

**Non-Mevalonatbiosynthese: Identifizierung und Charakterisierung
von Hemmstoffen gegen IspD aus *Plasmodium vivax***

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Lebensmittelchemie der Universität Hamburg /
Hamburg School of Food Science**

vorgelegt von

Antje Nörnberg

Hamburg

August 2017

Druckfreigabe: 28.02.2018

1. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Markus Fischer
2. Gutachter der Dissertation: Prof. Dr. Henning Tidow

Tag der Disputation: 17.11.2017

Der praktische Teil der vorliegenden Arbeit wurde in der Zeit von April 2012 bis März 2015 unter der wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Markus Fischer und Dr. Tobias Gräwert der Hamburg School of Food Science der Universität Hamburg angefertigt.

I. Inhaltsverzeichnis

I.	INHALTSVERZEICHNIS	III
II.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1.	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK / CONCLUSIONS AND OUTLOOK	1
1.1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
1.2.	AUSBLICK	3
1.3.	CONCLUSION AND OUTLOOK	4
2.	EINLEITUNG UND AKTUELLER KENNNTNISSTAND	7
2.1.	MALARIA (<i>PLASMODIUM VIVAX</i>)	9
2.2.	DER MEP-BIOSYNTHESEWEG	10
2.3.	TERPENE	12
2.4.	RESISTENZENTWICKLUNGEN	12
2.5.	ARZNEISTOFFENTWICKLUNG	13
2.6.	HIGH THROUGHPUT SCREENING	16
2.7.	ARZNEISTOFFANWENDUNG BEI MALARIA	17
3.	AUFGABENSTELLUNG DER ARBEIT	19
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	21
4.1.	IspD AUS <i>P. VIVAX</i> EXPRESSIONSVARIANTEN	22
4.2.	CHARAKTERISIERUNG VON IspD AUS <i>P. VIVAX</i> MIT N-TERMINALEM HISACTOPHILIN-AFFINITÄTSTAG	38
4.3.	BEREITSTELLUNG DES HILFSENZYMS ISPE AUS <i>E. COLI</i>	43
4.4.	SYNTHESE VON 2C-METHYL-D-ERYTHRITOL-4-PHOSPHAT (MEP)	47
4.5.	OPTIMIERUNG DES FOTOMETRISCHEN ASSAYS VON IspD AUS <i>P. VIVAX</i>	54
4.6.	HIGH TROUGHPUT SCREENING	58
4.6.1.	Primärscreen	59
4.6.2.	Sekundärscreen der Primärhits	60
4.6.3.	IC ₅₀ -Bestimmung	61
4.6.4.	¹³ C-NMR-Assay zur Bestätigung der Inhibitorwirkung auf IspD aus <i>P. vivax</i>	71
4.7.	HEMMMECHANISMUS DER BESTEN INHIBITOREN	76
4.8.	VERIFIZIERUNG DER HEMMUNG VON ANALOGA	80
4.9.	VERIFIZIERUNG DER BESTEN INHIBITOREN AUF EINE HEMMUNG VON AtIspD	85
4.10.	MODELLING VON INHIBITOREN MIT DER STRUKTUR VON AtIspD	87
5.	EXPERIMENTELLER TEIL	92
5.1.	MATERIALIEN	92
5.1.1.	Chemikalien, Puffer und Reagenzien	92

5.1.2.	<i>Geräte</i>	92
5.1.3.	<i>Expressionsvektoren</i>	92
5.1.4.	<i>Primer</i>	93
5.1.5.	<i>Bakterienstämme</i>	93
5.1.6.	<i>Nährmedien und Selektiv-Agarplatten</i>	95
5.1.7.	<i>Verwendete Trennmaterialien und Säulen</i>	96
5.2.	METHODEN	96
5.2.1.	<i>Molekularbiologische Methoden</i>	96
5.2.1.1.	Isolierung von Plasmid-DNA	96
5.2.1.2.	Darstellung der Insert-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	96
5.2.1.3.	Verdau mit Restriktionsendonukleasen	99
5.2.1.4.	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	100
5.2.1.5.	Ligation	100
5.2.1.6.	Transformation in chemisch kompetente Zellen nach HANAHAN (Hanahan, 1983)	101
5.2.1.7.	PCR-Screen.....	102
5.2.2.	<i>Proteinbiochemische Methoden</i>	103
5.2.2.1.	BL21(DE3)- und ArcticExpress(DE3)-Zellen	103
5.2.2.2.	Fermentation und Expression.....	104
5.2.2.3.	Zellaufschluss.....	106
5.2.2.4.	Herstellung chemisch kompetenter Zellen nach HANAHAN (Hanahan, 1983)	107
5.2.2.5.	Nickelaffinitätschromatographie	108
5.2.2.6.	Dialyse	109
5.2.2.7.	Entsalzung mittels Entsalzungschromatographie	109
5.2.2.8.	Aufkonzentration	110
5.3.	DNA-SEQUENZIERUNG	111
5.4.	GELELEKTROPHORESEN.....	111
5.4.1.	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	111
5.4.2.	<i>Semi-Dry Western Blot</i>	113
5.5.	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION NACH BRADFORD.....	115
5.6.	FOTOMETRISCHER ASSAY ÜBER NADH.....	116
5.6.1.1.	Fotometrische Bestimmung der PvlspD-Aktivität.....	117
5.6.1.2.	Kinetik unter Steady-State-Bedingungen.....	119
5.6.1.3.	Fotometrische Bestimmung der EclspE-Aktivität	121
5.6.1.4.	Fotometrische Bestimmung der EclspC-Aktivität	123
5.6.2.	<i>Aktivitätsbestimmung mittels Kernspinresonanzspektroskopie</i>	125
5.7.	HIGH THROUGHPUT SCREENING (HTS)	126
5.7.1.	<i>Verdünnung der Mutterplatten mit dem Pipettierroboter</i>	126
5.7.2.	<i>Primärscreen</i>	128
5.7.3.	<i>Sekundärscreen</i>	129
5.7.4.	<i>IC₅₀-Bestimmung</i>	129

5.7.5.	<i>Bestimmung des Bindungsmechanismus</i>	129
5.7.6.	<i>Fotometrische Bestimmung der Hemmung von Analoga der gefundenen Inhibitoren</i>	130
5.7.7.	<i>Fotometrische Bestimmung der Hemmung von Inhibitoren getestet gegen AtIspD</i>	130
6.	ANHANG	131
6.1.	CHEMIKALIENVERZEICHNIS	131
6.2.	VERWENDETE LÖSUNGEN UND PUFFER	150
6.3.	WEITERE VERWENDETE REAGENZIEN UND MATERIALIEN	154
6.4.	GERÄTE	158
6.5.	PRIMER	163
6.6.	ARBEITSANWEISUNGEN	164
6.6.1.	<i>Autoklavierbedingungen</i>	164
6.6.2.	<i>Arbeitsanweisung QIAprep Spin Miniprep Kit</i>	164
6.6.3.	<i>Arbeitsanweisung peqGOLD Gel Extraction Kit</i>	165
6.7.	SOFTWARE	166
6.7.1.	<i>Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (disk. SDS-Page)</i>	167
6.8.	VERWENDETE VEKTOREN	169
6.8.1.	<i>Vektorkarte pET-22b(+)-Vektor</i>	169
6.8.2.	<i>Vektorkarte pQE-30-Vektor</i>	170
6.8.3.	<i>Vektorsequenz pNCO113-Vektor</i>	171
6.9.	VERWENDETE PRIMER FÜR DIE KLONIERUNG UND DARAUS RESULTIERENDE KONSTRUKTE	173
6.9.1.	<i>PvIspD im pET-22b(+)-Vektor, C-terminal, His₆-Tag</i>	173
6.9.2.	<i>PvIspD im pNCO113-Vektor, N-terminal, His₆-Tag</i>	174
6.10.	DATEN ZUR TESTEXPRESSION	176
6.11.	WEITERE GRAFIKEN ZU ERGEBNISSEN	177
6.11.1.	<i>IspE-Reinigung</i>	177
6.11.2.	<i>Optimierung des fotometrischen Assays</i>	178
6.11.3.	<i>Bestätigung der Inhibitoren mittels ¹³C-NMR</i>	184
7.	LITERATURVERZEICHNIS	191
8.	DANKSAGUNG	198
9.	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	200

II. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Ausgeschriebene Bedeutung
ADME	Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Ausscheidung (engl.: absorption, distribution, metabolism, excretion)
ADME/T	Aufnahme, Verteilung, Metabolismus, Ausscheidung und Toxikologie (engl.: absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicity)
ADP	Adenosindiphosphat
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
<i>Bam</i>HI	Restriktionsendonuklease aus <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H
bidest.	Bidestilliert
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumine)
bzw.	beziehungsweise
ca.	Circa
CE	Zellextrakt (engl. cell extract)
CDP-ME	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol
CDP-MEP	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-4-phosphat
CMP	Cytidinmonophosphat
¹³C-NMR	¹³ C-Kernspinresonanz (engl.: nuclear magnetic resonance) Spektroskopie, Detektion der ¹³ C-Isotope
CoA	Coenzym A
C-terminal	Carboxy-Terminus
CTP	Cytidintriphosphat
disk.	diskontinuierlich
DL	Durchlauf
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid

Abkürzung	Ausgeschriebene Bedeutung
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
Dxs	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase
E₀	Gesamtkonzentration des Enzyms
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	≅ u. a. = und andere (lat.: et alii / et aliae / et alia)
etc.	und so weiter (lat.: et cetera)
FPLC	schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie (engl.: <i>fast protein liquid chromatography</i>)
Fr.	Fraktion
Fw	Forward-Primer
GP	Gesamtprotein
GTP	Guanosintriphosphat
hac	Hisactophilin
His₆-Tag	Hexahistidin-Affinitätstag
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HTS	Hochdurchsatz-Screening (engl.: <i>high throughput screening</i>)
IMAC	Metallchelat-Affinitätschromatographie (engl.: <i>immobilized metal chelate affinity chromatography</i>)
IC₅₀	Inhibitorkonzentration, die benötigt wird, um die Aktivität des Zielenzyms um 50 % zu senken
Idi	Isopentenylidiphosphat-Isomerase
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie (engl.: <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

Abkürzung	Ausgeschriebene Bedeutung
IspC	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase
EclspC	IspC aus <i>E. coli</i>
IspD	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Transferase
AtIspD	IspD aus <i>A. thaliana</i>
PvIspD	IspD aus <i>P. vivax</i>
IspE	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase
EclspE	IspE aus <i>E. coli</i>
IspF	2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase
IspG	1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat-Synthase
IspH	1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat-Reduktase
kcat	Wechselzahl
K_i	Dissoziationskonstante für Enzym-Inhibitor-Komplex
K_{is}	Dissoziationskonstante für Enzym-Inhibitor-Komplex oder Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
K_S	Dissoziationskonstante für Enzym-Substrat Komplex
LB	Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien nach Luria-Bertani (engl.: <i>lysogeny broth</i>)
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Marker
MEP	2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MRE	multiresistente Erreger
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MW	Molekulargewicht (engl.: <i>molecular weight</i>)
NADH	Nikotinsäureamid-Adenosin-Dinukleotid
NADPH	Nikotinsäureamid-Adenosin-Dinukleotidphosphat
NdeI	Restriktionsendonuklease aus <i>Neisseria denitrificans</i>
NMR	Kernspinresonanz-Spektroskopie (engl.: <i>nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)

Abkürzung	Ausgeschriebene Bedeutung
N-terminal	Aminoterminal
OD	Optische Dichte
OD₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PEP	Phosphoenolpyruvat
pET-22	Plasmidserie zur Expression mittels T7-Polymerase (engl.: <i>plasmide for expression by T7-RNA-polymerase</i>)
<i>P. falciparum</i>	<i>Plasmodium falciparum</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Hydronium-Ionen Konzentration
P_i	Phosphat
PK	Pyruvatkinase
pNCO-113	Plasmid zur Expression mittels T5-Promotor
PP	Pyrophosphat
pQE-xx	Plasmidserie zur Expression mittels T5-Promotor
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>P. vivax</i>	<i>Plasmodium vivax</i>
RE	Rohextrakt
Rev	Rückwärts-Primer (engl.: <i>reverse primer</i>)
S	Substrat
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SE	Standardabweichung (engl.: <i>standard error</i>)
SOB	komplexes Nährmedium (engl.: <i>super optimal broth</i>)
SOC	komplexes Nährmedium (engl.: <i>super optimal broth with catabolite repression</i>)
spec.	Spezies (lat.: <i>species</i>)
T5-Promotor	Promotor aus dem Bakteriophagen T5
T7-Promotor	Promotor aus dem Bakteriophagen T7

Abkürzung	Ausgeschriebene Bedeutung
T4-Ligase	DNA-Ligase aus dem Bakteriophagen T4
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq-DNA Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TEV	<i>Tobacco Etch Virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
UV	Ultraviolett
WHO	<i>World Health Organization</i>

Maßeinheiten und Größen

%	Prozent
° C	Grad Celsius
μ	Mikro
Au	Extinktion (engl.: absorption unit)
bar	1 bar = 10 ⁵ kg / (m·s ²)
bp	Basenpaare
cps	Zählimpulse pro Sekunde (engl.: counts per second)
c	Zenti
Da	Dalton
ε	Extinktionskoeffizient
g	Gramm
h	Stunden
k	Kilo
L	Liter
m	Milli
m	Meter

Abkürzung	Ausgeschriebene Bedeutung
Maßeinheiten und Größen	
M	Molarität [mol/L]
min	Minuten
mol	Mol
n	Nano
p	Piko
ppm	Teile von einer Million (engl.: parts per million)
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: rounds per minute)
s	Sekunden
u	Unit
V	Volt
vol	Volumen

1. Zusammenfassung und Ausblick / Conclusions and Outlook

1.1. Zusammenfassung

Im Jahr 2013 starben laut WHO (World Health Organization) ca. 584'000 Menschen an Malaria und 198 Millionen waren infiziert (World Health Organization, 2014). Etablierte Medikamente gegen Malaria sind aufgrund von Resistenzbildungen (siehe Kapitel 2. und 2.4.) mittlerweile nur noch begrenzt wirksam. Aufgrund dieser Tatsache besteht ein großer Bedarf an neuen Strategien und Wirkprinzipien für eine erfolgreiche Behandlung dieser schwerwiegenden Tropenkrankheit (World Health Organization, 2010).

Ein möglicher neuer, aber bislang noch kaum ausgeschöpfter Ansatzpunkt, ist der Mevalonat-unabhängige Biosyntheseweg von Isoprenoiden (auch DXP- oder MEP-Weg). Dieser kommt im Menschen nicht vor, aber in allen Malariaerregern (*Plasmodium spec.*), wie auch in einer Vielzahl anderer bakterieller Pathogene. Darüber hinaus ist dieser Biosyntheseweg in den Pathogenen essentiell. In der vorliegenden Arbeit wurde die 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase (IspD) aus *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), einem Malariaerreger, untersucht. IspD gehört zu den Enzymen des 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP)-Stoffwechselweges (Eisenreich et al., 2004) und *P. vivax* ist der Erreger der sehr häufigen *Malaria tertiana*. Die Symptome im Anfangsstadium unterscheiden sich kaum von der gefährlichsten Form *Malaria tropica* (siehe Kapitel 2.1.), sodass Fehlbehandlungen der Krankheit sehr häufig vorkommen (World Health Organization, 2010).

Ein möglicher Ansatzpunkt für das Auffinden neuer Strukturen ist ein Hochdurchsatz-Screening (High Throughput Screening, HTS). Im Rahmen eines HTS wurden neue Leitstrukturen aus einer Substanzbibliothek mit über 100'000 ausgewählten Verbindungen identifiziert (siehe Kapitel 2.5.).

Um die für den HTS benötigte Menge an Targetenzym (IspD) herstellen zu können, wurde zunächst ein für die Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*) Codon-optimiertes synthetisches Gen (siehe Kapitel 4.1.) verwendet und hinsichtlich seiner Expressionsleistung in verschiedenen gängigen Plasmiden und *E. coli* Stämmen überprüft. Zur Isolierung des Enzyms wurden verschiedene, Expressionssysteme und Affinitäts-Tags überprüft. Das geeignetste System sowohl zur Expression, wie auch zur Anreicherung, war eine

Kombination aus N-terminalem Hisactophilin-Tag (hac-Tag), einem pET22-b(+) Vektor und *E. coli* ArcticExpress(DE3)-Zellen (siehe Kapitel 4.1). Durch die Optimierung des Systems konnten aus 5 L Bakterienkultur ca. 8 g Zellen (Feuchtmasse) erhalten werden und daraus 6 mg Protein mit einer spezifischen Aktivität von $26 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ isoliert werden (siehe Kapitel 4.4.1).

Für das HTS wurde ein fotometrischer Assay mit Verfolgung einer Nicotinamid-adenindinukleotid (NADH)-Abnahme optimiert und für das HTS getestet. Da für den fotometrischen Enzymassay abgesehen von IspD zusätzliche Enzyme zum Einsatz kamen, mussten die im HTS gefundenen aktiven Substanzen auch gegen diese Hilfsenzyme überprüft werden. Dabei stellte sich heraus, dass ca. 20 % der identifizierten Substanzen nicht IspD, sondern eines der Hilfsenzyme inhibierten.

Die ermittelten Inhibitoren wurden weiter, hinsichtlich ihres IC_{50} -Wertes (IC_{50} = mittlere inhibitorische Konzentration), charakterisiert. Dabei wurden 100 Substanzen mit einem IC_{50} Wert unter $100 \mu\text{M}$ ermittelt und davon 14 Substanzen mit einem $\text{IC}_{50} \leq 10 \mu\text{M}$ (siehe Kapitel 4.6.3.). Die besten drei IC_{50} -Werte lagen bei $2.4 \mu\text{M}$ (LS 5286989), $2.6 \mu\text{M}$ (LS 5351135) und $2.6 \mu\text{M}$ (LS 5333093). Die Inhibition der 14 besten Treffer, mit einem $\text{IC}_{50} \leq 10 \mu\text{M}$, wurde mittels NMR-Assay unter Verwendung von ^{13}C -markiertem Substrat bestätigt (siehe Kapitel 4.6.4.). Zwölf Verbindungen zeigten eine unkompetitive Hemmung, bei zweien lag eine nicht-kompetitive Hemmung vor.

Potentielle Inhibitoren, die mit dem bereits entwickelten fotometrischen Assay ermittelt wurden, wurden auch auf eine Hemmung von IspD aus *Arabidopsis thaliana* (AtIspD) untersucht. *Arabidopsis thaliana* dient hier als gut untersuchte Modellpflanze. Apikoplexa zu denen Plasmodien gehören, besitzen wie Pflanzen ein Plastid, den Apikoplasten. Sowohl bei Pflanzen, als auch bei Apikoplexa kommen die MEP-Gene in den Plastiden vor. Es lag folglich nahe, identifizierte wirksame Strukturen auch in Pflanzen zu testen. Von 15 Substanzen, die AtIspD hemmten, lag der IC_{50} -Wert bei vieren unter $100 \mu\text{M}$. Für den stärksten Inhibitor wurde ein IC_{50} -Wert von $20 \mu\text{M}$ bestimmt (siehe Kapitel 4.9.).

Da es für das Protein aus *Arabidopsis thaliana* (im Gegensatz zu *P. vivax*) eine Kristallstruktur (pdb: 4NAI) gibt, wurden die besten Inhibitoren von AtIspD in dieses Protein modelliert (Richard et al., 2001, Witschel et al., 2011). Die computergestützten Untersuchungen legten nahe, dass der Wirkort dieser Verbindungen die CTP-Bindestelle

von AtIspD sein könnte. Dies war eine neue Erkenntnis, bislang wurden lediglich Strukturen publiziert, die an die Substratbindestelle binden (siehe Kapitel 4.10.) (Gabrielsen et al., 2006).

1.2. Ausblick

Zukünftig sollte eine chemische Optimierung der besten Inhibitoren erfolgen. Dazu wäre das Vorliegen einer Kristallstruktur des Enzyms aus *Plasmodium* hilfreich. Mit den modellierten oder auch kristallinen Daten einer Proteinstruktur könnten mögliche Inhibitoren besser verstanden und damit besser auf Basis ihrer Leitstruktur optimiert werden. Diesbezüglich wäre eine Co-Kristallisation des Proteins mit Inhibitor am sinnvollsten.

Des Weiteren kann mit einem guten Inhibitor, mit einem IC₅₀-Wert im nM/μM-Bereich, (z.B. Substanz LS 5286989) eine Überprüfung der Hemmung *in vivo*, also im eigentlichen Erreger stattfinden. Im Anschluss daran sollten Untersuchungen zu dem ADME/T-Verhalten (Absorption, Verbreitung, Metabolismus, Exkretion und Toxikologie) der Substanz erfolgen. Zuerst müsste dafür das ADME/T-Verhalten anhand der Struktur und der funktionellen Gruppen der Substanz theoretisch ermittelt, und dann praktisch in Tierversuchen und schließlich in klinischen Studien überprüft werden.

Die Untersuchung der gefundenen Inhibitoren auf eine Hemmung in anderen Organismen kann auch genutzt werden, um für andere Krankheitserreger passende Medikamente zu entwickeln. Alle Erreger (z.B. *Helicobacter pylori* oder *Campylobacter jejuni*), die auf den MEP-Stoffwechselweg zurückgreifen und nicht den Mevalonat-Biosyntheseweg verwenden, kämen dafür infrage.

1.3. Conclusion and Outlook

Conclusion

In 2013, a total of 584'000 people died of malaria out of 198 million people who were infected, according to the WHO (World Health Organization, 2014). Due to the fact that various strains of almost all *Plasmodium* species have developed resistance against common anti-malarials (see Chapters 2. and 2.4.), the effectiveness of existing medications against malaria is limited. It is thus important to identify new targets within the parasite and to subsequently search for new drugs to effectively treat this tropical disease (World Health Organization, 2014).

A possible new starting point—which has hardly been exploited so far—is the non-mevalonate pathway of isoprenoids (also the DOXP pathway or MEP pathway). This biosynthetic route is absent in humans, but all *Plasmodium* species rely on it. Also, it is essential in a broad variety of bacterial pathogens. The subject of this thesis was the investigation of 2C-methyl-D-erythritol-4-phosphate cytidyltransferase (IspD) from *Plasmodium vivax* (*P. vivax*—a malaria pathogen), as a potential new drug target (Eisenreich et al., 2004). *P. vivax* is a pathogen of the common *Malaria tertiana*, whose symptoms are similar to the most dangerous form of malaria—the *Malaria tropica* (see Chapter 2.1.). This similarity often leads to incorrect treatment of this disease (World Health Organization, 2010).

Apart from computational methods and pull-down assays, high throughput screening (HTS) is a very promising and straightforward approach to identify the effectiveness of new drugs against a given target. During this thesis, new lead structures were searched for within a substance library of over 100'000 compounds (see Chapter 2.5.).

To obtain the required amount of IspD protein, a synthetic gene optimized for *Escherichia coli* (*E. coli*) codon usage (see Chapter 4.1.) was used. A variety of common plasmids and *E. coli* strains were investigated with respect to the high protein yield. Also, different N-terminal and C-terminal affinity tags were tested to optimize the protein purification. The best system of expression and enrichment was found to be an N-terminal Hisactophilin-tag (hac tag), together with a pET22-b(+) expression system in an *E. coli* ArticExpress(DE3) strain (see Chapter 4.1.). With optimized conditions, it was possible to

obtain 8 g of cell mass (wet) from 5 L of bacterial culture. The protein yield was 6 mg, with a specific activity of $26 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (see Chapter 4.4.1).

For the high throughput screening, NADH consumption was monitored in a photometer-based enzyme assay. During the HTS, 151 primary hits could be identified. Several auxiliary enzymes were necessary to correlate MEP consumption with NADH decrease. Therefore, the primary hits were subsequently tested against the auxiliary enzymes. It was found that 31 substances (20 %) inhibit one or several of the auxiliary enzymes, and not IspD.

The inhibitors were further characterized regarding their IC_{50} values (the middle inhibition concentration). A total of 100 substances were found to show an IC_{50} -value lower than $100 \mu\text{M}$; among these 100 substances, 14 had an IC_{50} value less than $10 \mu\text{M}$ (see Chapter 4.6.3.). Of all the IC_{50} values, the three best ones were $2.4 \mu\text{M}$ (LS 5286989), $2.6 \mu\text{M}$ (LS 5351135), and $2.6 \mu\text{M}$ (LS 5333093). Moreover, the inhibitory potential for each of the 14 best hits (with an IC_{50} value $\leq 10 \mu\text{M}$) was unambiguously verified with ^{13}C -NMR (see Chapter 4.6.4.). Further, the inhibition mechanism was found to be uncompetitive for 12 substances, and non-competitive for two substances.

The MEP-pathway, which is present in the apicoplasts in *Plasmodia* exist in plants in the chloroplasts. Due to this similarity, the inhibition of IspD from *Arabidopsis thaliana* (AtIspD) with potential *P. vivax* inhibitors was additionally tested. A total of 15 substances were found to inhibit AtIspD, of which four inhibitors even had IC_{50} values lower than $100 \mu\text{M}$. The strongest inhibitor had an IC_{50} value of $20 \mu\text{M}$ (see Chapter 4.9.).

Since the crystal structure (pdB:4NAI) is known for the *Arabidopsis thaliana* protein (Richard et al., 2001, Witschel et al., 2011), docking experiments were conducted with the strongest inhibitors. Surprisingly, these computer-based experiments revealed that the binding site of CTP for AtIspD is possibly the compound's targeting area. So far, only those inhibitors which are binding at the MEP site were published (Gabrielsen et al., 2006) (see Chapter 4.10.).

Outlook

In the future, the best inhibitors should be further optimized and re-tested for the inhibition of *PvlspD*. For that reason, the crystal structure of the enzyme would be helpful. With the structure of *PvlspD*, the understanding of the inhibition mechanisms can be deepened, and the inhibitors can be optimized in terms of their lead structures. The co-crystallization of *IspD* together with an inhibitor would be the most promising approach to learn more about the binding mechanism.

Furthermore, the inhibition should be verified *in vivo* for those inhibitors of *PvlspD* that have an activity in the nano-molar/micro-molar range (e.g. substance LS 5286989). This should be followed by studies on the absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicology (ADME/T) behaviour of the respective compounds. Thus, the ADME/T behaviour should be determined theoretically with the structure of the inhibitor and its functional groups. The ADME/T behaviour should be determined practically in animal studies and finally in clinical trials.

Additionally, the identified lead structures can be used to find new suitable drugs for other pathogens like *Helicobacter pylori* or *Campylobacter jejuni*. Generally, all pathogens that rely on the MEP-pathway and not the mevalonate-pathway could be considered for this.

2. Einleitung und aktueller Kenntnisstand

Malaria ist eine Tropen- bzw. Subtropenkrankheit, mit der sich täglich ca. eine halbe Million Menschen infizieren (Tun et al., 2015; World Health Organization, 2014). In der folgenden Abbildung 1 ist das Ausbreitungsgebiet der Malaria dargestellt.

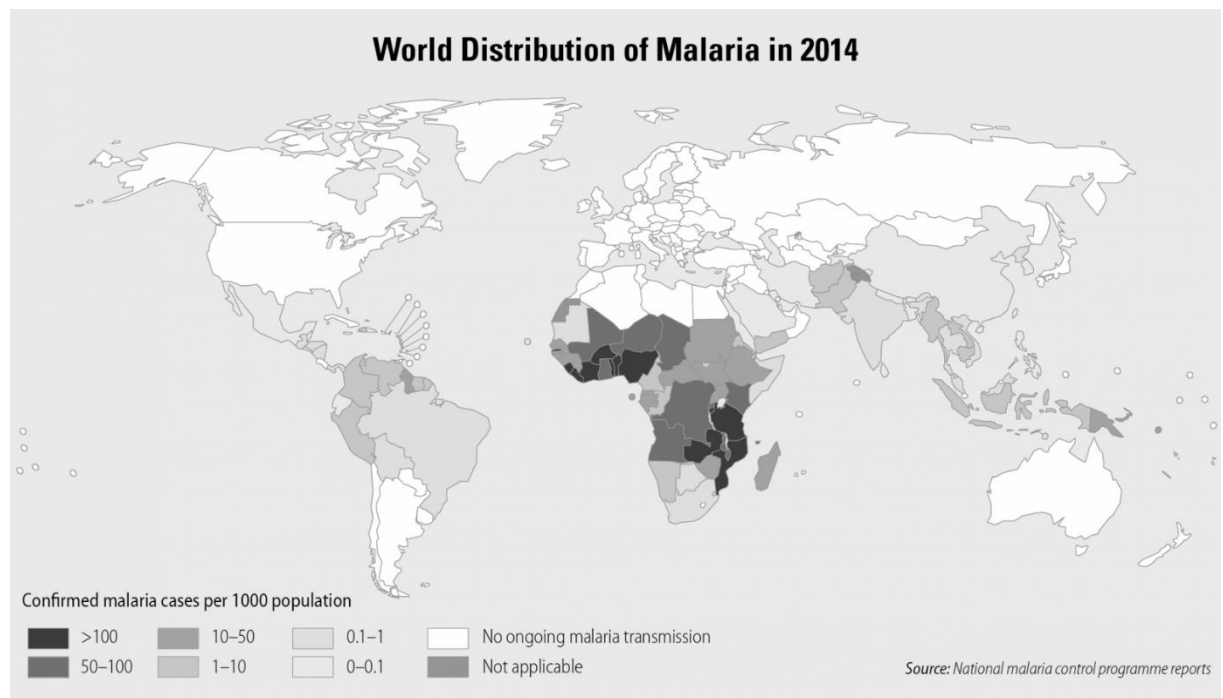


Abbildung 1: Weltweites Ausbreitungsgebiet von Malaria (World Health Organization, 2014)

Dass am stärksten betroffene Gebiet ist Afrika, aber es treten auch immer wieder Krankheitsfälle in Südamerika und Südasien auf. Im Jahr 2013 starben laut WHO (World Health Organization) ca. 584'000 Menschen an Malaria und 198'000'000 waren mit der Krankheit infiziert. Mit 90 % tritt der Großteil der Todesfälle in Afrika auf. Dabei sind mit 78 % am häufigsten Kinder unter 5 Jahren betroffen (World Health Organization, 2014). Diese hohen Zahlen könnten durch die Problematik des sinkenden Interesses der Pharmakonzerne an neuen Antiinfektiva bzw. Impfstoffen gegen Krankheiten in den betroffenen Ländern erklärt werden. Die betroffenen Länder verfügen nicht über die finanziellen Mittel, um teure und übergreifende Maßnahmen durchführen zu können. Beschränkte Mittel im Kampf gegen Malaria und schlechte oder gar nicht vorhandene Logistik und Aufklärung in den betroffenen Ländern, lässt die Situation unverändert

erscheinen (World Health Organization, 2014). Dass es auch andere Möglichkeiten gibt, hat der Ebola-Ausbruch 2014 in Afrika oder die rückgängigen Zahlen an AIDS-Neuinfizierungen gezeigt (Wellcome Trust and The Center for Infectious Disease Research and Policy, 2015). Dahingehend, dass das Thema Ebola durch die Medien publik wurde, sind auch viele westliche Staaten mit finanzieller Unterstützung oder humanitärer Hilfe vor Ort aktiv geworden. Deshalb konnte die Epidemie eingeschränkt werden und es wurde sogar mit einer Testphase für einen vielversprechenden Impfstoff begonnen (Wellcome Trust and The Center for Infectious Disease Research and Policy, 2015; Agnandji et al., 2015). Jedoch sind für die effektive Bekämpfung von Malaria viele Faktoren nötig und nur die Gesamtheit führt zu einer erfolgreichen Eliminierung des Erregers und somit zu einer Bekämpfung einer globalen Problematik.

Ein möglicher Ansatz ist die Entwicklung neuer Antiinfektiva. Zu diesen zählen unter anderem Antibiotika, die gegen Bakterien eingesetzt werden und Antimykotika, die zur Eliminierung von Hefen und Pilzen verwendet werden (zum Überblick siehe Fischer et al., 2014). Aufgrund der Ausbildung immer neuer Resistenzen (siehe Abschnitt 2.4.) gegen Antibiotika bzw. Antiinfektiva, ist es stets erforderlich neue Wirkstoffe zur Bekämpfung von Krankheitserregern zu entwickeln. Die Resistenzen führen zu einer Abschwächung, oder sogar zum Verlust, der antibiotischen Wirkung. (zum Überblick siehe Fischer et al., 2014).

Der Methylerythritolphosphatweg (MEP-Stoffwechselweg) oder auch Non-Mevalonatweg ist ein möglicher Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Antiinfektiva. Auf diesem Biosyntheseweg werden von Organismen über mehrere Schritte die Grundbausteine Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) synthetisiert (Rohmer, 1999). Beide Verbindungen sind Vorläufer vieler Terpene, wie zum Beispiel D-Vitamine und einige Hormone (Breitmaier, 2005). Bei der Bekämpfung von schädlichen Organismen im menschlichen Körper kann der Non-Mevalonatweg ein möglicher Ansatzpunkt sein (J. Gershenzon and Croteau, 1990; Lichtenthaler et al., 1997). Der Non-Mevalonatweg benötigt andere Ausgangsbausteine und andere Enzyme. Somit wäre eine Inhibierung einzelner Enzyme des MEP-Biosyntheseweges möglich, ohne dass die Synthese von IPP und DMAPP im menschlichen Organismus beeinträchtigt wäre. Das würde im besten Fall bedeuten, dass sofern der Erreger an der Inhibierung des MEP-

Biosyntheseweges stirbt, der Wirt des Krankheitserregers keine unerwünschte Folgen davon tragen würde (Fischer et al., 2014).

2.1. Malaria (*Plasmodium vivax*)

Malaria ist eine Tropenkrankheit, die von den Erregern der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen wird. Der Parasit ist hauptsächlich in den Tropen und Subtropen der Erde heimisch und wird von der weiblichen Stechmücke (Moskito), der Gattung Anopheles übertragen. Humanpathogene Erreger sind *Plasmodium falciparum* (*Malaria tropica*), *Plasmodium vivax* (*Malaria tertiana*), *Plasmodium ovale* (*Malaria tertiana*), *Plasmodium malariae* (*Malaria quartana*) und *Plasmodium knowlesi* (Idel, 1999; Walker et al., 2010). Die Erreger unterscheiden sich hinsichtlich der Schwere des Krankheitsverlaufs. Nach bisherigen Erkenntnissen ist *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*) der klinisch bedeutsamste und bedrohlichste Vertreter. Die typischen Symptome sind ein hohes wiederkehrendes Fieber, Schüttelfrost und Beschwerden des Magen-Darm-Trakts, sowie Krämpfe. Besonders betroffen sind Kinder und ältere Menschen (World Health Organization, 2014; Walker et al., 2010).

Der Krankheitserreger der *Malaria tertiana* ist ein einzelliger Parasit und gehört zu den *Plasmodien*. Im Gegensatz zu *Malaria tropica* hat diese hervorgerufene Malariaart oft eine gutartige Verlaufsform und ist in vielen Fällen heilbar, aber durch die hohe Anzahl an Infektionen (72 – 80 Millionen pro Jahr) kommt es auch bei dieser Malariaart in absoluten Zahlen gesehen zu einer hohen Morbidität (Price et al., 2009; Mendis et al., 2001; Cornejo and Escalante, 2006). *Plasmodium vivax* (*P. vivax*) kommt vor allem in Asien und westlichem Pazifik sowie Mittel- und Südamerika vor. Der Schädling gelangt über die Mücke in den menschlichen Körper und infiziert zunächst Leberzellen. Nach Reifung und Vermehrung wird der Erreger in die Blutbahn freigesetzt, wo er rote Blutkörperchen infiziert und für die typischen Krankheitssymptome verantwortlich ist. Durch Bildung von Gametozyten und einen erneuten Stich durch einen möglichen Wirt, gelangt der Parasit wieder in eine Stechmücke und der Kreislauf beginnt erneut (Lindner et al., 2012).

Das hauptsächliche Problem der Krankheit *Malaria tertiana* ist, dass sie im Anfangsstadium kaum von der schweren *Malaria tropica* zu unterscheiden ist und es somit immer wieder zu

Fehlbehandlungen führt. Außerdem hat der Erreger eine außergewöhnliche phänotypische Vielfalt, weswegen es schwieriger ist, den Schädling effektiv zu bekämpfen (Neafsey et al., 2012; Carlton et al., 2009).

2.2. Der MEP-Biosyntheseweg

Eine gängige Theorie lautet, dass im Laufe der Evolution ein Vertreter einer früheren Generation des Malariaparasiten eine Alge inkorporierte, wodurch sich ein intrazelluläres Kompartiment (der sogenannte Apikoplast) entwickelt hat. Im Apikoplast des Erregers findet der MEP-Biosyntheseweg (Non-Mevalonatweg) statt. Dieser wird von *Plasmodien* für die Biosynthese von isoprenoiden Vorstufen wie IPP und DMAPP verwendet (Eisenreich et al., 2004).

Als Ausgangsstoff dient Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (nicht Mevalonat, wie beim Mevalonatweg) (Lichtenthaler et al., 1997). Der Name MEP-Weg stammt von der zentralen Verbindung Methylerythritolphosphat (Verbindung 4 in Abbildung 2, MEP) des Biosyntheseweges (Illarionova et al., 2006).

In Abbildung 2 ist der MEP-Biosyntheseweg über die verschiedenen Schritte dargestellt.

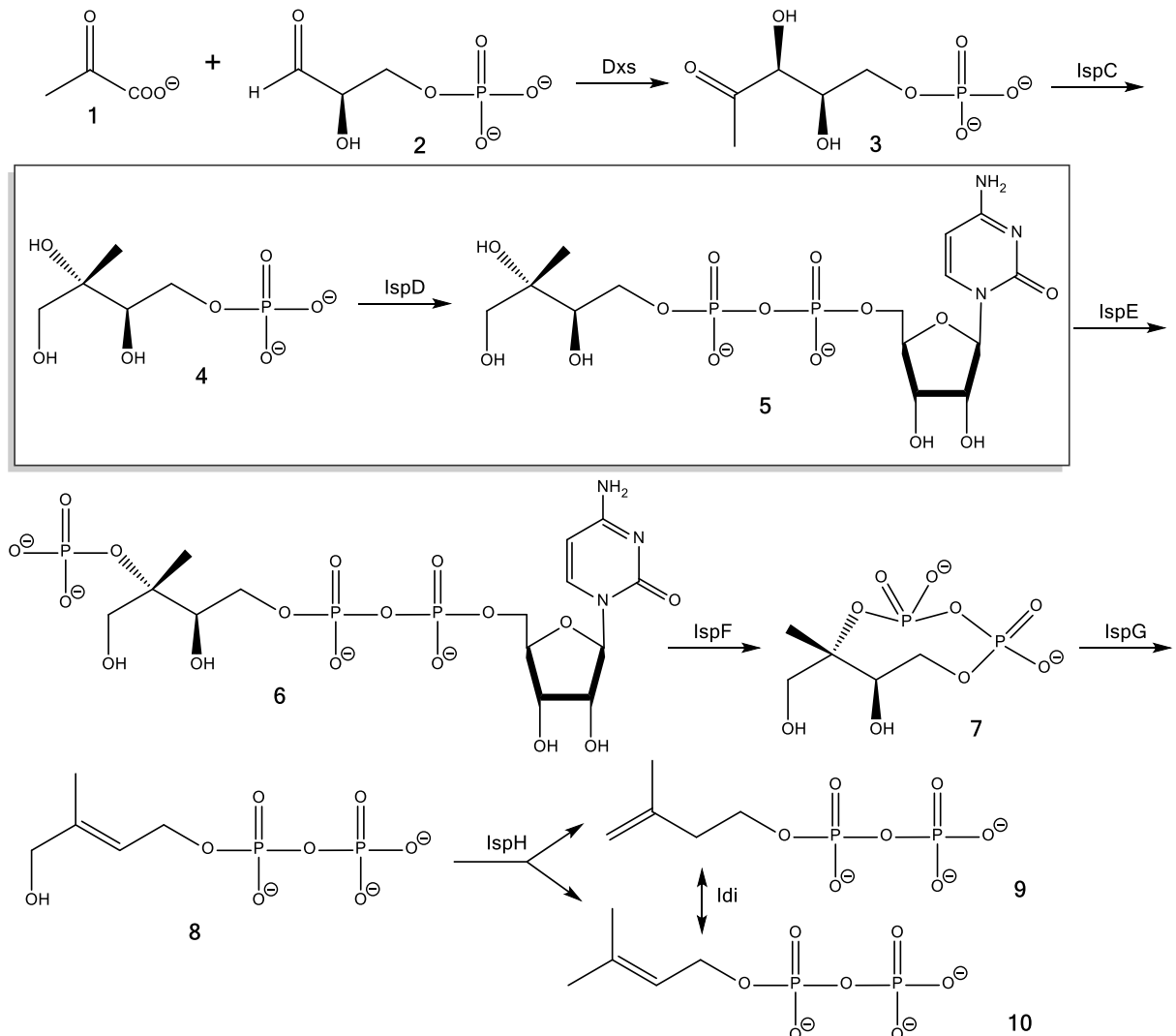


Abbildung 2: Schematische Darstellung des MEP-Biosyntheseweges (Illarionova et al., 2006). 1: Pyruvat, 2: Glycerinaldehyd-3-phosphat, Dxs: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase, 3: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP), IspC: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase, 4: 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP), IspD: 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase, 5: 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME), IspE: 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase, 6: 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-2-phosphat (CDP-MEP), IspF: 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase, 7: 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (MEcPP), IspG: 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat-Synthase, 8: 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-di-phosphat (HMB-PP), IspH: 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat-Reduktase, 9: Iso-pentenylidiphosphat (IPP), 10: Dimethylallyldiphosphat (DMAPP), Idi: Isopentenylidiphosphat-Isomerase (Rohmer et al., 1993)

Die Umsetzung von Schritt 4 zu 5 (in Abbildung 2 eingerahmt) durch IspD, ist der für diese Arbeit relevante Teil des MEP-Biosyntheseweges.

2.3. Terpene

Terpene gehören mit ihren 20000 bekannten Vertretern zu einer der größten Naturstoffklasse. Abgeleitet werden Terpene formal von Isopren und folgen dem Bauprinzip $(C_5)_n$. Sie zeichnen sich durch ein großes Kohlenstoffgerüst mit wenigen funktionellen Gruppen aus (Breitmaier, 2005).

Die Naturstoffklasse der Terpene beinhaltet für viele Organismen, den menschlichen Körper eingeschlossen, essenzielle Substanzen. Dazu gehören Vitamine, wie Vitamin E, oder auch Hormone und Steroide (Breitmaier, 2005). Ausgangsstoffe dieser großen Gruppe an Substanzen im Organismus sind IPP (siehe Abbildung 2, Substanz 9) und DMAPP (siehe Abbildung 2, Substanz 10), (Zinglé et al., 2010).

2.4. Resistenzentwicklungen

Resistenzbildungen von Erregern gegen Antiinfektiva sind ubiquitär. Als Beispiel für resistente Bakterien sind die nosokomialen Erreger wie Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) und multiresistente *Enterobacteriaceae* (MRE) zu nennen (Leverstein-van Hall et al., 2001; Köck et al., 2010). Ein Grund für Resistenzbildungen ist der natürliche Selektionsdruck. Die Entwicklung von Resistenzen ist als Anpassung an extreme Umweltbedingungen zu verstehen, die aufgrund der sehr hohen Wachstumsrate und kurzen Generationszeiten der Mikroorganismen in verhältnismäßig kurzen Zeitabständen entstehen können (Fischer et al., 2014). Weitere Gründe können die Aufnahme von Fremd-DNA sein, wodurch aufgenommene Gene die Resistenzen dem Wirt vermitteln. Eine zusätzliche Ursache sind falsche Verwendungen von Antibiotika in der Bevölkerung bzw. bei der Tierhaltung. Durch eine fehlerhafte Medikation können sich mit der Zeit resistente Erreger bilden (Rodríguez-Rojas et al., 2013). Die Aufnahme von Antibiotika erfolgt mittlerweile nicht nur in direkter Arzneiform, sondern auch über Lebensmittel. Vor allem in der Tiermast können durch den unkontrollierten Einsatz von Antibiotika und mangelnder Hygiene während des Schlachtprozesses resistente Keime auf Lebensmittel übergehen (Wegener, 2003).

Um die Entwicklung der Resistenzbildungen zu veranschaulichen, sind in Tabelle 1 einige bekannte Antibiotika mit dem Zeitpunkt der Markteinführung und dem Zeitpunkt der ersten beobachteten Resistenzen aufgeführt.

Tabelle 1: Antibiotika – Einführung und Resistenzentwicklung (Palumbi, 2001)

Antibiotikum	Jahr der Einführung	Jahr der beobachteten Resistenzen
Sulfonamide	1930s	1940s
Penicillin	1943	1946
Chloramphenicol	1947	1959
Vancomycin	1956	1988
Methicillin	1960	1961

Die Zeit bis zur Resistenzentwicklung ist stark unterschiedlich und benötigt von ca. 30 Jahren bei Vancomycin, bis ca. 10 Jahren bei den Sulfonamiden und Penicillin sowie Chloramphenicol, oder sogar nur ein Jahr bei Methicillin. Diese Unterschiede in der zeitlichen Resistenzbildung sind Ergebnisse der bereits diskutierten vielfältigen Faktoren (Palumbi, 2001).

Aus diesen Gründen ist es wichtig, die Forschung an neuen Antiinfektiva voranzutreiben, um einen Vorsprung gegenüber resistenten Bakterien aufrechtzuerhalten (Wells, 2010).

2.5. Arzneistoffentwicklung

Ein Weg der Arzneistoffentwicklung ist die Strukturaufklärung des gewünschten Ziel-Moleküls (Zielstruktur). Meistens werden dabei Enzyme in Stoffwechselwegen untersucht. Diese sollten im menschlichen Organismus nicht vorkommen oder im Erreger gehemmt werden können, ohne Nebenwirkungen für den Menschen zu erzeugen. Kristallstrukturen ermöglichen es, gezielt Antiinfektiva *in silico* mittels *Molecular Modelling* in das aktive Zentrum des Ziel-Enzyms zu modellieren. Ist die Struktur des Ziel-Enzyms unbekannt, ist ein möglicher anderer Weg und eine wichtige Vorstufe für die Arzneistoffentwicklung die *Trial-*

and-Error-Methode (Versuch und Irrtum; (Popper, 1935)) im Hochdurchsatz-Verfahren (engl.: *High Throughput Screening*, HTS). Dabei werden Substanzbibliotheken mit möglichst hoher Strukturendiversität gegen das Enzym getestet und gefundene potenzielle Inhibitoren weiter hinsichtlich ihrer Hemmwirkung charakterisiert. Substanzen, die über *High Throughput Screening* getestet werden, zeigten oftmals schon an anderer Stelle eine gewünschte Wirkung, sodass die Wahrscheinlichkeit einer gewünschten Reaktion erhöht wird (Hüser, 2006; Lipinski et al., 2001). Ein wichtiger Faktor bei der Auswahl der Substanzen sind die Lipinski-Regeln. Zum Beispiel sollten Substanzen, die oral verabreicht werden, eine hohe Wahrscheinlichkeit der Aufnahme in den Blutkreislauf haben. Es ist zwar möglich, dass ein Arzneistoff diese Regeln nicht erfüllt und trotzdem eine gute Bioverfügbarkeit besitzt, aber bei der Arzneistoffentwicklung spielen diese Regeln heutzutage eine große Rolle (Stryer et al., 2007; Lipinski, 2004)

Ein wichtiger Parameter bei der Entwicklung von Antiinfektiva ist im frühen Forschungsstadium die Affinität der Leitsubstanz zum Ziel-Enzym. Die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes K_i und der IC_{50} -Wert geben Auskunft über die Affinität des Inhibitors zum Ziel-Enzym. Der IC_{50} -Wert beschreibt die Inhibitor-konzentration, die benötigt wird, um die Aktivität des Ziel-Enzyms um 50 % zu senken (Cer et al., 2009).

Außerdem ist ein weiterer Faktor die Bindungsstärke des gefundenen Inhibitors an das Ziel-Enzym. Oftmals binden mögliche Antiinfektiva an mehreren Stellen oder haben verschiedene Bindungsmechanismen und reduzieren somit eine gewünschte Wirkung (Stryer et al., 2007).

Danach erfolgen Untersuchungen auf ADME bzw. ADME/T-Eigenschaften (absorption, distribution, metabolism, excretion, toxicology). Ein Schema dazu ist in Abbildung 3 dargestellt.

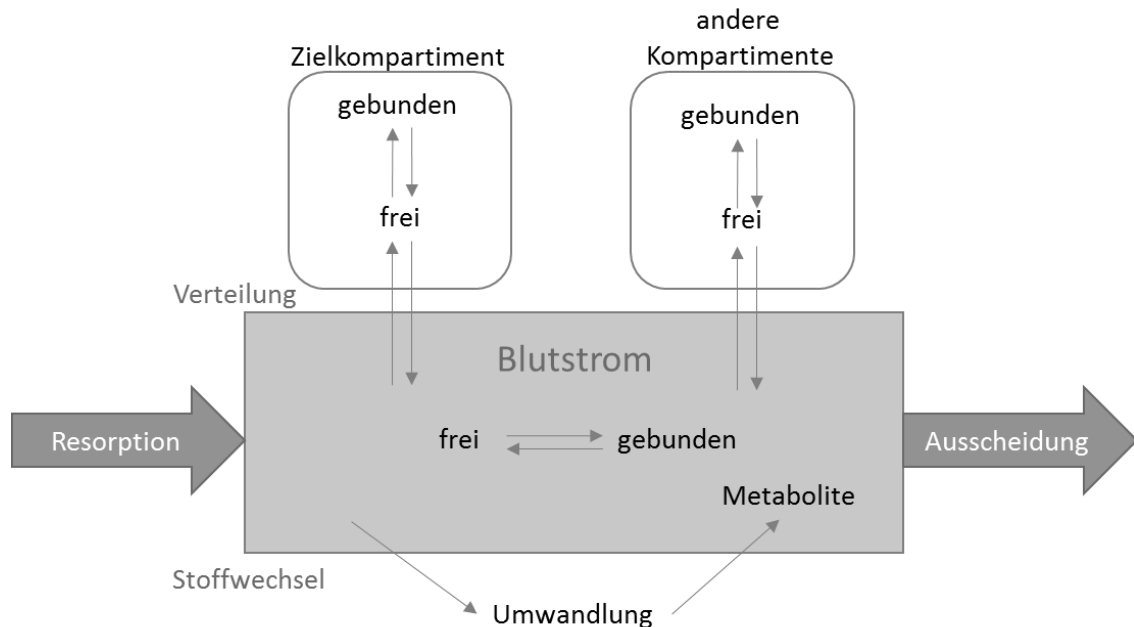


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen von Antiinfektiva im Organismus (Stryer et al., 2007)

Ob ein potenzieller Arzneistoff ein gewünschtes Zielmolekül im Körper erreicht, hängt von unterschiedlichen Mechanismen, wie zum Beispiel Resorption, Verteilung, Stoffwechsel und Ausscheidung ab. Die Vorgänge werden kurz in Abbildung 3 veranschaulicht. Der Ablauf dieser Prozesse wird durch Polaritäten der Arzneistoffe vorhergesagt bzw. abgeschätzt oder in Tierversuchen getestet. Nur wenn alle Vorgänge wie gewünscht erfolgen und eine Wirkung nachweisbar ist, kann ein Medikament zugelassen werden (Stryer et al., 2007; Klebe, 2009).

Verbindung der Entwicklung von Herbiziden und Antiinfektiva gegen *Plasmodium*

Wie im Abschnitt 2.2. erklärt, verwenden einige Erreger (z. B. *Plasmodium*) den gleichen Biosyntheseweg, wie einige Pflanzen z. B. *Arabidopsis thaliana*. Daher könnten Ergebnisse aus der Herbizid-Forschung für die Malaria-Bekämpfung und umgekehrt genutzt werden (Bajsa et al., 2007; Duke, 2010). Ein positives Beispiel dafür ist Fosmidomycin, welches

sowohl die Deoxyxylulosephosphat Reductoisomerase (DXR, IspC) aus dem MEP-Biosyntheseweg von *Plasmodien* und Bakterien als auch die von Pflanzen hemmt (Zeidler et al., 1998). Dieser Ansatz aus der Herbizid-Forschung kann auch auf andere Gebiete angewendet werden. Ein weiterer Vorteil von Pflanzenschutzmitteln ist, dass sie oft im Maßstab von über 1000 Tonnen/Jahr produziert werden und somit relativ kostengünstig verfügbar wären (zum Überblick siehe Fischer et al., 2014).

2.6. High Throughput Screening

Beim *High Throughput Screening* (HTS) oder auch Hochdurchsatz-Screening werden neue, biologisch aktive Moleküle überprüft. Bei dieser Methode werden möglichst viele kleine chemische Substanzen in einem automatisierten Verfahren auf eine mögliche Zielverbindung, in einem vorher validierten Prozess, getestet. Von den ermittelten Kandidaten lassen sich Leitstrukturen ableiten, um neue wirksame Arzneistoffe zu entwickeln (Hüser, 2006; Valler and Green, 2000).

Diese automatisierte Technologie wird hauptsächlich in der Pharmaforschung eingesetzt und ist ein Verfahren bei dem 10000 bis eine Million Moleküle pro Tag biochemischen oder anderen Tests unterzogen werden (Hüser, 2006, Wunder et al., 2008). Dabei wird eine Substanz auf eine bestimmte Wirkung untersucht. Dies kann auf unterschiedlichsten Wegen erfolgen, wie z.B. durch zielbasierte oder Phänotyp-basierte Prüfsysteme (Assays) (Hüser, 2006).

2.7. Arzneistoffanwendung bei Malaria

Ein Beispiel für bereits etablierte Malariamedikamente sind Chloroquin, Proguanil, Mefloquin, Atovaquon/Proguanil, Doxycyclin und Sulfadoxin-Pyrimethamin (World Health Organization, 2010). In Abbildung 4 sind einige Vertreter mit Strukturformel dargestellt.

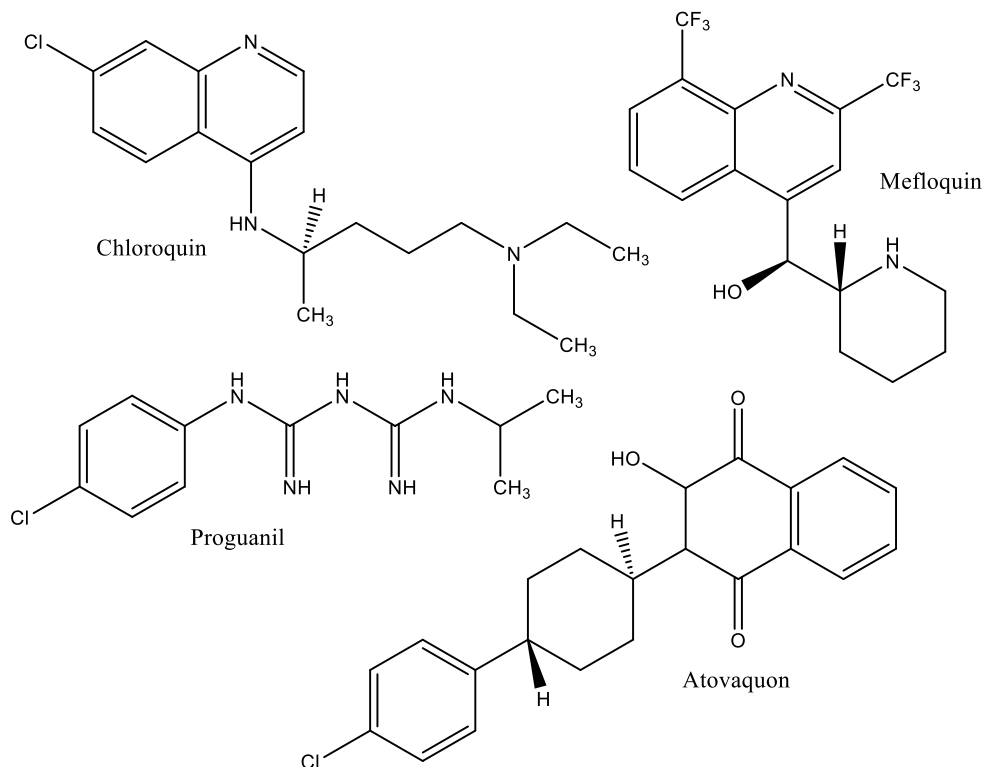


Abbildung 4: Einige Malariamedikamente mit Strukturformel

Bei Chloroquin und Mefloquin ist nur eines der Stereoisomere dargestellt. Ein häufiges Strukturmotiv ist Chlorbenzol, ansonsten unterscheiden sich die Strukturen sehr stark. Je nach Erreger und Standort werden mitunter auch Kombinationen verabreicht. Das soll eine steigende Resistenz wie bei Chloroquin verhindern oder abmildern (World Health Organization, 2014). Von Proguanil wird wegen Resistenzen schon völlig abgeraten, obwohl es im Verhältnis zu Chloroquin weniger Nebenwirkungen aufzeigt und auch für Schwangere, sowie für Kleinkinder geeignet wäre. Einige dieser Präparate sind wegen hoher Nebenwirkungen in Deutschland nicht zugelassen, werden aber teilweise bei Reisen in Tropenregionen trotzdem verabreicht. Daher liegt auf der Hand, dass die Entwicklung

neuer Antiinfektiva aufgrund der Nebenwirkungen und Resistenzen der verfügbaren Malariamedikamente, unerlässlich ist (World Health Organization, 2014; Betram et al., 2008).

3. Aufgabenstellung der Arbeit

Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Erforschung potenzieller Inhibitoren zur gezielten Hemmung des Erregers von Malaria *Plasmodium vivax* und die Charakterisierung in Bezug auf Wechselwirkungen mit dem Ziel-Enzym 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat-transferase (IspD).

Als Grundlage dazu sollte das Enzym IspD des Malariaerregers *Plasmodium vivax* (*P. vivax*), welches die Umsetzung von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (4) zu 4 Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (5) katalysiert, in ausreichender Menge in *Escherichia coli* (*E. coli*) synthetisiert werden. Um das zu ermöglichen war eine Optimierung der Expression und Reinigung des Proteins notwendig. Das Ziel-Enzym PvlspD ist Teil des MEP-Biosyntheseweges des Erregers. Das Analogon zum MEP-Biosyntheseweg im menschlichen Organismus ist der Mevalonatweg. Zudem ist es möglich, einzelne Enzyme des MEP-Biosyntheseweges zu hemmen, ohne den Mevalonatweg im Wirtsorganismus zu unterbrechen, sodass keine Beeinträchtigung der Synthese essenzieller Bausteine für den menschlichen Körper bedeuten würde (siehe Abschnitt 2.2. und 2.3.). Die einzelnen Schritte des MEP-Biosyntheseweges sind aufgeklärt (siehe Kapitel 2.2.) aber Kristallstrukturen der einzelnen Enzyme in wichtigen Organismen, wie z. B. *Plasmodium vivax*, sind jedoch bisher weitgehend unbekannt. Folglich sollte ein *High Throughput Screening* (HTS) zur Findung neuer Antiinfektiva angewendet werden.

Weiterführend war es nötig, das Protein in *E. coli* zu klonieren und das optimale Expressionssystem, sowie die besten Expressionsbedingungen zu ermitteln. Darüber hinaus sollten benötigte Mengen des Ziel-Enzyms, Hilfsenzyme und alle benötigten Substrate für ein HTS und die folgenden Charakterisierungen, in genügender Menge und Qualität bereitgestellt werden.

Anschließend konnte ein HTS mit 103'909 Substanzen erfolgen. Dafür sollte eine nach allgemeingültigen Regeln, wie z. B. den „*Lipinski's Rules Of Five*“, optimierte Substanzbibliothek, verwendet werden (Lipinski et al., 2001) (siehe Kapitel 2.5.). Die genauen Spezifikationen der Substanzbank sind in Kapitel 4.6. beschrieben. Die HTS-Messungen sollten mittels eines fotometrischen Assays erfolgen. Nach der Überprüfung der gefundenen Inhibitoren würde die Durchführung eines Counterscreenings erfolgen, um

eine Hemmung der eingesetzten Hilfsenzyme auszuschließen. Des Weiteren müssten die ermittelten Inhibitoren hinsichtlich ihrer Hemmwirkung durch einen fotometrischen Assay charakterisiert werden und eine weitere Überprüfung mittels ^{13}C -NMR erfolgen. Zusätzlich sollten Bindungsmechanismen, Analoga der gefundenen Leitstrukturen und die Wirkung der Inhibitoren auf das gleiche Ziel-Enzym in anderen Organismen untersucht werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen weitere Tests ermöglichen, um zukünftig neue Antiinfektiva zu etablieren.

4. Ergebnisse und Diskussion

Für die vorliegende Arbeit wurde ein synthetisches Gen (GenScript USA Inc.), welches das Ziel-Protein kodiert, genutzt. Die Expressionsleistung dieses Gens wurde im Vorfeld optimiert, um das Protein in ausreichender Menge zu exprimieren und aufzureinigen. Danach erfolgten die Arbeiten des HTS und eine anschließende Charakterisierung der gefundenen Treffer. Der Ablauf der hier beschriebenen Arbeiten ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

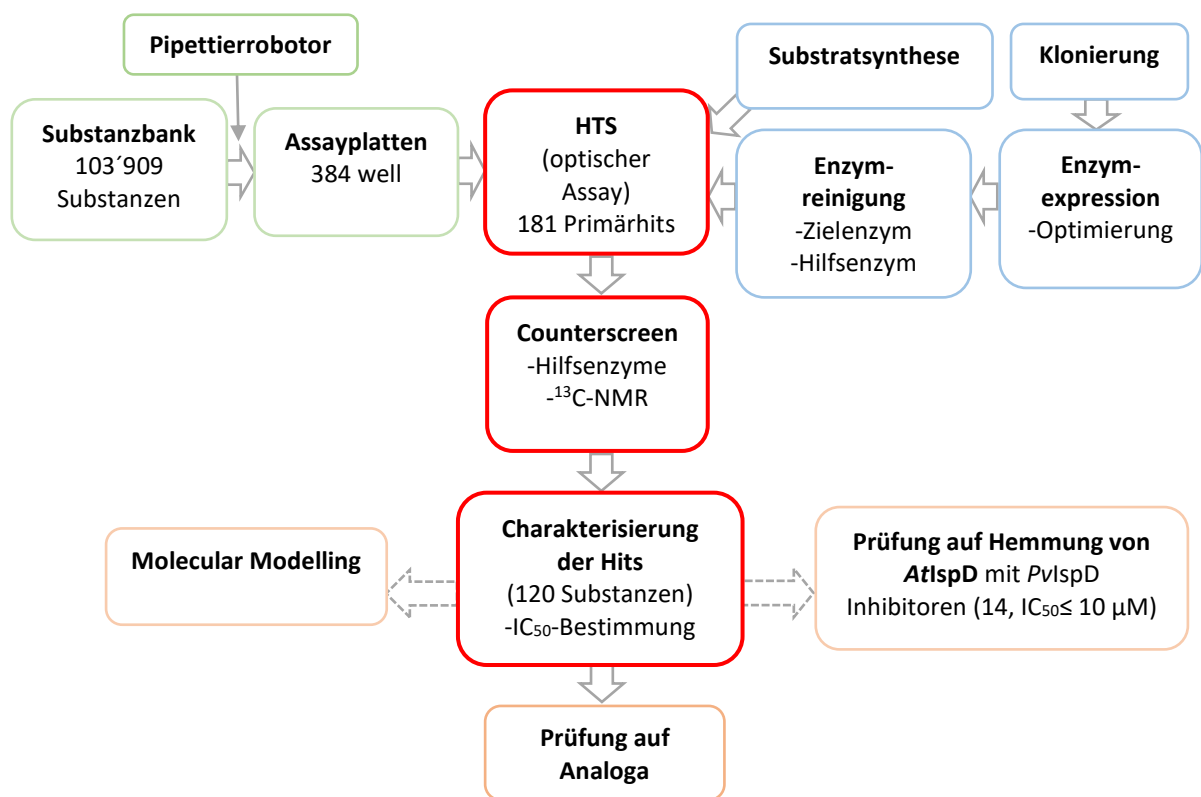


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Arbeitsabläufe

4.1. IspD aus *P. vivax* Expressionsvarianten

Das synthetische Gen IspD aus *P. vivax* wurde von Herrn Prof. Dr. Fischer bereitgestellt. IspD aus *P. vivax* wurde zunächst im pET-22b(+) Vektor synthetisiert und sollte auf seine Expressionsleistung hin optimiert werden. Dazu wurden verschiedene Affinitätstags am C-Terminus oder N-Terminus des Proteins variiert. Zusätzlich erfolgte ein Austausch des Vektors, von einem pET22-b(+)-Vektor, zu einem pQE-30 oder pNCO-113-Vektor. Optimierte Affinitätstags und Vektoren wurden im Anschluss daran in verschiedenen Zellsystemen, wie zum Beispiel *E. coli* BL21(DE3), *E. coli* XL1-Blue, *E. coli* M15 und *E. coli* Arctic Express (DE3) getestet.

IspD aus *P. vivax*, das synthetisierte Gen

In dem Abschnitt soll kurz das synthetische Gen und dessen Eigenschaften, sowie die ersten Expressionsversuche zur Optimierung der Expression des Gens betrachtet werden.

Die Sequenz von IspD aus *P. vivax* wurde in Vorarbeiten (Prof. Dr. Fischer) an eine Expression im Wirtsorganismus *E. coli* für eine höhere Expressionsrate und zur besseren Nutzbarkeit optimiert (Codon-Optimierung). Das Gen enthält die genetische Information für die Expression des Enzyms IspD aus *P. vivax* (PvIspD). PvIspD ist aus 569 Aminosäuren aufgebaut und katalysiert den dritten Schritt des Mevalonat-unabhängigen Terpenbiosyntheseweges (Zinglé et al., 2010).

Die optimierte Sequenz des Gens ist in Abbildung 6 dargestellt.

```

1  CATATGGGTAACAGAGCATTCAAATCACATCACGGTCACTTTTAAAGCGCTGAAGGCGAA 60
1  H M G N R A F K S H H G H F L S A E G E 20

61  GCTGTAAAGACTCACCACGGTCATCATGATCATCACACCCATTTCACGTTGAAAATCAT 120
21  A V K T H H G H H D H H T H F H V E N H 40

121  GGTGGTAAAGTTGCATTAAAGACCCATTCCGGAAAATACCTTTCAATTGGTGATCATAAA 180
41  G G K V A L K T H S G K Y L S I G D H K 60

181  CAAGTTTACCTCTCACACCACTTACACGGTGACCACTCACTCTTCCACTTAGAACATCAT 240
61  Q V Y L S H H L H G D H S L F H L E H H 80

241  GCGGGTAAAGTCTCAATCAAAGGTCATCACCACCACTACATTTCCGCTGATCATCATGGT 300
81  G G K V S I K G H H H H Y I S A D H H G 100

301  CATGTTTCAACCAAAGAACACCACGATCACGACACCACCTTTGAAGAAATTATTATTGGA 360
101  H V S T K E H H D H D T T F E E I I I G 120

361  TCCGAAAACCTGTATTTTCAGGGCGATGACGACGATAAGTCGCTGCACAAGAAGAACATC 420
121  S E N L Y F Q G D D D D K S L H K K N I 140

421  CACGCCATTTTGCTCTGCGGTGGCATCGGCCAACGTACGGAGTTGGCTAGCCGTAAGCAA 480
141  H A I L L C G G I G Q R T E L A S R K Q 160

481  TTCCTTAAGCTGAATGATGTCCCTCTCTTCGTCTACTCCTTTAATTTGTTTGTGAAATGC 540
161  F L K L N D V P L F V Y S F N L F V K C 180

541  AATTTAATTAAAGCTATCACCCCTGTGTGCGACCCGAACCTATTTCCAGCACGTCATCGAG 600
181  N L I K A I T L V C D P N Y F Q H V I E 200

601  AGCATTAACCGCCATAACGCTTCTCTTCTGCGTCGCAAGCACCAGCGTGGTTTCCTGCGC 660
201  S I N R H N A S L L R R K H Q R G F L R 220

661  CGTGGTCATTCTGAAGAATGTGTTGGCCTCGTCGGGTGAGCAATCCGAGGGCGATGCCAGC 720
221  R G H S K N V L A S S G E Q S E G D A S 240

721  GGCGCTCTCCATTTTTTAAAGAAGAATAAATATATCCTGTATGATAATGAGAAGGGCAAG 780
241  G A L H F L K K N K Y I L Y D N E K G K 260

781  TCGTCAACCAACTTGGATGAGCTGCTCAGCGATGTGACGGCCACGAAGGGCCAATACGTA 840
261  C V T N L D E L L S D V T A T K G Q Y V 280

841  TCAGAGGTTGACGAGGTGGACGAGGTGAAGCCAGGCGATGTAACTCAAATCGATACAAG 900
281  S E V D E V D E V K P G D V N S N R Y K 300

901  CTCATTGCGCTGGTGGAGAGCGGCCGCGAGCGTGCTGACTCCCTGTTGAATGCGCTGCGT 960
301  L I R L V E S G R E R A D S L L N A L R 320

```

Ergebnisse und Diskussion

```
961 GGTCTGGACTTGCGCGTGCAAACCGGTGAGTACATCAGCCAGCTGTTGCGCGGTGGTGGC 1020
321 G L D L R V Q T G E Y I S Q L L R G G G 340

1021 ACGGACGAAGCGGGTAAAGGCGATGGCGCGGATAAAGGTGATAAATCGGATGGTGTGGAT 1080
341 T D E A G K G D G A D K G D K S D G V D 360

1081 GGTGGCCACCCTGCAGACTGTACACCTATCTCGCACATCCTGGTGCACGACGGTGC GCGT 1140
361 G G H P A D C T P I S H I L V H D G A R 380

1141 CCATTCTGTCCGAGCTCGACCTCTTCAACCTGATTTACATGGCCACCATCGGTTCGCAAT 1200
381 P F L S E L D L F N L I Y M A T I G R N 400

1201 GCCATTCTGGGCTCGCGCGCCACGGACACCATTAAGCGTATCGGTACCGAGCAGCAAGGT 1260
401 A I L G S R A T D T I K R I G T E Q Q G 420

1261 GAGAGTTGCCACGTGTGAAGGCCACATGGATCGTCAATTCATCTTCGCAGCTCAAAC 1320
421 E S C P R V K A H M D R Q F I F A A Q T 440

1321 CCACAGATCTTCAGCAGCCAAGCGTTGCTCCAAGTGTGTGCGAAGTTACCTTCCC GCCGC 1380
441 P Q I F S S Q A L L Q V C A K L P S R R 460

1381 GGTGGCGAAACCCAGAAAGGTAGCCGTGCCTTCACCGATACTAGTTCCCTGTTTCAACAC 1440
461 G G E T P E G S R A F T D T S S L F Q H 480

1441 GTTACCAAAAAGAAAGTGTTTCGCTTTGCAGGCAAAGTTTCCTAATTTTAAGATTACAACG 1500
481 V T K K K V F A L Q A K F P N F K I T T 500

1501 CCGACGGATGTCTTCCTCGCCATCTTTCTGATGGGATGCATTTTCAAACCTTCTCATTCC 1560
501 P T D V F L A I F L M G C I F K T S H S 520

1561 GACGTCGACATGGGTATGTTTAAAGAAACGTTTCGTGAATTCCCATCTAGCTGCGTGCCT 1620
521 D V D M G M F K E T F V N S P S S C V P 540

1621 GCCAATCAGCTGAACGACCATTCTTTTACCACTCCCTAGGCGGTAAGCAGCGCGTCCTG 1680
541 A N Q L N D H F F Y H S L G G K Q R V L 560

1681 TACCGCCACTTTTACTACGAGTAAGCT 1707
561 Y R H F Y Y E * A 569
```

Abbildung 6: Sequenz des synthetisierten Gens von *PvlspD*, gelb markierter Bereich = Hisactophilin-Affinitätstag, blau markierter Bereich = TEV-Schnittstelle, grün markierter Bereich = Entero-kinaseschnittstelle

Das Molekulargewicht von *PvlspD* mit dem N-terminalen Hisactophilin-Affinitätstag (hac-Tag) beträgt 63.5 kDa (verwendete Software: ApE – A plasmid Editor v 2.0.47). Der gelb markierte Bereich in Abbildung 6 kennzeichnet den hac-Tag, durch den ein Protein mit Hilfe einer Nickel-Affinitätschromatographie (IMAC - Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography) gereinigt werden kann. Dies wird dadurch ermöglicht, dass Histidinreste

an zweiwertige Metallionen wie Ni^{2+} , Zn^{2+} u.a. binden. Hisactophilin (hac) ist ein 13.5 kDa großes Protein, bei dem 31 der 118 Aminosäurereste Histidine sind. Es stammt ursprünglich aus dem Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Scheels et al., 1989). Hisactophilin kann die Löslichkeit bzw. die Stabilität des Ziel Proteins verbessern (Risse et al., 2010). Den blau und grün markierten Bereich kennzeichnen die möglichen Schnittstellen des Enzyms, um den Affinitätstag für weitere Untersuchungen z. B. bei einer Kristallisation entfernen zu können.

Das Gen für *PvlspD*, wie in der Abbildung 6 dargestellt, wurde bereits in einem pET-22b(+)-Vektor geliefert. Dieses Gen wurde bezüglich seiner Expressionsleistung untersucht. Dazu wurde das Plasmid in BL21(DE3)-Zellen (*E. coli*) transformiert und drei, der erhaltenen, Klone wurden weiter untersucht. Alle drei Klone zeigten die gleichen Testexpressions-Ergebnisse. Genauere Angaben zu den Bedingungen der Testexpressionen sind im Anhang 6.10. zu finden. Beispielhaft ist in Abbildung 7 die Testexpression eines Klons gezeigt.

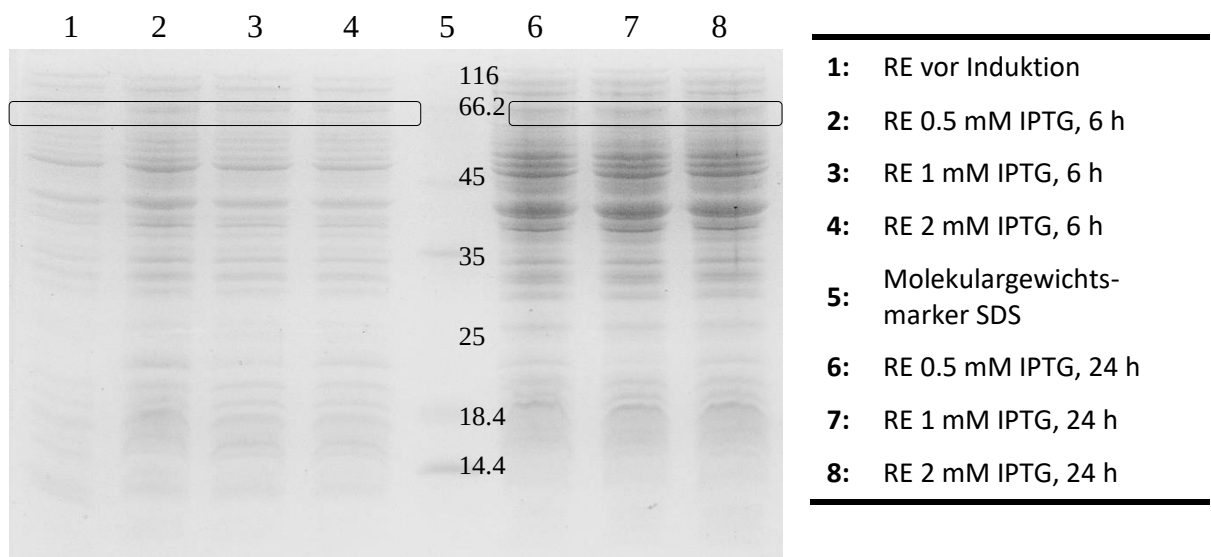


Abbildung 7: Testexpression des Klones 3 des *PvlspD*-Gens in einem pET-22b(+)-Vektor, RE = Rohextrakt, Spuren 2-4 und 6-8 zeigen RE nach Induktion und 6 h bzw. 24 h Inkubationszeit

Die gewünschte Proteinbande bei 63.5 kDa ist in Abbildung 7 eingerahmt worden. Eine Konzentrationsabhängigkeit der Expressionsleistung konnte im untersuchten Bereich von 0.5 mM bis 2.0 mM Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) nicht beobachtet werden. Eine längere Inkubationszeit (24 h) zeigt eine bessere Expressionsleistung der

Proteine, allerdings war dann auch eine nicht zuzuordnende Expression von zelleigenen Fremdproteinen zu beobachten. Auf Grundlage der Testexpression wurde, für eine Testanzucht, eine Zugabe von 1 mM IPTG sowie 24 h Inkubationszeit gewählt.

In der folgenden Abbildung 8 ist eine Reinigung einer Expression mit 1 mM IPTG und 24 h gezeigt.

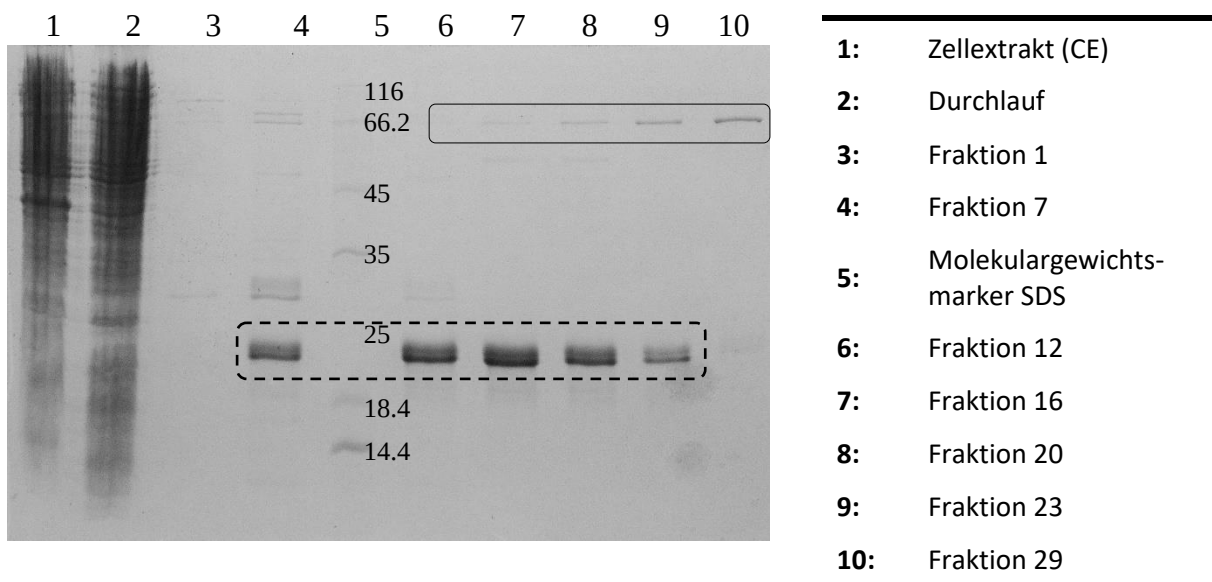


Abbildung 8: SDS-Gel der Reinigung von Klon 3, DL = Durchlauf, RE = Rohextrakt, Fr. = Fraktion, M = Marker

Als Fraktionen (siehe die Tabelle zur Abbildung 8) werden Lösungen bezeichnet, die während der Reinigung (Nickel-Affinitätschromatographie) nach der Säule regelmäßig und immer mit dem gleichen Volumen aufgefangen werden. Unter den gewählten Bedingungen zeigte sich eine geringe Expressionsleistung (Proteinbande bei 63.5 kDa, siehe Abbildung 8) von 0.5 mg/mL bzw. 1.5 mg *PvlspD* pro 8 g Zellen. Weiterhin war die Reinheit, wie in Abbildung 8 ersichtlich, gering (siehe eingerahmte Proteinbande). Die zweite deutlich sichtbare Bande bei ca. 23 kDa (siehe gestrichelt eingerahmte Proteinbande) könnte ein Hydrolyse-Produkt des Proteins sein, was sich bei der Reinigung oder auch schon bei der Expressierung abgespalten hat. Dieses Expressionssystem ist für ein HTS, bei dem große Mengen an Protein benötigt werden, als ungeeignet anzusehen. Um zu einer Alternative zu gelangen, wurde das synthetische Gen umgestaltet. Eine Variante war die Verwendung eines His₆-Affinitätstags (His₆-Tag) an verschiedenen Positionen (C-terminal und N-terminal) des Gens und der Einsatz verschiedener Vektoren (pQE-30 und pNCO-113) als

Expressionssystem. Die Arbeiten von Pérez-Gil konnten für den Organismus *Helicobacter pylori* zeigen, dass ein C-terminaler His₆-Tag die Stabilität des Proteins erhöht (Pérez-Gil et al., 2010). Allerdings ist IspD in *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) mit IspF zu einem Fusionsprotein verbunden und bildet ein bifunktionelles Enzym im Gegensatz zu IspD und IspF in *Plasmodium vivax*. Dadurch weicht die Struktur des Proteins in *H. pylori* von *P. vivax* ab. Dennoch ist dieses Expressionssystem mit einem C-terminalem His₆-Tag, wie in Abschnitt 4.1. beschrieben, erprobt worden.

IspD aus *P. vivax* mit C-terminalem His₆-Affinitätstag

Bei einer Veränderung des Konstruktes wird ein Plasmid, sowie ein DNA-Fragment (Insert) mit speziell ausgewählten Restriktionsenzymen inkubiert und geschnitten (Restriktion), sodass im Vektor und im DNA-Fragment (Insert) überhängende Enden (engl.: *sticky ends*) entstehen. Mit Hilfe der DNA-Polymerase werden Insert und Vektor bei der Ligation wieder zusammen gefügt und der gewünschte Austausch eines DNA-Fragments kann erfolgen. Das DNA-Fragment wurde vorher mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) generiert.

Für die Klonierung des *PvispD*-Gens in den pET-22b(+)-Vektor wurde der Affinitätstag Hisactophilin vom Gen entfernt und der pET-22b(+)-Vektor isoliert. Mit den Restriktionsenzymen *NdeI* und *XhoI* wurde das Gen als auch der Vektor verdaut und danach wurden beide ligiert. Im Anhang 6.9.1. sind die Primer und das resultierende Konstrukt aufgelistet. Anschließend erfolgte eine Transformation in BL21(DE3)-Zellen und in ArcticExpress(DE3)-Zellen. Es wurden zwei Kolonien von ArcticExpress(DE3)-Zellen analysiert.

Die 24 stündige Testexpression einer Kolonie ist in Abbildung 9 beispielhaft gezeigt.

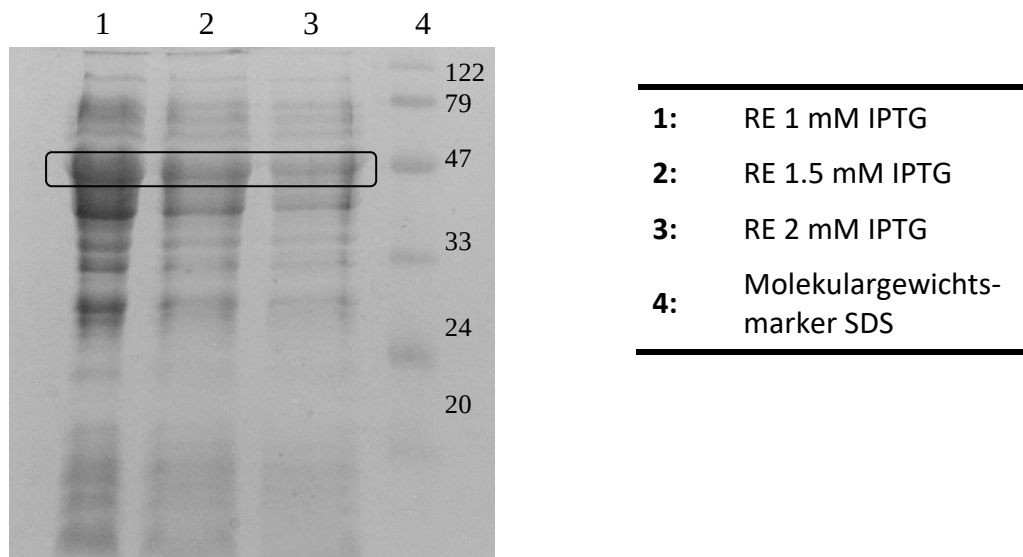


Abbildung 9: Testexpression des *PvispD* im pET-22b(+)-Vektor und in ArcticExpress(DE3)-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an IPTG, RE = Rohextrakt

In Abbildung 9 ist die, für *PvispD*, erwartete Proteinbande bei 48 kDa zu erkennen. Zusätzlich sind auch andere Proteinbanden, die deutlich intensiver sind, zu beobachten, was auf eine unzureichende Expression hindeutet. Da noch eine Aufreinigung erfolgen würde, wurde eine Anzucht für 24 h und 1 mM IPTG Zugabe des beschriebenen Expressionssystems durchgeführt. In Abbildung 10 ist das zugehörige SDS-Gel dargestellt.

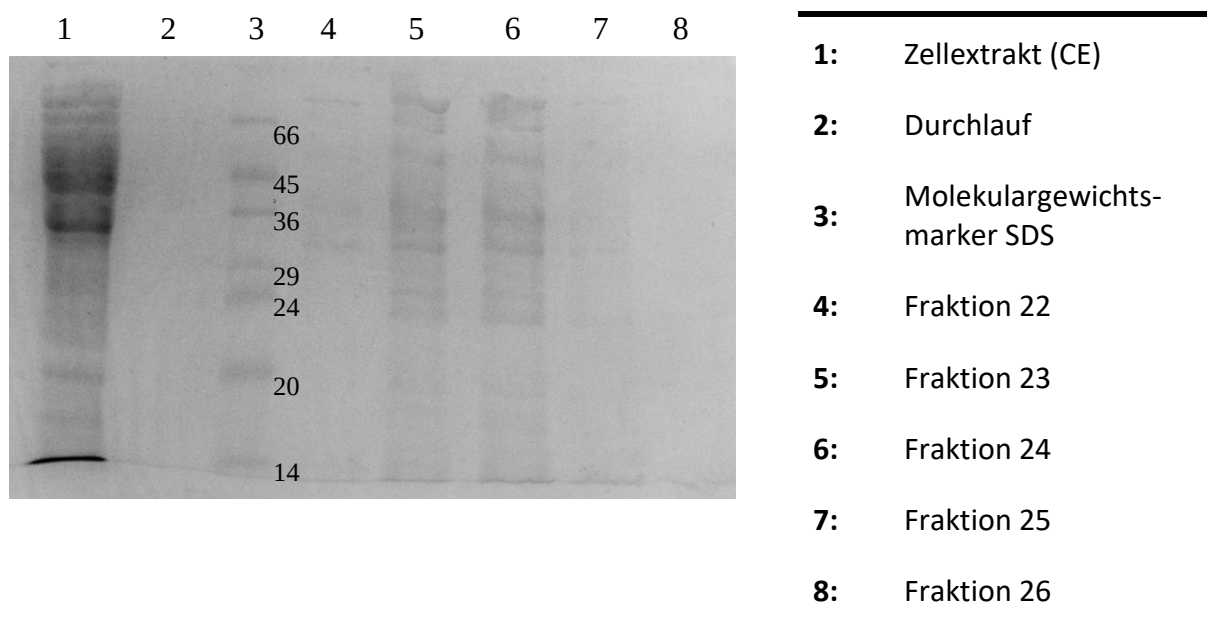


Abbildung 10: SDS-Gel der Aufreinigung von *PvispD* exprimiert mit einem pET-22b(+)-Vektor und in ArcticExpress(DE3)-Zellen

Wie in Abbildung 10 ersichtlich, konnte kein gereinigtes Protein erhalten werden.

IspD aus *P. vivax* mit N-terminalem His₆-Affinitätstag

Der C-terminale His₆-Tag im Konstrukt aus Abschnitt 4.1. wurde entfernt und ein N-terminaler His₆-Tag eingefügt. Daraufhin erfolgten weitere Klonierungen mit zwei verschiedenen Vektoren. Vektoren können die Expressionsleistung eines Proteins durch ihren verschiedenen Aufbau verändern. Der pET-22b(+)-Vektor z. B. besitzt einen T7-Promotor/lac-Operator und die Transkription vom T7-Promotor muss mit IPTG induziert werden. Als Vektoren kamen der pQE-30-Vektor und der pNCO-113-Vektor, beide mit T5-Promotor/lac-Operator, in Betracht. Die Vektorkarten bzw. Sequenzen der Vektoren sind im Anhang 6.8. aufgeführt. Die zugehörigen Primer und das resultierende Konstrukt sind im Anhang 6.9.2. aufgelistet.

Für die Klonierung des *PvispD*-Gens in den pQE-30-Vektor wurden das *PvispD*-Gen und der Vektor isoliert, mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III verdaut und danach ligiert. Da die Ligation und Transformation erfolgreich war, wurde das Plasmid (Gen + Vektor) isoliert und eine Dauerkultur für weitere Tests angelegt. Das Plasmid wurde in BL21(DE3) Zellen transformiert und eine Testexpression bei 30 °C und mit verschiedenen Konzentrationen an IPTG durchgeführt. Es war keine ausreichende Expressionsleistung vorhanden.

Bei dem pNCO-113-Vektor wurde wie bei den anderen beiden Vektoren vorgegangen (siehe Kapitel 4.1.). Die zugehörigen Primer und das resultierende Konstrukt sind im Anhang 6.9.2. aufgelistet. Die erfolgreiche Klonierung erfolgte im Rahmen einer Bachelorarbeit von Arabella Karstedt 2014. Mittels Sequenzierung wurde das Ergebnis bestätigt. Das Konstrukt wurde in BL21(DE3)-Zellen transformiert und anschließend eine Testexpression mit anschließendem Western Blot (Übertragung von Proteinen auf eine Trägermembran und anschließender Nachweis über verschiedenste Reaktionen), zur Überprüfung des eingefügten Affinitätstag, durchgeführt. Eine Proteinbande bei ca. 50 kDa wurde bestätigt (Karstedt, 2014). Somit war die Klonierung des *PvispD*-Gens in den pNCO-113-Vektor erfolgreich.

Anschließend wurde eine Kultivierung mit 1 mM IPTG Zugabe und 24 h Inkubationszeit durchgeführt. Ein zugehöriges SDS-Gel ist in Abbildung 11 aufgeführt.

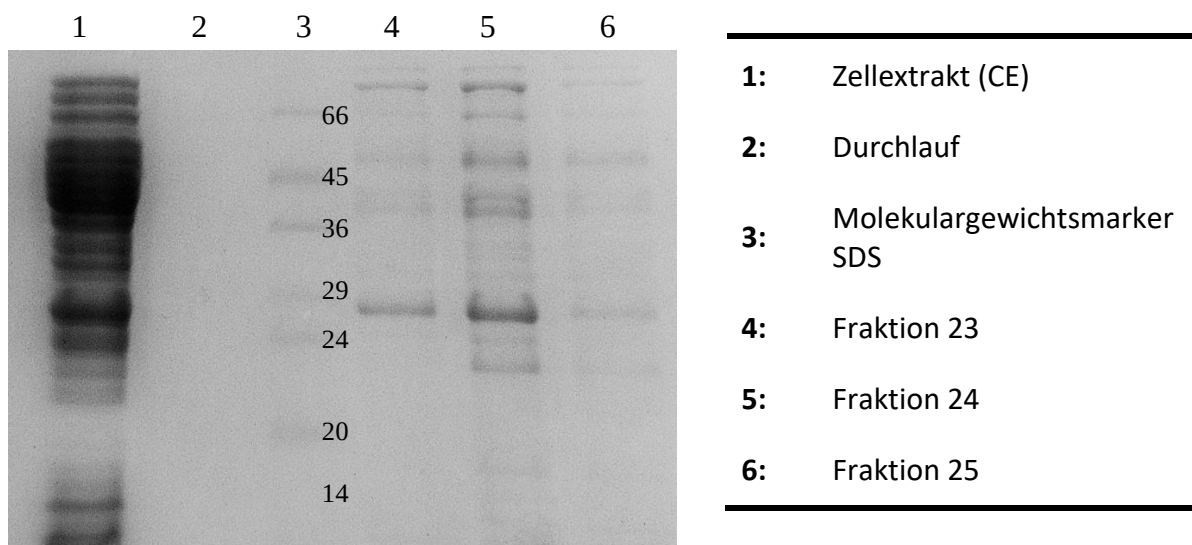


Abbildung 11: SDS-Gel der Aufreinigung von *PvlspD*, exprimiert im pNCO113-Vektor und in BL21(DE3)-Zellen, DL = Durchlauf, RE = Rohextrakt, Fr. = Fraktion, M = Marker

Aus den bereitgestellten Klonen (Karstedt, 2014) konnte in weiteren Arbeiten, jedoch auch nicht durch mehrere Wiederholungen einer Nickel-Affinitätschromatographie und anschließender IspD-Aktivitätsbestimmung, nicht das gewünschte Protein in ausreichender Menge gewonnen werden.

Auch die beiden Klonierungen mit einem N-terminalen His₆-Tag und dem C-terminalen His₆-Tag ergaben keine ausreichenden Mengen an Protein für ein High Throughput Screening, sodass das Konstrukt mit dem N-terminalen Hisactophilin-Tag weiterverfolgt worden ist.

IspD aus *P. vivax* mit N-terminalem Hisactophilin-Affinitätstag

Das Konstrukt aus Abschnitt 4.1. wurde anstatt in BL21(DE3)-Zellen in ArcticExpress(DE3)-Zellen transformiert und exprimiert. ArcticExpress(DE3)-Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass in den Zellen Chaperone aktiviert sind (Buchner, 2002), was die Proteinfaltung fördern soll. Die Chaperone von ArcticExpress(DE3)-Zellen arbeiten auch bei niedrigen Temperaturen, was sich zusätzlich positiv auf die Proteinfaltung auswirken kann. Sie

stammen aus der Alge *Oleispira anartica* (*O. anartica*) und haben ihr Optimum bei 4-12 °C (Lou, 2003).

Die Transformation in ArcticExpress(DE3)-Zellen war erfolgreich, was mit einem PCR-Screening überprüft wurde. In Abbildung 12 sind die erhaltenen Klone und deren Gesamtprotein in einem SDS-Gel zu sehen. Die gewünschte Bande bei 64 kDa wurde eingerahmt.

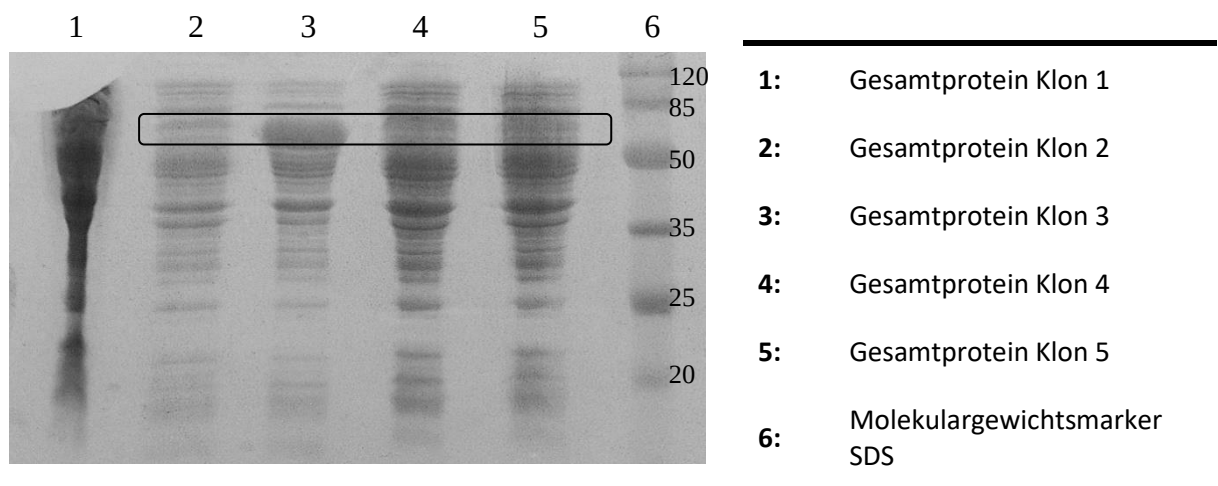


Abbildung 12: Gesamtprotein der transformierten Klone der Testexpression von *PvIspD* mit Hisactophilin-Tag in ArcticExpress(DE3)

Zwischen der Marker-Bande von 85 kDa und 50 kDa ist besonders beim Klon 3 eine intensive Bande zu erkennen. Das gewünschte Protein sollte bei ca. 64 kDa liegen. Daher handelt es sich hier um einen sehr vielversprechenden Klon. Aufbauend auf diesen positiven Ergebnissen erfolgte eine Anzucht mit 1 mM IPTG Zugabe und 24 h Inkubationszeit.

In der folgenden Abbildung 13 ist das Affinitätschromatogramm der Reinigung gezeigt.

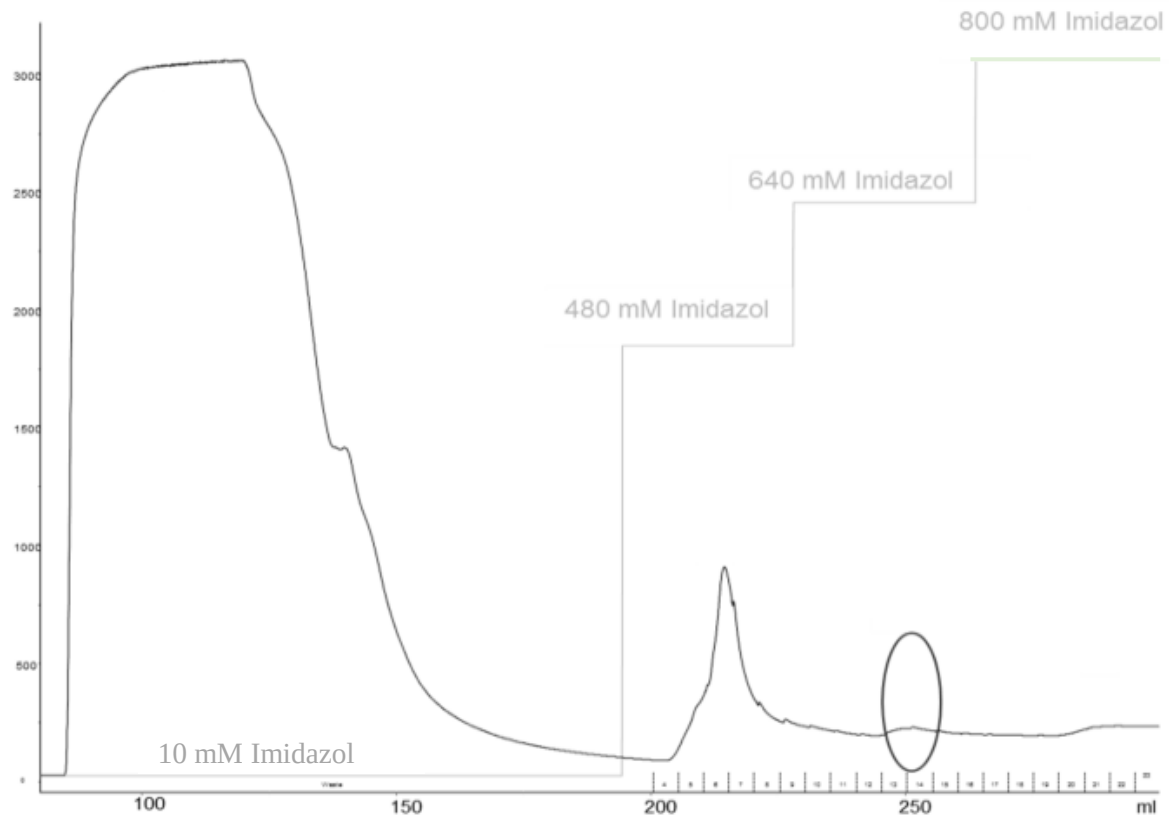
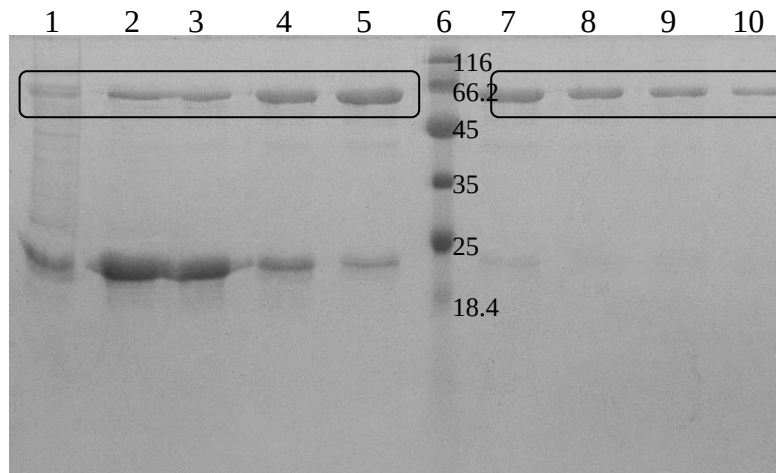


Abbildung 13: Affinitätsreinigung des PvlspD-Konstruktes mit N-terminalen Hisactophilin-Tag und in ArcticExpress(DE3)

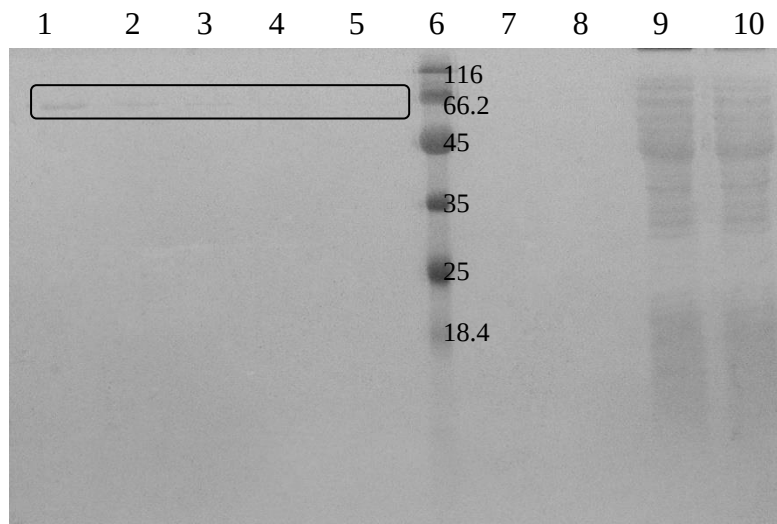
Das eingekreiste Signal zeigt das gewünschte Protein. Beim Signal von 200 bis ca. 240 mL handelt es sich um Proteine, die mit der Ni-NTA-Agarose unspezifisch wechselwirkten. Das Signal des gewünschten Proteins erscheint im Vergleich zum Signal der ungewollten Proteine (200 bis ca. 240 mL) sehr gering. Das Wichtige bei der Aufreinigung von Proteinen ist, unerwünschte Bestandteile von Zielproteinen abzutrennen, die eigentliche Proteinmenge liegt am Anfang nicht im Fokus. Unerwünschte Bestandteile sind hauptsächlich Proteine, die trotz des optimierten Expressionssystems exprimiert werden und mit der Ni-NTA-Agarose wechselwirken, obwohl sie nicht mit einem Affinitätstag versehen worden sind. Diese Wechselwirkungen kommen durch gehäufte Aminosäuren in den unerwünschten Proteinen, die mit der Ni-NTA-Agarose reagieren. Ausgewählte Fraktionen wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen, um das gewünschte Protein heraus zu filtern.

Abbildung 14 und Abbildung 15 zeigen die zugehörigen SDS-Gele zur Affinitätschromatographie.



-
- 1: Fraktion 2
 - 2: Fraktion 5
 - 3: Fraktion 8
 - 4: Fraktion 9
 - 5: Fraktion 10
 - 6: Molekulargewichts-
marker SDS
 - 7: Fraktion 11
 - 8: Fraktion 12
 - 9: Fraktion 13
 - 10: Fraktion 14
-

Abbildung 14: 1.SDS-Gel der Aufreinigung von Klon 3 von *PvlspD* mit Hisactophilin-Tag in ArcticExpress(DE3)



-
- 1: Fraktion 15
 - 2: Fraktion 16
 - 3: Fraktion 17
 - 4: Fraktion 18
 - 5: Fraktion 19
 - 6: Molekulargewichts-
marker SDS
 - 7: Fraktion 20
 - 8: Fraktion 21
 - 9: Zellextrakt (CE)
 - 10: Durchlauf (DL)
-

Abbildung 15: 2.SDS-Gel der Aufreinigung von Klon 3 von *PvlspD* mit Hisactophilin-Tag in ArcticExpress(DE3), DL = Durchlauf, RE = Rohextrakt, Fr. = Fraktion, M = Marker

Die gewünschte Bande bei ca. 64 kDa (wurde in Abbildung 14 und 15 eingerahmt) ist deutlich bei fast allen Fraktionen sichtbar und ab Fraktion 11 (Abbildung 14) sogar in einer sehr guten Reinheit. Die zweite deutlich sichtbare Bande bei ca. 23 kDa könnte ein Hydrolyse-Produkt des Proteins sein, was sich bei der Reinigung oder auch schon bei der Exprimierung abgespalten hat. Zwischen dem Zellextrakt und dem Durchlauf in Abbildung 15 ist kein großer Unterschied sichtbar, was möglicherweise auf die Qualität des SDS-Gels zurückgeführt werden kann. Die Isolierung des Zielproteins war somit erfolgreich, was an den Fraktionen 11 bis 14 sehr gut zu erkennen ist. Mit dieser Aufreinigung ließen sich aus ca. 8 g Zellmasse 6 mg Protein erhalten. Die über dieses Konstrukt von *PvlspD* mit N-terminalen Affinitätstag und in ArcticExpress(DE3)-Zellen dargestellte Proteinmenge war ausreichend für die nächsten Schritte des HTS. Dies ist auch an der hohen Aktivität zu erkennen.

Bei der Aktivitätsbestimmung wird die Absorption über die Zeit gemessen. Die Abbildung 16 verdeutlicht die biochemischen Vorgänge der Bestimmung. Bei dieser Messung wird die Nicotinamidadenindinukleotid (NADH)-Abnahme fotometrisch bei 340 nm gemessen. Die Wellenlänge von 340 nm wurde gewählt, da NADH dort ein Absorptionsmaximum hat. Bei einem Verbrauch von NADH ist eine Aktivität von IspD vorhanden. Je stärker die Absorption abnimmt, umso größer ist die vorhandene Aktivität des Enzyms (siehe Kapitel 5.6.1.).

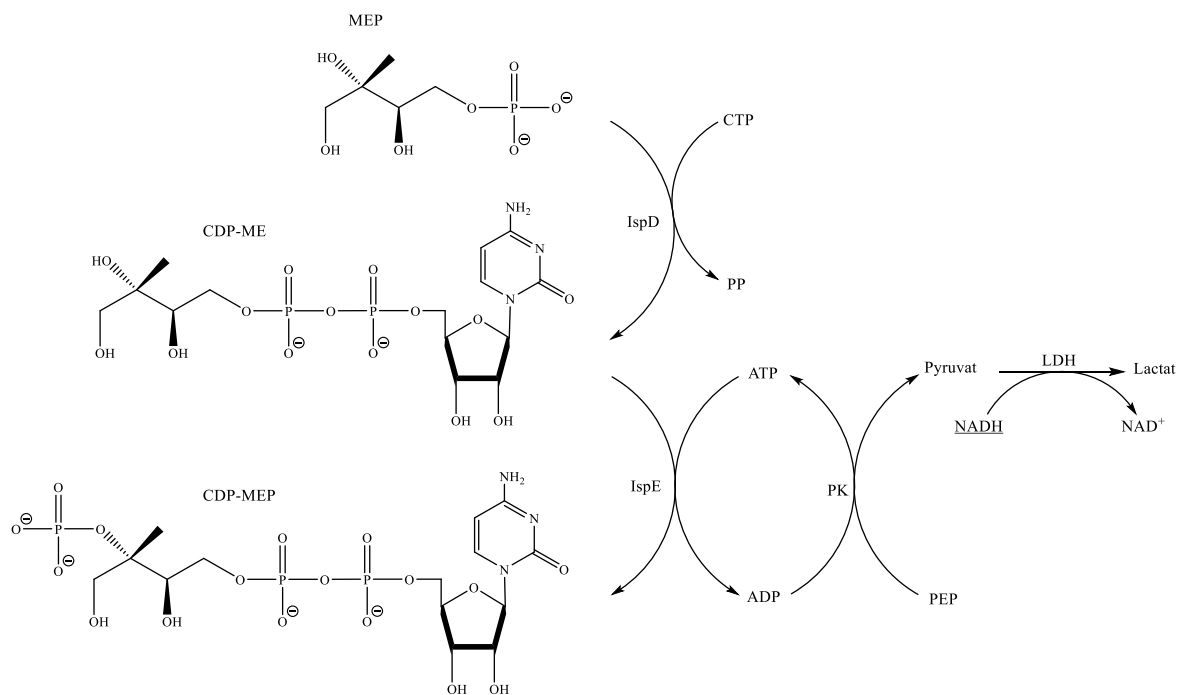


Abbildung 16: Schematische Darstellung des IspD-Aktivitätsassays, MEP = 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat, IspD = 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Transferase, CTP = Cytidintriphosphat, PP = Pyrophosphat, CDP-ME = 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol, IspE = 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, PK = Pyruvatkinase, PEP = Phosphoenolpyruvat, LDH = Lactatdehydrogenase, NADH = Nicotinamidadenindinukleotid, CDP-MEP = 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-4-phosphat

In Abbildung 17 ist eine Aktivitätsbestimmung des gereinigten *PvlspD* dargestellt.

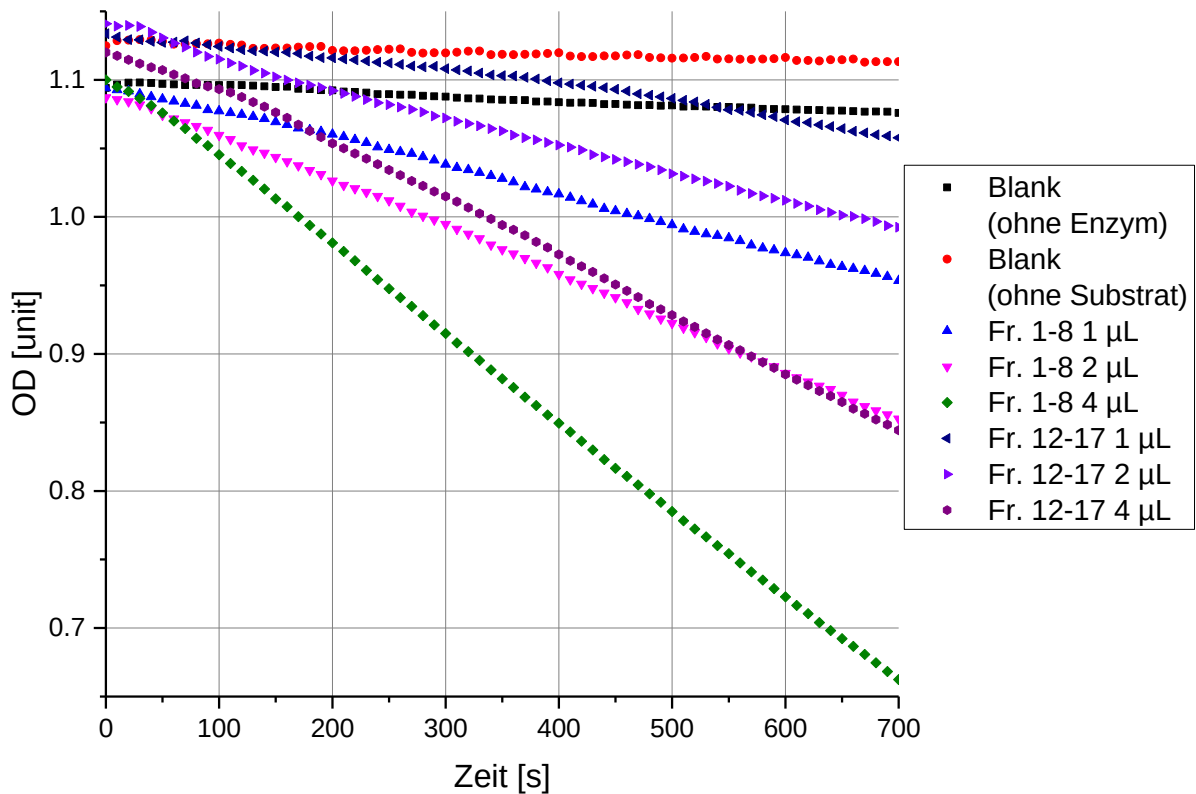
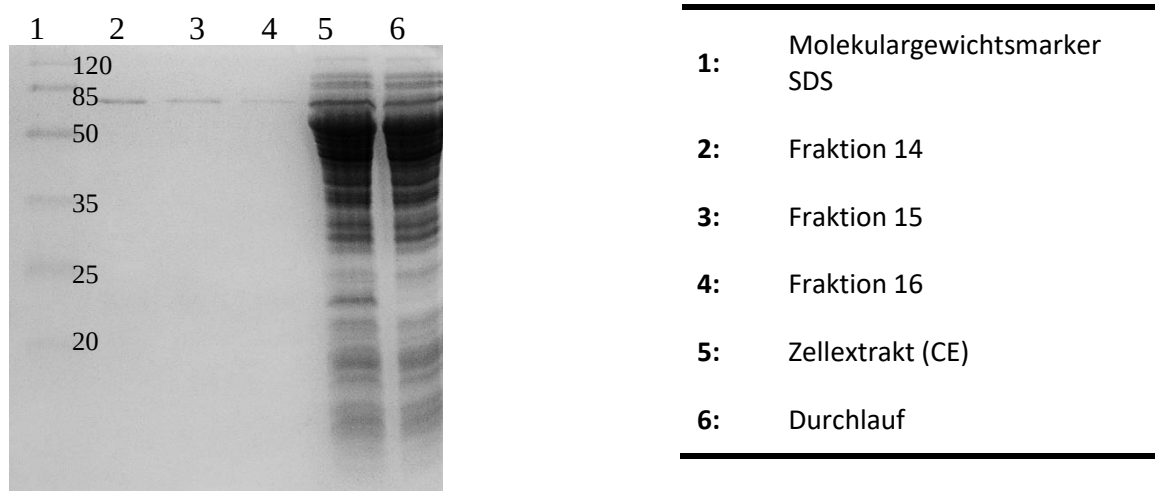
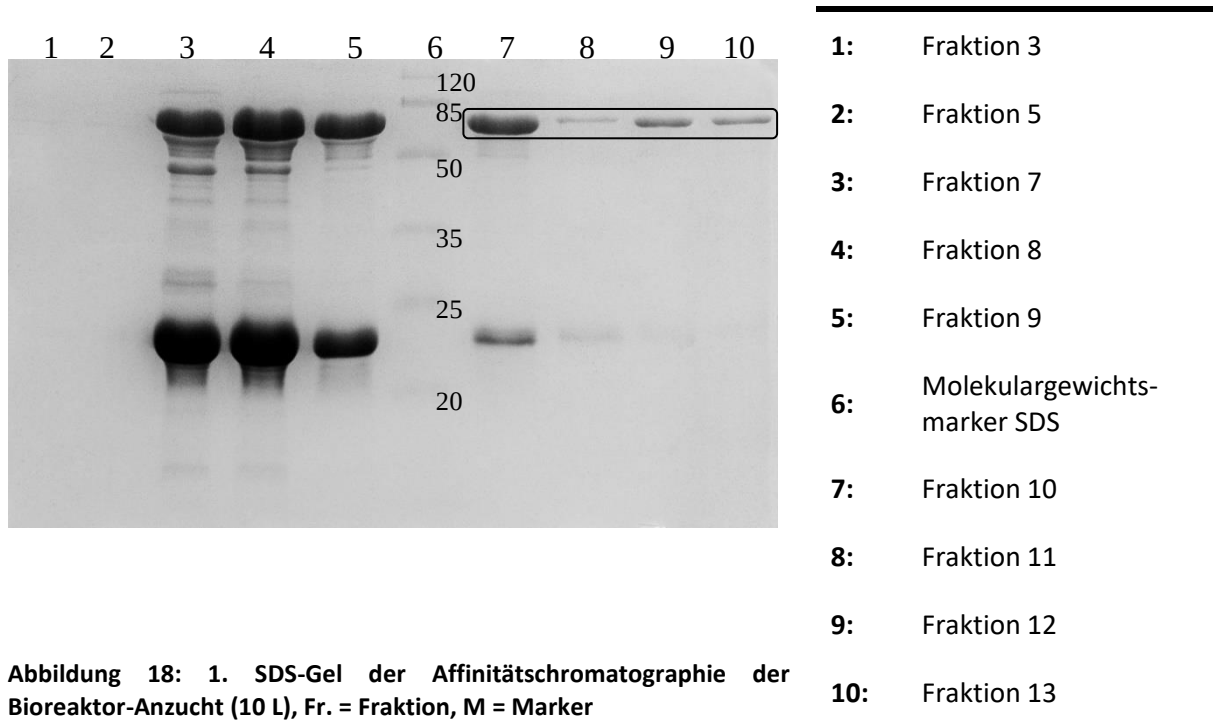


Abbildung 17: Fotometrische Aktivitätsbestimmung des gereinigten *PvlspD*

Die Fraktionen 1-8 zeigten nach der Dialyse eine sehr gute Aktivität, allerdings sind diese Fraktionen wie in Abbildung 14 ersichtlich, inhomogen. Die Fraktionen 12-17 mit einer ausreichenden Reinheit (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15) zeigten eine ausreichende Aktivität zur weiteren Verwendung. Daraufhin wurde *PvlspD* in ausreichender Menge für HTS-Messungen exprimiert und aufgereinigt.

IspD aus *P. vivax* mit N-terminalem Hisactophilin-Affinitätstag / Bioreaktor-Anzucht

In den vorangegangenen Kapiteln wurde die Optimierung der Anzucht von *PvlspD* dargestellt. Für ein HTS und weitere Charakterisierungen werden Mengen von ca. 0.8 g Protein benötigt. Die Menge wurde für eine HTS-Durchführung von 103909 Substanzen berechnet. Daher erfolgte die Übertragung der Anzucht in den 10 L Maßstab. Die erhaltenen Fraktionen bei der Affinitätschromatographie sind auf ein SDS-Gel aufgetragen worden und in Abbildung 18 und Abbildung 19 dargestellt.



Die Fraktionen (z. B. 10-12 in Abbildung 19) der Aufreinigung der Bioreaktor-Anzucht enthielten das Ziel-Protein (eingerahmte Banden), was weniger homogen war als bei der Reinigung im Kolbenmaßstab. Die zweite deutlich sichtbare Bande bei ca. 23 kDa könnte ein Hydrolyse-Produkt des Proteins sein, was sich bei der Reinigung oder auch schon Exprimierung abgespalten hat. Die Ausbeute bei dieser Reinigung war mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/mL für ca. 3 mL bei 12.7 g eingesetzter Zellmasse, geringer als die Ausbeute im Kolbenmaßstab mit 6 mg Protein und nur 8 g eingesetzter Zellmasse. Daher wurde nicht weiter im 10 L Bioreaktor gearbeitet und es wurde die Kultivierung der Zellen im Kolbenmaßstab mehrfach wiederholt.

4.2. Charakterisierung von IspD aus *P. vivax* mit N-terminalem Hisactophilin-Affinitätstag

Für die katalytische Aktivitätsbestimmung wurden unterschiedliche Konzentrationen von PvIspD mittels fotometrischen Assay untersucht (siehe Kapitel 5.6.1.1., Tabelle 22). Die katalytische Aktivität konnte mittels Auftragung von Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Konzentration von PvIspD und Kurvenanpassung (siehe Abbildung 20), nach dem Modell von Hill (Coval, 1970; Heck, 1971), bestimmt werden.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation, Massachusetts, USA).

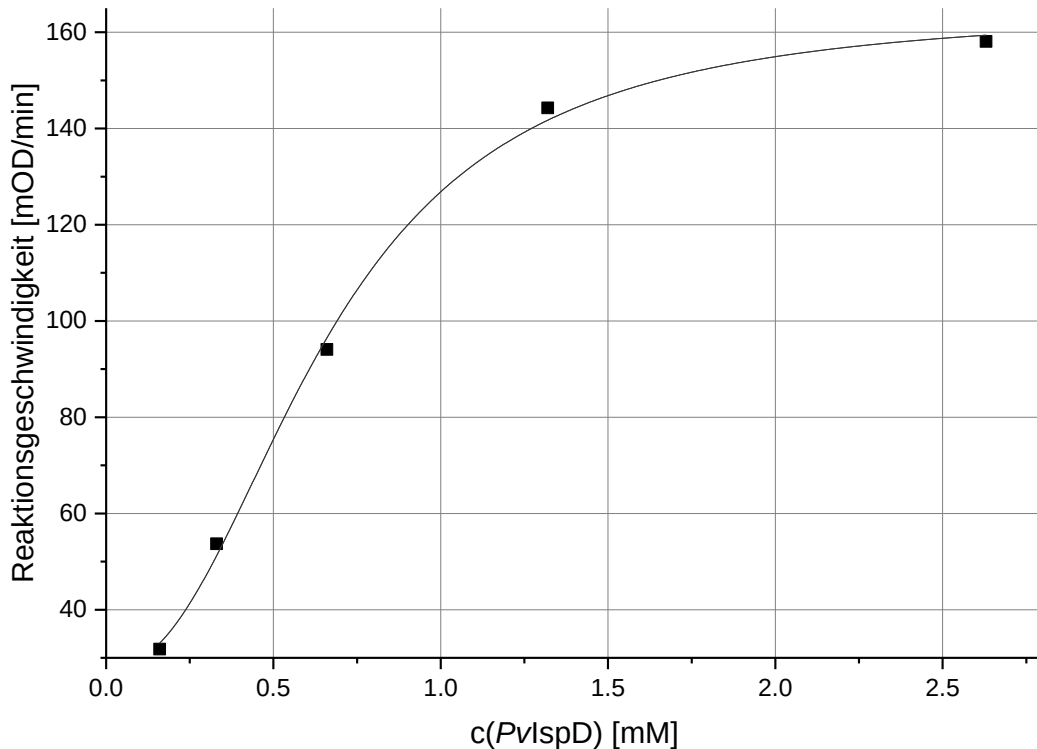


Abbildung 20: Graphische Darstellung der *PvlspD*-Kinetik mit Anpassung nach Hill, schwarz = Werte der Messung, schwarze Linie = Fitkurve

Die Fitkurve zeigte einen leicht sigmoidalen Verlauf. Um eine Aussage über den Grund für den Verlauf treffen zu können, müsste nicht die Änderung der Enzymkonzentration untersucht werden, sondern die Änderung der Substratkonzentration. Folglich kann zur Kooperativität an dieser Stelle keine Aussage getroffen werden. Eine Möglichkeit für einen sigmoidalen Verlauf könnten zu hohe Konzentrationen des Substrates sein, da dieses dann an einem allosterischen Zentrum bindet und so eine Änderung der Konformation hervorrufen kann. In der geänderten Konformation könnte das Enzym weniger aktiv sein und somit einen sigmoidalen Verlauf erzeugen.

Für weitere Bestimmungen ist es wichtig, dass das Enzym (*PvlspD*) den limitierenden Faktor ausmacht und nicht die Hilfsenzyme oder das Substrat. Die ermittelte Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional der Anzahl an katalytisch aktiven Enzymmolekülen und somit auch der Enzymkonzentration (Löffler et al., 2006). Die optimale Enzymkonzentration für weitere Messungen liegt bei 0.17 mM. Für weitere

Untersuchungen (z.B. spezifische Aktivität) oder zur weiteren Charakterisierung wurden die Konzentrationen der Substrate MEP und CTP entsprechend variiert (siehe Kapitel 5.6.1.1.).

Steady-State Kinetik für IspD aus *P. vivax* mit N-terminalem Hisactophilin-Affinitätstag

Folgend werden die kinetischen Eigenschaften und die spezifische Aktivität von *PvIspD* mit N-terminalen hac-Tag untersucht. Für die beiden Substrate MEP und CTP werden kinetische Untersuchungen im *Steady-State-Modus* durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation, Massachusetts, USA) mit dem Modell nach Hill (Coval, 1970, Heck, 1971). In Abbildung 21 ist die kinetische Untersuchung von *PvIspD* mit dem Substrat MEP dargestellt.

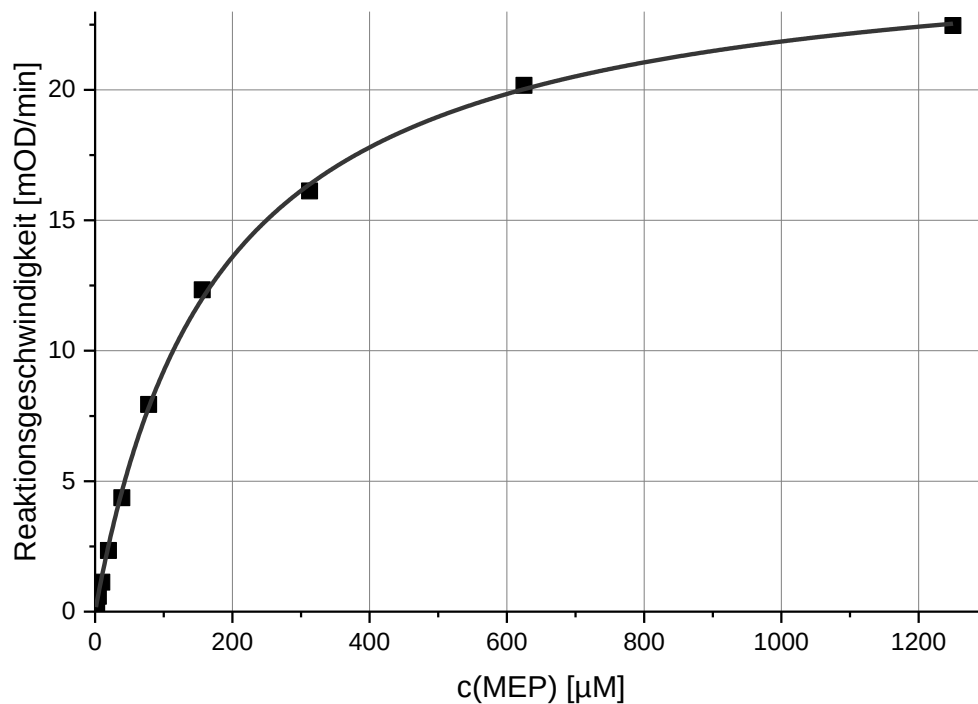


Abbildung 21: Graphische Darstellung der MEP-Kinetik (*PvIspD*) mit Anpassung nach Hill, schwarz = Werte der Messung, schwarze Linie = Fitkurve

In Abbildung 22 ist die kinetische Untersuchung von *PvlspD* mit dem Substrat CTP dargestellt.

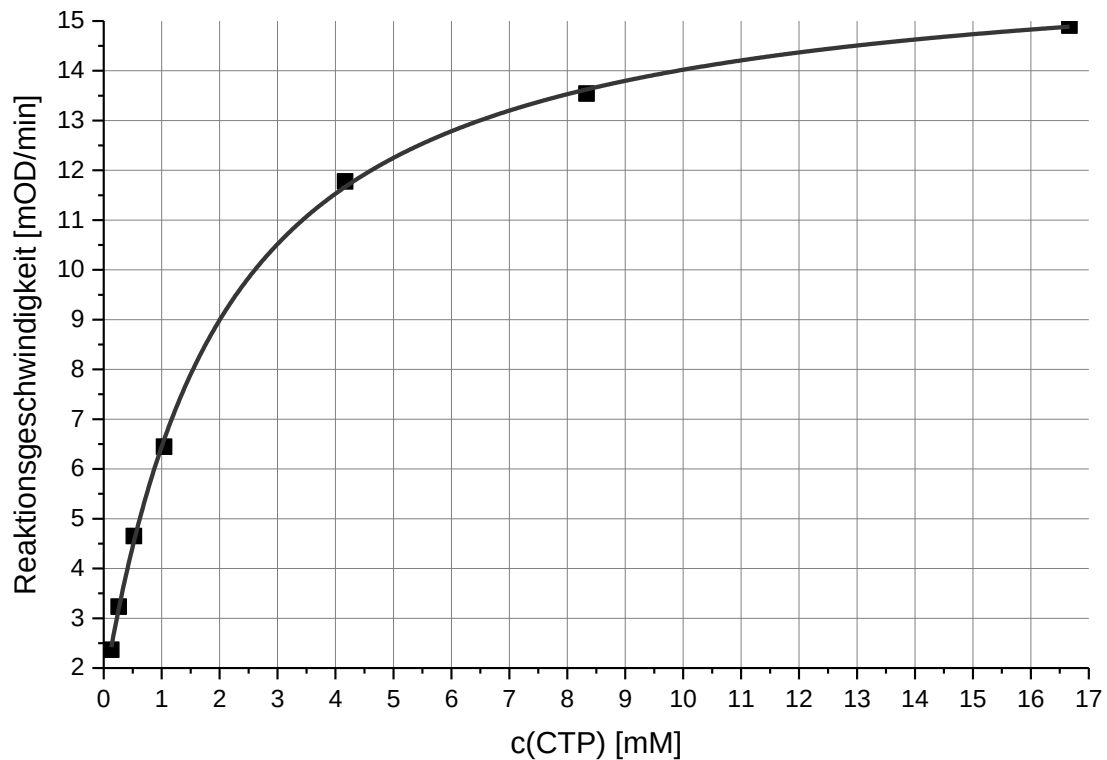


Abbildung 22: Graphische Darstellung der CTP-Kinetik (*PvlspD*), schwarz = Werte der Messung, schwarze Linie = Fitkurve

PvlspD katalysierte die Umsetzung von MEP und CTP zu CDP-ME mit einer spezifischen Aktivität von $26 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ für MEP und $16 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ für CTP. Die Daten sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Dabei ist n der Hill-Koeffizient.

Tabelle 2: Zusammenfassung der kinetischen Daten von *PvlspD* mit den Substraten MEP und CTP

	MEP	CTP
$v_{\max} [\mu\text{mol}/(\text{mg}\cdot\text{min})] \pm \text{SE}$	26 ± 0	16 ± 0
$k [\mu\text{M}] \pm \text{SE}$	175 ± 5	1571 ± 6
$n \pm \text{SE}$	1 ± 0	1 ± 0

Als Vergleich betragen die spezifische Aktivität von IspD mit dem Substrat MEP aus *E. coli* $23 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Rohdich et al., 1999) und die von IspD aus *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) $8 \mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ (Shi et al., 2007). Es ist zu erkennen, dass die spezifische Aktivität von PvlspD im Vergleich zu *E. coli* oder *M. tuberculosis* in der gleichen Größenordnung liegt. Die Aktivität kann durch die Expression in einem Wirtsorganismus beeinflusst werden, da andere Bedingungen vorliegen können, wie z.B. veränderte pH Werte (Schellenberger, 1989). Im Allgemeinen ist die spezifische Aktivität eine vom Organismus abhängige Größe und kann daher variieren.

Die Daten sowie die entsprechenden Fitkurven sind in Abbildung 21 und Abbildung 22 dargestellt. Die Fitkurven folgten einem hyperbolischen Sättigungsverlauf, was der Michaelis-Menten Kinetik entspricht. Der Hill-Koeffizient von ca. 1 bedeutet, dass keine Kooperativität vorliegt und entspricht ebenfalls der Michaelis-Menten Kinetik. Somit sollte das Enzym für die Substrate MEP und CTP eine Bindungsstelle besitzen und k entspricht K_M (Fersht A., 1985, Voet et al., 2002).

4.3. Bereitstellung des Hilfsenzym *IspE* aus *E. coli*

IspE aus *E. coli* (*EclspE*) wurde mittels Fermentation im Litermaßstab hergestellt und durch Affinitätschromatographie gereinigt. Das Konstrukt zur Expressierung des Enzyms wurde bereitgestellt (Lüttgen et al., 2000). In der folgenden Abbildung 23 ist Chromatogramm einer Reinigung gezeigt.

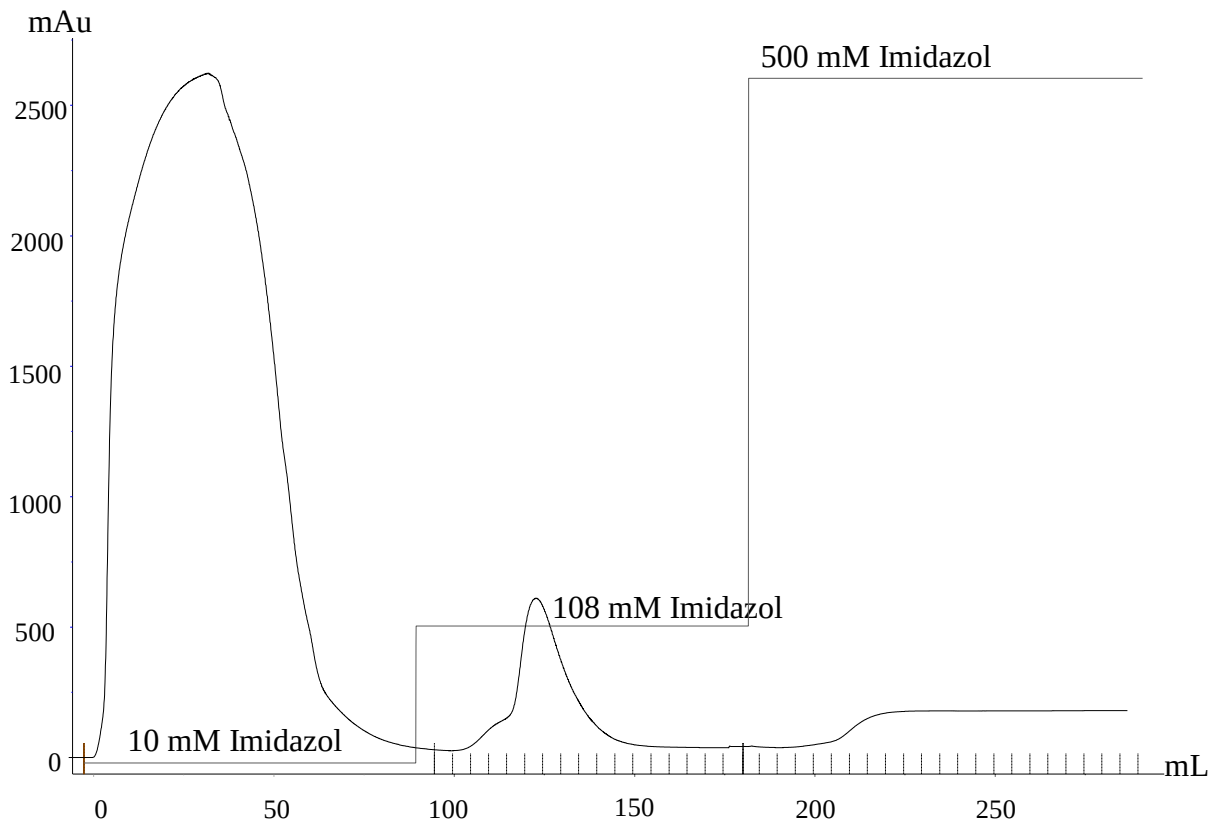


Abbildung 23: Affinitätschromatogramm der Aufreinigung von *EclspE*

Das erste Signal von 0 bis ca. 90 mL enthält eluierte Proteine, die nicht mit den Nickel-Ionen der stationären Phase in Wechselwirkung getreten sind, daher auch Durchlauf genannt (Lösung mit 10 mM Imidazol). Das vorhandene Signal ab ca. 100 mL und bei 108 mM Imidazol entsprach dem erwartenden Signal des gewünschten Zielproteins *EclspE*. Es wurden keine weiteren Signale beobachtet, dies entspricht ebenfalls einer erfolgreichen Aufreinigung.

Die Fraktionen, die bei der Affinitätschromatographie erhalten worden sind, wurden zusätzlich auf ein SDS-Gel aufgetragen. In Abbildung 24 und Abbildung 25 sind die Ergebnisse gezeigt.

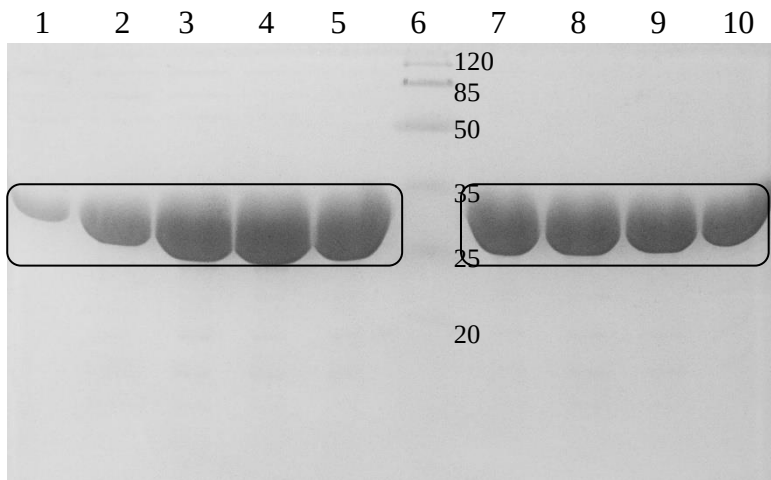


Abbildung 24: 1. SDS-Gel der Aufreinigung von *EclspE*

-
- 1: Fraktion 17
 - 2: Fraktion 19
 - 3: Fraktion 21
 - 4: Fraktion 23
 - 5: Fraktion 25
 - 6: Molekulargewichtsmarker SDS
 - 7: Fraktion 27
 - 8: Fraktion 29
 - 9: Fraktion 31
 - 10: Fraktion 33
-

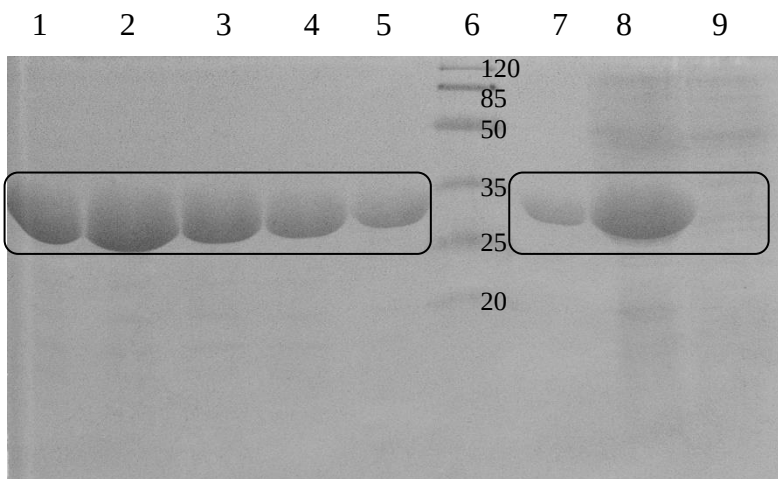


Abbildung 25: 2. SDS-Gel der Aufreinigung von *EclspE*

-
- 1: Fraktion 35
 - 2: Fraktion 37
 - 3: Fraktion 39
 - 4: Fraktion 41
 - 5: Fraktion 43
 - 6: Molekulargewichtsmarker SDS
 - 7: Fraktion 48
 - 8: Rohextrakt
 - 9: Durchlauf
-

Der Unterschied zwischen Rohextrakt (Spur 8) und Durchlauf (Spur 9) ist gut zu erkennen. Die intensivere Bande bei einer Größe von ca. 32 kDa (siehe markierte Bande), was der Größe des gewünschten Proteins entspricht, ist im Durchlauf der Säule nahezu verschwunden. Weiterhin wurde eine Aktivitätsbestimmung des gereinigten Proteins

mittels eines fotometrischen Assays durchgeführt. In der folgenden Abbildung 26 ist dieser (fotometrische Assay) schematisch dargestellt.

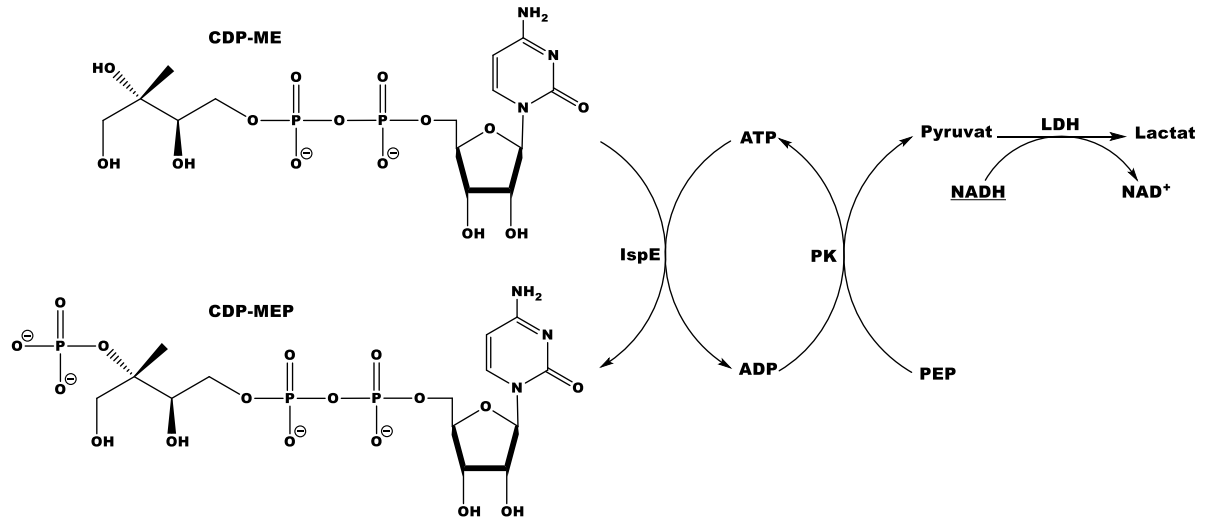


Abbildung 26: Schematische Darstellung des IspE-Assays, CDP-ME = 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol, IspE = 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase, ATP = Adenosintriphosphat, ADP = Adenosindiphosphat, PK = Pyruvatkinase PEP = Phosphoenolpyruvat, LDH = Lactatdehydrogenase, NADH = Nicotinamadenindinukleotid, CDP-MEP = 4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-4-phosphat

Bei der Reaktion wird CDP-ME zu CDP-MEP über mehrere parallele Schritte umgesetzt. In der fotometrischen Bestimmung wird, wie beim IspD-Assay, die NADH-Abnahme verfolgt. Mit dem vorgestellten fotometrischen Assay lässt sich die Aktivität des IspE-Proteins bestimmen. Je stärker die Abnahme der Kurve ist, umso höher ist die IspE-Aktivität.

Die Ergebnisse des fotometrischen Assays sind in Abbildung 27 dargestellt.

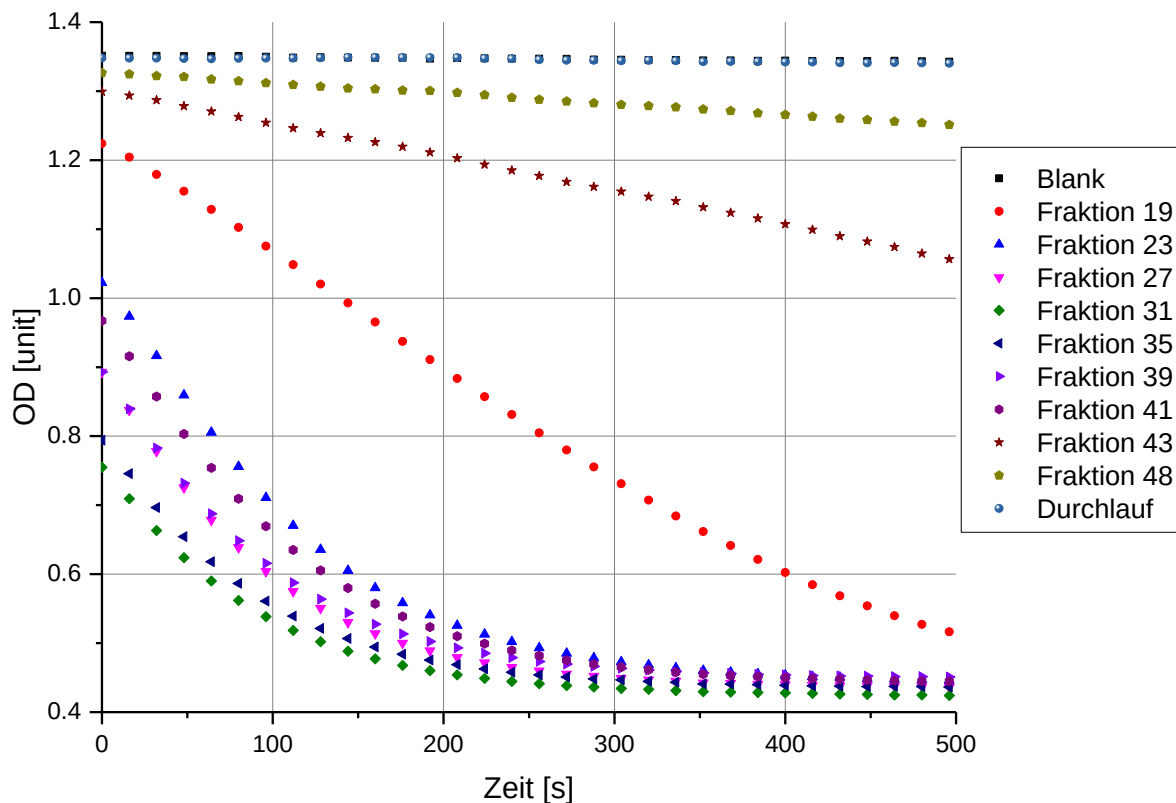


Abbildung 27: Fotometrische Aktivitätsbestimmung des gereinigten EclspE

Eine im Vergleich mit den übrigen Fraktionen hohe Aktivität des EclspE-Proteins in Abbildung 27 liegt in den Fraktionen 19 bis 41 vor. Eine weitere Reinigung, z.B. zur Abtrennung des zur Affinitätschromatographie verwendeten Imidazols, erfolgte für die Fraktionen 19 bis 41 über eine HiPrep 26/10 Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Greatbritian). Die dazu gehörige Abbildung 69 befindet sich im Anhang (siehe Anhang 6.11.1.). Im Anschluss erfolgte die Aufkonzentration der proteinhaltigen (EclspE) Fraktionen und eine Konzentrationsbestimmung wurde durchgeführt. Mit Hilfe des vorgestellten Verfahrens konnten aus 8 g Zellmasse 5 mL eine Proteinlösung mit einer Konzentration von 15 mg/mL erhalten werden.

4.4. Synthese von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP)

Für die Synthese von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP, **4**) wurden unterschiedliche Komponenten benötigt. Als Ausgangsmaterial diente 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (DXP, **3**), welches von Dr. Boris Illarionov (Hamburg School of Food Science, Universität Hamburg) bereitgestellt wurde. Die Ausgangskonzentration wurde mittels ^{13}C -NMR ermittelt, dies war möglich da DXP durch eine enzymatische Synthese aus ^{13}C -vollmakierter Glucose hergestellt wurde (Illarionova et al., 2006). In Abbildung 28 ist die enzymatische Synthese von DXP zu MEP schematisch dargestellt.

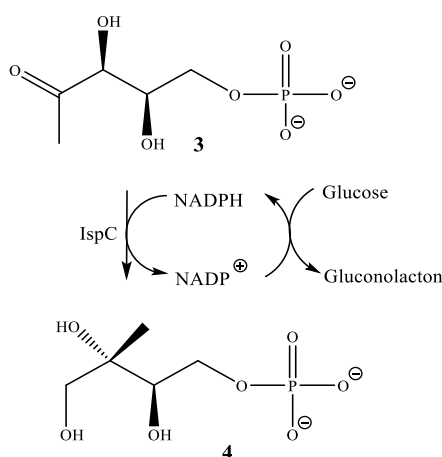


Abbildung 28: Schematische Darstellung der enzymatischen Synthese von MEP (Illarionova et al., 2006), IspC = 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase, NADPH = Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat

Es wurde eine Konzentration von 22 mM DXP ermittelt. Des Weiteren wurde für die enzymatische Synthese das Enzym IspC benötigt. IspC wurde deswegen aus *E. coli* exprimiert und gereinigt.

Reinigung von IspC aus *E. coli* als benötigtes Enzym für die MEP-Synthese

IspC aus *E. coli* wurde bei einer Fermentation im Litermaßstab kultiviert und über eine Affinitätschromatographie gereinigt. Das Konstrukt für die Expressierung des Enzyms wurde von Dr. Boris Illiaronov (Hamburg School of Food Science, Universität Hamburg) bereitgestellt (Steinbacher et al., 2003). In der folgenden Abbildung 29 ist das Chromatogramm zur Reinigung dargestellt.

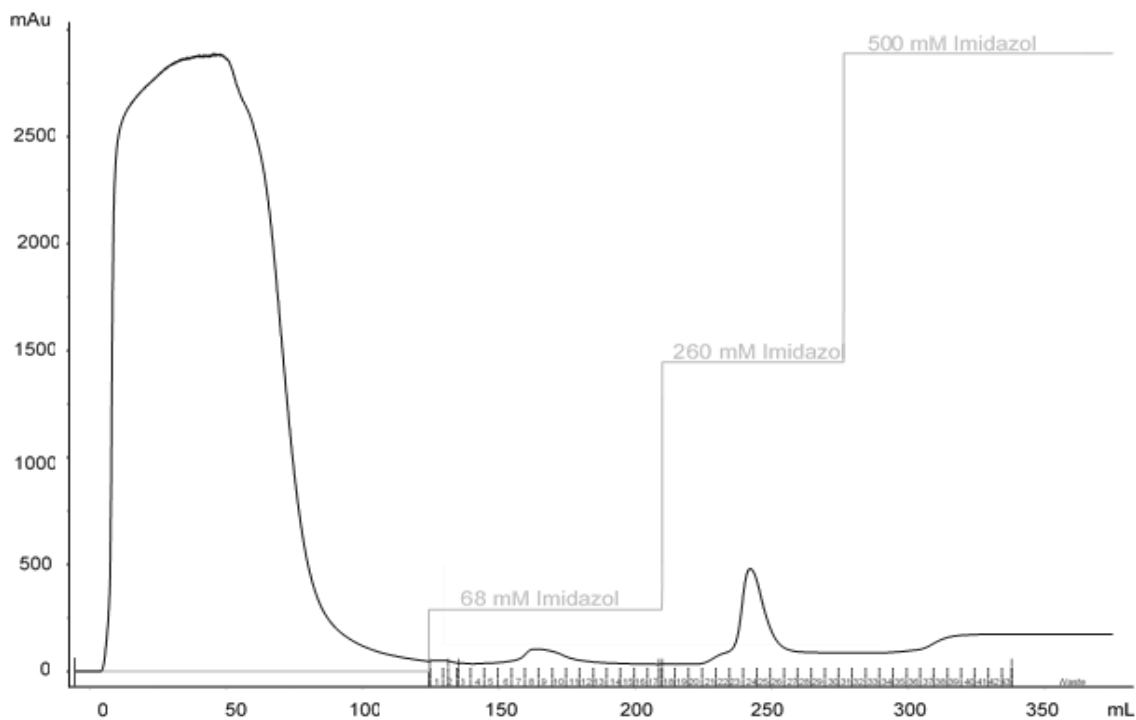


Abbildung 29: Affinitätschromatogramm der Aufreinigung von EclspC

Wie im Affinitätschromatogramm ersichtlich, wurde zunächst der Rohextrakt bis 100 mL bei einer Konzentration von 0 mM Imidazol eluiert. Es folgten unbekannte Verunreinigungen bei einer Imidazolkonzentration von 68 mM und schließlich eluierte das gewünschte Protein bei einer Imidazolkonzentration von 260 mM.

Die gesammelten Fraktionen wurden zusätzlich auf ein SDS-Gel aufgetragen. Dieses ist in Abbildung 30 gezeigt.

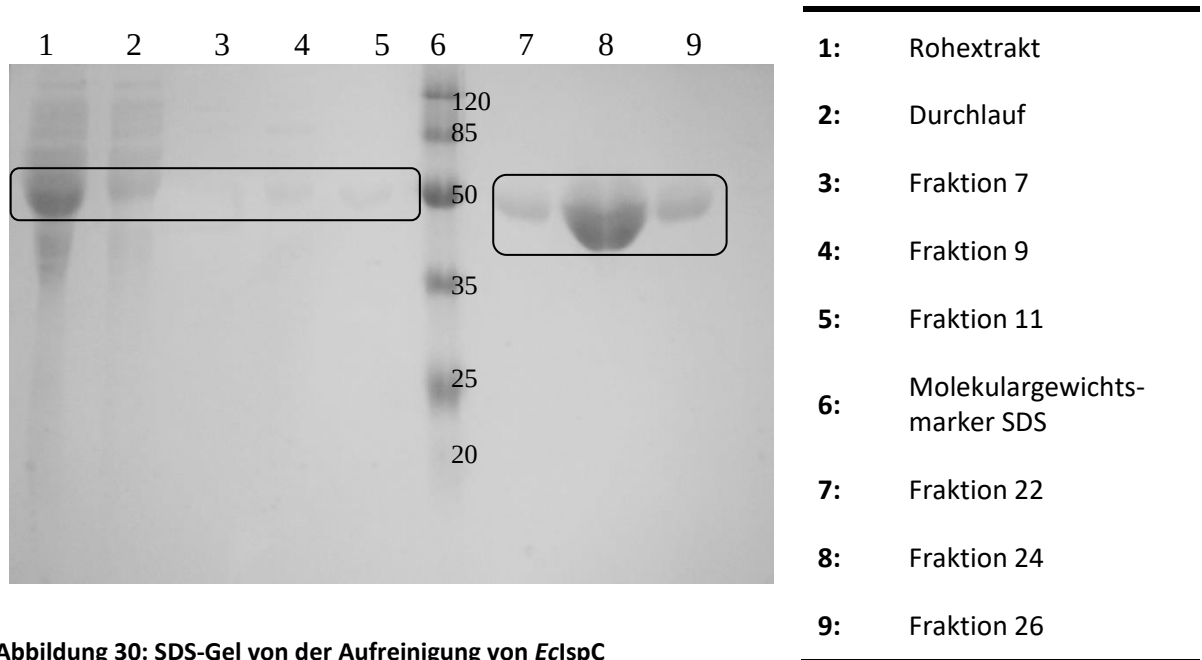


Abbildung 30: SDS-Gel von der Aufreinigung von *EclspC*

Der Unterschied in der Bandenintensität bei ca. 50 kDa zwischen dem Rohextrakt und dem Durchlauf ist gut zu erkennen. Die Bande des gewünschten Proteins (eingerahmte Banden) ist im Durchlauf fast verschwunden, was für eine gute Anhaftung des Proteins an das Säulenmaterial spricht. Es erfolgte eine Aktivitätsbestimmung mittels eines fotometrischen Assays.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 und Abbildung 32 dargestellt.

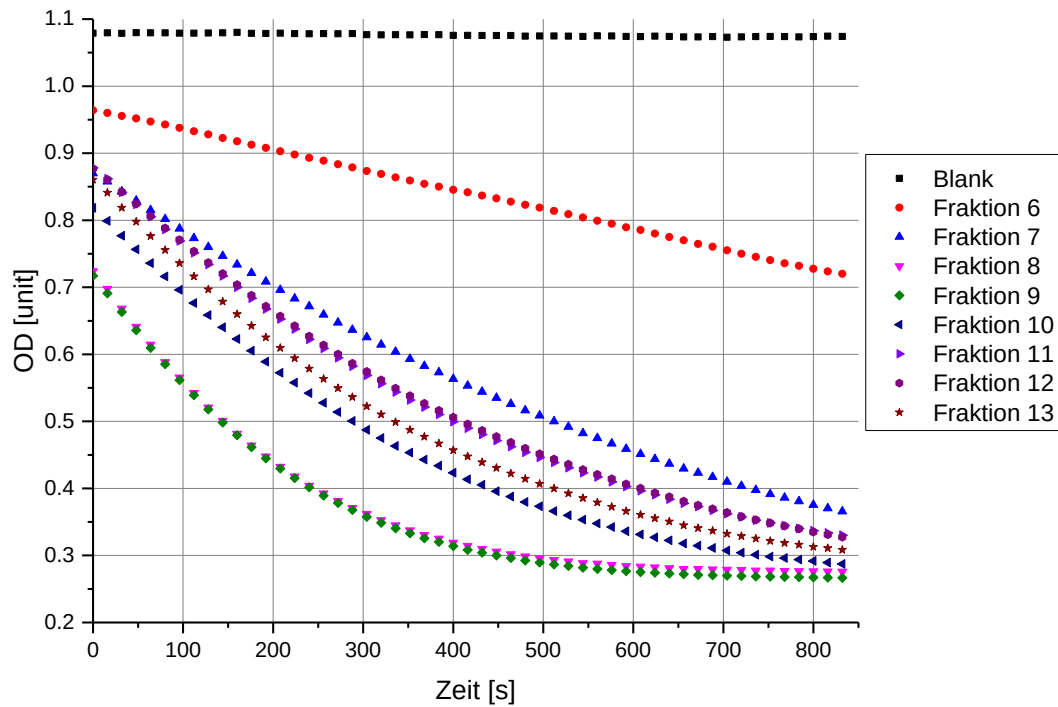


Abbildung 31: 1. Fotometrische Aktivitätsmessungen der Aufreinigung von EclspC

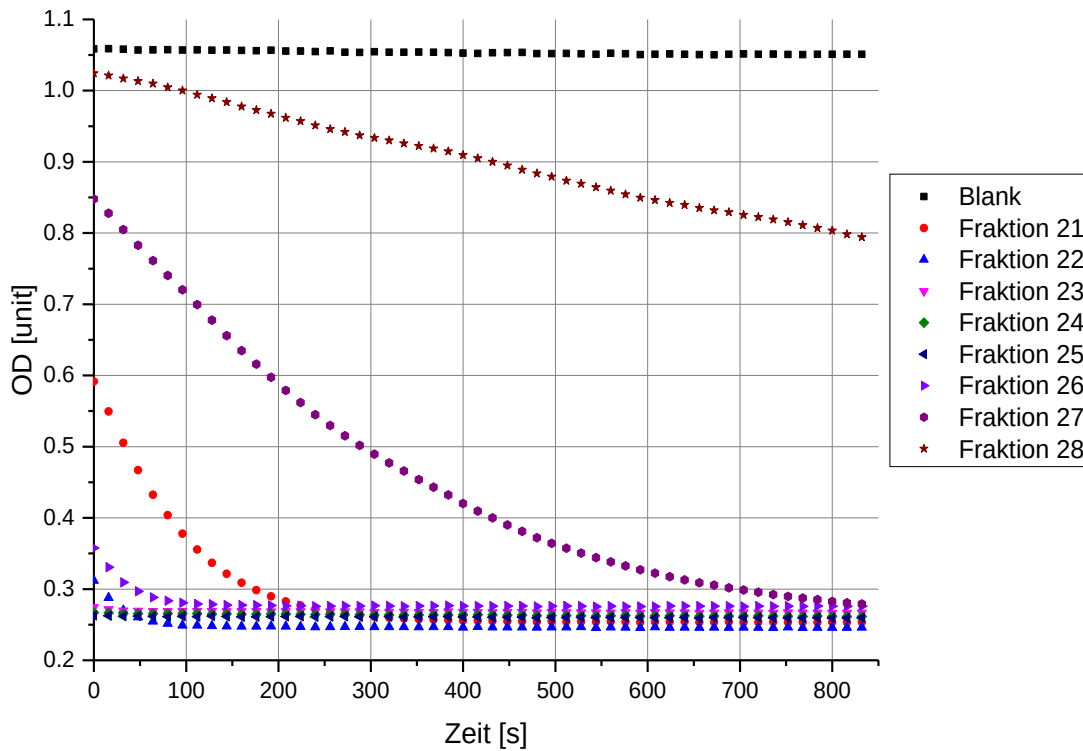


Abbildung 32: 2. Fotometrische Aktivitätsmessungen der Aufreinigung von EclspC

Die Reaktion der Fraktionen 22 bis 26 mit Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) erfolgte sehr schnell. Wegen Einschränkungen im experimentellen Aufbau konnte zwischen 0 bis 100 s lediglich der Endbereich des Reaktionsverlaufs beobachtet werden. Zur Entfernung von überschüssigem Imidazol wurde bei den Fraktionen 7 bis 13 und den Fraktionen 22 bis 27 mit hohem *EclspC*-Gehalt eine Dialyse durchgeführt.

Mittels einer Bradfordbestimmung (siehe Kapitel 5.5.) wurde eine Konzentration des Proteins in 3 mL der Lösung zu 8 mg/mL ermittelt. Eingesetzt wurden ca. 8 g Zellmasse. Eine anschließende Aktivitätsbestimmung, die in Abbildung 33 dargestellt ist, ergab die erhaltene Menge an aktivem *EclspC*.

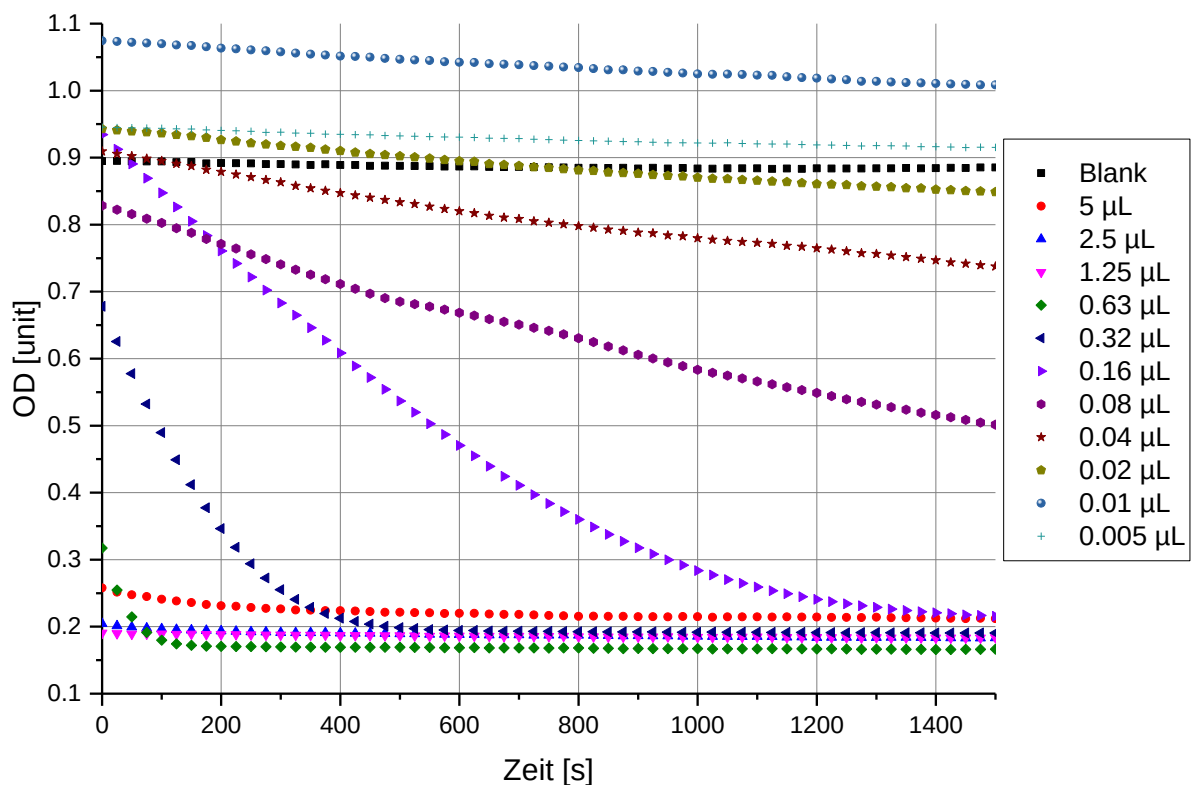


Abbildung 33: Fotometrische Aktivitätsmessungen von *EclspC*

Für weitere Schritte (HTS) sollte eine Abnahme des Signals von 0.3 OD innerhalb von 30 min zu beobachten sein. Dieser Messbereich ist im HTS am besten zu realisieren und ermöglicht auswertbare Ergebnisse. Dies ist bei einer Zugabe von 0.16 µL bis 0.32 µL *EclspC* pro 60 µL Assay der Fall.

Synthese von 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP)

Zur Bestimmung der IspD-Aktivität mittels Fotometrie oder ^{13}C -NMR wird stets das Substrat 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP) benötigt. Dieses wurde aus ^{13}C -markiertem DXP (ein Zwischenprodukt des Non-Mevalonatweges) und *EclspC* (ein Enzym des Non-Mevalonatweges) und weiteren Komponenten, mittels enzymatischer Synthese, hergestellt.

Die Synthese wurde analog zu Illarionova et. al., 2006 durchgeführt. Zunächst wurde eine Synthese von MEP im 300 μL Maßstab durchgeführt, um zu überprüfen, ob alle Substanzen in der richtigen Konzentration vorlagen und geeignete Synthesebedingungen bestimmt wurden. Das benötigte DXP wurde von Dr. Boris Illarionov (Hamburg School of Food Science, Universität Hamburg) bereitgestellt. Zur Überprüfung der Synthese wurde eine ^{13}C -NMR-Bestimmung durchgeführt. In Abbildung 34 sind die Ergebnisse der ^{13}C -NMR-Bestimmung abgebildet.

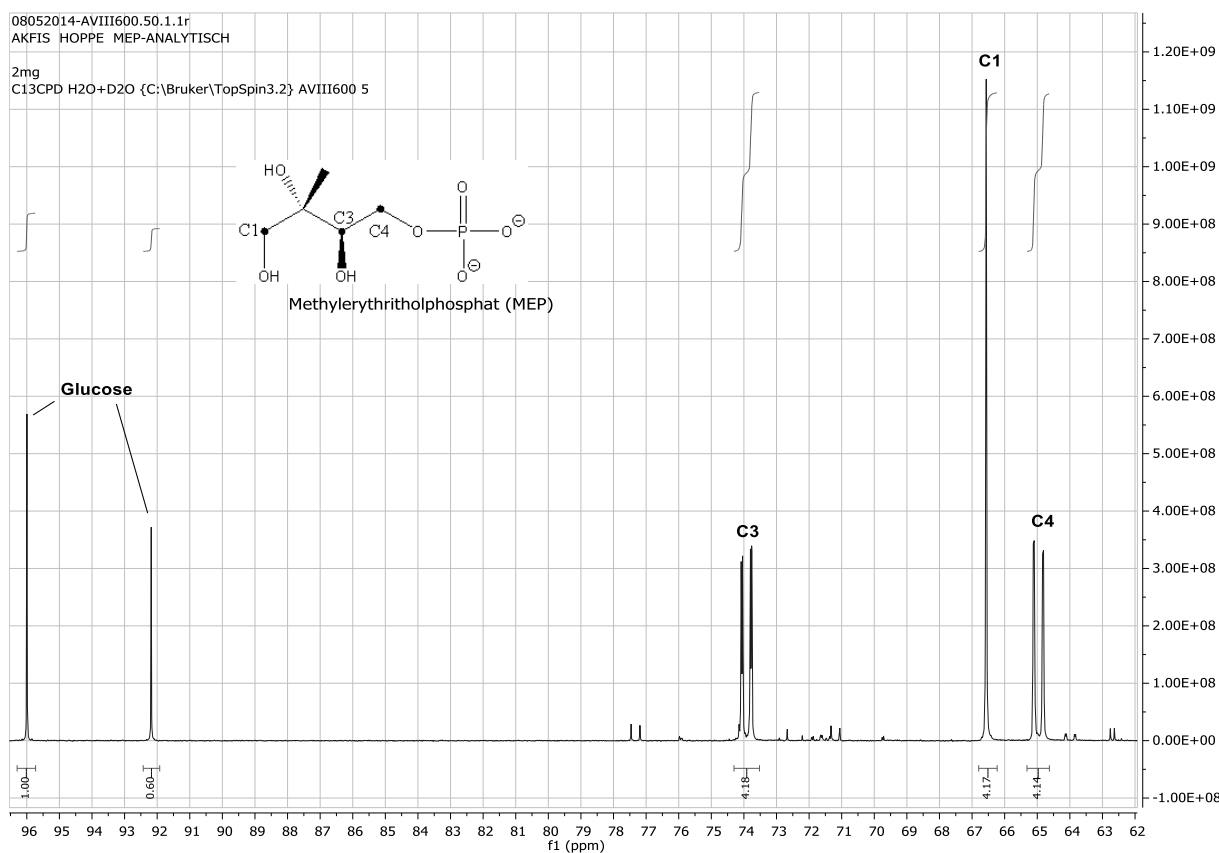


Abbildung 34: ^{13}C -NMR des Produkts der Synthese von MEP

Die Synthese von MEP im kleinen Maßstab war erfolgreich, was anhand der Signale im NMR-Spektrum gezeigt werden konnte. Die Signale der C-Atome von MEP bei 74 ppm (C3), 67.5 ppm (C1) und 65 ppm (C4) deckten sich mit den Vergleichsspektren aus der Literatur (Illarionova et al., 2006). Durch die Zugabe von 5 mM markierter 1- $^{13}\text{C}_1$ -Glucose (siehe Signale bei 96 ppm und 92 ppm) war es möglich, die Konzentration des Substrats MEP durch Vergleich der Signale C3, C1 oder C4 mit den Glucose Signalen zu bestimmen (durch Bestimmung der Integrale der einzelnen C-Signale). Anhand des Signals von C3 von MEP ergab sich eine MEP-Konzentration von 30 mM. Anschließend erfolgte eine MEP-Synthese mit gleichen Bedingungen im größeren Maßstab (50 mL). Die ^{13}C -NMR-Bestimmung ist in Abbildung 35 dargestellt.

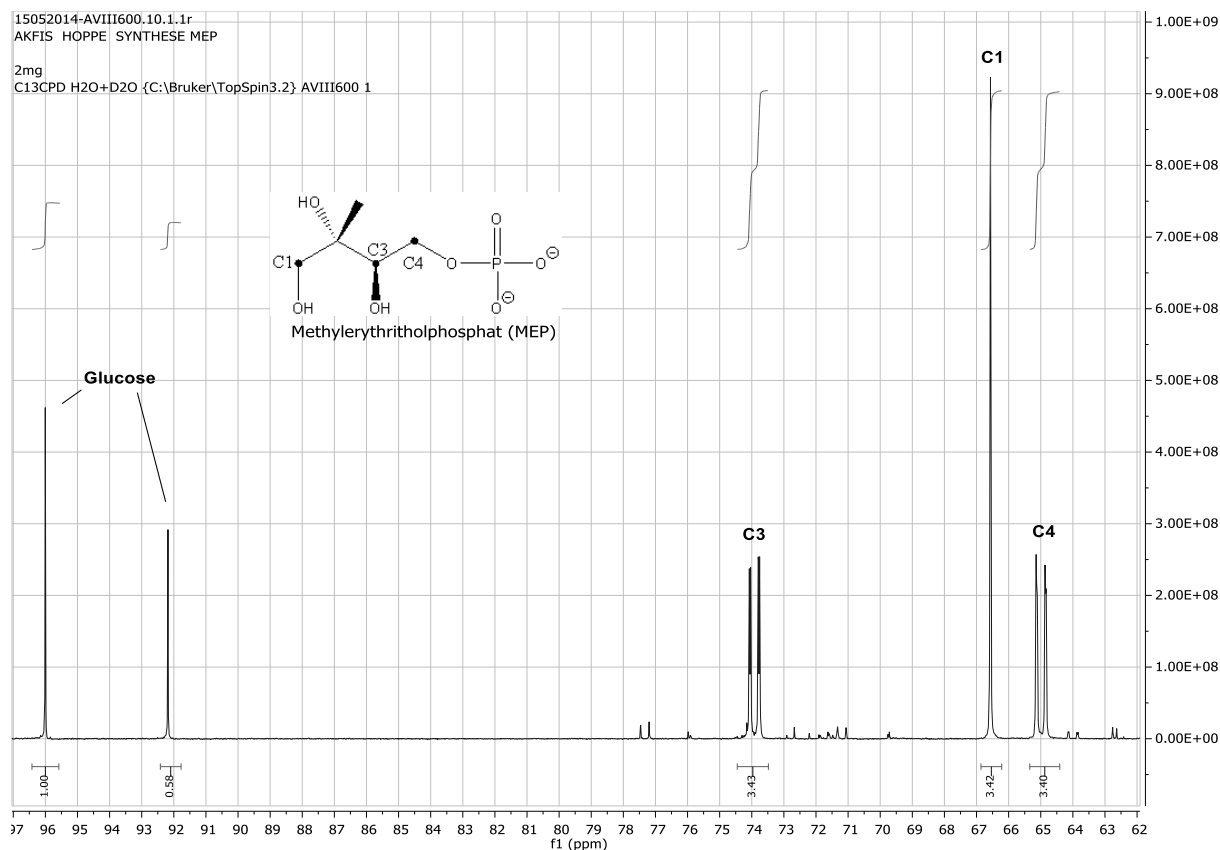


Abbildung 35: ^{13}C -NMR der präparativen Synthese von MEP

Auch die Synthese, um den Faktor 167 vergrößerten Maßstab, war, wie in Abbildung 35 zu erkennen, erfolgreich. Die Konzentrationsbestimmung mit der 5 mM markierten 1- $^{13}\text{C}_1$ -Glucose ergab eine MEP-Konzentration von 26 mM.

4.5. Optimierung des fotometrischen Assays von IspD aus *P. vivax*

Der fotometrische Assay für IspD aus *P. vivax* wurde bezüglich der Konzentration der wichtigsten Bestandteile optimiert. Als Ausgangsassay diente die Arbeit von Illarinova 2006. Der verwendete Assay ist schematisch in Abbildung 36 dargestellt.

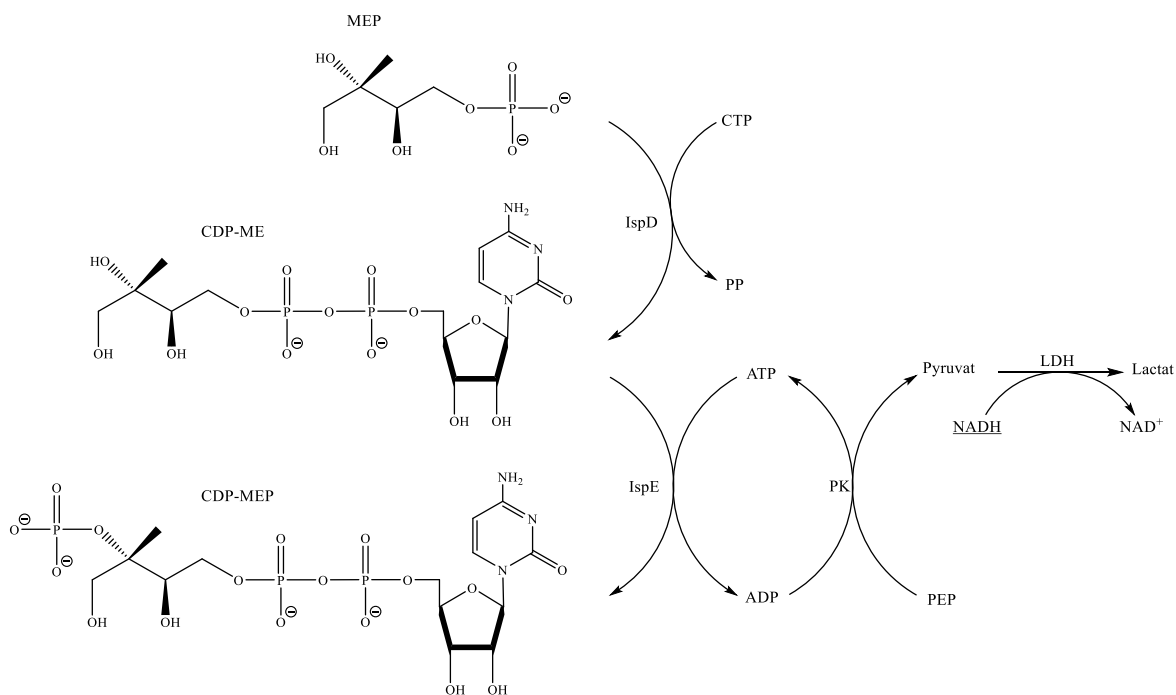


Abbildung 36: Schematische Darstellung des fotometrischen Assays von IspD

Es ist sicher zu stellen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit nicht durch die Konzentration der Hilfsenzyme IspE, PK und LDH, sondern ausschließlich von *PvIspD* limitiert wird. Darum war es notwendig, den Assay hinsichtlich seiner Bestandteile und deren Konzentrationen zu optimieren. Dazu wurde zuerst die MEP-Konzentration im Assay überprüft.

Die Verifizierung der MEP-Konzentration erfolgte durch eine Messung mit verschiedenen MEP-Konzentrationen (Stammlösung = 15 mM) im fotometrischen Assay. Diese ist in Abbildung 37 dargestellt.

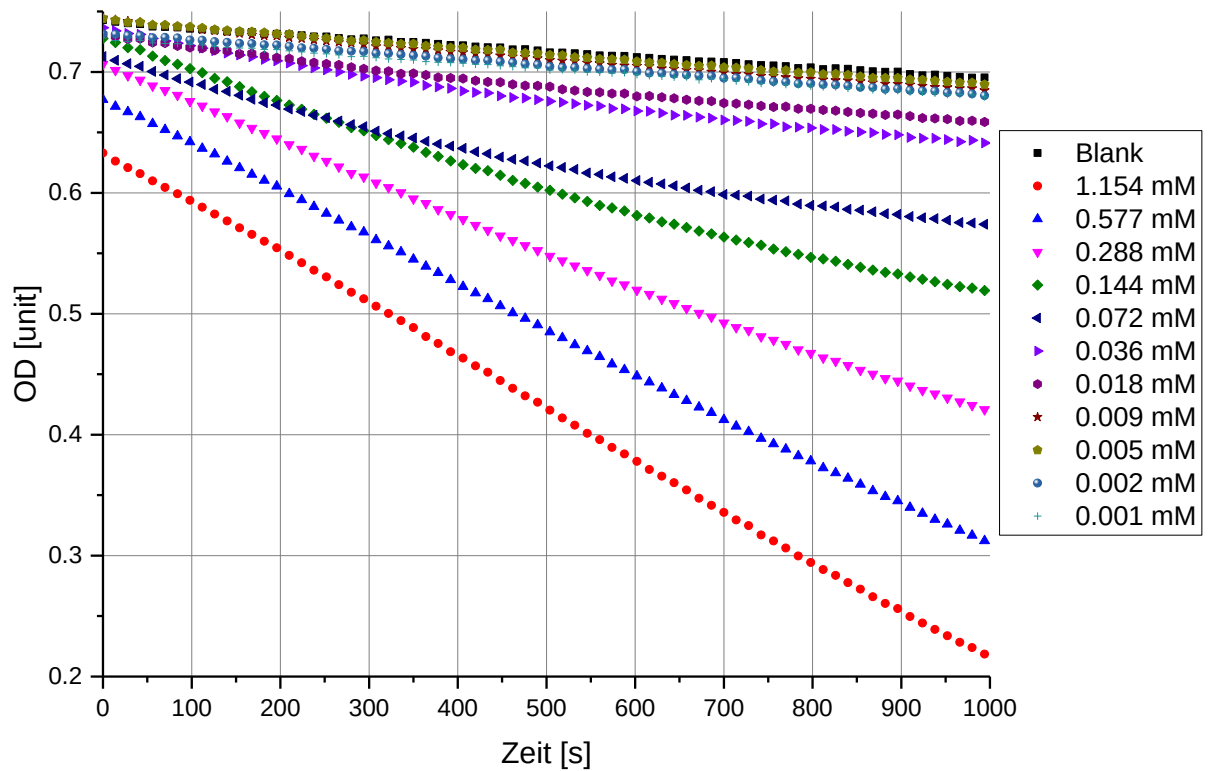


Abbildung 37: Fotometrischer IspD Assay zur Optimierung von c(MEP)

Für optimale Assaybedingungen sollte die optischen Dichte (OD) in einem bestimmten Zeitraum um einen gewissen Betrag abnehmen. In diesem Fall in 30 min bzw. 1800 s um 0.3 OD. Das entspricht 1.25 μL der Stammlösung von MEP für einen 60 μL Assay bzw. 62.5 μL der Stammlösung von MEP für 3 mL Assay (0.036 mM). Eine andere Herangehensweise ist, dass die Konzentration im Assay 2-10 K_M beträgt. K_M ist ca. 175 μM und die Konzentration an MEP im Assay beträgt ca. 313 μM . Somit entspricht die Konzentration im Assay ungefähr zweimal K_M . Die gewünschten Bedingungen sind in dem Fall realisiert worden.

Als Nächstes folgte ein fotometrischer Assay um die geeignete Konzentration von CTP (200 mM) für das HTS auszuwählen. In Abbildung 38 sind die Ergebnisse gezeigt.

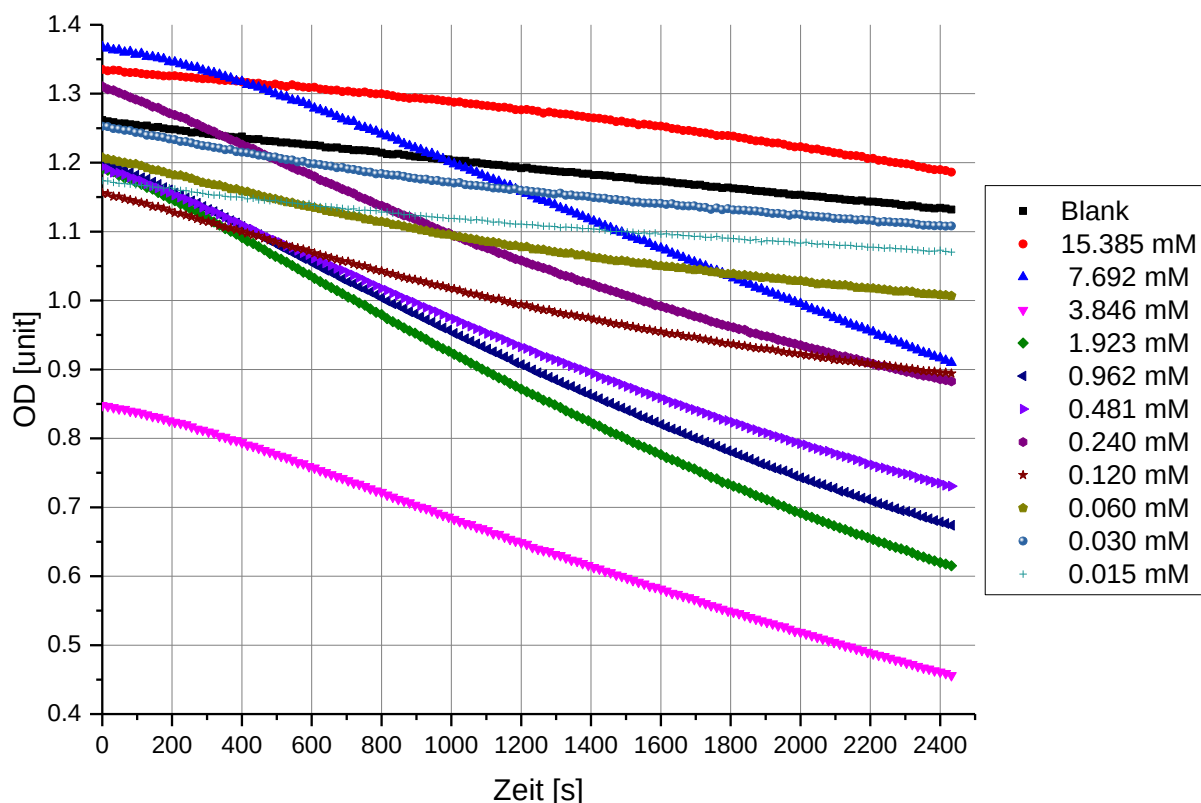


Abbildung 38: Fotometrischer IspD-Assay zur Optimierung der CTP-Konzentration

Die Kurvenverläufe bei Konzentrationen von 0.48 mM und 0.24 mM CTP sind sehr ähnlich. Für weitere Messungen wurde der Mittelwert dieser Konzentration von 0.36 mM für den 60 μ L Gesamtassay ausgewählt. Der Mittelwert von 0.36 mM stellt sicher, dass genügend aktives Enzym im Assay vorhanden ist und zusätzlich eine Einsparung des Substrates erfolgt. Das entspricht 12 μ L (0.36 mM) bei einem 3 mL Gesamtassay.

Bei NADH (200 mM), ATP (300 mM), PEP (300 mM), *EclspE* (15 mg/mL, 31.75 kDa), PK (600-1.000 units/mL), LDH (900-1400 units/mL) und *PvIspD* (ca. 2 mg/mL) wurde analog verfahren. Die Grafiken dazu sind im Anhang 6.11.2. zu finden. Weil große Mengen von *EclspE* und *PvIspD* benötigt wurden, war eine fortlaufende Synthese dieser Proteine über die gesamte Laufzeit des HTS nötig. Daher musste jeweils erneut eine Optimierung analog zu dem oben beschriebenen Vorgehen erfolgen.

In Tabelle 3 ist eine Übersicht über die optimalen Konzentrationen aller IspD Assaykomponenten dargestellt.

Tabelle 3: Mittlere Konzentrationen der einzelnen Bestandteile des optimierten fotometrischen Assays von *PvIspD*

Bestandteile des Assays	Konzentration der Stammlösung [mM]	Konzentration im Assay [mM]
Tris/HCl-Puffer	50	50
Kaliumchlorid (KCl)	3000	25
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1000	5.0
Dithiothreitol (DTT)	1000	5.0
Adenosintriphosphat (ATP)	300	0.5
Phosphoenolpyruvat (PEP)	300	0.3
Cytidintriphosphat (CTP)	200	0.4
Nicotinamidadenindinukleotide (NADH)	200	0.4
Pyruvatkinase/Laktatdehydrogenase (PK/LDH)	PK: 0.6 bis 1.0 u LDH: 0.9 bis 1.4 u	PK: 6.9×10^{-4} u LDH: 1.01×10^{-3} u
4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritolkinase (<i>EclspE</i>)	472	0.1
2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate-cytidyltransferase (<i>PvIspD</i>)	32	0.2
2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphate (MEP)	15	0.3

Je nach Variation und Aktivität der Enzyme ist eine geringfügige Anpassung der Konzentrationen aus Tabelle 3 nötig gewesen.

4.6. High Throughput Screening

Das *High Throughput Screening* (HTS) (siehe Kapitel 2.6. und Kapitel 5.7.) war Hauptbestandteil dieser Arbeit und erforderte die Entwicklung reproduzierbarer Methoden für alle Schritte. Eine Substanzbank, mit 103'909 Substanzen, sollte auf die Hemmwirkung gegen das Enzym *PvlspD* getestet werden. Die Substanzbank wurde von der BASF AG zur Verfügung gestellt und entspricht den Industriestandards bezüglich der Qualitätsparameter. Zudem wurden die enthaltenden Substanzen nach folgenden Kriterien ausgewählt.

- Molekulargewicht: 250-500 g/mol
- logP (calc.): 0.5-6.0
- Wasserstoff-Bindungsakzeptoren: 0-7
- Andere Atome als Wasserstoff-Atome: 12-28

Dabei entspricht der logP dem dekadischen Logarithmus des P-Wertes oder auch K_{ow} -Wertes. Dieser Wert steht für das Verhältnis zwischen Lipophilie (Fettlöslichkeit) und Hydrophilie (Wasserlöslichkeit) einer Substanz. Entsprechend ist logP positiv für lipophile und negativ für hydrophile Substanzen.

Die Substanzbank wurde nach den oben aufgelisteten Suchkriterien zusammengestellt und in einem weiteren Schritt wurden reaktive und unerwünschte Gruppen, wie z. B. Säurechloride entfernt. Weiterführend wurde die Substanzbank nochmals nach Diversität gefiltert.

Verdünnung der Mutterplatten mit dem Pipettierroboter

Für das HTS war es nötig, die 103'909 Substanzen von 10 mM auf 50 μ M zu verdünnen. Dies wurde mit einer Anzahl von 326 Assayplatten im 384 Well Format bewerkstelligt. Das genaue experimentelle Vorgehen ist in Kapitel 5.7.1. detailliert beschrieben. Um neben dem HTS für *PvlspD* noch weitere Enzyme *screenen* zu können, wurden mehrere Replikate erstellt. Die für das HTS fertig verdünnten Platten enthielten nach einer Zugabe von 60 μ L Assaygemisch jeweils eine Konzentration von 50 μ M des jeweiligen Inhibitors.

4.6.1. Primärscreen

Der optimierte Assay von Kapitel 4.5. wurde auf die Assayplatten von Kapitel 5.7.1. mittels eines Dispensers (MultiFlo Microplate, BioTek Germany, Bad Friedrichshall, Deutschland) gegeben und anschließend wurde die gesamte Platte zentrifugiert. Danach wurde der fotometrische Assay mit einer Messzeit von 30 min bei einer Wellenlänge von 340 nm durchgeführt. In Abbildung 39 ist ein Primärscreen des Inhibitors LS 5286989 (Substanz 1) exemplarisch für das gesamte HTS dargestellt.

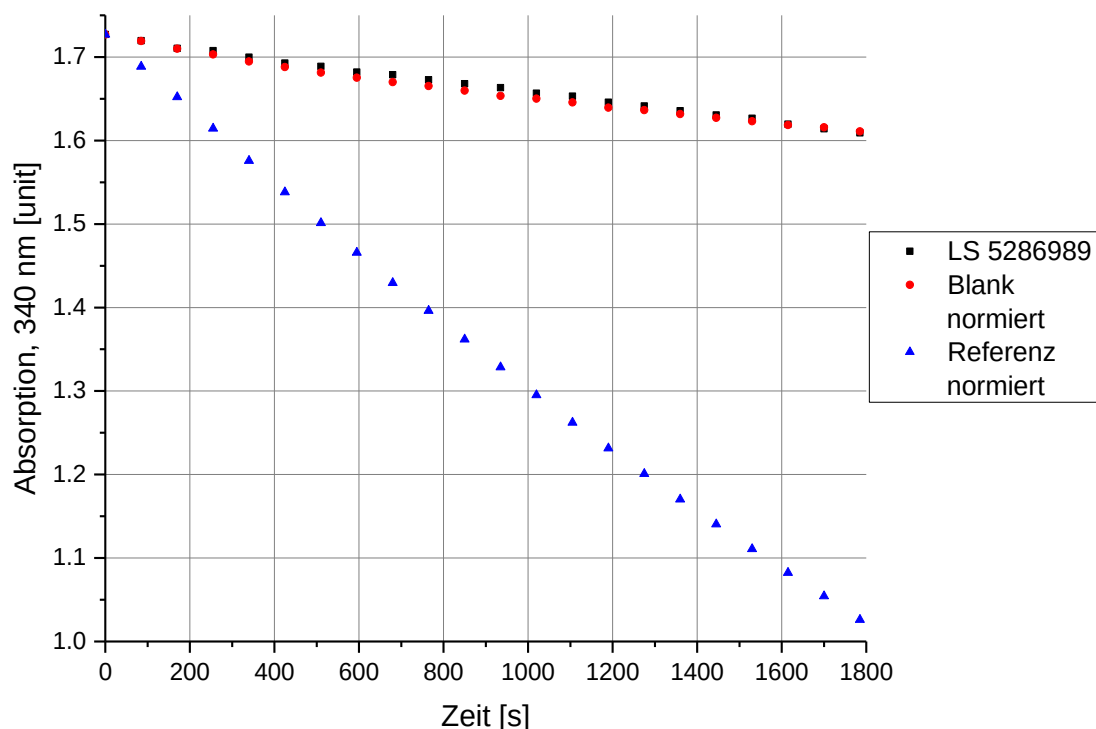


Abbildung 39: Primärscreen des Inhibitors LS 5286989 (Substanz 1)

Die rote Kurve war eine Blindprobe, bei der keine NADH-Abnahme zu beobachten sein sollte, da kein Substrat im Reaktionsgemisch hinzugegeben wurde. Die blaue Kurve zeigt die Referenz, bei der eine NADH-Abnahme erfolgte, da alle Assay Bestandteile, außer einem Inhibitor, vorhanden waren. Die schwarze Kurve zeigt den Assay mit Zugabe eines Inhibitors LS 5286989 (Substanz 1). In diesem Fall hemmt der Inhibitor, da der gleiche Kurvenverlauf, und somit die gleiche NADH-Abnahme, wie bei der Blindmessung zu beobachten war. Von den 103'909 Substanzen wiesen 181 eine Restaktivität von $\leq 30\%$ auf. Außerdem wurde zur Bestimmung der Messgüte ein z-Faktor eingeführt. Der z-Faktor ist ein Maß der statistischen Effektgröße und wird durch den Mittelwert und die

Standardabweichung von Positiv- und Negativkontrolle definiert (Zhang et al., 1999). Dieser z-Faktor sollte bei den weiter verwendeten Treffern über 0.5 liegen. War dies nicht der Fall, wurde der Treffer nicht weiter berücksichtigt und es erfolgte keine weitere Charakterisierung. Dieser Fall trat bei 11 Platten von 326 Platten auf. Der fotometrische Assay des Primärscreens wurde mit den gefundenen 181 Substanzen wiederholt, um auf Reproduzierbarkeit zu überprüfen. In der Wiederholungsmessung konnte die Hemmwirkung von 152 Substanzen bestätigt werden.

4.6.2. Sekundärscreen der Primärhits

Der Sekundärscreen (Counterscreen) erfolgte zur Überprüfung der Inhibition auf das Ziel-Enzym *PvlspD* oder eine unerwünschte Inhibition der eingesetzten Hilfsenzyme IspE, PK und LDH. Der dafür verwendete Assay ist in Abbildung 40 dargestellt.

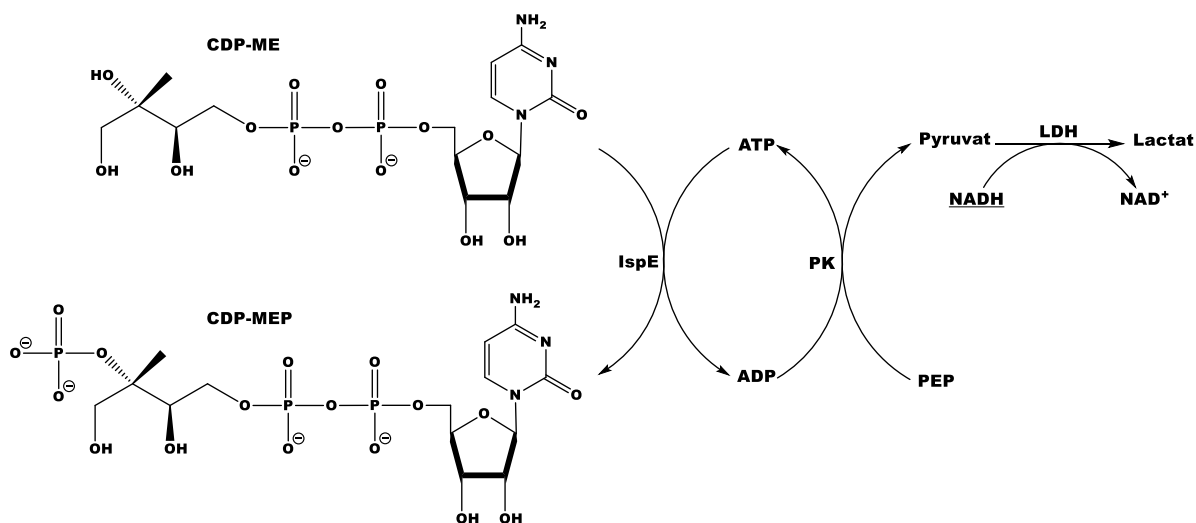


Abbildung 40: Schematischer Ablauf des fotometrischen Assays von EclspE für den Counterscreen

War eine Inhibition bei diesem Assay mit mehr als 70 % Aktivität feststellbar, wurde von einer Inhibition der Hilfsenzyme ausgegangen. Welches der Hilfsenzyme gehemmt wird, kann allerdings nicht anhand dieser Messungen aufgeklärt werden. Dazu wäre ein weiterer Assay zur Bestimmung der Hemmung der Hilfsenzyme PK und LDH erforderlich gewesen.

In der Abbildung 41 ist beispielhaft ein Counterscreen des Inhibitors LS 5286989 (Substanz 1) abgebildet.

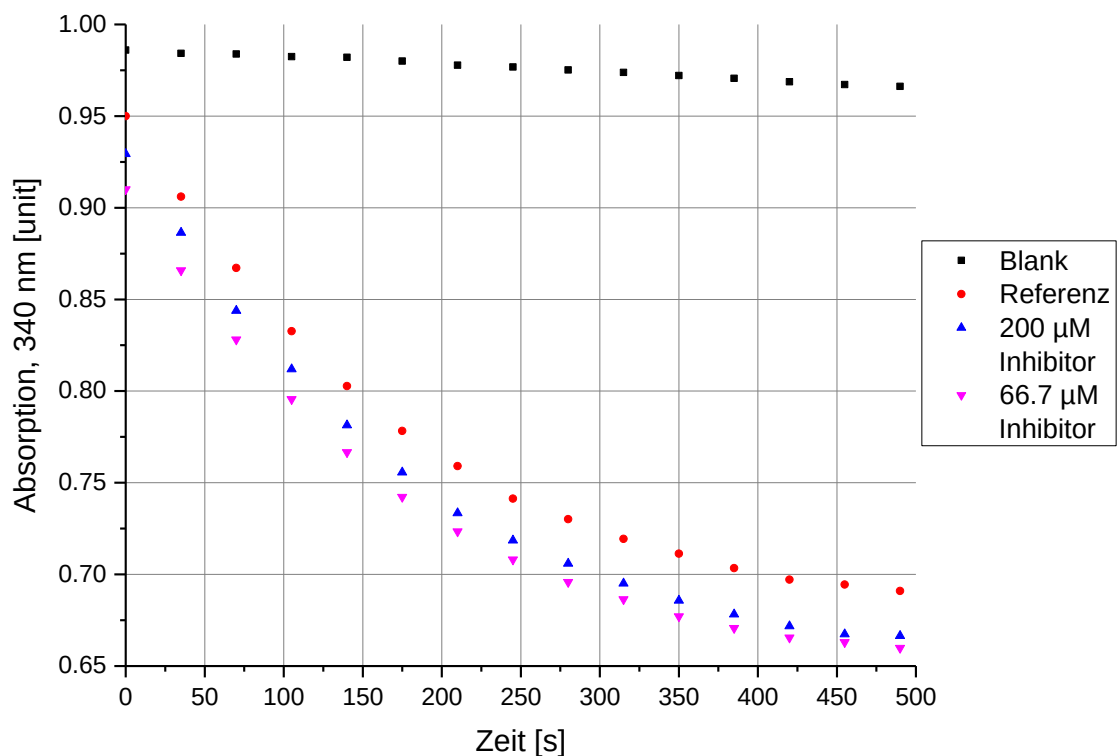


Abbildung 41: Counterscreen des Inhibitors LS 5286989 (Substanz 1)

Da alle Kurven des Inhibitors LS 5286989 (Substanz 1) etwa bei der Referenz lagen, war keine Inhibierung der Hilfsenzyme zu erkennen. Bei 31 Substanzen der Primärhits lag eine Hemmung vor. Diese Inhibitoren hemmten auch die Hilfsenzyme und nicht nur das Ziel-Enzym. Somit blieben 121 gefundene Substanzen, die *PvlspD* inhibieren und weiter charakterisiert wurden.

4.6.3. IC₅₀-Bestimmung

Bei der IC₅₀-Bestimmung wurde eine Konzentration des Inhibitors von 0.5 µM bis 300 µM eingesetzt. Die Ergebnisse wurden mit DynaFit3 (BioKin, Ltd., Watertown, USA) ausgewertet und angepasst. Der IC₅₀-Wert von 100 Substanzen lag unter 100 µM. 14 dieser Substanzen wiesen sogar einen IC₅₀ ≤ 10 µM auf.

In der Abbildung 42 und der Tabelle 4 ist ein Beispiel einer IC_{50} -Bestimmung des Inhibitors LS 5286989 (Substanz 1) und deren erhaltener Parameter dargestellt.

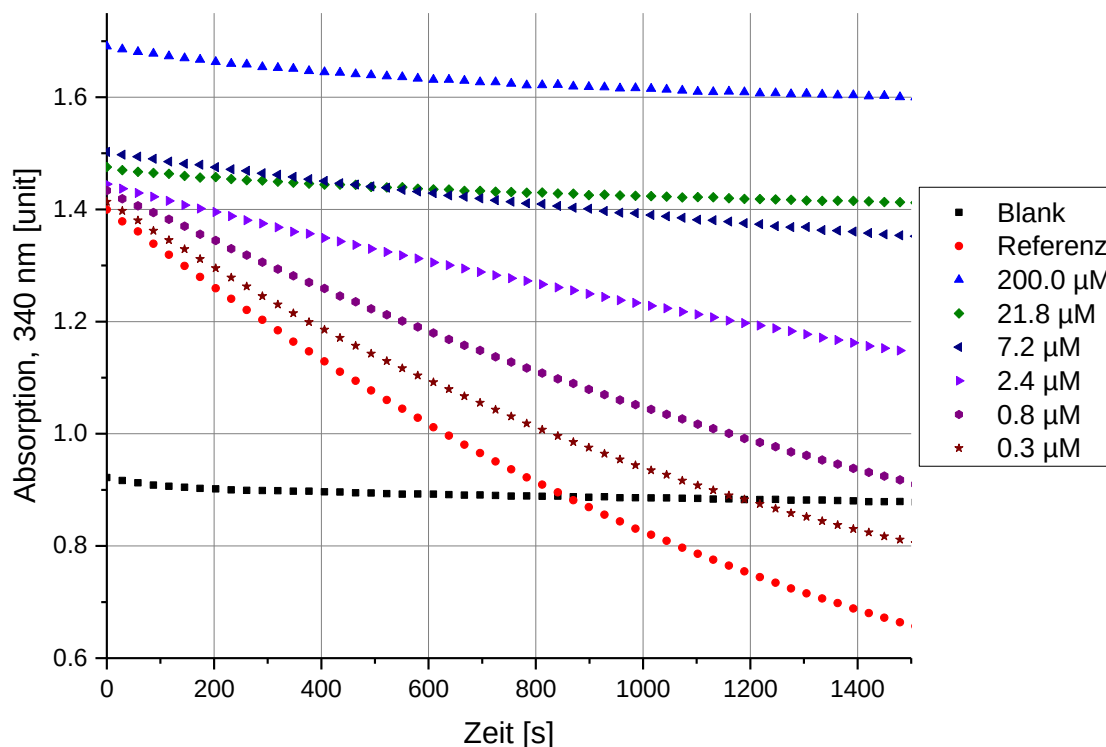


Abbildung 42: IC_{50} -Bestimmung des Inhibitors LS 5286989 (Substanz 1)

Tabelle 4: Erhaltenen Parameter der IC_{50} -Bestimmung des Inhibitors LS 5286989 (Substanz 1)

c (Inhibitor) [μM]	v [mOD/min]
200.0	1.0
21.8	0.5
7.2	3.9
2.4	9.4
0.8	14.9

In der Tabelle 4 sind die Konzentrationen und die zugehörigen Reaktionsgeschwindigkeiten einer IC_{50} -Bestimmung (siehe Abbildung 42) beispielhaft aufgelistet. Der ermittelte IC_{50} -Wert für den Inhibitor LS 5286989 (Substanz 1) betrug $2.4 \mu M$. Aus der IC_{50} -Bestimmung ergeben sich noch weitere Parameter, wie E_0 , K_s , S und K_i . In dem Fall ergab die IC_{50} -

Bestimmung von der Substanz LS 5286989 $k_{\text{cat}} = 27 \text{ s}^{-1}$, was bedeutet, dass 27 Moleküle pro Sekunde umgesetzt wurden. E_0 ist die Enzymkonzentration im eingesetzten Assay, diese betrug $0.1 \text{ } \mu\text{M}$. Die Dissoziationskonstante K_s wurde zu $74 \text{ } \mu\text{M}$ und die Substratkonzentration S zu $500 \text{ } \mu\text{M}$ bestimmt. Die Inhibitorkonstante bzw. Dissoziationskonstante des Inhibitors K_i beträgt $0.3 \text{ } \mu\text{M}$. K_i ist ein Maß für die Affinität zwischen Enzym und Inhibitor. In der folgenden Abbildung 43 ist die IC_{50} -Fitkurve der Substanz LS 5286989 (Substanz 1) dargestellt, dies wurde mit DynaFit3 (BioKin, Ltd., Watertown, USA) ermittelt.

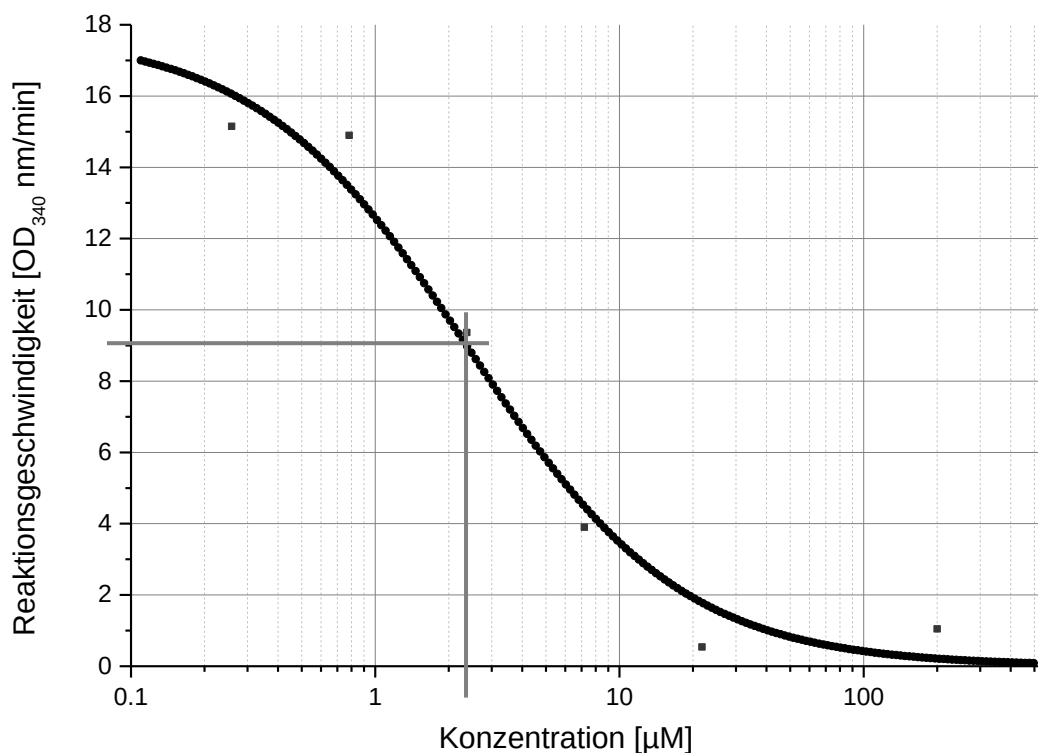
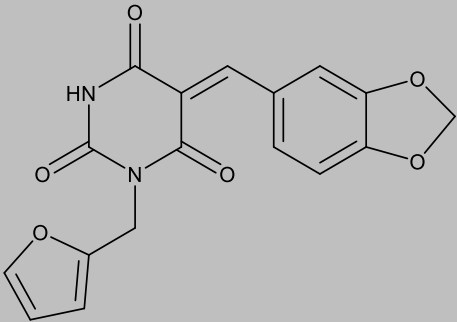
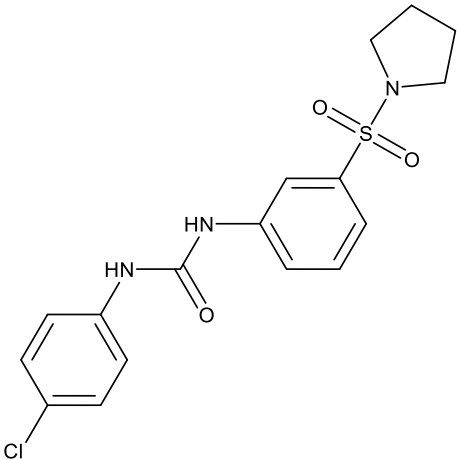
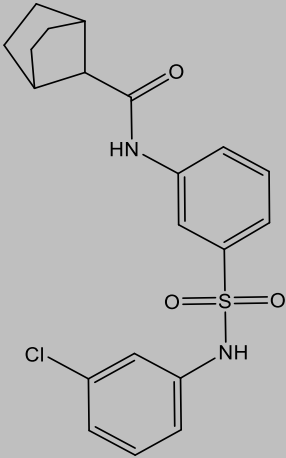
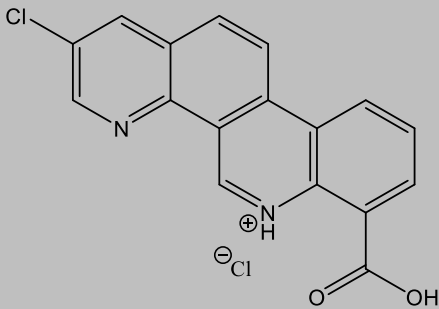
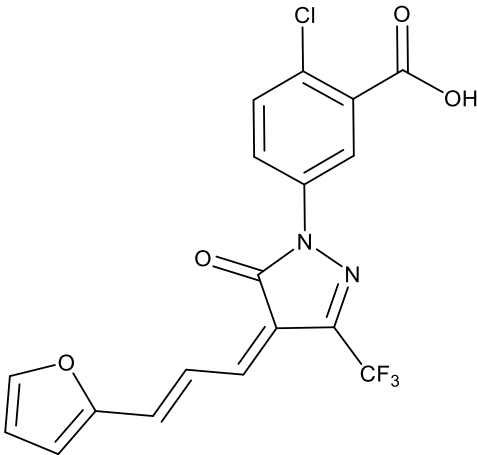
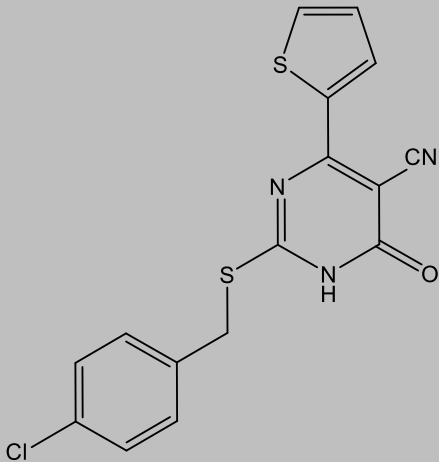


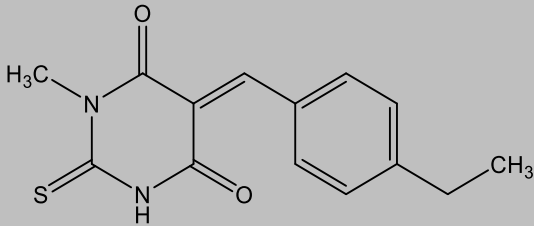
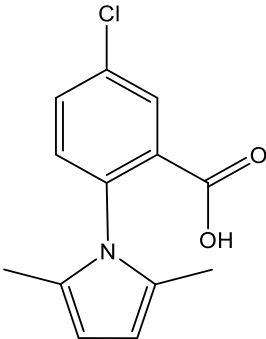
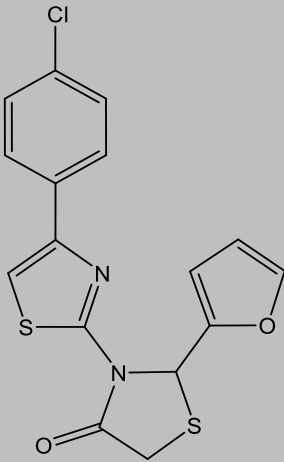
Abbildung 43: Fitkurve der IC_{50} -Bestimmung von LS 5286989 (Substanz 1), Punkte = Werte der Bestimmung, schwarze Kurve = Fitkurve

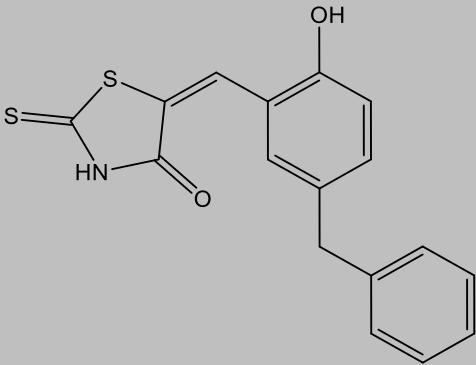
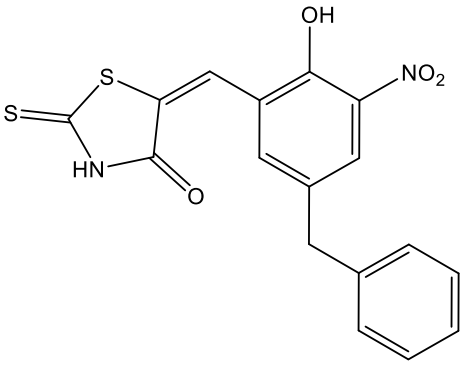
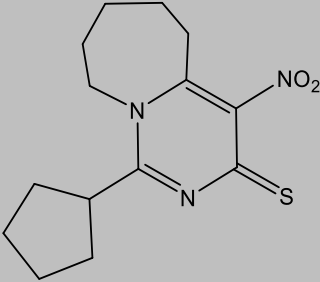
Der IC_{50} -Wert kann am Wendepunkt der Kurve abgelesen werden (graue Linien). In dem oben abgebildeten Beispiel beträgt der IC_{50} -Wert $2.4 \text{ } \mu\text{M}$. In der Tabelle 5 sind Strukturformeln von Substanzen, die einen IC_{50} -Wert von weniger als $10 \text{ } \mu\text{M}$ aufweisen, aufgelistet. Als Gütekriterium der Anpassung wird die Standardabweichungen (SE) hinter den IC_{50} -Werten angegeben.

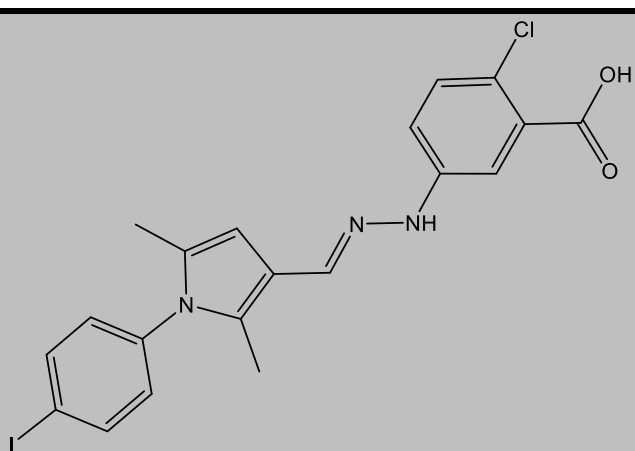
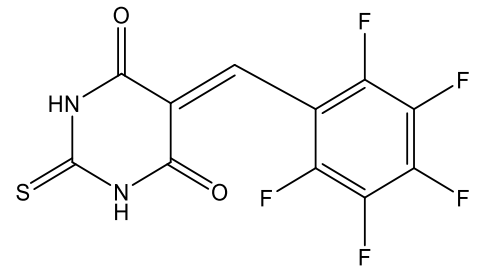
Tabelle 5: IC₅₀-Werte der identifizierten Inhibitoren

Substanz	Struktur	IC ₅₀ -Wert ± SE [μM]
LS 5286989 (1)	 (5Z)-5-(2H-1,3-benzodioxol-5-ylmethyliden)-1-(furan-2-ylmethyl)-1,3-diazinan-2,4,6-trion	2.4 ± 0.7
LS 5351135 (2)	 N-(4-chlorophenyl)-N'-[3-(1-pyrrolidinylsulfonyl)phenyl]-Urea	2.6 ± 0.7
LS 5333093 (3)	 2-{bicyclo[2.2.1]heptan-2-yl}-N-[3-[(3-chlorophenyl)-sulfamoyl]phenyl]acetamid	2.6 ± 0.7

Substanz	Struktur	IC ₅₀ -Wert ± SE [μM]
LS 160313 (4)	 2-chlorobenzo[i][1,9]phenanthroline-7-Carbonsäure	5.1 ± 0.7
LS 5299218 (5)	 2-chloro-5-[4-[3-(2-furanyl)-2-propen-1-ylidene]-4,5-dihydro-5-oxo-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]-Benzoessäure	5.4 ± 0.8
LS 5270361 (6)	 2-[[[4-chlorophenyl)methyl]thio]-1,6-dihydro-6-oxo-4-(2-thienyl)- 5-Pyrimidin-carbonitril	5.9 ± 1.7

Substanz	Struktur	IC ₅₀ -Wert ± SE [μM]
LS 5270852 (7)	 5-[(4-ethylphenyl)methylen]dihydro-1-methyl-2-thioxo-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i>)-Pyrimidindion	6.8 ± 0.7
LS 5298096 (8)	 5-chloro-2-(2,5-dimethyl-1 <i>H</i> -pyrrol-1-yl)-Benzoessäure	7.1 ± 1.2
LS 306484 (9)	 3-[4-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazol-2-yl]-2-(furan-2-yl)-1,3-thiazolidin-4-on	7.7 ± 1.7

Substanz	Struktur	IC ₅₀ -Wert ± SE [μM]
LS 5294453 (10)	 5-[[2-hydroxy-5-(phenylmethyl)phenyl]methylen]-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on	8.8 ± 2.0
LS 5299219 (11)	 (5<i>E</i>)-5-(5-benzyl-2-hydroxy-3-nitrobenzyliden)-2-thioxo-1,3-thiazolidin-4-on	8.9 ± 1.8
LS 5332069 (12)	 1-cyclopentyl-6,7,8,9-tetrahydro-4-nitro- Pyrimido[1,6-a]azepin-3(5<i>H</i>)-thion	9.1 ± 2.9

Substanz	Struktur	IC ₅₀ -Wert ± SE [μM]
LS 5333957 (13)	 2-chloro-5-[2-[[1-(4-iodophenyl)-2,5-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl]methylene]hydrazinyl]-Benzoessäure	9.1 ± 5.3
LS 4062690 (14)	 Dihydro-5-[(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)methylene]-2-thioxo-4,6(1H,5H)-Pyrimidin-2-one	9.3 ± 2.6

Bei einigen Strukturen liegen Gemeinsamkeiten vor. Bei Substanz 2 und 3 liegt das Strukturmotiv der Sulfonamide, siehe Abbildung 44 grau eingekreister Bereich, vor. Diese Stoffklasse ist bereits als Malariamedikament bekannt, wie z. B. Sulfadoxin, siehe Abbildung 44.

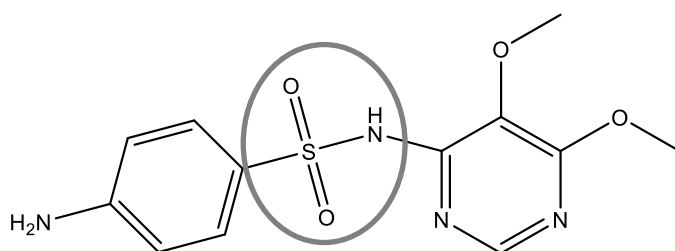


Abbildung 44: Struktur von Sulfadoxin

Der bisher publizierte Wirkmechanismus dieser Substanz erfolgt über den Folsäureweg (World Health Organization, 2010; White, 2004). Da bei Medikamenten dieser Substanzklasse Resistenzbildungen beobachtet wurden, ist die Untersuchung von Sulfonamiden mit abgewandelten Strukturen von Interesse (World Health Organization, 2010).

Bei den Substanzen 9, 10 und 11 zeigt sich das Strukturmotiv der Thiazolidinone. Diese Substanzklasse ist bereits für eine antimikrobielle Wirkung bekannt, und auch als Malariawirkstoff bereits teilweise untersucht, wie z. B. 3-(3-(7-Chloroquinolin-4-ylamino)propyl)-2-(furan-2-yl)thiazolidin-4-one (Rojas Ruiz et al., 2011; Jain et al., 2012), siehe Abbildung 45.

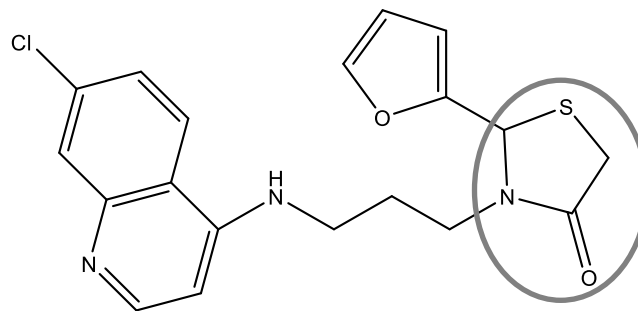


Abbildung 45: Struktur von 3-(3-(7-Chloroquinolin-4-ylamino)propyl)-2-(furan-2-yl)thiazolidin-4-one

Eine auffällige Struktur der Barbiturate oder Thiobarbiturate ist bei den Substanzen 1, 7 und 14 zu erkennen. Allerdings sind Barbiturate nicht als Antiinfektiva bekannt, sondern vielmehr für ihre narkotische Wirkung, wie z. B. Barbitursäure, siehe Abbildung 46 (Russo and Bressolle, 1998; Volwiler and Tabern, 1939).

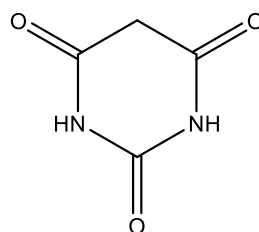


Abbildung 46: Struktur von Barbitursäure

Zusätzlich werden ähnliche Strukturmerkmale bei den Substanzen 5, 8 und 13 gefunden. Alle drei Substanzen besitzen das Strukturmerkmal der Aminochlorbenzoesäure. Diese Substanzklasse ist seit längerem in der medizinischen Forschung bekannt, so konnten leistungsfähige Substanzen gegen HIV (*human immunodeficiency virus*) bereits identifiziert werden, wie z. B. N-(4-carboxy-3-hydroxy)phenyl-2,5-dimethylpyrrol (Liu et al., 2008), siehe Abbildung 47.

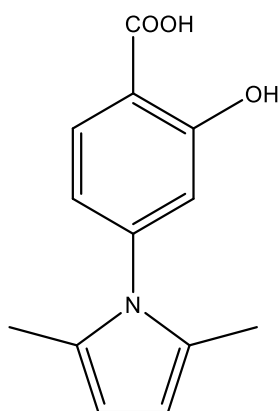


Abbildung 47: Struktur von N-(4-carboxy-3-hydroxy)phenyl-2,5-dimethylpyrrol

4.6.4. ^{13}C -NMR-Assay zur Bestätigung der Inhibitorwirkung auf IspD aus *P. vivax*

Zur Bestätigung der Inhibition, der besten gefundenen Treffer mit einem $\text{IC}_{50} \leq 10 \mu\text{M}$ im fotometrischen Assay, wurde eine zweite Methode, die ^{13}C -NMR durchgeführt (Illarionova et al., 2006). Dazu war es notwendig, den ^{13}C -NMR Assay auf seine Inkubationszeit, bzw. Konzentrationen der verwendeten Substanzen, zu optimieren. In der folgenden Abbildung 48 ist ein ^{13}C -NMR des Substrates MEP dargestellt.

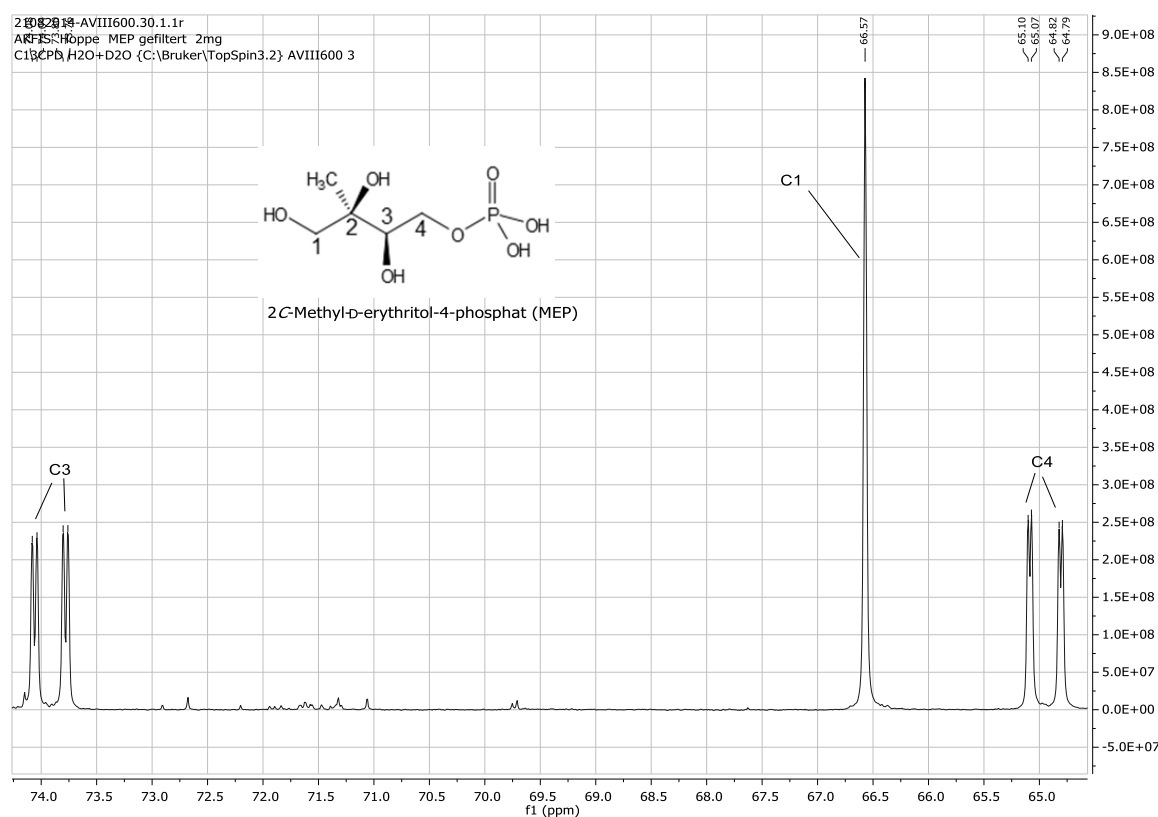


Abbildung 48: ^{13}C -NMR von MEP (Substrat)

Die Signale der C-Atome von MEP (Struktur ist in Abbildung 48 dargestellt) bei 74 ppm (C3), 66.5 ppm (C1) und 65 ppm (C4) deckten sich mit den Vergleichsspektren aus der Literatur (Illarionova et al., 2006).

Zusätzlich wurde eine ^{13}C -NMR des Produktes CDP-ME der Synthese zum Vergleich aufgenommen, dieses ist in Abbildung 49 gezeigt.

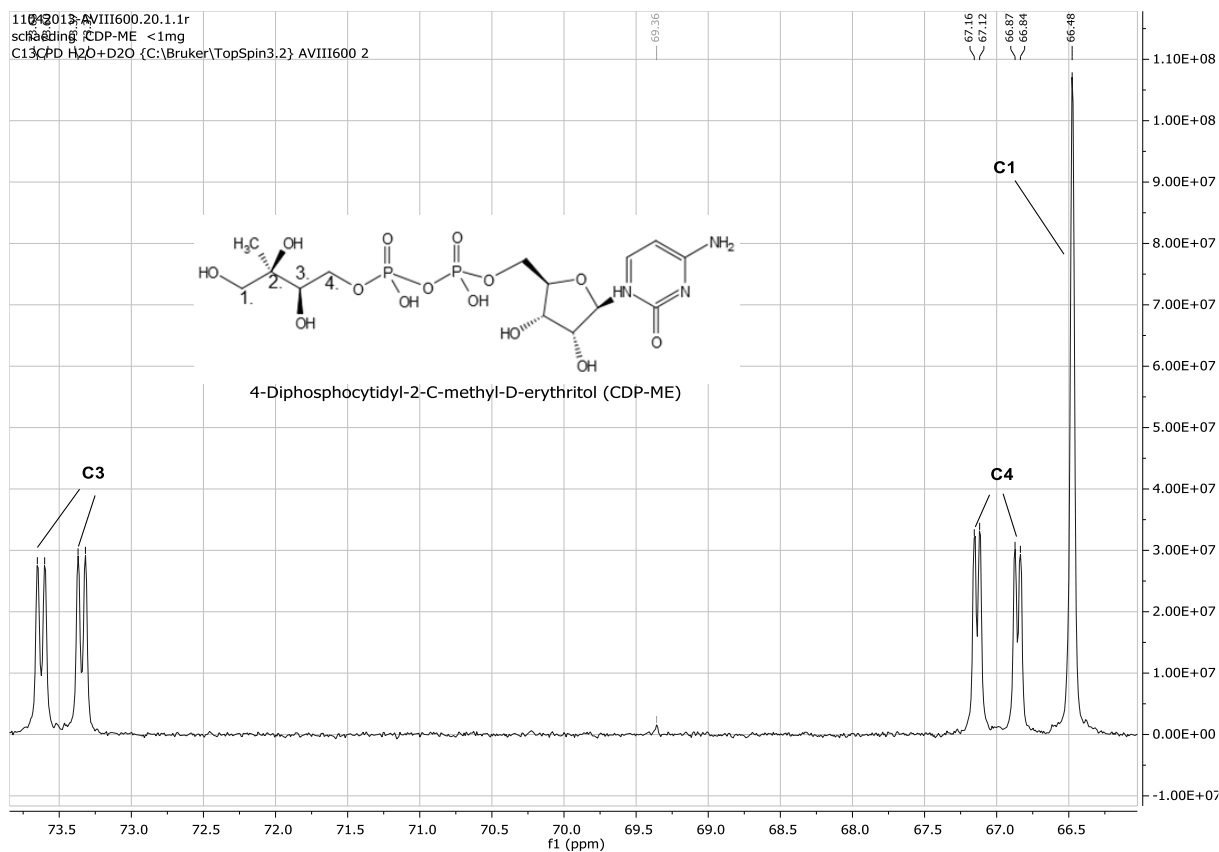


Abbildung 49: ^{13}C -NMR von CDP-ME (Produkt)

Die Signale der C-Atome von CDP-ME (Struktur ist in Abbildung 49 dargestellt) bei 73.5 ppm (C3), 66.5 ppm (C1) und 67 ppm (C4) deckten sich auch hier mit den Vergleichsspektren aus der Literatur (Illarionova et al., 2006).

Es erfolgte eine Optimierung der Inkubationszeit hinsichtlich des optimalen Umsatzes von MEP zu CDP-ME. Da es sich bei der Reaktion um eine Gleichgewichtsreaktion handelt, lag der maximal mögliche Umsatz bei ca. 60 %.

Der Umsatz der Synthese von MEP zu CDP-ME, mit dem katalysierenden Protein *PvlspD*, ist in Abbildung 50 dargestellt.

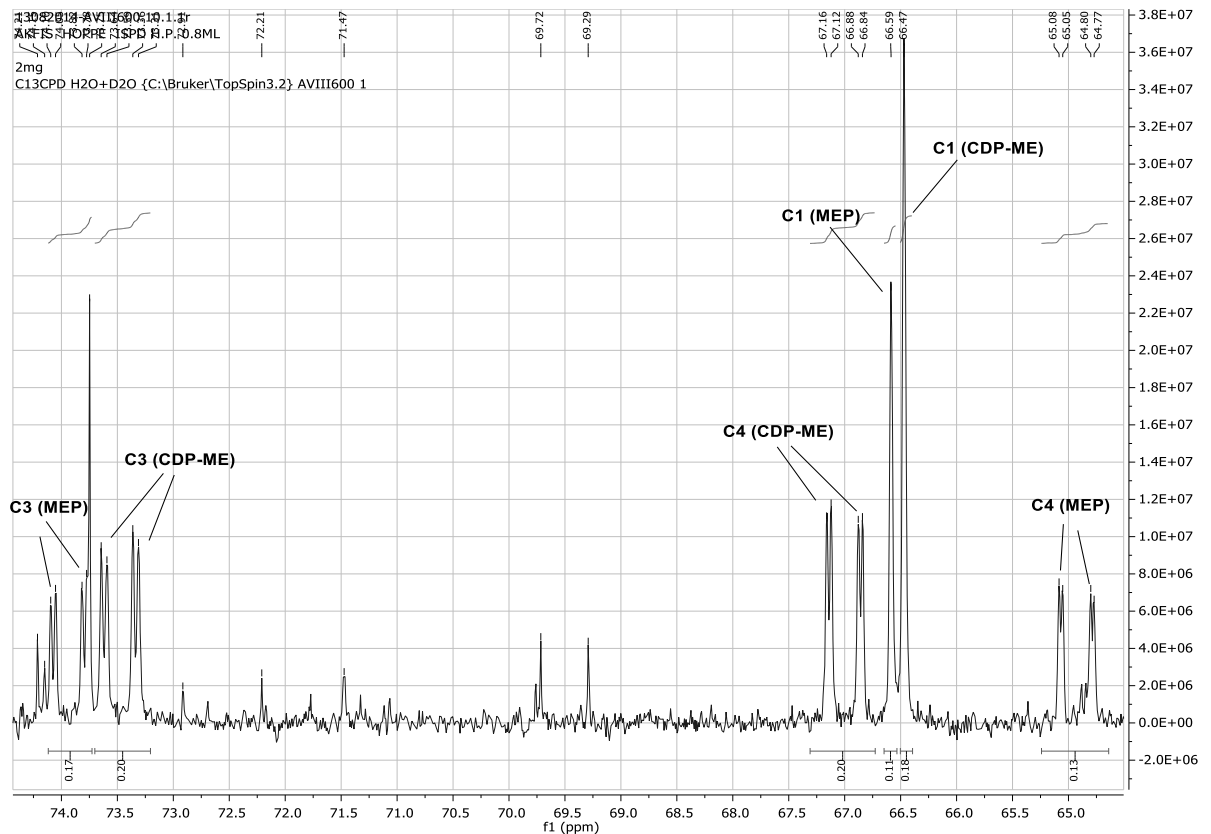


Abbildung 50: ^{13}C -NMR des Umsatzes der Synthese von MEP zu CDP-ME mit dem katalysierenden Protein *PvlspD*

In Abbildung 50 ist zu erkennen, dass sowohl die Signale des Produktes CDP-ME bei 73-74 ppm (C3), 67 ppm (C4) und 66.5 ppm (C1) als auch die des Eduktes MEP bei 73.5-74.5 ppm (C3), 66.5 ppm (C1) und 65 ppm (C4) vorhanden sind. Der Umsatz, berechnet sich über das Verhältnis der Integrale von MEP und CDP-ME zueinander und beträgt ca. 60 %. Dieser Grenzumsatz wurde nach eine Stunde erreicht. Auch nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit erhöhte sich der Umsatz nicht mehr signifikant. Der Umsatz bei der ^{13}C -NMR-Messung soll möglichst aber nicht dem Maximalumsatz entsprechen, da nach 2 Stunden auch der Inhibitor seine Wirkung verlieren könnte und somit beide Umsätze mit und ohne Inhibitor gleich wären. Deswegen wurde die Messzeit von 30 min festgelegt. Da die ^{13}C -NMR-Messung einen deutlich höheren Aufwand bedeutet, als ein fotometrischer Assay, wurden nur die Inhibitoren mit einem IC_{50} -Wert

$\leq 10 \mu\text{M}$ überprüft. Bei allen überprüften Inhibitoren wurden mittels ^{13}C -NMR die Inhibitionswirkung bestätigt.

Im Vergleich zu Abbildung 50 ist in Abbildung 51 ein ^{13}C -NMR des Inhibitors LS 5299218 (Substanz 5), als positives Beispiel, gezeigt. Positiv bedeutet in dem Fall, dass es zu keiner Umsetzung von dem Substrat MEP zu CDP-ME kam und somit eine Wirkung des Inhibitors auf das Ziel-Enzym *PvlspD* bestätigt werden konnte. Alle weiteren ^{13}C -NMRs sind im Anhang 6.11.3. dargestellt.

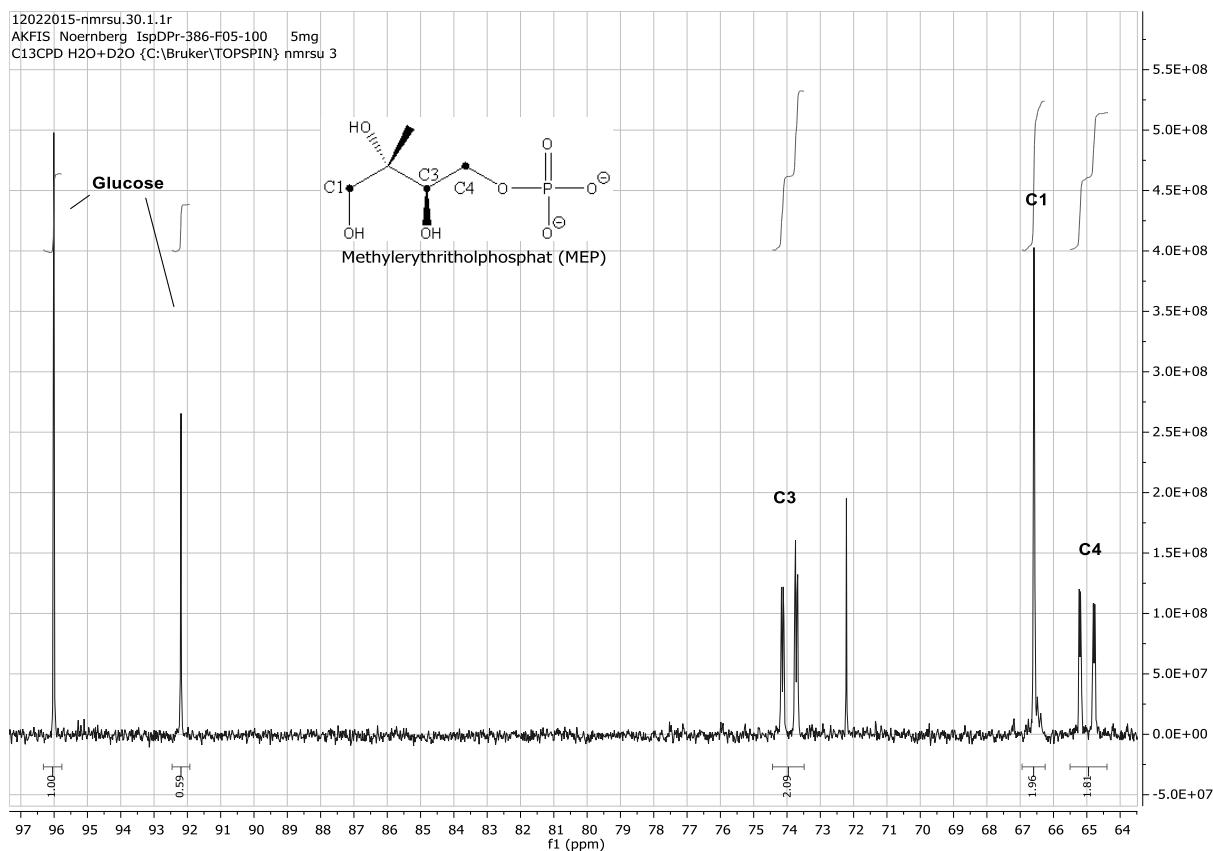


Abbildung 51: ^{13}C -NMR-Assay der Substanz LS 5299218 (Substanz 5)

In der Abbildung 51 sind lediglich die Signale bei 74 ppm (C3), 66-67 ppm (C1) und 65 ppm (C4) von MEP, sowie von Glucose bei 96 ppm und 92-92.5 ppm zu beobachten. Der Inhibitor hat das Enzym *PvlspD* vollständig gehemmt und es kam zu keiner Synthese von CDP-ME. Damit wurde die Inhibierung des Inhibitors auf *PvlspD* bestätigt. Der nicht zugeordnete Peak bei ca. 72.2 ppm gehört mit aller Wahrscheinlichkeit zu CTP, was durch die Inhibierung nicht vollständig umgesetzt wurde. Alle weiteren gezeigten Inhibitoren

(siehe Kapitel 4.6.3.) wurden im ^{13}C -NMR auf ihre Inhibierung bestätigt, die Spektren sind im Anhang zu finden (siehe Kapitel 6.11.3.).

4.7. Hemmmechanismus der besten Inhibitoren

Zur Bestimmung der Hemmmechanismen wurde eine Messung mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren von 0 μM bis 9 μM , sowie mit unterschiedlichen Konzentrationen des Substrates (MEP) von 0 μM bis 800 μM durchgeführt und mittels fotometrischem IspD-Assay vermessen. Beispielhaft ist in Abbildung 52 ein Ergebnis der Messungen dargestellt, was mittels DynaFit3 (BioKin, Ltd., Watertown, USA) ermittelt wurde.

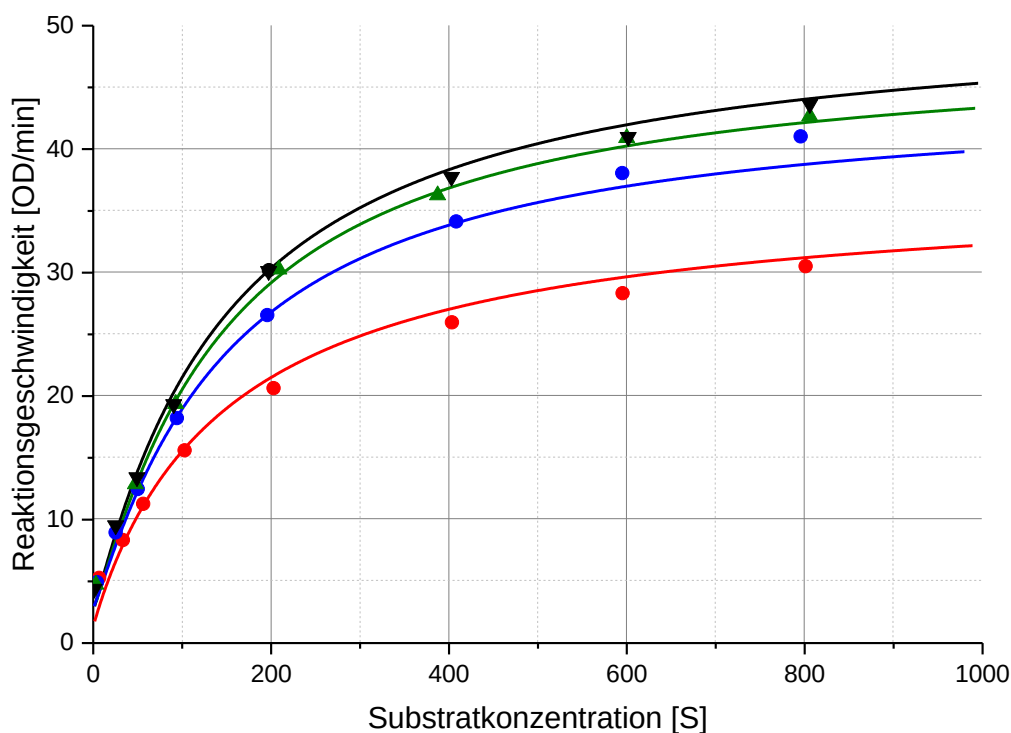
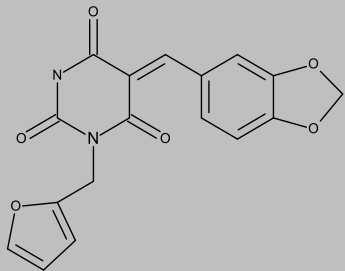
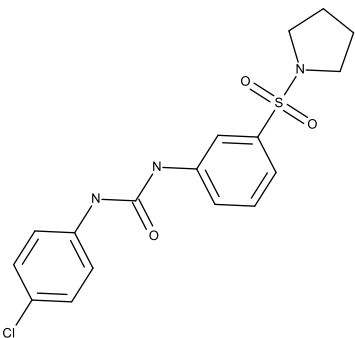
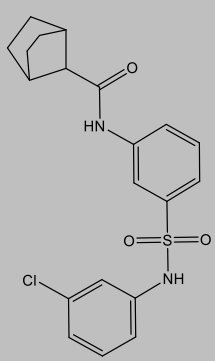
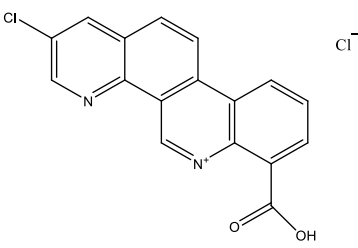


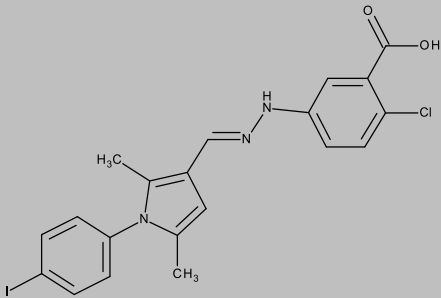
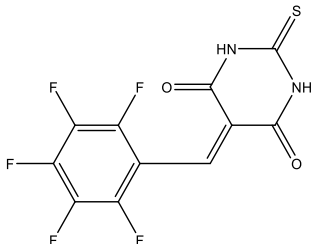
Abbildung 52: Ergebnisse der Hemmmechanismus-Bestimmung von LS 5299218 (Substanz 5), schwarze Kurve = 9 μM Inhibitor, grüne Kurve = 6 μM Inhibitor, blaue Kurve = 3 μM Inhibitor, rote Kurve = 0 μM Inhibitor

Mithilfe der in Abbildung 52 dargestellten Messung wurde überprüft, welcher Hemmmechanismus beim untersuchten Inhibitor vorliegt. Dies erfolgte mit dem Programm DynaFit3 (BioKin, Ltd., Watertown, USA). Für die Experimente wurde der bereits bekannte IspD-Assay (siehe Kapitel 5.6.1.1.) verwendet. Jede Kurve entspricht einer Anfangskonzentration des Inhibitors bei der Messung. Durch einen Vergleich der Kurvenverläufe kann der passende Hemmmechanismus ermittelt werden. Die erhaltenen Parameter stimmen mit einem unkompetitiven Mechanismus überein. Der Inhibitor geht

bei diesem Mechanismus nur mit dem Enzym-Substrat-Komplex (ES) eine Wechselwirkung ein. Es kommt zu einer Hemmung des Enzyms, sodass keine weitere Reaktion stattfinden kann (Stryer et al., 2007). In der folgenden Tabelle 6 sind alle Ergebnisse bezüglich der Hemmmechanismen aufgelistet.

Tabelle 6: Ergebnisse der Bestimmung der Hemmmechanismen der besten Inhibitoren

Substanz	Struktur	Hemmmechanismus
LS 5286989 (1)		unkompetitiv $K_{is}: 6.6 \mu\text{M} \pm 1.3 \mu\text{M}$
LS 5351135 (2)		nichtkompetitiv $K_{is}: 0.9 \mu\text{M} \pm 0.3 \mu\text{M}$
LS 5333093 (3)		nichtkompetitiv $K_{is}: 0.9 \mu\text{M} \pm 0.4 \mu\text{M}$
LS 160313 (4)		unkompetitiv $K_{is}: 21.8 \mu\text{M} \pm 3.0 \mu\text{M}$

Substanz	Struktur	Hemmmechanismus
LS 533957 (13)		unkompetitiv $K_{is}: 7.8 \mu\text{M} \pm 1.3 \mu\text{M}$
LS 4062690 (14)		unkompetitiv $K_{is}: 3.5 \mu\text{M} \pm 0.5 \mu\text{M}$

Von zwei Substanzen (nicht in Tabelle 6 aufgelistet) war es nicht möglich, einen Hemmmechanismus zu bestimmen. Die Mehrheit der Inhibitoren zeigte einen unkompetitiven Mechanismus. Bei den Messungen gilt zu beachten, dass der Messfehler der Bestimmungen bis zu 23 % betrug und somit Abweichungen möglich wären. K_{is} ist die Dissoziationskonstante des Enzym-Inhibitor-Komplexes oder des Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplexes bei unkompetitiven oder nichtkompetitivem Hemmmechanismus. Je größer K_{is} ist, umso instabiler ist die Bindung des Komplexes (Stryer et al., 2007).

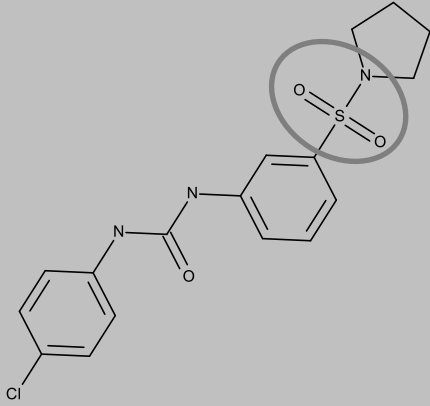
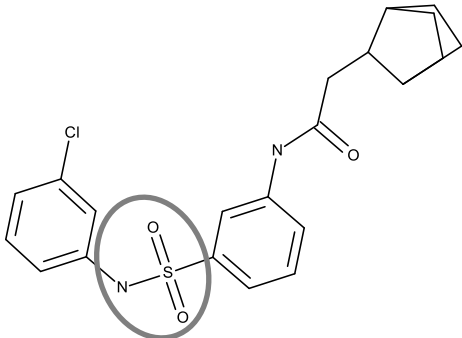
Zwei Inhibitoren zeigten einen nichtkompetitiven oder auch allosterischen Hemmmechanismus. Bei diesem Mechanismus lagert sich der Inhibitor nicht am aktiven Zentrum des Enzyms, sondern an einer anderen Bindungsstelle, an (Stryer et al., 2007) und es kommt zu keiner vollständigen Inaktivierung des Enzyms. Für weitere Erklärungen dieses Verhaltens müsste die Struktur des Enzyms bekannt sein. Des Weiteren wurden die Inhibitoren auf einen kompetitiven Hemmmechanismus und einen gemischten Mechanismus aus kompetitiven und unkompetitiven Hemmmechanismus überprüft, was jedoch auf keiner der untersuchten Inhibitoren zutraf. Bei einer kompetitiven Hemmung bindet der Inhibitor an das aktive Zentrum des Enzyms und es kommt zu einer Inaktivierung der Reaktion (Stryer et al., 2007).

4.8. Verifizierung der Hemmung von Analoga

Sulfonamide

Beim HTS viel auf, dass viele Substanzen mit einer Sulfonamidgruppe in der Struktur inhibiert haben. Folglich wurden ähnliche Substanzen mit diesem Strukturmotiv untersucht. Diese Substanzen wurden freundlicherweise vom Kooperationspartner (BASF) bereitgestellt. In der folgenden Tabelle 7 sind die beiden Vertreter mit den IC_{50} -Werten dargestellt. Die grau markierten Bereiche sind die Sulfonamidgruppen der Substanzen.

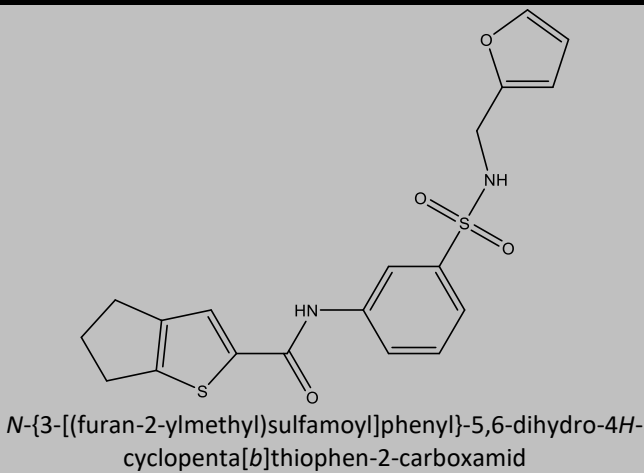
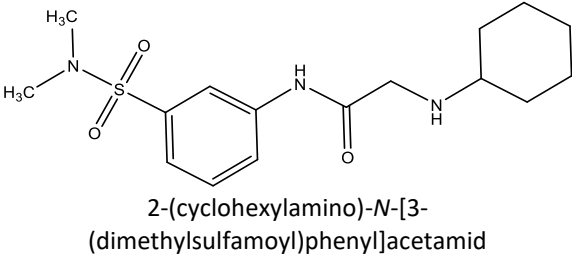
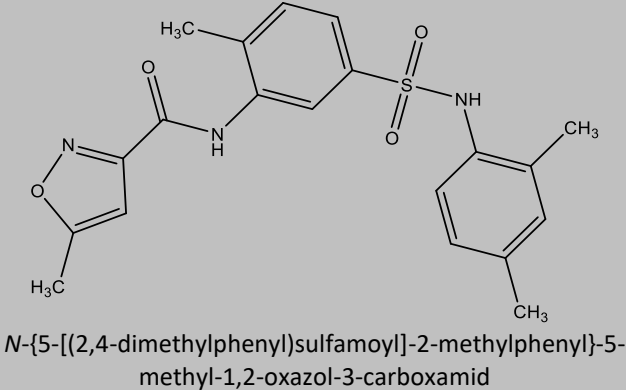
Tabelle 7: Ergebnisse der Bestimmung der Hemmung von Analoga der gefundenen Inhibitoren

Substanz	Struktur	IC_{50} -Wert $\pm$ SE [μ M]
LS 5351135 (2)		2.6 ± 0.7
LS 5333093 (3)		2.6 ± 0.7

Diese Substanzklasse gilt als vielversprechend, da Sulfonamide bereits in der Medizin Anwendung finden (World Health Organization, 2010; White, 2004). Durch eine antimikrobielle Wirkung werden Sulfonamide als Antibiotika eingesetzt. Zum Beispiel Sulfamethoxazol, ein Wirkstoff gegen Harnwegsinfekten und Lungenentzündungen, oder Sulfamerazin, ein Wirkstoff, der Anwendung bei Infektionen der Harnwege und bei

Toxoplasmose findet (Lüllmann et al., 2006). Weiterführend wurden 95 Substanzen mit einer Sulfonamidgruppe aus bereits bestehenden Substanzbibliotheken ausgewählt und auf eine Inhibierung von *Pv*lspD getestet. Es wurden drei Substanzen mit einem IC_{50} -Wert unter 100 μ M gefunden. Diese drei Substanzen sind in der folgenden Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Strukturen der gefundenen Substanzen mit einem IC_{50} -Wert unter 100 μ M

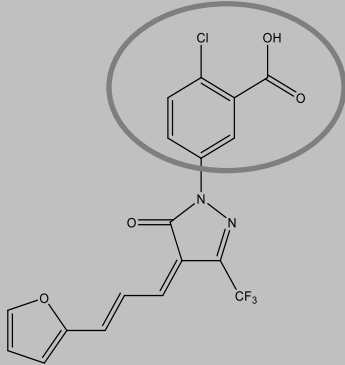
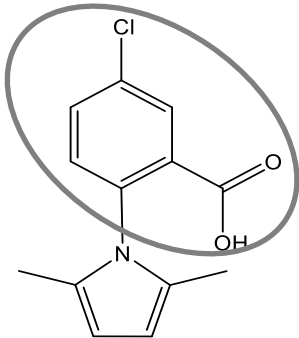
Substanz	Struktur	IC_{50} -Wert $\pm$ SE [μ M]
5328406	 <i>N</i>-{3-[(furan-2-ylmethyl)sulfamoyl]phenyl}-5,6-dihydro-4<i>H</i>-cyclopenta[<i>b</i>]thiophen-2-carboxamid	26 ± 5
5335711	 2-(cyclohexylamino)-<i>N</i>-[3-(dimethylsulfamoyl)phenyl]acetamid	90 ± 12
5320867	 <i>N</i>-{5-[(2,4-dimethylphenyl)sulfamoyl]-2-methylphenyl}-5-methyl-1,2-oxazol-3-carboxamid	94 ± 12

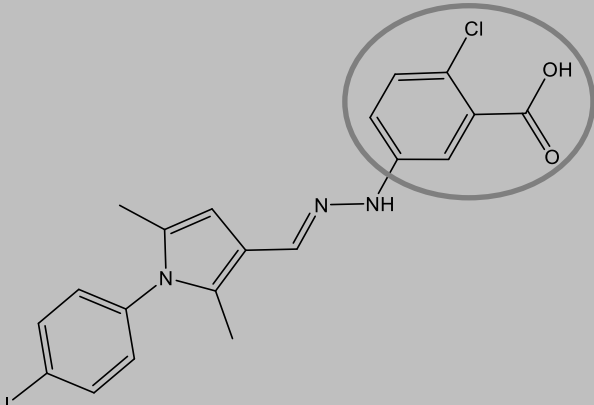
Die gefundenen IC₅₀-Werte lagen entgegen den Erwartungen höher als die Hits aus dem HTS. Gründe dafür könnten nur mit Hilfe der aktuell noch unbekannten Enzymstruktur von PvlspD diskutiert werden.

Aminochlorbenzoesäure-Derivate

Drei Substanzen der Aminochlorbenzoesäure-Derivate zeigten im HTS eine gute Hemmung des Enzyms PvlspD. In der Literatur wird eine Wirkung der 5-Amino-2-chlorbenzoesäure-Derivate gegen HIV (*human immunodeficiency virus*) beschrieben (Liu et al., 2008). Zusätzlich gibt es ein Patent der 5-Amino-2-chlorbenzoesäure-Derivate gegen Atemwegserkrankungen (Akada and Matsuura, 2005). Aus anderen BASF-Substanzbibliotheken wurden Analoga zu den Substanzen ausgewählt und auf eine Hemmung auf PvlspD getestet. In der Tabelle 9 sind die Substanzen mit dem Strukturmotiv Aminochlorbenzoesäure (grau eingerahmt) aufgelistet, die eine Wirkung im HTS gezeigt haben.

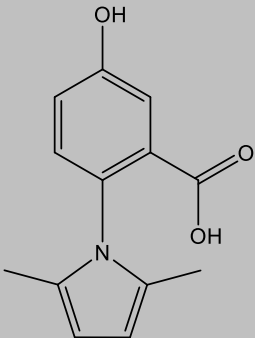
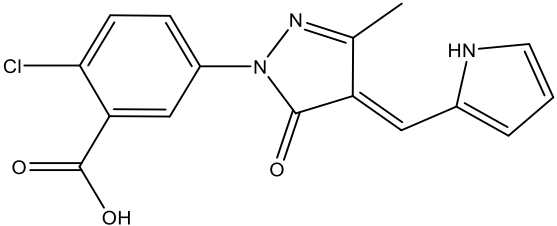
Tabelle 9: Substanzen mit gutem IC₅₀-Wert und einer Aminochlorbenzoesäuregruppe

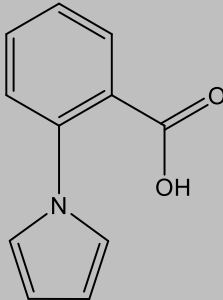
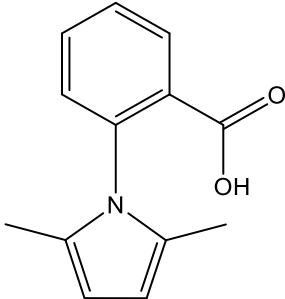
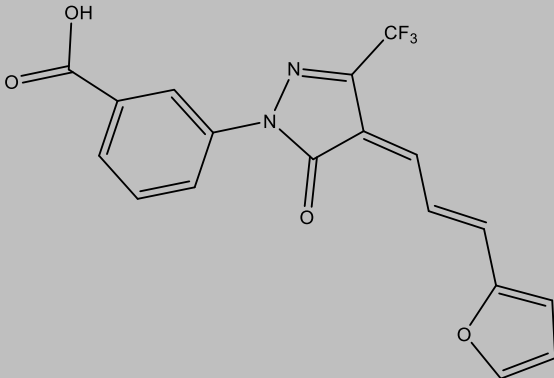
Substanz	Struktur	IC ₅₀ -Wert ± SE [μM]
LS 5299218 (5)		5.4 ± 0.8
LS 5298096 (8)		7.1 ± 1.2

Substanz	Struktur	IC ₅₀ -Wert ± SE [μM]
LS 533957 (13)		9.1 ± 5.3

Es wurden fünf Analoga zu den anfangs gefundenen und bereits beschriebenen Substanzen mit einem IC₅₀-Wert unter 100 μM gefunden. In der folgenden Tabelle 10 sind diese fünf Substanzen mit IC₅₀-Wert aufgelistet.

Tabelle 10: Strukturen der gefundenen Analoga mit einem IC₅₀-Wert unter 100 μM

Substanz	Struktur	IC ₅₀ -Wert ± SE [μM]
5133793		18 ± 2
5173389		29 ± 3

Substanz	Struktur	IC ₅₀ -Wert ± SE [μM]
458590	 2-(1<i>H</i>-pyrrol-1-yl)-Benzoessäure	58 ± 9
5214266	 2-(2,5-dimethyl-1<i>H</i>-pyrrol-1-yl)-Benzoessäure	65 ± 6
5194857	 3-[(4<i>Z</i>)-4-[(2<i>E</i>)-3-(furan-2-yl)prop-2-en-1-yliden]-5-oxo-3-(trifluoromethyl)-4,5-dihydro-1<i>H</i>-pyrazol-1-yl]-Benzoessäure	83 ± 16

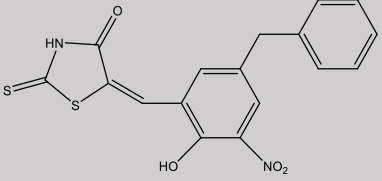
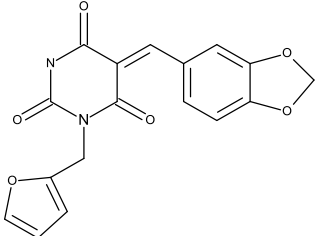
Auch hier sind die gefundenen IC₅₀-Werte der Analoga höher als die gefundenen Werte von den Ausgangssubstanzen aus dem HTS. Wie schon im Kapitel 4.8. Sulfonamide kann auf Grund der fehlenden Enzymstruktur keine Erklärung dafür angeführt werden. Denkbar

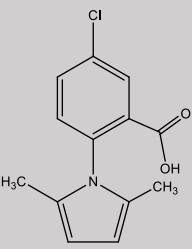
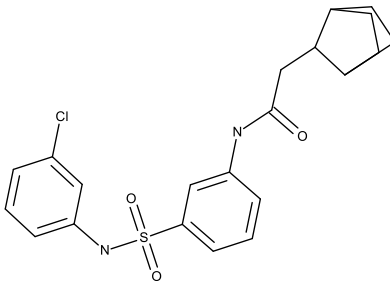
wären, da sich die Substanzen zum Teil erheblich in der Struktur unterscheiden, verschiedene sterische Ansprüche der Inhibitoren.

4.9. Verifizierung der besten Inhibitoren auf eine Hemmung von AtIspD

Da die Kristallstruktur von PvIspD zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit unbekannt war, wurde AtIspD (pdb: 4NAI) als Alternative mit bekannter Struktur, zur Überprüfung einer Inhibition ausgewählt (siehe Kapitel 2.5.). *Arabidopsis thaliana* ist eine in der Landwirtschaft unerwünschte Pflanze und ein mögliches Enzym für weitere inhibitorische Untersuchungen. Durch die Kristallstruktur lassen sich bei einer gefundenen inhibitorischen Wirkung, Rückschlüsse auf die Wirkmechanismen der Inhibitoren bilden. Dazu wurde der fotometrische Assay zuerst auf die Konzentration von AtIspD optimiert, um eine NADH-Abnahme von 0.3 OD in 30 min zu gewährleisten. Es wurden 23 Substanzen auf eine Hemmung gegen AtIspD getestet. Bei der durchgeführten 2 Punktmessung inhibierten AtIspD 15 Substanzen. Von diesen 15 Substanzen wurde der IC₅₀-Wert ermittelt und es wurden 4 Substanzen mit einem IC₅₀-Wert unter 100 µM gefunden. Diese 4 Inhibitoren sind in der folgenden Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11: Gefundene Substanzen mit einer Hemmung auf AtIspD mit einem IC₅₀-Wert unter 100 µM

Substanz	Struktur	IC ₅₀ -Wert ± SE [µM]
LS 5299219 (11)		20 ± 4
LS 5286989 (1)		53 ± 12

Substanz	Struktur	IC ₅₀ -Wert ± SE [μM]
LS 5298096 (8)		67 ± 8
LS 5333093 (3)		68 ± 15

Die gefundenen IC₅₀-Werte sind verglichen mit der inhibitorischen Wirkung der jeweiligen Substanz, gegen Malaria bzw. *Pv*lspD aus dem HTS, mittelmäßig. Dennoch lässt sich darauf aufbauen, da die Struktur von *At*lspD im Gegensatz zu *Pv*lspD bekannt ist (Kunfermann et al., 2014; Witschel et al., 2011). Exzellente Inhibitoren liegen im einstelligen nanomolaren Bereich des IC₅₀-Wertes oder sogar noch tiefer (Stryer et al., 2007; Witschel et al., 2013). Es ist bei bekannter Enzymstruktur möglich, durch Modelling und Strukturveränderung, den IC₅₀-Wert weiter zu verbessern (Arbeiten dazu erfolgen in Kooperation mit Herrn Prof. F. Diederich, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (ETH)).

Dies ist bis heute für *Pv*lspD auf Grund der unbekannten Proteinstruktur, nicht möglich. Mit einer veröffentlichten Proteinstruktur von *Pv*lspD ließen sich viele Aussagen treffen, wie zum Beispiel eine genaue mögliche Bindung des Inhibitors mit dem Enzym erfolgt, also welche Aminosäuren an der Bindung beteiligt sind. Darauf aufbauend wäre eine bessere Strukturvorhersage der Inhibitoren möglich, bzw. könnten die gefundenen Leitstrukturen strukturbasiert verbessert werden.

4.10. Modelling von Inhibitoren mit der Struktur von AtIspD

Da die Struktur von AtIspD bereits veröffentlicht wurde (Richard et al., 2001; Gabrielsen et al., 2006), können Docking-Versuche von gefundenen Inhibitoren mit der AtIspD-Struktur (pdb:4NAI) (Witschel et al., 2011) durchgeführt werden. Dazu wurde ein Docking-Programm des Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) verwendet (Grosdidier et al., 2011a; Grosdidier et al., 2011b). Als Vergleich für die Bindungsstelle des Inhibitors wurde ein bereits veröffentlichter Inhibitor (5-chloro-7-hydroxy-6-(phenylmethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-carbonitril), der mit AtIspD kristallisiert wurde (Witschel et al., 2011), herangezogen. Dieser Inhibitor besaß einen IC_{50} -Wert von 35 ± 7 nM. In der Abbildung 53 ist zu sehen, wo sich der Inhibitor in der AtIspD-Struktur befindet.

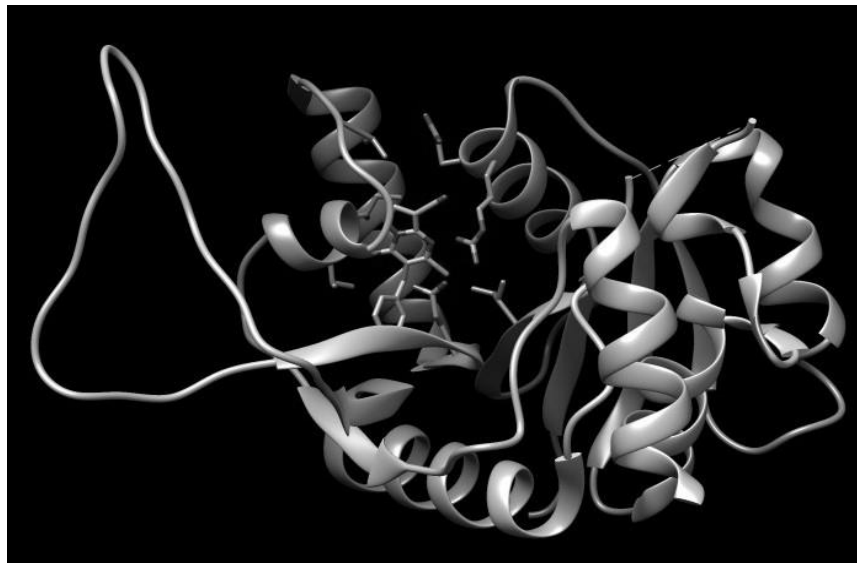


Abbildung 53: AtIspD kristallisiert mit der Substanz 5-chloro-7-hydroxy-6-(phenylmethyl)pyrazolo [1,5-a]pyrimidin-3-carbonitril (Witschel et al., 2011)

Die Dockingversuche waren für drei Substanzen erfolgreich. Als Erstes wurde die Substanz LS 55351135 (Substanz 2) in die Struktur von *AtlspD* gedockt. Das Ergebnis für die Substanz LS 55351135 ist in Abbildung 54 dargestellt.

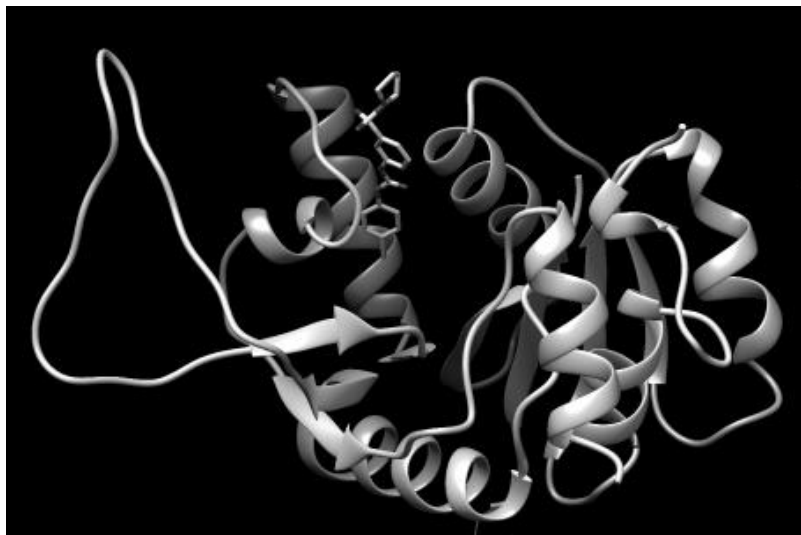


Abbildung 54: Ergebnis des Dockingversuches mit der Struktur von *AtlspD* und der Substanz 2 (LS 55351135)

Der Inhibitor liegt im Vergleich zur Substanz aus Abbildung 53 etwas freier in der Enzymstruktur und dies deutet auf eine geringere Wechselwirkung mit dem Enzym hin. Der Bindungsort ist dagegen ähnlich. Auch der Inhibitor LS 5333093 (Substanz 3) zeigte ein interessantes Ergebnis beim Docking-Versuch. Das Ergebnis dazu ist in Abbildung 55 gezeigt.

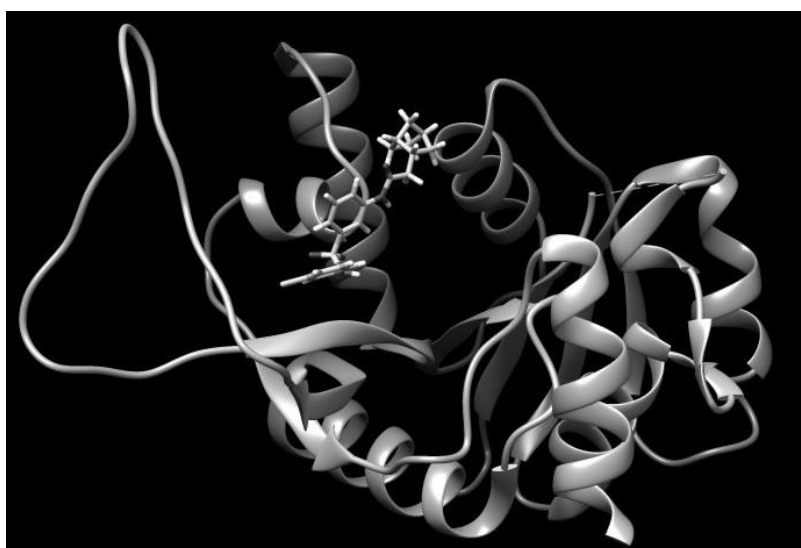


Abbildung 55: Ergebnis des Dockingversuches mit der Struktur von *AtlspD* und der Substanz 3 (LS 5333093)

Es ist zu erkennen, dass die Bindungsstelle des Inhibitors 3 (Witschel et al., 2011) ungefähr die Gleiche ist, wie beim Dockingversuch mit der Substanz 2 (LS 5351135). Die Bindungsstelle der Substanz 2 (LS 5351135) liegt in Abbildung 55 nicht 100 % genau wie in Abbildung 54. Für die anderen Inhibitoren mit einem IC_{50} -Wert unter 10 μ M konnten keine erfolgreichen Docking-Versuche durchgeführt werden. Gabrielsen veröffentlichte 2006 die Kristallisationsstruktur von AtIspD mit dem gebundenen Substrat CTP (Gabrielsen et al., 2006). In der Abbildung 56 ist diese Struktur von AtIspD mit dem Substrat CTP schematisch dargestellt.

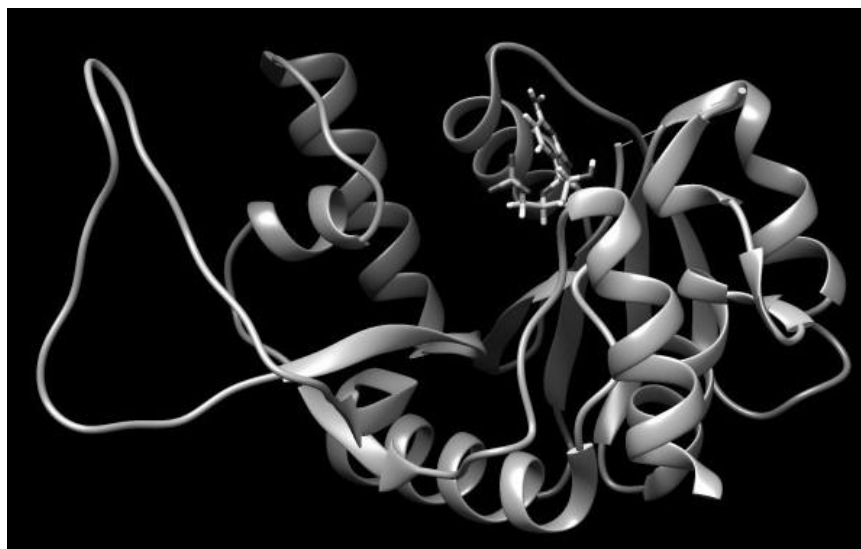


Abbildung 56: Ergebnis des Dockingversuches mit der Struktur von AtIspD und des Substrates CTP (Gabrielsen et al., 2006)

Die Bindungsstelle des Substrates befindet sich an einer anderen Stelle als der Inhibitor 5-chloro-7-hydroxy-6-(phenylmethyl) pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-carbonitril, wonach davon ausgegangen werden kann, dass es mehrere Bindungsstellen gibt (Witschel et al., 2011). Auch das Substrat MEP liegt nach dem Docking-Versuch in der gleichen Bindungsstelle wie CTP mit AtIspD.

In Abbildung 57 ist die Struktur aus dem Docking-Versuch dargestellt.

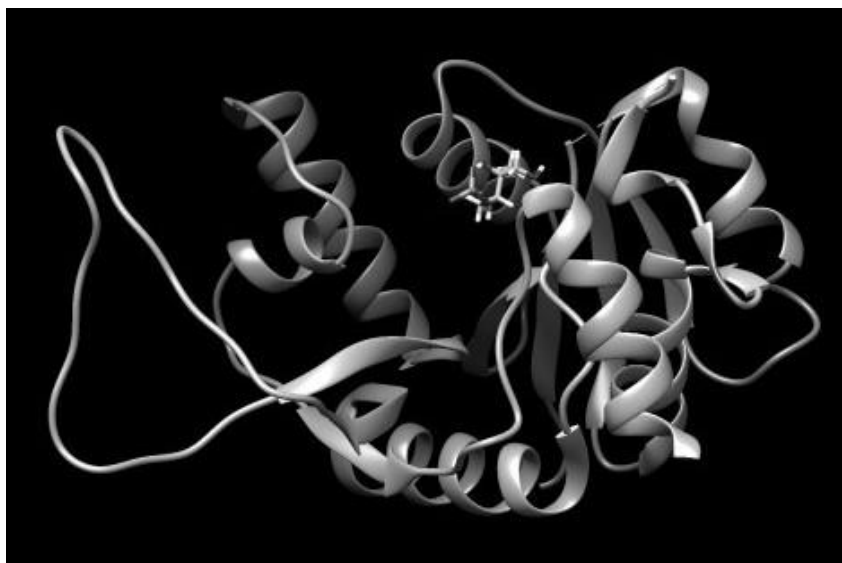


Abbildung 57: Ergebnis des Dockingversuches mit der Struktur von AtIspD und des Substrates MEP

Dass beide Substrate an der gleichen Stelle binden, liegt möglicherweise an den ähnlichen Strukturen beider Verbindungen. Beide haben eine Phosphatgruppe, die eine starke funktionelle Gruppe darstellt und im gleichen Abstand von zwei C-Atomen besitzen CTP und MEP zwei Hydroxy-Gruppen. Da CTP mit MEP und IspD zu CDP-ME reagiert, ist es folgerichtig, dass beide Substrate in der Nähe oder sogar an der gleichen Stelle binden, da eine Reaktion untereinander erfolgen muss. Der Inhibitor LS 4062690 (Substanz 14) bindet im Docking-Versuch bei der Bindungsstelle des Substrates. In Abbildung 58 ist die Struktur aus dem Docking-Versuch dargestellt.

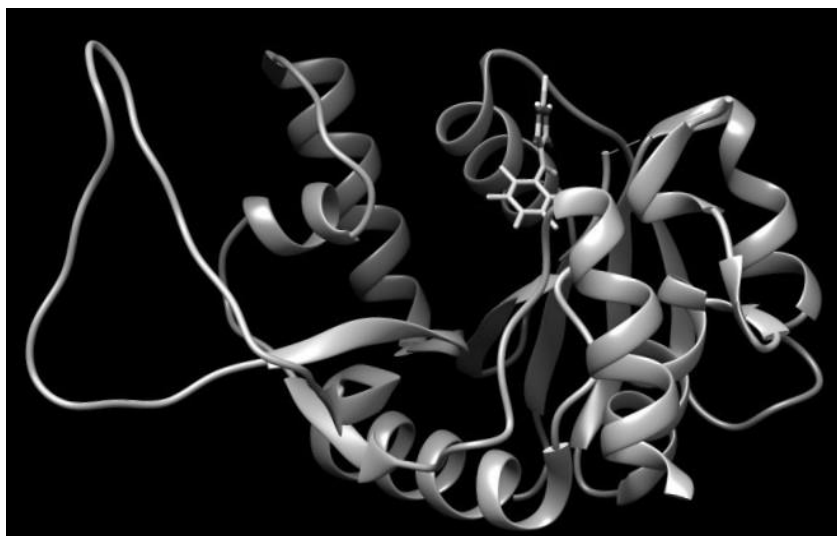


Abbildung 58: Ergebnis des Dockingversuches mit der Struktur von AtIspD und des Inhibitors LS 406290

Der Inhibitor bindet mit dem polaren Ende dort, wo auch das Substrat CTP mit dem Phosphatende bindet. Die Konkurrenz von Inhibitor und Substrat ist häufig zu beobachten und deutet gewöhnlich auf eine kompetitive Hemmung hin. Dieser Inhibitor hat aber bei der Bestimmung des Hemmmechanismus eine unkompetitive Hemmung gezeigt. Diese Ergebnisse sind dennoch vereinbar da der Inhibitor mit dem Enzym-Substrat-Komplex eine Bindung eingeht (Stryer et al., 2007). Dabei befindet sich der Inhibitor in der Nähe der Substratbindestelle, was eine mögliche Erklärung für das Docking Ergebnis ist.

5. Experimenteller Teil

5.1. Materialien

5.1.1. Chemikalien, Puffer und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien wurden in molekularbiologischer Qualität oder in der höchsten verfügbaren Reinheit eingesetzt. Im Anhang 6.1. ist eine ausführliche Auflistung der Chemikalien mit den jeweiligen Spezifikationen zu dieser Arbeit zu finden. Eine Auflistung der verwendeten Puffer sowie ihrer Zusammensetzung befindet sich ebenfalls im Anhang (siehe Kapitel 6.2.) sowie eine Liste der verwendeten Reagenzien und Materialien (siehe Kapitel 6.3.).

5.1.2. Geräte

Eine Auflistung der verwendeten Geräte, inklusive Spezifikationen und Hersteller befindet sich im Anhang (siehe Kapitel 6.4.).

5.1.3. Expressionsvektoren

In dieser Arbeit wurden die Expressionsvektoren pET-22b(+) (Novagen, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), pQE-30 und pNCO-113 (Stüber et al., 1990) verwendet. Die Vektorkarte des pET-22b(+)-Vektor befindet sich im Anhang (siehe Anhang 6.8.1., Abbildung 67). Es handelt sich bei diesem Vektor um ein T7-Promotor und lac-Operator. Die Vektorkarte des pQE-30-Vektor befindet sich im Anhang (siehe Anhang 6.8.2., Abbildung 68). Für den pNCO-113-Vektor ist im Anhang 6.8.3. die Sequenz angegeben und es handelt sich um ein T5-Promotor sowie zwei lac-Operatoren Expressionssystem. Alle Vektoren besitzen außerdem ein β -Lactamasegen, welches eine Ampicillinresistenz vermittelt.

5.1.4. Primer

Eine Auflistung der verwendeten PCR-Primer sowie ihrer Sequenzen befindet sich im Anhang (siehe Kapitel 6.5.) dieser Arbeit.

5.1.5. Bakterienstämme

Für die Vervielfältigung von Plasmiden und für die durchgeführten Klonierungen wurden Bakterien des Stammes *E. coli* XL1-Blue verwendet. Zur Expression der in dieser Arbeit untersuchten rekombinanten Proteine wurden verschiedene *E. coli*-Stämme genutzt (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Verwendete Bakterien- und Expressionsstämme

Bakterienstämme	Expressionsstämme	Resistenz	Literatur / Quelle
<i>E. coli</i> M15 [pREP4]	Nal ^S Str ^S Rif ^S Thi ⁻ Lac ⁻ Ara ⁺ Gal ⁺ Mtl ⁻ F ⁻ RecA ⁺ Uvr ⁺ Lon ⁺	Kanamycin	(Zamenhof and Villarejo, 1972)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Tetracyclin	(Bullock et al., 1987)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F ⁻ ompT hsdS (r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ gal λ (DE3)	Ampicilin	(Studier and Moffatt, 1986)
<i>E. coli</i> ArcticExpress (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ ompT hsdS (r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent ^r]	Gentamicin	(Agilent Technologies, Kalifornien, USA)
<i>E. coli</i> ArcticExpress-(DE3)-pET22b(+)-nhac-PvIspD¹	IspD aus <i>P. vivax</i> (N-terminaler Hisactophilin-Tag, TEV-Protease-und Enterokinase Schnittstelle)	Gentamicin, Ampicilin	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET22b(+)-nhac-PvIspD¹	IspD aus <i>P. vivax</i> (N-terminaler Hisactophilin-Tag, TEV-Protease-und Enterokinase Schnittstelle)	Ampicilin	diese Arbeit

Bakterienstämme	Expressionsstämme	Resistenz	Literatur / Quelle
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-pET22b(+)-cHis₆-PvlspD	IspD aus <i>P. vivax</i> (C-terminaler His ₆ -Tag)	Gentamicin, Ampicilin	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-pQE-30-cHis₆-PvlspD	IspD aus <i>P. vivax</i> (C-terminaler His ₆ -Tag)	Ampicilin	diese Arbeit
<i>E. coli</i> BL21(DE3)-pNCO-113-cHis₆-PvlspD	IspD aus <i>P. vivax</i> (C-terminaler His ₆ -Tag)	Ampicilin	diese Arbeit
<i>E. coli</i> M15-[pREP4]-pNCO-113-cH6-EclspE²	IspE aus <i>E. coli</i> (C-terminaler His ₆ -Tag)	Kanamycin Ampicilin	Asseccion: gb AE000219
<i>E. coli</i> M15-[pRep4]-pQE-30-cH6-EclspC²	IspC aus <i>E. coli</i> (C-terminaler His ₆ -Tag)	Kanamycin Ampicilin	Asseccion: P45568
<i>E. coli</i> M15-[pRep4]-pNCO-113 AtlspD²	IspD aus <i>A. thaliana</i>	Kanamycin Ampicilin	Asseccion: NP_565286

¹:das Konstrukt wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Markus Fischer (Hamburg School of Food Science, Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt.

²:der Stamm wurde freundlicherweise von Dr. Boris Illarionov (Hamburg School of Food Science, Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt.

5.1.6. Nährmedien und Selektiv-Agarplatten

Vollmedium nach Luria-Bertani (LB-Medium, engl. *Lysogeny broth media*) (Bertani, 1951)

Zur Anzucht von Bakterienkolonien wurde in dieser Arbeit das Nährmedium nach Luria Bertani verwendet (Bertani, 1951, Sambrook and Russell, 2001). Die Zusammensetzung des Mediums ist im Anhang unter 6.2. in Tabelle 31 angegeben. Das Medium wurde autoklaviert (siehe Kapitel 6.6.1., Tabelle 34) und nach dem Abkühlen gemäß den Antibiotikaresistenzen der entsprechenden Bakterienstämme (siehe Kapitel 5.1.5., Tabelle 12) mit folgenden Mengen Antibiotikum versetzt:

- 170 mg/L Ampicillin
- 20 mg/L Chloramphenicol
- 20 mg/L Kanamycin
- 24 mg/L Gentamicin
- 10 mg/L Tetracyclin

Zur Herstellung der Selektiv-Agarplatten wurde dem LB-Medium Agar zugegeben. Die Zusammensetzung dieses Mediums ist ebenfalls im Anhang (siehe Anhang 6.2.) in Tabelle 30 aufgeführt. Alle Bestandteile des Mediums wurden in bidest. Wasser gelöst und autoklaviert (Autoklavierbedingungen, siehe Anhang 6.6.1.). Nach dem Abkühlen auf ca. 50 °C erfolgte die Zugabe von Antibiotikum zur Selektion des gewählten Bakterienstamms (siehe Tabelle 11) (M. Jansohn and Rothhämmel, 2012). Das warme Medium wurde anschließend unter sterilen Bedingungen in Petrischalen gegossen. Die Lagerung der Agarplatten erfolgte nach dem Aushärten bei 4 °C.

Super Optimal Medium mit Glukosezusatz (SOC-Medium)

Die Zusammensetzung dieses Mediums ist ebenfalls im Anhang (siehe Anhang 6.2.) in Tabelle 30 aufgeführt. Zur Herstellung des SOC-Mediums wurden alle Bestandteile in bidest. Wasser gelöst und autoklaviert (Autoklavierbedingungen, siehe Anhang 6.6.1.). Nachdem die Lösung auf 30 °C abgekühlt wurde, erfolgte die Zugabe von 10 mL einer

sterilen Mg^{2+} -Lösung (siehe Anhang 6.2.). Es erfolgte keine Zugabe von Antibiotikum, sondern ein besonderes Augenmerk lag auf einer sterilen Behandlung des Mediums.

5.1.7. Verwendete Trennmaterialien und Säulen

Eine Auflistung der verwendeten Trennmaterialien und Säulen ist Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Auflistung der Trennmaterialien für die verschiedenen chromatographischen Methoden

Trennmaterial	Trennprinzip
Protino® Ni-NTA-Agarose (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland)	Nickel-Affinitätschromatographie
Q-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Germany)	Anionenaustauschchromatographie
HiPrep 26/10 Desalting (Sephadex™ G-25 Fine) (GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, Greatbritian)	Entsalzungschromatographie

5.2. Methoden

5.2.1. Molekularbiologische Methoden

5.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Plasmidisolierung von Zellen wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Im Anhang ist die Arbeitsanweisung der Kits zu finden (siehe Anhang 6.6.)

5.2.1.2. Darstellung der Insert-DNA mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um die optimale Temperatur des Primer-Annealing-Schritts der PCR zu bestimmen, wurde eine Gradienten-PCR mit Temperaturen zwischen 50 °C und 70 °C während des Annealing-

Schritts durchgeführt. Hierfür wurde ein 144 µL PCR-Ansatz mit dem Gen (siehe Kapitel 4.1.) gleichmäßig auf 10 PCR-Caps aufgeteilt. Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes ist in Tabelle 14 dargestellt, die verwendeten Primer in Tabelle 15 und das Temperaturprogramm in Tabelle 16.

Tabelle 14: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (Gradienten-PCR)

Bestandteil	Volumen [µL]	Konzentration
Puffer (enthält 20 mM MgCl₂)	19.5	2.71 mM
dNTPs (je 2.5 mM)	12	2.08 mM pro dNTP
Forward Primer	1.5	1.04 µM
Reverse Primer	1.5	1.04 µM
Dream-Taq-Polymerase	1.5	0.05 U
Bidest. Wasser	108	-

Die Sequenz der verwendeten Primer ist in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Verwendete Primer

Primer	Sequenz
<i>PvispDNdelfw</i>	5'-ATTATTCATATGTCGCTGCACAAGAAGAACATCCACGCC-3'
<i>PvispDXhol</i> Rev	5'-ACACACCTCGAGCTCGTAGTAAAAGTGGCGGTACAGG-3'
<i>PvispDBamHif</i> w	5'-ATAATAGGATCCCATCATCACCACCATCATGGTTCCGATGATGACGACAA GTCGCTGCACAAGAAGAACATCCACGC-3'
<i>PvispD</i> <i>HindIII</i>rev	5'-ACACACAAGCTTTTACTCGTAGTAAAAGTGGCGGTACAGGACGCGCTGCT TACCGCCTAGGGAGTGG-3'

In Tabelle 16 ist das Temperaturprogramm der Gradienten-PCR dargestellt.

Tabelle 16: Temperaturprogramm der Gradienten-PCR

Reaktionsschritt	Temperatur und Dauer	Zyklen
1. primäre Denaturierung	94 °C, 5 min	1
2. Denaturierung	94 °C, 30 sec	25
3. Annealing	50 bis 70 °C, 30 sec	25
4. Elongation	72 °C, 5 min	25
5. terminale Elongation	72 °C, 5 min	1
6. Kühlphase	4 °C, unbegrenzte Dauer	

Somit wurde mit Hilfe der Gradienten-PCR die optimale Temperatur des Primer-Annealing-Schritts bestimmt und es konnte die Vervielfältigung der Insert-DNA mittels präparativer PCR erfolgen. Hierfür wurde ein 200 µL PCR-Ansatz mit dem Gen (siehe Kapitel 4.1.) gleichmäßig auf 10 PCR-Caps aufgeteilt.

Die Zusammensetzung des PCR-Ansatzes für die präparative PCR ist in Tabelle 17 dargestellt und das verwendete Temperaturprogramm für die jeweilige PCR in Tabelle 18.

Tabelle 17: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (präparative PCR)

Bestandteil	Volumen [µL]	Konzentration
Puffer (enthält 20 mM MgCl ₂)	26	2.71 mM
dNTPs (je 2.5 mM)	16	2.04 mM pro dNTP
Forward Primer	2	1.04 µM
Reverse Primer	2	1.04 µM
Taq-DNA-Polymerase (1 U/µL)	2	0.05 U
Bidest. Wasser	152	-

In Tabelle 18 ist das Temperaturprogramm der beiden präparativen PCRs von Kapitel 4.1. dargestellt.

Tabelle 18: Temperaturprogramm der präparativen PCR

Reaktionsschritt	Temperatur und Dauer	Zyklen
1. primäre Denaturierung	94 °C, 5 min	1
2. Denaturierung	94 °C, 30 sec	25
3. Annealing	65 °C, 30 sec	25
4. Elongation	72 °C, 5 min	25
5. terminale Elongation	72 °C, 5 min	1
6. Kühlphase	4 °C, unbegrenzte Dauer	-

Die Reinigung der erhaltenen PCR-Amplifikate erfolgte über eine präparative Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 5.4.1). Die Isolierung der DNA aus dem Agarosegel erfolgte gemäß Kapitel 5.2.1.1.

5.2.1.3. Verdau mit Restriktionsendonukleasen

Die Insert-DNA sowie der Vektor wurden vor der Ligation mit den gleichen Restriktionsendonukleasen verdaut, damit sie komplementäre Enden aufweisen. Als Expressionsvektor diente das isolierte Plasmid pET-22b(+) aus dem *E. coli*-Stamm XL1 oder das isolierte Plasmid pQE-30 aus dem *E. coli*-Stamm XL1. Dieses Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen *Nde*I und *Xho*I verdaut, sodass ein linearisierter pET-22b(+)-Vektor oder pQE-30-Vektor erhalten wurde. Der Verdau der Insert-DNA wurde ebenfalls mit *Nde*I und *Xho*I durchgeführt.

In Tabelle 19 ist die Zusammensetzung der Ansätze für den Verdau dargestellt. Die Spezifikationen der verwendeten Reagenzien sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.3., Tabelle 31).

Tabelle 19: Zusammensetzung der Verdau-Ansätze

Komponente	Insert-DNA	Expressionsvektor
Puffer	7 µL CutSmart™	7 µL CutSmart™
1. Restriktionsenzym	3 µL <i>NdeI</i> (20000 U/mL)	3 µL <i>NdeI</i> (20000 U/mL)
2. Restriktionsenzym	3 µL <i>XhoI</i> (20000 U/mL)	3 µL <i>XhoI</i> (20000 U/mL)
Templat	40 µL PCR-Amplifikat	50 µL Plasmid aus XL1
Steriles bidest. Wasser	17 µL	7 µL

Der präparative Verdau erfolgte durch Inkubation für 4 h bei 37 °C im Schüttler. Nach dem Verdau wurden die Ansätze auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Im Anschluss erfolgt eine Extraktion der DNA aus dem Gel mit Hilfe des peqGOLD Gel Extraction Kits (siehe Anhang 6.3.).

5.2.1.4. Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde das peqGOLD Gel Extraction Kit der Firma peqlab Biotechnologie (Erlangen, Deutschland) verwendet. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese (siehe Kapitel 5.4.1) aufgetrennt und nach Inkubation mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ausgeschnitten. Die Arbeitsanweisung für das verwendete Kit befindet sich im Anhang (siehe Anhang 6.6.).

5.2.1.5. Ligation

Die Ligation erfolgte in 15 µL Ansätzen. Dazu wurden die Insert-DNA und der Vektor nach dem Verdau in den Verhältnissen 8:7, 4:1 und 1:4 in einem Gesamtvolumen von 15 µL

gemischt. Die Reaktionsansätze wurden anschließend bei 50 °C für 10 min im Wasserbad inkubiert. Es folgte eine Inkubation für 5 min auf Eis. Die gekühlte Lösung wurde mit 4 µL T4-Ligasepuffer und 1 µL T4-Ligase versetzt. Anschließend wurde der Ansatz für 24 h bei 4 °C inkubiert, bevor eine Transformation in chemisch kompetente Zellen erfolgte (siehe Kapitel 5.2.1.6.).

Die Spezifikationen der verwendeten Reagenzien sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.3., Tabelle 31).

5.2.1.6. Transformation in chemisch kompetente Zellen nach HANAHAN (Hanahan, 1983)

Die Transformation des Plasmides in BL21- und XL1-chemisch kompetente Zellen erfolgte mit Hilfe der Hitzeschockmethode.

2 µL des in 100 µL sterilen Wasser gelösten Gens wurden mit 200 µL chemisch kompetenten Zellen versetzt und nach vorsichtigem Vermischen für 1 h auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde anschließend für 90 s in einem Wasserbad auf 42 °C erhitzt und danach sofort wieder auf Eis abgekühlt. Danach erfolgte die Zugabe von 800 µL antibiotikafreiem SOC-Medium und Temperierung bei 37 °C für 1 h im Schüttelinkubator. Anschließend wurden 20 µL bzw. 100 µL und der Rest nach Zentrifugation der Lösung auf LB-Agarplatten, die entsprechendes Antibiotikum enthielten (siehe Kapitel 5.1.5.), ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Erfolg der Transformation wurde mittels PCR-Screening überprüft (siehe Kapitel 5.2.1.7.).

In identischer Weise wurde die Transformation der Ligationsansätze durchgeführt, jedoch wurden hierfür 15 µL des jeweiligen Ansatzes mit 200 µL chemisch kompetenten Zellen vermischt.

Die Spezifikationen der verwendeten Lösungen, Puffer und Reagenzien sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.2., Tabelle 30 und siehe Anhang 6.3., Tabelle 31).

5.2.1.7. PCR-Screen

Das PCR-Screening diente dazu, den Erfolg der Transformation von Plasmiden in chemisch kompetente Zellen (siehe Kapitel 5.2.1.6.) zu überprüfen. Dazu wurden die Transformanten, die auf den LB-Agar-Platten wuchsen, dahingehend überprüft, ob sie die gewünschten Plasmide enthielten. Als Indikator für eine erfolgreiche Transformation diente ein bereits erfolgreiches PCR-Produkt mit bekannter Größe.

Für einen PCR-Screen wurden 15 µL des PCR-Ansatzes mit Zellmaterial einer Kolonie der Transformanten versetzt. Dazu wurden jeweils etwas Zellen mit einem sterilen Zahnstocher aus der Kolonie entnommen und zur Vereinzelung der Kolonie mehrfach in abschnittsweise unterteilte LB-Agarplatten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten (siehe Kapitel 5.1.5.), gestochen, sodass neue Kolonien der Transformanten entstehen können. Anschließend wurde der Zahnstocher in eins der PCR-Ansätze getaucht und suspendiert, um das verbleibende Zellmaterial mit der PCR-Lösung zu vermischen. Zusätzlich wurden Lösungen hergestellt mit 14 µL PCR-Ansatz und 1 µL des jeweiligen Ligationsansatzes. Das PCR-Programm ähnelte dem der präparativen PCR (siehe Kapitel 5.2.1.2., Tabelle 17 und Tabelle 18). Der einzige Unterschied war die Annealingtemperatur, die je nach verwendeten Primern variierte. Die Agarplatte zur Vereinzelung der Transformanten wurde bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert. Die Zusammensetzung des Ansatzes für einen PCR-Screen ist in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (PCR-Screen)

Bestandteil	Volumen [µL]	Konzentration
Puffer (enthält 20 mM MgCl₂)	32.5	2.6 mM
dNTPs (je 2.5 mM)	20	2.0 mM pro dNTP
Forward Primer (100 µM)	2.5	1.0 µM
Reverse Primer (100 µM)	2.5	1.0 µM
Taq-DNA-Polymerase (1 U/µL)	2.5	0.05 U
Bidest. Wasser	190	-

Im Anschluss an die PCR wurden die Ansätze mittels Agarosegelelektrophorese elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Vergleich mit einem ebenfalls aufgetragenen Molekularmarkers konnte die Größe der DNA-Abschnitte bestimmt werden. Eine erfolgreiche Transformation konnte durch Vergleich mit dem PCR-Ansatz überprüft werden, welcher den Ligationsansatz enthält. Zusätzlich wurde eine Sequenzierung der vielversprechendsten Kolonien durchgeführt.

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind im Anhang dargestellt (siehe Anhang 6.5. und Tabelle 33), ebenso wie die Spezifikationen der verwendeten Puffer und Reagenzien (siehe Anhang 6.2., Tabelle 30 und 6.3., Tabelle 31).

Im Anschluss an die PCR wurden die Amplifikate mittels 2 %iger Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (siehe Kapitel 5.4.1) und über den Vergleich mit einem Standardgemisch (DNA-Leiter) die erhaltenen Amplifikate mit den erwarteten Amplifikatlängen verglichen.

5.2.2. Proteinbiochemische Methoden

5.2.2.1. BL21(DE3)- und ArcticExpress(DE3)-Zellen

Zur Überexpression von rekombinanten Proteinen wurden verschiedene *E. coli* Zellen, die BL21(DE3)-Zellen und ArcticExpress(DE3)-Zellen verwendet. Die Expression der Proteine unterliegt der Kontrolle eines T7-Promotorsystems, wobei die T7-RNA-Polymerase unter der Kontrolle eines lac-Promotors steht. Die Induktion durch IPTG ermöglicht die Transkription. Es kommt lediglich zu einer Überexpression des rekombinanten Proteins, da die T7-RNA-Polymerase keine *E. coli* - Promotoren erkennt (Studier and Moffatt, 1986).

Die ArcticExpress(DE3)-Zellen enthalten neben *E. coli*-Chaperonen auch die Chaperone (Cpn10 und Cpn60) aus dem psychophilen Organismus *Oleispira antarctica*. Nachdem *E. coli* ein Temperaturoptimum von etwa 37 °C besitzt, nimmt die Wachstumsrate unterhalb von 20 °C stark ab, da die Enzymaktivität bei tiefen Temperaturen sinkt. *O. antarctica* hat ein Temperaturoptimum bei 4-12 °C, sodass eine korrekte Proteinfaltung durch die in *E. coli* eingebrachten Cpn10 und Cpn60 aus *O. antarctica* ermöglicht werden kann (Agilent Technologies, 2010).

5.2.2.2. Fermentation und Expression

Vorkulturen

Es wurden 30 mL antibiotikahaltiges LB-Medium mittels einer Impföse mit der Dauerkultur des entsprechenden Stamms unter sterilen Bedingungen beimpft. Anschließend wurde die Vorkultur über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator aufbewahrt. Nach der Inkubation wurden 10 mL der Zellsuspension entnommen, um den Rohextrakt herzustellen. 1 mL wird für die Untersuchung des Gesamtproteins verwendet. Für die Herstellung einer eventuellen Dauerkultur wurden ebenfalls 10 mL entnommen.

Rohextrakt

Es wurden 10 mL der Zellsuspension in ein 15-mL-Tube überführt und bei 3000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert, das zurück gebliebene Zellpellet in 600 µL Puffer A resuspendiert und anschließend in ein 1.5-mL-Cap überführt. Mittels Ultraschall erfolgte der Aufschluss der Zellen (siehe Abschnitt 5.2.2.3). Es folgte eine Zentrifugation der Zellsuspension bei Raumtemperatur (13000 rpm, 10 min). 30 µL des Überstands wurden in ein 1.5-mL-Cap überführt und mit 60 µL SDS-Probenpuffer versetzt. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE-Gel erfolgt ein Erhitzen auf 95 °C für 8 min. Mit Hilfe des Rohextrakts können Proteine untersucht werden, die im Cytosol löslich sind.

Dauerkultur

Zur Herstellung einer Dauerkultur wurden 4 mL einer Zellsuspension bei 3000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das zurückbleibende Zellpellet in 1 mL LB-Glycerin-Medium resuspendiert und anschließend in ein Cryo-Cap überführt. Die Lagerung der Dauerkultur erfolgte bei - 80 °C oder unter flüssigem Stickstoff bei - 196 °C.

Die Spezifikationen der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.2., Tabelle 30).

Gesamtprotein

Es wurde 1 mL der Zellsuspension in ein 2 mL Cap überführt und bei Raumtemperatur und 13000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und das zurückbleibende Zellpellet mit 100 µL SDS-Probenpuffer versetzt. Vor dem Auftragen auf ein SDS-PAGE-Gel erfolgte ein Erhitzen auf 95 °C für 8 min.

Testexpression

Die Testexpression dient zur Bestimmung der optimalen Anzuchtsergebnisse eines gewünschten Proteins. Dabei werden die optimalen Bedingungen gesucht, um eine möglichst große Zellmasse zu gewinnen und auch zu berücksichtigen ist die gewonnene Proteinmenge. Dazu wurden für die Testexpression 100 mL antibiotikahaltiges Medium mit 1 mL einer entsprechenden Vorkultur überimpft und im Schüttler bei 37 °C inkubiert. Nach 3 h wurde 1 mL Zellsuspension entnommen und die optische Dichte (OD_{600}) bei einer Wellenlänge von 600 nm ermittelt. Als Blindwert der fotometrischen Bestimmung diente nichtbeimpftes Nährmedium. Dieser Vorgang wurde stündlich wiederholt, bis die optische Dichte der Zellsuspension größer als 0.6 war, aber nicht größer als 0.8. Anschließend wurde die rekombinante Proteinexpression mit verschiedenen Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) Konzentrationen induziert. Nach der Induktion wurden die Hauptkulturen inkubiert und nach verschiedenen Zeiten jeweils 10 mL der Zellsuspension für den Rohextrakt und 1 mL für das Gesamtprotein entnommen.

Hauptkultur bei einer Anzucht

Die Hauptkultur wurde im Volumenverhältnis 1:100 mit der Vorkultur beimpft. Es wurden 800 mL frisches antibiotikahaltiges LB-Medium mit 8 mL der entsprechenden Vorkultur überimpft und analog zur Testexpression behandelt. Eine Ausnahme bildete der Stamm *E. coli* ArcticExpress(DE3), bei dem gemäß der Herstellerangabe (Agilent Technologies, Kalifornien, USA) auf eine Antibiotikazugabe in der Hauptkultur verzichtet wurde.

Die verschiedenen Zellkulturen wurden gemäß Parametern in Tabelle 21 temperiert.

Tabelle 21: Inkubationstemperatur und –Dauer der verschiedenen Expressionsstämme

Stamm	Inkubationstemperatur nach Induktion [°C]	Inkubationsdauer nach Induktion [h]
<i>E. coli</i> ArcticExpress(DE3)	10	24 / 48
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	30	24
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	30	48

Zellernte

Die Zellsuspension wurde bei 3500 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde mit ca. 10 mL Saline (0.9 % NaCl) gewaschen und erneut zentrifugiert (3500 rpm, 4 °C, 60 min). Der Überstand wurde erneut verworfen und das Zellpellet entweder bei – 20 °C gelagert oder direkt für eine Proteinreinigung für den Zellaufschluss verwendet.

5.2.2.3. Zellaufschluss

Zellaufschluss mittels French-Press

Beim Zellaufschluss mittels French-Press wurde das Zellpellet aufgetaut und in Puffer A resuspendiert. Die French-Press wurde vor der Verwendung ebenfalls mit dem Puffer A gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension in das Vorlagegefäß der French-Press gegeben und bei einem Druck von 2 kbar aufgeschlossen. Der Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt, um eine vollständige aufgeschlossene Zelloösung zu gewährleisten. Die aufgeschlossene Zelloösung wurde in einem, mit Eis gekühltem, Zentrifugentube aufgefangen und danach bei 13000 rpm und 4 °C für 60 min zentrifugiert. Der klare Überstand oder auch Rohextrakt wurde zur weiteren Analyse mittels SDS-PAGE sowie zur Aufreinigung mittels Nickelaffinitätschromatographie verwendet.

Zellaufschluss mittels Ultraschall

Beim Zellaufschluss mittels Ultraschall wurde das Zellpellet (siehe Kapitel 5.2.2.3.) aufgetaut und in Puffer A (siehe Anhang 6.2.) resuspendiert. Anschließend wurde die Zelllösung mittels Ultraschall aufgeschlossen. Hierzu wurden für die Testexpression dreimal 8 Pulse bei einer Intensitätseinstellung von 25 % angewendet. Nach jeweils 8 Pulsen wurde die Zellsuspension für 1 min auf Eis gekühlt, sodass ein zu starkes Erwärmen der Suspension verhindert wurde. Anschließend wurde die Suspension bei 13000 rpm und Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert und der Überstand zur Analyse mittels SDS-PAGE verwendet.

Für den Zellaufschluss der großen Anzucht wurde das resuspendierte Zellpellet für 18 sec mit 5 Pulsen/sec bei einer Intensitätseinstellung (ca. 75 %) aufgeschlossen. Anschließend wurde die Zellsuspension für 1 min auf Eis gekühlt und der Aufschluss fünfmal wiederholt. Danach wurde die Suspension bei 15000 rpm und 4 °C für 60 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde zur chromatographischen Reinigung eingesetzt (siehe Kapitel 5.2.2.5.).

Die Spezifikationen der verwendeten Puffer und Lösungen sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.2, Tabelle 30).

5.2.2.4. Herstellung chemisch kompetenter Zellen nach HANAHAN (Hanahan, 1983)**Vorkultur**

50 mL LB-Medium, welches die entsprechenden Antibiotika enthielt (siehe Kapitel 5.1.5, Tabelle 12), wurden mit 30 µL einer Dauerkultur des entsprechenden Stammes beimpft und für 12 Stunden bei 28 °C und 125 rpm inkubiert.

Hauptkultur

800 mL antibiotikahaltiges LB-Medium wurden mit 5 mL Vorkultur beimpft und mit 1.5 mL einer sterilen 2 M Magnesium-Lösung versetzt. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C im Schüttelinkubator bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0.4 inkubiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte fotometrisch bei 600 nm gegen unbeimpftes Medium als Blindwert.

Nach Erreichen der optischen Dichte von 0.4 wurde das Wachstum der Bakterien gestoppt, indem der Kolben mit der Zellsuspension 15 min auf Eis gelagert wurde. Im Anschluss wurde die Zellsuspension in vorher autoklavierte Zentrifugenbecher überführt und bei 1.000 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 350 mL eiskaltem, sterilen RF1-Puffer resuspendiert, erneut 15 min auf Eis inkubiert und zentrifugiert (siehe oben). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 15 mL eiskaltem, sterilem RF2-Puffer resuspendiert und erneut 15 min auf Eis inkubiert.

Die Zellsuspension wurde in 200 µL Aliquoten in Cryo-Gefäßen bei -80 °C gelagert.

Die Spezifikationen der verwendeten Puffer, Lösungen und Medien sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.2, Tabelle 30).

5.2.2.5. Nickelaффinitätschromatographie

Die Aufreinigung rekombinanter Proteine, die einen Affinitätstag aufweisen, erfolgt mittels Nickelaффinitätschromatographie.

Zum Befüllen des Säulengehäuses wurden etwa 15 mL des Säulenmaterials luftblasenfrei eingefüllt und mit einem Stempel fixiert. Um das Säulenmaterial zu aktivieren und dementsprechend mit Nickel(II)-Ionen zu beladen, wurde die Säule bei einer Flussrate von 1 mL/min mit einer gesättigten Nickel(II)-sulfatlösung gespült und danach mit einem Puffer A aktiviert.

Die Säule wurde bei einer Flussrate von 0.5 mL/min bei einer Konzentration von 100 % Puffer A an die FPLC-Anlage (ÄKTAprime plus, GE Healthcare) angeschlossen. Anschließend wurde die Säule bei einer Flussrate von 2 mL/min bis zu einem konstanten UV-Signal equilibriert.

Alle Arbeiten mit aufgeschlossenem Zellmaterial und geschützten Proteinen erfolgten in einem gekühlten Bereich, in dem Fall in einem Kühlkabinett (Unichrome 1500, UniEquip GmbH, Martinsried, Deutschland) bei 6 °C.

Der aufgeschlossene Rohextrakt wurde in eine Probenschleife gegeben (Super-Loop, 50 mL) und anschließend auf die Säule injiziert. Nach der Injektion wurde die Säule mit einer Konzentration von 100 % Puffer A gewaschen, bis das UV-Signal konstant war.

Anschließend wurde die Konzentration von Puffer B im Laufmittel stufenweise erhöht und das Eluat in Fraktionen von 5 – 10 mL aufgefangen. Abschließend wurde die Säule bei einer Konzentration von 100 % Puffer B gewaschen und erneut mit 100 % Puffer A gespült, anschließend bei einer Flussrate von 0.5 mL/min entfernt und aufbewahrt. Die Detektion des Signals erfolgte mittels eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 280 nm.

5.2.2.6. Dialyse

Eine Dialyse dient dem Konzentrationsausgleich der Lösungen und somit einer Entfernung des Imidazols in der Proteinlösung nach der Aufreinigung mittels Nickelaffinitätschromatographie. Durch das Einfüllen der Proteinlösung in einen Dialyseschlauch kann der imidazolhaltige Puffer durch einen Puffer, der kein Imidazol enthält, ausgetauscht werden. Hierbei wurde die Proteinlösung bei 6 °C über Nacht gegen einen imidazolfreien Puffer (siehe Anhang 6.2, Tabelle 30) dialysiert. Das Volumen des Dialysepuffers wurde je nach Bedarf gewählt.

5.2.2.7. Entsalzung mittels Entsalzungschromatographie

Die Entsalzungschromatographie dient wie die Dialyse (siehe Abschnitt 5.2.2.6.) zur Entfernung des Imidazols aus der Proteinlösung nach der Nickelaffinitätschromatographie.

Die Entsalzungssäule (siehe Anhang 6.3.) wurde bei einer Flussrate von 0.5 mL/min und einer Konzentration von 100 % Puffer C an die FPLC-Anlage (ÄKTaprime plus, GE Healthcare, siehe Abschnitt 5.1.7.) angeschlossen. Anschließend wurde die Säule bei einer Flussrate von 8 mL/min mit 100 % Puffer C (siehe Anhang 6.2., Tabelle 30) bis zu einem konstanten UV-Signal equilibriert.

Die Fraktionen (maximal 10 mL) der Nickelaffinitätschromatographie wurden in die Probenschleife gegeben (Super-Loop, 50 mL) und anschließend auf die Säule injiziert. Sobald ein Anstieg des UV-Signals zu erkennen war, wurde die Lösung in einem 15 mL Tube aufgefangen, bis das UV-Signal wieder abnahm. Nach dem Signal der entsalzten Proteinlösung war ein weiterer Anstieg des UV-Signals erkennbar. Dieses Signal wurde durch das abgetrennte Imidazol bzw. Salz hervorgerufen und das Eluat wurde in dem

Bereich nicht aufgefangen. Anschließend wurde die Säule so lange gespült, bis ein konstantes UV-Signal erreicht wurde. Danach konnten weitere Probenaufgaben erfolgen.

Zum Schluss wurde die Säule mit 100 % Puffer C gespült, bis das UV-Signal konstant war und anschließend bei einer Flussrate von 0.5 mL/min entfernt. Die Detektion des Signals erfolgte mittels eines UV-Detektors bei einer Wellenlänge von 280 nm.

5.2.2.8. Aufkonzentration

Nach dem Dialysieren oder Entsalzen mittels Entsalzungschromatographie konnte die Proteinlösung auf unterschiedliche Weise aufkonzentriert werden. Mit Hilfe des Amico Ultra Centrifugal Filter Devices werden Proteine durch eine Membran mit einem NMWL (*nominal molecular weight limit*) von 10 oder 30 kDa zurückgehalten, während das Lösungsmittel und Stoffe mit geringerem Molekulargewicht durch die Membran hindurchtreten können. Nach Befüllen des Filtertubes wurde die Proteinlösung bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert, bis die Proteinlösung auf 2 bis 3 mL aufkonzentriert war. Die aufkonzentrierte Proteinlösung wurde entnommen und der Durchfluss verworfen.

Mit Hilfe einer Amicon® Stirred Cell (Volumen: 50 mL; NMWL = 10 kDa/30 kDa) wurde die Proteinlösung aufkonzentriert. Hierbei wurde nach dem Befüllen der Zelle unter langsamen Rühren und externer Kühlung Druck auf die Membran aufgebaut, indem Stickstoff in die Zelle eingeleitet wurde. Durch die Kühlung und die Stickstoffatmosphäre wurden Oxidationsreaktionen bedingt durch Kontakt mit der Luft unterbunden. In der Lösung enthaltenes Protein kann aufgrund seines Molekulargewichts die Membran nicht passieren und wird zurückgehalten, das Lösungsmittel hingegen durchquert die Membran. Der Durchfluss wurde verworfen und die aufkonzentrierte Proteinlösung entnommen.

Die Spezifikationen der verwendeten Puffer bzw. Reagenzien und Materialien sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.2., Tabelle 30 bzw. siehe Anhang 6.3., Tabelle 31).

5.3. DNA-Sequenzierung

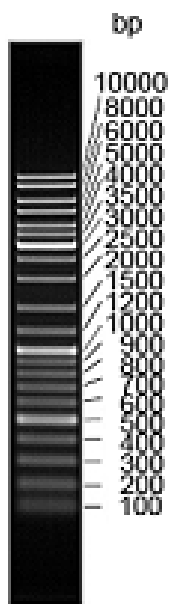
Die DNA-Sequenzierung der klonierten Plasmide erfolgte nach der Methode nach Sanger (Sanger and Nicklen, 1977) und wurde in Dienstleistung von der Firma GATC-Biotech (Konstanz, Deutschland) durchgeführt.

5.4. Gelelektrophoresen

5.4.1. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe wurde in dieser Arbeit die Agarose-Gelelektrophorese angewendet. Zur Auftrennung von Plasmid-DNA wurden 0.8 %ige und zur Auftrennung von PCR-Amplifikaten 2 %ige Agarosegele verwendet. Die Agarose wurde entsprechend der gewünschten Konzentration in 50 mL TAE-Puffer eingewogen und zum Sieden erhitzt. Die Agarosegele wurden in horizontalen Gelgießständen auspolymerisiert. Zur Formung von Probenaschen wurden verschiedene Kämme verwendet. Für qualitative Gele wurden Kämme verwendet, die Taschen mit einem Volumen von 10 µL formten und für präparative Gele wurden Kämme für 50 – 100 µL große Taschen verwendet.

Die Entwicklung der Gele erfolgte in ebenfalls horizontalen Laufkammern bei 120 V (0.8 %ige Gele) bis 150 V (2 %ige Gele) für ca. 25 min. Als Laufpuffer diente der erwähnte TAE-Puffer. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 10:1 mit Probenpuffer (Loading Dye) versetzt. Für qualitative Gele wurden 10 µL und für präparative Gele 50 – 100 µL Probe aufgegeben.



Die Detektion der DNA-Banden erfolgte mit Hilfe des Interkalationsfarbstoffs Ethidiumbromid (0.001 %ig in Wasser) unter UV-Licht bei 312 nm (Aaij and Borst, 1971). Für die Zuordnung der Banden wurde bei jedem Lauf ein Größenmarker (siehe Abbildung 59) mit aufgetragen. Die Digitalisierung der Elektropherogramme erfolgte mit Hilfe einer Geldokumentationseinheit, die es ermöglichte, die Gele unter UV-Licht (312 nm) zu fotografieren.

Die Spezifikationen der verwendeten Puffer und Lösungen bzw. Reagenzien sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.2., Tabelle 30 bzw. siehe Anhang 6.3., Tabelle 31).

Abbildung 59: DNA-Größenmarker 100 1000 bp, Fermentas

5.4.2. Semi-Dry Western Blot

Für die Western-Blot-Analyse wurden je zwei SDS-Polyacrylamidgele (siehe Abschnitt 5.4.2.) mit jeweils identischer Belegung verwendet. Der einzige Unterschied der beiden Gele ist lediglich der verwendete Proteinmarker. Für das Gel, welches für den Semi-Dry Western Blot verwendet wurde, wurde ein gefärbter Molekularmarker (siehe Abschnitt 6.3.) verwendet. (siehe Abbildung 60).

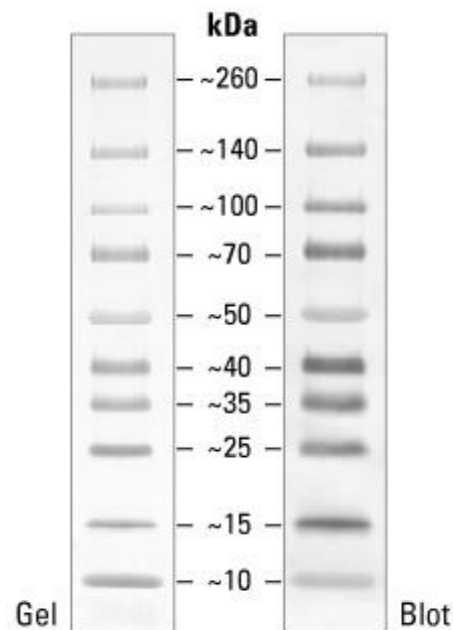


Abbildung 60: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, Fermentas

Nach Entwicklung der Gele erfolgte bei dem Referenzgel eine Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G250. Das Gel für den Blot mit dem gefärbten Molekularmarker wurde zur Vorbereitung in Kathodenpuffer inkubiert. Eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid, Millipore Corporation, siehe Anhang 6.3.) wurde zunächst für 15 s in Methanol, dann für 2 min in Wasser und schließlich für 15 s in Anodenpuffer II inkubiert.

Danach wurden die Proteine auf die PVDF-Membran übertragen (geblottet) bei einer Stromstärke von 40 mA für 2 h.

In Abbildung 61 ist der schematische Aufbau der Schichtung des Semi-Dry Western Blots dargestellt.

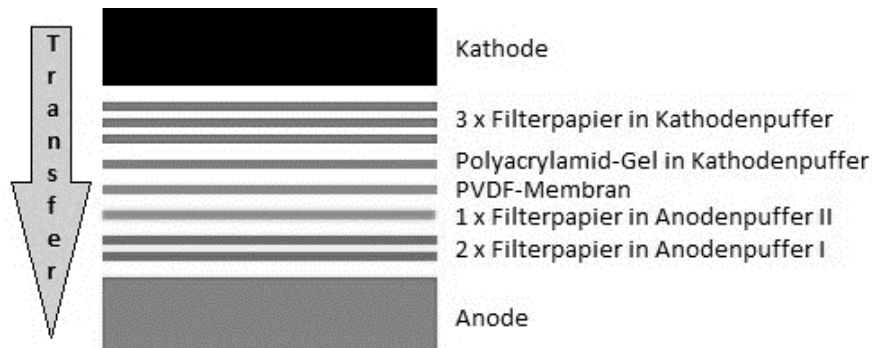


Abbildung 61: Schematischer Aufbau des Semi-Dry Western Blots

Vor der Schichtung wurden drei Filterpapiere (siehe Anhang 6.3.) im Kathodenpuffer, zwei Filterpapiere im Anodenpuffer I und ein Filterpapier in Anodenpuffer II inkubiert.

Detektion von His₆-Tag-Proteinen

Nach dem Blotting wurde die Membran für 60 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in 20 mL Waschpuffer, der 3 % Milchpulver enthält, inkubiert. Das vorhandene Milchpulver lagerte sich an proteinfreie Bereiche der Membran an, sodass es zu keiner unspezifischen Bindung der Antikörper an die Membran kommen konnte. Anschließend wurde die Membran gründlich mit Waschpuffer gewaschen und für 9 h in 20 mL Waschpuffer mit 1 % Milchpulver und 10 µL Penta-His-Antikörper (Verdünnung 1:2000, Qiagen GmbH, siehe Anhang 6.3., Tabelle 31) bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut gründlich mit Waschpuffer gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Die Membran wurde anschließend in 20 mL Waschpuffer mit 1 % Milchpulver und 10 µL Anti-Maus-Antikörper-HRP-Konjugat (Verdünnung 1:2000, Qiagen GmbH, siehe Anhang 6.3., Tabelle 31) über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist mit Meerrettichperoxidase (engl.: *horseradish peroxidase*, *HRP*) markiert und bindet an

den Primärantikörper. Überschüssige Antikörper wurden durch erneutes gründliches Waschen mit Waschpuffer entfernt.

Im letzten Schritt wurde die Membran in 20 mL Waschpuffer mit 6 mg 3,3'-Diaminobenzidin und 10 µL 30 %-igem Wasserstoffperoxid inkubiert, bis die Banden gut sichtbar waren. Dabei bewirkte die Meerrettichperoxidase eine Umsetzung des Substrates zu einem braun gefärbten Produkt. Anschließend wurde die Membran mit bidest. Wasser gewaschen, getrocknet und zur Dokumentation fotografiert.

Die Spezifikationen der verwendeten Puffer und Lösungen bzw. Reagenzien sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.2., Tabelle 30 bzw. siehe Anhang 6.3., Tabelle 31).

5.5. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung erfolgt mit der Methode nach Bradford (Bradford, 1976) und variierte nach Compton und Jones (Compton and Jones, 1985). Mittels einer Rinderserumalbumin-Standardreihe (BSA, engl. *bovine serum albumin*) wurde eine Kalibriergerade erstellt. Dafür wurden BSA-Standards der Konzentration 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 und 0.5 mg/mL für die externe Kalibrierung vermessen. 10 µL der Standardlösungen sowie 10 µL dest. Wasser für den Blindwert wurden mit 990 µL Bradford-Reagenz versetzt und für 5 min unter Lichtausschluss inkubiert. Anschließend erfolgte die fotometrische Vermessung bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Bestimmung der Probenlösungen erfolgt nach eventueller Verdünnung analog zu den Standards.

Die Spezifikationen der verwendeten Reagenzien und Proteine sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.3., Tabelle 31). Bestimmung der enzymatischen Aktivität und Untersuchungen zur Kinetik.

5.6. Fotometrischer Assay über NADH

Wie bereits in Punkt 2.2. erläutert, katalysiert LspD die Umsetzung von MEP zu CDP-ME. Um eine fotometrisch messbare Größe zu erhalten, wird das gebildete CDP-ME mit Hilfe eines zweiten Enzyms (LspE) zu CDP-MEP umgesetzt. Dabei reagiert ATP zu ADP und PEP mit Hilfe der Pyruvatkinase zu Pyruvat. Im Verlauf dieser Reaktion wird, wie in Abbildung 62 schematisch dargestellt, NADH+H⁺ (kurz NADH) zu NAD⁺ (kurz NAD) oxidiert (Stryer et al., 2007; W.W. Cleland, 1963).

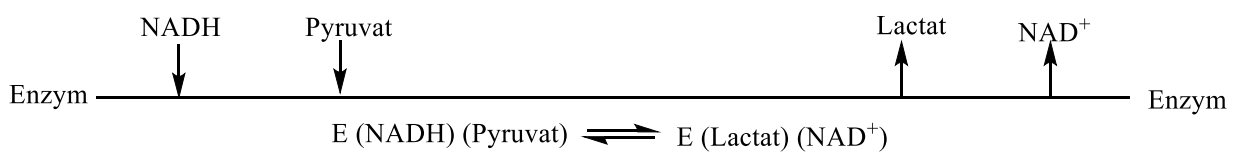


Abbildung 62: Darstellung der durch LDH katalysierten Indikatorreaktion.

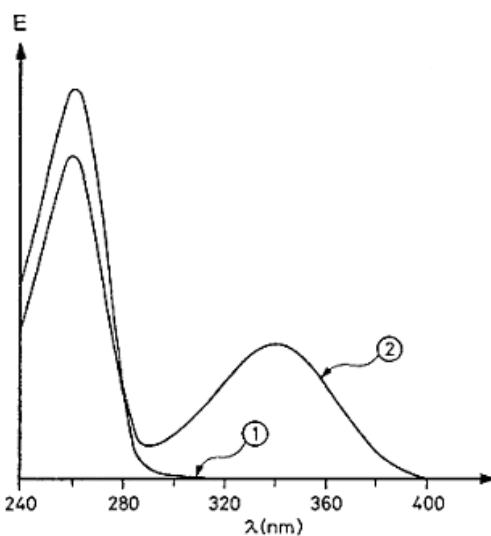


Abbildung 63: Elektronenanregungs-spektren von NAD (1) und NADH (2) (Belitz et al., 2007)

Wie in Abbildung 63 dargestellt, weisen NADH und NAD unterschiedliche Maxima im UV-Bereich auf. NADH besitzt ein zweites Maximum bei 340 nm, was für fotometrische Untersuchungen genutzt werden kann. Durch die Umsetzung von NADH zu NAD nimmt die Absorption bei 340 nm im Verlauf der Reaktion ab. Diese Abnahme wird UV-spektrometrisch verfolgt. Sie ist umgekehrt proportional zur umgesetzten Menge an Pyruvat. Die Berechnung der Aktivität, bzw. der Reaktionsgeschwindigkeit, erfolgt über den Extinktionskoeffizienten von NADH (Extinktionskoeffizient von NADH = 6220 L·mol⁻¹·cm⁻¹ (Horecker and Kornberg, 1948; Bergmeyer, 1975)).

5.6.1.1. Fotometrische Bestimmung der *PvlspD*-Aktivität.

Zur Aktivitätsbestimmung von *PvlspD* mittels eines fotometrischen Assays wurden zwei Lösungen hergestellt. Die Lösung A enthielt alle benötigten Bestandteile und das zu untersuchende Enzym, die Lösung B enthielt das Substrat (MEP) der enzymatischen Reaktion. Somit war sichergestellt, dass die katalysierte Reaktion erst begann, sobald Lösung A und B zusammengegeben wurden. Die Zusammensetzung der Lösung A ist in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Zusammensetzung der Lösung A

Bestandteil	Stammlösung Konz. [mM]	Konzentration [mM]
Tris/HCl-Puffer, pH = 8.0	50	50
Kaliumchlorid (KCl)	3000	25
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1000	5
Dithiothreitol (DTT)	1000	5
Adenosintriphosphat (ATP)	300	0.8
Phosphoenolpyruvat (PEP)	300	0.8
Cytidintriphosphat (CTP)	200	0.8
Nicotinamidadenindinukleotide (NADH)	200	0.4
Pyruvatkinase/Laktatdehydrogenase (PK/LDH)	PK: 0.6 bis 1.0 u LDH: 0.9 bis 1.4 u	PK: 6.9×10^{-4} u LDH: 1.01×10^{-3} u
4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritolkinase (<i>EclspE</i>)	600 µM	5 µM
<i>PvlspD</i> (2C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidyltransferase)	30	100 µM

Die Zusammensetzung der Lösung B ist in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23: Zusammensetzung der Lösung B

Bestandteil	Stammlösung Konz. [mM]	Konzentration [mM]
Tris/HCl-Puffer, pH = 8.0	50	50
2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP)	15	0.33

Für den *PvlspD* Assay wurden jeweils 30 µL der Lösung A zentrifugiert und anschließend wurde das Enzym (*PvlspD*) mit den 30 µL vermischt und erneut zentrifugiert. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 30 µL Lösung B zum Gemisch, welche wiederum gut vermischt wurden. Nach dem Zentrifugieren erfolgte die fotometrische Messung bei einer Wellenlänge von 340 nm mit dem SpectraMax M3 oder SpectraMax M5 (Molecular Devices, LLC., Sunnyvale CA, USA).

Bei der fotometrischen Detektion erfolgt die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit mit Hilfe von Gleichung 1.

$$v = \frac{r * V * 1000}{\epsilon * d * E_0}$$

Gleichung 1

v = Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]

r = Steigung der Messwerte (abzüglich der Steigung des Blindwertes) [$\text{Skt} \cdot \text{min}^{-1}$]

V = Assayvolumen [mL]

ϵ = Extinktionskoeffizient von NADH [$\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$] = 6220 $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Bergmeyer, 1975)

d = Schichtdicke der Küvette [0.575 cm]

E_0 = Gehalt an *PvlspD* im Assay [mg]

1000 = Faktor zur Umrechnung von $\text{mmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ in $\mu\text{mol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$

Die Spezifikationen der verwendeten Chemikalien und Puffer sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.1., Tabelle 29 bzw. siehe Anhang 6.2., Tabelle 30).

5.6.1.2. Kinetik unter *Steady-State*-Bedingungen

Für das Substrat MEP und das Substrat CTP erfolgten kinetische Untersuchungen in Bezug auf *PvlspD*. Die kinetischen Untersuchungen für MEP und CTP wurde in 384 well Platten durchgeführt. Zusätzlich wurden alle anderen Komponenten des *IspD*-Assays im Überschuss zugegeben, während die Konzentration an MEP bzw. CTP so lange erhöht wurde, bis die Reaktionsgeschwindigkeit in eine Sättigung überging. Aus den Werten der Experimente und somit errechneten Steigung der erhaltenden Kurven konnte mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten für NADH (siehe Kapitel 5.6.1.1) die Reaktionsgeschwindigkeit für die jeweilige Substratkonzentration berechnet werden. Über die Auftragung der verschiedenen Substratkonzentrationen gegen die entsprechenden Reaktionsgeschwindigkeiten wurde eine Sättigungskurve erhalten. Das kinetische Modell nach Hill (siehe Gleichung 2) wurde verwendet um eine Fitkurve mit Hilfe der Software OriginPro 9.1 (Firma OriginLab Corporation, Massachusetts, USA) zu berechnen. Aus der Fitkurve nach Hill konnte die maximale Reaktionsgeschwindigkeit $v_{\max}$, sowie die Substratkonzentration bei halbmaximaler Geschwindigkeit k und der Hill-Koeffizient n abgeleitet werden (Goutelle et al., 2008). Der Hill-Koeffizient gibt Informationen, mit denen eine Aussage über die Kooperativität von Enzymen getroffen werden kann. Kooperativität tritt insbesondere bei Enzymen mit mehreren aktiven Zentren auf. Der Effekt, dass die Bindung eines Substratmoleküls die Affinität der Bindung eines weiteren Substratmoleküls positiv oder negativ beeinflusst, wird als Kooperativität beschrieben (Voet et al., 2002; Porter and Miller, 2012).

$$V = \frac{v_{\max} * [S]^n}{(k^n + [S]^n)}$$

Gleichung 2

v = Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]

v_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]

$[S]$ = Substratkonzentration [μM]

k = Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit [μM]

n = Hill-Koeffizient:

$n > 1$: positive Kooperativität

$n = 1$: keine Kooperativität

$n < 1$: negative Kooperativität

Bei einem Hill-Koeffizienten von $n = 1$ zeigt das Enzym keine Kooperativität und folgt der Michaelis-Menten-Kinetik (siehe Gleichung 3). In diesem bestimmten Fall entspricht die Konstante k der Michaelis-Menten-Konstante K_M (Porter and Miller, 2012). Für Enzyme mit mehreren Substrat-Bindungsstellen (multimere Enzyme) entspricht der Maximalwert für n der Anzahl an Bindungsstellen des Enzymkomplexes (Porter and Miller, 2012).

$$v = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]}{(K_M + [S])} \quad \text{Gleichung 3}$$

v = Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]

v_{max} = maximale Reaktionsgeschwindigkeit [$\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]

$[S]$ = Substratkonzentration [μM]

K_M = Michaelis-Menten-Konstante (Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit) [μM]

Die Konzentration an MEP wurde von 10 μM bis 2500 μM variiert und die Konzentration von CTP von 15 μM bis ca. 15000 μM . Die Assayzusammensetzung der restlichen Substanzen entsprach Tabelle 22 (siehe Kapitel 5.6.1.1.).

Die Auswertung erfolgte jeweils bei beiden Substraten über den Fit nach Hill.

5.6.1.3. Fotometrische Bestimmung der *EclspE*-Aktivität

Zur Aktivitätsbestimmung von *EclspE* mittels eines fotometrischen Assays wurden zwei Lösungen hergestellt. Die Lösung A enthielt alle benötigten Bestandteile und das zu untersuchende Enzym, die Lösung B enthielt das Substrat (CDP-ME) der enzymatischen Reaktion. Somit war sichergestellt, dass die katalysierte Reaktion erst begann, sobald Lösung A und B zusammengegeben wurden. Die Zusammensetzung der Lösung A ist in Tabelle 24 dargestellt.

Tabelle 24: Zusammensetzung der Lösung A

Bestandteil	Stammlösung [mM]	Konz. Konzentration [mM]
Tris/HCl-Puffer, pH = 6.8	100	100
Kaliumchlorid (KCl)	3000	25.5
Dithiothreitol (DTT)	1000	10
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1000	6.7
Adenosintriphosphat (ATP)	300	1
Phosphoenolpyruvat (PEP)	300	1
Nicotinamidadenindinukleotide (NADH)	200	0.4
Pyruvatkinase/Laktatdehydrogenase (PK/LDH)	PK: 0.6 bis 1.0 u LDH: 0.9 bis 1.4 u	PK: 6.9×10^{-4} u LDH: 1.01×10^{-3} u
4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritolkinase (IspE)	600	75 μ M

Die Zusammensetzung der Lösung B ist in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25: Zusammensetzung der Lösung B

Bestandteil	Stammlösung Konz. [mM]	Konzentration [mM]
Tris/HCl-Puffer, pH = 6.8	100	100
4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol (CDP-ME)	50	0.15

Für den *EclspE* Assay wurden jeweils 30 μ L der Lösung A zentrifugiert und anschließend wurde das Enzym (*EclspE*) mit den 30 μ L vermischt und erneut zentrifugiert. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 30 μ L Lösung B zum Gemisch, welche wiederum gut vermischt wurden. Nach dem Zentrifugieren erfolgte die fotometrische Messung bei einer Wellenlänge von 340 nm mit dem SpectraMax M3 oder SpectraMax M5 (Molecular Devices, LLC., Sunnyvale CA, USA).

Bei der fotometrischen Detektion erfolgt die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit mit Hilfe von Gleichung 1 (siehe Kapitel 5.6.1.).

Die Spezifikationen der verwendeten Chemikalien und Puffer sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.1., Tabelle 29 bzw. siehe Anhang 6.2., Tabelle 30).

5.6.1.4. Fotometrische Bestimmung der *EclspC*-Aktivität

Zur Aktivitätsbestimmung von *EclspC* mittels eines fotometrischen Assays wurden zwei Lösungen hergestellt. Die Lösung A enthielt alle benötigten Bestandteile und das zu untersuchende Enzym, die Lösung B enthielt das Substrat (DXP) der enzymatischen Reaktion. Somit war sichergestellt, dass die katalysierte Reaktion erst begann, sobald Lösung A und B zusammengegeben wurden. Die Zusammensetzung der Lösung A ist in Tabelle 26 dargestellt.

Tabelle 26: Zusammensetzung der Lösung A

Bestandteil	Stammlösung Konz. [mM]	Konzentration [mM]
Tris/HCl-Puffer, pH = 7.0	100	100
Kaliumchlorid (KCl)	3000	25.5
Dithiothreitol (DTT)	1000	10
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1000	6.7
Adenosintriphosphat (ATP)	300	1
Phosphoenolpyruvat (PEP)	300	1
Nicotinamidadenindinukleotide (NADH)	200	0.4
Pyruvatkinase/Laktatdehydrogenase (PK/LDH)	PK: 0.6 bis 1.0 u	PK: 6.9×10^{-4} u
	LDH: 0.9 bis 1.4 u	LDH: 1.01×10^{-3} u
1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase (IspC)	600	75 μ M

Die Zusammensetzung der Lösung B ist in Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Zusammensetzung der Lösung B

Bestandteil	Stammlösung Konz. [mM]	Konzentration [mM]
Tris/HCl-Puffer, pH = 7.0	100	100
1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate (DXP)	50	0.15

Für den *EclspC* Assay wurden jeweils 30 μ L der Lösung A zentrifugiert und anschließend wurde das Enzym (*EclspC*) mit den 30 μ L vermischt und erneut zentrifugiert. Danach erfolgte die Zugabe von jeweils 30 μ L Lösung B zum Gemisch, welche wiederum gut vermischt wurden. Nach dem Zentrifugieren erfolgte die fotometrische Messung bei einer Wellenlänge von 340 nm mit dem SpectraMax M3 oder SpectraMax M5 (Molecular Devices, LLC., Sunnyvale CA, USA).

Bei der fotometrischen Detektion erfolgt die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit mit Hilfe von Gleichung 1 (siehe Kapitel 5.6.1.).

Die Spezifikationen der verwendeten Chemikalien und Puffer sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.1., Tabelle 29 bzw. siehe Anhang 6.2., Tabelle 30).

5.6.2. Aktivitätsbestimmung mittels Kernspinresonanzspektroskopie

Zur Aktivitätsbestimmung von *PvlspD* mittels ^{13}C -Kernspinresonanzspektroskopie wurde ein Reaktionsansatz hergestellt der anschließend bei 30 °C im Wasserbad für 10 min inkubiert wurde. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

Bestandteil	Stammlösung Konz. [mM]	Konzentration [mM]
Tris/HCl-Puffer, pH = 8.0	50	50
Kaliumchlorid (KCl)	3000	25
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	1000	5
Dithiothreitol (DTT)	1000	5
Cytidintriphosphat (CTP)	200	5
2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP)	29	3.5

Nach der Inkubation wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe einer 200 mM Ethylendiamintetraacetat-Lösung (EDTA) gestoppt. Somit ergab sich eine EDTA Konzentration im Assay von 1.67 mM. Anschließend wurde der Ansatz bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Zusätzlich wurde dem Reaktionsansatz noch 70 μL D_2O und 2 bis 7 μL ^{13}C -Glucose (535 mM) hinzugegeben. Danach wurde der Reaktionsansatz zum NMR-Messservice der organischen Chemie der Universität Hamburg gegeben.

Die Spezifikationen der verwendeten Chemikalien und Puffer sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.1., Tabelle 29 bzw. siehe Anhang 6.2., Tabelle 30).

5.7. *High Throughput Screening (HTS)*

5.7.1. Verdünnung der Mutterplatten mit dem Pipettierroboter

Bevor das eigentliche *High Throughput Screening* (HTS) beginnen konnte war es notwendig, die bereit gestellte Substanzbibliothek von der BASF so zu verdünnen, dass eine messbare Konzentration erreicht wird. Die Spezifikationen der Substanzbank, die freundlicherweise von der BASF bereitgestellt wurde, sind in Kapitel 4.6. beschrieben. Die Mutterplatten, so werden die Platten von der BASF mit einer Konzentration von 10 mM genannt. Um eine möglichst genaue und vor allem effektive Verdünnung zu erhalten, wurde ein Pipettierroboter der Firma Hamilton verwendet. Zunächst wurden Zwischenverdünnungen hergestellt. Dazu wurden die Inhibitoren der Mutterplatten im 96 well Format um das Zehnfache mit DMSO verdünnt, indem 18 μL aus den Mutterplatten mit 162 μL DMSO vermischt wurden. Die festen Carbonspitzen des Pipettierroboters wurden nach jedem Pipettierschritt mit einer verdünnten Lösung von Deconex 61DR und dest. Wasser gespült, um keine Verunreinigungen von Fremdinhibitoren zu erhalten. Aus diesen Zwischenverdünnungen wurden 3 μL in 384 well Platten überführt. Dabei wurden jeweils 4 Zwischenverdünnungen in eine 384 well Platte pipettiert. Bei einer Assayzugabe von 60 μL ergab sich eine Endkonzentration des Inhibitors von 50 μM . Die bei diesem Schritt verwendeten Pipettierspitzen wurden nur einmal pro Pipettiervorgang verwendet und dann ausgetauscht. Insgesamt ergaben 4 x 96 well Zwischenverdünnungsplatten eine 384 well Assayplatte.

In der folgenden Abbildung 64 ist der gesamte Pipettiervorgang schematisch dargestellt.

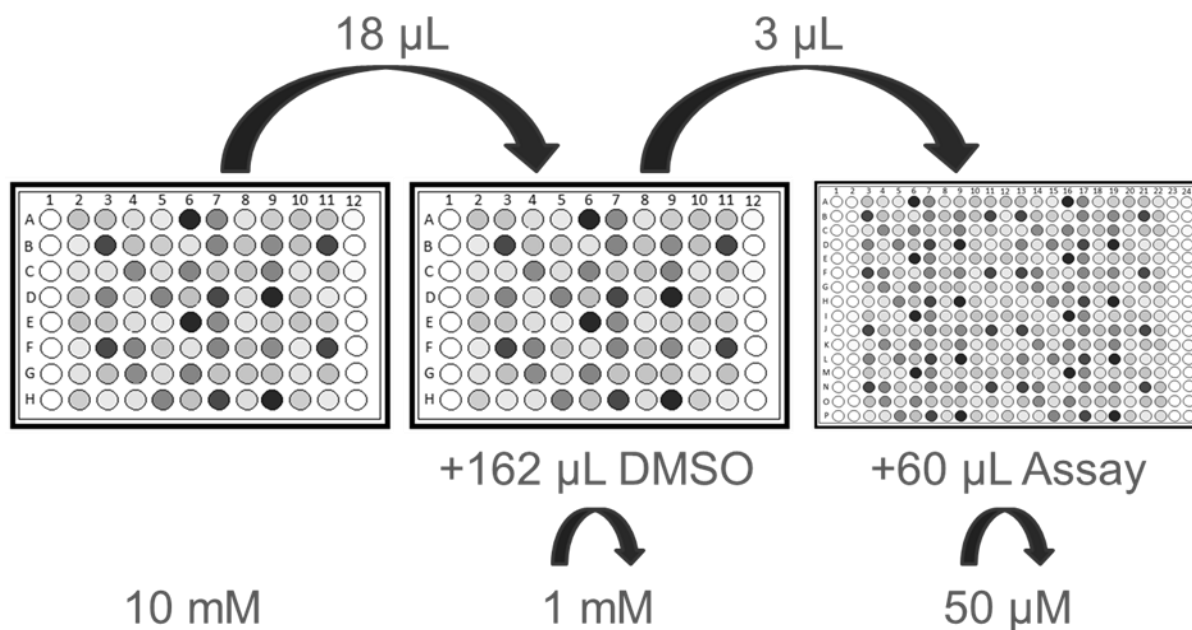


Abbildung 64: Schematische Abbildung der Verdünnungsvorgänge mit dem Pipettierroboter

Bei allen Schritten war es wichtig, die Inhibitoren ordentlich zu vermischen und die normalerweise bei -20 °C aufbewahrten Inhibitoren nicht zu lange aufgetaut zu lassen. Alle fertig gestellten Assayplatten wurden bei -20 °C aufbewahrt.

Die Verdünnungen erfolgten mit einem Pipettierroboter, weil die Genauigkeit des Pipettiervorganges mit einem Roboter viel genauer zu bewerkstelligen war und die Anzahl der fertig gestellten Assayplatten im Vergleich zum Hand pipettieren viel schneller erfolgen konnte. 103'909 Substanzen bedeuteten 326 Assayplatten, die in mehreren Ausführungen angefertigt wurden, um noch mehrere Enzyme bei Bedarf screenen zu können.

Die Spezifikationen der verwendeten Reagenzien und Chemikalien sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.1., Tabelle 29 bzw. siehe Anhang 6.2., Tabelle 30).

5.7.2. Primärscreen

326 Assayplatten wurden mit dem *PvlspD*-Assay (siehe Kapitel 5.4.3.2.) mittels eines Dispenser versetzt (60 µL pro Well) und anschließend bei 500 rpm, 1 min, RT, zentrifugiert. Danach erfolgte die fotometrische Bestimmung bei 340 nm und RT mit dem SpectraMax M3 oder SpectraMax M5 (Molecular Devices, LLC., Sunnyvale CA, USA).

Eine schematische Darstellung der verwendeten Inhibitorplatten ist in Abbildung 65 aufgezeigt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B																								
C																								
D																								
E																								
G																								
H																								
I																								
J																								
K																								
L																								
M																								
N																								
O																								
P																								

Abbildung 65: Schematische Darstellung einer 384-Well-Platte

Spalte 1 – 2: Negativkontrollen (Blindprobe)

Spalte 3 – 22: Inhibitoren in 3 µL DMSO (50 µM in 60 µL Assayvolumen)

Spalte 23 – 24: Positivkontrollen (Referenz)

5.7.3. Sekundärscreen

Die gefundenen Hits vom Primärscreen wurden mit einem Sekundärscreen bzw. Counterscreen auf die Inhibition der Hilfsenzyme überprüft. Dazu wurden 2-3 verschiedene Konzentrationen des Inhibitors in einer 384 well Platte mit 60 μ L IspE-Assay (siehe Abschnitt 5.6.1.3.) vermischt, bei 500 rpm, 1 min, RT zentrifugiert und bei 340 nm mit dem mit dem SpectraMax M3 oder SpectraMax M5 (Molecular Devices, LLC., Sunnyvale CA, USA) für 45 min, RT gemessen.

5.7.4. IC₅₀-Bestimmung

In einer 384 well Platte wurden mindestens 5 verschiedene Konzentrationen des Inhibitors mit 60 μ L PvlspD-Assay vermischt, bei 500 rpm, 1 min, RT zentrifugiert und bei 340 nm mit dem SpectraMax M3 oder SpectraMax M5 (Molecular Devices, LLC., Sunnyvale CA, USA) für 45 min gemessen. Die Ergebnisse wurden mittels DynaFit3 (BioKin, Ltd., Watertown, USA) ausgewertet und gefittet.

5.7.5. Bestimmung des Bindungsmechanismus

Zur Bestimmung des Bindungsmechanismus wurde der PvlspD-Assay aus Abschnitt 5.6.1.1. eingesetzt. Zusätzlich wurden vier verschiedene Konzentrationen des Inhibitors (0 μ M, 1 μ M, 3 μ M und 9 μ M) und acht verschiedene Konzentrationen des Substrats (MEP) von 0 μ M bis 800 μ M eingesetzt. Jede Konzentration des Inhibitors wurde mit jeder Konzentration von MEP bestimmt. Alle 32 Messungen wurden anschließend in einer fotometrischen Bestimmung durchgeführt und mittels DynaFit3 (BioKin, Ltd., Watertown, USA) ausgewertet.

5.7.6. Fotometrische Bestimmung der Hemmung von Analoga der gefundenen Inhibitoren.

Zur Bestimmung der Hemmung von Analoga der besten Inhibitoren wurde der *PvIspD*-Assay aus Abschnitt 5.6.1.1. eingesetzt. Es erfolgte eine Optimierung der Konzentration des *PvIspD*-Enzyms auf eine NADH-Abnahme von 0.3 OD innerhalb von 30 min, RT.

5.7.7. Fotometrische Bestimmung der Hemmung von Inhibitoren getestet gegen *AtIspD*

Zur Bestimmung der Hemmung von einigen Inhibitoren gegen *AtIspD* wurde der *PvIspD*-Assay aus Abschnitt 5.6.1.1. eingesetzt. Es erfolgte der Austausch des *IspD*-Enzyms von *PvIspD* zu *AtIspD* und eine Optimierung der Konzentration des *AtIspD*-Enzyms auf eine NADH-Abnahme von 0.3 OD innerhalb von 30 min.

6. Anhang

6.1. Chemikalienverzeichnis

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 29 aufgelistet.

Tabelle 29: Verwendete Chemikalien, GHS-Symbole, sowie H- und P-Sätze mit der Entsorgung

Substanz	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
Acrylamid-Lösung Rotiphorese® Gel 40 (29:1)	 	H302+H312, H315, H319, H317, H340, H350, H361f, H372	P280, P202, P301+P310, P302+P352, P308+P313	Roth
Adenosin-5'-tri- phosphat Dinatriumsalz > 98 %	-	-	-	Roth
Agar-Agar für die Bakteriologie	-	-	-	Roth
Agarose für die DNA	-	-	-	Serva
Ammoniumchlorid		H302-H319	P305+P351+P338	Roth
Ammonium- peroxodisulfat > 98 %	  	H272, H302, H315, H319, H334, H317, H335	P260, P280, P305+P351+P338	Roth
Ampicillin Natriumsalz 99 % für die Molekularbiologie		H334, H317	P280, P261, P302+P352, P342+P311	Roth
Bromphenolblau Natriumsalz	-	-	-	Roth
Calciumchlorid- Dihydrat		H319	P280, P305+P351+P338	Merck

Substanz	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
Caseinhydrolysat für die Mikrobiologie	-	-	-	Roth
Coomassie Brilliant Blue G250	-	-	-	Roth
Cytidintri-phosphat (CTP)	-	-	-	Appli-Chem PanReac
Deconex 61DR	  	H302-H314-H341-H332-H319-H315-H317	P261-P280-P305+P351+P338-P311	Borer
Dikaliumhydrogenphosphat	-	-	-	Roth
Dimethylsulfoxid ROTIPURAN® ≥ 99.8 %	-	-	-	Roth
1,4-Dithiothreitol (DTT) ≥ 99 %		H302, H315, H319, H335	P280, P301+P312, P302+P352, P403+P233	Roth
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ≥ 99 %	-	-	-	Roth
Essigsäure 100 % ROTIPURAN®	 	H226, H290, H314	P280, P210, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P310	Merck
Ethanol ≥ 96 %-ig		H225	P210	Eigene Abfüllung

Substanz	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
Ethidiumbromid ≥ 98 %		H302, H330, H341	P281, P301+P312, P304+P340, P310, P405	Merck
D(+)-Glucose wasserfrei	-	-	-	Roth
Glycerin ROTIPURAN® > 99.5 %	-	-	-	Roth
Glycin > 99 % für die Biochemie	-	-	-	Roth
Hefeextrakt pulv. für die Bakteriologie	-	-	-	Roth
Imidazol ≥ 99 %		H302, H314, H361D	P260, P281, P303+P361+P353, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P308+P313	Roth
Isoamylalkohol ROTIPURAN® ≥ 98.5 %		H226, H302+H332, H335	P280, P210, P303+P361+P353, P304+P340, P312, P403+P253	Roth
Isopropyl-β-D thiogalactopyranosid ≥ 99 % für die Biochemie	-	-	-	Roth
Kaliumchlorid ≥ 99.5 %	-	-	-	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat ≥ 98 %	-	-	-	Roth

Substanz	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
Kanamycinsulfat für die Biochemie		H360D	P281, P260; P308+P313	Roth
Kupfer(II)chlorid-Dihydrat	 	H302-H315-H319-H410	P260-P273-P302+P352-P305+P351+P338	Roth
α -Lactose	-	-	-	Merck
Magnesiumchlorid Hexahydrat $\geq 99\%$	-	-	-	Sigma-Aldrich
Magnesiumsulfat $\geq 99\%$	-	-	-	Merck
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat	 	H302-H411	P273	Merck
2-Mercaptoethanol 99 %	  	H301, H310+H330, H315, H318, H410	P280, P273, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P310	Merck
Methanol 100 %-ig	  	H225, H301+H311+H331, H370	P280, P210, P233, P302+P352, P309, P310	Eigene Abfüllung
MOPS Pufferan® > 99.5 %	-	-	-	Roth

Substanz	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
Natriumazid ≥ 99 %		H300, EUH032, H410	P273, P270, P309, P310, P405	Roth
Natriumchlorid > 99.9 %	-	-	-	Roth
Natriumdihydrogen- phosphat-Dihydrat	-	-	-	Roth
Natriumdodecyl- sulfat (SDS) > 99.5 %		H228, H302+H332, H315, H318, H335, H412	P210, P280, P302+P352, P304+P340, P305+P351+P338, P314	Roth
Natriumhydroxid ≥ 98 % in Plätzchen		H290, H314	P280, P301+P330+P331, P305+P351+P338, P310	Roth
Natriummolybdat- Dihydrat	-	-	-	Roth
Natriumsulfat- Decahydrat	-	-	-	Roth
Nickel(II)-sulfat- Hexahydrat		H302+H332, H315, H334, H317, H341, H350i, H360D, H372, H410	P280, P201, P302+P352, P308+P313, P342+P311	Riedel-de Häen
Nicotinamid- adenindinukleotid (NADH) ≥ 98 %	-	-	-	Roth
Phosphoenol- pyruvat Natriumsalz ≥ 97 %	-	-	-	Alfa Aesar

Substanz	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
ortho-Phosphorsäure ROTIPURAN® ≥ 85 %		H290, H314	P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P301+P330+P331, P310	Roth
2-Propanol ≥ 99 %-ig	 	H225-H319-H336	P210-P233- P305+P351+P338	Eigene Abfüllung
Rubidiumchlorid ≥ 99 %	-	-	-	Appli- chem
Substanz	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
Salzsäure 32 %ig	 	H290, H314, H335	P280, P304+P340, P305+P351+P338, P309, P310	Merck
TEMED-Lösung 99 % für die Elektrophorese	 	H225, H302+H332, H314	P280, P210, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P301+P330+P331, P310	Roth
Tris PUFFERAN® ≥ 99.9 %		H315, H319, H335	P280, P302+P352, P305+P351+P338	Roth
Triton X-100	 	H302, H318	P280, P305+P351+P338, P310	Roth
Tween® 20	-	-	-	Roth
Xylencyanol für die Elektrophorese		H319	P280, P264, P305+P351+P338, P337+P313	Roth

Substanz	GHS-Symbole	H-Sätze	P-Sätze	Hersteller
Zink(II)sulfat-Heptahydrat	  	H302-H318-H410	P280-P273-P305+P351+P338	Merck

AppliChem = AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)

Sigma = Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)

Serva = SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Deutschland)

Roth = Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

Merck = Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Alfa Aesar = Alfa Aesar GmbH & Co KG (Karlsruhe, Deutschland)

Riedel-de Häen = Honeywell Specialty Chemicals Seelze GmbH (Seelze, Deutschland)

H-Codes H-Sätze

H200 Instabil, explosiv.

H201 Explosiv, Gefahr der Massenexplosion.

H202 Explosiv; große Gefahr durch Splitter, Spreng- und Wurfstücke.

H203 Explosiv; Gefahr durch Feuer, Luftdruck oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.

H204 Gefahr durch Feuer oder Splitter, Spreng- und Wurfstücke.

H205 Gefahr der Massenexplosion bei Feuer.

H220 Extrem entzündbares Gas.

H221 Entzündbares Gas.

H222 Extrem entzündbares Aerosol.

H223 Entzündbares Aerosol.

H-Codes H-Sätze

H224 Flüssigkeit und Dampf extrem entzündbar.

H225 Flüssigkeit und Dampf leicht entzündbar.

H226 Flüssigkeit und Dampf entzündbar.

H228 Entzündbarer Feststoff.

H240 Erwärmung kann Explosion verursachen.

H241 Erwärmung kann Brand oder Explosion verursachen.

H242 Erwärmung kann Brand verursachen.

H250 Entzündet sich in Berührung mit Luft von selbst.

H251 Selbsterhitzungsfähig, kann sich selbst erhitzen; kann in Brand geraten.

H252 In großen Mengen selbsterhitzungsfähig; kann in Brand geraten.

H260 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase, die sich spontan entzünden können.

H261 In Berührung mit Wasser entstehen entzündbare Gase.

H270 Kann Brand verursachen oder verstärken; Oxidationsmittel.

H271 Kann Brand oder Explosion verursachen; starkes Oxidationsmittel.

H272 Kann Brand verstärken; Oxidationsmittel.

H280 Enthält Gas unter Druck; kann bei Erwärmung explodieren.

H281 Enthält tiefkaltes Gas; kann Kälteverbrennungen oder -Verletzungen verursachen.

H290 Kann gegenüber Metallen korrosiv sein.

H300 Lebensgefährlich bei Verschlucken.

H301 Giftig bei Verschlucken.

H302 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken.

H304 Kann bei Verschlucken und Eindringen in die Atemwege tödlich sein.

H310 Lebensgefahr bei Hautkontakt.

H-Codes H-Sätze

H311 Giftig bei Hautkontakt.

H312 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt.

H314 Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden.

H315 Verursacht Hautreizungen.

H317 Kann allergische Hautreaktionen verursachen.

H318 Verursacht schwere Augenschäden. (entfällt, wenn auch H314)

H319 Verursacht schwere Augenreizung.

H330 Lebensgefahr bei Einatmen.

H331 Giftig bei Einatmen.

H332 Gesundheitsschädlich bei Einatmen.

H334 Kann bei Einatmen Allergie, asthmaartige Symptome oder Atembeschwerden verursachen.

H335 Kann die Atemwege reizen.

H336 Kann Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen.

H340 Kann genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H341 Kann vermutlich genetische Defekte verursachen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H350 Kann Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H351 Kann vermutlich Krebs erzeugen (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H360 Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (sofern bekannt, konkrete Wirkung angeben) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefährdung bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H-Codes H-Sätze

H361 Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen oder das Kind im Mutterleib schädigen (sofern bekannt, konkrete Wirkung angeben) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass die Gefährdung bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H362 Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.

H370 Schädigt die Organe (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H371 Kann die Organe schädigen (oder alle betroffenen Organe nennen, sofern bekannt) (Expositionsweg angeben, sofern schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H372 Schädigt die Organe (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H373 Kann die Organe schädigen (alle betroffenen Organe nennen) bei längerer oder wiederholter Exposition (Expositionsweg angeben, wenn schlüssig belegt ist, dass diese Gefahr bei keinem anderen Expositionsweg besteht).

H300+H310 Lebensgefahr bei Verschlucken oder Hautkontakt.

H300+H330 Lebensgefahr bei Verschlucken oder Einatmen.

H310+H330 Lebensgefahr bei Hautkontakt oder Einatmen.

H300+H310+H330 Lebensgefahr bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.

H301+H311 Giftig bei Verschlucken oder Hautkontakt.

H301+H331 Giftig bei Verschlucken oder Einatmen.

H311+H331 Giftig bei Hautkontakt oder Einatmen.

H301+H311+H331 Giftig bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.

H302+H312 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Hautkontakt.

H302+H332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken oder Einatmen.

H-Codes H-Sätze

H312+H332 Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt oder Einatmen.

H302+H312+H332 Gesundheitsschädlich bei Verschlucken, Hautkontakt oder Einatmen.

H400 Sehr giftig für Wasserorganismen. (entfällt, wenn auch H410)

H410 Sehr giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

H411 Giftig für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

H412 Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

H413 Kann für Wasserorganismen schädlich sein, mit langfristiger Wirkung.

H420 Schädigt die öffentliche Gesundheit und die Umwelt durch Ozonabbau in der äußeren Atmosphäre.

EUH001 In trockenem Zustand explosionsgefährlich.

EUH006 Mit und ohne Luft explosionsfähig.

EUH014 Reagiert heftig mit Wasser.

EUH018 Kann bei Verwendung explosionsfähige/entzündbare Dampf/Luft-Gemische bilden.

EUH019 Kann explosionsfähige Peroxide bilden.

EUH029 Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.

EUH031 Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.

EUH032 Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.

EUH044 Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss.

EUH066 Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen.

EUH070 Giftig bei Berührung mit den Augen.

EUH071 Wirkt ätzend auf die Atemwege.

EUH201 Enthält Blei. Nicht für den Anstrich von Gegenständen verwenden, die von Kindern gekaut oder gelutscht werden könnten.

H-Codes H-Sätze

EUH201A Achtung! Enthält Blei.

EUH202 Cyanacrylat. Gefahr. Klebt innerhalb von Sekunden Haut und Augenlider zusammen. Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.

EUH203 Enthält Chrom (VI). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

EUH204 Enthält Isocyanate. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

EUH205 Enthält epoxidhaltige Verbindungen. Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

EUH206 Achtung! Nicht zusammen mit anderen Produkten verwenden, da gefährliche Gase (Chlor) freigesetzt werden können.

EUH207 Achtung! Enthält Cadmium. Bei der Verwendung entstehen gefährliche Dämpfe. Hinweise des Herstellers beachten. Sicherheitsanweisungen einhalten.

EUH208 Enthält (Name des sensibilisierenden Stoffes). Kann allergische Reaktionen hervorrufen.

EUH209 Kann bei Verwendung leicht entzündbar werden
und

EUH209A Kann bei Verwendung entzündbar werden.

EUH210 Sicherheitsdatenblatt auf Anfrage erhältlich.

EUH401 Zur Vermeidung von Risiken für Mensch und Umwelt die Gebrauchsanleitung einhalten.

H350i Kann beim Einatmen Krebs erzeugen.

H360F Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.

H360D Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

H361f Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.

H361d Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.

H360FD Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann das Kind im Mutterleib schädigen.

H361fd Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.

H-Codes H-Sätze

H360Fd Kann die Fruchtbarkeit beeinträchtigen. Kann vermutlich das Kind im Mutterleib schädigen.

H360Df Kann das Kind im Mutterleib schädigen. Kann vermutlich die Fruchtbarkeit beeinträchtigen.

P-Codes P-Sätze

P101 Ist ärztlicher Rat erforderlich, Verpackung oder Etikett bereithalten.

P102 Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.

P103 Vor Gebrauch Etikett lesen.

P201 Vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.

P202 Vor Handhabung sämtliche Sicherheitsratschläge lesen und verstehen.

P210 Von Hitze/Funken/offener Flamme/heißen Oberflächen fernhalten. Nicht rauchen.

P211 Nicht in offene Flamme oder andere Zündquelle sprühen.

P220 Von Kleidung/.../brennbaren Materialien fernhalten/entfernt aufbewahren.

P221 Vermischung mit brennbaren Stoffen unter allen Umständen vermeiden.

P222 Berührung mit Luft vermeiden.

P223 Berührung mit Wasser wegen heftiger Reaktion und möglichem Aufflammen unbedingt vermeiden.

P230 Feucht halten mit ...

P231 Unter inertem Gas handhaben.

P232 Vor Feuchtigkeit schützen.

P233 Behälter dicht verschlossen halten.

P234 Nur im Originalbehälter aufbewahren.

P235 Kühl halten.

P240 Behälter und zu befüllende Anlage erden.

P-Codes P-Sätze

P241 Explosionsgeschützte elektrische Anlagen/Lüftungsanlagen/ Beleuchtungsanlagen/... verwenden.

P242 Nur funkenfreies Werkzeug verwenden.

P243 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen.

P244 Druckminderventile frei von Fett und Öl halten.

P250 Nicht schleifen/stoßen/.../reiben.

P251 Behälter steht unter Druck: Nicht durchstechen oder verbrennen, auch nicht nach der Verwendung.

P260 Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol nicht einatmen.

P261 Einatmen von Staub/Rauch/Gas/Nebel/Dampf/Aerosol vermeiden.

P262 Nicht in die Augen, auf die Haut oder auf die Kleidung gelangen lassen.

P263 Berührung in der Schwangerschaft/der Stillzeit vermeiden.

P264 Nach Handhabung ... gründlich waschen.

P270 Bei Verwendung dieses Produkts nicht essen, trinken oder rauchen.

P271 Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden.

P272 Kontaminierte Arbeitskleidung nicht außerhalb des Arbeitsplatzes tragen.

P273 Freisetzung in die Umwelt vermeiden.

P280 Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/Gesichtsschutz tragen.

P281 Vorgeschriebene persönliche Schutzausrüstung verwenden.

P282 Schutzhandschuhe/Gesichtsschild/Augenschutz mit Kälteisolierung tragen.

P283 Feuerbeständige/flammbeständige/feuerhemmende/flammhemmende Kleidung tragen.

P284 Atemschutz tragen.

P285 Bei unzureichender Belüftung Atemschutz tragen.

P231+P232 Unter inertem Gas handhaben. Vor Feuchtigkeit schützen.

P-Codes P-Sätze

P235+P410 Kühl halten. Vor Sonnenbestrahlung schützen.

P301 BEI VERSCHLUCKEN:

P302 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT:

P303 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar):

P304 BEI EINATMEN:

P305 BEI BERÜHRUNG MIT DEN AUGEN:

P306 BEI BERÜHRUNG MIT DER KLEIDUNG:

P307 BEI Exposition:

P308 BEI Exposition oder Verdacht:

P309 BEI Exposition oder Unwohlsein:

P310 Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

P311 GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

P312 Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

P313 Ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P314 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P315 Sofort ärztlichen Rat einholen / ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P320 Gezielte Behandlung dringend erforderlich (siehe ... auf diesem
Kennzeichnungsetikett).

P321 Besondere Behandlung (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).

P322 Gezielte Maßnahmen (siehe ... auf diesem Kennzeichnungsetikett).

P330 Mund ausspülen.

P331 KEIN Erbrechen herbeiführen.

P332 Bei Hautreizung:

P333 Bei Hautreizung oder -ausschlag:

P-Codes P-Sätze

P334 In kaltes Wasser tauchen / nassen Verband anlegen.

P335 Lose Partikel von der Haut abbürsten.

P336 Vereiste Bereiche mit lauwarmem Wasser auftauen. Betroffenen Bereich nicht reiben.

P337 Bei anhaltender Augenreizung:

P338 Eventuell vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

P340 Die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P341 Bei Atembeschwerden die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P342 Bei Symptomen der Atemwege:

P350 Behutsam mit viel Wasser und Seife waschen.

P351 Einige Minuten lang behutsam mit Wasser ausspülen.

P352 Mit viel Wasser und Seife waschen.

P353 Haut mit Wasser abwaschen/duschen.

P360 Vor Ablegen der Kleidung kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit reichlich Wasser abwaschen.

P361 Alle kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen.

P362 Kontaminierte Kleidung ausziehen und vor erneutem Tragen waschen.

P363 Kontaminierte Kleidung vor erneutem Tragen waschen.

P370 Bei Brand:

P371 Bei Großbrand und großen Mengen:

P372 Explosionsgefahr bei Brand.

P373 KEINE Brandbekämpfung, wenn das Feuer explosive Stoffe/Gemische bzw. Erzeugnisse erreicht.

P374 Brandbekämpfung mit den üblichen Vorsichtsmaßnahmen aus angemessener Entfernung.

P-Codes P-Sätze

P375 Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.

P376 Undichtigkeit beseitigen, falls gefahrlos möglich.

P377 Brand bei Gasleckage: Nicht löschen, bis Leckage gefahrlos gestoppt werden kann.

P378 ... zum Löschen verwenden.

P380 Umgebung räumen.

P381 Entfernung sämtlicher Zündquellen, falls gefahrlos möglich.

P390 Ausgetretene Mengen zur Vermeidung von Materialschäden aufnehmen.

P391 Ausgetretene Mengen auffangen.

P301+P310 BEI VERSCHLUCKEN: Sofort GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

P301+P312 BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

P301+P330+P331 BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen.

P302+P334 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: In kaltes Wasser tauchen/nassen Verband anlegen.

P302+P350 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Vorsichtig mit reichlich Wasser und Seife waschen.

P302+P352 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen.

P303+P361+P353 BEI BERÜHRUNG MIT DER HAUT (oder dem Haar): Alle Kontaminierten Kleidungsstücke sofort ausziehen. Haut mit Wasser abwaschen/duschen.

P304+P340 BEI EINATMEN: An die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P304+P341 BEI EINATMEN: Bei Atembeschwerden die betroffene Person an die frische Luft bringen und in einer Position ruhigstellen, die das Atmen erleichtert.

P-Codes P-Sätze

P305+P351+P338 BEI BERÜHRUNG MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang vorsichtig mit Wasser ausspülen. Eventuell. vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter ausspülen.

P306+P360 BEI BERÜHRUNG MIT DER KLEIDUNG: Vor Ablegen der Kleidung Kontaminierte Kleidung und Haut sofort mit viel Wasser abwaschen.

P307+P311 BEI Exposition: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

P308+P313 BEI Exposition oder Verdacht: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P309+P311 BEI Exposition oder Unwohlsein: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

P332+P313 Bei Hautreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P333+P313 Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P335+P334 Lose Partikel von der Haut abbürsten. In kaltes Wasser tauchen/ nassen Verband anlegen.

P337+P313 Bei anhaltender Augenreizung: Ärztlichen Rat einholen/ärztliche Hilfe hinzuziehen.

P342+P311 Bei Symptomen der Atemwege: GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.

P370+P376 Bei Brand: Undichtigkeit beseitigen, falls gefahrlos möglich.

P370+P378 Bei Brand: ... zum Löschen verwenden.

P370+P380 Bei Brand: Umgebung räumen.

P370+P380+P375 Bei Brand: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brandbekämpfung aus der Entfernung.

P371+P380+P375 Bei Großbrand und großen Mengen: Umgebung räumen. Wegen Explosionsgefahr Brand aus der Entfernung bekämpfen.

P401 ... aufbewahren.

P-Codes P-Sätze

P402 An einem trockenen Ort aufbewahren.

P403 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

P404 In einem geschlossenen Behälter aufbewahren.

P405 Unter Verschluss aufbewahren.

P406 In korrosionsfestem/... Behälter mit korrosionsfester Auskleidung aufbewahren.

P407 Luftspalt zwischen Stapeln/Paletten lassen.

P410 Vor Sonnenbestrahlung schützen.

P411 Bei Temperaturen nicht über ...°C/...°F aufbewahren.

P412 Nicht Temperaturen über 50 °C/ 122 °F aussetzen.

P413 Schüttgut in Mengen von mehr als ... kg/...lbs bei Temperaturen nicht über ...
°C/...°F aufbewahren.

P420 Von anderen Materialien entfernt aufbewahren.

P422 Inhalt in/unter ... aufbewahren

P402+P404 An einem trockenen Ort aufbewahren. In einem geschlossenen Behälter
aufbewahren.

P403+P233 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Behälter dicht verschlossen halten.

P403+P235 An einem gut belüfteten Ort aufbewahren. Kühl halten.

P410+P403 Vor Sonnenbestrahlung schützen. An einem gut belüfteten Ort aufbewahren.

P410+P412 Vor Sonnenbestrahlung schützen. Nicht Temperaturen über 50 °C/ 122 °F
aussetzen.

P411+P235 Bei Temperaturen nicht über ... °C/... °F aufbewahren. Kühl halten.

P501 Inhalt/Behälter ... zuführen.

P502 Informationen zur Wiederverwendung/ Wiederverwertung beim Hersteller/
Lieferanten erfragen.

6.2. Verwendete Lösungen und Puffer

Alle Puffer und Lösungen wurden mit bidest. Wasser angesetzt. Alle Puffer enthielten des Weiteren zur Konservierung 0.02 % Natriumazid. Die pH-Werte der verwendeten Puffer wurden mit einem digitalen pH-Meter eingestellt. In der folgenden Tabelle 30 sind alle verwendeten Puffer und Lösungen aufgelistet.

Tabelle 30: Auflistung aller verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ammoniumperoxodisulfat-Lösung (APS Lösung, disk. SDS-PAGE)	10 % (w/v) APS
Anodenpuffer I (Semi-Dry Western-Blot)	300 mM Tris/HCl 10 % (v/v) Methanol, pH 10.4
Anodenpuffer II (Semi-Dry Western-Blot)	25 mM Tris/HCl 10 % (v/v) Methanol, pH 10.4
Bradford-Lösung	8.5 % (v/v) Phosphorsäure 4.8 % (v/v) Ethanol 0.01 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R 250
Dialysepuffer (EclspC)	50 mM Tris /HCl 50 mM NaCl 2 mM Dithiothreitol, pH 8.0
Dialysepuffer (AtlspD)	50 mM Tris /HCl 250 mM NaCl 2 mM Dithiothreitol, pH 8.0
Entfärbelösung (disk. SDS-PAGE)	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure
Färbelösung (disk. SDS-PAGE)	40 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure 0.2 % (w/v) Coomassie Brillant Blue G 250
IPTG-Lösung	1 M IPTG

Bezeichnung	Zusammensetzung
Kathodenpuffer (Semi-Dry Western-Blot)	25 mM Tris/HCl 10 % (v/v) Methanol 192 mM Glycin, pH 9.4
Laufpuffer (disk. SDS-PAGE)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0.1 % (w/v) SDS
LB-Agar-Medium	10 g/L Caseinhydrolysat 5 g/L Hefeextrakt 5 g/L Natriumchlorid 15 g/L Agar-Agar
LB-Glycerin-Medium	50 % (v/v) LB-Medium 50 % (v/v) Glycerin
LB-Medium	10 g/L Caseinhydrolysat 5 g/L Hefeextrakt 5 g/L Natriumchlorid
Loading Dye (Agarose-Gelelektrophorese)	50 % Glycerin 0.25 % Bromphenolblau in TAE-Puffer 0.25 % Xylencyanol in TAE-Puffer
Magnesium-Lösung (chemisch kompetente Zellen nach HANAHAN)	1 M MgCl 2 x Hexahydrat 1 M MgSO ₄
Probenpuffer (disk. SDS-PAGE)	100 mM Tris/HCl 20 % (w/v) Glycerin 4 % (w/v) SDS 4 % (v/v) Mercaptoethanol 0.05 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8
Puffer A (PvlspD) (Nickel-Affinitätschromatographie)	10 mM Imidazol 35 mM Tris/HCl 300 mM NaCl 5 % Glycerin, pH 8.0

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer B (<i>PvIs</i>pD) (Nickel-Affinitätschromatographie)	1000 mM Imidazol 35 mM Tris/HCl 300 mM NaCl 5 % Glycerin, pH 8.0
Puffer C (<i>PvIs</i>pD) (Nickel-Affinitätschromatographie)	50 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 2 mM Dithiothreitol 5 % Glycerin, pH 8.0
Puffer A (<i>Ecl</i>pE) (Nickel-Affinitätschromatographie)	20 mM Imidazol 35 mM Tris/HCl 300 mM NaCl, pH 8.0
Puffer B (<i>Ecl</i>pE) (Nickel-Affinitätschromatographie)	500 mM Imidazol 35 mM Tris/HCl 300 mM NaCl, pH 8.0
Puffer C (<i>Ecl</i>pE) (Nickel-Affinitätschromatographie)	100 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 5 mM Dithiothreitol, pH 8.0
Puffer A (<i>Ecl</i>pC) (Nickel-Affinitätschromatographie)	20 mM Imidazol 100 mM Tris/HCl 500 mM NaCl, pH 8.0
Puffer B (<i>Ecl</i>pC) (Nickel-Affinitätschromatographie)	500 mM Imidazol 100 mM Tris/HCl 500 mM NaCl, pH 8.0
Puffer A (<i>Atl</i>pD) (Nickel-Affinitätschromatographie)	50 mM Tris/HCl 2 mM Dithiothreitol, pH 8.0
Puffer B (<i>Atl</i>pD) (Nickel-Affinitätschromatographie)	500 mM Imidazol 50 mM Tris/HCl 2 M NaCl 2 mM Dithiothreitol, pH 8.0

Bezeichnung	Zusammensetzung
Puffer für fotometrische Assays (IspD, IspE, IspC)	50 mM Tris pH eingestellt mit HCl
RF 1-Puffer (chemisch kompetente Zellen nach HANAHAN)	100 mM RbCl 50 mM MnCl ₂ 30 mM Kaliumacetat 10 mM CaCl ₂ 15 % (w/v) Glycerin pH 5.8 (eingestellt mit Essigsäure)
RF 2-Puffer (chemisch kompetente Zellen nach HANAHAN)	10 mM MOPS 10 mM RbCl 75 mM CaCl ₂ 15 % (w/v) Glycerin pH 6.3 (eingestellt mit NaOH (1 M))
Saline	0.9 % (w/v) NaCl
Sammelgelpuffer (disk. SDS-PAGE, 2-fach)	250 mM Tris/HCl 0.2 % (w/v) SDS, pH 6.3
SOB-Medium	20 g/L Caseinhydrolysat 5 g/L Hefeextrakt 0.5 g/L Natriumchlorid 10 mL MgCl ₂ (1 M, steril filtriert)* 10 mL MgSO ₄ (1 M, steril filtriert)* *Zugabe nach dem Autoklavieren
SOC-Medium	980 mL SOB-Medium 20 mL Glucose-Lösung (20 % (w/v), steril filtriert)
TAE-Puffer (Agarose-Gelelektrophorese)	40 mM Tris 2 mM Na ₂ -EDTA pH 8.2 (eingestellt mit Essigsäure)
Taq-DNA-Polymerase-Puffer (10-fach)	100 mM Tris/HCl 500 mM KCl 1 % (m/v) Triton X-100, pH 8.8

Bezeichnung	Zusammensetzung
Trenngelpuffer (disk. SDS-PAGE, 4-fach)	1.5 M Tris/HCl 0.4 % (w/v) SDS, pH 8.8
Waschpuffer (Semi-Dry Western-Blot)	20 mM Tris/HCl 150 mM NaCl 3 mM KCl 0.05 % (v/v) Tween 20, pH 7.4

6.3. Weitere verwendete Reagenzien und Materialien

In der folgenden Tabelle 31 sind alle verwendeten Reagenzien und Materialien aufgelistet.

Tabelle 31: Weitere verwendete Reagenzien und Materialien

Bezeichnung	Hersteller/Quelle	Spezifikation/Beschreibung
Reagenzien für die PCR		
dNTPs	Bioline GmbH (Luckenwalde, Deutschland)	dNTPs (1:1:1:1) dATP, dCTP, dGTP, dTTP (10 mM)
Primer	Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland)	Konzentration: 100 µM
Taq-DNA-Polymerase (Thermus aquaticus) (inkl. Puffer)	Instituts-interne Herstellung (Focke 2011)	10 U/µL (vor der Verwendung erfolgte eine 1:10-Verdünnung)
Reagenzien für den Restriktionsverdau und die Ligation		
BamHI (inkl. Puffer)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M., Deutschland)	20.000 U/mL

Bezeichnung	Hersteller/Quelle	Spezifikation/Beschreibung
Reagenzien für den Restriktionsverdau und die Ligation		
NdeI (inkl. Puffer)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M., Deutschland)	20.000 U/mL
XhoI (inkl. Puffer)		20.000 U/mL
HindIII (inkl. Puffer)		20.000 U/mL
T ₄ -DNA-Ligase (inkl. Puffer)		400.000 U/mL
weitere Reagenzien und Materialien		
Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Devices	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	max. Volumen: 15 mL; 10.000 NMWL (10 kDa) / 30.000 NMWL (30 kDa)
Amicon Stirred Cell	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	Volumen: 50 mL 10.000 NMWL (10 kDa) / 30.000 NMWL (30 kDa)
anti-penta-His-Antikörper	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)	Mouse Anti-(H)5 lyophilisiert, 100 µg
anti-Maus-IgG-HRP- linkedAntikörper	Promega GmbH (Mannheim, Deutschland)	Anti-Mouse IgG HRP Conjugate 1 mg/mL
Avidin	Fisher Scientific-Germany GmbH (Schwerte, Deutschland)	10 mg
Bovine Serum Albumin, BSA (Bos primigenius taurus)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)	B4287-1G MW = 66 kDa (Größenmarker GF)

Bezeichnung	Hersteller/Quelle	Spezifikation/Beschreibung
weitere Reagenzien und Materialien		
Bovine Serum Albumin, BSA (<i>Bos primigenius taurus</i>)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M., Deutschland)	20 mg/mL (Standard Bradford Bestimmung)
Dialysierschläuche	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	Visking Typ 27/32
<i>E. coli</i> ArcticExpress(DE3)	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen, Deutschland)	Arctic Express(DE3) TM Competent Cells (10 * 0.1 mL)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Böblingen, Deutschland)	BL21(DE3) TM Competent Cells (10 * 0.1 mL)
Filter (Western-Blot)	Schleicher u. Schuell Bioscience GmbH (Dassel, Deutschland)	Gel-Blotting Papier, 200 x 200 mm
Halbmikroküvetten	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	Polymethylmethacrylat, 300 – 900 nm
Milchpulver	Avidity LLC (Colorado, USA)	Blotting grade, pulv., fettarm
peqGOLD DNA-Leiter Mix	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)	100 - 10.000 bp 21 Fragmente in 10 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA, 500 ng DNA/μl

Bezeichnung	Hersteller/Quelle	Spezifikation/Beschreibung
weitere Reagenzien und Materialien		
PVDF-Membran	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	Immobilon™-P, Typ: PVDF Porengröße: 0.45 µm
peqGOLD Gel Extraction Kit	peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)	Art.-Nr.: 12-2501-02
Phenyl-Sepharose 6 Fast Flow	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)	Agarose, 6% crosslinked, Partikelgröße 45 – 165 µm
Protino® Ni-NTA-Agarose	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)	6 % beaded agarose (crosslinked), precharged with Nickel, Partikelgröße 45 – 165 µm
QIAprep Spin Miniprep Kit	QIAGEN GmbH (Hilden, Deutschland)	Art.-Nr.: 27106
SDS-Marker (14 – 66 kDa)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland)	14 – 66 kDa, 7 Proteine (SDS7)
SDS-Marker (14.4 – 116 kDa)	peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)	14.4 - 116 kDa, 7 Proteine (Protein-Marker I)
SDS-Marker (20– 120 kDa)	peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)	20 - 120 kDa, 6 Proteine (Protein-Marker III)

Bezeichnung	Hersteller/Quelle	Spezifikation/Beschreibung
weitere Reagenzien und Materialien		
Semi-Dry Blotting Unit	Biostep GmbH (Jahnsdorf, Deutschland)	Semi-Dry-Blotter, 20 x 20 cm
Spectra TM Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fisher Scientific-Germany GmbH (Schwerte, Deutschland)	10 – 260 kDa, 7 Proteine (vorgefärbt, vers. Farben)

6.4. Geräte

In der folgenden Tabelle 32 sind alle verwendeten Geräte aufgelistet.

Tabelle 32: Auflistung aller verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Analysenwaage	Kern und Sohn GmbH (Balingen, Deutschland)	Kern ABJ 220-4M Maximalgewicht: 220 g Genauigkeit: 0.1 mg
Autoklav	Systec GmbH (Wettenberg, Deutschland)	Horizontaler Tischaufoklav: DX23
		Vertikaler Standaufoklav: VX95
Barcode-Drucker	Brother (Bad Vilbel, Deutschland)	Brother CI-550
Bidestille	Heraeus Instruments GmbH (Osterode, Deutschland)	Destamat [®] Bi 18 E
Brutschrank	Fisher Scientific-Germany GmbH (Schwerte, Deutschland)	Thermo Scientific Heraeus Function Line Typ B20, max. 70 °C

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Clean Bench	Thermo Fisher Scientific Inc. (Massachusetts, USA)	Thermo Scientific Safe 2020
Digitalkamera	Casio Computer Co., LTD (Tokyo, Japan)	EX-Z33 Exilim
Dispenser	BioTek Germany (Bad Friedrichshall, Deutschland)	MultiFlo Microplate Dispenser
Eismaschine	AB Ninolab (Upplands Väsby, Schweden)	Ismaskin IQ-135
FPLC-Anlage	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)	ÄKTAprime plus, System No.: 1313261/1324656
Geldokumentationseinheit	Biostep GmbH (Jahnsdorf, Deutschland)	Biostep Dark Hood DH- 40/50
Laminar Flow Fisher	Scientific-Germany GmbH (Schwerte, Deutschland)	HERAsafe 2020
French Press	Constant Systems LTD (Northants, Vereinigtes Königreich)	Constant Cell Disruption System
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)	handelsüblich
Gefrierschrank (-80 °C)	New Brunswick Scientific (New Jersey, USA)	Ultra Low Temperature Freezer, U570 Premium
Gradienten-Thermocycler	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)	Biometra TGradient Thermocycler

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Grobwaage	Mettler Toledo GmbH (Gießen, Deutschland)	Balance Classic Light PL1501-S/00 Maximalgewicht: Genauigkeit: 0.1 g
Heizblock	Techne Inc. (Burlington, USA)	DRI-Block, DB 2A (8 min, 90 °C)
Kühlkabinett +6 °C	UniEquip GmbH (Martinsried, Deutschland)	Unichrome 1500
Kühlschrank +6 °C	Liebherr (Bulle, Schweiz)	Mediline, handelsüblich
NMR-Spektrometer	Bruker AXS GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	DRX 500 MHz Spektrometer 5 mm BBI Probenkopf mit ATM und z-Gradient B-ACS 120 Probenwechsler Software: TOPSPIN 1.3
NMR-Spektrometer	Bruker AXS GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	AVANCEI 400 MHz Spektrometer 5 mm BBO Probenkopf mit ATM und z-Gradient B-ACS 120 Probenwechsler Software: TOPSPIN 2.1
NMR-Spektrometer	Bruker AXS GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	AVANCEII 400 MHz Spektrometer 5 mm BBI Probenkopf mit ATM und z-Gradient B-ACS 120 Probenwechsler Software: TOPSPIN 3.0
pH-Meter	Mettler Toledo GmbH (Gießen, Deutschland)	SevenEasy Meter, S20K pH/mV/Temperatur Meter with Inlab® Expert Pro pH- Elektrode

Gerät	Hersteller	Spezifikation
Pipettierrobotor	Hamilton (Reno, USA)	Microlab Star LET
Plattenleser	Molecular Devices (Germany) GmbH (Biberach an der Riss, Deutschland)	SpectraMax M2 und M5 Multi Mode Microplate Readers
Probenaufgabeschleife	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)	Volumen: 50 mL, 5 mL und 2 mL
Schüttler	Fisher Scientific-Germany GmbH (Schwerte, Deutschland)	MaxQTM 8000 (kühlbar)
Spannungsquelle für Agarosegele	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)	Power Pac 1000
Spannungsquelle für Polyacrylamidgele	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)	Elektrophoresis Power Supply ESP 600
Spülmaschine	Miele Professional (Gütersloh, Deutschland)	handelsüblich
Thermocycler	Biometra GmbH (Göttingen, Deutschland)	Biometra T ₃₀₀₀ Thermocycler Biometra Thermocycler TGradient
Tischschüttler	Edmund Bühler GmbH (Hechingen, Deutschland)	TH 30 (5 °C über Raumtemperatur bis 50 °C)
Tischzentrifuge	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)	Microfuge® 16 Centrifuge
Ultraschallgerät	Bandelin electronic GmbH & Co. KG (Berlin, Deutschland)	Sonopuls HD 2200 Spitzen: MS72 und VS72

Gerät	Hersteller	Spezifikation
UV/Vis-Fotometer	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg, Deutschland)	Ultrospec 4300 pro UV/Visible Spektrofotometer
Vortex	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach, Deutschland)	Reax Top
Wasseraufbereitungsanlage	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)	Merck Millipore Direct-Q 3 UV-R
Wasserbad	Thermo Haake GmbH (Karlsruhe, Deutschland)	Haake D8/Haake G
Zentrifuge	Fisher Scientific-Germany GmbH (Schwerte, Deutschland)	Sorvall® RC 6 Plus
Zentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH (Osterode, Deutschland)	Sigma Laboratory Centrifuge 3K15 Sigma Laboratory Centrifuge 3-16 PK

6.5. Primer

In der folgenden Tabelle 33 sind alle verwendeten Primer aufgelistet.

Tabelle 33: Auflistung der verwendeten Primer

Primer (Verwendung)	Endonuklease	Sequenz 5' → 3'
pET-Fw (Screening)	-	TAATACGACTCACTATAGGG
pET-Re (Screening)	-	CTAGTTATTGCTCAGCGG
PvispDNdelfw	<i>NdeI</i>	ATTATT CATATG TCGCTGCACAAGAAGAACATCCA CGCC
PvispDXholrev	<i>XhoI</i>	ACACAC CTCGAG CTCGTAGTAAAAGTGGCGGTACA GG
PvispDBamHlfw	<i>BamHI</i>	ATAATAGGATCC CATCATCACCACCATCAT GGTTCC GATGATGACGACAAG TCGCTGCACAAGAAGAACA TCCACGC
PvispDHindIIIrev	<i>HindIII</i>	ACACAC AAGCTT TTTACTCGTAGTAAAAGTGGCGGT ACAGGACGCGCTGCTTACCGCCTAGGGAGTGG

CATATG	= <i>NdeI</i> -Schnittstelle
CTCGAG	= <i>XhoI</i> -Schnittstelle
GGATCC	= <i>BamHI</i> -Schnittstelle
CATCATCACCACCATCAT	= His ₆ -Tag
GGTTCC	= GS-Linker
GATGATGACGACAAG	= Enterokinase-Schnittstelle
AAGCTT	= <i>HindIII</i> -Schnittstelle

6.6. Arbeitsanweisungen

6.6.1. Autoklavierbedingungen

In der folgenden Tabelle 34 sind alle Autoklavierbedingungen aufgelistet.

Tabelle 34: Auflistung der Autoklavierbedingungen

Programm	Sterilisier- temperatur [°C]	Sterilisierzeit [min]	Trocknungs- zeit [min]	Vakuum zyklen [int]
Abfall	121	20	0	0
Festkörper	121	20	10	6
Flüssigkeiten	121	20	0	0

6.6.2. Arbeitsanweisung QIAprep Spin Miniprep Kit

- 10 mL einer 50-mL-Übernachtskultur des entsprechenden Bakterienstammes abnehmen, zentrifugieren (30 min, 4500 rpm, 4 °C) und Überstand verwerfen
- das Zellmaterial in 250 µL Puffer P1 resuspendieren und in ein 1.5 mL Cap überführen
- 250 µL Puffer P2 zugeben, durch 4- bis 6-maliges Wenden vermischen
- 350 µL Puffer N3 zugeben, durch 4- bis 6-maliges Wenden vermischen
- bei 17000 rpm für 10 min zentrifugieren
- Überstand in QIAprep Spin Column (Säule) überführen
- 1 min zentrifugieren und Durchfluss verwerfen
- 500 µL Puffer PB auf die Säule geben und 1 min zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- 750 µL Puffer PE auf die Säule geben und 1 min zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- zum Trocknen der Säule erneut 1 min zentrifugieren
- Säule auf neues 1.5 mL Cap setzen

- Elution: zweimal je 25 µL steriles bidest. Wasser auf die Säule geben, je 1 min stehen lassen, je 1 min zentrifugieren (Eluat in einem Cap sammeln)

Über die Zusammensetzung der Puffer macht der Hersteller keine genauen Angaben.

6.6.3. Arbeitsanweisung peqGOLD Gel Extraction Kit

- DNA-Bande aus dem Agarosegel ausschneiden und in ein 2 mL Cap überführen
- gleiches Volumen an XP2 Binde-Puffer hinzugeben
- Caps bei 55 – 65 °C im Heizbad inkubieren, alle 2 - 3 min vortexen
- nach dem vollständigen Lösen der Agarose muss der Binde-Puffer eine hellgelbe Farbe aufweisen. Ist der Puffer rötlich gefärbt, wird 3 M Na-Acetat-Lösung hinzugegeben, bis die Mischung in helles Gelb umschlägt
- Lösung in 750 µL-Schritten auf PerfectBind DNA Column (Säule) geben, jeweils 1 min bei 9500 rpm zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Waschen I: 300 µL XP2 Binde-Puffer auf die Säule geben, 1 min zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- Waschen II: 750 µL des SPW Wasch-Puffers auf die Säule geben, 1 min zentrifugieren, Durchfluss verwerfen
- zum Trocknen der Säule erneut 1 min zentrifugieren
- Säule auf das neues Cap setzen
- Elution: zweimal je 25 µL steriles bidest. Wasser auf die Säule geben, je 1 min stehen lassen, je 1 min zentrifugieren (Eluat in einem Cap sammeln)

Über die Zusammensetzung der Puffer macht der Hersteller keine Angaben.

6.7. Software

- Die Software „ApE – A plasmid Editor v2.0.47“ wurde zur Erstellung einer DNA-Sequenzen und Alignments genutzt.
- Die Online-Software „ExPASy“ wurde zur Berechnung des Molekulargewichts und des isoelektrischen Punkts anhand der Aminosäuresequenz verwendet:

<http://web.expasy.org/protparam/>

- Die Software „GENTle V 1.9.4“ wurde zur Erstellung einer DNA-Datenbank genutzt.
- Die Software „MestReNova v9.0.1-13254“ wurde zur Auswertung der NMR-Spektren genutzt.
- Die Software „SWIFT II Instrument Control Version 2.06“ wurde zur Auswertung der Signale des Spektrofotometers verwendet.
- Die Software „PrimeView 5.0“ wurde zur Auswertung der Signale der FPLC-Anlagen genutzt.
- Die Software „Soft Max Pro 5.4.3“ und „Soft Max Pro 6.1“ wurde zur Auswertung der Signale der Plattenleser verwendet.
- Die Software „Biostep Argus X1 Version 4.1.10“ wurde zur Bearbeitung von Fotos verwendet, die mittels Gel-Dokumentationssystem aufgenommen wurden.
- Die Software „chimera-1.10.1“ wurde zur Darstellung von Proteinstrukturen verwendet.
- Die online-Software „SwissDock“ wurde zu Dockingexperimenten verwendet.
- Die Software „OriginPro 9.1“ der Firma OriginLab Corporation (Massachusetts, USA) wurde zur Erstellung von Grafiken verwendet.

6.7.1. Diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (disk. SDS-Page)

Zur Auftrennung von Proteingemischen, wie z.B. Zellextrakte oder säulenchromatographisch gereinigte Proteinfractionen, wurde in dieser Arbeit die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (disk. SDS-PAGE) nach Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Sammel- und Trenngel wurden in vertikalen Gelgießständen selbst gegossen. Die Zusammensetzung der Trenn- und des Sammelgels für die Polyacrylamidgelelektrophorese ist in Tabelle 35 dargestellt.

Tabelle 35: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels

Bestandteile	Trenngel (12 %-ig)	Sammelgel (4 %-ig)
Bidest. Wasser	4.5 mL	2 mL
Puffer	2.5 mL Trenngelpuffer (4-fach)	2.5 mL Sammelgelpuffer (2-fach)
Acrylamid-Lösung	3 mL	0.5 mL
APS-Lösung (10 %-ig)	50 µL	50 µL
TEMED-Lösung	5 µL	5 µL

Die Gele wurden in einer vertikalen Kammer mit einem Laufpuffer bei 35 mA entwickelt.

Zur Abschätzung des Molekulargewichts der Proteine wurden jeweils kommerziell erworbene Molekulargewichtsmarker verwendet (siehe Abbildung 66 a, b und c).

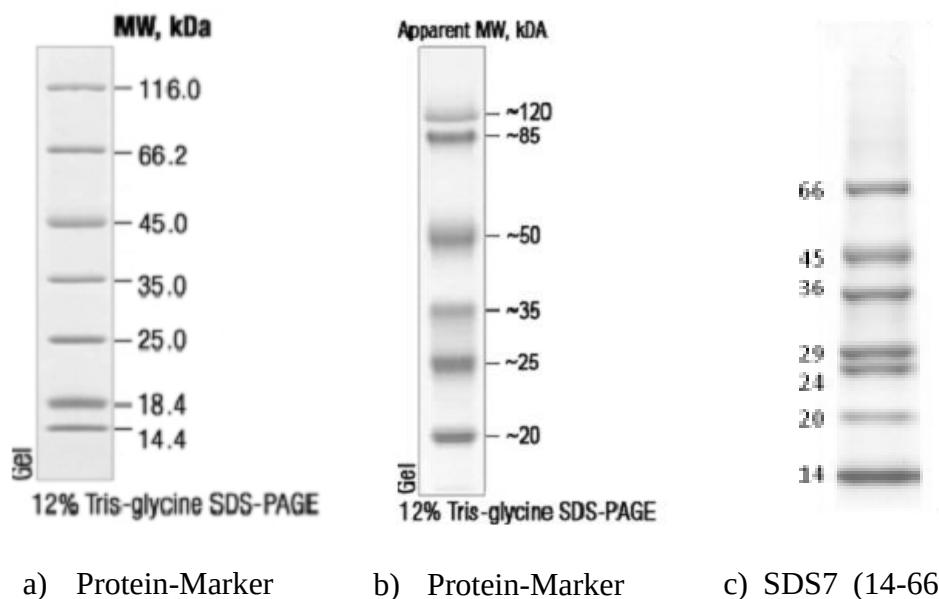


Abbildung 66: verwendete Molekulargewichtsmarker

Von den Proteinproben wurden 50 bis 100 μ L mit 50 μ L SDS-Probenpuffer versetzt und das Gemisch ca. 8 min bei 90 °C erhitzt. 10 μ L der so vorbereiteten Proben bzw. der Molekulargewichtsmarker wurden für die Analyse mittels disk. SDS-PAGE verwendet.

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit Hilfe des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G250. Das Gel wurde zunächst 30 min mit 20 mL Färbelösung inkubiert und dann so lange mit Entfärbepuffer behandelt, bis die Banden deutlich sichtbar waren. Die Digitalisierung der Elektropherogramme erfolgte mit Hilfe einer Geldokumentationseinheit.

Die Spezifikationen der verwendeten Puffer und Lösungen bzw. Reagenzien sind im Anhang dieser Arbeit dargestellt (siehe Anhang 6.2., Tabelle 30 bzw. siehe Anhang 6.3., Tabelle 31).

6.8. Verwendete Vektoren

6.8.1. Vektorkarte pET-22b(+)-Vektor

In Abbildung 67 ist die Vektorkarte des verwendeten pET-22b(+)-Vektors dargestellt.

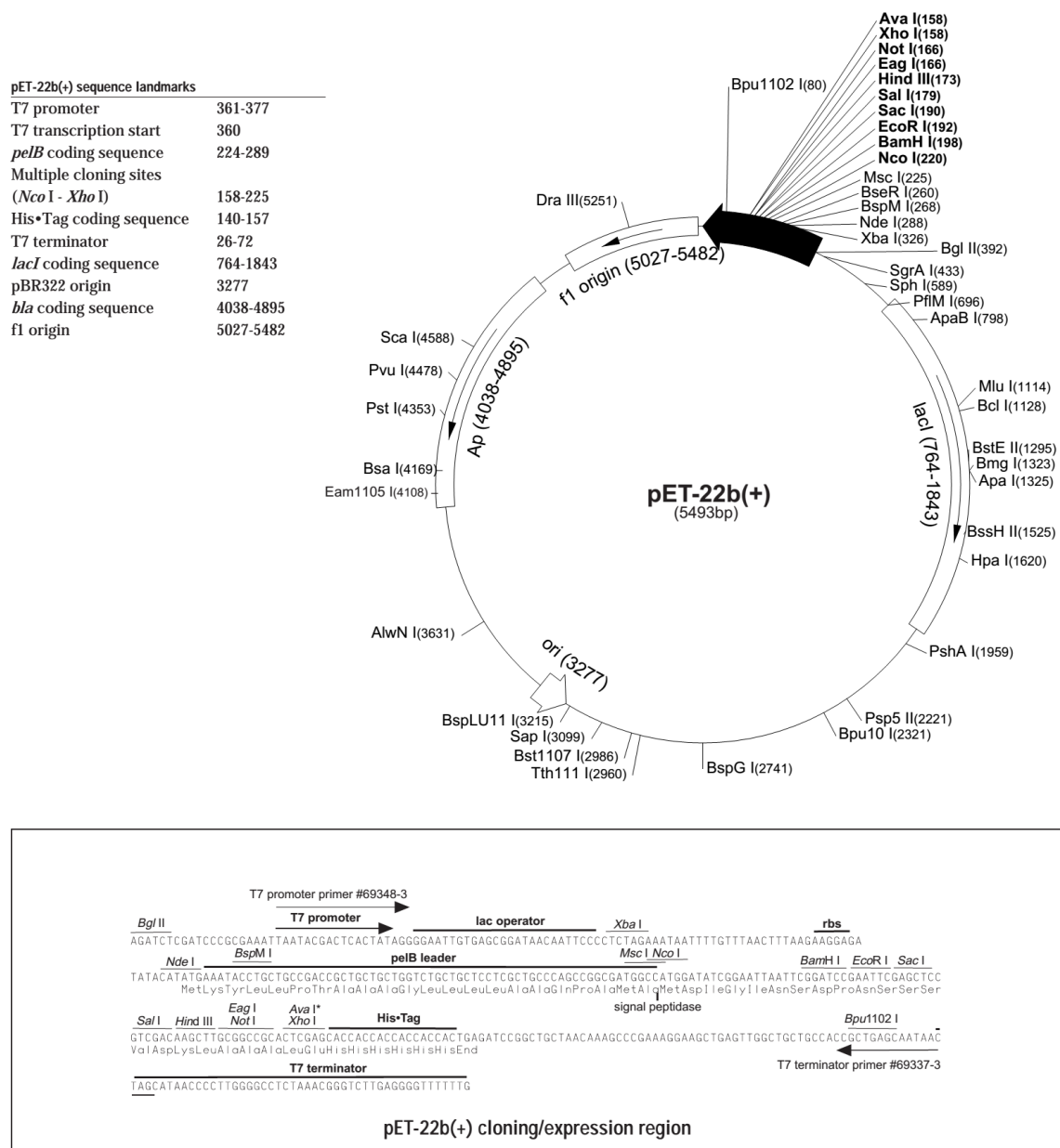
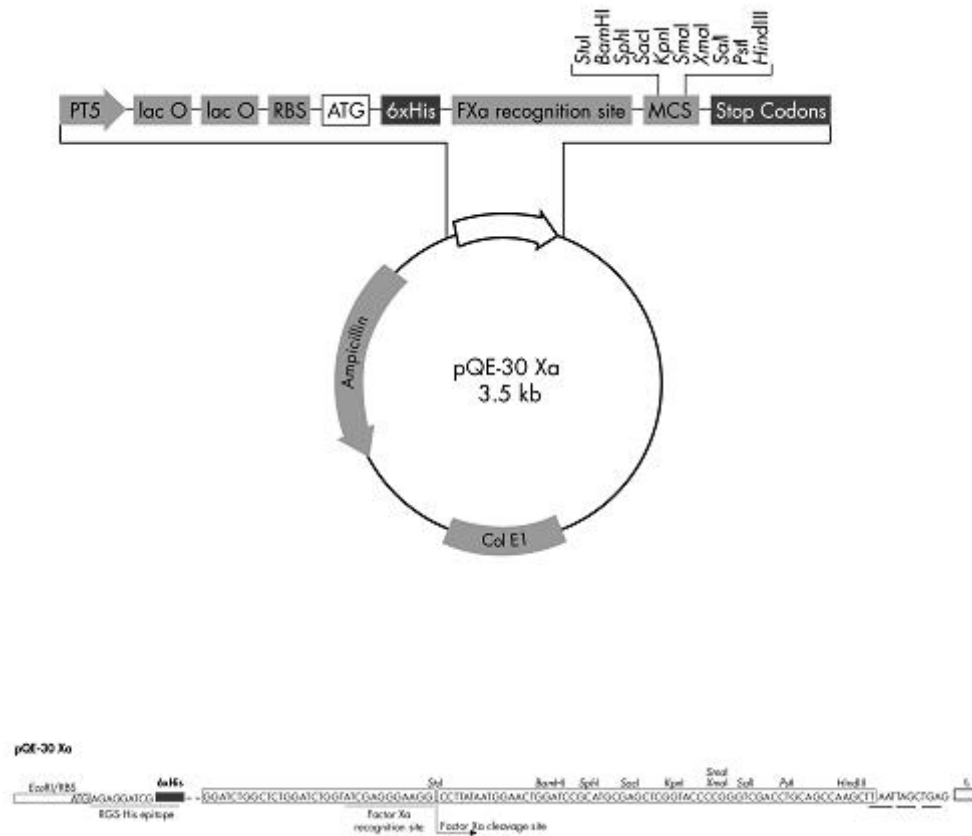


Abbildung 67: Vektorkarte des pET-22b(+)-Vektors (Novagen, 2015)



6.8.3. Vektorsequenz pNC0113-Vektor

Folgend ist die Sequenz des verwendeten pNC0113-Vektors ohne Hisactophilin dargestellt.

```
CTCGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAATTGTGAGCGGAT
AACAATTTACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGGGAGGATCCGTCGACCTGCAGCCAAGCT
TAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGTTGATAGATCCAGTAATGACCTCAGAACTCCATCTGGATTTGTTGAGAA
CGCTCGTTGCCGCCGGCGTTTTTTATTGGTGAGAATCCAAGCTAGCTTGGCGAGATTTTCAGGAGCTAAG
GAAGCTAAATGGAGAAAAAATCACTGGATATACCACCGTTGATATATCCCAATGGCATCGTAAAGAACAT
TTTGAGGCATTTGAGTCAGTTGCTCAATGTACCTATAACCAGACCGTTGAGCTGGATATTACGGCCTTTTTAAA
GACCGTAAAGAAAAATAAGCACAAGTTTTATCCGGCCTTTATTCACATTCTTGCCCGCCTGATGAATGCTCAT
CCGGAATTTTCGTATGGCAATGAAAGACGGTGAGCTGGTGATATGGGATAGTGTTACCCTTGTTACACCGTT
TTCCATGAGCAAACCTGAAACGTTTTTCATCGCTCTGGAGTGAATACCACGACGATTTCCGGCAGTTTCTACACA
TATATTCGAAGATGTGGCGTGTTACGGTGAAAACCTGGCCTATTTCCCTAAAGGGTTTATTGAGAATATGTT
TTTCGTCTCAGCCAATCCCTGGGTGAGTTTACCAGTTTTGATTTAAACGTGGCCAATATGGACAACTTCTTCG
CCCCGTTTTTACCATGCATGGGCAAATATTATACGCAAGGCGACAAGGTGCTGATGCCGCTGGCGATTGAG
GTTTCATCATGCCGCTGTGATGGCTTCCATGTCGGCAGAAATGCTTAATGAATTACAACAGTACTGCGATGAGT
GGCAGGGCGGGGCGTAATTTTTTAAAGGCAGTTATTGGTGCCCTTAAACGCCTGGGGTAATGACTCTCTAGC
TTGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTG
AACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCTCTAGAGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAAC
CTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCG
TCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGA
GTGTATACTGGCTTAACCTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATAC
CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTC
GGTCTGTGCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGG
ATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCT
GGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAA
CCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCTGTTCCGACCCTG
CCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCAATGCTCACGCTGTAGGT
ATCTCAGTTCGGTGATAGGTGTTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTGAGCCCGACCGCT
GCGCCTTATCCGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC
TGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACG
GCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTA
GCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGCAAGCAGCAGATTACGCGCA
```

GAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCAC
GTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTT
TAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATC
TCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGCTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGG
GCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAAT
AAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAA
TTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGG
CATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACA
TGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCG
CAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCG
TCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGG
CGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTT
CAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGA
ATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTA
TTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCC
CGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATAGGCGTATCACGA
GGCCCTTTCGTCTTCAC

6.9. Verwendete Primer für die Klonierung und daraus resultierende Konstrukte

6.9.1. *PvispD* im pET-22b(+)-Vektor, C-terminal, His₆-Tag

Klonierung des *PvispD*-Gens in einen pET-22b(+)-Vektor mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *NdeI/XhoI* und Affinitätstag C-terminal (His₆-Tag).

Vorwärts-Primer (*PvispD**NdeI*fw)

5'-ATTATTCATATGTCGCTGCACAAGAAGAACATCCACGCC-3'

Rückwärts-Primer (*PvispD**XhoI*rev)

5'-ACACACCTCGAGCTCGTAGTAAAAGTGGCGGTACAGG-3'

Resultierendes Konstrukt:

ATTATTCATATGTCGCTGCACAAGAAGAACATCCACGCCATTTTGCTCTGCGGTGGCATCGGCCAAC
GTACGGAGTTGGTAGCCGTAAGCAATTCCTTAAGCTGAATGATGTCCCTCTCTTCGTCTACTCCTTT
AATTTGTTTGTGAAATGCAATTTAATTAAGCTATCACCTTGTGTGCGACCCGAACATTTCCAGCA
CGTCATCGAGAGCATTAAACGCCATAACGCTTCTCTTCTGCGTCGCAAGCACCAGCGTGGTTTCCTG
CGCCGTGGTCATTGAAGAATGTGTTGGCCTCGTCGGGTGAGCAATCCGAGGGCGATGCCAGCGG
CGCTCTCCATTTTTTAAAGAAGAATAAATATATCCTGTATGATAATGAGAAGGGCAAGTGCGTCACC
AACTTGGATGAGCTGCTCAGCGATGTGACGGCCACGAAGGGCCAATACGTATCAGAGGTTGACGA
GGTGGACGAGGTGAAGCCAGGCGATGTAACTCAAATCGATACAAGCTCATTGCCTGGTGGAGA
GCGGCCGCGAGCGTGCTGACTCCCTGTTGAATGCGCTGCGTGGTCTGGACTTGCGCGTGCAAACC
GGTGAGTACATCAGCCAGCTGTTGCGCGGTGGTGGCACGGACGAAGCGGGTAAAGGCGATGGCG
CGGATAAAGGTGATAAATCGGATGGTGTGGATGGTGGCCACCCTGCAGACTGTACACCTATCTCGC
ACATCCTGGTGACGACGGTGCGCGTCCATTCTGTCCGAGCTCGACCTCTTCAACCTGATTTACAT
GGCCACCATCGGTCGCAATGCCATTCTGGGCTCGCGCGCCACGGACACCATTAAGCGTATCGGTAC
CGAGCAGCAAGGTGAGAGTTGCCACGTGTGAAGGCCACATGGATCGTCAATTCATCTTCGCAGC
TCAAACCTCCACAGATCTTCAGCAGCCAAGCGTTGCTCCAAGTGTGTGCGAAGTTACCTTCCCGCCGC

GGTGGCGAAACCCAGAAAGGTAGCCGTGCCTTCACCGATACTAGTTCCTGTTTCAACACGTTACC
AAAAAGAAAGTGTTTCGCTTTGCAGGCAAAGTTTCCTAATTTTAAGATTACAACGCCGACGGATGTC
TTCCTCGCCATCTTTCTGATGGGATGCATTTTCAAACTTCTCATTCCGACGTCGACATGGGTATGTT
TAAAGAAACGTTTCGTGAATTCCCATCTAGCTGCGTGCCTGCCAATCAGCTGAACGACCATTCTTT
TACCACTCCCTAGGCGGTAAGCAGCGCGTCCTGTACCGCCACTTTTACTACGAGCTCGAGG

6.9.2. *PvispD* im pNCO113-Vektor, N-terminal, His₆-Tag

Klonierung des *PvispD*-Gens in einen pNCO113-Vektor mit Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI/*Hind*III und Affinitätag N-terminal (His₆-Tag).

Vorwärts Primer (*PvispD***Bam**HI fw)

5'-ATAATA**GGATCC**CATCATCACCACCATCATGGTTCCGATGATGACGACAAGTCGCTGCACAAGA
AGAACATCCACGC-3'

CATCATCACCACCATCAT = His₆-Tag

GATGATGACGACAAG = Enterokinaschnittstelle

GGTTCC = GS-Linker

Rückwärts Primer (*PvispD**Hind*III rev)

5'-ACACACA**AAGCTT**TTACTCGTAGTAAAAGTGGCGGTACAGGACGCGCTGCTTACCGCCTAGGG
AGTGG-3'

Resultierendes Konstrukt

ATAATA **GGATCC** **CATCATCACCACCATCATGGTTCCGATGATGACGACAAGTCGCTGCACAAGAAG**
AACATCCACG CATT TTTGCTCTGCGGTGGCATCGGCCAACGTACGGAGTTGGCTAGCCGTAAGCAA
TTCCTTAAGCTGAATGATGTCCCTCTCTTCGTCTACTCCTTAATTTGTTTGTGAAATGCAATTTAATT
AAAGCTATCACCTTGTGTGCGACCCGAACTATTTCCAGCACGTCATCGAGAGCATTAAACCGCCATA
ACGCTTCTCTTCTGCGTCGCAAGCACCGTGGTTTCCTGCGCCGTGGTCATTCTGAAGAATGTGTT
GGCCTCGTCGGGTGAGCAATCCGAGGGCGATGCCAGCGGCGCTCTCCATTTTTTAAAGAAGAATA
AATATATCCTGTATGATAATGAGAAGGGCAAGTGCGTACCAACTTGGATGAGCTGCTCAGCGATG
TGACGGCCACGAAGGGCCAATACGTATCAGAGGTTGACGAGGTGGACGAGGTGAAGCCAGGCGA
TGTTAACTCAAATCGATACAAGCTCATTCGCCTGGTGGAGAGCGGCCGCGAGCGTGCTGACTCCCT
GTTGAATGCGCTGCGTGGTCTGGACTTGCGCGTGCAAACCGGTGAGTACATCAGCCAGCTGTTGCG
CGGTGGTGGCACGGACGAAGCGGGTAAAGGCGATGGCGCGGATAAAGGTGATAAATCGGATGGT
GTGGATGGTGGCCACCCTGCAGACTGTACACCTATCTCGCACATCCTGGTGCACGACGGTGC GCGT
CCATTCCTGTCCGAGCTCGACCTCTTCAACCTGATTTACATGGCCACCATCGGTGCAATGCCATTCT
GGGCTCGCGCGCCACGGACACCATTAAAGCGTATCGGTACCGAGCAGCAAGGTGAGAGTTGCCAC
GTGTGAAGGCCACATGGATCGTCAATTCATCTTCGCAGCTCAAACCTCCACAGATCTTCAGCAGCCA
AGCGTTGCTCCAAGTGTGTGCGAAGTTACCTCCCGCCGCGGTGGCGAAACCCAGAAAGGTAGCC
GTGCCTTCACCGATACTAGTTCCTGTTTCAACACGTTACCAAAAAGAAAGTGTTGCTTTGCAGGC
AAAGTTTCCTAATTTTAAGATTACAACGCCGACGGATGTCTTCCTCGCCATCTTTCTGATGGGATGC
ATTTTCAAACTTCTCATTCCGACGTCGACATGGGTATGTTTAAAGAAACGTTCTGTGAATCCCCATC
TAGCTGCGTGCCTGCCAATCAGCTGAACGACCATTTCTTTTAC **CCACTCCCTAGGCGGTAAGCAGCGC**
GTCTGTACCGCCACTTTTACTACGAGTAA **AAGCTT** GTGTGT

6.10. Daten zur Testexpression

In der folgenden Tabelle 36 sind alle Bedingungen der Testexpression aufgelistet.

Tabelle 36: Inkubationszeiten, Konzentrationen an IPTG sowie Nährmedien für die Testexpression

Bakterienstamm	Inkubationszeit [h]	IPTG-Konzentration [mM]	Temperatur [°C]	Nährmedium
BL21 (DE3)	6	0.5 mM	30	LB-Amp-Medium
BL21 (DE3)	6	1.0 mM	30	LB-Amp-Medium
BL21 (DE3)	6	2.0 mM	30	LB-Amp-Medium
BL21 (DE3)	24	0.5 mM	30	LB-Amp-Medium
BL21 (DE3)	24	1.0 mM	30	LB-Amp-Medium
BL21 (DE3)	24	2.0 mM	30	LB-Amp-Medium
BL21 (DE3)	48	0.5 mM	30	LB-Amp-Medium
BL21 (DE3)	48	1.0 mM	30	LB-Amp-Medium
BL21 (DE3)	48	2.0 mM	30	LB-Amp-Medium

6.11. Weitere Grafiken zu Ergebnissen.

6.11.1. IspE-Reinigung

In der Abbildung 69 ist das Entsalzungschromatogramm der *EclspE*-Reinigung aufgezeigt.

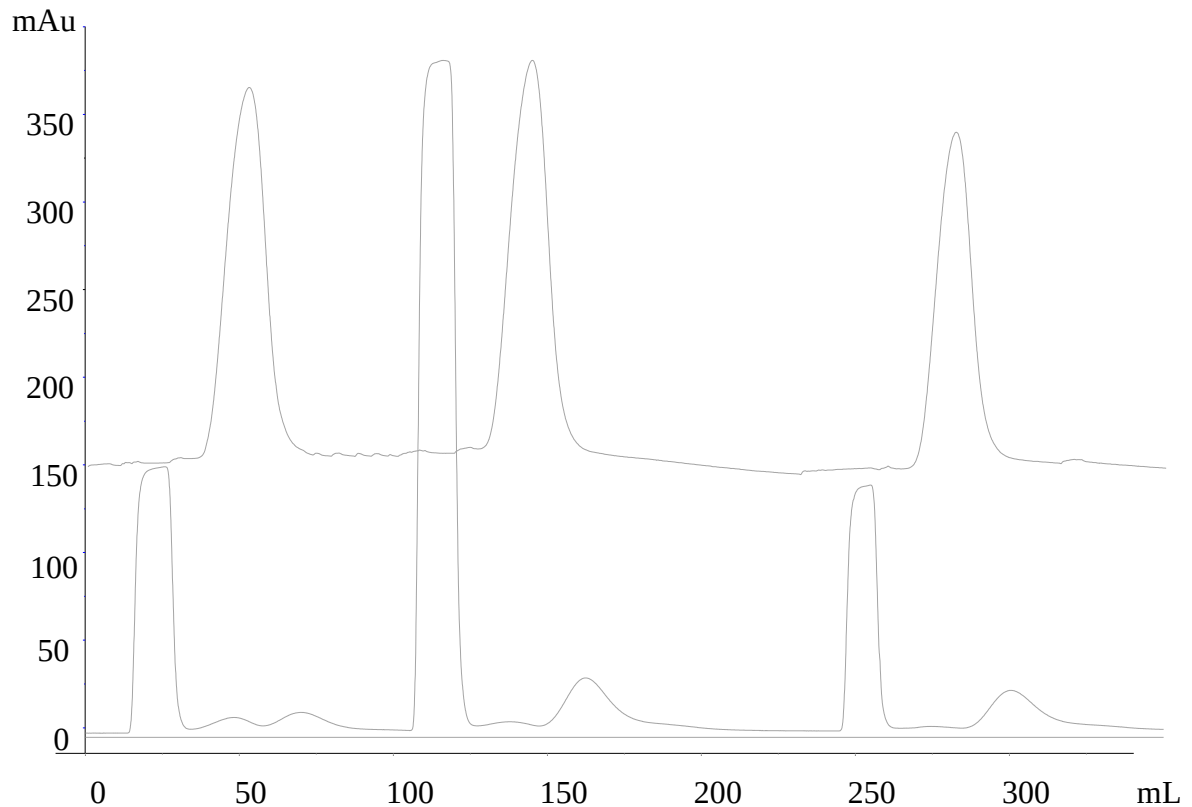


Abbildung 69: Entsalzungschromatogramm der IspE-Reinigung

Die untere Kurve in der Abbildung 69 stellt dabei das UV-Signal da und die obere Kurve die Leitfähigkeit. Das Protein wird zuerst von der Säule gespült, was im Bereich von ca. 10 bis 30 mL, ca. 100 bis 120 mL und bei 250 mL der blauen Kurve zu erkennen ist. Es folgt das Salz bzw. Imidazol der aufgetragenen Proteinlösung bei ca. 50 mL, ca. 160 mL und 300 mL. Die obere Kurve bzw. die Leitfähigkeit steigt immer dann an, wenn viele Ionen, also in dem Fall Salz, vorhanden sind. In der Abbildung 69 wurden mehrere Fraktionen nacheinander auf die Säule aufgetragen, daher sind mehrere Peaks sichtbar.

6.11.2. Optimierung des fotometrischen Assays

In der Abbildung 70 ist die Konzentrationsbestimmung im fotometrischen Assay von *PvlspD* beispielhaft für eine *PvlspD* Konzentration von 2 mg/mL dargestellt.

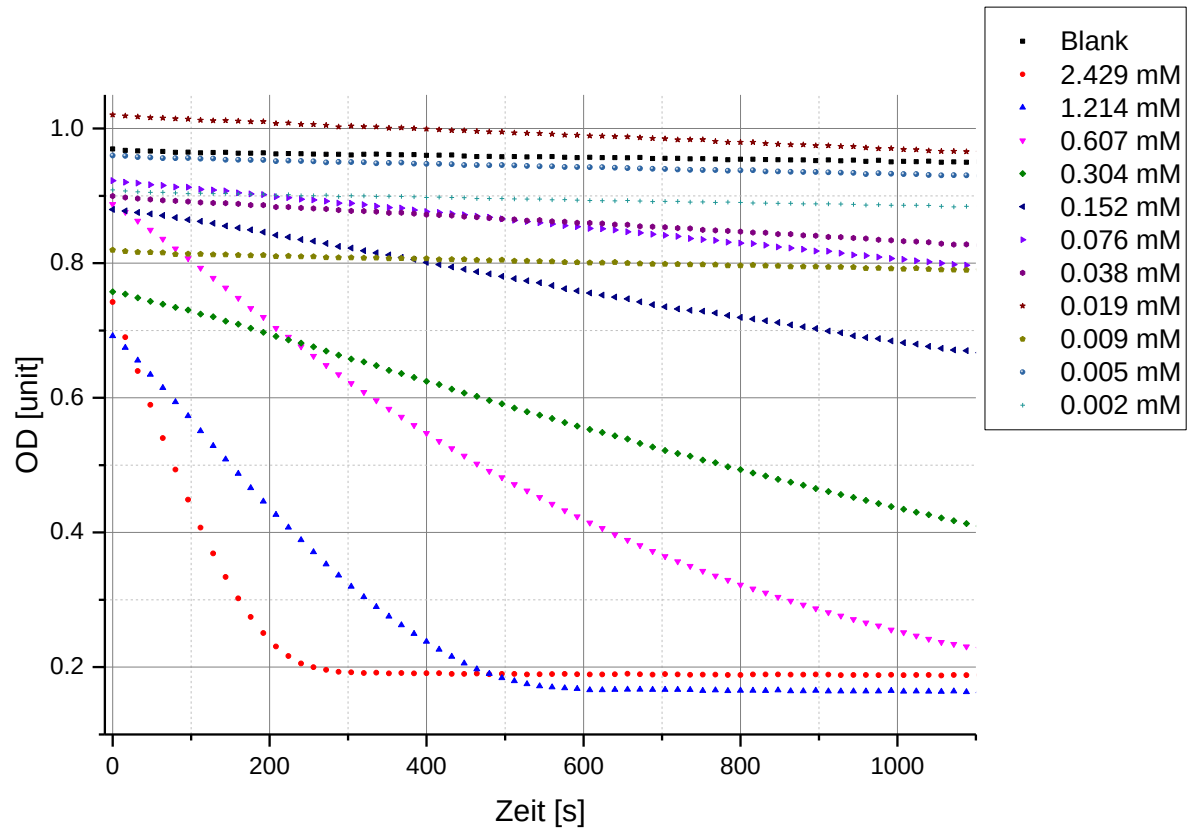


Abbildung 70: Fotometrischer Assay von IspD zur optimalen Konzentrationsbestimmung von *PvlspD*

Bei dieser *PvlspD*-Bestimmung sind 0.152 mM optimal für den fotometrischen Assay. Daher wurde sich für die Konzentration von 0.31 μ L (0.152 mM) für 60 μ L Gesamtassay entschieden und das entspricht 15.5 μ L für 3 mL Gesamtassay.

In der Abbildung 71 ist die Konzentrationsbestimmung im fotometrischen Assay von *PvlspD* von *EclspE* dargestellt.

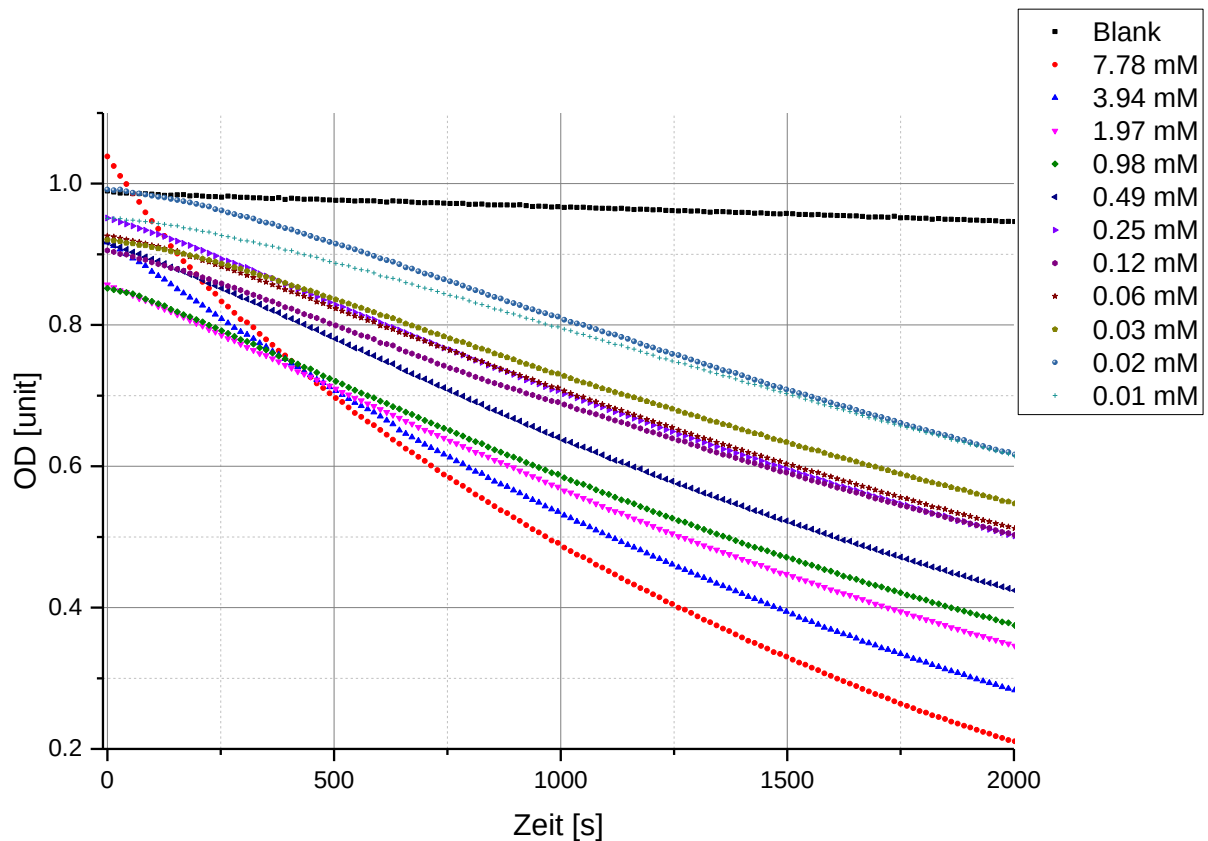


Abbildung 71: Fotometrischer Assay von *IspD* zur optimalen Konzentrationsbestimmung von *EclspE*

Bei *EclspE* sind 0.25 mM, 0.12 mM und 0.06 mM sehr ähnlich. Daher wurde sich für die Mitte der Konzentrationen von 0.12 mM für 60 μ L Gesamtassay entschieden und das entspricht 0.8 μ L (0.12 mM) für 3 mL Gesamtassay.

In der Abbildung 72 ist die Konzentrationsbestimmung im fotometrischen Assay von *PvlspD* von PK/LDH dargestellt.

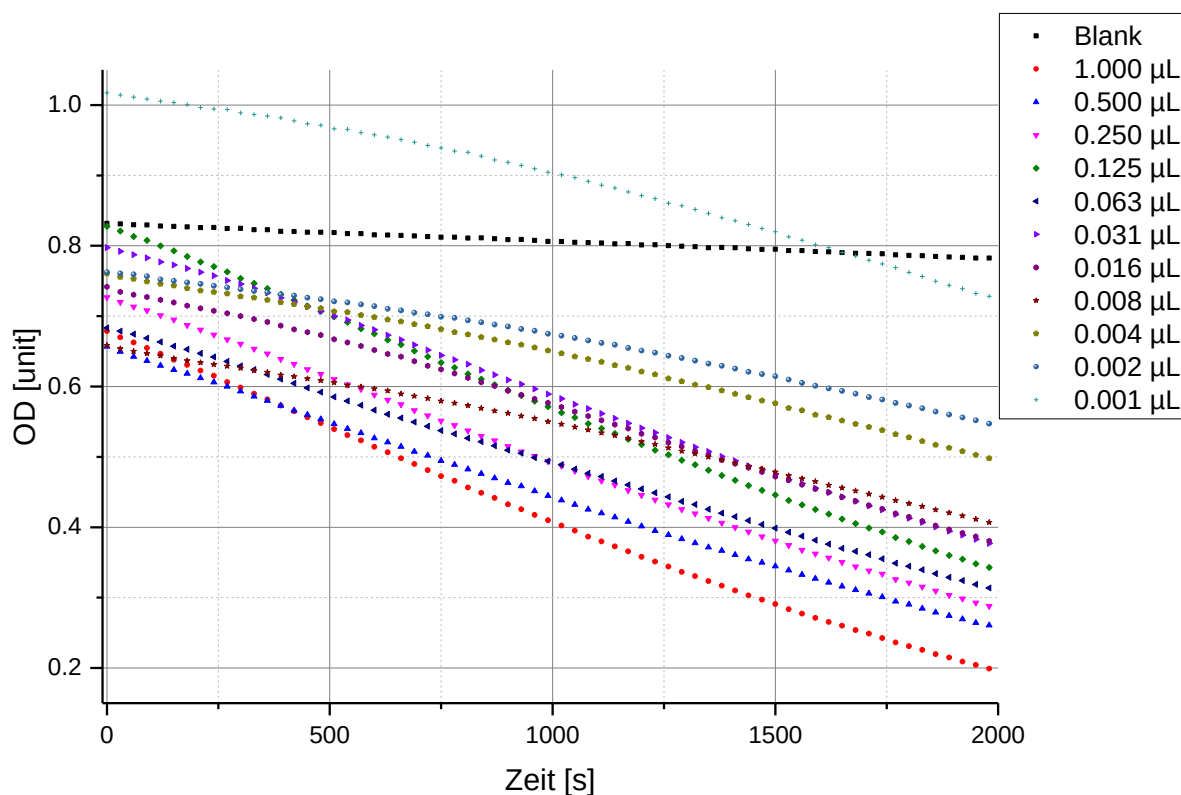


Abbildung 72: Fotometrischer Assay von IspD zur optimalen Konzentrationsbestimmung von PK/LDH

Bei PK/LDH handelt es sich um ein Gemisch mit der Konzentration von PK 600-1.000 units/mL und LDH 900-1400 units/mL, daher wird auf eine Umrechnung in mM verzichtet. Bei der Bestimmung war die Aktivitätsbestimmung von 0.060 μL und 0.031 μL sehr ähnlich. Daher wurde sich für die Konzentration von 0.031 μL für 60 μL Gesamtassay entschieden und das entspricht 1.6 μL für 3 mL Gesamtassay.

In der Abbildung 73 ist die Konzentrationsbestimmung im fotometrischen Assay von *PvlspD* von ATP dargestellt.

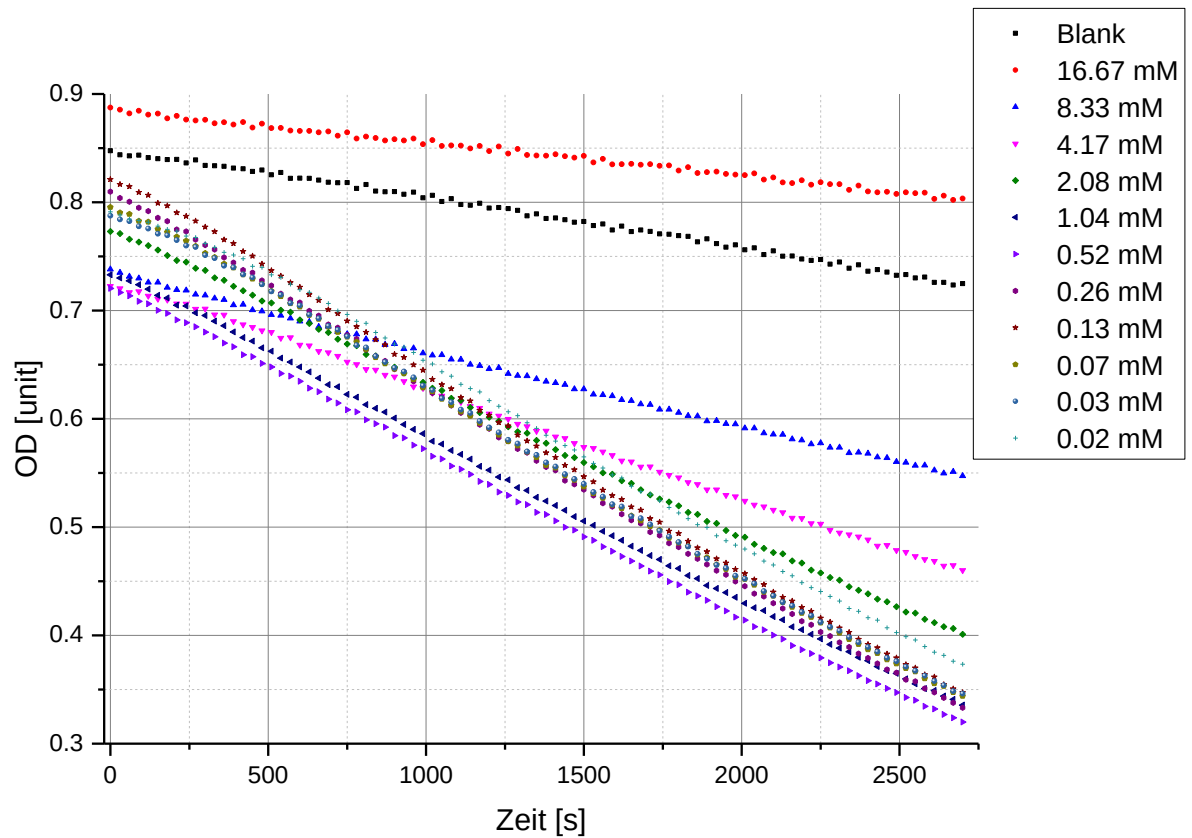


Abbildung 73: Fotometrischer Assay von *IspD* zur optimalen Konzentrationsbestimmung von ATP

Es wurde sich für die Konzentration von ATP von 0.52 mM für 60 μ L Gesamtassay entschieden und das entspricht 8.0 μ L (0.52 mM) für 3 mL Gesamtassay.

In der Abbildung 74 ist die Konzentrationsbestimmung im fotometrischen Assay von *PvlspD* von PEP dargestellt.

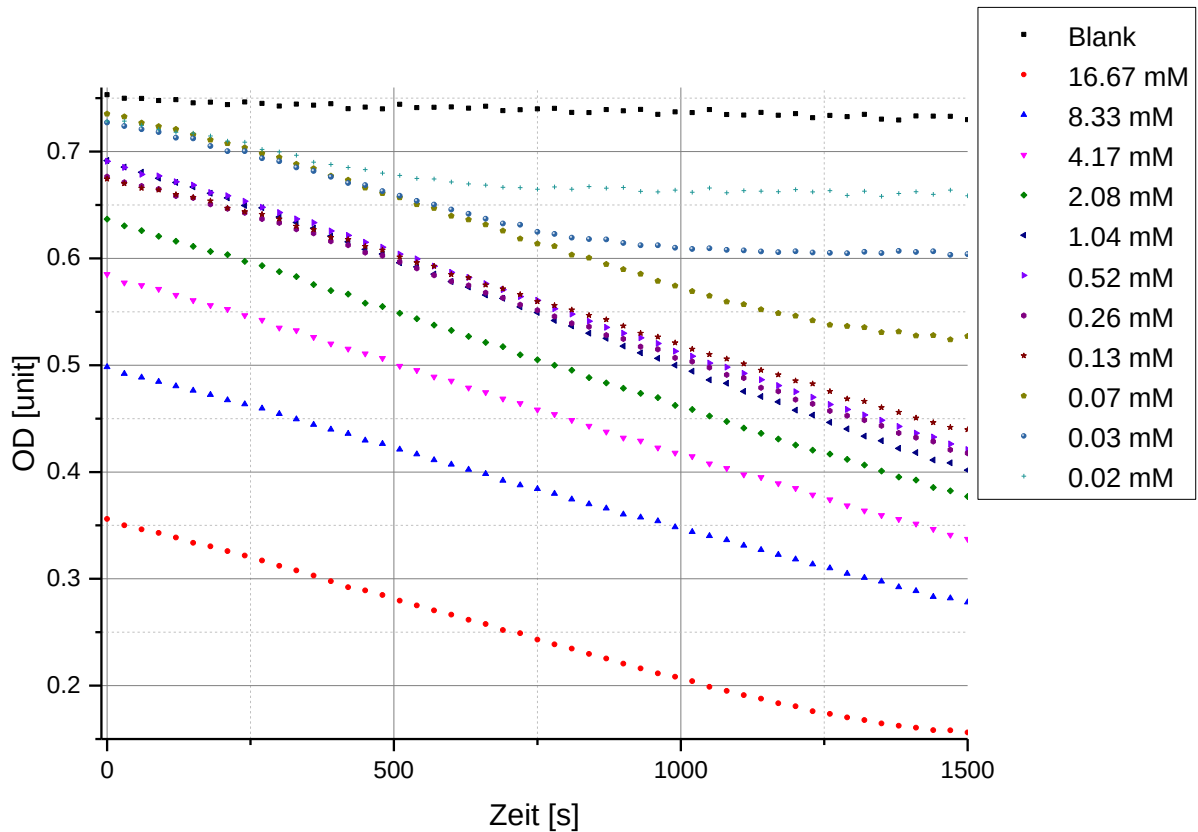


Abbildung 74: Fotometrischer Assay von *IspD* zur optimalen Konzentrationsbestimmung von PEP.

Es wurde sich für die Konzentration von PEP von 0.26 mM für 60 μ L Gesamtassay entschieden und das entspricht 4 μ L (0.26 mM) für 3 mL Gesamtassay.

In der Abbildung 75 ist die Konzentrationsbestimmung im fotometrischen Assay von *PvlspD* von NADH dargestellt.

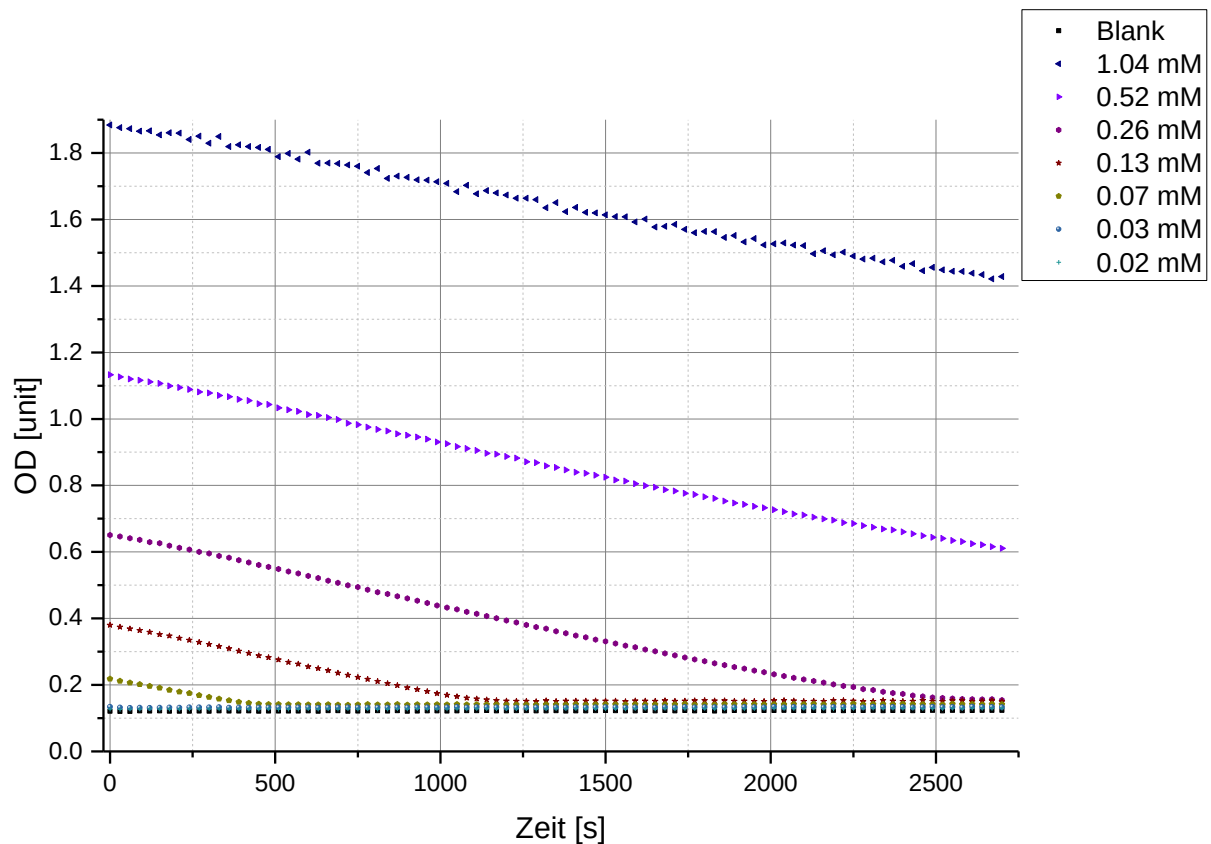


Abbildung 75: Fotometrischer Assay von *IspD* zur optimalen Konzentrationsbestimmung von NADH.

Die ersten 4 Konzentrationsbestimmungen von NADH wurden weggelassen, weil bei der fotometrischen Bestimmung ein OD-Wert über 2 gemessen wurde und diese Werte vom Spektrometer nicht ordnungsgemäß verarbeitet werden konnten. Bei der Bestimmung war die Aktivitätsbestimmung von 0.52 mM und 0.26 mM sehr ähnlich. Es wurde sich für die Konzentration von NADH von 0.4 mM für 60 μ L Gesamtassay entschieden und das entspricht 6.0 μ L (0.4 mM) für 3 mL Gesamtassay.

6.11.3. Bestätigung der Inhibitoren mittels ^{13}C -NMR.

In diesem Abschnitt sind die ^{13}C -NMRs zur Bestätigung der Inhibierung der gefundenen Inhibitoren aus Abschnitt 4.6.4. gezeigt. In Abbildung 76 ist der NMR-Assay des Inhibitors LS 5286989 (Substanz 1) abgebildet.

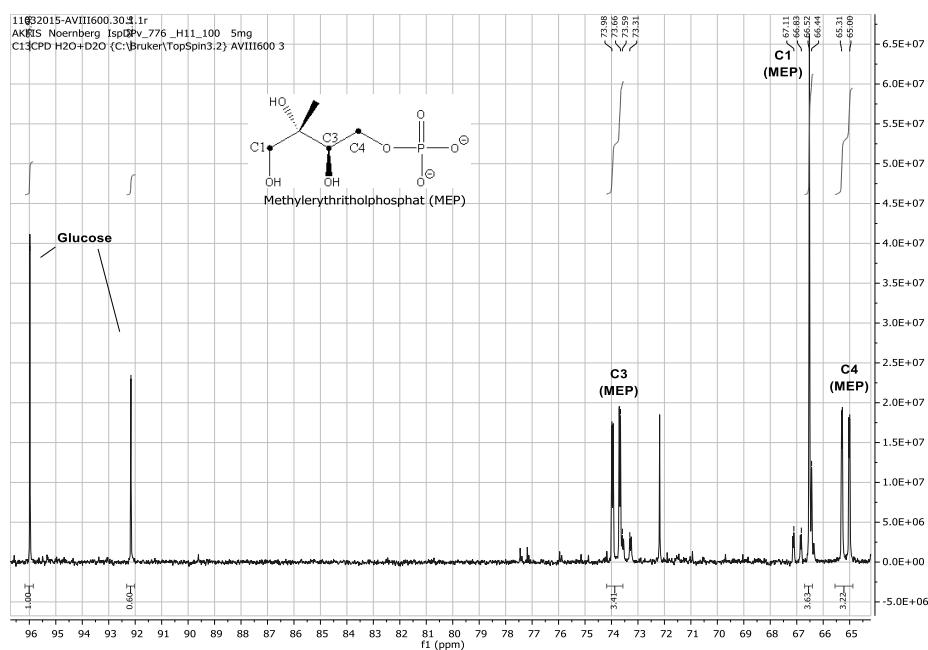


Abbildung 76: ^{13}C -NMR vom Assay mit LS 5286989 (Substanz 1)

Bei diesem ^{13}C -NMR ist zu erkennen, dass es zu keiner vollständigen Inhibierung kam, da noch kleine Peaks von CDP-ME zu sehen sind, aber die Umsetzung ist eindeutig gehemmt. Diese Tatsache ist in mehreren ^{13}C -NMRs der folgenden Abbildungen zu erkennen aber es kommt bei allen Inhibitoren zu einer eindeutigen Hemmung des Proteins PvlspD. Der nicht zugeordnete Peak bei ca. 72 ppm gehört wahrscheinlich zu CTP, was durch die Hemmung der Synthese nicht vollständig umgesetzt wurde.

In Abbildung 77 ist der NMR-Assay des Inhibitors LS 5351135 (Substanz 2) abgebildet.

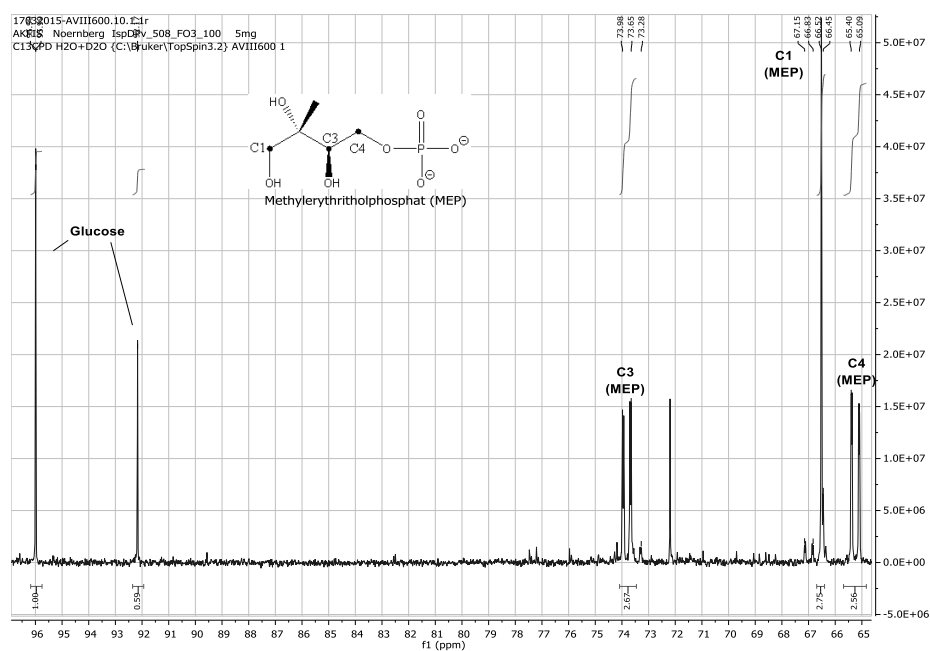


Abbildung 77: ^{13}C -NMR vom Assay mit LS 5351135 (Substanz 2).

In Abbildung 78 ist der NMR-Assay des Inhibitors LS 5333093 (Substanz 3) abgebildet.

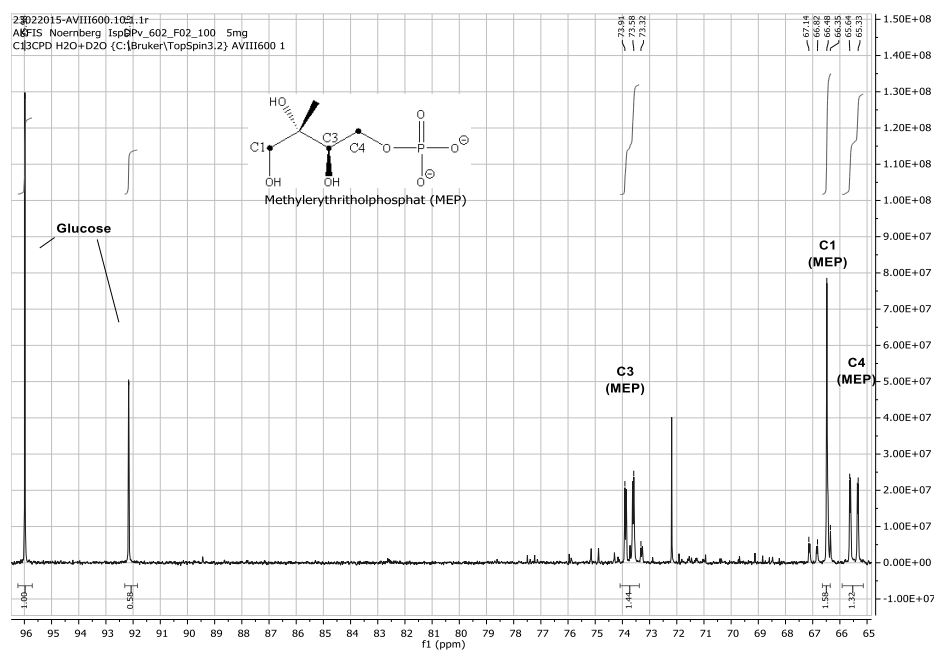


Abbildung 78: ^{13}C -NMR vom Assay mit LS 5333093 (Substanz 3)

In Abbildung 79 ist der NMR-Assay des Inhibitors LS 5333093 (Substanz 4) abgebildet.

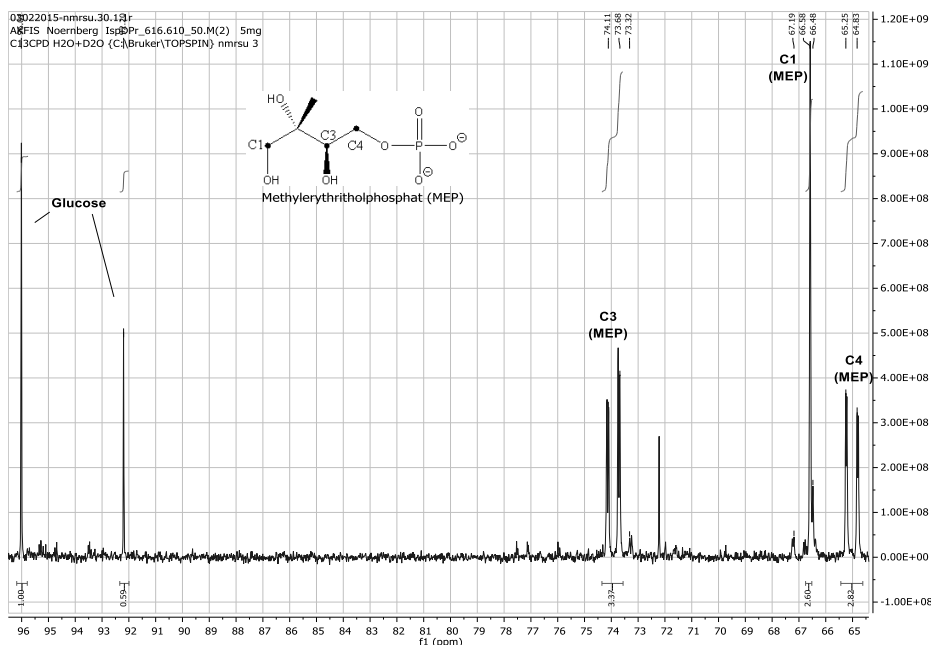


Abbildung 79: ^{13}C -NMR vom Assay mit LS 160313 (Substanz 4)

In Abbildung 80 ist der NMR-Assay des Inhibitors LS 5270361 (Substanz 6) abgebildet.

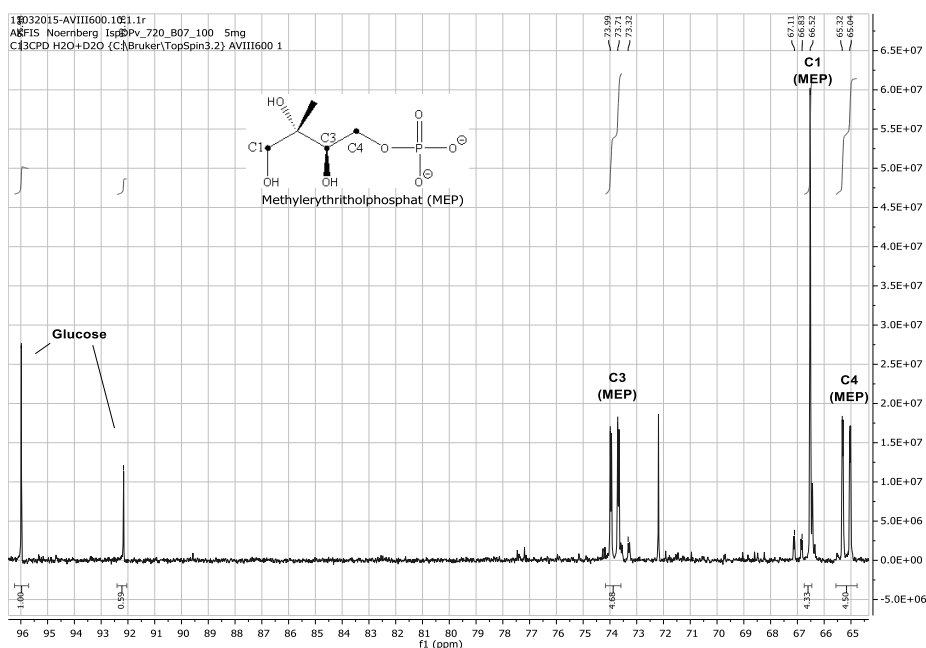


Abbildung 80: ^{13}C -NMR vom Assay mit LS 5270361 (Substanz 6)

In Abbildung 81 ist der NMR-Assay des Inhibitors LS 5270852 (Substanz 7) abgebildet.

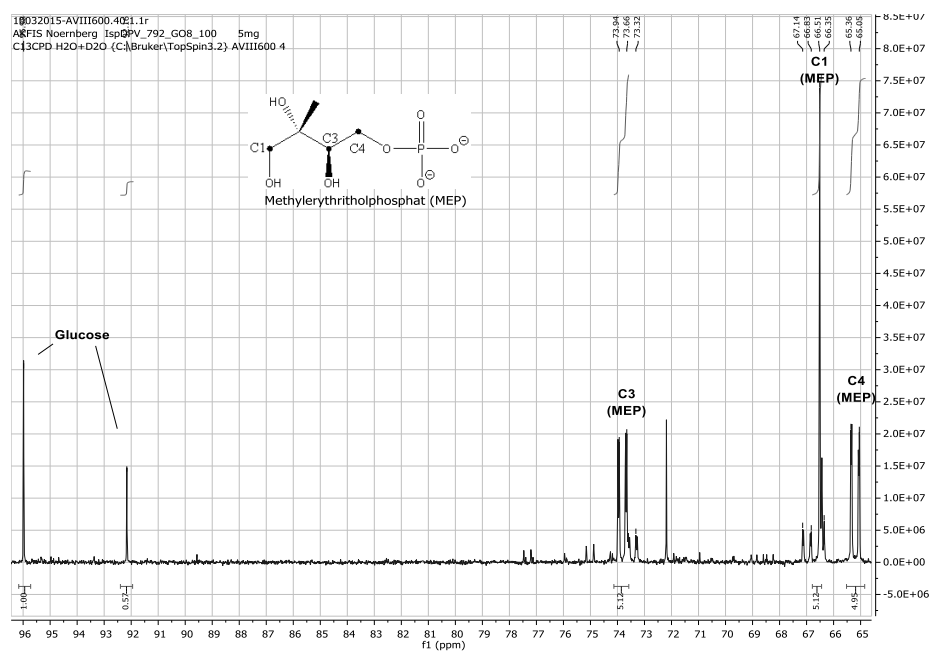


Abbildung 81: ^{13}C -NMR vom Assay mit LS 5270852 (Substanz 7)

In Abbildung 82 ist der NMR-Assay des Inhibitors LS 5298096 (Substanz 8) abgebildet.

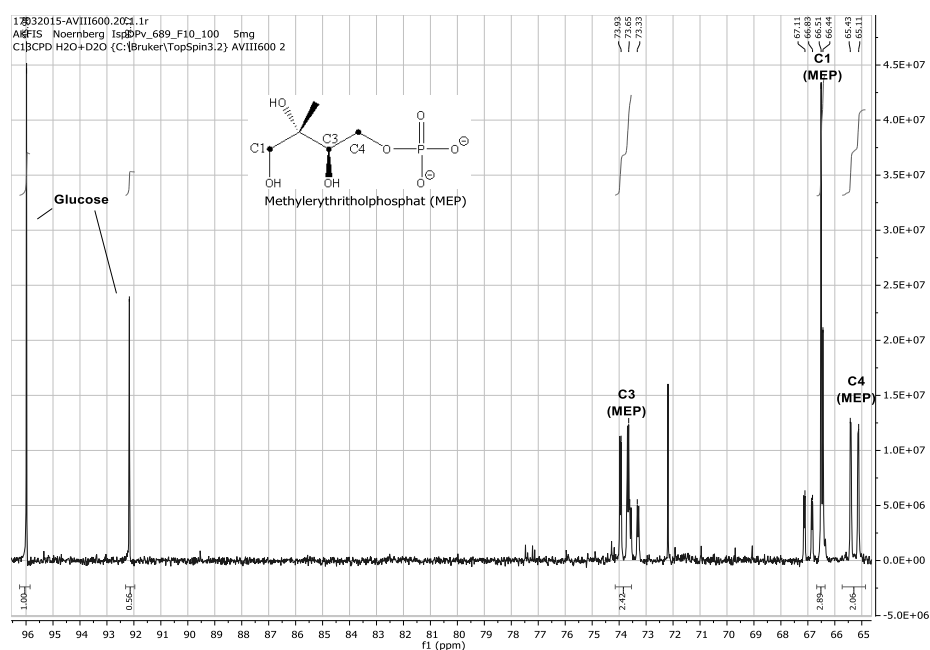


Abbildung 82: ^{13}C -NMR vom Assay mit LS 5298096 (Substanz 8)

In Abbildung 83 ist der NMR-Assay des Inhibitors LS 306484 (Substanz 9) abgebildet.

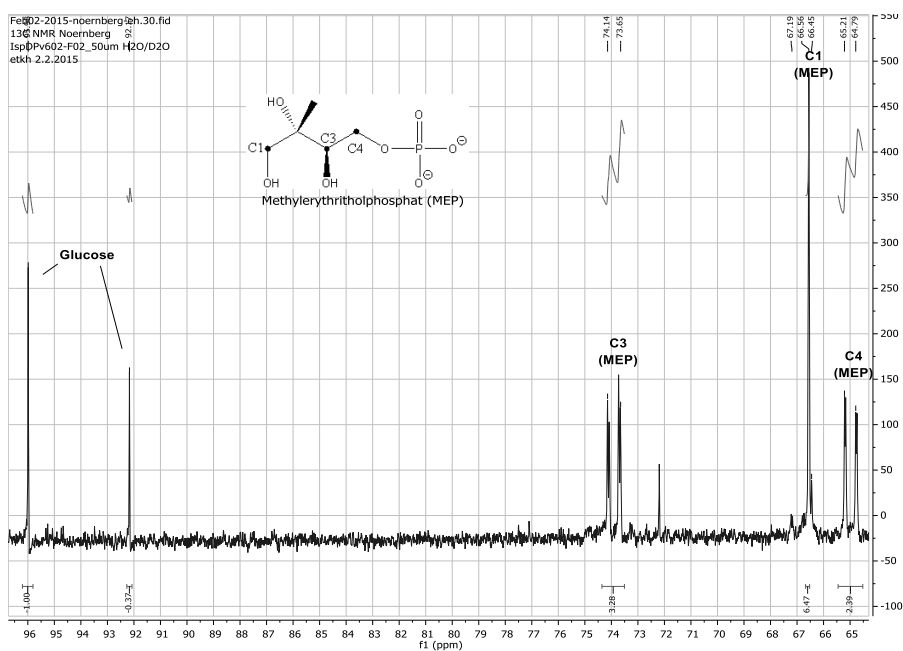


Abbildung 83: ¹³C-NMR vom Assay mit LS 306484 (Substanz 9)

In Abbildung 84 ist der NMR-Assay des Inhibitors LS 5299219 (Substanz 10) abgebildet.

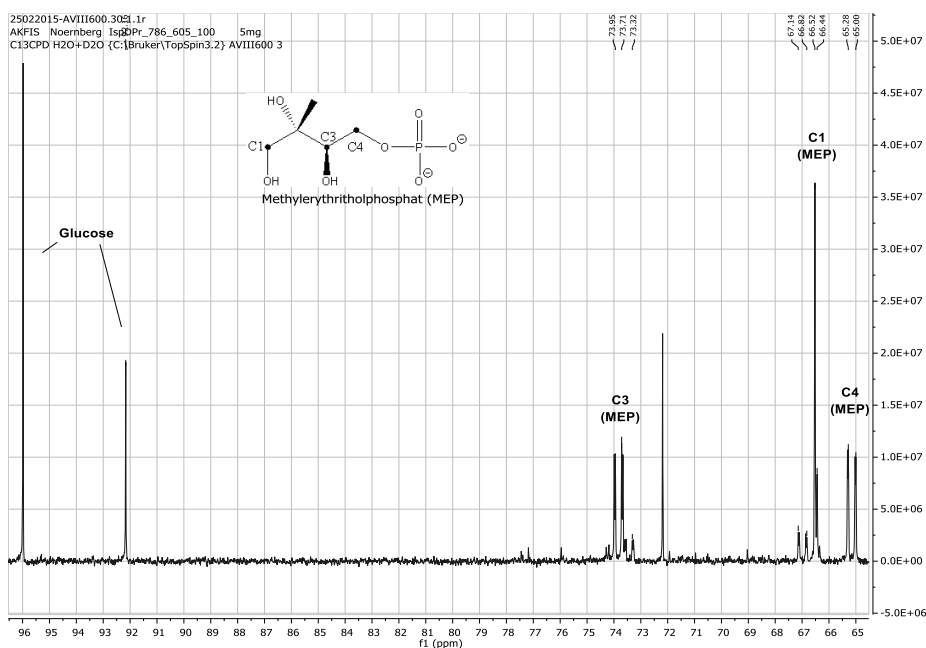


Abbildung 84: ¹³C-NMR vom Assay mit LS 5299219 (Substanz 10)

In Abbildung 85 ist der NMR-Assay des Inhibitors LS 5332069 (Substanz 11) abgebildet.

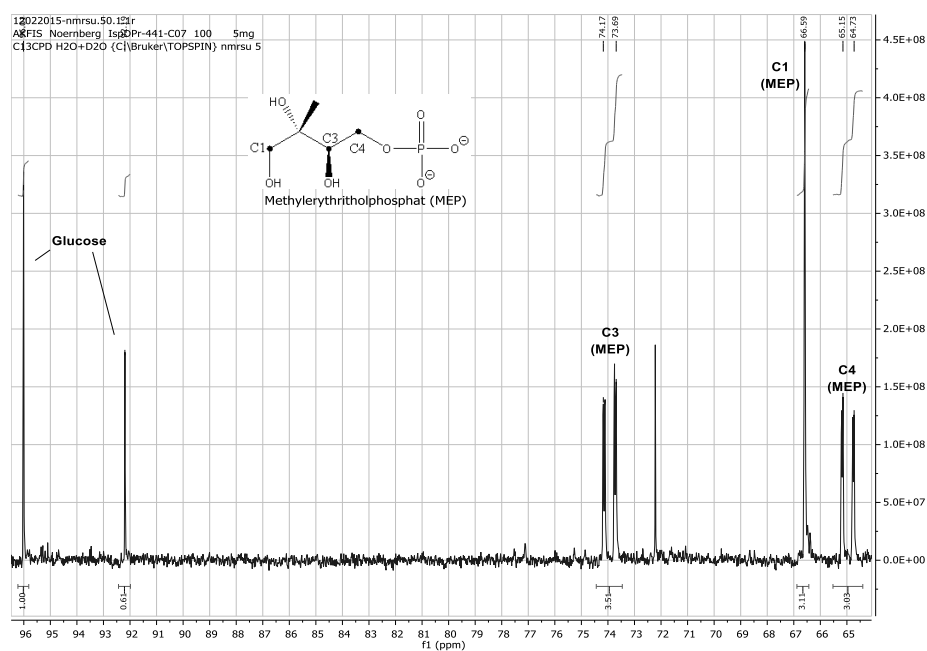


Abbildung 85: ^{13}C -NMR vom Assay mit LS 5332069 (Substanz 11)

In Abbildung 86 ist der NMR-Assay des Inhibitors LS 5333957 (Substanz 12) abgebildet.

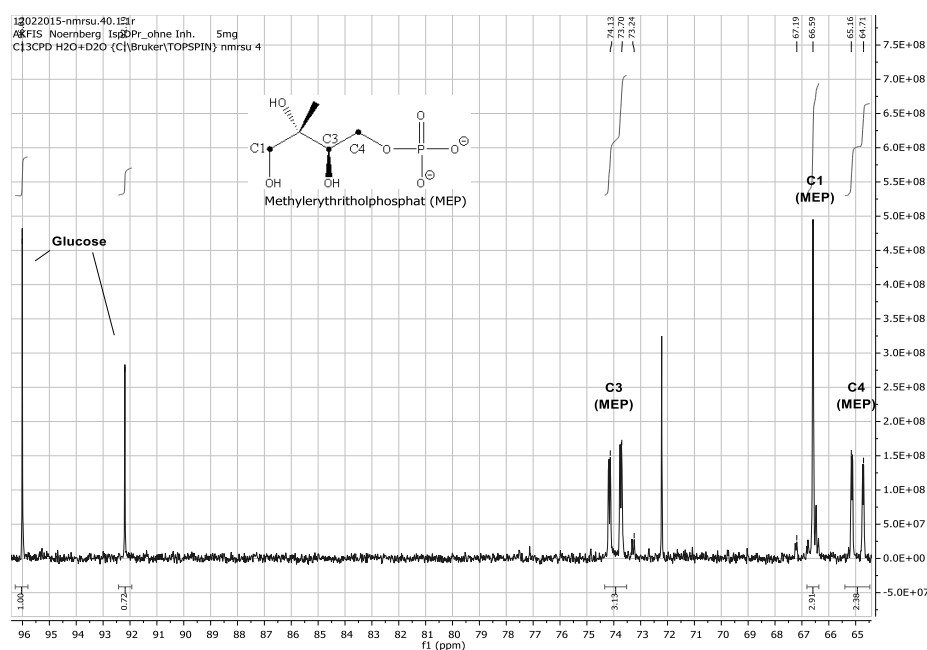


Abbildung 86: ^{13}C -NMR vom Assay mit LS 5333957 (Substanz 12)

In Abbildung 87 ist der NMR-Assay des Inhibitors LS 4062690 (Substanz 13) abgebildet.

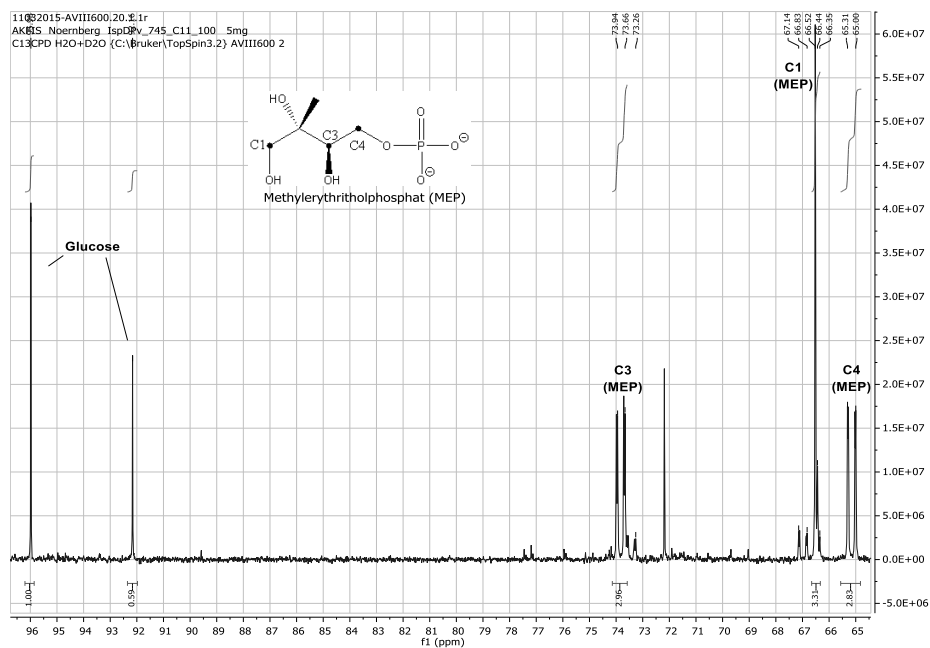


Abbildung 87: ^{13}C -NMR vom Assay mit LS 4062690 (Substanz 13)

In Abbildung 88 ist der NMR-Assay des Inhibitors LS 5294453 (Substanz 14) abgebildet.

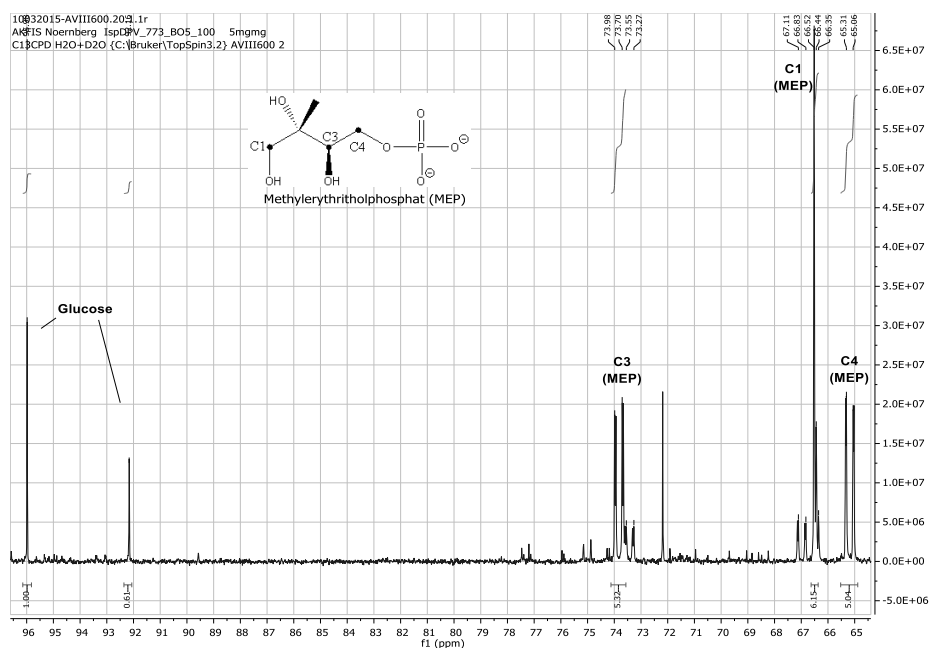


Abbildung 88: ^{13}C -NMR vom Assay mit LS 5294453 (Substanz 14)

7. Literaturverzeichnis

Aaij, C.; Borst, P. *The Gelelectrophoresis Of DNA*. Biochim. Biophys. Acta 1971, 269 (192-200).

Agilent Technologies. *ArcticExpress™ Competent Cells and ArcticExpress™ (DE3) Competent Cells*; 2010.

Agnandji, S. T.; Huttner, A.; Zinser, M. E.; Njuguna, P.; Dahlke, C.; Fernandes, J. F.; Yerly, S.; Dayer, J.; Kraehling, V.; Kasonta, R.; et al. *Phase 1 Trials of rVSV Ebola Vaccine in Africa and Europe — Preliminary Report*. New England Journal of Medicine 2015, 1–14.

Akada, Y.; Matsuura, K. *Therapeutic Agent For Respiratory Disease Containing 4-Hydroxypiperidine Derivate As Active Ingredient*, 2005.

Bajsa, J.; Singh, K.; Nanayakkara, D.; Duke, S. O.; Rimando, A. M.; Evidente, A.; Tekwani, B. L. *A Survey of Synthetic and Natural Phytotoxic Compounds and Phytoalexins as Potential Antimalarial Compounds*. Biological & pharmaceutical bulletin 2007, 30 (9), 1740–1744.

Belitz, H.-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. *Lehrbuch Der Lebensmittelchemie.*, 6th ed.; Springer-Verlag: Berlin/Heidelberg, 2007.

Bergmeyer, H. U. *Neue Werte Fur Die Molaren Extinktions-Koeffizienten von NADH Und NADPH Zum Gebrauch Im Routine-Laboratorium*. Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 1975, 13 (11), 507–508.

Bertani, G. *Studies on Lysogenesis. I. The Mode of Phage Liberation by Lysogenic Escherichia Coli*. Journal of bacteriology 1951, 62 (3), 293–300.

Betram, H.; Thomas, W. B.; Forest, a K. J.; John, M. *Second Edition*. 2008, 344, 215–221.

Bradford, M. M. *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. Analytical biochemistry 1976, 72, 248–254.

Breitmaier, E. *Terpene: Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone*, 2nd ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2005.

Buchner, J. *Introduction: The Cellular Protein Folding Machinery*. Cellular and molecular life sciences : CMLS 2002, 59 (10), 1587–1588.

Bullock, W. O.; Fernandez, J. M.; Short, J. M. *XL1-Blue: A High Efficiency Plasmid Transforming recA Escherichia Coli Strain with Beta-Galactosidase Selection*. Biotechniques 1987, 5 (4), 376 – &.

- Carlton, J. M.; Adams, J. H.; Silva, J. C.; Bidwell, S. L.; Caler, E.; Crabtree, J.; Angiuoli, S. V.; Merino, E. F.; Amedeo, P.; Cheng, Q.; et al. *Comparative Genomics of the Neglected Human Malaria Parasite Plasmodium Vivax*. NIH Public Access 2009, 455 (7214), 757–763.
- Cer, R. Z.; Mudunuri, U.; Stephens, R.; Lebeda, F. J. *IC50-to-Ki: A Web-Based Tool for Converting IC50 to Ki Values for Inhibitors of Enzyme Activity and Ligand Binding*. Nucleic Acids Research 2009, 37 (SUPPL. 2), 441–445.
- Compton, S. J.; Jones, C. G. *Mechanism of Dye Response and Interference in the Bradford Protein Assay*. Analytical biochemistry 1985, 151 (2), 369–374.
- Cornejo, O. E.; Escalante, A. A. *NIH Public Access*. Trends Parasitol 2006, 22 (12), 558–563.
- Coval, M. L. *Analysis of Hill Interaction Coefficients and the Invalidity of the Kwon and Brown Equation*. Journal of Biological Chemistry 1970, 245 (23), 6335–6336.
- Duke, S. O. *Herbicide and Pharmaceutical Relationships*. Weed Science 2010, 58 (3), 334–339.
- Eisenreich, W.; Bacher, a; Arigoni, D.; Rohdich, F. *Biosynthesis of Isoprenoids via the Non-Mevalonate Pathway*. Cellular and molecular life sciences : CMLS 2004, 61 (12), 1401–1426.
- Fersht A. *Enzyme Structure and Mechanism*, 2nd ed.; W.H. Freeman: New York, 1985.
- Fischer, M.; Bacher, A.; Betzel, C.; Heisig, P.; Hoffmann, M.; Meyer, T.; Perbandt, M.; Rohde, H.; Sohn, S.; Witschel, M. *Neue Und Alte Infektionskrankheiten*; 2014.
- Gabrielsen, M.; Kaiser, J.; Rohdich, F.; Eisenreich, W.; Laupitz, R.; Bacher, A.; Bond, C. S.; Hunter, W. N. *The Crystal Structure of a Plant 2C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Cytidylyltransferase Exhibits a Distinct Quaternary Structure Compared to Bacterial Homologues and a Possible Role in Feedback Regulation for Cytidine Monophosphate*. FEBS Journal 2006, 273 (5), 1065–1073.
- Goutelle, S.; Maurin, M.; Rougier, F.; Barbaut, X.; Bourguignon, L.; Ducher, M.; Maire, P. *The Hill Equation: A Review of Its Capabilities in Pharmacological Modelling*. Fundamental and Clinical Pharmacology 2008, 22 (6), 633–648.
- Grosdidier, A.; Zoete, V.; Michielin, O. *Fast Docking Using the CHARMM Force Field with EADock DSS*. J Comput Chem. 2011a, 32 (10), 2149–2159.
- Grosdidier, A.; Zoete, V.; Michielin, O. *SwissDock, a Protein-Small Molecule Docking Web Service Based on EADock DSS*. Nucleic Acids Research 2011b, 39 (SUPPL. 2), 270–277.
- Hanahan, D. *Studies on Transformation of Escherichia Coli with Plasmids*. J Mol Biol. 1983, 166 (4), 557–580.
- Heck, H. A. *Statistical Theory of Cooperative Binding to Proteins. The Hill Equation and the Binding Potential*. Journal of the American Chemical Society 1971, 93 (1).

- Hüser, J. *High-Throughput Screening in Drug Discovery*, 35th ed.; WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, 2006.
- Illarionova, V.; Kaiser, J.; Ostrozhenkova, E.; Bacher, A.; Fischer, M.; Eisenreich, W.; Rohdich, F. *Nonmevalonate Terpene Biosynthesis Enzymes as Antiinfective Drug Targets: Substrate Synthesis and High-Throughput Screening Methods*. *The Journal of organic chemistry* 2006, 71 (23), 8824–8834.
- J. Gershenzon; Croteau, R. *Biochemistry of the Mevalonic Acid Pathway to Terpenoids*, 24th ed.; Towers, G. H. N., Helen A. Stafford, Eds.; Springer US: Washington, 1990.
- Jain, A. K.; Vaidya, A.; Ravichandran, V.; Kashaw, S. K.; Agrawal, R. K. *Recent Developments and Biological Activities of Thiazolidinone Derivatives: A Review*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2012, 20 (11), 3378–3395.
- Karstedt, A. *Klonierung von IspD Aus Plasmodium Vivax*, Hamburg, 2014.
- Klebe, G. *Wirkstoffdesign - Entwurf Und Wirkung von Arzneistoffen*, 2. Auflage.; Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- Köck, R.; Becker, K.; Cookson, B.; van Gemert-Pijnen, J. E.; Harbarth, S.; Kluytmans, J.; Mielke, M.; Peters, G.; Skov, R. L.; Struelens, M. J.; et al. *Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA): Burden of Disease and Control Challenges in Europe*. *Euro surveillance : bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 2010, 15 (41), 19688.
- Kunfermann, A.; Witschel, M.; Illarionov, B.; Martin, R.; Rottmann, M.; Höffken, H. W.; Seet, M.; Eisenreich, W.; Knölker, H.-J.; Fischer, M.; et al. *Pseudilins: Halogenated, Allosteric Inhibitors of the Non-Mevalonate Pathway Enzyme IspD*. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 2014, 53 (8), 2235–2239.
- Laemmli, U. K. *Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4*. *Nature* 1970, 227 (5259), 680–685.
- Leverstein-van Hall, M.; Fluit, a.; Blok, H.; Box, a.; Peters, E.; Weersink, a.; Verhoef, J. *Control of Nosocomial Multiresistant Enterobacteriaceae Using a Temporary Restrictive Antibiotic Agent Policy*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2001, 20 (11), 785–791.
- Lichtenthaler, H. K.; Rohmer, M.; Schwender, J. *Two Independent Biochemical Pathways for Isopentenyl Diphosphate and Isoprenoid Biosynthesis in Higher Plants*. *Plant physiology* 1997, 101, 643–652.
- Lindner, S. E.; Miller, J. L.; Kappe, S. H. I. *Malaria Parasite Pre-Erythrocytic Infection: Preparation Meets Opportunity*. *Cellular Microbiology* 2012, 14 (3), 316–324.

Lipinski, C. a; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development settings* PII of Original Article: S0169-409X(96)00423-1. The Article Was Originally Published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001, 46 (1-3), 3–26.

Lipinski, C. A. *Lead- and Drug-like Compounds: The Rule-of-Five Revolution*. Drug discovery today. Technologies 2004, 1 (4), 337–341.

Liu, K.; Lu, H.; Hou, L.; Qi, Z. *Design , Synthesis , and Biological Evaluation of N - Carboxyphenylpyrrole Derivatives as Potent HIV Fusion Inhibitors Targeting gp41*. 2008, 7843–7854.

Löffler, G.; Petrides, P. E.; Heinrich, P. C. *Biochemie Und Pathobiochemie*, 8th ed.; Springer-Verlag, 2006.

Lou, S. *Sabine Louët Responds : Chaperonins Govern Growth of Escherichia Coli at Low Temperatures To the Editor : Nature Biotechnology* 2003, 21 (11), 1266–1267.

Lüllmann, H.; Mohr, K.; Hein, L. *Pharmakologie Und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen Verstehen - Medikamente Gezielt Einsetzen*, 16. Auflag.; Georg Thieme Verlag: Stuttgart, 2006.

Lüttgen, H.; Rohdich, F.; Herz, S.; Wungsintaweeikul, J.; Hecht, S.; Schuhr, C. a; Fellermeier, M.; Sagner, S.; Zenk, M. H.; Bacher, a; et al. *Biosynthesis of Terpenoids: YchB Protein of Escherichia Coli Phosphorylates the 2-Hydroxy Group of 4-Diphosphocytidyl-2C-Methyl-D-Erythritol*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2000, 97 (3), 1062–1067.

M. Jansohn; Rothhämmel, S. *Gentechnische Methoden - Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen Für Das Molekularbiologische Labor*, 5th ed.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, 2012.

Mendis, K.; Sina, B. J.; Marchesini, P.; Carter, R. *The Neglected Burden of Plasmodium Vivax Malaria*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 2001, 64 (1-2 Suppl), 97–106.

Neafsey, D. E.; Galinsky, K.; Jiang, R. H. Y.; Young, L.; Sykes, S. M.; Saif, S.; Gujja, S.; Goldberg, J. M.; Young, S.; Zeng, Q.; et al. *The Malaria Parasite Plasmodium Vivax Exhibits Greater Genetic Diversity than Plasmodium Falciparum*. Nature genetics 2012, 44 (9), 1046–1050.

Novagen. pET-22b (+) Restriction Sites <http://wolfson.huji.ac.il/expression/commercial-vectors/pet-22b-map.pdf>.

Palumbi, S. R. *Evolution - Humans as the World's Greatest Evolutionary Force*. Science 2001, 293 (5536), 1786–1790.

- Pérez-Gil, J.; Bergua, M.; Boronat, A.; Imperial, S. *Cloning and Functional Characterization of an Enzyme from Helicobacter Pylori That Catalyzes Two Steps of the Methylerythritol Phosphate Pathway for Isoprenoid Biosynthesis*. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 2010, 1800 (9), 919–928.
- Popper, K. *Logik Der Forschung Zur Erkenntnistheorie Der Modernen Naturwissenschaft*, 9th ed.; Springer-Verlag: Wien, 1935.
- Porter, C. M.; Miller, B. G. *Cooperativity in Monomeric Enzymes with Single Ligand-Binding Sites*. *Bioorg Chem.* 2012, 43, 44–50.
- Price, R. N.; Tjitra, E.; Guerra, C. A.; Yeung, S.; White, N. J.; Anstey, N. M. *Europe PMC Funders Group Vivax Malaria : Neglected and Not Benign*. 2009, 77 (61), 79–87.
- QIAGEN. pQE-30 Xa Vector
<https://www.qiagen.com/de/resources/resourcedetail?id=cb411367-5567-4657-99e6-02e63c275f2c&lang=en>.
- Richard, S. B.; Bowman, M. E.; Kwiatkowski, W.; Kang, I.; Chow, C.; Lillo, A. M.; Cane, D. E.; Noel, J. P. *Structure of 4-Diphosphocytidyl-2-C- Methylerythritol Synthetase Involved in Mevalonate-Independent Isoprenoid Biosynthesis*. 2001, 8 (7), 641–648.
- Risse, J. O. E. M. a X.; Friehs, K.; Fermentationstechnik, L. F. Ü. R.; Bielefeld, U. *Sekretion Und Affinitätschromato- Grafie Rekombinanter Proteine*. *Biospektrum* 2010, 5, 550–552.
- Rodríguez-Rojas, A.; Rodríguez-Beltrán, J.; Couce, A.; Blázquez, J. *Antibiotics and Antibiotic Resistance: A Bitter Fight against Evolution*. *International Journal of Medical Microbiology* 2013, 303 (6-7), 293–297.
- Rohdich, F.; Wungsintaweekul, J.; Fellermeier, M.; Sagner, S.; Herz, S.; Kis, K.; Eisenreich, W.; Bacher, A.; Zenk, M. H. *Isoprenoids : YgbP Protein of Escherichia Coli Catalyzes the Formation of 4-Diphosphocytidyl-2-C-Methylerythritol*. 1999.
- Rohmer, M. *The Discovery of a Mevalonate-Independent Pathway for Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria, Algae and Higher Plants*. *Natural product reports* 1999, 16 (5), 565–574.
- Rohmer, M.; Knani, T. M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahmt, H.; Nationale, E.; Chimie, S. De; Werner, A.; Cedex, F. M. *Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria : A Novel Pathway for the Early Steps Leading to Isopentenyl Diphosphate*. 1993, 524, 517–524.
- Rojas Ruiz, F. a.; García-Sánchez, R. N.; Estupiñan, S. V.; Gómez-Barrio, A.; Torres Amado, D. F.; Pérez-Solórzano, B. M.; Nogal-Ruiz, J. J.; Martínez-Fernández, A. R.; Kouznetsov, V. V. *Synthesis and Antimalarial Activity of New Heterocyclic Hybrids Based on Chloroquine and Thiazolidinone Scaffolds*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 2011, 19 (15), 4562–4573.
- Russo, H.; Bressolle, F. *Pharmacodynamics and Pharmacokinetics of Thiopental*. *Clinical Pharmacokinetics* 1998, 35 (2), 95.

- Sambrook, J.; Russell, D. W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, 2001.
- Sanger, F.; Nicklen, S. *DNA Sequencing with Chain-Terminating*. 1977, 74 (12), 5463–5467.
- Scheels, J.; Ziegelbauer, K.; Kupke, T.; Humbel, B. M.; Noegel, A. A.; Gerisch, G. *Hisactophilin, a Histidine-Rich Actin-Binding Protein from*. 1989, 264 (5), 2832–2839.
- Schellenberger, A. *Enzymkatalyse*, 1st ed.; Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, 1989.
- Shi, W.; Feng, J.; Zhang, M.; Lai, X.; Xu, S.; Zhang, X.; Wang, H. *Biosynthesis of Isoprenoids: Characterization of a Functionally Active Recombinant 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Cytidyltransferase (IspD) from Mycobacterium Tuberculosis H37Rv*. Journal of biochemistry and molecular biology 2007, 40 (6), 911–920.
- Steinbacher, S.; Kaiser, J.; Eisenreich, W.; Huber, R.; Bacher, A.; Rohdich, F. *Structural Basis of Fosmidomycin Action Revealed by the Complex with 2-C-Methyl-D-Erythritol 4-Phosphate Synthase (IspC). Implications for the Catalytic Mechanism and Anti-Malaria Drug Development*. Journal of Biological Chemistry 2003, 278 (20), 18401–18407.
- Stryer, L.; Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. *Biochemie*, 6th ed.; Elsevier GmbH: München, 2007.
- Stüber, D.; Matile, H.; Garotta, G. *System for High-Level Production in Escherichia Coli and Rapid Purification of Recombinant Proteins: Application to Epitope Mapping, Preparation of Antibodies, and Structure-Function Analysis*. Immunological methods 1990, 4, 121–152.
- Studier, F. W.; Moffatt, B. a. *Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-Level Expression of Cloned Genes*. Journal of molecular biology 1986, 189 (1), 113–130.
- Tun, K. M.; Imwong, M.; Lwin, K. M.; Win, A. a; Hlaing, T. M.; Hlaing, T.; Lin, K.; Kyaw, M. P.; Plewes, K.; Faiz, M. A.; et al. *Spread of Artemisinin-Resistant Plasmodium Falciparum in Myanmar: A Cross-Sectional Survey of the K13 Molecular Marker*. The Lancet Infectious Diseases 2015, 21–26.
- Valler, M. J.; Green, D. *Diversity Screening versus Focussed Screening in Drug Discovery*. Drug Discovery Today 2000, 5 (7), 286–293.
- Voet, D.; Voet, J. G.; Pratt, C. W.; Maelicke, A.; Müller-Esterl, W. *Lehrbuch Der Biochemie*, 2nd ed.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002.
- Volwiler, E. H.; Tabern, D. L. *Thio-Barbituric Acid Derivates*. 218, 103, 1939.
- W.W. Cleland. *The Kinetics of Enzyme-Catalyzed Reactions with Two or More Substrates*. Biochem. Biophys. Acta 1963, 67, 104–137, 173–196.
- Wegener, H. C. *Antibiotics in Animal Feed and Their Role in Resistance Development*. Current Opinion in Microbiology 2003, 6 (5), 439–445.

- Wellcome Trust; The Center for Infectious Disease Research and Policy. *Recommendations for Accelerating the Development of Ebola Vaccines*; Minnedota, 2015.
- Wells, T. N. C. *Is the Tide Turning for New Malaria Medicines?* Science 2010, 329 (5996), 1153–1154.
- White, N. J. *Antimalarial Drug Resistance*. The Journal Of Clinical Investigation 2004, 113 (8), 1084–1092.
- Witschel, M. C.; Höffken, H. W.; Seet, M.; Parra, L.; Mietzner, T.; Thater, F.; Niggeweg, R.; Röhl, F.; Illarionov, B.; Rohdich, F.; et al. *Inhibitors of the Herbicidal Target IspD: Allosteric Site Binding*. Angewandte Chemie (International ed. in English) 2011, 50 (34), 7931–7935.
- Witschel, M.; Röhl, F.; Niggeweg, R.; Newton, T. *In Search of New Herbicidal Inhibitors of the Non-Mevalonate Pathway*. Pest management science 2013, 69 (5), 559–563.
- World Health Organization. *Guidelines for the Treatment of Malaria Second Edition*; Geneva 27, 2010.
- World Health Organization. *Malaria*; Geneva, 2014.
- Wunder F, Kalthof B, Müller T, H. J. *Functional Cell-Based Assays in Microliter Volumes for Ultra-High Throughput Screening*. Comb Chem High Throughput Screen. 2008, 11 (7), 495–504.
- Zamenhof, P. J.; Villarejo, M. *Construction and Properties of Escherichia Coli Strains Exhibiting -Complementation of -Galactosidase Fragments in Vivo*. Journal of Bacteriology 1972, 110 (1), 171–178.
- Zeidler, J.; Schwender, J.; Muller, C.; Wiesner, J.; Weidemeyer, C.; Beck, E.; Jomaa, H.; Lichtenthaler, H. K. *Inhibition of the Non-Mevalonate 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphate Pathway of Plant Isoprenoid Biosynthesis by Fosmidomycin*. Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences 1998, 53 (11-12), 980–986.
- Zhang, J.-H.; Chung, T. D. Y.; Oldenburg, K. R. *A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays*. Journal Of Biomolecular Screening 1999, 4 (2).
- Zinglé, C.; Kuntz, L.; Tritsch, D.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M. *Isoprenoid Biosynthesis via the Methylerythritol Phosphate Pathway: Structural Variations around Phosphonate Anchor and Spacer of Fosmidomycin, a Potent Inhibitor of Deoxyxylulose Phosphate Reductoisomerase*. The Journal of organic chemistry 2010, 75 (10), 3203–3207.

8. Danksagung

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Markus Fischer danke ich für den Austausch der Ergebnisse und deren Verwendung, sowie zahlreicher Tipps und das stete Interesse am Fortgang dieser Arbeit. Außerdem danke ich Prof. Dr. Markus Fischer für die Bereitstellung des synthetischen Gens aus Kapitel 4.1. und die Idee an diesem Konstrukt.

Mein Dank gilt auch Dr. Tobias Gräwert für die herzliche Aufnahme und Einarbeitung in das Thema, sowie der Arbeitsgruppe. Außerdem danke ich dir für unzähligen hilfreichen Tipps und Tricks im Umgang mit Proteinen. Und natürlich für die Betreuung meiner Promotion als Zweitbetreuer.

Einen Dank möchte ich auch Prof. Dr. Henning Tidow aussprechen für die Zweitkorrektur der Dissertation.

Einen besonderen Dank möchte ich der HANS-FISCHER-Gesellschaft aussprechen, für die Bereitstellung eines dreijährigen Stipendiums zur Durchführung meiner Promotion.

Mein herzlichster Dank gilt meinen Kolleginnen der Arbeitsgruppe, die mit mir täglich in die Mensa gingen und immer ein offenes Ohr hatten. Einen besonderen Dank möchte ich dabei Alexandra Siemens aussprechen, als direkte Kollegin und immer zur Hilfe bereit. Sowohl beruflich als auch privat immer als Ansprechpartner und Freund zur Stelle.

Zusätzlich möchte ich meinen ehemaligen Kollegen Sonja Schüssler und Dr. Sonja Sarge danken, die mir am Anfang der Promotion und auch später mit ihrer Erfahrung weitergeholfen haben und auch später immer zu einem regen Austausch auch privat bereit waren. Marina Creydt möchte ich für eine freundschaftliche Beziehung in der Promotion danken.

Ich danke außerdem allen weiteren derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern und Kollegen der Hamburg School of Food Science der Universität Hamburg, sowie dem Untersuchungsamt für das angenehme Arbeitsklima.

Des Weiteren danke ich meinen Diplomanden Olga Stelwach und Tobias Burmeister, sowie meiner BTA-Auszubildenden Judith Bartels und meiner Bachelorstudentin Arabella Karstedt.

Außerdem danke ich Dr. Boris Illarionov und Dr. Tobis Gräwert für die vielen hilfreichen Tipps und Kniffe in Bezug auf das High Throughput Screening. Meinen besonderen Dank möchte ich dabei an Dr. Boris Illarionov richten, der bei allen wichtigen Fragen immer zur Stelle war und jederzeit Probleme mit einem versucht hat zu lösen. Außerdem einen Dank für die Bereitstellung der rekombinanten Enzyme *EclspE*, *AtlspD* und *EclspC*, sowie DXP als Substratedukt. Besonderen Dank für die Programmierung der Ergebnisauswertung der ganzen HTS-Ergebnisse und weiteren Charakterisierung der Inhibitoren.

Meinen besonderen Dank möchte ich der Kooperation mit der BASF (Dr. Matthias Witschel) und die freundlicherweise bereit gestellte Substanzbank für das HTS, aussprechen.

Ein Dank gilt auch den anderen Kooperationspartnern, wie der Arbeitsgruppe von Prof. François Diederich von der ETH Zürich, der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gisbert Schneider von der ETH Zürich und der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Michael Groll von der TU München, sowie Prof. Dr. Adelbert Bacher von der TU München.

Des Weiteren möchte ich der NMR-Abteilung von Dr. Thomas Hackl an der Universität Hamburg danken, für die vielen durchgeführten Messungen.

Außerdem gilt mein Dank der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Sascha Rohn und besonders Dr. Kathrin Tscherch sowie Valeria Reim für die Nutzung der Dünnschichtchromatographie.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken. Ohne den Beistand und die Hilfe meiner Familie wäre ich nie so weit gekommen. Ein besonderer Dank geht dabei an meinen Mann Christian, der mich nie aufgegeben und immer wieder Mut zugesprochen hat und vor allem immer an mich geglaubt hat. Ohne dich wäre alles nur halb so viel wert.

Und auch bei meinen Freunden möchte ich mich für die vielen Gespräche und den Rückhalt bedanken.

9. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den 24.08.2017