Biochemische und strukturelle Charakterisierung der Glutamat-Dehydrogenasen aus *Plasmodium falciparum*

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)



dem Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgelegt

von

Kathleen Zocher aus Doberlug-Kirchhain

Gießen, Januar 2011

Die vorliegende Arbeit wurde am Interdisziplinären Forschungszentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen, am Institut für Ernährungswissenschaft, Professur für Biochemie der Ernährung des Menschen, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Katja Becker durchgeführt.

Angenommen vom Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen am 11.01.2011.

Dekan:Prof. Dr. Volkmar WoltersReferentin:Prof. Dr. Katja BeckerKoreferent:Prof. Dr. Michael Martin

"Das Schönste, was wir erleben können, ist das Geheimnisvolle!"

- Albert Einstein -

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
Allgemeine Abkürzungen	VIII
1-Buchstaben- und 3-Buchstabenabkürzungen der Aminosäuren	X

1	Einleitung	1
1.1	Malaria	1
1.1.1	Der Parasit im menschlichen Wirt – Pathogenese der Malaria	2
1.1.2	Strategien zur Malariakontrolle	5
1.1.3	Bisher eingesetzte Malariamedikamente	6
1.2	Glutamat-Dehydrogenasen	8
1.2.1	NAD ⁺ und NADP ⁺	10
1.2.2	Einteilung der Glutamat-Dehydrogenasen	11
1.2.3	Bekannte Proteinstrukturen	11
1.3	Die humane Glutamat-Dehydrogenase	13
1.3.1	Funktion und Lokalisation	13
1.3.2	Struktur der humanen und bovinen Glutamat-Dehydrogenasen	15
1.3.3	Allosterische Regulation dual-spezifischer Glutamat-Dehydrogenasen	16
1.3.4	Hyperinsulinismus-Hyperammonämie-Syndrom	18
1.3.5	Hemmstoffe der humanen GDH	19
1.4	Die Glutamat-Dehydrogenasen aus Plasmodium falciparum als Zielmoleküle v	on
	Wirkstoffen gegen Malaria	20
1.4.1	<i>Pf</i> GDH als Zielmoleküle	20
1.4.2	Glutamat-Dehydrogenasen in Plasmodium falciparum	21
1.4.3	Glutamat-Dehydrogenase 1	21
1.4.4	Oxidativer Stress in Mensch und Parasit	23
1.5	Röntgenstrukturanalyse von Proteinmolekülen	25
1.6	Wirkstoffsuche durch rationales Drug Design	27
1.7	Modellierung einer Proteinstruktur durch Verfahren des Molecular Modelling.	29
1.8	Zielsetzung der Arbeit	30

Material und Gerate	
Chemikalien, Enzyme und Fertigansätze	31
Chromatographiematerialien, Verbrauchsmaterialien und Geräte	
Vektoren, Oligonucleotide und Templates	
Proteine und Konstrukte	
Bakterien- und Hefestämme	
Puffer und Lösungen	
Puffer zur DNA-Aufreinigung	
Expressionsmedien	
Puffer zur Proteinaufreinigung	40
Puffer für die Zellkultur	40
Stammlösungen	41
Computerprogramme	41
Methoden	42
Molekularbiologische Methoden	
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
Bestimmung der DNA-Konzentration	
Agarose-Gelelektrophorese	43
Spaltung doppelsträngiger DNA mittels Restriktionsendonukleasen	43
Ligation	44
Herstellung und Transformation kompetenter E. coli Zellen	45
Präparation von Plasmid-DNA	46
Biochemische Methoden	47
Plasmodium falciparum 3D7-Zellkultur	47
Gewinnung eines Proteinrohextraktes aus P. falciparum	47
Bakterienkultivierung	47
Heterologe Genexpression	48
Bakterienaufschluss mittels Ultraschall	51
Affinitätschromatografie	51
Abspaltung N-terminaler Aminosäurereste mittels Enterokinase	53
Abspaltung N-terminaler Aminosäurereste mittels Thrombin	54
Präparative Gelfiltration	54
Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
	Chemikalien, Enzyme und Fertigansätze

3.2.11	Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen	56
3.2.12	Immunochemischer Proteinnachweis mittels Western Blot	56
3.2.13	Proteinbestimmung nach Bradford	57
3.2.14	Untersuchung der Enzymfunktion	58
3.2.15	Untersuchung der Enzymaktivität in Gegenwart von Wirkstoffen	61
3.2.16	Lokalisationsstudien mit dem green fluorescent protein	61
3.3	Kristallographische Methoden	62
3.3.1	Kristallisation der <i>Pf</i> GDH2	62
3.3.2	Röntgenkristallographische Untersuchungen	63
3.3.3	Prozessierung der Rohdaten und molekularer Ersatz	64
3.3.4	Erstellung und Verfeinerung des Strukturmodells	65
3.4	Computergestützte Methoden	66
3.4.1	Homology Modelling	66
3.4.2	Docking	70

4	Ergebnisse	72
4.1	Die Glutamat-Dehyhdrogenase 1 aus P. falciparum	72
4.1.1	Heterologe Überexpression und Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose	72
4.2	Die Glutamat-Dehydrogenase 2 aus P. falciparum	74
4.2.1	Aminosäuresequenzvergleiche	74
4.2.2	Homologiemodell der <i>Pf</i> GDH2	75
4.2.3	Klonierung der einzelnen PfGDH2-Konstrukte	76
4.2.4	Rekombinante Darstellung der <i>Pf</i> GDH2	78
4.2.5	Abspaltung des His ₆ -tags mittels Thrombin	79
4.2.6	Spezifischer immunochemischer Nachweis der PfGDH2	80
4.2.7	Kinetische Parameter der <i>Pf</i> GDH2	80
4.2.8	Kristallisationsansätze mit der <i>Pf</i> GDH2	81
4.2.9	Lösung und Verfeinerung der Kristallstruktur der PfGDH2	82
4.2.10	Kristallstruktur der <i>Pf</i> GDH2	85
4.2.11	Monomer-Monomer-Interaktionen	86
4.3	Die Glutamat-Dehydrogenase 3 aus P. falciparum	88
4.3.1	Klonierungs- und Überexpressionsversuche des PfGDH3 full-length Proteins	88
4.3.2	<i>Pf</i> GDH3 Konstrukte	88
4.3.3	Überexpression der PfGDH3 full-length in Saccharomyces cerevisiae	89

4.4	Ergebnisse für die humane Glutamat-Dehydrogenase	90
4.4.1	Überexpression und optimierte Aufreinigung	90
4.4.2	Biochemische Charakterisierung der hGDH	90
4.4.3	Aufreinigung der hGDH im GST-Genfusionssystem	91
4.5	Subzelluläre Lokalisation der Glutamat-Dehydrogenasen aus P. falciparum	92
4.6	Aktivitätsbestimmung der Glutamat-Dehydrogenasen in Anwesenheit von	
	potentiellen Wirkstoffen	93
4.7	Docking-Lösungen	97
5	Diskussion	102
5.1	Bewertung der Genexpression und Aufreinigungsoptimierung für die PfGDH	2.102
5.2	Die <i>Pf</i> GDH1 und <i>Pf</i> GDH2 im Vergleich	104
5.3	Lokalisation der Glutamat-Dehydrogenasen in P. falciparum	108
5.4	<i>Pf</i> GDH3	109
5.4.1	Prädiktive Sequenzvergleiche zur Analyse der PfGDH3 Funktion	111
5.5	Suche nach Inhibitoren für die GDH	114
5.6	Rolle der Glutamat-Dehydrogenasen im Stoffwechsel des Malariaparasiten	116
6	Zusammenfassung	118
7	Literaturverzeichnis	122
Anhang		130
Danksag	ung	138
Eidesstaa	tliche Erklärung	139

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Weltweite Verbreitung der Malaria	2
Abb. 1.2	Darstellung des Lebenszyklus des Malaria Parasiten	3
Abb. 1.3	Auswahl neuerer und älterer Wirkstoffe in der Malariatherapie	7
Abb. 1.4	Oxidative Desaminierung von L-Glutamat	8
Abb. 1.5	Reaktionsmechanismus der Glutamat-Dehydrogenase aus C. symbiosum	9
Abb. 1.6	NAD ⁺ und NADP ⁺ in <i>stick</i> Darstellung	10
Abb. 1.7	Übertragung eines Hydridions auf NAD ⁺	10
Abb. 1.8	Kristallstruktur der GDH aus Clostridium symbiosum	12
Abb. 1.9	Monomer der bovinen GDH mit Bindedomänen	16
Abb. 1.10	Schematische Darstellung der evolutionären Entwicklung von	
	Antennen und allosterischer Regulation	17
Abb. 1.11	Einfluss verschiedener Faktoren auf die Insulinsekretion und die	
	Harnstoffsynthese	19
Abb. 1.12	Antioxidatives Abwehrsystem von Plasmodium falciparum	24
Abb. 1.13	Ablaufschema des strukturbasierten Wirkstoffdesigns	28
Abb. 2.1	Schematische Darstellung der generierten Konstrukte für die	
	<i>Pf</i> GDH2 und <i>Pf</i> GDH3	37
Abb. 3.1	Schema zur Proteinaufreinigung über GST-Sepharose	53
Abb. 3.2	Anordnung der einzelnen Komponenten während des Blotvorgangs	57
Abb. 3.3	Absorptionsspektrum für Coomassie Brilliant Blue	58
Abb. 3.4	Darstellung der Kristallisationsmethoden	63
Abb. 3.5	Vorgehensweise für die Generierung von Proteinmodellen	67
Abb. 3.6	Torsionswinkel des Proteinrückgrats	69
Abb. 3.7	Ramachandran-Plot	69
Abb. 4.1	SDS-PAGE-Gele der Expression und Reinigung der PfGDH1	72
Abb. 4.2	Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie für die	
	Rekombinante <i>Pf</i> GDH1	73
Abb. 4.3	Fotografie der reproduzierten PfGDH1-Kristalle	73
Abb. 4.4	Sequenzalignment der PfGDH1 und PfGDH2	74
Abb. 4.5	Ramachandran-Plot des berechneten Homologie-Modells für die	
	<i>Pf</i> GDH2	75
Abb. 4.6	<i>Pf</i> GDH2 Konstrukte	76

Abb. 4.7	Eluate nach Aufreinigung der PfGDH2(-60) und PfGDH2(-21) über	
	Ni-NTA-Agarose	77
Abb. 4.8	SDS-Gele der Expression und Reinigung der PfGDH2	78
Abb. 4.9	Elutionsprofil der PfGDH2 in der Gelfiltration	79
Abb. 4.10	Immunochemischer Nachweis der Abspaltung des His6-tags mittels	
	Thrombin	79
Abb. 4.11	Western Blot mit spezifischem anti- <i>Pf</i> GDH2-Antikörper	80
Abb. 4.12	<i>Pf</i> GDH2 Kristalle	81
Abb. 4.13	Endmodell des Hexamers der <i>Pf</i> GDH2	84
Abb. 4.14	Elektronendichtekarten im Verlauf der Verfeinerung	84
Abb. 4.15	Ramachandran-Plot für die Kristallstruktur der GDH2 aus Plasmodium	
	falciparum nach dem letzten Verfeinerungszyklus	85
Abb. 4.16	Überlagerung jeweils eines Monomers der PfGDH1 und PfGDH2	86
Abb. 4.17	Zwei Beispiele für Monomer-Monomer-Interaktionen in der PfGDH1	
	und <i>Pf</i> GDH2	87
Abb. 4.18	Konstrukte der <i>Pf</i> GDH3	88
Abb. 4.19	Western Blot der <i>Pf</i> GDH3 _(END)	89
Abb. 4.20	SDS-Gel vor und nach Aufreinigung der hGDH über Ni-NTA-Agarose	90
Abb. 4.21	Lokalisation der PfGDH1-3 mittels GFP-Fusionsproteinen	92
Abb. 4.22	Definierte Bindetaschen in den Kristallstrukturen der hGDH,	
	der <i>Pf</i> GDH1 und der <i>Pf</i> GDH2	98
Abb. 4.23	Docking-Ergebnisse für den Liganden 57D02	99
Abb. 4.24	Aminosäurereste, die den Liganden 57D02 koordinieren	99
Abb. 4.25	Docking-Lösung für den Liganden 57A12	100
Abb. 5.1	Aminosäurereste, die an der Koordinierung von NADP ⁺ und Glutamat	
	beteiligt sind	105
Abb. 5.2	Verhalten des C-Terminus der boGDH nach Bindung der Inhibitoren	107
Abb. 5.3	Überlagerung der PfGDH2 mit der Kristallstruktur des Protein-	
	Inhibitor-Komplexes 3ETG der boGDH	108
Abb. 5.4	Darstellung der Domänen, die innerhalb der PfGDH3 Sequenz	
	identifiziert wurden	109
Abb. 5.5	Effizienz verfügbarer Trennmethoden für Biomoleküle	110
Abb. 5.6	Sequenzvergleich der PfGDH3 mit der GDH aus S. clavuligerus	113
Abb. 5.7	Koordinierung von Bithionol in den Strukturen der boGDH,	

PfGDH1 und PfGDH2		115
Abb.5.8	Reaktionen und Funktionen des Citrat"zyklus" in P. falciparum	117

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Unterschiede zwischen den jeweiligen GDH der einzelnen Familien	11
Tab. 1.2	Strukturen hexamerer GDH der Familie S_50 _I	12
Tab. 3.1	Zeiten und Temperaturen für die einzelnen Reaktionsschritte der PCR	42
	für die <i>full-length Pf</i> GDH-Amplifikate	
Tab. 3.2	Verwendete Restriktionsenzyme	44
Tab. 3.3	Transformationsansätze für alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide	45
Tab. 3.4	Bedingungen für die Überexpression der einzelnen PfGDH3 Konstrukte	49
Tab. 3.5	Getestete Bedingungen für die Überexpression der hGDH	50
Tab. 3.6	Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Gels	55
Tab. 3.7	Erlaubte Donoren und Akzeptoren basierend auf SYBYL-Atomtypen	71
Tab. 4.1	Parameter zur Datensammlung und Statistiken zur Auswertung der	
	<i>Pf</i> GDH2 Struktur	82
Tab. 4.2	Aminosäurereste der Glutamat-Dehydrogenasen 1 und 2 aus P.	
	falciparum sowie der humanen GDH, die an der Monomer-Monomer-	
	Interaktion beteiligt sind	87
Tab. 4.3	Enzymkinetische Parameter der His-getaggten hGDH	91
Tab. 4.4	Liste der Wirkstoffe, die zur Inhibition der PfGDH1 führten	93
Tab. 4.5	Liste der Wirkstoffe, die zur Inhibition der PfGDH2 führten	94
Tab. 4.6	Liste der Wirkstoffe, die zur Inhibition der hGDH führten	94
Tab. 4.7	Hemmkinetische Daten für die Substanzen Bithionol, GW5074 und	
	Hexachlorophen	96
Tab. 4.8	Aminosäuren, die mit Bithionol, GW5074 und Hexachlorophen in der	
	boGDH und der GDH1 und GDH2 aus P. falciparum wechselwirken	96
Tab. 4.9	Atome zur Definition der Bindetasche für die jeweilige Proteinstruktur	97
Tab. 5.1	Kinetische Parameter der PfGDH1 und PfGDH2 im Vergleich	102
Tab. 5.2	Aminosäurereste, die an der Koordinierung von Glutamat und NADP ⁺	
	beteiligt sind	105

Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen

Über SI-Einheiten und gängige Abkürzungen der deutschen Sprache hinaus wurden folgende Abkürzungen verwendet:

ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
С	Carbenicillin
Ch	Chloramphenicol
Da / kDa	Dalton/ Kilodalton
ddH ₂ O	Reinstwasser, zweifach destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTNB	5, 5'-Dithiobis(2-nitrobenzoat)
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
G6PDH	Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase
GDH	Glutamat-Dehydrogenase
GSH/GSSG	Glutathion reduziert/oxidiert
GST	Glutathion-S-Transferase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-(2-ethansulfonsäure)
HRP	horse radish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IL-1	Interleukin 1
IPTG	Isopropyl-ß-thiogalactopyranosid
K _i	Hemmkonstante
K _m	Michaelis-Konstante
LB	lysogeny broth; Luria Broth Medium

L-Rha	Rhamnose
Μ	Molar (mol/l)
M _r	relative Molekülmasse
МНС	major histocompatibility complex
NAD^+	Nicotinamidadenindinucleotid (oxidierte Form)
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (oxidierte Form)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriacetat
OD	optische Dichte
p.a.	pro analysis (für Analyseverfahren)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction
PDB	Proteindatenbank
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS (- Puffer/-Protease)	PreScission TM (-Puffer/ - Protease)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RMSD	root mean square deviation
RNA	Ribonucleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Spez. Akt.	Spezifische Aktivität
ТВ	terrific broth
TEA	Triethanolamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (µmol/min)
UMP	Uridinmonophosphat
UpM / rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
UV-Vis	ultraviolett-sichtbares Licht
v/v	Volumenprozent
w/v	Masseprozent
WHO	World Health Organization
ZNS	zentrales Nervensystem

1-Buchstaben- und 3-Buchstabenabkürzungen der Aminosäuren

Ala	Alanin
Asx	Asparagin oder Aspartat
Cys	Cystein
Asp	Aspartat
Glu	Glutamat
Phe	Phenylanlanin
Gly	Glycin
His	Histidin
Ile	Isoleucin
Lys	Lysin
Leu	Leucin
Met	Methionin
Asn	Asparagin
Pro	Prolin
Gln	Glutamin
Arg	Arginin
Ser	Serin
Thr	Threonin
Sel	Selenocystein
Val	Valin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Glx	Glutamin oder Glutamat
	Ala Asx Cys Asp Glu Phe Gly His Ile Lys Leu Met Asn Pro Gln Arg Ser Thr Sel Val Trp Tyr Glx

1 Einleitung

Malaria - auch Sumpffieber oder Wechselfieber genannt - zählt zu den weltweit verbreitetsten Infektionskrankheiten, die bislang weder durch Immunisierungsmaßnahmen, universell einsetzbare Chemoprophylaxe, noch durch Ausrottungsversuche des Vektors, wirksam eingedämmt werden konnte. In den folgenden Kapiteln wird zunächst auf grundlegende Charakteristika der Malaria eingegangen, sowie der Mechanismus ihrer Pathogenese näher erläutert. Mit der Skizzierung des Parasitenmetabolismus und den damit verbundenen Möglichkeiten des Designs neuer Wirkstoffe soll deutlich gemacht werden, welche Rolle den Glutamat-Dehydrogenasen des Parasiten innerhalb des Krankheitsgeschehens zukommt. Eine besondere Betrachtung der bisher aufgeklärten Proteinstrukturen von Glutamat-Dehydrogenasen unterschiedlicher Spezies, insbesondere der Säuger-Enzyme, im Vergleich zu der bekannten Struktur der GDH1 des Malariaparasiten, soll Einblick in die Möglichkeit der Beeinflussung derselben geben. Mit der Beschreibung der Methoden der Röntgenkristallographie und des virtuellen Drug Designs schließt die Einleitung.

1.1 Malaria

Etwa die Hälfte der Weltbevölkerung ist einem erhöhten Malariarisiko ausgesetzt und 243 Millionen Krankheitsfälle führten im Jahr 2008 zu rund 900 000 Todesopfern. Wie die Abbildung 1.1 zeigt, ist die Inzidenz in den Ländern südlich der Sahara am höchsten. Hier liegt die Rate der Neuerkrankungen bei über 200 pro 1 000 Einwohner [WHO, 2009]. Hinzu kommt, dass bezüglich der Anzahl der Krankheits- und Todesfälle in den Entwicklungsländern, eine nicht unerhebliche Dunkelziffer angenommen werden muss.

Die humane Malaria wird durch eine Infektion mit einer der fünf möglichen humanpathogenen *Plasmodien*-Spezies – *P. falciparum, P. vivax, P. ovale, P. malariae* und *P. knowlesi* – hervorgerufen [Galinski & Barnwell, 2009]. *Plasmodium falciparum* ist der klinisch bedeutsamste und bedrohlichste Erreger und der Krankheitsverlauf der *P. falciparum* Malaria wird als besonders schwerwiegend beschrieben. Beim Menschen existieren drei durch die verschiedenen *Plasmodien*-Spezies bedingte Ausprägungen des Krankheitsbildes, die sich jeweils durch ihren Krankheitsverlauf und die Prognose unterscheiden: *Malaria tertiana und Malaria quartana*.



Abb. 1.1: Weltweite Verbreitung der Malaria (unter Angabe der Risikostufen nach der Deutschen Gesellschaft für Tropenmedizin und Internationale Gesundheit (DTG)) [2009].

1.1.1 Der Parasit im menschlichen Wirt – Pathogenese der Malaria

Der Lebenszyklus der Plasmodien ist sehr komplex und besteht aus mehreren Phasen. Er setzt sich aus zwei Grundzyklen, dem asexuellen Zyklus im Menschen und dem sexuellen Zyklus in der weiblichen Anophelesmücke, zusammen (s. Abb. 1.2). Nach der Übertragung der Parasiten durch die Mücke, bei der Sporozoiten in die Blutbahn des Wirtes entlassen werden, befallen diese sofort die Leber. In den Hepatozyten entwickeln sich diese zunächst in einem präerythrozytären Zyklus von Schizonten zu Merozoiten (Leberschizogonie, s. Abb. 1.2 A) [Sturm et al., 2006]. Obwohl infizierte Hepatozyten in der Lage sind, parasitenspezifische Antigene im MHC-Klasse-I-Kontext auf ihrer Oberfläche zu präsentieren [Hill et al., 1992], sind keine Symptome und nur minimale histopathologische Änderungen feststellbar. Dies ist laut Sturm *et al.* [2006] unter anderem dadurch zu erklären, dass Merozoiten aktiv Ca²⁺-Ionen akkumulieren, die aus internen Ca²⁺-Speichern absterbender Leberzellen freigesetzt werden. Apoptotische Zellen sind durch eine asymmetrische Verteilung von Phospatidylserinresten auf ihrer Zelloberfäche gekennzeichnet, die sich aus durch Calcium-Ionen-gesteuerte Signalwege ergibt. Durch Aufnahme von Ca²⁺-Ionen durch die Merozoiten, wird der Calcium-Spiegel konstant gehalten, was eine Umverteilung des Phosphatidylserins und damit das Erkennen apoptotischer Hepatozyten durch das menschliche Immunsystem verhindert. Nach sieben bis zehn Tagen werden mehrere Tausend Merozoiten aus den Hepatozyten freigesetzt. Diese befallen Erythrozyten, in denen sie sich dann über ringförmige Trophozoiten zu reifen Schizonten entwickeln. Die Invasion der Parasiten erfolgt zunächst über einen initialen *long-range* Kontakt, über nicht spezifische Mechanismen wie z. B. elektrostatische Wechselwirkungen, gefolgt von der Ausbildung einer festen Bindung des Parasiten an den Erythrozyten über EBA-175 (*erythrocyte binding antigen*) und Glycophorin A [Barnwell & Galinski, 1998]. Nachdem sich der Parasit vollständig über das Aktin-Myosin-Netzwerk des Erythrozyten in diesen hineingeschoben hat, schließt sich die Erythrozytenmembran wieder, so dass er innerhalb der so gebildeten parasitären Vakuole isoliert ist.



Abb. 1.2: Darstellung des Lebenszyklus des Malariaparasiten Plasmodium falciparum.

- A) Exoerythrocytäre Schizogonie Vermehrung der Parasiten in der Leber des Wirtes;
- B) Erythrozytäre Schizogonie Vermehrung des Parasiten in den roten Blutkörperchen;
- C) Sporogonie Vermehrung der Parasiten in der Mücke [http://www.dpd.cdc.gov].

Die Pathophysiologie der *Malaria tropica*, auf die hier insbesondere eingegangen werden soll, resultiert überwiegend aus vier Mechanismen während des erythrozytären Zyklus der Parasiten (s. Abb. 1.2 B). Diese beinhalten die Oberflächenveränderung und Zerstörung der Erythrozyten, die Freilassung von Erythrozyten- und Parasitenbestandteilen in den Blutkreislauf und schließlich die Reaktion des menschlichen Organismus [White, 1996]. Die Veränderungen des infizierten Erythrozyten drücken sich hauptsächlich in modifizierten Mechanismen des Membrantransportes und einer verminderten Verformbarkeit aus. Weiterhin wird die Expression unterschiedlicher Oberflächenantigene induziert, was mitunter zu einer vermehrten Zytoadhärenz infizierter Erythrozyten in der Mikrovaskulatur führt. Hierfür wird maßgeblich das Protein PfEMP1 (erythrocyte membrane protein) bzw. SICA (surface of the infected cell antigen) verantwortlich gemacht. Dieses wird durch 50-60 separate Gene (var-Gen-Familie) kodiert, die der Parasit innerhalb kürzester Zeit sequentiell exprimieren kann [Borst, 1995]. Diese Antigenvariation als auch die damit verbundene Fähigkeit zur Adhäsion ermöglichen es P. falciparum, eine persistierende Infektion aufrecht zu erhalten. Bei letalen Malariainfektionen konnte beobachtet werden, dass sich eine Vielzahl von sequestrierten Erythrozyten in Leber, Milz, Gehirn, Herz, Lunge und Gastrointestinaltrakt zeigten. Dadurch wird der Flusswiderstand der betroffenen Kapillaren lokal so stark erhöht, dass es zu Rissen in den Gefäßen kommen kann [Berendt et al., 1994]. Ausserdem führt der Blutstau zunächst zu einer verminderten Diffusion von Sauerstoff, Glucose und anderen Metaboliten, was eine Hypoxie und Hypoglykämie zur Folge hat. Die Anreicherung von parasitierten Erythrozyten in den Blutgefäßen des Gehirns korreliert mit der schwersten Form der Malaria, der zerebralen Malaria.

Da Erythrozyten kernlos sind und daher keine Antigene im MHC-Kontext auf ihrer Oberfläche präsentieren können, bieten sie dem Parasiten einen optimalen und immunopriviligierten "Lebensraum". Dort teilt sich der Schizont in mehrere Tochtermerozoiten, die durch Platzen der Erythrozyten freigesetzt werden und neue Erythrozyten infizieren. Die intravasale Hämolyse, sowohl infizierter als auch nicht infizierter Erythrozyten, ist die Hauptursache für die malariabedingte Anämie. Durch die Lyse der roten Blutkörperchen werden jedoch nicht nur weitere Parasiten, sondern auch z.T. toxische Zelltrümmer und parasitäre Antigene in die Blutbahn entlassen. Dies führt zu einer massiven inflammatorischen Antwort des humanen Wirtes über Cytokine (TNF-a) und Interleukine (IL-1) [Day et al., 1999], wodurch Fieber entsteht. Die Dauer der asexuellen Schizogonie ist für die humanpathogenen Malariaparasiten unterschiedlich und beträgt 48-50 h bei P. vivax, P. ovale, P. falciparum (tertian) bzw. 72 h bei P. malariae (quartan). Bei Ausbleiben einer frühzeitigen und effektiven Therapie kann eine P. falciparum Malariainfektion bei 15-20 % der nicht-immunen Erkrankten zum Tod führen [Kretschmer & Klauss, 1996].

1.1.2 Strategien zur Malariakontrolle

Traditionell können zwei unterschiedliche Ansätze zur Kontrolle der Malaria unterschieden werden. Der erste und eher indirekte Ansatz ist der biologische Ansatz, der das Ziel verfolgt, die Transmission des Parasiten von der Anophelesmücke als Vektor zum menschlichen Wirt zu unterbinden. Der zweite Ansatz ist der klinische Ansatz und verfolgt das Ziel, den Parasitenbefall des infizierten Patienten einzudämmen, um damit das Leben des Patienten zu stabilisieren und zu schützen [Sinden & Gilles, 2002].

Die Möglichkeiten für den biologischen Ansatz sind vielfältig und beinhalten im Rahmen der Expositionsprophylaxe unter anderem den Einsatz von Moskitonetzen oder Insektiziden. Weiterhin wird versucht, über eine Reduktion der Anopheles-Population oder transgene Vektoren, eine Übertragugung der Parasiten zu vermindern [Christophides, 2005].

Die Umsetzung des klinischen Ansatzes wird bis heute fast ausschließlich durch den Einsatz von Chemotherapeutika erreicht. Ein Problem des chemotherapeutischen Ansatzes ist jedoch, dass sowohl der Erreger als auch der Wirt zu den Eukaryoten zählen. Aus diesem Grund ist es hier entscheidend, Zielmoleküle oder Stoffwechselwege im Parasiten ausfindig zu machen, die einzigartig für ihn sind. Eine weitere Möglichkeit stellt das Nutzen von Unterschieden in der Effizienz von Wirkstoffen dar, mit der sie den Parasiten penetrieren oder mit ihm oder bestimmten Molekülen (Proteinen) interagieren, verglichen zum Verhalten in den Wirtszellen. Für die Suche nach Zielmolekülen eignen sich generell Proteine, die in essentielle Stoffwechselwege oder die Replikation involviert sind und damit zum Überleben des Parasiten im Wirt beitragen. Bisher konnten im Speziellen Enzyme aus dem Nucleinsäureaber auch dem Kohlenhydrat-Metabolismus als wichtige drug targets identifiziert werden und darüber hinaus auch Enzyme, die an der Eliminierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt sind. Beispielhaft können hier die Dihydrofolatreduktase-Thymidylatsynthase [Nzila, 2006] und die Lactat-Dehydrogenase [Granchi et al., 2010], respektive die Thioredoxin-Reduktase [Rahlfs & Becker, 2006] genannt werden. Insbesondere in der letzten Dekade haben auch mitochondrial lokalisierte Enzyme, wie die des Citratzyklus oder der Atmungskette, an Wichtigkeit als Zielmoleküle gewonnen. Eine Zusammenfassung darüber wurde in unterschiedlichen Veröffentlichungen gegeben [van Dooren et al., 2006; Mather et al., 2007; Seeber et al., 2008; Vaidya & Mather, 2009; Rodrigues et al., 2010]. Zusätzlich zum Mitochondrium besitzen Malariaparasiten einen Apicoplasten. Dieser ist ein stark reduziertes Plastid, welches evolutionär vermutlich durch doppelte Phagozytose einer Rotalgenart, die ihrerseits ein Cyanobakterium als endosymbiontischen Prokaryoten beherbergte, entstand [Lucius & Loos-Frank, 2008]. Da die Stoffwechselwege dieses Organells bakteriellen Ursprungs und damit sehr unterschiedlich zum Metabolismus des Wirtes sind, stellen sie attraktive Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente dar. In der vorliegenden Arbeit soll aufgezeigt werden, dass die untersuchten Glutamat-Dehydrogenasen mehrere der aufgezählten Kriterien erfüllen, und daher als vielversprechende *drug targets* angesehen werden können.

Eine dritte Strategie eröffnet sich mit der Entwicklung eines geeigneten Impfstoffes gegen Malaria. Ansätze zur Herstellung einer Malariaimpfung basieren entweder auf einer Immunisierung mit standardspezifischen Antigenen oder auf dem Einsatz attenuierter Parasiten [Targett & Grennwood, 2008]. Im Allgemeinen wird die Entwicklung von drei, in unterschiedlichen Stadien des Lebenszyklus der Parasiten wirkenden Impfstoffen in Betracht gezogen. Antisporozoiten Impfstoffe könnten präventiv gegen Infektionen eingesetzt werden, während Impfstoffe gegen Parasiten im Blutstadium dazu beitragen würden, schwerwiegende Manifestationen der Krankheit zu verhindern. Impfstoffe, die auf die Blockierung der Transmission abzielen, sollen hingegen zur Arretierung der Parasiten bereits in der Mücke führen [Persidis, 2000]. Einige der entwickelten Impfstoffe werden bereits in klinischen Studien getestet. Ein vielversprechender Kandidat ist der von GlaxoSmithKline in Kollaboration mit dem Walter Reed Army Institut entwickelte Impfstoff gegen das CSP (*circumsporozoite protein*), welcher seit 2009 in einer Phase-III-Studie getestet wird und bei erfolgreichem Verlauf 2012 zugelassen werden kann [Pierce & Miller, 2009].

1.1.3 Bisher eingesetzte Malariamedikamente

Die derzeit gebräuchlichen Antimalariamedikamente lassen sich in sieben Wirkstoffklassen einteilen: 4-Aminochinoline (Chloroquin und Amodiaquin), Arylaminoalkohole (Chinin, Mefloquin und Lumefantrin), 8-Aminochinoline (Primaquin), Antifolate (Pyrimethamin, Proguanil, Dapson und Sulfadoxin), Artemisinine (Artemisinin, Artesunat, Artemether, Arteether und Dihydroartemisinin), Hydroxynaphtochinone (Atovaquon) und Antibiotika (Doxycyclin und Clindamycin) [Schlitzer, 2008]. Seit dem Zweiten Weltkrieg, aber auch heute noch, wird zur Behandlung einer P. falciparum Malaria Chloroquin (s. Abb. 1.3 A) als das Medikament der ersten Wahl eingesetzt, da es billig, sicher und für die ambulante Therapie geeignet ist [Cooper & Magwere, 2007]. Aufgrund der starken Resistenzentwicklung gegen diesen Wirkstoff, hat sich in Afrika seit den 60er Jahren, die in den Folatmetabolismus der Parasiten eingreifende Kombination aus dem Diaminopyrimidin Pyrimethamin (s. Abb. 1.3 B) und dem Sulfonamid Sulfadoxin (Fansidar[®]) als Alternative durchgesetzt. Jedoch haben sich hauptsächlich in Südamerika und Südostasien auch gegen diese Wirkstoffe bereits Resistenzen entwickelt [Sibley et al., 2001]. In afrikanischen Ländern wird daher vermehrt die ebenfalls auf den Folatmetabolismus der Protozoen gerichtete Kombination der älteren Wirkstoffe Chlorproguanil und Dapson ("Lapdap") eingesetzt [Alloueche et al., 2004]. Weiterhin steht auch heute noch das aus der Rinde des Gelben Chinarindenbaumes (Cinchona officinalis) gewonnene Chinin (s. Abb. 1.3 C) zur Verfügung, welches bereits seit dem 17. Jahrhundert zur Therapie der Malaria eingesetzt wird. In den letzten fünfzehn Jahren wurden drei neue Medikamente in den westlichen Ländern zugelassen, die oben genannten Wirkstoffklassen zugeordnet werden können [Olliaro & Taylor, 2003]. Die erste Klasse besteht aus Derivaten des Artemisinins (s. Abb. 1.3 E), einem Sesquiterpenlacton aus Wermutarten, das bereits Anfang der 70er Jahre von chinesischen Chemikern aus den Blättern verschiedener Artemisia-Arten isoliert wurde. Die Derivate Artemether, Artesunat und Dihydroartemisinin besitzen eine stärkere Aktivität gegen P. falciparum als die Ausgangssubstanz selbst, sind allerdings auch teurer [Winstanley, 2000]. Die zweite Klasse wird von den Hydroxynaphtochinonen gebildet. Die von GlaxoSmithKline entwickelte Kombination aus dem Hydroxynaphtochinon Atovaquon (s. Abb. 1.3 F), welches durch Bindung am Cytochrom bc1-Komplex die mitochondriale Atmung des Parasiten inhibiert, und dem Biguanid Proguanil (Malarone[®]), stellte ebenfalls eine Neuerung auf dem Gebiet der Malariatherapie dar [Bustos et al., 1999]. Seit 2006 erwies sich besonders die Kombination aus Artemisinin oder dessen Derivaten mit einem zweiten Wirkstoff, wie z. B. Lumefantrin, als sehr effektiv (= artemisinin-based combination therapies, ACT). Zurzeit ist kein weiterer Wirkstoff auf dem Markt vorhanden, der die ACT ablösen könnte, obwohl die Resistenzentwicklungen auch hierfür zunehmend sind [Dondorp et al., 2009].



Abb. 1.3: Auswahl neuerer und älterer Wirkstoffe in der Malariatherapie. A) Chloroquin,B) Pyrimethamin, C) Chinin, D) Mefloquin, E) Artemisinin, F) Atovaquon [übernommen aus Werner, 2008].

1.2 Glutamat-Dehydrogenasen

Glutamat-Dehydrogenasen (GDH) gehören zu den Oxidoreduktasen (EC 1.4.1.2-4) und katalysieren die reversible oxidative Desaminierung von Glutamat zu α-Ketoglutarat, unter Freisetzung von Ammoniak. Entsprechend des dafür verwendeten Elektronendonors bzw. -akzeptors können Glutamat-Dehydrogenasen in drei Gruppen eingeteilt werden. NADP(H)abhängige GDH (EC 1.4.1.4) wurden bisher hauptsächlich in Eukaryoten, Bakterien und identifiziert katalysieren dort die Reaktion Archaeen und in Richtung der Ammoniumassimilation. Die NAD(H)-abhängigen Enzyme (EC 1.4.1.2) sind hingegen hauptsächlich am Glutamatkatabolismus beteiligt und innerhalb der Pilze, Pflanzen und Bakterien verbreitet. Die dritte Gruppe wird von Glutamat-Dehydrogenasen gebildet, die sowohl NAD(H) als auch NADP(H) als Cofaktoren nutzen können, und konnten in den Mitochondrien ausschließlich höherer Eukaryoten nachgewiesen werden.

Während der durch diese Enzyme katalysierten Redoxreaktion wird unter Beteiligung von $NAD(P)^+$ ein Hydrid-Ion (1 Proton und 2 Elektronen) von einem reduzierten Substrat (Glutamat) auf den Nicotinamidring des Coenzyms übertragen, wobei NAD(P)H entsteht. Zusätzlich wird ein Proton an die wässrige Lösung abgegeben. In diesem ersten Teilschritt der Reaktion wird Glutamat zu α -Iminoglutarat oxidiert. Im zweiten Reaktionsschritt wird dieses dann hydrolytisch zu α -Ketoglutarat desaminiert (s. Abb. 1.4).





Die Glutamat-Dehydrogenase katalysiert die oxidative Desaminierung von L-Glutamat zu α -Ketoglutarat. Die Reaktion verläuft über eine Zwischenstufe, das α -Iminoglutarat. Als Cofaktor kann die Glutamat-Dehydrogenase NAD⁺ oder NADP⁺ nutzen [Löffler *et al.*, 2007].

Im Jahr 1992 entwickelten Stillman *et al.* anhand der Struktur der GDH aus *Clostridium symbiosum* ein detailliertes Schema zum Ablauf der Reaktion (s. Abb. 1.5).

Zu Beginn der Reaktionen bindet Lys125, das einen niedrigen pKa-Wert besitzt und deshalb deprotoniert vorliegt, an ein katalytisch wichtiges Wassermolekül, welches seinerseits über

eine Wasserstoffbrücke an die Ammoniumgruppe des Substrates gebunden ist. Durch den starken Elektronenzug von Asp165 kommt es zur Abspaltung eines Hydridions vom C_a des Glutamats und seiner Übertragung auf NAD⁺ (A). Durch die Deprotonierung der Ammoniumgruppe und den Abgang des Hydridions kommt es zur Ausbildung einer Iminiumgruppe. Das nun stark elektrophile C_a des Substrats wird durch das von Lys125, Gly91 und Gln110 koordinierte katalytische Wassermolekül angegriffen. Die Nucleophilie des Wassermoleküls wird erhöht, indem Lys125 ein Proton zurück erhält (B). Der durch den nucleophilen Angriff des Wassermoleküls entstandene Aminoalkohol ist instabil und spaltet nach Abgabe eines Protons an Asp165 Ammoniak ab (C). Die Produkte der Reaktion sind α -Ketoglutarat und Ammoniak, die Reduktionsäquivalente wurden auf NAD⁺ übertragen (D) [Werner, 2008].



Abb. 1.5: Reaktionsmechanismus der Glutamat-Dehydrogenase aus *C. symbiosum*. Abgebildet sind die an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste sowie Glutamat (rot) [modifiziert nach Werner, 2008].

1.2.1 NAD⁺ und NADP⁺

Da nahezu jede Stoffwechselreaktion, die in Zellen zum Abbau von Nährstoffen oder zum Abbau zelleigener Stoffe durchgeführt wird, eine Elektronenübertragungsreaktion ist, haben NAD⁺ und NADP⁺ eine Schlüsselposition im Energiestoffwechsel inne (s. Abb. 1.6).



Abb. 1.6: NAD⁺ und NADP⁺ in *stick* **Darstellung.** Der rote Kasten markiert die Position des Phosphatrestes im NADP⁺ (rot: Sauerstoffe, blau: Stickstoffe, orange: Phosphate, weiß: Wasserstoffe, schwarz: C-Atome).

Dabei übernehmen beide unterschiedliche Funktionen. In Säugetieren nimmt NAD⁺ bei katabolen Stoffwechselwegen Elektronen auf, während NADPH innerhalb reduktiver Biosynthesewege bevorzugt Elektronen abgibt. Dies lässt sich durch ihr unterschiedliches Redoxpotential erklären. In den meisten Geweben ist das Verhältnis von NADH/NAD⁺ sehr klein, woraus sich ein positives Redoxpotential ergibt. Die Reduktionsenergie des NADH wird dann unter anderem für den Aufbau eines Protonengradienten an der inneren Mitochondrienmembran genutzt, um ATP zu produzieren. NADPH hingegen kann als Reduktionsmittel angesehen werden, da es aufgrund des Verhältnisses von NADPH/NADP⁺, welches im Allgemeinen sehr groß ist, ein negatives Redoxpotential aufweist. Neben seiner Rolle in anabolen Stoffwechselwegen erfüllt NADPH in sämtlichen antioxidativen Abwehrmechanismen der Zelle eine weitere wichtige Funktion. Beispielhaft kann hier das Glutathion genannt werden, dessen Re-Reduktion durch die Glutathion-Reduktase mittels NADPH erreicht wird. Hierbei, und bei zahlreichen anderen Mechanismen, wirkt es indirekt als Antioxidans. Offenbar kann NADPH aber auch als direktes Antioxidans wirken und freie Radikale abfangen, sowie durch freie Radikale geschädigte Biomoleküle regenerieren [Kirsch et al., 2001].



Abb. 1.7: Übertragung eines Hydridions auf NAD⁺.

1.2.2 Einteilung der Glutamat-Dehydrogenasen

Laut Miñambres *et al.* [2000] können Glutamat-Dehydrogenasen anhand der Größe und Anzahl ihrer Untereinheiten unterschiedlichen Familien oder Klassen zugeordnet werden. Zur ersten Familie werden die GDH gezählt, deren Untereinheiten ein Molekulargewicht von etwa 50 kDa aufweisen, weshalb diese Sub-Familie auch als S_GDHs (small GDHs) bezeichnet wird. Zu ihr gehören sowohl die hexameren NAD⁺- oder NADP⁺-abhängigen Glutamat-Dehydrogenasen (50_I - Klasse), wie sie hauptsächlich in Bakterien und Säugern gefunden wurden, als auch die tetrameren NAD⁺-abhängigen Enzyme meist niederer Eukaryoten (50_{II} – Klasse). Die zweite Sub-Familie beinhaltet Glutamat-Dehydrogenasen, deren Untereinheiten ein molekulares Gewicht von etwa 115 kDa oder 180 kDa aufweisen (L_GDHs, large GDHs). Bisher charakterisierte Enzyme der L_115 Klasse treten als Tetramere auf, wohingegen die Mitglieder der L_180 Klasse vermutlich Hexamere ausbilden. Für die Mitglieder beider L_GDHs Klassen wird NAD⁺ als verwendeter Cofaktor vorhergesagt. Die wichtigsten Unterschiede zwischen den Familien sind in Tabelle 1.1 zusammengefasst.

Familie	Klasse (Molekulargewicht)	Untereinheiten	Elektronen- akzeptoren
S_GDHs	50 _I	Hexamer	NAD ⁺ oder NADP ⁺
	50 _{II}	Tetramer	NAD^+
L_GDHs	L_115	Tetramer	NAD^+
_	L 180	Hexamer	NAD^+

Tab. 1.1: Unterschiede zwischen den jeweiligen GDH der einzelnen Familien.

1.2.3 Bekannte Proteinstrukturen

Familien S_50_I und S_50_{II}

Für die GDH der Familie S_50₁ sind Kristallstrukturen unterschiedlicher Organismen (s. Tab. 1.2) untersucht worden. Die Bestimmung der Kristallstrukturen konnte bei allen mit einer Auflösung von 1,9 Å bis 3,5 Å erfolgen. Die Enzyme der S_50₁ Familie sind Hexamere, die aus sechs identischen Untereinheiten aufgebaut sind (Homohexamere). Anhand der bisher gelösten Kristallstrukturen lässt sich erkennen, dass die Sekundärstrukturmuster aller Enzyme große Übereinstimmungen aufweisen. So besteht jedes Monomer aus zwei Domänen, einer N-terminalen Domäne (Domäne I), die die Glutamatbindestelle enthält und einer C-terminalen Domäne (Domäne II) mit der Nucleotidbindestelle (Abb. 1.8). Diese weist ein klassisches Nucleotidbindungs-Faltungsmuster (*Rossmann-Fold*), mit einem sechssträngigen β -Faltblatt auf, das durch ober- und unterhalb der β -Stränge liegende α -Helices verknüpft

wird. Von Glutamat-Dehydrogenasen der S $_50_{II}$ Familie wurden bisher noch keine Strukturen veröffentlicht.



Abb. 1.8: Kristallstruktur der GDH aus *Clostridium symbiosum* (1BGV). Dargestellt ist ein Monomer des hexameren Enzyms. Das gebundene Glutamat ist magenta dargestellt.

Tab. 1.2: Strukturen hexamerer	GDH der Familie S	_50 _I , die in der	Proteindatenbank	(PDB) eingetragen
sind.				

PDB-	Organismus	Liganden	Cofaktor	Mutationen	Auflösung	M _r (kDa)
code					(Å)	Monomer
2BMA	P. falciparum		NADP ⁺		2,70	49,500
1AUP 1BGV 1K89 1HRD	C. symbiosum C. symbiosum C. symbiosum C. symbiosum	Glutamat Glutamat	NAD ⁺ NAD ⁺ NAD ⁺ NAD ⁺	K89L; S380V K89L	2,50 1,90 2,05 1,96	49,165 49,165 49,165 49,165
1B26 1B3B 2TMG	T. maritima T. maritima T. maritima		NAD ⁺ (NADP ⁺) NAD ⁺ (NADP ⁺) NAD ⁺ (NADP ⁺)	N97D; G376K mehrfach	3,00 3,10 2,90	45,689 45,689 45,689
1HWX 1HWY 1HWZ	B. taurus B. taurus B . taurus	Glu, GTP, NAD α-KG, NADP Glu, GTP, NADPH, ADP	NAD ⁺ /NADP ⁺ NAD ⁺ /NADP ⁺ NAD ⁺ /NADP ⁺		2,50 3,20 2,80	61,512 61,512 61,512
1NQT	B. taurus	ADP	NAD ⁺ /NADP ⁺		3,50	61,512
1NR7	B. taurus	~ ~ ~ ~ ~	NAD ⁺ /NADP ⁺		3,30	61,512
3ETD	B. taurus	Glu, GTP, NADPH, Inh ^{*1}	NAD [*] /NADP [*]		2,50	61,512
3ETE	B. taurus	Glu, GTP, NADPH, Inh ^{*2}	NAD ⁺ /NADP ⁺		3,00	61,512
3ETG	B. taurus	Glu, GTP, NADPH, Inh ^{*3}	NAD ⁺ /NADP ⁺		2,50	61,512

-						
1L1F	H. sapiens		NAD ⁺ /NADP ⁺		2,70	61,398
1NR1	H. sapiens		NAD ⁺ /NADP ⁺	R463A	3,30	61,398
1BVU	T. litoralis				2,50	46,608
1EUZ	T. profundus	0.10.4			2,25	46,699
1GTM	P. furiosus	Sulfat			2,20	47,114
	-	Sulfat				

^{*1}Bithionol (2,2'-sulfandiylbis(4,6-dichlorphenol)); ^{*2}Hexachlorophen (2,2'-Methylenbis(3,4,6-trichlorphenol)); ^{*3}GW5074 (3-(3,5-Dibromo-4-hydroxy-benzylidene)-5-iodo-1,3-dihydro-indol-2-one)

Familien L_115 und L_180

Aufgrund ihrer Größe ist es bisher noch nicht gelungen, Enzyme dieser Familien erfolgreich zu kristallisieren, was auch auf die geringen Mengen an Protein zurückzuführen ist, die jeweils überexprimiert werden konnten. Jedoch wurde bereits in unterschiedlichen Veröffentlichungen eine prädiktive Strukturbetrachtung anhand der Aminosäuresequenz von Mitgliedern der L_115 und L_180 Familien, im Vergleich mit bereits röntgenkristallographisch gelösten Proteinstrukturen der S_50 Familie, vorgenommen.

Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse soll im Kontext der Diskussion zur *Pf*GDH3 gegeben werden.

1.3 Die humane Glutamat-Dehydrogenase

1.3.1 Funktion und Lokalisation

Die wesentlichen Forschungsergebnisse zur humanen GDH stützen sich im Allgemeinen auf Untersuchungen an der bovinen GDH (boGDH), die aufgrund ihrer regulatorischen und katalytischen Eigenschaften funktionell vergleichbar ist mit dem humanen Enzym. Beide besitzen eine Aminosäuresequenzidentität von 95 % zueinander [Fang *et al.*, 2002].

Im Menschen ist die GDH ubiquitär verteilt, die höchste Aktivität konnte allerdings in der Leber festgestellt werden [Mastorodemos *et al.*, 2005]. Lokalisiert ist die hGDH in den Mitochondrien. Im Menschen wurden zwei Isoformen des Enzyms nachgewiesen, die durch unterschiedliche Gene kodiert werden. Die sogenannte *housekeeping* GDH wird durch das GLUD1-Gen, die nervengewebs-spezifische GDH durch das GLUD2-Gen kodiert [Shashidharan *et al.*, 1994]. Es wird angenommen, dass das GLUD2-Gen durch zufällige Mutationen und natürliche Selektion aus dem GLUD1-Gen entstand [Burki und Kaessmann, 2004]. Beide Isoformen unterscheiden sich in nur 16 Aminosäureresten, weisen jedoch eine grundlegend voneinander abweichende allosterische Regulation durch ADP, ATP, L-Leucin und GTP auf. Aufgrund ihres vermehrten Auftretens in Lebermitochondrien dient die humane Glutamat-Dehydrogenase als diagnostisches Markerenzym für starke Leberzellschädigungen.

Die hGDH verknüpft den Kohlenstoff- mit dem Stickstoffmetabolismus und dient damit der Aufrechterhaltung unterschiedlichster Metabolitgleichgewichte. Auch die Verbindung zum Glutamat, welches eine zentrale Rolle im Aminosäurestoffwechsel einnimmt, lässt ihre Wichtigkeit erkennen. So liefert die Glutamat-Dehydrogenase-Reaktion zum einen Glutamat, welches zur Synthese weiterer Aminosäuren oder von N-Acetylglutamat zur Verfügung steht. Letzteres ist ein allosterischer Aktivator der Carbamoylphosphat-Synthetase im initialen Schritt der Harnstoffsynthese [Löffler et al., 2007]. Zum anderen kann das in der gegenläufigen Reaktion entstehende a-Ketoglutarat in den Citratzyklus eingeschleust und damit, in dessen weiteren Verlauf, zur Gewinnung von Reduktionsäquivalenten und ATP herangezogen werden. Weiterhin dient α-Ketoglutarat als Vorstufe für Succinyl-CoA, welches unter anderem das Ausgangsmolekül für die Häm-Biosynthese darstellt. Eine weitere wichtige Funktion der humanen Glutamat-Dehydrogenase ist die Fixierung von Ammoniak, welches somit direkt entgiftet werden kann. Ammoniak (NH₃) ist eine mittelstarke Base mit einem pKs-Wert von 9,2. Unter physiologischen Bedingungen liegt es daher zu 98,5 % in protonierter Form als Ammoniumion (NH₄⁺) vor. Die Konzentration von NH₃/NH₄⁺ im Blut liegt bei Gesunden bei ca. 15-60 µmol/L. Wird dieser Wert markant überschritten, kann dies schwere neurologische Schäden zur Folge haben [Löffler et al., 2007], wobei die genauen Ursachen für die neurotoxische Wirkung des Ammoniaks noch nicht geklärt sind.

Die Hauptaufgabe der vorwiegend in den Astrozyten, aber auch Oligodendrozyten des Nervengewebes vorkommenden hGDH2 besteht vermutlich darin, Glutamat, das im zentralen Nervensystem (ZNS) als exzitatorischer Transmitter dient, nach der Erregungsfortleitung aus dem synaptischen Spalt zu entfernen [Plaitakis & Zaganas, 2001]. Eine anhaltend hohe Glutamatkonzentration würde durch Überregung der Neuronen zytotoxisch wirken. Burki und Kaessmann [2004] gehen sogar so weit zu behaupten, dass die Entstehung des GLUD2-Gens vor mehr als 23 Millionen Jahren durch Retroposition aus dem GLUD1-Gen, die Gedächtnisleistung in Menschenaffen und Menschen erweiterte und somit entscheidend zur Evolution erhöhter kognitiver Kapazitäten in Hominiden beigetragen hat.

1.3.2 Struktur der humanen und bovinen Glutamat-Dehydrogenasen

Von der hGDH1 sind bisher die von Smith *et al.* [2002] veröffentlichte Struktur des Apoenzyms (PDB Code: 1L1F) sowie das von Banerjee *et al.* [2003] veröffentlichte Apoenzym der R463A-Mutante (PDB Code: 1NR1) strukturell gelöst. Von der bovinen GDH liegen dreidimensionale Strukturen vor, die mit Coenzymen und Substraten, als auch mit Aktivatoren und Inhibitoren co-kristallisiert wurden (s. Tab. 1.2). Ein Monomer der boGDH ist in Abb. 1.9 dargestellt.

Wie bereits beschrieben, liegen sowohl das humane als auch das bovine Enzym als Homohexamer vor, welche aus zwei aufeinanderliegenden Trimeren gebildet werden. Jede der sechs Untereinheiten besteht aus einer Polypeptidkette mit 505 (human) bzw. 501 (bovin) Aminosäuren. Die Trimere werden über die etwa 200 Aminosäuren lange, N-terminale Glutamatbindedomäne zusammengehalten, welche hauptsächlich β-Faltblattstrukturen aufweist. An diese schließt sich die stark konservierte NAD⁺-Bindedomäne (*Rossmann-Fold*) sowie eine weitere Domäne, die ein 48 Aminosäuren langes Helix-Loop-Helix Motiv ausbildet und als Antenne bezeichnet wird [Banerjee et al., 2003], an. Die Antennen jedes Trimers winden sich umeinander und unterliegen Konformationsänderungen, wenn sich der katalytische Spalt öffnet oder schließt [Smith et al., 2002]. Die Glutamatbinde- und Antennen-Domäne sind mit der sogenannten Pivot-Helix verbunden, die den Dreh- und Angelpunkt zwischen den Domänen während des katalytischen Prozesses darstellt. In jedem katalytischen Zyklus erfährt die GDH Konformationsänderungen [Li et al., 2009]. Die allosterische Regulation der Säuger-Enzyme korreliert wahrscheinlich mit diesen komplexen Bewegungen während der Ausbildung von GDH-Ligand-Komplexen [Smith & Stanley, 2008]. Die NAD⁺-Domäne schwenkt gegen die Pivot-Helix, was einem Öffnen und Schließen des katalytischen Spaltes gleichkommt [Kanavouras et al., 2007; Peterson & Smith, 1999]. Glutamat bzw. α -Ketoglutarat binden in der Vertiefung zwischen der NAD⁺-bindenden Domäne und der Glutamatbindedomäne. Nach Bindung des Coenzyms rotiert die NAD⁺bindende Domäne um etwa 18°, schließt sich um Substrat und Coenzym und initiiert somit die Katalyse. Schließt sich der katalytische Spalt auf diese Weise, rotiert die Basis einer jeden aufsteigenden Helix in der Antennenregion gegen den Uhrzeigersinn und stößt dann gegen die Pivot-Helix einer angrenzenden Untereinheit [Smith et al., 2002].



Abb. 1.9: Monomer der bovinen GDH mit Bindedomänen. Die Glutamatbindedomäne ist blau, die NAD⁺-Bindedomäne orange, die Antenne violett und die Pivot-Helix grün gekennzeichnet. GTP ist rot, ADP grün, NADH silber und Glutamat gelb dargestellt [Allen *et al.*, 2004].

1.3.3 Allosterische Regulation dual-spezifischer Glutamat-Dehydrogenasen

Bei den dualspezifischen GDH der Säugetiere wird das Gleichgewicht zwischen Glutamat-Anabolismus und -Katabolismus durch komplexe allosterische Regulationsmechanismen kontrolliert [Peterson & Smith, 1999]. Die Evolution der GDH gibt Einblicke in die Entwicklung ihrer Enzymregulation (s. Abb. 1.10). In Pflanzen, Pilzen und Protisten fehlt dem Protein die so genannte Antennenregion und die Aktivität wird hauptsächlich über die Transkription und das Substrat- bzw. Produktlevel gesteuert. Bei den Protozoen ist erstmals eine Antennenregion vorhanden, das Enzym unterliegt allerdings noch keiner Regulation durch Purine. Daraus kann geschlossen werden, dass zunächst die Ausbildung der Antennenregion stattfand, woraufhin sich später die Möglichkeit zur allosterischen Regulation. Komplexe allosterische Regulationen wurden allerdings nur im Tierreich nachgewiesen [Smith & Stanley, 2008].



Abb. 1.10: Schematische Darstellung der evolutionären Entwicklung von Antennen und allosterischer Regulation [Banerjee *et al.*, 2003].

Obwohl das thermodynamische Gleichgewicht der GDH-Reaktion auf Seiten der Bildung von Glutamat liegt. dominiert unter physiologischen Bedingungen vermutlich die Desaminierungsreaktion. Im Gegensatz zu Glutamat-Dehydrogenasen anderer Spezies bestimmt beim Menschen die Stoffwechsellage, nicht aber das Vorhandensein bestimmter Cofaktoren, die Richtung der katalysierten Reaktion. Bereits Frieden [1962] konnte zeigen, dass ATP und GTP hemmend auf die Säuger-GDH wirken, während ADP das Enzym aktiviert. Der Energiestatus der Zelle, bestimmt durch das ATP/ADP- oder auch das GTP/GDP-Verhältnis, hat somit einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivität der Glutamat-Dehydrogenasen. Durch Interaktion von ADP mit Arg463 wird der katalytische Spalt geöffnet und das Produkt schneller freigesetzt, sodass eine erneute Substratbindung an das Enzym beschleunigt wird. Bei sehr hohen Substratkonzentrationen bilden sich so genannte abortive, nicht-katalytische Komplexe im aktiven Zentrum, die die Reaktion inhibieren. Sie bestehen aus dem Substrat und dem Cofaktor, also NAD(P)H-Glutamat bzw. $NAD(P)^+$ - α -Ketoglutarat. ADP destabilisiert die abortiven Komplexe und hebt die negative Kooperation auf [Fang et al., 2002]. Die aktivierende Eigenschaft von ADP wird daher nur bei gesättigten Substratkonzentrationen beobachtet. GTP, der Gegenspieler von ADP und potenter Inhibitor, erhöht die Affinität des Enzyms zum Coenzym und stabilisiert abortive Komplexe. Wie die Kristallstrukturen zeigen, öffnet sich nach NAD⁺-Bindung ein kleiner Spalt zwischen der Pivot-Helix und dem Rücken der NAD⁺-Domäne, wo GTP über das γ - Phosphat des Triphosphat-Endes binden kann. Es resultiert ein verlangsamter Substrat-Umsatz [Banerjee *et al.*, 2003].

In den pankreatischen ß-Zellen ist die Regulation der hGDH durch den energetischen Zustand der Zelle mit der Insulinhomöostase verbunden.

1.3.4 Hyperinsulinismus-Hyperammonämie-Syndrom

Das Hyperinsulinismus-Hyperammonämie-Syndrom (HI-HA-Syndrom) ist eine autosomalgekennzeichnet dominant vererbte Erkrankung, die ist durch eine exzessive Insulinausschüttung mit daraus resultierenden rezidivierenden Hypoglykämien, sowie einer asymptomatischen Erhöhung des Plasma-Ammoniumspiegels [Stanley et al., 1998; Muntau, 2007; Meissner & Mayatepek, 2000]. Die Ursache hierfür liegt in Mutationen des GLUD1-Gens, die direkt in die allosterische Enzymhemmung durch GTP involviert sind [Fang et al., 2002]. Dies resultiert in einer Überaktivität der Glutamat-Dehydrogenase in allen Geweben [Stanley et al., 1998]. Im Pankreas führt die vermehrte GDH-Aktivität unter anderem zu einer erhöhten Sekretion von Insulin [Li et al., 2009]. Dies lässt sich dadurch erklären, dass in Folge des gesteigerten Umsatzes von Glutamat zu α-Ketoglutarat, und dessen Verstoffwechselung über den Citratzyklus und die nachgeschaltete Atmungskette, sich auch das ATP/ADP-Verhältnis in der Zelle erhöht. Liegt ATP wiederum in erhöhten Konzentrationen vor, bindet dies an ATP-gesteuerte Kaliumkanäle und führt zu deren Schließung. Dies löst eine Depolarisation der Zelle aus, infolge derer sich spannungsregulierte Ca²⁺-Kanäle öffnen und die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration ansteigt. Dieser Anstieg ist Auslöser für eine gesteigerte Exozytose der β-Granula, welche das Insulin enthalten. Neben der Hyperinsulinämie ist auch die Hyperammonämie durch den gesteigerten Glutamat-Katabolismus zu erklären, welches dadurch nicht mehr zur Synthese von N-Acetylglutamat zur Verfügung steht. Da dieses ein allosterischer Aktivator der Carbamoylphosphat-Synthetase I im ersten Schritt der Harnstoffbiosynthese ist, kommt es zur Beeinträchtigung der Ammoniak-Entgiftung in der Leber. Weiterhin führt die Desaminierungsreaktion des Enzyms noch zusätzlich einer Erhöhung zu der Ammoniakkonzentration in den Leberzellen (s. Abb. 1.11).



Abb. 1.11: Einfluss verschiedener Faktoren auf die Insulinsekretion und die Harnstoffsynthese.

Glucose wird beginnend mit der Glucokinase (GK) verstoffwechselt, was zu einem Anstieg des ATP/ADP-Verhältnisses führt. Ein in der Plasmamembran sitzender, ATP-empfindlicher Kaliumkanal, bestehend aus den Untereinheiten *SUR1* und *Kir6.2*, wird daraufhin geschlossen. In Folge der daraus resultierenden Depolarisation der β -Zelle kommt es zum Einstrom von zweiwertigen Calcium-Ionen und letztlich zur Insulinfreisetzung aus den Speichervesikeln. L-Leucin stimuliert die Insulinsekretion indirekt über allosterische Aktivierung der Glutamat-Dehydrogenase. Diazoxid und Tolbutamid wirken auf Ebene der *SUR1*-Untereinheit des Kaliumkanals [Stanley *et al.*, 2003].

1.3.5 Hemmstoffe der humanen GDH

Der bereits beschriebene, zu diesen pathologischen Zuständen führende Aktivitätsgewinn der humanen Glutamat-Dehydrogenase 1 gab in den letzten Jahren bereits Anlass dazu, nach Inhibitoren für dieses Enzym zu suchen. Beispielsweise wurde von Li et al. [2007] ein High Throughput Screening (HTS) mit 27 000 chemischen Verbindungen an der bovinen GDH durchgeführt, wodurch Diethylstilbestrol, Epigallocatechin-3-monogallat und ein Epigallocatechin-3,5-digallatderivat als potente Inhibitoren identifiziert werden konnten. Darauf aufbauend wurde von denselben Autoren ein weiteres Screening mit etwa 30 000 Substanzen, die ein ähnliches Grundgerüst aufwiesen, durchgeführt. Dabei zeigten die Substanzen Hexachlorophen, Bithionol und GW5074 die stärkste inhibitorische Wirkung in Bezug auf die Säuger-GDH. Darüber hinaus konnte durch die röntgenkristallographische Analyse von Protein-Ligand-Komplexen des bovinen Enzyms mit diesen drei Inhibitoren der Hemmmechanismus aufgeklärt werden, auf den im Diskussionsteil der vorliegenden Arbeit eingegangen wird.

1.4 Die Glutamat-Dehydrogenasen aus *Plasmodium falciparum* als Zielmoleküle von Wirkstoffen gegen Malaria

1.4.1 *Pf*GDH als Zielmoleküle

Wie bereits in Kapitel 1.1.2 beschrieben, ist eine Strategie zur Entwicklung neuer Malariamedikamente die Manipulation von Enzymen, die eine wesentliche Rolle im Parasitenmetabolismus einnehmen. Erst die Identifizierung dieser Enzyme und das Verständnis ihrer Reaktionen, im Kontext mit dem Wissen über ihre Lokalisation, gibt Aufschluss über die genauen Abläufe im Metabolismus der Parasiten. Vaidya & Mather [2009] postulierten in einem Review, dass der Haupteintrittspunkt des Citratzyklus im Parasiten a-Ketoglutarat ist, welches vorwiegend durch die Reaktion der Glutamat-Dehydrogenasen zur Verfügung gestellt wird. Weiterhin konnten Olszewski et al. [2010] in einer kürzlich veröffentlichten Studie zeigen, dass der Malariaparasit keinen Citratzyklus im herkömmlichen Sinne besitzt. Da die Pyruvat-Dehydrogenase im Apicoplasten, nicht aber im Mitochondrium lokalisiert ist und weder β -Oxidation noch der vollständige Abbau verzweigtkettiger Aminosäuren im Mitochondrium stattfinden, steht diesem Organell augenscheinlich keine Acetyl-CoA-Quelle zur Verfügung [van Dooren et al., 2006]. Die Untersuchungen zeigten jedoch, dass alle bekannten Intermediate des Citratzyklus in den Mitochondrien der Parasiten nachweisbar sind [Olszewski et al., 2010]. Auch Aktivitäten aller übrigen Enzyme des klassischen Citratzyklus konnten festgestellt werden, wenn auch mit geringen Abweichungen zu diesen. Demzufolge wird aktuell davon ausgegangen, dass der Tricarbonsäuremetabolismus nicht zyklisch abläuft, sondern Verzweigungen der einzelnen Reaktionen aufweist. Aufgrund dessen sind sowohl der Ablauf, als vermutlich auch die Funktion dieses Stoffwechselweges, sowie das Zusammenspiel mit anderen Stoffwechselwegen, einzigartig für die Parasiten, was alle darin involvierten Enzyme, einschließlich der plasmodialen Glutamat-Dehydrogenasen, zu interessanten drug targets macht. Hinzu kommt die Bedeutung der PfGDH in der NADPH-Bereitstellung für antioxidative Prozesse, die im Punkt 1.4.4 angesprochen wird.

1.4.2 Glutamat-Dehydrogenasen in *Plasmodium falciparum*

In der Datenbank der Plasmodienspezies (PlasmoDB) konnten 3 Isoenzyme der Glutamat-Dehydrogenase identifiziert werden. Die *Pf*GDH1 (PF14_0164) wurde bereits 1986 [Ling *et al.*] zum ersten Mal erwähnt. Weiterhin werden Gene annotiert, die für eine zweite (*Pf*GDH2; PF14_0286) und eine dritte (*Pf*GDH3; PF8_0132) Glutamat-Dehydrogenase kodieren. Eine biochemische Charakterisierung der *Pf*GDH1 wurde durch Wagner *et al.* [1998] vorgenommen und strukturell konnte sie durch Werner *et al.* [2005] aufgeklärt werden. Die bisher vorliegenden Ergebnisse dieser Untersuchungen werden im Folgenden näher betrachtet.

1.4.3 Glutamat-Dehydrogenase 1

Da die humanen Glutamat-Dehydrogenasen mitochondrial lokalisiert sind, liegen diese Enzyme in den Erythrozyten nicht vor. Aus diesem Grund identifizierten Vander Jagt *et al.* [1982] die NADP⁺-abhängige *Pf*GDH1 als Markerenzym für eine Plasmodien-Infektion. Vom gleichen Autor wurde dieses Enzym, gemeinsam mit der Isocitrat-Dehydrogenase und der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, als Hauptlieferant von NADPH für den Parasiten postuliert, was ihr eine wichtige Rolle im antioxidativen System (s. Kapitel 1.4.4) zukommen lässt [Vander Jagt *et al.*, 1989]. Die Glutamat-Dehydrogenase 1 wurde erstmals 1996 aus dem Parasiten isoliert, aufgrund der geringen verfügbaren Menge jedoch nur ansatzweise charakterisiert [Krauth-Siegel *et al.*, 1996]. Im Jahr 1998 erfolgte dann die Klonierung und ausführliche kinetische Charakterisierung des rekombinanten Enzyms [Wagner *et al.* 1998] sowie 2005 die strukturelle Aufklärung [Werner *et al.*].

1.4.3.1 Die Struktur der PfGDH1

Wie unter Punkt 1.2.3 beschrieben, weist auch die *Pf*GDH1 die wesentlichen Sekundär- und Tertiärstrukturmerkmale der GDH S_50_I-Familie auf. Die erste Domäne, die hauptsächlich in die Interaktion der einzelnen Untereinheiten involviert ist, wird durch die Aminosäurereste 1-220 und 452-470 gebildet. Die Aminosäurereste 221-451 sind hingegen an der Ausbildung des Rossmann-Faltungsmotives mit der Nucleotidbindestelle beteiligt, welches jedoch bezogen auf die klassische Faltung, ein β -Faltblatt in umgekehrter Orientierung aufweist. Alle Aminosäurereste, die im Enzym aus *Clostridium symbiosum* direkten Kontakt zum Substrat aufweisen, sind auch in der GDH1 des Malariaerregers hoch konserviert und daher ähnlich positioniert [Werner *et al.*, 2005]. Die Coenzym-Bindestelle der *P. falciparum* GDH1 zeigt

eine größere Ähnlichkeit zum dualspezifischen humanen Enzym, als zur NAD⁺-abhängigen GDH aus *Clostridium symbiosum*, da auch hier die für die Ladungskompensation der 2⁻Phosphatgruppe des Riboseanteils im NADP⁺ notwendigen Aminosäuren (Ser284, Lys156 und Lys306) vorliegen. Ein weiteres wichtiges Augenmerk bei der Betrachtung der *Pf*GDH1-Struktur sollte auf die Interaktionen gelegt werden, die zwischen den einzelnen Untereinheiten ausgeübt werden. Jeweils eine Untereinheit des Enzyms interagiert mit vier anderen Untereinheiten über hauptsächlich 14 ladungsunterstützte Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen werden als stark unterschiedlich zu denen im humanen Enzym beschrieben, was zunächst dadurch zu begründen ist, dass im Parasiten-Enzym die für die Säuger-GDH typische Antennendomäne fehlt. Weiterhin tragen im humanen Enzym lediglich vier Aminosäuren pro Untereinheit zu ladungsbasierten Wechselwirkungen bei. Hier bestimmen hydrophobe Kontakte die Kommunikation der einzelnen Untereinheiten. Die zahlreichen Salzbrücken, die zwischen den Monomeren der *Pf*GDH1 bestehen, werden für ihre hohe Thermostabilität verantwortlich gemacht.

1.4.3.2 Bekannte Hemmstoffe der PfGDH1

Bereits 1957 wurde durch Caughey *et al.* ein Screening mit unterschiedlichsten Substanzklassen an der bovinen Glutamat-Dehydrogenase durchgeführt. Die besten Inhibitoren dieser Untersuchungen waren hauptsächlich Substanzen, die eine große strukturelle Ähnlichkeit zum Glutarat bzw. α -Iminoglutarat aufwiesen, wie beispielsweise Isophtalat oder Bromofuroat. Isophtalat wurde durch Aparicio *et al.* [2010] zudem an der *Pf*GDH1 getestet. Am gereinigten Enzym konnte ein K_i-Wert von 6,2 µM festgestellt werden, während der IC₅₀-Wert in Tests an der Parasiten-Zellkultur lediglich bei etwa 450 µM lag. Ein von Crowther *et al.* [2010] durchgeführtes Screening von kommerziell erhältlichen Substanzbibliotheken führte zu 5 655 niedermolekularen Substanzen, die mit einem EC₅₀ von weniger als 1,25 µM inhibitorisch auf das Parasitenwachstum in Kultur wirkten. Diese Wirkstoffe wurden in weiterführenden Versuchen an neun Plasmodien-Enzymen, unter anderem der *Pf*GDH1, getestet, zeigten jedoch keine inhibitorische Wirkung auf dieses Enzym.

1.4.4 Oxidativer Stress in Mensch und Parasit

Täglich fallen im menschlichen Organismus reaktive Sauerstoffspezies (ROS von engl.: reactive oxygen species), unter anderem aus Nebenreaktionen der Zellatmung, an. Sauerstoffradikale entstehen immer dann, wenn ein Sauerstoffmolekül ein einzelnes Elektron aufnimmt, wodurch das Hyperoxid-Anion $(O_2 \cdot \bar{})$, auch Superoxidradikal genannt, entsteht. Superoxidradikale sind sehr reaktiv und schädigen die Zellen durch ihre unspezifischen Reaktionen erheblich [Sies, 1997]. In Mitochondrien werden Superoxidradikale überwiegend unter Beteiligung des Komplexes III der Atmungskette gebildet. Die Eliminierung von Superoxidradikalen wird durch die in allen menschlichen Zellen vorkommende Superoxiddismutase (SOD) gewährleistet. Die Produkte ihrer Reaktion sind Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und molekularer Sauerstoff (O₂). H₂O₂ wiederum kann über das Enzym Katalase, oder auch über die Glutathion-Peroxidase, zu Wasser und ebenfalls Sauerstoff umgewandelt werden. Wird ein Gewebe jedoch nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt oder entstehen große Mengen an Wasserstoffperoxid, ist dieses System überfordert. Reagieren Superoxidradikale mit H2O2, entstehen Hydroxylradikale, welche über ihre Reaktivität die Quervernetzung von Fettsäuren in der Zellmembran oder von Proteinen bewirken und dadurch den Verlust ihrer Funktionsfähigkeit herbeiführen. Werden in einem System mehr Sauerstoffradikale gebildet, als Möglichkeiten bestehen, diese zu eliminieren, wird dies als oxidativer Stress bezeichnet.

Andererseits besitzen ROS auch eine wichtige Funktion in der immunologischen Abwehr. In neutrophilen Granulozyten, sowie Makrophagen, die pathogene Mikroorganismen phagozytieren, um sie abzutöten, wird durch die NADPH-Oxidase gezielt H₂O₂ synthetisiert. Die Entgiftung reaktiver Sauerstoff- aber auch Stickstoffspezies stellt eine Herausforderung für mit Plasmodien infizierte Erythrozyten dar [Rahlfs & Becker, 2006]. Nicht nur auf Grund einer hohen metabolischen Rate durch das schnelle Wachstum und die rapide Vermehrung der Parasiten, sondern auch durch den Abbau von Hämoglobin durch diese und die Immunantwort des Wirtes, resultiert eine große Menge an Sauerstoffradikalen [Becker et al. 2004]. Golenser et al. [1991] konnten nachweisen, dass Malariaparasiten anfälliger gegenüber oxidativem Stress sind als ihr Wirt und daher umso stärker auf Mechanismen angewiesen sind, diesen zu vermindern. Innerhalb der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass Plasmodium über eine Reihe antioxidativer Abwehrmechanismen verfügt [Becker et al., 2004; Becker et al., 2006] (Abbildung 1.12). Dazu gehören ein vollständiges Glutathion-System, mit NADPH, einer Glutathion-Reduktase (GR), Glutathion (GSH) und mehreren Glutaredoxin-ähnlichen Proteinen (GLP), sowie einem funktionellen Glutathion-abhängigen
Glyoxalase-System. Des Weiteren ist ein komplettes Thioredoxin-System mit NADPH, einer Thioredoxin-Reduktase (TrxR), Thioredoxin (Trx), unterschiedlichen Thioredoxin-ähnlichen Proteinen, sowie Wasserstoffperoxid-entgiftenden Enzymen, wie Thioredoxin-abhängigen Peroxidasen (TPx) und zwei funktionellen Superoxiddismutasen, in den Parasiten existent. Im Gegensatz zu den meisten Eukaryoten besitzt der Parasit jedoch keine Katalase und keine typische Glutathionperoxidase.

Die TrxR wie auch die GR sind NADPH-abhängige Enzyme und daher auf NADPreduzierende Enzyme angewiesen. Es wird angenommen, dass NADPH hauptsächlich durch den Hexosemonophosphatweg bereitgestellt wird, dessen Schlüsselenzym die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) ist. Vander Jagt *et al.* [1989] konnten jedoch zeigen, dass auch die Glutamat-Dehydrogenase, sowie die NADP-abhängige Isocitrat-Dehydrogenase NADPH zur Verfügung stellen. Dass die NADPH-Bereitstellung im parasitierten Erythrozyten direkten Einfluss auf den Krankheitsverlauf der Malaria hat, wurde durch epidemiologische Studien schon früh postuliert. So schützen beispielsweise ein angeborener Enzymdefekt wie der G6PDH-Mangel oder die Sichelzellanämie in einem bestimmten Umfang vor einer schweren Form der Malaria.



Abbildung 1.12: Antioxidatives Abwehrsystem von *Plasmodium falciparum*. Sowohl das TrxR- als auch das GR-System sind NADPH-abhängig und stellen Reduktionsäquivalente für die Entgiftung von H₂O₂ und die Ribonucleotidreduktase zur Verfügung [Rahlfs & Becker, 2006].

1.5 Röntgenstrukturanalyse von Proteinmolekülen

Für die Strukturbestimmung kleiner organischer Moleküle bis hin zu makromolekularen Proteinen stehen heute im Wesentlichen zwei Methoden zur Auswahl. Zum einen die Röntgenstrukturanalyse und zum anderen die magnetische Kernresonanzspektroskopie (NMR). Während die Strukturbestimmung mit Hilfe der NMR-Methode durch die Größe der zu bestimmenden Moleküle begrenzt ist (höchstens 50 kDa in Tripelresonanzexperimenten), können mit der Röntgenstrukturanalyse Proteine jeglicher Größe vermessen werden [Lottspeich, 1998].

Die Röntgenkristallographie beinhaltet die Bestimmung der Struktur eines Proteinkristalls im atomaren Bereich mittels Röntgenstrahlung, die am Kristallgitter gebeugt wird. Dadurch kann die Verteilung der Elektronen in der Elementarzelle bestimmt und eine Elektronendichtekarte erstellt werden. Über die Auswertung dieser Elektronendichtekarte ist es dann möglich, die Struktur des Proteins aufzuklären, um somit Kenntnisse über die Geometrie des Proteins und damit Verständnis für dessen Proteinfunktion auf molekularer Ebene, z. B. den katalytischen Mechanismus eines Enzyms, zu erlangen.

Kristalle

Die Kristallisation von biologischen Makromolekülen ist eine Technik, die auf dem Prinzip von Versuch und Irrtum beruht und deren Ergebnisse nicht vorhersagbar sind [Lottspeich, 1998]. In Kristallen weisen die atomaren Bausteine eines festen Stoffes eine Fernordnung in allen drei Raumrichtungen auf, d. h. die Moleküle sind in diesem Fall regelmäßig angeordnet. Die kleinste sich wiederholende Einheit bezüglich des Translationsgitters wird als Einheitszelle (a, b, c und α , β , γ) bezeichnet. Aus ihr kann durch räumliche Translation der gesamte Kristallverband (das Kristallgitter) erzeugt werden. Die Kanten der Einheitszelle sind gleichbedeutend mit den so genannten Kristallachsen, die im Fall von Proteinkristallen oft zwischen 30 und 400 Å (1 Å = 0,1 nm) lang sind. Neben dem primitiven Kristallgitter (P) gibt es noch weitere spezielle Gittertypen: flächenzentriert, innenzentriert und rhomboedrisch. Mit Ausnahme der triklinen Kristallform weisen dabei alle Einheitszellen eine interne Symmetrie auf. Die Einheitszelle kann durch eine kleinere, so genannte asymmetrische Einheit beschrieben werden, die durch Anwendung der Symmetrieoperationen eine Einheitszelle ergibt. Die Kombination der Gittertypen mit einer oder mehreren Symmetrieoperationen ergibt die Raumgruppen [Lottspeich, 1998].

Röntgendiffraktion

Ein Teil des auf den Kristall gerichteten Röntgenstrahls wechselwirkt mit der Elektronenhülle der Atome, wodurch diese angeregt werden. Bei der Rückkehr der angeregten Elektronen in den Grundzustand wird Röntgenstrahlung in alle Richtungen abgegeben. Da sich die Atome in einer regelmäßigen, sich periodisch wiederholenden räumlichen Anordnung im Kristallgitter befinden, kommt es zur Interferenz der von den Atomen emittierten Röntgenstrahlung. Die Richtung des gebeugten Röntgenstrahls ist dabei vom kristallinen Gitter abhängig. Für diese Beziehung gilt das Bragg'sche Gesetzt (Gleichung 1.1). Die Beugung der Röntgenstrahlen mit der Wellenlänge λ und dem Winkel θ an einem Kristall wird dabei als eine Reflexion an einer imaginären Ebenenschar aus parallelen Ebenen beschrieben, die den Abstand d voneinander haben. Jeder beobachtete Punkt auf einem Röntgenfilm, auch Reflex genannt, entspricht somit dem an einer bestimmten Ebenenschar gebeugten Röntgenstrahl. Der mathematische Zusammenhang zwischen den Positionen der Atome in der Einheitszelle und den gebeugten Röntgenstrahlen ist eine Fourier-Transformation. Um möglichst viele Kristallebenen im Beugungswinkel zum Primärstrahl zu orientieren, wird der Kristall im Röntgenstrahl gedreht und es werden Beugungsbilder unter verschiedenen Winkeln aufgenommen.

Gleichung 1.1:
$$n\lambda = 2d \sin(\theta)$$

Das Phasenproblem

Die an einem Kristall gebeugten Röntgenstrahlen enthalten die komplette Information über die dreidimensionale Anordnung der Atome im Kristall. Diese Information ist in den drei beschreibenden Größen einer elektromagnetischen Welle, der Wellenlänge, der Amplitude und der Phase, erhalten. Die Wellenlänge des Primärstrahls wird durch die Beugung am Kristallgitter nicht verändert und ist somit bekannt [Lottspeich, 1998]. Die Amplitude kann durch Bestimmung der relativen Intensität der Reflexe gemessen werden, aber eine Messung der Phase ist generell nicht möglich. Zur Bestimmung der Phase stehen Methoden des isomorphen oder molekularen Ersatzes zur Verfügung. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die Methode des molekularen Ersatzes angewendet, weshalb diese im Folgenden kurz beschrieben wird. Mit der Methode des molekularen Ersatzes (MR, *Molecular Replacement*) wird eine Proteinstruktur *de novo* auf Grundlage einer bereits vorhandenen Proteinstruktur, die eine Sequenzidentität von mindestens 25 % zum untersuchten Protein besitzt, berechnet. Aus den Koordinaten der bekannten Proteinstruktur können, guasi rückwärts, die

Strukturfaktoramplituden (F_{calc}) und die Phasen (α_{calc}) für das Modell berechnet werden. Mit den Modellphasen und den gemessenen Strukturfaktoramplituden (F_{obs}) wird eine Elektronendichtekarte für die neue Kristallstruktur erhalten. Meistens unterscheiden sich sowohl die Raumgruppe als auch die Orientierung des Proteinmoleküls in der bekannten und der neuen, unbekannten Kristallstruktur. Daher muss das bekannte Strukturmodell erst korrekt in der neuen Kristallzelle platziert werden. Dieses sechsdimensionale Suchproblem mit drei Rotations- und drei Translationsvariablen wird in zwei Schritte (Rotation und Translation) aufgeteilt [Rossmann & Blow, 1962]. Nachdem das Suchmodell in der neuen Kristallzelle platziert wurde, kann eine Elektronendichte für das Zielmolekül berechnet und mit der Korrektur und Verfeinerung der Struktur begonnen werden.

1.6 Wirkstoffsuche durch rationales Drug Design

Das strukturbasierte Wirkstoffdesign beschreibt die Suche nach einem Molekül, das möglichst perfekt in die Bindetasche eines Zielproteins hineinpasst und dort in der Lage ist, energetisch günstige Wechselwirkungen mit dem Protein einzugehen [Mannhold *et al.*, 1998]. Der Prozess des strukturbasierten Wirkstoffdesigns wird schrittweise durchgeführt und durchläuft mehrere Zyklen, bevor eine optimierte Leitstruktur gefunden wird. Anhand des Schemas in Abbildung 1.13 kann der Weg eines solchen Prozesses nachvollzogen werden.

Für das rationale, strukturbasierte Ligandendesign sind Kenntnisse über die dreidimensionale Struktur des Zielproteins zwingend erforderlich. Diese kann entweder experimentell durch NMR (Kernresonanzspektroskopie) oder die bereits beschriebene Röntgenkristallographie aufgeklärt, oder durch das Verfahren des *Homology Modelling* theoretisch vorhergesagt werden.

Steht dann eine dreidimensionale Proteinstruktur zur Verfügung, wird diese nach so genannten *hot spots* untersucht, das heißt, nach Stellen im Protein, an denen es zwischen einem möglichen Liganden und dem Protein zu günstigen Wechselwirkungen kommen könnte. Protein und Ligand können entweder über kovalente oder über nicht-kovalente Wechselwirkungen miteinander interagieren. Mögliche Interaktionen nicht-kovalenter Art sind hierbei Wasserstoffbrückenbindungen, ionische Wechselwirkungen, hydrophobe Kontakte, Metallkomplexierungen und Kationen- π -Wechselwirkungen. Ist eine Bindetasche des Proteins definiert, können *Docking*-Untersuchungen im Rahmen des virtuellen Computer-Screenings durchgeführt werden, welche Leitstrukturen, d. h. Grundgerüste für mögliche Liganden des Zielproteins, liefern. In einem iterativen Prozess, der sowohl theoretische aber

auch experimentelle Untersuchungen erfordert, erfolgt dann die Optimierung der gefundenen Leitstrukturen, bis ideale Bindungseigenschaften zwischen Ligand und Protein gefunden sind.



Abb. 1.13: Ablaufschema des strukturbasierten Wirkstoffdesigns [modifiziert nach Anderson, 2003].

1.7 Modellierung einer Proteinstruktur durch Verfahren des *Molecular Modelling*

Im Rahmen des *Molecular Modelling* wird die Berechnung, Darstellung und Bearbeitung von relevanten dreidimensionalen Molekülstrukturen und ihren physikochemischen Eigenschaften durchgeführt. Dabei wird versucht, von bekannten experimentellen Daten auf die Geometrie und die physikochemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Struktur zu schließen. In einem wissensbasierten Vorgehen werden dann vorliegende Daten zu den Molekülstrukturen, Interaktionsgeometrien in der Kristallpackung, den Proteinstrukturen und -sequenzen sowie Strukturwirkungsbeziehung von Protein-Ligand-Komplexen usw. zur Beantwortung aktueller Problemstellungen genutzt.

Die in vitro-Aufklärung von Proteinstrukturen ist oft durch zahlreiche technische Schwierigkeiten, wie z. B. problematischer oder unzulänglicher Genexpression und Aufreinigung der Proteine bzw. dem Ausbleiben der Kristallisation fiir eine Strukturbestimmung erschwert und macht dadurch ein Zurückgreifen auf Simulationsverfahren notwendig, um Modelle für die Raumstruktur eines Proteins zu erhalten. Eine solche Methode stellt das Homology Modelling dar.

Beim Homology Modelling wird davon ausgegangen, dass bei Proteinen verschiedener und manchmal auch unterschiedlicher Funktion, Herkunft die jedoch ähnliche Aminosäuresequenzen besitzen, die Sequenzähnlichkeit in einer Strukturähnlichkeit widergespiegelt wird. Das bedeutet, dass die Struktur eines Proteins anhand von Proteinen mit homologer Aminosäuresequenz und bekannter Kristallstruktur ermittelt werden kann. Die Qualität der erhaltenen Homologiemodelle hängt dabei stark von der Aminosäuresequenzidentität zwischen der Vorlage und dem Zielprotein ab. Die untere Grenze, bis zu der ein Homologiemodell sinnvoll erstellt werden kann, liegt bei ungefähr 30 % Aminosäuresequenzidentität [Mannhold et al., 1998].

Im Allgemeinen werden vor allem hochkonservierte Bereiche der Rückgratstruktur in Sekundärstrukturelementen mit großer Genauigkeit vorhergesagt, während Schleifen ohne eindeutige Sekundärstruktur (loops) oft stark von der tatsächlichen Struktur abweichen können. Bei einer 50 %-igen Identität beträgt der mittlere Fehler (RMSD = *root mean square deviation*) der Koordinaten bezogen auf eine Kristallstruktur nur ungefähr 1 Ångström [Guex & Peitsch, 1997]. Dieser Befund diente als Prämisse für die Entwicklung von Homologiemodellierungsverfahren. Sie stellen gegenwärtig eine Alternative zur Strukturvorhersage von Proteinen dar, wenn die Ermittlung einer experimentell bestimmten Struktur nicht möglich ist.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Katja Becker lag ein Schwerpunkt der bisherigen Arbeiten auf Enzymen, die am Redoxstoffwechsel von Parasiten beteiligt sind. Hierzu zählen beispielsweise die Thioredoxin-Reduktase und die Glutathion-Reduktase, als auch die unterschiedlichen Peroxiredoxine und Glutaredoxine. Die durch Wagner *et al.* [1998] und Werner *et al.* [2005] untersuchte Glutamat-Dehydrogenase 1 aus *Plasmodium falciparum* wurde als ein Hauptlieferant von NADPH in erythrozytären Stadien des Parasiten beschrieben. Die Identifizierung von zwei weiteren, bisher nicht charakterisierten GDH Isoenzymen ermöglicht nun die vollständige Klärung der Rolle von Glutamat-Dehydrogenasen im Redoxstoffwechsel von Malariaerregern.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Glutamat-Dehydrogenasen 2 und 3 aus *Plasmodium falciparum* detailliert auf molekularer Ebene zu charakterisieren. Dazu sollten diese durch Klonierung und Produktion in heterologen Expressionssystemen sowie durch optimierte Aufreinigung rekombinant dargestellt und anschließend (hemm-)kinetisch charakterisiert werden. Weiterhin war es das Ziel, durch proteinkristallographische Methoden die Kristallstruktur des rekombinanten *Pf*GDH2 Proteins zu bestimmen. Untersuchungen zur Lokalisation der einzelnen Plasmodien-Enzyme über Fusionsproteine mit dem *green fluorescent protein* (GFP) sollten Aufschluss über das Vorkommen dieser innerhalb des Parasiten geben, sowie Hinweise darauf, in welcher Art und Weise sie miteinander in Verbindung stehen.

Mittels computergestützter Methoden, wie dem virtuellen *Docking* zur strukturbasierten Wirkstoffsuche, sollten auch *in silico* Untersuchungen sowohl an den drei plasmodialen Enzymen, als auch dem humanen Vergleichsenzym, durchgeführt werden, um die experimentell bestimmten Ergebnisse zu validieren und weiterführend zu erklären. Dadurch sollten ebenfalls Unterschiede, aber auch Ähnlichkeiten, einerseits zwischen den Enzymen aus *Plasmodium falciparum* untereinander, andererseits aber auch im Vergleich mit der humanen GDH1, herausgearbeitet werden. Dies stellt die Grundlage für die Entwicklung hochspezifisch wirkender Inhibitoren dar. Des Weiteren sollte mit der detaillierten Untersuchung der drei Isoenzyme, als auch dem Zusammenwirken dieser, das Verständnis zum Ablauf einzelner Stoffwechselwege innerhalb des Malariaparasiten, wie z. B. des Citratzyklus, verbessert werden.

2 Material und Geräte

2.1 Chemikalien, Enzyme und Fertigansätze

Chemikalien

Acrylamid/ Bisacrylamid (30/0,8 % Lösung)	Roth, Karlsruhe
Adenosindiphosphat	Sigma Aldrich, Steinheim
Adenosintriphosphat	Sigma Aldrich, Steinheim
Agarose	PeqLab, Erlangen
Ammoniumchlorid	Noras, Höchberg
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Roth, Karlsruhe
6-Aminohexansäure	Merck, Darmstadt
L-Arabinose	Sigma Aldrich, Steinheim
Bradford-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brillant Blue R250	Sigma Aldrich, Steinheim
Cumarinsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Gentamycin	Invitrogen, Karlsruhe
Giemsa (4 %, w/v)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutamat	Serva, Mannheim
L-Glutamin	Merck, Darmstadt
Glutathion	Sigma, Deisenhofen
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe
Guanosintriphosphat	Sigma Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	Oxoid, Basingstoke, England
HEPES	Roth, Karlsruhe
Hypoxanthin	Sigma Aldrich, Steinheim

Imidazol	Roth, Karlsruhe
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
α-Ketoglutarat	Boehringer, Ingelheim
Luminol	Sigma Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
NAD/NADH	Sigma Aldrich, Steinheim
NADP/NADPH	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natronlauge	Roth, Karlsruhe
PMSF	Sigma Aldrich, Steinheim
PEG 8000	Roth, Karlsruhe
Ponceau	Sigma Aldrich, Steinheim
Rhamnose	Becton Dickinson, Heidelberg
Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
TRIS (Tris-(hydroxymethyl-)aminoethan)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypton/Pepton	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Roth, Karlsruhe

Wirkstoffe

Eine Wirkstoffbibliothek zu Screening-Zwecken wurde uns freundlicherweise vom Hans-Knöll-Institut, Jena, zur Verfügung gestellt.

Fertigansätze

AccuPrime Taq-DNA-PolymeraseInvitrogen, KHiSpeed®Plasmid Maxi kitQiagen, HildeIn vitro transcription and translation KitNew EnglandQIAprep Spin Miniprep KitQiagen, HildeQIAquick PCR Purification KitQiagen, HildeQuick Ligation KitNew England

Invitrogen, Karlsruhe Qiagen, Hilden New England Biolabs, Frankfurt Qiagen, Hilden Qiagen, Hilden New England Biolabs, Frankfurt

Restriktionsendonukleasen

Enzymbezeichnung	Restriktionsschnittstelle	Hersteller
AvrII (XmajI)	5' CCTAGG 3'	Fermentas, St. Leon-Rot
BamHI	5' GGATCC 3'	Fermentas, St. Leon-Rot
BglII	5' AGATCT 3'	Fermentas, St. Leon-Rot
EcoRI	5' GAATTC 3'	Fermentas, St. Leon-Rot
KpnI	5' GGTACC 3'	Fermentas, St. Leon-Rot
NdeI	5' CATATG 3'	Fermentas, St. Leon-Rot
PstI	5' CTGCAG 3'	Fermentas, St. Leon-Rot
PvuI	5' CGATCG 3'	Fermentas, St. Leon-Rot
XhoI	5' CTCGAG 3'	Fermentas, St. Leon-Rot

Weitere Enzyme

Cystatin
DNaseI
Enterokinase
Lysozym
Pepstatin A
Pfu-DNA-Polymerase
PreScission TM -Protease (2 U/ μ L)
T4 Ligase
Thrombin

Elektrophoresemarker

Roche, Mannheim New England Biolab, Frankfurt Sigma Aldrich, Steinheim Sigma Aldrich, Steinheim Promega, Wisconsin, USA Amersham Bioscience, Freiburg Fermentas, St. Leon-Rot Novagen (Merck), Darmstadt

Sigma Aldrich, Steinheim

GeneRuler 1kb DNA-LadderFermer6x Loading Dye Solution (für Agarosegele)Fermer6x His Protein LadderQiagenPageRuler™ Prestained Protein LadderFermerSpectra™ Multicolor Broad Range Protein LadderFermer

Protein Molecular Weight Marker

Antikörper

Maus Anti-His₆-*tag* Antikörper HRP Anti-mouse-Antikörper HRP Anti-rabbit-Antikörper Fermentas, St. Leon-Rot Fermentas, St. Leon-Rot Qiagen, Hilden Fermentas, St. Leon-Rot Fermentas, St. Leon-Rot Fermentas, St. Leon-Rot

Dianova, Hamburg Dianova, Hamburg JacksonImmunoResearch, Suffolk, UK

Proteinkristallisationskits

Crystal Screen[™] I&II Detergent Screen

Detergentien

n-Octyl-ß-D-glucopyranosid 2-Methyl-2,4-pentaendiol (MPD) Hampton Research, Aliso Viejo, USA Hampton Research, Aliso Viejo, USA

Roth, Karlsruhe Schuchardt, Hohenbrunn

2.2 Chromatographiematerialien, Verbrauchsmaterialien und Geräte

Chromatographiematerial	
2'5'-ADP-Sepharose	GE Healthcare, Freiburg
Glutathion-Sepharose TM 4B	GE Healthcare, Freiburg
Ni-NTA-Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Superdex TM 200 prep grade (HiLoad 16/60)	GE Healthcare, Freiburg

Verbrauchsmaterialien

Amicon TM Ultra-15	Millipore, Eschborn
Blotting-Papier	Macherey-Nagel, Düren
Centricon	Sartorius, Göttingen
Crystal Clear Sealing Tape	Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Deckgläser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Einwegpipetten Cellstar	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Entwicklungsfilm	GE Healthcare, Freiburg
Halbmikro-Küvetten, Polysterol	Sarstedt, Nürnbrecht
Küvetten Uvette	Eppendorf, Hamburg
Membran Western-Blot Roti-PVDF	Roth, Karlsruhe
Millex TM Filter Units, steril	Millipore, Eschborn
Parafilm M	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen FastRack	Omnitip, Warschau, Polen
Plastiköse (blau/weiß) Nunc Brand Products	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Plastikröhrchen (15 ml und 50 ml, steril)	Roth, Karlsruhe
PS-Mikrotiterplatten 96 K	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Greiner, Frickenhausen
Roti [®] -PVDF-Membran	Roth, Karlsruhe

Vivaspin (20, 500) Wägepapier MN 226

Geräte

Autoklav **Bio Photometer** Brutschrank Drucker Fotos Geldoc Mitsubishi P91 Elektrophoresekammern Mini-Protean 3cell Feinwaage 474-32 FPLC System ÄKTA-FPLC Fraktionssammler Frac-100 Gefriertruhe -80 °C Gel-Dokumentationsanlage GelDoc 2000 Gelkammern (Agarose) Heizblock neoBlock II Heizblock Thermomixer comfort Magnetrührer Mikropipetten PCR Gerät Mastercycler gradient Pipetten Eppendorf Research Pipetten Gilson pH-Meter Reinstwasseranlage Optilab Plus Röntgenfilmentwicklungsmaschine Optimax TR Rotor Sorvall SLA 3000 Rotor Sorvall SS34 Schüttler Duomax 1030 Schüttler KS 500 Spektrophotometer Beckman DU 650 Spektrophotometer U-2001 Tecan infinite M200 Multiwell-Reader Ultraschallstab Sonoplus GM70 Vortex MS2 Minishaker Waage PE 626 Zentrifuge miniSpin Zentrifuge Sorvall[®] RC5BPlus

Sartorius, Göttingen Macherey-Nagel, Düren

Webeco, Bad Schwartau Eppendorf, Hamburg Thermo Life Sciences, Egelsbach Mitsubishi, Ratingen BioRad, München Scaltec Instruments, Göttingen Amersham Bioscience, Freiburg Pharmacia Biotech, Freiburg Heraeus BioRad, München Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA neoLab, Heidelberg Eppendorf, Hamburg Ika-Werke, Staufen Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg Gilson, Middleton, USA Knick, Berlin MembraPure, Bodenheim Protec, Oberstenfeld Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Heidolph, Schwabach Junke & Kunel, Ika Werke Beckmann, München Hitachi, Schwäbisch Gmünd Tecan, Crailsheim Bandelin, Berlin Ika-Werke, Staufen Bosch, Stuttgart Eppendorf, Hamburg ThermoScientific, Waltham, USA

2.3 Vektoren, Oligonucleotide und Templates

Vektoren

Vektor	Verwendungszweck	Bezugsquelle
pARL-1a	Transfektion in <i>Plasmodium</i> falciparum	freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. A. Cowman, Melbourne
pET28a	Überexpression	Novagen (Merck), Darmstadt
pGEX-6P-1	Überexpression mit GST-Fusionsprotein	freundlich zur Verfügung gestellt von Frau Prof. M. Löffler, Philipps-Universität Marburg
pGro7	Coexpression in E. coli	Takara Bio, Shiga, Japan
pQE30	Überexpression	Qiagen, Hilden
pRARE II	Coexpression in E. coli	Merck, Darmstadt
pRSETA A	Überexpression	Invitrogen, Karlsruhe
pSK	Klonierungsvektor	Stratagene, Cedar Creek, Texas
p426 TDH3	Shuttle Vektor <i>E. coli</i> \rightarrow Hefe	freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. R. Lill, Universität Marburg

Oligonucleotide

OhG1N53	5' CGCG <u>GGATCC</u> AGCGAGGCGGTGGCCGA 3'
OhG1C558	5' GCGC <u>GAATTC</u> CTATGTGAAGGTCACACCAG 3'
OpfGDH1-for:	5' GCGC <u>GAGCTC</u> AGTGCTCTTAAAGACAAAACGG 3'
OpfGDH1-rev:	5' CGCG <u>CTGCAG</u> TTAAAAACAACCTTGTTCAATATATG 3'
OpfGDH2N	5' CGCG <u>GGATCC</u> ATTTTGTATTCATGTGTTGTTTG 3'
OpfGDH2A	5' CGCG <u>GGATCC</u> AAAAATAAAGTTCTTAAATATGCTAAAC 3'
OpfGDH2P	5' CGCG <u>GGATCC</u> ACTTCTACCAAATCTGTAGATAAC 3'
OpfGDH2C	5' GCGC <u>CTGCAG</u> TTATAAACCTCCTTGCTCTAGG 3'
OpfG2Nde	5' cgcg <u>CATATG</u> AGTAGACTAGGTAGTCTACAC 3'
OpfG2Xho	5' cgcg <u>CTCGAG</u> TTATAAACCTCCTTGCTCTAGG 3'
OpfG3N	5' CGCG <u>GGATCC</u> GATATTGATAGAAGGTCGGCATT 3'
Opfg3Xas	5' CTCC <u>TCGAGA</u> TATCTTACTAAAAC 3'
OpfG3Xs	5' ATAT <u>CTCGAG</u> GAGGAGTTCGTATT 3'
OpfG3C	5' GCGC <u>CTGCAG</u> TTAAGCACTTTCGCTTTGTAATTTC 3'
PfGDH1s	5' TTAAGATCTATGAGTGCTCTTAAAGACAAAACG 3'
PfGDH1as	5' AACCCTAGGACCTGCTGCTTTAGGTTCTTCCATAAATAATGG 3'
PfGDH2s	5' TTAAGATCTATGATTTTGTATTCATGTGTTGTTTG 3'
PfGDH2as	5' AACCTAGGACCTGCTGCTACAGATTTGGTAGAAGT'ATAGC 3'
PfGDH3s	5' TTAAGATCTATGGATATTGATAGAAGGTC 3'
PfGDH3as	5' AACCCTAGGACCTGCTGCTCCTAACTTGTTAAAATAAAA

Templates

Escherichia coli K12 Zellen PA340, die das *Plasmodium falciparum gdh1*-Gen enthielten, wurden uns freundlich von Prof. Luise Krauth-Siegel, Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

Protein	Anzahl Basenpaare	Anzahl	Theoretisches M _r
	(bp)	Aminosäuren	(kDa)
<i>Pf</i> GDH1	1413	470	53
PfGDH2 full-length	1530	510	57
<i>Pf</i> GDH2 ₍₋₂₁₎	1467	489	55
<i>Pf</i> GDH2 ₍₋₆₀₎	1350	450	50
<i>Pf</i> GDH2	1383	461	52
PfGDH3 full-length	4191	1397	160
PfGDH3 _(MID)	1827	609	68
PfGDH3(END)	1551	517	59
PfGDH3 _(2P)	3591	1197	138
hGDH1	1515	505	56

2.4 Proteine und Konstrukte

A)

MILYSCVVCF IVFVFHVKAY SKNKVLKYAK PGFITNEIDI GAYAKRRGKS RLGSLHNYGY TSTKSVDNQIEELRE...



Abb. 2.1: Schematische Darstellung der generierten Konstrukte für die PfGDH2 und PfGDH3.

Im Anhang befinden sich die Aminosäuresequenzen der *Pf*GDH2, der *Pf*GDH3 und der humanen GDH. Die Klonierung der unterschiedlichen *Pf*GDH2 Konstrukte (Abb. 2.1 A) erfolgte auf Grundlage unterschiedlicher Vorhersagen für eine Signalsequenz am N-Terminus über die Programme SignalP 3.0 [Bendtsen *et al.*, 2004] und PATS [Zuegge *et al.*, 2001]. Die Auswahl der klonierten Konstrukte für die *Pf*GDH3 (Abb. 2.1 B) erfolgte anhand von Sequenzvergleichen mit Glutamat-Dehydrogenasen der gleichen Familie und der durch eine Datenbanksuche über BLAST (www.rcsb.org) erhaltenen homologen Sequenzen der Enzyme unterschiedlicher Organismen (s. Anhang).

E. coli	Genotyp	Bezugsquelle
BL21	$F \text{ ompT hsdS}_{B}(r_{B} m_{B}), gal, dcm, \Delta(DE3)$	Invitrogen, Karlsruhe
BL21-Star	$F ompT hsdS_B(r_B m_B)$, gal, dcm, rne131 (DE3)	Invitrogen, Karlsruhe
C41	$F^- ompT hsdS_B(r_B^-m_B^+)$, gal, dcm, λ (DE3)	Avidis, Frankreich
KRX	[F', traD36, $\Delta ompP$, proA ⁺ B ⁺ , lacI ^q , $\Delta(lacZ)M15$] $\Delta ompT$, endA1, recA1, gyrA96(Nal ⁺), thi-1, hsdR17 (r_k ⁻ , m_k ⁺), e14 ⁻ (McrA ⁻), relA1, supE44, $\Delta(lac-$ proAB), $\Delta(rhaBAD)$: T7 RNA Polymerase	Promega, Mannheim
M15 [pREP4]	Nal ^S , str ^S , rif ^S , Km ^R , lac ⁻ , ara ⁺ , gal ⁺ , mt ⁻ , F, recA ⁺ , uvr ⁺ , Ion ⁺	Qiagen, Hilden
Rosetta-gamiII	F- $ompT$ hsdS _B (r_{B} - mv -), gal, dcm,	Novagen, Bad Soden
	pRARE2 (CamR)	
XL1-Blue	endA1 hsdR17(r_{K12} ⁺ m_{K12} ⁺) supE44 thi-1 recA1 ⁻ gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ Δ M15 Tn10 Tet ^r]	Stratagene, Amsterdam
Hefe		
BY4742	His $3\Delta 1$, leu $2\Delta 0$, lys $2\Delta 0$, ura $3\Delta 0$	Euroscarf (AG Prof. R. Lill,
		Universität Marburg)

2.5 Bakterien- und Hefestämme

2.6 Puffer und Lösungen

2.6.1 Puffer zur DNA-Aufreinigung

5x TBE-Puffer, 2 L	108 g TRIS, pH 7,3
	55 g Borsäure
	9,3 g EDTA

2.6.2 Expressionsmedien

Die Medien wurden mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt und bei 120 °C autoklaviert. Die Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren und/oder vor Gebrauch der Medien zugesetzt.

Luria-Broth-Medium (LB), 1 L	10 g Trypton
(lysogeny broth)	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
Luria-Broth-Agarplatten, 1 L	10 g Trypton
	5 g Hefeextrakt
	10 g NaCl
	15 g Agarose
Terrific-Broth-Medium (TB), 1 L	12 g Trypton
	24 g Hefeextrakt
	9,4 g K ₂ HPO ₄
	2,2 g KH ₂ PO ₄
	4 ml Glycerol
2x YT Medium, 1 L	16 g Trypton
	10 g Hefeextrakt
	5 g NaCl
Modifiziertes Minimalmedium (M9)(PfGDH3)	6 g Na ₂ HPO ₄
	3 g KH ₂ PO ₄
	0,5 g NaCl
	1 g NH ₄ Cl
	5 g Glutamat
	0,2 % Glucose

PreScission Protease Binding Buffer, 1 L	10 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 7,3
	1,8 mM KH ₂ PO ₄
	140 mM NaCl
	2,7 mM KCl
PreScission Protease Cleavage Buffer, 1 L	50 mM TRIS; pH 7,0
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM DTT
<i>Pf</i> GDH1-Puffer, 1 L	50 mM TRIS; pH 7,4
	300 mM NaCl
<i>Pf</i> GDH2-Puffer, 1L	100 mM TRIS; pH 7,8 (pH 8,7 zur
	Resuspension des Pellets)
	500 mM NaCl
Phosphat-Puffer, 1 L	50 mM Na ₂ HPO ₄ ; pH 8,0
	300 mM NaCl
Thrombin Cleavage Buffer 10x	200 mM TRIS; pH 8,4
	1,5 M NaCl
	25 mM CaCl ₂

2.6.3 Puffer zur Proteinaufreinigung

2.6.4 Puffer für die Zellkultur

Saponin Lyse-Puffer	7 mM K ₂ HPO ₄ ; pH 7,4
	1 mM NaH ₂ PO ₄
	11 mM NaHCO ₃
	58 mM KCl
	56 mM NaCl
	1 mM MgCl
	14 mM Glucose
	0,02 % Saponin
Cytomix	10 mM K ₂ HPO ₄ ; pH 7,6
	10 mM KH ₂ PO ₄
	12 mM KCl
	0,15 mM CaCl ₂
	5 mM MgCl ₂
	25 mM HEPES
	2 mM EGTA

2.6.5 Stammlösungen

APS	10 % (w/v) in ddH ₂ O, bei -20 °C gelagert
L-Arabinose	20 % (w/v) in ddH ₂ O, bei -20 °C gelagert
Carbenicillin (C)	50 mg/mL in 50 % (v/v) EtOH, bei -20 °C gelagert
Chloramphenicol (Ch)	35 mg/mL in 100 % EtOH, bei -20 °C gelagert
Cystatin	40 μM in US-Puffer, bei -20 °C gelagert
IPTG	1 M in ddH ₂ O, sterilfiltriert, bei -20 °C gelagert
Kanamycin (K)	25 mg/mL in ddH2O, sterilfiltriert, bei -20 °C gelagert
Pepstatin A	0,3 mM in DMSO, bei -20 °C gelagert
PMSF	100 mM in DMSO, bei RT gelagert
L-Rhamnose	20 % (w/v) in ddH ₂ O, sterilfiltriert, bei -20 °C gelagert
SDS	10 % in ddH ₂ O, bei RT gelagert

Computerprogramme 2.7

ACD/ ChemSketch 5.12	ACD Inc., Toronto, CDN
Chimera	http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/
CNS	http://cns-online.org/v1.3/
Deep View, Swiss-Pdb Viewer 3.7	http://www.expasy.org/spdbv/
ExPASy-Proteomics Tools	http://www.expasy.org/
GOLD 4.2	http://www.ccdc.cam.ac.uk
JustBio Tools	http://www.justbio.com
0	http://xray.bmc.uu.se/~alwyn
Office 2003	Microsoft, Lund
PyMOL v0.99	http://www.pymol.org
SYBYL 7.2	http://www.tripos.com
XDS	http://xds.mpimf-heidelberg.mpg.de/

Das Programm SYBYL 7.2 wurde von der AG Herr Prof. Klebe, Marburg freundlich zur Verfügung gestellt.

3 Methoden

Alle durchgeführten Arbeiten mit Bakterienstämmen wurden gemäß dem Gentechnikgesetz [GenTG] durchgeführt und gehörten zur Sicherheitsstufe S1. Bei Experimenten anfallende, mit Bakterien kontaminierte Lösungen und Gefäße wurden getrennt gesammelt und durch 30 Minuten bei 120 °C und 2,5 bar im Autoklaven sterilisiert. Arbeiten im Rahmen der GFP-Lokalisationsstudien wurden unter der Sicherheitsstufe S2 durchgeführt.

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

DNA-Abschnitte können mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) von einer DNA-Vorlage (Template) amplifiziert werden [Mullis & Faloona, 1987]. Dabei hybridisieren zwei Oligonucleotide, sogenannte Primer, an die DNA-Einzelstränge und werden durch eine thermostabile DNA-Polymerase komplementär zum DNA-Strang verlängert. Die Hybridisierungstemperatur richtet sich nach der jeweiligen Sequenz der Oligonucleotide und wurde nach Herstellerangaben bestimmt. Die eingesetzten thermostabilen DNA-Polymerasen, *Pfu-* oder *Taq-*DNA-Polymerase, katalysieren die Polymerisationsreaktion.

Tab.	3.1:	Zeiten	und	Temperaturen	für	die	einzelnen	Rea	ktionsschritte	der	PCR	für	die	full-length
<i>Pf</i> GD	DH-A	mplifika	ate.											
										1	CDU			

	<i>Pf</i> GDH2	<i>Pf</i> GDH3	hGDH
Denaturierung	2' 94 °C	2' 94 °C	90" 94 °C
Synthesezyklen	30x	30x	30x
Denaturierung	30" 94 °C	30" 94 °C	20" 94 °C
Hybridisierung	30" 55 °C	45" 60 °C	20" 55 °C
Elongation	4' 68 °C	6' 69 °C	2' 68 °C
Finale Elongation	6' 69 °C	9' 69 °C	5' 68 °C

3.1.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration einer Probe wurde durch Absorptionsbestimmung bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Als Leerwert diente ddH₂O. Eine $A_{260nm} = 1$ entspricht einer DNA-Konzentration von 50 ng/µL [Sambrook *et al.*, 1989]. Der Reinheitsgrad der DNA-Probe wurde durch eine weitere Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. Eine reine DNA-Probe entspricht dem Quotienten von $A_{260nm}/A_{280nm} = 1,8-2,0$.

3.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Durch eine Agarosegelelektrophorese lässt sich ein Gemisch aus DNA-Fragmenten trennen und somit analysieren [Koolmann & Röhm, 2003]. Dabei ist die Beweglichkeit der DNA abhängig von deren Größe und Form sowie der Agarosekonzentration im Gel. Die Überprüfung von PCR-Produkten und dem Restriktionsverdau von Gen-Vektor-Konstrukten erfolgte in einer horizontalen Gelanlage in 1x TBE-Puffer. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Größenbestimmung erfolgte durch den 1 kb DNA Längenstandard. Die Elektrophorese wurde zunächst mit einer Spannung von 60 V durchgeführt und dann nach weiteren 50 Minuten bei 100 V beendet. Anschließend wurde das Gel für 10 Minuten in einem Ethidiumbromid-Bad inkubiert. Mittels der Gel-Dokumentationsanlage Gel Doc 2000 wurden unter UV-Licht die DNA-Banden sichtbar gemacht und digital dokumentiert.

3.1.4 Spaltung doppelsträngiger DNA mittels Restriktionsendonukleasen

Für analytische Zwecke oder zur Erzeugung komplementärer Enden für Ligationen wurden DNA-Sequenzen mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen gespalten. Die palindromischen Schnittstellen wurden durch die in der PCR eingesetzten Primer generiert oder waren bereits in der DNA-Sequenz vorhanden. Entsprechend der Herstellerangaben erfolgte die Restriktion in entsprechenden Puffersystemen durch eine einstündige Inkubation bei der jeweils optimalen Temperatur. Bei Umklonierungen wurde der Ursprungsvektor mit zusätzlichen Restriktionsendonukleasen geschnitten, um eine Religation zu verhindern.

Gen	Zielvektor	Restriktionsenzyme
Pfgdh1	pQE30	SacI / PstI
Pfgdh2 full-length	pQE30	BamHI / PstI
Pfgdh2 ₍₋₂₁₎	pQE30	BamHI / PstI
<i>Pfgdh2</i> (-60)	pQE30	BamHI / PstI
Pfgdh2	pET28a	Ndel / XhoI
Pfgdh3 (1-1784)	pRSETA	BamHI / XhoI
Pfgdh3 (1785-4194)	pRSETA	XhoI / PstI
Pfgdh3 full-length	pRSETA	BamHI / PstI
Pfgdh3 _(MID/END/2P)	pRSETA	BamHI / PstI
Pfgdh3 full-length (Hefe)	p426TDH3	SpeI / BamHI
hgdh1	pRSETA	BamHI / EcoRI
<i>Pfgdh1-3</i> (66AS)	pSK ⁺	BglII / AvrII (XmajI)
Pfgdh1-3+GFP	pARL-1a	XhoI / AvrII

Tab. 3.2: Verwendete Restriktionsenzyme.

3.1.5 Ligation

Bei einer Ligation wird ein DNA-Fragment mit einem Zielvektor durch das Enzym Ligase verknüpft [Mühlhardt, 2009]. Die komplementären Enden von Insert und Vektor lagern sich dafür zunächst aneinander. Die Ligase katalysiert daraufhin die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-OH-Gruppe des einen und der 5'-Phosphat-Gruppe des anderen Fragmentes. Die dafür eingesetzte Menge der DNA-Fragmente wurde anhand folgender Formel berechnet:

$$Masse_{Fragment}[ng] = 5 \times Masse_{Vektor}[ng] \times Länge_{Fragment}[bp] / Länge_{Vektor}[bp]$$

Je nach Ligationsansatz wurden 0,5-1 µL T4-DNA-Ligase oder Quick-T4-DNA-Ligase eingesetzt. Ligationen mit Quick-Ligase wurden fünf Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt, während Ansätze mit T4-Ligase entweder für 4 Stunden bei 16 °C oder bei 4 °C über Nacht inkubiert wurden. Nach der Ligation wurden chemisch kompetente Bakterien mit dem Ligationsprodukt transformiert, über Nacht bei 37 °C erst auf Agarplatten, dann in Flüssigmedium kultiviert und anschließend die DNA isoliert.

3.1.6 Herstellung und Transformation kompetenter E. coli Zellen

Herstellung: Mit Hilfe der CaCl₂-Methode können *E. coli* Bakterienmembranen für Plasmid-DNA durchlässig gemacht werden. Es wurde eine 3 mL-Übernachtkultur in LB-Medium angezüchtet. Diese wurde in 100 mL LB-Medium überführt und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von etwa 0,6 inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde dann für 10 Minuten bei 4 000 g und 4 °C abzentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 10 mL eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis belassen. Nach wiederholter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen. 50 μ L Aliquots wurden nach schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei -80 °C gelagert.

Transformation: Bei der Transformation wird das Plasmid mit dem gewünschten Insert in die kompetenten Zellen eingebracht. Je 50 μ L chemisch kompetente *E. coli* Bakterien wurden mit 1-8 μ L Expressionsvektor (50-400 ng DNA) versetzt (s. Tab. 3.3). Der Transformationsansatz wurde 30 Minuten auf Eis und anschließend 90 Sekunden bei 42 °C inkubiert, bevor eine weitere Minute auf Eis folgte. Es wurden 400 μ L LB-Medium hinzugegeben und der Ansatz für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Jeweils 30 μ L, 50 μ L und 100 μ L der Bakteriensuspension wurden auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Enzym	Plasmid	Resistenz der Plasmide	<i>E. coli</i> Zellen und Resistenzen
	pQE30 leer	Carbenicillin	M15 Kanamycin
	pRSETA leer	Carbenicillin	KRX
<i>Pf</i> GDH1	pQE30	Carbenicillin	M15 Kanamycin
<i>Pf</i> GDH1/2/3 (GFP)	pSK^+	Carbenicillin	XL1-Blue
	pARL-1a	Carbenicillin	XL1-Blue
PfGDH2 full length, PfGDH2 ₍₋₆₀₎ PfGDH2 ₍₋₂₁₎	pQE30	Carbenicillin	M15 Kanamycin
PfGDH2	pET28a	Kanamycin	BL21
	pET28a	Kanamycin	KRX
<i>Pf</i> GDH3	pQE30	Carbenicillin	M15 Kanamycin
	pRSETA	Carbenicillin	KRX
	pRSETA pRAREII	Carbenicillin Chloramphenicol	KRX
	pRSETA	Carbenicillin	BL21 Star
	pRSETA pGro7	Carbenicillin Chloramphenicol	BL21 Star
	pRSETA	Carbenicillin	BL21

Tab. 3.3: Transformationsansätze für alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide.

	nGro7	Chloramphenicol	
	pRAREII	Chloramphenicol	
	pRSETA	Carbenicillin	C41
	pRAREII	Chloramphenicol	011
PfGDH3 _(MID)	pRSETA	Carbenicillin	KRX
	pRSETA	Carbenicillin	Rosetta-gamiII Chloramphenicol
PfGDH3(END)	pRSETA	Carbenicillin	KRX
	pRSETA pGro7	Carbenicillin Chloramphenicol	BL21
	pRSETA pGro7 pRAREII	Carbenicillin Chloramphenicol Chloramphenicol	BL21
	pRSETA	Carbenicillin	Rosetta-gamiII Chloramphenicol
	pQE30	Carbenicillin	M15 Kanamycin
PfGDH3 _(2P)	pRSETA	Carbenicillin	KRX
	pRSETA	Carbenicillin	Rosetta-gamiII Chloramphenicol
hGDH1	pRSETA	Carbenicillin	BL21
	pRSETA	Carbenicillin	KRX
	pRSETA pRAREII	Carbenicillin Chloramphenicol	KRX
	pRSETA pGro7	Carbenicillin Chloramphenicol	KRX
	pGEX-6P-3	Carbenicillin	BL21
	pGEX-6P-3	Carbenicillin	M15 Kanamycin
	pGEX-6P-3	Carbenicillin	KRX

3.1.7 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Plasmid-DNA-Präparation wurden transformierte *E. coli* Bakterien in 3 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum kultiviert. Doppelsträngige Plasmid-DNA wurde mittels des QIAprep[®] Spin Miniprep Kits von Qiagen entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt und in 50 μ L steriles ddH₂O eluiert. Die Konzentrationsbestimmung des aufgereinigten Plasmids erfolgte photometrisch.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 Plasmodium falciparum 3D7-Zellkultur

P. falciparum Parasiten wurden im intraerythrozytären Stadium nach Trager und Jensen [1976] in RPMI 1640-Medium unter Zugabe von 9 mM Glucose, 0,2 mM Hypoxanthin, 2,1 mM L-Glutamin und 22 μ g/mL Gentamycin kultiviert. Weiterhin wurden Leukozyten-freie Erythrozyten der Blutgruppe A⁺ mit einem Hämatokrit im Endvolumen von 3,3 % und 0,2 % Albumax[®] hinzugefügt. Die Kulturen wurden bei 37 °C und einer Begasung von 3 % Sauerstoff, 3 % Kohlendioxid und 95 % Stickstoff in einem Inkubator und in fortlaufender Kultur gehalten. Bei optimalen Bedingungen teilten sich die Parasiten alle 48 Stunden bis zu 7-fach. Die Parasitämie wurde für den Erhalt auf 1-2 % oder auf 5-8 % für die Ernte gebracht und mittels Giemsa-Färbung bestimmt. Es wurde der Chloroquin-sensitive Stamm 3D7 verwendet.

3.2.2 Gewinnung eines Proteinrohextraktes aus P. falciparum

Um Proteine aus *P. falciparum* direkt zu isolieren, wurden 6-8 große Schalen (45 mL Kulturen) mit rund 7 % Parasitämie angezogen und geerntet. Für die Gewinnung cytosolischer Proteine wurden durch vier Zyklen Frieren (flüssiger Stickstoff) und Tauen (Wasserbad) sowie anschließend 3 x 10 Sekunden Ultraschall, die Parasitenmembranen und Organellen zerstört. Die Membranbestandteile wurden bei 30 000 g 20 Minuten abzentrifugiert.

3.2.3 Bakterienkultivierung

Um *E. coli*-Bakterien auf LB-Platten zu kultivieren, wurden Bakterien aus Glycerolstocks oder Transformationsansätzen auf LB-Platten ausgestrichen und im Brutschrank über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die LB-Platten wurden bei 4 °C gelagert und standen zum Animpfen von Flüssigkulturen für etwa vier Wochen zur Verfügung. Dem Plattenmedium wurden entsprechende Antibiotika hinzugefügt. Für Übernachtkulturen wurden 50 mL LB-Medium mit 3 mL Bakterienvorkulturen angeimpft und über Nacht bei 37 °C mit 175 Upm inkubiert. Die Antibiotika-Zusätze waren mit denen der LB-Platten identisch. Um Glycerolstocks zu erhalten, wurden 0,8 mL einer Übernachtkultur mit 0,2 mL sterilem Glycerol gemischt und die Bakteriensuspension bei -80 °C gelagert.

3.2.4 Heterologe Genexpression

PfGDH1

Für die Produktion des rekombinanten *Pf*GDH1 Proteins (pQE30/*Pfgdh1*) wurden transformierte *E. coli* M15 Zellen auf LB-Platten ausgestrichen und anschließend 3 mL LB Medium mit je einer Kolonie angeimpft. Nach etwa sechs Stunden wurde die Vorkultur in 50 mL LB Medium überführt und bei 37 °C über Nacht bei 175 Upm schüttelnd inkubiert. Ein Liter LB-Medium, welches 100 µg/mL Carbenicillin und 50 µg/mL Kanamycin enthielt, wurde mit der Übernachtkultur versetzt und bei 37 °C und 175 Upm bis zu einer OD_(600 nm) = 0,8 inkubiert. Die Induktion erfolgte mit IPTG in 1 mM Endkonzentration. Es wurde jeweils eine 1 mL-Probe als Null-Stunden-Wert entnommen, kurz zentrifugiert und deren Bakteriensediment bei -20 °C gelagert. Die induzierten 1 L-Kulturen wurden über 4 h bei RT und 175 Upm geschüttelt. Nach der Genexpression wurden erneut 1 mL-Proben entnommen und entsprechende Pellets ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 4 °C und 8 000 g geerntet und das Sediment in 50 mL *Pf*GDH1-Puffer resuspendiert. Ein Proteaseinhibitorcocktail, bestehend aus 100 μ M PMSF, 150 nM Pepstatin und 40 nM Cystatin, wurde umgehend hinzugegeben. Die Suspension wurde entweder bei -20 °C gelagert oder sofort zur Aufreinigung verwendet.

PfGDH2

Alle rekombinanten *Pf*GDH2 Proteine wurden als N-terminal His₆-*getaggte* Proteine durch Überexpression gewonnen. Die heterologe Überexpression der *Pf*gdh2 Konstrukte – *Pf*gdh2 *full-length*, *Pf*gdh2₍₋₆₀₎ und *Pf*gdh2₍₋₂₁₎ – die zuvor in den pQE30 Vektor kloniert wurden, wurden entsprechend des Protokolls für die Überexpression der *Pf*GDH1 behandelt. Die Überexpression der *Pf*GDH2 (pET28a/*Pfgdh2*) wurde in *E. coli* KRX Zellen und 1 L TB-Medium durchgeführt. Dem Medium wurden 50 µg/mL Kanamycin als Selektionsmarker zugesetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C bis zu einer OD_(600 nm) = 0,8 wachsen gelassen und weiter bei RT inkubiert, bis eine OD_(600 nm) = 1,0-1,1 erreicht wurde. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von Rhamnose in 0,1 %iger Endkonzentration. 18 Stunden nach Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation für 20 min bei 4 °C und 8 000 g geerntet. Die Zellpellets wurden in *Pf*GDH2-Puffer (pH 8,7), einschließlich Proteaseinhibitoren, resuspendiert und bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

PfGDH3

Die Überexpression der *Pf*GDH3 wurde in unterschiedlichen Systemen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Zusammenfassend sind die getesteten Bedingungen in Tabelle 3.4 dargestellt.

	PfGDH3 full-length							
Zellen	Vektor	Hilfsplasmid	Medium,	Temperatur	Zeit	Induktion		
			Antibiotikum					
BL21 Star	pRSETA	-	TB, C	37 °C	3 h	IPTG		
BL21 Star	pRSETA	-	LB, C	37 °C	3 h	IPTG		
BL21 Star	pRSETA	pGro7	LB, C + Ch	37 °C	3 h	IPTG		
						L-Arabinose		
BL21 Star	pRSETA	pGro7	2 x YT,	$37 ^{\circ}\text{C} \rightarrow 16 ^{\circ}\text{C}$	ÜN	IPTG		
			C + Ch			L-Arabinose		
C41	pRSETA	pRAREII	TB, C + Ch	37 °C	ÜN	IPTG		
BL21	pRSETA	pRAREII	2 x YT,	$37 ^{\circ}\mathrm{C} \rightarrow \mathrm{RT}$	32 h	IPTG		
		pGro7	C + Ch	$\rightarrow 16 \ ^{\circ}\text{C}$		L-Arabinose		
M15	pQE30	-	LB, C + K	37 °C	4 h	IPTG		
	PfGDH3 _(MID)							
Zellen	Vektor	Hilfsplasmid	Medium,	Temperatur	Zeit	Induktion		
			Antibiotikum					
KRX	pRSETA	-	TB, C	37 °C	4 h	Rhamnose		
KRX	pRSETA	-	TB, C	$37 \circ C \rightarrow RT$	ÜN	Rhamnose		
Rosetta-	pRSETA	pRAREII	TB, C + Ch	37 °C	ÜN	IPTG		
gami II								
		I	PfGDH3 _(END)	1	1			
Zellen	Vektor	Hilfsplasmid	Medium,	Temperatur	Zeit	Induktion		
			Antibiotikum					
KRX	pRSETA	-	TB, C	37 °C	4 h	Rhamnose		
KRX	pRSETA	-	TB, C	$37 \circ C \rightarrow RT$	ÜN	Rhamnose		
KRX	pRSETA	-	TB, C	$37 \circ C \rightarrow 16 \circ C$	ÜN	Rhamnose		
Rosetta-	pRSETA	pRAREII	TB, C + Ch	37 °C	ÜN	IPTG		
gami II								
BL21	pRSETA	pRAREII	2 x YT,	$37 \circ C \rightarrow RT$	ÜN	IPTG		
		pGro7	C + Ch			L-Arabinose		
M15	pQE30	-	LB, C + K	37 °C	4 h	IPTG		
	1		PfGDH3 _(2P)					
Zellen	Vektor	Hilfsplasmid	Medium,	Temperatur	Zeit	Induktion		
			Antibiotikum					
1								

Tab. 3.4: Bedingungen für die Überexpression der einzelnen PfGDH3 Konstrukte.

KRX	pRSETA	-	TB, C	37 °C	4 h	Rhamnose
KRX	pRSETA	-	TB, C	$37 ^{\circ}\mathrm{C} \rightarrow \mathrm{RT}$	ÜN	Rhamnose
Rosetta-	pRSETA	pRAREII	TB, C + Ch	37 °C	ÜN	IPTG
gami II						

Durch Versuche an den Teilkonstrukten zur PfGDH3 im Rahmen der Masterarbeit von Helga Rogel [2010] wurde die vorliegende Arbeit unterstützt.

hGDH

Das Gen, das für die hGDH kodiert, wurde in den pRSETA-Vektor kloniert, der zum einen ein starker Expressionsvektor (T7-Promotor) ist und zum anderen die Reinigung des Proteins über einen His-*tag* vereinfacht. Des Weiteren enthält das Plasmid ein Ampicillin-Resistenzgen und in der multiplen Klonierungsstelle (MCS) unter anderem die Schnittstellen *Bam*HI und *Eco*RI, sowie ein Stopp-Codon. Für die heterologe Überexpression der hGDH1 in *E. coli* wurde in der Masterarbeit von Anne Weiland [2009] folgendes Protokoll entwickelt und standardisiert:

Nach Animpfen einer 3 mL Vor- und der anschließenden 50 mL Übernachtkultur wurde ein Liter TB-Medium überimpft und bei 37 °C geschüttelt. Die Medien enthielten jeweils 100 μ g/mL Carbenicillin. Die Zugabe von 0,1 % L-Rhamnose erfolgte bei einer OD_(600 nm) = 1,0-1,1. Anschließend wurden die Bakterienkulturen für 24 h bei Raumtemperatur mit 175 Upm schüttelnd inkubiert. Die Ernte der Zellen erfolgte durch 20-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 8 000 g. Zur Resuspension der Zellen wurden etwa 30 mL Phosphat-Puffer zusätzlich des Proteaseinhibitorcocktails verwendet. Weitere Expressionsversuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten laut Tabelle 3.5.

hGDH1								
Zellen	Vektor	Hilfsplasmid	Medium,	Temperatur	Zeit	Induktion		
			Antibiotikum					
BL21	pRSETA	-	TB, C	$37 ^{\circ}\mathrm{C} \rightarrow \mathrm{RT}$	24 h	IPTG		
KRX	pRSETA		TB, C	$37 ^{\circ}\mathrm{C} \rightarrow \mathrm{RT}$	24 h	Autoinuktion		
						0,1 % Rha		
						0,15 % D-Glc		
KRX	pRSETA	pGro7	TB, C, Ch	$37 ^{\circ}\mathrm{C} \rightarrow \mathrm{RT}$	4 h	0,05 % L-Ara		
						0,1 % L-Rha		
KRX	pRSETA	pRAREII	TB, C, Ch	$37 ^{\circ}\mathrm{C} \rightarrow \mathrm{RT}$	24 h	0,1 % L-Rha		
KRX	pRSETA	-	TB, C	37 °C	4 h	0,1 % L-Rha		
KRX	pRSETA	-	TB, C	$37 \circ C \rightarrow RT$	ÜN	0,1 % L-Rha		

Tab. 3.5: Getestete Bedingungen für die Überexpression der hGDH.

KRX	pGEX	-	TB, C	37 °C	4 h	IPTG
KRX	pGEX	-	TB, C	$30 ^{\circ}\mathrm{C} \rightarrow \mathrm{RT}$	ÜN	IPTG
M15	pGEX	-	2 x YT, C	37 °C	4 h	IPTG
M15	pGEX	-	2 x YT, C	$37 \circ C \rightarrow 16 \circ C$	4 h	IPTG
BL21	pGEX	-	2 x YT, C	37 °C	4 h	IPTG
BL21	pGEX	-	2 x YT, C	$37 \circ C \rightarrow 16 \circ C$	4 h	IPTG

Um das Gen der hGDH in *E. coli* zu exprimieren, wurde in der Masterarbeit von Helga Rogel außerdem das GST-Fusionssystem mit dem Vektor pGEX-6P3-hGDH verwendet (s. Vektorkarte im Anhang). Zu den strukturellen Elementen dieses Vektors gehören eine *tac*-Promotorregion für die durch IPTG induzierbare Expression in *E. coli* Bakterien, eine GST kodierende Region für das Fusionsprotein, eine *PreScission*TM-Protease Erkennungsstelle, ein Ampicillin-Resistenzgen und der Replikationsursprung.

3.2.5 Bakterienaufschluss mittels Ultraschall

Die Bakteriensuspensionen wurden mit 200 μ g/mL Lysozym und 20 μ g/mL DNaseI versetzt und 30 bis 60 Minuten auf Eis gerührt. Anschließend wurde der Bakterienaufschluss durch hochfrequente Beschallung (60 % Intensität, 90 % Intervall über 4 x 30 sec) mittels Ultraschallsonde auf Eis durchgeführt. Durch 30-minütiges Zentrifugieren des Homogenisates bei 18 000 g und 4 °C wurden die Bakterientrümmer sedimentiert. Der Überstand (= Zellextrakt) stand, nach Entnahme einer 50 μ L-Probe, die bei -20 °C gelagert wurde, für die Proteinaufreinigung mittels Affinitätschromatographie zur Verfügung.

3.2.6 Affinitätschromatografie

Das Prinzip der Affinitätschromatographie beruht darauf, Proteine auf der Basis einer reversiblen Interaktion - meist zwischen einem zusätzlich eingefügten Anhang (*tag*), wie einem Peptid oder Protein und einem spezifischen Liganden, welcher an eine chromatographische Matrix gebunden ist - zu trennen. Diese Art der Proteinaufreinigung bietet eine hohe Selektivität und Ausbeute für das zu untersuchende Enzym.

3.2.6.1 Proteinaufreinigung mittels immobilisierter Metallchelat-Affinitätschromatographie

Für die Ni-NTA-Affinitätschromatografie wird die Komplexbildung zweiwertiger, über den vierzähnigen Liganden Nitrilotriessigsäure (NTA) an die Matrix gebundener Metallionen mit Proteinen, die C- oder N-terminal mehrere aufeinander folgende Histidine aufweisen, genutzt. Die verwendeten Vektoren pQE30 und pRSETA enthalten upstream der eingefügten PfGDH Gene die Kodierung für einen Hexahistidyl-tag (His₆-tag), welcher durch seine reversible Bindung an die Ni²⁺-Ionen eine Aufreinigung der überexprimierten Proteine aus dem bakteriellen Rohextrakt ermöglicht. Der Vektor pET28a kann beliebig einen N- oder Cterminalen His-tag bereitstellen, wobei er in der vorliegenden Arbeit ausschließlich für eine N-terminale Fusion der Markerstruktur genutzt wurde. Die durchschnittliche Bindungskapazität des Trägermaterials liegt bei 5-10 mg Protein pro mL Säulenmaterial. Die Elution der gebundenen Proteine kann durch einen Wechsel des pH-Wertes, sowie einen Salzoder Imidazolgradienten erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Elution über die Zugabe steigender Konzentrationen an Imidazol erreicht.

3.2.6.2 Proteinaufreinigung mittels Glutathion-S-Transferase Fusionssystem

Das Glutathion-S-Transferase-Fusionssystem basiert auf induzierbarer Expression von Genfragmenten, die mit dem GST-Gen aus *Schistosoma japonicum* fusioniert sind [Smith & Johnson, 1988]. Bei der Genexpression in *E. coli* entstehen Proteine, die sich aus GST am N-Terminus und dem zu untersuchenden Protein am C-Terminus zusammensetzen. Das so erhaltene Zielprotein kann spezifisch und reversibel an die chromatographische Matrix gebunden werden, welche durch das natürliche Substrat der GST, Glutathion, gebunden an Sepharose, gebildet wird (Abb. 3.1). Die Proteinbindungskapazität dieses Materials wird mit bis zu 8 mg pro mL angegeben. Das Gen, welches für das Fusionsprotein aus hGDH1 und GST kodiert, wurde in dieses Vektorsystem kloniert und das Protein über folgendes Protokoll aufgereinigt.

Bindungspuffer	170 mM NaCl; 27 mM KCl; 18 mM KH ₂ PO ₄ ; 10 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,3
Cleavage-Puffer	50 mM Tris pH 7; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT
Elutionspuffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ pH 8; 300 mM NaCl; 10 mM reduziertes Glutathion
Phosphat-Puffer	50 mM Na ₂ HPO ₄ pH 8; 300 mM NaCl

Das Säulenmaterial wurde mit 10 mL Bindungspuffer bei einer Flussgeschwindigkeit von 1-1,5 mL/min equilibriert. Die Proteinlösung wurde aufgetragen und ungebundenes Protein mit 10 mL Bindungspuffer ausgewaschen. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit 10 mL Cleavage-Puffer gespült, um die Trennsäule unter ein für die *PreScission*TM-Protease geeignetes Puffersystem zu setzen. Die *PreScission*TM-Protease wurde auf die Matrix gegeben, um die Fusionsproteine, die auf der Säule gebunden haben, zu schneiden. Danach wurde diese über Nacht bei 4 °C gelagert. Um das Protein zu eluieren, wurde das Trägermaterial mit 2,5 mL Elutions-Puffer gespült. Da durch DTT, das im Cleavage-Puffer enthalten ist, eine Destabilisierung des Enzyms hervorgerufen werden könnte, wurde das Enzym sofort über eine Konzentrationseinheit (Centricon[®]) in Phosphat-Puffer umgepuffert und bei 4 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.



Abb. 3.1: Schema zur Proteinaufreinigung über GST-Sepharose-Säulen (nach Amersham Bioscience).

3.2.7 Abspaltung N-terminaler Aminosäurereste mittels Enterokinase

Die Enterokinase (EK) ist eine spezifische Protease, die nach der Aminosäure Lysin an der Erkennungssequenz Asp-Asp-Asp-Asp-Lys↓ spaltet. Diese Sequenz ist Teil des pRSETA-Vektors und befindet sich zwischen der *multiple cloning site* und dem Polyhistidin-*tag*.

Für die Behandlung der hGDH1 mit EK erfolgte zunächst die Aufkonzentrierung der gepoolten Imidazol-Fraktionen 100 mM, 125 mM und 150 mM. Zur Umpufferung wurde das Enzym gegen Enterokinase-Puffer dialysiert. Anschließend wurde die Proteinlösung mit Enterokinase versetzt und für 16 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.8 Abspaltung N-terminaler Aminosäurereste mittels Thrombin

Die Abspaltung des N-terminalen His-*tag* von der *Pf*GDH2 erfolgte mittels des Thrombin-Kits von Novagen. Die Schnittstelle für diese Endoprotease (Leu-Val-Pro-Arg↓Gly-Ser) wird innerhalb des pET28a Vektors zwischen der *multiple cloning site* (MCS) und dem 6xHis-*tag* kodiert. Das Abspalten des angehängten Peptids erfolgt jeweils nach einer Prolin-Arginin Abfolge und wird als hoch effizient angegeben. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden jeweils etwa 3-4 mg *Pf*GDH2 1:10 mit 10x Thrombin Cleavage Buffer und 1 µL Thrombin pro mg zu spaltendem Protein versetzt und 16 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend erfolgte die Trennung des Thrombins vom Zielprotein mittels Gelfiltration.

3.2.9 Präparative Gelfiltration

Bei der Gelfiltration können Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen molekularen Masse aufgetrennt werden, wobei größere Moleküle das Säulenmaterial schneller durchlaufen als kleinere.

Vor Beginn der Gelfiltration wurde die Säule mit 1 Säulenvolumen Reinstwasser gespült und anschließend mit entsprechendem Puffer äquilibriert. Danach wurde die nach der Affinitätschromatographie erhaltene Proteinlösung aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 1 mL/min, wobei Fraktionen von 2 mL gesammelt wurden.

Zur Regeneration wurde das Trennmaterial mit 120 mL Puffer und 300 mL Reinstwasser gespült. Um die Gelfiltrations-Säule lagern zu können, musste anschließend 20 %iges EtOH (v/v) auf die Säule gegeben werden. Die Zielfraktionen wurden mittels eines Aktivitätstests, eines SDS-Gels und einer Proteinbestimmung nach Bradford (s. Punkt 3.2.13) ermittelt, vereinigt und bei 4 °C gelagert.

3.2.10 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird verwendet, um ein Proteingemisch unter denaturierenden Bedingungen dem Molekulargewicht nach aufzutrennen. Als Träger dient hierbei ein hoch vernetztes Polyacrylamidgel. Die Proteine werden in eine Lösung aufgenommen, die SDS und Mercaptoethanol enthält. SDS ist ein negativ geladenes Detergens, welches Proteine denaturiert und durch seine hohe Ladungsdichte an der Oberfläche der entfalteten Proteine deren ursprüngliche Ladungseigenschaften überdeckt. Mercaptoethanol ist in der Lage, Disulfidbrücken innerhalb eines Proteins zu spalten. Während der Elektrophorese wandern die Proteine durch die Matrix in Richtung der positiven Elektrode, wobei sie der Größe nach getrennt werden. Kleinere Proteine bewegen sich schneller durch die Matrix als größere. Die Proteinmassen können mittels eines mitgeführten Proteingrößenstandards verglichen und bestimmt werden [Laemmli, 1970].

Nach Beendigung des Elektrophoresevorgangs wurden die Proteine durch Coomassie Brilliant Blue oder Silbernitrat angefärbt.

Acrylamidlösung	40 % (w/v) Acrylamid/Bisacrylamid (37, 5:1)		
Trenngelpuffer	1,5 M Tris pH 8,8		
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6,8		
Probenpuffer (4x)	250 mM Tris pH 6,8;		
(Laemmli-Puffer, reduzierend)	40 % (v/v) Glycerin; 8 % (v/v) Mercaptoethanol; 6 % (w/v)		
	SDS; 0,04 % (w/v) Bromphenolblau		
10x Laufpuffer	250 mM Tris; 1,9 M Glycin; 35 mM SDS		

Nachdem die Trenngellösung hergestellt war (s. Tab. 3.6), wurden APS und TEMED hinzugefügt, um die Polymerisation zu starten. Danach wurde die Lösung in die vorbereitete Gießapparatur für 4 Minigele eingefüllt, bis diese zu etwa 2/3 gefüllt war und mit 75 %-igem EtOH (v/v) überschichtet. Nach beendeter Polymerisation des Trenngels wurde das Ethanol vollständig entfernt und die Sammelgellösung gleichmäßig auf alle Gele verteilt. Unmittelbar nach dem Auffüllen der Sammelgellösung wurden die Kämme gesteckt. Nachdem das Sammelgel polymerisiert war, konnten die Gele direkt verwendet oder in feuchten Tüchern für etwa 2-4 Wochen bei 4 °C aufbewahrt werden.

Tab. 3.6: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Gels.

	Trenngel	Sammelgel
	(10 % Acrylamid)	(4 % Acrylamid)
Acrylamid-/Bisacrylamidlösung	4 950 μL	650 μL
Trenngelpuffer	3 750 μL	
Sammelgelpuffer		1 250 μL
10 % SDS	150 μL	50 µL
ddH ₂ O	6 250 μL	3 050 μL
10 % APS	75 μL	25 μL
TEMED	7,5 μL	5 μL

Die zu bestimmenden Proteinproben wurden mit je 5 μ L Laemmli-Probenpuffer versetzt, für fünf Minuten bei 95 °C inkubiert und kurz zentrifugiert. Es wurden jeweils 10 μ L des

Größenstandards und eine jeweils unterschiedliche Menge (10-20 μ L) der Proben auf das Gel aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde zunächst 15 min bei 80 V und anschließend etwa 60 min bei 200 V durchgeführt, bis die Lauffront am unteren Ende des Gels vollständig ausgetreten war. Bei Durchführung einer nativen PAGE wurde SDS sowohl beim Gießen des Gels als auch im Laufpuffer nicht hinzugefügt.

3.2.11 Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamid-Gelen

Färbelösung	30 % (v/v) Isopropanol; 10 % (v/v) Eisessig; 0,1 % (w/v) Coomassie Brillant Blue R
Entfärbelösung	5 % (v/v) Ethanol, 7 % (v/v) Essigsäure

Das SDS-Gel wurde in der Färbelösung kurz aufgekocht und für etwa 20 Minuten bei RT geschwenkt. Die Proteinbanden wurden dadurch sichtbar gemacht, dass die nicht proteinhaltigen Bereiche des Gels durch mehrmaliges Wechseln der Entfärbelösung entfärbt wurden. Anschließend wurde das SDS-Gel digitalisiert und gegebenenfalls zur weiteren Aufbewahrung getrocknet.

3.2.12 Immunochemischer Proteinnachweis mittels Western Blot

Beim Western Blot-Verfahren werden Proteine, die zuvor durch eine SDS-PAGE der Größe nach aufgetrennt wurden, elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran transferiert, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt. Auf der PVDF-Membran können anschließend, durch immunologische Reaktionen, Proteine spezifisch nachgewiesen werden.

Anodenpuffer I	0,3 M Tris pH 10,4
Anodenpuffer II	25 mM Tris pH 10,4
Kathodenpuffer	40 mM 6-Aminohexansäure
TBS-Tween	10 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05 % (v/v) Tween 20
Ponceau-S	0,1 % Essigsäure, 3 % Sulfosalicylsäure, 0,2 % Ponceau
Anti-His ₆ -Antikörper (mouse)	1:1 000 verdünnt
Anti-PfGDH1-Antikörper (rabbit)	1:5 000 verdünnt
Anti-PfGDH2-Antikörper (rabbit)	1:5 000 verdünnt
Anti-Mouse/Goat/Rabbit-HRP Antikörper	1:10 000 (1:20 000) verdünnt

Der Proteintransfer vom SDS-Gel auf die PVDF-Membran erfolgte durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld im "*semi-dry*"-Verfahren. Jeweils 2 bis 5 Blätter Gel-Blotting Papier GB002 wurden in den entsprechenden Puffern angefeuchtet. Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol und anschließend in Anodenpuffer II geschwenkt. Das SDS-Gel wurde kurz vor dem Blotvorgang mit dem Kathodenpuffer befeuchtet. Alle Schichten wurden luftblasenfrei aufeinander gelegt und die Apparatur mit 0,5 kg Gewicht beschwert (s. Abb. 3.2). Der Blotvorgang für ein Gel erfolgte über einen Zeitraum von 55 min bei 0,8 mA/cm² Gel.

Anode	
3x Gel-Blotting Papier in Anodenpuffer I	
2x Gel-Blotting Papier in Anodenpuffer II	
PVDF-Membran	
SDS - Gel	
5x Gel-Blotting Papier in Kathodenpuffer	
Kathode	

Abb. 3.2: Anordnung der einzelnen Komponenten während des Blotvorgangs.

Nach dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran mit der Ponceau-Lösung angefärbt und nach mehrmaligem Waschen mit TBS-Tween in einer Lösung mit 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-Tween für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C geschwenkt, wodurch überzählige Proteinbindungsstellen der Membran abgesättigt wurden. Dann wurde 3 x je 10 Minuten schüttelnd mit TBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 Stunde mit einem spezifischen Anti-His₆-Antikörper (oder entsprechend anderem spezifischen Antikörper) inkubiert. Nach 3 x 10 min waschen mit TBS-Tween erfolgte die Inkubation mit einem zweiten Antikörper, der Peroxidase-gekoppelt war. Ein mit Peroxidase markierter Antikörper ermöglicht einen Nachweis der Proteine mittels ECL-Reaktion [Gültekin & Heerman, 1988]. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol und löst damit Chemolumineszenz aus. Die Detektion des Lichtsignals und damit auch der Proteinbanden erfolgte nach Inkubation der Membran mit 1 mL Luminol + 10 μ L Cumarinsäure durch das Auflegen eines Röntgenfilms.

3.2.13 Proteinbestimmung nach Bradford

Bei der Bindung von Coomassie Brilliant Blue an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe (465 nm ohne Protein zu 595 nm mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinmenge in der Lösung [Bradford, 1976] (s. Abb. 3.3). Die Proteinbestimmung nach Bradford stellt somit eine Möglichkeit der quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration dar.



Abb. 3.3: Absorptionsspektrum für Coomassie Brilliant Blue ohne (CB) und mit Protein (CB-Protein-Komplex) [www.courses.rochester.edu, 2005].

3SA-Standards	1/ 2,5/ 5/ 7,5/ 10/ 15/ 20 μ g/mL in ddH ₂ O
---------------	---

Um in unterschiedlichen Proteinlösungen die Proteinmenge bestimmen zu können, ist es zunächst notwendig, anhand einer BSA-Standardreihe eine Kalibrierkurve zu erstellen. Dazu wurden jeweils 5 μ L der jeweiligen BSA-Standardlösung, aber auch 5 μ L der zu bestimmenden Proteinlösung mit 495 μ L ddH₂O verdünnt. Sowohl der Leerwert (ddH₂O) als auch die vorgelegten Proteinlösungen wurden dann mit jeweils 125 μ L Bradfordreagenz versetzt und gut gemischt. Nach fünfzehnminütiger Inkubation bei RT wurde die Absorption in Halbmikro-Küvetten bei einer Wellenlänge von 595 nm mittels Photometer bestimmt.

3.2.14 Untersuchung der Enzymfunktion

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten GDH verwenden als physiologischen Elektronenakzeptor NAD(P)H. Die Untersuchung unterschiedlicher enzymkinetischer Parameter erfolgte basierend auf dem optischen Test nach Otto Warburg. Hierbei kann die Umsetzung von NAD(P)⁺ zu NAD(P)H photometrisch bei 340 nm verfolgt werden. Bei einer Wellenlänge von 340 nm absorbieren ausschließlich die reduzierten Nicotinamidadenindinucleotide NADH und NADPH Licht, nicht jedoch die oxidierten Formen NAD⁺ und NADP⁺.

Reaktionspuffer (PfGDH1-3)	100 mM KH ₂ PO ₄ (pH 7/pH 8); 1 mM EDTA
Substrate (PfGDH 1+2)	10 mM Glutamat, 100 μ M NADP ⁺ in Reaktionspuffer pH 8,0;
	100 μ M NADPH, 10 mM α -Ketoglutarat, 40 mM NH ₄ Cl in
	Reaktionspuffer pH 7,0
Reaktionspuffer (hGDH)	50 mM TEA pH 8,0; 1 mM EDTA
Substrate (hGDH)	20 mM Glutamat; 1,4 mM NAD(P) ⁺ ; 150 µM NAD(P)H; 8 mM
	α -Ketoglutarat; 100 mM NH ₄ Cl in Reaktionspuffer

Für die Aktivitätsbestimmung in Richtung der Desaminierung von Glutamat (Hinreaktion) wurden 0,1 mM NADP⁺ und 10 mM Glutamat (oder entsprechend der oben aufgeführten Angaben für die unterschiedlichen Enzyme), d. h. im Substratsättigungsbereich, eingesetzt. Die Standardreaktion in Richtung der Glutamatbildung (Rückreaktion) fand für die *Pf*GDH1 und die *Pf*GDH2 unter Anwesenheit von 0,1 mM NADPH, 10 mM α -Ketoglutarat und 40 mM Ammoniumchlorid statt. Für die enzymkinetischen Untersuchungen der hGDH sowie der *Pf*GDH3 wurde jeweils NAD⁺ als Elektronenakzeptor verwendet. Die Aktivität der Enzyme wurde über die Entstehung von NAD(P)H in der Hin- oder dessen Abnahme in der Rückreaktion, über einen Zeitraum von 60 s bei einer Wellenlänge von 340 nm und 25 °C bestimmt. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter der *Pf*GDH2 wurde jeweils die Konzentration eines Substrates variiert, während die übrigen Parameter konstant gehalten wurden. Die Messungen erfolgten jeweils als 0,5 mL-Testansatz in Halbmikro-Küvetten im UV-Vis-Spektrophotometer. Um die spezifische Aktivität der Proben berechnen zu können, wurde die nach Bradford bestimmte Proteinkonzentration jeder verwendeten Probe zugrunde gelegt. Für die Berechnung der spezifischen Aktivität dienten folgende Gleichungen:

$$Volumenaktivität(VA) = \frac{\Delta A / \min \times V}{\varepsilon \times d \times \Delta t \times vi} [U / ml]$$

spezifische Aktivität =
$$\frac{VA [U/ml]}{mg \text{ Protein}}$$

Gleichung 3.1: Berechnung der Volumenaktivität und der spezifischen Aktivität. ($\Delta A =$ Absorptionsänderung; d = Schichtdicke der Küvette = 1 cm; V = Volumen in der Küvette in mL; vi = Enzymlösung im Ansatz in mL; $\Delta t =$ Zeitänderung; $\epsilon =$ Absorptionskoeffizient der einzelnen Elektronenakzeptoren - ϵ_{340} (NAD(P)H) = 6200 (mol/l)⁻¹ cm⁻¹).
Weiterhin wurden die K_m-, V_{max}-, k_{cat}- und k_{cat}/K_m-Werte bestimmt. Die Michaelis-Konstante K_m charakterisiert die Affinität eines Enzyms zu seinem Substrat (Gleichung 3.2). Sie entspricht derjenigen Substratkonzentration, bei der die Hälfte der maximalen Umsatzgeschwindigkeit V_{max} erreicht wird. Aus den Geradengleichungen der Diagramme der Linearisierungen nach Lineweaver-Burk, Eadie-Hofstee und Hanes (-Woolf) wurden die K_m- und V_{max}-Werte bestimmt (Gleichung 3.3-3.5).

$$v = V_{\max} \times \left[\frac{[E]}{(K_m \times [S])} \right] \qquad \qquad K_m [S] = \frac{1}{2} V_{\max} \qquad \qquad \text{Michaelis-Menten}$$
$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}} \qquad \qquad \qquad x = -1/K_m, \ y = 1/V_{\max} \qquad \qquad \text{Lineweaver-Burk}$$

$$v = -K_m \times \frac{v}{[S]} + V_{max}$$
 $x = V_{max}/K_m, y = V_{max}$ Eadie-Hofstee

$$\frac{[S]}{v} = \frac{1}{V_{\text{max}}} \times [S] + \frac{K_m}{V_{\text{max}}} \qquad \text{x} = -K_m, \text{ y} = K_m/V_{\text{max}} \qquad \text{Hanes (-Woolf)}$$

Gleichungen 3.2-3.5: Berechnung der Michaelis-Konstante und Linearisierungsverfahren zur Berechnung des V_{max} -Wertes. (S = Substratkonzentration; V_{max} = maximale Umsatzgeschwindigkeit; v = Umsatzgeschwindigkeit; K_m = Michaeliskonstante (mol/l); E = Enzym).

Ebenso können über den auf diese Weise erhaltenen V_{max} -Wert die spezifische Aktivität sowie der k_{cat} -Wert ermittelt werden. K_{cat} , auch als Wechselzahl des Enzyms definiert, gibt die Anzahl von Substratmolekülen an, die pro Enzymmolekül unter Substratsättigung pro Zeiteinheit in das Produkt umgewandelt werden (Gleichung 3.6). Darüber wurde weiterhin der Quotient k_{cat}/K_m berechnet, der die Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym beschreibt und ein Maß für die katalytische Effizienz darstellt [Stryer, 2003].

$$k_{cat} = \frac{V_{\max} \left[\mu mol / ml \right]}{[E][\min \times ml \times \mu mol]}$$

Gleichung 3.6: Berechnung des k_{cat} **-Wertes.** (S = Substratkonzentration; V_{max} = maximale Umsatzgeschwindigkeit; v = Umsatzgeschwindigkeit; K_m = Michaeliskonstante (mol/l); E = Enzym).

3.2.15 Untersuchung der Enzymaktivität in Gegenwart von Wirkstoffen

Verschiedene Wirkstoffe der Hans-Knöll-Substanzbibliothek (Jena) wurden getestet. Dafür wurde der bereits beschriebene Enzymassay entweder in Halbmikroküvetten oder in Mikrotiterplatten in modifizierter Weise durchgeführt. hier Auch wurde im Substratsättigungsbereich gearbeitet. Für das initiale Screening wurde jeweils 1 µL der Wirkstoffe eingesetzt, die in einer Konzentration von 5 mg/mL in DMSO vorlagen. Mit den Wirkstoffen, die in ausreichender Menge vorhanden waren, wurden die Messungen mindestens dreifach durchgeführt. Als Kontrollreaktion wurde jeweils an Stelle des Wirkstoffes, Reaktionspuffer oder DMSO zum Testansatz gegeben. Die ungehemmte Reaktion wurde 100 % gesetzt und alle weiteren Angaben darauf bezogen.

3.2.16 Lokalisationsstudien mit dem green fluorescent protein

Das grün fluoreszierende Protein (GFP; engl. *green fluorescent protein*) ist ein erstmals 1961 beschriebenes Protein aus der Qualle *Aequorea victoria* [Shimomura *et al.*], das bei Anregung mit blauem oder ultraviolettem Licht grün fluoresziert. Als Fusionsprotein mit den zu untersuchenden Proteinen kann es in eukaryotische Zellen transfiziert werden. Tragen die Zielproteine Transportsequenzen für ein bestimmtes Zellkompartiment, kann dort über die Emission des grünen Lichtes und eine Co-Lokalisation Kompartiment-spezifischer Proteine über Immunfluoreszenz, eine Lokalisation der Fusionsproteine erfolgen. Das Emissionsspektrum von GFP hat sein Maximum bei 509 nm.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudien wurden zunächst die ersten 66 N-terminalen Aminosäuren (198 bp) aller drei *Pf*GDH aus der cDNA amplifiziert und in den pGEM-Vektor kloniert. Alle dafür verwendeten *sense*-Primer trugen eine *Bgl*II Schnittstelle, während die *antisense*-Primer für eine *Avr*II (*Xmaj*I) Schnittstelle kodierten. Die daraus resultierenden PCR-Produkte wurden anschließend in einen pSK Vektor kloniert, welcher bereits das GFP-Gen *downstream* der eingefügten *Pf*GDH-Gene enthielt. Nach der Sequenzierung der Konstrukte erfolgte die Ligation in den pARL-1a Vektor über *Xho*I. Die Transfektion wurde am Plasmodien-Stamm 3D7 mittels Elektroporation vorgenommen. Dazu wurde jeweils eine 15 mL Parasiten-Kultur mit je 5-8 % Parasitämie im jungen Ringstadium (ca. 6 Stunden alt) angezogen. 100-200 µg der DNA wurden mit Cytomix-Puffer auf ein Endvolumen von 400 µL gemischt. Es wurden 5 ml der Kultur bei 1 500 g für fünf Minuten abzentrifugiert und 200 µL der erhaltenen parasitierten Erythrozyten mit der DNA-Cytomix-Lösung vermischt. Die Suspension wurde in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette steril

überführt. Anschließend erfolgte die Elektroporation bei 310 V, 550 F, einem unendlichen Widerstand und einer Zeitkonstante von etwa 13 ms im Elektroporator (BioRad X-Cell). Die transfizierten Parasiten wurden sofort in 15 mL frisches und vorgewärmtes Medium mit 3,5 % Erythrozyten überführt. Sechs Stunden nach der Transfektion wurden jeweils 5 nM WR99210 als Selektionsmarker hinzugegeben. Das Medium wurde täglich gewechselt und wöchentlich 100 μ L frische Erythrozyten zugesetzt.

Die Lokalisation der GFP-Konstrukte wurde in Zusammenarbeit mit der AG Lingelbach, Philipps-Universität Marburg, von Dr. Jude Przyborski durchgeführt. Die Zellen wurden in 4 % Paraformaldehyd/0,0075 % Glutaraldehyd in PBS pH 7,4 nach Tonkin *et al.* [2004] 30 Minuten bei 37 °C fixiert. Die Fluoreszenzlöschung (Quenching) erfolgte durch Zugabe von 100 mM Glycin/PBS. Zur Markierung des Nucleus wurde der DNA-bindende Farbstoff Hoechst (50 ng/mL) und zur Lokalisation des Apicoplasten als primärer Antikörper anti-ACP (1:500) verwendet. Cy2- und Cy3-konjugierte sekundäre Antikörper wurden 1:2 000 eingesetzt. Die Aufnahmen erfolgten an einem Zeiss Axio Observer (*inverse epifluorescence*) Mikroskopsystem.

3.3 Kristallographische Methoden

3.3.1 Kristallisation der *Pf*GDH2

Die Kristallisationsversuche wurden begonnen, nachdem das Protein zur bestmöglichen Homogenität gereinigt worden war.

Zwei häufig zur Proteinkristallisation angewendete Techniken sind die zur Dampfdiffusion gehörende "hanging drop"- und "sitting drop"-Technik, deren Prinzip in Abbildung 3.4 dargestellt ist. Bei der in der vorliegenden Arbeit verwendeten "hanging drop"-Methode wird die Proteinlösung als kleiner Tropfen auf ein Deckgläschen gegeben und in einem bestimmten Verhältnis mit der schon vorgelegten Reservoirlösung gemischt. Danach wird die Vertiefung mit dem Deckglas und Silikonöl luftdicht verschlossen. Anfangs enthält der vorgelegte Tropfen eine geringere Konzentration des Fällungsmittels (Präzipitans) als die Reservoirlösung, wodurch es zu Dampfdiffusion kommt. Entweder diffundieren aus dem Tropfen stetig kleine Mengen Wasser, welche in die Reservoirlösung übergehen oder Präzipitans diffundiert in die Proteinlösung, wodurch jeweils die Konzentration des Fällungsmittels im Tropfen ansteigt. Dies geschieht solange, bis sich ein Gleichgewicht

zwischen dem Tropfen und der Reservoirlösung eingestellt hat. Unter systematisch variierten Bedingungen wird dann versucht herauszufinden, welches Gleichgewicht ein Optimum für die Proteinkristallisation darstellt [Rhodes, 1993; McRee, 1993].



Abb. 3.4: Darstellung der Kristallisationsmethoden "hanging drop" (A) und "sitting drop"(B)

Kristallisationskits	Crystal Screen I&II TM , Detergent Screen (Hampton Research)
Substrat	10 mM Glutamat in Reaktionspuffer pH 7,0
Detergentien	β-D-Octylglucopyranosid

Zum Auffinden initialer Kristallisationsbedingungen ist es nötig, einen multidimensionalen Parameterraum durch sogenannte *screens* punktuell durchzutesten [Cudney *et al.*, 1994]. Dabei wird zwischen bifaktoriellen *grid screens* und multifaktoriellen *sparse matrix screens* unterschieden. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein multifaktorielles Testverfahren mit dem Crystal Screen I&II durchgeführt, welcher Lösungen mit einer großen Variationsbreite an pH-Werten, Fällungsmitteln und -konzentrationen, sowie zusätzlichen Additiven, wie Salzen und organischen Molekülen, umfasst. Mit einer Proteinkonzentration von 16 mg/mL (nach wiederholter Einengung über Centricons) und bei einer Temperatur von 18 °C wurde versucht, Kristalle der *Pf*GDH2 zu erhalten. Der Kristallisationstropfen, bestehend aus 2 μ L Proteinlösung und 2 μ L Reservoirlösung, wurde gegen 800 μ L Reservoirlösung, in Linbro Kulturplatten mit 24 Kammern, äquilibriert. Zuvor wurde die Proteinlösung mit Glutamat in einer Endkonzentration von 10 mM versetzt.

3.3.2 Röntgenkristallographische Untersuchungen

Nach erfolgreicher Kristallisation wurden die Kristalle zunächst wenige Sekunden in Cryo-Puffer (0,1 M TRIS/HCl pH 8,5; 0,2 M Magnesiumchlorid Hexahydrat; 30 % PEG4000; 5 mM Glutamat, 20 % MPD; 1 % n-octyl-ß-D-Glucopyranosid und 24 % Glycerin) inkubiert und danach umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Um Kristalle von biologischen Makromolekülen unbeschadet einfrieren zu können, muss die Bildung von kristallinem Eis im Kristallwasser und in der den Kristall umgebenden Mutterlauge unterdrückt werden. Dazu werden der Mutterlauge geeignete Frostschutzmittel wie z. B. Glycerol oder Polyethylenglycol (PEG) zugesetzt [Garman und Schneider, 1997]. Zur initialen Charakterisierung der Kristalle, d. h. Bestimmung der Raumgruppe und Größe der Einheitszelle, wurden diese in einen fokussierten Röntgenstrahl einer Drehanode am Rigaku, MicroMax-007HF (MPI, Heidelberg) gebracht. Auch während der Messung wurden die Kristalle ständig mit Stickstoff auf 100 K gekühlt, da diese empfindlich auf die durch die Röntgenstrahlung erzeugte Wärme reagieren. Die experimentelle Messanordnung zur Röntgenbeugung besteht aus einer Röntgenstrahlungsquelle, sowie einem Detektor zur Messung der gebeugten Röntgenstrahlen. Im Labor werden die Röntgenstrahlen von einem Drehanodenröntgengenerator erzeugt, der mit einer Kupferanode ausgestattet ist. Die Wellenlänge dieser Röntgenstrahlen beträgt 1,54 Å (Kupfer-K_a-Strahlung). Für die Aufnahme des benötigten kompletten Datensatzes wurden die Kristalle am Synchrotron vermessen. Die Synchrotronstrahlung hat den Vorteil, dass sie wesentlich intensiver ist und so den Einsatz von sehr kleinen Kristallen erlaubt. Es kann hier eine beliebige Wellenlänge im Bereich von circa 0,2-4,0 Å verwendet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Beugungsdaten wurden im Drehkristallverfahren [Arndt und Wonacott, 1977] gemessen und mit monochromatischer Synchrotronstrahlung der Wellenlänge 0,97932 Å am Messplatz X06SA des Paul Scherrer Instituts (PSI; Villigen, Schweiz) mit einer Rotation von 0,7 Grad pro Bild auf einem CCD Detektor (MARCCD) aufgenommen.

3.3.3 Prozessierung der Rohdaten und molekularer Ersatz

Die erhaltenen Rohdaten wurden mit dem Programmpaket XDS [Kabsch, 2010] prozessiert. Auf Grund sich ändernder Bedingungen im Verlauf einer Datensammlung (schwankende Intensität des Röntgenstrahls, Absorption, veränderte Streukraft des Kristalls durch Strahlenschäden), müssen die erhaltenen Intensitäten intern skaliert werden. Für die Skalierung der Intensitäten wurde das Programm XSCALE [Kabsch, 2010] verwendet. Anschließend wurden die skalierten Daten auf die asymmetrische Einheit des reziproken Raumes der Raumgruppe reduziert. Diese Strukturfaktoren wurden aus den skalierten Intensitäten mit dem Programm XDS CONV [Kabsch, 2010] berechnet. Die Struktur der *Pf*GDH2 wurde mit der Methode des molekularen Ersatzes gelöst (s. Punkt 1.5). Für die Einzelschritte der Phasenlösung wurden die entsprechenden Routinen des Programmpaketes CNS [Brünger *et al.*, 1998] verwendet.

3.3.4 Erstellung und Verfeinerung des Strukturmodells

Ausgehend von der Elektronendichtekarte, die aus einer Kombination der durch molekularen Ersatz bestimmten Phasenwinkel und den gemessenen Strukturfaktoramplituden berechnet wurde, konnte ein erstes Strukturmodell der *Pf*GDH2 erstellt werden. Modellbau und manuelle Anpassung der Struktur des Enzyms an die Elektronendichteverteilung wurden mit Hilfe des Programms O [Jones *et al.*, 1991] durchgeführt und erfolgten im Wechsel mit der Verfeinerung des Modells. Dabei wurden unter anderem die im Folgenden aufgeführten Elektronendichtekarten verwendet.

(2F_{obs}-F_{calc})-Elektronendichtekarten

• zeigen die Elektronendichte des Modells und die Differenzdichte in voller Höhe und werden auf einem Konturniveau von 1 σ dargestellt.

(Fobs-Fcalc)-Elektronendichtekarten (Differenz-Fourierkarten)

- zeigen Unterschiede zwischen Modell und tatsächlicher Struktur auf. Fehlende Bereiche des Modells erscheinen mit positiver Differenzdichte, falsch positionierte mit negativer. Die Differenzen erscheinen mit halber tatsächlicher Höhe und sind ab einem Konturniveau von drei Standardabweichungen (3 σ) der durchschnittlichen Elektronendichte signifikant.
- dienen als Basis f
 ür die Korrektur und Erg
 änzung des Proteinmodells sowie f
 ür den Einbau von Wassermolek
 ülen oder Liganden.

Prinzipiell lassen sich Modelle nur dann verfeinern, wenn die Zahl der Observablen (Röntgenreflexe) die der zu verfeinernden Parameter übersteigt. Da diese Zahl jedoch durch Auflösungsgrenze, Vollständigkeit und Raumgruppe des Kristalls beschränkt ist, müssen meist noch weitere Nebenbedingungen eingeführt werden. Beispielsweise können Einschränkungen der Werte (*restraints*), die freie Parameter annehmen dürfen, als zusätzliche Observablen dienen. So werden bei der Verfeinerung von Proteinstrukturen unerschiedlich gewichtete Einschränkungen für die geometrischen Parameter des Modells eingeführt [Engh & Huber, 1991] und die Temperaturfaktoren benachbarter Atome aneinander gekoppelt, um übermäßige Schwankungen innerhalb kurzer Distanzen zu vermeiden. Zudem kann die Ähnlichkeit durch nicht-kristallographische Symmetrie (NCS) verknüpfter Moleküle berücksichtigt werden.

Für die automatische Verfeinerung und die Erstellung der Elektronendichtekarten wurden auch hier die entsprechenden Routinen des Programmpaketes CNS genutzt. Ziel der Verfeinerung ist es, durch eine Variation der Modellparameter die Übereinstimmung der berechneten Strukturfaktoramplituden (F_{calc}) mit denen der gemessenen Reflexe (F_{obs}) zu maximieren. Ein Maß der Übereinstimmung ist der kristallographische R-Faktor R_{cryst} (Gleichung 3.7). Laut Wilson [1949] besitzt eine Zufallsstruktur bereits einen R-Faktor von etwa 59 %, wohingegen erfolgreich verfeinerte Röntgenstrukturen einen R-Faktor zwischen 10 und 25 % aufweisen. Mit einem kleinen, zufällig ausgewählten Teil der Reflexe, dem Testdatensatz (etwa 5-10 % aller Reflexe), der nicht in die Verfeinerung mit einbezogen wird, wird in Analogie zum kristallographischen R-Faktor der freie R-Faktor R_{free} berechnet [Brunger, 1992]. Der freie R-Faktor korreliert mit dem mittleren Fehler der Modellphasen und dient daher als Maß für den Fortschritt der Verfeinerung [Kleywegt & Brunger, 1996].

$$R_{cryst} = \frac{\Sigma |F_{obs}(hkl) - F_{calc}(hkl)|}{\Sigma F_{obs}(hkl)} \times 100$$

Gleichung 3.7: Berechnung des kristallographischen R-Faktors R_{cryst} (wobei die Summe über alle Symmetrie-unabhängigen Reflexe hkl läuft).

3.4 Computergestützte Methoden

3.4.1 Homology Modelling

Die zuverlässigste Methode für die theoretische Vorhersage der Geometrie von Proteinstrukturen ist das *Homology Modelling*. Die allgemeine Vorgehensweise zur Modellierung von Proteinstrukturen ist in Abb. 3.5 dargestellt.





Abb. 3.5: Vorgehensweise für die Generierung von Proteinmodellen [nach Hartmann, 2002].

Suche homologer Proteine und multiples Sequenzalignment

Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Glutamat-Dehydrogenasen der verwendeten Organismen wurden der Online-Datenbank für Protein-Sequenzen SwissProt/TrEMBL des ExPASy (*Expert Protein Analysis System*)-Proteomics Server des Schweizer Institutes für Bioinformatik (SIB) entnommen [http://expasy.org].

Eine Datenbanksuche nach homologen Sequenzen für die Aminosäuresequenz der GDH2 aus *P. falciparum* erfolgte über BLAST und die Suche nach homologen Proteinen, deren Struktur bereits gelöst ist, wurde mit der Online-Suchfunktion der *Research Collaboratory for Structural Bioinformatics* (RCSB) Proteindatenbank [http://www.rcsb.org] durchgeführt.

Ein multiples Alignment und paarweise Überlagerungen aller ausgewählten homologen Enzyme wurde mit den Online-Programmen CLUSTAL W [Thomson *et al.*, 1994] und T-COFFEE [Notredame, 2000] des EMBL-EBI (*European Molecular Biology Laboratory – European Bioinformatics Institute*) [http://www.ch.EMBnet.org] erstellt.

Zur Beurteilung der erhaltenen multiplen Alignments wurde das Programm AMAS (*Analyse Multiply Aligned Sequences*) [Livingstone, 1993] eingesetzt.

Homologiemodellierung

Zur Entwicklung eines Strukturmodells für die GDH2 aus *Plasmodium falciparum* wurde das Programmpaket SWISS MODEL [Schwede *et al.*, 2003; http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html] verwendet. Die Vorbereitung des Homologieprojekts erfolgte lokal über das als Web-Interface dienende Programm SWISS-PDB VIEWER. Zu Beginn wird dem Programm eine Referenzstruktur in Form eines aus der Brookhaven Protein Data Bank (PDB) stammenden Moleküls, dessen Kristallstruktur bekannt ist, vorgegeben, auf dessen Grundlage das Zielprotein modelliert werden soll. Auch die Vorgabe mehrerer Moleküle (bis zu fünf verschiedene) ist möglich. Als Referenzstruktur können alle Proteine verwendet werden, deren Aminosäuresequenzen einen FastA-Score von 10 der Standardabweichung oberhalb der randomisierten Punkte aufweisen. Die Aminosäuresequenz des modellierenden Proteins wird im FastA-Format zu eingelesen und ein Aminosäurensequenz-Vergleich der beiden oder der verschiedenen Sequenzen erzeugt. Danach erfolgt ein vorläufiger Aufbau der Rückgratstruktur des Zielproteins basierend auf der Lokalisation des entsprechenden Atoms in der Vorlage. Während dieses Vorgangs erfolgt auch eine paarweise strukturelle Überlagerung der beiden (oder mehr) Moleküle [Peitsch, 1996]. Das zuvor erstellte Sequenzalignment wird nun durch das manuelle Einfügen von Insertionen und Deletionen, die die Grundlage für in der Vorlage nicht vorhandene Schleifenstrukturen bilden, den Ergebnissen aus dem multiplen Sequenzvergleich angepasst. Dies ist bei Proteinen, die eine geringere Aminosäuresequenz-Identität von weniger als 40 % aufweisen, stets notwendig. Das erarbeitete Modell wird mit Hilfe eines Internetformulars an den Server übermittelt, wo jetzt die rechenintensiven Schritte der Optimierung und Minimierung mit dem GROMOS96-Kraftfeld [Van Gunsteren, 1996] durchgeführt werden. Für die Proteinseitenketten, für die keine Strukturinformationen aus der Kristallstruktur-Vorlage existieren, werden durch Erzeugen aller möglichen Rotamere, mit Hilfe eines Vander-Waals-Ausschluss-Tests die sterisch günstigsten ausgewählt.

In den PDB-Dateien sind nicht notwendigerweise die Koordinaten aller Aminosäuren oder Atome der Proteinkristallstruktur enthalten, da bei der Röntgenstrukturbestimmung eventuell eine Elektronendichte ermittelt wurde, die in bestimmten Bereichen nicht ausreichend gut definiert ist. Dies kann durch eine hohe Flexibilität in einigen Bereichen des Proteins verursacht werden. Für diese Bereiche muss im Rahmen der Berechnungen des Strukturmodells eine plausible Geometrie angenommen werden. Das berechnete Modell wird per e-Mail vom Server zurückgesandt und kann mit einem empirischen Paarpotential [Bajorath, 1993; Sippl, 1993] und einer Verteilung der Torsionswinkel analysiert werden.

Bestimmte strukturelle Aspekte eines Proteinmodells können mit einem inversen Faltungsansatz überprüft werden, wobei die Wahrscheinlichkeit berechnet wird, mit der ein Aminosäurerest in einer bestimmten Nachbarschaft mit anderen Resten anzutreffen ist. Dieser Wert wird mit den empirisch ermittelten Ergebnissen von Eisenberg *et al.* [1992] für verschiedene Umgebungen verglichen [Luthy, 1992]. Ein anderer Ansatz, ProsaII, basiert auf

empirischen Energiepotentialen, die von paarweisen Interaktionen in gut definierten Proteinstrukturen abgeleitet wurden [Sippl, 1993]. Diese Werte werden für alle Reste des Proteins aufsummiert und resultieren in einer mehr oder weniger guten Energiebewertung.



Abb. 3.6: Torsionswinkel des Proteinrückgrats; phi (φ), psi (ψ) und omega (ω).

Die Rotationen, die um die N-C_{α}- und C_{α}-C-Bindungen des Rückgrats einer Polypeptidkette möglich sind, stehen in Abhängigkeit zu den Torsionswinkeln phi und psi. In natürlichen Proteinen werden nur bestimmte Winkelkombinationen beobachtet, die einem so genannten Ramachandran-Plot (s. Abb. 3.7) entnommen werden können. Ein Vergleich der modellierten Struktur mit den empirisch ermittelten Wertebereichen liefert Bewertungskriterien, die beurteilen lassen, inwiefern Unvereinbarkeiten des Faltungsmusters mit der Struktur in lokalen Bereichen vorliegen.

Die Genauigkeit des Modells hängt im Wesentlichen von der Richtigkeit des Sequenzalignments ab, welches wiederum stark durch das Ausmaß der Sequenzidentität bestimmt wird.



Abb. 3.7: Ramachandran-Plot. Faltungsmotive in Abhängigkeit der Torsionswinkel phi (ϕ) und psi (ψ). Dunkelblauer Bereich um α : zulässige Winkelkombinationen in α -Helices; dunkelblauer Bereich um β : zulässige Winkelkombinationen in β -Faltblättern. Die hellblauen Bereiche geben Winkelkombinationen an, die unter Umständen toleriert werden können [http://biophysics.biol.uoa.gr].

Visualisierung der erhaltenen Modelle

Die Visualisierung der erzeugten Strukturen erfolgte mit dem SwissPdb-Viewer [www.expasy.org/spdbv] oder PyMOL [DeLano, 1997].

3.4.2 Docking

Zwei Aspekte sind für ein erfolgreiches strukturbasiertes Wirkstoffdesign von enormer Bedeutung: (i) das Generieren von möglichst relevanten Protein-Liganden-Konfigurationen (*docking*) und damit das Identifizieren der Bindungsmodi, die am besten mit den experimentell ermittelten Ergebnissen übereinstimmen, und (ii) die ungefähre Vorhersage der Bindungsaffinität, die aus der erzeugten Geometrie des Protein-Ligand-Komplexes (*scoring*) abgeleitet wird [Evers, 2003].

Ziel des *Docking* ist die Berechnung von nicht kovalenten Protein-Ligand-Komplexen, wobei Informationen über die 3D-Struktur des Proteins vorgegeben werden und Liganden mit bekannter Topologie in diese Struktur eingepasst werden (sog. *Docking*-Problem).

Einen umfangreichen Überblick über *Docking*-Algorithmen und -Programme haben Sotriffer *et al.* [2002] und Halperin *et al.* [2002] herausgegeben.

Im Folgenden wird das *Docking*-Programm GOLD näher beschrieben, das in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde.

GOLD

Das Programm GOLD (*Genetic Optimisation for Ligand Docking*) ist ein automatisches Liganden-*Docking*-Programm, das einen genetischen Algorithmus (GA) nutzt, der auf einem 1995 von Jones *et al.* beschriebenen Algorithmus basiert. Genetische Algorithmen stellen eine Klasse von Rechenverfahren dar, die eine schnelle Identifikation guter, nahe dem Optimum befindlicher Lösungen des *Docking*-Problems liefern. Sie imitieren einen Evolutionsprozess, indem sie das Optimierungsproblem in einer Weise repräsentieren, das entsprechend der Manipulation von Chromosomen modifiziert werden kann. Jedes Chromosom kodiert eine Konformation des Liganden in der Bindetasche des Proteins und beinhaltet eine Zuordnung von Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren des Liganden zu denen des Proteins. Um die Chromosomen zu dekodieren, werden die Liganden so in die Bindetasche des Proteins eingepasst, dass möglichst viele der vorhergesagten Wasserstoffbrückenbindungen zustande kommen. Die Bewertung der Passgenauigkeit jedes einzelnen dekodierten Chromosoms besteht aus der Kombination der ermittelten Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen und ihrer Stärke sowie der van der Waals-Energie des vorliegenden Komplexes. GOLD führt das

70

automatische *Docking* unter Berücksichtigung der Drehbarkeit um alle offenkettigen Bindungen durch. Teilweise kann Ligandenflexibilität auf Zyklen und auf die Flexibilität des Proteins in der Umgebung des aktiven Zentrums ausgedehnt werden.

Vorbereitung des Proteins und der Liganden für das Docking mit GOLD

Um eine Aussage darüber treffen zu können, wie die einzelnen *in vitro* getesteten Substanzen in die Bindetasche der jeweiligen Glutamat-Dehydrogenase passen und welche Aminosäuren zur inhibitorischen Wirkung dieser beitragen, wurden *Docking*-Analysen mit GOLD durchgeführt.

Die Kristallstrukturen der humanen GDH (1L1F) und der *Pf*GDH1 (2BMA) wurden der Brookhaven Proteindatenbank [Bernstein *et al.*, 1977] entnommen. Wassermoleküle und Ionen, sowie die gebundenen Liganden wurden aus den Proteinstrukturen entfernt und Wasserstoffatome in adäquater Geometrie hinzugefügt.

Die Strukturen der Liganden wurden partiell optimiert, um ungünstige sterische Kontakte abzubauen, die durch Anfügen der Wasserstoffatome hervorgerufen wurden. Diese Optimierung wurde mit dem SYBYL Mehrzweck-Kraftfeld aus Tripos 7.2 [Clark *et al.*, 1989] durchgeführt. Zugängliche Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren wurden sowohl im aktiven Zentrum des Proteins als auch bei den Liganden durch die SYBYL-Atomtypklassifizierung [Clark *et al.*, 1989] identifiziert (s. Tab. 3.7). Analog wurde auch die in dieser Arbeit erstellte Kristallstruktur der *Pf*GDH2 behandelt.

SYBYL Atomtypen	Donor	Akzeptor
N.1, N.ar, O.co2 (Carboxylgruppe), O.2 in NO2 Nitrogruppe	Nein	Ja
N.3, N.2, N.pl3 mit nur 2 Bindungen	Ja	Ja
O.2, O.2 in amidischen Gruppen	Nein	Ja
0.3	Ja	Ja
O.co2 oder O.2 die an ein P oder S gebunden sind, oder O.co2 (einfach	Nein	Ja
geladener Sauerstoff)		
N.am, N.pl3, N.4	Ja	Nein

Tab. 3.7: Erlaubte Donoren und Akzeptoren basierend auf SYBYL-Atomtypen [Jones, 1995].

4 Ergebnisse

4.1 Die Glutamat-Dehyhdrogenase 1 aus *P. falciparum*

4.1.1 Heterologe Überexpression und Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose

Innerhalb der vorliegenden Arbeit sollte die *Pf*GDH1 zu Vergleichszwecken erstmals als Fusionsprotein mit einem N-terminalen Hexahistidylpeptid kloniert werden. Die heterologe Überexpression wurde dazu in *E. coli* M15 Zellen unter Verwendung des pQE30-Vektors durchgeführt. Die Selektion der Bakterien erfolgte über eine Ampicillin-Resistenz, die auf dem Expressionsvektor vorhanden ist und des auf einem weiteren Vektor kodierten Kanamycinresistenzgens. Die Ausbeute für dieses Protein lag bei etwa 80 mg pro Liter aufgereinigter *E. coli* Kultur. Wie das SDS-Gel in Abbildung 4.1 B zeigt, konnte bereits über die Methode der Ni-NTA-Affinitätschromatografie eine Proteinlösung mit hohem Reinheitsgrad für die Elutions-Fraktionen von 100 bis 200 mM Imidazol erhalten werden.



Abb. 4.1: SDS-PAGE-Gele der Expression und Reinigung der *Pf*GDH1. A) Spur 1: Induktionsstart des Expressionsansatzes; Spur 2-5: 1, 2, 3 und 4 h nach Induktion. Der Pfeil markiert die Bande des rekombinanten Proteins. B) Spur 1: Durchlauf nach Auftrag der Proteinlösung auf die Ni-NTA-Säule; Spuren 2-8: Eluate nach Zugabe steigender Imidazolkonzentrationen (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 mM Imidazol). Die Proteine wurden mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. M: *unstained molecular weight marker*.

Mit diesen Fraktionen wurden jeweils eine Proteinbestimmung nach Bradford und eine Aktivitätsbestimmung mittels des GDH-Assays durchgeführt. Die K_m-Werte für Glutamat, α -Ketoglutarat, NADP und NADPH betrugen $1,0 \pm 0,2$ mM, $340 \pm 34 \mu$ M, $26 \pm 5 \mu$ M und $21 \pm 5 \mu$ M unter Standardbedingungen, und entsprachen damit den Werten, wie sie bereits von Wagner *et al.* [1998] beschrieben wurden. Die spezifische Aktivität konnte in der vorliegenden Arbeit für die Hinreaktion mit $2,7 \pm 0,36$ U/mg und die Rückreaktion mit 16 ± 1000

2,2 U/mg bestimmt werden. Diese Werte unterscheiden sich deutlich von denen in der Literatur, wo sie mit $9 \pm 1,5$ U/mg und 61 ± 5 U/mg angegeben werden.

Weiterhin wurde mittels einer Größenausschlusschromatografie überprüft, inwiefern sich der eingefügte His₆-*tag* auf die Oligomerisierung der *Pf*GDH1 auswirkt. Hier konnte eindeutig ein Maximum beobachtet werden (s. Abb. 4.2), dass mit einem Molekulargewicht von 316 kDa für das Hexamer (52,6 kDa pro Monomer) der theoretisch vorhergesagten Größe eines Hexamers dieses Proteins entspricht. Durch Vorreduktion der *Pf*GDH1 mit 4 mM DTT ergaben sich bei gleichartigen Analysen keine Änderungen im Elutionsprofil, was dafür spricht, dass an der Oligomerisierung des Enzyms keine Disulfide beteiligt sind.



Abb. 4.2: Elutionsprofil der Größenausschlusschromatograpie für die rekombinante PfGDH1.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Glutamat-Dehydrogenase 1 aus *Plasmodium falciparum* mit Substraten oder Cofaktoren zu kristallisieren. Mit dem in dieser Arbeit rekombinant hergestellten Protein war lediglich die Reproduktion der Kristalle möglich, die auch in der Doktorarbeit von Christoph Werner [2008] erhalten wurden, nicht jedoch die Kristallisation mit Liganden (Abb. 4.3).



Abb. 4.3: Fotografie der reproduzierten *Pf*GDH1-Kristalle.

4.2 Die Glutamat-Dehydrogenase 2 aus *P. falciparum*

4.2.1 Aminosäuresequenzvergleiche

Vorbereitend zur Erstellung eines Homologiemodells der PfGDH2 wurde mit der Online-Suchfunktion der Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) die Proteindatenbank (www.rcsb.org) nach Proteinsequenzen gesucht, der Aminosäuresequenz der PfGDH2 ähnlich und deren Kristallstrukturen bereits aufgeklärt sind. Erwartungsgemäß zeigte die PfGDH1, deren dreidimensionale Struktur bereits vorliegt (2BMA), eine große Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz mit der der PfGDH2. Daraufhin wurden die Aminosäuresequenzen beider mit den Online-Programmen CLUSTAL W [Thomson et al., 1994] und T-COFFEE [Notredame, 2000] unter Standardeinstellungen miteinander verglichen (Abb. 4.4). Dabei konnte eine Aminosäuresequenzidentität der beiden von 59 % festgestellt werden.

PfGDH1 PfGDH2	MSALKDKTGRFVVLDKNAS MILYSCVVCFIVFVFHVKAYSKNKVLKYAKPGFITNEIDIGAYAKRRGKSRLGSLHNYGY :.* .: * *: *.: .
PfGDH1 PfGDH2	NYESLVDQEMNNVYERVMKLDPNQVEFLQAFHEILYSLKPLFMEEPKYLPIIETLSEPER TSTKSVDNQIEELREKVVSKNKNEPEFLQAFEEVLSCLKPVFKKDNVYIGVLENIAEPER **::::: *:*:: : *: ******.*:* .****:* :: *: ::*::****
PfGDH1 PfGDH2	AIQFRVCWLDDNGVQRKNRCFRVQYNSALGPY <mark>K</mark> GGLRFHPSVNLSIVKFLGFE <mark>Q</mark> IF <mark>K</mark> NSL VIQFRVPWINDKGEHKMNRGFRVQYNSVLGPYKGGLRFHPTVNLSVIKFLGFEQIFKNSL .***** *::*:* :: ** ******.************
PfGDH1 PfGDH2	TGLSMGGGKGGSDFDP <mark>K</mark> GKSDNEILKFCQAFMNELYRHIGPCTDVPA <mark>GD</mark> IGVGGREIGYL TTLPMGGGKGGSDFDP <mark>K</mark> GKSENEILKFCQSFMTNLFRYIGPNTDVPA <mark>GD</mark> IGVGGREIGYL * *.**********************************
PfGDH1 PfGDH2	YGQYKKIVNSFNGTLTGKNVKWGGSNLRVEATGYGLVYFVLEVLKSLNIPVEKQTAVVSG FGQYKKLKNSFEGVLTGKNIKWGGSNIRAEATGYGVVYFAENVLKDLNDNLENKKCLVSG :*****: ***:*.****:******:*************
PfGDH1 PfGDH2	SGNVALYCVQKLLHLNVKVLTLSD <mark>S</mark> NGYVYEPNGFTHENLEFLIDLKEEKKGRIKEYLNH SGNVAQYLVEKLIEKGAIVLTMSD <mark>S</mark> NGYILEPNGFTKEQLNYIMDIKNNQRLRLKEYLKY ***** * *:**: ***:*****: ******:*:*:*:
PfGDH1 PfGDH2	SSTAKYFPNEKPWGVPCTLAFPCATQNDVDLDQAKLLQKNGCILVGEGANMPSTVDAINL SKTAKYFENQKPWNIPCDIAFPCATQNEINENDADLFIQNKCKMIVEGANMPTHIKALHK *.***** *:***.:** :********:: ::*.*: :* * :: ******: :.*:
PfGDH1 PfGDH2	FKSNNIIYCPSKAANAGGVAI <mark>S</mark> GLEMSQNFQFSHWTRETVDEKLKEIMRNIFIACSENAL LKQNNIILCPSKAANAGGVAV <mark>S</mark> GLEMSQNSMRLQWTHQETDMKLQNIMKSIYEQC-HNTS :*.**** *******************************
PfGDH1 PfGDH2	KYTKNKYDLQAGANIAGFLKVAESYIEQGCF KIYLNESDLVAGANIAGFLKVADSFLEQGGL * *: ** **************

Abb. 4.4: Sequenzalignment der *Pf*GDH1 und *Pf*GDH2. * identische Aminosäurereste; : sehr ähnliche Aminosäurereste; . ähnliche Aminosäurereste. Gelb unterlegt wurden Aminosäurereste, die an der Glutamatbindung beteiligt sind, in magenta sind Aminosäurereste gekennzeichnet, die NADP⁺ binden. Grün wurden die Aminosäuren markiert, die entfernt wurden, um ein katalytisch aktives *Pf*GDH2 Protein zu erhalten.

4.2.2 Homologiemodell der *Pf*GDH2

Mit der Kristallstruktur der *Pf*GDH1 [2BMA; Werner *et al.*, 2005] als Vorlagenprotein wurde ein Homologiemodell der *Pf*GDH2 erstellt. Dies erfolgte mit Hilfe des Programms Swiss-Pdb Viewer 3.7. Das Strukturmodell sollte vorrangig dazu genutzt werden, um vor Beginn der Klonierungsarbeiten beurteilen zu können, ob Konstrukte mit N- oder C-terminalem His₆-*tag* angefertigt werden sollen. Die modellierte Struktur wies analog zur Vorlagenstruktur alle Sekundärstrukturmerkmale auf und zeigte nur wenige Abweichungen im Vergleich zu dieser. Anhand des Modells wurde deutlich, dass sich lediglich der N-Terminus der *Pf*GDH2 für die Positionierung eines Affinitäts-*tags* eignet, da der C-Terminus vollständig im Inneren des Proteins vergraben liegt. Das Strukturmodell wurde mit dem Programm PROCHECK auf seine Qualität hin überprüft. Der entsprechende Ramachandran-Plot ist in Abbildung 4.5 dargestellt.



Abb. 4.5: Ramachandran-Plot des berechneten Homologie-Modells für die PfGDH2.

4.2.3 Klonierung der einzelnen PfGDH2-Konstrukte

Wie unter 2.4 beschrieben, wurden unterschiedliche Konstrukte der *Pf*GDH2 angefertigt (s. Abb. 4.6). Als erstes erfolgte die Klonierung der gesamten Sequenz des *Pf*GDH2 Proteins (*Pf*GDH2 *full-length*). Dieses konnte jedoch aufgrund der N-terminalen Signalsequenz nicht erfolgreich überexprimiert werden. Daher wurde ein weiteres, als *Pf*GDH2₍₋₂₁₎ bezeichnetes Konstrukt, dessen Länge dem *Pf*GDH2 *full-length* Protein, abzüglich der vorhergesagten N-terminalen Apicoplast-Signalsequenz (21 Aminosäuren), entsprach, kloniert. Weiterhin erfolgte die Klonierung eines um 60 Aminosäuren verkürzten Proteins (*Pf*GDH2₍₋₆₀₎), was dem Kernbereich der Glutamat-Dehydrogenasen aus unterschiedlichen Organismen (z. B. Bakterien, Hefen) entspricht.



Abb. 4.6: *Pf*GDH2 Konstrukte.

Sowohl das PfGDH2₍₋₂₁₎- als auch das PfGDH2₍₋₆₀₎-Protein konnten in *E. coli* M15 Zellen überexprimiert werden (s. Abb. 4.7 A). Für beide Enzyme war jedoch keine Aktivität im GDH-Assay messbar. Gelfiltrationsanalysen zeigten, dass für PfGDH2₍₋₆₀₎ lediglich Monomere in der Lösung vorlagen. Auch für die Untersuchungen an der PfGDH2₍₋₂₁₎ wurden diese hauptsächlich nachgewiesen, wobei hier jedoch zusätzlich ein Peak, der der Größe von PfGDH2-Hexameren entsprach, detektierbar war (s. Abb. 4.7 B). Des Weiteren konnte für das um 21 Aminosäuren verkürzte Protein jeweils eine Doppelbande auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel beobachtet werden, von der jedoch nur die obere Bande mit dem Anti-His₆-Antikörper reagierte (s. Abb. 4.7 B). Zusätzlich durchgeführte massenspektrometrische Analysen ergaben, dass es sich bei beiden Banden um PfGDH2 handelt.



Abb. 4.7: Eluate nach Aufreinigung der PfGDH2₍₋₆₀₎ und PfGDH2₍₋₂₁₎ über Ni-NTA-Agarose. A) SDS-Gel der Aufreinigung der PfGDH2₍₋₆₀₎. M: *unstained molecular weight marker*; Spuren 1-7: Elution mit steigender Imidazolkonzentration (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150 und 200 mM). Unter dem SDS-Gel ist das Elutionsprofil der Größenausschlusschromatografie für die PfGDH2₍₋₆₀₎ abgebildet. B) Western Blot und SDS-Gel ausgewählter Eluate der Aufreinigung der PfGDH2₍₋₂₁₎ nach heterologer Überexpression in *E. coli* M15 Zellen. Spur 1: Eluat nach Zugabe von 75 mM Imidazol; Spur 2: Eluat nach Zugabe von 100 mM Imidazol; Spur 3: Eluat nach Zugabe von 150 mM Imidazol; M: *unstained molecular weight marker*. Auch für dieses Protein ist das Elutionsprofil der Gelfiltration dargestellt.

Da *E. coli* M15 Zellen nicht proteasedefizient sind, wurde auf Grund dieser Ergebnisse angenommen, dass spezifische Proteasen des Bakteriums für eine Abspaltung N-terminaler Aminosäuren am PfGDH2₍₋₂₁₎-Protein verantwortlich sein könnten. Durch eine weitere heterologe Überexpression dieses Konstruktes in proteasedefizienten *E. coli* KRX-Zellen, konnte diese Annahme bestätigt werden. Anhand eines SDS-Gels war in diesem Fall eindeutig nur eine Bande und in Gelfiltrationsexperimenten nur ein Peak entsprechend des Proteinmonomeres nachweisbar. Daraufhin wurde die Sequenz der *Pf*GDH2 anhand der beiden Programme PATS [Zuegge *et al.*, 2001] und SignalP [Bendtsen *et al.*, 2004] zur Vorhersage von Signalpeptiden, noch einmal genauer *in silico* untersucht. Die Ergebnisse

77

dieser Untersuchungen waren nicht eindeutig, gaben aber Hinweise auf einen Bereich in der N-terminalen Sequenz des Proteins, der durch das Vorhandensein überdurchschnittlich vieler geladener Aminosäuren als Signalpeptid gewertet werden konnte. Dieser Bereich umfasst in etwa die ersten 49 Aminosäuren des *Pf*GDH2 *full-length* Proteins. Entsprechend dieser Auswertungen wurde eine Umklonierung eines um 49 Aminosäuren verkürzten Konstruktes in den pET28a Vektor vorgenommen, welches im Folgenden als *Pf*GDH2 bezeichnet wird.

4.2.4 Rekombinante Darstellung der *Pf*GDH2

Die Überexpression des pET28a/*Pfgdh2* Konstruktes erfolgte in *E. coli* KRX Zellen. Die Aufreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatografie ergab eine Ausbeute von ungefähr 50 mg Protein pro Liter Flüssigkultur (s. Abb. 4.8). Eine Gelfiltrationsanalyse des gereinigten Proteins zeigte deutlich ein Absorptionsmaximum bei einem Elutionsvolumen von 62,2 mL, was einem Molekulargewicht von 324 kDa und damit der Größe von *Pf*GDH2 Hexameren entspricht (s. Abb. 4.9). Daraus ergibt sich ein Molekulargewicht von 54,1 kDa für ein Monomer der *Pf*GDH2.



Abb. 4.8: SDS-Gele der Expression und Reinigung der *Pf*GDH2. A) Spur 1: Induktionsstart des Expressionsansatzes; Spur 2: 18 h nach Induktion. Der Pfeil markiert die Bande des rekombinanten Proteins. B) Spur 1: Durchlauf nach Auftrag der Proteinlösung auf die Ni-NTA-Säule; Spuren 2-9: Eluate nach Zugabe steigender Imidazolkonzentrationen (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 mM Imidazol). Die Proteine wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. M: *unstained molecular weight marker*.



Abb. 4.9: Elutionsprofil der PfGDH2 in der Gelfiltration.

4.2.5 Abspaltung des His₆-tags mittels Thrombin

Da bereits bei der *Pf*GDH1 als auch bei der hGDH (s. Punkt 4.3.) beobachtet werden konnte, dass ein Anhängen zusätzlicher N-terminaler Aminosäuren zu einer starken Verminderung der spezifischen Aktivität führte, sollte nun an der *Pf*GDH2 überprüft werden, inwiefern sich die spezifische Aktivität nach Entfernen des His₆-*tags* verbessern lässt. Da die *Pf*GDH2 in den pET28a Vektor kloniert worden war, der zwischen der Polyhistidylsequenz und der MCS eine Schnittstelle für Thrombin aufweist, konnte diese Untersuchung hier beispielhaft durchgeführt werden. Wie in Abbildung 4.10 gezeigt ist, konnten durch die Behandlung des zuvor über Affinitätschromatographie gereinigten Proteins mit Thrombin nahezu 100 % des His₆-*tags* entfernt werden. Zur Eliminierung des Thrombins und des abgespaltenen Polyhistidylpeptides wurde anschließend eine Gelfiltration durchgeführt. Die Ergebnisse der darauffolgenden Bestimmung kinetischer Parameter werden unter Punkt 4.2.7 besprochen.



Abb. 4.10: Immunochemischer Nachweis der Abspaltung des His₆-*tags* mittels Thrombin. A) SDS-Gel der *Pf*GDH2 vor (Spur 1) und nach (Spur 2) Abspaltung des His₆-*tags* nach Färben mit Coomassie Brilliant Blue. B) Ponceau gefärbte PVDF-Membran nach dem Blotvorgang. C) Western Blot mit Anti-His₆-Antikörper.

4.2.6 Spezifischer immunochemischer Nachweis der *Pf*GDH2

Für den spezifischen Nachweis der rekombinanten PfGDH2 nach Aufreinigung, aber auch des nativen Enzyms im Parasitenlysat, wurde hochreines Protein nach Abspaltung des His₆-*tags* mittels Thrombin an die Firma Eurogentec (Seraign, Belgien) verschickt. Dort wurden Kaninchen mit dem Protein immunisiert und polyklonale Antikörper gegen die PfGDH2 gewonnen. In Abbildung 4.11 ist deutlich erkennbar, dass mit dem gewonnen anti-PfGDH2-Antikörper sehr spezifisch die PfGDH2 detektiert werden kann und keine Kreuzreaktionen mit anderen Glutamat-Dehydrogenasen aus dem Malariaerreger oder Mensch auftraten. Obwohl mehrere Versuche unternommen wurden, eine große Anzahl von Apicoplasten aus den Parasiten zu isolieren, war eine Detektion der nativen PfGDH2 im Parasitenlysat nicht möglich.



Abb. 4.11: Western Blot mit spezifischem anti-*Pf*GDH2-Antikörper. A) SDS-Gel mit Coomassie Blue gefärbt. B) Western Blot. Spur 1: *Pf*GDH2 (1A: 15 µg Protein; 1B: 5 µg Protein) nach Aufreinigung über Ni-NTA-Agarose und anschließender Größenausschlusschromatographie; Spur 2: His-getaggte rekombinant gewonnene *Pf*GDH1; 3: His-getaggte hGDH. M: *unstained molecular weight marker*.

4.2.7 Kinetische Parameter der *Pf*GDH2

Die Messung der Enzymaktivität sowie die Bestimmung der K_m-Werte für die Substrate der *Pf*GDH2 erfolgten in Dreifachbestimmung wie unter 3.2.12 beschrieben. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurde ausschließlich Protein verwendet, welches über einen weiteren Aufreinigungsschritt einer Gelfiltration zu bestmöglicher Homogenität gebracht wurde. Die Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Gleichung 3.1. Die Michaelis-Konstanten für Glutamat, α -Ketoglutarat, NADP⁺ und NADPH betrugen 1,5 ± 0,15 mM, 380 ± 10 μ M, 60 ± 5 μ M und 28 ± 2 μ M. Weiterhin wurden die Werte für V_{max} sowie für k_{cat}/K_m bestimmt (s. Tab. 5.1).

4.2.8 Kristallisationsansätze mit der *Pf*GDH2

Mit reiner, rekombinant erzeugter *Pf*GDH2 in 100 mM Tris pH 7,8 und 500 mM NaCl, wurden Kristallisationsansätze mit einer Proteinkonzentration von etwa 16 mg/mL und mit Glutamat in einer Endkonzentration von 10 mM durchgeführt. Nachdem ein Screening unterschiedlicher Kristallisationsbedingungen mit dem Crystal Screen 1 & 2 erfolgt war, konnte für drei Bedingungen (CSI Nr. 4, CSI Nr. 6 und CSI Nr. 17) eine Bildung von kleinen, nadelförmigen Proteinkristallen beobachtet werden (Abb. 4.12 A). Hierbei war auffällig, dass alle drei Lösungen 0,1 M Tris/HCl pH 8,5 als Puffer und sowohl CSI/6 als auch CSI/17 30 % PEG 4000 enthielten.



Abb. 4.12: *Pf*GDH2 Kristalle. A) Kristalline Strukturen der *Pf*GDH2 in Kristallisationsansätzen, die nach der Methode des "*hanging drop*" angesetzt wurden. B) Proteinkristall der *Pf*GDH2.

Ebenfalls nach der Methode des "*hanging drop*" wurde darauffolgend versucht, die Kristallisation durch den Einsatz von Detergentien zu optimieren. Als Ausgangsbedingung wurden die in den Vorversuchen ermittelten Lösungen ausgewählt. Diese Bedingungen wurden sowohl in der Konzentration an PEG 4000, im pH-Wert als auch in der TRIS-Konzentration variiert. Als Detergentien wurden ausgewählte Substanzen des Detergent Screen von Hampton Research verwendet.

Nach etwa 14 Tagen konnte im Ansatz mit 2,5 µL Protein und 2,5 µL der Lösung mit 0,1 M Tris/HCl pH 8,5, 0,2 M Magnesiumchlorid Hexahydrat und 30 % PEG 4000, sowie 10 mM Glutamat und 0,01 M Spermintetrahydrochlorid als Detergenz, die Bildung eines großen Kristalls beobachtet werden (Abb. 4.12 B). Mit diesem Kristall wurden anschließend Diffraktionsexperimente im Drehkristallverfahren durchgeführt. Die Parameter der Datensammlung sowie die Statistiken der Auswertung sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Protein	<i>Pf</i> GDH2
Space group	P212121
Unit cell dimensions [Å]	a=138.78 b=140.01 c=180.99 α=β=γ=90°
Resolution range [Å]	25 - 3.1
Completeness [%] ^a	99.6 (99.5)
Mean redundancy	10.5 (9.2)
R _{sym} ^b [%]/ Rmrgd-F ^c	15 / 12.6
<i {{\sigma}="">}</i>	15.3 (2.5)
Reflections used in refinement	53 497
Protein atoms	21 612
Solvent molecules	19
rmsd bonds [Å] / rmsd angles	0.008 / 1.1
R _{cryst} ^d [%] / R _{free} ^e [%]	23.1 / 25.7

Tab. 4.1: Parameter zur Datensammlung und Statistiken zur Auswertung der PfGDH2 Struktur.

^a Werte in Klammern beziehen sich auf die letzte Auflösungsschale 3.2 -3.1

 $^{b}R_{sym} = 100 \Sigma |Ih - \langle I \rangle | / \Sigma Ih$

^cRmrgd-F = Qualität der Amplituten (F) im zweiten Datensatz [Diederichs & Karplus, 1997] ^d $R_{cryst} = 100 \Sigma$ ||Fobs| – |Fcalc|| / Σ |Fobs| Für alle erhaltenen Daten berechnet. Es wurde kein sigma cutoff angewendet. (Gleichung 3.7, Abschnitt 3.3.4)

^e R_{free} wurde anhand 6 % zufällig ausgewählter Einzelreflexe bestimmt, die während der Verfeinerung ausgeschlossen wurden.

4.2.9 Lösung und Verfeinerung der Kristallstruktur der PfGDH2

Die erhaltenen Kristalle zeigten eine orthorhombische Symmetrie in Raumgruppe 19 $(P2_12_12_1)$ mit je einem Hexamer des Enzyms pro asymmetrische Einheit. Über die Methode des molekularen Ersatzes und der Kristallstruktur der PfGDH1 (PDB-ID: 2BMA) als Suchmodell, konnten die Aminosäurereste der PfGDH2 in der Elektronendichte positioniert werden. Dieses Startmodell wurde dann in mehreren Minimierungszyklen verfeinert. In jedem Durchgang wurden Elektronendichten aus (2Fobs-Fcalc)- und (Fobs-Fcalc)-Fouriersynthesen berechnet, wobei Fobs die gemessenen Strukturfaktoramplituden darstellt und Fcalc die aus dem aktuellen berechneten Strukturfaktoramplituden, und dem aktuellen Modell mit Strukturmodell überlagert. Mit Hilfe des Computergraphiksystems O wurden Veränderungen und Erweiterungen des Strukturmodells gemäß der Elektronendichteverteilung vorgenommen, die in automatischen Verfeinerungszyklen optimiert wurden. Beispielsweise wies die zweite Domäne, in Bezug auf die entsprechenden Bereiche in der PfGDH1, eine deutliche Verschiebung auf, wodurch ein großer Teil der Aminosäurereste dieser Domäne nicht korrekt in die Elektronendichte eingepasst wurde. Diese Regionen musste in allen Monomeren manuell korrigiert werden. Durch diesen iterativen Prozess konnten der kristallographische R-Faktor (Gleichung 3.7) und der freie R-Faktor für den Auflösungsbereich von 25 Å bis 3,1 Å von jeweils etwa 47 % auf Endwerte von 23,1 % bzw. 25,7 % reduziert werden. Das Endmodell (s. Abb. 4.13 A) enthält 21 612 (Nicht-Wasserstoff-) Atome der PfGDH2 die den Aminosäureresten 55-510 des Proteins entsprechen, sowie 19 Wassermoleküle. Mit der berechneten Elektronendichte konnte die gesamte Struktur definiert werden, mit Ausnahme von 24 Aminosäureresten (50-54 für jedes Monomer). Der mittlere Temperaturfaktor des Strukturmodells beträgt 44,6 Å². Der sogenannte B-Faktor oder berechneten Temperaturfaktor trägt zur Ortsunschärfe eines Atoms im Strukturmodell bei, die sich unter anderem aus thermischen Gitterschwingungen, Fehlordnungen des Kristalls und der Flexibilität eines Molekülbereiches ergibt. Je größer der einem Atom zugeordnete B-Faktor, umso beweglicher ist dieses Atom. Erwartungsgemäß zeigten sich in Bereichen des Moleküls, die nicht in Sekundärstrukturelementen stabilisiert sind, höhere Temperaturen als innerhalb von β -Faltblatt- oder α -Helix-Regionen (s. Abb. 4.13 B).





Abb. 4.13: Endmodell des Hexamers der *Pf*GDH2. A) Darstellung als Cartoon. B) Darstellung der B-Faktoren. Die Colorierung erfolgt entsprechend der Regenbogenfarben, von violett = niedriger B-Faktor bis rot = hoher B-Faktor.



Abb. 4.14: Elektronendichtekarten im Verlauf der Verfeinerung. Die Ausschnitte zeigen jeweils die 1 σ über dem Untergrundrauschen konturierte Elektronendichte aus einer (2F_{obs}-F_{calc})-Fouriersynthese. In gelb ist das aktuelle Strukturmodell überlagert. A) Ausgangsdichte aus den mit MR ermittelten Phasenwinkeln. B) 2F_{obs}-F_{calc})-Elektronendichte und Stukturmodell nach dem letzten Verfeinerungszyklus.

Der Ramachandran-Plot [Ramakrishnan & Ramachandran, 1965] der verfeinerten Struktur zeigt, dass die Faltung der Hauptkette sehr gut erlaubten Konformationen entspricht (s. Abb. 4.15). 100 % der Nicht-Glycin-Reste nehmen Kombinationen von dihedralen Winkeln an, die typisch sind für die Faltung einer Polypeptidkette und im Ramachandran-Plot in den sogenannten erlaubten Bereichen liegen.



Abb. 4.15: Ramachandran-Plot (generiert mit PROCHECK, Laskowski, 1993) für die Kristallstruktur der GDH2 aus *Plasmodium falciparum* nach dem letzten Verfeinerungszyklus. Die auftretenden Kombinationen der dihedralen Winkel (Φ , Ψ) der Hauptkette sind für Glycin-Reste durch Dreiecke dargestellt und für alle übrigen Reste durch Quadrate symbolisiert. Stereochemisch erlaubte Bereiche sind gelb gefärbt, dabei sind Regionen, deren Winkelkombinationen die Sekundärstrukturelemente β -Faltblatt, rechtshändige α -Helix oder linkshändige α -Helix beschreiben, rot hervorgehoben.

4.2.10 Kristallstruktur der PfGDH2

Die dreidimensionale Struktur der *Pf*GDH2 weist alle für die GDH S_50₁ Familie typischen Strukturmerkmale auf. So bilden die Aminosäuren 55-261 und 492-510 die erste Domäne aus, die hauptsächlich an der Interaktion der einzelnen Untereinheiten und der Glutamatbindung beteiligt ist. Die zweite Domäne entspricht dem klassischen Nucleotidbindungs-Motiv, der Rossmann-Faltung, welche durch die Aminosäurereste 262-491 gebildet wird. Wie bereits für die *Pf*GDH1 beschrieben, liegt auch hier ein β-Faltblatt in umgekehrter Orientierung vor. Ein Vergleich der einzelnen Untereinheiten der *Pf*GDH2, insgesamt oder nach ihren Domänen unterteilt, zeigte nur geringe Abweichungen, was durch die gesetzten *restraints* in den Bereichen der Aminosäuren 66-294, 300-347 und 404-510 aller Monomere zu erklären ist. Eine Überlagerung der erhaltenen *Pf*GDH2-Struktur mit der Kristallstruktur der *Pf*GDH1 lässt erkennen, dass eine große Ähnlichkeit zwischen diesen beiden besteht. Jedoch kann auch hier die bereits beschriebene Verschiebung der zweiten Domäne strukturelle Abweichung (rmsd) von 2,08 Å, während dieser Wert für ein Monomer bei 1,44 Å liegt. Zu dieser

85

Abweichung trägt die erste Domäne (1 309 Atome) lediglich 0,49 Å, die zweite Domäne (1 392 Atome) jedoch 1,06 Å bei (s. Abb. 4.16).



Abb. 4.16: Überlagerung jeweils eines Monomers der PfGDH1 (grau) und PfGDH2 (türkis).

4.2.11 Monomer-Monomer-Interaktionen

Die Analyse der Wechselwirkungen der einzelnen Untereinheiten der *Pf*GDH2 zeigte, dass ein Monomer dieses Enzyms mit vier anderen Monomeren über je acht ladungsgetragene Wechselwirkungen interagiert, wobei zwei dieser Interaktionen Salzbrücken sind. Im Gegensatz dazu interagieren die Untereinheiten der *Pf*GDH1 über je 14 ladungsunterstützte Wechselwirkungen. Diese Wechselwirkungen treten in diesem Enzym clusterartig auf, was auch für Glutamat-Dehydrogenasen hyperthermophiler Organismen wie *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus litoralis* beschrieben wurde [Britton *et al.*, 1995]. Zudem sind an der Ausbildung des Clusters mehrere Salzbrücken beteiligt. Im Vergleich der *Pf*GDH1 und *Pf*GDH2 mit der humanen GDH1 weist Letztere nur wenige Wechselwirkungen auf, die über geladene Aminosäurereste ausgeübt werden (s. Abb. 4.17). Die Monomer-Monomer-Interaktionen finden hier hauptsächlich über hydrophobe Wechselwirkungen statt (s. Tab. 4.2). Tab. 4.2: Aminosäurereste der Glutamat-Dehydrogenasen 1 und 2 aus P. falciparum sowie der humanenGDH, die an der Monomer-Monomer-Interaktion beteiligt sind. Grau unterlegt wurden geladeneSeitenketten, die Wasserstoff- (H) oder Salzbrücken (S) ausbilden.

I = (5 A = 120! (1 = 1))	<i>PJ</i> GDH2	hGDH
Leuos-Asn138 (nyd)	Lys206-Lys206' (hyd)	Tyr386-Val396' (hyd)
Glu150-Lys182' (S)	Asn214-Lys246' (H)	Leu393-His395' (hyd)
Asn138-Arg-16' (H)	Asn249-Arg120' (H)	Glu406-Ser409' (hyd)
Tyr175-Arg-16' (H)	Asn259-Glu506' (hyd)	Glu406-Tyr405' (hyd)
Lys181-Gln445' (H)	Trp262-Glu506' (H)	Arg443-Ser409' (H)
Asn185-Arg56' (H)	Arg452-Asn222' (H)	Thr460-Arg400' (hyd)
Asn196-Glu444' (H)	Arg452-Ser450' (hyd)	Glu499-Ser208' (hyd)
Lys198-Glu444' (S)	Asn57-Glu134' (hyd)	Phe504-Glu146' (hyd)
Trp199-Glu444' (H)	Glu117-Arg139' (S)	Thr505-Arg150' (hyd)
Arg-16-Gln71' (hyd)	Arg139-Asn81' (H)	Thr505-Asp185' (hyd)
Asp15-Arg75' (S)	Asp193-Lys80' (S)	Arg70-Asn143' (H)
Glu53-Arg75' (S)	Tyr218-Arg120' (H)	His61-Glu155' (H)
Glu53-Lys73' (S)	Gln507-Lys245' (hyd)	His61-Lys159' (hyd)
Gln71-Tyr442' (H)	Val121-Gln123' (hyd)	Arg70-Phe504' (hyd)
Glu150-Arg56' (S)	Leu453-Ser447' (hyd)	Trp76-Val502' (hyd)
Phe448-Arg61' (hyd)	His135-His56' (hyd)	Gln85-Lys159' (H)
Ser441-Trp199' (hyd)		Arg151-Phe504' (hyd)
Asp137-Thr-18' (hyd)		Thr503-Arg151' (hyd)
		Phe504-Arg70' (hyd)
		Phe504-Arg151' (hyd)
		Gln209-Glu493' (hyd)
		Gln209-Glu493' (hyd) Arg423-Val435' (hyd)
E53 D15 R75'		Gln209-Glu493' (hyd) Arg423-Val435' (hyd) 7' E117 R139' N81

Abb. 4.17: Zwei Beispiele für Monomer-Monomer-Interaktionen in der *Pf*GDH1 (links) und *Pf*GDH2 (rechts).

4.3 Die Glutamat-Dehydrogenase 3 aus *P. falciparum*

4.3.1 Klonierungs- und Überexpressionsversuche des PfGDH3 full-length Proteins

Die Klonierung der *Pf*GDH3 *full-length* mit einem ebenfalls N-terminalen Hexahistidyl-*tag* erfolgte sowohl in den pQE30-Vektor als auch den Vektor pRSETA. Des Weiteren wurde der Hilfsvektor pRAREII, sowie ein Chaperon-Helfersystem pGro7 verwendet. Die jeweiligen Plasmide wurden entweder in *E. coli* BL21, BL21star, C41, oder M15 Zellen eingebracht. Die heterologe Überexpression erfolgte mit variierenden Expressions-Parametern, wie Temperatur, Dauer und Nährmedium. Zusätzlich wurde parallel zu den Versuchen jeweils der Leervektor (Plasmid ohne das Gen für die *Pf*GDH3) in den entsprechenden Zellen und mit identischen Parametern exprimiert, um die Expressionsprofile vergleichen zu können. Weder durch die beschriebenen Testsysteme, noch über Versuche, die *Pf*GDH3 in modiziertem Minimalmedium (M9) zu exprimieren, konnte ein rekombinantes Protein gewonnen werden. Ferner wurde das *in vitro* Translations- und Transkriptionskit von New England Biolab getestet. Aber auch hier konnte keine deutliche Bande in Größe der *Pf*GDH3, weder auf dem SDS-Gel beobachtet, noch mittels Western Blot detektiert werden.

4.3.2 PfGDH3 Konstrukte

Daraufhin wurden im Rahmen der Masterarbeit von Helga Rogel [2010] unterschiedliche Konstrukte der *Pf*GDH3 angefertigt (Abb. 4.18), die zunächst alle in den pRSETA Vektor kloniert wurden. Mit diesen wurden entweder *E. coli* M15, BL21, KRX oder Rosetta-gami II-Zellen transformiert (s. Punkt 3.2.4). Auch hier erfolgte die Überexpression mit variierender Expressionsdauer und -temperatur sowie in unterschiedlichen Nährmedien.



Abb. 4.18: Konstrukte der PfGDH3.

Die Aufreinigung aller Konstrukte erfolgte über 1 ml Ni-NTA-Agarose unter Verwendung von Phosphat-Puffer pH 8,0. Sowohl für das Protein *Pf*GDH3_(MID) (68 kDa) als auch das Protein *Pf*GDH3_(2P) (138 kDa) konnte weder nach PAGE noch über Western Blot Analysen eine Bande in entsprechender Größe detektiert werden. Als einziges der drei Konstrukte konnte das Protein *Pf*GDH3_(END) erfolgreich überexprimiert werden und eine Bande in der vorhergesagten Größe von 59 kDa erhalten werden (s. Abb. 4.19). Die Ausbeute des Proteins war allerdings sehr gering. Eine Optimierung der Expressionsbedingungen konnte innerhalb dieser Arbeit nicht erreicht werden.



Abb. 4.19: Western Blot der *Pf*GDH3_(END). His-Marker (M), 0 h: Probe vor Induktion mit Rhamnose; 24 h: Probe 24 Stunden nach Induktion; Pus: Pellet nach Ultraschall (Pus); Eluate nach Zugabe von 10 mM, 25 mM, 100 mM und 200 mM Imidazol. Der Pfeil deutet auf die Bande des Zielproteins bei ca. 59 kDa.

4.3.3 Überexpression der *Pf*GDH3 *full-length* in *Saccharomyces cerevisiae*

Auf Grund der bereits beschriebenen Schwierigkeiten bei der heterologen Überexpression des vollständigen Proteins der *Pf*GDH3 in *E. coli* Zellen, wurde alternativ eine Expression im eukaryotischen Expressionssystem *Saccharomyces cerevisiae*, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. R. Lill der Philipps-Universität Marburg, durchgeführt. Zuvor wurde das Gen der *Pf*GDH3 in den Shuttlevektor p426 kloniert und die Hefezellen nach Standardprotokoll mit dem Plasmid transfiziert. Nach der Überexpression des Proteins in diesem System erfolgte ein spezifischer Nachweis des ebenfalls mit sechs N-terminalen Histidinen fusionierten Proteins mittels Western Blot. Auch hier war die Detektion eines Signals in der richtigen Größe nicht möglich.

4.4 Ergebnisse für die humane Glutamat-Dehydrogenase

4.4.1 Überexpression und optimierte Aufreinigung

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse führten zu einem standardisierten Protokoll für die Überexpression und Aufreinigung der humanen GDH, die innerhalb der vorliegenden Arbeit zu Vergleichszwecken mit den plasmodialen Enzymen verwendet wurde. In dieser Arbeit wurde die hGDH erstmals über ein Histidin-Affinitäts-System produziert. Beste Resultate für die heterologe Überexpression dieses Enzyms konnten mit dem pRSETA-Vektor und *E. coli* KRX-Zellen erhalten werden (s. Abb. 4.20). Um die Aufreinigung der hGDH zu optimieren, d. h. um möglichst viel des vorhandenen Fremdproteins aus der Lösung zu entfernen, wurde als zweiter Reinigungsschritt eine präparative Gelfiltration durchgeführt. Ausserdem konnte gezeigt werden, dass die in allen getesteten Systemen (s. Punkt 3.2.4) rekombinant hergestellte hGDH hauptsächlich als *"inclusion bodies"* im Sediment der lysierten Zellen nachgewiesen werden konnte.



Abb. 4.20: SDS-Gel vor und nach Aufreinigung der hGDH über Ni-NTA-Agarose. M: Größenstandard, *unstained molecular weight marker*; Spuren 1-9 Eluate nach Zugabe steigender Konzentrationen an Imidazol (10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 500 mM). Der Pfeil markiert die Bande in Größe der hGDH.

4.4.2 Biochemische Charakterisierung der hGDH

Nach optimierter Aufreinigung wurde die Proteinkonzentration mittels Bradford bestimmt und die spezifische Aktivität des Enzyms in der erhaltenen Lösung anhand der Gleichung 3.1 ermittelt (s. Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Enzymkinetische Parameter der His-getaggten hGDH. Die kinetischen Parameter wurden, wie unter Punkt 3.2.14 beschrieben, in 50 mM TEA-Puffer pH 8 mit 1 mM EDTA bestimmt. Die spezifische Aktivität bezieht sich auf die Enzymaktivität, die nach Messung unter Standardbedingungen im hGDH-Assay berechnet werden konnte.

Bestimmte Größe	Literaturwerte	hGDH (His ₆ -tag)
Spezifische Aktivität (hin) in U/mg	84 ± 9,5	0,9 ± 1,05
Spezifische Aktivität (rück) in	125 ± 5,5	$1,31 \pm 0,9$
U/mg		
Spezifische Aktivität mit His ₆ -tag		0,7
(hin) in U/mg		
Spezifische Aktivität nach		1,71
Abspaltung des His ₆ - <i>tag</i> s (hin) in		
U/mg		
K _m Glutamat in mM	3,44	3,02
K _m α-Ketoglutarat in mM	1,4	1,4
K _m NAD in mM	0,71	0,58
K _m NADH in μM	80	66

4.4.3 Aufreinigung der hGDH im GST-Genfusionssystem

Die Aufreinigung des Fusionsproteins aus hGDH und GST erfolgte mittels einer Affinititätschromatographie über Glutathion-Sepharose. Die pGEX-Vektoren des GST-Genfusionssystems enthalten eine spezifische Schnittstelle für die *PreScission*TM-Protease, die es ermöglicht, das rekombinante Protein während der Aufreinigung von der GST zu trennen. Die *PreScission*TM-Protease ist ein Fusionsprotein aus GST und humaner Rhinovirus 3C Protease [Walker *et al.*, 1994], die spezifisch die Aminosäuresequenz LEVLFQGP erkennt und zwischen Glutamin und Glycin schneidet [Cordingley *et al.*, 1990]. Da die Protease mit GST fusioniert ist, kann sie, ebenso wie die vom Fusionsprotein abgetrennte GST, mittels Glutathion-*S*-Sepharose aus der Proteinlösung entfernt werden.

Das molekulare Gewicht der GST wird mit 26 kDa angegeben und das der hGDH aus *P. falciparum* beträgt 56 kDa. Als Ergebnis der Genexpression wurde daher ein Fusionsprotein mit einem molekularen Gewicht von etwa 82 kDa erwartet. Dies konnte mittels SDS-PAGE gezeigt werden (ohne Abb.). Eine Größenausschlußchromatografie zeigte jedoch, dass in den Eluaten nach Glutathion-*S*-Sepharose lediglich hGDH-Monomere vorlagen. In der auf diese Weise erhaltenen Proteinlösung war entsprechend keine Enzymaktivität detektierbar.

4.5 Subzelluläre Lokalisation der Glutamat-Dehydrogenasen aus

P. falciparum

Durch die Fusion des *green fluorescent protein* (GFP) mit den einzelnen *Pf*GDH-Konstrukten konnte die Lokalisation dieser Proteine innerhalb des Parasiten analysiert werden. Dafür wurden die Zielgene aller drei plasmodialen Glutamat-Dehydrogenasen, die lediglich für die ersten 66 Aminosäuren dieser Proteine und das C-terminal fusionierte GFP kodierten, in den Erreger transfiziert. Da die Länge von Signalpeptiden im Allgemeinen 15-60 Aminosäuren beträgt, konnten in diesem Fall die verkürzten Sequenzen verwendet werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die *Pf*GDH1 als auch die *Pf*GDH3 cytosolisch lokalisiert sind (s. Abb. 4.21 A, C). Eine Überlappung des Signals für das *Pf*GDH2-GFP Protein mit dem des im Apicoplasten spezifisch vorkommenden Proteins ACP (*acyl-carrier-protein*), sprach eindeutig für eine Co-Lokalisation der beiden (s. Abb. 4.21 B).



Abb. 4.21: Lokalisation der *Pf*GDH1-3 mittels GFP-Fusionsproteinen. A) *Pf*GDH1; B) *Pf*GDH2; C) *Pf*GDH3. Anti-GFP, anti-ACP und der Farbstoff Hoechst 33258 wurden zur Co-Lokalisation in der Immunfluoreszenz genutzt. DIC = Durchlichtaufnahme.

4.6 Aktivitätsbestimmung der Glutamat-Dehydrogenasen in

Anwesenheit von potentiellen Wirkstoffen

Die Testung von etwa 1 000 Substanzen der Hans-Knöll-Bibliothek erfolgte sowohl an den rekombinanten plasmodialen Glutamat-Dehydrogenasen *Pf*GDH1 und *Pf*GDH2, als auch an der rekombinant hergestellten humanen GDH. Die hemmkinetischen Untersuchungen wurden in 96-well-Platten durchgeführt und die bekannten Assaybedingungen dementsprechend angepasst. Die Messung der Proteinaktivität in Anwesenheit der Substanzen wurde im Multiwell-Reader (Tecan) durchgeführt. Da alle Substanzen dieser Bibliothek in DMSO gelöst sind, wurde die Enzymaktivität ohne Inhibitor, aber der adäquaten Menge DMSO, 100 % gesetzt und alle weiteren Angaben darauf bezogen. Eine Substanz wurde als Inhibitor gewertet, wenn durch ihn die Aktivität des jeweiligen Enzyms um mindestens 80 % vermindert wurde. Alle daraus resultierenden Wirkstoffe sind in den Tabellen 4.4 bis 4.6 dargestellt.

Substanzname	Strukturformel	Plattenposition	Molmasse	Eingesetzte
			g/mol	Konzentration
2-Benzoyaminopropionsäure-	СН3	55D07	349,45	72 µM
2-fluor-1-heptylallylester				
	H ₂ C F CH ₃ O			
(R,R)-Bis{2-[1-	N_CH3	57A12	426,33	59 μΜ
(methylamino)ethyl]phenyl}di				
selenid	CH ₃ Se ^{-Se} H ₃ C			
3-Hydroxy-6, 3',4'-	CH ₃	83E02	328,32	76 μΜ
trimethoxyflavone	H ₃ C-O O O O O O O O O O O O O O O O O O O			

Tab. 4.4: Liste der Wirkstoffe, die zu einer ≥ 80 %igen Inhibition der *Pf*GDH1 führten.

4-Oxo-5-[5-(3-	0,	4E12	413,408	60 µM
trifluormethylphenyl)-2-	HO N-O			
furylmethylen]-2-	s			
thioxothiazolidin-	O			
3-ylessigsäure				
	É É			

Tab. 4.5: Liste der Wirkstoffe, die zu einer ≥ 80 %igen Inhibition der *Pf*GDH2 führten.

Substanzname	Strukturformel	Plattenposition	Molmasse	Eingesetzte
			g/mol	Konzentration
3-Acetyl-1,2,3,4,5,6-		57D02	232,28	108 µM
hexahydro-(1R,5S)-1,5-				
methano-8H-pyrido-[1,2-	N CH ₃			
a][1,5]diazocin-8-on				
	0			
(R,R)-Bis{2-[1-	СН	57A12	426,33	59 µM
(methylamino)ethyl]phenyl}	N_0.13			
diselenid	CH ₃			
	Se Se			
	H ₃ C			
	N_CH.			
(S.S)-Bis-[1-(8-hydroxy-2-	- 3	57A09	512.37	49 uM
methoxy-5.6.7.8-			,	
tetrahydronaphthyl)]diselenid	OH O ^{-CH} 3			
(enuity al onuprial yr) juiserenna	Se			
	0_HO			

Tab. 4.6: Liste einer Auswahl	der Wirkstoffe,	die zu einer ≥	≥ 80 %igen	Inhibition of	ler humanen	Glutamat-
Dehydrogenase führten.						

Substanzname	Strukturformel	Plattenposition	Molmasse	Eingesetzte
			g/mol	Konzentration
(-Methyl-3-(1-	H-C	55G04	344,46	73 μM
phenylethyl)-3a,4,5,6-				
tetrahydro-1H-				
pyrazino[3,2,1-				
jk]carbazol-2(3H)-one	CH3			
	×			

5-Ethyl-spiro-2H-		58D03	374,48	67 μM
benz[e]inden-2,2'-	0 			
[2H]inden]-	H ₃ C 0			
1,1',3,3',6,7,8,9-	CH ₃			
octahydro-9-oxo-5'-				
carbonsäuremethylester				
2-Carboxymethyl-	0	58B12	904,98	28 µM
tetrabenzyl-	ОН			
maduraphthalazin				
	н,с			
	C C C CH3			
Boeravinone C	Н	58G05	344,32	73 µM
	H ₃ C ^O			
	H ₃ C OH			
	OH OH			
Chen14	CH3	58H02	232,32	108 µM
	H ₃ C CH ₂			
	O S			
O-Methylmoschatoline		83F03	321.34	78 uM
	H ₃ C _O	001 00		, o para
	H ₃ C ⁻⁰			
	H ₃ C ₀ ^N			
1-(2,4-Dimethoxy-		82G02	251,26	99 µM
benzyl)-3-fluoro-1,5-				
dihydro-pyrrol-2-one				
	CH,			
	3			

Wie aus diesen Ergebnissen ersichtlich wird, konnten für alle drei Enzyme jeweils sehr unterschiedliche Substanzklassen als potentielle Inhibitoren identifiziert werden. Auffällig war, dass die Substanz (R,R)-Bis $\{2-[1-(methylamino)ethyl]phenyl\}$ diselenid, im Folgenden zur Vereinfachung als 57A12 bezeichnet, sowohl auf die *Pf*GDH1 als auch die *Pf*GDH2 inhibitorische Wirkung zeigte. Aufgrund der geringen Verfügbarkeit dieser Substanz war
weder eine Reproduktion dieser, noch die Bestimmung der IC_{50} Werte möglich. Daher wurde anschließend über *Docking*-Analysen versucht, Hinweise zur Ursache der unterschiedlichen Hemmbarkeit der jeweiligen GDH durch die identifizierten Inhibitoren zu finden (s. Punkt 4.7).

Weiterhin wurden die Substanzen Bithionol, Hexachlorophen und GW5074, die bereits als gute Inhibitoren der humanen GDH beschrieben wurden [Li *et al.*, 2009], an der *Pf*GDH1 und der *Pf*GDH2 getestet. Eine Auflistung der Ergebnisse wurde in Tabelle 4.7 vorgenommen.

Tab. 4.7: Hemmkinetische Daten für die Substanzen Bithionol, GW5074 und Hexachlorophen auf die boGDH und die GDH1 und GDH2 aus *P. falciparum*.

	Bithionol	GW5074	Hexachlorophen
	IC ₅₀ in µM	IC ₅₀ in µM	
		[−] → → → → → → → → → → → → →	
boGDH	4,8*	1,5*	$IC_{50} = 3.9 \ \mu M^*$
<i>Pf</i> GDH1	> 120	> 150	15 % Hemmung bei 16 μM
<i>Pf</i> GDH2	25,2	13,9	80 % Hemmung bei 16 μM

* [Li et al., 2009]

Tab. 4.8: Aminosäuren, die mit Bithionol, GW5074 und Hexachlorophen in der boGDH und der GDH1 und GDH2 aus *P. falciparum* wechselwirken. Die Ergebnisse für die Enzyme des Malariaerregers basieren auf Analysen der modellierten Komplexe durch Überlagerung dieser mit der jeweiligen Kristallstruktur des bovinen Enzyms.

Inhibitor	Aminosäurereste			
	boGDH	<i>Pf</i> GDH1	<i>Pf</i> GDH2	
Bithionol	MonA: E142, K143,	MonA: Q145, A146,	MonA: K206, Q209,	
	R146, R147, D181, S185	N149, G178, Q179,	S210, T213, G242,	
	MonE: R146, R147	K182	Q243, K246, L510	
		MonE: wie A	MonE: K206, Q209,	
			S210, T213, Q243	
GW5074	MonA: E142, R146,	MonA: L141, Q145,	MonA: L205, K206,	
	R147, M150, D181,	N149, G178, Q179,	Q209, S210, T213,	
	S185	K182, I183	Q243, K246, L247	
	MonE: E142, R146,	MonE: Q145, A146,	MonE: K206, Q209,	
	R147, M150, T182,	N149, G178, Q179,	S210, T213, Q243,	
	S185, T186	K182, I183	K246, L247	
Hexachlorophen	MonA: A153, I158,	MonA: Y152, I183,	MonA: F216, R217,	
	T186, I187, Y190, Y183	V184, N185	I219, L247, K248, N249	
	MonE: M150, A153,			
	K154, G156, T186, I187,			
	H189, Y190			

4.7 Docking-Lösungen

Die für das Docking verwendeten Kristallstrukturen der jeweiligen Glutamat-Dehydrogenase, die Strukturen der Liganden sowie wurden im Programm SYBYL 7.2 [http://www.tripos.com] für das Docking vorbereitet. Dies beinhaltete zum einen das Entfernen Wassermolekülen und zum anderen die Zuordnung von optimaler Protonierungszustände für saure und basische Aminosäuren. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die Carboxylgruppen von Glutamat und Aspartat deprotoniert, Lysine und Arginine jedoch protoniert vorlagen. Des Weiteren wurden über eine adäquate Funktion des Programms jeweils die Ladungen nach Gasteiger & Marsili berechnet. Glutamat und NADP(H) waren während des Docking-Prozesses nicht in den Strukturen enthalten. Die Untersuchungen wurden jeweils an einem Monomer der Enzyme vorgenommen.

Die Liganden, die in die Proteinstrukturen eingepasst werden sollten, wurden zunächst mit Hilfe des dem Programm SYBYL eigenen Kraftfeldes (TRIPOS forcefield) energetisch minimiert. Für das *Docking* mit GOLD musste zusätzlich ein Atom der verwendeten Proteinstruktur angegeben werden, um welches in einem Radius von 10 Å die Bindetasche definiert wurde. Die angegebenen Atome für die jeweilige Struktur sind in Tabelle 4.9 aufgelistet. Die Ergebnisse wurden in PyMOL graphisch dargestellt und analysiert.

Proteinstruktur	Definiertes Atom
<i>Pf</i> GDH1	NZ 1182 (Lys125)
PfGDH2	NZ 1092 (Lys189)
hGDH	NZ 967 (Lys130)

Tab. 4.9: Atome zur Definition der Bindetasche für die jeweilige Proteinstruktur.

In den Abbildungen 4.22 A bis 4.22 C sind die einzelnen Strukturen der verwendeten Kristallstrukturen mit den von GOLD definierten Bindetaschen dargestellt.

A





Abb. 4.22 Definierte Bindetaschen (rot) in den Kristallstrukturen der hGDH (A), der *Pf*GDH1 (B) und der GDH2 aus *P. falciparum* (C). (In Oberflächen-Darstellungsweise)

In den aufgezeigten Abbildungen ist zu erkennen, dass die Bindetaschen ähnlich definiert wurden. In allen Strukturen wurde von GOLD lediglich eine Region definiert, die die Merkmale einer Bindetasche aufweist. Sie befindet sich in dem bereits beschriebenen Spalt, in welchem die Glutamat-Bindestelle lokalisiert ist. Für die *Docking*-Studien wurden Liganden verwendet, die während der vorliegenden Arbeit in hemmkinetischen Tests bestimmt wurden. Damit sollte untersucht werden, ob und wodurch eine speziesspezifische Hemmbarkeit der GDH auf atomarer Ebene erklärt werden kann.

Bei der Betrachtung der *Docking*-Ergebnisse wurde deutlich, dass die jeweiligen Inhibitoren auf unterschiedliche Weise in die Bindetaschen der drei untersuchten Enzyme eingepasst wurden. Exemplarisch sind in den Abbildungen 4.23 A bis 4.23 D die jeweiligen Strukturen dargestellt, in welche der Ligand 57D02 eingepasst wurde.





Abb. 4.23 *Docking*-Ergebnisse für den Liganden 57D02. Oberflächendarstellung der definierten Bindetasche der A) *Pf*GDH2, C) *Pf*GDH1, D) hGDH. B) In die Bindetasche der *Pf*GDH2 modelliertes Glutamat aus *C. symbiosum*.

Diese Substanz bewirkte in hemmkinetischen Untersuchungen eine Inhibition der PfGDH2 um 80 %, wohingegen bei der PfGDH1 als auch der hGDH keine Hemmeffekte auftraten. Anhand der oben gezeigten Abbildungen wird deutlich, dass der Ligand 57D02 in der PfGDH2 an der Stelle positioniert wurde, an welcher die Glutamatbindung stattfindet. Dazu wurde im Vergleich ein Glutamatmolekül der Kristallstruktur des bakteriellen Enzyms aus *C. symbiosum* mit entsprechenden Koordinaten in die PfGDH2 Struktur modelliert. Im Gegensatz dazu konnten optimale Bindungseigenschaften dieses Liganden in der PfGDH1 an einer zur Glutamatbindestelle unterschiedlichen Position gefunden werden. In der hGDH wurde 57D02 ähnlich wie in der PfGDH2 Struktur platziert. Ein Vergleich der an der Koordinierung dieses Liganden beteiligten Aminosäurereste in der PfGDH2 und der hGDH zeigt jedoch, dass in der hGDH deutlich mehr Wechselwirkungen zwischen dem Liganden und dem Protein realisierbar sind als in der PfGDH2 (s. Abb. 4.24).



Abb. 4.24: Aminosäurereste, die den Liganden 57D02 koordinieren. A) PfGDH2 B) hGDH.

Eine Überlagerung der *Pf*GDH1 mit der *Pf*GDH2 einschließlich der *Docking*-Lösung für den 57D02 zeigt, dass in beiden Proteinstrukturen identische Aminosäurereste zur Verfügung stehen, jedoch durch sterische Hinderungen diese Lösung für die *Pf*GDH1 nicht gefunden werden konnte.



Abb. 4.25: Docking-Lösung für den Liganden 57A12 für A) PfGDH2, B) PfGDH1, C) hGDH.

Auch die unterschiedliche Hemmung der drei Enzyme durch den selenhaltigen Liganden 57A12 ist durch die Lösungen der *Docking*-Analyse nicht eindeutig zu klären (s Abb. 4.25). Ein möglicher Ansatzpunkt könnte darin liegen, dass dieser Ligand lediglich in der *Pf*GDH2 so positioniert ist, dass er durch Asp229 in der Bindetasche koordiniert wird. Da diese Substanz aber auch Hemmung auf die *Pf*GDH1 zeigte, ist dieser Erklärungsansatz jedoch nicht ausreichend. Allerdings könnte über diesen Mechanismus auch die Inhibition durch 57A09 erklärt werden, der auf ähnliche Weise in die Bindetasche der *Pf*GDH2 eingepasst wurde.

5 Diskussion

5.1 Bewertung der Genexpression und Aufreinigungsoptimierung für die *Pf*GDH2

In dieser Arbeit wurde die *Pf*GDH2 erstmals sowohl kinetisch als auch strukturell charakterisiert. Nach erfolgreicher Klonierung eines N-terminal um 49 Aminosäuren verkürzten Konstruktes im *tet*A-Promotorsystem und einer Proteinaufreinigung mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie konnte eine sehr homogene Proteinlösung mit großer Proteinausbeute erhalten werden. Ein weiterer Aufreinigungsschritt über eine präparative Gelfiltration führte zu einer nahezu 100 %ig reinen Proteinlösung. Ebenso konnte über dieses Verfahren die Oligomerisierung der *Pf*GDH2 zu katalytisch aktiven Hexameren mit einem Molekulargewicht von etwa 324 kDa nachgewiesen werden. Die Bestimmung der kinetischen Parameter K_m, V_{max}, k_{cat}/K_m und der spezifischen Aktivität ergab, dass die *Pf*GDH2 mit zur *Pf*GDH1 ähnlichen Substrat- und Cofaktor-Konzentrationen arbeitet (s. Tab. 5.1).

Tab. 5.1: Kinetische Parameter der *Pf***GDH1 und** *Pf***GDH2 im Vergleich.** Die kinetischen Daten wurden, wie unter Punkt 3.2.14 beschrieben, in 100 mM Kaliumphosphatpuffer und 1 mM EDTA ermittelt. Die spezifische Aktivität bezieht sich auf die Enzymaktivität, die unter Standardbedingungen im *Pf***GDH-Assay bestimmt wurde**.

	PfGDH1 (Wagner	<i>Pf</i> GDH1	<i>Pf</i> GDH2
	et al., 1998)	(His_6-tag)	(His ₆ -tag)
K_m Glutamat (μ M)	1,050 +/- 250	1,000 +/- 200	1,500 +/- 150
$K_m \alpha$ -Ketoglutarat (μ M)	365 +/- 25	340 +/- 34	380 +/- 10
K _m NADPH (μM)	12 +/- 1	21 +/- 5	28 +/- 2
$K_m NADP^+(\mu M)$	20 +/- 2	26 +/- 5	60 +/- 5
Spezifische Aktivität	9 +/- 1.5	2.7 +/- 0.36	2.5 +/- 0.26
Hinreaktion (U/mg)			
			3.8 (ohne His_6 -tag)
Spezifische Aktivität	61 +/- 5	16.0 +/- 2.2	25 +/- 4.7
Rückreaktion (U/mg)			
k_{cat} Hinreaktion (min ⁻¹)	$4,1 \ge 10^6$	$1,9 \ge 10^2$	$1,7 \ge 10^2$
k _{cat} Rückreaktion (min ⁻¹)	244 x 10 ⁶	$1,2 \ge 10^3$	$1,5 \ge 10^3$
k_{cat}/K_m Hinreaktion (M ⁻¹ min ⁻¹)	$4,5 \pm 1,5 \ge 10^5$	$0,7 \ge 10^2$	$0,68 \ge 10^2$
k_{cat}/K_m Rückreaktion (M ⁻¹ min ⁻¹)	$4,0 \pm 1,0 \ge 10^6$	$0,75 \ge 10^2$	0,60 x 10 ²
Anzahl der Aminosäurereste	470	476	482
Oligomer	Hexamer	Hexamer	Hexamer
NAD	Keine Aktivität	Keine Aktivität	Keine Aktivität
Theoretisches MW (Da)	52 546	53 813	54 024
pI	7,48	7,64	9,09

Sowohl der k_{cat} -Wert, als auch die spezifische Aktivität fielen für dieses Enzym jedoch deutlich geringer aus. Eine ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte

Charakterisierung der über das Histidin-Affinitätssystem rekombinant erhaltenen PfGDH1 und hGDH zeigte, dass auch hier eine geringere spezifische Aktivität im Vergleich zu den für diese Enzyme bisher in der Literatur beschriebenen Werte bestimmt werden konnte. Für den Nachweis eines Zusammenhangs einer N-terminalen Markerstruktur (His₆-tag) und einer damit verbundenen verringerten spezifischen Aktivität wurde beispielhaft an der PfGDH2, sowie in der Masterarbeit von Helga Rogel auch an der hGDH, der Hexahistidyl-tag mittels Thrombin oder Enterokinase entfernt. Anschließend wurden die kinetischen Parameter erneut bestimmt. Durch das Abspalten des N-terminalen Anhangs konnte jeweils mehr als eine Verdopplung der spezifischen Aktivität beobachtet werden. Eine Betrachtung der bis zu diesem Zeitpunkt bereits gelösten Kristallstrukturen der bovinen und ersten plasmodialen GDH ließ vermuten, dass die zusätzlich angefügten Histidine in die Bindetasche hineinragen und dort insbesondere mit Aminosäureresten wechselwirken, die an der Bindung von NADP(H) beteiligt sind. Allerdings konnten auch nach Entfernen des His6-tags die bekannten Literaturwerte für die spezifische Aktivität der hGDH nicht erreicht werden. Es war lediglich eine Verdopplung bis Verdreifachung der Ausgangswerte möglich. Bei einem rekombinant hergestellten Fusionsprotein aus hGDH und N-terminaler GST war auch nach Entfernen des GST-Anteils keine Oligomerisierung des Proteins mehr möglich. Alle erhaltenen Daten sprechen dafür, dass die direkte Faltung der GDH-Proteine während der Translation entscheidend für ihre Funktionalität ist. Aufgrund dieser Ergebnisse ist daher anzunehmen, dass die in dieser Arbeit ermittelten Werte für die spezifische Aktivität der PfGDH2 von denen unterschiedlich sind, die an Enzymen ohne N-terminale Markerstrukturen bestimmt würden.

Auch für die Klonierung der *Pf*GDH2 war die Länge des N-Terminus von entscheidender Bedeutung. Zusätzlich zu einer vorhergesagten Apicoplast-Signalsequenz fand sich bei diesem Protein, ebenso wie für die *Pf*GDH1 beschrieben, eine ausserordentliche Verlängerung des N-Terminus. Während sich diese Verlängerung für die *Pf*GDH1 als nicht essentiell für die Ausbildung eines katalytisch aktiven Hexamers zeigte [Werner *et al.*, 2005], führte die heterologe Überexpression des um 60 Aminosäuren verkürzten *Pf*GDH2-Proteins (*Pf*GDH2₍₋₆₀₎) zum Ausbleiben der Oligomerisierung und damit zum Verlust der Aktivität. Auch ein um lediglich 21 Aminosäuren verkürztes Protein (*Pf*GDH₍₋₂₁₎) konnte nicht als aktives Enzym gewonnen werden. Auch hier lagen ausschließlich Monomere nach Metallchelat-Affinitätschromatographie und Gelfiltration vor. Untersuchungen proteolytischer Effekte durch Chymotrypsin und Trypsin an der bovinen GDH durch Beynon & Kay [1976] ergaben, dass auch bei diesem Enzym der N-Terminus eine ausschlaggebende Rolle innerhalb der Proteinaktiviät einnimmt. Nach Behandlung der bovinen GDH mit Chymotrypsin, zur Abspaltung der ersten zehn N-terminalen Aminosäurereste, konnte eine Aktivierung dieses Enzyms um das drei- bis vierfache gemessen werden [Beynon & Kay, 1976]. Im Gegensatz dazu stellten McCarthy & Tipton [1985] keine signifikanten kinetischen Effekte nach Abspaltung der ersten vier Aminosäurereste fest. Verantwortlich für die Beobachtung dieser Effekte machten Carrigan & Engel [2008] Interaktionen zwischen den Aminosäuren Aspartat 6, Asparagin 7 und Lysin 329. Die Aktivitätssteigerung wurde von den Autoren durch eine Destabilisierung des Enzym-Substrat-Komplexes erklärt, wodurch die die Katalyse limitierenden abortiven Komplexe schneller entlassen werden könnten.

5.2 Die *Pf*GDH1 und *Pf*GDH2 im Vergleich

Die dreidimensionale Struktur der *Pf*GDH2, die anhand von Kristallen orthorhombischer Symmetrie bestimmt werden konnte, weist eine den GDH-Strukturen der S_50₁ Familie ähnliche Anordnung der Sekundärstrukturmerkmale [Miñambres *et al.*, 2000] auf. Die erhaltene Strukur entspricht der Apo-Form des Enzyms, da sie weder im Komplex mit dem Substrat noch mit dem Cofaktor vorliegt. Im Vergleich mit der *Pf*GDH1 [2BMA; Werner *et al.*, 2005] liegt die *Pf*GDH2 jedoch in einer stärker geöffneten Konformation vor, die sich in einem vergrößerten Winkel der ersten und zweiten Domäne zueinander ausdrückt. Geschlossene Konformationen, hauptsächlich begründet durch die Bindung von Substrat und Cofaktor, konnten beispielsweise für die bovine GDH gezeigt werden [Peterson *et al.*, 1999]. In Bezug auf diese Kristallstrukturen weisen sowohl die *Pf*GDH1 als auch die *Pf*GDH2 eine offenere Konformation auf. Die im Vergleich zur *Pf*GDH1, die ebenfalls in ihrer Apo-Form kristallisiert wurde, stärker geöffnete Konformation der *Pf*GDH2 lässt sich in diesem Fall als vorwiegend kristallographisches Artefakt erklären.

Eine Überlagerung des aktiven Zentrums der dreidimensionalen PfGDH2-Struktur mit der Kristallstruktur der PfGDH1 (2BMA) und der bovinen/humanen GDH ergab, dass die Aminosäurereste im aktiven Zentrum hochkonserviert und daher auch identisch positioniert sind (s. Abb. 5.1), abgesehen von den bereits beschriebenen durch die Verschiebung betroffenen Aminosäureresten der zweiten Domäne (s. Tab. 5.2). Das Erzeugen einer geschlossenen Konformation der PfGDH2 durch Überlagerung der jeweiligen Domäne mit der entsprechenden Domäne des bovinen Enzyms zeigte, dass dadurch die Position der an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste erreicht werden kann. Innerhalb des aktiven Zentrums

sind jedoch sowohl bei der GDH1 als auch der GDH2 aus *P. falciparum* zwei Aminosäurereste, die an der Bindung von Glutamat beteiligt sind, im Vergleich zur humanen GDH, ausgetauscht. Hierbei handelt es sich um Gln174 (= Met115 hGDH) und Gly228 (= Pro171 hGDH). Auch die Aminosäuresequenz der GDH aus *Clostridium symbiosum* entspricht in dieser Hinsicht eher den plasmodialen Enzymen. Eine Veränderung der Bindungseigenschaften von Glutamat sollte sich daraus jedoch nicht ergeben.

Tab. 5.2: Aminosäurereste, die an der Koordinierung von Glutamat und NADP⁺ beteiligt sind. In Klammern wurden die Aminosäuren der Enzyme angegeben, die NAD⁺ als Cofaktor nutzen und daher nicht auf den Ladungsausgleich der Phosphatgruppe angewiesen sind. Die dargestellten Aminosäurereste für die *Pf*GDH3 wurden aus Aminosäuresequenzvergleichen mit homologen Proteinen erhalten.

	<i>Pf</i> GDH1	PfGDH2	<i>Pf</i> GDH3	hGDH	BoGDH	CsGDH
Wechselwirkung mit der γ- Carboxylat-Gruppe des	Lys112	Lys153	Lys639	Lys94	Lys90	Lys89
Substrates	Ser401	Ser442	Ser1157	Ser385	Ser381	Ser380
Wechselwirkung mit der α- Carboxylat-Gruppe des	Gln133	Gln174	Asp677	Met115	Met111	Gln110
Substrates	Lys136	Lys177	Glu680	Lys118	Lys114	Lys113
Koordinierung der Amino-	Gly187	Gly228	Lys792	Pro171	Pro167	Gly164
Gruppe des Glutamates	Asp188	Asp229	Asp793	Asp172	Asn168	Asp165
Ladungsausgleich der 2'-	Ser284	Ser325	(Gly1007)	Ser280	Ser276	(Pro262)
Phospat-Gruppe in der Nucleotidbindestelle	Lys156	Lys197	(Arg714)	Lys138	Lys134	(Asn133)
	Lys306	Lys347	(Arg1029)	Lys299	Lys295	(Arg285)
Katalytisch aktives Lysin	Lys148	Lys189	Lys692	Lys130	Lys126	Lys125



Abb. 5.1: Aminosäurereste, die an der Koordination von NADP⁺ (links) und Glutamat (rechts) beteiligt sind.

Die deutlichsten Unterschiede der PfGDH2 zur PfGDH1 konnten in den Kontakten der einzelnen Monomere untereinander beobachtet werden. Im Gegensatz zur PfGDH1, zu deren Monomer-Monomer-Interaktion 14 geladene Aminosäurereste beitragen [Werner et al., 2005], sind es in der PfGDH2 etwa acht. In dieser Eigenschaft ist das zweite Isoenzym des Erregers der hGDH ähnlicher als seinem Homolog in P. falciparum. Monomere der humanen GDH wechselwirken hauptsächlich über hydrophobe Interaktionen miteinander und zudem sind keine geladenen Aminosäurereste an jeglichen Wechselwirkungen beteiligt. Aufgrund dieser Resultate und zur Bestätigung dieser, wurden die drei Substanzen Bithionol, GW5074 und Hexachlorophen and der PfGDH1 und der PfGDH2 getestet. Li et al. [2009] beschrieben nicht-kompetitiv wirkende Inhibitoren diese drei als der Säuger-GDH. Eine röntgenkristallographische Analyse von Enzym-Ligand-Komplexen dieser Substanzen mit dem bovinen Enzym ergab, dass sie im Zentrum des Hexamers, im Falle von Hexachlorophen, beziehungsweise jeweils zwischen zwei Monomeren, für Bithionol und GW5074, binden. Der bereits in der Einleitung unter Punkt 1.3.2 beschriebene Katalyse-Mechanismus der Säuger-GDH und die damit verbundene Veränderung der Konformation werden durch die Bindung dieser Inhibitoren unterbunden, worüber diese ihre inhibitorische Wirkung ausüben. Durch das Schließen des katalytischen Spaltes während der Bindung von Substrat und Cofaktor scheint das gesamte Hexamer komprimiert zu werden [Li et al., 2009]. Da sich die drei Paare der Monomere, die jeweils aufeinander liegen, als starre Einheit bewegen, wird dadurch das Zentrum des Hexamers gestaucht und der zuvor vorhandene Hohlraum schließt sich. Dieser, auch als GDH-Atmung bezeichnete Vorgang, wird durch das Binden der drei erwähnten Hemmstoffe unterdrückt, so dass in diesem Fall eine mechanistische Hemmung der Katalyse erreicht wird. Die Bindung der Inhibitoren erfolgt hauptsächlich in dem Bereich, in dem die an der bereits beschriebenen Monomer-Monomer-Interaktion beteiligten Aminosäurereste lokalisiert sind. Wie erwartet, konnte mit den vorwiegend hydrophoben Wirkstoffen eine stärkere Inhibition der PfGDH2 gegenüber der PfGDH1 erreicht werden. Durch die Analyse struktureller Veränderungen, die an der boGDH während der Bindung der Inhibitoren stattfinden, konnte weiterhin festgestellt werden, dass während dessen die Position des C-Terminus ändert. Dazu werden sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Tyr493 und Gly497 sowie zwischen N494 und A496 gelöst. Nach Bindung der Inhibitoren wird eine Bewegung des C-Terminus in Richtung des N-Terminus deutlich, wodurch neue Wasserstoffbrückenbindungen ausgebildet und die neu erhaltene Konformation stabilisiert werden kann (s. Abb. 5.2). Diese Bewegung des C-Terminus ist für die Bindung der drei beschriebenen Inhibitoren von entscheidender Bedeutung, da nur so die Bindestelle für diese freigegeben wird. In den plasmodialen GDH ist eine derartige Bewegung nicht nötig, da eine unterschiedliche Grundkonformation des C-Terminus vorliegt, die sich nicht störend auf den Zugang zur Bindestelle auswirkt (s. Abb. 5.3).



Abb. 5.2: Verhalten des C-Terminus der boGDH nach Bindung der Inhibitoren Hexachlorophen, Bithionol und GW5074. A) Überlagerung der Kristallstruktur der boGDH [1HWX] (grün) mit der Kristallstruktur dieses Enzyms im Komplex mit GW5074 [3ETG] (magenta). B) Oberflächendarstellung der überlagerten Strukturen. In der linken Abbildung ist die ursprüngliche Position des C-Terminus deutlich erkennbar. In der rechten Abbildung wurde die veränderte Position des C-Terminus nach Bindung der Inhibitoren dargestellt.



Abb. 5.3: Überlagerung der *Pf*GDH2 (türkis) mit der Kristallstruktur des Protein-Inhibitor-Komplexes **3ETG der boGDH (magenta).** Sowohl im linken als auch im rechten Bild ist deutlich zu erkennen, dass der C-Terminus der *Pf*GDH2 keine Hinderung für den Zugang zur Bindestelle darstellt.

Ein weiteres Ergebnis zur Kommunikation der einzelnen Untereinheiten in der *Pf*GDH2 verglichen zur *Pf*GDH1 wurde durch Inkubation des Enzyms bei 80 °C erhalten. Während die *Pf*GDH1 nach zehn Minuten unter diesen Temperaturen stabil bleibt, konnte für die *Pf*GDH2 bereits nach drei Minuten ein starkes Präzipitat festgestellt und somit auch keine Aktivität mehr nachgewiesen werden.

5.3 Lokalisation der Glutamat-Dehydrogenasen in *P. falciparum*

Neben den bereits beschriebenen strukturellen Unterschieden der ersten zwei Isoenzyme der GDH in *Plasmodium falciparum*, ist ein weiteres Kriterium ihre differierende Lokalisation. Subzellulären Lokalisationsstudien, mit Fusionsproteinen aus N-terminalem GFP und den ersten 66 Aminosäuren der jeweiligen plasmodialen GDH zufolge, lokalisiert sowohl die *Pf*GDH1 als auch die *Pf*GDH3 im Cytosol des Erregers. Durch Co-Lokalisation der *Pf*GDH2 mit dem Apicoplast-spezifischen Protein ACP (*acyl-carrier-protein*) wurde dieses Organell als Wirkort des Enzyms bestimmt.

Die subzelluläre Lokalisation wichtiger redox-regulatorischer Proteine durch Kehr *et al.* [2010] erbrachte eine erste Übersicht über die Kompartimentierung des Redoxnetzwerkes in *Plasmodium falciparum.* Zusätzlich zu der in der vorliegenden Arbeit untersuchten *Pf*GDH2 konnten auch zwei Peroxiredoxine (AOP = *antioxidant protein* und TPx_{Gl} = *peroxidase-like thioredoxin peroxidase*) und Proteine des Glyoxalase-Systems (GILP = *glyoxalase-1-like protein* und tGloII = *glyoxalase II* mit Signalsequenz) im Apicoplasten lokalisiert werden.

Weiterhin wurde beobachtet, dass eine Isoform der *Pf*GR, wahrscheinlich über alternative Translationsinitiation gesteuert, ebenfalls in den Apicoplasten transportiert wird. Inwiefern die einzelnen redoxaktiven Komponenten dieses Organells miteinander interagieren oder voneinander abhängig sind, kann nur in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

5.4 *Pf*GDH3

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des vollständigen PfGDH3 Proteins, mit bereits in der Datenbank vorhandenen Proteinsequenzen, ergab das im Anhang dargestellte Profil. Die PfGDH3 weist im Bereich der Aminosäuren 850 bis 1 350 eine stärkere, als auch im Bereich der Aminosäuren 1 bis 650 eine moderate Ähnlichkeit zum einen zu NAD⁺-abhängigen Glutamat-Dehydrogenasen anderer Plasmodienspezies, als auch zu den Enzymen aus anderen Apicomplexa, wie Theileria, Babesia und Toxoplasma, auf. Auch zu NAD⁺-spezifischen GDH aus Pilzen der Klasse Ascomycota (Schlauchpilze), wie Penicillium, Aspergillus, Neurospora und Saccharomyces können Ähnlichkeiten überwiegend zum letzten Drittel der PfGDH3-Sequenz gefunden werden. Die Suche nach bekannten Domänen innerhalb der PfGDH3-Proteinsequenz in der CDD (Conserved Domain Database) [Marchler-Bauer et al., 2009] gab Hinweise auf das Vorliegen einer allgemeinen Aminosäure-Dehydrogenase $NAD(P)^+$ Domäne sowie einer speziellen Bindedomäne **ELFV** von (Glutamat/Leucin/Phenylalanin/Valin)-Dehydrogenasen (s. Abb. 5.4).



Abb. 5.4: Darstellung der Domänen, die innerhalb der PfGDH3 Sequenz identifiziert wurden.

Verglichen mit den beiden anderen Isoenzymen des Malariaerregers, teilt die *Pf*GDH3 18 % Aminosäuresequenzidentität mit der *Pf*GDH1 und 15 % mit der *Pf*GDH2. Die größte Homologie war in beiden Fällen in den Regionen im Protein erkennbar, die an der Ausbildung des katalytischen Zentrums (der Nucleotidbindedomäne und der Glutamatbindung) beteiligt sind (s. auch Tab. 5.2). In der Aminosäuresequenz der *Pf*GDH3 fand sich ein Bereich (AS 650-850), der nur ihr eigen und selbst in Glutamat-Dehydrogenasen 109 verwandter Plasmodienarten nicht vorhanden ist. Auffällig ist, dass in diesen Bereichen überdurchschnittlich viele Asparagine aber auch Glutamate zu finden sind (s. Sequenz im Anhang).

In der vorliegenden Arbeit, aber auch den Masterarbeiten von Anne Weiland und Helga Rogel, wurden vielfältige Versuche unternommen, das *full-length* Protein, aber auch Teilstücke der *Pf*GDH3, rekombinant herzustellen. Für die Herstellung des *Pf*GDH3_(2P) Proteins wurde der bereits beschriebene charakteristische mittlere Bereich entfernt, während das *Pf*GDH3_(MID) Protein hauptsächlich diesen Bereich beinhaltete. Das Protein *Pf*GDH3_(END) enthielt vorwiegend das hochkonservierte Endstück des Enzyms.

Das full-length Protein der Glutamat-Dehydrogenase aus P. falciparum besteht aus 1 397 Aminosäuren, woraus sich ein theoretisches Molekulargewicht von etwa 160 kDa ergibt. Im Allgemeinen wird die Isolierung als auch die Reinigung größerer Moleküle mit einem Molekulargewicht größer 150 kDa als schwierig beschrieben [Lottspeich, 1998]. Anhand der Abbildung 5.5 wird ersichtlich, dass kein effizientes Trennverfahren für Moleküle dieser Größe zur Verfügung steht. Jedoch ist die Trenneffizienz einer Methode nicht immer der ausschließlich relevante Parameter. Bei der unter Punkt 3.2.5 beschriebenen Methode der Affinitätschromatographie über immobilisierte Metallchelate beispielsweise, steht hauptsächlich die Selektivität im Vordergrund. Daher wurde auch für die PfGDH3 und ihre drei Teilkonstrukte die Klonierung dieser Proteine mit N-terminaler Hexahistidyl-Markerstruktur vorgenommen.



Abb. 5.5: Effizienz verfügbarer Trennmethoden für Biomoleküle unterschiedlicher Größe [Lottspeich, 2005].

Weder die heterologe Überexpression der *Pf*GDH3 in prokaryotischen *E. coli* BL21, BL21star, C41, oder M15 Zellen, noch der Versuch im eukaryotischen Hefe-Expressionssystem, führten zu rekombinantem Protein. Da das Parasitengenom durch einen geringen GC-Gehalt charakterisiert ist (AT-Gehalt 82 %) [Weber *et al.*, 1987], können *E. coli* Zellen die eingebrachten, artfremden Gene nicht immer effizient ablesen. Aus diesem Grund wurde zur Verbesserung der *codon usage* das Helferplasmid pRAREII eingesetzt. Jedoch zeigte sich auch hier keine nachweisliche Bande im Western Blot. Auch die von Miñambres *et al.* [2000] beschriebene Expressionssteigerung durch Zugabe von Substrat in das Kulturmedium der GDH aus *S. clavuligerus*, führten in ähnlichen Versuchen an der *Pf*GDH3 nicht zum gleichen Effekt.

Lediglich für das Konstrukt der PfGDH3_(END) zeigte sich ein rekombinant erzeugtes Produkt, welches mittels Western Blot nachgewiesen werden konnte. Da Glutamat-Dehydrogenasen jedoch nur in oligomerem Zustand Aktivität zeigen, konnte für das erhaltene PfGDH3_(END) Protein erwartungsgemäß keine Reduktion von NAD⁺ oder NADP⁺ im GDH-Assay beobachtet werden.

Die erhaltenen Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass das *Pf*GDH3 Protein *in vivo* womöglich gar nicht exprimiert wird. Proteom- und massenspektrometrische Analysen unterschiedlicher Stadien *Plasmodium falciparums* – Ookinet, Gametozyt, Trophozoit, Schizont – ergaben jedoch, dass jeweils kleine Abschnitte der *Pf*GDH3-Aminosäuresequenz nachweisbar waren [persönliche Mitteilung, Dr. Helena Prieto, *Scripps Research Institute*, La Jolla, CA, USA]. Hierbei handelte es sich hauptsächlich um Peptide, die jeweils im Bereich der letzten 200 Aminosäuren lagen und damit etwa 15 % der gesamten Sequenz des Proteins abdeckten.

5.4.1 Prädiktive Sequenzvergleiche zur Analyse der PfGDH3 Funktion

Durch die bereits diskutierten Schwierigkeiten in Bezug auf die Überexpression der *Pf*GDH3 bedingt, konnten weder enzymkinetische noch strukturelle Untersuchungen an diesem Protein erfolgen. Ebenso waren *in silico* Experimente zur Generierung eines dreidimensionalen Strukturmodells der *Pf*GDH3 dadurch ausgeschlossen, dass bisher keine Kristallstruktur eines homologen Enzyms aufgeklärt wurde. Zusätzlich wurden Analysen mit dem *de novo* Strukturvorhersage-Programm ROBETTA [www.bakerlab.org] durchgeführt, die aufgrund der enormen Größe der *Pf*GDH3 aber ebenfalls abgebrochen wurden.

Um dennoch Kenntnisse über strukturelle und kinetische Beschaffenheiten der *Pf*GDH3 zu erhalten, wurde ein Vergleich mit den Ergebnissen zu den Glutamat-Dehydrogenasen der

GDH_L Familie anderer Organismen angestellt. Hierzu diente hauptsächlich die Veröffentlichung von Miñambres *et al.* [2000]. Die Autoren beschrieben mit der GDH aus *Streptomyces clavuligerus* erstmals ein hexameres Enzym der GDH L_180 Klasse, mit einem entsprechenden Molekulargewicht von 183 kDa pro Untereinheit. Weiterhin bestimmten sie an dem nativ aufgereinigten Protein enzymkinetische Parameter mit einem $K_m = 1,33$ mM für α -Ketoglutarat und 19,87 μ M für NADH. Der K_m -Wert für Ammoniak lag bei diesem Enzym bei 33,9 mM. Anhand einer Mehrfachüberlagerung der Aminosäuresequenz dieses Proteins mit denen bekannter GDHs, konnten die an der Katalyse maßgeblich beteiligten Aminosäurereste identifiziert werden. Die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene Überlagerung der *Sc*GDH-Sequenz mit der Sequenz der *Pf*GDH3 zeigt, dass auch hier die essentiellen katalytischen Aminosäuren konserviert sind. Der Sequenzvergleich mit entsprechender Markierung ist in Abbildung 5.6 dargestellt.

PfGluDH3 ScGluDH	480 762	SSLASSSSSCSSSFSLHSYLSGSYESPYYHHNKDSKDIIDEIEDNHDKKI LDGALDQVASLDEDRI :*:::*	529 777
PfGluDH3 ScGluDH	530 778	LQYFYMFEKYALKTNFFLTHKISLAVAFDGALLKDSIYEAQP LRSFLTVIKATLRTNFFQGTTGDGVDGRHGYVSMKFDPQAIPDLP-APRP *: * . * :*:**** . ::: ** : * .:*	571 826
PfGluDH3 ScGluDH	572 827	YSIIMILGLHFVGFHIRFSKISRGGVRIVISNNVNSYMHNSDNLFDEAYN AYEIWVYSPRVEGVHLRFGKVA <mark>RGGLR</mark> WSDRREDFRTEILG * : . :. *.*:**.*:***:* ::: * .	621 868
PfGluDH3 ScGluDH	622 869	LAYTQNFKNKDIPEGGSKG-IILLDADVCNVANTKYI-KNLS-FYSYVNS LVKAQMV <mark>K</mark> NTVIVPVGAKGGFVAKQLPDPSVDRDAWLAEGIACYRTFISA *. :* .**. * *:** :: .* .: :: ::::::	668 917
PfGluDH3 ScGluDH	669 918	ILDLLINEDLNEESASSISVHSTKGANNTTITFDNVMSSVENMVDRGGVE LLDITDNMVGGEV-VPPADVVRHD :**: * .**	718 940
PfGluDH3 ScGluDH	719 941	GEHLNITLPYDANMACNNNTTNDNLSNMHDTYNLNNSGEATLDHHS GDDTYLVVAADKGTASFSDIANEVALAYGFWLGDAFASGGSAGYDH *:. : * . *: :*: : * :*.* **	764 986
PfGluDH3 ScGluDH	765	VDNRIVSNSSGTNNMNAQKGEGEDEKAKDKEMSNNRKNEENERKRCDNVS	814
PfGluDH3 ScGluDH	815 987	NSNYNYVNGTTEDAVQKIMGSKCKGGRNNNGEEKDGDMNGHNNNNNDNNN <mark>KGMGITARGAWESVERHFRELGHDTQTQDFTV</mark> * ***. *:. *:. **:*	864 1018
PfGluDH3 ScGluDH	865 1019	IDDDEHIEECYKGAGCVINGENKTRKMILQEKMNEEEDLIFLGPDE VGVGDMSGDVFGNGMLLSEHIRLVAAFDHRHIFIDPAP:*:*:*	910 1056
PfGluDH3 ScGluDH	911 1057	NTGSDQLMDWACIIAKKRKYPYWKTFSTGKLRKNGGV DAATSYAERRRLFELPRSSWADYNKELLSAGGGIHPRTAKSI * * *::*: . * : * .** :	947 1098

PfGluDH3	948	PHDMYGMTTLGIETYISKLCEKLNIKEESISRSLVGGPDGDLGSNAILQS PVNAQVRAALGIEAGITKMTPA * : ::****: *:*: .: *::: .* .** :	997
ScGluDH	1099		1141
PfGluDH3	998	KTKIISIIDGSGILYDKQGLNKEELIRLAKRRNNKDKSKAITCCTLYDEK YVKA*	1047
ScGluDH	1142		1145
PfGluDH3	1048	YFSKDGFKISIEDHNVDIFGNKIRNGLDFRNTFFLNPLNKCELFNPCGGR	1097
ScGluDH	1146	<mark>SSESNADV-GDKAN</mark>	1158
PfGluDH3 ScGluDH	1098 1159	PHSINIFNVNNIIKNG-ECIYKYIVEGANVFISDDARNILESKNVILFKD <mark>DPIRVNGDELRVKVVGEGGNLGLTQLGRIEFDRNGGKVNTD</mark> : * ** * * : **.*: ::: .* :: :. : .*	1146 1199
PfGluDH3 ScGluDH	1147 1200	AATNKGGVISSSLEVLAGLVLDDKQYIDYMCSPDSDILQVA AID <mark>NSAGVDTSDHEVNIKILLNALVTEGDLTLKQRNILLAQMTDEVGALV</mark> * *** :*. ** ::*: . : : : :**.	1186 1249
PfGluDH3	1187	DENEINFVHQNQKMNHSLSFKRGSINN	1213
ScGluDH	1250	LRNNYAQNVALANAVSQSTSLVHAHQRYLRKLV-RDGALDRSLEFLPTDR	1298

Abb. 5.6: Sequenzvergleich der *Pf*GDH3 mit der GDH aus *Streptomyces clavuligerus*. Die GDH Domäne innerhalb der vorliegenden Sequenz setzt sich wie folgt aus zwei Subdomänen zusammen: aus der Glutamatbindenden Domäne (Sub-Domäne I) und der Dinucleotid-bindenden Region (Sub-Domäne II). Die erste Subdomäne, die für die *S. clavuligerus* GDH beschrieben wurde, ist in grau unterlegt, während die Aminosäuren der zweiten Subdomäne gelb unterlegt sind. Die rotgefärbten Aminosäurereste sind an der Koordination des Glutamates beteiligt, die blau gekennzeichneten an der Bindung von NAD⁺. Aminosäurereste, die an der Bindung beider beteiligt sind, sind schwarz unterlegt. Die $\beta\alpha\beta$ -Faltung ist durch ein Kästchen markiert. Die Aminosäuren 815 bis 1 253 der *Sc*GDH stellen den GDH-Kernbereich dar.

 Tab. 5.3 Vergleichende Analyse unterschiedlicher Mitglieder der L_180 GDH Klasse [Miñambres et al., 2000].

Organisms	No.	Amino acids	Mass	Identity	Accession data bank
			Da	%	
S. clavuligerus	1	1,651	183,354	100	AF218569
C. crescentus	2	1,607	176,496	40.8	TIGR
P. aeruginosa	3	1,620	182,637	44.3	TIGR
P. putida	4	1,621	182,491	43.2	TIGR
S. putrefaciens	5	1,614	182,332	45.0	TIGR
V. cholerae	6	1,613	183,559	42.7	TIGR
M. tuberculosis	7	1,624	176,899	43.5	CAA16053
M. bovis	8	1,623	176,798	43.5	TIGR
M. avium	9	1,617	177,097	44.3	TIGR
M. leprae	10	1,622	177,875	41.8	CAB43156
R. prowazekii	11	1,581	181,383	28.7	CAA15186

Verglichen zur Aminosäuresequenz der GDH aus *S. clavuligerus* weist die *Pf*GDH3 45 % Aminosäuresequenzidentität auf. Die Auswertung der über die prädiktiven Betrachtungen erhaltenen Ergebnisse zur *Pf*GDH3 lassen vermuten, dass sie eher der L_180 GDH als der L_115 Famie zugeordnet werden kann und damit wahrscheinlich NADH als Cofaktor nutzt.

5.5 Suche nach Inhibitoren für die GDH

Ein gutes Medikament gegen Malaria zeichnet sich laut Sadanand [2010] dadurch aus, dass es gegen Plasmodien in intraerythrozytären Stadien, auch resistenter Stämme, wirkt. Weiterhin sollte es leicht und kostengünstig herzustellen und gut verträglich sein. Derzeit werden weltweit hauptsächlich zwei Methoden angewendet, um neue Wirkstoffe zu identifizieren. Zum einen das "whole parasite" Screening, bei welchem Substanzbibliotheken an kultivierten Parasiten getestet werden. Zum anderen wird an zuvor definierten drug targets des Parasiten ein rationales Wirkstoffdesign durchgeführt. Idealerweise sollten jedoch beide Methoden in Kombination angewendet werden. Nach dem "whole parasite" Screening könnten mögliche Wirkstoffe in klinischen Studien getestet und währenddessen, mit Methoden des rationalen drug desings, die jeweiligen Wirkmechanismen untersucht werden. Die Bedeutung von "whole parasite" Screenings wurde erst kürzlich durch die Entdeckung einer neuen Klasse, gegen Malaria wirksamer Substanzen, den Spiroindolonen, hervorgehoben [Rottman et al., 2010]. Des Weiteren konnten durch Gamo et al. [2010], durch ein Screening einer GlaxoSmithKline Substanzbibliothek mit 2 000 000 Molekülen, etwa 8 000 chemische Substanzen als potentielle Antimalaria-Wirkstoffe identifiziert werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Methoden des rationalen Wirkstoffdesings verwendet.

Die mittels eines Screenings von 1 000 Substanzen der Hans-Knöll-Wirkstoffbibliothek identifizierten potentiellen Inhibitoren der PfGDH1 und PfGDH2 sowie vergleichsweise der hGDH1, wurden anhand des Docking Programms GOLD virtuell in die jeweils definierte Bindetaschen eingepasst. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sollten für die Beurteilung genutzt werden, inwiefern und wodurch das unterschiedliche Bindungsverhalten von Inhibitoren innerhalb der GDH verschiedener Spezies erklärt werden kann. Ein besonderes Augenmerk wurde in diesem Zusammenhang auf die Unterschiede der an der Bindung dieser Liganden beteiligten Aminosäurereste gelegt. Auf Grund der massiven Änderungen der Konformation der Glutamat-Dehydrogenasen während der Bindung von Cofaktoren und der dadurch bedingten Verschiebung einzelner Aminosäurereste, ist eine Einschätzung der Bindungsmodi anhand virtuell erzeugter Protein-Ligand-Komplexe jedoch schwierig. Auch die Ähnlichkeit aller drei getesteten Enzyme innerhalb der definierten Bindetasche ermöglichen keine exakten Aussagen über Gründe der unterschiedlichen Hemmwirkung der einzelnen Inhibitoren. So kann beispielsweise für die Inhibitoren (R,R)-Bis{2-[1-(methylamino)ethyl]phenyl}diselenid und (S,S)-Bis-[1-(8-hydroxy-2-methoxy-5,6,7,8tetrahydronaphthyl)]diselenid eine stärkere inhibitorische Wirkung am PfGDH2 Protein im Vergleich zu den beiden anderen Enzymen dadurch erklärt werden, dass hier ein im aktiven Zentrum lokalisiertes Aspartat (Asp229) mit der Selenogruppe interagiert, während eine Interaktion der entsprechenden Aspartate in der *Pf*GDH1 und hGDH durch die differierende Positionierung des Liganden in den ermittelten *Docking*-Lösungen nicht möglich ist.

Jedoch konnten, ebenso wie für die hGDH beschrieben, die Substanzen Bithionol, Hexachlorophen und GW5074 [Li *et al.*, 2009] als Inhibitoren der *Pf*GDH2 im unteren micromolaren Bereich bestimmt werden, wohingegen keine wesentliche Inhibition der *Pf*GDH1 durch diese beobachtet wurde. Die unterschiedliche Effektivität dieser nichtkompetitiven Hemmstoffe kann weitestgehend dadurch erklärt werden, dass sie in der Region der Monomer-Monomer-Kontakte binden, die sich in allen drei Enzymen deutlich unterscheiden. Während diese Interaktionen in der hGDH aber auch in der *Pf*GDH2 hauptsächlich durch hydrophobe Wechselwirkungen gebildet werden, sind in der *Pf*GDH1 ladungsbasierte Wechselwirkungen dominant. Dadurch lässt sich dementsprechend auch das bessere Bindungsverhalten der vorwiegend hydrophoben Substanzen in der hGDH und der *Pf*GDH2 erklären.



Abb. 5.7: Koordinierung von Bithionol in den Strukturen der boGDH, *Pf*GDH1 und *Pf*GDH2. A) Kristallstruktur der boGDH (3ETD) mit gebundenem Bithionol. B) Bithionol mit den Koordinaten aus 3ETD in die Struktur der *Pf*GDH1 modelliert. C) Bithionol mit den Koordinaten aus 3ETD in die Struktur der *Pf*GDH2 modelliert.

5.6 Rolle der Glutamat-Dehydrogenasen im Stoffwechsel des Malariaparasiten

Während des intraerythrozytären Zyklus gewinnt der Malariaparasit seine Energie hauptsächlich aus dem Abbau von Glucose, mit anschließender Umwandlung des entstandenen Pyruvates zu Lactat [Sherman, 1998]. Daher kommt der plasmodialen Atmungskette nur eine geringe Rolle in der ATP-Produktion zu. Painter et al. [2007] konnten zeigen, dass die Funktion der Atmungskette hauptsächlich in der Regeneration des Ubiquinons liegt, was essentiell für die Pyrimidinbiosynthese und damit für das Überleben der Parasiten ist. Für den reibungslosen Ablauf der Reaktionen der Atmungskette ist die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten ausserodentlich wichtig. Diese werden normalerweise in den Reaktionen des Citratzyklus produziert und über die Succinat-Dehydrogenase oder den Malat-Shuttle in die Atmungskette eingespeist. Da der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex des Erregers nicht im Mitochondrium, sondern im Apicoplast lokalisiert ist [Foth et al., 2005] und weder der Abbau von Fettsäuren noch der von verzweigtkettigen Aminosäuren in den Mitochondrien Plasmodium falciparums stattfindet, steht dem Parasiten augenscheinlich keine Acetyl-CoA-Quelle zur Verfügung. Bisher war daher fraglich, ob hier tatsächlich ein Zyklus im herkömmlichen Sinne vorliegt oder dieser gänzlich fehlt. Untersuchungen des P. falciparum Genoms ergaben jedoch, dass orthologe Proteine für alle im Tricarbonsäurezyklus vorkommende Enzyme kodiert [Gardner et al., 2002] und auch während des Blutstadiums transkribiert vorliegen [Bozdech et al., 2003]. Neueste Ergebnisse einer Studie von Olszewski et al. [2010] belegen, dass dieser Stoffwechselweg im Parasiten nicht zyklisch, sondern in verzweigter Form und vollständig abgekoppelt von der Glycolyse in den Parasiten abläuft. Als Hauptquelle für die benötigten Kohlenstoffatome dieses verzweigten Stoffwechselweges identifizierten die Autoren die Aminosäuren Glutamat und Glutamin. Die Einspeisung des durch die Glutamat-Dehydrogenase bereit gestellten a-Ketoglutarates wird als Ausgangspunkt sämtlicher Reaktionen dieses modifizierten "Citratzyklus" angegeben, was diesem Enzym eine ausserordentliche Rolle innerhalb des Parasitenmetabolismus zukommen lässt (s. Abb. 5.7).



Abb. 5.8: Reaktionen und Funktionen des Citrat"zyklus" in *Plasmodium falciparum*. Es sind die Enzyme und Substrate des klassischen Citratzyklus gezeigt [modifiziert nach Vaidya AB. & Mather MW., 2009].

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudien aller drei Isoenzyme der GDH in *Plasmodium falciparum* zeigten jedoch, dass in den Mitochondrien keine Glutamat-Dehydrogenase lokalisiert ist. Derzeit ist daher fraglich, über welche Mechanismen das im Cytosol produzierte α-Ketoglutarat in die Mitochondrien geschleust wird. Ob der im Plasmodiengenom kodierte Oxoglutarat/Malat-Transporter auch in umgekehrter Richtung funktionieren kann oder andere bisher gänzlich unbekannte Transporter diese Funktion übernehmen, kann derzeitig nicht abschließend geklärt werden.

Die cytosolisch lokalisierten *Pf*GDH1 und *Pf*GDH3 könnten eine Funktion ähnlich der in Hefe beschriebenen GDH, ausüben. In diesem Organismus konnten ebenfalls zwei cytosolische Glutamat-Dehydrogenasen, eine NAD⁺- und eine NADP⁺-abhängige, nachgewiesen werden, die in Abhängigkeit zueinander einen Substratkreislauf aufrecht erhalten. Hierbei kommt der NADP⁺-abhängigen GDH die Konstanthaltung des NADP⁺-Pools zu, während das NAD⁺-abhängige Enzym lediglich das dabei entstehende Glutamat metabolisiert [Boles *et al.*, 1993]. Weiterhin wurden Glutamat-Dehydrogenasen anderer Organismen als essentiell für die Entgiftung von Ammoniak beschrieben [Lightfoot *et al.*, 1988; Frechilla *et al.*, 2004].

6 Zusammenfassung

Die Resistenzentwicklung des bedeutendsten humanpathogenen Erregers der Malaria, Plasmodium falciparum, gegen vorhandene Wirkstoffe, nimmt seit den 60er Jahren stetig zu und bedingt seit den 90er Jahren nahezu 50 % der Gesamtsterblichkeitsrate innerhalb der afrikanischen Bevölkerung. Aus diesem Grund ist es von besonderer Bedeutung, neue Zielmoleküle zu identifizieren und darauf basierend effizienter wirkende Antimalariamedikamente zu entwickeln. Die NADP⁺-abhängige Glutamat-Dehydrogenase 1 (GDH, EC 1.4.1.2) des Parasiten, die während der oxidativen Desaminierung von Glutamat zu α-Ketoglutarat zusätzlich NADPH produziert, wurde als mögliches, für den Redox- und Energiestoffwechsel des Erregers essentielles Enzym beschrieben und gilt daher als potentielles drug target. Des Weiteren weist der Parasit jedoch zwei weitere Glutamat-Dehydrogenasen (PfGDH2 und PfGDH3) auf. Um die Funktion und daraus resultierend auch die Wichtigkeit jeder einzelnen PfGDH aber auch das Zusammenspiel aller aufzuklären, ist ihre detaillierte Untersuchung unabdingbar.

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag daher auf der biochemischen und strukturellen Charakterisierung des zweiten Glutamat-Dehydrogenase Isoenzyms aus Plasmodium falciparum. Die Klonierung unterschiedlich langer PfGDH2 Konstrukte und eine anschließende Separation dieser über Metallchelat-Affinitätschromatografie erbrachte letztlich ein um 49 Aminosäuren verkürztes, katalytisch aktives Enzym. Die ermittelten K_m-Werte für die Substrate der PfGDH2 lagen im gleichen Konzentrationsbereich, wie für die der PfGDH1. Große Abweichungen ergaben sich jedoch bei den V_{max}-Werten, was vermutlich in der angehängten N-terminalen Hexahistidyl-Markerstruktur begründet lag. Die Ergebnisse dieser Arbeit und vorangegangener Studien am bovinen Enzym bezüglich des N-Terminus sprechen dafür, dass dieser maßgeblich an der Ausbildung eines zur maximal katalytischen Aktivität fähigen Enzyms beteiligt ist und eine Variation der Länge des N-Terminus starke Auswirkungen auf die Aktivität sowie die Fähigkeit zur Ausbildung von Oligomeren hat. Weiterhin wurde die dreidimensionale Kristallstruktur der Apo-Form des hexameren PfGDH2 Proteins bestimmt und auf molekularer Ebene untersucht. Eine Überlagerung dieser Struktur mit der der PfGDH1 zeigte eine große Übereinstimmung der Sekundärstrukturmerkmale, die der allgemein bekannten Struktur von Glutamat-Dehydrogenasen der S 50_I Familie unterschiedlicher Organismen entspricht. Verglichen mit der PfGDH1 und der humanen bzw. bovinen GDH sind alle an der Koordination der Substrate beteiligten Aminosäurereste stark konserviert. Innerhalb des aktiven Zentrums waren daher kaum Unterschiede feststellbar. Im Gegensatz dazu zeigte die Analyse der Monomer-Monomer-Interaktionen jedoch deutliche Unterschiede. Während im PfGDH1 Protein überwiegend ladungsbasierte Wechselwirkungen stattfinden, wird die Interaktion der Monomere in der PfGDH2 hauptsächlich über hydrophobe Kontakte realisiert. Aus diesem Grund zeigten auch die für die hGDH beschriebenen nicht-kompetitiv wirkenden Inhibitoren Bithionol, Hexachlorophen und GW5074 eine gute Hemmwirkung an der PfGDH2 und nur eine geringe an der PfGDH1. Diese differierenden Ergebnisse konnten dadurch erklärt werden, dass die Bindestelle dieser Wirkstoffe in der Monomer-Interaktionsfläche lokalisiert ist. Aus der Testung einer Substanzbibliothek mit 1 000 Wirkstoffen gingen weitere Substanzklassen hervor, die als mögliche Grundstrukturen zur Entwicklung neuer PfGDH Inhibitoren in Frage kommen. Die abschließende Klärung der unterschiedlichen Hemmeffekte der einzelnen Substanzen auf die PfGDH1, PfGDH2 und hGDH konnte jedoch auch anhand von zusätzlich durchgeführten Docking-Experimenten nicht erfolgen. Auf Grund der enormen Größe des dritten PfGDH Isoenzyms waren keine experimentellen Untersuchungen, sondern lediglich prädiktive Analysen zur Funktion dieses Proteins möglich. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine NAD⁺-abhängige Glutamat-Dehydrogenase der L 180 Familie, die Hexamere ausbildet, um katalytisch aktiv zu sein. Über Fusionsproteine aller drei PfGDH und GFP konnten die PfGDH1 und PfGDH3 cytosolisch lokalisiert werden, wohingegen die PfGDH2 in den Apicoplasten transportiert wird.

Zusammenfassend kann zur Funktion der Glutamat-Dehydrogenasen aus *P. falciparum* gesagt werden, dass sie zum einen die Bereitstellung des für antioxidative Prozesse wichtigen NADPH gewährleisten und zum anderen als Hauptlieferant von α -Ketoglutarat für den verzweigt ablaufenden Tricarbonsäuremetabolismus dienen. Der *Pf*GDH2 kommt in der Hinsicht eine größere Bedeutung in der Entwicklung neuer Antimalariamedikamente zu, da sie im Apicoplasten lokalisiert ist, der mit seinen zum Wirt deutlich unterschiedlichen Stoffwechselwegen eine Sonderstellung bezüglich des *Drug Development* einnimmt. Um die Wichtigkeit der Glutamat-Dehydrogenasen in *Plasmodium falciparum* zu bestätigen, wären weiterführend *knock-out* Studien eines oder sogar aller GDH Proteine notwendig. Auch die kinetische und strukturelle Charakterisierung der *Pf*GDH3 würde zusätzliche Informationen liefern, die es erlauben, das Zusammenspiel aller drei Isoenzyme zu erklären und diese in den Kontext angeschlossener Stoffwechselwege zu stellen.

Summary

The development of resistance in the most significant human pathogen of malaria, Plasmodium falciparum, against currently available drugs has been steadily increasing since the 1960s and has accounted for nearly 50 % of all deaths in the African population since the 1990s. For this reason it is especially important to identify new target molecules and to develop efficient antimalarial medications based on them. The NADP⁺-dependent glutamate dehydrogenase 1 (GDH, EC 1.4.1.2) of the parasite, which produces additional NADPH during oxidative deamination of glutamate to α -ketoglutarate, was described as a putative enzyme participating in the pathogen's essential antioxidative system and therefore can be considered a potential drug target. However, the parasite also exhibits two more glutamate dehydrogenases (PfGDH2 and PfGDH3). In order to elucidate the function and therefore the importance of each *Pf*GDH as well as all their interactions, detailed analysis is indispensible. The focus of this dissertation therefore was on the biochemical and structural characterization of the second glutamate dehydrogenase isoenzyme from *Plasmodium falciparum*. Cloning *Pf*GDH2 constructs of varying lengths and then separating these via metal chelate affinity chromatography resulted in a catalytically active enzyme that had been shortened by 49 amino acids. The calculated K_m values for the substrates of PfGDH2 were in the same concentration range as those of PfGDH1. However, large variances arose in the V_{max} values, most likely based on the attached N-terminal hexahistidyl tag. The results of this dissertation and previous studies of the bovine enzyme relating to the N-terminus demonstrate that this participates significantly in the formation of an enzyme capable of maximum catalytic activity and that a variation of the length of the N-terminus has strong effects on the activity as well as the ability to form oligomers. Furthermore the three-dimensional crystal structure of the apo form of the hexameric PfGDH2 protein was determined and examined at a molecular level. Superimposing this structure onto that of *Pf*GDH1 showed great similarity in the secondary structure features, which correspond to the generally known structure of glutamate dehydrogenases in the S 50₁ family of various organisms. Compared to the PfGDH1 and to the human and bovine GDH respectively, all amino acids that participate in the coordination of the substrates are highly conserved. Therefore, within the active center there were barely any recognizable differences. In contrast to this however, the analysis of the monomermonomer interactions showed significant differences. While charge-assisted interactions occur predominantly in the PfGDH1, the interaction of monomers in the PfGDH2 is predominantly realized via hydrophobic contacts. For this reason the non-competitively effective inhibitors bithionol, hexachlorophene, and GW5074, described for hGDH, also showed a good inhibitory action on *Pf*GDH2 but only a small action on *Pf*GDH1. These differing results could thereby be explained in that the binding site of these drugs is localized in the monomer-monomer interaction area. By screening a substance library of 1,000 drugs, further substance classes emerged that could possibly become basic structures for the development of new *Pf*GDH inhibitors. However, the final clarification of the various inhibitory effects of the individual substances on *Pf*GDH1, *Pf*GDH2, and hGDH could not be made, even by conducting additional docking experiments. Because of the enormity of the third *Pf*GDH isoenzyme, no experimental testing was possible, merely predictive analyses on the function of this protein. It probably involves an NAD⁺-dependent glutamate dehydrogenase of the L_180 family, which forms hexamers, in order to be catalytically active. *Pf*GDH1 and *Pf*GDH3 could be cytosolically localized via fusion proteins of all three *Pf*GDHs and GFP, whereas the *Pf*GDH2 is transported into the apicoplast.

The following can be summarized about the function of the glutamate dehydrogenases from *P. falciparum*: they for one ensure the supply of NADPH important for antioxidative processes, and they also serve as the main providers of α -ketoglutarate for the branched tricarboxylic acid metabolism. *Pf*GDH2 has in this respect a greater significance in the development of new antimalarial medicines, because it is localized in the apicoplast, whose metabolic pathways are so different from the host's that it has a special impact in drug development. In order to confirm the importance of glutamate dehydrogenases in *Plasmodium falciparum*, further knock-out studies of one or even all GDH proteins would be necessary. Even the kinetic and structural characterization of *Pf*GDH3 would provide additional information in order to explain the interaction of all three isoenzymes and place them into the context of connected metabolic pathways.

7 Literaturverzeichnis

- Alloueche A., Bailey W., Barton S., Bwika J., Chimpeni P., Falade CO., Fehintola FA., Horton J., Jaffar S., Kanyok T., Kremsner PG., Kublin JG., Lang T., Missinou MA., Mkandala C., Oduola AM., Premji Z., Robertson L., Sowunmi A., Ward SA., Winstanley PA. (2004). Comparison of chlorproguanil-dapsone with sulfadoxine-pyrimethamine for the treatment of uncomplicated falciparum malaria in young African children: double-blind randomised controlled trial. *Lancet.* 363(9424): 1843-8.
- Amersham Biosciences. GST Gen Fusion System Handbook (18-1157-58).
- Arndt UW. & Wonacott AJ. (Hrsg.) (1977). The rotation method in crystallography. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Barnwell JW. & Galinski MR. (1998). Invasion of erythrocytes. In Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection. Edited by Irwin W. Sherman. American Society for Microbiology.
- Bajorath J., Steukamp R., Aruffo A. (1993). Knowledge-based model building of proteins: concepts and examples. *Protein Sci.* 2: 1798-1810.
- Banerjee S., Schmidt T., Fang J., Stanley CA. und Smith TJ. (2003). Structural Studies on ADP of Mammalian Glutamate Dehydrogenase and the Evolution of Regulation. *Biochem*, 42, 3446-3456.
- Becker K., Kirk K. (2004). Of malaria, metabolism and membrane transport. *Trends Parasitol.* 20(12): 590-6. Review.
- Becker K., Tilley L., Vennerstrom JL., Roberts D., Rogerson S., Ginsburg H. (2004). Oxidative stress in malaria parasite-infected erythrocytes: host-parasite interactions. *Int J Parasitol.* 34(2): 163-89. Review.
- Berendt AR., Ferguson DJP., Gardner GT., Rowe A., McCormick C., Roberts D., Graig A., Pinches R., Elford BC. und Newbold CI. (1994). Molecular Mechanism of sequestration in malaria. *Parasitology* 108, 19-28.
- Berman HM., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat TN., Weissig H., Shindyalov IN., Bourne PE. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28: 235-242
- Boles E., Lehnert W. und Zimmermann FK. (1993). The role of the NAD-dependent glutamate dehydrogenase in restoring growth on glucose of a Saccharomyces cerevisiae phophoglucose isomerase mutant. *Eur J Biochem*. 217: 469-477.
- Borst P., Bitter W., McCulloch R., Van Leeuwen F., Rudenko G. (1995). Antigenic variation in malaria. *Cell*. 82(1): 1-4.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

- Britton KL., Baker PJ., Borges KM., Engel PC., Pasquo A., Rice DW. (1995). Insights into thermal stability from a comparison of the glutamate dehydrogenase from *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis. Eur. J. Biochem.* 229, 688-695.
- Brünger AT. (1992). Free R value: a novel statistical quantity for assessing the accuracy of crystal structures. *Nature*. 355 (6359): 472-5.
- Brünger AT. (1993). Assessment of phase acuracy by cross validation: the free R value. Methods and applications. *Acta Cryst.* D49, 24-36.
- Brünger AT., Adams PD., Clore GM., DeLano WL., Gros P., Grosse-Kunstleve W., Jiang JS.,
 Kuszewski J., Nilges M., Pannu NS., Read, RJ., Rice LM., Simonson T. and Warren GL.
 (1998). Crystallography and NMR system (CNS): A new software system for macromolecular structure determination. *Acta Cryst.* D54, 905-921.
- Bundesrepublik Deutschland (2010). Gesetz zur Regelung der Gentechnik (Gentechnikgesetz GenTG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 16. Dezember 1993 (BGBl. I S. 2066), zuletzt geändert durch Artikel 1 des Gesetzes vom 09. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1934).
- Burki F. & Kaessmann H. (2004). Birth and adaptive evolution of a hominoid gene that supports a high neurotransmitter flux. *Nat. Genet.* 36: 1061-1063.
- Bustos DG., Canfield CJ., Canete-Miguel E., Hutchinson DB. (1999). Atovaquone-proguanil compared with chloroquine and chloroquine-sulfadoxine-pyrimethamine for treatment of acute Plasmodium falciparum malaria in the Philippines. *J Infect Dis.* 179(6): 1587-90.
- Clark M., Cramer RD. and Opdenbosch N. (1989). Validation of the general purpose tripos 5.2 force field. *J Comp Chem.* 10 (8): 982-1012.
- Cole JC., Nissink JWM., Taylor R. (in press). Protein-Ligand Docking and Virtual Screening with GOLD. *Virtual Screening in Drug Discovery* eds. J. Alvarez & B. Shrichet, Dekker: New York.
- Cordingley MG., Callahan PL., Sardana VV., Garsdy VM., Colonno RJ. (1990). Substrate requirements of human rhinovirus 3C protease for peptide cleavage in vitro. *J. Biol. Chem.* 265: 9062-9065.
- Cudney R., Patel S., Weisgraber K. and Newhouse Y. (1994). Screening and optimization strategies for macromolecular crystal growth. *Acta Cryst.* D50, 414-423.
- Day NP., Hien TT., Schollaardt T., Loc PP., Chuong LV., Chau TT., Mai NT., Phu NH., Sinh DX., White NJ., Ho M. (1999). The prognostic and pathophysiologic role of pro- and antiinflammatory cytokines in severe malaria. *J Infect Dis.*, 180(4): 1288-97.
- Dondorp AM., Nosten F., Yi P., Das D., Phyo AP., Tarning J., Lwin KM., Ariey F., Hanpihakpong W., Lee SJ., Ringwald P., Silamut K., Imwong M., Chotivanich K., Lim P., Herdman T., An SS., Yeung S., Singhasivanon P., Day NP., Lindegardh N., Socheat D. and White NJ. (2009). Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 361(5): 455-67.
- Eisenberg D., Bowie JU., Luthy R., Choe S. (1992). Three-dimensional profiles for analysing protein sequence-structure relationships. *Faraday Discuss*. 93: 25-34.

- Evers A. (2003). A new method for ligand-supported homology modelling of proteinbinding sites: development and application to the neurokinin-1 receptor. *Dissertation*. Fachbereich Pharmazie, Philipps-Universität Marburg
- Evers A., Gohlke H., Klebe G. (2003). Ligand-supported homology modelling for protein bindingsites using knowledge-based potentials. *J. Mol. Biol.* 334: 327-345.
- Evers A., Klebe G. (2004). Successful virtual screening for a submicromolar antagonist of the neurokinin-1-receptor based on a ligand-supported homology model. J. Med. Chem. 47: 5381-5392.
- Fang J., Hsu BYL., MacMullen CM., Poncz M., Smith TJ., Stanley CA. (2002). Expression, purification and characterization of human glutamate dehydrogenase (GDH) allosteric regulatory mutations. *Biochem J* 363, 81-87.
- Foth BJ., Stimmler LM., Handman E., Crabb BS., Hodder AN. and McFadden, GI. (2005). The malaria parasite *Plasmodium falciparum* has only one pyruvate dehydrogenase complex, which is located in the apicoplast. *Mol Microbiol*. 55: 39-53.
- Frechilla S., Lasa B., Aleu M., Juanarena N., Lamfus C., Aparicio-Tejo PM. (2002). Short-term ammonium supply stimulates glutamate dehydrogenase activity and alternative pathway respiration in roots of pea plants. *J Plant Physiol*. 159(8): 811-818.
- Frieden C. (1962). The unusual inhibition of glutamate dehydrogenase by guanosine di- and triphosphate. *Biochim Biophys Acta*. 21; 59: 484-6.
- Galinski MR., Barnwell JW. (2009). Monkey malaria kills four humans. *Trends Parasitol.*, 25(5): 200-4.
- Gamo FJ., Sanz LM., Vidal J., deCozar C., Alvarez E., Lavandera JL., Vanderwall DE., Green DVS.,
 Kumar V., Hasan S., Brown JR., Peishoff CE., Cardon LR. And Garcia-Bustos JF. (2010).
 Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. *Nature*. 465: 305-312.
- Golenser J., Marva E., Chevion M. (1991). The survival of Plasmodium under oxidant stress. *Parasitol Today*. 7(6): 142-6.
- Granchi C., Bertini S., Macchia M., Minutolo F. (2010). Inhibitors of lactate dehydrogenase isoforms and their therapeutic potentials. *Curr Med Chem.*, 17(7): 672-97. Review.
- Guex N., Peitsch MC. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18: 2714-2723.
- Gültekin A., Heermann KH. (1987). The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal. Biochem.* 172: 320-329.
- Halperin I., Ma B., Wolfson H., Nussinov R. (2002). Principles of docking. An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *Proteins* 47: 409-443.
- Hartmann M. (2002). Computergestützte Wirkstoffentwicklung am Beispiel der menschlichen Tyrosinase. *Diplomarbeit*. Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg.

- Hill AV., Elvin J., Willis AC., Aidoo M., Allsopp CE., Gotch FM., Gao XM., Takiguchi M., Greenwood BM., Townsend AR. (1992). Molecular analysis of the association of HLA-B53 and resistance to severe malaria. *Nature*. 360(6403): 434-9.
- Jones TA., Zou JY., Cowan SW. & Kjeldgaard M. (1991). Improved methods for the building of protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Cryst.* A47 110-119.
- Jones G., Willet P., Glen RC., Leach AR., Taylor R. (1997). Development and validation for a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* 267: 727-748.
- Kabsch W. (2010). XDS. Acta Cryst. 66 (Pt2): 125-32.
- Kabsch W. (2010). Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Cryst.* 66 (Pt2): 133-44.
- Kanavouras K., Mastorodemos V., Borompokas N., Spanaki C., Plaitakis A. (2007). Properties and molecular evolution of human GLUD2 (neural and testicular tissue-specific) glutamate dehydrogenase. *J Neurosci Res.* 85(15): 3398-406.
- Kar S. & Kar S. (2010). Control of malaria. Nat Rev Drug Discov. 9(7): 511-2.
- Kehr S., Sturm N., Rahlfs S., Przyborski JM and Becker K. (2010). Compartmentation of Redox Metabolism in Malaria Parasites. *PLoS Pathogen*. 6(12): e1001242.
- Kleywegt GJ. & Brünger AT. (1996). Checking your imagination: applications of the free R value. *Structure*. 4(8): 897-904.
- Koolmann J., Röhm KH. (2003). Taschenatlas der Biochemie. 3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kretschmer HBU. and Klauss V. (1996). Malaria. Tropen- und Reisemedizin. Gustav Fischer Verlag, 1996. Knobloch, J. (ed.).
- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Li C., Allen A., Kwagh J., Doliba NM., Qin W., Najafi H., Collins HW., Matschinsky FM., Stanley CA., Smith TJ. (2006). Green Tea Polyphenols Modulate Insulin Secretion by Inhibiting Glutamate Dehydrogenase. *J Biol Chem* 281 (15), 10214-10221.
- Li M., Allen A., Smith TJ. (2007). High Throughput Screening Reveals Several New Classes of Glutamate Dehydrogenase Inhibitors. *Biochemistry* 46, 15089-15102.
- Li M., Smith CJ., Walker MT., Smith TJ. (2009). Novel inhibitors complexed with glutamate dehydrogenase: allosteric regulation by control of protein dynamics. *J Biol Chem*. 284(34): 2988-3000.
- Lightfoot DA., Baron AJ., Wootton JC. (1988). Expression of the *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase gene in the cyanobacterium *Synechococcus PCC6301* causes ammonium tolerance. *Plant Mol Biol.* 11(3): 335-344.

- Ling IT., Cooksley S., Bates PA., Hempelmann E., Wilson RJ. (1986). Antibodies to the glutamate dehydrogenase of *Plasmodium falciparum*. *Parasitology*. 92 (Pt 2): 313-24.
- Livingstone CD., Barton GJ. (1993). Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation. *Comput Appl Biosci.* 9 (6): 745-756.
- Lottspeich F., Zorbas H. (Hrsg.) (1998). Bioanalytik. Spektrum. Akad. Verl., Heidelberg.
- Löffler G., Petrides P. (2003). Biochemie & Pathobiochemie. Springer Verlag Heidelberg, 7. Auflage.
- Lucius R., Loos-Frank B. (2008). Biologie von Parasiten. Springer Verlag Berlin-Heidelberg.
- Mannhold R., Kubinyi H., Timmerman H. (1998). Structure-based Ligand Design. WILEY-VCH.
- Mastorodemos V., Zaganas I., Spanaki C., Bessa M., Plaitakis A. (2005). Molecular Basis of Human Glutamate Dehydrogenase Regulation under changing Energy Demands. *J Neurosci Res* 79, 65-73.
- Mather MW., Henry KW. and Vaidya AB. (2007). Mitochondrial drug targets in apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets*. 8: 49-60. Review.
- Meissner T., Mayatepek E., Recurrent excessive transient hypertriglyceridaemia. *Eur J Pediatr.* 158(8): 683.
- McRee DE. (1993). Practical Protein Crystallography. San Diego: Academic Press. 1-23.
- Miñambres B., Olivera ER., Jensen RA., Luengo JM. (2000). A New Class of Glutamate Dehydrogenases (GDH). *J Biol Chem* 275 (50), 39529-39542.
- Mullis KB., Faloona FA. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-50.
- Mühlhardt C. (2009). Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomic. 6. Auflage. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Notredame C., Higgins DG., Heringa J. (2000). T-COFFEE: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302: 205-217.
- Nzila A. (2006). Inhibitors of de novo folate enzymes in *Plasmodium falciparum.Drug Discov Today*. 11(19-20): 939-44. Review.
- Olszewski KL., Mather MW., Morrisey JM., Garcia BA., Vaidya AB., Rabinowitz JD., Llinás M. (2010). Branched tricarboxylic acid metabolism in *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 466(7307): 774-8.
- Painter HJ., Morrisey JM., Mather MW. and Vaidya AB. (2007). Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature*. 446: 88-91.
- Persidis A. (2000). Malaria. Nat Biotechnol. 18(1): 111-2. Review.
- Peterson PE. und Smith TJ. (1999). The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. *Structure*. 7, 769-782.
- Plaitakis A., Zaganas I. (2001). Regulation of human glutamate dehydrogenases: implications for glutamate, ammonia and energy metabolism in brain. *J Neurosci Res.* 66(5): 899-908. Review.

- Rahlfs S., Becker K. (2006). Interference with Redox-Active Enzymes as a Basis for the Design of Antimalaria Drugs. Mini-Reviews in *Medicinal Chemistry* 6 (2), 163-176.
- Peitsch MC., (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans*. 24 (1): 274-9.
- Ramakrishnan C. & Ramachandran GN. (1965). Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. II. Allowed conformations for a pair of peptide units. *Biophys. J.* 5, 909-933.
- Rhodes G. (1993). Crystallography Made Crystal Clear. San Diego: Academic Press (pp. 8-10, 29-38).
- Rodrigues T., Lopes F. and Moreira R. (2010). Inhibitors of the mitochondrial electron transport chain and de novo pyrimidine biosynthesis as antimalarials: The present status. *Curr Med Chem.* 17: 929-956.
- Rogel, H. (2010). Charakterisierung von Glutamat-Dehydrogenasen aus *Plasmodium falciparum* und Mensch. Masterarbeit. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Rottmann M., McNamara C., Yeung BKS. (2010). Spiroindolones, a potent compound class for the treatment of malaria. *Science*. 329(5996): 1175-80.
- Rossmann MG. & Blow DM. (1962). The detection of subunits within the crystallographic asymmetric unit. *Acta Crystallogr*. 15: 24-31.
- Sadanand S. (2010). Malaria: An Evaluation of the current state of research on pathogenesis and antimalarial drugs. *YJBM*. 83: 185-191.
- Sambrook J., Fritsch EF. and Maniatis T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Jork.
- Schlitzer M. (2008). Antimalarial drugs what is in use and what is in the pipeline., *Arch Pharm* (Weinheim). 341(3): 149-63. Review.
- Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch MC. (2003). SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31: 3381-3385.
- Seeber F., Limenitakis J., and Soldati-Favre D. (2008). Apicomplexan mitochondrial metabolism: a story of gains, losses and retentions. *Trends Parasitol.* 24: 468-478. Review.
- Shashidharan P., Michaelides TM., Robakis NK., Kretsovali A., Papamatheakis J., Plaitakis A. (1994). Novel human dehydrogenase expressed in neural and testicular tissues and encoded by an Xlinked intronless gene. J. Biol. Chem. 269: 16971-16976.
- Sherman I.W. (1979). Biochemistry of Plasmodium (malarial parasites). *Microbiol Rev.* 43: 453-495. Review.
- Shimomura O., Johnson FH., Saiga Y. (1961). Purification and properties of Cypridina luciferase. *J Cell Comp Physiol.* 58: 113-23.
- Sibley CH., Hyde JE., Sims PF., Plowe CV., Kublin JG., Mberu EK., Cowman AF., Winstanley PA.,
 Watkins WM., Nzila AM. (2001). Pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum*: what next? *Trends Parasitol*. 17(12): 582-8. Review.

Sies H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Exp Physiol. 82: 291-295.

- Sinden RE. & Gilles HM. (2002). The malarial parasite parasite metabolism and the design of antimalarial strategies. In: Essential Malariology. Fourth Edition. Oxford University Press.
- Sippl MJ. (1993). Boltzmann's principle, knowledge-based mean fields and protein folding. An approach to the computational determination of protein structures. J. Comput-Aided. Mol. Des. 7: 473-501.
- Smith TJ., Schmidt T., Fang J., Wu J., Siuzdak G., Stanley CA. (2002). The Structure of Apo Human Glutamate Dehydrogenase Details Subunit Communication and Allostery. *J Mol Biol* 318, 765-777.
- Smith TJ., Stanley CA. (2008). Untangling the glutamate dehydrogenase allosteric nightmare. *Trends Biochem Sci*, 1-8.
- Smith DB., Johnson KS. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione-S-transferase. *Gene* 67: 31-40
- Sotriffer C., Gohlke H., Klebe G. (2002). Docking into knowledge-based potential fields: a comparative evaluation of DrugScore. *J. Med. Chem.* 45: 1967-1970
- Stanley CA., Lieu YK., Hsu BYL., Burlina AB., Greenberg CR., Hopwood NJ., Perlman K., Rich BH., Zammarchi E., Poncz M. (1998). Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *NEJM*. 338: 1352-1357.
- Stanley CA. (2003). Hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome: insights into the regulatory role of glutamate dehydrogenase in ammonia metabolism. *Mol Gen Metab* 81, 45-51.
- Stillman TJ., Migueis AM., Wang XG., Baker PJ., Britton KL., Engel PC., Rice DW. (1999). Insights into the mechanism of domain closure and substrate specificity of glutamate dehydrogenase from *Clostridium symbiosum*. J Mol Biol. 285(2): 875-85.
- Stryer L. (1996). Biochemie. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg.
- Sturm A., Amino R., Sand van de C., Regen T., Retzlaff S., Rennenberg A., Krueger A., Pollok JM, Menard R., Heussler VT. (2006). Manipulation of host hepatocytes by the malaria parasite for delivery into liver sinusoids. *Science*. 313: 1287-1290.
- Thompson JD., Higgins DG., Gibson TJ. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680
- Tonkin CJ., van Dooren GG., Spurck TP., Struck NS., Good RT., Handman E., Cowman AF., McFadden GI. (2004). Localization of organellar proteins in Plasmodium falciparum using a novel set of transfection vectors and a new immunofluorescence fixation method. *Mol Biochem Parasitol.* 137(1): 13-21.
- Vaidya AB. and Mather MW. (2009). Mitochondrial evolution and functions in malaria parasites. *Annu Rev Microbiol.* 63: 249-267. Review.

- Vander Jagt DL., Hunsaker LA., Kibirige M. and Campos, NM. (1989). NADPH production by the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *Blood*. 74: 471-474.
- Van Dooren GG., Stimmler LM. and McFadden GI. (2006). Metabolic maps and functions of the Plasmodium mitochondrion. *FEMS Microbiol Rev.* 30: 596-630. Review.
- Van Gunsteren WF., Hunenberger PH., Kovacs H., Mark AE., Schiffer CA. (1995). Investigation of protein unfolding and stability by computersimulation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 348: 49-59
- Wagner JT., Lüdemann H., Färber PM., Lottspeich F., and Krauth-Siegel RL. (1998). Glutamate dehydrogenase, the marker protein of *Plasmodium falciparum*-cloning, expression and characterization of the malarial enzyme. *Eur J Biochem*. 258(2): 813-819.
- Weiland, A. (2009). Charakterisierung von Glutamat-Dehydrogenasen als Zielmoleküle für die Medikamentenentwicklung. Masterarbeit. Justus-Liebig-Universität Gießen.
- Werner C., Stubbs MT., Krauth-Siegel RL. and Klebe G. (2005). The crystal structure of *Plasmodium falciparum* glutamate dehydrogenase, a putative target for novel antimalarial drugs. *J Mol Biol.* 349: 597-607.
- Werner C. (2008). Die Röntgenstrukturen der Glutamatdehydrogenase von *Plasmodium falciparum* und der Liponamiddehydrogenase von *Trypanosoma cruzi*. Zielmoleküle für das strukturbasierte Design neuer antiparasitärer Wirkstoffe. Dissertation. Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Pharmazie.
- White N.J. (1996). The treatment of malaria. N Engl J Med. 335: 800-806.
- Wilson AJC. (1949). The probability distributions of x-ray intensities. Acta Cryst. (2): 318-321.
- Winstanley PA. (2000). Chemotherapy for falciparum malaria: the armoury, the problems and the prospects. *Parasitol Today*. 16(4): 146-53. Review.
- WHO (2009). World Malaria Report 2009. http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2009/en/ (April 2010)

Anhang

1 <u>0</u>	2 <u>0</u>	3 <u>0</u>	4 <u>0</u>	5 <u>0</u>	6 <u>0</u>
MILYSCVVCF	IVFVFHVKAY	SKNKVLKYAK	PGFITNEIDI	GAYAKRRGKS	RLGSLHNYGY
7 <u>0</u>	8 <u>0</u>	9 <u>0</u>	10 <u>0</u>	11 <u>0</u>	12 <u>0</u>
TSTKSVDNQI	EELREKVVSK	NKNEPEFLQA	FEEVLSCLKP	VFKKDNVYIG	VLENIAEPER
13 <u>0</u>	14 <u>0</u>	15 <u>0</u>	16 <u>0</u>	17 <u>0</u>	18 <u>0</u>
VIQFRVPWIN	DKGEHKMNRG	FRVQYNSVLG	PYKGGLRFHP	TVNLSVIKFL	GFEQIFKNSL
19 <u>0</u>	20 <u>0</u>	21 <u>0</u>	22 <u>0</u>	23 <u>0</u>	24 <u>0</u>
TTLPMGGGKG	GSDFDPKGKS	ENEILKFCQS	FMTNLFRYIG	PNTDVPAGDI	GVGGREIGYL
25 <u>0</u>	26 <u>0</u>	27 <u>0</u>	28 <u>0</u>	29 <u>0</u>	30 <u>0</u>
FGQYKKLKNS	FEGVLTGKNI	KWGGSNIRAE	ATGYGVVYFA	ENVLKDLNDN	LENKKCLVSG
31 <u>0</u>	32 <u>0</u>	33 <u>0</u>	34 <u>0</u>	35 <u>0</u>	36 <u>0</u>
SGNVAQYLVE	KLIEKGAIVL	TMSDSNGYIL	EPNGFTKEQL	NYIMDIKNNQ	RLRLKEYLKY
37 <u>0</u>	38 <u>0</u>	39 <u>0</u>	40 <u>0</u>	41 <u>0</u>	42 <u>0</u>
SKTAKYFENQ	KPWNIPCDIA	FPCATQNEIN	ENDADLFIQN	KCKMIVEGAN	MPTHIKALHK
43 <u>0</u>	44 <u>0</u>	45 <u>0</u>	46 <u>0</u>	47 <u>0</u>	48 <u>0</u>
LKQNNIILCP	SKAANAGGVA	VSGLEMSQNS	MRLQWTHQET	DMKLQNIMKS	IYEQCHNTSK
49 <u>0</u>	50 <u>0</u>	51 <u>0</u>			
IYLNESDLVA	GANIAGFLKV	ADSFLEQGGL			

Abb. A1: Aminosäurensequenz der *Pf*GDH2. Die Signalsequenz ist in rot dargestellt, die *Pf*GDH2-Sequenz, die für das aktive Enzym kodiert in schwarz.

Anhang

20 30 40 50 60 10 MDIDRRSALS CSPNNMECGF GSGHFSNNSI TWKEKYEQTK ELLKSYNLFS DHLINYSIDF 80 90 100 110 70 120 YFNKLGFNKF HFEETSPELI SKVVVCIITA KINEQYSSDK YFPTFEETHD NVIFIITRVF 130 140 150 160 170 180 ADDNKTRLNY KMEKKIEEKY FNFSDMSKDC YRLKSFRSVH SVFDKEHTYQ EPLRTYILEL 200 210 220 230 190 240 PTYNDDIIKE NETDLKKLMD VNFYNYIKGT RSEQIYYELN KAVLYDLTGQ FLQTHYYETS 250 260 270 280 290 300 SSTFTLTIAV KRSNVISSIF SLIGDCLNMH RCFSYSKYVE PLKNGVLLII LNVKVIVNNE 310 32<u>0</u> 33<u>0</u> 34<u>0</u> 35<u>0</u> 36<u>0</u> MEREKQKLDL KDKIYKVVKS LKTLCLFNDS KFIQLSVKRT FTAQESAYLF MIIKFITFFS 370 380 390 400 410 420 TNTLSSYKNV EHALNLRNYN NNIMDTTTNS SSSPSSVLND VYIIKEKLKS SKYTKEEILR 430 440 450 460 470 480 CAQSNVRTIK MLFANFEKKL NHQRNKCNQM KYGENNMKNS GDLLKEYSTN NRNVDHPTLS 490 50<u>0</u> 51<u>0</u> 52<u>0</u> 530 540 SLASSSSSCS SSFSLHSYLS GSYESPYYHH NKDSKDIIDE IEDNHDKKIL QYFYMFEKYA 560 570 580 590 600 550 LKTNFFLTHK ISLAVAFDGA LLKDSIYEAQ PYSIIMILGL HFVGFHIRFS KISRGGVRIV 620 630 640 650 610 660 ISNNVNSYMH NSDNLFDEAY NLAYTQNFKN KDIPEGGSKG IILLDADVCN VANTKYIKNL
 670
 680
 690
 700
 710
 720
 SFYSYVNSIL DLLINEDLNE ESASSISVHS TKGANNTTIT FDNVMSSVEN MVDRGGVEGE 730 740 750 760 770 780 HLNITLPYDA NMACNNNTTN DNLSNMHDTY NLNNSGEATL DHHSVDNRIV SNSSGTNNMN 79<u>0</u> 80<u>0</u> 81<u>0</u> 820 830 840 AQKGEGEDEK AKDKEMSNNR KNEENERKRC DNVSNSNYNY VNGTTEDAVQ KIMGSKCKGG

131
90 <u>0</u>	89 <u>0</u>	88 <u>0</u>	87 <u>0</u>	86 <u>0</u>	85 <u>0</u>
MILQEKMNEE	VINGENKTRK	IEECYKGAGC	DNNNIDDDEH	DMNGHNNNNN	RNNNGEEKDG
96 <u>0</u>	95 <u>0</u>	94 <u>0</u>	93 <u>0</u>	92 <u>0</u>	91 <u>0</u>
MYGMTTLGIE	LRKNGGVPHD	PYWKTFSTGK	ACIIAKKRKY	NTGSDQLMDW	EDLIFLGPDE
102 <u>0</u>	101 <u>0</u>	100 <u>0</u>	99 <u>0</u>	98 <u>0</u>	97 <u>0</u>
LYDKQGLNKE	IISIIDGSGI	SNAILQSKTK	LVGGPDGDLG	NIKEESISRS	TYISKLCEKL
108 <u>0</u>	107 <u>0</u>	106 <u>0</u>	105 <u>0</u>	104 <u>0</u>	103 <u>0</u>
RNGLDFRNTF	HNVDIFGNKI	KDGFKISIED	CTLYDEKYFS	NKDKSKAITC	ELIRLAKRRN
114 <u>0</u>	113 <u>0</u>	112 <u>0</u>	111 <u>0</u>	110 <u>0</u>	109 <u>0</u>
DARNILESKN	VEGANVFISD	KNGECIYKYI	INIFNVNNII	FNPCGGRPHS	FLNPLNKCEL
120 <u>0</u>	119 <u>0</u>	118 <u>0</u>	117 <u>0</u>	116 <u>0</u>	115 <u>0</u>
INFVHQNQKM	SDILQVDENE	QYIDYMCSPD	VLAGLVLDDK	KGGVISSSLE	VILFKDAATN
126 <u>0</u>	125 <u>0</u>	124 <u>0</u>	123 <u>0</u>	122 <u>0</u>	121 <u>0</u>
NKCNEDQQDV	QDNSHHHNNS	IIKTVNKNDT	DTSNNEKNKN	INNLEEDEKK	NHSLSFKRGS
132 <u>0</u>	131 <u>0</u>	130 <u>0</u>	129 <u>0</u>	128 <u>0</u>	127 <u>0</u>
LKKDILSSDT	INILSNKISE	RRTKTPISKA	LEFESLWKET	IQKKITHYCE	SDFYKAYVKE
138 <u>0</u>	137 <u>0</u>	136 <u>0</u>	135 <u>0</u>	134 <u>0</u>	133 <u>0</u>
YYSQQFLNDL	LFASSLASNY	ERVPYVYIKS	LKIVTFEQIL	VLERVIPPTL	LCRDYKLLKK
					139 <u>0</u>

SAFNFFEYIT KLQSESA

Abb. A2: Aminosäuresequenz der PfGDH3 [ProtParam].

Anhang



Abb. A3: Sequenzvergleich der *Pf*GDH3 mit GDHs verwandter Plasmodien-Arten und den GDH anderer Organismen (Expasy Blast).

10	20	30	40	50	60
MYRYLGEALL	LSRAGPAALG	SASADSAALL	GWARGQPAAA	PQPGLALAAR	RHYSEAVADR
70	80	90	100	110	120
EDDPNFFKMV	EGFFDRGASI	VEDKLVEDLR	TRESEEQKRN	RVRGILRIIK	PCNHVLSLSF
130	140	150	160	170	180
PIRRDDGSWE	VIEGYRAQHS	QHRTPCKGGI	RYSTDVSVDE	VKALASLMTY	KCAVVDVPFG
190	200	210	220	230	240
GAKAGVKINP	KNYTDNELEK	ITRRFTMELA	KKGFIGPGID	VPAPDMSTGE	REMSWIADTY
250	260	270	280	290	300
ASTIGHYDIN	AHACVTGKPI	SQGGIHGRIS	ATGRGVFHGI	ENFINEASYM	SILGMTPGFG
310	320	330	340	350	360
DKTFVVQGFG	NVGLHSMRYL	HRFGAKCIAV	GESDGSIWNP	DGIDPKELED	FKLQHGSILG
370	380	390	400	410	420
FPKAKPYEGS	ILEADCDILI	PAASEKQLTK	SNAPRVKAKI	IAEGANGPTT	PEADKIFLER
430	440	450	460	470	480
NIMVIPDLYL	NAGGVTVSYF	EWLKNLNHVS	YGRLTFKYER	DSNYHLLMSV	QESLERKFGK
490	500	510	520	530	540
HGGTIPIVPT	AEFQDRISGA	SEKDIVHSGL	AYTMERSARQ	IMRTAMKYNL	GLDLRTAAYV
550					

NAIEKVFKVY NEAGVTFT

Abb. A4: Aminosäurensequenz der hGDH1. Die mitochondriale Signalsequenz ist in rot dargestellt, die in der Arbeit klonierte hGDH1-Sequenz in schwarz.



Abb. A5: Karte des pRSETA-Vektors (Invitrogen, 2001).



Abb. A6: pQE30 Vektorkarte (Qiagen) 3461 bp.



Abb. A7: pGEX-6P-3 Vektorkarte (GE Healthcare) 4900 bp.



Abb. A8: pET-28a Vektorkarte (Novagen) 5369 bp.



Abb. A9: p426TDH Vektorkarte (AG Lill, Marburg) 6606 bp.

Danksagung

Leider lässt sich eine wahrhafte Dankbarkeit mit Worten nicht ausdrücken. (Johann Wolfgang von Goethe)

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Katja Becker für die Bereitstellung dieser Doktorarbeit, sowie für die umfangreiche Unterstützung und die anregenden Diskussionen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit ausserordentlich beigetragen haben.

Bei Herrn Dr. Stefan Rahlfs möchte ich mich für die hilfreichen Ideen, Ratschläge und die Beantwortung meiner nicht enden wollenden Fragen zu meiner Arbeit, aber auch zu universellen Dingen, bedanken.

Frau Dr. Karin Fritz-Wolf danke ich für die exzellente Betreuung in Sachen Proteinkristallographie und Röntgenstrukturanalyse, sowie die schöne Zeit in Heidelberg. Ihre stete Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und Problemen hat mich in meiner Arbeit enorm unterstützt.

Frau Dr. Rimma Iozef danke ich für ihre unbezahlbare und freundliche Hilfe bei sämtlichen molekularbiologischen Arbeiten.

Außerdem danke ich meinen Bachelor- und Masterstudenten, Anne Weiland, Helga Rogel und Nina Herzlieb für ihre Hilfe und ihre Anregungen zu meiner Arbeit, sowie die abwechslungsreiche Gestaltung der Arbeits- und Freizeit, mit allen möglichen und unmöglichen Ideen!

Besonders möchte ich mich auch bei den guten Seelen der Arbeitsgruppe Prof. Becker: Anette Netsch, Beate Hecker, Elisabeth Fischer, Marina Fischer, Michaela Stumpf, Timothy Bostick und Ulrike Burkhard-Zahrt für die hilfreiche Unterstützung im Labor und eine angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken.

Herrn Prof. Dr. Klebe und seiner Arbeitsgruppe, insbesondere Michael Beetz und Tobias Craan, danke ich für die Ermöglichung der Generation von 3D-Inhibitorstrukturen mit Hilfe der zur Verfügung gestellten Programme. Herrn Prof. Dr. Lill und Herrn Dr. Mühlenhoff gilt mein Dank für die Ermöglichung der Durchführung der Hefeexperimente. Der Arbeitsgruppe Prof. Lingelbach, insbesondere Dr. Jude Przyborski, danke ich für die Messung und Auswertung der GFP-Ergebnisse.

Dr. Kerstin Kaddatz und Dr. Bernd Kösters danke ich für die unbezahlbare Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön möchte ich den Arbeitsgruppen Prof. Dr. Uwe Wenzel und PD Dr. Ralf Pätzold für die unterhaltsamen und oft auch aufbauenden Mittags-, Nachmittags- und zum Teil auch Abend- und Nachtstunden aussprechen!

Ganz besonders danke ich meiner Familie für die Unterstützung jeglicher Art und den Glauben an mich. Marek, ich danke dir für die massive Unterstützung durch deine guten Worte und Taten.

Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe.

Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.

Gießen, 11.01.2011

Kathleen Zocher