionelle und strukturelle Analysen verfügen zu können. Es sollten außerdem geeignete Kristallisationsbedingungen für das Protein in Abwesenheit und in Gegenwart von Inhibitoren identifiziert werden.

Die Arbeit wurde in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Schirmeister (Institut für Pharmazie, Universität Würzburg) durchgeführt und durch den Sonderforschungsbereich 630 „Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten“ der Universität Würzburg unterstützt. Ausgangspunkt war ein Konstrukt zur Expression von Rhodesain aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Conor Caffrey (Sandler Center for Basic Research of Parasitic Diseases, Universität Californien, USA).

Die strukturbasierte Wirkstoffentwicklung gegen die afrikanische Trypanosomiasis ist derzeit ein brisantes Gebiet der Wissenschaft, an dem mehrere international tätige Arbeitsgruppen akademischer Einrichtungen unter Hochdruck arbeiten (Vicik et al. 2006; Gonzalez et al. 2007; Kanaji et al. 2007; Chen et al. 2008; Jaishankar et al. 2008; Mallari et al. 2008).

Der Anspruch dieser Arbeit ist, die wissenschaftlichen Experimente und Erkenntnisse, die in dem Zeitraum von Dezember 2006 bis Dezember 2007 im Labor gewonnen wurden, darzulegen. Die schriftliche, hier vorliegende Arbeit wurde im Mai 2009 fertiggestellt sowie den Referenten zur Korrektur und dem Labor zur Ansicht überlassen. Die Literatur, auf die sich diese Arbeit bezieht, ist auf dem Stand vom 1. April 2009.

2. METHODEN

2.1 Molekularbiologische Methoden der Gentechnik

Amplifikation von Plasmid-DNA durch Transformation

Das Einschleusen freier Plasmid-DNA in Bakterien wird als Transformation bezeichnet und wurde zur Amplifikation der Plasmide ETM-11 und pPICZalphaB durchgeführt. Rezeptives Bakterium war chemisch kompetentes *E. coli* DH5 α .

Plasmid und kompetente Zellen wurden langsam von -20 °C auf 4°C aufgetaut und zusammen im Verhältnis 1:100 (1 μ l Plasmid + 100 μ l kompetente Zellen) für 15min auf Eis inkubiert. In einem als Hitzeschock bezeichneten Schritt wurde die Suspension 2 min bei 42°C gehalten und anschließend für 2 min auf Eis gelegt. 1 ml LowSalt LB Medium (ohne Antibiotikum) wurde dazugegeben und die Suspension 1 h bei 37°C und 600 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden bei 4000 rpm abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 μ l Low-Salt LB Medium (wiederum ohne Antibiotikum) aufgenommen und auf Low-Salt LB Agar mit Antibiotikum (Zeocin für pPICZalphaB, Kanamycin für ETM-11) ausplattiert. Lichtgeschützt wurden die Agarplatten bei 37°C über Nacht inkubiert und bei Koloniewachstum zur weiteren Aufbewahrung und Hemmung der Replikation bei +4°C gelagert.

Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Zur Gewinnung der Plasmid-DNA aus *E. coli* DH5 α wurde das Nucleo-Bond®-Kit von Macherey-Nagel verwendet und gemäß dem *Plasmid Purification User Manual* desselben vorgegangen. Um für die zur Elektroporation relativ große Menge an Plasmid-DNA zu erhalten, wurden die Mengenangaben entsprechend dem im Manual enthaltenen *High-copy plasmid purification Maxi* Protokoll befolgt.

Eine Kolonie der transformierten Bakterien von der Agarplatte wurde in 200 ml Low-Salt-Medium mit Zeocin gegeben und bei 200 rpm und 37°C über Nacht geschüttelt. Anschließend wurde die Kultur bei 6000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Zur Lyse der Zellen wurde das Zellpellet in 12 ml S1-Puffer + RNase-A resuspendiert, die Suspension nach Zugabe von 12 ml S2-Puffer durch 7-maliges Wenden des Behälters vorsichtig gemischt, für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und 12 ml 4°C

kalter S3-Puffer zugegeben. Der Behälter wurde wiederum durch mehrmaliges Wenden gemischt bis eine homogene Suspension mit weißen Flocken entstand und anschließend für 5 min auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde mit einem Nukleobond®-Filter, angefeuchtet mit N2-Puffer, gereinigt und der Durchfluss auf eine mit 6 ml N2-Puffer äquilibrierten Nukleobond® AX500 Säule gegeben, um Plasmid-DNA an die Säule zu binden. Mit 32 ml N3-Puffer wurde die Säule gewaschen und die Plasmid-DNA mit 15 ml N5-Puffer eluiert. Um die Plasmid-DNA zu fällen, wurde 11 ml Isopropanol zugegeben, vorsichtig gemischt, bei 15000 g und 4°C 30 min zentrifugiert und anschließend der Überstand vorsichtig verworfen. Um die DNA zu waschen, wurden 5 ml 70%iges Ethanol auf das Pellet gegeben, die Suspension kurz gemischt, und bei 15000 g und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert. Das Ethanol wurde mit einer Pipettenspitze vorsichtig vom Pellet entfernt, welches dann bei Raumtemperatur für mindestens 15 min getrocknet wurde. 50 µl deionisiertes, steriles Wasser wurden auf das Pellet gegeben und das Gefäß so lange (>1h) auf einem 3D-Schüttler bewegt, bis sich das Pellet vollständig gelöst hatte.

UV-Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Das Spektrophotometer misst die UV-Absorption einer Lösung in einer Kuvette mit vorgegebenem Durchmesser. Mit dem Agilent 8453 Spectrophotometer sowie dem NanoDrop® Spectrophotometer (erforderliche DNA-Menge: 1µl) konnte bei einer Absorption von 260 nm und der Absorption des reinen Lösungsmittels als Referenzwert mittels integrierter Standardkurve die DNA-Konzentration nach dem Lambert-Beerschen Gesetz berechnet werden.

Analyse der DNA durch Sequenzierung

Die Bestimmung der DNA-Sequenz erfolgte durch ein Kettenabbruchverfahren, bei dem die DNA mittels der Technik der Polymerase-Kettenreaktion und Fluoreszenzfarbstoff markierten Didesoxynukleosidtriphosphaten in unterschiedlich lange DNA-Fragmente zerlegt wird. Die Didesoxynukleosidtriphosphate führen zum Abbruch der DNA-Synthese, emittieren nach Anregung Licht einer für das Nukleotid spezifischen Wellenlänge und erlauben somit nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente, die Identifikation der Nukleotidreihenfolge in der DNA-Sequenz.

Die Primer wurden mit Hilfe des Programms FastPCR konzipiert und bei Biomers bestellt. Der PCR-Ansatz (5 µl) bestand aus 2 µl (1,2µl/ml) Template, 1 µl (5 pmol) Primer, 1 µl BDT (1/8 Verdünnung) sowie 1 µl 2.5x Sequenzierungspuffer (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1). Die PCR-Einstellung war wie folgt: 1 min Hitzeschock bei 96°C, anschließend 30 Zyklen zu je 20 sec Denaturierungsphase bei 96°C, 15 sec Annealing-Phase bei geeigneter Temperatur (je nach Primer) und 4 min Extensionsphase bei 60°C. Anschließend wurde die Probe bei 4°C gelagert.

Die empfohlene Temperatur während der Annealing-Phase lag 5° unterhalb der Schmelztemperatur T_M der Primer. Diese berechnete sich für Oligonukleotide mit weniger als 14 Basen aus: $T_M = 4^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl der G und C im Primer}) + 2^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl der A und T im Primer})$. Für Oligonukleotide mit mehr als 14 Basen, errechnete sich die Schmelztemperatur wie folgt: $T_M = 64.9^\circ\text{C} + 41^\circ\text{C} \times (\text{Anzahl der G und C Basen im Primer} - 16.4) / \text{Gesamtanzahl der Nukleotide}$.

Die weitere Sequenzierung übernahm das Institut für Virologie der Universität Würzburg. Die Proben mussten hierfür in für die jeweilige Arbeitsgruppe vorgesehene Behälter in den Kühlschrank vor Zimmer 102 gestellt, durchnummeriert und signiert sowie in einer Liste am Kühlschrank dokumentiert werden, anzukreuzen war „V1.1“ und „BigDye“.

Die zugesante Sequenz wurde mit dem Programm 4 Peaks bearbeitet und mit den Programmen CLC Free Work Bench 3 und GENTle analysiert. Mit 4Peaks wurde der Anfang und das Ende der Sequenz, welche keine eindeutig zu identifizierende Analyse erlauben, weggeschnitten und die gesamte, automatisch erstellte Übersetzung der Signale in den Code der Nukleotide überprüft. Mittels CLC Free Work Bench 3 und GENTle wurde die Sequenz mit einer Referenzsequenz verglichen.

DNA-Analyse durch Agarose-Gelelektrophorese und Färbung

Unterschiedliche DNA-Stücke können elektrophoretisch aufgetrennt und im Vergleich zu einer Referenz-DNA-Probe ihrer groben Größe und Konformation (linear, zirkulär) nach identifiziert werden. Als Trägermaterial dient ein Gel aus TBE, Ethidiumbromid und Agarose, in dem letzteres als Siebstruktur fungiert. Je höher die Konzentration an Agarose, desto feiner das Sieb, durch das bei Anlegen einer elektrischen Spannung die DNA-Proben unterschiedlich schnell wandern können. Das Ethidiumbromid interkaliert mit der DNA, welches dabei seine Fluoreszenzintensität unter UV-Licht erhöht und somit indirekt die

negativ geladene DNA auf ihrem Weg zum Pluspol sichtbar macht. Der Laufpuffer bestand aus 1 x TBE, als Referenz-DNA-Probe wurde 1 µl GeneRuler® aufgetragen. Die zu analysierende Probe wurde vor dem Auftragen im Verhältnis 5:1 mit Ladebuffer gemischt. Die angelegte Spannung betrug 100 V.

Restriktionsverdau zur Analyse der DNA und zum Herausschneiden von spezifischen DNA-Abschnitten aus einem Plasmid

Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische DNA-Sequenzen und schneiden in einem jeweilig typischen Muster (Restriktionsverdau). Sollschnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme befinden sich innerhalb der Erkennungssequenz (Typ 2 Restriktionsendonukleasen) und erzeugen sogenannte „sticky ends“ (versetzte Schnittenden).

Der folgende Reaktionsansatz wurde verwendet: 1 µl DNA (1-2µg DNA/µl), 1 µl Enzym (10000-20000 U/ml), 10% des Gesamtansatzes 10x Puffer, 1% des Gesamtansatzes BSA falls vom Enzym-Hersteller empfohlen. Das Gesamtreaktionsansatzvolumen von 10 bis 20 µl wurde mit ddH₂O komplettiert. Der Ansatz wurde bei 37°C für 2 bis 24 h inkubiert, die Enzyme anschließend für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Die verdauten Proben wurden bei 4°C gelagert. Um DNA-Abschnitte aus dem Plasmid heraus zu schneiden, wurden zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme benötigt. Das Protokoll dieses Doppelverdaus war wie folgt: 3 µl (1-2 µg/µl) PCR-Produkt oder Plasmid, 2 µl Enzym1 (10000-20000 U/ml), 2 µl Enzym2 (10000-20000 U/ml), 3 µl Puffer, 0.3 µl BSA (falls vom Enzymhersteller empfohlen). Der Puffer war so zu wählen, dass er sowohl für Enzym1 als auch für Enzym2 geeignet ist. Das Gesamtreaktionsansatzvolumen von 30 µl wurde mit ddH₂O komplettiert, der Verdau erfolgte für 2 h bei 37°C. Anschließend wurde das Gemisch für 20min bei 65°C hitzeinaktiviert und dann bei 4°C gelagert. Die DNA-Fragmente konnten mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und das gewünschte Segment aus dem Gel für weitere molekularbiologische Methoden extrahiert werden (siehe unten).

Ligation zweier DNA-Fragmente

Um zwei DNA-Fragmente (Vektor + Insert) mit „sticky ends“ zu ligieren, wurde das Quick-Ligation™ Kit verwendet. Das Insert wurde im Überschuss (2 bis 6 fach) eingesetzt und die

Gesamtmenge an DNA zwischen 1 und 10 ng/μl gehalten. Die benötigte Menge des Inserts in Relation zu der Menge des Vektors, wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Masse}_{\text{Insert}}[\text{ng}] = Y_{\text{Molares Verhältnis Insert:Vektor}} \times \text{Masse}_{\text{Vektor}}[\text{ng}] \times (\text{Länge}_{\text{Insert}} [\text{bp}] / \text{Länge}_{\text{Vektor}} [\text{bp}])$$

Folgende Reaktionsansätze wurden verwendet: 1 μl Vektor (48 ng DNA), entsprechende Menge an Insert (2 bis 10fach zur Vektormenge), 1 μl Quick Ligase, 10 μl Ligase-Puffer (entspricht 50% des Gesamtansatzes), x μl ddH₂O (komplettiert das Gesamtvolumen von 20 μl). Der Reaktionsansatz wurde für 7 min bei 25°C inkubiert, danach auf Eis gelegt und in kompetente *E.coli* Zellen transformiert. Die Transformanten wurden auf Zeocin-haltigem Low-Salt Agar ausplattiert, eine Kolonie geerntet und mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des Plasmids überprüft.

Extraktion der DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin® Extract II Kit von Macherey-Nagel verwendet und gemäß dem *Protocol for DNA extraction from agarose gels* desselben vorgegangen.

Die DNA-Fragmente wurden aus dem Agarosegel unter UV-Licht geschnitten, wobei zu achten war, die DNA so wenig wie möglich dem UV-Licht auszusetzen. Die Gelstücke wurden in ein Eppendorfgefäß überführt und pro 100 mg Gelstücke 200 μl NT-Puffer zugegeben, bei 50°C für 5-10 min inkubiert und alle 2-3 min gevortext bis die Gelstücke vollständig gelöst waren. Um die DNA an eine NucleoSpin Extract II Säule zu binden, wurde die Probe über die Matrix gegeben, indem bei 11000 g für 1 min zentrifugiert wurde. Mit 600 μl NT3-Puffer wurde die Säule bei 11000 g für 1 min gewaschen sowie durch weiteres Zentrifugieren bei 11000 g für 2 min getrocknet. Nach Inkubation der Säule mit 30μl Elutionspuffer NE wurde die DNA mit demselben Puffer eluiert.

Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion erlaubt die äußerst effiziente und ökonomische Vervielfältigung von DNA in einem mehrphasigen Prozess. In einem ersten Schritt wird bei relativ hoher Temperatur die Doppelstrang-DNA zu zwei Einzelsträngen denaturiert. Nach Absenken der Temperatur lagern sich Primer an die beiden Einzelstränge an (Primer-Annealing), die die Synthese bei einer geringeren Temperatur und mit Hilfe einer thermostabilen DNA Polymerase zu zwei Doppelsträngen erlauben (Extension). Bei weiterer

Erhöhung der Temperatur beginnt der Zyklus erneut mit der Denaturierungsphase (Abb. 2.1).

Um spezifische DNA-Sequenzen aus einem Plasmid heraus zu amplifizieren, wurde folgender Ansatz gewählt: 5 µl 10x Pfu-Puffer mit 25 mM MgSO₄, 1 µl dNTPs (10 mM), 2.5 µl Forward Primer (25 pmol), 2.5 µl Reverse Primer (25 pmol), 2 µl Template, 0.5 µl Pfu (1.25 Units), 37 µl H₂O. Die PCR-Einstellung war wie folgt: 1 min Hitzeschock bei 95°C, anschließend 30 Zyklen mit 30 s Denaturierungsphase bei 95°C, 30 s Annealing-Phase bei entsprechender Temperatur (je nach Primer) und 4 min Extensionsphase bei 72°C. Abschließend wurde eine Extensionsphase von 7 min bei 72°C angeschlossen und die Probe bei 4°C gelagert.

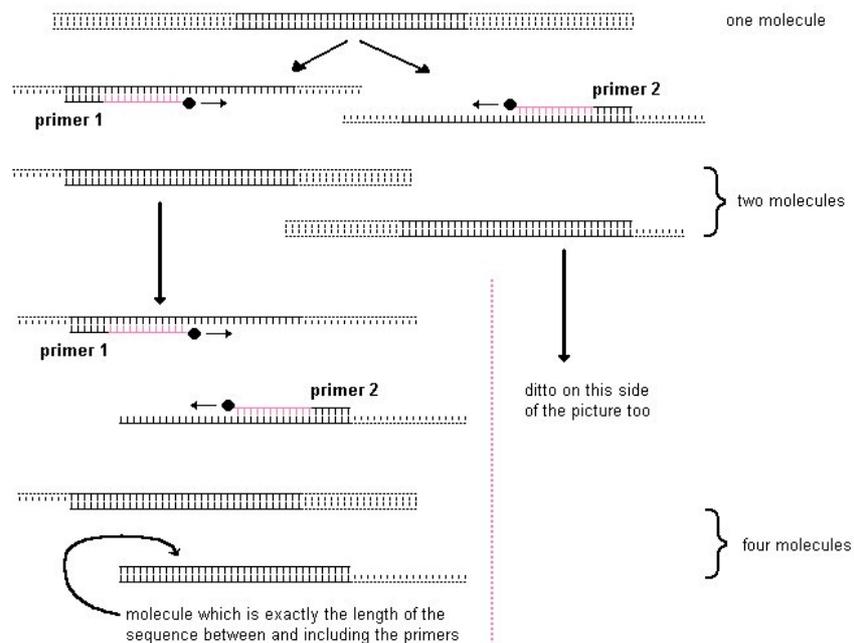


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion. Das doppelsträngige DNA-Molekül wird in zwei Einzelstränge denaturiert, Primer lagern sich an und zwei neue Doppelstränge werden synthetisiert (Denaturierungsphase – Anlagerungsphase – Extensionsphase). (Bildquelle: <http://www.ucl.ac.uk/>)

Reinigung des PCR Produkts

Zur Reinigung der DNA nach Amplifikation mittels PCR wurde das NucleoSpin® Extract II Kit von Macherey-Nagel verwendet und gemäß dem *Protocol for direct purification of PCR products* desselben vorgegangen.

Das PCR-Produkt und Puffer NT wurden im Verhältnis 1:2 (100 µl : 200 µl) gemischt und durch Zentrifugieren bei 11000 g über die NucleoSpin® Extract II Säule gegeben, um die DNA an eine Membran zu binden. Nach Waschen der Membran mit 600 µl Puffer NT3 (Zentrifugieren bei 11000g für 1 min), konnte die DNA mit 15-50 µl NE Puffer eluiert werden (1 min inkubiert, danach 1 min bei 11000 g zentrifugiert).

Konzentrieren von DNA mittels Vakuumzentrifuge (SpeedVac)

Bei der SpeedVac ist die aufzukonzentrierende DNA-Lösung sowohl einer Zentripetalkraft, welche die DNA-Moleküle sedimentiert, als auch ein Vakuum, das die Siedetemperatur des Lösungsmittels erniedrigt, ausgesetzt. Das Lösungsmittel siedet und wird flüchtig, während die DNA-Moleküle durch die Sedimentierung im Zentrifugenbehälter gehalten werden.

Wichtig bei dieser Methode war die Reihenfolge der Bedienung. Zuerst wurde der Rotor angestellt, danach das Vakuum generiert. Das Vakuum wurde am Ende nur langsam über mehr als 10 s aufgehoben und erst danach der Rotor ausgeschaltet. Die umgekehrte Reihenfolge führt zum Verlust der Probe.

Konzentrieren von DNA mittels Aussalzen

Eine weitere Methode, die DNA-Lösung zu konzentrieren, stellt das Aussalzen der Lösung dar. Zu 170 µl DNA-Lösung wurden 10 µl Natriumacetat und 170 µl Isopropanol hinzugegeben. Die Probe wurde für 20 min auf Eis gelegt, anschließend für 20 min bei Raumtemperatur und 2000 g zentrifugiert; der Überstand wurde abgenommen. 750 µl 70%iges nichtvergälltes Ethanol wurde auf das Pellet gegeben, für weitere 10 min bei 2000 g zentrifugiert und der Überstand erneut abgenommen. Der Behälter wurde für 10 min offen gehalten und das Pellet im Anschluss in H₂O aufgenommen.

Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese bezeichnet eine Methode des gezielten Austauschs, der Insertion sowie der Deletion von Nukleotiden. Sie basiert auf der Vervielfältigung von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion bei der zwei Primer (Vorwärts- und Rückwärtsprimer) verwendet werden, welche die gewünschte Mutation enthalten.

Bei der Konzeption der Primer waren folgende Richtlinien zu beachten: Der Primer sollte zwischen 24 und 45 Basen enthalten, die Schmelztemperatur $T_M \geq 78^\circ\text{C}$ betragen

($T_M = 81.5 + 0.41(\%GC) - 675/N - \%mismatch$, wobei N = Gesamtzahl der Nukleotide im Primer). Die Mutation sollte sich möglichst in der Mitte des Primers mit jeweils mindestens 10-15 korrekten Basen auf jeder Seite befinden. Der Primer sollte auf ein oder mehrere Cytosine oder Guanine enden sowie mindestens 40% Guanin und Cytosin enthalten. Bestellt wurden die Primer bei Biomers.net.

Die Mutagenese wurde mit dem Quick Change® II Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene® und dessen empfohlenem Protokoll durchgeführt. Der Reaktionsansatz bestand aus 5 µl 10x Reaction Buffer, 20 ng dsDNA, 125 ng Vorwärtsprimer, 125 ng Rückwärtsprimer, 1 µl dNTP-Mix des Quick Change® Kits (Konzentration vom Hersteller nicht veröffentlicht), 1 µl PfuUltra HF DNA Polymerase. Mit ddH₂O wurde das Reaktionsvolumen von 50 µl komplettiert. PCR-Parameter waren wie folgt: 1 Zyklus über 30 s bei 95°C, danach 13 Zyklen mit 30 s bei 95°C, 1 min bei 55°C und x min bei 68°C (1 min pro kb der Plasmidlänge). Die ursprüngliche, spiralförmig gewickelte DNA (supercoiled DNA) wurde anschließend verdaut, indem 1 µl Restriktionsenzym DpnI dem Ansatz hinzugegeben, mit der Pipette gut durchmischt, 1 min bei 2500rpm zentrifugiert und bei 37°C für 1 h inkubiert wurde. Zur anschließenden Transformation wurden 50 µl kompetente *E.coli* Zellen DH5α auf Eis aufgetaut, in ein vorgekühltes 14ml Falcon-Röhrchen überführt, und 1 µl der behandelten DNA hinzugegeben. Die Transformationsreaktion wurde behutsam durchmischt, für 30 min auf Eis inkubiert, für 45 s bei 42°C belassen, für 2 min auf Eis gelegt, 1 ml LowSalt Medium hinzugegeben und bei 37°C und 230 rpm für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LowSalt-Medium mit Ampicillin ausplattiert.

Transfektion zur Herstellung rekombinanter Hefezellen

Um die Expression rekombinanter Proteine in Hefezellen zu forcieren, können diese mit Plasmiden transfiziert werden, in welche zuvor das gewünschte Gen kloniert wurde. Für das Hefezell-Expressionssystem *Pichia pastoris* stellt die Elektroporation unter den verschiedenen Verfahren der Transfektion das Effektivste dar (Invitrogen, 2006).

Zellen werden mit Hilfe der Elektroporation einem elektrischen Feld ausgesetzt, wodurch die Zellmembran Poren formt und für DNA permeabel wird (Elektropermeabilisation) (Neumann, 1999). Bringt man auf diese Weise das Plasmid pPICZalhpαB in die Zellen des Expressionssystems *Pichia pastoris*, erfolgt durch die Interaktion der AOX1 Loki von Wirts- und Fremd-DNA die Rekombination und Integration des Plasmids in das Genom der

Hefezellen (Abb. 2.2). Die Frequenz dieser Ereignisse erhöht sich, wenn die eingebrachte DNA im Gegensatz zur Abbildung 2.2 linearisiert vorliegt. Multiple Insertionen an einem einzigen Locus sind ebenfalls möglich (Abb. 2.2) (Invitrogen, 2006).

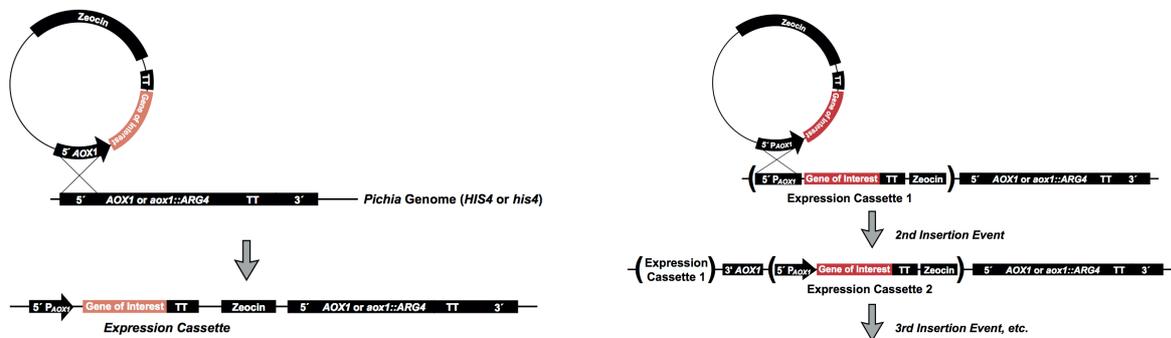


Abb. 2.2: Schema der Rekombination. Der Vektor pPICZ wird über die AOX1 Loci in das Genom integriert. Links: Einzelne Insertion. Rechts: Multiple Insertionen. (Invitrogen, 2006)

Zur Elektroporation wurde gemäß dem Manual des EasySelect™ *Pichia* Expression Kit vorgegangen. Eine 5 ml Kultur von *Pichia pastoris* X-33 Zellen in YPD wurde in einem 50 ml Behälter über Nacht bei 30°C und 250rpm angelegt. 0.5 ml dieser Übernachtskultur wurden in 500 ml YPD eines 2 Liter Glaskolbens inokuliert und die Kultur über Nacht bis zu einer OD zwischen 1.3 und 1.5 kultiviert. Dieser Schritt konnte zwischen 12 und 24 h andauern, schien aber essentiell für die erfolgreiche Präparation der Zellen. Die Kultur wurde anschließend bei 1500 g und 4°C für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 500 ml sterilem Eiswasser resuspendiert. Diese Suspension wurde wiederum bei 1500 g und 4°C für 5 min zentrifugiert, das Pellet in 250 ml Eiswasser resuspendiert, abermals mit denselben Einstellungen zentrifugiert und in 20 ml 1M Sorbitol (0°C) resuspendiert. Nach weiterem Zentrifugieren mit den gleichen Einstellungen wurden die Zellen mit 1 ml 1 M Sorbitol (0°C) zu einem Endvolumen von ungefähr 1.5 ml resuspendiert und die Zellen auf Eis gelagert. 80 µl dieser Zellen wurden mit 7 µg linearisiertem Plasmid pPICZalphaB_RhodesainΔC in eine 0°C kalte 0.2 cm Elektroporationsküvette überführt und auf Eis für 5 min inkubiert. Die eigentliche Elektroporation wurde bei 1500 V, 400 Ω und 25 µF durchgeführt. Anschließend wurde sofort 1 ml 1 M Sorbitol (0°C) in die Küvette gegeben. Insbesondere ist bei der Elektroporation darauf zu achten, dass die Außenseiten der Küvetten vollständig trocken sind und das Sorbitol so schnell wie möglich nach der Elektroporation auf die Zellen gegeben wird. Der Küvetteninhalt wurde in ein steriles 15 ml Gefäß überführt, ohne Schütteln bei

30°C für 90 min inkubiert und anschließend jeweils 50 µl auf YPDS Platten mit 100, 500, 1000 sowie 2000 µg/ml Zeocin ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C für 10 Tage inkubiert. Kolonien auf Platten mit der höchsten Zeocinkonzentration wurden für die weiteren Versuche verwendet.

Kolonie-PCR zur Analyse spezifischer DNA-Abschnitte in Hefe- und Bakterienzellen

Um DNA in Hefe- und Bakterienzellen zu analysieren, können mittels Kolonie-PCR spezifische DNA-Abschnitte aus der in den jeweiligen Zellen enthaltenen DNA amplifiziert und detektiert werden. Der Reaktionsansatz für jeweiliges Verfahren bestand aus 10 µl Taq-PCR-Mastermix (Quiagen), 6 µl H₂O, 2 µl Vorwärtsprimer, 2 µl Rückwärtsprimer sowie einer Kolonie der Hefe- bzw. Bakterienzellen. Bei 95°C für 2 min wurden die Zellen aufgeschlossen und die DNA mit 30 PCR-Zyklen aus 45 s bei 95°C, 30 s bei 55°C und 1 min bei 72°C amplifiziert. Die abschließende Extensionsphase wurde für 10 min bei 72°C durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde bei 4°C gelagert und konnte mittels Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht und interpretiert werden.

2.2 Proteinexpression in der Hefekultur *Pichia pastoris*

Kultur und Glycerinstocks von *Pichia pastoris*

Pichia pastoris ließ sich bei 28-30°C und 200-250 rpm kultivieren. Für die Langzeitlagerung bei -80°C wurden Glycerinstocks hergestellt. Hierzu wurde eine *Pichia pastoris* Zellsuspension auf einer YPD-Agar-Platte ausgestrichen und bei 30°C kultiviert. Am folgenden Tag wurde eine einzelne Kolonie in 500 ml YPD Flüssigmedium überführt und die Kultur bei 200rpm und 29.9°C über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 2 und 6 kultiviert. Glycerin wurde zu einer Endkonzentration von 15% hinzugegeben, die Kultur mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Überexpression von Rhodospain in *Pichia pastoris*

25 ml BMG wurden in einem 250 ml Schüttelkolben mit einer Kolonie oder 50 µl der Kultur *Pichia pastoris* pPICZalphaB_RhodospainΔC angeimpft und über Nacht bei 29.9°C und 200-250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 2 und 6 kultiviert. Die gesamte Kultur wurde zum Animpfen

von 1 L BMG im 5 L Schüttelkolben verwendet und bei 29.9°C und 200-250 rpm wiederum bis zu einer OD₆₀₀ zwischen 2 und 6 über Nacht kultiviert (12-26h). Die komplette Hefezellsuspension wurde in einen sterilen Zentrifugenbecher überführt und bei 2300 g und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit BM bis zu einer OD von 1.0 resuspendiert, wofür 4 bis 6 Liter BM benötigt wurden. Die Kultur wurde auf 4 bis 6 5 L Schüttelkolben zu jeweils 500-1000 ml verteilt und 100% Methanol zu einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Die Kolben wurden mit einem Imkernetz abgedeckt, um maximale Luftzufuhr zu gewährleisten, und bei 200 bis 250 rpm und 29.9°C für 2 bis 3 Tage geschüttelt. Alle 24 h wurde Methanol jeweils in der Menge von 1% des Kulturgesamtvolumens zugegeben.

2.3 Proteinaufreinigung

Um Proteinproben für Kristallisationsexperimente zu verwenden, muss eine Reinheit von über 95% erreicht, das Protein stark aufkonzentriert und in eine geeignete Umgebung gebracht werden. Die nachfolgenden Verfahren wurden hierzu verwendet.

Zentrifugation

Proteinproben, welche durch die unten beschriebenen Chromatographien gereinigt werden sollen, müssen frei von Zellen, Zellfragmenten sowie makroskopischen Verschmutzungen sein. Die *Pichia pastoris* Kultur wurde in einem ersten Aufreinigungsschritt bei 30966 g und 4°C für 45 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig vom Pellet getrennt.

Filtration

Der Überstand nach Zentrifugation der *Pichia pastoris* Kultur wurde weiter gereinigt, indem dieser mittels Unterdruck an einer Membran der Porengröße 2 µm filtriert wurde. Um eine möglichst geringe Interaktion zwischen Filtermembran und dem Protein zu gewährleisten, wurde ein Glas-Mikrofaser-Filter (Whatmann®) verwendet.

Chromatographie mittels hydrophober Wechselwirkungen (HIC)

Nach Zentrifugation und Filtration der *Pichia*-Kultur wurde dem Überstand langsam (>1 h) 1 M NaCl zugefügt. Der pH wurde mittels NaOH auf pH 7.0 eingestellt. 1700 ml der Proteinlösung wurden auf eine Phenyl-SepharoseTM-Säule (26ml) aufgetragen. Die Säule wurde vorher mit 1 M NaCl-Lösung (pH7.0) äquilibriert, und die Probe mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgte durch eine abnehmende NaCl Konzentration (Lösung A= 1 M NaCl, Lösung B= 20 mM NaCl) und einer Durchflussrate von 2.5 ml/min.

Größenausschluss-Chromatographie

8-10 ml (max. 13 ml) der Proteinlösung wurden auf eine SuperdexTM (330ml) Größenausschluss-Säule aufgetragen. Äquilibrierungs- und Elutionspuffer enthielten 20 mM Tris-HCl pH 7.9 und 200mM NaCl. Die Elution erfolgte bei 1.2 SV (400 ml).

Probenauftrag, Äquilibrierung, Elution und Elutionsanalyse der HIC sowie der Größenausschluss-Chromatographie wurden mit dem ÄktaTM-Purifier FPLC-System gesteuert. Druckhöchstgrenzen, maximale Durchflussraten, Säulenvolumina sowie Lagerungsbedingungen siehe Kapitel 2 „Material“ (Tabelle 3.15). Alle Puffer und ddH₂O wurden vor den Chromatographie-Schritten, die mit dem ÄktaTM-Purifier System durchgeführt wurden, entgast.

Affinitätschromatographie mittels Ni²⁺-Säule

Der Kulturüberstand wurde nach Zentrifugation und Filtration langsam mit 10 mM Imidazol und 500 mM KCl versetzt. Die Säule wurde bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 10 ml/min mit 5 SV H₂O gewaschen und mit 5 SV Lysispuffer äquilibriert. Bei einer Durchflussgeschwindigkeit, die unterhalb 4 ml/min lag, wurde die Probe aufgetragen und anschließend wurde die Säule mit 2 SV Lysispuffer und 2 SV Waschpuffer gewaschen. Jeweils 4 SV Elutionspuffer 1, 2, 3 und 4 wurden über die Säule gegeben und in 5 ml Proben aufgefangen. Abschließend wurde die Säule mit 10 SV H₂O gewaschen. Eine SDS-PAGE der ursprünglichen Probe, vom Durchfluss bei Probenauftrag, von den zwei Waschfraktionen mit Lysispuffer und Waschpuffer, sowie den Elutionsfraktionen wurde zur Analyse durchgeführt. Die Säule wurde in 20% Ethanol gelagert. Pufferbeschreibungen siehe Kapitel 2 „Material“ (Tab. 3.9).

Konzentrationsverfahren

Filtrations-Konzentratoren erlauben die Trennung von Substanzen hinsichtlich eines Molekulargewichtsgrenzwertes. Dieser sogenannte Cut-off-Wert (MWCO) des Konzentrators gibt dabei das jeweilig kleinste Molekulargewicht an, bis zu welchem globuläre Moleküle im Konzentrator zurückgehalten werden können. Um sicher zu gehen, dass kein aufzukonzentrierendes Protein verloren geht, wurde ein <4fach geringerer MWCO als der des Molekulargewichts des aufzureinigenden Proteins gewählt. Jedes neue Centricon® (MWCO 5000) wurde mit Puffer bei 3200 g für 5 min vorgespült, anschließend mit der maximalen Proteinlösung beladen und bei 3200 g für 10-15 min zentrifugiert. Dieser Schritt war repetitiv, neue Proteinlösung wurde jeweils zugeführt ohne die maximale Füllmenge von 19 ml zu überschreiten. Um das gesamte Retentat der Zentrifugensäule zu erhalten, wurde der Konzentrator abschließend umgedreht und bei 600 g für 90 s zentrifugiert (Invert Spin). Die Lagerung der Konzentratoren erfolgte in Puffer bei 4°C.

2.4 Proteincharakterisierung

Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration verlief nach dem in 2.1 „Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration“ beschriebenen Prinzip. Die Berechnung erfolgte ebenfalls nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz bei einer Wellenlänge von 280nm.

Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ermöglicht die Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld über die Zeit abhängig von der Molekülgröße. Die Proteine werden mittels SDS anionisch maskiert, wodurch alle Proteine im elektrischen Feld entgegen der konventionellen Stromrichtung von der Kathode weg zur Anode hin laufen. Während die Proteine im Sammelgel durch Glycinat und Chloridionen gezwungen werden, sich ohne wesentlichen Molekularsiebeffekt in diskreten Schichten zu sammeln, geht diese Isotachophorese in eine Zonelektrophorese im Trenngel über und trennt die Proteine gemäß ihrer elektrophoretischen Mobilität auf. Meist wurde ein 5% Tris-Glycin SDS Polyacrylamidgel verwendet. Zuerst wurde das Trenngel

(3.5 ml) in die Gelkammer gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Festwerden des Gels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel (1.5 ml) in die Gelkammer gegeben. 5x Ladebuffer wurde vor dem Auftrag zusammen mit der Proteinprobe für 7 min bei 95°C inkubiert. Eine 10 µl Referenzprobe wurde auf das Gel aufgetragen, die Elektrophorese bei 200 V betrieben.

Um die Proteine im Gel sichtbar zu machen, wurde das Gel im Anschluss an die Elektrophorese für 15 min in Coomassie Färbelösung gelegt. Danach über Nacht in Entfärbelösung inkubiert. Vor dem Einschweißen der Gele in Folien wurden die Gele für 15 min in Wasser geschwenkt.

Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ermöglicht die Analyse von Proteinproben anhand von messbaren Masse-Ladungs-Verhältnissen der Moleküle und lässt damit u.a. Schlüsse auf die Aminosäurezusammensetzung der N-terminalen Enden zu. Die Durchführung wurde von der Arbeitsgruppe Sickmann des RVZ übernommen, abzugeben war eine aufkonzentrierte, reine Probe des zu analysierenden Proteins.

Fluorimetrischer Rhodesain-Assay

Rhodesain spaltet das nicht fluoreszierende Z-Phe-Arg-7-amino-4-methylcumarin (Z-Phe-Arg-AMC). Misst man die Intensität des fluoreszierenden Spaltprodukts, kann von dieser auf die Aktivität von Rhodesain geschlossen werden. Der Reaktionsansatz wurde in folgender Reihenfolge zusammenpipettiert: 100 µl Assaypuffer, 10 µl Rhodesain-Lösung, 100 µl Assaypuffer, 5 µl S40. Der Assay wurde mit weißen Mikrotiterplatten (schwarze und farblose wurden nicht empfohlen), bei 25°C und mit einer Detektorspannung von 450 V durchgeführt. Die Anregungswellenlänge des Fluorimeters lag bei 380 nm, die Detektionswellenlänge bei 460 nm.

Computer basierte Berechnungen

Molekulargewicht und Extinktionskoeffizienten konnten über das im Internet frei zugängliche Programm ProtParam der ExPASy Homepage berechnet werden. Die FASTA-DNA-Sequenz der Proteine, zugänglich über Pubmed, wurde hierzu in die Eingabemaske von ProtParam kopiert.

2.5 Kristallisation

Unter bestimmten Bedingungen formen Proteine durch ihre dreidimensionale Anordnung im Raum Kristalle. Diese sind meist mikroskopische Formationen, welche einen großen Teil an Wasser beinhalten und überwiegend durch nicht-kovalente Bindungskräfte zusammengehalten werden. Die Qualität ihrer Diffraktion sowie deren Form, Farbe und Größe variieren abhängig vom Protein und dessen Umgebung bei Kristallbildung.

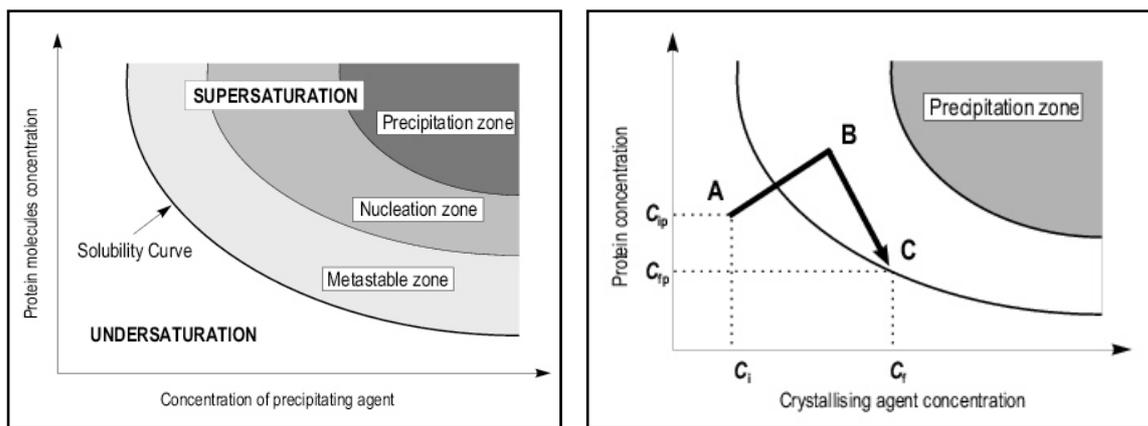


Abb. 2.3: Modell der Kristallbildung von Proteinen nach der Dampf-Diffusions-Technik. Das linke Bild stellt die verschiedenen Phasen in Kristallisationsexperimenten mit der Dampf-Diffusions-Technik dar, das rechte Bild zeigt den idealen Verlauf der Kristallbildung. Eine nicht gesättigte Proteinlösung erreicht durch Dampf-Diffusion den gesättigten Bereich und bildet in der Nukleationszone Kristallisationskeime aus, welche in der metastabilen Zone wachsen. Ist die Präzipitationszone erreicht, fällt Protein aus, welches meist nicht mehr für die Kristallisation zur Verfügung steht.

Um geeignete Kristallisationsbedingungen zu finden, werden Kristallisationsexperimente durch unterschiedliche Zusammensetzungen von dem zu kristallisierenden Protein und einem Fällungsmittel (Präzipitant) durchgeführt. Hierbei können verschiedene Phasen durchlaufen werden (Abb. 2.3, links). In sogenannten Dampf-Diffusion-Kristallisationstechniken wie den unten beschriebenen Hanging- und Sitting-Drop Verfahren wird idealerweise versucht, eine nicht gesättigte Proteinlösung durch Dampfdiffusion zu sättigen und damit in die Nukleationszone zu bringen, in der die Keimbildung von Kristallen erfolgt. Während sich die ersten Kristalle bilden, verringert sich die Konzentration und der Kristall wächst so lange bis der Quotient aus Protein- und Fällungsmittelkonzentration die Löslichkeitskurve erreicht hat (Abb. 2.3, rechts)

Hanging Drop Methode zur Proteinkristallisation

In vorgefertigte 24-well Kristallisationsplatten wurde jeweils 1 ml Fällungsmittel pro Einbuchtung pipettiert. 1 μ l Proteinlösung sowie 1 μ l Fällungsmittel aus dem Well wurden zu einem gemeinsamen Tropfen auf das Deckglas gegeben. Mit dem Tropfen nach unten wurde dieses auf die Einbuchtung gesetzt und mit Silikongel versiegelt (Abb. 2.4). Anschließend wurden die Tropfen unter dem Mikroskop nach Verunreinigungen untersucht, dokumentiert und bei 20°C gelagert. In der ersten Woche wurden die Screens täglich mikroskopisch untersucht, danach in Abständen von einigen Tagen, später sporadisch.

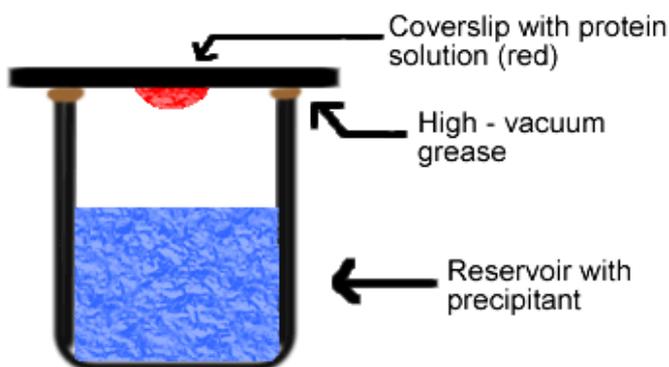


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Hanging-Drop-Verfahrens. Ein Tropfen (rot) aus Proteinlösung und Fällungsmittel hängt am Deckglas, welches auf der Einbuchtung der Kristallisationsplatte liegt. Versiegelt ist die dadurch entstehende Kammer mit Silikongel (braun), am Grund der Einbuchtung befindet sich ebenfalls Fällungsmittel (blau).

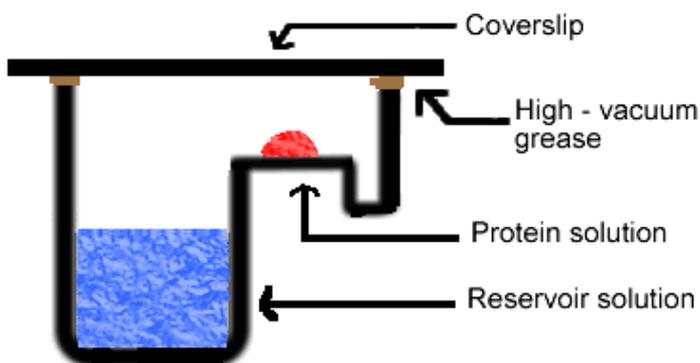


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Sitting-Drop-Verfahrens. Die Einbuchtung der Kristallisationsplatte ist mit einer Folie dicht verschlossen. Die Kammer enthält auf ihrem Grund das Fällungsmittel (blau) sowie auf einer Anhebung den Tropfen (rot) aus Proteinlösung und Fällungsmittel.

Sitting Drop Methode zur Proteinkristallisation

Die Sitting Drop Methode wurde mit Hilfe des Kristallisationsroboters Honey BEE und einer 96-well Kristallisationsplatte durchgeführt. Der Roboter pipettierte jeweils Fällungsmittel in die vorgesehenen Einbuchtungen der Platte sowie 0.5 µl Proteinlösung und 0.5 µl Fällungsmittel zu einem gemeinsamen Tropfen auf die Anhebung innerhalb der Einbuchtung (Abb. 2.5). Die Platte wurde mit Hilfe des Roboters unter einer Kunststofffolie verschlossen. Die weiteren Schritte waren mit denen der Hanging Drop Methode identisch.

Kristallisationsscreens

Zum groben Screening um geeignete Kristallisationsbedingungen zu identifizieren, wurde auf vorgefertigte Lösungen (Kristallisationsscreens) verschiedener Firmen zurückgegriffen. Desweiteren wurde die Lagerungstemperatur (4°C, 20°C, 28°C), die Menge der Reservoirlösung (1ml, 2ml) sowie die Zusammensetzung des Proteintropfens (µl Proteinlösung : µl Fällungsmittel; 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1, 2:2) variiert.

Optimierung der Kristallisationsbedingungen bei Mikrokristallen

Um bei Auftreten von Mikrokristallen die Kristallisationsbedingungen zu optimieren, wurde der pH und die Salzkonzentration des Fällungsmittels sowie die Proteinkonzentration variiert. Es wurde auch versucht durch Additive wie z.B. Glycerin, Ethanol, 1,2-Dioxan, Succrose, MPD sowie 1,6-Hexandiol zu jeweils 1-25% des Gesamtvolumens größere Kristalle zu erhalten.

Micro-Seeding

Um das weitere Wachsen von Mikrokristallen zu forcieren, wurde das Verfahren des Micro-Seedings angewandt. Hierbei wurden 500 µl der Reservoirlösung und der hängende Tropfen gemischt und für 10 s gevortext. 50 µl davon wurden in weitere 450 µl Reservoirlösung gegeben und wiederum gevortext. Dieser Schritt wurde mehrfach wiederholt, so dass eine 6-fache Verdünnungslösung entstand. Der neue hängende Tropfen wurde aus 1 µl Proteinlösung, 1 µl Reservoirlösung sowie 0.5 µl der Micro-Seeding-Verdünnungslösung zusammengesetzt.

Streak-Seeding

Eine weitere Technik, um die Größenzunahme von Mikrokristallen zu begünstigen, ist das Streak-Seeding. Hierzu wurde mit einer Augenbraue zuerst durch einen hängenden Tropfen, welcher Mikrokristalle enthielt, gefahren. Dieselbe Augenbraue wurde ohne Zeitverzögerung durch einen Tropfen der reinen Reservoirlösung und zuletzt durch einen frisch angesetzten hängenden Tropfen gezogen.

Co-Kristallisationsversuche

Um Kristallisationsversuche des Enzyms Rhodocerythrin mit dessen Inhibitoren durchzuführen, wurden die Inhibitoren im Überschuss zu einer Endkonzentration von 100 μM eingesetzt. 2 h vor Beginn des Kristallisationsversuchs wurden die Inhibitoren zur Inkubation der Proteinlösung hinzugegeben. Um die Löslichkeit der Inhibitoren 134C und 112D zu garantieren, wurde die Proteinlösung mit DMSO zu einer Endkonzentration von 10% angereichert. Die Inhibitoren UM110 und UM117 waren in Wasser löslich und bedurften keinem DMSO-Zusatz.

Soaking

Beim Soaking wird zu einem präformierten Kristall ein weiteres Molekül gegeben, welches bei entsprechender Konstellation in den Kristall diffundieren und gegebenenfalls mit diesem interagieren und reagieren kann. Der Inhibitor UM110 wurde im Überschuss zu einer Endkonzentration von 100 μM zu einem hängenden Tropfen, welcher Kristalle enthielt, 3h vor den Röntgenaufnahmen am ESRF zur Inkubation bei Raumtemperatur gegeben.

Untersuchung hinsichtlich Salz- bzw. Proteinkristalle

Mittels einer Stecknadel wurde Druck auf die Kristalle ausgeübt. Da Proteinkristalle in der Regel im Gegensatz zu Salzkristallen sehr fragil sind, konnte die Zerbrechlichkeit einen ersten Hinweis bezüglich Salz- oder Proteinkristall geben.

2.6 Röntgenstrukturanalyse

Grundlagen der Röntgenstrukturanalyse

Schießt ein Röntgengerät ein schmales Bündel Röntgenstrahlen auf einen Kristall, werden diese an der Elektronenhülle der Atome gestreut. Die gebeugten Strahlen ergeben bei Detektion aufgrund der festen Anordnung der Atome im Kristall ein spezifisches Diffraktionsmuster, welches sich aus Punkten zusammensetzt, die sich in Ihrer Position und Intensität unterscheiden.

Röntgenvorbereitung der Kristalle

Der zu untersuchende Kristall wurde mit einer Öse eingefangen und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Auf Zugabe weiterer Substanzen zur Cryoprotektion konnte verzichtet werden, da die Kristallisationsbedingungen ausreichend cryoprotektive Substanzen enthielten.

Datensammlung

Um die Qualität und Art der Kristalle (Protein vs. Salz) festzustellen, wurden Diffraktionsbilder des Kristalls in unterschiedlichen Winkeln aufgenommen. Größere Kristalle wurden mittels des Diffraktometers am RVZ untersucht, kleine Kristalle mittels Synchrotron am ESRF.

3. MATERIAL

3.1 Mikroorganismen, Kultur- und Induktionsmedien, Medienzusätze

Tabelle 3.1: Mikroorganismen

Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle
<i>Pichia pastoris</i>	Samm X-33, wildtyp	Invitrogen
<i>E. coli DH5α</i>	F-(ϕ 80d Δ lacZ M15) Δ (lacZYA-argF) U169hsdR17(r-M) recA1 endA1 relA1 deoR) λ -,phoA supE44thi-1, gyrA96	Stratagene

Tabelle 3.2: Kultur- und Induktionsmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung / Herstellung
10X YNB	134 g YNB in 1000 ml Wasser unter Wärme vollständig lösen und anschließend per Filter (Porengröße 0.22 μ m) sterilisieren. Lagerung bei +4°C.
500X B	20 mg Biotin in 100 ml Wasser vollständig lösen und anschließend per Filter (Porengröße 0.22 μ m) sterilisieren. Lagerung bei +4°C.
100X H	400 mg L-histidin in 100 ml Wasser unter Wärme (<50°C) vollständig lösen und anschließend per Filter (Porengröße 0.22 μ m) sterilisieren. Lagerung bei +4°C.
10X D	200 g D-Glucose in 1000 ml Wasser lösen und anschließend per Filter sterilisieren oder autoklavieren. Lagerung bei Raumtemperatur.
10X GY	100 ml Glycerin mit 900 ml Wasser mischen und anschließend per Filter sterilisieren oder autoklavieren. Lagerung bei Raumtemperatur.
YPD (+Zeocin TM) (-Agar)	10 g yeast extract und 20 g Pepton werden in 900 ml Wasser gelöst. Für Kulturplatten zusätzlich 20 g Agar zugeben. Anschließend autoklavieren. Bis auf 60°C abkühlen lassen und 100 ml 10X D sowie gegebenenfalls 100 mg Zeocin zugeben. Lagerung bei +4°C (und lichtgeschützt). Haltbarkeit 1-2 Wochen.
YPDS + Zeocin TM Agar	10 g yeast extract, 182.2 g Sorbitol und 20 g Pepton in 900 ml Wasser lösen. 20 g Agar zugeben. Anschließend autoklavieren. Bis auf 60°C

	abkühlen lassen und 100 ml 10X D sowie 100 mg Zeocin zugeben. Lagerung bei +4°C (lichtgeschützt). Haltbarkeit 1-2 Wochen.
BMG	690 ml Wasser autoklavieren. Auf Raumtemperatur abkühlen lassen und 100 ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.0, 100 ml 10X YNB, 2 ml 500X B sowie 100 ml 10X GY dazugeben. Lagerung bei +4°C. Die Haltbarkeit beträgt ca. 2 Monate.
BM	690 ml Wasser autoklavieren. Auf Raumtemperatur abkühlen lassen und 100ml 1 M Kaliumphosphatpuffer pH 6.0, 100 ml 10X YNB sowie 2ml 500X B dazugeben. Lagerung bei +4°C. Die Haltbarkeit beträgt 2 Monate.
Low Salt LB Medium (Agar)	10 g Trypton, 5 g Yeast Extract und 5 g NaCl in 950 ml Wasser lösen. Den pH-Wert mit NaOH auf 7.5 einstellen und mit ddH ₂ O das Volumen bis auf 1 Liter erhöhen. Für Kulturplatten zusätzlich 15 g Agar hinzugeben. Anschließend autoklavieren. Wenn das Medium bis auf 55°C abgekühlt ist, kann gegebenenfalls Antibiotikum zugegeben werden. Lagerung bei +4°C.

Tabelle 3.3: Medienzusätze

Bezeichnung	Konzentration der Stammlösung	Bezugsquelle
Zeocin™ Selection Reagent	100 mg/ml	Invitrogen™
Kanamycinsulfat	50 mg/ml	Invitrogen™
Methanol	>99.9%	Roth
Ampicillin	100 mg/ml	Roth

3.2 Primer, Vektoren, Enzyme und Antikörper

Tabelle 3.4: Primer

Bezeichnung	Sequenz	Bezugsquelle
Primer1_forward	5'-gac tgg ttc caa ttg aca agc-3'	Biomers
Primer1_reverse	5'-tat tct cct caa agg cac gga agc-3'	Biomers
Primer2_forward	5'-ttg cgt ctg tcg cac tcg ggt-3'	Biomers

Primer2_reverse	5'-ttc cca gaa aca tag gga tag ctc-3'	Biomers
Primer3_forward	5'-cag gtg gca gga aat cct ctc gt-3'	Biomers
Primer4_forward	5'-caa tgt ctc atg aat cag gcc gta-3'	Biomers
Primer4_reverse	5'-gca aat ggc att ctg aca tcc-3'	Biomers
Primer5_forward	5'-gaa tgg tca cga gat cgg tgc tg-3'	Biomers
Primer_Mutagenese	5'-gtt gga ggc ccc gga gcg gcc gcc agc-3'	Biomers
PrimerI_forward_ETM11	5'-aga aaa gag agc atc acc atc acc atc acc-3'	Biomers
PrimerI_reverse_ETM11	5'-gtg cgg ccg caa gct tgt cga c-3'	Biomers
PrimerII_forward_ETM11	5'-tat aca tac tcg aga aaa gag agc atc acc-3'	Biomers
PrimerII_reverse_ETM11	5'-taa tta aca gtg cgg ccg caa gct tgt cga-3'	Biomers
PrimerIII_forward_ETM11	5'-tatacataccatggcgtgccttgctgtcgc-3'	Biomers
PrimerIII_reverse_ETM11	5'-taagtaggatccattagggcctccaacaact-3'	Biomers

Tabelle 3.5: Vektoren

Bezeichnung	Resistenz	Anmerkung
pPICZalphaB	Zeocin TM	Vektorkarte siehe Anhang
ETM-11	Kanamycin	Vektorkarte siehe Anhang

Tabelle 3.6: Antikörper

Bezeichnung	Immunglobulin-Typ	Ursprungstier
Anti-His	IgG, primärer Antikörper	Maus
Anti-Maus	IgG, sekundärer Antikörper	Ziege

Tabelle 3.7: Proteine, Enzyme und Inhibitoren

Bezeichnung	Bezugsquelle	Anmerkung / Erkennungssequenz
T4-Ligase	New England Biolabs	aus Quick Ligation TM Kit, 1000U [*] /ml
Phusion TM High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs	2000U [*] /ml
PfuUltra [®] Hotstart DNA Polymerase	Stratagene	
SacI (20000 U [*] /ml) Restriktionsendonuklease	New England Biolabs	5'-GAGCT ^v C-3'

NotI (10000 U [*] /ml) Restriktionsendonuklease	New England Biolabs	5'-GC ^v GGCCGC-3'
XhoI (20000 U [*] /ml) Restriktionsendonuklease	New England Biolabs	5'-C ^v TCGAG-3'
BamHI (20000 U [*] /ml) Restriktionsendonuklease	New England Biolabs	5'G ^v GATCC-3'
BSA	Invitrogen TM	
UM110	AG Schmuck / Uwe Machon	Peptidischer Inhibitor (reversibel)
UM117	AG Schmuck / Uwe Machon	Peptidischer Inhibitor (reversibel)
RV134C	AG Schirmeister / Dr. Radim Vicik	Nicht-peptidischer Inhibitor (irreversibel)
RV112D	AG Schirmeister / Dr. Radim Vicik	Nicht-peptidischer Inhibitor (irreversibel)

* 1 Unit entspricht der Menge an Enzym, welche die Umwandlung von 1µmol Substrat in einer Minute katalysiert.

3.3 Chemikalien, Lösungen, Puffer und Kristallisationscreens

Tabelle 3.8: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
1,4-Dioxan	Roth
2-Methyl-2,4-Pentandiol	Fluka
30% Acrylamid Lösung	Roth
Agar-Agar	Roth
Aktivkohle	Roth
Ammoniumsulfat	Roth
Bicine	Fluka
Bis-Tris	Fluka
Brij 35	Thermo Scientific
Bromphenolblau	Sigma

Cobalt(II)-Chlorid	Roth
D(+) Biotin	Roth
Dimethylsulfoxid	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid 1% Stammlösung	Roth
Fe(III)chlorid	Fluka
Glycerin	Roth
Hefeextrakt	Roth
HEPES Natrium Salz	Roth
Imidazol	Fluka
Isopropanol	Roth
Jeffamine M-600	Fluka
Loading Dye Solution	Fermentas
Lithiumchlorid	Fluka
Lithiumsulfat	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Methanol	Roth
MES	Roth
MPD	Roth
Mn(II)chlorid	Fluka
Natriumchlorid	Roth
Natronlauge (32%)	Roth
Stickstoff, tiefgekühlt, flüssig	Cryotherm
Pepton aus Casein	Roth
p-Nitrotetrazoliumblausäure	Roth
Polyethylenglycol 400	Fluka
Polyethylenglycol 6000	Fluka
Polyethylenglycol 20000	Fluka
Rotiphorese® Gel 30	Roth
Salzsäure	Roth
Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat	Fluka

TEMED	Roth
YNB	Invitrogen™
Z-Phe-Arg-AMC	Bachem

Tabelle 3.9 (1): Lösungen und Puffer

Methoden	Bezeichnung	Zusammensetzung
SDS-PAGE	10% Trenngellösung	1.7 ml 30% Acrylamid 1.3 ml 1.5 M Tris pH 8.8 0.05 ml 10% SDS 0.05 ml 10% APS 0.002 ml TEMED ddH ₂ O ad 5ml
	5% Sammelgel	0.33 ml 30% Acrylamid 0.25ml 1 M Tris pH 6.8 0.02 ml 10% SDS 0.02 ml 10% APS 0.002 ml TEMED dd H ₂ O ad 2 ml
	10X SDS-Laufpuffer	144 g Glycin 30 g Tris 5 g SDS dd H ₂ O ad 1 L
	4X SDS-Probenpuffer	7 ml Glycerin 3.2 ml 2-Mercaptoethanol 3 ml 1 M Tris-HCl pH 7 0.8 g SDS 10 mg Bromphenolblau dd H ₂ O ad 20 ml

Tabelle 3.9 (2): Lösungen und Puffer

Methode	Bezeichnung	Zusammensetzung
SDS-PAGE	Coomassie-Färbelösung	250 ml Methanol 50 ml Essigsäure 0.5 g Coomassie
	Entfärbelösung	20 ml Methanol 10 ml Essigsäure 170 ml dd H ₂ O
DNA-Elektrophorese	1%iges Agarosegellösung	200 ml 1X TBE + 2 g Agarose in Mikrowelle erhitzen bis Agarose gelöst, wenn Lösung handwarm 5µl Ethidiumbromid hinzugeben
	10X TBE	108 g Tris Base 55 g Boric Acid 20 ml 0.5 M EDTA mit dd H ₂ O auf 1 L auffüllen
Gelfiltrationschromatographie	Puffer	20 mM Tris pH 7.9 200mM KCl
HIC	Lösung 1	20 mM NaCl
	Lösung 2	1 M NaCl
Affinitätschromatographie	Lysispuffer	20 mM K-Acetat pH 5 500 mM KCl 10 mM Imidazol
	Waschpuffer	20 mM K-Acetat pH 5 500 mM KCl 60 mM Imidazol
	1. Elutionspuffer	20 mM K-Acetat pH 5 500 mM KCl 250 mM Imidazol

Tabelle 3.9 (3): Lösungen und Puffer

Methode	Bezeichnung	Zusammensetzung
Affinitätschromatographie	2. Elutionspuffer	20 mM K-Acetat pH 5 500 mM KCl 500 mM Imidazol
	3. Affinitätspuffer	20 mM K-Acetat pH 5 500 mM KCl 1 M Imidazol
Rhodesain-Assay	Puffer für Enzymlösung	50 mM Acetat Puffer pH 5.5 5 mM DTT 5 mM EDTA 200 mM NaCl
	S ₄₀	2mM Z-Phe-Arg-AMC in DMSO
	Assaypuffer	50 mM Acetat-Puffer pH 5.5 5 mM EDTA

Tabelle 3.11: Kristallisationsscreens

Bezeichnung	Bezugsquelle
Crystal Screen™ I	Hampton Research
Crystal Screen™ II	Hampton Research
Wizard Screen™ I	Emerald BioSystems
Wizard Screen™ II	Emerald BioSystems
Wizard Screen™ III	Emerald BioSystems
Topaz™ OptiMix-1	Fluidigm
Topaz™ OptiMix-2	Fluidigm
Topaz™ OptiMix-3	Fluidigm
Topaz™ OptiMix-PEG	Fluidigm
Pre-filled EasyXtal Tool X-Seal Classic Suite	Quiagen

3.4 Geräte, Verbrauchsgegenstände, Kits und Chromatographiematerialien

Tabelle 3.12: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Autoklav Systec V-150	Systec
Bakterienschüttler ISF-1-W	Kühner
Bio-Photometer	Eppendorf
Chromatographiesystem ÄKTA Purifier (P-900 + UV-900 + pH/c-900 + Frac-950)	GE Healthcare
Elektroporator	BioRad
Electronic UV Transilluminator	Ultra-Lum, Inc.
Feinwaage XS 105 Dual Range	Mettler Toledo
Fluorescence Spectrophotometer	Varian
GelAir Dryer	BioRad
Gelelektrophorese Mini-Protean 3-cell	Biorad
Honeybee	Genomic Solutions®
Inkubator	Heraeus, Thermo Electron Corporation
Kamera AxioCam MRC	Zeiss
Kryo-Loop	Hampton Research
Magnetrührer MR 3002	Heidolph
NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000	PeQlab Biotechnologie GmbH
Thermocycler Mastercycler ep gradient S	Eppendorf
Mikroskop	Zeiss
Peristaltische Pumpe (Pump P1)	GE Healthcare
pH-Elektrode	Schott
pH-Meter	Schott
Pipetten	Rainin
Synchrotron	ESRF (Grenoble)
Röntgeneratore MicroMax™ 007HF	Rigaku
Spannungsgerät	Biorad
Spektrophotometer	Agilent
Speed vac	Savant

Thermoblock Rotilabo-Block-Heater 250	Roth
Thermomixer	Eppendorf
UV-visible Spektrophotometer	Agilent
Vortexer (Vortexe-Genie 2)	Scientific Industries
Waage XS 6002S Dual Range	Mettler Toledo
Wasserbad	Memmert
Zentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf
Zentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf
Zentrifuge Avanti J-26 XP	Beckmann Coulter
Zentrifugenrotor JLA 25.50	Beckmann Coulter
Zentrifugenrotor JA 8.100	Beckmann Coulter

Tabelle 3.13: Verbrauchsgegenstände

Bezeichnung	Hersteller
24-well Platten	Crystalgen
96-well Platten	Greiner
Baysilone-Paste	GE Bayer Silicones
Centricon Ultrafiltrationseinheit (MWCO 5000 Da)	Millipore
Deckgläser Circular Cover Slides 22 mm (siliconized)	Jena Bioscience
Eppendorfgefäße 0.5 ml/1.5 ml/2 ml	Sarstedt
Glass microfibre filters GF/F 55 mm	Whatmann® Schleicher & Schnell
Greinerröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner
Membranfilter 0.2 µm 50 mm (regenerierte Cellulose)	Roth
Microcon (MWCO 5000 Da)	Millipore
Multiply® µStrip 0.2 ml Kette + Deckel	Sarstedt
Nitril Handschuhe	Roth
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl, 5000 µl	Rainin

Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf
Spritzen 5 ml, 10 ml, 50 ml	Roth
Silikongel	Bayer
UV-Küvetten, 1 cm Ganglänge	Roth

Tabelle 3.14: Kits

Bezeichnung	Hersteller
NucleoSpin® Extract II Kit	Macherey-Nagel
NucleoBond® Kit	Macherey-Nagel,
NucleoSpin® Plasmid Kit	Macherey-Nagel
QuickChange® II Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Quick Ligation™ Kit	New England Biolabs
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1	Applied Biosystems
Tag PCR Mastermix Kit	Qiagen

Tabelle 3.15: Chromatographiematerialien

Bezeichnung	Hersteller	Eigenschaften
Phenyl Sepharose™ High Performance	Amersham Biosciences	Druckhöchstgrenze: 0.5 MPa Säulenvolumen: 26 ml Max. Flussrate: 150 cm/h
Superdex™ 200, HighLoad™ 20/26	Amersham Biosciences	Druckhöchstgrenze: 0.3 MPa Säulenvolumen: 330 ml Max. Flussrate: 50 cm/h
Ni-NTA Agarose	Invitrogen	

3.5 Computersoftware, Datenbanken und Größenstandards

Tabelle 3.16: Computersoftware

Bezeichnung	Autor	Download
PyMOL	DeLano Scientific LLC	http://pymol.sourceforge.net/

4 Peaks	Griekspoor, Groothuis	http://mekentosj.com/4peaks/
GENTle	Magnus Manske	http://nixpedia.de/gentle_download/
CLC Sequence Viewer	CLC bio	http://www.clcbio.com/index.php?id=28/
EndNote X	Thomson Reuters	http://www.endnote.com/endemo.asp/ (free trial)
FastPCR	Ruslan Kalendar	http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm

Tabelle 3.17: Datenbanken

Bezeichnung	URL	Referenz
Protein Databank	http://www.rcsb.org/	Berman et al., 2000
pubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Lipman & McEntyre, 2001
ExpASy	http://expasy.org	Wilkins et al., 1999
ProtParam	http://expasy.org/tools/protparam.html	Wilkins et al., 1999

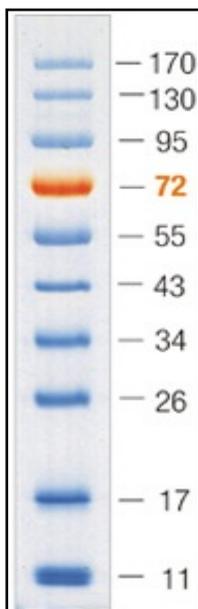


Abb. 3.1: Prestained Protein Ladder *Page Ruler*[™]
0.5µg/µl, Bezugsquelle: Fermentas

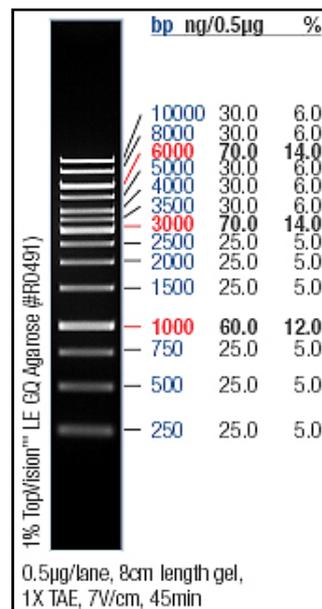


Abb. 3.2: Gene Ruler[™], 1kb DNA Ladder,
Bezugsquelle: Fermentas

4. ERGEBNISSE

4.1 Verifizierung, Konstruktion und Mutation von Plasmiden sowie deren Transfektion

Verifizierung und Transfektion von pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut

Das Plasmid pPICZ α B mit integrierter Rhodesain-Teilsequenz vom *Sandler Center for Basic Research in Parasitic Diseases* der Universität Californien (USA) wurde mittels Sequenzanalyse untersucht und die korrekte Integration und Sequenz von Rhodesain Δ C sowie dessen Mutation (mut) verifiziert. Rhodesain Δ Cmut besteht aus einer 966bp langen

AlphaS-Sequenz + Rhodesain Δ Cmut + Stop-Codon (Basen)

1	ATGAGATTTTC	CTTCAATTTT	TACTGCTGTT	TTATTCGCAG	CATCCTCCGC	ATTAGCTGCT
61	CCAGTCAACA	CTACAACAGA	AGATGAAACG	GCACAAATTC	CGGCTGAAGC	TGTCATCGGT
121	TACTCAGATT	TAGAAGGGGA	TTTCGATGTT	GCTGTTTTGC	CATTTTCCAA	CAGCACAAAT
181	AACGGGTTAT	TGTTTATAAA	TACTACTATT	GCCAGCATTG	CTGCTAAAGA	AGAAGGGGTA
241	<u>TCTCTCGAGA</u>	<u>AAAGAGCGTG</u>	CCTTGCGTCT	GTCGCACTCG	GGTCGCTCCA	CGTGGAGGAG
301	TCATTGGAGA	TGCGTTTTGC	TGCGTTCAAG	AAGAAGTACG	GCAAGGTGTA	CAAGGATGCT
361	AAGGAGGAAG	CATTCCGCTT	CCGTGCCTTT	GAGGAGAATA	TGGAGCAGGC	GAAGATPCAA
421	GCTGCGGCGA	ACCCATACGC	AACGTTTTGGT	GTGACACCCT	TCTCGGATAT	GACACGTGAA
481	GAGTTCAGGG	CACGCTACCG	TAACGGCGCG	TCCTACTTTG	CAGCTGCGCA	GAAGCGGCTA
541	CGCAAGACGG	TGAACGTAAC	CACTGGCCGT	GCTCCTGCAG	CTGTGGATTG	GCGTGAGAAG
601	GGAGCAGTGA	CCCCAGTGAA	GGATCAGGGT	CAGTGC GGCT	CGTGCTGGGC	CTTTTCAACT
661	ATCGGCAACA	TCGAAGGGCA	GTGGCAGGTG	GCAAGAAATC	CTCTCGTATC	CCTCTCGGAG
721	CAGATGCTAG	TGTCATGTGA	TACCATTGAT	TTCGGCTGTG	GTGGTGGGCT	GATGGACAAT
781	GCCTTCAACT	GGATAGTAAA	TTCAAACGGT	GGAAACGTAT	TCACGGAGGC	GAGCTATCCC
841	TATGTTTCTG	GGAATGGTGA	GCAGCCACAG	TGCCAGATGA	ATGGTCACGA	GATCGGTGCT
901	GCGATAACAG	ACCATGTTGA	CTTACCGCAG	GATGAGGACG	CTATCGCCGC	GTATTTGGCA
961	GAAAACGGTC	CCCTTGCTAT	TGCCGTTGAC	GCCACAAGTT	TTATGGACTA	TAACGGTGGG
1021	ATTCTGACTT	CATGCACCTC	CGAGCAATTG	GATCATGGTG	TGCTCCTCGT	TGGTTACAAT
1081	GATGCTAGCA	ATCCACCCTA	CTGGATCATC	AAAAACTCGT	GGAGCAACAT	GTGGGGCGAG
1141	GACGGCTACA	TCCGCATCGA	GAAGGGCACA	AACCAATGTC	TCATGAATCA	GGCCGTATCC
1201	TCCGCAGTTG	TTGGAGGCC	CTGA			

AlphaS-Sequenz + Rhodesain Δ Cmut (Aminosäuren)

1	MRFPSIFTAV	LFAASSALAA	PVNTTTEDET	AQIPAEAVIG	YSDLEGDFDV	AVLPFSNSTN
61	NGLLFINTTI	ASIAAKEEGV	<u>SLEKRA</u> CLAS	VALGSLHVEE	SLEMRFAAFK	KKYGKVKYKDA
121	KEEAFRFRAF	EENMEQAKIQ	AAANPYATFG	VTPFSDMTRE	EFRARYRNGA	SYFAAAQKRL
181	RKTVNVTTGR	APAADVWREK	GAVTPVKDQG	QCGSCWAFST	IGNIEGQWQV	AGNPLVSLSE
241	QMLVSCDTID	FGCGGGLMDN	AFNWIVNSNG	GNVFTEASYP	YVSGNGEQPQ	CQMNGHEIGA
301	AITDHDVLPQ	DEDAIAAYLA	ENGPLAIAVD	ATSFMDYNGG	ILTSCTSEQL	DHGVLLVGYN
361	DASNPPYWII	KNSWSNMWGE	DGYIRIEKGT	NOCLMNQAVS	SAVVGGP	

Abb. 4.1: AlphaS-Sequenz + Rhodesain Δ Cmut + Stop-Codon. Alpha-Factor Signal Sequenz (blau), Kex2 Cleavage Erkennungssequenz (blau unterstrichen), Rhodesain Δ C (schwarz, grau unterlegt), Mutation des Rhodesain Δ C (rot), Stop-Codon von pPICZ α B (schwarz, nicht grau unterlegt).

Sequenz, die im Vergleich zum vollständigen Full-Length-Rhodesain (1350bp) ein Defizit von 60 bp in 5'-Richtung und 324 bp in 3'-Richtung aufweist (Abb. 4.1). Sie enthält die zwei Mutationen A829G und G830C, liegt *in frame* mit dem Start-Codon der vorausgehenden Alpha-S-Sequenz (255bp), und endet direkt mit dem Stop-Codon TGA ohne neben Alpha-S

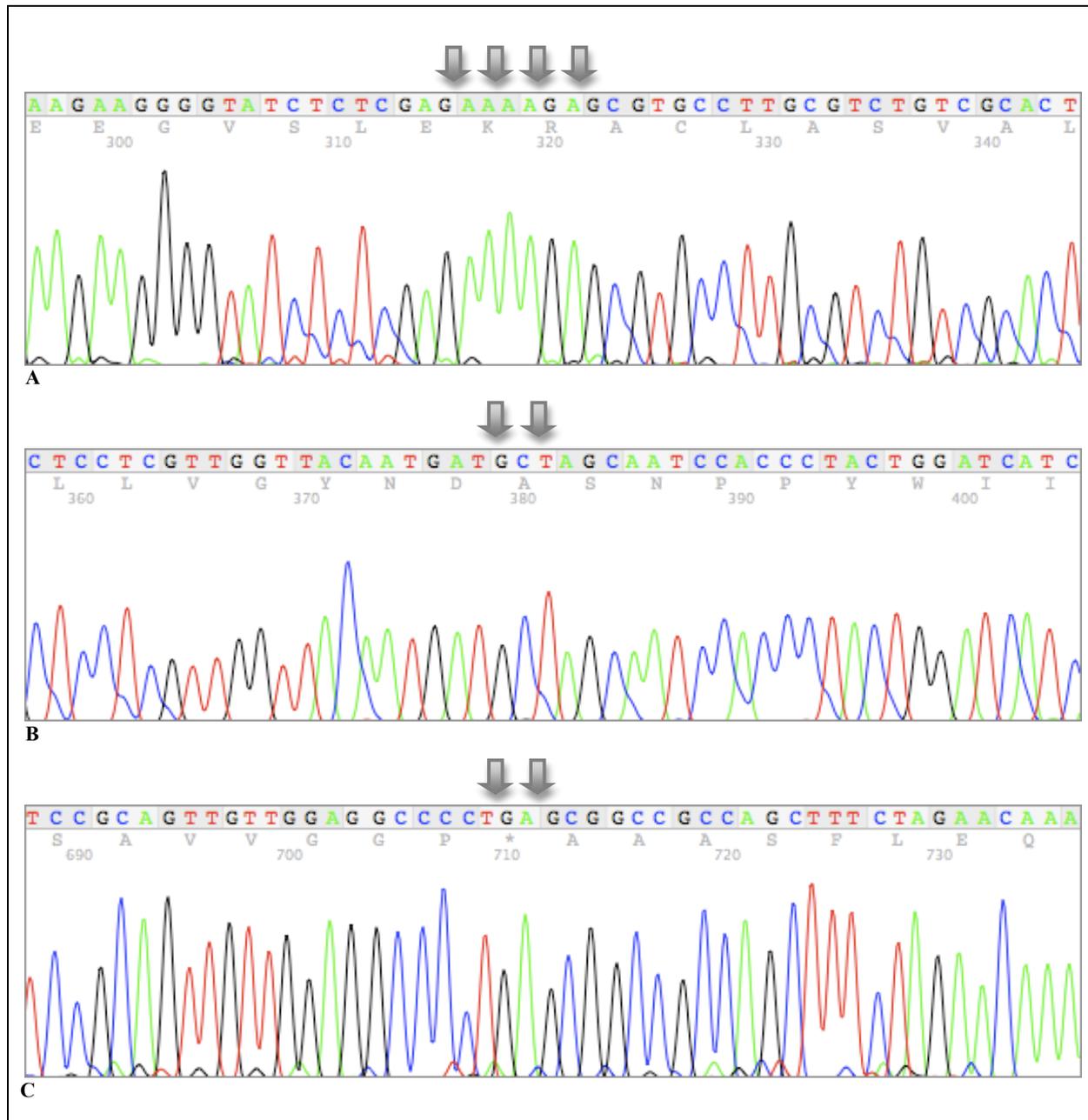


Abb. 4.2: Sequenzierungsergebnisse der Multiple Cloning Site von pPICZ α B mit integrierter Rhodesain Δ Cmut-Sequenz.

Dargestellt mit 4PEaks. (Die Nummerierung der Basenlokalisierung richtet sich nach dem Primer und ist daher nicht mit der Basennummerierung im Rhodesaingen gleichzusetzen.) A: Teilsequenz, sequenziert durch Primer1_forward. Pfeile zeigen auf die Kex2-Cleavage-Erkennungssequenz GAGAAAAGA sowie auf den Übergang vom Alpha-Factor zur Rhodesain-Sequenz. B: Teilsequenz, sequenziert durch Primer3_forward. Pfeile zeigen auf die Mutation A829G und G830C. C: Teilsequenz, sequenziert durch Primer4_reverse. Pfeile zeigen auf das Stop-Codon TGA.

weitere Teile der Plasmidsequenz in den Transkriptionsabschnitt von Rhodesain Δ Cmut miteinzubeziehen. An die Kex2-Schnittstellenerkennungssequenz Glu-Lys-Arg schließt sich Rhodesain Δ Cmut nahtlos an (Abb. 4.1 und 4.2).

Das errechnete Molekulargewicht von Rhodesain Δ Cmut liegt bei 34975 Da, der theoretische pI bei 4.85, der Extinktionskoeffizient beträgt $56880 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Der Vektor pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut wurde mit dem Restriktionsenzym SacI geschnitten (Abb. 4.3). Dieser Vektor besitzt nur eine einzige Schnittstellenerkennungssequenz für dieses Restriktionsenzym, die in der 5'-AOX1-Region liegt und man erreicht durch den Verdau eine Linearisierung des zirkulären Plasmids. Mittels Elektroporation wurde die Hefezelle mit dem linearisierten Plasmid transfiziert und auf selektivem YPD-Zeocin[®]-Agar ausplattiert. Nach ungefähr 3 Tagen waren die ersten transformierten Hefezellen in Form von creme-farbenen Kolonien auf YPD-Agarplatten mit Zeocin[®]-Konzentrationen von 100 bis 1000 $\mu\text{g/ml}$ sichtbar (Abb. 4.4). Zwischen Tag 3 und Tag 10 post Elektroporation kamen weitere Kolonien hinzu. Mit dem Rhodesain-Assay wurden mehrere Kolonien auf ihre Rhodesainexpression hin untersucht, und derjenige Stamm der Kultur mit der relativ höchsten Rhodesain-Aktivität für die anschließenden Versuche weiter kultiviert und in Glycerinstocks bei -80°C gelagert.

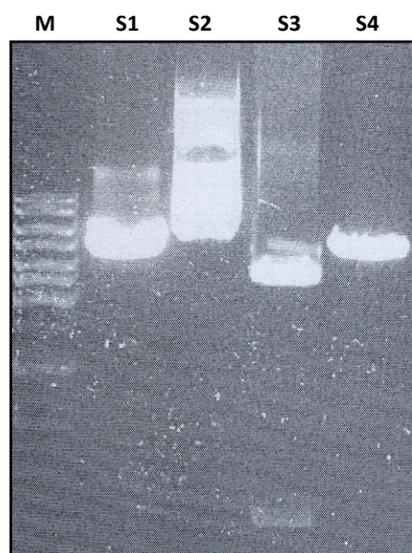


Abb. 4.3: Plasmidverdau. M = DNA-Marker. Spur 1 und 4: Mit SacI einfach verdautes (linearisiertes) Plasmid. Spur 2: unverdautes (zirkuläres) Plasmid. Spur 3: Mit SacI und XhoI doppelt verdautes Plasmid. Die drei Banden dieser Spur repräsentieren den Teil an unverdaulichem Plasmid (oberste Bande), sowie die zwei Fragmente des doppelt verdaulichem Plasmids (mittlere und unterste Bande).

Um die erfolgreiche Transformation dieses Hefestamms mit dem Plasmid pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut zusätzlich zu belegen, wurde mittels Kolonie-PCR ein Plasmid-Abschnitt (727bp) unter Verwendung von Primer3_forward und Primer4_reverse aus den Hefezellen heraus amplifiziert und durch Agarose-Gelelektrophorese und Färbung sichtbar gemacht (Abb. 4.5).

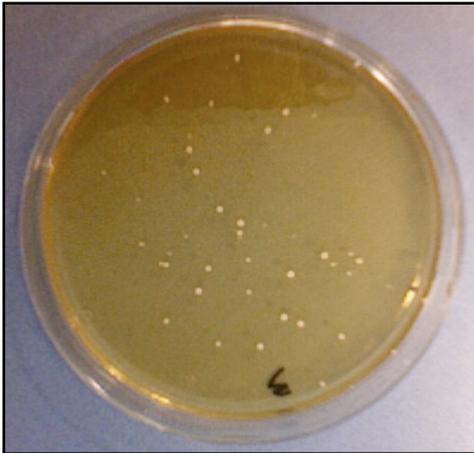


Abb. 4.4: Transfizierte *Pichia pastoris* Kolonien auf YPD-Agar mit Zeocin (100 μ g/ml). Erste Kolonien sind 72h post Elektroporation sichtbar, die Bild-Aufnahme erfolgte am Tag 4. Die Kolonien erscheinen creme-farben.

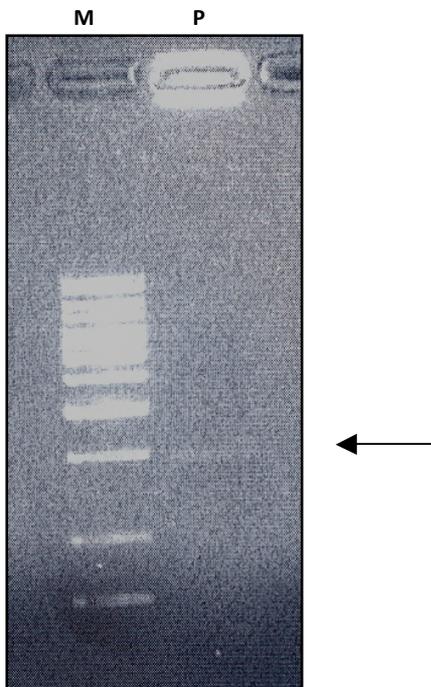


Abb. 4.5: Agarose-Gelelektrophorese und Färbung des Colony-PCR-Produkts der transfizierten *Pichia pastoris* Zellen. PCR-Produkt (727 bp) bestehend aus einer Teilsequenz von Rhodesain Δ Cmut (537bp) sowie einer sich C-terminal anschließenden Sequenz des Vektors (190 bp), amplifiziert durch Primer3_forward und Primer4_reverse. Das amplifizierte Produkt befindet sich auf Höhe der 750 bp-Bande des Markers (Pfeil). In der Geltasche befinden sich die denaturierten Zellfragmente sowie das Genom der Hefezellen. M= Referenzmarker, P= PCR-Produkt.

Mutation zu und Transfektion von pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut_HisTag(C)

Durch ortsgerichtete Mutagenese wurde das Stop-Codon „TGA“ am Ende der Rhodesain Δ Cmut-Sequenz innerhalb des Plasmids pPICZ α B in das Codon „GGA“ (entspricht Glycin) umgeschrieben (Abb. 4.6). Damit umfasst der Transkriptionsabschnitt von Rhodesain Δ Cmut C-terminal einen erweiterten, 78bp langen Bereich, welcher die DNA-Sequenz korrespondierend zu einem c-myc-Epitop (GAACAAAACATCTCAGAAGAGGATCTG) sowie einem Polyhistidin-Schwanz „HisTag(C)“ beinhaltet.

AlphaS-Sequenz + Rhodesain Δ Cmut + C-terminale Sequenz mit HisTag (Basen)

1	ATGAGATTTTC	CTTCAATTTT	TACTGCTGTT	TTATTCGCAG	CATCCTCCGC	ATTAGCTGCT
61	CCAGTCAACA	CTACAACAGA	AGATGAAACG	GCACAAATTC	CGGCTGAAGC	TGTCATCGGT
121	TACTCAGATT	TAGAAGGGGA	TTTCGATGTT	GCTGTTTTGC	CATTTTCCAA	CAGCACAAAT
181	AACGGGTTAT	TGTTTATAAA	TACTACTATT	GCCAGCATTG	CTGCTAAAGA	AGAAGGGGTA
241	TCTCTCGAGA	AAAGAGCGTG	CCTTGCGTCT	GTCGCACTCG	GGTCGCTCCA	CGTGGAGGAG
301	TCATTGGAGA	TGCGTTTTGC	TGCGTTC AAG	AAGAAGTACG	GCAAGGTGTA	CAAGGATGCT
361	AAGGAGGAAG	CATTCCGCTT	CCGTGCCTTT	GAGGAGAATA	TGGAGCAGGC	GAAGATTCAA
421	GCTGCGGCGA	ACCCATACGC	AACGTTTGGT	GTGACACCCT	TCTCGGATAT	GACACGTGAA
481	GAGTTCAGGG	CACGCTACCG	TAACGGCGCG	TCCTACTTTG	CAGCTGCGCA	GAAGCGGCTA
541	CGCAAGACGG	TGAACGTAAC	CACTGGCCGT	GCTCCTGCAG	CTGTGGATTG	GCGTGAGAAG
601	GGAGCAGTGA	CCCCAGTGAA	GGATCAGGGT	CAGTGC GGCT	CGTGCTGGGC	CTTTTCAACT
661	ATCGGCAACA	TCGAAGGGCA	GTGGCAGGTG	GCAGGAAATC	CTCTCGTATC	CCTCTCGGAG
721	CAGATGCTAG	TGTCATGTGA	TACCATTGAT	TTCGGCTGTG	GTGGTGGGCT	GATGGACAAT
781	GCCTTCAACT	GGATAGTAAA	TTCAAACGGT	GGAAACGTAT	TCACGGAGGC	GAGCTATCCC
841	TATGTTTCTG	GGAATGGTGA	GCAGCCACAG	TGCCAGATGA	ATGGTCACGA	GATCGGTGCT
901	GCGATAACAG	ACCATGTTGA	CTTACCGCAG	GATGAGGACG	CTATCGCCGC	GTATTTGGCA
961	GAAAACGGTC	CCCTTGCTAT	TGCCGTTGAC	GCCACAAGTT	TTATGGACTA	TAACGGTGGG
1021	ATTCTGACTT	CATGCACCTC	CGAGCAATTG	GATCATGGTG	TGCTCCTCGT	TGGTTACAAT
1081	GATGCTAGCA	ATCCACCCTA	CTGGATCATC	AAAAACTCGT	GGAGCAACAT	GTGGGGCGAG
1141	GACGGCTACA	TCCGCATCGA	GAAGGGCACA	AACCAATGTC	TCATGAATCA	GGCCGTATCC
1201	TCCGCAGTTG	TTGGAGGCC	<u>C</u> GGA <u>G</u> CGGCC	GCCAGCTTTC	TAGAACAAAA	ACTCATCTCA
1261	GAAGAGGATC	TGAATAGCGC	CGTCGACCAT	CATCATCATC	ATCATTGA	

AlphaS-Sequenz + Rhodesain Δ Cmut + C-terminale Sequenz mit HisTag (Aminosäuren)

1	MRFPSIFTAV	LFAASSALAA	PVNTTTEDET	AQIPAEAVIG	YSDLEGDFDV	AVLPFSNSTN
61	NGLLFINTTI	ASIAAKEEGV	<u>SLEKRA</u> CLAS	VALGSLHVEE	SLEMRFAAFK	KKYGKVKYKDA
121	KEEAFRFRAF	EENMEQAKIQ	AAANPYATFG	VTPFSDMTRE	EFRARYRNGA	SYFAAAQKRL
181	RKTVNVTTGR	APAAVDWREK	GAVTPVKDQG	QCGSCWAFST	IGNIEGQWQV	AGNPLVLSLE
241	QMLVSCDTID	FGCGGGLMDN	AFNWIVNSNG	GNVFTEASYP	YVSGNGEQPQ	CQMNGHEIGA
301	AITDHVDLPQ	DEDAIAAYLA	ENGPLAIAVD	ATSFMDYNGG	ILTSCTSEQL	DHGVLVVGYN
361	DA <u>S</u> NPPYWII	KNSWSNMWGE	DGYIRIEKGT	NOCLMNQAVS	SAVVGGP <u>G</u> AA	ASFLEQKLIS
421	EEDLNSAVDH	HHHHH				

Abb. 4.6: AlphaS-Sequenz + Rhodesain Δ Cmut + erweiterter C-terminaler Bereich mit DNA-Sequenz für HIS-Tag. Alpha-Factor- Signalsequenz (blau), Kex2-Cleavage-Erkennungssequenz (blau unterstrichen), Rhodesain Δ C (schwarz, grau unterlegt), Mutation des Rhodesain Δ C (rot), C-terminale Sequenz (schwarz, weiß unterlegt), Mutation (T1222G) des Stopcodons (TGA) zu Glycin (GGA) (braun und unterstrichen), HIS-Tag (grün).

Konstruktion und Transfektion von pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut_HisTag(N)

Um einen N-terminalen Polyhistidin-Schwanz an das Rhodesain Δ Cmut-Protein zu erhalten, wurde das Gen aus pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut heraus amplifiziert, in den Vektor pETM11 downstream der Polyhistidin-Sequenz kloniert, aus pETM11 zusammen mit dem Polyhistidin-Korrelat heraus vervielfältigt und schließlich zurück in pPICZ α B kloniert.

Die Amplifikation von Rhodesain Δ Cmut aus pPICZ α B erfolgte mit den Primern PrimerI_Forward_ETM11 und PrimerI_Reverse_ETM11 (Abb. 4.8), wobei gleichzeitig N-terminal eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym NcoI und C-terminal eine Erkennungssequenz für das Restriktionsenzym BamHI hinzugefügt wurde (Abb. 4.8, 4.9A). Das PCR-Produkt und pETM11 wurden jeweils mit BamHI und NcoI verdaut und anschließend miteinander ligiert.

PrimerI_Forward_ETM11: 5'-TATACATAC <u>CATGGCGTGCCTTGCCTGTCGC</u> -3' NcoI-Schnittstelle
PrimerI_Reverse_ETM11: 5'-TAAGTAG <u>GATCCATTAGGGGCCTCCAACA</u> ACT-3' BamHI-Schnittstelle
PrimerII_Forward_ETM11: 5'-AGAAAAGAGAGCATCACCATCACCATCACC-3'
PrimerII_Reverse_ETM11: 5'-GTGC <u>GGCCGCAAGCTTGT</u> CGAC-3' NotI-Schnittstelle
PrimerIII_Forward_ETM11: 5'-TATACATAC <u>TCGAGAAAAGAGAGCATCACC</u> -3' XhoI-Schnittstelle
PrimerIII_Reverse_ETM11: 5'-TAATTAACA <u>GTGC</u> GGCCGCAAGCTTGT <u>CGA</u> -3' NotI-Schnittstelle

Abb. 4.8: Konzipierte Primer zur Konstruktion von pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut_HisTag(N). Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme NotI, XhoI sowie BamHI sind unterstrichen dargestellt. Pfeile geben die Schnittstelle an. Grau unterlegte Abschnitte stellen die komplementären Sequenzen der zu amplifizierenden DNA dar.

Rhodesain Δ Cmut wurde daraufhin aus dem zuvor zusammenligierten Konstrukt gemeinsam mit einer N-terminalen Sequenz aus 77 bp, welche die His-Tag-Sequenz beinhaltet, heraus amplifiziert (9B). Zusätzlich wurde N-terminal mit Hilfe der Primer eine weitere Extension aus 11 bp als komplementäre Sequenz für den im nächsten Schritt verwendeten Primer PrimerIII_Forward_ETM11 hinzugefügt sowie C-terminal eine 9 bp lange Extension mit NotI-

Schnittstellenerkennungssequenz. Primer hierfür waren PrimerII_Forward_ETM11 und PrimerII_Reverse_ETM11 (Abb. 4.8).

Mittels einer weiteren Amplifikation des PCR-Produkts durch die Primer PrimernIII_Foward_ETM11 und PrimerIII_Reverse_ETM11 wurde N-terminal eine XhoI-Schnittstellenerkennungssequenz eingefügt und C-terminal die Sequenz um 9 bp verlängert (Abb. 4.8, 4.9C).

Das PCR-Produkt und das Plasmid pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut wurden mit den Restriktionsenzymen NotI und XhoI verdaut (Abb. 3.10) und anschließend miteinander ligiert (Abb. 4.11).

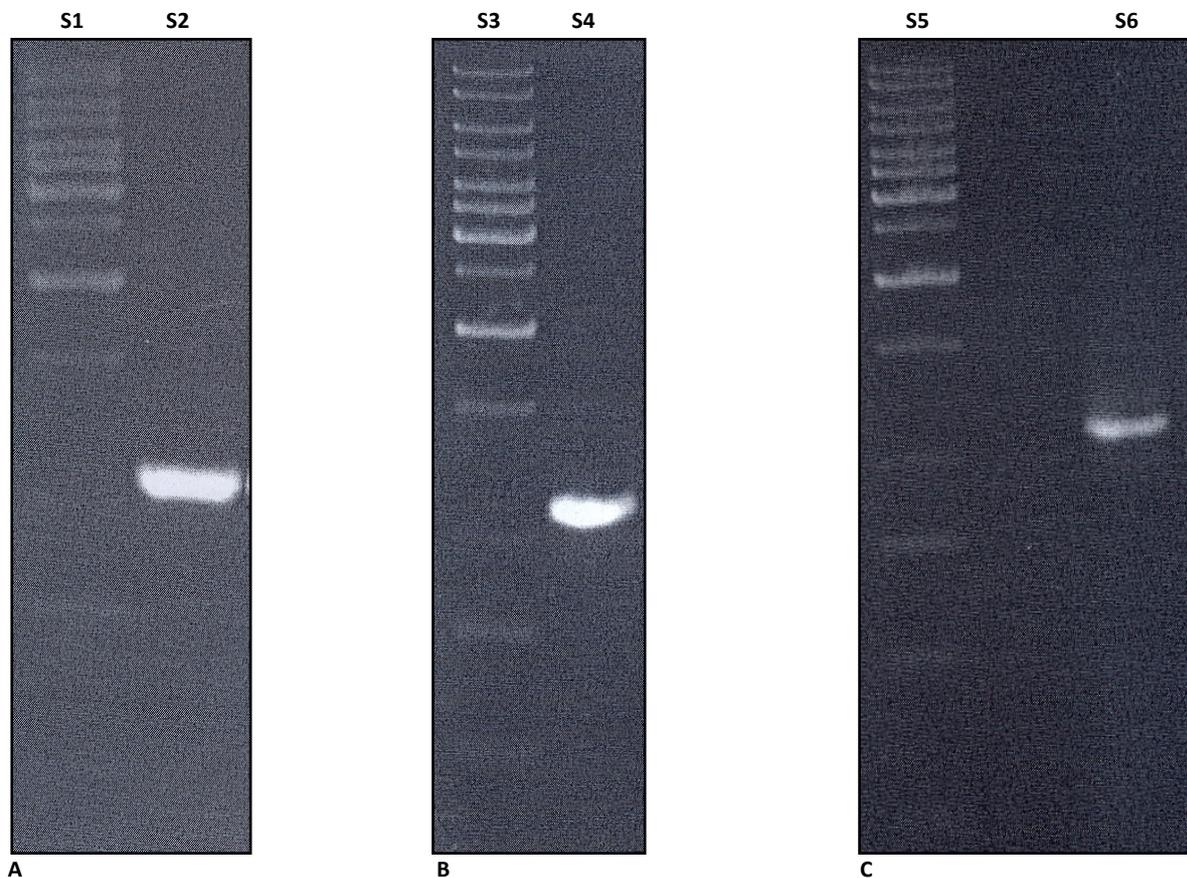


Abb. 4.9: Agarosegelelektrophoresen der PCR-Produkte nach Reinigung. In Spur S1, S3 und S5 befindet sich jeweils die Referenz-DNA-Leiter Gene-Ruler™. In den Spuren S2, S4 und S6 befindet sich leicht oberhalb bzw. auf Höhe der 1000 bp-Bande der Referenzprobe die Bande des aufgetragenen PCR-Produkts (A:995 bp, B:1094 bp, C:1115 bp), amplifiziert durch PrimerI_Forward_ETM11 und PrimerI_Reverse_ETM11 (A), PrimerII_Forward_ETM11 und PrimerII_Reverse_ETM11 (B) sowie PrimerIII_Forward_ETM11 und PrimerIII_Reverse_ETM11 (C).

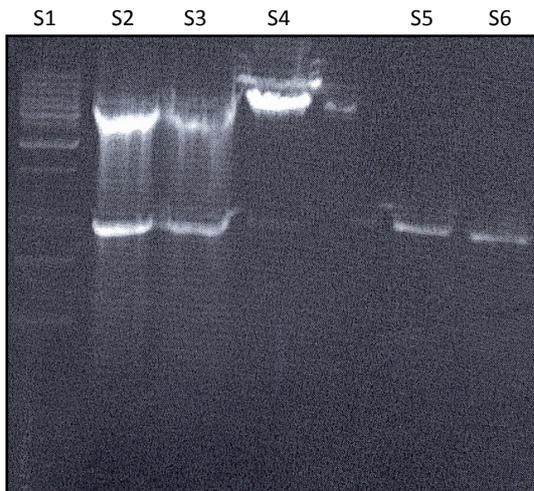


Abb.4.10: DNA-Gelelektrophorese der Verdau-Produkte. In Spur 1 ist die Referenz-DNA-Probe Gene-Ruler™ aufgetragen. Spur 2 und 3 enthalten den verdauten Vektor pPICZαB_RhodesainΔCmut. Die schneller laufende Bande befindet sich etwas unterhalb der 1000bp-Referenzbande und entspricht dem herausgeschnittenen RhodesainΔCmut-Fragment (966+12bp), die langsamer laufende Bande bewegt sich im Bereich 1500>5000bp des Referenzmarkers und entspricht dem verdauten pPICZαB-Fragment (3522bp). Das verdaute PCR-Produkt RhodesainΔCmut_HisTag(N) (1056+64bp) in Spur 5 und 6 läuft ebenfalls in etwa auf Höhe der 1000 bp-Referenzbande. Da RhodesainΔCmut_HisTag(N) etwas größer ist als RhodesainΔCmut läuft dessen Bande geringfügig langsamer als RhodesainΔCmut. Spur S4 enthält eine Probe, bei der der Verdau nicht stattgefunden hat.

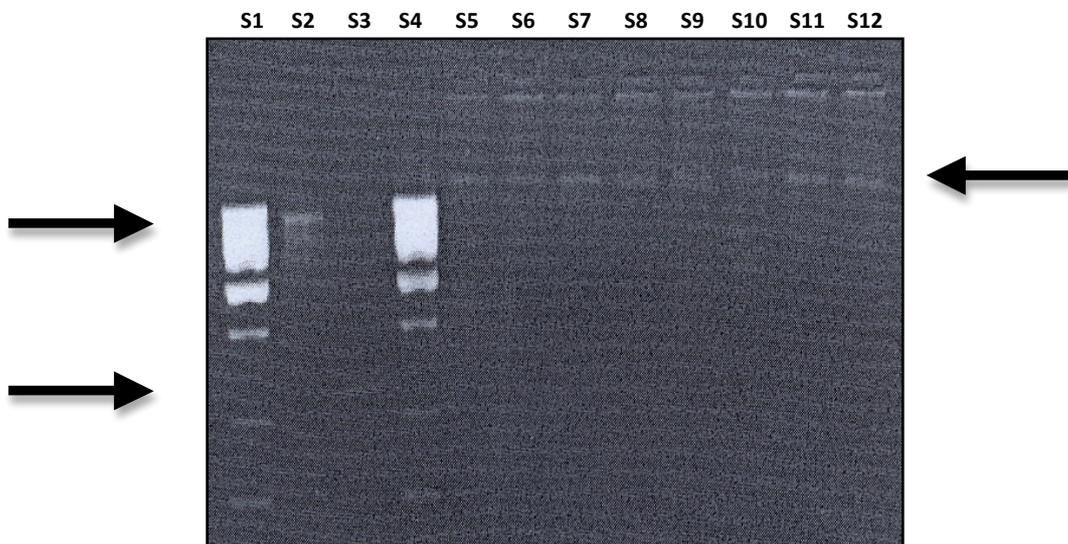


Abb. 4.11: DNA-Gelelektrophorese von verdautem Vektor pPICZαB (Spur2), verdautem Insert RhodesainΔCmut_HisTag(N) (Spur3) sowie dem Ligationsprodukt aus Vektor und Insert (Spur 5 bis 9). Die Referenzprobe Gene-Ruler™ befindet sich in Spur 1 und 4. Die Laufzeit des Gels ist kurz gehalten, um das schnell wandernde Insert in Spur 3 in die Dokumentation miteinzubeziehen. Da es jedoch damit zu keiner vollständigen Auftrennung des Markers im Kilobasenbereich kommen konnte und das Ligationsprodukt keine weite Strecke im Gel fortlegen konnte, ist eine Interpretation hinsichtlich der Referenzprobe im größeren kb Bereich nur bedingt möglich. Es ist allerdings deutlich zu erkennen, dass die Ligationsprodukte (Spur 5-12, rechter Pfeil) langsamer laufen (und damit größer sind) als der Vektor (Spur2, linke Pfeil oben) bzw. das Insert (Spur 3, linke Pfeil unten) für sich genommen.

Das konstruierte Plasmid pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut_HisTag(N) wurde in transformierten *E.coli*-Bakterien, welche zur Vervielfältigung des Plasmids herangezogen wurden, nachgewiesen (Abb. 4.12) und mittels Sequenzierung analysiert (Abb. 4.13 und 4.14).

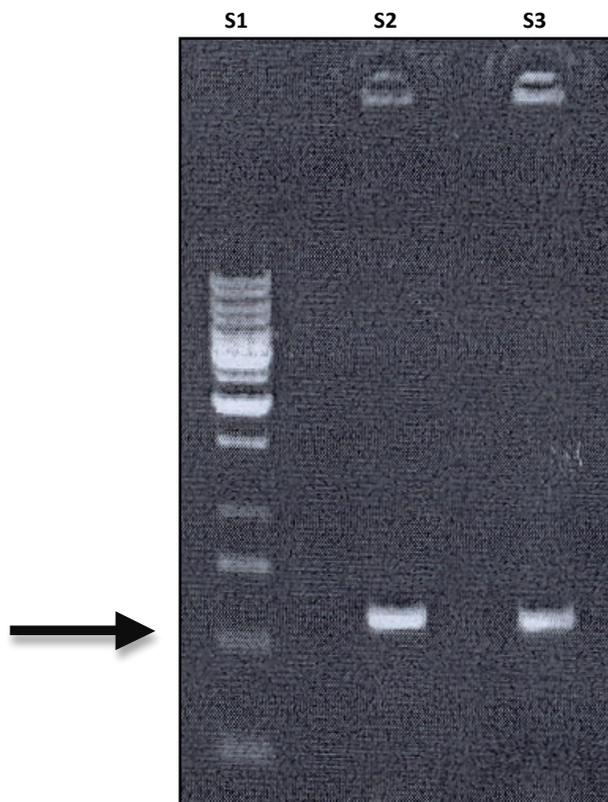


Abb. 4.12: Kolonie-PCR *E.coli*, transformiert mit pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut_HisTag(N). Die Referenzprobe Gene-Ruler™ befindet sich in Spur 1. Mittels Primer2_Forward und Primer2_Reverse wurde ein 592 bp langes Fragment der Rhodesain Δ Cmut-Gensequenz amplifiziert. Der Kolonie-PCR-Reaktionsansatz ist in Spur 2 und 3 aufgetragen. Die Bande leicht oberhalb der 500bp-Referenzbande (siehe Pfeil) entspricht dem amplifizierten Fragment. Das fluoreszierende Material in den Geltaschen entspricht dem restlichen Genmaterial der *E.coli*-Bakterien.

Zwischen dem AlphaS-Faktor und dem Rhodesain Δ Cmut liegt eine 78 bp lange Sequenz, welche C-terminal über einen Polyhistidinschwanz sowie weiter downstream über eine TEV-Schnittstelle verfügt. Diese DNA-Abschnitte sowie Rhodesain Δ Cmut liegen *in frame* mit dem Start-Codon von AlphaS. Das Stop-Codon des gesamten Transkriptionsabschnitts liegt direkt am Ende von Rhodesain Δ Cmut. Die Kex2-Schnittstelle zeigt sich intakt (Abb. 4.13, 4.14).

Das errechnete Molekulargewicht von Rhodesain Δ Cmut_HisTag(N) liegt bei 38102.4 Da, der theoretische *pI* bei 5.00, der Extinktionskoeffizient beträgt 59860 M⁻¹ cm⁻¹.

Pichia pastoris wurde mit pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut_HisTag(N), welches zuvor mit SacI verdaut wurde, transfiziert und anschließend auf selektiven, Zeocin[®]-haltigen YPDS-Agar-Platten kultiviert.

AlphaS-Sequenz + N-terminale Sequenz inkl. HisTag und TEV-Schnittstelle + Rhodesain Δ Cmut (Basen)

```

1  ATGAGATTTT CTTCAATTTT TACTGCTGTT TTATTCGCAG CATCCTCCGC ATTAGCTGCT
61  CCAGTCAACA CTACAACAGA AGATGAAACG GCACAAATTC CGGCTGAAGC TGTCATCGGT
121 TACTCAGATT TAGAAGGGGA TTTCGATGTT GCTGTTTTGC CATTTTCCAA CAGCACAAAT
181 AACGGGTTAT TGTTTATAAA TACTACTATT GCCAGCATTG CTGCTAAAAGA AGAAGGGGTA
241 TCTCTCGAGA AAAGAGAGCA TCACCATCAC CATCACCCCA TGAGCGATTA CGACATCCCC
301 ACTACTGAGA ATCTTTATTT TCAGGGCGCC ATGGCGTGCC TTGCGTCTGT CGCACTCGGG
361 TCGCTCCACG TGGAGGAGTC ATTGGAGATG CGTTTTGCTG CGTTCAAGAA GAAGTACGGC
421 AAGGTGTACA AGGATGCTAA GGAGGAAGCA TTCCGCTTCC GTGCCTTTGA GGAGAATATG
481 GAGCAGGCGA AGATTCAAGC TCGCGCGAAC CCATACGCAA CGTTTGGTGT GACACCCCTC
541 TCGGATATGA CACGTGAAGA GTTCAGGGCA CGTACCGTA ACGGCGCGTC CTACTTTGCA
601 GCTGCGCAGA AGCGGCTACG CAAGACGGTG AACGTAACCA CTGGCCGTGC TCCTGCAGCT
661 GTGGATTGGC GTGAGAAGGG AGCAGTGACC CCAGTGAAGG ATCAGGGTCA GTGCGGCTCG
721 TGCTGGGCCT TTTCAACTAT CGGCAACATC GAAGGGCAGT GGCAGGTGGC AGGAAATCCT
781 CTCGTATCCC TCTCGGAGCA GATGCTAGTG TCATGTGATA CCATTGATTT CGGCTGTGGT
841 GGTGGGCTGA TGGACAATGC CTTCAACTGG ATAGTAAATT CAAACGGTGG AAACGTATTC
901 ACGGAGGCGA GCTATCCCTA TGTTTCTGGG AATGGTGAGC AGCCACAGTG CCAGATGAAT
961 GGTACAGAGA TCGGTGCTGC GATAACAGAC CATGTTGACT TACCGCAGGA TGAGGACGCT
1021 ATCGCCGCGT ATTTGGCAGA AAACGGTCCC CTTGCTATTG CCGTTGACGC CACAAGTTTT
1081 ATGGACTATA ACGGTGGGAT TCTGACTTCA TGCACCTCCG AGCAATTGGA TCATGGTGTG
1141 CTCCTCGTTG GTTACAATGA TGCATGCAAT CCACCCTACT GGATCATCAA AAACCTCGTG
1201 AGCAACATGT GGGGCGAGGA CGGCTACATC CGCATCGAGA AGGGCACAAA CCAATGTCTC
1261 ATGAATCAGG CCGTATCCTC CGCAGTTGTT GGAGGCCCTT AA

```

AlphaS-Sequenz + N-terminale Sequenz inkl. HisTag und TEV-Schnittstelle + Rhodesain Δ Cmut (Aminosäuren)

```

1  MRFPSIFTAV LFAASSALAA PVNTTTEDET AQIPAEAVIG YSDLEGDFDV AVLPFSNSTN
61  NGLLFINTTI ASIAAKEEGV SLEKREHHHH HHPMSDYDIP TTENLYFQGA MACLASVALG
121 SLHVEESLEM RFAAFKKKYG KVKDAKEEA FRFRAFEENM EQAKIQAAAN PYATFGVTPF
181 SDMTREEFRA RYRNGASYFA AAQKRLRKTV NVTTGRAPAA VDWREKGAVT PVKDQGCQGS
241 CWFSTIGNI EGQWQVAGNP LVSLSEQMLV SCDTIDFGCG GGLMDNAFNW IVNSNGGNVF
301 TEASYPYVSG NGEQPQCOMN GHEIGAAITD HVDLPQDEDA IAAYLAENGP LAIAVDATSF
361 MDYNGGILTS CTSEQLDHGV LLVGYNDASN PPYWIIKNSW SNMWGEDGYI RIEKGTNQCL
421 MNQAVSSAVV GGP

```

Abb. 4.13: AlphaS-Sequenz + N-terminale Sequenz inkl. HisTag und TEV-Schnittstelle + Rhodesain Δ Cmut. Alpha-Factor Signal Sequenz (blau), Kex2 Cleavage Erkennungssequenz (blau unterstrichen), Rhodesain Δ Cmut (schwarz, grau unterlegt), Mutation des Rhodesain Δ C (rot), N-terminale Sequenz aus pETM11-Vektor (schwarz/grün, nicht grau unterlegt), N-terminaler HisTag (hellgrün), TEV-Schnittstelle (dunkelgrün und unterstrichen).

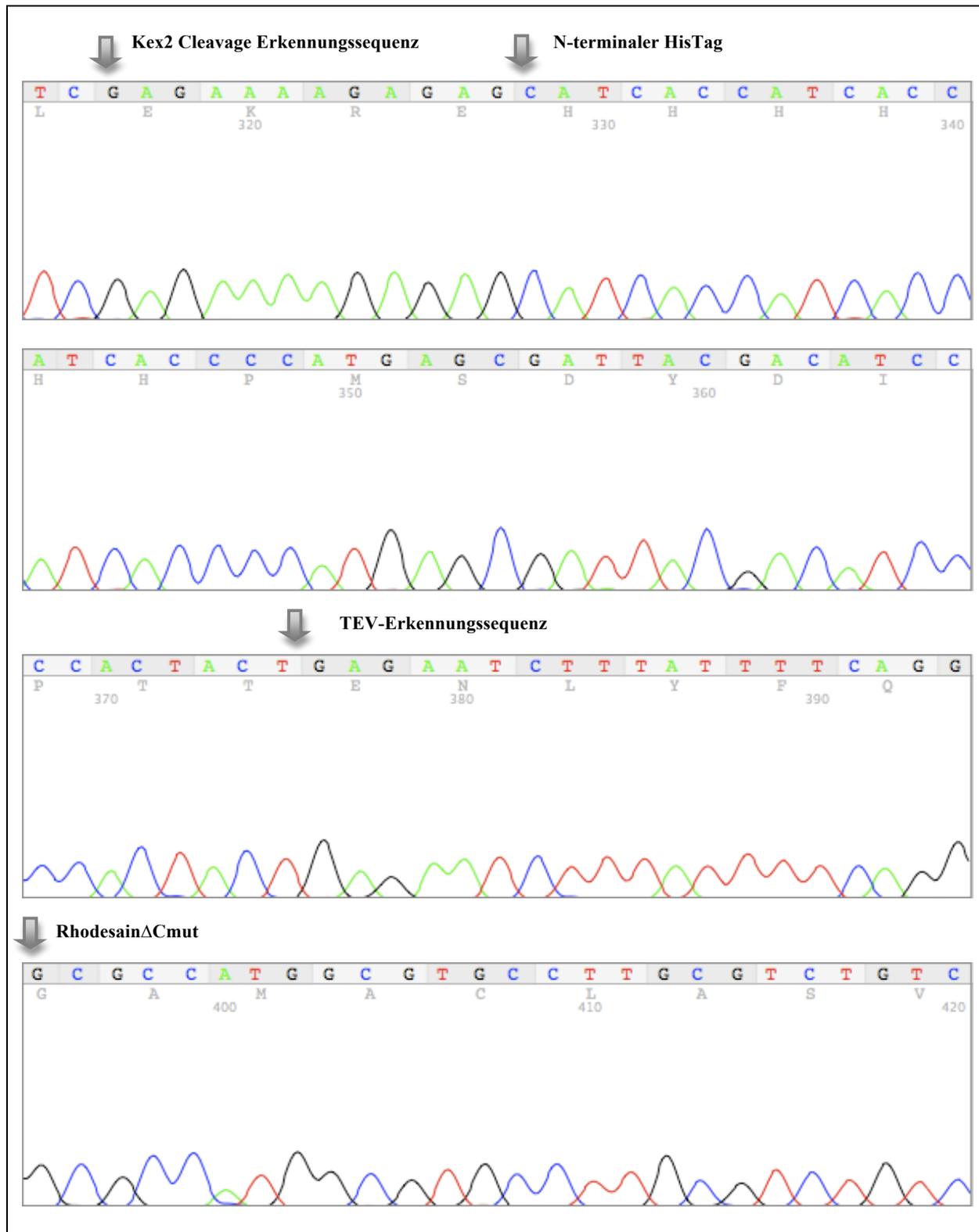


Abb. 4.14: Teilsequenzierungsergebnisse der multiplen Klonierungsstelle von pPICZαB, integrierter RhodesainΔCmut-Sequenz, N-terminalem HisTag und TEV-Erkennungssequenz. Dargestellt mit 4PEaks. (Die Nummerierung der Basenlokalisierung richtet sich nach dem Primer und ist daher nicht mit der Basennummerierung im Rhodesaingengleichzusetzen). Fortlaufende Sequenz von oben links nach unten rechts, darunter KEX2 Cleavage Erkennungssequenz, N-terminaler HisTag, TEV-Erkennungssequenz sowie Beginn der RhodesainΔCmut-Sequenz.

4.2 Rhodessain-Überexpression

Die transfizierten *Pichia pastoris* Kulturen können ein Protein exprimieren und in das Wachstumsmedium sekretieren, so dass bereits ohne vorherige Konzentrationsverfahren 24 h nach Induktion mittels SDS-PAGE das Protein nachweisbar ist. Dies trifft für alle drei Plasmide pPICZ α B_Rhodessain Δ Cmut, pPICZ α B_Rhodessain Δ Cmut_HisTag(C), sowie pPICZ α B_Rhodessain Δ Cmut_HisTag(N) zu. Eine weitere Proteinemengenzunahme nach 68 h ist hinsichtlich der Analyse mit SDS-PAGE nicht gegeben (Abb. 4.15, Tab. 1). Die detektierte Bande läuft in Höhe der vorausgesagten Lauffront für Rhodessain Δ Cmut (Caffrey, 2001) (Abb. 4.15). Ohne die Probe aufzukonzentrieren, scheint der Überstand nach Zentrifugation bei 2500 g für 5 min relativ frei von anderen Proteinen zu sein. Wird die Probe allerdings mit Hilfe eines Centricon® aufkonzentriert, werden weitere Banden entlang der gesamten Laufbahn eminent, insbesondere eine Bande direkt oberhalb der auffallend kräftigen Bande im Bereich von 26 kDa sowie eine diskrete Bande bei 11 und 17 kDa (Abb. 4.16).

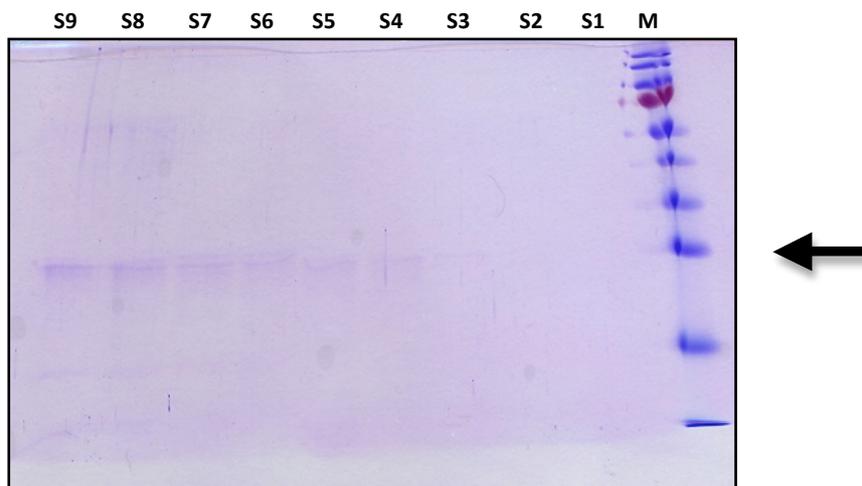


Abb. 4.15: Expressionstest. Proben der zur Expression induzierten *Pichi pastoris* Kultur wurden zu den in Tab. 1 angegebenen Zeitpunkten entnommen, für 5 min bei 2500 g zentrifugiert und der Überstand mittels SDS-PAGE analysiert. Die Proben wurden nicht aufkonzentriert. Eine erste Bande ist nach 24 h zu erkennen und befindet sich auf Höhe der 26kDa-Referenzbande (Pfeil). Dies entspricht der Bande für Rhodessain Δ Cmut (Caffrey, 2001). Nach 68 h nimmt die Bande an Intensität in der SDS-PAGE nicht weiter zu. In Spur M befindet sich der Marker Prestained Protein Ladder Pager Ruler™.

Tab. 4.1: Rhodessain-Expressionsprotokoll. Gel-Spur nimmt bezug auf Abb. 4.15.

Gel-Spur	1	2	3	4	5	6	7	8	9
d seit Induktion	1	1	1	1	2	2	3	4	4
Methanolzugabe	x				x		x		
h nach Induktion	0	6	12	24	38	44	68	88	95

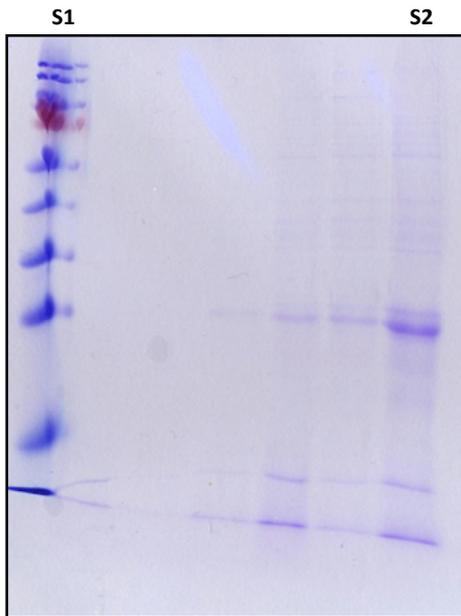


Abb. 4.16: Expressionstest. Eine 19 ml Probe der zur Expression induzierten *Pichia pastoris* Kultur wurde 68 h nach Induktion entnommen, für 5 min bei 2500 g zentrifugiert und der Überstand mittels Centricon (MWCO 5000) von 19 ml auf 4 ml einkonzentriert. Anschließende Analyse mittels SDS-PAGE. Der Marker Prestained Protein Ladder Pager Ruler™ auf Spur 1. Eminent sind in Spur 2 eine auffallend kräftige Bande im Bereich von 26 kDa, eine diskrete Bande direkt darüber, sowie jeweils eine scharfe Bande in der Höhe von 11 und 17 kDa. Zwischen Spur 1 und Spur 2 sind andere Proben aufgetragen, welche hier nicht weiter diskutiert werden.

4.3 Rhodessain-Aufreinigung

Die *Pichia pastoris* Kultur wurde 68 h nach Induktion für 45 min bei 16000 rpm und 4°C zentrifugiert, danach an einer Glasfasermembran filtriert und anschließend langsam (>1 h) mit 1 M NaCl versetzt (Abb. 4.17). Die Probe wurde bei einer Flussrate von 1ml/min auf eine Phenylsepharose-Säule aufgetragen und mit Hilfe eines Gradienten in der Elutionslösung (ausgehend von 1 M NaCl und Verringerung bis zu 50 mM NaCl) aufgetrennt.

Die gemessene UV-Absorption gegenüber dem Eluat zeigte drei signifikante, diskrete Peaks (Abb. 4.18). Der erste Peak tritt bei einer NaCl-Konzentration um 530 mM auf. Die korrespondierenden Elutionsfraktionen weisen in der SDS-PAGE eine einzelne, intensive, diskrete Bande auf Höhe der 26 kDa-Bande der Referenzprobe ohne signifikanten Hintergrund in der restlichen Spur auf (Abb. 4.19). Elutionsfraktionen zeitlich vor dem ersten Peak zeigen zum Teil Doppelbanden auf derselben Höhe. Die SDS-PAGE der

Elutionsfraktionen des zweiten Peaks zeigen einen deutlichen Schmier im Bereich <26 kDa (Abb. 4.19).

Die Säule wurde nach dem Lauf mit ddH₂O gewaschen, wobei die UV-Absorption nach 20 ml nochmals einen diskreten, hohen Peak zeigt. Die korrespondierenden Elutionsfraktionen weisen allerdings keine eindeutige Bande im Bereich 26kDa nach (Abb. 4.19C).

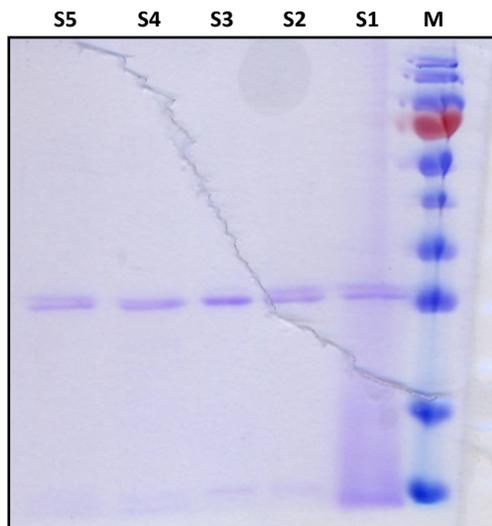


Abb. 4.17: SDS-Polyacrylamidgel. Proteinmarker (Spur M). Überstand der Hefekultur nach Expressionsphase (Spur 1), Probe nach Zentrifugation bei 16000 rpm (Spur 2), Probe nach Filtration (Spur 3), Probe nach Zugabe von 1 M NaCl (Spur 4+5). Alle Proben wurden vor dem Auftrag zur besseren Darstellung mittels eines Centricon® leicht aufkonzentriert.

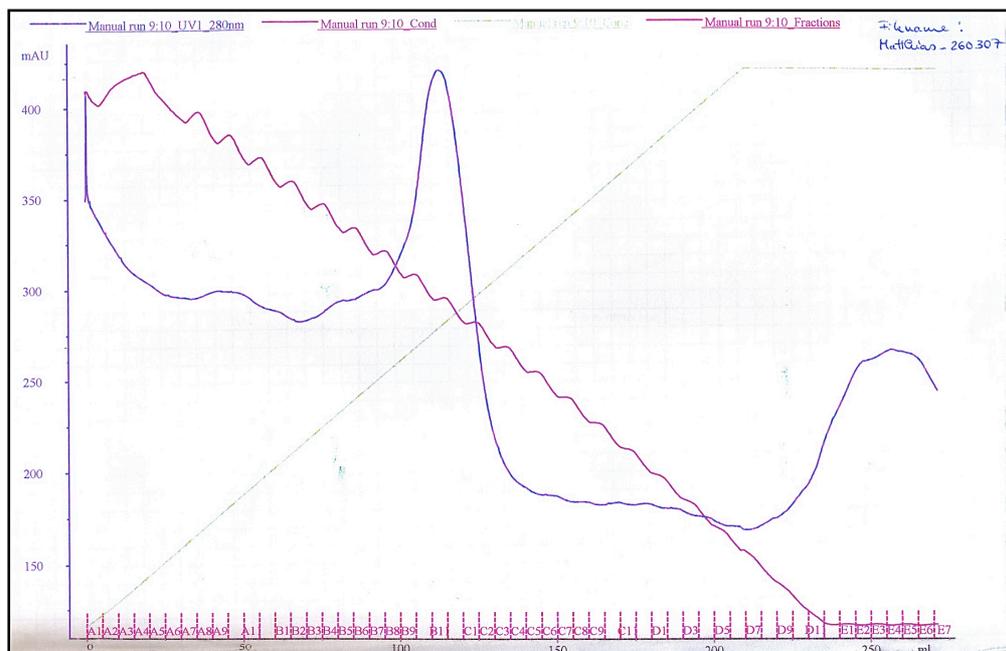
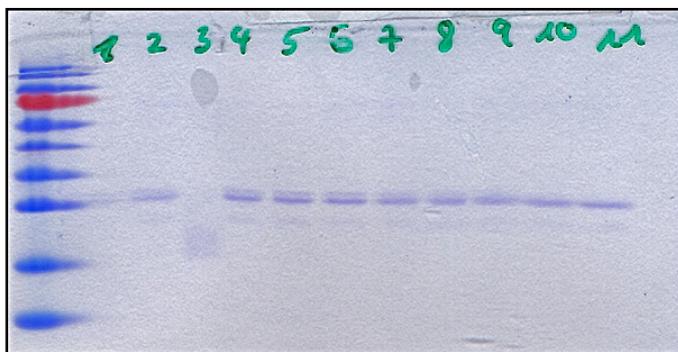
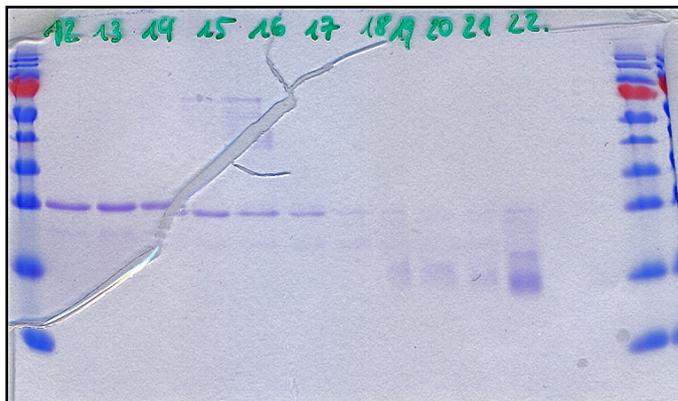


Abb. 4.18: HI-Chromatographie mit einer Phenylsepharose®-Säule. 275ml Elutionsvolumen aus 55 Fraktionen (A1 bis E7) a 5 ml, UV Detektion der Elution bei 280nm [mAU] (blau), Konduktivität (pink), Gradient der Elutionslösung von 1 M NaCl zu 50 mM NaCl (grün).

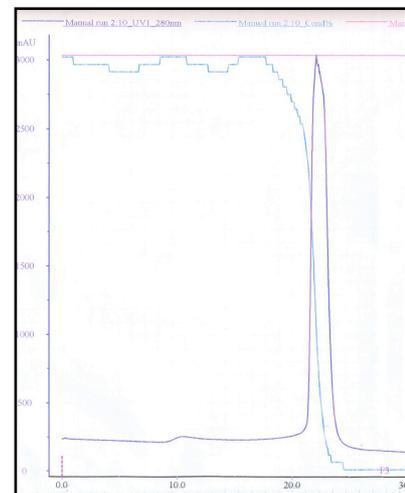
Elutionsfraktionen, bei denen nur eine einzelne Bande auf Höhe des 26kDa-Referenzmarkers ohne signifikanten Hintergrund in der SDS-PAGE zu erkennen war, wurden kumuliert, mit dem Centricon® auf 8 ml konzentriert und mittels Größenausschlusschromatographie einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen. Die UV-Absorption zeigte einen diskreten Peak nach ungefähr 230 ml Elutionsvolumen (Abb. 4.20). Die dazu korrespondierenden Elutionsfraktionen ergaben in der Analyse mittels SDS-PAGE einzelne, diskrete Banden auf Höhe der 26 kDa-Referenzbande. Diese Fraktionen wurden kumuliert und mit dem Centricon® für Kristallisationsexperimente auf >7 mg/ml konzentriert.



A



B



C

Abb. 4.19: SDS-PAGE der HIC-Elutionsfraktionen (A +B), Waschfraktion der HIC (C). A+B: Marker (links bzw. rechts außen), Durchfluss (Spur 1), Waschfraktion (Spur 2), Fraktion A1 (Spur 4), Fraktion A4 (Spur 5), Fraktion A8 (Spur 6), Fraktion A9 (Spur 7), Fraktion B1 (Spur 8), Fraktion B5 (Spur 9), Fraktion B7 (Spur 10), Fraktion B9 (Spur 11), Fraktion B10 (Spur 12), Fraktion B11 (Spur 13), Fraktion B12 (Spur 14), Fraktion C1 (Spur 15), Fraktion C2 (Spur 16), Fraktion C3 (Spur 17), Fraktion D1 (Spur 18), Fraktion E1 (Spur 19), Fraktion E4 (Spur 20), Fraktion E6 (Spur 21), H2O-Waschfraktion I (Spur 3), H2O-Waschfraktion II (Spur 22). C: H₂O-Waschfraktion II (30 ml). UV Detektion der Elution bei 280 nm [mAU] (dukelblau), Peak nach 22 ml, Konduktivität (hellblau).

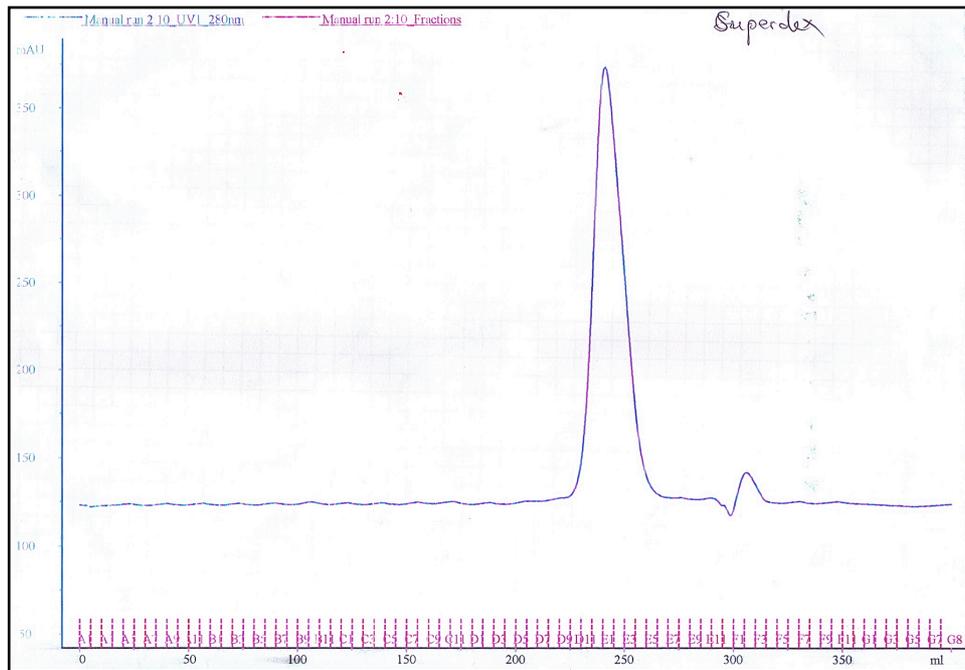


Abb. 4.20: Gelfiltrationschromatographie. 400ml Elutionsvolumen aus 80 Fraktionen (A1 bis G8) a 5 ml. UV Detektion der Elutionsfraktionen bei 280 nm [mAU]. Diskreter, hoher Peak nach ca. 250 ml.

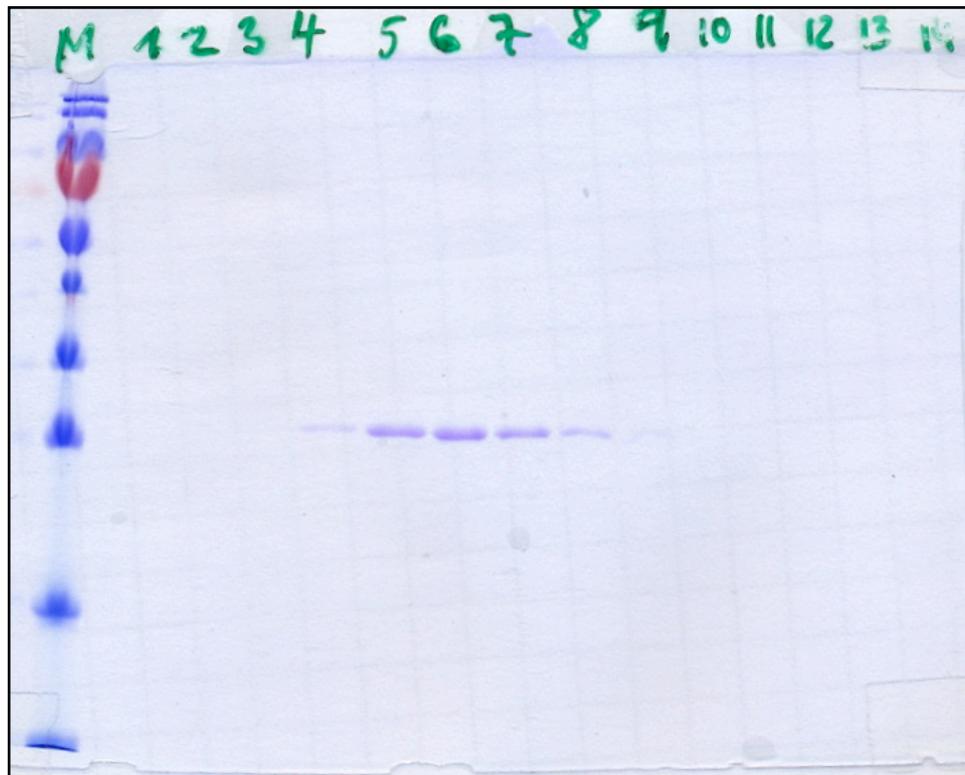


Abb. 4.21: SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Gelfiltrationschromatographie. A: M= Marker, Fraktion B9 (Spur 1), Fraktion D8 (Spur 2), Fraktion D9 (Spur 3), Fraktion D10 (Spur 4), Fraktion D11 (Spur 5), Fraktion D12 (Spur 6), Fraktion E1 (Spur 7), Fraktion E2 (Spur 8), Fraktion E3 (Spur 9), Fraktion E4 (Spur 10), Fraktion E5 (Spur 11), Fraktion E12 (Spur 12), Fraktion F1 (Spur 13), Fraktion G1 (Spur 14).

Lagerung von Rhodesain

Rhodesain wurde bei 4°C gelagert und war für längere Zeit stabil. Nach 6 Monaten lassen sich im Vergleich zu aktuell exprimiertem Rhodesain in der SDS-PAGE keine signifikanten Abbaubanden erkennen (Abb. 4.22). Sowohl nach 6 als auch nach 12 Monaten war noch immer eine starke Aktivität im Rhodesain-Assay nachzuweisen.

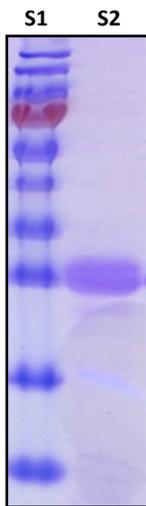


Abb. 4.22: SDS-PAGE. 6 Monate alte Rhodesainprobe (14 mg/ml, Doppelbandenfraktion), gelagert bei 4°C. A: Marker (Spur 1), Rhodesainprobe (Spur 2).

Aufreinigung der Rhodesainmoleküle mit HIS-Tag

Die exprimierten Proteine Rhodesain Δ Cmut_HisTag(C) sowie Rhodesain Δ Cmut_HisTag(N) wurden während der Affinitätschromatographie trotz des Versuchs mit verschiedenen Imidazolkonzentrationen und unterschiedlichen pH-Werten nicht an die Nickel-Säule gebunden.

4.4 Rhodesain-Charakterisierung

Rhodesain-Assay

Der Rhodesain-Assay wies in Kulturen aller drei *Pichia pastoris* Stämme (pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut, Rhodesain Δ Cmut_HisTag(C), Rhodesain Δ Cmut_HisTag(N)) Rhodesain-Aktivität nach. Kulturen, dessen Überstand die größte Rhodesain-Aktivität aufwies, wurden für die weitere Kultivierung, Überexpression und Langzeitlagerung verwendet.

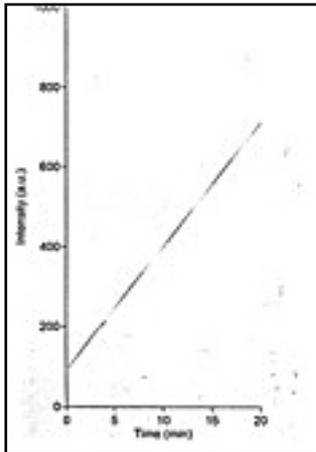


Abb. 4.23: Rhodessain-Aktivitäts-Assay mit dem Überstand der Kultur *Pichia pastoris* pPICZ α B_Rhodessain Δ Cmut. Anregungswellenlänge 380 nm, Detektionswellenlänge 460 nm. Die Aktivität entspricht dem Quotienten aus Intensität (y-Achse) und Zeit (x-Achse).

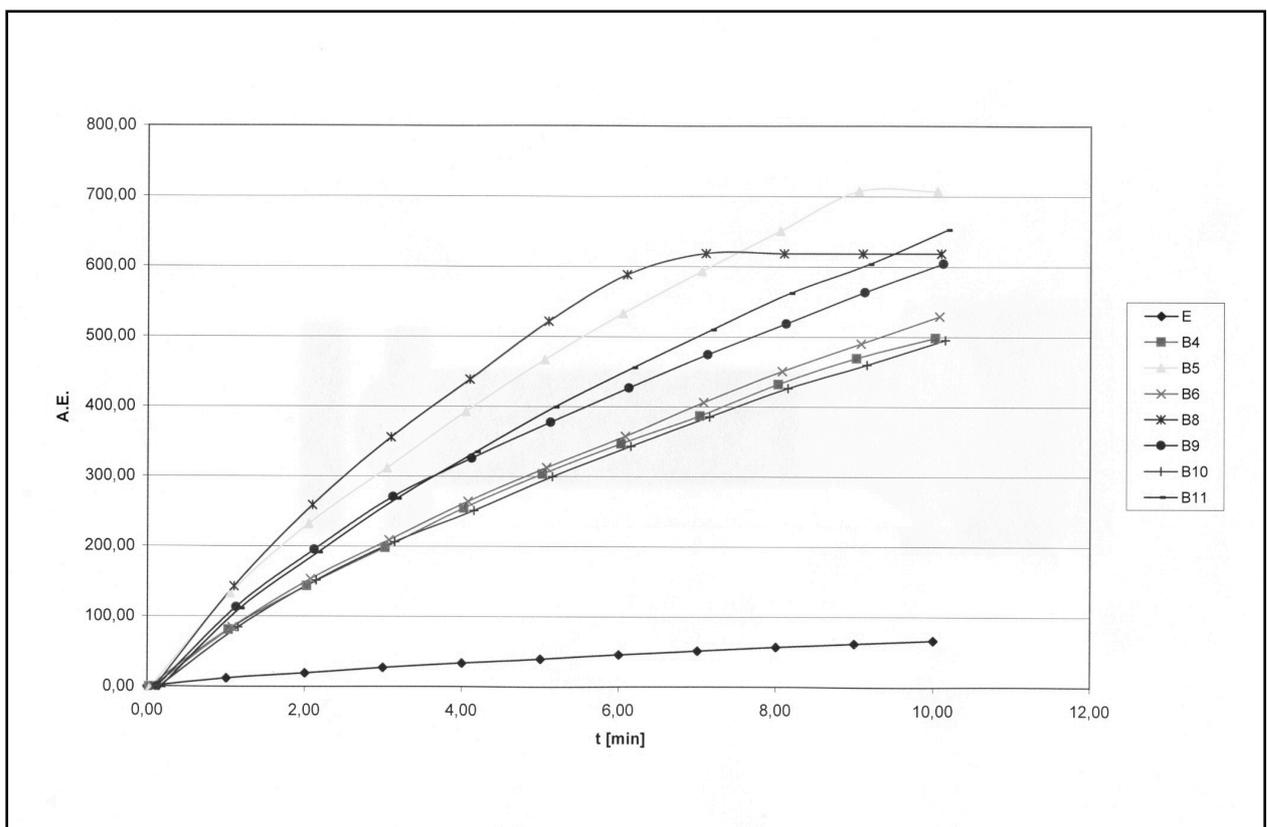


Abb. 4.24: Rhodessain-Aktivitäts-Assay mit dem Überstand der Kultur *Pichia pastoris* pPICZ α B_Rhodessain Δ Cmut_HisTag(N) (Kurve B6). Anregungswellenlänge 380 nm, Detektionswellenlänge 460 nm. Die Aktivität entspricht dem Quotienten aus Intensität (y-Achse) und Zeit (x-Achse). Die Kurven E, B4, B5, B8-B11 sind von weiteren Versuchen mit unterschiedlicher Dauer der Expressionsphase und unterschiedlichen Hefe-Konzentrationen, welche hier nicht weiter diskutiert werden.

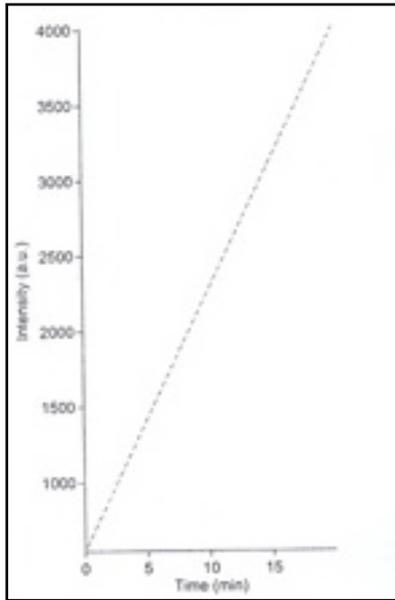


Abb. 4.25: Rhodesain-Aktivitäts-Assay mit dem Überstand der Kultur *Pichia pastoris* pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut_HisTag(C). Anregungswellenlänge 380 nm, Detektionswellenlänge 460 nm. Die Aktivität entspricht dem Quotienten aus Intensität (y-Achse) und Zeit (x-Achse).

Massenspektrometrie

Die im SDS PAGE nachgewiesene 26 kDa Proteinbande wurde mittels Massenspektrometrie analysiert. Sie entspricht dem Protein Rhodesain Δ Cmut.

Das zu analysierende Protein wurde hierzu gespalten und aus den Spaltprodukten 4 Peptide identifiziert (Abb. 4.26/4.27 und Tab. 4.2). Die Analyse erfolgte durch die Arbeitsgruppe Sickmann (RVZ).

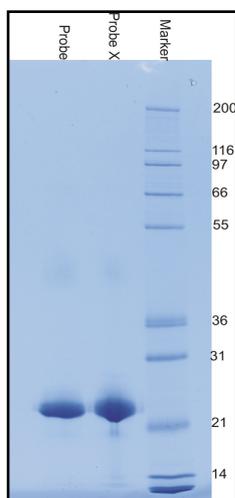


Abb. 4.26: SDS-PAGE der zu analysierenden Proteinprobe. In Spur „Probe“ und „ProbeX“ sind zwei unterschiedliche Konzentrationen der gleichen Proteinlösung aufgetragen. Die Proteinbanden, die oberhalb von 21 kDa in den Spuren „Probe“ und „ProbeX“ vorliegen, wurden mittels Massenspektrometrie analysiert.

Tab. 4.2: Auswertung der Massenspektrometrie. Analysiert wurde die Proteineprobe Rhodesain Δ Cmut. Vier Peptide (blau) konnten N-terminal abgespalten und identifiziert werden.

Query	Observe	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank
<u>1095</u>	443.25	884.48	884.98	-0.50	0	69	3.1e-006	1
<u>1241</u>	464.83	927.65	928.08	-0.43	1	47	0.00054	1
<u>2710</u>	866.16	1730.30	1730.81	-0.51	0	77	4e-007	1
<u>3045</u>	954.32	1906.63	1906.10	0.53	0	115	5.3e-011	1

Query	Peptide
<u>1095</u>	R.APAVDWR.E 1089 1091 1092 1093 1094 1096 1097 1098 1099 1102
<u>1241</u>	R.EKGAIVPK.D 1242
<u>2710</u>	K.NSWSNMWGEDGYIR.I 2672 2673 2674 2675 2677 2679 2680 2711 2712 2713 2714 2715 2716 2717 2719
<u>3045</u>	K.GTNQCLMNQAVSSAVVGGP.- 2989 2991 2992 2993 2994 2995 3038 3040 3042 3044 3046

ACLASVALGS	LHVEESLEMR	FAAFKKKYGK	VYKDAKEEAF	RFRAFEENME	QAKIQAAANP
YATFGVTPFS	DMTREFRFR	YRNGASYFAA	AQKRLRKTVN	VTTGRAPAAV	DWREKGAIVP
VKDQGQCGSC	WAFSTIGNIE	GQWQVAGNPL	VSLSEQMLVS	CDTIDFGCGG	GLMDNAFNWI
VNSNGGNVFT	EASYPYVSGN	GEQPQCQMNG	HEIGAAITDH	VDLPQDEDAI	AAYLAENGPL
AIAVDATSFM	DYNGGILTSC	TSEQLDHSV	LVGYNDASNP	PYWIIKNSWS	NMWGEDGYIR
IEKGTNQLM	NQAVSSAVVG	GP			

Abb. 4.27: Rhodesain Δ Cmut-Sequenz. Identifizierte Aminosäuresequenzen sind blau dargestellt.

4.5 Kristallisation

Co-Kristallisationsversuche mit Rhodesain und den Inhibitoren RV134C sowie RV112D wurden, um die Löslichkeit der Inhibitoren zu garantieren, mit einer Endkonzentration von 10% DMSO durchgeführt. Wenn Polyethylenglykol in Verbindung mit anderen Fällungsmitteln und Puffern als Präzipitans eingesetzt wurde, traten nach Stunden bis Tagen Kristalle auf (Abb. 4.28). Das Diffraktionsbild von wenigen, sehr markanten Aufhellungen zeigte allerdings nicht das für eine Diffraktion am Proteinkristall typische Muster.

Bei Kristallisationsversuchen in Abwesenheit eines Inhibitors und bei einer Proteinkonzentration von 14.5 mg/ml wurden unter folgenden Bedingungen (Bed.) Mikrokristalle erhalten:

Bed.1: 0.4 M Lithiumsulfat ($\text{Li}_2\text{O}_4\text{S}\cdot\text{H}_2\text{O}$), 27% w/v PEG4000, 0.1 M BisTris Propane pH 7.0, 4°C

Bed.2: 0.4 M Natriumformiat (HCOONa), 0.1 M HEPES pH 7.0, 20% PEG 3350, 4°C

Bed.3: 0.6 M Natriumiodid ($\text{NaI}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 0.1 M ADA pH 6.5, 10% MPD, 4°C

Bed.4: 1.6 M Ammoniumsulfat ($\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$), 0.1 M MES Monohydrat pH 6.5, 10% v/v 1,4-Dioxane

Neben den Kristallen der Bedingung 2, wurden nach Optimierungsversuchen mittels Streak-Seeding, Micro-Seeding sowie Variieren der pH-Konzentration und der Reservoirzusammensetzung Kristalle folgender Bedingungen am ESRF untersucht:

Bed.5: 1.0 M Ammoniumsulfat ($\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$), 0.1 M BisTris pH 5.5, 25% Ethanol, 0.01 M Cobalt(II)Cl

Bed.6: 1.6 M Ammoniumsulfat ($\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$), 10% 1,4-Dioxan, 0.1 M MES pH 6.9

Bed.7: 1.9 M Ammoniumsulfat ($\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$), 10% 1,4-Dioxan, 0.1 M MES pH 6.9

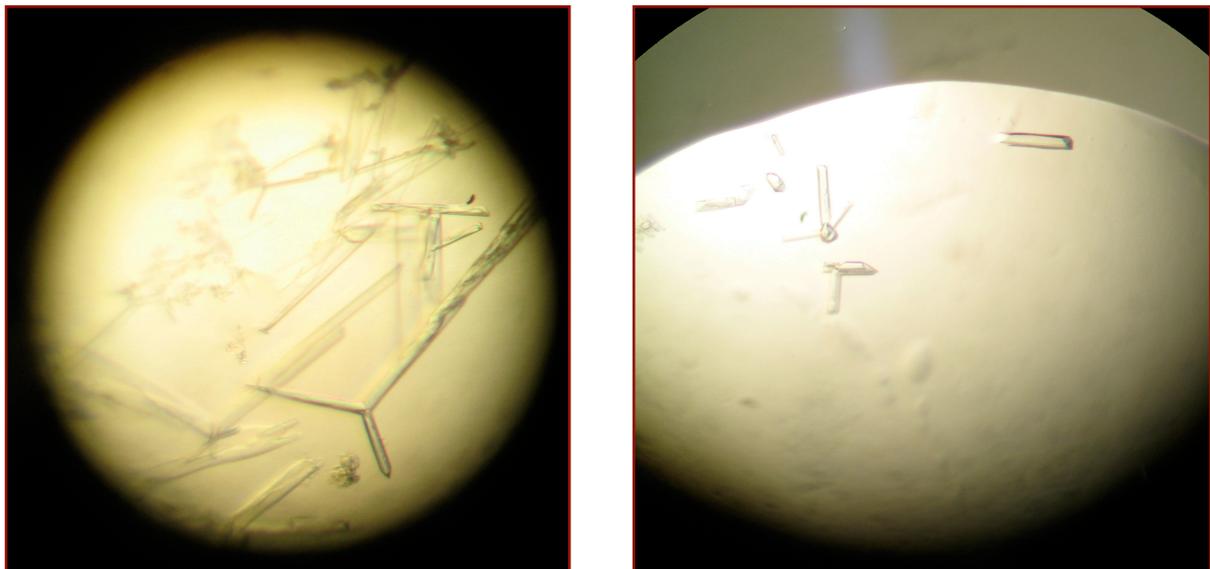


Abb. 4.28: Kristalle bei Co-Kristallisationsversuchen von Rhodesain mit RV134C.

Während sich innerhalb weniger Tage unter den Bedingungen 2 und 5 wenige, große, stabile Kristalle bildeten, formierten sich unter den Bedingungen 6 und 7 viele, kleine, längliche Kristalle (Abb. 4.29, 4.30). Hierbei lagen stabile und fragile Kristalle nebeneinander vor, welche nicht immer voneinander optisch zu unterscheiden waren. Die zerbrechlichen Kristalle wurden schon bei äußerst feinfühligem und leichten Berührungen mit einer Stecknadel zerstört.

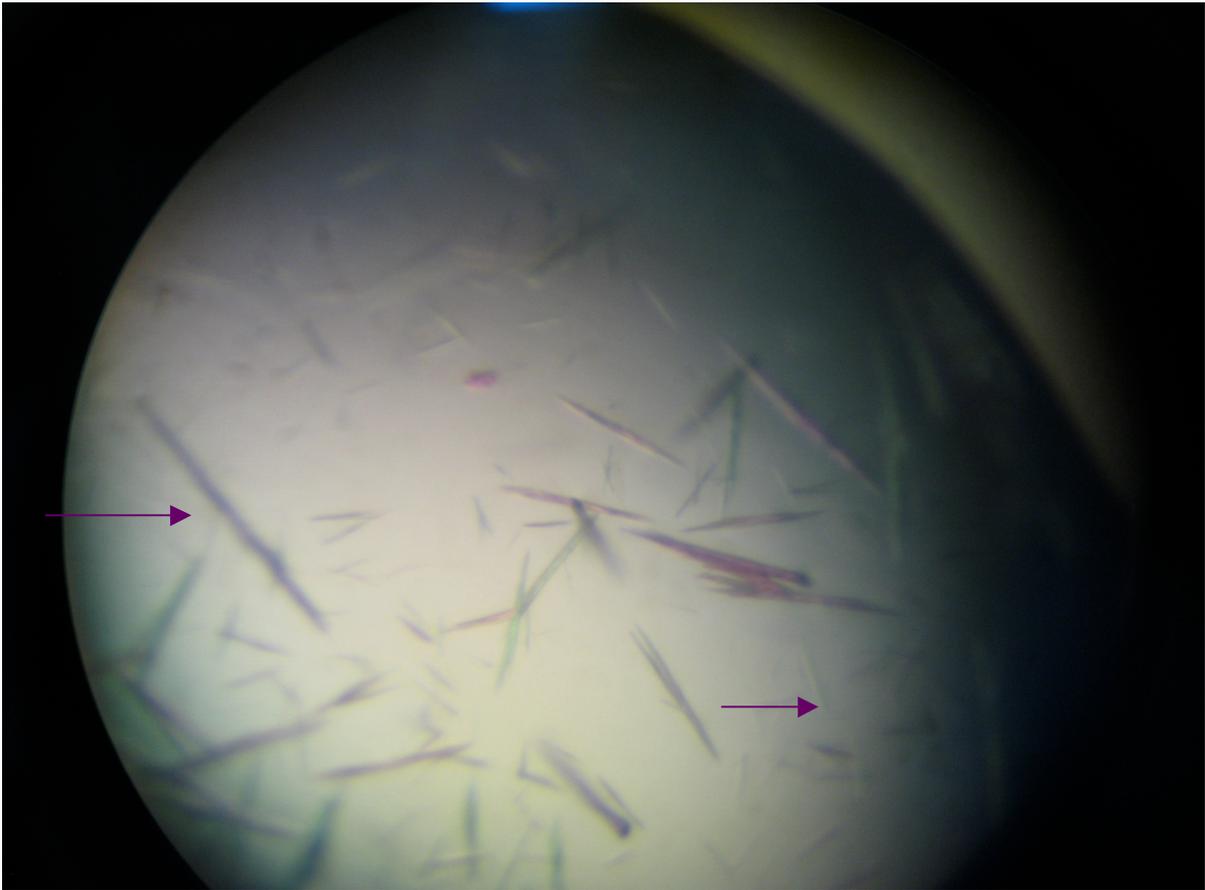


Abb. 4.29: Kristallisationsbedingung 6. Stabile, große Kristalle (linker Pfeil) sowie fragile, kleine Kristalle (rechter Pfeil).

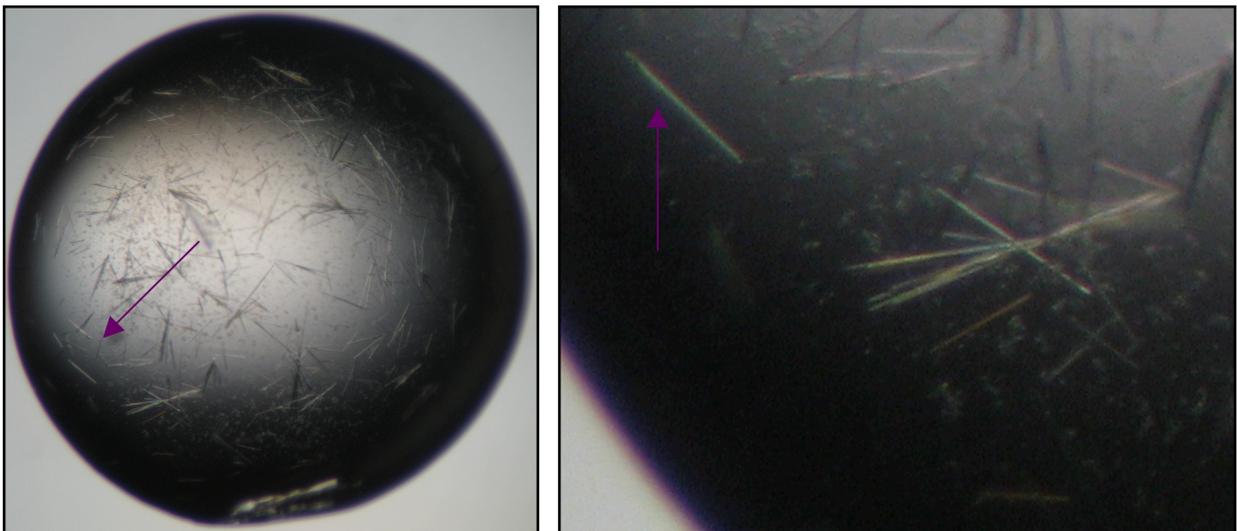


Abb. 4.30: Kristallisationsbedingung 7 (+ Inhibitor-Soaking). Links: Übersicht des Tropfens. Rechts: Vergrößerung des linken, unteren Quadranten des Tropfens. Pfeile deuten auf den röntgenanalytisch untersuchten Kristall.

4.6 Röntgenaufnahmen

Die Kristalle wurden mit monochromatischer, elektromagnetischer Strahlung der Wellenlänge 0.97625 Å vermessen (Tab. 4.3 und 4.4). Dabei zeigten einige Diffraktionsbilder ein für Salzkristalle typisches Muster, zwei Messungen ergaben kein Muster und drei Kristalle ergaben ein für Proteinkristalle typisches Muster. Der Kristall aus Hülse Bedingung Nr. 7 (1.9 M Ammoniumsulfat, 10% 1,4-Dioxan, 0.1 M MES pH 6.9) welcher eine Stunde vor der Messung mit dem Inhibitor UM110 getränkt wurde, erzeugte ein für Proteinkristalle typisches, schwaches Diffraktionsbild mit einer maximalen Auflösung bis zu 3.04 Å (Expositionszeit = 60.0 s) (Abb. 4.31/ 4.32).

Tab. 4.3: Pack 467a. Röntgenkristallographisch analysierte Proben.

Hülse Nr.	Kristallisationsplatten-Nr.	Kristallisationsbedingung	Diffraktionsbild
2	PL 14, Well C3	Bed. 6	Salz-typisch
3	PL 14, Well C3	Bed. 6	kein Muster
4	PL 14, Well C3	Bed. 6	kein Muster
5	PL 14, Well C3	Bed. 6	Salz-typisch
6	PL 26, Well B4	Bed. 7	kein Muster
7	PL 14, Well C3	Bed. 6	Protein-typisch
8	PL 26, Well C3	Bed. 7 + Inhibitor-Soaking	Protein-typisch, Streuung bis <3.04Å

Tab. 4.4: Pack 139a. Röntgenologisch analysierte Proben.

Tube Nr.	Kristallisationsplatten-Nr.	Kristallisationsbedingung	Diffraktionsbild
1	PL 14, Well C3	Bed. 6	Protein-typisch
2	PL 14, Well C3	Bed. 6	Salz-typisch
3	PL 14, Well C3	Bed. 6	Salz-typisch
4	PL Topaz 2, Well C4	Bed. 2	Salz-typisch
5	PL Ethanol, Well A6	Bed. 5	Salz-typisch
7	PL Ethanol, Well A6	Bed. 5	Salz-typisch
8	PL Ethanol, Well A6	Bed. 5	Salz-typisch

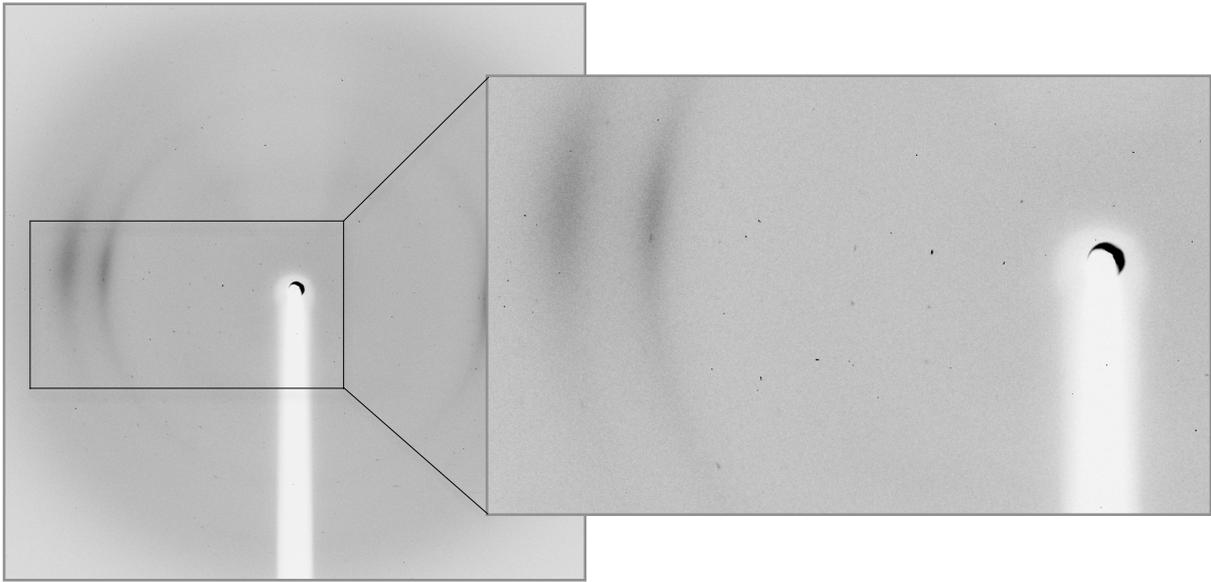


Abb. 4.31: Diffractionsbild des Kristalls aus Bedingung Nr. 7 (1.9 M Ammoniumsulfat, 10% 1,4-Dioxan, 0.1 M MES pH 6.9), zuvor getränkt mit Inhibitor UM110. Schwaches für Protein typisches Diffractionsbild, maximale Auflösung bis zu 3.04Å. Wellenlänge 0.97624Å, Expositionszeit 60s.

5. DISKUSSION

5.1 Projektübersicht

Projekte, welche die Röntgenkristallstrukturanalyse von einzelnen, spezifischen Proteinen zum Ziel haben, umfassen häufig eine typische Abfolge von Versuchen und Arbeitsschritten. Ausgehend von dem genetischen Code des zu analysierenden Proteins, wird die gewünschte DNA-Sequenz in einen probaten Vektor integriert und dieser anschließend in ein geeignetes Expressionssystem inkludiert. Wird das Protein extrazellulär exprimiert, liegt es in einem heterogenen Stoffgemisch vor, welches über meist mehrere Verfahren aufgereinigt wird. Das Protein wird anschließend stark aufkonzentriert und mit Hilfe von zahlreichen, unterschiedlichen Präzipitantien auf Kristallbildung hin untersucht. Erfolgreiche Bedingungen werden optimiert. Kristalle können dann an Röntgengeneratoren hinsichtlich ihres Diffraktionsmusters (Richtung + Intensität) analysiert werden und liefern unter optimalen Bedingungen die Informationen, um später mit der Phaseninformation zusammen das gewünschte Protein auf atomarer Ebene dreidimensional am Computer zu rekonstruieren.

Den Ausgang der vorliegenden Arbeit stellte das Plasmid pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut dar, welches von Prof. Dr. C. Caffrey, Kooperationspartner am Sandler Center (Californien, USA), dem Institut zur Verfügung stellte. Rhodesain Δ Cmut wurde von Caffrey et al. in den Vektor pPICZ α B kloniert und setzt sich lediglich aus einer zentralen Region, welche der katalytischen Domäne entspricht, und einer Pro-Region, welche für die korrekte Faltung der zentralen Region von Bedeutung ist, zusammen (Caffrey, 2001; Cygler, 1997). Full-Length-Rhodesain besteht hingegen zusätzlich aus einem Pre-peptid sowie einem Carboxy-Terminus. Der Carboxy-Terminus setzt sich aus 9 konsekutiven Prolinen sowie weiteren 100 Aminosäuren, darunter 8 Cysteinen, zusammen. Sowohl Pre-Peptid als auch C-Terminus sind für die Aktivität von Rhodesain nicht entscheidend. Ihre Funktion ist bisher im Wesentlichen unklar, eine Rolle als Signalsequenz für den Transport innerhalb der Zelle werden diskutiert (Pamer, 1990; Mottram, 1989).

Rhodesain Δ Cmut enthält eine von Caffrey et al. eingefügte Mutation im Bereich der Glykosylierungsstelle N-X-S/T. Die deglykosylierte Form ist für Kristallisationsprojekte geeigneter, da Zuckerketten die Kristallbildung tendenziell behindern.

Der im Vektor dem Rhodesain Δ Cmut-Gen vorgelagerte und im selben Transkriptionsabschnitt liegende Alpha-Faktor ist die Signalsequenz für die Sekretion des Proteins in das extrazelluläre Wachstumsmedium. Eine zwischen Alpha-Faktor und Rhodesain Δ Cmut-Gen liegende Kex-2-Schnittstelle (Lys-Arg[^]Glu-Ala) ermöglicht intrazellulär die Abspaltung des Alpha-Faktors vom restlichen Protein, so dass extrazellulär das gewünschte, rekombinante Protein ohne Alpha-Faktor vorliegt (Invitrogen, 2002).

```

001 mprtemvrfv rlpvllama aclasvalgs lhveeslemr faafkkkygk vykdaeeaf
061 rfrafeenme qakiqaaanp yatfgvtpfs dmtreefrar yrngasyfaa aqkrlrktvn
121 vttgrapaav dwregavtp vkdqggcgsc wafstignie gqwqvagnpl vslseqmlvs
181 cdtidfgcgg glmdnafnwi vnsnggnvft easypyvsgn geppqcqmng heigaaithd
241 vdlpqdedai aaylaengpl aiavdatsfm dynggiltsc tseqldhgv1 lvgyndssnp
301 pywiiknsws nmwgedgyir iekgtngclm nqavssavvg gptpppppppp ppsatftqdf
361 cegkgctkgc shatfptgec vqttgvgsvi atcgasnlqt iiyplrsrscs glsvpitvpl
421 dkcipiligs veyhcstnpp tkaarlvpqh

```

Abb. 5.1: Aminosäuresequenz von Full Length Rhodesain (450 Aminosäuren, MW 48431.8 Da). N- und C-terminale Sequenz, welche bei Rhodesain Δ C fehlt, ist grau dargestellt.

Da die Affinitätschromatographie eine attraktive Methode zur Isolierung eines Proteins darstellt und die Aufreinigung von Rhodesain Δ Cmut vereinfachen würde, wurden zwei modifizierte Plasmide konstruiert. Bei Rhodesain Δ CmutHisTAG(N) wurde N-terminal eine Histidin-Sequenz hinzugefügt, bei Rhodesain Δ CmutHisTAG(C) wurde diese C-terminal integriert. Die Lösungen, die die exprimierten Proteine enthielten, wurden über eine Nickel-NTA-Säule gegeben, zeigten jedoch keine Affinität zum Säulenmaterial. Obwohl die Aufreinigung mittels Histidin-Tag und Nickelsäule eine effiziente Aufreinigungsmethode für viele Proteine darstellt, ist bekannt, dass diese Methode nicht für alle Proteine möglich ist. Eine Faltung des Proteins, bei welcher die hinzugefügte Histidin-Sequenz ins Innere des Proteins zeigt und somit keine direkte Exposition gegenüber dem Säulenmaterial erfährt, wird diskutiert. Bezüglich des C-terminalen Histidin-Tags ist dies die wahrscheinlichste Ursache. Im Fall des N-terminalen Histidin-Tags scheint es wahrscheinlich, dass dieser mitsamt der Pro-Domäne autokatalytisch abgeschnitten wurde.

Für die Proteinexpression wurden *Pichia pastoris* Hefezellen mit den drei oben erwähnten Plasmiden transfiziert. Eine für die Transfektion ausreichende Menge an Plasmid wurde in *E.coli* generiert. Hierzu diente der auf pPICZ α B enthaltene pUC ori (Plasmid University of California Origin), der die Replikation des Plasmids in *E.coli* ermöglicht. Durch das ZeocinTM-Resistenzgen (*Streptoaloteichus hidustanus ble* Gen) auf pPICZ α B konnte eine Selektion der transfizierten Zellen in und auf ZeocinTM-haltigen Medien erfolgen.

Das klassische Expressionssystem für Proteine ist *Escherichia coli*. Es wächst schnell, ist einfach zu handhaben und das Genom des Bakteriums ist vollständig bekannt. Pamer et al. beschreibt die Aufreinigung von in *E. coli* exprimiertem Rhodesain Δ C mittels Ammoniumsulfat-Präzipitation, HIC sowie Ionen-Austauschchromatographie.

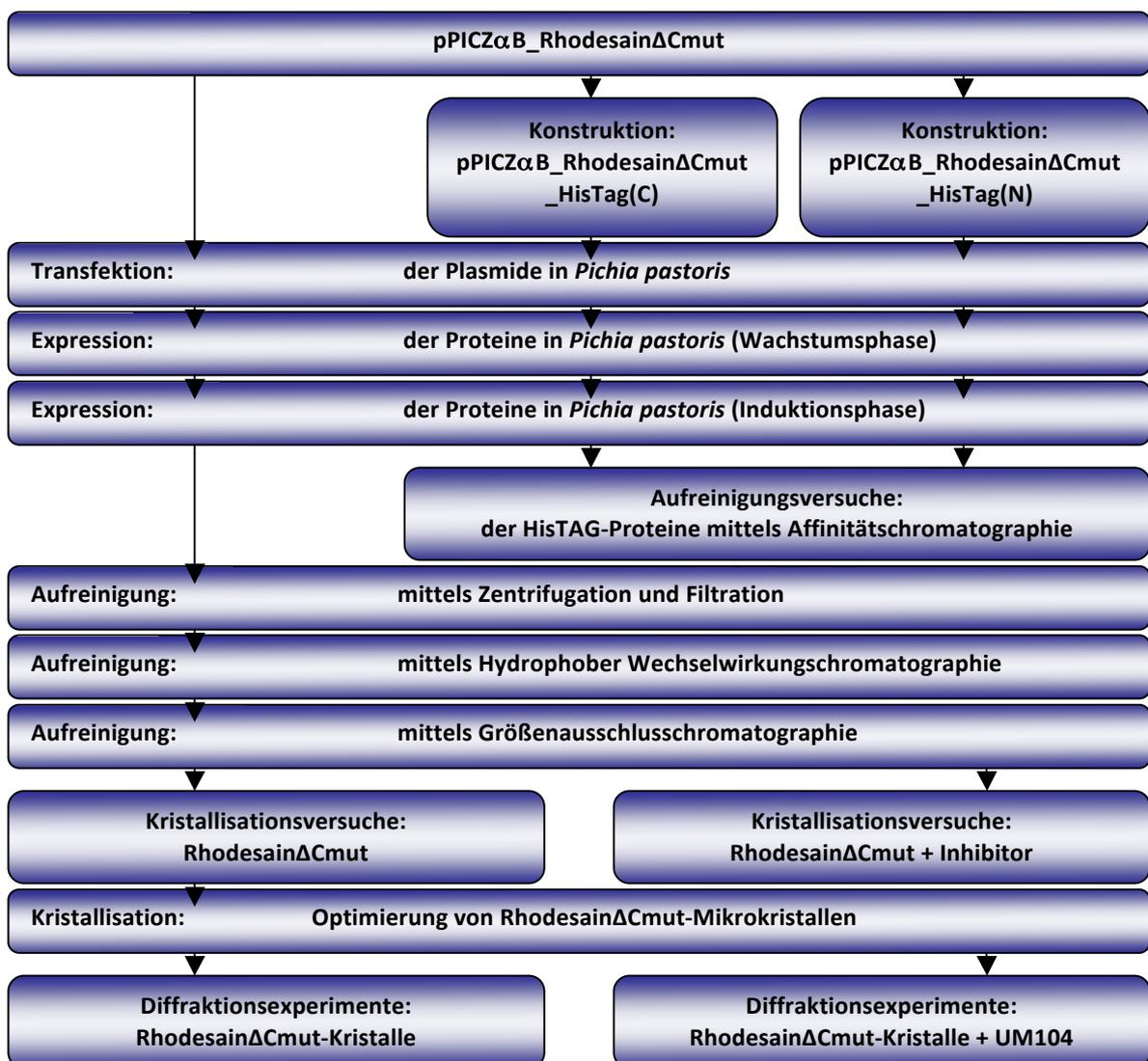


Abb. 5.2: Übersicht des Projekts.

Allerdings schildert er erhebliche Probleme mit den Aufreinigungsbedingungen, welche zu Autodegradation sowie einer behinderten Regeneration des Proteins führten. Desweiteren war die Beurteilung des Reinheitsgrads unsicher, da sich das aufgereinigte Protein weder mit Coomassieblau noch durch Silbernitrat im SDS-Gel anfärben ließ (Pamer, 1991).

Weitere Versuche von Wissenschaftlern aus der Arbeitsgruppe Kisker zur Aufreinigung von Rhodesain aus *E.coli* zeigten ebenfalls eine erschwerte Aufreinigung bei der keine für die Kristallisation notwendige Reinheit erzielt werden konnte.

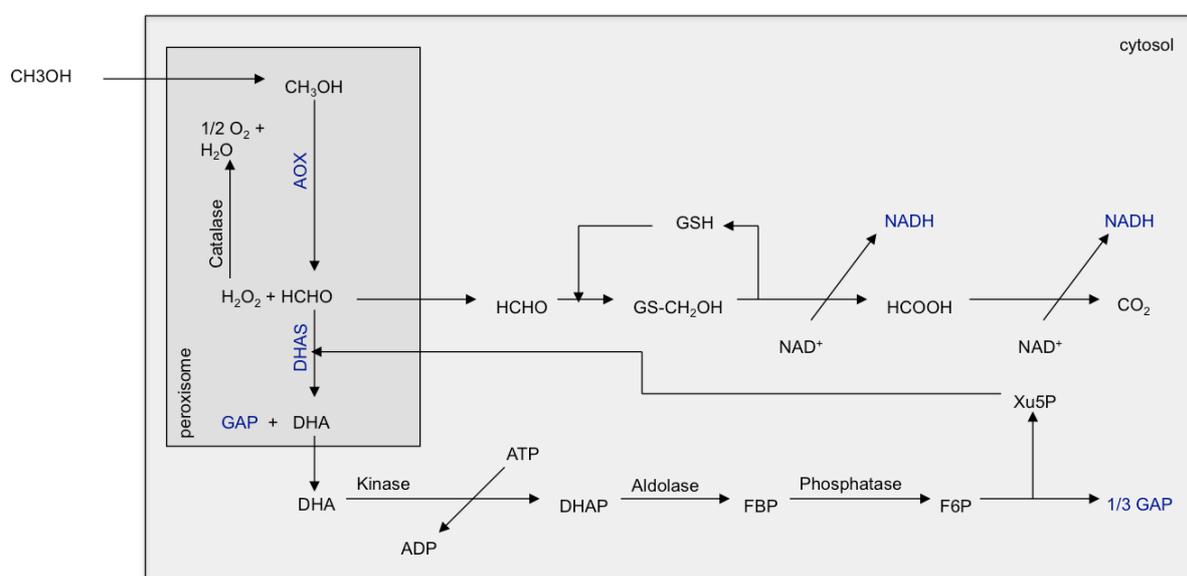


Abb. 5.3: Methanol-Stoffwechselweg bei *Pichia pastoris* (dargestellt nach der Vorlage von Cregg, 2000). Die Kompartimente Zytosol und Peroxisom sind voneinander abgetrennt dargestellt. Methanol (CH_3OH) wird ausgehend von der AOX (Alkoholdehydrogenase) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Formaldehyd (HCHO) gespalten. HCHO wird zum einen weiter zu HCOOH (Ameisensäure) und CO_2 (Kohlendioxid) oxidiert, wobei 2 NAD^+ (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) zu 2 NADH regeneriert werden. Zum anderen wird HCHO mittels DHAS (Dihydroxyacetonsynthase) und Xylulose-5-monophosphat (Xu5P) zu DHA (Dihydroxyaceton) und GAP (Glycerinaldehyd 3-Phosphat) verstoffwechselt. DHA wird im Zytosol über DHAP (Dihydroxyacetonphosphat), FBP (Fruktose-Bisphosphat) und F6P (Fruktose-6-Phosphat) zu $1/3$ GAP degradiert, wobei Xu5P wiederum regeneriert wird.

Die Proteine wurden daher in den methanolotrophen Hefezellen *Pichia pastoris* exprimiert. Diese besitzen die Fähigkeit Methanol zu verstoffwechseln und in Energie in Form von NADH sowie Glycerinaldehyd-3-Phosphat umzuwandeln, beginnend mit der Oxidation von Methanol zu Formaldehyd durch die Alkoholoxidase (Abb. 5.3). Die Transkription des Alkoholoxidase-Gens wird durch den Alkoholoxidase-Promoter, welcher über einen Induktions- und Repression-/Derepressionsmechanismus verfügt, reguliert. Während der

Promotor in Anwesenheit von Kohlenstoffquellen wie Glucose, Glycerin und Ethanol gehemmt wird (Repression), wird er bei Glucose-Abstinenz enthemmt und bei Methanol-Präsenz induziert (Cregg, 2000; Tschopp, 1987). In dem hier verwendeten Expressionssystem ist das Rhodesain Δ Cmut-Gen hinter den AOX Promotor geschaltet, womit eine Proteinüberexpression in relativ hohen Konzentrationen in einem zweiphasigem Verfahren möglich ist.

Zuerst wird in einer Wachstumsphase Zellmasse generiert und in einer anschließenden Expressionsphase mittels Methanol-Induktion vor allem Rhodesain exprimiert. Da Rhodesain extrazellulär exprimiert wird, treten endotoxische Probleme wie bei anderen Expressionssystemen in den Hintergrund.

Relativ geringe Konzentrationen an eigenem Hefezellproteinen werden extrazellulär sezerniert, so dass bereits nach Zentrifugation der Hefekultur eine relativ saubere Proteinlösung im Überstand nachgewiesen werden kann.

Während das errechnete Molekulargewicht von Rhodesain Δ Cmut bei 34975 Da liegt, zeigt es sich in der SDS-PAGE als Bande auf Höhe von ungefähr 26000 Da. Dies liegt daran, dass von Rhodesain Δ Cmut autokatalytisch die N-terminale Pro-Domäne bis auf 3 Aminosäuren abgespalten wird. Das errechnete Molekulargewicht des so entstehenden reifen Rhodesain Δ Cmut, das dann 220 Aminosäuren enthält, beträgt nur noch 23362.8 Da und stellt damit das zu kristallisierende Protein dar.

```

001  ACLASVALGS LHVEESLEMR FAAFKKKYGK VYKDAKEEAF RFRAFEENME OAKIQAAANP
061  YATFGVTPFS DMTREEFRAR YRNGASYFAA AQKRLRKTVN VTTGRAPAAV DWREKGAVTP
121  VKDQGQCGSC WAFSTIGNIE GQWQVAGNPL VSLSEQMLVS CDTIDFGCGG GLMDNAFNWI
181  VNSNGGNVFT EASYPYVSGN GEQPQCQMNG HEIGAAITDH VDLPQEDAI AAYLAENGPL
241  AIAVDATSFM DYNGGILTSC TSEQLDHGVL LVGYNDASNP PYWIIKNSWS NMWGEDGYIR
301  IEKGTNQCLM NQAVSSAVVG GP

```

Abb. 5.4: Sequenz von Rhodesain Δ Cmut. Pro-Domäne (unterstrichen), nach Expression abgespaltenes Peptid (grau), reifes Rhodesain Δ Cmut (schwarz).

Um das Protein zu reinigen, wurde von C. Caffrey empfohlen, das Induktionsmedium zu lyophilisieren, mit Wasser in einem Zehntel des Volumens zu resuspendieren, danach zu

filtrieren sowie mittels GE Amersham PD10 Säulen den Puffer mit 0.05 M Citrat-Phosphat pH 5.5 auszutauschen. Aufgrund des großen Volumens des Induktionsmediums sowie der benötigten Menge an Rhodessain schien die Aufreinigung nicht praktikabel und am Institut nicht durchführbar. Verschiedene Aufreinigungsverfahren wurden getestet und schließlich folgende Methoden konsekutiv eingesetzt. Nach Zentrifugation des Induktionsmediums wurde der Überstand filtriert und an einer Phenylsepharose®-Säule mittels hydrophober Wechselwirkungen sowie einer Größenausschlusschromatographie weiter aufgereinigt. Mit Konzentratoren wurden die Proben anschließend auf Proteinkonzentrationen > 10 mg/ml gebracht.

Während der Aufreinigung zeigten sich in der SDS-PAGE Fraktionen mit einer einzelnen Bande sowie Fraktionen mit einer Doppelbande auf Höhe des 26 kDa Referenzmarkers. Da die Doppelbanden, von denen die langsamer laufende schwächer ausgeprägt ist, im Gel sehr nah beieinander liegen, ist die optische Trennung beider Banden in Proben mit hohen Proteinkonzentrationen (und damit sehr dicken Banden) nicht möglich. In der Arbeit von Caffrey et al. ist diese Doppelbande in Fig. 1C2 angedeutet zu erkennen, jedoch nicht erwähnt. Caffrey et al. beschreibt allerdings für die glykosylierte Form Rhodessain Δ C zwei Banden, welche unterschiedliche Glykosylierungsmuster darstellen. Die Banden stellen sich aber im Gegensatz zu den hier beschriebenen Doppelbanden ungefähr gleich intensiv dar und weisen einen größeren Molekulargewichtsunterschied auf. Deshalb sind die hier bei der deglykosylierten Mutante Rhodessain Δ Cmut beschriebenen Doppelbanden mit diesen nicht gleichzusetzen. Die Ursache für diese Doppelbande wurde allerdings bis dato nicht eruiert. Für die Kristallisation wurden nur Fraktionen mit der schneller laufenden Einzelbande verwendet.

Das reife, aufgereinigte und hochkonzentrierte Rhodessain Δ Cmut wurde bei 4°C gelagert und zeigte sich über Monate äußerst stabil.

Kristallisationsexperimente wurden mit unterschiedlichen Protein-Konzentrationen bei unterschiedlichen Kristallisations-Bedingungen durchgeführt. Zum einen wurden Kokristallisationsexperimente mit Rhodessain Δ Cmut und den vom pharmazeutischen Institut bereitgestellten Inhibitoren RV134C und RV112D durchgeführt. Kristallisationsbedingungen mussten hierfür 10% DMSO enthalten, um die Löslichkeit der Inhibitoren zu garantieren. Unter mehreren Bedingungen mit Polyethylenglycol als Präzipitans kam es zur Bildung von größeren Kristallen, welche optisch eine große Ähnlichkeit mit Proteinkristallen aufwiesen.

Das Diffraktionsbild am Röntgengenerator ergab jedoch kein für Protein typisches Beugungsmuster, so dass Salz- bzw. Inhibitorkristalle vermutet werden.

Zum anderen wurden Kristallisationsexperimente mit dem Rhodesain Δ Cmut Protein in Abwesenheit von Inhibitoren durchgeführt. Bei mehreren Bedingungen ließen sich Kristallisationskeime nachweisen. Nach Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurden feine Kristallnadeln an der Europäischen Anlage für Synchrotronstrahlung ESRF untersucht. Mehrere Kristalle ergaben ein für Protein typisches Diffraktionsbild. Der Kristall, welcher zuvor mit dem Inhibitor UM110 getränkt wurde, zeigte ebenfalls ein für Protein typisches Beugungsmuster mit einer Streuung bis 3.0 Å. Der Hintergrund des Diffraktionsbildes war jedoch sehr intensiv, so dass die Beantragung auf die Datensammlung an einer High Precision Beamline in Hamburg diskutiert wurde, um eine bessere Relation zwischen Kristalldurchmesser und Durchmesser des elektromagnetischen Strahls zu erhalten. Da zu diesem Zeitpunkt allerdings noch keine genauen Daten bezüglich der Reinheit des Inhibitors bzw. dessen Aktivität *in-vivo* vorlagen, wurde darauf verzichtet und die Optimierung der Kristalle weiter verfolgt.

5.2 Inhibitoren und Rhodesain

Von September 2000 bis Dezember 2008 wurden insgesamt 12 Publikationen mit zentralem Bezug auf spezifische Inhibitoren gegen Rhodesain am National Center for Biotechnology Information registriert. Veröffentlichende Institutionen waren aus Californien (USA), Florida (USA), Atlanta (USA), Philadelphia (USA), Castelló (Spanien), Nabeshima (Japan), Heidelberg (Deutschland), Würzburg (Deutschland) sowie Kapstadt (Südafrika) (Chen, 2008; Malari 2008; Jaishankar 2008; Gonzalez 2007; Kanaji 2007; Vicik 2006; Gosalia 2005; Fujii 2005; Götz 2004; Chiyanzu 2003; Nkemgu 2003; Du 2000). Desweiteren steht eine gewaltige Anzahl an Veröffentlichungen über Inhibitoren gegen andere Cystein-Proteasen sowie Cystein-Proteasen im Allgemeinen zur Verfügung.

Für diese Arbeit standen nicht-peptidische Aziridine-2,3-dicarboxylat-Inhibitoren (RV134C sowie RV112D) der Arbeitsgruppe Schirmeister vom Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Würzburg (Vicik, 2006), sowie peptidische Inhibitoren (UM110 sowie UM117) der Arbeitsgruppe Schmuck (vormals am Institut für Organische Chemie derselben Universität,

derzeit an der Universität Duisburg-Essen) zur Verfügung. Publikationen zu den peptidischen Inhibitoren UM110 sowie UM117 liegen bis dato noch nicht vor, weshalb auf die exakte Darstellung der Strukturen in dieser Arbeit verzichtet wird.

134C und 112D sind irreversible, peptidomimetische Cysteinprotease-Inhibitoren, die bis zu einer Konzentration von 125 μM keine Toxizität gegenüber Makrophagen (J744.I) aufweisen (Vicik, 2006). Das Grundprinzip des Inhibitionsmechanismus ist vergleichbar mit dem von β -Laktam-Antibiotika, welche von den bakteriellen Transpeptidasen, die für die Zellwandsynthese entscheidend sind, nukleophil angegriffen und irreversibel gebunden werden. Die Inhibitoren 134C und 112D greifen die Cysteinprotease Rhodesain ebenfalls nukleophil an und bilden eine kovalente Bindung. Während bei der Spaltung von regulären Peptidbindungen durch Cysteinproteasen diese Bindung, wie in der Einleitung dargestellt, durch Hydrolyse sofort wieder aufgehoben wird, kann die kovalente Bindung zwischen Rhodesain und den Inhibitoren 134C bzw. 112D nicht hydrolysiert werden. Das Enzym ist damit irreversibel blockiert.

Da die Löslichkeit der Inhibitoren nur bei einer Konzentration von 10% DMSO garantiert ist, wurde von der AG Schirmeister angedacht, für Kokristallisationsexperimente sowie spätere *in-vivo*-Studien, die Inhibitoren in Bezug auf Ihre Löslichkeit zu optimieren.

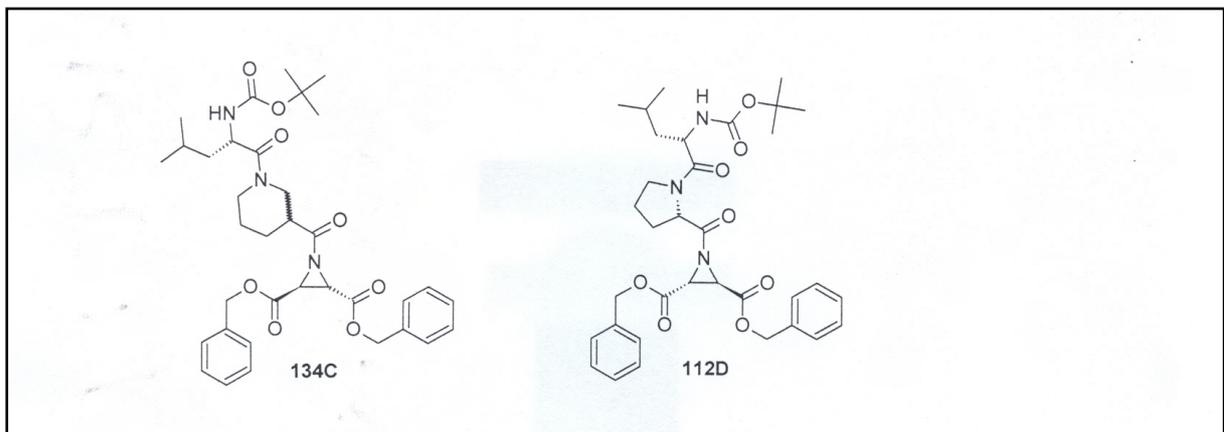


Abb. 5.5: Peptidomimetische, Leu-Pro-enthaltende Dibenzyl-Aziridin-2,3-Dicarboxylate als irreversible Inhibitoren (Vicik, 2006).

Der exakte Inhibitionsmechanismus der peptidischen Inhibitoren UM110 und UM117 ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass es sich hierbei um reversible Inhibitoren handelt. Mitte 2008 wurden nach Angabe der AG Schmuck am Missionsärztlichen Institut Würzburg unter Leitung von PD Dr. August Stich die Inhibitoren

auf ihre Wirksamkeit gegenüber *Trypanosoma brucei rhodesiense* getestet. Im Gegensatz zu anderen, ähnlichen Strukturen der AG Schmuck zeigten sich UM110 sowie UM117 nicht toxisch gegenüber *T. b. rhodesiense*, obwohl diese eine gute Hemmung von Rhodesain *in vitro* zeigen.

2004 schloss Mackey et al. aus einem RNA-Interferenz-Versuch, dass Rhodesain im Gegensatz zu der bisherigen Meinung für das Überleben von *T.b. rhodesiense* nicht essentiell sei. Er postulierte, dass *tbc*atB, eine Cathepsin B ähnliche Protease, das eigentliche Zielmolekül in *T.b. rhodesiense* sei (Mackey 2004). Dies könnte eine mögliche Ursache für das Nichtansprechen der Inhibitoren UM110 und UM117 *in-vivo* darstellen. Allerdings wurde die Hypothese von Mackey in einer Arbeit von Scory et al. (2006) relativiert, welcher diskutiert, dass in dem RNA-Interferenz-Versuch 35% der Aktivität von Rhodesain erhalten blieben, was möglicherweise für eine normale Zellfunktion ausreichend sei.

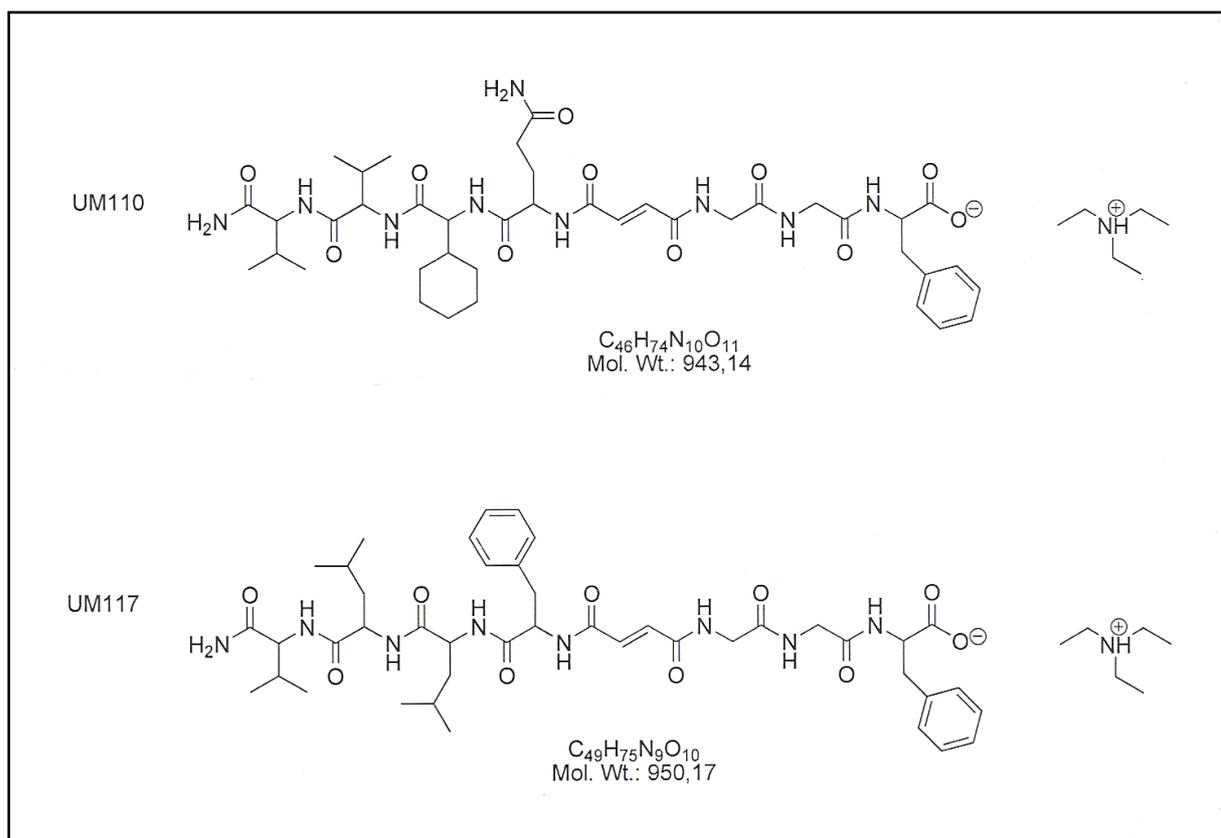


Abb. 5.6: Peptidische Inhibitoren (Uwe Machon, AG Schmuck 2008).

Da somit noch immer nicht eindeutig geklärt werden konnte, welche Protease in *T.b. rhodesiense* essentiell ist, ist es weiterhin sinnvoll, die strukturelle Analyse von Rhodesain im Komplex mit seinen Inhibitoren voranzutreiben. Somit soll der Bindungsmodus

der Inhibitoren strukturell geklärt werden und dann dazu genutzt werden, neue Inhibitoren zu synthetisieren, die eine wesentlich höhere Affinität und Spezifität gegenüber Rhodesain aufweisen. Desweiteren können mit diesen Strukturen auch Docking-Methoden, mit denen die Bindungsmodi vorhergesagt wurden, verifiziert werden.

Seit 2002 wird die Rolle von Rhodesain als eine extrazellulär sezernierte Protease diskutiert (Cecaille 2002). Da sich in unseren Versuchen Rhodesain als besonders stabile Protease gezeigt hat, wären in diesem Fall Rhodesain-Inhibitoren zur Prophylaxe von Gewebedestruktionen im Rahmen der Trypanosomiasis auch ohne direkten Einfluss auf den Erreger zu diskutieren.

5.3 Rhodesain im Komplex mit Inhibitor K777 sowie K11002

Am 25. März 2008 wurden die Koordinaten der Struktur von Rhodesain im Komplex mit dem Inhibitor K777 und am 01. April 2008 mit dem Inhibitor K11002 in der Protein Data Bank (PDB) der Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) hinterlegt (2p86, 2p7u). Publikationen zu beiden Strukturen stehen bis dato noch aus.

Die Auflösung beträgt für Rhodesain/K777 1.65 Å (Raumgruppe P1), Kristallisationsbedingungen fanden sich wie folgt: 1.0 M Natriumcitrat, Imidazol (Konzentration nicht angegeben), pH 8.0, Dampfdiffusion/ Hanging Drop Methode, 291 K.

Für Rhodesain/K11002 beträgt die Auflösung 1.16 Å (Raumgruppe P2₁2₁2₁), Kristallisationsbedingungen fanden sich wie folgt: 1.6 M Ammoniumsulfat, 0.1 M Bicine pH 9.0, Dampfdiffusion/ Sitting Drop, 298 K.

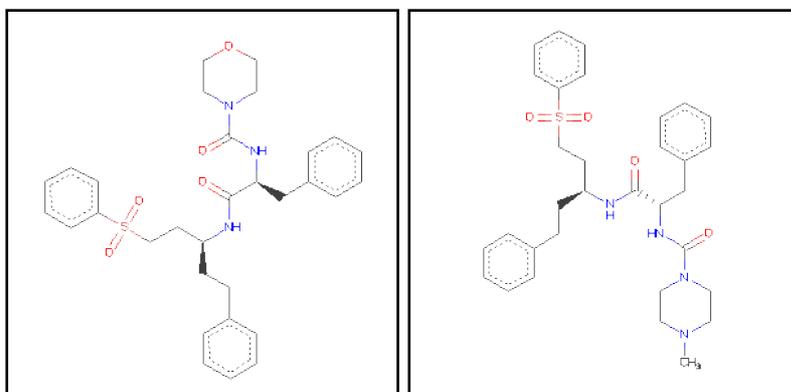


Abb. 5.7: Inhibitor K11002 (links), Inhibitor K777 (rechts).

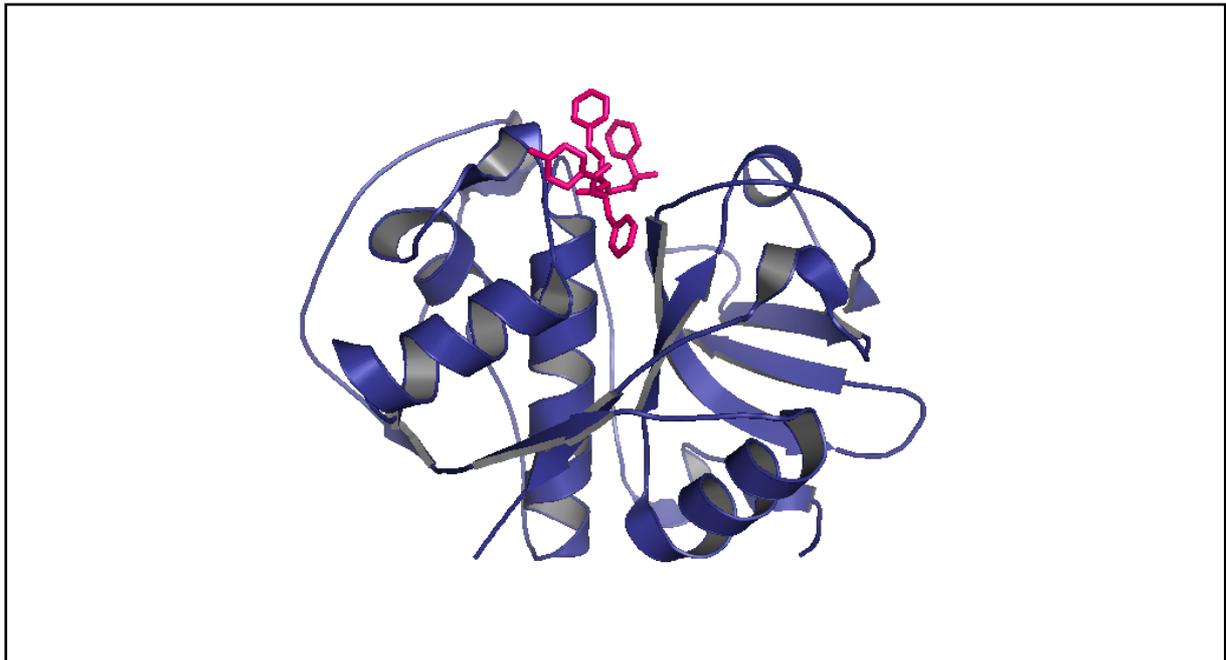


Abb. 5.8: Kristallstruktur von Rhodesain im Komplex mit dem Inhibitor K777 (2p7u). Rhodesain (blau), K777 (pink). Dargestellt mit PyMol.

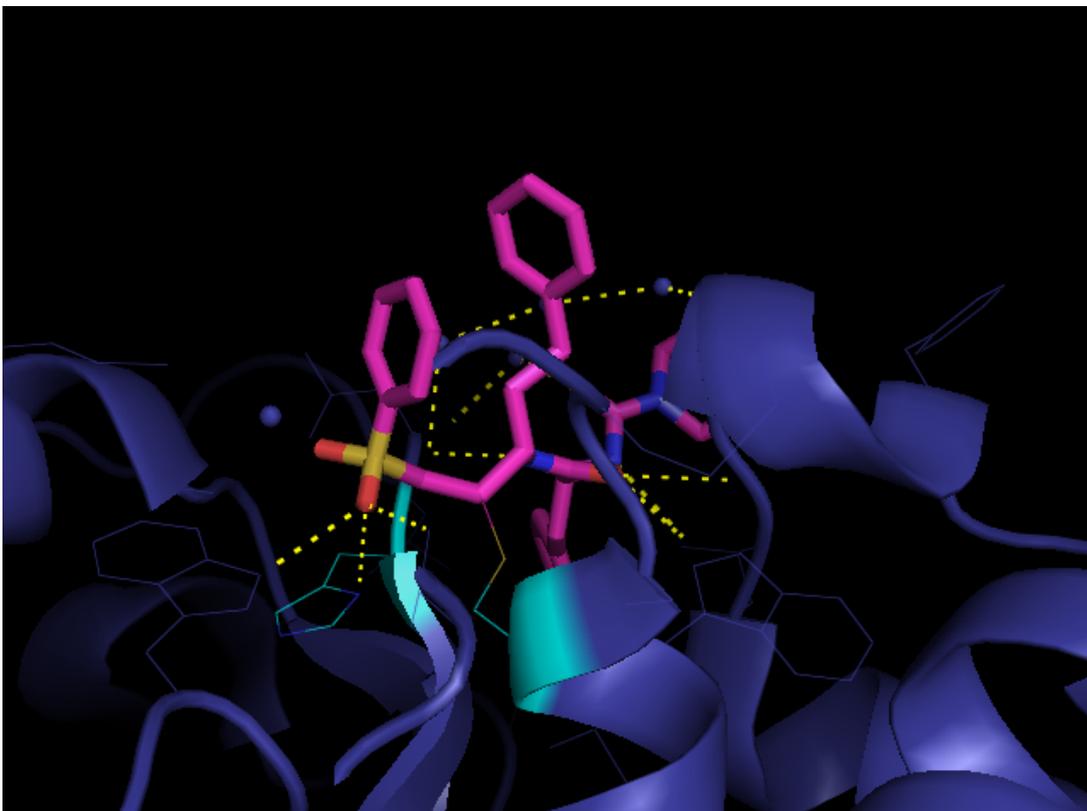


Abb. 5.9: Bindungsverhältnis zwischen Rhodesain und Inhibitor K777 (2p7u), dargestellt mit PyMol. Rhodesain-Molekül (hellblau), Kohlenstoffgrundgerüst des Histidin-Rest HIS162 (links im Bild) und des Cystein-Rest Cys25 (rechts im Bild) (türkis). Kohlenstoffgrundgerüst des Inhibitors (rosa), Schwefelatome (gelb), Sauerstoffatome (orange), Stickstoffatome (dunkelblau). Wasserstoffbrückenbindungen als gelb gestrichelte Linien dargestellt.



Abb. 5.10: Röntgenkristallstruktur von Rhodesain im Komplex mit dem Inhibitor K11002 (2p86). Rhodesain (blau), K777 (pink). Dargestellt mit PyMol.

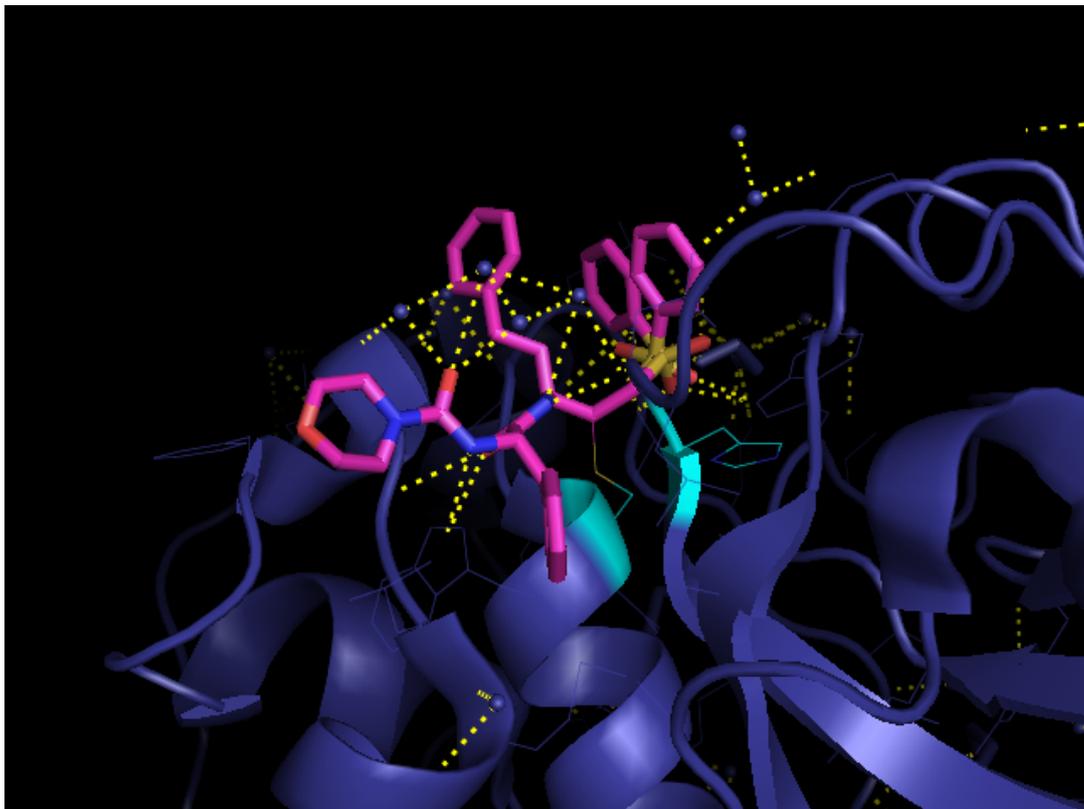


Abb. 5.8: Bindungsverhältnis zwischen Rhodesain und Inhibitor K11002 (2p86), dargestellt mit PyMol. Rhodesain-Molekül (hellblau), Kohlenstoffgrundgerüst des Histidin-Rest HIS162 (rechts im Bild) und des Cystein-Rest Cys25 (links im Bild) (türkis). Kohlenstoffgrundgerüst des Inhibitors (rosa), Schwefelatome (gelb), Sauerstoffatome (orange), Stickstoffatome (dunkelblau). Wasserstoffbrückenbindungen als gelb gestrichelte Linien dargestellt.

Sowohl K11002 als auch K777 weisen eine kovalente Bindung mit dem katalytischen Cystein-Rest CYS26 des Rhodesain-Moleküls auf. Die Inhibition des Enzyms durch K11002 und K777 lässt sich somit nachvollziehen. Das katalytische CYS26 wird blockiert, indem es eine Bindung mit dem Inhibitor eingeht, und steht somit für weitere nukleophile Angriffe auf zu spaltende Peptidbindungen nicht mehr zur Verfügung. Eine irreversible Hemmung ist damit anzunehmen.

5.4 Zukünftige Perspektiven

Zusammenfassend liefert diese Arbeit Ergebnisse, die eine Basis für weitere Versuche zur Lösung der Struktur von Rhodesain mit Inhibitoren bilden.

Da die bisher erhaltenen, sehr kleinen Kristallnadeln für gewöhnliche Diffraktionsexperimente nicht geeignet sind, müssen zunächst Kristallisationsbedingungen gefunden werden, die zu größeren, gut geordneten Kristallen führen. Dafür sollten vor allem Bedingungen mit höherem pH in Betracht gezogen werden. Während unsere am ESRF analysierten Proteinkristallnadeln bei 1.6 M Ammoniumsulfat, 10% 1,4-Dioxane, MES pH 6.9 sowie 20°C (Hanging-Drop) vorlagen, konnte Brinen et al. Kristall-Inhibitor-Komplexe bei 1.6 M Ammoniumsulfat, 0.1 M Bicine pH 9 sowie 24.85°C (Sitting-Drop) züchten.

Weitere, neue nicht-peptidische Inhibitoren der AG Schmuck, welche sowohl Rhodesain hemmen als auch Trypanosomen abtöten, stehen derzeit bereit. Optimierte Inhibitoren der AG Schirmeister, welche löslicher sind und kein DMSO benötigen, wurden in Aussicht gestellt.

Neben der Arbeit an Rhodesain erscheinen Versuche mit *tbcAtB* ebenfalls als sinnvoll. Da am Missionsärztlichen Institut Würzburg (PD Dr. Stich) Trypanosomen ganzjährig kultiviert werden, wäre die Möglichkeit der Extraktion von DNA zu eruieren (DNA-Isolierung bei Trypanosomen beschreiben in Castro et al., 1981, sowie Eakin et al., 1990). Es ist anzunehmen, dass mit Hilfe des Expressionssystems *Pichia pastoris* (wie bisher auch bei Rhodesain) *tbcAtB* exprimiert werden könnte, welches ohne weitere Aufreinigungsverfahren für Inhibitions-Versuche der derzeit existierenden Rhodesain-Inhibitoren zur Verfügung stehen könnte.

Das gesamte Projekt wurde 2008 von Dipl.-Biol. Uwe Dietz im Rahmen seiner Dissertation und des Sonderforschungsbereichs SFB-630 übernommen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die akute Form der afrikanischen Schlafkrankheit wird durch den Parasiten *Trypanosoma brucei rhodesiense* verursacht und führt unbehandelt zum exitus letalis. Da derzeit nur wenige, zum Teil hoch toxische Substanzen mit zunehmender Resistenzlage klinische Anwendung finden, ist die Entwicklung neuer Medikamente dringend erforderlich.

Rhodesain ist eine essenzielle Cysteinprotease des Erregers und wird als potentiell Zielmolekül für die intelligente Wirkstoffentwicklung gehandelt. Inhibitoren, welche dieses Molekül im niedrigen mikromolaren Bereich inhibieren, konnten bereits vom Institut für Pharmazie der hiesigen Universität synthetisiert werden. Um die Inhibitoren hinsichtlich ihrer Selektivität, Affinität und Toxizität zu optimieren, ist deren röntgenstrukturbiochemische Analyse im Komplex mit dem Zielmolekül Rhodesain notwendig.

Rhodesain wurde in den Hefezellen *Pichia pastoris*, welche mit dem Vektor pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut transfiziert wurden, exprimiert und mittels Hydrophober-Wechselwirkungs- sowie Größenausschlußchromatographie gereinigt. Nadelförmige Kristalle konnten mit einer Reservoirolösung aus 1.6 M Ammoniumsulfat, 10% 1,4-Dioxan und 0.1 M MES pH6.9 sowie bei einer Temperatur von 20°C erhalten werden. Die Kristalle wurden mit dem Inhibitor UM112C getränkt und an der Europäischen Anlage für Synchrotronstrahlung ESRF (Grenoble) vermessen. Das Diffraktionsbild bei einer Wellenlänge von 0.97625 Å ergab ein für Proteine typisches Beugungsmuster mit einer Streuung bis 3.04 Å. Zur weiteren Analyse und Optimierung der Kristalle wurde das Projekt von Dipl.-Biol. Uwe Dietz im Rahmen seiner Dissertation und des Sonderforschungsbereichs SFB-630 übernommen.

7. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abb. 0.1 Genetische Code-Sonne
- Abb. 0.2 Aminosäuren
- Abb. 1.1 *Trypanosoma brucei rhodesiense* im Blutausschlag, Giemsa-Färbung
- Abb. 1.2 Structure-based Drug Design Zyklus
- Abb. 1.3 Terminologie und Schema der Peptid-Substrat-Interaktion am Beispiel der Cysteinprotease
- Abb. 1.4 Katalytischer Mechanismus der Cysteinproteasen am Beispiel von Papain aus *Carica Papaya*
- Abb. 1.5 Struktur von Papain bei einer Auflösung von 1.65Å
- Abb. 1.6 Darstellung des Inhibitionsmechanismus des Propeptids
- Abb. 1.7 Struktur des Rhodesains mit Inhibitor K11002 bei einer Auflösung von 1.16Å
- Abb. 2.1 Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion
- Abb. 2.2 Schema der Rekombination
- Abb. 2.3 Modell der Kristallbildung von Proteinen nach der Dampf-Diffusions-Technik
- Abb. 2.4 Schematische Darstellung des Hanging-Drop-Verfahrens
- Abb. 2.5 Schematische Darstellung des Sitting-Drop-Verfahrens
- Abb. 3.1 Prestained Protein Ladder *Page Ruler*TM
- Abb. 3.2 *Gene Ruler*TM, 1kb DNA Ladder
- Abb. 4.1 AlphaS-Sequenz + RhodesainΔCmut + Stop-Codon
- Abb. 4.2 Sequenzierungsergebnisse der Multiple cloning Site von pPICZαB mit integrierter RhodesainΔCmut-Sequenz
- Abb. 4.3 Plasmidverdau
- Abb. 4.4 Transfizierte *Pichia pastoris* Kolonien auf YPD-Agar mit Zeocin (100µg/ml)
- Abb. 4.5 Abb. 4.5: Agarose-Gelelektrophorese und Färbung des Colony-PCR-Produkts der transfizierten *Pichia pastoris* Zellen
- Abb. 4.6 AlphaS-Sequenz + RhodesainΔCmut + erweiterter C-terminaler Bereich mit DNA-Sequenz für HIS-Tag
- Abb. 4.7 Sequenzierungsergebnisse der Mutationsstelle und der C-terminalen His-Tag-Sequenz mit Stop-Codon

- Abb. 4.8 Konzipierte Primer zur Konstruktion von pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut_HisTag(N)
- Abb. 4.9 Agarosegelelektrophoresen der PCR-Produkte nach Reinigung
- Abb. 4.10 DNA-Gelelektrophorese der Verdau-Produkte
- Abb. 4.11 DNA-Gelelektrophorese von verdautem Vektor pPICZ α B (Spur2), verdautem Insert Rhodesain Δ Cmut_HisTag(N) (Spur3) sowie dem Ligationsprodukt aus Vektor und Insert (Spur 5 bis 9)
- Abb. 4.12 Kolonie-PCR E.coli, transformiert mit pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut_HisTag(N)
- Abb. 4.13 AlphaS-Sequenz + N-terminale Sequenz inkl. HisTag und TEV-Schnittstelle + Rhodesain Δ Cmut
- Abb. 4.14 Teilsequenzierungsergebnisse der multiplen Klonierungsstelle von pPICZ α B, integrierter Rhodesain Δ Cmut-Sequenz, N-terminalem HisTag und TEV-Erkennungssequenz
- Abb. 4.15 Expressionstest
- Abb. 4.16 Expressionstest
- Abb. 4.17 SDS-Polyacrylamidgel
- Abb. 4.18 HI-Chromatographie mit einer Phenylsepharose[®]-Säule
- Abb. 4.19 SDS-PAGE der HIC-Elutionsfraktionen (A +B), Waschfraktion der HIC (C)
- Abb. 4.20 Gelfiltrationschromatographie
- Abb. 4.21 SDS-PAGE der Elutionsfraktionen der Gelfiltrationschromatographie
- Abb. 4.22 SDS-PAGE. 6 Monate alte Rhodesainprobe (14 mg/ml, Doppelbandenfraktion), gelagert bei 4°C
- Abb. 4.23 Rhodesain-Aktivitäts-Assay mit dem Überstand der Kultur *Pichia pastoris* pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut
- Abb. 4.24 Rhodesain-Aktivitäts-Assay mit dem Überstand der Kultur *Pichia pastoris* pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut_HisTag(N) (Kurve B6)
- Abb. 4.25 Rhodesain-Aktivitäts-Assay mit dem Überstand der Kultur *Pichia pastoris* pPICZ α B_Rhodesain Δ Cmut_HisTag(C)
- Abb. 4.26 SDS-PAGE der zu analysierenden Proteinprobe
- Abb. 4.27 Rhodesain Δ Cmut-Sequenz
- Abb. 4.28 Kristalle bei Co-Kristallisationsversuchen von Rhodesain mit RV134C
- Abb. 4.29 Kristallisationsbedingung 6

Abb. 4.30	Kristallisationsbedingung 7 (+ Inhibitor-Soaking)
Abb. 4.31	Diffractionsbild des Kristalls aus Bedingung Nr. 7 (1.9 M Ammoniumsulfat, 10% 1,4-Dioxan, 0.1 M MES pH 6.9), zuvor getränkt mit Inhibitor UM110
Abb. 5.1	Aminosäuresequenz von Full Length Rhodensain (450 Aminosäuren, MW 48431.8 Da)
Abb. 5.2	Übersicht des Projekts
Abb. 5.3	Methanol-Stoffwechselweg bei <i>Pichia pastoris</i>
Abb. 5.4	Sequenz von Rhodensain Δ Cmut
Abb. 5.5	Peptidomimetische, Leu-Pro-enthaltende Dibenzyl-Aziridin-2,3-Dicarboxylate als irreversible Inhibitoren
Abb. 5.6	Peptidische Inhibitoren
Abb. 5.7	Inhibitor K11002 (links), Inhibitor K777 (rechts)
Abb. 5.8	Kristallstruktur von Rhodensain im Komplex mit dem Inhibitor K777 (2p7u)
Abb. 5.9	Bindungsverhältnis zwischen Rhodensain und Inhibitor K777 (2p7u)
Abb. 5.10	Röntgenkristallstruktur von Rhodensain im Komplex mit dem Inhibitor K11002 (2p86)
Abb. 5.11	Bindungsverhältnis zwischen Rhodensain und Inhibitor K11002 (2p86)
Tab. 1.1	Überblick der im Einsatz befindlichen trypanocidalen Medikamente für Erwachsene
Tab. 3.1	Mikroorganismen
Tab. 3.2	Kultur- und Induktionsmedien
Tab. 3.3	Medienzusätze
Tab. 3.4	Primer
Tab. 3.5	Vektoren
Tab. 3.6	Antikörper
Tab. 3.7	Proteine, Enzyme und Inhibitoren
Tab. 3.8	Chemikalien
Tab. 3.9	Lösungen und Puffer
Tab. 3.11	Kristallisationsscreens
Tab. 3.12	Geräte
Tab. 3.13	Verbrauchsgegenstände
Tab. 3.14	Kits

Tab. 3.15	Chromatographiematerialien
Tab. 3.16	Computersoftware
Tab. 3.17	Datenbanken
Tab. 4.1	Rhodesain-Expressionsprotokoll
Tab. 4.2	Auswertung der Massenspektrometrie
Tab. 4.3	Pack 467a
Tab. 4.2	Pack 139a

8. LITERATUR

- Aksoy, S., and R. V. Rio. 2005. Interactions among multiple genomes: tsetse, its symbionts and trypanosomes. *Insect biochemistry and molecular biology* 35:691-698.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum, and L. Montagnier. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science (New York, N.Y)* 220:868-871.
- Barrett, M. P., D. W. Boykin, R. Brun, and R. R. Tidwell. 2007. Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *British journal of pharmacology* 152:1155-1171.
- Barrett, M. P., R. J. Burchmore, A. Stich, J. O. Lazzari, A. C. Frasch, J. J. Cazzulo, and S. Krishna. 2003. The trypanosomiasis. *Lancet* 362:1469-1480.
- Berman HM, Westbrook K, Feng Z, Gilliland G, Bhat TN, Weissig H, Shindyalov IN, Bourne PE. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28(1):235-42.
- Berti, P. J., and A. C. Storer. 1995. Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *Journal of molecular biology* 246:273-283.
- Blundell, T. L., B. L. Sibanda, R. W. Montalvo, S. Brewerton, V. Chelliah, C. L. Worth, N. J. Harmer, O. Davies, and D. Burke. 2006. Structural biology and bioinformatics in drug design: opportunities and challenges for target identification and lead discovery. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 361:413-423.
- Brun, R., and O. Balmer. 2006. New developments in human African trypanosomiasis. *Current opinion in infectious diseases* 19:415-420.
- Burri, C., and R. Brun. 2003. Eflornithine for the treatment of human African trypanosomiasis. *Parasitology research* 90 Supp 1:S49-52.
- Caffrey, C. R., E. Hansell, K. D. Lucas, L. S. Brinen, A. Alvarez Hernandez, J. Cheng, S. L. Gwaltney, 2nd, W. R. Roush, Y. D. Stierhof, M. Bogyo, D. Steverding, and J. H. McKerrow. 2001. Active site mapping, biochemical properties and subcellular localization of rhodesain, the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei* rhodesiense. *Molecular and biochemical parasitology* 118:61-73.
- Checchi, F., and M. P. Barrett. 2008. African sleeping sickness. *BMJ (Clinical research ed)* 336:679-680.

- Chen, Y. T., R. Lira, E. Hansell, J. H. McKerrow, and W. R. Roush. 2008. Synthesis of macrocyclic trypanosomal cysteine protease inhibitors. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*.
- Croft, S. L. 2005. Public-private partnership: from there to here. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99 Suppl 1:S9-14.
- Datta, S., and D. J. Grant. 2004. Crystal structures of drugs: advances in determination, prediction and engineering. *Nature reviews* 3:42-57.
- De Clercq, E. 2007. The design of drugs for HIV and HCV. *Nature reviews* 6:1001-1018.
- DeLano, W. L. 2002. The PyMOL Molecular Graphics System *in* S. C. DeLano Scientific, CA, USA, ed.
- Denise, H., and M. P. Barrett. 2001. Uptake and mode of action of drugs used against sleeping sickness. *Biochemical pharmacology* 61:1-5.
- Drews, J. 2000. Drug discovery: a historical perspective. *Science (New York, N.Y)* 287:1960-1964.
- Du, X., E. Hansell, J. C. Engel, C. R. Caffrey, F. E. Cohen, and J. H. McKerrow. 2000. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. *Chemistry & biology* 7:733-742.
- Engstler, M., T. Pfohl, S. Herminghaus, M. Boshart, G. Wiegertjes, N. Heddergott, and P. Overath. 2007. Hydrodynamic flow-mediated protein sorting on the cell surface of trypanosomes. *Cell* 131:505-515.
- Flexner, C. 2007. HIV drug development: the next 25 years. *Nature reviews* 6:959-966.
- Fujii, N., J. P. Mallari, E. J. Hansell, Z. Mackey, P. Doyle, Y. M. Zhou, J. Gut, P. J. Rosenthal, J. H. McKerrow, and R. K. Guy. 2005. Discovery of potent thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and cruzain. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 15:121-123.
- Garcia, A., D. Courtin, P. Solano, M. Koffi, and V. Jamonneau. 2006. Human African trypanosomiasis: connecting parasite and host genetics. *Trends in parasitology* 22:405-409.
- Gershell, L. J., and J. H. Atkins. 2003. A brief history of novel drug discovery technologies. *Nature reviews* 2:321-327.
- Gonzalez, F. V., J. Izquierdo, S. Rodriguez, J. H. McKerrow, and E. Hansell. 2007. Dipeptidyl-alpha,beta-epoxyesters as potent irreversible inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17:6697-6700.

- Hunter, W. N. 1997. A structure-based approach to drug discovery; crystallography and implications for the development of antiparasite drugs. *Parasitology* 114 Suppl:S17-29.
- IUBMB. 2008. Enzyme Nomenclature of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>.
- Jaishankar, P., E. Hansell, D. M. Zhao, P. S. Doyle, J. H. McKerrow, and A. R. Renslo. 2008. Potency and selectivity of P2/P3-modified inhibitors of cysteine proteases from trypanosomes. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 18:624-628.
- Kamphuis, I. G., K. H. Kalk, M. B. Swarte, and J. Drenth. 1984. Structure of papain refined at 1.65 Å resolution. *Journal of molecular biology* 179:233-256.
- Kanaji, S., Y. Tanaka, Y. Sakata, K. Takeshita, K. Arima, S. Ohta, E. J. Hansell, C. Caffrey, J. C. Mottram, J. Lowther, S. Donnelly, C. Stack, T. Kadowaki, K. Yamamoto, J. H. McKerrow, J. P. Dalton, G. H. Coombs, and K. Izuhara. 2007. Squamous cell carcinoma antigen 1 is an inhibitor of parasite-derived cysteine proteases. *FEBS letters* 581:4260-4264.
- Kennedy, P. G. 2004. Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *The Journal of clinical investigation* 113:496-504.
- Kramer, R., and D. Cohen. 2004. Functional genomics to new drug targets. *Nature reviews* 3:965-972.
- Lecaille, F., J. Kaleta, and D. Bromme. 2002. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chemical reviews* 102:4459-4488.
- Legros, D., G. Ollivier, M. Gastellu-Etchegorry, C. Paquet, C. Burri, J. Jannin, and P. Buscher. 2002. Treatment of human African trypanosomiasis--present situation and needs for research and development. *The Lancet infectious diseases* 2:437-440.
- Linares, G. E., E. L. Ravaschino, and J. B. Rodriguez. 2006. Progresses in the field of drug design to combat tropical protozoan parasitic diseases. *Current medicinal chemistry* 13:335-360.
- List, E. O., D. E. Berryman, A. J. Palmer, L. Qiu, S. Sankaran, D. T. Kohn, B. Kelder, S. Okada, and J. J. Kopchick. 2007. Analysis of mouse skin reveals proteins that are altered in a diet-induced diabetic state: a new method for detection of type 2 diabetes. *Proteomics* 7:1140-1149.

- Lundkvist, G. B., K. Kristensson, and M. Bentivoglio. 2004. Why trypanosomes cause sleeping sickness. *Physiology* (Bethesda, Md 19:198-206.
- Luscher, A., H. P. de Koning, and P. Maser. 2007. Chemotherapeutic strategies against *Trypanosoma brucei*: drug targets vs. drug targeting. *Current pharmaceutical design* 13:555-567.
- Mallari, J. P., A. Shelat, A. Kosinski, C. R. Caffrey, M. Connelly, F. Zhu, J. H. McKerrow, and R. K. Guy. 2008. Discovery of trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of rhodesain and TbcA. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 18:2883-2885.
- Marcello, L., S. Menon, P. Ward, J. M. Wilkes, N. G. Jones, M. Carrington, and J. D. Barry. 2007. VSGdb: a database for trypanosome variant surface glycoproteins, a large and diverse family of coiled coil proteins. *BMC bioinformatics* 8:143.
- Maudlin, I. 2006. African trypanosomiasis. *Annals of tropical medicine and parasitology* 100:679-701.
- McEntyre J, Lipman D. 2001. PubMed: bridging the information gap. *CMAJ* 164(9):1317-9.
- Médecins-Sans-Frontières. 2007. Clinical Guidelines. available through:
http://www.refbooks.msf.org/msf_docs/en/Clinical_Guide/CG_en.pdf.
- Merops. 2008. The Peptidase Database. Release 8.1. Accessed: 17. June 2008.
- Mittl, P. R., and M. G. Grutter. 2006. Opportunities for structure-based design of protease-directed drugs. *Current opinion in structural biology* 16:769-775.
- Naessens, J., D. M. Mwangi, J. Buza, and S. K. Molloo. 2003. Local skin reaction (chancre) induced following inoculation of metacyclic trypanosomes in cattle by tsetse flies is dependent on CD4 T lymphocytes. *Parasite immunology* 25:413-419.
- Nkemgu, N. J., R. Grande, E. Hansell, J. H. McKerrow, C. R. Caffrey, and D. Steverding. 2003. Improved trypanocidal activities of cathepsin L inhibitors. *International journal of antimicrobial agents* 22:155-159.
- Otto, H. H., and T. Schirmeister. 1997. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chemical reviews* 97:133-172.
- PDB-ID:9PAP. <http://www.pdb.org/>.
- Pecoul, B. 2004. New drugs for neglected diseases: from pipeline to patients. *PLoS medicine* 1:e6.
- Rawlings, N. D., F. R. Morton, C. Y. Kok, J. Kong, and A. J. Barrett. 2008. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic acids research* 36:D320-325.

- Robays, J., G. Nyamowala, C. Sese, V. Betu Ku Mesu Kande, P. Lutumba, W. Van der Veken, and M. Boelaert. 2008. High failure rates of melarsoprol for sleeping sickness, Democratic Republic of Congo. *Emerging infectious diseases* 14:966-967.
- Rowland, R. S. 2002. Using X-ray crystallography in drug discovery. *Current opinion in drug discovery & development* 5:613-619.
- Rzychon, M., D. Chmiel, and J. Stec-Niemczyk. 2004. Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta biochimica Polonica* 51:861-873.
- Sajid, M., and J. H. McKerrow. 2002. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular and biochemical parasitology* 120:1-21.
- Schechter, I., and A. Berger. 1967. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochemical and biophysical research communications* 27:157-162.
- Simarro, P. P., J. Jannin, and P. Cattand. 2008. Eliminating human African trypanosomiasis: where do we stand and what comes next? *PLoS medicine* 5:e55.
- Sternberg, J. M. 2004. Human African trypanosomiasis: clinical presentation and immune response. *Parasite immunology* 26:469-476.
- Stich, A., P. M. Abel, and S. Krishna. 2002. Human African trypanosomiasis. *BMJ (Clinical research ed)* 325:203-206.
- Stich, A., M. P. Barrett, and S. Krishna. 2003. Waking up to sleeping sickness. *Trends in parasitology* 19:195-197.
- Tavel, J. A. 2000. Ongoing trials in HIV protease inhibitors. *Expert opinion on investigational drugs* 9:917-928.
- Taylor, J. E., and G. Rudenko. 2006. Switching trypanosome coats: what's in the wardrobe? *Trends Genet* 22:614-620.
- Then, R. L. 2004. Antimicrobial dihydrofolate reductase inhibitors--achievements and future options: review. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* 16:3-12.
- Tonge, P. J., C. Kisker, and R. A. Slayden. 2007. Development of modern InhA inhibitors to combat drug resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Current topics in medicinal chemistry* 7:489-498.
- Troeberg, L., R. E. Morty, R. N. Pike, J. D. Lonsdale-Eccles, J. T. Palmer, J. H. McKerrow, and T. H. Coetzer. 1999. Cysteine proteinase inhibitors kill cultured bloodstream forms of *Trypanosoma brucei brucei*. *Experimental parasitology* 91:349-355.

- Turk, V., B. Turk, and D. Turk. 2001. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *The EMBO journal* 20:4629-4633.
- Vallance, P., and M. Levick. 2007. Drug discovery and development in the age of molecular medicine. *Clinical pharmacology and therapeutics* 82:363-366.
- van Dongen, M., J. Weigelt, J. Uppenberg, J. Schultz, and M. Wikstrom. 2002. Structure-based screening and design in drug discovery. *Drug discovery today* 7:471-478.
- Vicik, R., V. Hoerr, M. Glaser, M. Schultheis, E. Hansell, J. H. McKerrow, U. Holzgrabe, C. R. Caffrey, A. Ponte-Sucre, H. Moll, A. Stich, and T. Schirmeister. 2006. Aziridine-2,3-dicarboxylate inhibitors targeting the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei* as lead trypanocidal agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 16:2753-2757.
- Volarath, P., R. W. Harrison, and I. T. Weber. 2007. Structure based drug design for HIV protease: from molecular modeling to cheminformatics. *Current topics in medicinal chemistry* 7:1030-1038.
- Werbovets, K. A. 2000. Target-based drug discovery for malaria, leishmaniasis, and trypanosomiasis. *Current medicinal chemistry* 7:835-860.
- WHO. 2005. Control of Human African Trypanosomiasis: A Strategy for the African Region. World Health Organization Regional Committee for Africa Report, Maputo, Mozambique.
- WHO. 2006. Fact sheet N°259: African trypanosomiasis or sleeping sickness. WHO Media Center Fact Sheets.
- Wiederanders, B. 2003. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta biochimica Polonica* 50:691-713.
- Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF. 1999. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* 112:531-552.
- Wlodawer, A., and J. Vondrasek. 1998. Inhibitors of HIV-1 protease: a major success of structure-assisted drug design. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 27:249-284.

9. ABKÜRZUNGEN, EINHEITEN, AMINOSÄUREN, GENETISCHE CODE

A	Absorption
Bp	Basenpaare
C	Konzentration
CV	Column volume (Säulenvolumen)
D	Schichtdicke von Küvetten
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	5'-Desoxyribonukleotidtriphosphate
E	Extinktionskoeffizient
E.coli	Escherichia coli
ESRF	European Synchrotron Radiation Facility
His	Histidin
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Mililiter
mM	millimolar
MW	molecular weight (Molekulargewicht)
MWCO	molecular weight cut off (Molekulargewichtsausschlussgrenze)
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OD ₆₀₀	optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 600nm
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
T _M	Schmelztemperatur des Primer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin

VORSÄTZE

k	kilo	(10 ³)
d	dezi	(10 ⁻¹)
c	centi	(10 ⁻²)
m	milli	(10 ⁻³)
μ	mikro	(10 ⁻⁶)
n	nano	(10 ⁻⁹)
p	piko	(10 ⁻¹²)

EINHEITEN

Å	Angström
°C	Grad Celcius
Da	Dalton
g	Gramm
h	hour (Stunde)
L	Liter
m	Meter
M	Molarität (mol/L)
min	Minute
mol	molare Masse
s	Sekunde
U	Unit (Einheit)

10. DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer und herzlicher Dank gilt meiner Doktormutter Frau Prof. Dr. Caroline Kisker, die mir die nötige Freiheit und Unterstützung gab sowie das nötige Vertrauen entgegenbrachte, um ein eigenständiges Thema bearbeiten zu können. Ihre Herzlichkeit, ihr Optimismus und ihre stets gute Laune waren mir bis weit in andere Lebensbereiche hinein ein Vorbild. Es freut mich daher sehr und ich schätze mich glücklich, ihr Doktorand gewesen sein zu dürfen.

Die Arbeit im Labor und am Institut war durch die freundliche Atmosphäre, die große Geduld und die Unterstützung der Wissenschaftler der Arbeitsgruppen Kisker und Schindelin geprägt. Ich danke dafür Christine Topf, Dr. Daniela Schneeberger, Eun-Young Lee, Heide Marie Roth, Prof. Dr. Hermann Schindelin, Dr. Ingrid Tessmer, Joachim Baumeister, Dr. Jochen Kuper, Dr. Petra Hänzelmann, Petra Lütke, Sabine Erhard, Shambhavi Mishra, Silvia Scheuring, Stefanie Wolski, Sylvia Luckner, Uwe Dietzel, Wilko Rauert und Xaver Kober. Ganz besonderer Dank gilt Florian Sauer für seine fordernde Unterstützung und hitzigen Diskussionen.

Die Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Tanja Schirmmeister und Dr. Radim Vicik vom Institut für Pharmazeutische Chemie, Dr. Uwe Machon vom Institut für Organische Chemie und Prof. Dr. Reidl vom Institut für Hygiene und Mikrobiologie sowie Dr. Paul Schuter vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg war ebenso sehr angenehm und bereichernd.

Es freut mich besonders, dass PD Dr. Peter Langmann sich dazu bereit erklärt hat, das Koreferat zu übernehmen. Er konnte mich früh für infektiologische Themen begeistern, hat mich im Studium und in vielen meiner naiv-euphorischen Ideen bedingungslos unterstützt und war letztendlich ausschlaggebend für die Suche nach einer experimentellen Doktorarbeit. Als einer der verrücktesten Dozenten, die ich kennen lernen durfte, hat er mir im Studium für meine Zukunft als Arzt und Mensch am meisten beigebracht.

Zu meinem größten Glück, auch während der Zeit der Promotionsarbeit, zählen meine Freunde Matthias Bauer, Dieter März, Martin Bauerschmitt, Rainer Volkert und Marc Lange sowie meine Familie Getrud, Karl, Rainer und Carolin Leyh und Sven Zipperich. Mit ihrer Anteilnahme haben sie entscheidend dazu beigetragen, dass die wissenschaftliche Arbeit zu einem sehr wichtigen, nie aber zu meinem einzigen Lebensinhalt geworden ist.

11. Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Nachname	L e y h	Nationalität	deutsch
Vorname	Matthias	Geburtstag/-ort	24. Mai 1982, Crailsheim

HOCHSCHULBILDUNG

03/2003 – 12/2003	Humanmedizin Julius-Maximilians Universität Würzburg
05/2005 – 12/2008	Experimentelle Medizin Julius-Maximilians Universität Würzburg
08/2006 – 03/2007	Forschungssemester am Rudolf-Virchow-Zentrum/ DFG-Forschungszentrum für experimentelle Biomedizin, Würzburg

SCHULAUSSCHULE UND ZIVILDIENTST

2002 – 2003	Zivildienst als Rettungshelfer Deutsches Rotes Kreuz, Schwäbisch Hall
2000 - 2002	Abitur, Albert-Schweizer-Gymnasium Crailsheim
2000	Worthington Senior High School, MN, USA

Würzburg, den 22.04.2010