

# Strukturelle und biochemische Charakterisierung ausgewählter Proteine und Peptide des Interaktoms zyklischer Parasitosen

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

**Eingereicht im Fachbereich Chemie der Fakultät für Mathematik,  
Informatik und Naturwissenschaften an der Universität Hamburg**

vorgelegt von  
**Raphael Eberle**  
aus Hamburg  
2013

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2009 bis Juni 2013 in der Arbeitsgruppe von Prof. Ch. Betzel im Laboratorium für Strukturbiologie von Infektion und Entzündung am Institut für Biochemie und Molekularbiologie des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg durchgeführt.

1. Gutachter: **Prof. Dr. Ch. Betzel**

2. Gutachter: **Prof. Dr. R. Bredehorst**

Tag der Disputation: 02.08.2013

## Inhaltsverzeichnis

I	Abkürzungsverzeichnis.....	7
1	EINLEITUNG.....	9
1.1	Parasiten und Parasitologie.....	9
1.2	Interaktom .....	10
1.3	Malaria.....	12
1.3.1	Epidemiologie .....	12
1.3.2	Lebenszyklus .....	12
1.3.3	<i>Plasmodium falciparum</i> Glutathion-S-transferase – PfGST .....	13
1.4	Flussblindheit (Onchozerkose).....	15
1.4.1	Epidemiologie .....	15
1.4.2	Lebenszyklus .....	16
1.4.3	Immunantwort und Regulierung der Immunantwort durch <i>Onchocerca volvulus</i> exkretorische – sekretorische Produkte (ESPs) .....	16
2	ZIELSETZUNG DER DOKTORARBEIT .....	18
3	MATERIAL UND METHODEN .....	19
3.1	Material.....	19
3.1.1	Geräte.....	19
3.1.2	Bakterienstämme und Plasmide .....	21
3.1.3	Puffer und Lösungen.....	21
3.1.4	Enzyme.....	24
3.1.5	Gele für denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese .....	24
3.2	Methoden .....	25
3.2.1	Plasmid Präparation.....	25
3.2.2	Bestimmung der DNA Konzentration .....	25
3.2.3	Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> Zellen .....	25
3.2.4	Transformation.....	26
3.2.5	Glycerin Stammkulturen.....	26
3.2.6	Heterologe Genexpression in <i>E.coli</i> .....	26
3.2.7	Zellaufschluss der <i>E.coli</i> Zellen.....	27
3.2.8	Affinitätschromatographie .....	27
3.2.9	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	29

## Inhaltsverzeichnis

3.2.10	Bestimmung der Peptidkonzentration nach Scopes .....	29
3.2.11	ÄKTA-Reinigungssystem.....	29
3.2.12	Ionenaustauschchromatographie .....	30
3.2.13	Größenausschlusschromatographie.....	31
3.2.14	SDS PAGE .....	31
3.2.15	Coomassie Färbung der SDS Gele .....	31
3.2.16	Zirkulärer Dichroismus (CD) Spektroskopie.....	31
3.2.17	Dynamische Lichtbeugung (DLS) .....	33
3.2.18	Kleinwinkelbeugung ( <i>Small angle X-Ray scattering</i> (SAXS)) .....	33
3.2.19	Kristallisation .....	34
3.2.20	Datensammlung unter Anwendung von Synchrotron Strahlung .....	36
3.2.21	Datenprozessierung und Modelbau .....	36
3.2.22	Molekulares Docking .....	37
3.2.23	DARPin Selektion (P-cube Projekt Zürich) .....	37
3.2.24	PfGST CDNB-Assay.....	39
3.2.25	[ <sup>3</sup> H]-Hypoxanthin-Assay.....	40
3.2.26	<i>Onchocerca ochengi</i> Sekret Aufbereitung .....	40
3.2.27	Massenspektrometrie .....	41
3.2.28	Bakterizider LB-Agarplatten-Assay.....	42
4	ERGEBNISSE .....	44
4.1	PfGST Inhibitor Kinetiken .....	44
4.1.1	[ <sup>3</sup> H]-Hypoxanthin-Assay .....	52
4.2	PfGST MES Struktur .....	54
4.2.1	Kristallisation, Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung .....	54
4.2.2	PfGST nicht-Substrat-Bindungsstelle.....	58
4.2.3	Molekulares Docking mit Hämin in der PfGST nicht-Substrat-Bindungsstelle .....	60
4.2.4	Charakterisierung der PfGST-MES Interaktion mit CD Spektroskopie..	62
4.3	PfGST Kristallisation mit Inhibitoren .....	63
4.4	Peptide aus den exkretorischen und sekretorischen Produkten von <i>Onchocerca ochengi</i> .....	66
4.4.1	Fraktionierung der Peptide.....	66
4.4.2	Peptid-Identifikation .....	67
4.4.3	Antibakterielle Peptide aus den <i>Onchocerca Ochengi</i> ESPs.....	72

## Inhaltsverzeichnis

4.5	ESP-Proteine von <i>Onchocerca volvulus</i> .....	74
4.6	Onchocystatin (Ov7).....	75
4.6.1	Expression und Reinigung .....	75
4.6.2	Biophysikalische und biochemische Charakterisierung von Ov7 .....	77
4.6.3	Struktur von Ov7 in Lösung .....	79
4.7	Mikrofilarien Oberflächengebundenes Antigen (Ov103).....	80
4.7.1	Expression und Reinigung .....	80
4.7.2	Biophysikalische und biochemische Charakterisierung von Ov103 .....	82
4.7.3	DARPin Selektion .....	83
4.8	Makrophagen Migration inhibierender Faktor 1 (MIF-1) .....	85
4.8.1	Expression und Reinigung .....	85
4.8.2	Biophysikalische und biochemische Charakterisierung von MIF-1 .....	87
4.9	Immundominantes hypodermales Antigen (RAL-2).....	89
4.9.1	Expression und Reinigung .....	89
4.9.2	Biophysikalische und biochemische Charakterisierung von RAL-2.....	90
5	DISKUSSION .....	93
5.1	Identifikation potenzieller PfGST Inhibitoren.....	93
5.2	PfGST MES Komplex-Identifikation der potenziellen L-site ?.....	97
5.3	PfGST Kristallisation.....	101
5.4	Peptid Identifikation .....	103
5.5	Die ESPs parasitärer Helminthen, Identifikation von Peptiden mit antibakterieller Aktivität .....	104
5.6	Proteine aus den ESPs von <i>Onchocerca volvulus</i> .....	106
6	ZUSAMMENFASSUNG – SUMMARY .....	111
6.1	Zusammenfassung .....	111
6.2	Summary .....	112
7	REFERENZEN .....	113
8	GEFAHREN – UND SICHERHEITSHINWEISE .....	122
8.1	Benutzte Chemikalien (GHS Einstufung).....	122
8.2	Kommerzielle Protein Screenings und Kits.....	125
8.3	GHS-und Risikosymbole und Informationen über Gefahren,-Risiko,- Sicherheits- und Vorsogehinweise .....	126
9	ANHANG .....	132
10	DANKSAGUNG .....	142

## Inhaltsverzeichnis

11	LEBENS LAUF .....	144
12	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG.....	145

## I. Abkürzungsverzeichnis

Å	Angström
ALT	<i>Abundant larval transcript</i>
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
CD	zirkulärer Dichroismus
CDNB	2,4-Dinitrochlorbenzol
Cm	Chloramphenicol
Da	Dalton
DARPin	<i>designed ankyrin repeat proteins</i>
deg	<i>degree</i> (Winkelmaß)
DLR	Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt
DLS	dynamische Lichtbeugung
Dmax	maximaler Durchmesser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESR	Elektronenspinresonanz
ESPs	exkretorische/sekretorische Produkte
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPx	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
G-site	GSH Bindungsstelle der PfGST
GST	Glutathion-S-Transferase
H-Brücken	Wasserstoffbrücken
HDM	Helminthen defensiv Moleküle
HDP	Wirt defensiv Proteine
H-site	hydrophobe Bindungsstelle der PfGST
I(0)	Vorwärtsstreuung
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kDa	Kilodalton
K <sub>i</sub>	Dissoziationskonstante
K <sub>m</sub>	Michaelis Menten Konstante
kV	Kilovolt
LB	lysogeny broth
L-site	Ligandin Bindungsstelle der PfGST
LPS	Lipopolysaccharid
MALDI	<i>Matrix assisted laser desorption/ionisation</i>
MBP	<i>Maltose binding protein</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

## Abkürzungsverzeichnis

MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MIF-1	Makrophagen migrations inhibierender Faktor 1
min	Minuten
MS	Massenspektrometrie
MW	Molekulargewicht
Nal	Nalidixinsäure
NLT-1	Neues larvales Transkript 1
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD	optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
Ov	<i>Onchocerca volvulus</i>
OvSOD	<i>Onchocerca volvulus</i> Superoxid Dismutase
Ov33	Immundominantes Antigen
Ov103	Mikrofilarien Oberflächengebundenes Antigen
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PfGST	<i>Plasmodium falciparum</i> Glutathion-S-Transferase
pl	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RAL2	Immundominantes hypodermales Antigen
Rg	Trägheitsradius
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RPC	<i>Reversed phase</i> Chromatographie
rpm	<i>Rounds per minute</i>
SAXS	<i>Small angle X-ray scattering</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat
Str	Streptomycin
Sv	Säulenvolumen
TCA	Trichloressigsäure
Temed	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
Tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
T <sub>h</sub> Zellen	T Helfer Zellen
TLR	<i>Toll like</i> Rezeptoren
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrosefaktor $\alpha$
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor</i> $\beta$
TOF	<i>Time of flight</i>
ün	über Nacht
Ww	Wechselwirkungen
WHO	<i>World health organisation</i>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Parasiten und Parasitologie

Unter einem Parasiten versteht man herkömmlich einen Organismus, der einem anderen Lebewesen, nämlich seinem Wirt für den eigenen Bedarf Energie im Allgemeinen als Nahrung entzieht, ohne ihn entsprechend zu entschädigen. H.D. Crofton hat bereits vor mehr als 40 Jahren folgende detaillierte Definition dazu angegeben [1]:

1. Der Parasit ist von seinem Wirt physiologisch abhängig. Dies kommt in seiner Wirts- und Organspezifität zum Ausdruck.
2. Der Parasit entzieht seinem Wirt Energie, meistens als Nahrung.
3. Der Parasit hat ein höheres Reproduktionspotenzial als sein Wirt.
4. Der Parasit beeinträchtigt die Vitalität, Fertilität und damit die Lebenserwartung seines Wirtes. Dadurch kann er ihn auch potenziell töten.
5. Die Parasitenlast pro Wirtsindividuum neigt in der Wirtspopulation zur Überdispersion, d.h. sie ist nicht normal verteilt.

Zu den Parasiten, die den Menschen am häufigsten befallen zählen Helminthen- und Protozoenspezies [2]. Diese Krankheitserreger sind die Ursache für viele der häufigsten Infektionskrankheiten. Es wird angenommen, dass mehr als 1 Mrd. Menschen in den Entwicklungsländern Afrikas südlich der Sahara, Asiens und Amerikas mit einem oder mehreren Helminthen infiziert sind [3, 4]. Eine Infektionskrankheit, die von Parasiten verursacht wird, ist die Onchozerkose oder „Flussblindheit“, hierbei handelt es sich weltweit um die zweithäufigste Infektionsursache für Blindheit [5]. Die Erkrankung ist das Resultat einer Infektion mit *Onchocerca volvulus*, einer parasitären Filarie [6, 7]. Im Jahr 2010 waren ungefähr 37 Mio. Menschen weltweit betroffen, 99% davon in Afrika. Insgesamt leben mehr als 100 Mio. Menschen unter einem ständigen Infektionsrisiko [8].

Eine bedeutende Infektionskrankheit, die durch Protozoen verursacht wird ist die Malaria. Diese Erkrankung betrifft eine große Zahl von Ländern in Afrika, Asien und Südamerika. Im Jahr 2010 lag die Infektionsrate der Malaria bei ca. 200 Mio. Fällen [9]. Über 3 Mrd. Menschen, also etwa 40% der Weltbevölkerung, leben mit dem

## Einleitung

ständigen Risiko an Malaria zu erkranken [10]. Im Jahr 2009 sank die jährliche Sterberate zwar auf unter 1 Mio. Menschen, aber dennoch bleibt Malaria eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit [9].

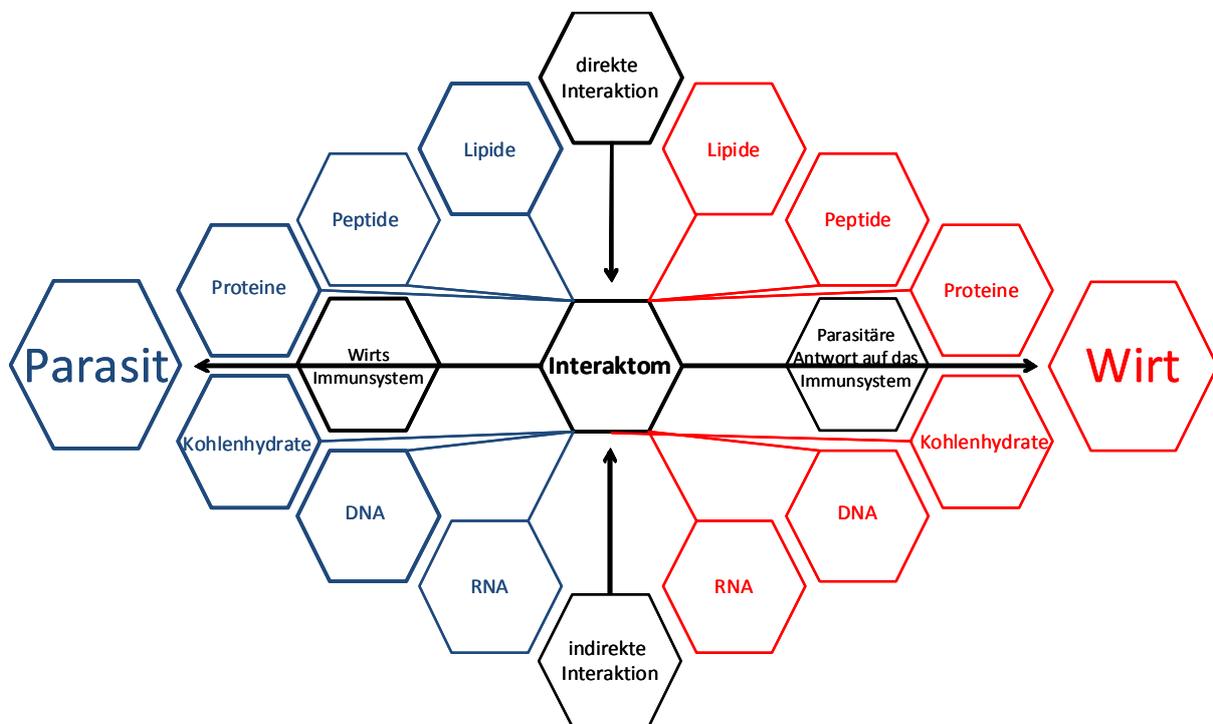
Sowohl Malaria als auch Onchozerkose zählen zu den zyklisch übertragenen Parasitosen. Bei diesen Erkrankungen ist eine Dreiecksbeziehung zwischen Parasit, Zwischenwirt und Endwirt zu beobachten. Zwischen- und Endwirte sind hierbei unterschiedlich und stellen wechselweise das spezifische Biotop für die Parasiten dar. Im Fall von Malaria und Onchozerkose, können die Endwirte auch Menschen sein. Bei den Zwischenwirten beider Parasiten handelt es sich ausschließlich um Mücken, bei der Malaria um Stechmücken (Culiciden) und bei der Onchozerkose um Kriebelmücken (Simuliiden) [11].

### **1.2 Interaktom**

Biologische Systeme bestehen aus einer großen Anzahl verschiedener Komponenten, welche wiederum untereinander in verschiedenem Maße interagieren. Die meisten Moleküle und Zellkompartimente wirken innerhalb eines komplexen Netzwerkes von Interaktionen, wobei ein einzelnes Molekül eine Vielzahl anderer Moleküle beeinflussen kann. Diese Netzwerke sind komplex und werden als „Interaktom“ bezeichnet. In einer genaueren Betrachtung versteht man unter dem Ausdruck Interaktom die Gesamtheit der molekularen Interaktionen zwischen biologischen Molekülen und Kompartimenten in Zellen und/oder zwischen Organismen [12]. Analysen des Interaktoms liefern Einblicke in die Organisation biologischer Netzwerke, helfen bei der Funktionsbestimmung vieler Moleküle und identifizieren Komponenten die bei humanen Krankheiten eine Rolle spielen [13]. An diesen Interaktionen sind Proteine, Peptide, DNA, RNA, Lipide, Kohlenhydrate beteiligt. Protein-Protein-Interaktionen beeinflussen die biologische Aktivität und sind insbesondere beim Aufbau großer Proteinkomplexe oder makromolekularer Maschinen, wie den Ribosomen, von essentieller Bedeutung. Weiterhin haben Protein-Protein-Interaktionen wichtige Funktionen bei biologischen Prozessen wie der Immunantwort, dem Metabolismus, der Signaltransduktion und der Genexpression [14, 15]. Insbesondere bei der Betrachtung des Immunsystems wird deutlich, dass es sich um ein sehr komplexes System handelt. Mehrere Liganden können eine Reihe von unterschiedlichen Rezeptoren gleichzeitig stimulieren und

## Einleitung

unterschiedliche Signaltransduktionswege auslösen [16]. Diese Wege besitzen komplexe Rückkopplungsmechanismen, die wiederum auf der Interaktion von Molekülen basieren [17]. Das Umgebungsmillieu der Immunzellen kann einen starken Effekt auf deren Antwort auf einen Krankheitserreger haben, beispielsweise durch den Einfluss von Zytokinen, Hormonen oder extrinsischen Molekülen [18, 19]. Während parasitärer Erkrankungen stellt die Interaktion zwischen dem Immunsystem des Wirtsorganismus und des Parasiten ein zentrales Element dar [20]. Die Wirt-Parasiten-Interaktionen basieren auf einem komplexen Zusammenspiel zwischen parasitärer Überlebensstrategie und der Immunantwort des Wirts [21]. Um die Funktionsweise zu verstehen, ist es von Bedeutung die makromolekularen Interaktionen zu erfassen und zu charakterisieren [22].



**Abbildung 1:** Darstellung des Wirt-Parasiten Interaktoms bezogen auf das Immunsystem des Wirts. Das Interaktom stellt dabei die Gesamtheit der molekularen Interaktionen zwischen biologischen Molekülen der Organismen dar. Die molekularen Interaktionen können hierbei direkten oder indirekten Ursprungs sein. Das Ziel des Parasiten ist so lange wie möglich im Wirt zu überleben, wohingegen der Wirt versucht den Parasiten so schnell wie möglich loszuwerden. Diese Wirt-Parasiten Interaktion ist nicht nur auf das Immunsystem zu reduzieren, es gibt weitere Parameter die hier einen Einfluss haben, wie Parasitendichte, Gesundheits- und Ernährungsstatus des Wirts, Zwischenwirt usw.

### 1.3 Malaria

#### 1.3.1 Epidemiologie

Bei der Malaria handelt es sich um eine der tödlichsten Infektionskrankheiten weltweit, obwohl sie vermeidbar und medikamentös behandelbar ist [23]. Viele Menschen mit einem hohen Infektionsrisiko leben in verarmten und entlegenen Gebieten von Entwicklungsländern. In diesen Gebieten ist die medikamentöse Versorgung und der präventive Malariaschutz nur unzureichend organisiert [24]. Gerade in diesen Regionen werden aber günstige und wirksame Medikamente sowie Impfstoffe benötigt [25]. Neun von zehn malariabedingten Todesfällen sind in der Region südlich der Sahara zu beobachten, wobei es sich bei 85 % der Todesfälle um Kinder unter fünf Jahren handelt [24]. Malaria wird durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* verursacht und durch weibliche Mücken der Gattung *Anopheles* während einer Blutmahlzeit übertragen [26]. Es sind bisher fünf Parasiten der Gattung *Plasmodium* bekannt, die eine pathogene Wirkung auf den Menschen haben: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* und *Plasmodium knowlesi* [27]. *Plasmodium falciparum* ist der Erreger der Malaria *tropica* und hat mit Abstand die größte klinische Bedeutung [28].

#### 1.3.2 Lebenszyklus

Beim Lebenszyklus der Malariaparasiten unterscheidet man die asexuelle Phase (Schizogonie) im Menschen und die sexuelle Phase (Sporogonie) in der Mücke. Beim Blutmahl einer infizierten *Anopheles*-Mücke werden mehrere hundert Sporozoiten in den Blutkreislauf übertragen. Die Sporozoiten dringen in die Hepatozyten ein und wachsen dort zum Leberschizont heran. In der Leber kommt es zur Vermehrung durch exoerythrozytäre Schizogonie, in Folge dessen bis zu 30.000 Merozoiten gebildet werden. Die Leberschizonten bersten und geben in Vesikeln verpackt die Merozoiten in die Blutbahn ab, dort befallen die Merozoiten die Erythrozyten. In der intraerythrozytären Entwicklungsphase unterzieht sich der Parasit transkriptionalen und morphologischen Veränderungen. Dabei reift er über Ring- und Trophozoitenstadium zum Schizonten. Nach 48 h platzen die Schizonten und der Erythrozyt. Daraufhin werden Merozoiten in den Blutkreislauf freigesetzt und der Kreislauf kann von neuem starten. Eine geringe Anzahl von Merozoiten reift zu

## Einleitung

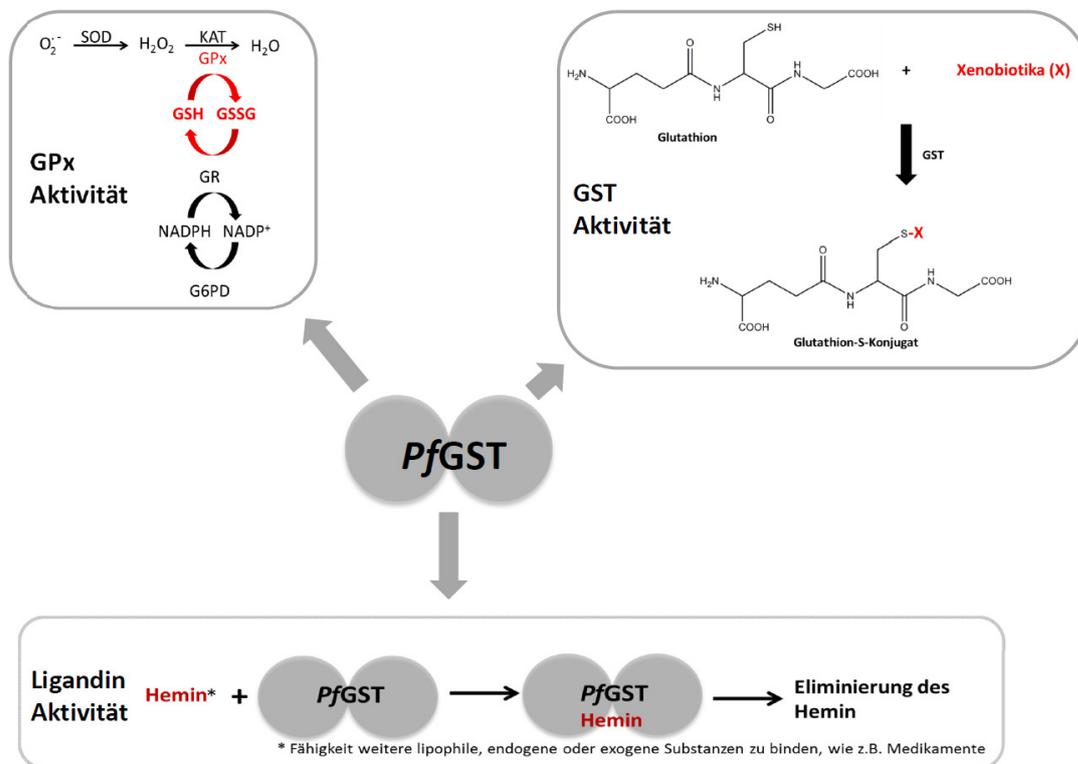
Gametozyten, wobei die männlichen Gametozyten Mikrogametozyten und die weiblichen Makrogametozyten genannt werden. Beim erneuten Blutmahl einer *Anopheles*-Mücke nimmt sie die Gametozyten auf und sie entwickeln sich im Mückendarm zu Gameten. Der Mikrogamet penetriert den Makrogameten und es entsteht eine Zygote, die sich zu einer Oozyste weiterentwickelt. In ihr werden bis zu 1.000 Sporozoiten gebildet, die nach ihrer Freisetzung in die Speicheldrüse der Mücke wandern und dort für eine Neuinfektion zur Verfügung stehen. Die Sporogonie in der *Anopheles*-Mücke ist Außentemperatur abhängig und dauert zwischen 8 bis 16 Tage. Wobei für diesen Entwicklungsschritt eine Mindesttemperatur von 15 °C erforderlich ist, unterhalb dieser Temperatur kommt kein Zyklus zustande [29, 30].

### **1.3.3 *Plasmodium falciparum* Glutathion-S-transferase – PfGST**

Angesichts der intraerythrozytären Entwicklungsphase, befinden sich die Parasiten unter einem massiven Einfluss toxischer Stoffwechselprodukte und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Aus diesem Grund benötigen die Plasmodien ein raffiniertes Schutzsystem, bei dem unter anderem GSTs wichtige Funktionen übernehmen [31]. Bei den zytosolischen Glutathion-S-transferasen (GST) [EC 2.5.1.18] handelt es sich um eine Superfamilie von multifunktionalen Enzymen [32, 33] und Phase II Entgiftungsenzymen [34, 35]. Sie sind bei der zellulären Entgiftung vieler endobiotischer und xenobiotischer Substanzen beteiligt [32, 33]. Auf Grundlage von Sequenzhomologien, Substratspezifität und der Aminosäurevarianz im aktiven Zentrum wurden die zytosolischen Säugetier GSTs in 8 Klassen eingeteilt: Alpha, Mu, Pi, Theta, Sigma, Kappa, Omega, Zeta [36]. Eine wichtige katalytische Funktion der Glutathion-S-Transferasen ist die Konjugation von Glutathion an toxische elektrophile Substanzen [32, 33], wobei die elektrophile Gruppe des zweiten Substrates vom GSH Schwefelatom nukleophil attackiert wird [37]. Durch diese Konjugationsreaktion mit GSH sind die Moleküle wasserlöslicher als zuvor, wodurch sie vom Organismus leichter ausgeschieden werden können [25]. Außerdem besitzen GSTs eine Selen unabhängige GPx Aktivität. Diese Fähigkeit verhindert die Schädigung von Phospholipiden, Fettsäuren und DNA durch freie Radikale [38]. Ursprünglich wurden die GSTs als Ligandin bezeichnet, aufgrund der Fähigkeit neben ihrer enzymatischen Aktivität, große lipophile endogene oder exogene Moleküle wie Gallensäuren, Bilirubin, Hämin und verschiedene Medikamente zu

## Einleitung

binden [31, 34, 39]. Die Ligandin Aktivität resultiert in der Inaktivierung und Immobilisierung dieser Moleküle [35].



**Abbildung 2:** Wirkungsspektrum der PfGST im plasmodialen Entgiftungsprozess. Die PfGST besitzt eine GPx Aktivität, hierbei kommt es zur Entgiftung von  $H_2O_2$  zu  $H_2O$ , KAT (Katalase), GPx (Glutathion Peroxidase), GSSG (oxidiertes Glutathion), GR (Glutathionreduktase), G6PD (Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase). Die klassische GST Aktivität ist die Konjugation von GSH auf toxische Xenobiotika. Die Ligandin Aktivität der PfGST spielt eine wichtige Rolle für *Plasmodium falciparum*, da es das parasitentoxische Hämin bindet und so eliminiert.

Im Vergleich zu anderen Organismen, besitzt *Plasmodium falciparum* nur ein GST Isoenzym (PfGST) [40], das keiner der bis lang bekannten GST Klassen zugeordnet werden kann [41]. Das Molekulargewicht der PfGST als Monomer liegt bei ca. 25 kDa [42]. Die molare Masse des aktiven Proteins liegt bei ca. 50 kDa, da es ein Dimer bildet [43]. Intraerythrozytäre Parasitenstadien verdauen das Hämoglobin ihrer Wirtszelle, wodurch sich der Parasit mit Aminosäuren versorgt. Bei dem Abbau von Hämoglobin wird allerdings das für den Parasiten toxische Hämin gebildet [31]. Überschüssiges, ungebundenes Hämin kann reaktive Sauerstoff Spezies produzieren und somit den Parasiten schädigen [44]. Die PfGST bindet sehr effizient Hämin und kann so den Parasiten vor diesem für ihn giftigen Abbauprodukt des Häm schützen, dabei wird das Enzym unkompetitiv gehemmt ( $K_i=6,5 \mu M$ ) [37, 45].

## Einleitung

Aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen besitzen GSTs für ihre mannigfachen Substrate mehrere Bindungsstellen. Zunächst sind die GSH Bindungsstelle (*G-site*) und eine hydrophobe Bindungsstelle (*H-site*) zu nennen. Die *G-site*, aller GSTs ist hoch spezifisch gegenüber dem natürlichen Substrat Glutathion. An der *H-site* binden die elektrophilen Konjugationspartner des GSH. Von einer strukturellen Sichtweise aus gesehen, liegen die interessantesten Unterschiede der PfGST zu anderen GSTs in einer der Umgebung geöffneten *H-site* und einem atypischen extra *Loop* [41, 42]. Die vorhandenen Strukturdaten der PfGST lassen keinen Schluss über die Lage und die dabei involvierten Aminosäurereste der Ligandin Bindungsstelle (*L-site*) zu. Ergebnisse früherer kinetischer Experimente legten den Schluss nahe, das die *L-site* eine andere Lokalisation im Molekül besitzt als die *H-*oder *G-site* [35].

Substanzen, welche die Funktion der PfGST inhibieren, stellen vielversprechende Vorstufen für Malaria Medikamente dar [40, 46]. In diesem Zusammenhang ist die Untersuchung der strukturellen und biochemischen Eigenschaften dieses Enzyms von Bedeutung. Diese Informationen wiederum sind wichtig für die Entwicklung selektiver Inhibitoren, die für den Parasiten toxisch sind, aber harmlos für die Wirtszelle.

## 1.4 Flussblindheit (Onchozerkose)

### 1.4.1 Epidemiologie

Infektionen sind weltweit die Hauptursache für Erblindungen. Die häufigste Infektionsursache für Blindheit ist eine Infektion mit dem intrazellulären Bakterium *Chlamydia trachomatis* [47]. Die zweithäufigste Infektionsursache ist die Flussblindheit oder Onchozerkose [4]. Neben der Erblindung bei infizierten Personen treten weit häufiger Hautschäden auf. Diese werden hauptsächlich durch lokale Entzündungsreaktionen verursacht, die wiederum durch den Tod migrierender Wurmlarven (Mikrofilarien) ausgelöst werden [48]. Die Onchozerkose ist vor allem in afrikanische Staaten zu finden. Darüber hinaus im Jemen und sechs lateinamerikanischen Ländern (Brasilien, Kolumbien, Ecuador, Guatemala, Mexiko und Venezuela) [49]. Verursacht wird die Onchozerkose durch die Filarie (Nematode) *Onchocerca volvulus*. Die Übertragung der Parasiten erfolgt während einer Blutmahlzeit von Kriebelmücken [50]. Die adulten Würmer können bis zu 15 Jahre in subkutanen Knoten des Wirtes überleben [48]. Onchozerkose wird auch

## Einleitung

Flussblindheit genannt, weil die blutsaugenden Mücken, die diese Krankheit übertragen, an schnell fließenden Gewässern brüten und das Auftreten von Onchozerkose dadurch an solchen Gewässern sehr hoch ist [51]. Obwohl Medikamente existieren, kann eine Reinfektion nach Behandlung in endemischen Gebieten auftreten. Außerdem kann eine zunehmende Resistenzentwicklung gegen die genutzten Medikamente beobachtet werden [52].

### 1.4.2 Lebenszyklus

Onchocercarien besitzen wie alle parasitären Filarien einen Lebenszyklus mit Wirtswechsel. Dabei dient die weibliche Kriebelmücke (*Simulium damnosum*) als Zwischenwirt und als Endwirt dient für *Onchocerca volvulus* der Mensch. In den Endemiegebieten sind nahezu 100 % der Bevölkerung infiziert. Die Kriebelmücke nimmt beim Blutmahl Mikrofilarien auf, die sich in der Mücke zum infektiösen L3 Larvenstadium entwickeln. Bei einem erneuten Blutmahl werden die Larven auf den Endwirt übertragen, die folgend ein bis zwei Jahre durch das Bindegewebe migrieren und gelegentlich auch die Augen befallen können. Adulte Parasiten besitzen die Fähigkeit über Jahre eingekapselt in subkutanen Knoten (Onchozerkomen) zu überleben [50]. Die weiblichen Würmer sind in der Lage pro Tag 1000 Mikrofilarien zu produzieren und freizusetzen. Sie wandern durch die Lymphspalten des Bindegewebes und werden schließlich in den Blutkreislauf geschwemmt [7]. Die Mikrofilarien können ebenfalls das Auge befallen, wodurch die hauptsächliche Schädigung (Erblindung) zustande kommt [51].

### 1.4.3 Immunantwort und Regulierung der Immunantwort durch *Onchocerca volvulus* exkretorische – sekretorische Produkte (ESPs)

Infektionen mit mikrobiellen Pathogenen rufen eine Th1 Immunantwort hervor [6], während Infektionen mit Helminthen eine starke Th2 Immunantwort auslösen. Bezeichnend für diesen Teil der Immunabwehr ist die Bildung der Zytokine, IL-4, IL-5, IL-9 und IL-13, die wiederum eine vermehrte Bildung von Ig1 und IgE bewirken. Dieses charakteristische Zytokinprofil wiederum aktiviert inflammatorische Effektorzellen, wie Eosinophile, Basophile und Mastzellen, die wiederum den Parasiten attackieren [53]. Parasiten benutzen diverse Strategien um der

## Einleitung

Immunantwort des Wirts entgegen zu wirken [54-59]. *Onchocerca volvulus* moduliert das Immunsystem des Wirts durch die Freisetzung löslicher Mediatoren oder über Oberflächenmoleküle der Kutikula. Dabei spielen besonders die exkretorischen – sekretorischen Produkte (ESP) des Parasiten eine bedeutende Rolle, indem sie die Zellen bzw. Moleküle der Immunabwehr ligieren, degradieren oder in anderer Weise mit ihnen interagieren [60]. Die Zusammensetzung der ESPs variiert zwischen den parasitären Helminthen Spezies und deren individuellen Lebenszyklusstadien [61, 62]. Die Helminthen ESPs sind generell reich an verschiedenen Proteinen, Peptiden, Glykoproteinen, Lipiden und Lipidmediatoren, die mit dem Wirtsimmunsystem interagieren und dieses dadurch regulieren können [63]. Besonders unter den Proteinen gibt es eine sehr heterologe Zusammensetzung. Die ESPs der Helminthen besitzen unterschiedliche Typen von Proteaseinhibitoren [64-66]. Außerdem bilden diese Krankheitserreger homologe Moleküle menschlicher Zytokine [65, 67-70] und antioxidative Proteine, sowie Entgiftungsenzyme [71-74]. Serin-, Aspartat-, Metallo- und Cysteinproteasen sind ebenfalls in den ESPs nachweisbar [75, 76]. Ansonsten sekretiert *Onchocerca volvulus* eine Vielzahl von Produkten deren Funktion auf das Immunsystem des Wirts bis lang nur unvollständig aufgeklärt ist [77-81].

## 2 ZIELSETZUNG DER DOKTORARBEIT

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Proteine und Peptide charakterisiert, die eine wichtige Funktion bei der Malaria und Onchozerkose besitzen. Beide Infektionskrankheiten gehören zur Klasse der zyklisch übertragenden Parasitosen. Bei diesen Parasitosen fungieren zwei unterschiedliche Wirte wechselweise als spezifisches Biotop für einen Parasiten.

Malaria gehört zu den am sorgfältigsten und am besten charakterisierten zyklisch übertragenen Parasitosen, deren Erreger im Blut zirkulierende, einzellige Protozoen Spezies sind. Bei der Onchozerkose hingegen sind die Erreger metazoische Parasiten, deren Larven nicht im Blut sondern in der Gewebslymphe der Haut zirkulieren. Als Zwischenwirt und Überträger dienen in beiden Fällen Mücken. Der Malariaerreger *Plasmodium falciparum* besitzt eine Reihe von Enzymen und Proteinen, die ihn vor der humanen Immunantwort als auch vor toxischen Metaboliten schützen. Eines dieser Enzyme ist die PfGST, die eine zentrale Bedeutung bei der Eliminierung von Hämin, ROS und bestimmten Wirkstoffen einnimmt. Durch diese zentrale Funktion der PfGST bei der Verteidigungsstrategie des Parasiten, stellt dieses Enzym ein attraktives Ziel für eine strukturbasierte Wirkstoffentwicklung dar. Im Rahmen der Doktorarbeit sollten potenzielle und neuartige PfGST-Inhibitoren bezüglich ihrer Spezifität und Aktivität charakterisiert und sowohl kinetische als auch strukturbasierte Daten erhoben werden.

*Onchocerca volvulus*, der Erreger der Onchozerkose, ist in der Lage das Immunsystem des Wirts durch (seine) ESPs zu modulieren. Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher zur Klasse der ESPs gehörende, funktionelle Proteine und Peptide biochemisch und strukturell charakterisiert werden. Weiterhin sollten auch niedermolekulare Peptide aus *Onchocerca ochengi* biochemisch charakterisiert werden.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Synchrotron	<u>P14-Petralll, DESY, Hamburg, Deutschland</u>
Messplätze	<u>X33 SAXS Messplatz, EMBL, HASYLAB/DESY, Hamburg, Deutschland</u>
	<u>X13 Konsortiums Messplatz, HASYLAB/DESY, Hamburg, Deutschland</u>
Zentrifugen	Zentrifuge 5810R (Eppendorf, Deutschland) Zentrifuge 5804R (Eppendorf, Deutschland) Zentrifuge 5415R (Eppendorf, Deutschland) Zentrifuge 5424 (Eppendorf, Deutschland) Zentrifuge Minispin <sup>®</sup> Plus (Eppendorf, Deutschland) Optima TL Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, USA) Avanti J-26 XP (Beckman Coulter, USA)
Thermomixer	Thermomixer <i>comfort</i> (Eppendorf, Deutschland)
Spektrophotometer	GeneQuant 1300 (GE Healthcare, UK)
Schrankinkubatoren	37°C Inkubator Kelvitron <sup>®</sup> t (ThermoScientific, USA) 4°C Inkubator (Rubarth, Deutschland) 20°C Inkubator (Rubarth, Deutschland)
Schüttelinkubatoren	IRC-1-U ( Adolf Kühner AG, Schweiz) Innova <sup>®</sup> 43/43R (New Brunswick Scientific, USA) Innova <sup>®</sup> 4330 (New Brunswick Scientific, USA)

## Material und Methoden

Branson Sonifizierer	Sonifier 250/450 (Emerson Electric Co, USA)
Kristallisationsroboter	Honeybee 961 (Genomic Solutions, USA)
DLS Gerät	SpectroSIZE 300 (Nabitec, Deutschland)
Mikroskope und Photosysteme	CrystalScore (Diversified Scientific Inc., USA) Mikroskop SZX12 mit Kamera DP10 (Olympus, Japan)
Waage	TE3102S (Sartorius AG, Deutschland)
Feinwaage	LP224S-0CE (Sartorius AG, Deutschland)
pH Meter	sevenEASY (Mettler Toledo, USA)
FPLC	ÄKTA Purifier P-901 (GE Healthcare, UK)
CD-Spektrometer	J-815 (Jasco, UK)
Photospektrometer	Nanodrop 2000c (Peqlab, Deutschland)
Pipettierroboter	Lissy (Zinsser, Deutschland)
Elektrophorese Stromversorgung	EV 231 (Peqlab, Deutschland)
Elisa Reader	GENios <i>microplate reader</i> (Tecan, Schweiz)
Magnetrührer	VMS-A (VWR, USA) MR 3001 (Heidolph, Deutschland)

## Material und Methoden

Massenspektrometer                      UltrafleXtreme MALDI-TOF-TOF-MS (Bruker Daltonik, Bremen, Deutschland)

Lyophylle                                      ALPHA 1-2 LD p l u s (Christ, Deutschland)

### 3.1.2 Bakterienstämme und Plasmide

#### 3.1.2.1 Bakterienstämme

*E.coli* BL21 (DE3) (Stratagene, USA)

*E.coli* BL21 Star™ (DE3) (Life technologies, USA)

*E.coli* DH5α™ (Life technologies, USA)

*E.coli* XL10-Gold (Stratagene, USA)

*E.coli* XL1-Blue (Stratagene, USA)

#### 3.1.2.2 Plasmide

pJC40 (ATCC, USA)

pJC20 (ATCC, USA)

pET14b (Novagen, Merck Millipore, USA)

pQE30 (Qiagen, Deutschland)

### 3.1.3 Puffer und Lösungen

Wenn nicht angegeben wurde der pH Wert mit HCl oder NaOH eingestellt

#### 3.1.3.1 Allgemeine Puffer und Lösungen

PBS                                              1,78 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,27 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g KCl;  
8,01 g NaCl; pH 7,5; ad 1000 mL dH<sub>2</sub>O

100 % TCA Stock                              50 g TCA gelöst in 35 mL dH<sub>2</sub>O

1 M DTT Stock                                      154,5 mg DTT gelöst in 1 mL dH<sub>2</sub>O

## Material und Methoden

### 3.1.3.2 *E.coli* Zellkultur

LB Medium-/ Agar	10 g Trypton; 10 g NaCl; 5 g Hefeextrakt Für LB-Agar wurden 1,5 % Agar Agar addiert
2YT Medium	16 g Trypton; 5 g NaCl; 10 g Hefeextrakt
<b>Autoinduktionsmedium</b>	
ZY Medium	10 g Trypton; 5 g Hefeextrakt
MgSO <sub>4</sub>	2 mM MgSO <sub>4</sub>
50x5052	0,5 % Glycerin, 0,05 % Glucose, 0,2 % α-Laktose
50xM	50 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 50 mM NH <sub>4</sub> CL; 5 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Antibiotika	50 mg/mL Amp in 50 % EtOH; Stocklösung
IPTG	1 M in dH <sub>2</sub> O; Stocklösung

### 3.1.3.3 Proteinreinigung

Proteaseinhibitor	0,1 M PMSF in Isopropanol
Lysis-Puffer A (MIF-1, Ov103, OvSOD)	50 mM Tris HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 10 % Glycerin; 10 mM Imidazol; 0,1 mM PMSF
Lysis-Puffer B (Ov7, RAL2)	50 mM Tris HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 10 mM Imidazol; 0,1 mM PMSF
Lysis-Puffer C (PfGST)	100 mM MES pH 6,0 ; 3 mM GSH; 0,1 mM PMSF
Lysis-Puffer D (DARPin)	50 mM Tris HCl pH 7,5; 500 mM NaCl; 10 % Glycerin; 20 mM Imidazol; 0,005 % Tween 20
His Waschpuffer	Lysis-Puffer A oder B mit 20-100 mM Imidazol
His Elutionspuffer	Lysis-Puffer A oder B mit 150-800 mM Imidazol
PfGST Waschpuffer	Lysis-Puffer C
PfGST Elutionspuffer	Lysis-Puffer C mit 30 mM GSH
DARPin Waschpuffer	Lysis-Puffer D
DARPin Elutionspuffer	Lysis-Puffer D mit 250 mM Imidazol
Puffer A Anionenaustauscher	20 mM Tris Base pH 8,0
Puffer B Anionenaustauscher	20 mM Tris Base pH 8,0; 1 mM NaCl
Puffer A Kationenaustauscher	20 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,0
Puffer B Kationenaustauscher	20 mM K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,0; 1 mM NaCl
Puffer Superdex 75 16/60	20 mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM NaCl

## Material und Methoden

### 3.1.3.4 Kompetente Zellen

Puffer 100 mM CaCl<sub>2</sub>; 10 % Glycerin, autoklaviert

### 3.1.3.5 SDS-PAGE

10x Laufpuffer 30,3 g Tris Base pH 8,3 (pH wurde nicht eingestellt); 144 g Glycin; 10 g SDS; ad 1000 mL

1x Laufpuffer 10x Laufpuffer 1:10 verdünnt mit dH<sub>2</sub>O

2x Probenpuffer 1,25 mL 0,5 M Tris pH 6,8

3,55 mL dH<sub>2</sub>O

2,5 mL Glycerin

2 mL 10 % (w/v) SDS

0,2 mL 0,5 % (w/v) Bromphenolblau

10% APS 100 mg APS; ad 1 mL dH<sub>2</sub>O

10% SDS 10 g SDS; ad 100 mL dH<sub>2</sub>O

Sammelgelpuffer (100 mL) 6,06 g Tris Base pH 6,8; ad 100 mL dH<sub>2</sub>O

0,5 M Tris

Trenngelpuffer (100 mL) 18,17 g Tris Base pH 8,8; ad 100 mL dH<sub>2</sub>O

1,5 M Tris

Färbelösung 250 mL Isopropanol; 100 mL Essigsäure; 1 g Coomassie-Blau; ad 1000 mL dH<sub>2</sub>O

Entfärbelösung 200 mL Essigsäure; ad 1000 mL dH<sub>2</sub>O

### 3.1.3.6 CD Spektroskopie

Proteinpuffer 20 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,5 (pH Wert wurde mit Essigsäure und NaOH eingestellt)

### 3.1.3.7 PfGST-Assay

Assay-Puffer 100 mM HEPES pH 6,5 und 1 mM EDTA

GSH 1 mM Stocklösung in dH<sub>2</sub>O

CDNB 1 mM Stocklösung in 100 % EtOH

Komponenten 4 mM Stocklösung in 100 % DMSO

## Material und Methoden

### 3.1.3.8 Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose Regeneration

Regenerationspuffer	6 M GuHCl; 0,1 M Essigsäure
SDS Puffer	2 % (w/v) SDS in dH <sub>2</sub> O
EDTA Puffer	100 mM EDTA pH 8,0 in dH <sub>2</sub> O
NiSO <sub>4</sub> Puffer	100 mM NiSO <sub>4</sub> in dH <sub>2</sub> O
EtOH	25 %, 50 %, 75 % und 100 %

### 3.1.3.9 GSH Agarose Regeneration

Regenerationspuffer	6 M GuHCl
---------------------	-----------

### 3.1.4 Enzyme

Lysozym	Sigma-Aldrich, USA
Papain	AppliChem, Deutschland
DNase I	ThermoScientific, USA

### 3.1.5 Gele für denaturierende SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

	4 % Sammelgel	15 % Trenngel
Sammel-/Trenngelpuffer	2,5 mL	2,5 mL
dest. Wasser	6,1 mL	2,4 mL
Acrylamid	1,3 mL	5,0 mL
SDS	0,1 mL	0,1 mL
APS	50 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Plasmid Präparation

3 mL LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit einer transformierten *E. coli* Kolonie von einer LB Agarplatte beimpft und in bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid DNA aus den *E. coli* Zellen unter Verwendung des peqlabGOLD Plasmid Miniprep Kit I (Peqlab, Deutschland) entsprechend den Herstelleranweisungen isoliert. Die Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

### 3.2.2 Bestimmung der DNA Konzentration

Die Absorption von Nukleotiden und Nukleinsäuren kann bei 260 nm photometrisch bestimmt werden. Die DNA Konzentration wurde mit der folgenden Formel bestimmt.

$$c \text{ [}\mu\text{g}/\mu\text{l]} = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

c = Konzentration der DNA Lösung

OD<sub>260</sub> = optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm

V = Verdünnungsfaktor

F = Multiplikationsfaktor (= 50 für dsDNA)

Die Messungen wurden an einem Nanodrop 2000c (Peqlab, Deutschland) durchgeführt mit jeweils 1 µl Probe und einer dreifach Bestimmung der OD<sub>260</sub>.

### 3.2.3 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

3 mL LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum wurden mit 50 µl eines Glycerinstocks des *E. coli* Stammes angeimpft und in bei 37 °C inkubiert. Im nächsten Schritt wurden 100 mL LB Medium mit 1 mL der in Kultur und dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Die Zellkultur wurde bei 37 °C inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> einen Wert von 0,6 bis 0,8 erreicht hatte. Die Zellen wurden 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend für 10 min bei 4 °C und 3.200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, wohingegen das Zellpellet in 10 mL einer sterilen und kalten 0,1 M CaCl<sub>2</sub>/10 % (v/v) Glycerin Lösung für 15 min auf Eis inkubiert wurde. Nach der Inkubation wurde das Gemisch für 10 min bei 4 °C und 3.200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde erneut in 1 mL

## Material und Methoden

der sterilen und kalten 0,1 M CaCl<sub>2</sub>/10 % (v/v) Glycerin Lösung resuspendiert. 50 µl der gelösten Zellpellets wurden in 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Zellen wurden bei -80 °C gelagert.

### 3.2.4 Transformation

Ein 50 µl Aliquot chemisch kompetenter *E.coli* Zellen wurde auf Eis aufgetaut und mit 100 ng der Plasmid DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz in einem Thermoblock (Eppendorf, Deutschland) 90 Sekunden einem Hitzeschock bei 42 °C ausgesetzt. Anschließend wurde der Transformationsansatz für zwei Minuten auf Eis abgekühlt, mit 500 µl LB Medium versetzt und in einem Thermoblock (Eppendorf, Deutschland) für 1 h bei 37 °C inkubiert. 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf einer LB Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und in bei 37 °C inkubiert.

### 3.2.5 Glycerin Stammkulturen

Für die Herstellung einer Glycerin Stammkultur, wurden *E.coli* Zellen mit Plasmiden transformiert und auf LB Agarplatten mit dem korrespondierenden Antibiotikum ausplattiert. 3 mL LB Medium wurde mit einer Kolonie angeimpft und bei 37 °C inkubiert. 800 µl der in Kultur wurden gründlich mit 1000 µl Glycerin durch invertieren gemischt und bei -80 °C gelagert.

### 3.2.6 Heterologe Genexpression in *E.coli*

Für die Expression der Zielproteine wurden verschiedene *E.coli* Stämme verwendet. Stamm und Expressionsparameter werden im Ergebnissteil detailliert dargestellt. Der grundlegende Ablauf der heterologen Genexpression wird im Folgenden beschrieben. Für die in Kultur wurden 100 mL LB Medium mit 50 µg/mL Ampicillin versetzt und aus einem Glycerinstock oder transformierten *E.coli* Kolonien von einer LB Agarplatte angeimpft. Diese Vorkultur wurde in bei 37 °C inkubiert. Für die Expressionskultur wurde 1 L LB Medium ebenfalls mit 50 µg/mL Ampicillin versetzt und mit 10 mL der Vorkultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C inkubiert, bis die OD<sub>600</sub> einen Wert von 0,3 bis 1,0 (je nach Protein unterschiedlich) erreicht hatte. Die Expressionslösung wurde mit 1 mM IPTG induziert. Die Expressionsdauer der

## Material und Methoden

Zielproteine variierte zwischen 3 h bis 5 h bei 37 °C oder ün bei 18 °C. Während der Zellernte wurden die Expressionskulturen zunächst für 25 min bei 3.200 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit 30 mL Lysis-Puffer resuspendiert. Die Lagerung der Zellsuspension erfolgte bis zum Zellaufschluss bei -20 °C. Zur Überprüfung der Expressionsqualität wurden Expressionsprofile erstellt. Wobei, 1 mL der Zellkultur kurz vor der Induktion (0 h) in ein Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert wurde. Weitere Proben der Expressionskultur wurden je 1 h, 2 h, 3 h usw. nach der Induktion bis zur Ernte entnommen. Die Proben wurden für 10 min bei 4 °C und 13.400 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das *E.coli* Zellpellet in 50 µl SDS Auftragspuffer gelöst und für 10 min bei 96 °C erhitzt. Auf eine SDS PAGE wurden jeweils 10 µl Probe aufgetragen.

### **3.2.7 Zellaufschluss der *E.coli* Zellen**

Zunächst wurde ein gefrorenes Zellpellet bei Raumtemperatur aufgetaut, anschließend wurden die Zellen in einem Becherglas mit einer Spatelspitze Lysozym versetzt und für 30 bis 60 min auf Eis inkubiert. Für die Ultraschallbehandlung wurde ein Branson Sonifizierer 250/450 (Emerson Electric Co, USA), mit den folgenden Einstellungen verwendet: 6 min bei Stufe 4 und 40 kHz auf Eis. Der Zellrohextrakt wurde dann für 45 min bei 4 °C und 13.000 x g zentrifugiert. Der Überstand enthielt das lösliche Protein und wurde für die Reinigung des Zielproteins mittels Affinitätschromatographie oder anderer chromatographischer Methoden verwendet.

### **3.2.8 Affinitätschromatographie**

#### **3.2.8.1 Ni-NTA Agarose**

Nach dem in Punkt 3.2.7 beschriebenen Zellaufschluss wurden die im Überstand befindlichen Zielproteine mit Ni-NTA Agarose (Qiagen, Deutschland) gereinigt. Zunächst wurde die Ni-NTA Agarose mit dem Reinigungspuffer äquilibriert. Die Menge der verwendeten Matrix richtete sich nach der Menge des vorhandenen Zielproteins und variierte zwischen 1,5 und 4 mL. Der Proteinrohextrakt wurde in der Säule mit der Ni-NTA Matrix vermischt und 30 min im Kaltraum bei 6 °C inkubiert. Danach wurde der Rohextrakt durch die Matrix durchtropfen gelassen, der Durchlauf

## Material und Methoden

wurde aufgefangen. Die Matrix wurde mit 4 Säulenvolumen (Sv) Puffer ohne Imidazol gewaschen, wobei ein Sv 5 mL entsprach. Anschließend wurde ein Imidazolgradient eingeführt, beginnend mit 10 mM Imidazol (Waschschritt) bis hin zu 800 mM Imidazol (Elutionsschritt), zu je 2 Sv. Diese Fraktionen wurden gesammelt und zu einem späteren Zeitpunkt auf einer SDS Page bezüglich Reinheit des Zielproteins untersucht. Das eluierte Zielprotein wurde gegen 4 L des entsprechenden Puffers ohne Imidazol ün bei 4 °C dialysiert.

### 3.2.8.2 Regeneration der Ni-NTA Agarose

Die Regeneration der Ni-NTA Agarose wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt (Qiagen; the QIAexpressionist™) und anschließend mit 8 Sv des Reinigungspuffers gewaschen und äquilibriert. Gelagert wurde die Ni-NTA Matrix im Reinigungspuffer +20 % EtOH.

### 3.2.8.3 Reinigung der PfGST mit GSH Sepharose

Ein gefrorenes Zellpellet wurde bei Raumtemperatur aufgetaut und danach direkt sonifiziert. Der Zellrohextrakt wurde im Anschluss für 45 min bei 4 °C und 13.000 x g zentrifugiert. Für die Reinigung wurde Glutathion Superflow Sepharose (Generon, UK) verwendet. Alle Reinigungsschritte wurden bei 6 °C durchgeführt. Zunächst wurde die Matrix mit dem Reinigungspuffer äquilibriert, danach mit dem Überstand aus dem Zellaufschluss gemischt und für 30 min inkubiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Matrix wurde mit 3x3 Sv 0,1 M MES pH 6,0 gewaschen um unspezifisch gebundene Kontaminationen mit *E.coli* Proteinen zu entfernen. Die PfGST wurde mit 10 mL 0,1 M MES pH 6,0 und 33 mM GSH eluiert. Die Elutionsfraktion wurde auf einer SDS Page bezüglich Reinheit des Zielproteins untersucht. Die PfGST wurde anschließend gegen 2 L 0,1 M MES pH 6,0; 4 mM GSH bei 6 °C, ün dialysiert.

### 3.2.8.4 Regeneration der GSH Matrix

Die GSH Matrix wurde 30 min mit 6 M GuHCl inkubiert und danach mit 8 Sv des Reinigungspuffers gewaschen und äquilibriert. Die Matrix wurde im Reinigungspuffer +20 % EtOH gelagert.

### 3.2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Absorption von Proteinen kann bei 280 nm photometrisch bestimmt werden, aufgrund des Absorptionsmaximums der aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin). Die Absorption der Proteinlösung wurde an einem Nanodrop 2000c (Peqlab, Deutschland) bestimmt. Jeweils 2 µl der Proteinlösung wurden für die Konzentrationsbestimmung eingesetzt. Zusammen mit dem Molaren Extinktionskoeffizienten ( $M^{-1}cm^{-1}$ ) und dem Molekulargewicht des Proteins kann mit der nachfolgenden Formel, die auf dem Lambert-Beer'schen-Gesetz beruht, die Konzentration der Proteinlösung bestimmt werden.

$$E = l \times c \times d$$

E = gemessene Extinktion

l = molarer Extinktionskoeffizient

c = Konzentration der Protein Lösung

d = Küvettenschichtdicke

### 3.2.10 Bestimmung der Peptidkonzentration nach Scopes

Die Peptidkonzentration wurde bei 205 nm bestimmt, wobei die Absorption der Peptid Bindung bestimmt wurde. Die Messungen wurden am GeneQuant 1300 Spektrophotometer (GE Healthcare, UK) durchgeführt. Die Absorption wurde von 500 µl der Peptidlösung in einer Polystyrol Küvette (Sarstedt, Deutschland) bestimmt. Das Gerät wurde zuvor gegen 500 µl dH<sub>2</sub>O kalibriert [82]. Eine Standardgerade bekannter Konzentrationen des Peptids SAVLQSGFRK (Genescrypt, USA) wurde benutzt, um die Konzentrationen der Peptidproben zu bestimmen.

### 3.2.11 ÄKTA-Reinigungssystem

Für die weitere Reinigung der Proteine wurden Ionenaustausch- und Gelfiltrationssäulen verwendet, die an ein ÄKTA-Reinigungssystem (GE Healthcare, UK) angeschlossen waren. Die Reinigungsläufe wurden bei 6 °C durchgeführt. Das ÄKTA System wurde über die Software UNICORN 4.12 (GE Healthcare, UK) gestartet und gesteuert, parallel wurde bei  $A_{280}$  die Proteinkonzentration bestimmt. Die Peakfraktionen, die eine hohe  $A_{280}$  Absorption zeigten wurden vereinigt und mit einer SDS PAGE auf Reinheit analysiert.

## Material und Methoden

**Tabelle 1:** Verwendete Ionenaustausch- und Gelfiltrationssäulen zur Reinigung der Zielproteine

Säule	Chromatographie Typ	Gruppe	Bindungskapazität (mg)	Flussrate (mL/min)	Max. Druck (MPa)	Volumen (mL)	Säulengröße (mm)	Hersteller
UnoQ-6	Anionen Austausch	(-N+(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> )	80	0,5 – 8,0	4,5	6	12 x 53	BIORAD
MonoS HR 5/5	Kationen Austausch	-CH <sub>2</sub> -SO <sub>3</sub> -	20-50	0,5 – 2,0	5	1	5 x 50	GE Healthcare
Säule	Chromatographie Typ		Trennungskapazität (kDa)	Flussrate (mL/min)	Max Druck (MPa)	Volumen (mL)	Säulengröße (cm)	Hersteller
Superdex 75 16/60	Gelfiltration		3 – 70	0,3 – 1,6	0,5	120	1,6 x 60	GE Healthcare

### 3.2.12 Ionenaustauschchromatographie

#### 3.2.12.1 Anionenaustauschchromatographie

Für die Anionenaustauschchromatographie wurde eine UnoQ-6 12x53 mm, 6 mL Anionenaustauschsäule (BIORAD, USA) verwendet. Zunächst wurde das Protein gegen 2 L Laufpuffer A bei 4 °C ün dialysiert und danach bei 13.400 x g, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Säule wurde mit Puffer A äquilibriert und 2 mL einer konzentrierten Protein Lösung wurden in das ÄKTA System (GE Healthcare, UK) injiziert. Die Trennung wurde bei einer Flussrate der mobilen Phase von 1,5 mL/min und einen linearen Gradienten von Puffer B, 0-100 % in 50 min durchgeführt. Letztendlich wurden 70 Fraktionen mit jeweils 1 mL Volumen gesammelt. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS PAGE untersucht.

#### 3.2.12.2 Kationenaustauschchromatographie

Für die Kationenaustauschchromatographie wurde eine MonoS HR 5/5, 1 mL Kationenaustauschsäule (GE Healthcare, UK) verwendet. Das Protein wurde gegen 2 L Laufpuffer A bei 4 °C ün dialysiert und anschließend bei 13.400 x g, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Säule wurde zunächst mit Puffer A äquilibriert und 2 mL einer konzentrierten Protein Lösung wurden in das ÄKTA System (GE Healthcare, UK) injiziert. Die Trennung wurde bei einer Flussrate der mobilen Phase von 0,6 mL/min durchgeführt. Der folgende Gradient wurde dabei verwendet: 10-25 % B in 2,5 min, auf 60 % B in 17 min und auf 100 % B in 4 min. Letztendlich wurden 20 Fraktion mit jeweils 1 mL Volumen gesammelt und die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS PAGE untersucht.

### **3.2.13 Größenausschlusschromatographie**

Für die Größenausschlusschromatographie wurde eine Superdex 75 16/60, 120 mL Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, UK) verwendet. Als Puffer für die Reinigungsläufe wurde 20 mM Tris pH 7,5 und 150 mM NaCl verwendet. Die Superdex 75 16/60 Säule wurde zunächst mit diesem Puffer äquilibriert und je nach Proteinkonzentration wurden 2 mL oder 5 mL Proteinprobe auf die Säule aufgetragen, zuvor wurde das Protein bei 13.400 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die Trennung wurde bei einer Flussrate der mobilen Phase von 0,6 mL/min durchgeführt. Es wurden 90 Fraktionen mit jeweils 1,5 mL Volumen gesammelt, die Sauberkeit des Proteins wurde mittels SDS PAGE nachgeprüft.

### **3.2.14 SDS PAGE**

Die SDS PAGE ist eine einfache, hochauflösende Methode, wobei das Prinzip auf der Trennung negativ geladener SDS-Proteinkomplexe nach ihrem MW in einem elektrischen Feld beruht [83]. Das diskontinuierliche Polyacrylamidgel besteht aus einem schmalen Sammelgel (4 % Acrylamid; pH 6,8) und aus dem darauf folgenden Trenngel (15 % Acrylamid; pH 8,8). Proteinproben wurden mit 2x SDS Probenpuffer versetzt und durch Erhitzen bei 96 °C für 10 min vollständig denaturiert. 20 µl der Proben wurden auf das SDS Gel aufgetragen. Die Gele wurden in einer Mighty Small II Gelkammer (Hoefer Inc, USA) eingespannt, die Gelkammern wurden mit 10x SDS Laufpuffer gefüllt und die elektrische Spannung pro SDS PAGE betrug 25 mA. Die Energiezufuhr wurde an einem EV 231 Stromversorger (Peqlab, Deutschland) gesteuert.

### **3.2.15 Coomassie Färbung der SDS Gele**

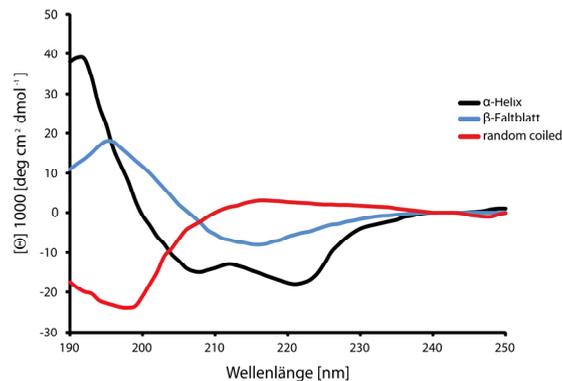
Für die Coomassie Färbung wurde das Sammelgel entfernt und das Trenngel für 2 h in der Färbelösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel für 2 h in einer Entfärberlösung inkubiert, bis die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Die Gele wurden nach dem Entfärben in Wasser gelagert.

### **3.2.16 Zirkulärer Dichroismus (CD) Spektroskopie**

Die CD-Spektroskopie ist eine Standardmethode in der Strukturbiologie um die

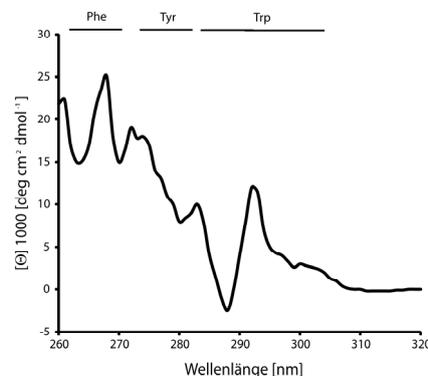
## Material und Methoden

Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen zu untersuchen. Die Methode beruht auf der unregelmäßigen Absorption von links- und rechtsgängig polarisierten Lichts durch die Peptidbindungen (Absorption unterhalb 240 nm), aromatischen Aminosäuren (Absorption 260 – 320 nm) und Disulfidbrücken (schwache Absorptionsbanden bei ungefähr 260 nm) [84, 85]. Die verschiedenen Sekundärstrukturtypen der Proteine besitzen charakteristische CD-Spektren (Abb. 5).



**Abbildung 3:** Charakteristischer Verlauf der CD-Spektren der Sekundärstrukturen von Proteinen. In schwarz das  $\alpha$ -Helix CD-Spektrum, in blau das  $\beta$ -Faltblatt CD-Spektrum und in rot das CD-Spektrum für *random coiled* Strukturen [84].

Im Nah-UV Bereich von 260 nm bis 320 nm können CD-Spektren der aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin) aufgenommen werden [86].



**Abbildung 4:** CD-Spektren der aromatischen Aminosäuren, verwendet für einen Tertiärstruktur Fingerabdruck. Tryptophan (Trp) zeigt ein charakteristisches CD-Spektrum zwischen 285 – 305 nm. Tyrosin (Tyr) zeigt ein charakteristisches CD-Spektrum zwischen 275 – 285 nm und Phenylalanin (Phe) zeigt ein charakteristisches CD-Spektrum zwischen 260 und 270 nm [85].

Die CD-Messungen der Zielproteine wurden mit dem J-815 CD-Spektrometer (Jasco, UK) durchgeführt. Das Gerät wurde gemäß den Herstellerangaben gestartet. Über die Software Spectra Manager (Jasco, UK) wurden die Messparameter eingestellt und die Auswertung der Ergebnisse durchgeführt. Zunächst wurden die

## Material und Methoden

Proteinproben gegen 1 L 20 mM  $K_2HPO_4$  dialysiert und anschließend für 10 min bei 4 °C und 13.400 x g zentrifugiert. Die Proteinkonzentration für die Sekundärstrukturmessungen lag zwischen 100 µg/mL bis 500 µg/mL und für die Tertiärstrukturmessungen bei 4 mg/mL. Das Volumen der Proteinlösung für die Sekundärstrukturmessungen lag bei 200 µl und für die Tertiärstrukturmessungen bei 1 mL. Die Messungen der jeweiligen Proteinproben wurden 15x wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Der Puffer in dem das Protein vorlag wurde ebenfalls gemessen, um eventuelle Störsignale vom Proteinsignal abzuziehen, wobei der Puffer mit 5 Wiederholungen gemessen wurde. Das Ergebnis wurde in molarer Elliptizität  $[\theta]_{1000}$  [deg cm<sup>2</sup> dmol<sup>-1</sup>] angegeben und mit dem Spectra Manager II (Jasco, Deutschland) konvertiert.

### **3.2.17 Dynamische Lichtbeugung (DLS)**

DLS-Messungen wurden durchgeführt um die Dispersität der Proteinlösungen vor Kristallisationsversuchen und SAXS Experimenten zu überprüfen. Die Messungen wurden am SpectroSIZE 300 (Nabitec, Deutschland) durchgeführt. Zuvor gereinigtes und dialysiertes Protein wurde für 30 min bei 16.100 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die Proteinprobe mit einem UFC40GV0S Ultrafree Zentrifugenfilter (0,22 µm) (Merck Millipore, USA) filtriert. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration der Probe, wie unter Kapitel 3.2.9 beschrieben bestimmt. Pufferbedingungen und Messparameter wurden in der Gerätesoftware spezifiziert. Die Experimente wurden in einer Quarzküvette durchgeführt, wobei 20 µl der Proteinprobe verwendet wurde. Messungen wurden über 20 Sekunden und über 20 Wiederholungen ausgeführt.

### **3.2.18 Kleinwinkelbeugung (*Small angle X-Ray scattering* (SAXS))**

Für SAXS-Experimente wurden 4 Verdünnungen von Ov7 mit den folgenden Konzentrationen verwendet 2,5; 3,9; 5,5 und 7,3 mg/mL. Zur Probenvorbereitung wurde das Protein 1 h bei 16.100 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde die Monodispersität der Proteinlösungen mittels DLS geprüft, die monodispersen Lösungen wurden für SAXS-Experimente an dem Messplatz X33 (EMBL, HASYLAB/DESY, Hamburg, Deutschland) verwendet. Der Detektorabstand während

den Messungen betrug 2,7 m und die Wellenlänge lag bei 1,5 Å. Der Bereich der Impulsübertragung wurde durch  $0,01 < s < 0,6 \text{ \AA}^{-1}$  abgedeckt ( $s = 4\pi \sin\theta/\lambda$ , wobei  $2\theta$  der Streuwinkel war). Die Beugung des Proteinpuffers wurde von Proteinspektren abgezogen und die resultierenden Kurven entsprechend der Proteinkonzentration skaliert. Mit Hilfe der Guinier Analyse [87] wurde  $I(0)$  und der Trägheitsradius ( $R_g$ ) bestimmt. Die Voraussetzung für diese Berechnung war, dass die kleinen Winkel ( $s < 1,3/R_g$ ) eine Intensität von  $I(s) = I(0) \exp(-(sR_g)^2/3)$  haben. Das Software Paket GNOM [88] wurde verwendet um  $R_g$ ,  $\rho(r)$  und  $D_{\max}$  aus den vollständigen Streuungsdaten zu errechnen. Für das Prozessieren der Daten wurde das Programm PRIMUS [89] verwendet. Die Programme DAMMIN [90] und DAMMIF [91] wurden für das *ab initio* Modelling benutzt.

### 3.2.19 Kristallisation

#### 3.2.19.1 Dampfdiffusion

Die am weitesten verbreitete Methode für die Kristallisation von Proteinen ist die Dampfdiffusion. Diese Kristallisationstechnik lässt sich einteilen in die Methode des hängenden (*hanging drop*) oder des sitzenden Tropfens (*sitting drop*) [92]. Die Kristallisationsmethode des hängenden Tropfens wurden in 24 Well CPL-130 Platten (Jena Bioscience, Deutschland) durchgeführt. Dabei wurde jedes Well mit 1 mL Reservoirlösung gefüllt und mit einem silikonisierten Deckglas verschlossen. Die Tropfen hingen von dem Deckglas über dem Reservoir und enthielten Protein- und Reservoirlösung im Verhältnis 1:1 oder 2:1. Bei der Kristallisationsmethode des sitzenden Tropfens, wurde ebenfalls ein Tropfen bestehend aus Protein und Reservoirlösung (1:1), sowie das Reservoir gemeinsam verschlossen. Bei dieser Technik sitzt der Tropfen allerdings über dem Reservoir. Für diese Kristallisationsmethode wurden NeXtal QIA1  $\mu$ plates 96 Well Platten (Qiagen, Deutschland) verwendet. Das Volumen des Reservoirs betrug 600  $\mu$ l und des Tropfens 600 nl. Für diese Methode wurde der Pipettierroboter Honeybee 961 (Genomic solutions, UK) eingesetzt, der in kurzer Zeit ein geringes Proteinvolumen und eine hohe Anzahl von Kristallisationsbedingungen pipettieren kann.

## Material und Methoden

### 3.2.19.1 Probenvorbereitung für Kristallisationsversuche

Zunächst wurden die gereinigten Proteinlösungen für 1 h bei 4 °C mit 16.100 x g zentrifugiert. Durch einen pre-Kristallisationstest (Hampton Research, USA) wurde getestet, ob sich die Proteinkonzentration in der übersättigten Phase des Phasendiagramms befindet. Initiale Kristallisationsbedingungen der Proteine wurden mit den kommerziellen Kristallisationsscreenings PACT *premier*<sup>TM</sup>, Stura Foodprint<sup>TM</sup> (Molecular Dimensions, UK) und Classic, Cryos, ComPAS, JCSG+ Suite (Quiagen, Deutschland) gesucht. Die Kristallisationsansätze wurden mit dem Pipettierroboter Honeybee 961 (Genomic solutions, UK) hergestellt. Dabei wurden 300 nl der Proteinlösung mit 300 nl der entsprechenden Präzipitanten in die *Wells* einer NeXtal QIA1  $\mu$ plates 96 *Well* (Qiagen, Deutschland) pipettiert. In das Reservoir wurden 55  $\mu$ l der Präzipitantenlösung pipettiert. Danach wurden die Platten luftdicht verschlossen und bei 20 °C oder 4 °C gelagert. Das Kristallwachstum wurde mit dem Mikroskop SZX12 mit integrierter Kamera DP10 (Olympus, Japan) und dem System CrystalScore (Diversified Scientific Inc, USA) überwacht und dokumentiert.

### 3.2.19.2 Optimierung der initialen Kristallisationsbedingungen

Die initialen Kristallisationsbedingungen wurden durch Variation der Präzipitantenkonzentrationen um die gefundene Bedingung herum optimiert. Wobei die Konzentration bei Salzen in 200 mM und bei PEGs in 2 % Schritten variiert wurde. Mit dem Pipettierroboter Lissy (Zinsser, Deutschland) wurden Masterblocks für Verfeinerungsscreening erstellt, um die Kristallisationsbedingungen in einer hohen Zahl zu variieren und testen zu können. Die Verfeinerungsansätze wurden folgend vom Honeybee 961 (Genomic Solutions, USA) Pipettierroboter in NeXtal QIA1  $\mu$ plates 96 *Well* (Qiagen, Deutschland) pipettiert. Wobei 300 nl der Proteinlösung mit 300 nl der entsprechenden Präzipitantenlösung in einem *Well* gemischt wurden. Das Reservoir wurde mit 55  $\mu$ l der Präzipitanten gefüllt. Darüber hinaus wurden Verfeinerungsansätze in Crystalgen SuperClear<sup>TM</sup> 24 *Well* Platten (Jena Bioscience, Deutschland) angesetzt. Wobei im Kristallisationstropfen 1-4  $\mu$ l Proteinlösung und ein äquivalentes Volumen der Präzipitantenlösung miteinander gemischt wurden. Die Lagertemperatur der Kristallisationsansätze wurde ebenfalls variiert, wobei die Platten entweder bei 4 °C oder 20 °C in Inkubationsschränken (Rubarth, Deutschland) oder in einem klimatisierten Labor bei 19 °C gelagert wurden.

### 3.2.20 Datensammlung unter Anwendung von Synchrotron Strahlung

Die Diffraktionsdaten wurden bei 100 K an dem Messplatz P14-Petralll (DESY, Hamburg, Deutschland) gesammelt. Unter Verwendung eines PILATUS 6M Detektor bei einer Wellenlänge von 1,24 Å. Ein kompletter Datensatz bis 1,7 Å Auflösung wurde gesammelt. Die Kristalle waren orthorhombisch und gehörten zur Raumgruppe  $P2_12_12$  mit den Zellparametern  $a = 86,4$   $b = 60,9$  und  $c = 74,8$  Å. Die asymmetrische Einheit enthält ein Dimer der PfGST (A, A'). Der Matthew's Koeffizient resultierte zu  $2,34 \text{ \AA}^3/\text{Da}$  [93] und einem korrespondierenden Lösungsmittelanteil von 47,5 %. Zum Cryoschutz wurde 10 – 15 % (v/v) Glycerin addiert. Die Kristalle wurden mit Nylonloops montiert und im flüssigen Stickstoff Strahl schockgefroren.

### 3.2.21 Datenprozessierung und Modelbau

Die Diffraktionsdaten wurden indiziert, integriert und skaliert mit XDS [94]. Das Phasenproblem wurde durch molekularen Ersatz gelöst, wobei eine native PfGST Struktur (PDB: **1PA3**) als Grundlage verwendet wurde. Die Struktur wurde sorgfältig durch ein schrittweises Vorgehen von mehreren Modellbaurunden gebaut. Wobei das Model nach jedem Schritt mit REFMAC [95] verfeinert wurde. Durch die kontinuierlichen Abnahme des R Wertes [96] wurde der Fortschritt des Modells überprüft. Die CCP4 Software [97] und das Programm COOT [97] wurde für Berechnungen beziehungsweise den Modellbau verwendet. Lösungsmittelmoleküle wurden am Ende des Verfeinerungsprozesses durch das Programm wARP [98] eingefügt, dazu wurde für eine chemisch sinnvolle Position in der Struktur eine Differenzdichte von  $3 \sigma$  verwendet. Die Struktur wurde bis 1,7 Å Auflösung und einen  $R_{\text{work}}$  von 18,3 ( $R_{\text{free}} = 22,8$ ) verfeinert. Die stereochemische Qualität des finalen Modells wurde durch PROCHECK [99] überprüft. Die Koordinaten der PfGST Struktur, sowie die experimentellen Beugungsamplituden wurden in der Proteindatenbank (<http://www.rcsb.org>) hinterlegt. Die PfGST Dimer- und Tetramerschnittstellen und die Protein-Liganden Interaktionen wurde durch die Programme PDBsum [100] und LigPlot [101] analysiert.

### 3.2.22 Molekulares Docking

Molekulares Docking von Hämin mit der nicht-Substrat-Bindestelle der beschriebenen 1,7 Å PfgST Struktur wurde mit der SYBYL-X Software (Version 2.1, Tripos Associates, St. Louis, USA) mit der Anwendungssoftware Flexi-Dock™ durchgeführt. Dabei wurde der Ligand manuell in der Bindungsstelle vorpositioniert. Die Ladungen für Hämin wurden nach Gasteiger-Huckel hinzugefügt. Docking wurde durchgeführt mit einer maximalen Wiederholungsanzahl von 88000, mit zufällig gewählten Startpositionen und Konformationen.

### 3.2.23 DARPin Selektion (P-cube Projekt Zürich)

DARPin (designed ankyrin repeat proteins) sind synthetisch hergestellte Proteine, die sich aus wiederholenden Ankyrin Sequenzmotiven zusammensetzen. Sie sind in der Lage mit Proteinen in einer hohen Affinität zu interagieren und besitzen dabei die Fähigkeit diese Proteine zu stabilisieren, sowie deren Kristallisation zu beschleunigen [102, 103]. Um DARPins für Ov103 selektieren zu können, wurden DNA Bibliotheken mit einer Vielfalt von über  $10^{12}$  Varianten dieser Proteine verwendet. Von diesen Bibliotheken ausgehend wurde nach DARPins gescreent die im picomolaren Bereich an das Zielprotein binden. Zu Beginn der DARPin Selektion wurde Ov103 auf einer Neutraavidin beschichteten 96 Well Platte immobilisiert. Zu diesem Zweck musste das Protein zuvor biotinyliert werden. Für die Biotinylierung wurde EZ-Link® Sulfo-NHS-SS-Biotin (ThermoScientific, Deutschland) verwendet. Für die Selektion von stark bindenden DARPins wurde die *ribosome display* Methode eingesetzt. Dabei wurden insgesamt 0,5 – 1 mg Protein, in 20 µl Aliquots mit jeweils 10 µM verwendet. Ausgehend von DARPin Bibliotheken wurden PCR Produkte ohne Stop Codons hergestellt und durch *in vitro* Transkription die entsprechenden mRNAs der Fragmente hergestellt. Nach diesem Schritt folgte die *in vitro* Translation. Die für diesen Schritt benötigten Ribosomen stammten aus S30 Extrakten. Während der *in vitro* Translation entstanden Komplexe aus dem Ribosom, der mRNA und dem sich bildenden DARPin. Allerdings enthielten die DARPin mRNAs kein Stop Codon, deshalb konnte das Protein nicht vom Ribosom freigesetzt werden. Durch die Bindung des Protein-Ribosom-mRNA Komplexes an das immobilisierte Ov103 wurden potenzielle DARPins selektiert. Durch mehrere Waschschriffe wurden

## Material und Methoden

unspezifisch gebundene Komplexe von den Zielproteinen entfernt. Die Bildung des Komplexes mit dem Zielprotein konnte über einen Myk-Tag detektiert werden. Die identifizierten Binder wurden eluiert, in dem der Ribosom-mRNA-Protein Komplex durch Zugabe von EDTA aufgelöst wurde. Anschließend wurde die genetische Information der identifizierten DARPins durch eine PCR amplifiziert und in einen pQE30 Expressionsplasmid (Amp, His-tag) kloniert. Die selektierten DARPins wurden in XL1 Blue oder XL10 Gold<sup>®</sup> *E.coli* Zellen (Stratagene, USA) heterolog exprimiert. Für die Expression wurde ein Autoinduktionsmedium verwendet. Die Zusammensetzung des Mediums ist in Kapitel 3.1.3.2 beschrieben. Dieses Medium enthielt sowohl Glukose und  $\alpha$ -Laktose, dabei nahm die Glukosekonzentration mit der Zeit ab, während die Bakterienzahl anstieg. Wenn die Glukose aufgebraucht war, verwendeten die Bakterien die  $\alpha$ -Laktose als Kohlenstoffquelle. Wobei das *lac* Operon des Plasmids nicht mehr gehemmt wurde, dadurch kam es zu einer automatischen Induktion durch  $\alpha$ -Laktose. Eine Vorkultur, bestehend aus 100 mL 2YT Medium mit 50  $\mu$ g/mL Ampicillin, wurde aus einem Glycerinstock von *E.coli* Zellen mit der genetischen Information des jeweiligen DARPins angeimpft und in bei 37 °C kultiviert. Die Hauptkultur wurde mit 10 mL der *in* Kultur angeimpft und 18 h, 120 rpm in einem Inkubationsschüttler bei 37 °C inkubiert. Bei der Zellernte wurden die Expressionskulturen für 15 min bei 3.200 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in 20 mL Lysis-Puffer D resuspendiert. Für den Zellaufschluss wurden die Zellen zunächst mit 100 mg/mL Lysozym und 10 mg/mL DNase I versetzt und für 1 h im Kaltraum bei 6 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die *E.coli* Zellen mit einer „French press“ aufgeschlossen, 3x bei 1000 psi, bei 6 °C und der Zellrohextrakt wurde für 45 min bei 4°C mit 13.400 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde verworfen und der Überstand durch einen 0,4  $\mu$ m Spritzenfilter filtriert. Die DARPins wurden mit Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt. Zunächst wurden 0,6 mL der Ni-NTA Matrix mit Lysis-Puffer D äquilibriert, danach mit dem filtrierten Proteinrohextrakt vermischt und für 1 h bei 6 °C inkubiert. Danach wurde der Proteinrohextrakt durch die Matrix laufen gelassen und der Durchlauf wurde verworfen. Um unspezifisch gebundene *E.coli* Proteine zu entfernen wurde die Ni-NTA Matrix mit 60 mL Lysis-Puffer D +20 mM Imidazol gewaschen. Das DARPins wurde mit 2 mL Lysis-Puffer D +250 mM Imidazol eluiert. Die Elutionsproben wurden mittels SDS PAGE bezüglich der Sauberkeit untersucht. Über eine

Größenaufschlusschromatographie wurden vorhandene Aggregate und mögliche *E.coli* Kontaminationen entfernt. Die DARPin Proteine sollten einen Komplex mit Ov103 bilden.

### 3.2.24 PfGST CDNB-Assay

Die PfGST Aktivität gegenüber GSH und CDNB wurde bei einer Wellenlänge von 340 nm photometrisch bestimmt, auf der Basis des Extinktionskoeffizienten des Produkts S-(2,4-dinitrophenyl)Glutathion ( $\epsilon_{340\text{nm}} = 9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Der Versuchsansatz (210  $\mu\text{l}$ ) enthielt den Assay-Puffer (100 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH 6,5), 1 mM GSH gelöst in  $\text{dH}_2\text{O}$ ; 0,5 mM CDNB gelöst in 100 % EtOH und 0,5 mM PfGST, die im Assay-Puffer vorlag. Die Bestandteile des Assays wurden in den *Wells* der Microlon® 200 96 *Well* Platte (Greiner bio-one, Österreich) vermischt und durch Zugabe von 0,5 mM CDNB wurde die Reaktion gestartet. Von den getesteten Inhibitoren wurde eine Stocklösung mit einer Konzentration von 4 mM hergestellt, gelöst wurden die Substanzen in 100 % DMSO. Aus dieser Lösung wurden Verdünnungen zu 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  hergestellt. Aus diesen Verdünnungen wurden die Inhibitorkonzentrationen für den Assay 20, 15; 10; 5; 1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01  $\mu\text{M}$  angesetzt. Als Kontrollen wurden Ansätze ohne Inhibitor, ohne Enzym und ohne GSH in den *Wells* gemessen. Die Daten wurden in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten bestimmt. Die Zunahme der Konjugationsreaktion zwischen GSH und CDNB S-(2,4-dinitrophenyl)Glutathion, einem Dinitrophenylthioether, wurde bei 340 nm mit einem Elisa Reader gemessen. Die  $\text{IC}_{50}$ -Werte wurden durch eine Dreifachbestimmungen der Aktivität bei zunehmenden Komponentenkonzentrationen (0,01 – 20  $\mu\text{M}$ ) bestimmt, wobei die Konzentration des Enzyms, CDNB und GSH konstant gehalten wurden. Die  $K_m$ -Werte und  $\text{IC}_{50}$ -Werte der gegenüber der PfGST getesteten Komponenten wurden mit der Software Prism 5 (GraphPad, USA) bestimmt. Der  $K_i$ -Wert wurde auf Grundlage des bestimmten  $\text{IC}_{50}$ -Wertes berechnet.

Zur Bestimmung von Lineweaver-Burk Kinetiken der Komponenten wurden CDNB-Assays mit zwei unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen (1 und 10  $\mu\text{M}$ ) und eine Kontrolle ohne Inhibitor angesetzt. Dabei wurden die GSH Konzentrationen variiert (3; 2; 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2; 0,1; 0,08; 0,06; 0,04; 0,02 mM). Die Daten wurden in drei

unabhängigen Experimenten in Duplikaten bestimmt. Die Ergebnisse wurden in der Lineweaver-Burk Auftragung dargestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Komponenten wurden am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie, Arbeitskreis von **Prof. Stefan Bräse** synthetisiert.

### 3.2.25 [<sup>3</sup>H]-Hypoxanthin-Assay

Die getesteten Xanthonderivate mit den stärksten IC<sub>50</sub>- und K<sub>i</sub>-Werten aus Kapitel 3.2.24 wurden in der Arbeitsgruppe von **Dr. Ingrid Müller** am BNI, Hamburg auf ihre Effektivität gegenüber *Plasmodium falciparum* untersucht. Wobei die Versuche am 3D7 *P. falciparum* Stamm in einer durchgängigen Kultur nach Trager und Jensen modifiziert durch Das Gupta et al. [104] durchgeführt wurde. Die Parasiten wurden in humanen Erythrozyten (O+) aufgezogen, RPMI 1640 Medium mit 25 mM HEPES, 20 mM NaHCO<sub>3</sub> und 0,5 % AlbuMAX II (Invitrogen, Deutschland) mit einem Hämatokrit Wert von 4 %. Die Zellen wurden in 90 mm Petrischalen (Nunc, Dänemark) kultiviert und bei 37 °C in 90 % N<sub>2</sub>, 5 % O<sub>2</sub> und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Der inhibitorische Effekt der Komponenten auf das Erythrozytenstadium von *Plasmodium falciparum* wurde durch den [<sup>3</sup>H]-Hypoxanthin-Assay [104] bestimmt. Die IC<sub>50</sub>-Werte der getesteten Komponenten wurden mit der Software Prism 5 (GraphPad, USA) bestimmt. Um die antiplasmodiale Effektivität dieser Komponenten abschätzen zu können wurde die folgende Einteilung nach Batista *et al.* verwendet: IC<sub>50</sub> < 1 µM, exzellente Aktivität; IC<sub>50</sub> von 1 – 20 µM, gute Aktivität; IC<sub>50</sub> von 20 – 100 µM, moderate Aktivität; IC<sub>50</sub> von 100 – 200 µM, geringe Aktivität; IC<sub>50</sub> > 200 µM, inaktiv [105].

### 3.2.26 *Onchocerca ochengi* Sekret Aufbereitung

Verschiedene Entwicklungsstadien des Rinderparasiten *Onchocerca ochengi* wurden aus Hautknoten entfernt und gesammelt. Die Parasiten wurden in Minimalmedium (MEM Sigma, No. M0268), ergänzt mit 10 mM HEPES, 200 U/mL Penicillin, 200 µg/mL Streptomycin, 50 µg/mL Gentamycin (pH 7,0 - 7,2) stabilisiert. Die weiblichen Würmer wurden einzeln gesammelt, während 5-10 männliche Würmer zusammen gehalten wurden. Die Parasiten wurden in dem Minimalmedium für 96 h bei 37 °C kultiviert. Täglich wurde der Überstand von den Parasiten durch

Zentrifugation getrennt und das Minimalmedium wurde gewechselt. Proteine, die sich im Überstand befanden wurden mit TCA (10 %) gefällt und durch Zentrifugation entfernt. Peptide, Lipide und Kohlenhydrate verblieben im Überstand. Moleküle mit einem MW > 10 kDa wurden durch Filtration mit einem Amicon 10.000 Da *cut-off* (Merck Millipore, USA) entfernt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das aufbereitete Sekret weiblicher *Onchocerca ochengi* Würmern untersucht, das von **Prof. Norbert Brattig** vom BNI Hamburg zur Verfügung gestellt wurde. Die Peptidfraktion wurde von Lipiden, Kohlenhydraten und Salzen/Pufferkomponenten getrennt, in dem eine Oasis HLB Plus Kartusche (Waters, USA) verwendet wurde. Stark hydrophile und stark hydrophobe Moleküle binden nicht an diese *reversed phase* Kartusche. Die Matrix wurde mit 2 mL Methanol gespült und mit 3 mL 0,2 % Methansäure äquilibriert. Die Probe muss zuvor mit 0,2 % Methansäure versetzt werden. 5 mL der Probe wurden auf die Kartusche geladen und danach wurde die Matrix mit 5 mL 0,2 % Methansäure gewaschen. Der Durchlauf und der Waschschrift wurden gesammelt und bei -20 °C gelagert, um sie später hinsichtlich der vorhandenen niedermolekularen Komponenten untersuchen zu können. Die gebundenen Peptide wurden mit 1 mL 30 % Acetonitril 0,2 % Methansäure und 1 mL 60 % Acetonitril, 0,2 % Methansäure eluiert. Die entsalzten Elutionsfraktionen wurden weiter durch *reversed phase* Chromatographie getrennt. Für die Trennung wurde eine chromolith® RP-18e 100 x 4,6 mm Säule (Merck Millipore, USA) verwendet. Puffer A (Probenauftrag und Waschpuffer) bestand aus 0,2 % Methansäure. Puffer B (Elutionspuffer) bestand aus 0,2 % Methansäure und 60 % Acetonitril. Die Trennung wurde bei einer Flussrate der mobilen Phase von 1 mL/min durchgeführt. Der folgende Gradient wurde dabei verwendet, 0 – 3 % B in 5 min auf 35 % B in 30 min, auf 35 % B in 30 min und auf 60 % B in 4 min. Letztendlich wurden 45 Fraktion mit jeweils 1 mL Volumen gesammelt, lyophilisiert und bei -80 °C bis zur massenspektrometrischen Analyse gelagert.

### 3.2.27 Massenspektrometrie

Zu der Identifizierung von Peptiden aus den *Onchocerca Ochengi* ESPs wurden MALDI-TOF und TOF/-TOF Analysen an einem UltrafleXtreme (Bruker Daltonik, Deutschland) Massenspektrometer durchgeführt. Die Peptide wurden wie in Punkt 3.2.21 beschrieben vorbereitet. Die lyophilisierten Proben wurden in 30 % Acetonitril

## Material und Methoden

und 0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O gelöst. 0,75 µl dieser Lösung wurden auf eine MTP AnchorChip 384 MALDI *target* Platte (Bruker Daltonik, Deutschland) pipettiert und eingetrocknet. Anschließend wurde 0,75 µl MALDI Matrix (0,7 mg mL<sup>-1</sup> Cyano-4-Hydroxymethylsäure) (Bruker Daltonik, Deutschland), in 85 % Acetonitril gelöst und 1 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 0,1 % TFA in H<sub>2</sub>O auf die getrockneten Probenpunkte pipettiert. Die Daten wurden mit der Software flexControl 3.3 (Bruker Daltonik, Deutschland) im positiven Ionenmodus erfasst. Die folgenden Messparameter wurden verwendet: Ionenquelle 1: 25 kV, Ionenquelle 2: 23,6 kV, Objektiv: 7,5 kV. Die MS Daten wurden automatisch mit dem Programm autoXecute unter den folgenden Parametern gesammelt: Laser Power: 47 %; Laserschüsse: 1000. Die MS Daten wurden in flexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonik, Deutschland) analysiert. Für die weitere Daten Auswertung wurde BioTools 3.2 (Bruker Daltonik, Deutschland) und Mascot *inhouse search* verwendet. Die Mascot Version 2.1.03 wurde benutzt um in der Teilmenge *other Metazoa* der NCBI Datenbank nach Übereinstimmungen mit den identifizierten Peptiden zu suchen. Dabei wurde die Ionenmassentoleranz des Vorläuferproteins auf 0,1 % gesetzt und die Ionenmassentoleranz des Proteinfragments auf 0,5 Da. Darüber hinaus, wurden die identifizierten Peptidsequenzen mit dem prognostizierten Proteom *des Onchocerca ochengi* Genom Projektes, bezüglich vorhandener Übereinstimmungen verglichen ([http://www.nematodes.org/genomes/onchocerca\\_ochengi/](http://www.nematodes.org/genomes/onchocerca_ochengi/)). Überdies wurden die identifizierten Peptidsequenzen mit der Suchfunktion NCBI BLAST dahingehend überprüft, dass es sich um keine menschlichen oder bovinen Proteinkontaminationen handelt. Außerdem wurde die theoretische Nettoladung und die Hydrophobizität der identifizierten Peptide mit dem Programm PepDraw (<http://www.tulane.edu/~biochem/WW/PepDraw/index.html>) bestimmt.

### 3.2.28 Bakterizider LB-Agarplatten-Assay

Zur Identifikation von Peptiden mit einer antibakteriellen Aktivität aus den *Onchocerca ochengi* ESPs wurde ein bakterizider LB-Agarplatten-Assay durchgeführt. Bei diesem Experiment wurden BL21 Star<sup>TM</sup> (De3) (Invitrogen) *E.coli* Zellen als Modellorganismus verwendet. Die Zellen wurden in LB Medium kultiviert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,4 erreicht wurde. 200 µl der Kultur wurde auf LB Agarplatten ohne Antibiotikum ausplattiert. Anschließend wurden 30 µl der Peptide in Löcher mit

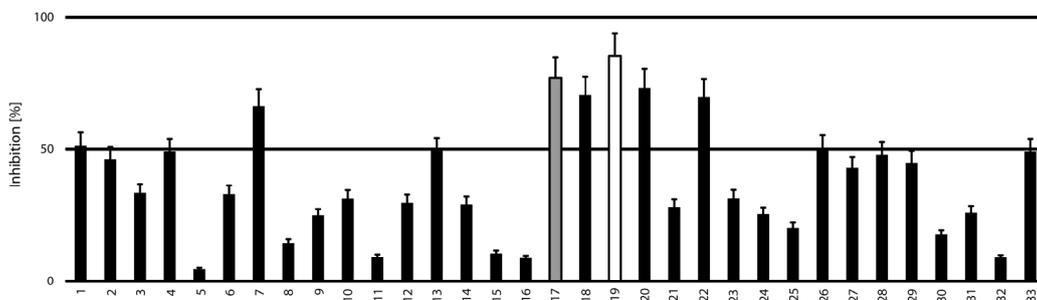
## Material und Methoden

60 mm Durchmesser in der LB Agarplatte pipettiert und für 12 h bei 37 °C inkubiert. Das entsalzte Peptidgemisch und die 45 RPC Fraktionen wurden bezüglich ihrer antibakteriellen Aktivität getestet. Die antibakterielle Wirksamkeit der Peptide wurde auf Basis der Durchmesser der Inhibitionszonen von 5, 10 und 20 µg/mL Ampicillin bestimmt. Dabei wurde eine Standardprozedur verwendet um das antibakterielle Potenzial der Peptide zu bestimmen [106].

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 PfGST Inhibitor Kinetiken

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden insgesamt 59 unterschiedliche Komponenten auf ihre inhibitorische Aktivität gegenüber der PfGST getestet, dies mit dem Ziel Leitstrukturen für eine Wirkstoffentwicklung zu identifizieren. Diese 59 Komponenten sind im Anhang in Tabelle 1 mit IUPAC Nomenklatur und Strukturformel aufgelistet. Die PfGST wurde wie in Kapitel 3.2.8.3 beschrieben exprimiert und gereinigt. Für die Aktivitätsassays wurde das Protein gegen 3 L des PfGST Assay-Puffers ün bei 6 °C dialysiert und im Anschluss für 30 min bei 4 °C und 13.000 x g zentrifugiert. Die PfGST Aktivität und der inhibierende Effekt der getesteten Komponenten wurden mit dem aus Kapitel 3.2.24 beschriebenen CDNB-Assay bestimmt. Zu Beginn wurden 33 Substanzen bezüglich ihrer inhibierenden Wirkung auf die PfGST getestet, wobei die Komponentenkonzentration 5 µM betrug. Das Ziel dieser ersten Experimente war es, die Komponenten mit dem stärksten inhibitorischen Effekt auf die PfGST zu identifizieren. Letztlich konnten sechs Komponenten identifiziert werden, die eine Inhibition der PfGST Aktivität von über 50 % zeigten (Abb. 5).



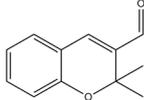
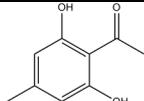
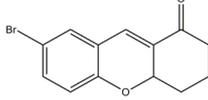
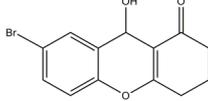
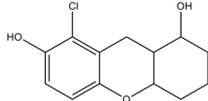
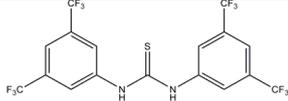
**Abbildung 5:** Balkendiagramm der 33 getesteten Komponenten gegenüber der Aktivität der PfGST mit dem CDNB-Assay. Sechs Komponenten, die zu einer Inhibition der PfGST Aktivität über 50 % führten, konnten identifiziert werden. Komponente **7** inhibiert die PfGST Aktivität zu 65 %; Komponente **17** zu 81 %; **18** zu 73 %; **24** zu 86 %; **20** zu 75 %; **22** zu 73 %. Die 6 Komponenten **1**, **4**, **13**, **26**, **28** und **33** inhibierten die Aktivität der PfGST zu annähernd 50 %.

Die Komponenten **7**, **17**, **18**, **19**, **20** und **22** wurden wegen ihrer offenkundig starken inhibitorischen Effekte auf die PfGST weitergehend kinetisch charakterisiert. Dabei wurden der  $K_i$ - und  $IC_{50}$ -Wert dieser Substanzen gegenüber der PfGST mit dem CDNB-Assay in drei unabhängigen Experimenten in Duplikaten bestimmt. Zur

## Ergebnisse

Bestimmung der  $IC_{50}$ -Werte wurde der Logarithmus der InhibitorKonzentration gegen die gemessene Inhibition (%) aufgetragen. Mit der Software Prism5 (Graphpad, USA) wurde am Wendepunkt der sigmoidalen Kurven der  $IC_{50}$ -Wert bestimmt. Basierend auf diesen  $IC_{50}$ -Werten wurden die  $K_i$ -Werte der jeweiligen Komponenten berechnet. Auf der Grundlage dieser Experimente konnte 1,3-bis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]Thioharnstoff und 7-Bromo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on als die Substanzen mit dem stärksten inhibitorischen Effekt identifiziert werden. Die Xanthon- und Thioharnstoffgrundstruktur mit der Kohlenstoffnomenklatur sind in Abbildung 1 des Anhangs dargestellt. Die kinetischen Daten der PfGST gegenüber den Komponenten **7**, **17**, **18**, **19**, **20** und **22** sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

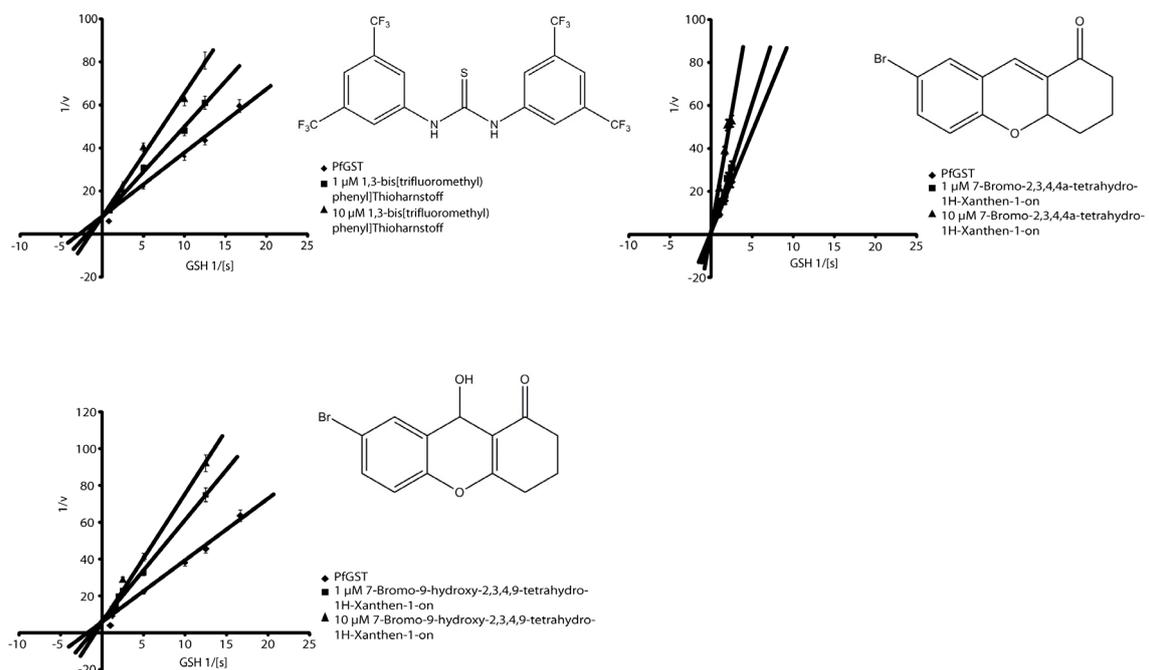
**Tabelle 2:** Kinetische Daten der sechs getesteten Komponenten 7, 17, 18, 19, 20 und 22 gegenüber der PfGST Aktivität

Nr.	Grund- verbindung	IUPAC	Strukturformel	KM [ $\mu$ M]	$IC_{50}$ [ $\mu$ M]	$K_i$ [ $\mu$ M]
7	Chromen	2,2-dimethyl-2H-chromen-3-Carbaldehyd		290 $\pm$ 94	12,5 $\pm$ 3,6	3,61 $\pm$ 0,47
18	Benzaldehyd	1-(2,6-dihydroxy-4-methylphenyl)Ethan-1-on		461 $\pm$ 145	8,5 $\pm$ 0,9	2,69 $\pm$ 0,42
19	Xanthon	7-Bromo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		370 $\pm$ 60	0,68 $\pm$ 0,24	0,28 $\pm$ 0,04
20	Xanthon	7-Bromo-9-hydroxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		469 $\pm$ 116	1,96 $\pm$ 0,89	0,63 $\pm$ 0,18
22	Xanthon	8-Chloro-7-hydroxy-2,3,4-trihydro-1H-Xanthen-1-on		489 $\pm$ 234	5,83 $\pm$ 0,57	1,91 $\pm$ 0,51
17	Thioharnstoff	1,3-bis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]Thioharnstoff		413 $\pm$ 44	0,55 $\pm$ 0,15	0,21 $\pm$ 0,05

Zusätzlich zeigten die Ergebnisse dieser Experimente den Einfluss der Substituentenart und der Lokalisation der Substituenten im Inhibitormolekül auf die

## Ergebnisse

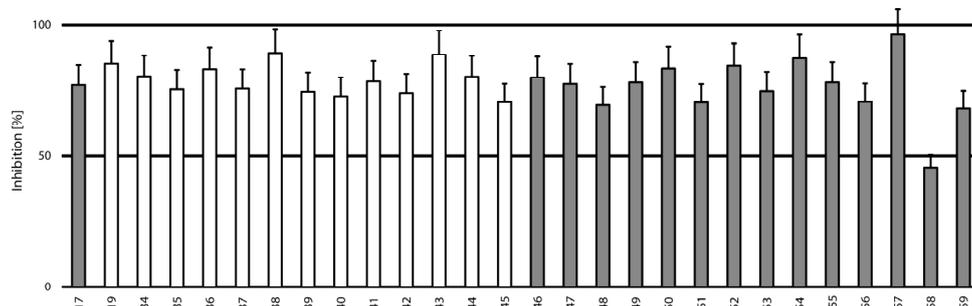
inhibitorischen Eigenschaften der Komponenten. Dabei zeigte der Vergleich von 7-Bromo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on mit 7-Bromo-9-hydroxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on, dass eine Substitution einer zusätzlichen Hydroxylgruppe an Position 9 des Xanthons und die Verschiebung einer Doppelbindung im Molekül zu einem erhöhten  $IC_{50}$ - und  $K_i$ -Wert führte. Bei der Komponente 8-Chloro-7-hydroxy-2,3,4-trihydro-1H-Xanthen-1-on wurde das Bromatom an Position sieben durch eine Hydroxylgruppe ersetzt und weiterhin an Position acht mit einem Chloratom substituiert. Außerdem wurde die Ketongruppe an Position eins durch eine Hydroxylgruppe ersetzt. Diese Modifikationen führten zu  $IC_{50}$ - und  $K_i$ -Werten die im Vergleich zu 7-Bromo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on um den Faktor acht erhöht waren. Letztendlich konnte durch diese Versuche gezeigt werden, dass die Substitution eines Bromatoms an Kohlenstoffatom sieben und die Ketongruppe an Position eins des Xanthonmoleküls zu einer Verbesserung der  $IC_{50}$ - und  $K_i$ -Werte gegenüber der PfgST führten. Um den Mechanismus der PfgST Hemmung durch die Komponenten **17**, **19** und **20** zu charakterisieren wurden die Ergebnisse über eine Lineweaver-Burk Auftragung analysiert (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Lineweaver-Burk Auftragung für die Komponenten 1,3-bis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] Thioharnstoff (**17**), 7-Bromo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on (**19**) und 7-Bromo-9-hydroxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on (**20**) zur weitergehenden Analyse des Inhibitionsmechanismus der Komponenten gegenüber der PfgST. In den Diagrammen sind zusätzlich die Strukturformeln der Komponenten dargestellt. Jeweils eine Kontrolle und zwei Ansätze mit einer InhibitorKonzentration von 1 und 10  $\mu\text{M}$  wurden aufgetragen. **A:** Lineweaver-Burk Auftragung für Komponente 17, der Schnittpunkt der drei Geraden zeigt eine kompetitive Inhibition der PfgST. **B:** Lineweaver-Burk Auftragung für Komponente 19, der Schnittpunkt der drei Geraden zeigt eine kompetitive Inhibition der PfgST. **C:** Lineweaver-Burk Auftragung für Substanz 20, der Schnittpunkt der drei Geraden zeigt ebenfalls eine kompetitive Inhibition der PfgST.

## Ergebnisse

Die Lineweaver-Burk Auftragungen der Substanzen **17**, **19** und **20** wiesen darauf hin, dass diese Komponenten die PfGST kompetitiv inhibieren. Basierend auf den zuvor beschriebenen Ergebnissen und der daraus folgenden Erkenntnis, dass Xanthone und Thioharnstoffe einen starken inhibitorischen Effekt auf die PfGST zeigten, wurden weitere Komponenten am KIT, Karlsruhe in der Arbeitsgruppe von **Prof. Bräse** synthetisiert. Diese 26 Komponenten gehörten zur Gruppe der Xanthone (11), Chromen (1), Thioharnstoffe (10) oder Harnstoffe (4). Dabei wurden die getesteten Xanthone an Molekülposition sechs, sieben und acht mit unterschiedlichen Halogenen, Trifluoromethyl-, Hydroxyl- oder Methylgruppen substituiert. Die Thioharnstoff- und Harnstoffderivate wurden mit Trifluoromethyl-, Methylgruppen oder Fluoridatome an Position drei bis sechs der Moleküle substituiert. Die inhibitorischen Eigenschaften dieser 26 Komponenten auf die PfGST wurden mit dem zuvor beschriebenen CDNB-Assay systematisch getestet. Dabei konnte letztlich eine Komponente identifiziert werden, die sogar eine vollständige Inhibition der PfGST zeigte (Abb. 7).



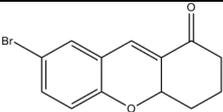
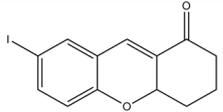
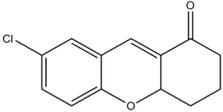
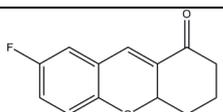
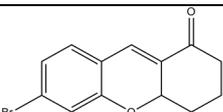
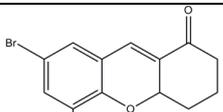
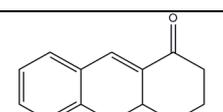
**Abbildung 7:** Balkendiagramm des inhibitorischen Effekts gegenüber der PfGST Aktivität der 26 modifizierten Komponenten mit dem CDNB-Assay. Komponente **57** zeigt eine Inhibition der PfGST von annähernd 100 %. 3 Komponenten **38**, **43** und **54** zeigen eine Inhibition der PfGST von annähernd 90 %. Insgesamt zeigten alle getesteten Komponenten außer Nr. **58** eine Inhibition der PfGST über 50 %.

25 der 26 getesteten Komponenten (Nr. **58** wurde nicht weiter untersucht, da der inhibitorische Effekt weit unter dem der anderen Komponenten lag) wurden zusammen mit der Substanz **34** und deren zwei Enantiomeren kinetisch charakterisiert, wobei die  $K_i$ - und  $IC_{50}$ -Werte dieser Substanzen gegenüber der PfGST bestimmt wurden. Dabei zeigten die Komponenten **34**, **62**, **63** und **37** die stärksten inhibitorischen Effekte in der Xanthongruppe. Der stärkste inhibitorische Effekt in der Thioharnstoffgruppe konnte für Substanz **57** beobachtet werden. Die

## Ergebnisse

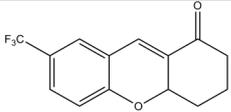
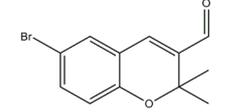
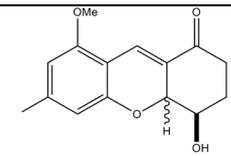
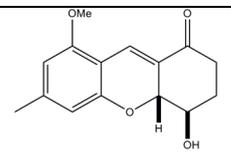
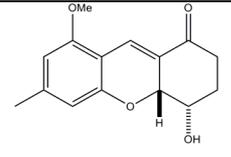
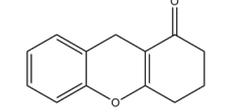
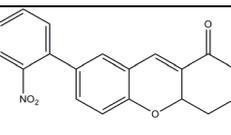
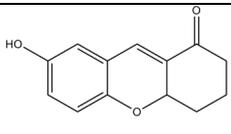
kinetischen Daten der 28 getesteten Komponenten gegenüber der PfGST sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3a:** Kinetische Daten der getesteten Komponenten gegenüber der nativen PfGST Aktivität

Nr.	Grund- verbindung	IUPAC	Strukturformel	KM [ $\mu\text{M}$ ]	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	K <sub>i</sub> [ $\mu\text{M}$ ]
19	Xanthon	7-Bromo- 2,3,4,4a- tetrahydro-1H- Xanthen-1-on		370 ± 60	0,68 ± 0,24	0,28 ± 0,014
38	Xanthon	7-Iodo-2,3,4,4a- tetrahydro-1H- Xanthen-1-on		426 ± 89	0,48 ± 0,05	0,22 ± 0,05
39	Xanthon	7-Chloro- 2,3,4,4a- tetrahydro-1H- Xanthen-1-on		520 ± 120	0,62 ± 0,12	0,31 ± 0,15
40	Xanthon	7-Fluoro- 2,3,4,4a- tetrahydro-1H- Xanthen-1-on		469 ± 79	0,60 ± 0,08	0,28 ± 0,06
41	Xanthon	6-Bromo- 2,3,4,4a- tetrahydro-1H- Xanthen-1-on		643 ± 65	0,45 ± 0,07	0,25 ± 0,07
42	Xanthon	5,7-Dibromo- 2,3,4,4a- tetrahydro-1H- Xanthen-1-on		782 ± 149	0,77 ± 0,15	0,52 ± 0,14
43	Xanthon	5-Bromo- 2,3,4,4a- tetrahydro-1H- Xanthen-1-on		448 ± 52	0,43 ± 0,08	0,20 ± 0,04

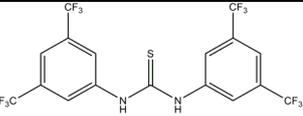
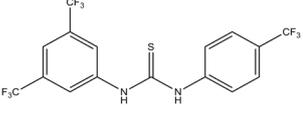
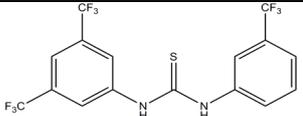
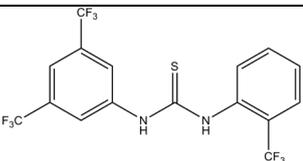
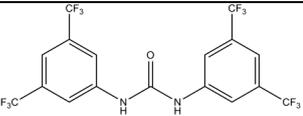
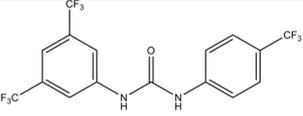
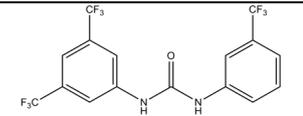
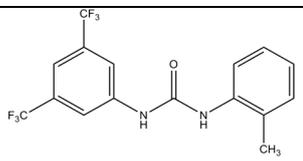
# Ergebnisse

**Tabelle 3b:** Kinetische Daten der getesteten Komponenten gegenüber der nativen PfGST Aktivität

Nr.	Grund- verbindung	IUPAC	Strukturformel	KM [ $\mu\text{M}$ ]	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	K <sub>i</sub> [ $\mu\text{M}$ ]
44	Xanthon	7-(trifluoromethyl)-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		430 ± 75	0,44 ± 0,03	0,21 ± 0,05
45	Chromen	7-Bromo-2,2-dimethyl-2H-chromene-3-carbaldehyd		677 ± 155	0,65 ± 0,17	0,38 ± 0,13
34	Xanthon	(4R)-4-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		330 ± 74	0,29 ± 0,03	0,12 ± 0,05
62	Xanthon	(4R,4aR)-4-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		310 ± 55	0,18 ± 0,02	0,07 ± 0,02
63	Xanthon	(4S,4aR)-4-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		352 ± 26	0,27 ± 0,03	0,11 ± 0,01
35	Xanthon	2,3,4,9-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		495 ± 75	0,42 ± 0,16	0,21 ± 0,07
36	Xanthon	7-(2-nitrophenyl)-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		760 ± 156	0,95 ± 0,31	0,57 ± 0,15
37	Xanthon	7-hydroxy-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		323 ± 56	0,34 ± 0,08	0,14 ± 0,04

# Ergebnisse

**Tabelle 3c:** Kinetische Daten der getesteten Komponenten gegenüber der nativen PfGST Aktivität

Nr.	Grund- verbindung	IUPAC	Strukturformel	KM [ $\mu$ M]	IC <sub>50</sub> [ $\mu$ M]	K <sub>i</sub> [ $\mu$ M]
17	Thioharnstoff	1,3-bis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]Thioharnstoff		413 ± 44	0,55 ±0,15	0,21 ± 0,05
46	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]Thioharnstoff		363 ± 59	0,49 ±0,04	0,21 ± 0,04
47	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]Thioharnstoff		661 ± 106	0,87 ±0,09	0,50 ± 0,10
48	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[2-(trifluoromethyl)phenyl]Thioharnstoff		765 ± 50	0,86 ±0,08	0,52 ± 0,14
49	Harnstoff	1,3-bis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]Harnstoff		652 ± 92	0,54 ±0,10	0,30 ± 0,08
50	Harnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]Harnstoff		434 ± 91	0,50 ± 0,09	0,23 ± 0,04
51	Harnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]Harnstoff		541 ± 117	0,49 ±0,23	0,38 ± 0,11
52	Harnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-(2-methylphenyl)Harnstoff		933 ± 95	0,89 ±0,07	0,58 ± 0,06

## Ergebnisse

**Tabelle 3d:** Kinetische Daten der getesteten Komponenten gegenüber der nativen PfGST Aktivität

Nr.	Grund- verbindung	IUPAC	Strukturformel	KM [ $\mu\text{M}$ ]	IC <sub>50</sub> [ $\mu\text{M}$ ]	K <sub>i</sub> [ $\mu\text{M}$ ]
53	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[4-fluoro-3-(trifluoromethyl)phenyl] Thioharnstoff		717 ± 116	0,71 ± 0,09	0,42 ± 0,08
54	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-(4-fluorophenyl) Thioharnstoff		799 ± 59	0,64 ± 0,06	0,45 ± 0,05
55	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-(2,4difluorophenyl) Thioharnstoff		1138 ± 191	1,33 ± 0,17	0,85 ± 0,16
56	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-(2,5difluorophenyl) Thioharnstoff		730 ± 29	0,69 ± 0,07	0,40 ± 0,05
57	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-(3,5-dimethyl phenyl) Thioharnstoff		313 ± 30	0,34 ± 0,06	0,13 ± 0,03
58	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] Thioharnstoff		738 ± 176	0,81 ± 0,18	0,61 ± 0,17
59	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl] Thioharnstoff		453 ± 86	2,67 ± 0,53	1,03 ± 0,18

Im Vergleich aller getesteten Komponenten zeigte (4R,4aR)-4-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on (**62**) den stärksten inhibitorischen Effekt gegenüber der nativen PfGST. Diese Komponente war ein Enantiomer von (4R)-4-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on. Das Molekül besaß eine Methoxy- und eine Methylgruppe an Position sechs und acht und an

## Ergebnisse

Kohlenstoffatom vier eine Hydroxylgruppe die in Cis- oder Transposition vorliegen konnte. Xanthonderivate mit einer substituierten Fluorid-, Hydroxyl- oder Trifluoromethylgruppe an Kohlenstoffatom sieben, zeigten einen erniedrigten  $IC_{50}$ - und  $K_i$ - Wert. Ebenso führte die Bromsubstitution an Kohlenstoffatom fünf oder sechs des Xanthonmoleküls zu einer weiteren Verbesserung der PfGST Inhibition. Durch eine Verschiebung der Doppelbindung im Xanthonmolekül von Position 4a nach 9, konnte ebenso eine Erniedrigung des  $IC_{50}$ - und  $K_i$ -Wertes beobachtet werden. Dagegen führte bei den Thioharnstoff- und Harnstoffderivaten eine Reduzierung der Anzahl von Trifluoromethylgruppen zu einem erniedrigten  $IC_{50}$ - und  $K_i$ -Wert, wie bei der Komponente 3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-(3,5-dimethylphenyl)Thioharnstoff (**57**) zu beobachten war. Bei diesem Thioharnstoffderivat wurden zwei Trifluoromethylgruppen durch Methylgruppen ersetzt. Weiterhin zeigte dieser Inhibitor den stärksten Effekt aus der Harnstoff- und Thioharnstoffgruppe. Im Folgenden wird die Effektivität ausgewählter Xanthonderivate an *Plasmodium falciparum* mit einem *in vivo* [ $^3H$ ]-Hypoxanthin-Assay beschrieben.

### 4.1.1 [ $^3H$ ]-Hypoxanthin-Assay

Die *in vivo* Aktivität von elf Xanthonderivaten (Tabelle 4) gegen den *Plasmodium falciparum* 3D-7 Stamm wurde mit dem [ $^3H$ ]-Hypoxanthin-Assay [104] getestet. Die Interpretation der  $IC_{50}$ -Werte wurde über eine Einteilung nach Batista *et al.*(2009) vorgenommen [105]. Die ermittelten  $IC_{50}$ -Werte dieser Verbindungen lagen zwischen 15,4  $\mu M$  bis >40  $\mu M$ . Dabei zeigten die Xanthonderivate **19**, **30**, **38** und **39** die niedrigsten  $IC_{50}$ -Werte. Gemäß der Einteilung nach Batista *et al.* konnte diesen Komponenten eine „gute“ antiplasmodiale Aktivität zugewiesen werden. Während den restlichen sieben Verbindungen eine „moderate“ Aktivität gegen den Parasiten zugeschrieben wurde (Tabelle 4).

## Ergebnisse

**Tabelle 4:** IC<sub>50</sub>-Werte der elf getesteten Xanthonderivate aus dem [<sup>3</sup>H]-Hypoxanthin-Assay, wobei SEM der Standardfehler ist und n die Anzahl der Stichproben.

Nr.	Komponente	Strukturformel	IC <sub>50</sub> [μM]	SEM [μM]	n	Einteilung nach Batista <i>et al.</i> *
34	(4R)-4-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		26,06	4,53	5	moderate Aktivität
62	(4R,4aR)-4-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		>40	-	5	moderate Aktivität
30	2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		15,40	3,43	5	gute Aktivität
39	7-Chloro-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		15,41	2,34	5	gute Aktivität
63	(4S,4aR)-4-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		>40	-	3	moderate Aktivität
35	2,3,4,9-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		28,70	4,36	3	moderate Aktivität
37	7-hydroxy-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		24,26	3,17	3	moderate Aktivität
38	7-Iodo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		18,33	2,94	3	gute Aktivität
40	7-Fluoro-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		>40	-	3	moderate Aktivität
44	7-(Trifluoromethyl)-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		>40	-	3	moderate Aktivität
45	7-Bromo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on		18,06	2,43	3	gute Aktivität

## Ergebnisse

Der stärkste inhibitorische Effekt wurde dabei für die Komponenten **30** und **39** beobachtet, deren  $IC_{50}$ -Wert bei ungefähr  $15,4 \mu\text{M}$  lag. Komponente **30** ist die Grundstruktur aller getesteten Xanthonderivate und Komponente **39** wurde ein Chloratom an Kohlenstoffatom sieben substituiert. Die Xanthonderivate mit einer substituierten Fluorid- und Trifluoromethylgruppe an Kohlenstoffatom sieben zeigten zusammen mit den Komponenten **62** und **63** den schwächsten Effekt gegenüber dem Malariaparasiten.

### 4.2 PfGST MES Struktur

#### 4.2.1 Kristallisation, Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung

In der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung werden hochauflösende Kristallstrukturen des Zielproteins benötigt. Daher wurden Proteinkristalle der PfGST an dem P14-PetraIII Messplatz (DESY, Deutschland) vermessen.

Die PfGST wurde wie in Kapitel 3.2.8.3 beschrieben exprimiert und gereinigt. Das Protein wurde gegen 3 L 0,1 M MES pH 6,0; 5 mM GSH in bei  $6^\circ\text{C}$  dialysiert und anschließend für 30 min bei  $4^\circ\text{C}$  und bei  $16.100 \times g$  zentrifugiert. Für die Kristallisationsversuche wurde eine Proteinlösung mit der Konzentration von  $18 \text{ mg/mL}$  und eine Präzipitantenlösung bestehend aus 0,1 M MES pH 6,0; 5 mM GSH und 2,1 M  $\text{NH}_2\text{SO}_4$  verwendet. Die Kristallisationsansätze wurden mit der Methode des hängenden Tropfens in 24 Well CPL-130 Platten ausgeführt. Dabei wurden  $2 \mu\text{L}$  der konzentrierten Proteinlösung und  $2 \mu\text{L}$  des Präzipitanten gemischt. Das Reservoir enthielt 1 mL des Präzipitanten. Nach sieben Tagen Inkubation bei RT waren Kristalle mit den Maßen  $0,4 \times 0,5 \times 0,4 \text{ mm}^3$  gewachsen. Vor den Streuungsexperimenten wurde ein PfGST Kristall zum Cryoschutz in eine Präzipitantenlösung mit 15 % (v/v) Glycerin überführt und danach in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diffraktionsdaten dieses Kristalls wurden bis zu einer Auflösung von  $1,7 \text{ \AA}$  aufgenommen. Die Statistiken der Datensammlung und der Strukturverfeinerung sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

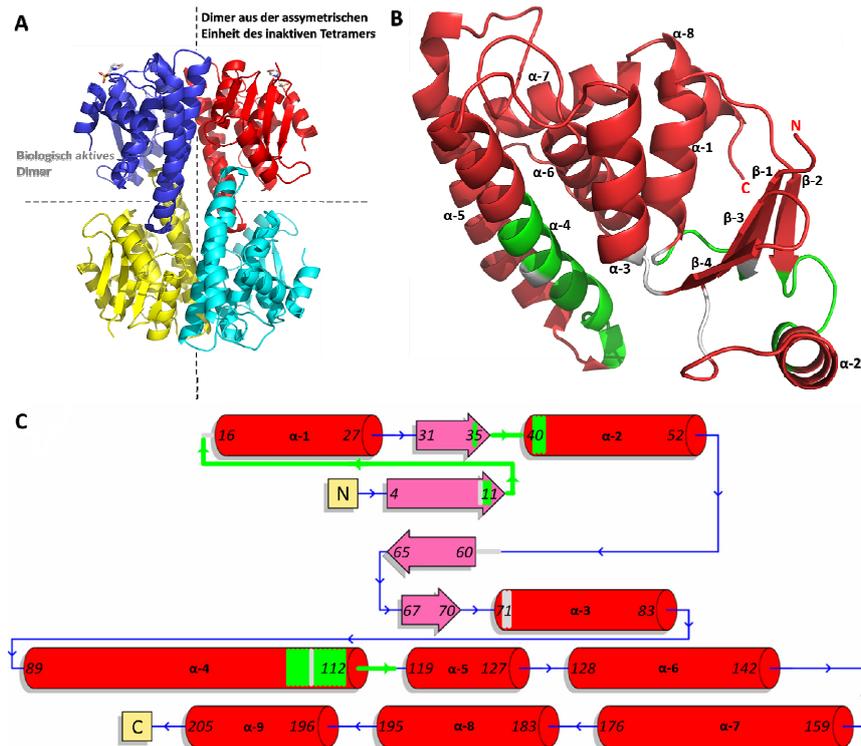
## Ergebnisse

**Tabelle 5:** Datensammlung und Strukturverfeinerung der PfGST Struktur

Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2
Einheitszellparameter: a, b, c [Å]	a = 86,4; b = 60,9; c = 74,8
V <sub>M</sub> (Å <sup>3</sup> /Da)	2,34
Lösemittelgehalt [%]	47,5
Datenvollständigkeit [%]	98,3 (89,1)
Mittel I/sigma Intensität	30,5 (3,6)
Auflösung [Å]	30-1,7 (1,7-1,75)
R <sub>merge</sub> [%] <sup>a</sup>	2,6 (42,1)
Anzahl der Reflektionen, welche für die Verfeinerung verwendet wurden	43889
R <sub>work</sub> [%] <sup>b</sup>	18,3
R <sub>free</sub> [%] <sup>c</sup>	22,9
Proteinatome	3718
Lösungsmittelatome	218
Ligandenatome	9
Mittlerer B Wert [Å <sup>2</sup> ]:	19,5
Mittlere quadratische Abweichung:	
Bindungen [Å]	0,02
Bindungswinkel [°]	1,7
Ramachandran plot Analyse:	
Favorisierte Regionen [ %]	97,9
Erlaubte Regionen [ %]	2,1
Großzügig erlaubte Regionen [ %]	0

Die 1,7 Å Struktur der PfGST zeigt eine inaktive tetramere Form des Proteins (Abb. 8A). Wobei in der asymmetrischen Einheit zwei Monomere der PfGST A, A' ein Dimer bilden, welches aber nicht das biologisch aktive Dimer darstellt (Abb. 8A). Die verfeinerte Struktur des PfGST-Homotetramers hatte die Maße 72x52x46 Å. Das PfGST Dimer und Monomer haben folgende Maße 72x24x46 Å und 42x24x46 Å. Das PfGST Monomer besteht aus neun  $\alpha$ -Helices und vier  $\beta$ -Faltblättern, die über mehrere *Loops* miteinander verbunden sind (Abb. 8C). Die PfGST besteht aus zwei Domänen. Die N-terminale Domäne bildet sich aus den vier parallelen  $\beta$ -Faltblättern, die mit drei  $\alpha$ -Helices durchsetzt sind ( $\beta\alpha\beta\alpha\beta\alpha$ ). Wohingegen die C-terminale Domäne ausschließlich aus sechs  $\alpha$ -Helices besteht (Abb. 8C). Darüber hinaus besitzt jedes Monomer Aminosäurereste die bei dem aktiven Dimer zusammen die *G*- und *H*-site des Proteins bilden. Die *H*-site wird dabei vor allem von Resten der  $\alpha$ -Helix 4 beider Monomere und des *Loops* zwischen  $\alpha$ -Helix 4 und 5 gebildet. Während die *G*-Site Reste in der vorab beschriebenen N-Terminalen Domäne des Proteins lokalisiert sind (Abb. 8B und C).

## Ergebnisse



**Abbildung 8:** Röntgenkristallstruktur der PfGST im Komplex mit MES. **A:** Tetramere Struktur der PfGST in *ribbon*-Darstellung, Monomere sind in vier unterschiedlichen Farben dargestellt, zwei Monomere haben jeweils ein MES-Molekül gebunden. Die blau+rot und gelb+cyan markierten PfGST-Monomere stellen das biologisch aktive Dimer dar. Während die blau+gelb und rot+cyan gefärbten gegenüberliegenden Monomere das Dimer einer asymmetrischen Einheit des Kristalls darstellen. **B:** Darstellung des PfGST-Monomers, die  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter sind vom N- zum C-terminus nummeriert. Die beteiligten Regionen an der *H-site* sind in grün und die beteiligten Regionen des Monomers an der *G-site* sind in weiß dargestellt. **C:** Topologie der PfGST, die beteiligten Reste an der *H-site* sind in grün dargestellt und die beteiligten Reste des Monomers an der *G-site* sind in weiß dargestellt.

In der tetrameren Anordnung des Proteins interagiert jedes PfGST Monomer mit jeweils drei anderen Monomeren durch unterschiedliche intermolekulare hydrophobe Kontakte und Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken). Die *Interface* Regionen wurden mit der PDBsum Datenbank [100] analysiert. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

## Ergebnisse

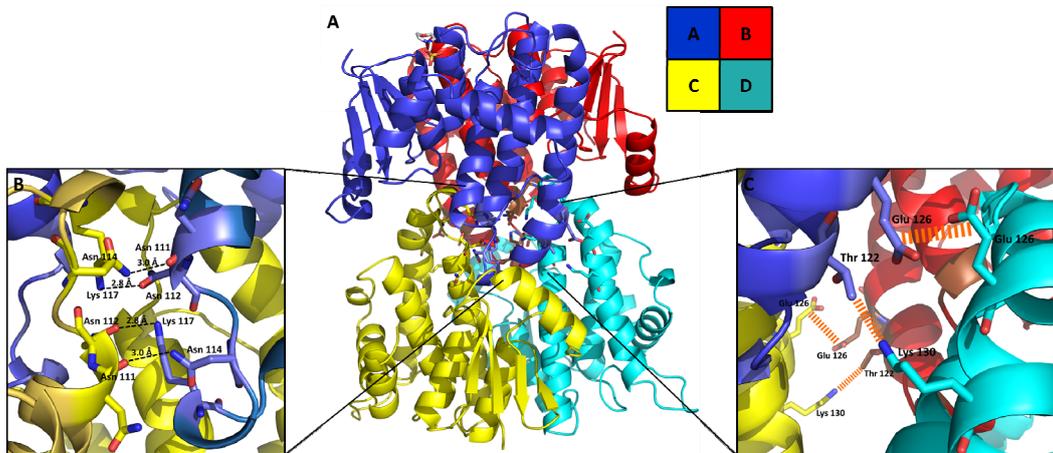
**Tabelle 6:** Strukturelle Details der PfGST Homotetramer *Interface* Regionen, sowie deren stabilisierenden H-Brücken und hydrophoben Wechselwirkungen. Wobei für die A-B≈C-D, A-C≈B-D und A-D≈B-C Regionen die Anzahl der beteiligten Reste, die Bindungsfläche, Anzahl der H-Brücken und die Anzahl der hydrophoben Wechselwirkungen bestimmt wurde.

Ketten	Anzahl der Bindungsflächen Reste	Bindungsfläche (Å <sup>2</sup> )	Anzahl der H-Brücken	Anzahl der hydrophoben Wechselwirkungen
A-B	23:23	1346:1346	6	141
C-D	25:25	1369:1369	6	152
A-C	20:20	1116:1125	4	112
B-D	20:20	1116:1125	4	112
A-D	2:2	177:186	-	2
B-C	2:2	177:186	-	2

Insgesamt sind 47 Aminosäuren an den drei *Interface* Regionen des PfGST Homotetramers beteiligt. Am A-B *Interface* sind 23 Aminosäuren beteiligt, während dem C-D *Interface* 25 Aminosäuren angehören. Zur Stabilisierung dieses *Interface* werden sechs H-Brücken gebildet, im Mittelpunkt dabei steht Asp97, das jeweils zwei H-Brücken zu Arg77 ausbildet. Diese zwei Bindungsflächen decken ein Gebiet von ca. 1358 Å<sup>2</sup> ab und entsprechen somit etwa 11,5 % der Monomeroberfläche (11489 Å<sup>2</sup>). An dem A-C, B-D *Interface* des PfGST Homotetramers, sind 20 Aminosäuren pro Monomer involviert. Wobei dieses *Interface* eine Fläche von ca. 1121 Å<sup>2</sup> abdeckt und somit etwa 9,7 % der Monomeroberfläche entspricht. In Abbildung 16 ist die Stabilisierung der A-C, B-D Bindungsfläche durch 4 H-Brücken und 112 hydrophobe Wechselwirkungen gezeigt. Die H-Brücken werden dabei zwischen den folgenden Aminosäuren der PfGST-Monomere A-C, B-D gebildet: Asn111-Asn114, Asn114-Asn111, Asn112-Lys117 und Lys117-Asn112. Die Aminosäurenreste, die bei diesen Interaktionen beteiligt sind, sind vor allem in der G- und H-site der PfGST lokalisiert, dabei ist speziell der Loop 113-119 bei der Interaktion involviert (Abb. 9B). Der Loop eines jeden Monomers ragt in die H-site des gegenüberliegenden Monomers. Weiterhin besitzt das PfGST Homotetramer ein A-D, B-C *Interface*, an dieser Bindungsfläche sind jeweils zwei Aminosäuren beteiligt. Diese Bindungsflächen decken ein Gebiet von ca. 182 Å<sup>2</sup> ab und entsprechen somit etwa 1,6 % der Monomeroberfläche. Bei dieser diagonalen Verbindung der Monomere sind zwei hydrophobe Interaktionen zwischen Thr122-Lys130 und

## Ergebnisse

Glu126-Glu126 zu beobachten (Abb. 9C).



**Abbildung 9:** Röntgenkristallstruktur der PfGST im Komplex mit MES. **A:** Tetramere Struktur der PfGST in *ribbon*-Darstellung, die Monomere sind in vier verschiedenen Farben dargestellt. Detaillierte Darstellung des A-C und A-D Interface. **B:** Vier stabilisierenden H-Brücken des A-C Interface, wobei vor allem Aminosäuren des atypischen Loop 113-119 beteiligt sind. **C:** A-D Interface mit den stabilisierenden hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Glu26-Glu26 und Thr122-Lys130.

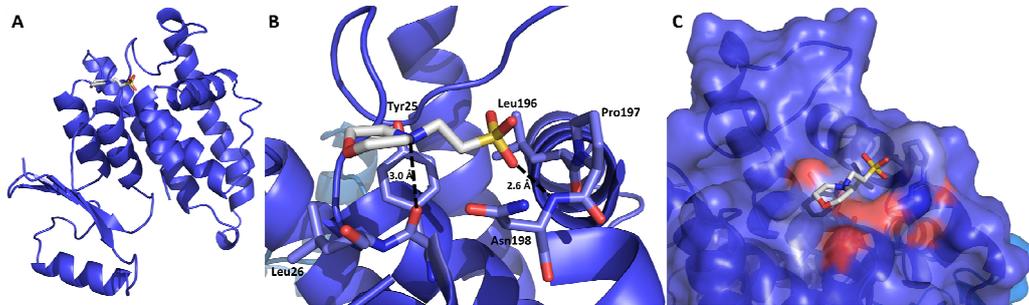
Die am *Interface* beteiligte Oberfläche aller Monomere des PfGST Homotetramers beträgt  $2661 \text{ \AA}^2$ , das in etwa 6 % der gesamten Oberfläche von  $45.952 \text{ \AA}^2$  entspricht. In der gelösten PfGST Struktur sind neben den Wassermolekülen, Schwefelionen und Glycerin, die Elektronendichte von MES Molekülen erkennbar, die an eine pufferzugängliche Region der PfGST gebunden sind. Diese MES Bindungsstelle wird im weiteren Verlauf der Arbeit als nicht-Substrat-Bindungsstelle bezeichnet. Im Kapitel 4.3.2 wird die entdeckte MES Binderegion der PfGST genauer beschrieben.

### 4.2.2 PfGST nicht-Substrat-Bindungsstelle

Wie zuvor beschrieben, war die Elektronendichte für ein MES Molekül an jedem PfGST Monomer des Dimers zu finden. Die MES Bindungsstelle liegt in einer Region des PfGST Moleküls, die weder zur *G-* oder *H-site* gehört. Über Abstandsmessungen konnte festgestellt werden, dass die Distanz zwischen der nicht-Substrat-Bindungsstelle und der *G-* und *H-site* bei ungefähr  $25 \text{ \AA}$  liegt. Die Position des MES Moleküls in der PfGST ist in Abbildung 17A dargestellt. Die MES Bindungsstelle befindet sich in einer kleinen Mulde in der Oberfläche der PfGST und wird dort von Tyr25, Leu26, Leu196, Pro197, und Asn198 koordiniert (Abb. 10C). Diese Aminosäuren sind ebenso bei der Interaktion zu dem MES Molekül beteiligt. Pro197

## Ergebnisse

und Leu196 bilden zusammen mit  $\alpha$ -Helix 5 eine Begrenzung der MES-Bindungsstelle. Ebenso werden durch  $\alpha$ -Helix 7 und 6 eine Grenze der Binderegion gebildet. Zwischen MES und dem Amidstickstoff von Asn198 und dem Carbonyl-Sauerstoff von Tyr25 werden zwei H-Brücken gebildet, welche die Interaktion stabilisieren (Abb. 10B).

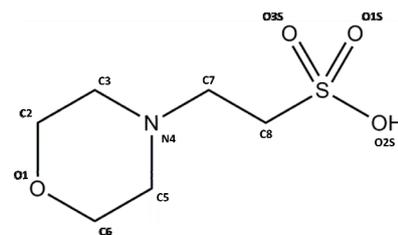


**Abbildung 10:** Monomer der PfgST in der *ribbon*-Darstellung. **A:** Lage des MES Moleküls im PfgST Monomer. Jeweils ein Monomer bindet ein MES Molekül. **B:** Beteiligte Aminosäuren an der MES Interaktion. Tyr25 und Asn198 bilden jeweils eine H-Brücke zum MES Molekül aus, wobei der Abstand zwischen Tyr25 zum MES Molekül bei 3,0 Å und zwischen Asn198 und MES bei 2,6 Å liegt. **C:** Oberflächendarstellung der PfgST nicht Substrat-Bindungsstelle mit gebundenen MES.

Die MES Bindung wird zusätzlich zu den H-Brücken durch hydrophobe Wechselwirkungen zu den Aminosäuren Tyr25, Leu26, Leu196, Pro197 und Asn198 stabilisiert. Die beteiligten Reste, Abstände und Art der Interaktion zwischen MES und PfgST sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

**Tabelle 7:** Beteiligte Reste der PfgST und Atome des MES Moleküls an der Interaktion

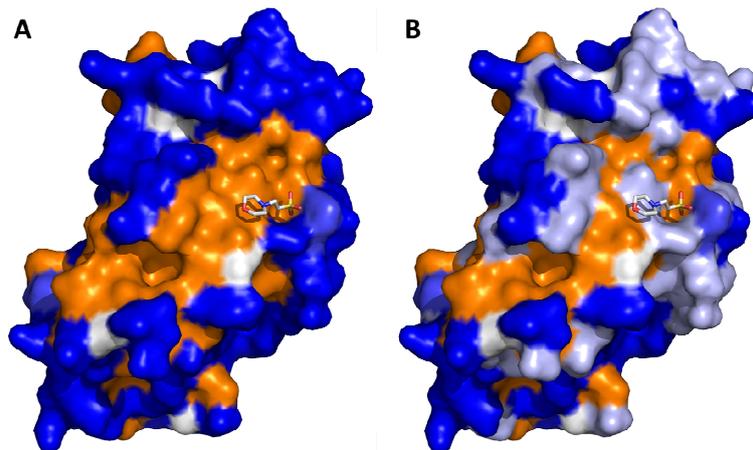
Liganden Atom	Interagierende Aminosäuren	Abstand (Å)	Bindungstyp
N4	Tyr25	3,0	H-Brücke
O3S	Asn198	2,6	H-Brücke
O3S	Asn198	4,6	hydrophobe Ww
C7	Asn198	4,8	hydrophobe Ww
C5	Asn198	4,4	hydrophobe Ww
O3S	Leu196	5,4	hydrophobe Ww
O1S	Pro197	3,6	hydrophobe Ww
O2S	Pro197	4,5	hydrophobe Ww
C8	Tyr25	4,0	hydrophobe Ww
C7	Tyr25	4,0	hydrophobe Ww
C5	Tyr25	5,8	hydrophobe Ww
C3	Tyr25	3,9	hydrophobe Ww
C6	Leu26	3,9	hydrophobe Ww
O1	Leu26	4,2	hydrophobe Ww



**Abbildung 11:** MES Molekül mit Atomnomenklatur.

## Ergebnisse

Die MES Bindungsstelle und ihre Umgebung, sind Bestandteil einer großen hydrophoben Furche des Proteins, die quer über die Oberfläche des PfGST Monomers verläuft. Die Aminosäurezusammensetzung dieser Region zeichnet sich durch einen hohen Anteil hydrophober Aminosäuren (Ile, Leu, Val, Tyr, Ala, Phe, und Trp) aus (Abb. 12A). Außerdem können Aminosäuren innerhalb und in den Randregionen dieser Furche gefunden werden, die H-Brücken mit dem potenziellen Interaktionspartner ausbilden können (Ser, Thr, Asn, Gln, Trp, Cys und Tyr) (Abb. 12B).



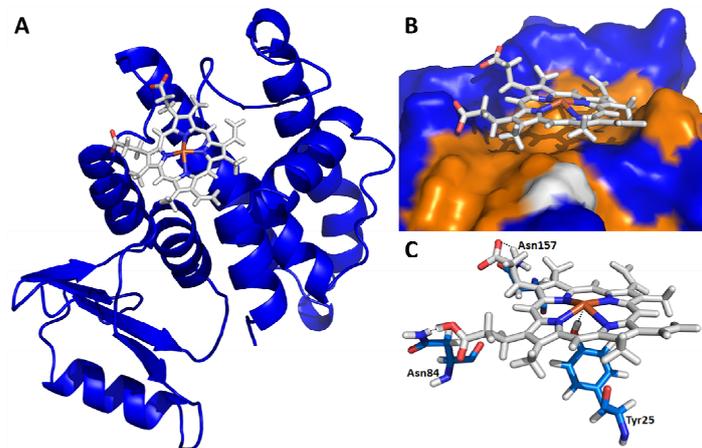
**Abbildung 12:** **A:** Hydrophobe Oberflächenansicht des PfGST-Monomers mit gebundenem MES-Molekül. Die hydrophoben Aminosäuren sind in orange dargestellt, die hydrophilen Aminosäuren in blau, die Aminosäuren, die zu keiner der beiden Gruppen gehören, sind weiß gefärbt. Interessanterweise ist die MES-Bindetasche in einem großen hydrophoben Gebiet lokalisiert, in dem viele hydrophobe Aminosäurereste Wechselwirkungen ausbilden können. **B:** Hydrophobe Oberflächenansicht des PfGST-Monomers mit dem gebundenen MES-Molekül. Die hydrophoben Aminosäuren sind in orange gehalten, die hydrophilen Aminosäuren in blau. Aminosäuren, die zu keiner der beiden Gruppen gehören, sind weiß gefärbt. In hellblau sind die Aminosäuren gefärbt, die als Donor oder Akzeptor-Molekül im Rahmen einer H-Brücke zwischen PfGST und einem Liganden wirken können. Besonders im Bereich der MES-Bindungsstelle treten solche Aminosäuren auf, die zur Fixierung des Liganden dienen können.

### 4.2.3 Molekulares Docking mit Hämin in der PfGST nicht-Substrat-Bindungsstelle

Die publizierten PfGST-Strukturen geben über die Lage der *L-site* im Protein keine genaue Auskunft. Wie in Kapitel 4.2.2 beschrieben wurde, besitzt die nicht-Substrat-Bindungsstelle der PfGST das Potenzial auch größere Moleküle als MES zu binden. Aus diesem Grund wurde molekulares Docking mit Hämin und der PfGST nicht-Substrat-Bindungsstelle mit der SYBYL-X Software (Version 2.1, Tripos Associates, St. Louis, USA) durchgeführt. Hämin ist ein bekannter Inhibitor der PfGST, der mit der *L-site* des Proteins interagiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass das

## Ergebnisse

Häminmolekül sehr gut mit der nicht-Substrat-Bindungsstelle der PfGST interagiert. In der tetrameren Form der PfGST ist diese Bindungsstelle frei zugänglich und wird von keinem der interagierenden Monomere blockiert (Abb. 9 und 10). Die Interaktion wird durch drei H-Brücken stabilisiert, die zwischen Tyr25, Asn84 und Asn157 und Hämin ausgebildet werden können. Dabei fällt auf, dass Tyr25, das aus der nicht-Substrat-Bindungsstelle herausragt, eine H-Brücke zu dem Fe-(II)-Atom des Hämins ausbildet. Die Aminosäurereste Asn84 und Asn157 bilden H-Brücken mit den Carbonylgruppen des Hämins (Abb. 13). Darüber hinaus wird die Interaktion zwischen Hämin und der PfGST nicht-Substrat-Bindungsstelle durch zehn hydrophobe Interaktionen stabilisiert.



**Abbildung 13:** Molekulares Docking von Hämin in die PfGST nicht-Substrat-Bindungsstelle. **A:** Orientierung des Hämin Moleküls in der PfGST nicht-Substrat-Bindungsstelle in der *ribbon*-Darstellung. **B:** Oberflächendarstellung der nicht-Substrat-Bindungsstelle der PfGST. Die hydrophoben Aminosäuren sind in orange dargestellt und die hydrophilen Aminosäuren in blau. Dabei fällt auf, dass das Fe-(II)-Atom des Hämin direkt über dem aus der Bindungsstelle herausragenden Tyr25 liegt. **C:** Darstellung der H-Brücken zwischen Hämin und Tyr25, Asn84, Asn157 der PfGST nicht-Substrat-Bindungsstelle.

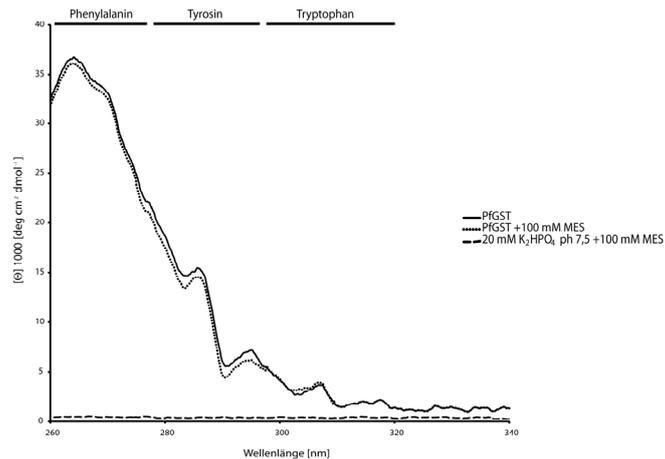
Die Ergebnisse des molekularen Dockings mit Hämin und der nicht-substrat-Bindungsstelle der PfGST bekräftigt die Annahme, dass es sich bei dieser Region um die *L-site* des Proteins handelt. Besonders das Tyr25 scheint eine entscheidende Funktion bei der Bindung der Liganden in dieser Region zu besitzen, das kann für die Hämin- als auch die MES-Interaktion beobachtet werden. Um herauszufinden wann die Bindung des MES Moleküls an die PfGST stattfindet wurden CD-Experimente durchgeführt. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.2.4 beschrieben.

### 4.2.4 Charakterisierung der PfGST-MES Interaktion mit CD Spektroskopie

An der Interaktion zwischen dem MES Molekül und der PfGST ist insbesondere die aromatische Aminosäure Tyr25 beteiligt. Außerdem scheint durch die MES Interaktion das Phe192 der PfGST verdeckt zu werden. Zur Überprüfung der Hypothese, dass MES und die PfGST in Lösung eine Interaktion eingehen, wurden Nah-UV CD-Experimente durchgeführt. Das Experiment basierte auf der Verringerung der Absorption im Bereich von 240-340 nm, sobald das MES Molekül in Lösung mit den aromatischen Aminosäureresten der PfGST interagiert oder sie verdeckte. Diese Abnahme der Absorption kann über Messungen des Nah-UV Bereiches an einem CD Spektrometer überprüft werden.

Für die CD-Messungen wurde die PfGST wie in Kapitel 3.2.8.3 beschrieben exprimiert und gereinigt. Das Protein wurde in 20 mM  $K_2HPO_4$  pH 7,5 in mit einer Konzentration von 4 mg/mL gemessen. Die CD-Experimente wurden am J-815 CD Spektrometer (Jasco, UK) in einem Wellenlängenbereich von 260 bis 340 nm durchgeführt. Die PfGST wurde zunächst ohne die Zugabe von MES gemessen um eine Vergleichsabsorption des Spektrums zu erhalten. Im Anschluss wurden 2 mL der Proteinlösung mit 100 mM MES versetzt und für 1 h bei RT inkubiert. Für die Messungen wurden 2 mL der Proteinlösung in einer 10 mm Quarzküvette (Hellma, Deutschland) mit 15 Wiederholungen gemessen. Die Spektren der korrespondierenden Puffer 20 mM  $K_2HPO_4$  pH 7,5 (+MES/-MES) wurden mit 5 Wiederholungen gemessen und vom Proteinsignal abgezogen und das Ergebnis in molarer Elliptizität angegeben. Die Messungen des Puffers 20 mM  $K_2HPO_4$  pH 7,5 (+MES/-MES) zeigten keinen messbaren Einfluss auf die untersuchte Nah-UV Region (Abb. 14). Die aufgenommenen Spektren der PfGST -MES/+MES Proben wurden durch Überlagerung miteinander verglichen (Abb. 20). Dabei konnten in den Nah-UV Regionen von Tyrosin (275 – 290 nm) und Phenylalanin (260 – 275 nm) eine schwache Abnahme in der Absorption beobachtet werden, sobald 100 mM MES zur PfGST Lösung hinzugegeben wurde. Im Gegensatz dazu, blieb die Nah-UV Region von Tryptophan (290 – 320 nm) unbeeinflusst.

## Ergebnisse



**Abbildung 14:** Ergebnis der Nah-UV CD-Messungen um die Bindung von MES in Lösung zu untersuchen. Die Experimente wurden in 20 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7,5 (+MES/-MES) durchgeführt. Der Vergleich der Nah-UV CD-Spektren der PfGST mit 100 mM MES und ohne MES zeigen eine schwache Abnahme der Absorption in der Tyrosin und Phenylalanin Region (260 – 295 nm). In Lösung bindet MES auch an die PfGST und überlagert Tyr25 und Phe192 zum Teil, so dass hier Abnahmen im Nah-UV CD-Spektrum gemessen werden können.

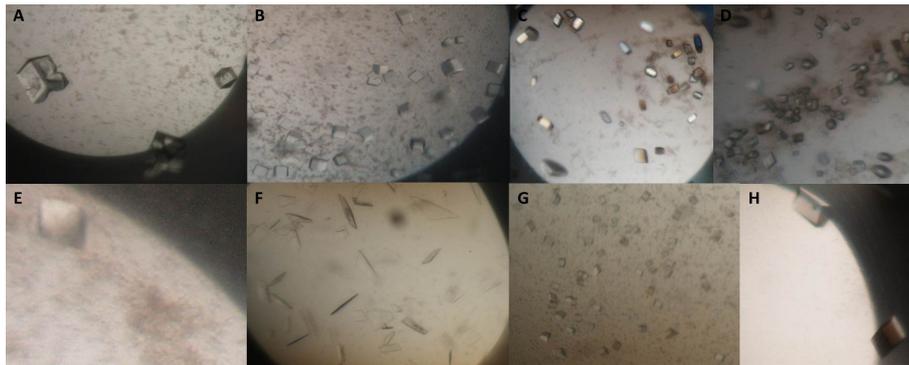
### 4.3 PfGST Kristallisation mit Inhibitoren

Parallel zu der Identifikation potenzieller Inhibitoren der PfGST, beschrieben im Kapitel 4.1, wurden Kokristallisationsversuche der PfGST und Komponente **19** durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Kristallisationsversuche war diese Substanz eine der stärksten PfGST Inhibitoren und wurde aus diesem Grund für die Kokristallisationsversuche ausgewählt.

Die PfGST wurde wie in Kapitel 3.2.8.3 beschrieben exprimiert und gereinigt. Anschließend wurde das Protein gegen 3 L 0,1 M MES pH 6,0; 3 mM GSH in bei 6 °C dialysiert und für 30 min bei 4 °C und bei 16.100 x g zentrifugiert. Für die Kristallisationsexperimente wurde eine Proteinkonzentration von 18 mg/mL eingesetzt. Die Proteinlösung und eine Lösung von Komponente **19** mit der Konzentration 50  $\mu\text{M}$  wurden für 1 h bei RT inkubiert. 192 Bedingungen des kommerziellen Screening Stura Foodprint<sup>TM</sup> (Molecular Dimensions, UK) und dem JBTR Screening von **Julia Drebes** wurden für die Kristallisation durch Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen getestet. Bei diesen Kristallisationsansätzen wurden 300 nL der Proteininhibitorlösung mit 300 nL der Präzipitantenlösung durch den Pipettierroboter Honeybee 961 (Genomic Solutions, USA) in NeXtal QIA1  $\mu\text{plates}$  96 Well Platten (Qiagen, Deutschland) pipettiert. Das Reservoir wurde mit 55  $\mu\text{L}$  der Präzipitanten gefüllt. Nach Inkubation der Ansätze über sieben Tage bei RT konnte Kristallwachstum in sechs Kristallisationsbedingungen beobachtet werden

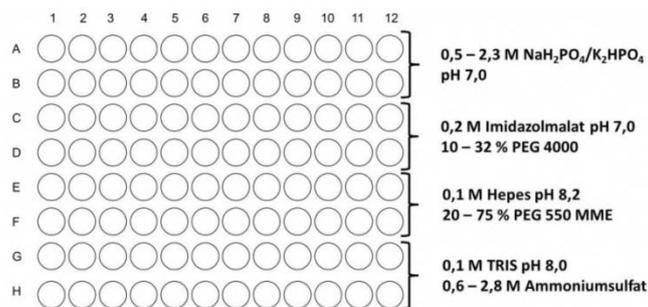
## Ergebnisse

(Abb. 15).



**Abbildung 15:** PfgST Kristalle bei einem Screening für Kristallisationsbedingungen, nach sieben Tagen Inkubation bei RT. **A:** Stura Foodprint™ A7 (0,2 M Imidazolmalat pH 7,0; 20 % PEG 4000); **B:** Stura Foodprint™ A8 (0,2 M Imidazolmalat pH 7,0; 25 % PEG 4000); **C:** Stura Foodprint™ B7 (1,6 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0); **D:** Stura Foodprint™ B8 (2,0 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0); **E:** Stura Foodprint™ C4 (0,1 M Hepes-Na-Salz pH 8,2; 60 % PEG 550 MME); **F:** Stura Foodprint™ F10 (0,1 M Tris pH 8,5; 0,2 M Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 25 % PEG 3350); **G:** Stura Foodprint™ G7 (0,2 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 24 % PEG 8000); **H:** JBTR C4 (2,4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).

Zur Optimierung der Kristallisationsbedingungen wurde die Kristallisation durch Dampfdiffusion im sitzenden Tropfen verwendet. Außerdem wurde die Präzipitantenkonzentrationen um die initiale Konzentration aus dem *Screening* variiert. Bei diesen Versuchen wurde ein Verfeinerungsscreening verwendet, das auf den folgenden Bedingungen basierte: 2,0 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,0; 0,2 M Imidazolmalat pH 7,0, 25 % PEG 4000; 0,1 M Hepes-Na-Salz pH 8,2; 60 % PEG 550 MME; 2,4 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Der Aufbau des Screenings ist in Abbildung 16 gezeigt, wobei jeweils Doppelansätze für jede Bedingung pipettiert wurden.

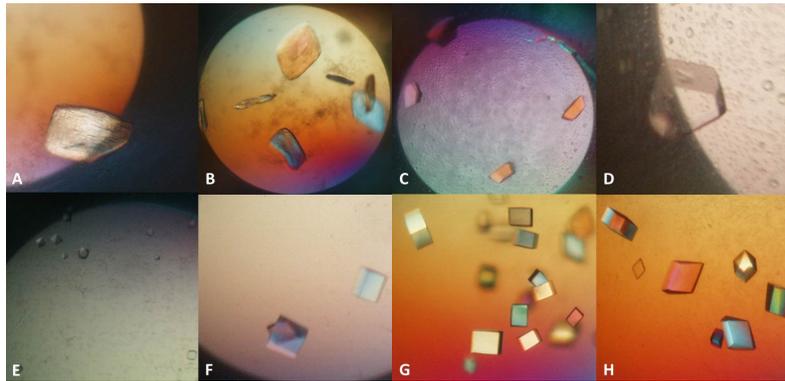


**Abbildung 16:** Aufbau des PfgST Verfeinerungsscreenings, basierend auf den Resultaten aus dem Stura Foodprint™ (Molecular Dimensions, UK) und JBTR Screening.

Die Kristallisationsansätze mit diesem Verfeinerungsscreening wurden mit dem Pipettierroboter Honeybee 961 (Genomic Solutions, USA) pipettiert. 300 nL der Proteininhibitorlösung wurden mit 300 nL der Präzipitantenlösung in NeXtal QIA1  $\mu$ plates 96 Well Platten (Qiagen, Deutschland) gemischt. Das Reservoir wurde mit

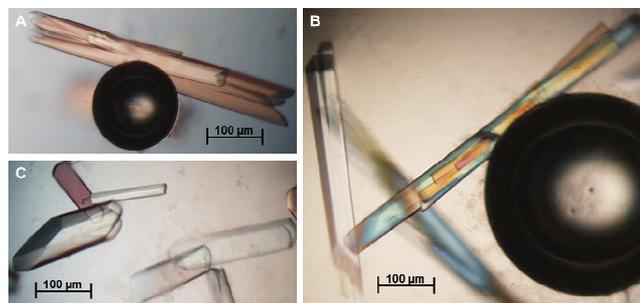
## Ergebnisse

55  $\mu\text{L}$  der Präzipitantenlösung gefüllt. Nach sieben Tagen Inkubation bei RT konnte Kristallwachstum beobachtet werden.



**Abbildung 17:** Verfeinerte PfGST Kristalle nach sieben Tagen Inkubation bei RT. **A:** PfGST Verfeinerungsscreen A10 (2,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7,0); **B:** A11 (2,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7,0 ); **C:** C7 (0,2 M Imidazolmalat pH 7,0; 22 % PEG 4000); **D:** C8 (0,2 M Imidazolmalat pH 7,0; 24 % PEG 4000); **E:** E5 (0,1 M HEPES-Na-Salz pH 8,2; 40 % PEG 550 MME); **F:** H8 (0,1 M Tris pH 8,0; 2,0 M Ammoniumsulfat); **G** und **H:** G9 und H9 (0,1 M Tris pH 8,0; 2,2 M Ammoniumsulfat).

Die PfGST bildete Proteinkristalle mit 2,1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7,0 als Präzipitanten, die im Vergleich zu den Kristallen aus dem initialen Screening ihre Größe verdreifacht hatten. Zur weiteren Optimierung dieser Bedingung wurden Kristallisationsversuche mit der Methode des hängenden Tropfens durchgeführt. Dabei wurde die Präzipitantenkonzentrationen in 200 mM Schritten variiert. Die Kristallisationsversuche wurden in 24 Well CPL-130 Platten (Jena Bioscience, Deutschland) angesetzt. 2  $\mu\text{L}$  der Proteininhibitorlösung wurden mit 2  $\mu\text{L}$  der Präzipitantenlösung, die mit 25  $\mu\text{M}$  Komponente **19** versetzt war, gemischt. Das Reservoir enthielt 1 mL der Präzipitantenlösung. Nach sieben Tagen Inkubation bei RT konnte Kristallwachstum beobachtet werden (Abb. 18).



**Abbildung 18:** Proteinkristalle der PfGST gewachsen über die Methode des hängenden Tropfens. **A:** Einzelner PfGST Kristall mit einer Länge von  $\sim 400 \mu\text{m}$  (2,4 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7,0); **B:** PfGST Kristall mit einer Länge von  $\sim 600 \mu\text{m}$  (2,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7,0); **C:** PfGST Kristalle mit einer Länge von  $\sim 200 \mu\text{m}$  (2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7,0);

## Ergebnisse

Bei den Optimierungsansätzen über die Methode des hängenden Tropfens konnten Proteinkristalle mit einer Länge zwischen 200 und 600  $\mu\text{m}$  generiert werden (Abb. 13 A+B). Diese Kristalle wurden hinsichtlich ihres Streuvermögens und Komplexbildung mit Komponente **19** an dem Konsortiums Messplatz X13 (Hasylab/DESY, Deutschland) getestet. Der getestete PfGST Kristall beugte bis zu einer maximalen Auflösung von 2,9 Å. Die anschließende Datenprozessierung und –analyse zeigte jedoch, dass der Inhibitor nicht oder nicht mehr an der PfGST gebunden war.

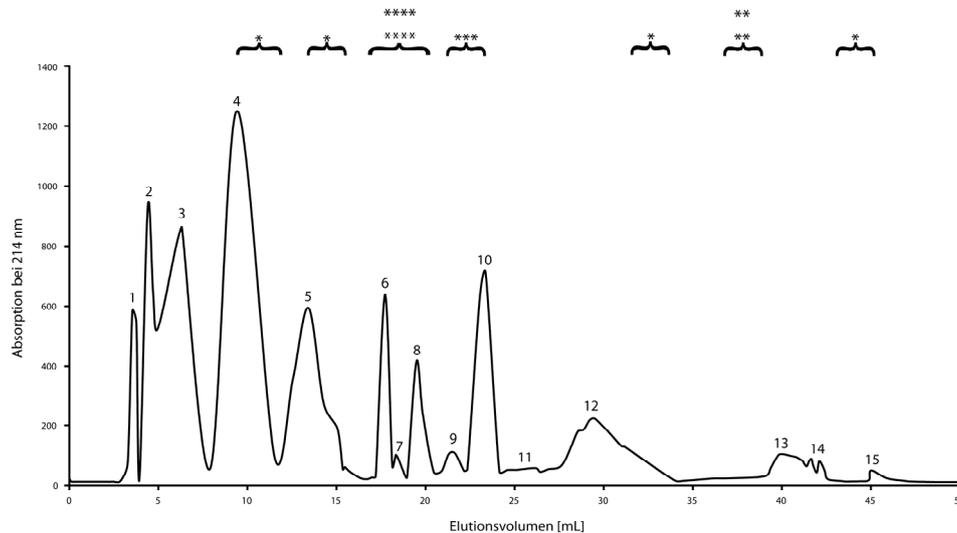
### **4.4 Peptide aus den exkretorischen und sekretorischen Produkten von *Onchocerca ochengi***

#### **4.4.1 Fraktionierung der Peptide**

Die ESPs von Helminthen enthalten neben makromolekulare auch niedermolekulare Modulatoren des Wirtsimmunsystems. Die Peptidzusammensetzung der *Onchocerca ochengi* ESPs wurde untersucht, dabei sollten Regulatoren aus dem Peptidbereich identifiziert werden.

Um Peptide aus den ESPs weiblicher *Onchocerca ochengi* Parasiten zu identifizieren, wurde die Peptidfraktion zunächst von Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden unter Verwendung einer Oasis HLB Plus Kartusche (Waters, USA) getrennt. Die Peptide, die sich in den entsalzten Elutionsfraktionen befanden, wurden durch *reversed phase* Chromatographie (RPC) getrennt. Für die Trennung wurde eine chromolith<sup>®</sup> RP-18e 100 x 4,6 mm Säule (Merck Millipore, USA) verwendet. Während der Trennung wurden 45 Fraktionen gesammelt und 13 Peaks konnten auf dem Chromatogramm beobachtet werden (Abb.19).

## Ergebnisse



**Abbildung 19:** Chromatogramm des RPC Laufes einer *Onchocerca ochengi* Peptidfraktion mit einer chromolith® RP-18e 100 x 4,6 mm Säule (Merck Millipore). Die Absorption der Peptide wurde bei 214 nm gemessen. 13 Peptidpeaks konnten detektiert werden und 45 Fraktionen mit jeweils 1ml Volumina wurden gesammelt. (\*) kennzeichnet die Fraktionen, in denen Peptide mit einer potenziellen antibakteriellen Aktivität identifiziert wurden.

### 4.4.2 Peptid-Identifikation

Zur Identifikation der enthaltenen Peptide wurden die 45 RPC Fraktionen an einem UltrafleXtreme MALDI-TOF-TOF-MS (Bruker Daltonik, Deutschland) untersucht. Dabei wurden 42 Peptide identifiziert, deren MW zwischen 780 und 2407 Da lag (Tabelle 8 und 9). 10 der 42 identifizierten Peptide entstehen nicht aus dem proteolytischen Abbau von Vorläuferproteinen und wurden bisher nicht beschrieben oder klassifiziert (Tabelle 9). Die theoretische Nettoladung wurde für alle 42 Peptide bestimmt. Bei diesem Prozess konnten je 14 Peptide mit einer neutralen, kationischen oder anionischen Ladung identifiziert werden. Das Peptid mit der Sequenz **DGGDEEGNDENEDVPRGSF** zeigte eine hohe anionische Nettoladung von -7 und gleichzeitig eine hohe Hydrophobizität von  $+44,7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Die Hydrophobizität der 42 identifizierten Peptiden variierte von  $+0,4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$  bis  $+44,7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ . In den Tabellen 8 und 9 sind die Sequenzen der identifizierten Peptide mit ihrem MW, korrespondierenden Nettoladungen, Hydrophobizität und einer Vorhersage der Sekundärstruktur aufgelistet.

## Ergebnisse

**Tabelle 8:** Identifizierte Peptide aus den *Onchocerca ochengi* ESPs, die proteolytisch aus Vorläuferproteinen gebildet werden

Fraktion Nr.	m/z	Sequenz	Vorläuferprotein (UniProtKB, <i>O. ochengi</i> Genom)	Netto Ladung	antibakterielle Aktivität	Hydrophobizität (kcal*mol <sup>-1</sup> )	Sekundärstrukturvorhersage
11	1288	VCPANWQPGSET	Peroxidoxin-2 (O76452), <i>O. ochengi</i>	-1	X	+13,2	<i>coiled coil</i>
12	1449	MMNGLRFPNETH	Cathepsin L ähnliche Cysteinprotease (Q9BJM3), <i>Onchocerca volvulus</i>	0	-	+14,6	β-Strang, <i>coiled coil</i>
13	1014	AKVIHDKF	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase pos. 13534, <i>O. ochengi</i>	+1	-	+16,7	<i>coiled coil</i>
13	1201	NLGAPEMAFPR	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 (Q9GC21), <i>O. ochengi</i>	0	-	+13,0	<i>coiled coil</i>
13	1251	HTVGIGSLLGAIN	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 (Q9GC2), <i>O. ochengi</i>	0	-	+10,5	α-Helix Windung, <i>coiled coil</i>
13	1312	RTAEDGRVNAVQ	Myosin ähnliches Antigen (P21249), <i>O. volvulus</i>	0	-	+21,9	β-Strang, <i>coiled coil</i>
16	1818	IKPEVKESKEYFGKH	Peroxidoxin-2 (O76452), <i>O. ochengi</i>	+1	(X)	+30,0	α-Helix Windung, <i>coiled coil</i>
17	861	MVFSGFCA	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 5 (Q5QIQ2), <i>O. ochengi</i>	0	(X)	+5,4	<i>coiled coil</i>
17	1135	QRDEREIPP	Immundominantes hypodermales Antigen (B2D1W6), <i>O. ochengi</i>	-1	(X)	+22,4	<i>coiled coil</i>
18	1267	AVRNVNEQIGPA	Enolase pos. 7559, <i>O. ochengi</i>	0	(X)	+16,1	β-Strang, <i>coiled coil</i>
18	2338	MEKQENFIEIAKS KDVEVLS	Ankyrin Homolog (O96411), <i>O. ochengi</i>	-2	(X)	+30,7	α-Helix Windung, <i>coiled coil</i>

## Ergebnisse

**Tabelle 8 (fortgesetzt):** Identifizierte Peptide aus den *Onchocerca ochengi* ESPs, die proteolytisch aus Vorläuferproteinen gebildet werden

Fraktion Nr.	m/z	Sequenz	Vorläuferprotein (UniProtKB, <i>O. ochengi</i> Genom)	Netto Ladung	antibakterielle Aktivität	Hydrophobizität (kcal* $\text{mol}^{-1}$ )	Sekundärstruktur Vorhersage
19	1329	RQKSQQIQAIM	Immundominantes hypodermales Antigen (B2D1W6), <i>O. ochengi</i>	+2	(X)	+13,6	<i>coiled coil</i>
20	882	SITPSYKS	Immundominantes hypodermales Antigen (B2D1W6), <i>O. ochengi</i>	+1	-	+10,6	<i>coiled coil</i>
20	2094	KDSRGVIQTDEEG DKCESP	B8 Protein (B2D1W7), <i>O. ochengi</i>	-3	-	+39,9	$\beta$ -Strang, <i>coiled coil</i>
21	780	EMNRTE	Ankyrin Homolog (O96411), <i>O. ochengi</i>	-1	-	+17,4	<i>coiled coil</i>
21	1362	LGEVINEKDKFA	Kleines Hitzeschock Protein pos. 13179, <i>O. ochengi</i>	-1	-	+22,4	<i>coiled coil</i>
22	907	LFGEKSNL	Immundominantes Antigen Ov33-3 pos. 11807, <i>O. ochengi</i>	0	-	+12,6	<i>coiled coil</i>
23	982	LDQAPSHCL	Uncharakterisiertes Protein pos. 8867, <i>O. ochengi</i>	-1	(X)	+13,2	<i>coiled coil</i>
23	1127	LAKVIHDKFG	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase pos. 13534 <i>O. ochengi</i>	+1	(X)	+16,6	<i>coiled coil</i>
24	1231	PKRPNVPGA EY	Glutathion-Reduktase (B5MAH7), <i>O. ochengi</i>	+1	-	+17,9	<i>coiled coil</i>
25	902	ADYERIH	Immundominantes hypodermales Antigen (B2D1W6), <i>O. ochengi</i>	-1	-	+18,0	<i>coiled coil</i>
25	1159	VLAGSLLFLLL	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 (Q9GC21), <i>O. ochengi</i>	0	-	+0,4	<i>coiled coil</i>
25	1633	IAVHNSKDP AEIPWG	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase pos. 11016 <i>O. ochengi</i>	-1	-	+19,3	<i>coiled coil</i>

## Ergebnisse

**Tabelle 8 (fortgesetzt):** Identifizierte Peptide aus den *Onchocerca ochengi* ESPs, die proteolytisch aus Vorläufer Proteinen gebildet werden

Fraktion Nr.	m/z	Sequenz	Vorläuferprotein (UniProtKB, <i>O. ochengi</i> Genom)	Netto Ladung	antibakterielle Aktivität	Hydrophobizität (kcal* $\text{mol}^{-1}$ )	Sekundärstruktur Vorhersage
26	1359	SNQRRETQQVI	OV39 Antigen (P31730), <i>O. volvulus</i>	+1	-	+17,4	$\alpha$ -Helix Windung, <i>coiled coil</i>
27	2394	VYQSFFIGGGPGSSWT FYPPLS	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 (Q9GC21), <i>O. ochengi</i>	0	-	+4,3	$\beta$ -Strang, <i>coiled coil</i>
29	1595	IPEEVKNFYKNLT	Fettsäure und Retinol bindendes Protein 1 (Q8WT57), <i>O. ochengi</i>	0	-	+17,6	$\alpha$ -Helix Windung, <i>coiled coil</i>
29	2407	WLPKAMAAPTPVSCL VHSSTLVT	NADH-Dehydrogenase Untereinheit 5 (Q5QIQ6), <i>O. ochengi</i>	+1	-	+9,2	$\beta$ -Strang, <i>coiled coil</i>
34	1244	SELMRPQIRN	Uncharakterisiertes Protein (J0DP81), <i>Loa loa</i>	+1	X	+14,3	<i>coiled coil</i>
37	2138	VENSPDTLLIVSNPVDVLT	L-Laktat Dehydrogenase pos. 2770, <i>O. ochengi</i>	-3	(X)	+14,3	$\beta$ -Strang, <i>coiled coil</i>
37	1168	GKHTIFGRVVG	Cyclophilin 4 pos. 7109, <i>O. ochengi</i>	+2	(X)	+14,8	<i>coiled coil</i>
44	2095	DGGDEEGGNDENED VPRGSF	ALT 1 (B2D1W8), <i>O. ochengi</i>	-7	X	+44,7	<i>coiled coil</i>
45	1165	HILIAVGGYPK	Glutathion-Reduktase (B5MAH7), <i>O. ochengi</i>	+1	-	+11,3	<i>coiled coil</i>

## Ergebnisse

**Tabelle 9:** Identifizierte Peptide aus den *Onchocerca ochengi* ESPs, die aus keinem proteolytischen Abbau eines Vorläuferproteins gebildet werden

Fraktion Nr.	m/z	Sequenz	Netto Ladung	antibakterielle Aktivität	Hydrophobizität (kcal* $\text{mol}^{-1}$ )	Sekundärstruktur Vorhersage
14	2324	KVDGPAFRKAIEPV VKANPAFA	+2	X	+24,4	$\alpha$ -Helix Windung, <i>coiled coil</i>
16	928	KMAIKLKP	+3	(X)	+13,9	<i>coiled coil</i>
19	1327	VGLLTLGCLEVLV	-1	(X)	+6,4	<i>coiled coil</i>
23	862	RAPLEYN	0	(X)	+12,9	<i>coiled coil</i>
24	1259	RKPLSSLPYSI	+2	-	+9,8	<i>coiled coil</i>
26	1336	PDPGPPSPRMSEA	-1	-	+19,6	<i>coiled coil</i>
29	877	SATPFSHM	0	-	+9,7	<i>coiled coil</i>
30	1573	PSLLYKEGISSAVP	0	-	+11,7	$\alpha$ -Helix Windung, <i>coiled coil</i>
37	2010	GITWAKDTLFIYLENPK	0	(X)	+14,7	$\beta$ -Strang, <i>coiled coil</i>
37	1636	LFAEGVVKREDLFI	-1	(X)	+17,1	$\beta$ -Strang, <i>coiled coil</i>

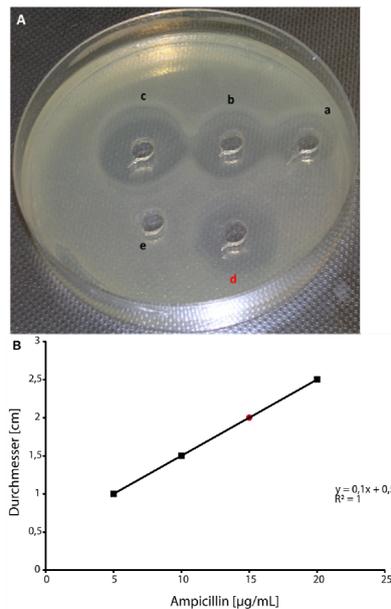
## Ergebnisse

Wie zuvor beschrieben, wurden 42 Peptide aus den *Onchocerca ochengi* ESPs identifiziert. Im Kapitel 4.4.3 werden die antibakteriellen Eigenschaften einiger dieser Peptide beschrieben.

### **4.4.3 Antibakterielle Peptide aus den *Onchocerca Ochengi* ESPs**

Die Helminthen sekretieren Substanzen, die Funktionen des Wirtsimmunsystems nachahmen können. Eine Gruppe dieser Moleküle sind die HDPs, die eine Aktivität gegenüber Bakterien, Viren, Pilzen und eukaryotischen Parasiten besitzen. Um Peptide aus den *Onchocerca ochengi* ESPs identifizieren zu können, die eine antibakterielle Funktion besitzen, wurde das entsalztes Peptidgemisch als auch die 45 Fraktionen nach der RPC mit Hilfe eines bakteriziden Agarplatten-Assay untersucht. Die Peptidkonzentration des entsalzten Peptidgemisches betrug bei diesen Experimenten 36 µg/ml. Das Ergebnis des Agarplatten-Assay des entsalzten Peptidgemisches resultierte in Inhibitionszonen mit einem Durchmesser von 20 mm (Abb. 20A). Die Durchmesser der Inhibitionszonen von bekannten Ampicillinkonzentrationen (5, 10 und 20 µg/mL) wurden als Referenzen für die antibakterielle Aktivität verwendet. Die antibakterielle Aktivität des entsalzten *Onchocerca ochengi* Peptidgemisches entsprach einer Ampicillinkonzentration von 15 µg/ml (Abb. 20A und B).

## Ergebnisse



**Abbildung 20:** Zeigt die Resultate des bakteriziden LB-Agarplatten-Assay des entsalzten Peptidgemisches. Die antibakterielle Aktivität wurde gegenüber BL21 Star<sup>TM</sup> (DE3) *E.coli* Zellen bestimmt. **A:** Agarplatten-Assay des entsalzten *Onchocerca ochengi* Peptidgemisches (d, in rot dargestellt), die Probe zeigte eine Inhibitionszone von 20 mm Durchmesser. **B:** Die Bestimmung der antibakteriellen Wirksamkeit der entsalzten Peptidfraktion basierte auf den Durchmessern der Inhibitionszonen von 5, 10, und 20 µg/mL Ampicillin. Eine daraus ermittelte Standardgerade wurde benutzt um die antibakterielle Wirksamkeit der Peptidproben zu bestimmen. Die antibakterielle Wirksamkeit dieser Fraktion entspricht einer Ampicillinkonzentration von ca. 15 µg/mL.

Anschließend wurden die 45 RPC Fraktionen mit dem LB-Agarplatten-Assay auf ihre antibakteriellen Eigenschaften untersucht. Zehn der 45 RPC Fraktionen zeigten einen antibakteriellen Effekt, mit korrespondierenden Ampicillinkonzentrationen zwischen 5,5 und 12 µg/mL (Tabelle 10). Vier dieser zehn Fraktionen enthielten je ein Peptid, dem die antibakterielle Aktivität eindeutig zugeordnet werden konnte: **SELMRPQIRN**, **DGGDEEGNDENEDVPRGSF**, **KVDGPAFRKAIEPVVKANPAFA** und **VCPANWQPGSET**. Weitere Untersuchungen dieser vier Peptide zeigten, dass **KVDGPAFRKAIEPVVKANPAFA** nicht aus dem proteolytischen Abbau eines bekannten Vorläuferproteins stammte. Die übrigen sechs RPC Fraktionen, die einen antibakteriellen Effekt zeigten, enthielten insgesamt 15 Peptide mit einer potenziellen antibakteriellen Funktion. Zehn dieser fünfzehn Peptide stammten aus dem proteolytischen Abbau von Vorgängerproteinen und fünf Peptide wurden bisher noch nicht beschrieben (Tabelle 8 und 9). Fraktion 37 beinhaltet 4 Peptide und besaß die stärkste absolute antibakterielle Wirksamkeit innerhalb der 10 RPC Fraktionen. Die 10 RPC Fraktionen mit einer antibakteriellen Aktivität enthielten insgesamt 19 Peptide mit einer potenziellen antibakteriellen Wirksamkeit. Die Peptidkonzentration,

## Ergebnisse

Zusammensetzung, sowie die absolute und relative antibakterielle Aktivität jeder Fraktion mit einem antibakteriellen Effekt ist in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tabelle 10:** Identifizierte Peptide aus den RPC Fraktionen, die eine antibakterielle Aktivität aufweisen, wobei der absolute und der relative Effekt der Peptide aufgelistet ist.

Rangfolge	RPC Fraktion	Peptide	Antibakterielle Aktivität äquivalent zu Amp (µg/mL) 100%= 20 µg/mL Amp	Peptid Konzentration RPC Fraktion (µg/mL)	Relativer Effekt
1	37	VENSPDTLLIVSNPVDVLT, GKHTIFGRVVG, GITWAKDTLFIYLENPK, LFAEGVVKREDLFI	12 (60 %)	0,4	30
2	16	IKPEVKESKEYFGKH, KMAIKLKP	9,5 (47,5 %)	0,5	19
3	18	AVRNVNEQIGPA, MEKQENFIEIAKSKDVEVLS	8,5 (42,5 %)	0,1	85
4	34	SELMRPQIRN	11 (55 %)	0,9	12
5	44	DGGDEEGGNDENEDVPRGSF	8,5 (42,5 %)	0,6	14
6	23	LDQAPSHCL, LAKVIHDKFG, RAPLEYN			
7	19	RQKSQQIQAIM, VGLLTLGCLEVLV	7 (35 %)	0,4	18
8	14	KVDGPAFRKAIEPVVKANPAFA	7 (35 %)	0,4	18
9	11	VCPANWQPGSET	6 (30 %)	0,6	10
10	17	MVFSGFCA, QRDEREIPP	5,5 (27,5 %)	0,4	14

Bei einem zusätzlichen Experiment wurde die entsalzte Peptidfraktion auf eine potenzielle Aktivität mit dem [<sup>3</sup>H]-Hypoxanthin-Assay [104] gegenüber dem *Plasmodium falciparum* 3D-7 Stamm getestet. Dabei konnte eine Aktivität gegen den Malariaparasiten in dieser Fraktion beobachtet werden. Es ist davon auszugehen, dass neben den Peptiden mit einer antibakteriellen Wirksamkeit auch antiplasmodiale Peptide in den ESPs von *Onchocerca ochengi* enthalten sind.

### 4.5 ESP-Proteine von *Onchocerca volvulus*

Der humanpathogene Parasit *Onchocerca volvulus* ist ein naher Verwandter von *Onchocerca ochengi*. Wie zuvor beschrieben, besitzen diese Parasiten die Fähigkeit

## Ergebnisse

das Immunsystem des Wirts zu modulieren. Die Regulation wird vor allem durch Moleküle der Helminthen ESPs hervorgerufen. Dabei sind Proteine von Bedeutung, die die Funktion von Proteinen des Immunsystems nachahmen oder Proteine, die als Antigene wirken, aber eine bisher noch nicht näher beschriebene Funktion auf das Immunsystem des Wirts haben. Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von **Prof. Eva Liebau** vom Institut für Zoophysiologie der Universität Münster, wurden von **Irene Ajonina** klonierte ESP Proteinkonstrukte verwendet. Dabei wurde der Ov7 ORF ohne Signalpeptid in einen pJC20 Vektor (ATCC, USA) mit einer N-terminalen Linkerregion, FaktorXa Schnittstelle und einem hexa His-Tag kloniert. Die ORFs von Ov103, MIF-1 und RAL-2 ohne Signalpeptid wurden jeweils in einen pJC40 Plasmid (ATCC, USA) mit einer N-terminalen Linkerregion, FaktorXa Schnittstelle und einem deka His-Tag kloniert. Mit dem online Programm *Protein calculator* v3.3 ([www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html](http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html)) wurde das MW, der theoretische pI und der molare Extinktionskoeffizient ( $\epsilon$ ) der ESP Proteine bestimmt

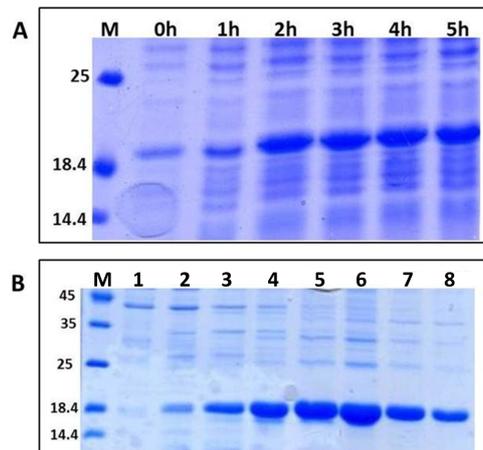
### 4.6 Onchocystatin (Ov7)

#### 4.6.1 Expression und Reinigung

Bei Onchocystatin handelt es sich um ein homologes Protein zu Cystatinen aus dem humanen Immunsystem, die in der Lage sind Cysteinproteasen zu inhibieren.

Das Protein wurde in BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3) *E.coli* Zellen (Life technologies, USA) heterolog exprimiert. Die Expression wurde in LB Medium mit 50  $\mu\text{g/mL}$  Ampicillin durchgeführt. Sobald das Bakterienwachstum eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,5 bis 0,8 erreicht hatte wurde die Zellkultur mit 1 mM IPTG induziert und für 4 h bei 37 °C oder un bei 18 °C exprimiert. Onchocystatin wurde nach dem Zellaufschluss mit einer Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS PAGE untersucht.

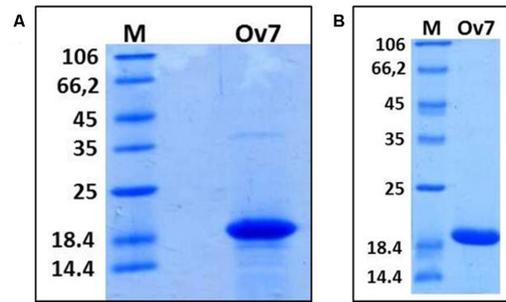
## Ergebnisse



**Abbildung 21:** SDS Gel eines Expressionsprofils von Ov7 in BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3) *E. coli* Zellen und der Reinigung von Ov7 mit Ni-NTA Matrix. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. **A:** Expressionsprofil von Ov7, M = Proteinmarker (MW in kDa), Auftragung 0 h (vor Induktion mit 1 mM IPTG) bis 5 h. Zunahme der Proteinbande für Ov7 18,5 kDa über die Zeit. **B:** Reinigung von Ov7 6x His-tag mit Ni-NTA Matrix, M = Proteinmarker (MW in kDa), 1 (20 mM Imidazol), 2 (30 mM Imidazol), 3 (50 mM Imidazol), 4 (75 mM Imidazol), 5 (100 mM Imidazol), 6 (200 mM Imidazol), 7 (300 mM Imidazol), 8 (500 mM Imidazol).

Ov7 eluierte bei Imidazolkonzentrationen zwischen 75 mM und 500 mM, wobei in diesen Fraktionen auf dem SDS Gel Kontaminationen mit *E. coli* Proteinen erkennbar waren (Abb. 21B). Daher wurde ein weiterer Reinigungsschritt in Form einer Kationenaustauschchromatographie mittels einer MonoS HR 5/5, 1 mL Kationenaustauschsäule (GE Healthcare, UK) eingeführt. Die Probenvorbereitung und die Durchführung dieses Reinigungsschrittes sind im Kapitel 3.2.12.1 beschrieben. SDS Gele von Proben nach der Kationenaustauschsäule zeigten, dass ein Großteil der *E. coli* Verunreinigungen entfernt werden konnte (SDS Gel Abb. 22A). Eine minimale Kontamination bei 37 kDa war auf einem SDS Gel erkennbar. Um diese und möglicherweise aggregiertes Onchocystatin zu entfernen wurde eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 75 16/60, 120 mL Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, UK) durchgeführt. Die Probenvorbereitung und die Durchführung dieses Reinigungsschrittes ist im Kapitel 3.2.13 beschrieben. Zur Analyse der Reinheit von Onchocystatin nach der Gelfiltrationssäule wurden Fraktionen mittels SDS PAGE untersucht.

## Ergebnisse

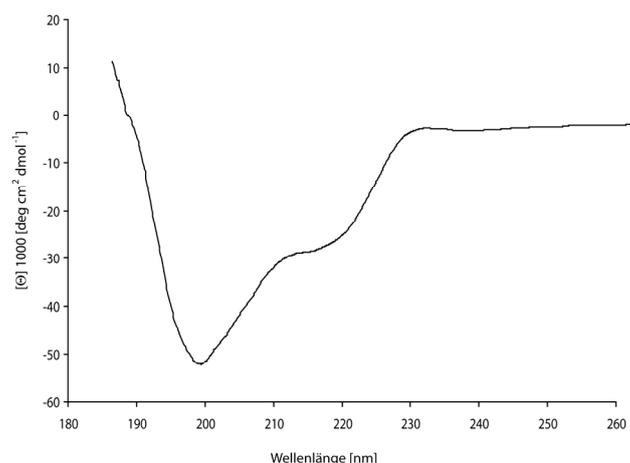


**Abbildung 22:** **A:** SDS Gel nach der Reinigung von Ov7 mit der MonoS HR 5/5, 1 mL Kationenaustauschsäule (GE Healthcare, UK). **B:** SDS PAGE der anschließenden Gelfiltration mit der Superdex 75 16/60 120 mL Säule (GE Healthcare, UK). Das SDS Gel wurde mit Coomassie gefärbt. M = Proteinmarker (MW in kDa), Ov7 A = Pool nach der Reinigung mit der Kationenaustauschsäule. Ov7 B = Pool nach der Reinigung der Gelfiltrationssäule.

Da keine Verunreinigungen nach dem Gelfiltrationslauf auf dem SDS Gel zu erkennen waren (Abb. 22B), konnte Ov7 für weitere Analysen verwendet werden.

### 4.6.2 Biophysikalische und biochemische Charakterisierung von Ov7

Onchocystatin wurde wie in Kapitel 3.2.16 dargestellt für die CD-Experimente vorbereitet. Die Proteinkonzentration für die CD-Messungen lag bei 400  $\mu\text{g/mL}$ . Die Messungen wurden am J-815 CD Spektrometer (Jasco, UK) in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 260 nm durchgeführt. Für die Experimente wurden 200  $\mu\text{L}$  der Ov7 Proteinlösung in eine 1 mm Quarzküvette (Hellma, Deutschland) überführt und Spektren mit 15 Wiederholungen gemessen. Spektren des Messpuffers (20 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  pH 7,5) wurden mit 5 Wiederholungen gemessen und vom Proteinsignal abgezogen. Das Ergebnis wurde in molarer Elliptizität angegeben.

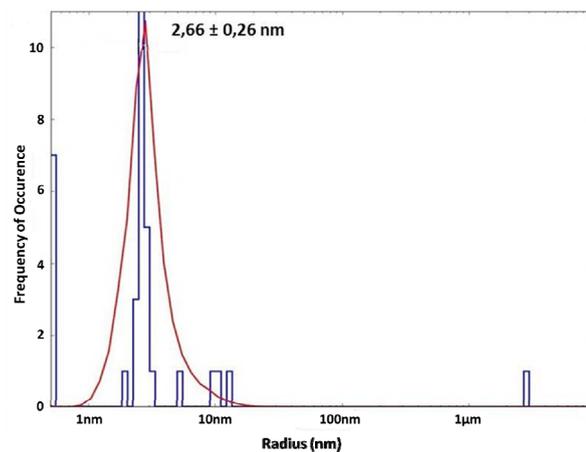


**Abbildung 23:** CD-Messungen von Ov7 nach der Reinigung des Proteins. Auftragung der Wellenlänge in nm gegen die molare Elliptizität  $[\theta] 1000 [\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}]$ . Das OV7 CD-Spektrum zeigt ein breites Minimum mit zwei negativen Peaks bei  $\sim 218 \text{ nm}$  und  $\sim 200 \text{ nm}$ .

## Ergebnisse

Durch die CD-Messungen konnte nachgewiesen werden, dass Ov7 nach den drei Reinigungsschritten gefaltet vorlag. Die CD Spektren des Proteins zeigten, dass sich die Sekundärstruktur aus einer Mischung zwischen  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblättern und *random coiled* Strukturen zusammensetzte. Wobei *Loop* und *random coiled* Regionen zu dominieren schienen.

Vor Kristallisationsversuchen von Onchocystatin, wurde die Dispersität der Proteinlösung mit dem DLS Gerät SpectroSIZE 300 (Nabitec, Deutschland) überprüft. Vor den Messungen wurde das Protein gegen 3 L 20 mM Tris pH 7,0; 20 mM NaCl dialysiert und anschließend für 30 min bei 4 °C und 16.100 x g zentrifugiert. Zusätzlich wurde die Proteinlösung mit einem UFC40GV0S Ultrafree Zentrifugenfilter (0,22  $\mu$ m) (Merck Millipore, USA) filtriert. Für die DLS-Messungen wurden 20  $\mu$ L der konzentrierten Proteinlösung (18 mg/mL) in eine Quarzküvette eingesetzt. Wobei eine monodisperse Proteinlösung hergestellt werden konnte (Abbildung 24).



**Abbildung 24:** Histogramm der DLS-Messung von Ov7. Die Proteinlösung ist monodispers und die Proteine lagen mit einem hydrodynamischen Radius von  $2,66 \pm 0,26$  nm vor.

Das Protein lag auch in hoher Konzentration (18 mg/mL) monodispers vor, mit einem hydrodynamischen Radius der Moleküle von  $2,66 \pm 0,26$  nm. Anschließend wurden initiale Kristallisationsbedingungen für Ov7 gesucht. Für Ov7 wurden 576 Kristallisationsbedingungen mit den kommerziellen Screenings JSCG+, Classic, Cryos, ComPAS (Quiagen, Deutschland) und Pact *premier*<sup>TM</sup>, Stura Foodprint<sup>TM</sup> (Molecular Dimensions, UK) getestet. Die Kristallisationsansätze wurden mit dem Pipettierroboter Honeybee 961 (Genomic Solutions, USA) wie in Kapitel 3.2.19.1 beschrieben pipettiert und bei RT inkubiert. Die Kristallisationsbedingungen bei

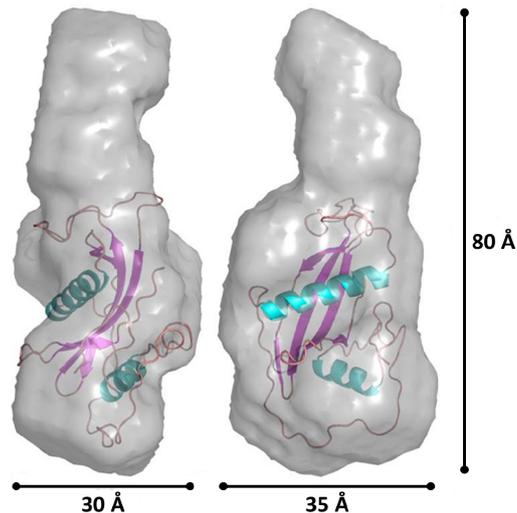
## Ergebnisse

denen Kristalle wuchsen wurden hinsichtlich ihrer Proteinkonzentration, Präzipitantenkonzentration, Kristallisationstechnik und Temperatur variiert.

### 4.6.3 Struktur von Ov7 in Lösung

Die Ergebnisse der DLS-Messungen von Ov7, bezüglich des hydrodynamischen Radius des Proteins, ließen darauf schließen, dass das Protein in Lösung als Dimer vorliegt. Um diese Beobachtungen weiter zu untersuchen, wurden SAXS-Experimente für das Protein an dem Messplatz X33 (Hasylab/EMBL, DESY) mit einem 1M Pilatus Detektor, einer Proben-Detektor Distanz von 2,7 m und einer Wellenlänge von  $\lambda = 1,5 \text{ \AA}$  durchgeführt. Ov7 wurde wie zuvor beschrieben exprimiert, gereinigt und gegen 20 mM Tris pH 7,0; 20 mM NaCl bei 6 °C und dialysiert. Danach wurde die Proteinlösung für 1 h bei 4 °C und 16.100 x g zentrifugiert und anschließend mit einem UFC40GV0S Ultrafree Zentrifugenfilter (0,22  $\mu\text{m}$ ) (Merck Millipore, USA) filtriert. Die Monodispersität der Proben wurde mittels DLS-Messungen überprüft. Für die SAXS-Experimente wurden vier Proteinlösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen (2,5 - 7,3 mg/mL) vorbereitet. Um Strahlungsschäden am Protein während der Messung zu kontrollieren, wurden acht aufeinanderfolgende Messungen mit einer Dauer von fünfzehn Sekunden miteinander verglichen. Dabei konnte keine signifikante Veränderung beobachtet werden. Die Beugung des Proteinpuffers wurde von den Proteinspektren abgezogen und die resultierenden Kurven entsprechend der Proteinkonzentration skaliert. Die Daten bei niedrigen Winkeln wurden zu unendlicher Verdünnung extrapoliert und mit den Daten der höheren Konzentrationen vereint, um die finale Kompositbeugungskurve zu erhalten. Ein MW  $16 \pm 2 \text{ kDa}$  der Moleküle in der Lösung wurde ermittelt und deutete darauf hin, dass Ov7 in Lösung als Monomer vorliegt. Das Programm GNOM [88] wurde benutzt um aus den experimentellen Rohdaten den Trägheitsradius ( $R_g$ ) von  $\sim 2,28 \pm 5 \%$  und die maximale Größe des Partikels ( $D_{\text{max}}$ ) von  $74 \pm 7 \text{ \AA}$  zu ermitteln. DAMMIF [91] wurde verwendet um die *ab initio* Hüllstruktur zu berechnen, die die Ausmaße  $80 \times 35 \times 30 \text{ \AA}$  hatte und auf eine langgestreckte Struktur des Moleküls hinwies. In Abbildung 25 wurde ein Homologiemodell von Ov7 mit dem Programm I-TASSER [107] erstellt und mit dem Ov7 SAXS Model überlagert.

## Ergebnisse



**Abbildung 25:** *Ab initio* Modell von Ov7 überlagert mit einem Ov7 Strukturmodell, generiert mit I-TASSER [107]. Das *ab initio* Modell hat eine Breite von ca. 30 Å, 35 Å und eine Länge von ca. 80 Å. Das Homologiemodell ließ sich mit guter Übereinstimmung mit dem SAXS Modell überlagern. Lediglich am N-Terminus weist das SAXS Modell eine Volumenvergrößerung auf, dass durch die Linkerregion, FaktorXa Schnittstelle und hexa His-Tag des Proteins gebildet wird.

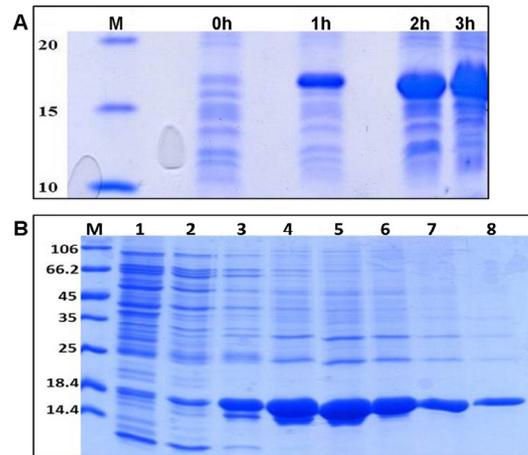
## 4.7 Mikrofilarien Oberflächengebundenes Antigen (Ov103)

### 4.7.1 Expression und Reinigung

Ov103 besitzt keine homologe Sequenz zu Proteinen aus dem humanen Immunsystem. Es ist vor allem auf der Oberfläche der migrierenden Mikrofilarien von *Onchocerca volvulus* zu finden.

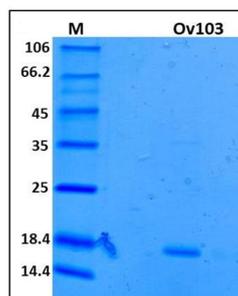
Ov103 wurde in BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3) *E.coli* Zellen (Life technologies, USA) heterolog exprimiert. Die Expression wurde in LB Medium mit 50 µg/mL Ampicillin durchgeführt. Wenn die Bakterienkultur einen OD<sub>600</sub> Wert von 0,6 erreicht hatte, wurde mit 1 mM IPTG induziert und für 3 h bei 37 °C exprimiert. Bei einer Expressionsdauer länger als 3 h wurden Abbauprodukte des Proteins auf der SDS PAGE nachgewiesen. Nach dem Zellaufschluss wurde Ov103 mit einer Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS PAGE untersucht.

## Ergebnisse



**Abbildung 26:** SDS Gel eines Expressionsprofils von Ov103 in BL21 Star™(DE3) *E.coli* Zellen und der Reinigung von Ov103 mit einem Dekahistidin-Tag und Ni-NTA Matrix. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. **A:** Expressionsprofil von Ov103, M = Proteinmarker (MW in kDa), Auftragung 0 h (vor Induktion mit 1 mM IPTG) bis 3 h. Zunahme der Proteinbande für Ov103 bei 17 kDa über 3 h Expression. **B:** Reinigung von Ov103 Dekahistidin-Tag mit Ni-NTA Matrix, M = Proteinmarker (MW in kDa), 1 (10 mM Imidazol), 2 (20 mM Imidazol), 3 (50 mM Imidazol), 4 (75 mM Imidazol), 5 (100 mM Imidazol), 6 (200 mM Imidazol), 7 (300 mM Imidazol), 8 (500 mM Imidazol).

Ov103 eluierte bei Konzentrationen zwischen 50 mM und 500 mM Imidazol, wobei zwischen 75 mM und 200 mM die größten Proteinmengen detektiert wurden. Auf dem SDS Gel nach der Reinigung mit Ni-NTA Agarose waren Kontaminationen mit *E.coli* Proteinen erkennbar (Abb. 29B). Aus diesem Grund wurde ein weiterer Reinigungsschritt in Form einer Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 75 16/60, 120 mL Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, UK) durchgeführt. Die Proteinvorbereitung und die Durchführung dieses Reinigungsschrittes ist in Kapitel 3.2.13 beschrieben. Zur Analyse der Reinheit von Ov103 nach diesem Reinigungsschritt wurden Fraktionen der Proteinpeaks des Gelfiltration Chromatogramms mittels SDS PAGE untersucht.



**Abbildung 27:** SDS PAGE nach einer Größenausschlusschromatographie mit Ov103, die Gelfiltrationsläufe wurden mit einer Superdex 75 16/60 120 mL Säule (GE Healthcare, UK) durchgeführt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. M = Proteinmarker (MW in kDa), Ov103 = vereinigte Peakfraktionen nach der Gelfiltration.

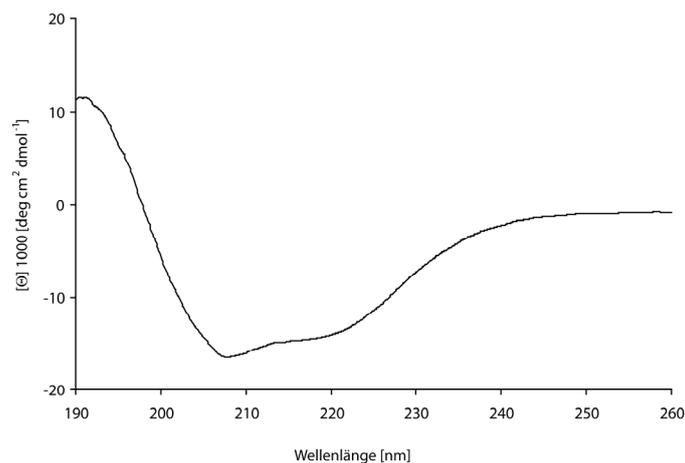
Da keine Verunreinigungen nach dem Gelfiltrationslauf auf dem SDS Gel zu

## Ergebnisse

erkennen waren (Abb. 27), konnte Ov103 für weitere Experimente verwendet werden.

### 4.7.2 Biophysikalische und biochemische Charakterisierung von Ov103

Nach der Reinigung wurde Ov103 gegen 3 L 20 mM  $K_2HPO_4$  pH 7,5; 20 mM NaCl dialysiert. Im Anschluss wurde Ov103 wie in Kapitel 3.2.16 beschrieben für die CD-Experimente vorbereitet. Die Proteinkonzentration lag für die Versuche bei 300  $\mu\text{g/mL}$ . Die CD-Messungen wurden am J-815 CD Spektrometer (Jasco, UK) in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 260 nm durchgeführt. Für die Messungen wurden 200  $\mu\text{L}$  der Proteinprobe in einer 1 mm Quarzküvette (Hellma, Deutschland) mit 15 Wiederholungen gemessen. Der korrespondierende Messpuffer wurden mit 5 Wiederholungen gemessen und vom Proteinsignal abgezogen, das Ergebnis wurde in molarer Elliptizität angegeben.



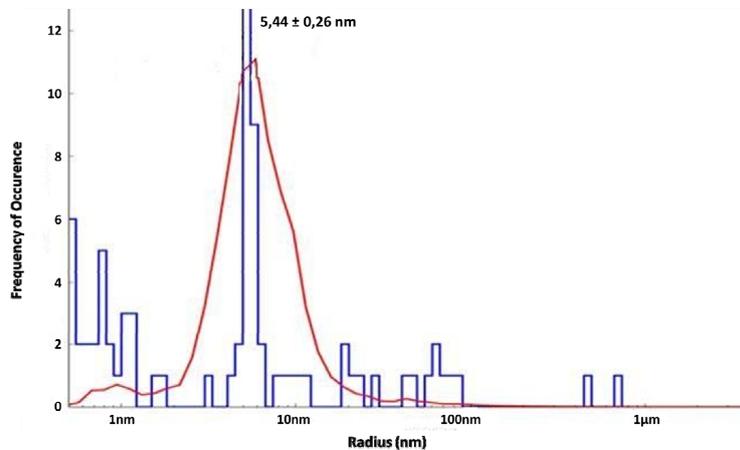
**Abbildung 28:** CD-Spektrum von Ov103, Auftragung der Wellenlänge in nm gegen die molare Elliptizität  $[\theta] 1000$  [ $\text{deg cm}^2 \text{ d mol}^{-1}$ ]. Das Ov103 CD Spektrum zeigt ein breites Minimum mit zwei negativen Peaks bei  $\sim 209$  nm und  $\sim 220$  nm.

Die Resultate der CD-Messungen von Ov103 zeigten, dass das Protein nach der Reinigung gefaltet vorlag. Das CD-Spektrum zeigte weiterhin, dass sich die Sekundärstruktur von Ov103 wahrscheinlich aus einer Mischung zwischen  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblättern und *random coiled* Strukturen zusammensetzt.

Vor initialen Kristallisationsversuchen von Ov103, wurde die Dispersität der Proteinlösung mittels DLS überprüft. Für die Messungen wurde das Protein gegen 20 mM Tris pH 7,0; 100 mM NaCl im Kaltraum bei 6 °C  $\ddot{u}$ n dialysiert und anschließend für 30 min bei 4 °C und 16.100 x g zentrifugiert. Die Proteinlösung

## Ergebnisse

wurde auf 25 mg/mL konzentriert und 20  $\mu$ L der Proteinlösung wurden in eine Quarzküvette überführt. Die Messungen zeigten einen hydrodynamischen Radius der Moleküle von  $5,4 \pm 0,26$  nm (Abb. 29).



**Abbildung 29:** Histogramm der DLS-Messung von Ov103. Das Histogramm der Proteinlösung zeigt einen breiten Peak bei einem hydrodynamischen Radius von  $5,4 \pm 0,26$  nm.

Um initiale Kristallisationsbedingungen für Ov103 zu finden wurden Screenings durchgeführt, die bis zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit leider keine Kristalle generierten.

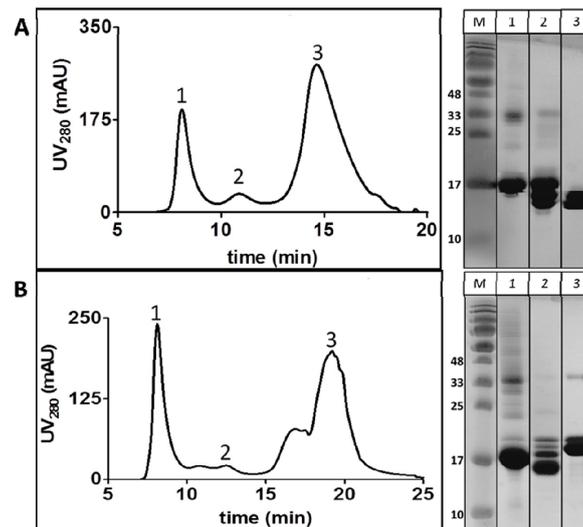
### 4.7.3 DARPin Selektion

Zur Unterstützung der Kristallisation von Ov103 wurde eine Darpinselektion an der Universität Zürich durchgeführt. Im Rahmen des *Pcube* Projektes der EU konnten diese Experimente in der Arbeitsgruppe von **Prof. Markus Grütter** unter Anleitung von **Dr. Heidi Roschitzki-Voser** durchgeführt werden. Die ersten Schritte der DARPin Selektion wurden von **Dr. Heidi Roschitzki-Voser** und **Reto Zbinden** in Zürich durchgeführt. Für die Selektion von stark bindenden DARPins wurde das Prinzip des *ribosome display* verwendet. Dafür musste Ov103 biotinyliert werden, um mit Streptavidin auf ELISA Platten immobilisiert zu werden. Um starke Binder zu selektieren, wurde das Protein nun mit mRNA-Ribosom-DARPin Komplexen behandelt. Dabei wurden die interagierenden DARPins über ELISA nachgewiesen, dass am Ende 30 potenzielle DARPins für Ov103 selektiert werden konnten. Der ORF der selektierten DARPins wurde in pQE30 Plasmide, mit einem N-terminalen hexa His-Tag kloniert. Das Molekulargewicht der selektierten DARPins lag zwischen 17 und 19 kDa. In Abbildung 1 des Anhangs sind die Proteinparameter und ein

## Ergebnisse

Sequenzvergleich der selektierten DARPins zusammengefasst. Die DARPins wurden in XL1-Blue oder XL10-Gold *E.coli* Stämmen (beide Stratagene, USA) in einem Autoinduktionsmedium exprimiert. Das Medium enthielt 50 µg/mL Ampicillin und die Expressionsdauer betrug 18 h bei 37 °C. Nach dem Zellaufschluss wurden die DARPins mit einer Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proteine eluierten bei einer Konzentration von 250 mM Imidazol. Um vorhandene *E.coli* Verunreinigungen und möglicherweise aggregierte DARPins zu entfernen wurde das Protein über eine Grössenausschlusschromatographie unter Verwendung einer Superdex 75 16/60 120 mL Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, UK) abgetrennt. Auf der Grundlage dieser Chromatogramme wurden die DARPins für weitere Experimente ausgesucht. Die Chromatogramme der DARPIn Gelfiltrationsläufe sind in Abbildung 2 des Anhangs dargestellt. Aus insgesamt 30 DARPins wurden 12 ausgewählt um Komplexe mit Ov103 zu bilden. Zur Bildung des Komplexes wurden Ov103 und die 12 DARPins wie zuvor beschrieben exprimiert und gereinigt. Beide Proteine wurden gegen PBS Puffer pH 7,4 dialysiert und anschließend für 30 min bei 4 °C und 10.000 x g zentrifugiert. Ov103 wurde mit dem jeweiligen DARPIn in einem Konzentrationsverhältnis von 1:1 für 1 h auf Eis inkubiert. Die Komplexbildung wurde über eine Superdex 75 16/60 120 mL Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, UK) verifiziert und überschüssige Monomere des Proteins wurden abgetrennt. Die Komplexbildung wurde durch das Auftreten eines zusätzlichen dritten Peaks im Chromatogramm beobachtet. Die Chromatogramme der Gelfiltrationsläufe für die 12 DARPIn+Ov103 Komplexe sind im Anhang in Abbildung 3 gezeigt. Zur Analyse der Komplexbildung wurden die Proteinpeaks der Gelfiltration Chromatogramme mittels SDS PAGE untersucht.

## Ergebnisse



**Abbildung 30:** Bildung von Ov103 DARPin Komplexen mit den DARPins n3 und o8. Die Bildung der Komplexe wurde über das Auftauchen eines zusätzlichen dritten Peaks nach der Gelfiltration beobachtet. Proben dieser Peaks wurden mittels SDS PAGE untersucht. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. **A:** Chromatogramm der Gelfiltration von Ov103 und DARPin n3, mit dem dazugehörigen SDS Gel der Peakfraktionen. M = Proteinmarker (MW in kDa), 1 = Ov103, 2 = Ov103 + n3, 3 = n3. DARPin n3 läuft etwas unter dem MW von Ov103, beide Proteine sind in Peak 2 zu finden. **B:** Chromatogramm der Gelfiltration von Ov103 und DARPin o8, mit dem dazugehörigen SDS Gel der Peakfraktionen. M = Proteinmarker (MW in kDa), 1 = Ov103, 2 = Ov103 + o8, 3 = o8. DARPin o8 läuft etwas über dem MW von Ov103, beide Proteine sind in Peak 2 zu finden.

Die Ergebnisse der SDS PAGE nach den Gelfiltrationsläufen zeigten, dass Ov103 mit den DARPins **n3** und **o8** interagiert. Allerdings war Ov103 während dieser Experimente aggregiert. Dies erklärt auch den großen Abstand zwischen den Elutionsvolumen von Ov103 und den DARPins auf dem Chromatogramm, obwohl das Molekulargewicht der Proteine nahezu identisch war. Dennoch kam es zur Interaktion zwischen Ov103 und den DARPins, wie in Abbildung 32A und B zu erkennen ist. Die Ov103+n3 und Ov103+o8 Peakfraktionen wurden jeweils vereinigt und mit einem Amicon MW cut-off von 3.000 Da (Millipore, USA) auf 6 mg/mL konzentriert. Um initiale Kristallisationsbedingungen zu finden wurden Kristallisationsscreenings mit diesen Fraktionen durchgeführt.

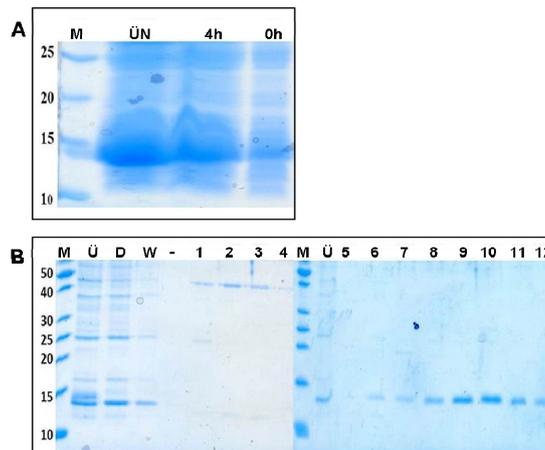
## 4.8 Makrophagen Migration inhibierender Faktor 1 (MIF-1)

### 4.8.1 Expression und Reinigung

Bei diesem Protein handelt es sich um ein homologes Protein zum humanen MIF des Immunsystems. Diese Proteine besitzen eine Disulfidreduktase und eine Phenylpyruvat Tautomerase Aktivität. MIF reguliert die Makrophagenaktivität während der Immunantwort.

## Ergebnisse

MIF-1 wurde in BL21 (DE3) *E. coli* Zellen (Stratagene, USA) heterolog exprimiert. Die Expression wurde in LB Medium mit 50 µg/mL Ampicillin durchgeführt. Nach Erreichen eines OD<sub>600</sub> Wert von 0,8 in der Bakterienkultur wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Bei einer Expressionsdauer länger als 4 h wurden Abbauprodukte des Proteins mittels SDS PAGE nachgewiesen. Nach dem Zellaufschluss wurde MIF-1 mit einer Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt. Zur Analyse der Reinheit des Proteins wurden SDS PAGE Läufe durchgeführt.

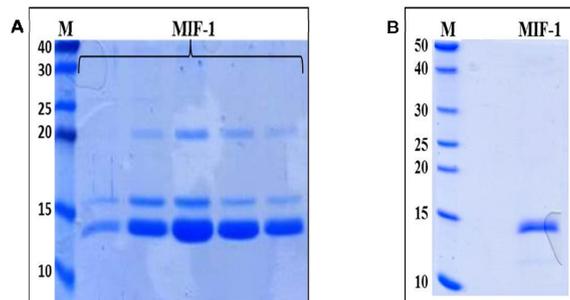


**Abbildung 31:** SDS PAGE eines Expressionsprofils von MIF-1 in BL21 (DE3) *E. coli* Zellen und der Reinigung von MIF-1 mit einem Dekahistidin-Tag und Ni-NTA Agarose. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. **A:** Expressionsprofil von MIF-1, M = Proteinmarker (MW in kDa), Auftragung 0 h (vor Induktion mit 1 mM IPTG) bis ün. Eine Zunahme der Proteinbande für MIF-1 bei 12 kDa ist zu beobachten. **B:** Reinigung von MIF-1 mit Ni-NTA Matrix, M = Proteinmarker (MW in kDa), Ü (Überstand), D (Durchlauf), W (Waschschritt), 1 (10 mM Imidazol), 2 (20 mM Imidazol), 3 (30 mM Imidazol), 4 (50 mM Imidazol), 5 (75 mM Imidazol), 6 (100 mM Imidazol), 7 (125 mM Imidazol), 8 (150 mM Imidazol), 9 (200 mM Imidazol), 10 (300 mM Imidazol), 11 (400 mM Imidazol), 12 (500 mM Imidazol).

MIF-1 eluierte bei Imidazolkonzentrationen zwischen 100 mM bis 500 mM, siehe Abbildung 36B. Wurden diese Fraktionen konzentriert und erneut mittels SDS PAGE untersucht, zeigten sich Kontaminationen mit *E. coli* Proteinen. Um diese Verunreinigungen zu entfernen wurde ein weiterer Reinigungsschritt in Form einer Anionenaustauschchromatographie etabliert. Für diesen Reinigungsschritt wurde eine UnoQ-6 12 x 53 mm, 6 mL Anionenaustauschsäule (BIORAD, USA) benutzt. Die Protein Vorbereitung und die Durchführung dieses Reinigungsschrittes sind im Kapitel 3.2.12.2 beschrieben. Zur Analyse der Reinheit von MIF-1 wurden Fraktionen der Proteinpeaks des Chromatogramms erneut mittels SDS PAGE untersucht. Nach der Anionenaustauschchromatographie reduzierten sich die Verunreinigungen auf

## Ergebnisse

die Proteinkontaminanten bei 16 und 22 kDa (Abb. 32A). Um diese Verunreinigungen und möglicherweise aggregiertes Protein von MIF-1 zu trennen, wurde eine Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 75 16/60, 120 mL Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, UK) durchgeführt. Die Proteinvorbereitung und die Durchführung dieses Reinigungsschrittes ist im Kapitel 3.2.13 beschrieben. Zur Analyse der Reinheit von MIF-1 wurden Fraktionen der Proteinpeaks des Chromatogramms mittels SDS PAGE untersucht.



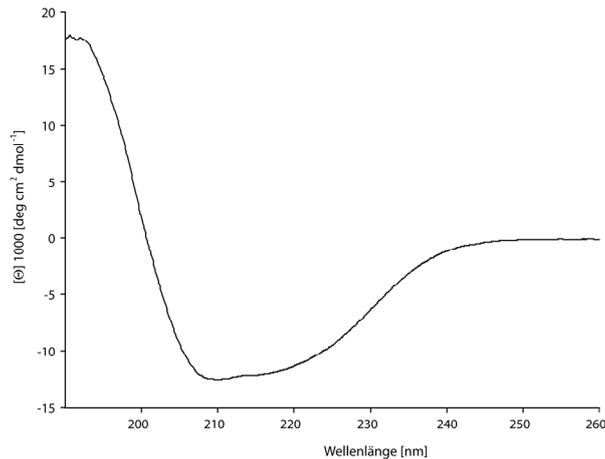
**Abbildung 32:** SDS PAGE nach der Reinigung von MIF-1 mit der UnoQ-6 12 x 53 mm, 6 mL Anionenaustauschsäule (BIORAD, USA) und anschließender Gelfiltration mit der Superdex 75 16/60 Säule (GE Healthcare, UK). Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. **A:** M = Proteinmarker (MW in kDa), MIF-1: Fraktionen nach der Reinigung mit der Anionenaustauschsäule. Dabei sind Kontaminationen mit *E.coli* Proteinen auf dem SDS Gel in der Höhe von 16 und 22 kDa zu erkennen. **B:** M = Proteinmarker (MW in kDa), MIF-1: vereinigte Fraktionen der Reinigung mit der Gelfiltrationssäule.

Da keine Verunreinigungen nach dem Gelfiltrationslauf auf dem SDS Gel zu erkennen waren (Abb. 32B), konnte MIF-1 für weitere Experimente verwendet werden.

### 4.8.2 Biophysikalische und biochemische Charakterisierung von MIF-1

MIF-1 wurde wie in Kapitel 3.2.16 beschrieben für die CD-Experimente vorbereitet. Die Versuche wurden mit einer Proteinkonzentration von 300 µg/mL durchgeführt. Die CD-Messungen wurden am J-815 CD Spektrometer (Jasco, UK) in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 260 nm durchgeführt. Für die Messungen wurden 200 µL der Proteinprobe in einer 1 mm Quarzküvette (Hellma, Deutschland) mit 15 Wiederholungen gemessen. Der Messpuffer wurde mit 5 Wiederholungen gemessen und vom Proteinsignal abgezogen, das Ergebnis wurde in molarer Elliptizität angegeben.

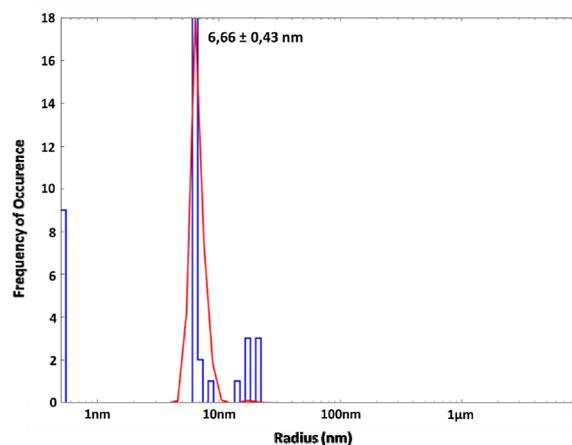
## Ergebnisse



**Abbildung 33:** CD-Spektrum von MIF-1, Auftragung der Wellenlänge in nm gegen die molare Elliptizität  $[\theta] 1000[\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}]$ . Das MIF-1 CD Spektrum zeigt ein relativ breites Minimum mit zwei negativen Peaks bei 210 nm und 218 nm.

Die Ergebnisse der CD-Messungen von MIF-1 zeigten, dass das Protein nach den drei Reinigungsschritten gefaltet vorlag. Das CD-Spektrum zeigte weiterhin, dass sich die Sekundärstruktur des Proteins wahrscheinlich aus einer Mischung von  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblättern und *random coiled* Strukturen zusammensetzt.

Vor initialen Kristallisationsversuchen von MIF-1 wurde die Dispersität der Proteinlösung mittels DLS überprüft. Vor den Messungen wurde das Protein gegen 20 mM Tris pH 7,0; 100 mM NaCl dialysiert und anschließend für 30 min bei 4 °C bei 16.100 x g zentrifugiert. Für die DLS Messungen wurden 20  $\mu\text{L}$  der Proteinlösung (25 mg/mL) in eine Quarzküvette überführt. Die Messung zeigte einen hydrodynamischen Radius der Moleküle von  $6,66 \pm 0,43 \text{ nm}$  (Abb. 34).



**Abbildung 34:** Histogramm der MIF-1DLS-Messung. Die Proteinlösung ist monodispers, aber der hydrodynamische Radius des Proteins von  $6,66 \pm 0,43 \text{ nm}$  ist relativ groß. Es ist davon auszugehen, dass MIF-1 Polymere bildet.

## Ergebnisse

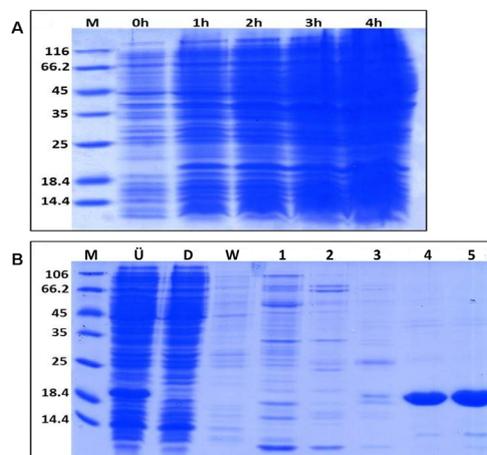
Im Anschluss wurden Kristallisationsscreenings durchgeführt um die initialen Kristallisationsbedingungen für MIF-1 zu finden, die bis zum Zeitpunkt leider keine Kristalle generierten.

### 4.9 Immundominantes hypodermales Antigen (RAL-2)

#### 4.9.1 Expression und Reinigung

Das Protein besitzt keine Homologie zu Proteinen aus dem humanen Immunsystem, ist aber bei weiblichen und männlichen Würmern, sowie den Mikrofilarien in hohen Mengen in der Hypodermis zu finden.

RAL-2 wurde in BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3) *E.coli* Zellen (Stratagene, USA) heterolog exprimiert. Die Expression wurde in LB Medium mit 50 µg/mL Ampicillin durchgeführt. Sobald die Bakterienkultur einen OD<sub>600</sub> Wert von 0,6 erreicht hat, wurde die Expression mit 1 mM IPTG induziert und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Zellaufschluss wurde RAL-2 mit einer Ni-NTA Affinitätschromatographie gereinigt. Um die Reinheit des Proteins zu untersuchen wurden die Fraktionen mittels SDS PAGE analysiert.

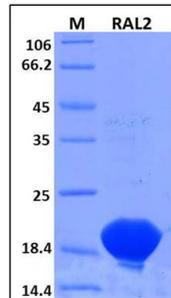


**Abbildung 35:** SDS PAGE eines Expressionsprofils von RAL2 in BL21 Star<sup>TM</sup>(DE3) *E.coli* Zellen und der Reinigung von RAL-2 mit einem Dekahistidin-Tag und Ni-NTA Matrix. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. **A:** Expressionsprofil von RAL-2 M = Proteinmarker (MW in kDa), Auftragung 0 h (vor Induktion mit 1 mM IPTG) bis 4 h. Eine Vergrößerung der RAL-2 Proteinbande bei 19 kDa konnte über 4 h beobachtet werden. **B:** Reinigung von RAL-2 mit Ni-NTA Matrix, M = Proteinmarker (MW in kDa), Ü (Überstand), D (Durchlauf), W (Waschschrift), 1 (20 mM Imidazol), 2 (50 mM Imidazol), 3 (100 mM Imidazol), 4 (200 mM Imidazol), 5 (500 mM Imidazol).

RAL-2 eluierte bei Imidazolkonzentrationen von 200 mM bis 500 mM, allerdings waren auf dem SDS Gel nach der Reinigung mit Ni-NTA Agarose Verunreinigungen mit *E.coli* Proteinen erkennbar (Abb. 35B). Um diese Kontaminationen zu entfernen wurde ein weiterer Reinigungsschritt in Form einer

## Ergebnisse

Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 75 16/60, 120 mL Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, UK) durchgeführt. Die Proteinvorbereitung und die Durchführung dieses Reinigungsschrittes ist im Kapitel 3.2.13 beschrieben. Zur Analyse der Reinheit von RAL-2 wurden Fraktionen der Proteinpeaks mittels SDS PAGE untersucht.



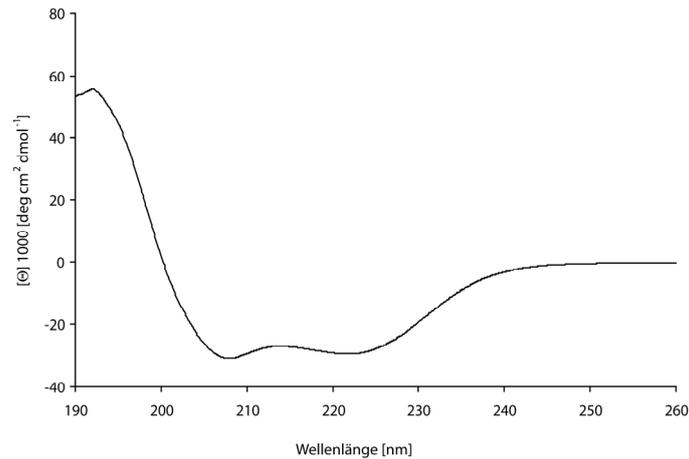
**Abbildung 36:** SDS PAGE nach Größenausschlusschromatographie von RAL2 mit der Superdex 75 16/60 120 mL (GE Healthcare, UK) Gelfiltrationssäule. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt. M= Proteinmarker (MW in kDa), RAL-2= vereinigte Peak Fraktionen nach der Reinigung mit der Gelfiltrationssäule.

Wie aus Abbildung 36 erkennbar ist, konnten die Verunreinigungen durch den Gelfiltrationslauf entfernt werden und RAL-2 konnte für weitere Experimente verwendet werden.

### 4.9.2 Biophysikalische und biochemische Charakterisierung von RAL-2

Das Protein wurde wie in Kapitel 3.2.16 beschrieben für die CD-Experimente vorbereitet. Die Versuche wurden mit einer Proteinkonzentration von 200 µg/mL durchgeführt. Die CD-Messungen wurden am J-815 CD Spektrometer (Jasco, UK) in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 260 nm durchgeführt. Für Messungen wurden 200 µL der Proteinprobe in eine 1 mm Quarzküvette (Hellma, Deutschland) pipettiert und mit 15 Wiederholungen gemessen. Der Messpuffer wurde 5x gemessen und vom Proteinsignal abgezogen, das Ergebnis wurde in molarer Elliptizität angegeben.

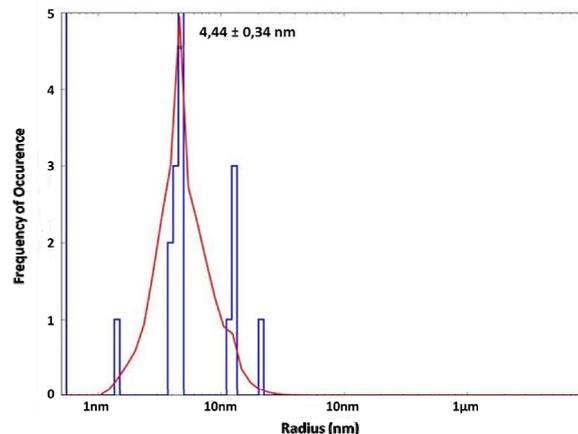
## Ergebnisse



**Abbildung 37:** CD-Spektrum von RAL2 nach der Reinigung des Proteins. Auftragung der Wellenlänge in nm gegen die molare Elliptizität  $[\theta] 1000[\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}]$ . Das RAL2 CD-Spektrum zeigt ein breites Minimum mit zwei negativen Peaks bei 208 nm und 226 nm.

Die Resultate der CD-Messungen von RAL-2 zeigten, dass das Protein nach der Reinigung gefaltet vorliegt und dass die Sekundärstruktur von  $\alpha$ -Helices dominiert wird.

Vor initialen Kristallisationsversuchen von RAL-2, wurde die Dispersität der Proteinlösung mittels DLS überprüft. Vor den Messungen wurde das Protein gegen 20 mM Tris pH 7,0; 20 mM NaCl im Kaltraum bei 6 °C ün dialysiert und anschließend für 30 min bei 4 °C bei 16.100 x g zentrifugiert, auf 20 mg/mL konzentriert. Für DLS-Messungen wurden 20  $\mu\text{L}$  in eine Quarzküvette pipettiert. Die Messungen zeigten einen hydrodynamischen Radius von  $4,44 \pm 0,34 \text{ nm}$  (Abb. 38).



**Abbildung 38:** Histogramm der DLS-Messung von RAL-2. Die Proteinlösung ist annähernd monodispers mit einem hydrodynamischen Radius von  $4,44 \pm 0,34 \text{ nm}$ .

Das Protein besitzt bei hoher Konzentration einen hydrodynamischen Radius von  $4,44 \pm 0,34 \text{ nm}$  vor. Um initiale Kristallisationsbedingungen des Proteins zu finden

## Ergebnisse

wurden 384 Kristallisationsbedingungen mit den kommerziellen Screenings JSCG+, Classic, Cryos, ComPAS (Quiagen, Deutschland) getestet. Die Kristallisationsansätze wurden mit dem Pipettierroboter Honeybee 961 (Genomic Solutions, USA) pipettiert. Die Kristallisationsansätze wurden bei RT inkubiert.

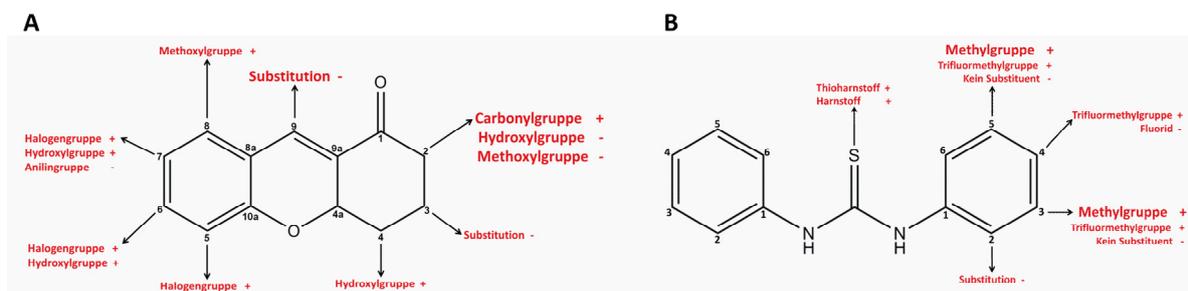
## 5 DISKUSSION

### 5.1 Identifikation potenzieller PfGST Inhibitoren

Der Malariaerreger, *Plasmodium falciparum*, entwickelt immer häufiger Resistenzen gegen Medikamente zur Prophylaxe und Behandlung der Erkrankung. Aus diesem Grund muss das Wirkstoffdesign für Leitstrukturen und Medikamente gegen Malaria stetig vorangetrieben werden [108]. Ein potenzielles Zielmolekül der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung stellt dabei die Glutathion-S-transferase von *Plasmodium falciparum* (PfGST) dar [31]. Die PfGST besitzt eine zentrale Funktion bei der Entgiftung toxischer Substanzen für *Plasmodium falciparum*. Besonders die Ausscheidung von Hämin ist hierbei hervorzuheben, da dieses Hämoglobinabbauprodukt hoch toxisch für den Parasiten ist [37, 45]. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden 59 Komponenten auf deren inhibitorische Wirkung gegenüber der PfGST getestet. Synthetisiert wurden diese Komponenten am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Institut für Organische Chemie, Arbeitskreis von **Prof. Dr. Stefan Bräse**. Bei den Versuchen wurden vor allem Xanthon- oder Thioharnstoffderivate mit einem starken inhibitorischen Effekt auf die PfGST Aktivität identifiziert. Xanthone sind sekundäre Pflanzenmetaboliten, die sich aus einem dibenzo- $\gamma$ -Pyrone Grundgerüst aufbauen. Wobei zwei aromatische Ringsysteme über einen zyklischen Ether verbunden sind [109]. Aus der Literatur ist der antiplasmodiale Effekt von Xanthonen bereits bekannt, wobei diese Verbindungen die Bildung des mindertoxischen Häminpolymers Hemozoin hemmen [110]. Die Antimalariawirkstoffe Anthraquinon und Rufigallol gehören auch zur Stoffklasse xanthonähnliche Substanzen [111, 112]. Allerdings wurde ein inhibitorischer Effekt durch diese Substanzen auf die PfGST bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beschrieben. Bei einer zweiten Gruppe potenzieller PfGST Inhibitoren handelte es sich um Thioharnstoffe. Diese Substanzen sind Harnstoffderivate, wobei der Sauerstoff durch Schwefel substituiert wurde. Aus der Literatur sind Thioharnstoffderivate mit einer Wirkung gegen den Malariaerreger bekannt [113, 114], allerdings wurde auch hier eine inhibitorische Wirkung gegen GSTs im Allgemeinen oder speziell gegen die PfGST bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht konkret

## Diskussion

beschrieben. Die stärksten inhibitorischen Effekte auf die PfGST aus den ersten Experimenten konnten aus der Xanthongruppe für 7-Bromo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on (**19**) und 7-Bromo-9-hydroxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on (**20**), sowie aus der Thioharnstoffgruppe für 1,3-bis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl] Thioharnstoff (**17**) ermittelt werden. 2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on (**30**), welche die Grundstruktur der Xanthonderivate ist, inhibierte die PfGST zu 20 %. Allerdings konnte durch eine Verschiebung der Doppelbindung in dem Xanthonmolekül bei 2,3,4,9-tetrahydro-1H-Xanthen-1-on (**35**), die Effektivität des Inhibitors erhöhen. Die veränderten Eigenschaften von Komponente **35** gegenüber Komponente **30** können durch eine Verlagerung der  $\alpha$ - $\beta$  ungesättigten Carbonylgruppe an dem Kohlenstoffatom eins des Xanthons erklärt werden. Dieser Effekt konnte ebenfalls im Vergleich zwischen Komponente **19** und **20** beobachtet werden, die sich in der Lage einer Doppelbindung unterscheiden. Zusätzlich sind beide Moleküle an Kohlenstoffatom sieben mit einem Bromatom substituiert, allerdings ist Komponente **20** zusätzlich an Kohlenstoffatom neun mit einer Hydroxylgruppe substituiert. Diese Modifikationen führten im Endeffekt zu einer dreifachen Erhöhung des  $IC_{50}$ - und  $K_i$ -Wertes für Komponente **20**. In der folgenden Abbildung sind die Substituenten der getesteten Xanthon- und Thioharnstoffinhibitoren vergleichend dargestellt.



**Abbildung 39:** Grundgerüst der effektivsten PfGST Inhibitoren mit Kohlenstoffnomenklatur. Die Lage der verschiedenen Substituenten ist durch Pfeile und in roter Schrift gekennzeichnet. Die unterschiedliche Schriftgröße stellt den Einfluss auf die inhibitorischen Eigenschaften des Moleküls dar. Wobei ein Pluszeichen einen positiven Einfluss und ein Minuszeichen einen negativen Einfluss auf die inhibitorischen Eigenschaften des Moleküls bedeutet. **A:** Xanthongrundstruktur, **B:** Thioharnstoffgrundstruktur.

Bei den Xanthonderivaten konnte herausgefunden werden, dass sowohl die Substitution an Kohlenstoffatom neun einen negativen Einfluss auf die Effektivität

## Diskussion

hat, als auch eine Änderung der Carbonylgruppe an Kohlenstoffatom eins. Diese negativen Effekte sind dominant gegenüber den Gruppierungen, die einen positiven Effekt haben. Also bleibt festzuhalten, dass die Carbonylgruppe an Kohlenstoffatom eins und kein Substituent an Position neun essentiell für die Funktionalität der PfGST Xanthoninhibitoren ist. Für die Funktion der Thioharnstoffderivate waren Trifluoromethyl-, oder Methylgruppen an den Kohlenstoffatomen fünf und drei essentiell. Den stärksten inhibitorischen Effekt aller getesteten Substanzen auf die PfGST besaß die Komponente 62 aus der Xanthongruppe. Bei der Thioharnstoffgruppe konnte der stärkste inhibitorische Effekt für Komponente 57 beobachtet werden. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass Xanthon- und Thioharnstoffderivate als Leitstrukturen für potenzielle Inhibitoren der PfGST geeignet sind. Vergleicht man die ermittelten  $IC_{50}$ - und  $K_i$ -Werte der getesteten Xanthon- und Thioharnstoffderivate mit Literaturwerten bekannter PfGST Inhibitoren fällt zunächst auf, dass dieser Effekt für diese Stoffklassen bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht beschrieben wurde. Die  $IC_{50}$ - und  $K_i$ -Werte der untersuchten Komponenten waren um den Faktor zehn geringer als die Werte der bekannten PfGST Inhibitoren Hämin, Cibacron blue 3GA oder Coruleo Ellagsäure. In der folgenden Tabelle sind die  $IC_{50}$ - und  $K_i$ -Werte bekannter PfGST Inhibitoren aus der Literatur zusammengefasst.

## Diskussion

**Tabelle 11:** Ausgewählte PfGST Inhibitoren mit Literaturhinweis

Inhibitoren	IC <sub>50</sub> (µM)	K <sub>i</sub> (µM)	Quelle
Cibacron blue 3GA	4	0,5	Harwaldt <i>et al.</i> 2002
Etacrynsäure	30	-	Harwaldt <i>et al.</i> 2002
Hämin	4	6,5	Harwaldt <i>et al.</i> 2002
Protoporphyrin IX	11	10	Harwaldt <i>et al.</i> 2002
Undekapeptid (Asn-Asn-Thr-Asn-Leu-Phe-Lys-Asn-Asn-Ala-Thr)	300	115	Deponte, Becker 2005
S-Hexylglutathion	180	35	Harwaldt <i>et al.</i> 2002
S-Propylglutathion	500	-	Deponte, Becker 2005
S-(p-nitrobenzyl) Glutathion	170	-	Deponte, Becker 2005
S-(N-hydroxy-N-phenylcarbamoyl) Glutathion	190	-	Deponte, Becker 2005
S-(N-hydroxy-N-chlorophenylcarbamoyl) Glutathion	40	-	Deponte, Becker 2005
S-(N-hydroxy-N-4-bromophenylcarbamoyl) Glutathion	32	-	Deponte, Becker 2005
Ellagsäure	~ 74	-	Sturm <i>et al.</i> 2006
Flav Ellagsäure	~ 29	-	Sturm <i>et al.</i> 2006
Coruleo Ellagsäure	~ 7	-	Sturm <i>et al.</i> 2006

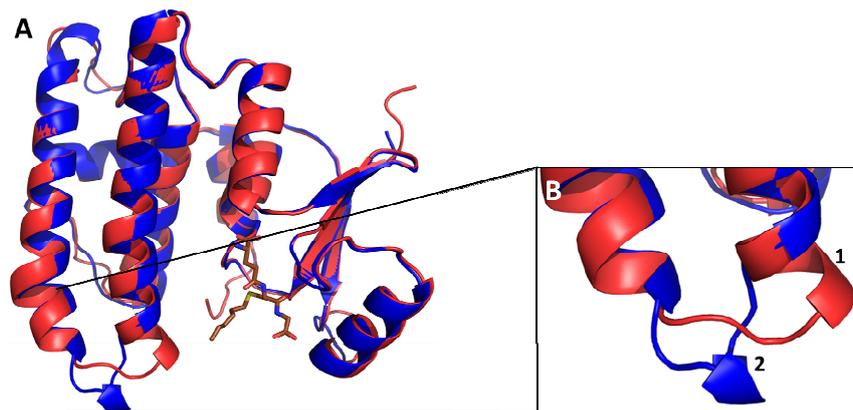
Elf Xanthonderivate wurden auf ihre Aktivität gegenüber dem 3D-7 *Plasmodium falciparum* Stamm getestet (Kapitel 4.1.1 Tabelle 4). Auf der Grundlage einer Einteilung von Batista *et al.* (2009) [105] konnten vier Komponenten mit einer guten antiplasmodialen Aktivität (IC<sub>50</sub>: 20 – 100 µM) identifiziert werden und sieben Komponenten mit einer moderaten Aktivität (IC<sub>50</sub>: 100 – 200 µM). Aus der Literatur sind IC<sub>50</sub>-Werte von Xanthonderivaten bekannt die zwischen 0,2 – 50 µM gegenüber *Plasmodium falciparum* liegen [115-117]. Die ermittelten IC<sub>50</sub>-Werte der elf getesteten Xanthonderivate befanden sich ebenfalls in diesem Bereich. Nichts desto trotz zeigten die Ergebnisse des [<sup>3</sup>H]-Hypoxanthin-Assays eine Diskrepanz gegenüber den Ergebnissen des CDNB-Assays an der PfGST. Diese Unterschiede

## Diskussion

können durch eine inadäquate Aufnahme oder die Verstoffwechslung der Komponenten im Parasiten erklärt werden. Die nächsten Schritte in der Xanthon und Thioharnstoff Wirkstoffentwicklung sollten sich auf die physikochemischen, pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Eigenschaften der Komponenten fokussieren um die Aufnahme in den Parasiten zu verbessern.

### 5.2 PfGST MES Komplex-Identifikation der potenziellen L-site ?

Die beschriebene PfGST Struktur aus Kapitel 4.2 zeigt das inaktive Tetramer dieses Proteins, das in der Abwesenheit von GSH oder anderer Liganden gebildet wird [34, 118]. Bei der Tetramerbildung der PfGST kommt es zu einer über den *Loop* 113-119 vermittelte regelrechte Verzahnung der beiden Homodimere miteinander [40, 41]. Im Gegensatz dazu, ordnet sich der *H-site Loop* 113-119 während der Bindung eines Liganden neu. Die Aminosäuren Asn114, Leu115 und Phe116 bilden dabei eine zusätzliche Windung in  $\alpha$ -Helix 4 und die Seitenketten der Aminosäuren Asn111, Phe116 und Tyr211 bewegen sich in die *H-site*. Die veränderte Anordnung der Reste 113-119 während der Liganden- oder Inhibitorbindung des Enzyms verhindert die Verzahnung und damit die Inaktivierung der PfGST Dimere [34]. Der Unterschied des *Loops* zwischen inaktivem PfGST Homotetramer und einem aktiven Homodimer, ist in Abbildung 40 dargestellt.



**Abbildung 40:** A: Überlagerung der PfGST Struktur mit gebundenem Liganden, PDB: 2AAW, (rot) und der 1,7 Å PfGST Struktur (blau). B: *Loop* 113-119 der PfGST, während einer Ligandenbindung und ohne Ligand. 1: Mit Ligand (rot) bilden die Aminosäurenreste Asn114, Leu115 und Phe116 eine zusätzliche Windung in  $\alpha$ -Helix 4. 2: Dadurch wird der *Loop* verkürzt und klappt in die *H-site* des Monomers ein.

Darüber hinaus, konnten bei der hier gezeigten Struktur eine Diagonalvernetzung zwischen dem A-D, B-C *Interface* der Monomere gefunden werden. Dieses *Interface*

## Diskussion

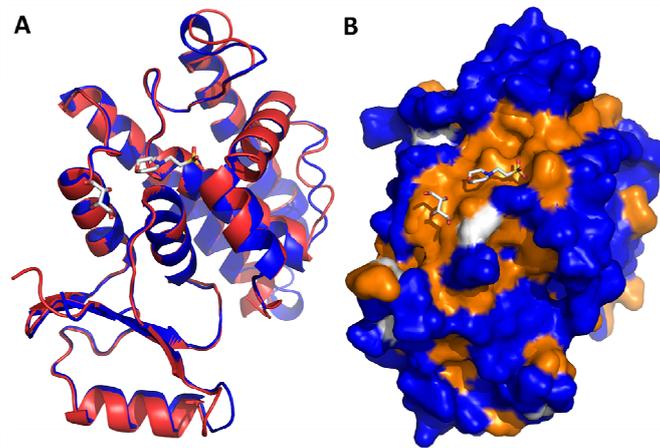
wurde jeweils durch zwei hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Thr122-Lys130 und Glu126-Glu126 stabilisiert. Bei einem Vergleich mit den derzeit bekannten acht PfGST Strukturen aus der PDB zeigte sich, dass dieses *Interface* bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht beschrieben wurde. Bei den A-B (C-D) und A-C (B-D) *Interfaces* gab es keine Unterschiede zwischen der Struktur und den acht PfGST Strukturen aus der PDB. Die im Rahmen dieser Arbeit analysierte 1,7 Å Struktur der PfGST liefert weitere molekulare Einblicke in den Reaktionsmechanismus des Proteins. Diese Informationen sind besonders hinsichtlich der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung für das Protein von Bedeutung. Die höchste Auflösung einer PfGST Struktur lag bis jetzt bei 1,9 Å (PDB: 1OKT, PDB: 3FR3) [41, 46]. Allerdings fehlten den jetzigen strukturellen Daten der PfGST fundierte Aussagen über die Lage und beteiligte Aminosäuren an der PfGST *L-site*.

Nichts desto trotz existieren von GSTs anderer Organismen detaillierte Informationen über die *L-site*. So befindet sich die *L-site* der GST von *Zea mays* in der *H-site* des Proteins [119]. Bei den GSTs von *Schistosoma japonica* oder *Cephalopoda spec.* scheint die *L-site* in der Dimerschnittfläche zu liegen [120, 121]. Zwei unterschiedliche Gruppen postulierten für die humane pi-GST verschiedene Positionen der *L-site*. Oakley *et al.* (1999) beschrieben, dass sich die *L-site* dieses Proteins in der *H-site* befindet [122]. Im Gegensatz dazu beschrieben Prade *et al.* (1997) eine nicht-Substrat-Bindungsstelle in einem Puffer zugänglichem Gebiet des Proteins, die unterschiedlich zur *G-* oder *H-site* des Proteins war [123]. Interessanterweise beschrieb die letztere Gruppe die Bindung eines MES-Moleküls an der nicht-Substrat-Bindungsstelle der humanen pi-GST. Frühere kinetische Experimente mit verschiedenen GSTs zeigten, dass die nicht-Substrat-Bindung des Proteins durch eine nichtkompetitive Inhibition der enzymatischen Aktivität gekennzeichnet war. Des Weiteren zeigten die kinetischen Daten, dass die nicht-Substrat-Bindungsstelle oder *L-site* eine unterschiedliche Lokalisation zu der *G-* und *H-site* des Proteins aufzeigt [35].

Ein Vergleich der in Kapitel 4.2 beschriebenen Proteinstruktur mit den hinterlegten acht PfGST Strukturen in der PDB zeigte bei der Struktur mit dem PDB Code: 2AAW die Bindung eines D-Threitol Moleküls nahe der identifizierten MES-Bindungsstelle. Das D-Threitol Molekül interagiert mit Leu26 und Gly27 durch hydrophobe Wechselwirkungen [34]. Die Aminosäure Leu26 ist ebenfalls bei der MES-Bindung

## Diskussion

durch eine hydrophobe Wechselwirkung involviert. In der folgenden Abbildung sind die Lokalisationen der beiden Moleküle in der Nicht-Substrat-Bindungsstelle der PfGST dargestellt.



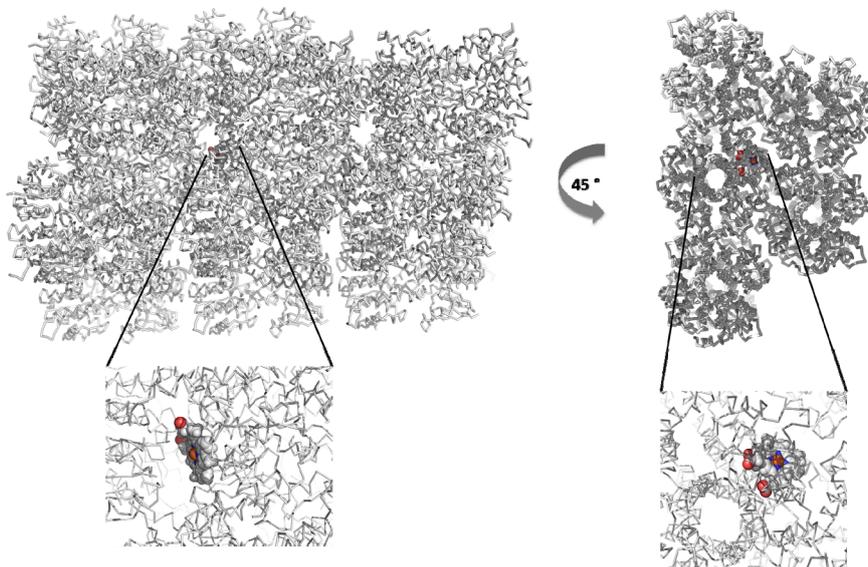
**Abbildung 41:** Überlagerung der 1,7 Å PfGST Struktur (blau) mit PDB:2AAW (rot). **A:** *Ribbon*-Darstellung mit dem MES Molekül und dem DTL Molekül. **B:** Oberflächendarstellung, Leu26 interagiert mit MES als auch mit DTL.

Die PfGST MES Bindung wird durch zwei H-Brücken stabilisiert, dabei sind die Aminosäurenreste Asn198 und Tyr25 beteiligt, die jeweils eine H-Brücke ausbilden. Zusätzlich kommt es zur Stabilisierung der Interaktion durch hydrophobe Wechselwirkungen. Asn198 ist am Rand der Nicht-Substrat-Bindungsstelle lokalisiert, während Tyr25 in der nicht-Substrat-Bindungsstelle liegt und aus ihr herausragt. Diese Konstruktion der Region führt zu der Annahme, dass Tyr25 als Anker-molekül wirken kann, indem es die Ligandenbindung durch die Ausbildung von H-Brücken stabilisiert. Die Größe und der molekulare Aufbau dieser Region lassen vermuten, dass komplexe Moleküle wie Hämin,  $\alpha$ -Tocopherol, Gallensäuren oder Medikamente hier binden können. Frühere Experimente identifizierten die Interaktion zwischen  $\alpha$ -Tocopherol und der humanen pi GST, die obendrein zur Inhibition des Proteins führte [124]. Die inhibitorische Eigenschaft von Hämin gegenüber der PfGST [37, 46] und humanen GSTs [125] wurde ebenfalls beschrieben.

Ferner zeigte molekulares Docking mit Hämin und der nicht-Substrat Bindungsstelle der PfGST, dass es sich wahrscheinlich bei der identifizierten Bindungsstelle um die *L-site* des Proteins handelt. Das Häminmolekül passt perfekt in die hydrophobe nicht-Substrat-Bindungsstelle. Die Bindung zu Hämin wird dabei durch drei H-Brücken

## Diskussion

stabilisiert. Eine herausragende Rolle ist dabei Tyr25 zugeordnet, dessen Hydroxylgruppe mit dem Fe-(II)-Atom des Hämins eine Wasserstoffbrücke ausbildet. Die Interaktion zwischen Tyrosin und Häm wurde ebenfalls für NEAT („near-iron Transporter“) Domänen bakterieller Proteine beschrieben [126, 127]. Unterstützt wird diese Interaktion durch zwei weitere H-Brücken zwischen dem Amidstickstoff der Aminosäuren Asn84 und Asn157 und dem Carbonylsauerstoff des Hämin. Außerdem wird die Interaktion durch zehn hydrophobe Wechselwirkungen stabilisiert. Die Häminbindungsstelle liegt in der tetrameren Form des Proteins frei zugänglich vor, wie in Kapitel 4.2 Abbildung 14 und 15 dargestellt wurde. Allerdings zeigte die Molekülpackung im Kristall, dass die potenzielle *L-site* durch PfGST Moleküle verdeckt und abgeschirmt wird (Abb. 42). Dabei wird die Anlagerung der einzelnen PfGST Moleküle während der Kristallbildung das Hämin nicht aus der Bindungsstelle verdrängen, da der Abstand in dieser Region des Kristalls zwischen den Molekülen groß genug ist. Allerdings kann Hämin nicht in einen bereits vorhandenen PfGST Kristall *gesoakt* werden. Der Grund hierfür ist, dass die vorhandenen Kristallkanäle einen Durchmesser von ungefähr 12 Å haben, während das Häminmolekül die Maße 14 Å x 15 Å besitzt und somit zu groß ist um über die Kanäle an die Bindungsstelle zu gelangen.



**Abbildung 42:** Molekülpackung des PfGST Kristalls, mit gebundenem Hämin an der voraussichtlichen *L-site* nach molekularem Docking. **A:** Längsansicht der PfGST Kristallpackung, Hämin ist durch die davorliegende Reihe PfGST Moleküle verdeckt. Der Abstand zwischen dem Hämin und dem davor liegenden PfGST Molekül beträgt 13 Å. **B:** Ansicht auf die Molekülpackung des PfGST Kristalls um 45 ° gedreht. Hämin ist durch die davorliegende Reihe PfGST Moleküle verdeckt. Der angrenzende Kristallkanal hat einen Durchmesser von 12 Å und ist für das Häminmolekül nicht passierbar.

Diese Ergebnisse sind kompatibel mit den Beobachtungen von Liebau *et al.* (2009), welche die Häminbindung der PfGST unabhängig von einer GSH oder GSSG Interaktion an der *G-site* des Proteins beschrieben [46] und mit den Ergebnissen von Mannervik *et al.* (1988), deren kinetische Daten zeigten, dass die *L-site* eine unterschiedliche Lokalisation zu der *G-* und *H-site* des Proteins aufzeigen [35]. Die *G-* und *H-site* der PfGST kann als Bindungsstelle für Hämin ausgeschlossen werden, da diese Unabhängigkeit der Bindung von GSH und GSSG zeigten, das auch die tetramere PfGST Hämin binden kann. Wie zuvor beschrieben ist im tetrameren Zustand des Proteins die *G-* und *H-site* blockiert. Es ist davon auszugehen, dass die Bindung von Hämin an die in Kapitel 4.2.2 postulierte *L-site* unabhängig von der PfGST Tetramerbildung und darüber hinaus von einer zusätzlichen GSH oder GSSG Bindung ist. Zur weiteren Untersuchung dieser Bindungsstelle kann das für die Häminbindung wichtige Tyr24 durch ortsgerichtete Mutagenese gegen die Aminosäure Alanin ersetzt werden. Dadurch kann die Essentialität dieser Aminosäure für die Häminbindung weiter untersucht werden. Weitere Aminosäuren, die an der Hämininteraktion beteiligt sind und deren Einfluss durch ortsgerichtete Mutagenese nachgeprüft werden kann, sind Asn84 und Asn157. Der Vergleich der MES Bindung in der PfGST Kristallstruktur mit den Ergebnissen aus den Nah-UV CD-Messungen zeigten, dass die Bindung des MES Moleküls bereits in Lösung stattfindet. Bei den CD-Messungen konnte eine schwache Abnahme in der Absorption der Tyrosin- und Phenylalaninspektren im Vergleich zu einem Nah-UV Spektrum der PfGST ohne MES gemessen werden. Während dieser Interaktion wird Tyr25 durch das MES Molekül verdeckt. Jedes PfGST Monomer besitzt 16 Tyrosine, bei der MES Interaktion wird aber nur ein Tyrosin verdeckt. Über 90 % der Tyrosine bleiben zugänglich für die Messung, deshalb kommt es zu keiner starken Abnahme der Absorption im Nah-UV Bereich für das Tyrosin Spektrum. Die Abnahme der Absorption im Nah-UV Spektrum von Phenylalanin ist durch eine teilweise Abdeckung von Phe192 durch das MES Molekül erklärbar.

### 5.3 PfGST Kristallisation

Als Grundlage der strukturbasierten Wirkstoffentwicklung werden hoch auflösende Strukturen der Zielproteine zusammen mit der untersuchten Leitstruktur benötigt. In

## Diskussion

der PDB sind acht Kristallstrukturen der PfGST hinterlegt (1OKT, 1PA3, 2AAW, 1Q4J, 3FRC, 3FR3, 3FR6 und 3FR9), deren Auflösung zwischen 2,4 und 1,9 Å liegt. Dabei liegen fünf Strukturen als das biologisch aktive Homodimer vor und drei Strukturen als inaktive Form des Homotetramers. Wenn die PfGST in der homotetrameren Form vorliegt, ist davon auszugehen dass der Inhibitor nicht binden kann, oder bei der Tetramerbildung der gebundene Inhibitor durch die Proteinmoleküle aus der *G*- oder *H-site* verdrängt wird. Folglich war es von Bedeutung optimale Kristallisationsbedingungen für die PfGST im Komplex mit Komponente **19** zu finden. Nach diesen Kristallisationsversuchen konnten vier Bedingungen gefunden werden, die für die PfGST zuvor noch nicht beschrieben wurden. Die publizierten Kristallisationsbedingungen der PfGST unterscheiden sich deutlich von den in Kapitel 4.3 beschriebenen Bedingungen. Zum Vergleich sind in der nachfolgenden Tabelle die Kristallisationsbedingungen der bislang publizierten PfGST Strukturen zusammengefasst.

**Tabelle 12:** Publierte Kristallisationsbedingungen der PfGST

Kristallisationsbedingungen	Protein Konzentration (mg/mL)	Quelle
1,5 M Natriumformiat; 2,5 M Natriumphosphat pH 7,8; 15 mM NaCl; das Reservoir bestand aus 3 M Natriumformiat	4,3	Fritz-Wolf <i>et al.</i> 2003
im Tropfen 60 mM CaCl <sub>2</sub> ; 30 mM Na Hepes pH 7,5; 8,4% PEG 400 und im Reservoir 150 mM CaCl <sub>2</sub> ; 75 mM Na Hepes pH 7,5; 21% PEG 400	3,4	Hiller <i>et al.</i> 2006
2 M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 0,1 M Tris HCl pH 8,5	7,0	Perbandt <i>et al.</i> 2004

Der PfGST Tetramerbildung wirkt die Bindung von GSH, GSSG und Inhibitoren entgegen, wenn sie an der *G*- oder *H-site* des Proteins binden [34, 46]. GSH ist das natürliche Substrat der PfGST. Während GSSG ein kompetitiver Inhibitor des Proteins ist, der mit der *G-site* interagiert [46]. Aus den Versuchen und Experimenten mit der PfGST im Rahmen der Doktorarbeit können die folgenden Ansätze durchgeführt werden, um eine Kristallisation des Proteins in seiner aktiven und dimeren Form zu verbessern:

## Diskussion

- Durchgängige GSH Konzentration von mindestens 2mM in allen Puffern und Lösungen von der Reinigung bis zur Kristallisation der PfGST.
- Durchgängige Kühlung der Proteinproben von der Reinigung bis zur Kristallisation.
- Frühestmögliche Interaktion zwischen GSH, GSSG oder anderer Liganden/Inhibitoren mit dem Protein.
- Inhibitoren die an der *G-* oder *H-site* des Proteins binden können benutzt werden, um das Protein während der Reinigung zu eluieren. Während Liganden die an der *L-site* des Proteins binden, zusammen mit GSH oder GSSG dem Protein zugeführt werden können.
- Eine weitere Empfehlung wäre, während der Kristallisation 2 mM GSH, GSSG oder Hämin und 50 µM Inhibitor in der Reservoirolösung vorliegen zu haben.
- Liebau *et al.* (2009) beschrieben, das ortsgerichtete Mutagenese am *Loop* 113-119 bis hin zum Entfernen des *Loops* die Tetramerisierung des Proteins verhindern können [46].

### 5.4 Peptid Identifikation

Die ESPs von *Onchocerca ochengi*, einem nahen verwandten Organismus von *Onchocerca volvulus* wurden bezüglich ihrer Peptidzusammensetzung untersucht. Dabei konnten insgesamt 42 Peptide aus den *Onchocerca ochengi* ESPs durch massenspektrometrische Methoden identifiziert werden. Weitere Analysen offenbarten das 32 Peptide durch Proteolyse aus Vorgängerproteinen gebildet wurden. Die verbliebenen zehn Peptide entstanden nicht durch proteolytische Spaltungsprozesse und wurden zuvor nicht beschrieben. Bei den Vorgängerproteinen handelte es sich um GAPDH, Cytochrom-C-Oxidase oder GSH-Reduktase aus dem intrazellulären Raum, oder um Proteine der ESPs die durch

## Diskussion

Spaltprozesse von Proteasen des humanen Immunsystems Peptide freisetzen, wie z.B. ALT-1, Ov-33 oder RAL-2. Einige Peptide mit einer antibakteriellen Aktivität werden durch Proteolyse aus Vorgängerproteinen gebildet, z.B. Buforin II aus Histon 2A [128] oder Laktoferricin aus Laktoferrin [129]. Die Zusammensetzung der *Onchocerca ochengi* ESPs ist ein dynamisches System, das sich hinsichtlich Geschlecht und Entwicklungsstadium des Parasiten, sowie dessen Antwort auf Signale des Immunsystems verändert. Zum Beispiel sekretieren *Brugia malayi* Mikrofilarien qualitativ und quantitativ unterschiedliche Moleküle im Vergleich zu adulten Parasiten, was deren unterschiedliche Lokalisation im Wirtsorganismus und den Kontakt mit dem Wirtsimmunsystem reflektiert [130]. Derselbe Sachverhalt wird für die *Onchocerca ochengi* ESPs gelten. Allerdings sollte der Fokus nicht nur auf die Peptide der ESPs gerichtet werden. Frühere Studien zeigten, dass helminthen ESPs Kohlenhydrate [131, 132] und Lipide sowie Lipidmediatoren [133, 134] besitzen, die mit dem Wirtsimmunsystem interagieren.

### **5.5 Die ESPs parasitärer Helminthen, Identifikation von Peptiden mit antibakterieller Aktivität**

Aus den 42 identifizierten Peptiden der *Onchocerca ochengi* ESPs konnte für 4 Peptide eine antibakterielle Aktivität gegen *gram* negative *E.coli* Bakterien nachgewiesen werden. Außerdem konnte bei sechs weiteren RPC Fraktionen eine antibakterielle Aktivität nachgewiesen werden, die insgesamt 15 potenzielle antibakterielle Peptide enthielten.

In allen lebenden Organismen sind HDPs ein Teil des angeborenen Immunsystems [135, 136]. Sie können eine Aktivität gegen Bakterien, Pilze, eukaryotische Parasiten und Viren besitzen [137-139]. Zusätzlich können diese Peptide Lipopolysaccharid (LPS) hervorgerufene Prozesse der Immunantwort neutralisieren [140, 141]. Bakterielle LPS sind Schlüsselmoleküle bei einem endotoxischen Schock, der bei Infektionen mit *gram* negativen Bakterien auftreten kann [142-144]. HDPs besitzen die einzigartige Fähigkeit hyperinflammatorische Immunantworten zu unterdrücken während Abwehrmechanismen der Immunantwort aufrechterhalten werden [145]. Zusätzlich zu ihrer antimikrobiellen Aktivität besitzen die HDPs also auch das Potenzial das Immunsystem zu regulieren [146]. Robinson *et al.* (2011) beschrieben eine Peptidfamilie die von dem Helminthen *Fasciola hepatica* sekretiert wird, mit

## Diskussion

ähnlichen funktionellen und biochemischen Eigenschaften wie die humanen Defensine und Cathelicidine. Diese Peptide wurden Helminthen defensiv Moleküle (HDMs) genannt. Durch die Hemmung der Interaktion zwischen bakteriellen LPS und Makrophagen verhindern die HDMs die Aktivierung einer inflammatorischen Immunantwort [147]. Dadurch wird der Schutz des Wirts erhöht und dementsprechend auch der des Parasiten [148].

Darüber hinaus konnte beobachtet werden, dass es durch Helminthen verursachte Schäden z.B. durch Gewebemigration, zu einer systemischen Bewegung von Bakterien im Wirt führen kann [149-152]. In endemischen Gebieten für Helminthen kann es außerdem zu gleichzeitigen Infektionen mit *gram* negativen Bakterien, wie *Salmonella sp* kommen [153]. Um diese Bakterieninfektionen abzumildern ist es von Vorteil wenn Helminthen ESPs antibakterielle Peptide enthalten. Der Wirtsorganismus wird vor starken Infektionen geschützt und der Parasit bewahrt seinen Lebensraum.

Ebenso, gewinnt die Anwendung von antimikrobiellen Peptiden für die humane Medizin eine immer größer werdende Bedeutung, dabei spielt vor allem das zahlreiche Auftreten von Resistenzen gegenüber verwendeten Antibiotika gegenüber humanpathogenen Bakterien eine Rolle [146]. Mehr als 800 verschiedene Peptide mit einer nachgewiesenen antimikrobiellen Aktivität wurden bis jetzt identifiziert. Sie stammen dabei aus verschiedenen Gewebe- und Zelltypen von Wirbellosen, Pflanzen und Tieren [146, 154-156]. Sie umfassen Zytokine und Chemokine [157, 158], Neuropeptide und Peptidhormone [159, 160] oder Produkte die über proteolytische Prozesse aus Vorgängerproteinen entstehen [129, 161].

Peptide mit einer antibakteriellen Aktivität teilen gemeinsame Charakteristika, wie Größe, Sequenz, Ladung, Konformation und Struktur, Hydrophobizität und Amphipathizität [154]. Die identifizierten antibakteriellen Peptide teilen ebenfalls diese Eigenschaften. Insbesondere das Peptid mit der Sequenz **DGGDEEGNDENEDVPRGSF** besaß die höchste Ladung mit -7 und eine hohe Hydrophobizität mit  $+44,7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ . Die antibakterielle Aktivität dieses Peptids entsprach einer Ampicillin Konzentration von  $8,5 \mu\text{g/ml}$ , dabei lag die Peptidkonzentration bei  $1,3 \mu\text{g/mL}$ .

Ferner wurde berichtet, dass von Helminthen freigesetzte antimikrobielle Peptide einen negativen Effekt auf die Vitalität von Protozoenparasiten wie *Plasmodium sp*

oder *Leishmania sp* haben [162, 163]. In der Tat konnten bei Experimenten ein inhibitorischer Effekt der entsalzten Peptidfraktion gegen den 3D-7 *Plasmodium falciparum* Stamm beobachtet werden. Die duale Funktion der HDPs, hinsichtlich der Aktivität gegen humane Pathogene und der Modulation des menschlichen Immunsystems ist eine Schlüsselfunktion dieser Moleküle und reflektiert deren zentrale Position in der angeborenen Immunantwort. Die Fähigkeit von *Onchocerca ochengi* Peptide freizusetzen, die HDPs nachahmen können unterstützt ihre Langlebigkeit im Wirt. Die Helminthen erhöhen die Überlebensfähigkeit des Wirts und damit ihre eigene Überlebenschance. Die ESPs der Helminthen stellen eine reiche Quelle von niedermolekularen Substanzen dar, die eine mikrobielle Aktivität besitzen und zum anderen eine modulierende Funktion auf die Immunantwort des Wirts besitzen.

### **5.6 Proteine aus den ESPs von *Onchocerca volvulus***

Eine Analyse der PDB zeigt, dass elf Proteinstrukturen aus der Familie *Filarioidea*, zu der *Onchocerca volvulus* zählt, in der Datenbank hinterlegt sind. Allerdings ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nur eine Proteinstruktur aus den ESPs von *Onchocerca volvulus* bekannt, wobei es sich um die extrazelluläre GST (PDB: 2HNL) des Parasiten handelt [164]. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde auch versucht die Struktur von vier *Onchocerca volvulus* ESP Proteinen zu lösen. MIF-1 und Ov7 als homologe Moleküle zu Proteinen des Wirtsimmunsystems und RAL-2 sowie Ov103 deren genaue Funktion auf das humane Immunsystem bis lang nur spärlich untersucht wurde. Dabei wurde zunächst die Primärsequenz der vier Proteine klassifiziert.

Onchocystatin gehört zur Cystatin Superfamilie, die Proteine dieser Klasse sind in der Lage Cysteinproteasen aus dem Immunsystem zu hemmen [64]. Ein Sequenzalignment von Ov7 mit homologen Cystatinen von *Brugia malayi* und *Homo sapiens* ist in der folgenden Abbildung dargestellt und zeigt die konservierten Cystatinmotive bei Ov7.

## Diskussion

<i>Onchocerca v.</i>	MLTIKDGTLTLHLLEFSVVALVLOQAKSARAKNPSKMEKSTGENQDRPVLLGGWEDRDP	60
<i>Brugia m.</i>	ML-I-DG-L---LILF---ALV-LQ-A---SDIESKTDI---VL-GGN---P	52
<i>Homo s.</i>	-----L---LIL---A-----GG-----39	
<i>Cystatin-SA</i>	-----L---LIL---A-----GG-----39	
<i>Cystatin-S</i>	-----L---LIL---A-----GG-----39	
<i>Cystatin-SN</i>	-----L---LIL---A-----GG-----D-39	
<i>Onchocerca v.</i>	KDEEILELTPSILMKVNEQSNDEHYHLMPIKILKVSSQVVGAVYTKMDVQVHRSCCKKSSN	120
<i>Brugia m.</i>	D-EI-EILP-L-KVN-QSNDEHYHLMPIKILKVSSQVVGAVYTKM-VQVHRG-CCKS-	112
<i>Cystatin-SA</i>	-DE---L---N---DEY---L---L---QIVGGV-Y-D-V-R-C-KS-	99
<i>Cystatin-S</i>	-DE---L---N---DEY---PL-L---QTEGGV-Y-DV-V-R-C-KS-	99
<i>Cystatin-SN</i>	-DE---L---N---D-Y---PL-L---QTVGGV-Y-DV-V-R-C-KS-	99
<i>Onchocerca v.</i>	EKVDLTKCKKLESHPEKVMTLEVWEKPEWENFMRVEILGTKEV---	162 100%
<i>Brugia m.</i>	E-V---CKKLEGHP--VMTLEVWEKPEW-F--V-IL-TK--SSV	157 65%
<i>Cystatin-SA</i>	-----E-----E-PWE-M-----E----	141 28%
<i>Cystatin-S</i>	-----E-----E-E-PWE-M-----E----	141 27%
<i>Cystatin-SN</i>	-----E-----E-E-PWE-----E----	141 29%

**Abbildung 43:** Sequenzvergleich von Ov7 mit verschiedenen Cystatinen von *Brugia malayi* und *Homo sapiens*. In grau ist die Signalsequenz von Ov7 dargestellt und die konservierten Cystatinmotive. An Position 54 und 55 der Proteinsequenz befinden sich zwei konservierte Glycine, an Position 97 – 101 befindet sich die konservierte QVVAG Sequenz und am C-Terminus an Position 145 und 146 liegt das PW Motiv. An Position 115 und 125 liegen zwei Cystatine, für die vorhergesagt wurde, dass sie eine intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden. Die höchste Sequenz Homologie von Ov7 liegt bei 65% gegenüber einem *Brugia malayi* Cystatin.

Bei den gelösten Proteinstrukturen von Cystatinen konnte gezeigt werden, dass die konservierten Cystatinmotive eine keilförmige Struktur bilden, welche das aktive Zentrum der Cysteinproteasen blockiert. Diese Struktur wird aus einem N-terminalen Glycin, einem Glutamin-Valin-Glycin (Q-X-V-X-G) Loop und einem weiteren Motiv bestehend aus Prolin und Tryptophan (PW) am C-Terminus, gebildet [165]. Diese Motive sind ebenfalls in der Primärsequenz von Ov7 zu finden.

Die Proteine der MIF-Superfamilie besitzen zum einen eine Phenylpyruvat Tautomerase Aktivität und eine Disulfidreduktase Aktivität und liegen in ihrer biologisch aktiven Form als Homotrimer vor [166, 167]. Ein Sequenzvergleich des *Onchocerca volvulus* MIF-1 mit den homologen Proteinen von *Brugia malayi*, *Trichinella spiralis* und *Homo sapiens* ist in Abbildung 44 gezeigt.

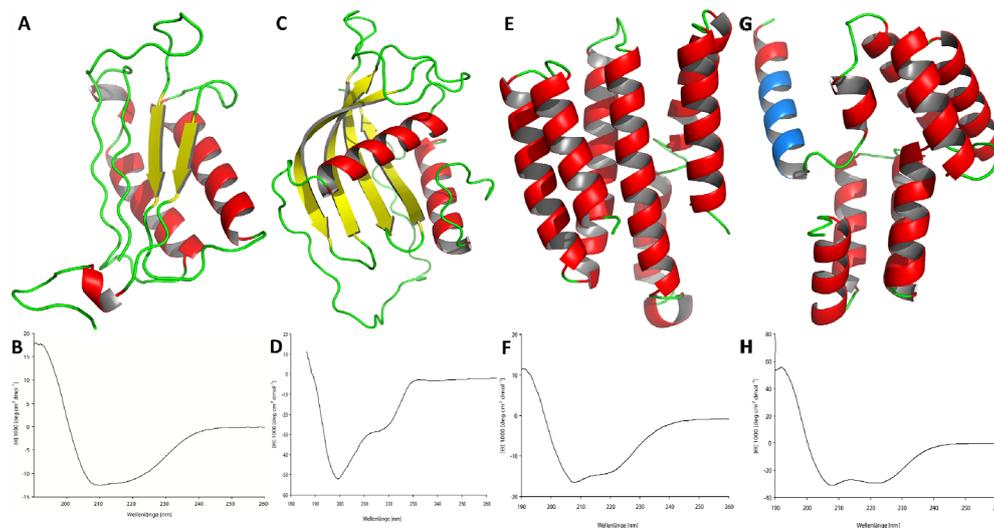
<i>Onchocerca v.</i>	MPAFTTININIPQSNVSDAFTIKKASSTVAKALGKPEESYVAIEHVNGGQAMVFGGSTDEPAV	60
<i>Brugia m.</i>	MP-FTI-INIPEQ---S-AFLKKAS--VAKALGKPEESYV-IEHVNGGQAMVFGGS-DEPAV	60
<i>Trichinella s.</i>	MP-FT-MTNI---V---FI---S-----L-KP-SYVAVE-N--Q---FGGST-P-A-	60
<i>Homo s.</i>	MP-E--NIN-P--V-D-FI-----A-A-GKE--L-AVEV---Q-M-FGGS--E-A-	60
<i>Onchocerca v.</i>	VTKSIGCVGPVNNNSHSEKLEKILADELKIIPKNROYIEFVNIDASIMAFNGSTFG	115 100%
<i>Brugia m.</i>	VTKSIGCVGP-VNNSH-EKIL-KILADELKIIPKNROYIEFV-I-AS-MAFNGSTFG	115 86%
<i>Trichinella s.</i>	-I-SIG--P--N--HS-KLF--L---L-IPKNR-YI-EVN-----NG-FF-	114 50%
<i>Homo s.</i>	-I-SIG--G---NRS-S-I--IIA--L-I---R-VI-----A-----N-SFE-	115 45%

**Abbildung 44:** Sequenzvergleich von *Onchocerca volvulus* MIF-1 mit MIF Proteinen von *Brugia malayi*, *Trichinella spiralis* und *Homo sapiens*. Im N-terminalen Bereich der MIF Proteine liegt das konservierte Motiv der Phenylpyruvat Tautomerase. An Position 57-60 liegt das konservierte CxxC, das zuständig für die Disulfidreduktase Aktivität des Proteins ist. Die Cysteine dieses Motivs sind grün gekennzeichnet. Die höchste Sequenzhomologie zu *O. volvulus* MIF-1 zeigte mit 86 % das MIF Protein von *Brugia malayi*.

Im Gegensatz zu MIF-1 und Onchocystatin sind Sequenzhomologien zu Proteinen außerhalb der Nematodenfamilie für RAL-2 und Ov103 gering. Die höchste Sequenzhomologie für RAL-2 und Ov103 zu humanen Proteinen liegt zwischen 17 %

## Diskussion

und 28 %. Die höchsten Sequenzhomologien beider Proteine kann zu Nematodenproteinen zwischen 44 % und 63% beobachtet werden. Sequenzvergleiche für Ov103 und RAL-2 mit homologen Sequenzen sind in den Abbildungen 4 und 5 im Angang dargestellt. RAL-2 besitzt eine charakteristische Polyglutaminsequenz (PolyQ), bestehend aus elf Glutaminresten. PolyQ-Sequenzen sind bei Proteinen bekannt, die neurodegenerative Erkrankungen beim Menschen hervorrufen, wie Huntington oder Ataxie [168]. Darüber hinaus wird angenommen das diese Sequenzen Interaktionen mit anderen Proteinen eingehen [169], mit sich selbst interagieren und Interaktionen zwischen Proteinen stabilisieren können [170]. Durch die Optimierung der heterologen Expression und Reinigung von Ov7, Ov103, MIF-1 und RAL2 konnte ausreichend Protein für Kristallisationsversuche produziert werden. Die Qualität der Proteinlösungen wurde durch CD spektroskopische Messungen und DLS-Messungen überprüft. In der folgenden Abbildung sind die CD-Spektren der vier ESP Proteine mit ihren Homologiemodellen, die mit dem Programm I-TASSER erstellt wurden [107] dargestellt.



**Abbildung 45:** Vergleichende Darstellung der Homologiemodelle von vier *Onchocerca volvulus* ESP Proteinen mit den CD-Spektren der heterolog exprimierten Proteine. **A:** Homologiemodell von MIF-1, der C-score Modells lag bei 1,50, der TM score bei  $0,92 \pm 0,06$  und die RMSD bei  $1,5 \pm 1,3$  Å. **B:** Das CD-Spektrum von MIF-1 lässt eine Mischung der Sekundärstrukturelemente,  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und *random coiled* Strukturen annehmen **C:** Homologiemodell von Ov7, Der C-score des Modells liegt bei -1,11, der TM score bei  $0,58 \pm 0,16$  und die RMSD bei  $7,3 \pm 4,2$  Å. **D:** Das CD-Spektrum von Ov7 lässt ebenfalls eine Mischung in den Sekundärstrukturelementen annehmen, allerdings mit einem hohen Anteil Loops oder ungefalteten Regionen. **E:** Homologiemodell von Ov103, der C-score des Modells lag bei -3,79, der TM score bei  $0,30 \pm 0,10$  und die RMSD bei  $13,8 \pm 3,9$  Å. **F:** Das CD-Spektrum von Ov103 lässt eine Mischung in den Sekundärstrukturelementen annehmen **G:** Homologiemodell von RAL2, Der C-score des Modells lag bei 3,65; der TM score bei  $0,32 \pm 0,10$  und die RMSD lag bei  $13,5 \pm 4,0$  Å. Die PolyQ Sequenz ist blau gekennzeichnet **H:** Das CD-Spektrum von RAL2 zeigt  $\alpha$ -Helices als dominierende Sekundärstrukturelemente.

## Diskussion

Der hohe Anteil an *random coil* Strukturelementen im Ov7 Homologiemodell war ebenfalls aus dem Verlauf des CD-Spektrums ersichtlich. Die RAL-2 CD-Spektren deuteten auf einen sehr hohen Anteil  $\alpha$ -Helices in der Sekundärstruktur des Proteins hin. Wobei ein *random coil* Signal im CD-Spektrum, das mit der ungeordneten PolyQ-Sequenz assoziiert wäre, nicht detektiert werden konnte. Die Sekundärstruktur des RAL-2 Homologiemodells zeigte ebenfalls einen hohen Anteil an  $\alpha$ -Helices. Das Ov103 Modell zeigt einen hohen Anteil an  $\alpha$ -Helices, der in diesem Ausmaß nicht im CD-Spektrum des Proteins wieder zu finden ist. Aufgrund der fehlenden Strukturen homologer Proteine für Ov103 und RAL-2 kann es hierbei zu der beobachteten Diskrepanz kommen. Das CD-Spektrum von RAL-2 zeigt dabei ein interessantes Ergebnis, das Protein besitzt eine ungeordnete PolyQ-Sequenz. Das CD-Spektrum zeigt allerdings ausschließlich  $\alpha$ -Helix assoziierte Spektren in der Sekundärstruktur. Schaefer *et al.* (2012) beschrieben, dass Organismen in der Lage sind Proteine mit PolyQ Sequenzen zu akkumulieren um Proteininteraktionen zu modulieren [170]. Aus der Sicht von *Onchocerca volvulus* ist es von Vorteil mit Proteinen des Wirtsimmunsystems zu interagieren, damit diese nicht ihrer Aufgabe nachkommen können. Eine weitere Annahme dieser Studie war, dass durch Proteininteraktion die ungeordnete PolyQ-Sequenz eine geordnete Sekundärstruktur einnimmt [170]. Diese Annahme unterstützt das Ergebnis aus den CD-Experimenten von RAL-2. Außerdem zeigten die Ergebnisse der DLS Messungen, dass RAL-2 in Lösung als Oligomer vorliegt. Diese Beobachtungen können zu der Annahme führen, dass RAL-2 ein Homooligomer bilden kann und durch die Bindung der Proteine die PolyQ Sequenz geordnet vorliegt.

Bei den Kristallisationsversuchen mit Ov7, Ov103, MIF-1 und RAL-2 konnten leider bislang keine beugenden Kristalle generiert werden. Analysen der Proteinsequenzen mit dem Programm XtalPred [171] zeigten, dass Ov7, Ov103 als auch RAL-2 einen relativ hohen Anteil ungeordneter und flexibler Regionen besitzen. Zumindest für Ov7 und Ov103 konnten diese im CD-Spektrum gezeigt werden. Diese beweglichen Regionen können den Kristallisationsprozess stören. Die PolyQ Sequenz von RAL-2 wurde ebenfalls als flexible und ungeordnete Region eingestuft.

Zur Unterstützung der Kristallisation von Ov103 wurden DARPins selektiert. Die DARPins sind in der Lage das gebundene Protein zu stabilisieren und können als Startpunkt des Kristallisationsprozesses dienen [172, 173]. Für Ov103 konnten 30

## Diskussion

DARPin selektiert werden und von diesen 30 DARPins wurden 16 auf die Komplexbildung mit Ov103 getestet. Dabei bildeten die DARPins n3 und o8 Komplexe mit Ov103. Die Beobachtungen während dieser Experimente zeigte, dass die DARPins in der Lage sind durch ihre Interaktion mit Ov103 das Protein vor Aggregation zu schützen. Eine Koexpression beider Proteine kann die Stabilität von Ov103 daher erhöhen und ein Komplex würde schon nach der Expression in den *E.coli* Zellen vorliegen. Außerdem kann bei dieser Methode Ov103 ohne His-Tag, Linkerregion und Proteaseschnittstelle produziert werden. Der Komplex kann mithilfe von Ni-NTA Affinitätschromatographie über das interagierende DARPin, das einen Hexahistidin-Tag besitzt, gereinigt werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG – SUMMARY

### 6.1 Zusammenfassung

Zyklisch übertragende Parasitosen stellen seit vielen Jahrhunderten eine bedeutende Bedrohung für die Gesundheit der Menschen in den subtropischen Gebieten Afrikas, Amerikas und Asiens dar. Die pathogenetischen Prozesse von Parasitosen sind bis heute weder immunologisch noch epidemiologisch ausreichend verstanden.

Die Identifikation und Entwicklung neuartiger Wirkstoffe ist deshalb von grundlegender Bedeutung. Im Fokus dieser Arbeit stehen daher ausgewählte Schlüsselenzyme und Peptide von zwei bedeutenden Parasitosen, der Onchozerkose und der Malaria.

Zum einen wurde die Glutathion-S-Transferase (PfGST) von *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der Malaria *tropica*, mit proteinbiochemischen und strukturbiochemischen Methoden charakterisiert. Dieses Enzym nimmt eine Schlüsselfunktion bei essentiellen Entgiftungsprozessen, insbesondere der Hämindetoxifikation ein. Es konnten hochaktive, neuartige Inhibitoren des Enzyms identifiziert werden. Diese Inhibitoren gehören zur Klasse der Xanthon- und Thioharnstoffderivate und wurden anhand von *in vitro* und *in vivo* Experimenten auf ihre Wirksamkeit geprüft. Darüber hinaus konnte mithilfe der Kristallstruktur der PfGST eine bisher nicht beschriebene, potenzielle Bindungsstelle für Häm in identifiziert und über molekulare Dockingverfahren verifiziert werden.

Im zweiten Teil der Arbeit konnten funktionell neuartige und bisher unbekannte niedermolekulare sekretorische Peptide von *Onchocerca ochengi*, dem Erreger der Onchozerkose bei Rindern, identifiziert werden. Im Rahmen von Aktivitätsstudien konnte überraschenderweise auch nachgewiesen werden, dass diese Peptide zum Teil sowohl eine antibakterielle als auch antiplasmodiale Aktivität aufweisen. Weiterhin konnten insgesamt vier verschiedene sekretorische Proteine von *Onchocerca volvulus*, dem humanpathogenen Erreger der Onchozerkose erfolgreich exprimiert, gereinigt und proteinchemisch charakterisiert werden. Bei den Proteinen handelt es sich um Ov7, Ov103, MIF-1 und RAL-2. Von keinem dieser Proteine liegen hochaufgelöste Strukturinformationen vor und über die biologische Funktion ist

bisher wenig bekannt. Diese Arbeiten haben den Grundstein für eine weiterführende strukturbioologische Charakterisierung gelegt.

## 6.2 Summary

Over the centuries cyclically transmitted parasitic diseases represent a major burden for the health of the populations in sub-saharan Africa, America and Asia. Until now the pathogenetic processes of the parasitoses are not understood sufficiently neither immunologically nor epidemiologically. The identification and development of novel drugs, in particular inhibitors of essential proteins is therefore of fundamental importance. This thesis is focussed on selected key enzymes and peptides of two major parasitic diseases, onchocerciasis and malaria.

In the first part, the glutathione S-transferase of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* (PfGST) has been characterized structurally and enzymatically. This enzyme plays a key role in essential detoxification processes, especially the heme detoxification. It was possible to identify highly active, novel inhibitors of the enzyme. These inhibitors belong to the class of xanthone and thiourea derivatives and their activity was studied by *in vitro* and *in vivo* experiments. Moreover, a previously undescribed but potential binding site of heme in the crystal structure of the PfGST was identified and eventually verified by molecular docking experiments.

In the second part, so far unknown low molecular weight peptides from *Onchocerca ochengi* were identified. It was demonstrated, that some peptides exhibit both antibacterial and antiplasmodial activity. Furthermore, a total of four different secretory proteins from *Onchocerca volvulus* have been successfully expressed, purified and characterized. The proteins are called Ov7, Ov103, MIF-1 and RAL-2.

So far high-resolution structural data are not available and the biological function is poorly understood as well. This work is the basis for further structural biology studies on these proteins.

## 7 REFERENZEN

- [1] Crofton HD. A model of host-parasite relationships. *Parasitology*, 1971. **63**(3): p. 343-64.
- [2] Ashford R and Crewe W. *The Parasites of Homo Sapiens: An Annotated Checklist of the Protozoa, Helminths, and Arthropods for Which We Are Home*. 2003: CRC Press.
- [3] Hotez PJ et al. Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest*, 2008. **118**(4): p. 1311-21.
- [4] Hotez PJ et al. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med*, 2007. **357**(10): p. 1018-27.
- [5] Zhang Y et al. Control of neglected tropical diseases needs a long-term commitment. *BMC Med*, 2010. **8**: p. 67.
- [6] Allen JE et al. Of mice, cattle, and humans: the immunology and treatment of river blindness. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008. **2**(4): p. e217.
- [7] Omura S and Crump A. The life and times of ivermectin - a success story. *Nat Rev Microbiol*, 2004. **2**(12): p. 984-9.
- [8] African Programme for Onchocerciasis Control - report of the sixth meeting of national task forces, October 2009. *Wkly Epidemiol Rec*, 2010. **85**(4): p. 23-8.
- [9] WHO. WHO world malaria report 2012. 2012
- [10] Tuteja R. Malaria - an overview. *FEBS J*, 2007. **274**(18): p. 4670-9.
- [11] Wenk P and Renz A. *Parasitologie: Biologie der Humanparasiten*. 2003: Georg Thieme.
- [12] Chautard E, Thierry-Mieg N, and Ricard-Blum S. Interaction networks: from protein functions to drug discovery. A review. *Pathol Biol (Paris)*, 2009. **57**(4): p. 324-33.
- [13] Simonis N et al. Empirically controlled mapping of the *Caenorhabditis elegans* protein-protein interactome network. *Nat Methods*, 2009. **6**(1): p. 47-54.
- [14] Sharan R, Ulitsky I, and Shamir R. Network-based prediction of protein function. *Mol Syst Biol*, 2007. **3**: p. 88.
- [15] Walhout AJ and Vidal M. Protein interaction maps for model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. **2**(1): p. 55-62.
- [16] Brikos C and O'Neill LA. Signalling of toll-like receptors. *Handb Exp Pharmacol*, 2008(183): p. 21-50.
- [17] Hu X, Chakravarty SD and Ivashkiv LB. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol Rev*, 2008. **226**: p. 41-56.
- [18] Kawaguchi Y et al. Contribution of single nucleotide polymorphisms of the IL1A gene to the cleavage of precursor IL-1alpha and its transcription activity. *Immunogenetics*, 2007. **59**(6): p. 441-8.
- [19] Reschner A et al. Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. *Clin Exp Immunol*, 2008. **152**(2): p. 219-26.
- [20] Andre JB, Ferdy JB, Godelle B. Within-host parasite dynamics, emerging trade-off, and evolution of virulence with immune system. *Evolution*, 2003. **57**(7): p. 1489-97.

## Referenzen

- [21] Salzet M, Capron A, Stefano GB. Molecular crosstalk in host-parasite relationships: schistosome- and leech-host interactions. *Parasitol Today*, 2000. **16**(12): p. 536-40.
- [22] Rao A et al. Cerebral malaria: insights from host-parasite protein-protein interactions. *Malar J*, 2010. **9**: p. 155.
- [23] WHO. World malaria report 2008. 2008
- [24] WHO. African Malaria Day Fact Sheet (WHO). 2012
- [25] Ahmad R and Srivastava AK. Purification and biochemical characterization of cytosolic glutathione-S-transferase from malarial parasites *Plasmodium yoelii*. *Parasitol Res*, 2007. **100**(3): p. 581-8.
- [26] Daily JP. Antimalarial drug therapy: the role of parasite biology and drug resistance. *J Clin Pharmacol*, 2006. **46**(12): p. 1487-97.
- [27] WHO. WHO world malaria report 2011. 2011
- [28] Lang W and Löscher T. *Tropenmedizin in Klinik und Praxis*. Vol. 3. 2000: Thieme.
- [29] Bozdech Z et al. The transcriptome of the intraerythrocytic developmental cycle of *Plasmodium falciparum*. *PLoS Biol*, 2003. **1**(1): p. E5.
- [30] Le Roch KG et al. Discovery of gene function by expression profiling of the malaria parasite life cycle. *Science*, 2003. **301**(5639): p. 1503-8.
- [31] Deponte M and Becker K. Glutathione S-transferase from malarial parasites: structural and functional aspects. *Methods Enzymol*, 2005. **401**: p. 241-53.
- [32] Armstrong RN. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. *Chem Res Toxicol*, 1997. **10**(1): p. 2-18.
- [33] Jakoby WB. *Enzymatic Basis of Detoxification* Vol. 2 1980, New York: Academic Press.
- [34] Hiller N et al. *Plasmodium falciparum* glutathione S-transferase--structural and mechanistic studies on ligand binding and enzyme inhibition. *Protein Sci*, 2006. **15**(2): p. 281-9.
- [35] Mannervik B and Danielson UH. Glutathione transferases--structure and catalytic activity. *CRC Crit Rev Biochem*, 1988. **23**(3): p. 283-337.
- [36] Frova C. Glutathione transferases in the genomics era: new insights and perspectives. *Biomol Eng*, 2006. **23**(4): p. 149-69.
- [37] Harwaldt P, Rahlfs S, Becker K. Glutathione S-transferase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: characterization of a potential drug target. *Biol Chem*, 2002. **383**(5): p. 821-30.
- [38] Hayes JD and Strange RC. Potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress. *Free Radic Res*, 1995. **22**(3): p. 193-207.
- [39] Salinas AE and Wong MG. Glutathione S-transferases--a review. *Curr Med Chem*, 1999. **6**(4): p. 279-309.
- [40] Perbandt M et al. Native and inhibited structure of a Mu class-related glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(2): p. 1336-42.
- [41] Fritz-Wolf K et al. X-ray structure of glutathione S-transferase from the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(24): p. 13821-6.
- [42] Liebau E et al. The glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol*, 2002. **124**(1-2): p. 85-90.
- [43] Liebau E et al. Biochemical analysis, gene structure and localization of the 24

## Referenzen

- kDa glutathione S-transferase from *Onchocerca volvulus*. Mol Biochem Parasitol, 1996. **80**(1): p. 27-39.
- [44] Becker K et al. Glutathione--functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. Biol Chem, 2003. **384**(4): p. 551-66.
- [45] Becker K et al. Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. Int J Parasitol, 2004. **34**(2): p. 163-89.
- [46] Liebau E et al. Tetramerization and cooperativity in *Plasmodium falciparum* glutathione S-transferase are mediated by atypic loop 113-119. J Biol Chem, 2009. **284**(33): p. 22133-9.
- [47] Weir E, Haider S, Telio D. Trachoma: leading cause of infectious blindness. CMAJ, 2004. **170**(8): p. 1225.
- [48] Enk CD. Onchocerciasis--river blindness. Clinics in dermatology, 2006. **24**(3): p. 176-180.
- [49] WHO, First WHO Report on Neglected Tropical Diseases: Working to Overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases. 2010, WHO.
- [50] Basanez MG et al. River blindness: a success story under threat? PLoS Med, 2006. **3**(9): p. e371.
- [51] Crump A, Morel CM, Omura S. The onchocerciasis chronicle: from the beginning to the end? Trends Parasitol, 2012. **28**(7): p. 280-8.
- [52] Harris N and Gause WC. To B or not to B: B cells and the Th2-type immune response to helminths. Trends Immunol, 2011. **32**(2): p. 80-8.
- [53] Oliphant CJ, Barlow JL, McKenzie AN, Insights into the initiation of type 2 immune responses. Immunology, 2011. **134**(4): p. 378-85.
- [54] Anthony RM et al. Protective immune mechanisms in helminth infection. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(12): p. 975-87.
- [55] Carvalho L et al., Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: mechanisms underlying helminth modulation of dendritic cell function. Immunology, 2009. **126**(1): p. 28-34.
- [56] Cooke A. Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: how might infection modulate the onset of type 1 diabetes? Immunology, 2009. **126**(1): p. 12-7.
- [57] David T et al. The impact of infection on the incidence of autoimmune disease. Curr Top Med Chem, 2004. **4**(5): p. 521-9.
- [58] Maizels RM. Infections and allergy - helminths, hygiene and host immune regulation. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(6): p. 656-61.
- [59] van Riet E, Hartgers FC, Yazdanbakhsh M. Chronic helminth infections induce immunomodulation: consequences and mechanisms. Immunobiology, 2007. **212**(6): p. 475-90.
- [60] Babu S et al. Regulatory networks induced by live parasites impair both Th1 and Th2 pathways in patent lymphatic filariasis: implications for parasite persistence. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 3248-56.
- [61] Hokke CH, Fitzpatrick JM, Hoffmann KF. Integrating transcriptome, proteome and glycome analyses of *Schistosoma* biology. Trends Parasitol, 2007. **23**(4): p. 165-74.
- [62] Jang-Lee J et al. Glycomics analysis of *Schistosoma mansoni* egg and cercarial secretions. Mol Cell Proteomics, 2007. **6**(9): p. 1485-99.
- [63] Schabussova I et al. O-methylated glycans from *Toxocara* are specific targets for antibody binding in human and animal infections. Int J Parasitol, 2007. **37**(1): p. 97-109.

## Referenzen

- [64] Lustigman S et al. Molecular cloning and characterization of onchocystatin, a cysteine proteinase inhibitor of *Onchocerca volvulus*. J Biol Chem, 1992. **267**(24): p. 17339-46.
- [65] Maizels RM et al. Helminth parasites--masters of regulation. Immunol Rev, 2004. **201**: p. 89-116.
- [66] Schonemeyer A et al. Modulation of human T cell responses and macrophage functions by onchocystatin, a secreted protein of the filarial nematode *Onchocerca volvulus*. J Immunol, 2001. **167**(6): p. 3207-15.
- [67] Gomez-Escobar N, Gregory WF, and Maizels RM. Identification of tgh-2, a filarial nematode homolog of *Caenorhabditis elegans* daf-7 and human transforming growth factor beta, expressed in microfilarial and adult stages of *Brugia malayi*. Infect Immun, 2000. **68**(11): p. 6402-10.
- [68] Korten S et al. The nematode parasite *Onchocerca volvulus* generates the transforming growth factor-beta (TGF-beta). Parasitol Res, 2009. **105**(3): p. 731-41.
- [69] Marson AL, Tarr DE, Scott AL, Macrophage migration inhibitory factor (mif) transcription is significantly elevated in *Caenorhabditis elegans* dauer larvae. Gene, 2001. **278**(1-2): p. 53-62.
- [70] Vermeire JJ et al. Orthologs of macrophage migration inhibitory factor from parasitic nematodes. Trends Parasitol, 2008. **24**(8): p. 355-63.
- [71] Hewitson JP et al. The secretome of the filarial parasite, *Brugia malayi*: proteomic profile of adult excretory-secretory products. Mol Biochem Parasitol, 2008. **160**(1): p. 8-21.
- [72] James ER, McLean DC, Perler F. Molecular cloning of an *Onchocerca volvulus* extracellular Cu-Zn superoxide dismutase. Infect Immun, 1994. **62**(2): p. 713-6.
- [73] Lu W et al. Thioredoxin peroxidase from *Onchocerca volvulus*: a major hydrogen peroxide detoxifying enzyme in filarial parasites. Mol Biochem Parasitol, 1998. **91**(2): p. 221-35.
- [74] Schrum S et al. Identification of a peroxidoxin protein (OvPXN-2) of the human parasitic nematode *Onchocerca volvulus* by sequential protein fractionation. Mol Biochem Parasitol, 1998. **94**(1): p. 131-5.
- [75] McKerrow JH. Parasite proteases. Exp Parasitol, 1989. **68**(1): p. 111-5.
- [76] Tort J et al. Proteinases and associated genes of parasitic helminths. Adv Parasitol, 1999. **43**: p. 161-266.
- [77] Bradley JE et al. *Onchocerca volvulus*: characterization of an immunodominant hypodermal antigen present in adult and larval parasites. Exp Parasitol, 1993. **77**(4): p. 414-24.
- [78] Frank GR et al. Molecular cloning of the 22-24 kDa excretory-secretory 22U protein of *Dirofilaria immitis* and other filarial nematode parasites. Mol Biochem Parasitol, 1999. **98**(2): p. 297-302.
- [79] Gregory WF et al. The abundant larval transcript-1 and -2 genes of *Brugia malayi* encode stage-specific candidate vaccine antigens for filariasis. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 4174-9.
- [80] Lustigman S et al. Identification and characterization of an *Onchocerca volvulus* cDNA clone encoding a microfilarial surface-associated antigen. Mol Biochem Parasitol, 1992. **50**(1): p. 79-93.
- [81] Wu Y et al. The Secreted Larval Acidic Proteins (SLAPs) of *Onchocerca* spp. are encoded by orthologues of the alt gene family of *Brugia malayi* and have

## Referenzen

- host protective potential. *Mol Biochem Parasitol*, 2004. **134**(2): p. 213-24.
- [82] Scopes RK. Measurement of protein by spectrophotometry at 205 nm. *Anal Biochem*, 1974. **59**(1): p. 277-82.
- [83] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
- [84] Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*, 2006. **1**(6): p. 2876-90.
- [85] Kelly SM and Price NC. Circular dichroism to study protein interactions. *Curr Protoc Protein Sci*, 2006. **Chapter 20**: p. Unit 20 10.
- [86] Whitmore L and Wallace BA. Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. *Biopolymers*, 2008. **89**(5): p. 392-400.
- [87] Guinier A. La diffraction des rayons X aux tres petits angles; application a l'etude de phenomenes ultramicroscopiques. *Ann. Phys.*, 1939. **12**: p. 161-237.
- [88] Svergun DI. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. *Journal of Applied Crystallography*, 1992. **25**(4): p. 495-503.
- [89] Konarev PV et al. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *Journal of Applied Crystallography*, 2003. **36**(5): p. 1277-1282.
- [90] Svergun DI. Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing. *Biophys J*, 1999. **76**(6): p. 2879-86.
- [91] Franke D and Svergun DI. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *Journal of Applied Crystallography*, 2009. **42**(2): p. 342-346.
- [92] Chayen NE and Saridakis E. Protein crystallization: from purified protein to diffraction-quality crystal. *Nat Methods*, 2008. **5**(2): p. 147-53.
- [93] Matthews BW. Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol*, 1968. **33**(2): p. 491-7.
- [94] Otwinowski Z and Minor W. Processing of X-ray diffraction data. *Methods in enzymology*, 1997. **276**: p. 307-326.
- [95] Murshudov GN et al. Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999. **55**(Pt 1): p. 247-55.
- [96] Brunger AT. Assessment of phase accuracy by cross validation: the free R value. *Methods and applications. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1993. **49**(Pt 1): p. 24-36.
- [97] CCP4, The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1994. **50**(Pt 5): p. 760-3.
- [98] Perrakis A, Morris R, and Lamzin VS. Automated protein model building combined with iterative structure refinement. *Nat Struct Biol*, 1999. **6**(5): p. 458-63.
- [99] Laskowski RA et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*, 1993. **26**(2): p. 283-291.
- [100] Hutchinson EG et al. PDBsum: a Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. *Trends in biochemical sciences*, 1997. **22**(12):

## Referenzen

- p. 488-490.
- [101] Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM, LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng*, 1995. **8**(2): p. 127-34.
  - [102] Andrade MA, Perez-Iratxeta C, Ponting CP, Protein repeats: structures, functions, and evolution. *J Struct Biol*, 2001. **134**(2-3): p. 117-31.
  - [103] Mosavi LK, Minor DL, Peng ZY. Consensus-derived structural determinants of the ankyrin repeat Motif. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(25): p. 16029-34.
  - [104] Das Gupta R et al. 3-Aminoxy-1-aminopropane and derivatives have an antiproliferative effect on cultured *Plasmodium falciparum* by decreasing intracellular polyamine concentrations. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005. **49**(7): p. 2857-64.
  - [105] Batista R, Silva Ade J, de Oliveira AB. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines. Part II. Non-alkaloidal natural products. *Molecules*, 2009. **14**(8): p. 3037-72.
  - [106] Lin CY et al. Transgenic zebrafish eggs containing bactericidal peptide is a novel food supplement enhancing resistance to pathogenic infection of fish. *Fish Shellfish Immunol*, 2010. **28**(3): p. 419-27.
  - [107] Zhang Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 2008. **9**: p. 40.
  - [108] Schirmer RH, Müller JG, Krauth-Siegel RL. Disulfide-Reductase Inhibitors as Chemotherapeutic Agents: The Design of Drugs for Trypanosomiasis and Malaria. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 1995. **34**(2): p. 141-154.
  - [109] Roberts JC. Naturally Occurring Xanthenes. *Chemical Reviews*, 1961. **61**(6): p. 591-605.
  - [110] Riscoe M, Kelly JX, Winter R. Xanthenes as antimalarial agents: discovery, mode of action, and optimization. *Curr Med Chem*, 2005. **12**(21): p. 2539-49.
  - [111] Winter RW et al. Potentiation of the antimalarial agent rufigallol. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996. **40**(6): p. 1408-11.
  - [112] Winter RW et al. Hydroxy-anthraquinones as antimalarial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1995. **5**(17): p. 1927-1932.
  - [113] Sunduru N et al. Synthesis of novel thiourea, thiazolidinedione and thioparabanic acid derivatives of 4-aminoquinoline as potent antimalarials. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009. **19**(9): p. 2570-3.
  - [114] Verlinden BK et al. Discovery of novel alkylated (bis)urea and (bis)thiourea polyamine analogues with potent antimalarial activities. *J Med Chem*, 2011. **54**(19): p. 6624-33.
  - [115] Hay AE et al. Antimalarial xanthenes from *Calophyllum caledonicum* and *Garcinia vieillardii*. *Life Sci*, 2004. **75**(25): p. 3077-85.
  - [116] Likhitwitayawuid K, Phadungcharoen T, Krungkrai J. Antimalarial xanthenes from *Garcinia cowa*. *Planta Med*, 1998. **64**(1): p. 70-2.
  - [117] Zelefsack F et al. Cytotoxic and antiplasmodial xanthenes from *Pentadesma butyracea*. *J Nat Prod*, 2009. **72**(5): p. 954-7.
  - [118] Liebau E et al. Cooperativity and pseudo-cooperativity in the glutathione S-transferase from *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(28): p. 26121-8.
  - [119] Axarli IA, Rigden DJ, Labrou NE. Characterization of the ligandin site of maize

## Referenzen

- glutathione S-transferase I. *Biochem J*, 2004. **382**(Pt 3): p. 885-93.
- [120] Ji X et al Location of a potential transport binding site in a sigma class glutathione transferase by x-ray crystallography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(16): p. 8208-13.
- [121] McTigue MA, Williams DR, Tainer JA. Crystal structures of a schistosomal drug and vaccine target: glutathione S-transferase from *Schistosoma japonica* and its complex with the leading antischistosomal drug praziquantel. *J Mol Biol*, 1995. **246**(1): p. 21-7.
- [122] Oakley AJ et al. The ligandin (non-substrate) binding site of human Pi class glutathione transferase is located in the electrophile binding site (H-site). *J Mol Biol*, 1999. **291**(4): p. 913-26.
- [123] Prade L et al. Structures of class pi glutathione S-transferase from human placenta in complex with substrate, transition-state analogue and inhibitor. *Structure*, 1997. **5**(10): p. 1287-95.
- [124] Ralat LA and Colman RF. Identification of tyrosine 79 in the tocopherol binding site of glutathione S-transferase pi. *Biochemistry*, 2006. **45**(41): p. 12491-9.
- [125] Caccuri AM et al. Interaction of Hemin with placental glutathione transferase. *Eur J Biochem*, 1990. **189**(3): p. 493-7.
- [126] Maresso AW, Chapa TJ, Schneewind O. Surface protein IsdC and Sortase B are required for heme-iron scavenging of *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(23): p. 8145-52.
- [127] Maresso AW, Garufi G, Schneewind O. *Bacillus anthracis* secretes proteins that mediate heme acquisition from hemoglobin. *PLoS Pathog*, 2008. **4**(8): p. e1000132.
- [128] Kim HS et al. Pepsin-mediated processing of the cytoplasmic histone H2A to strong antimicrobial peptide buforin I. *J Immunol*, 2000. **165**(6): p. 3268-74.
- [129] Kuwata H et al. Bactericidal domain of lactoferrin: detection, quantitation, and characterization of lactoferricin in serum by SELDI affinity mass spectrometry. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **245**(3): p. 764-73.
- [130] Moreno Y and Geary TG. Stage- and gender-specific proteomic analysis of *Brugia malayi* excretory-secretory products. *PLoS Negl Trop Dis*, 2008. **2**(10): p. e326.
- [131] Jenkins SJ et al. Schistosome larvae stimulate macrophage cytokine production through TLR4-dependent and -independent pathways. *Int Immunol*, 2005. **17**(11): p. 1409-18.
- [132] Thomas PG et al. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth glycan uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol*, 2003. **171**(11): p. 5837-41.
- [133] Brattig NW et al. Identification of the lipid mediator prostaglandin E2 in tissue immune cells of humans infected with the filaria *Onchocerca volvulus*. *Acta Trop*, 2009. **112**(2): p. 231-5.
- [134] van der Kleij D et al. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lysophosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem*, 2002. **277**(50): p. 48122-9.
- [135] Bowdish DM et al. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J Leukoc Biol*, 2005. **77**(4): p. 451-9.
- [136] Hancock RE and Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol*, 2000. **8**(9): p. 402-10.
- [137] Andes D et al. In vivo pharmacodynamic characterization of a novel plectasin

## Referenzen

- antibiotic, NZ2114, in a murine infection model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009. **53**(7): p. 3003-9.
- [138] Hsu KH et al. Production of bioactive human alpha-defensin 5 in *Pichia pastoris*. *J Gen Appl Microbiol*, 2009. **55**(5): p. 395-401.
- [139] Mookherjee N and Hancock RE. Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell Mol Life Sci*, 2007. **64**(7-8): p. 922-33.
- [140] Giuliani A, Pirri G, and Rinaldi AC. Antimicrobial peptides: the LPS connection. *Methods Mol Biol*, 2010. **618**: p. 137-54.
- [141] Murakami T et al. Antimicrobial cathelicidin polypeptide CAP11 suppresses the production and release of septic mediators in D-galactosamine-sensitized endotoxin shock mice. *Int Immunol*, 2009. **21**(8): p. 905-12.
- [142] Castellheim A et al. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Scand J Immunol*, 2009. **69**(6): p. 479-91.
- [143] Lehmann V, Freudenberg MA, Galanos C. Lethal toxicity of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor in normal and D-galactosamine-treated mice. *J Exp Med*, 1987. **165**(3): p. 657-63.
- [144] Morrison DC et al. Bacterial endotoxins and pathogenesis of Gram-negative infections: current status and future direction. *Journal of Endotoxin Research*, 1994. **1**(2): p. 71-83.
- [145] Cotton S et al. Defense peptides secreted by helminth pathogens: antimicrobial and/or immunomodulator molecules? *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 269.
- [146] Zasloff M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 2002. **415**(6870): p. 389-95.
- [147] Robinson MW et al. A family of helminth molecules that modulate innate cell responses via molecular mimicry of host antimicrobial peptides. *PLoS Pathog*, 2011. **7**(5): p. e1002042.
- [148] Robinson MW et al. A helminth cathelicidin-like protein suppresses antigen processing and presentation in macrophages via inhibition of lysosomal vATPase. *FASEB J*, 2012. **26**(11): p. 4614-27.
- [149] Ferraz AA et al. Gut bacterial translocation and postoperative infections: a prospective study in schistosomal patients. *Surg Infect (Larchmt)*, 2005. **6**(2): p. 197-201.
- [150] Herbert DR et al. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*, 2004. **20**(5): p. 623-35.
- [151] Ogunrinade A and Adegoke GO. Bovine fascioliasis in Nigeria--intercurrent parasitic and bacterial infections. *Trop Anim Health Prod*, 1982. **14**(2): p. 121-5.
- [152] Valero MA et al. High risk of bacterobilia in advanced experimental chronic fasciolosis. *Acta Trop*, 2006. **100**(1-2): p. 17-23.
- [153] Melhem RF and LoVerde PT. Mechanism of interaction of *Salmonella* and *Schistosoma* species. *Infect Immun*, 1984. **44**(2): p. 274-81.
- [154] Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 2005. **3**(3): p. 238-50.
- [155] Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(9): p. 710-20.

## Referenzen

- [156] Vizioli J and Salzet M. Antimicrobial peptides from animals: focus on invertebrates. *Trends Pharmacol Sci*, 2002. **23**(11): p. 494-6.
- [157] Cole AM et al. Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol*, 2001. **167**(2): p. 623-7.
- [158] Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun*, 2002. **70**(12): p. 6524-33.
- [159] Allaker RP and Kapas S. Adrenomedullin and mucosal defence: interaction between host and microorganism. *Regul Pept*, 2003. **112**(1-3): p. 147-52.
- [160] Kowalska K, Carr DB, Lipkowski AW. Direct antimicrobial properties of substance P. *Life Sci*, 2002. **71**(7): p. 747-50.
- [161] Liepke C et al. Human hemoglobin-derived peptides exhibit antimicrobial activity: a class of host defense peptides. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2003. **791**(1-2): p. 345-56.
- [162] Afacan NJ et al. Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. *Curr Pharm Des*, 2012. **18**(6): p. 807-19.
- [163] Torrent M et al. Antimicrobial peptide action on parasites. *Curr Drug Targets*, 2012. **13**(9): p. 1138-47.
- [164] Perbandt M et al. Structure of the extracellular glutathione S-transferase OvGST1 from the human pathogenic parasite *Onchocerca volvulus*. *J Mol Biol*, 2008. **377**(2): p. 501-11.
- [165] Turk V and Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett*, 1991. **285**(2): p. 213-9.
- [166] Sun HW et al. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(11): p. 5191-6.
- [167] Tan TH et al. Macrophage migration inhibitory factor of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Biochem J*, 2001. **357**(Pt 2): p. 373-83.
- [168] Gatchel JR and Zoghbi HY. Diseases of unstable repeat expansion: mechanisms and common principles. *Nat Rev Genet*, 2005. **6**(10): p. 743-55.
- [169] Hands S, Sinadinos C, Wyttenbach A. Polyglutamine gene function and dysfunction in the ageing brain. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1779**(8): p. 507-21.
- [170] Schaefer MH, Wanker EE, Andrade-Navarro MA. Evolution and function of CAG/polyglutamine repeats in protein-protein interaction networks. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(10): p. 4273-87.
- [171] Slabinski L et al. XtalPred: a web server for prediction of protein crystallizability. *Bioinformatics*, 2007. **23**(24): p. 3403-5.
- [172] Bandejas TM et al. Structure of wild-type Plk-1 kinase domain in complex with a selective DARPIn. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2008. **64**(Pt 4): p. 339-53.
- [173] Binz HK et al. Designing repeat proteins: well-expressed, soluble and stable proteins from combinatorial libraries of consensus ankyrin repeat proteins. *J Mol Biol*, 2003. **332**(2): p. 489-503.

## 8 GEFAHREN – UND SICHERHEITSHINWEISE

### 8.1 Benutzte Chemikalien (GHS Einstufung)

Verbindung	CAS-Nr.	Hersteller	GHS Gefahr	Gefahrenhinweise	Vorsorgehinweise
<b>Acetonitril</b>	75-05-8	Merck	<b>GHS02</b> <b>GHS08</b>	H225, H302, H312, H319, H332,	P210, P403+235, P305+351+338
<b>Acrylamide 30%</b>	79-06-1	Carl Roth	<b>GHS06</b> <b>GHS08</b>	H301, H312, H316, H317, H319, H332, H340, H350, H361f, H372	P201, P280, P301+310, P305+351+338, P308+313
<b>Agarose</b>	9012-36-6	Serva	-	-	-
<b>Methansäure</b>	64-18-6	Sigma	<b>GHS02</b> <b>GHS05</b>	H226, H314	P260, P280 P301+330+331, P305+351+338, P309, P310
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	12125-02-9	Merck	<b>GHS07</b> <b>GHS08</b>	H302, H319	P305+351+338
<b>NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	7722-76-1	Sigma	-	-	-
<b>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	7283-20-2	Carl Roth	-	-	-
<b>Ampicillin</b>	69-52-3	Carl Roth	<b>GHS08</b>	H334, H317	P280, P261, P302+P352, P342+P311
<b>APS</b>	7727-54-0	Carl Roth	<b>GHS03</b> <b>GHS07</b> <b>GHS08</b>	H272, H302, H315, H317, H319, H334; H335	P280, P305+351+338, P302+352, P304+341, P342+311
<b>Bromphenol- blau</b>	115-39-9	Applichem	-	-	-
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	10043-52-4	Merck	<b>GHS07</b>	H319	P305+351+338
<b>CDNB</b>	97-00-7	Sigma	<b>GHS06</b> <b>GHS08</b> <b>GHS09</b>	H301, H311, H331, H373, H410	P280, P273, P302+352, P304+340, P309, P310
<b>Coomassie Brilliant Blau R250</b>	6104-59-2	Serva	-	-	-

Gefahren – und Sicherheitshinweise

Verbindung	CAS-Nr.	Hersteller	GHS Gefahr	Gefahrenhinweise	Vorsorgehinweise
<b>CuCl<sub>2</sub></b>	7447-39-4	Sigma	<b>GHS07</b> <b>GHS09</b>	H302, H315, H319, H410	P260, P273, P302+352, P305+351+338
<b>DMSO</b>	67-68-5	Sigma	-	-	-
<b>DTT</b>	578517	Appllichem	<b>GHS07</b>	H302, H315, H319, H335	P302+352, P305+351+338
<b>EDTA</b>	60-00-4	Sigma	<b>GHS07</b>	H319	P305+351+338
<b>Essigsäure</b>	64-19-7	VWR	<b>GHS02</b> <b>GHS05</b>	H226, H314	P280, P305+351+338, P310
<b>FeCl<sub>2</sub></b>	7758-94-3	Sigma	<b>GHS05</b> <b>GHS07</b>	H302, H315, H318	P280, P302+352, P305+351+338
<b>Glycin</b>	56-40-6	Fisher	-	-	-
<b>Glycerin</b>	56-81-5	Sigma	-	-	-
<b>GSH</b>	70-18-8	Carl Roth	-	-	-
<b>Guanidinhydrochlorid</b>	50-01-1	Appllichem	<b>GHS07</b>	H302, H315, H319	P305+P351+P388, P302+P352
<b>Hefeextrakt</b>	8013-01-2	Serva	-	-	-
<b>Hepes</b>	7365-45-9	Sigma Aldrich	-	-	-
<b>Imidazol</b>	288-32-4	Carl Roth	<b>GHS05</b> <b>GHS06</b> <b>GHS08</b>	H301; H314; H361	P260, P281, P303+P361+P353, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P308+P313
<b>Imidazolmalat</b>					
<b>IPTG</b>	367-93-1	Carl Roth			
<b>Isopropanol</b>	67-63-0	Carl Roth	<b>GHS02</b> <b>GHS07</b>	H225, H319, H336.	P210, P233, P305+351+338
<b>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	7758-11-4	Carl Roth	-	-	-
<b>KCl</b>	7447-40-7	Carl Roth	-	-	-
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	7778-77-0	Merck	-	-	-
<b>KI</b>	7681-11-0	Sigma	-	-	-

Gefahren – und Sicherheitshinweise

Verbindung	CAS-Nr.	Hersteller	GHS Gefahr	Gefahrenhinweise	Vorsorgehinweise
<b>Li<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	10377-48-7	Merck	<b>GHS07</b>	H302	
<b>MES</b>	4432-31-9	Applichem	<b>GHS07</b>	H315, H319, H335	P261, P305+351+338
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	7786-30-3	Carl Roth	-	-	-
<b>MgSO<sub>4</sub></b>	7487-88-9	Merck	-	-	-
<b>Methanol</b>	67-56-1	Carl Roth	<b>GHS02</b> <b>GHS06</b> <b>GHS08</b>	H225, H301, H311, H331, H370	P210, P280, P233, P302+P352, P309, P310
<b>NaOAc</b>	127-09-3	Applichem	-	-	-
<b>NaCl</b>	7647-14-5	Carl Roth	-	-	-
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	7558-79-4	Carl Roth	-	-	-
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	10049-21-5	Applichem	-	-	-
<b>NaOH</b>	1310-73-2	Merck	<b>GHS05</b>	H314	P280, P310, P305+351+338
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	7757-82-6	Grüssing	-	-	-
<b>Ni<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	10101-97-0	Applichem	<b>GHS08</b> <b>GHS09</b> <b>GHS07</b>	H332, H315, H334, H317, H341, H350i, H360D, H372 H410	P280, P273, P201, P342+P311, P308+P313, P302+P352
<b>PEG 10000</b>	25322-68-3	Merck	-	-	-
<b>PEG 1500</b>	25322-68-3	Fluka	-	-	-
<b>PEG 550 MME</b>	25322-68-3	Fluka	-	-	-
<b>PEG 4000</b>	25322-68-3	Merck	-	-	-
<b>PMSF</b>	329-98-6	Applichem	<b>GHS06</b> <b>GHS05</b>	H301, H314	P280, P305+P351+P338, P310
<b>Salzsäure &gt;25 %</b>	7647-01-0	Merck	<b>GHS05</b> <b>GHS07</b>	H314, H335	P261, P280, P310, P305+351+338
<b>SDS</b>	151-21-3	Sigma	<b>GHS02</b> <b>GHS06</b>	H228, H302, H311, H315, H319, H335	P210, P261, P280, P312, P305+351+338
<b>TCA</b>	76-03-9	Sigma	<b>GHS05</b> <b>GHS09</b>	H314, H410	P273, P280, P301+P330+P331, P305+351+338, P309+P310

## Gefahren – und Sicherheitshinweise

Verbindung	CAS-Nr.	Hersteller	GHS Gefahr	Gefahrenhinweise	Vorsorgehinweise
<b>TEMED</b>	110-18-9	Merck	<b>GHS02 GHS05 GHS07</b>	H225, H302, H314, H332	P261, P280, P305+351+338
<b>TFA</b>	76-05-1	Sigma	<b>GHS05 GHS07</b>	H314, H332, H412	P273, P280, P301+P330+P331, P305+351+338, P309+P310
<b>Tris</b>	1185-53-1	Fluka	<b>GHS07</b>	H315, H319, H335	P261, P305+351+338
<b>Tween 20</b>	9005-64-5	Carl Roth	-	-	-
<b>ZnCl<sub>2</sub></b>	7646-85-7	Merck	<b>GHS05 GHS07 GHS09</b>	H302, H314, H410	P273, P280, P301+P330+P331, P305+351+338, P309+P310

## 8.2 Kommerzielle Protein Screenings und Kits

Name	Hersteller	Gefahrenzeichen	Risikosätze	Sicherheitssätze
<b>Floppy Choppy</b>	Jena Bio Science	<b>C, Xn, Xi</b>	R35, R41, R42, R36/37/38	S22, S26, S45, S24/25, S36/37/39:
<b>PACT premier</b>	Molecular Dimensions	<b>T</b>	R23/25, R52/53	S20, S36, S45, S61
<b>Stura / Footprint</b>	Molecular Dimensions	<b>T, N</b>	R10, R45, R46, R60, R61, R25, R36/37/38, R48/20/22, R51/53	S20, S26, S45, S53, S61, S36/37/39
<b>Classic Suite</b>	Qiagen	<b>T, N</b>	R10, R45, R46, R60, R61, R23/25, R36/37/38, R48/20/22, R51/53	S20, S26, S45, S53, S36/37/39.
<b>ComPAS Suite</b>	Qiagen	<b>T</b>	R10, R45, R23/24/25, R36/38, R39/23/24/25, R51/53	S13, S26, S45, S53, S61, S36/37/39.

## Gefahren – und Sicherheitshinweise

Name	Hersteller	Gefahrenzeichen	Risikosätze	Sicherheitssätze
<b>Cryos Suite</b>	Qiagen	<b>T, N</b>	R10, R45, R46, R60, R61, R23/25, R36/37/38, R48/20/22, R51/53	S20, S26, S45, S53, S61, S36/37/39.
<b>JCSG+ Suite</b>	Qiagen	<b>T, N</b>	R10, R21, R41, R45, R23/25, R37/38, R51/53	S13, S20, S26, S45, S53, S36/37/39
<b>peqGOLD Plasmid Mini Kit</b>	peqlab	-	-	-

### 8.3 GHS- und Risikosymbole und Informationen über Gefahren,-Risiko,- Sicherheits- und Vorsorgehinweise



Abbildung 46: GHS Piktogramme (Quelle: <http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/pictograms.html>).

GHS Gefahrenhinweise	
<b>H 225</b>	Leicht entzündbare Flüssigkeit und Dampf
<b>H 226</b>	entzündbare Flüssigkeit und Dampf
<b>H 228</b>	Entzündbare Feststoffe
<b>H 272</b>	Oxidationsmittel, Brandverstärker
<b>H 301</b>	Giftig beim Verschlucken
<b>H 302</b>	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
<b>H 311</b>	Giftig bei Berührung mit der Haut
<b>H 312</b>	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut
<b>H 314</b>	Verursacht schwere Hautverätzungen und Augenschäden

## Gefahren – und Sicherheitshinweise

<b>GHS Gefahrenhinweise</b>	
<b>H 315</b>	Verursacht Hautreizungen
<b>H 316</b>	Verursacht leichte Hautreizungen
<b>H 317</b>	Kann allergische Hautreaktionen verursachen
<b>H 318</b>	Verursacht schwere Augenschäden
<b>H 319</b>	Verursacht schwere Augenreizung
<b>H 330</b>	Lebensgefahr bei Einatmen
<b>H 331</b>	Giftig bei Einatmen
<b>H 332</b>	Gesundheitsschädlich beim Einatmen
<b>H 334</b>	Kann beim Einatmen Allergien, Asthma oder Atembeschwerden verursachen
<b>H 335</b>	Kann die Atemwege reizen
<b>H 336</b>	Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen
<b>H 340</b>	Kann genetische Defekte verursachen
<b>H 341</b>	Kann vermutlich genetische Defekte verursachen
<b>H 350</b>	Kann Krebs erzeugen
<b>H 350i</b>	Kann Krebs beim Einatmen erzeugen
<b>H 360</b>	Kann die Fruchtbarkeit oder das Kind im Mutterleib beeinträchtigen
<b>H 360D</b>	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
<b>H 361</b>	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit oder das Kind im Mutterleib beeinträchtigen
<b>H361f</b>	Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen
<b>H 370</b>	Schädigt die Organe
<b>H 372</b>	Schädigt die Organe bei längerer oder wiederholter Exposition
<b>H 410</b>	Sehr giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung
<b>H 411</b>	Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung

## Gefahren – und Sicherheitshinweise

<b>GHS Sicherheitshinweise</b>	
<b>P201</b>	Benötigt vor Gebrauch besondere Anweisungen
<b>P210</b>	Fern halten von Hitze / Funken / offener Flamme / heißen Oberflächen – Rauchen verboten
<b>P233</b>	Behälter dicht geschlossen halten
<b>P260</b>	Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol nicht einatmen
<b>P261</b>	Staub / Rauch / Gas / Nebel / Dampf / Aerosol vermeiden ein zu atmen
<b>P264</b>	Gründlich Waschen nach gebrauch
<b>P273</b>	Freisetzung in die Umwelt vermeiden
<b>P281</b>	Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden
<b>P280</b>	Schutzhandschuhe / Schutzkleidung / Augenschutz / Gesichtsschutz tragen
<b>P284</b>	Atemschutz tragen
<b>P309</b>	Bei Exposition oder Unwohlsein
<b>P310</b>	Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
<b>P311</b>	Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
<b>P312</b>	Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
<b>P321</b>	Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett)
<b>P362</b>	Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen
<b>P501</b>	Inhalt / Behälter ... zuführen
<b>P301+310</b>	Bei Verschlucken: Sofort Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
<b>P301+P312</b>	Bei Verschlucken: Bei Unwohlsein Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen
<b>P301+P330+P331</b>	Bei Verschlucken: Mund ausspülen. Kein Erbrechen herbeiführen
<b>P302+P352</b>	Bei Kontakt mit der Haut: Mit viel Wasser und Seife waschen
<b>P303+P361+P353</b>	Bei Kontakt mit der Haut (oder dem Haar): Alle beschmutzten, getränkten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen

## Gefahren – und Sicherheitshinweise

<b>P304+341</b>	Bei Einatmen: Bei Atembeschwerden an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert
<b>P305+351+338</b>	Bei Kontakt mit den Augen: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen
<b>P308+313</b>	Bei Exposition oder falls betroffen: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen
<b>P332+313</b>	Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.
<b>P342+311</b>	Bei Symptomen der Atemwege: Giftinformationszentrum oder Arzt anrufen.
<b>P403+233</b>	Behälter dicht verschlossen an einem gut belüfteten Ort aufbewahren



**Abbildung 47:** Gefahrensymbole für Formulierungen und entsprechende Kennzeichnung (Quelle: <http://de.wikipedia.org/wiki/Gefahrensymbol>).

<b>Risikosätze</b>	
<b>R8</b>	Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen
<b>R10</b>	Entzündlich
<b>R20</b>	Gesundheitsschädlich beim Einatmen
<b>R21</b>	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut
<b>R22</b>	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
<b>R25</b>	Giftig beim Verschlucken
<b>R35</b>	Verursacht schwere Verätzungen
<b>R36</b>	Reizt die Augen
<b>R38</b>	Reizt die Haut
<b>R41</b>	Gefahr ernster Augenschäden
<b>R42</b>	Sensibilisierung durch Einatmen möglich

## Gefahren – und Sicherheitshinweise

<b>Risikosätze</b>	
<b>R43</b>	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
<b>R45</b>	Kann Krebs erzeugen
<b>R46</b>	Kann vererbare Schäden verursachen
<b>R60</b>	Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
<b>R61</b>	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
<b>R39/23/24/25</b>	Giftig: ernste Gefahr irreversibler Schäden durch Einatmen, Verschlucken oder Hautkontakt
<b>R36/37/38</b>	Reizt Augen, Atmungsorgane und Haut
<b>R23/24/25</b>	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und Hautkontakt
<b>R20/21/22</b>	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und Hautkontakt
<b>R48/20/22</b>	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheits-schäden bei längerer Exposition durch Einatmen und Verschlucken
<b>R23/25</b>	Giftig beim Einatmen und Verschlucken
<b>R36/38</b>	Reizt die Augen und die Haut
<b>R51/53</b>	Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben
<b>R37/38</b>	Reizt das Atemsystem und die Haut

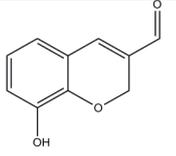
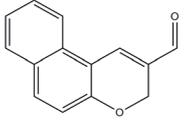
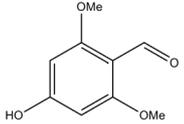
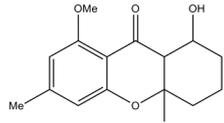
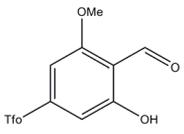
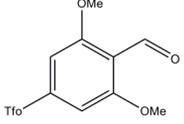
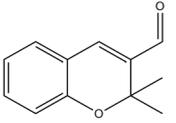
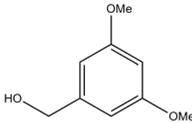
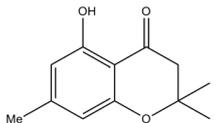
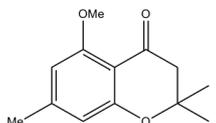
<b>Sicherheitssätze</b>	
<b>S20</b>	Bei der Arbeit nicht essen und trinken
<b>S22</b>	Staub nicht einatmen
<b>S26</b>	Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
<b>S28</b>	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (vom Hersteller anzugeben)
<b>S45</b>	Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen).
<b>S46</b>	Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.
<b>S53</b>	Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen. – Nur für den berufsmäßigen Verwender.

## Gefahren – und Sicherheitshinweise

<b>Sicherheitssätze</b>	
<b>S61</b>	Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
<b>S24/25</b>	Augen- und Hautkontakt vermeiden
<b>S36/37</b>	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Handschuhe tragen
<b>S36/37/39</b>	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Handschuhe, Schutzbrille oder Gesichtsschutz tragen

## 9 ANHANG

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten PfGST Inhibitoren, mit IUPAC Nomenklatur und Strukturformel

Nr.	Grund- verbindung	IUPAC-Nomenklatur	Strukturformel
1	Chromen	8-hydroxy-2H-chromen-3-carbaldehyd	
2	Chromen	3H-benzof[ <i>f</i> ]chromen-2-carbaldehyd	
3	Benzaldehyd	4-hydroxy-2,6-dimethoxybenzaldehyd	
4	Xanthon	1-hydroxy-8-methoxy-4a,6-dimethyl-2,3,4-trihydro-1H-xanthen-9-on	
5	Benzaldehyd	4-formyl-3-hydroxy-5-methoxyphenyl-7-trifluoromethansulfon	
6	Benzaldehyd	4-formyl-3,5-dimethoxyphenyl-7-trifluoromethansulfon	
7	Chromen	4-hydroxy-2,6-dimethoxybenzaldehyd	
8	Phenol	(3,5-dimethoxyphenyl)methanol	
9	Chromen	5-hydroxy-2,2,7-trimethyl-3,4-dihydro-2N-benzopyran-4-on	
10	Chromen	5-methoxy-2,2,7-trimethyl-3,4-dihydro-2N-benzopyran-4-on	

# Anhang

**Tabelle 1 (vortlaufend):** Auflistung der verwendeten PFGST Inhibitoren, mit IUPAC Nomenklatur und Strukturformel

Nr.	Grund- verbindung	IUPAC-Name	Strukturformel
11	Benzaldehyd	2,6-dimethoxy-4-methylbenzaldehyd	
12	Benzaldehyd	2-hydroxy-6-methoxy-4-methylbenzaldehyd	
13	Dioxatricyclol	(1R,9R)-9-methyl-8,12-dioxatricyclol	
14	Dioxatricyclol	(1R,9R,11R)-3-methoxy-5,9-dimethyl-8,12-dioxatricyclol	
15	Dioxatricyclol	(1R,2S,7S)-11,11-dimethyl-4,12-dioxatetracyclol	
16	Carbonsäureamid	3,5-dimethoxy-N,N-bis(pyridine-2-methyl)benzamid	
17	Thioharnstoff	1,3-bis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]thioharnstoff	
18	Benzaldehyd	1-(2,6-dihydroxy-4-methylphenyl)ethan-1-on	
19	Xanthon	7-bromo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
20	Xanthon	7-bromo-9-hydroxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	

# Anhang

**Tabelle 1 (vortlaufend):** Auflistung der verwendeten PfGST Inhibitoren, mit IUPAC Nomenklatur und Strukturformel

Nr.	Grund- verbindung	IUPAC-Name	Strukturformel
21	Xanthon	8-methoxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
22	Xanthon	8-chloro-7-hydroxy-2,3,4-trihydro-1H-xanthen-1-on	
23	Xanthon	2,3,4-trihydro-1H-xanthen-1,7-diol	
24	Xanthon	1-methoxy-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-7-ol	
25	Xanthon	1-methoxy-2,3,4-trihydro-1H-xanthen-7-ol	
26	Xanthon	7-bromo-1-methoxy-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-Xanthen	
27	Xanthon	8-methoxy-6-methyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-ol	
28	Xanthon	5-bromo-8-methoxy-2,3,4,9-tetrahydro-1H-xanthen-1,9-dion	
29	Xanthon	(3R,4S,4aR)-4-hydroxy-8-methoxy-3-methyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
30	Xanthon	2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	

# Anhang

**Tabelle 1 (vortlaufend):** Auflistung der verwendeten PfGST Inhibitoren, mit IUPAC Nomenklatur und Strukturformel

Nr.	Grund- verbindung	IUPAC-Name	Strukturformel
31	Xanthon	4-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-2,3,4,9-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
32	Xanthon	2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1,9-dion	
33	Xanthon	9-hydroxy-4a-[tri(methylsulfanyl)methyl]-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
34	Xanthon	(4R)-4-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
35	Xanthon	2,3,4,9-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
36	Xanthon	7-(2-nitrophenyl)-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
37	Xanthon	7-hydroxy-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
38	Xanthon	7-iodo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
39	Xanthon	7-chloro-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
40	Xanthon	7-fluoro-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	

# Anhang

**Tabelle 1 (vortlaufend):** Auflistung der verwendeten PfGST Inhibitoren, mit IUPAC Nomenklatur und Strukturformel

Nr.	Grund- verbindung	IUPAC-Name	Strukturformel
41	Xanthon	6-bromo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
42	Xanthon	5,7-dibromo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
43	Xanthon	5-bromo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
44	Xanthon	7-(trifluoromethyl)-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
45	Chromen	7-bromo-2,2-dimethyl-2H-chromen-3-carbaldehyd	
46	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thioharnstoff	
47	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]thioharnstoff	
48	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[2-(trifluoromethyl)phenyl]thioharnstoff	
49	Harnstoff	1,3-bis[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]harnstoff	
50	Harnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]harnstoff	

# Anhang

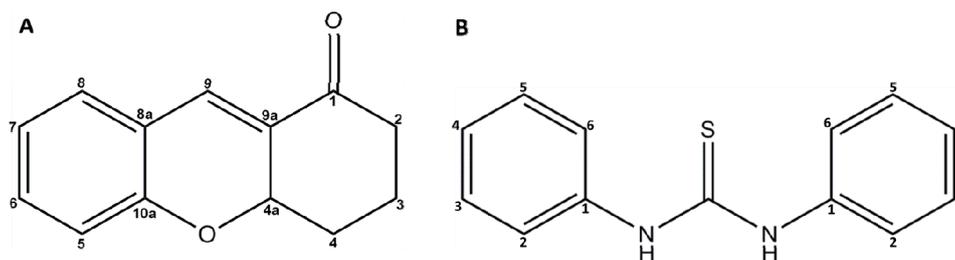
**Tabelle 1 (vortlaufend):** Auflistung der verwendeten PfGST Inhibitoren, mit IUPAC Nomenklatur und Strukturformel

Nr.	Grund- verbindung	IUPAC-Name	Strukturformel
51	Harnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[3-(trifluoromethyl)phenyl]harnstoff	
52	Harnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-(2-methylphenyl)harnstoff	
53	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[4-fluoro-3-(trifluoromethyl)phenyl]thioharnstoff	
54	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-(4-fluorophenyl)thioharnstoff	
55	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-(2,4-difluorophenyl)thioharnstoff	
56	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-(2,5-difluorophenyl)thioharnstoff	
57	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-(3,5-dimethylphenyl)thioharnstoff	
58	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]thioharnstoff	
59	Thioharnstoff	3-[3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl]-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]thioharnstoff	

## Anhang

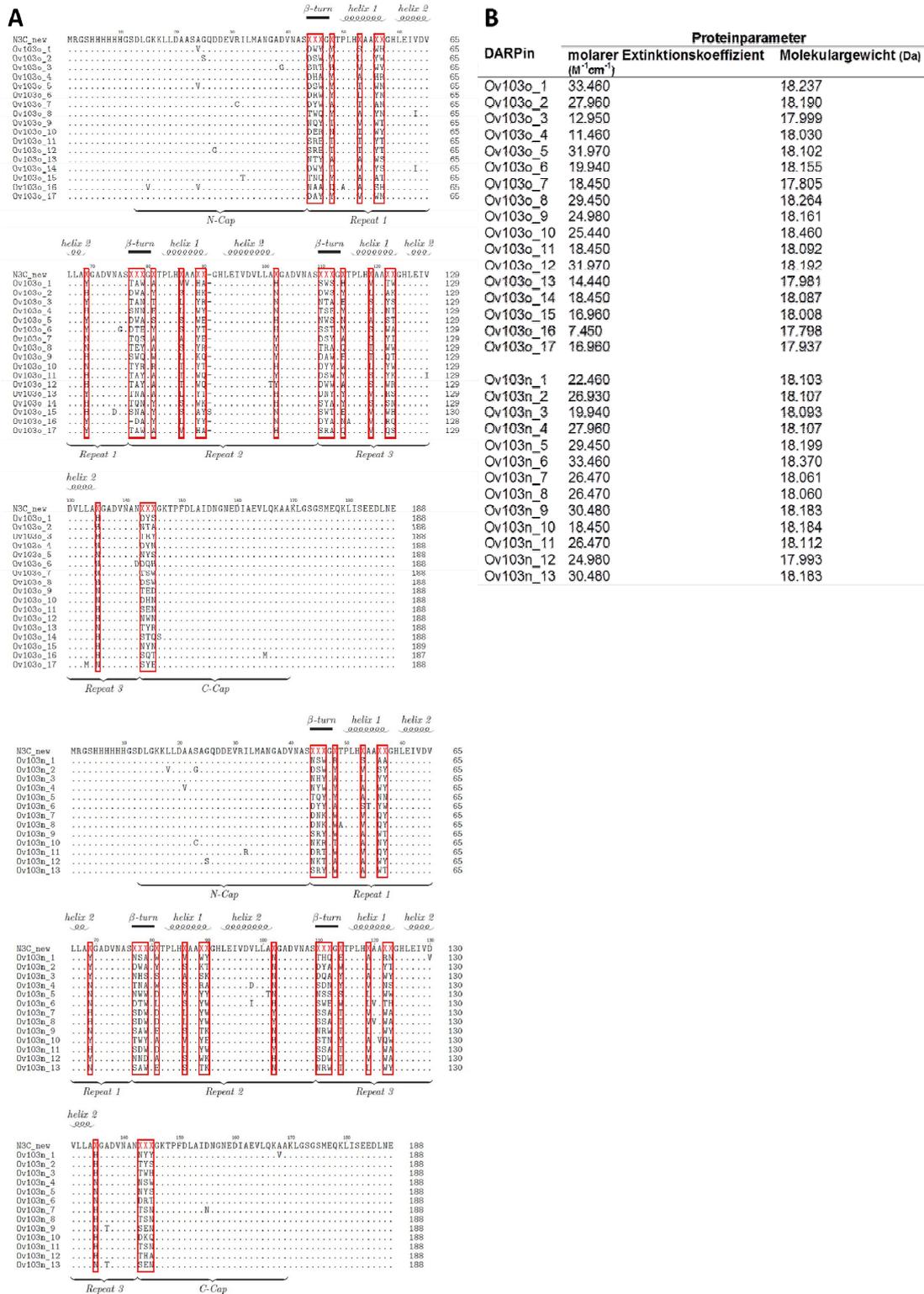
**Tabelle 1 (vortlaufend):** Auflistung der verwendeten PFGST Inhibitoren, mit IUPAC Nomenklatur und Strukturformel

Nr.	Grund- verbindung	IUPAC-Name	Strukturformel
60	Xanthon	7-bromo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
61	Xanthon	7-bromo-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
62	Xanthon	(4R,4aR)-4-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	
63	Xanthon	(4S,4aR)-4-hydroxy-8-methoxy-6-methyl-2,3,4,4a-tetrahydro-1H-xanthen-1-on	



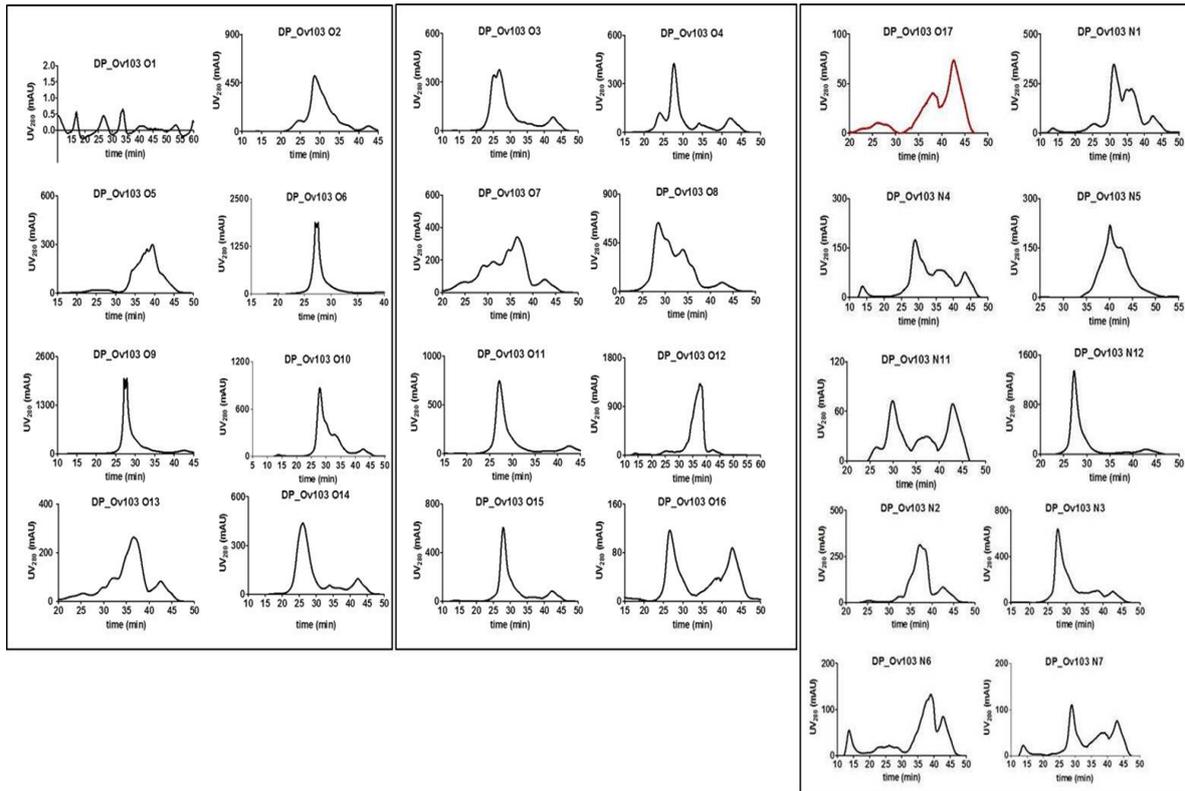
**Abbildung 1:** Strukturformeln des Xanthongrundgerüst (**A**) und Thioharnstoffgrundgerüst (**B**) mit der jeweiligen Kohlenstoffatomnomenklatur

# Anhang

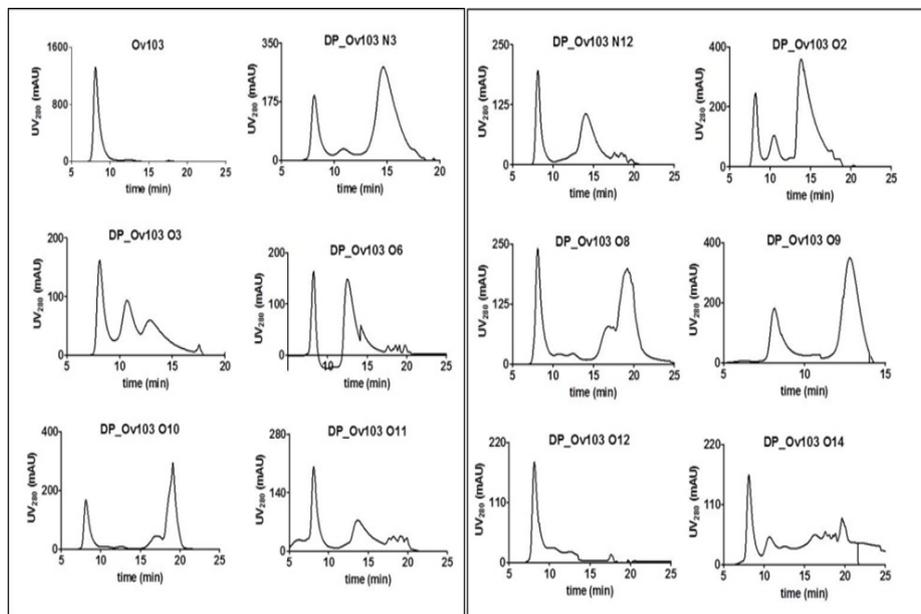


**Abbildung 2:** Sequenzvergleich und Proteinparameter der selektierten DARPin. **A:** Sequenzvergleich der 30 selektierten DARPin für Ov103. Die roten Kästen markieren die Variationen in den DARPin Sequenzen. **B:** Zusammenfassung der Proteinparameter der selektierten DARPin in Form des MW und des molaren Extinktionskoeffizienten.

# Anhang



**Abbildung 3:** Chromatogramme der Gelfiltrationsläufe von 26 DARPinen. Als abschließender Reinigungsschritt nach Ni-NTA Agarose.



**Abbildung 4:** Chromatogramme der Gelfiltrationsläufe von 12 DARPinen und Ov103. Die Komplexbildung wurde über eine Superdex 75 16/60 120 mL (GE Healthcare, UK) Gelfiltrationssäule verifiziert. Die Komplexbildung wurde durch das Auftreten eines zusätzlichen dritten Peaks im Chromatogramm beobachtet.

## Anhang

```

Onchocerca v. -----M LKYG--ILLMLITV GAYCDIILSEAGDFFTKHFTDKSLF 38
Brugia m. -----M LKYS--ILLVFVTVGVYCDIILSEAGDFF-KHFTDFKSLF 37
Teladorsagia b. MFCRVTVAVLLI LAYS-AHAGFFDDV-G---L ASDVGDFFTKQFNNVKDLF 50
Necator a. MFRPATAVLLI LLAASSTFAGFFDDVGG---L PSGVGDFFTKQFNNVKDLF 50

Onchocerca v. AKIEKQLQQSVDRVKDLIAITIQDRMSMIQPIANDMQRHITLKGIGDLISQV 90
Brugia m. AKIEK-----V-D----- 90
Teladorsagia b. A--QSELEKNIQRVKDLLMATEKAKMLIEMANDAOKKTI SEVNNYMQCV 100
Necator a. AKIQDTLEKNINLVKDLIAITIEKAKRMIEEMANEAKKTI LGQVDNYLNEV 100

Onchocerca v. NSF-RETMSNPKMDFITNKENKWEELIKKTFVTEGLNKVILP LLOKIKNSAP 140
Brugia m. -----KMEFNQKEN-WENI-KKTFIDEGLNK-LP LLOKIQNSAS 140
Teladorsagia b. DAFGAQVKRDGEAKFEQNKAKWQDMINNI FEKGGLENVM---KIMNLKS 150
Necator a. QQEGDQVAKEGSTKEEENKCKWQQMINDI FEKGGIDSVM---KIMNLKS 150

Onchocerca v. TTFATVYLFCTIVPV LINTIRE 161 100%
Brugia m. AITFATVYLLTCTIIP-LTNALIRE 161 44%
Teladorsagia b. AITQCTVMAAIIAPVILAFTR- 170 37%
Necator a. GGRCTLAALVAPVVLALIR- 170 32%

```

**Abbildung 5:** Sequenzvergleich von *Onchocerca volvulus* Ov103, gegen Oberflächen assoziierte Antigene parasitärer Nematoden. Die Höchste Sequenzhomologie zu Ov103 zeigte mit 44 % ein Protein von *Brugia malayi*.

```

Onchocerca v. MKFVILLITIGLLVVAIIPORFCOCQOQQOQOQORDERETPPFLSGAEP SVI
Wuchereria b. MKYFIELSLIGLI AASAQREACLHQP-----EIP PFLSGAESHVV
Brugia m. MKYFIELSLIGLI AASAQREACLHQP-----EIP PFLSGAESHVV
Loa l. -----NSARAETLAQRVPEPEQD-----ALPGLP PFLSGAEPDVV

Onchocerca v. DEEYNLLKIDENKIDCCTEADVEAFINRLGGSYKVRFTQEMEMRRARAD
Wuchereria b. KQFFDILLKIDESKIDEC TEADTEAFINRLGGDYQTRFEQEKQELKKEKAQ
Brugia m. KQFFDILLKIDESKIDEC TEADTEAFINRLGGDYQTRFEQEKQELKKEKAQ
Loa l. QRHYDLVNN-ESKITPEI EADVKEFIHKLGGNYITREFEKKEKEMRLNAE

Onchocerca v. YERITHQAVARESBAAKIADARMSATADSPHLTTROKSCQOQATMDSLSE
Wuchereria b. YEKTHQAVALLKESBAAARHADAKMSATADSTQLTNHQKTEQIKATMDSLSE
Brugia m. YEKTHQAVALLKESBAAARHADAKMSATADSTQLTNHQKTEQIKATMDSLSE
Loa l. FETQRSKIVSNLSEBAAARHADAMISDIAKDMHLINROKTERILTIMNSLSE

Onchocerca v. SVRREIINALSHQE 100%
Wuchereria b. AVRKEILEGFNSQ- 63%
Brugia m. AVRKEILEGFNSQ- 63%
Loa l. TVRNEILEALRPK- 52%

```

**Abbildung 6:** Sequenzvergleich von *Onchocerca volvulus* RAL-2, gegen Antigene parasitärer Filarien. Die Höchste Sequenzhomologie zu RAL-2 zeigte mit 63 % ein Protein von *Brugia malayi* und *Wuchereria bancrofti*. Die Signalsequenz von RAL-2 ist grau unterlegt.

## 10 DANKSAGUNG

Ich danke meinem Doktorvater Prof. Dr. Christian Betzel für die Betreuung, Unterstützung und Begutachtung meiner Arbeit. Im Rahmen von Konferenzen und Auslandsaufenthalten konnte ich ebenfalls neue Methoden und Techniken, sowie andere Kulturen kennenlernen.

Ein besonderer Dank gilt PD Dr. Markus Perbandt für seine intensive Betreuung, und Unterstützung meiner Arbeit, wobei er mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herzlich danken möchte ich auch Prof. Dr. Reinhard Bredehorst für die Anfertigung eines Zweitgutachtens sowie den Disputationsgutachtern Prof. Dr. Peter Heisig und Dr. Thomas Hackl.

Mein Dank geht auch an Prof. Dr. Eva Liebau und Dr. Irene Ajonina für die Bereitstellung der *Onchocerca volvulus* ESP Proteinkonstrukte.

An dieser Stelle möchte ich auch Prof. Dr. Stefan Bräse und seinem Team für die Synthese der getesteten PfGST Inhibitoren danken.

Außerdem möchte ich mich herzlichst bei Dr. Dirk Rehders, Anne Sommer (Laborehefrau) und Svetlana Kapis für angeregte Diskussion über das alltägliche Leben im Labor, den Arbeitsalltag, sowie das normale Leben bedanken.

Bei Dr. Julia Drebes (Spätzle) bedanke ich mich einfach für die tolle Zeit und den ein oder anderen Shiraz.

Petra Belda, Dr. Maria Trusch und Prof. Hartmut Schlüter gilt ein besonderer Dank für die Zusammenarbeit bei dem *O. ochengi* Peptid Projekt.

Einen herzlichen Dank an alle BTA-Schülerinnen und Schüler, Studentinnen und Studenten, die ich während meiner Arbeit betreuen durfte und die immens zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Allen Kolleginnen und Kollegen im Labor ein großes Dankeschön für eine wunderbare und erheiternde Zusammenarbeit, die ich nicht vergessen werde.

Danke an Arif, Prof. Dr. Gourinath, Prof. Dr. Yong Yu, Prof. Dr. Zhang, Heidi, Tobias und Prof. Dr. Arni für ihre Gastfreundschaft und Unterstützung während der Aufenthalte in ihren Laboren.

Vielen Dank an die Graduiertenschule SDI, durch deren Angebote ich viel Lernen

## Danksagung

konnte.

Ich möchte allen meinen Freunden danken, die mir während dieser Zeit immer beigestanden und geholfen haben. Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, meinen Eltern Monika Eberle und Horst Fritsch und meinem Bruder Tobias Eberle für ihre Unterstützung und Aufmunterung. Zu guter Letzt möchte ich meiner Freundin Monika Coronado danken für ihre immerwährende Unterstützung, ihrer stetigen Ermutigung und Geduld während meiner Doktorarbeit danken.

## 11 LEBENSLAUF

### **Persönliche Daten**

Name: Raphael Eberle

Geburtsdatum: 15.05.1980

Geburtsort: Hanau

### **Ausbildung**

10.2009 – 06.2013 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Christian Betzel. Laboratorium für Strukturbiologie von Infektion und Entzündung, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg.

04.2004 – 09.2009 Studium der Ernährungswissenschaften an der Justus-Liebig-Universität Gießen

03.2004 – 09.2009 Masterarbeit in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Becker, Institut für Ernährungswissenschaft, Justus Liebig Universität Giessen: „Die Selenoproteine 1 und 2 von *Plasmodium falciparum*: Optimierung der Expression und Interaktomanalysen.“

06.2001 Allgemeine Hochschulreife, Georg-Kerschensteiner-Schule, Obertshausen, Deutschland

### **Publikationen**

#### **Weitere Publikationen:**

Ajonina Ekoti I., D. Ndjonka, M. K. Tanyi, M. Wilbertz, A. E. Younis, D. Boursou, M. A. Kurosinski, R. Eberle, K. Lüersen, M. Perbandt, M. Breloer, N. W. Brattig, and E. Liebau, Functional characterization and immune recognition of the extracellular superoxide dismutase from the human pathogenic parasite *Onchocerca volvulus* (OvEC-SOD). Acta Tropica, 2012. 124: p. 15-26

## **12 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, diese Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, sowie keine anderen, als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ferner versichere ich, dass ich noch keine Promotionsversuche an anderen Universitäten unternommen habe.

Hamburg, 28. Juni 2013

---

(Raphael Eberle)