

Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität zu Lübeck
Direktorin Prof. Dr. Gabriele Gillessen-Kaesbach
in Zusammenarbeit mit dem
Institut für Biochemie
der Universität zu Lübeck
Direktor Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld

**Konstruktion, Synthese und Rückfaltung
zweier inaktiver Falcipain-2-Mutanten und
funktionelle Charakterisierung von
Falcipain-2, einer malarialen Hämoglobinase
von *Plasmodium falciparum***

Inauguraldissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
-Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von
Saskia Herzberg
aus Hannover

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: Frau Prof. Dr. Gabriele Gillessen-Kaesbach

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christian Schmidt

Tag der mündlichen Prüfung: 04.12.2009

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 04.12.2009

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	8
I.1. Malaria	8
I.1.1. Epidemiologie	9
I.1.2. Lebenszyklus der Plasmodien	10
I.1.3. Pathogenese und klinischer Verlauf	12
I.1.4. Prophylaxe, Therapie und Resistenzproblematik	14
I.2. Metabolismus von <i>Plasmodium falciparum</i>	16
I.2.1. Hämoglobin-Abbau	16
I.2.2. Cysteinproteasen von <i>Plasmodium falciparum</i> (Falcipaine)	17
I.2.2.1. Falcipain-2	19
I.3. Ausgangspunkt und Zielsetzung dieser Arbeit	21
 II. Material und Methoden	 22
II.1. Molekularbiologische Methoden	22
II.1.1. Plasmid-Vektoren	22
II.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA	22
II.1.3. Polymerase-Ketten-Reaktion	23
II.1.4. Reinigung und Konzentrierung der PCR-Produkte	24
II.1.5. End-Konversion und Ligation	24
II.1.6. Restriktionsspaltung	25
II.1.7. Transformation in <i>E. coli</i> -Zellen	25
II.1.8. Antibiotika	26
II.2. Proteinsynthese	27
II.2.1. Testexpression von <i>FPc285a</i> und <i>FPc285aM</i>	27
II.2.2. Optimierung der Expressionsbedingungen	27
II.2.2.1. Variation der IPTG-Konzentration	28
II.2.2.2. Kälteschock	28
II.2.2.3. Hitzeschock	29
II.2.2.4. Osmotischer Stress	29
II.2.3. Proteinpräparation, Reinigung und Rückfaltung von <i>FPc285a</i>	29
II.2.3.1. Expression in präparativem Maßstab	29
II.2.3.2. Vorreinigen und Lösen	30

II.2.3.3.	Säulenchromatographische Reinigung	30
II.2.3.4.	Protein-Rückfaltung	32
II.2.3.5.	Konzentrieren von Proteinlösungen	32
II.3.	Analytische Methoden	32
II.3.1.	Agarose-Gelelektrophorese	32
II.3.2.	SDS-PAGE (Laemmli)	33
II.3.3.	Semi-Dry Western-Blot	33
II.3.4.	Protein-Konzentrationsbestimmung	34
II.4.	Charakterisierung von Falcipain-2	35
II.4.1.	Aktivitätstests	35
II.4.1.1.	Aktivitätstests mit chromogenen Substraten	35
II.4.1.2.	Hämoglobinase-Assay	36
II.4.1.3.	pH-Abhängigkeit der Aktivität	36
II.4.1.4.	Western-Blot von FPc285a	37
II.4.1.5.	Selbstprozessierungs-Assay	37
II.4.2.	Inhibitorstudien mit N-(4-Bromophenyl)maleimid (N-4-BM)	37
III.	Ergebnisse	39
III.1.	Konstruktion inaktiver Falcipain-2-Mutanten	39
III.2.	Expression der mutierten Falcipain-Gene	42
III.2.1.	Expression von <i>FPc285a</i>	42
III.2.2.	Expression von <i>FPc285aM</i>	45
III.3.	Charakterisierung von Falcipain-2	47
III.3.1.	Aktivitätstests	47
III.3.2.	Inhibitorstudien mit N-(4-Bromophenyl)maleimid	53
IV.	Diskussion	54
IV.1.	Expression von <i>FPc285a</i> und <i>FPc285aM</i>	54
IV.2.	Reinigung und Rückfaltung von FPc285a	55
IV.3.	Charakterisierung von Falcipain-2	56
IV.4.	N-(4-Bromophenyl)maleimid als Kristallisationszusatz für FP-2	60
IV.5.	Ausblick	60

V. Zusammenfassung	62
VI. Literaturverzeichnis	64
VII. Anhang	76
VII.1. Primer	76
VII.2. Chemikalien, Proteine, Chromogene Substrate und Enzyme	76
VII.3. Puffer	79
VII.4. Medien, Lösungen und Färbelösungen	83
VII.5. Geräte und Chromatographiesäulen	85
VII.6. Labor-Kits, Bakterien-Stämme und Plasmide	87
VIII. Danksagung	90
IX. Lebenslauf	91

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
AMC	Amino-4-Methyl-Coumarin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BSA	Rinder-Serumalbumin
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DMF	Dimethylformamid
DTT	Dithiothreitol
E-64	N-[N-(L-3-Trans-carboxyrane-2-carbonyl)-L-Leucyl]-Agmatin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtBr	Ethidiumbromid
FP	Falcipain
Hb	Hämoglobin
GSH	reduziertes Gluthation
GSSG	oxidiertes Gluthation
His-Tag	Histidin-Tag
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertoni
MCS	Multiple Klonierungsstelle
NA	Nitroanilid
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitrotetrazoliumblausäure
NTA	Nitrilotriessigsäure
N-4-BM	N-(4-Bromophenyl)maleimid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion

RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
SH	Sulphydryl
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
WHO	<i>World Health Organisation</i>
w/v	Masse pro Volumen
Zn	Zink

I. Einleitung

I.1. Malaria

Die Malaria ist eine durch Protozoen der Gattung *Plasmodium* verursachte Infektion, die besonders in den Subtropen und Tropen weit verbreitet ist und als eine der häufigsten Krankheiten weltweit gilt.

Unter den mehr als 100 Plasmodienspezies gelten lediglich vier als humanpathogen. Diese rufen unterschiedliche Formen der Erkrankung hervor: *Plasmodium falciparum* (*Malaria tropica*), *P. ovale* und *P. vivax* (*Malaria tertiana*) und *P. malariae* (*Malaria quartana*). Ihr einziger warmblütiger Wirt ist der Mensch [94]. *P. knowlesi*, zunächst nur als Malariaerreger von Affen bekannt, wurde kürzlich ebenfalls bei der humanen Erkrankung gefunden [91].

Die Übertragung von Malaria erfolgt natürlicherweise durch den Stich einer weiblichen, mit Plasmodien infizierten *Anopheles*-Mücke (Moskito). Gelegentlich wird die Infektion unter der Geburt, durch Transfusion von Blutprodukten sowie bei Organtransplantation erworben [23]. Ein seltenes Phänomen ist die so genannte „Flughafen-Malaria“, bei der mit Flugzeugen importierte Moskitos Menschen in der Nähe von Flughäfen infizieren. Zwischen 1977 und 2000 sind in Westeuropa lediglich 75 Fälle aufgetreten [51].

Die Mehrzahl der Malariainfektionen wird durch *P. falciparum* und *P. vivax* verursacht. *P. falciparum* ist Erreger der schwer verlaufenden *Malaria tropica*, bei der besonders für Kleinkinder, Schwangere und nicht-immune Reisende unbehandelt akute Lebensgefahr besteht. Da die meisten malariaassoziierten Todesfälle auf Infektionen durch diesen Erreger beruhen, hat er die größte klinische Bedeutung [30].

Malariainfektionen haben in den letzten Jahren zugenommen. Dies ist vorwiegend auf die gehäuften Resistenzen der Malariaparasiten gegen die billigen und effektiven Medikamente wie Chloroquin und Sulfadoxin/Pyrimethamin [29], sowie der Moskitos gegen Insektizide [17] zurückzuführen. Ferner sind der ökologische-, der klimatische Wandel und vermehrte Reisen in die Malaria-Endemiegebiete als Faktoren zu nennen [52].

I.1.1. Epidemiologie

Schätzungsweise 40 % der Weltbevölkerung sind malariagefährdet, ein Großteil davon lebt in den ärmsten Ländern. Jährlich entwickeln mehr als 500 Mio. Menschen eine schwere Erkrankung, und bis zu 2,7 Mio. versterben daran [6]. Ungefähr 30.000 Krankheitsfälle betreffen Reisende aus industrialisierten Ländern, davon ca. 7.000 aus Europa [36,52]. Die meisten Krankheits- und Todesfälle sind bei Kindern der tropischen Länder zu verzeichnen [61]. Die Verbreitung der Malaria entspricht dem Lebensraum der Moskitos [90] und betrifft fast den gesamten tropischen Klimagürtel der Erde (s. Abb. 1).

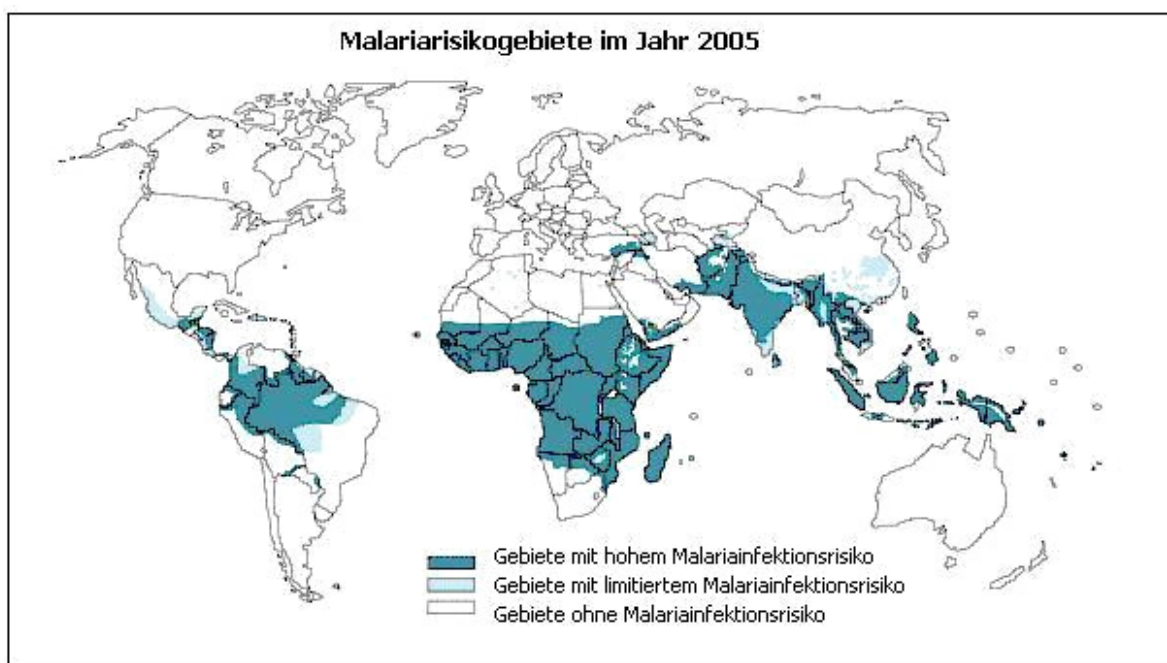


Abb 1: Weltweite Malariaverbreitung im Jahr 2005

Die Karte zeigt die weltweite Verteilung der Malaria im Jahr 2005. Die Orte mit einer hohen Prävalenz und Infektionsgefahr sind dunkelblau, die Gebiete mit geringem Risiko hellblau gekennzeichnet. Regionen ohne Malariavorkommen sind weiß dargestellt. Die Erkrankung kommt in Afrika, Indien, im mittleren Osten, Südostasien, China, Ozeanien, Haiti, Zentral- und Südamerika, Mexiko und in der Dominikanischen Republik vor [36]. Karte entnommen aus WHO, 2005 [1], modifiziert.

P. falciparum herrscht im tropischen Afrika, in Südostasien, Ozeanien, Haiti, im Amazonasstromgebiet Südamerikas und in der Dominikanischen Republik vor, während *P. vivax* in den übrigen Gebieten verbreitet ist.

Einige Regionen weisen über das Jahr recht konstante Fallzahlen auf. Diese werden als endemisch bezeichnet. In anderen Regionen ist die Malaria eher eine saisonale Erkrankung, meist an die Regenzeit gebunden, wenn die Moskitos besonders aktiv sind [6]. Für die Endemiegebiete ist die Malaria aufgrund der anfallenden medizinischen

Kosten sowie der geringen Arbeitsproduktivität im Krankheitsfall eine erhebliche ökonomische Last [77].

I.1.2. Lebenszyklus der Plasmodien

Alle vier humanpathogenen Plasmodienarten haben einen sehr ähnlichen Entwicklungszyklus mit obligatem Wirtswechsel. Die geschlechtliche Vermehrung (Sporogonie) vollzieht sich in der weiblichen Anopheles-Mücke als Endwirt, die ungeschlechtliche Vermehrung (Schizogonie) im Menschen als Zwischenwirt (siehe Abb. 2).

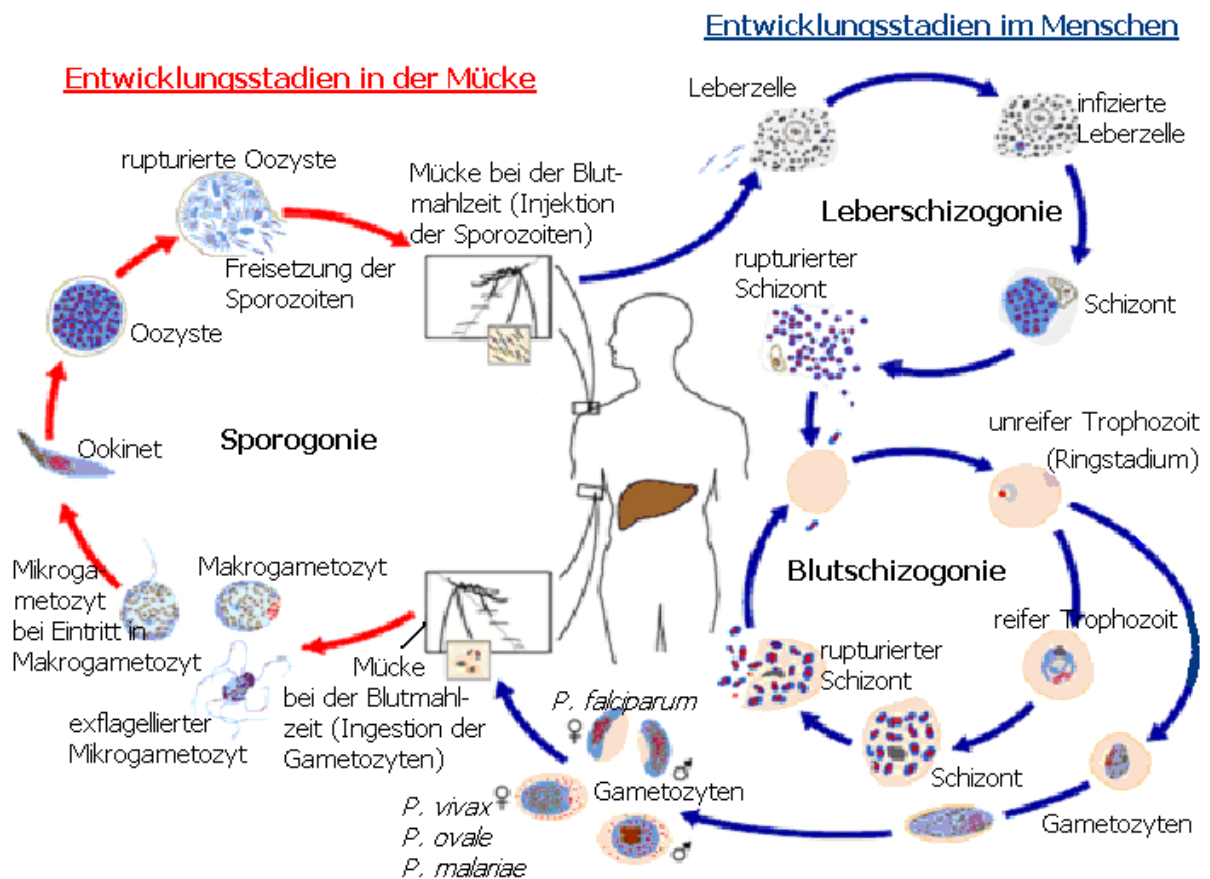


Abb. 2: Lebenszyklus der Plasmodien

Diese Darstellung zeigt die geschlechtliche Vermehrung in der Mücke (Sporogonie) in rot sowie die ungeschlechtliche Vermehrung im Menschen (Schizogonie), bestehend aus Leber- und Blutstadium, in blau. Entnommen aus Centers of Disease Control (CDC) [2], modifiziert.

Ungeschlechtliche Vermehrung (Schizogonie)

Die infizierte weibliche Anopheles-Mücke injiziert mit dem Stich die im Speichel befindlichen Sporozoiten in das subkutane Gewebe oder seltener direkt in den Blutstrom des Menschen. Hier durchlaufen die Parasiten zwei Entwicklungsstadien, die Leber- und die Blutschizogonie.

Leberschizogonie: Die Sporozoiten erreichen die Leber innerhalb kurzer Zeit und dringen in die Leberparenchymzellen ein. Hier reifen sie zu Schizonten heran, die eine rasche Zellteilung vollziehen. Dabei entstehen bis zu 30.000 Merozoiten, die bei Ruptur der Leberzelle in die Blutbahn gelangen.

Bei *P. vivax* und *P. ovale* entstehen parallel zu den Schizonten Wartestadien, die so genannten Hypnozoiten, die sich erst nach Monaten bis Jahren weiter entwickeln. Durch einen unbekannten Stimulus reifen sie heran und beginnen ebenfalls die Teilung, was die typischen Malariarezidive dieser beiden Spezies bedingt.

Blutschizogonie: Die aus den Leberzellen freigesetzten Merozoiten dringen in die roten Blutkörperchen ein, wo sie sich zunächst zu den metabolisch wenig aktiven Ringstadien, dann weiter zu den Trophozoiten entwickeln, in denen der Großteil des erythrozytären Hämoglobins verdaut wird [25]. Letztere entwickeln sich anschließend zu Schizonten und machen wie in der Leber eine Teilung zu Merozoiten durch. Die durch Ruptur der Erythrozyten freigesetzten Merozoiten befallen dann weitere Erythrozyten. Eine Blutschizogonie dauert, abhängig von der Plasmodienspezies, 48-72 Stunden. Sie ist bei *P. malariae*, *P. ovale* und *P. vivax* streng synchronisiert, wodurch sich die gesamte Population zeitgleich im selben Entwicklungsstadium befindet.

Ein Teil der Merozoiten entwickelt sich zu unreifen Geschlechtsformen, den Gametozyten, die ebenfalls ins Blut gelangen.

Geschlechtliche Vermehrung (Sporogonie)

Die Gametozyten werden bei der Blutmahlzeit von der Mücke aufgenommen und wandeln sich im Darm des Insekts innerhalb von Minuten in Gameten um. Die männlichen Mikrogameten gehen durch Abschnüren, als Exflagellation bezeichnet, aus den Gametozyten hervor und befruchten die weiblichen Makrogameten. Die dabei entstehende bewegliche Zygote („Ookinet“) lagert sich an die Darmwand an und wächst zur Oozyste heran. In der Oozyste läuft die Sporogonie ab, in der durch Reduktionsteilung, bevorzugt

bei höheren Temperaturen, ca. 1000 Sporozoitien gebildet werden. Nach 9-14 Tagen werden sie durch Lyse der Oozyste freigesetzt, wandern in die Speicheldrüsen der Mücke und sind dann infektiös für den Menschen [47].

I.1.3. Pathogenese und klinischer Verlauf

Die Inkubationszeit beträgt bei *P. falciparum*, *P. ovale*, und *P. vivax* 10-18 Tage, bei *P. malariae* 18-40 Tage [49].

Die klinische Manifestation der Infektion hängt entscheidend vom Parasiten sowie von der Immunität des Menschen ab. Die so genannte „Teilimmunität“ entwickelt sich über lange Zeit nach wiederholten Infektionen. Des Weiteren haben einige erbliche Erythrozytenanomalien eine schützende Wirkung. Zu diesen werden vor allem die Sichelzellenanämie, einige Formen der Thalassämie, der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase-Mangel und das Fehlen von Duffy-Blutgruppen-Antigenen im Falle der Vivax-Malaria gezählt [41]. Nicht-immune Menschen entwickeln besonders bei der *Malaria tropica* schwere Krankheitserscheinungen. Die hohe Morbidität und Mortalität von Kleinkindern zwischen einem halben Jahr und fünf Jahren in Endemie-Gebieten wird auf eine noch nicht ausreichend ausgebildete Teilimmunität zurückgeführt [49].

Eine Plasmodieninfektion verursacht lediglich im Blutstadium Symptome. Die akuten Krankheitserscheinungen, bestehend aus Fieber, Schüttelfrost, Schweißausbrüchen, Kopfschmerzen und allgemeinem Krankheitsgefühl werden durch die Ruptur der Erythrozyten am Ende des ungeschlechtlichen Zyklus ausgelöst. Die freigesetzten plasmodialen Toxine stimulieren Monozyten zur Synthese von Zytokinen (TNF- α) und Interleukinen (IL-1), die für die Symptome verantwortlich sind [41,49].

Das Fieber als Kardinalsymptom der Malaria verläuft bei den verschiedenen Malariaformen in Schüben unterschiedlicher Frequenz, was auf die Zyklusdauer der jeweiligen Plasmodien zurückzuführen ist. Bei der *Malaria tertiana* treten sie alle 48 Stunden auf, bei der *Malaria quartana* alle 72 Stunden. Ein solcher Schub beginnt typischerweise mit Schüttelfrost, geht dann in ein Hitzestadium über, um dann in der Entfieberungsphase mit Schweißausbrüchen zu enden [49]. Bei der *Malaria tropica* treten die Anfälle jedoch aufgrund der asynchronen Vermehrung von *P. falciparum* häufig unregelmäßig auf. Diese Tatsache führt oftmals zu Fehldiagnosen.

Die Hämolyse resultiert bei allen Spezies in weiteren häufigen Komplikationen, wie einer hämolytischen Anämie, einer Hämoglobinurie mit Dunkelfärbung des Urins (so genanntes

Schwarzwasserfieber) und einem Ikterus. Die infizierten Erythrozyten besitzen eine herabgesetzte Verformbarkeit, wodurch sie vermehrt von der Milz abgebaut werden. Die Folge sind eine Splenomegalie und eine Verstärkung der Anämie. Ebenfalls von Bedeutung sind Hypoglykämien, die durch den intraerythrozytären Metabolismus der Plasmodien bedingt sind [41].

Das besondere Gefahrenpotential der Falciparum-Malaria besteht in der Neigung zu Mikrozirkulationsstörungen und unterscheidet diese von den anderen Malariaformen.

P. falciparum induziert an der Oberfläche von Erythrozyten Ausstülpungen (engl. „sticky knobs“), die an Endothelzellen binden und zur Sequestration der Blutkörperchen in kleinen Gefäßen und dadurch zum Verschluss führen [56,60]. Ein verstärkender Faktor ist das so genannte „rosetting“, das Anheften infizierter an nicht infizierte Erythrozyten [76]. Die Gefäßverschlüsse führen besonders im Gehirn und anderen Organen (Niere, Lunge, Gastrointestinaltrakt) zu Gewebsschäden und dadurch zu den typischen Komplikationen der *Malaria tropica*. Die zerebrale Malaria kann sich in Bewusstseinsstörungen von Schläfrigkeit bis Koma äußern. Oft geht sie auch mit neurologischen Herdsymptomen, wie Lähmungen und Krampfanfällen einher. Unbehandelt ist sie letal. Die lebensbedrohliche anurische Niereninsuffizienz ist wahrscheinlich Folge mehrerer Faktoren wie Hypovolämie, mikrovaskuläre Verschlüsse und Hämolyse [14]. Übelkeit, Erbrechen und blutiger Stuhlgang sind häufig auftretende gastrointestinale Symptome, die oft als bakterielle Gastroenteritis fehlgedeutet werden. In der Lunge können die Gefäß- und Parenchymschäden mit einem Lungenödem einhergehen, das sich zum ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) entwickeln kann [41].

Die WHO unterscheidet eine schwere- von einer unkomplizierten Verlaufsform der *Malaria tropica*, für die verschiedene Therapie-Regime definiert werden [97]. Ohne antiparasitäre Therapie geht die Erkrankung schnell in die komplizierte Form über, die durch ernste Organdysfunktionen, Abnormalitäten im Blutbild oder im Stoffwechsel gekennzeichnet ist. Laut WHO-Kriterien muss für die Diagnose einer schweren *Malaria tropica* bei Nachweis von *P. falciparum* im Blut mindestens eines der folgenden Symptome vorliegen: Schwere normozytäre Anämie, zerebrale Malaria (mit nicht-erweckbarem Koma), akute Niereninsuffizienz, akutes Lungenödem, Hypoglykämie, Kreislaufschock, Spontanblutungen, generalisierte Krampfanfälle, metabolische Azidose mit Respiratory Distress Syndrome, Störung des Wasser- und Elektrolythaushaltes, Kollaps, Schock, Septikämie, Ikterus, Hämoglobinurie oder hohes Fieber [97].

I.1.4. Prophylaxe, Therapie und Resistenzproblematik

Prophylaxe

Die Krankheits-Prävention ist ein elementarer Grundpfeiler des Kampfes gegen Malaria. Dazu gehört in erster Linie die Expositionsprophylaxe, d.h. der Schutz vor dem Stich infizierter Moskitos durch Moskitonetze, Fliegengitter, Repellents wie Autan®, Insektizide in Räucherspiralen und Verdampfern und nicht zuletzt durch das Tragen hautbedeckender Kleidung [3]. Zur Chemoprophylaxe bei Reisen in Endemiegebiete werden unter Berücksichtigung der plasmodialen Resistenzen eine Reihe von Medikamenten eingesetzt, die auch als Therapeutika dienen. Von aktueller Bedeutung sind Chloroquin sowie Mefloquin (Lariam®) bei Reisen in Länder mit hohem Malariarisiko. Die Kombination von Atovaquon mit Proguanil (Malarone®) ist vor allem für „Last-minute“- und Kurzzeitreisen in Regionen mit *Malaria tropica*-Risiko geeignet. Das von der WHO empfohlene Antibiotikum Doxycyclin ist in Deutschland für die Malariatherapie nicht zugelassen [4].

Medikamente

Quinolin-Derivate: Hierzu zählen Chloroquin, Chinin, Chinidin, Amodiaquin, Mefloquin, Halofantrin und Primaquin. Sie hemmen die Häm-Polymerase-Aktivität, was in der Akkumulation freien Häms resultiert. Dieses wirkt toxisch auf die Parasiten. Chloroquin inhibiert zusätzlich die Freisetzung von TNF- α [66]. Es war vor wenigen Jahrzehnten das Standardpräparat zur Malaria-Behandlung. Nur Primaquin greift die Plasmodien sowohl im Blut- als auch im Leberstadium an.

Antifolate: Typische Vertreter sind Pyrimethamin, Sulfonamide (Sulfadoxin), Dapsone und Proguanil. Fansidar® ist eine Kombination aus Pyrimethamin und Sufadoxin. Sie erfassen die intrahepatischen Plasmodienstadien, nicht jedoch die Hypnozoiten von *P. vivax* und *P. ovale*. Pyrimethamin tötet zusätzlich die Gametozyten (sexuelle Formen). Dies verhindert eine Übertragung auf die Moskitos und dadurch auf weitere Menschen.

Artemisinin-Derivate: Artemisinin, Artemeter und Artesunat binden das Eisen des Malaria-Pigmentes (Hemozoin) und produzieren freie Radikale, die den Parasiten zerstören. Sie vermindern schnell die Parasitämie um den Faktor 10 pro Zyklus [9] und haben den Vorteil gegenüber den übrigen Antimalaria-Mitteln, dass sie Aktivität über das gesamte Blutstadium zeigen. Studien verdeutlichten, dass Artemisinine die

post-therapeutische Infektiosität sowie die Malariaübertragung in endemischen Gebieten reduzieren können [8,48,59].

Antibiotika: Clindamycin, Atovaquon und Tetracykline wirken synergistisch mit Quinolin-Derivaten auf die Blut-Schizonten.

Resistenzproblematik

Elementar wichtig für die Eindämmung der Malaria sind frühe Diagnosestellung und prompte Behandlung [6], damit die Vermehrung der Erreger im menschlichen Wirt und deren weitere Verbreitung unterbunden werden. Die Therapie wird jedoch massiv erschwert durch weit verbreitete und stetig zunehmende Resistenzen gegen die erhältlichen Medikamente.

Chloroquinresistente Stämme von *P. vivax* mit klinischer Relevanz wurden bisher nur in Papua Neu Guinea und Indonesien gefunden [13,26], Chloroquin gilt daher weiterhin als Mittel der ersten Wahl gegen Vivax-Malaria. Chloroquinresistente *P. falciparum*-Stämme existieren in nahezu allen Gebieten, in denen der Erreger auftritt [13]. Fast alle

P. falciparum-Infektionen benötigen daher eine alternative Therapie. Der Resistenz-Mechanismus besteht in der Ausscheidung des Medikamentes aus der Zelle [38].

Chininresistente *P. falciparum*-Stämme wurden in Thailand, Vietnam, Kambodscha, Myanmar, Kamerun und in Teilen des Amazonas-Stromgebietes gefunden. Es besitzt noch eine relativ hohe Effizienz in Südamerika und Thailand, wird jedoch wegen seiner geringen therapeutischen Breite nur selten eingesetzt [9]. Resistenzen des Erregers gegen Mefloquin (in den 80er Jahren als Nachfolger von Chloroquin angesehen) traten in Thailand, Myanmar sowie in Kambodscha auf [50,58]. Resistenzen *P. falciparums* gegen das einst bei chloroquinresistenten Stämmen wirksame Fansidar® (Pyrimethamin/Sulfadoxin) existieren in Südamerika, Südostasien, Thailand, Kambodscha, Myanmar und im subsaharischen Afrika [55].

Toleranz von *P. vivax* gegenüber Primaquin mit insuffizienter Eradikation der Leberstadien wurden in Thailand und Ozeanien beschrieben [44]. Von resistenten *P. falciparum*-Stämmen wurde aus dieser Region ebenfalls berichtet [10].

Das einzige erhältliche Medikament ohne nachgewiesene Resistenzen ist Artemisinin [9,33]. Bei der Therapie der „multidrug“-resistenten Falciparum-Malaria ist man auf dieses angewiesen. Eine Resistenzentwicklung ist jedoch zu befürchten, da sie *in vitro* zu beobachten ist und bereits von potentiell gefährlichen Mutationen berichtet wurde [35,48]. Man nimmt an, dass die Kombination von Artemisinin mit anderen effektiven Mitteln die

Parasiten schnell auslöschen und eine Resistenzentwicklung aufhalten kann [57,65,68]. Die WHO hat daher öffentlich zu einer Kombinationstherapie aufgerufen und deutlich vor der Monotherapie gewarnt [7].

Therapie der *Malaria tropica*

Nach den Richtlinien der WHO sollen die unkomplizierte und schwere *Malaria tropica* unterschiedlich therapiert werden [5]. Zur Behandlung der unkomplizierten *Malaria tropica* wird eine Artemisinin-Kombinationstherapie empfohlen. Als Kombinationspartner dienen Medikamente mit anderen Wirkmechanismen, wie Lumefantrin, Mefloquin, Clindamycin, Tetracycline und Pyrimethamin-Sulfadoxin, die entweder ebenfalls schnell oder langsam wirksam sind. Im ersten Fall beträgt die Therapiedauer sieben, im zweiten Fall drei Tage. Bei der schweren *Malaria tropica* soll dem Patienten innerhalb der ersten 24 Stunden nach Diagnosestellung rasch das Mittel der Wahl zugeführt werden. In Gebieten mit niedriger Plasmodien-Übertragungsrate ist dies Artesunat, in Ländern mit hoher Transmissionsrate kommen Artesunat, Artemeter oder Chinin in Betracht [5].

I.2. Metabolismus von *Plasmodium falciparum*

I.2.1. Hämoglobin-Abbau

Funktion

Während der asexuellen Vermehrung in den Erythrozyten baut *P. falciparum* bis zu 75 % des Wirtszell-Hämoglobins ab [25,45], um Aminosäuren für die plasmodiale Proteinbiosynthese zu gewinnen [82]. Des Weiteren deuten Forschungsergebnisse darauf hin, dass dieser Vorgang der osmotischen Stabilisierung von infizierten Erythrozyten dient [42] und die Volumenzunahme der wachsenden Parasiten ausgleicht [40].

Ort, Zeitpunkt und Ablauf

Bei *P. falciparum* findet der Hb-Abbau vorwiegend im Trophozoiten- und Schizontenstadium statt, den Stadien, in welchen der Parasit die höchste Stoffwechselaktivität zeigt. Die Trophozoiten ingestieren das erythrozytäre Zytoplasma und transportieren es zu einer großen Nahrungsvakuole, die ein saures Organell mit pH 5,0-5,4 analog zu Lysosomen darstellt [39,98]. Hier wird das Hämoglobin durch eine Reihe von Enzymen zu Globin und

Häm gespalten, wobei letzteres in polymerisierter Form als Malaria-Pigment Hemozoin [82] gespeichert wird. Das Globin wird dann weiter hydrolysiert.

Beteiligte Enzyme

Am Hb-Verdau sind drei verschiedene Protease-Typen beteiligt: Vier Aspartat-Proteasen (Plasmepsine), drei Cystein-Proteasen (Falcipaine) und eine Metallo-Protease (Falcilysin). Das genaue Zusammenwirken dieser Enzyme ist noch nicht vollständig geklärt. Aufgrund der bisherigen Forschungsergebnisse wird jedoch angenommen, dass die Plasmepsine für die initiale Spaltung des Hämoglobins verantwortlich sind, indem sie das Molekül in der so genannten „hinge“-Region angreifen und es dadurch entfalten [12,25,37,89]. Die Falcipaine FP-2, FP-2' und FP-3 hydrolysieren die Plasmepsin-Spaltprodukte zu kürzeren Fragmenten [27,72,74,81,83,87,92], aus denen schließlich durch Falcilysin einzelne Aminosäuren freigesetzt werden [53,54].

1.2.2. Cystein-Proteasen von *Plasmodium falciparum* (Falcipaine)

Klassifikation von Peptidasen im MEROPS-System

In der MEROPS-Datenbank werden Peptidasen (proteolytische Enzyme) mit homologer Aminosäuresequenz der Peptidase-Domäne (für die Peptidase-Aktivität verantwortlicher Teil des Enzyms) in Familien, die aus einem Vorläuferenzym (Prototyp) entstanden sind, zusammengefasst. Familien mit homologer Tertiär-Struktur und ähnlicher Aminosäure-Anordnung im katalytischen Zentrum oder in daran angrenzenden Bereichen werden weiter zu Clans gruppiert.

Bei der Familie der Cystein-Proteasen mit Papain als Vorläufer, „C1“, wird das katalytische Zentrum von Cystein und Histidin sowie Glutamin oder Asparagin gebildet. Die SH-Gruppe des Cysteins im aktiven Zentrum dient als Nucleophil, um die Carbonylgruppe der Peptidbindung bei der hydrolytischen Spaltung anzugreifen. Bei den meisten Cysteinproteasen wird die Spezifität vorwiegend durch die Subsite „S2“ der Substratbindungsstelle bestimmt [16].

Proteasen der Papain-Familie werden typischerweise als inaktive Proenzyme synthetisiert, die mit Hilfe der Prodomäne zu aktiven Enzymen gefaltet werden [67,93,95].

Der Clan „CA“ enthält alle Familien, die dem Papain ähnliche Strukturen aufweisen [70].

FP-1, FP-2, FP-2' und FP-3 wurden nach dem System der MEROPS-Datenbank in die Subfamilie der „C1A“-Cystein-Proteasen der Papain-Familie eingeordnet [64,81,83].

Nomenklatur nach Schechter und Berger

Die Nomenklatur nach Schechter und Berger dient der Beschreibung von Interaktionen zwischen einer Protease und ihrem Substrat. Die Aminosäuren des Substrates werden von der Spaltstelle aus in Richtung N-Terminus fortlaufend mit P1 bis Pn und in Richtung C-Terminus mit P1' bis Pn' bezeichnet. Die Bindungstaschen („Subsites“) des Enzyms werden analog zu den gebundenen Aminosäuren des Substrates mit S1 bis Sn bzw. S1' bis Sn' benannt [78].

Falcipaine

Als Falcipaine bezeichnet man Cysteinproteasen des Parasiten *Plasmodium falciparum*, dem Erreger der *Malaria tropica*. Hierzu zählen FP-1, FP-2, FP-2' und FP-3.

Das FP-1-Gen befindet sich auf dem plasmodialen Chromosom 14, während die Gene der übrigen Falcipaine auf Chromosom 11 liegen.

Die Homologie der Falcipaine ist sehr verschieden. Zwischen den FP-2-Isoenzymen besteht eine Sequenzgleichheit von 97,5 % [27,92]. Sie ähneln der katalytischen Domäne von FP-3 zu 68 % und dem von FP-1 nur zu ca. 40 % [71].

Die Enzyme sind nicht gleichzeitig im Parasiten zu finden, sondern werden sequenziell synthetisiert. Die Expression von FP-2 findet hauptsächlich in frühen bis späten Trophozoiten-Stadien statt, während FP-3 vorwiegend in späten Trophozoiten und frühen Schizonten detektierbar ist [18,20,86].

Bezüglich der Reaktionsbedingungen zeigen die Falcipaine saure pH-Optima, passend zu dem Reaktionsmedium der sauren Nahrungsvakuole. Als typische Cysteinproteasen lässt sich ihre Aktivität durch Zusatz von reduzierenden Reagenzien wie Gluthation und DTT stimulieren [71].

Eine Sonderstellung nimmt FP-1 ein. Dieser Protease wurde anfänglich ebenfalls eine Rolle im Hb-Verdau zugesprochen. Mittlerweile ist jedoch bekannt, dass sie nicht essentiell für diesen Prozess ist [22,84,85], sondern an der Invasion der Erythrozyten durch Merozoiten beteiligt ist [28]. Des Weiteren könnte FP-1 eine Bedeutung für die Oozysten-Produktion während der geschlechtlichen Entwicklung der Plasmodien im Moskito-Mitteldarm haben [22].

I.2.2.1. Falcipain-2

Falcipain-2 ist die am besten charakterisierte Protease von *Plasmodium falciparum*. Das Protein wird vorwiegend in frühen bis späten Trophozoiten-Stadien und in geringerem Maße auch in den Schizonten synthetisiert und ist in der Nahrungsvakuole der Trophozoiten und Schizonten lokalisiert [18,86].

FP-2 wird als integrales Membran-Proenzym aus 484 Aminosäuren synthetisiert [18,63,81,87] und auf sekretorischem Weg Vesikel-vermittelt aus dem Endoplasmatischen Retikulum durch den Golgi-Apparat zur Nahrungsvakuole transportiert [19].

Im Rahmen der Prozessierung des Profalcipains werden die 243 aminoterminalen Aminosäuren, die den Membran-Anker mit einschließen, proteolytisch abgespalten. Wie auch bei anderen Enzymen der Papain-Familie gesehen [95], wird hierbei ein Autohydrolyse-Mechanismus vermutet: Rekombinantes, rückgefaltetes FP-2 prozessiert bei neutralem bis leicht alkalischem pH-Wert zu maturem, aktivem Enzym [81,83]. Dieser Vorgang konnte durch Cystein-Protease-Inhibitoren gehemmt werden [18,81,88]. Die Prozessierung findet wahrscheinlich in einem spezifischen hydrophoben Kompartiment innerhalb der Plasmodien statt [18].

FP-2 weist für Proteasen der C1-Familie einige untypische Merkmale auf: Die katalytische Domäne besitzt ein aminoterminales Segment, das die Faltung der Protease unabhängig von der Prodomäne ermöglicht [63,88]. Der inhibitorische Effekt der Prodomäne auf das reife Enzym ist jedoch auch bei FP-2 zu finden [88].

Zusätzlich enthält das Protein eine Sequenz-Insertion nahe des Carboxyl-Terminus, die die Interaktion mit Hämoglobin vermittelt [64].

Auffällig ist auch, dass das Enzym ungewöhnlich viele Disulfidbrücken enthält (vier SH-Brücken) [81].

In den letzten Jahren wurden drei Hauptfunktionen für das Enzym ermittelt, die unterschiedliche pH-Optima aufweisen:

1. Wie beschrieben ist FP-2 am Hb-Abbau beteiligt (siehe I.2.1.). Es liegen Ergebnisse vor, die darauf hindeuten, dass FP-2 die Haupt-Hämoglobinase-Aktivität in frühen Trophozoiten ausmacht [18]. Inaktivierung des FP-2-Gens resultiert in einer veränderten Morphologie der Plasmodien: Die Trophozoiten sind geschwollen und zeigen mit nicht

abgebautem Hämoglobin gefüllte Nahrungsvakuolen, was auf eine kritische Rolle des Enzyms im Hb-Katabolismus hinweist [20,85,86].

Die Hämoglobinase-Aktivität von FP-2 besitzt ein saures pH-Optimum.

2. Wie geschildert, nimmt man einen Autohydrolyse-Mechanismus bei alkalischem bis neutralem pH-Wert für die Prozessierung an.

3. Außerdem spaltet FP-2 Proteine, die wichtig für die Stabilität der erythrozytären Zellmembran sind. Ankyrin und Protein 4,1 werden in späten Trophozoiten- und frühen Schizonten-Stadien mit einem pH-Optimum von 7,0-7,5 von FP-2 hydrolysiert [21,31,69].

Blockade des FP-2-Gens resultiert in einer reduzierten Membran-Ruptur und

Merozoiten-Egression [20], weshalb dem FP-2 auch eine Rolle bei der

Merozoiten-Freisetzung am Ende des erythrozytären Zyklus der Plasmodien zugesprochen wird.

Falcipain-2 und andere Hämoglobinasen als mögliche Angriffspunkte für Medikamente

Es konnte gezeigt werden, dass Inhibitoren gegen C1-Proteasen das Plasmodienwachstum in Zellkulturen hemmen [75,80] und Malaria-infizierte Mäuse heilen können [62,73]. Diese Tatsache macht die Falcipaine zu attraktiven Angriffspunkten für neue Antimalaria-Mittel.

Für den Hb-Abbau werden neben den Falcipainen auch Plasmepsine benötigt. Die gleichzeitige Hemmung beider Klassen zeigt einen synergistischen Effekt [43,79,86].

FP-2 ist aufgrund der vielen oben dargestellten Funktionen im parasitären Zyklus für

P. falciparum von besonders großer Bedeutung. In vorangegangenen Studien wirkten synthetische Inhibitoren gleichzeitig gegen FP-2 und FP-3 und wiesen eine potente Antimalaria-Wirkung auf [80], wobei FP-2-knock-out-Plasmodien eine gesteigerte Sensibilität gegenüber Cystein- und Plasmepsin-Protease-Inhibitoren zeigten [20,85,86].

Die Ausschaltung des FP-2-Gens war jedoch nicht letal für die Plasmodien, was durch kompensatorische Überexpression von FP-2' und FP-3 erklärt werden kann [86].

Diese Überlappung von Funktionen verschiedener Enzym-Klassen und der Falcipaine untereinander impliziert die Notwendigkeit, Hemmstoffe zu entwickeln, die an mehreren Stellen angreifen.

I.3. Ausgangspunkt und Zielsetzung dieser Arbeit

Vor dem Hintergrund der Verbreitung und Schwere der *Malaria tropica* sowie der zunehmenden Resistenzentwicklung gegenüber den aktuell erhältlichen Antimalaria-Mitteln ist die Entwicklung neuer Medikamente ein wichtiges Anliegen an die Forschung. Falcipain-2 und verwandte Cystein-Proteasen von *P. falciparum* stellen aufgrund der dargestellten Bedeutung für die Parasiten Angriffspunkte für dieses Ziel dar. Ein exaktes Verständnis von Synthese, Struktur und Funktion dieser Enzyme ist Grundlage für die Entwicklung von Inhibitoren als effiziente Antimalaria-Mittel.

Bis zu Beginn dieser Arbeit war es bereits gelungen, Falcipain-2 in rekombinanter Form in großer Menge zu gewinnen [83], und das Enzym weitestgehend biochemisch zu charakterisieren (siehe I.2.2.1.).

Eine Zielstellung dieser Arbeit war es, inaktive, fast identische Mutanten von FP-2 rekombinant herzustellen. Mit Hilfe dieser mutierten Proteine sollten die Expressionsbedingungen zur Synthese löslichen, korrekt gefalteten Enzyms für die Kristallisation und Strukturaufklärung optimiert werden. Eine Rückfaltung der fehlgefalteten Proteinaggregate (Inclusion Bodies), in denen FP-2 bisher stets vorlag [81,83], wäre dann nicht mehr erforderlich. Des Weiteren versprachen die Mutanten verbesserte Kristallisationsbedingungen, da aufgrund ihrer Inaktivität kein Inhibitor als Zusatz nötig wäre. Nicht zuletzt sollten die mutierten FP-2-Proteine der Funktionsuntersuchung von FP-2 dienen, indem sie für Bindestudien mit dem FP-2-Substrat Hämoglobin sowie als Präkursor-Modell in Prozessierungsstudien mit dem aktiven, rekombinanten Enzym verwendet werden sollten.

Ein weiteres Ziel war die Analyse der pH-Profile verschiedener Reaktionen von aktivem FP-2 (Hb-Verdau, Spaltung synthetischer peptidischer Substrate und Prozessierung des Enzyms).

Schließlich sollte an Stelle des bisher verwendeten Jodacetamids ein neuer Inhibitor untersucht werden, der sowohl das Protein während der Kristallisation stabilisiert als auch ein für das Lösen der Struktur hilfreiches Schweratom in die Kristallstruktur einfügt.

II. Material und Methoden

II.1. Molekularbiologische Methoden

II.1.1. Plasmid-Vektoren

pQE-30

Der pQE-30-Vektor enthält eine *Multiple Cloning Site (MCS)* für schnelles Klonieren, einen für einen 6x-His-Tag kodierenden Genabschnitt, ein β -Laktamase-Gen, welches die Wirtsbakterien gegen β -Lactamantibiotika (wie z.B. Carbenicillin) resistent macht und einen T5-Promotor unter der Kontrolle eines lac-Operator-Repressors, der die Expression eines Gens nur in Anwesenheit des Induktors IPTG ermöglicht (Vektorkarte s. Anhang).

Ausgangskonstrukt dieser Arbeit war ein pQE30-Plasmid, das ein Fragment des FP-2-Gens (Aminosäuren 211-484) enthielt, welches für die mature Domäne und die 35 carboxyterminalen Aminosäuren der Prodomäne des Falcipain-2-Präkursors kodiert. Dieses Expressionsplasmid trägt die Bezeichnung „pQ-35FP2“ und wurde von Prof. T. Schirmeister (Würzburg) zur Verfügung gestellt. Es wurde als Template für die PCR-Mutagenese (II.1.3.) eingesetzt.

pETBlue-1

Der Vektor pETBlue-1 ist ein high-copy-Plasmid, das einen T7lac-Promotor für die Proteinexpression, Spaltungs-Sites für diverse Restriktionsenzyme und eine Carbenicillin-Resistenz als selektierbaren Marker besitzt (Vektorkarte s. Anhang).

II.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA

Hierfür wurden je nach benötigter DNA-Menge verschieden große Volumina an LB-Medium (3 ml, 30 ml oder 100 ml) mit Zellkulturen beimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Die „Mini“- , „Midi“- oder „Maxi“-Präparation von Plasmid-DNA aus den durch Zentrifugation gewonnenen Zellpellets erfolgte unter Verwendung des jeweiligen Plasmid-Kits. Es wurde nach der vom Hersteller mitgelieferten Vorschrift gearbeitet. Das mit Isopropanol präzipitierte und mit Ethanol gewaschene Plasmid-Pellet wurde im Exsikkator getrocknet und anschließend in 50- oder 200 μ l TE-Puffer gelöst.

Zur Kontrolle der präparierten Plasmide wurde ein Restriktionsverdau mit anschließender Analyse auf einem Agarose-Gel durchgeführt.

II.1.3. Polymerase-Ketten-Reaktion

Die im Jahre 1987 von K. B. Mullis entwickelte Polymerase-Ketten-Reaktion ermöglicht es, *in vitro* zahlreiche Kopien bestimmter DNA-Sequenzen in kurzer Zeit herzustellen.

Eine DNA-abhängige DNA-Polymerase liest die Template-DNA in dem gewünschten, von den Oligonukleotid-Primern flankierten Bereich in 3'- zu 5'-Richtung und verlängert dabei den jeweiligen Primer unter Einbau von vier Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) in umgekehrter Richtung.

Durch die Verwendung der hitzestabilen Taq-Polymerase als DNA-Polymerase können die drei Schritte der PCR, das Denaturieren, das Primer-Annealing, und die Extension mehrmals hintereinander durchlaufen werden. Es wird hierbei eine exponentielle Amplifikation erreicht, da jeder Zyklus die vorhandene DNA-Menge verdoppelt.

PCR-Mutagenese

Die PCR-Mutagenese wurde mit dem für Aminosäure 211-485 des FP-2-Präkursors kodierenden Ausgangskonstrukt (pQ-35FP2) durchgeführt.

Die DNA-Sequenz wurde so verändert, dass sie für eine inaktive FP-2-Mutante mit der Aminosäure Alanin an Stelle von Cystein im aktiven Zentrum kodiert. Das entstehende Gen wurde mit „FPc285a“ bezeichnet.

Die synthetisierten Oligonukleotid-Primer wurden so gewählt, dass das gesamte Plasmid amplifiziert wurde.

Die optimalen PCR-Bedingungen wurden durch Variation der Magnesium-Konzentration (1,5; 3,5; 5,5 mM), der DNA-Menge (10, 5 und 2,5 ng) und der Temperatur für das Primer-Annealing (48 °C-71 °C) ermittelt.

In einer weiteren PCR wurden zwei Abschnitte der in der PCR-Mutagenese gewonnenen DNA-Sequenz amplifiziert. Das für den inaktiven, verkürzten Präkursor „FPc285a“ (Aminosäure 211-484) mit His-Tag sowie das für die mature Dömanne von FPc285a kodierende Fragment (Aminosäure 245-484). Letzteres wurde mit „FPc285aM“ benannt. Abweichend zu den Angaben für die PCR-Mutagenese, wurden hier Annealing-Temperaturen zwischen 45 °C und 64,5 °C getestet.

Die Ansätze wurden je in 6 Aliquots zu 12 µl verteilt und den verschiedenen Annealing-Temperaturen ausgesetzt.

Die PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen analysiert.

Die verwendeten Primer sind im Anhang aufgeführt.

II.1.4. Reinigung und Konzentrierung der PCR-Produkte

Um die PCR-Probe von der Polymerase, den Primern und von überschüssigen Nukleotiden zu trennen, wurde sie mit gleichem Volumen an Chloroform-Isoamyl-Alkohol versetzt, gemischt und bei 13.000 rpm für 10 Min zentrifugiert.

Die wässrige Phase mit der DNA wurde in ein Gefäß der „*Microcon-PCR Centrifugal Filter Devices*“ überführt und steriles Wasser bis zu einem Volumen von 400 µl zugesetzt.

Die anschließende Aufkonzentration wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Das gereinigte PCR-Produkt wurde in 20 µl sterilen Wassers aufgenommen. Die Menge der extrahierten DNA wurde durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität der Plasmidbande mit der eines Markers mit bekannter DNA-Menge nach der Elektrophorese in einem 0,8 % Agarosegel ermittelt.

II.1.5. End-Konversion und Ligation

Bei der Ligation werden Vektor- und Insert-DNA, katalysiert durch das Enzym „Ligase“, über eine Phosphodiesterbindung miteinander verknüpft.

Zuvor werden die DNA-Moleküle mit den gleichen Restriktionsendonukleasen geschnitten, um komplementäre Enden zu generieren. Die Enden von PCR-Produkten werden in der End-Konversion durch das Enzym Polynukleotid-Kinase phosphoryliert. Es wurde nach Vorschrift der „*Perfectly Blunt® Cloning Kits*“ gearbeitet.

Die freien Enden des mutierten Ausgangsplasmides wurden miteinander verbunden bzw. die verschiedenen amplifizierten Genabschnitte in den Vektor pETBlue-1 ligiert. Um die Reaktion zu beenden, wurde die T4-Ligase durch zehnminütiges Erhitzen auf 65 °C inaktiviert.

Das Ergebnis der Ligationsreaktion wurde anschließend auf einem Agarosegel überprüft, und die Plasmide wurden in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert.

Nach Selektion und erneuter Plasmidpräparation wurden adäquate Mengen an DNA in

N₂-Strom bei 40-60 °C eingedampft, um die Konstrukte mittels Dideoxy-Sequenzierung zu verifizieren.

Die so hergestellten Plasmide wurden mit „pQ-FPc285a“, „pET-FPc285a“ und „pET-FPc285aM“ (M für matur) benannt.

II.1.6. Restriktionsspaltung

Restriktionsenzyme sind Endonucleasen meist bakteriellen Ursprungs, die doppelsträngige DNA an bestimmten Erkennungssequenzen, den Restriktions-Sites, spalten. Der Restriktionsverdau ist eine in der Molekularbiologie unerlässliche Methode, um gewünschte Abschnitte aus einem DNA-Molekül zu isolieren und die korrekte Amplifikation und Ligation von Expressionsvektoren zu überprüfen.

Das entsprechende Restriktionsenzym, in dieser Arbeit EcoRI, EcoRII (MvaI), HindIII, BamHI und SspI und der vom Hersteller angegebene Puffer betrugen je 1/10 des Reaktionsvolumens von 10 µl.

Der Restriktions-Verdau erfolgte über Nacht bei einer Inkubations-Temperatur von 37 °C.

II.1.7. Transformation in *E. coli*-Zellen

Transformation in NovaBlue SinglesTM kompetente Zellen

Zur Gewinnung einer größeren Menge an Plasmid-DNA wurden die Konstrukte nach Vorschrift des „Perfectly Blunt[®] Cloning Kit“ in „NovaBlue SinglesTM kompetente Zellen“ transformiert. Dieser *E. coli*-Stamm ist bekannt für seine hohe Transformationsrate und seine gute Eignung für Plasmid-Präparationen.

Transformation in den Expressionsstamm M15(pREP4)

Der Expressionsstamm M15 enthält das Hilfsplasmid pREP4, welches über ein Lac-Repressor kodierendes Gen und ein Kanamycin-Resistenzgen zur Selektion verfügt. Der Lac-Repressor reguliert die Proteinexpression, indem er in Abwesenheit des Induktors an die Operator-Sequenz bindet. Lediglich in Anwesenheit des Induktors IPTG, welcher den Repressor inaktiviert und somit die Bindung der RNA-Polymerase ermöglicht, kann die Proteinexpression stattfinden.

Zur Proteinexpression wurde ein in der Restriktionsspaltung verifiziertes

pQ-FPc285a-Plasmid und als Negativ-Kontrolle das pQE-30-Plasmid ohne Insert in den *E. coli*-Stamm transformiert. Die Transformation erfolgte nach folgendem Protokoll, einer Modifikation der Methode von Inoue [34]:

Transformation in *M15(pREP4)*-Zellen

Schritt	Arbeitsanweisung	Zeit
1)	100 µl Wirts-Zellen auf Eis auftauen	
2)	0,5 µl Plasmid-DNA hinzupipettieren	
3)	Probe auf Eis inkubieren	30 Min
4)	auf 42 °C erhitzen	45 Sek
5)	900 µl SOC-Medium hinzupipettieren	
6)	ohne Schütteln auf 37 °C abkühlen	5 Min
7)	unter Schütteln bei 37 °C inkubieren	1 h
8)	Zellen bei 5.000 rpm zentrifugieren	10 Min
9)	Überstand bis auf 50 µl abnehmen, Pellet darin resuspendieren, und die konzentrierten Zellen auf Agarplatten ausplattieren	

Transformation in den Expressionsstamm *Origami(DE3)*

Dieser Zellstamm beinhaltet eine chromosomale Kopie des T7-RNA-Polymerase-Gens und ist besonders geeignet für IPTG-induzierte Protein-Expression. Weiter besitzt er die Eigenschaft, die zytoplasmatische Disulfidbrückenbildung zu erleichtern [15]. Zur Selektion trägt er eine Kanamycin- und eine Tetracyclin-Resistenz. Der Stamm wurde eingesetzt, um die Entstehung der Inclusion-Bodies zu reduzieren und eine korrekte und vollständige Faltung von Falcipain-2 zu ermöglichen.

Korrekte Klone der Plasmide pET-FPc285a, pET-FPc285aM und auch ein nicht korrektes Konstrukt als Negativ-Kontrolle wurden unter Verwendung des „*TransformAidTM Bacterial Transformation Kit*“ in den Expressions-stamm *Origami(DE3)* transformiert.

Aus den Transformationsansätzen wurden definierte Volumina (10 µl und 100 µl) entnommen, ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Agarplatten enthielten die zur Selektion der korrekten Transformanten erforderlichen Antibiotika.

Zur Gewinnung reiner Kolonien wurde am nächsten Tag vereinzelt.

II.1.8. Antibiotika

Die Kultivierung von *NovaBlue SinglesTM* kompetente Zellen und *Origami(DE3)*-Zellen in flüssigem LB-Medium sowie auf LB-Agarplatten erfolgte unter Selektion mit dem

Antibiotikum Carbenicillin (100 µg/ml), da beide verwendeten Vektoren (pETBlue-1, pQE-30) das entsprechende Resistenzgen enthielten.

M15(pREP4)-Zellen mit korrektem Plasmid wurden ebenfalls mit 100 µg/ml Carbenicillin und aufgrund des entsprechenden Resistenzgens auf dem Hilfsplasmid pREP4 zusätzlich mit 50 µg/ml Kanamycin selektiert.

II.2. Proteinsynthese

II.2.1. Testexpression von *FPc285a* und *FPc285aM*

Von den transformierten *M15(pREP4)*- bzw. *Origami(DE3)*-Zellen wurden mehrere Klone von der Agarplatte in je 3 ml LB-Medium überführt. Diese Vorkulturen wurden über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

Für die Hauptkultur wurden je 50 ml LB-Medium einprozentig mit den verschiedenen Vorkulturen angeimpft und im Schüttelinkubatur bei 140 rpm und 37 °C inkubiert.

Bei einer OD_{546nm} zwischen 0,6 und 0,8 wurden die Zellen mit 0,5 mM IPTG induziert und fünf Stunden weiter inkubiert.

Für die Zellernte wurden die Kulturen bei 4 °C und 5.000 rpm 30 Min zentrifugiert und das gewonnene Pellet in 3 ml TE-Puffer resuspendiert.

Anschließend wurden die Zellen mittels gepulsten Ultraschalls im Eisbad aufgeschlossen. Die Schalldauer betrug 5 Min im Intervalltakt von 15 Sek.

Um die löslichen von unlöslichen Proteinen zu trennen, wurde das Lysat bei 4 °C und 13.000 rpm 30 Min zentrifugiert. Der Überstand und die in 1 ml TE-Puffer resuspendierten Pellets wurden auf einem 15 % SDS-Gel analysiert.

II.2.2. Optimierung der Expressionsbedingungen

Mit der Variation der Expressionsbedingungen sollte eine gesteigerte Bildung von sogenannten Chaperoninen erzielt werden. Diese entziehen dem Faltungsgleichgewicht posttranslational un- oder missgefaltete Proteine durch Bindung und verhindern die Aggregation und Missfaltung weiterer Proteine infolge inkorrekt inter- und intramolekularer Wechselwirkungen.

Durch eine höhere Konzentration an Chaperoninen sollte das Faltungsgleichgewicht in Richtung korrekt gefalteter Proteine verschoben und die Entstehung der Inclusion

Bodies der Falcipain-2-Mutanten reduziert werden.

Im Folgenden werden lediglich die Abweichungen zu den Testexpressionen (II.2.1.) aufgeführt.

Die Inkubationszeit wurde auf 3 h reduziert, der Mindestzeit mit maximaler Proteinausbeute.

II.2.2.1. Variation der IPTG-Konzentration

Die transformierten *E. coli*-Zellen (*M15(pREP4)* bzw. *Origami(DE3)*) wurden mit verschiedenen IPTG-Konzentrationen (1 mM; 0,5 mM; 0,25 mM; 0,125 mM) induziert. Eine Negativ-Kontrolle wurde nicht induziert.

II.2.2.2. Kälteschock

In *M15(pREP4)*-Zellen

Die Hauptkultur wurde fünfprozentig mit der Vorkultur angeimft.

Nach Zugabe verschiedener IPTG-Mengen (1 mM; 0,5 mM; 0,25 mM; 0,125 mM) wurden die fünf Kolben in einen auf 25 °C vorgekühlten Schüttelinkubator gestellt, in dem die Zellen über Nacht inkubiert wurden.

In einem zweiten Experiment wurden die Zellen bei einer OD_{546nm} von 0,3 plötzlich auf 25 °C abgekühlt und bis zur OD_{546nm} 0,6-0,8 bei dieser Temperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5 mM bzw. 0,25 mM IPTG induziert und über Nacht bei 16 °C inkubiert.

In *Origami(DE3)*-Zellen

Die Zellen wurden mit 0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM IPTG versetzt und über Nacht bei 20 °C bzw. in einem weiteren Experiment bei 15 °C unter Schütteln inkubiert.

II.2.2.3. Hitzeschock

In *MI5(pREP4)*-Zellen

Die Zellen wurden zunächst bis zu einer OD_{546nm} von 0,5 bei 37 °C inkubiert und dann bei 40 °C weiter inkubiert. Bei einer optischen Dichte_{546nm} von 0,6-0,8 wurde induziert. Die Zellen wurden nach 1 h bzw. nach 3 h geerntet.

In *Origami(DE3)*-Zellen

In diesem Experiment wurde zusätzlich die IPTG-Konzentration variiert (1 mM; 0,5 mM; 0,25 mM). Eine nicht-induzierte Fraktion diente als Negativ-Kontrolle.

II.2.2.4. Osmotischer Stress

In diesem Experiment sollten die Bakterien mittels Sorbit zur Aufnahme von Betain angeregt werden. Sorbit im Medium führt zu hypertonem Milieu außerhalb der Zellen. Um diesem osmotischen Stress entgegenzuwirken, nehmen die *E. coli*-Zellen vermehrt Betain auf. Dieses verändert das intrazelluläre Milieu und kann den Faltungsprozess verbessern. Bei der optischen Dichte von 0,5 wurde die Zellkultur mit 300 mM Sorbit und 3 mM Betain versetzt und bis zur OD_{546nm} 0,6-0,8 bei 37 °C weiter inkubiert. Dann wurde induziert. Die Zellen wurden nach 1 h und nach 3 h geerntet.

Pellets und Überstände aller Experimente wurden in einer SDS-PAGE analysiert.

Die Überstände der Experimente mit *MI5(pREP4)*-Zellen und des Kälte-Schocks mit *Origami(DE3)*-Zellen wurden zusätzlich in einem Western-Blot analysiert.

II.2.3. Proteinpräparation, Reinigung und Rückfaltung von FPc285a

II.2.3.1. Expression in präparativem Maßstab

Für die Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium mit einer frischen Kolonie eines korrekten Klons (pQ-FPc285a in *MI5(pREP4)*) beimpft und wie beschrieben inkubiert.

Anschließend wurden 3 × 2 l LB-Medium einprozentig mit der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C und 120 rpm bis zu einer OD_{546nm} von 0,6-0,8 inkubiert.

Die Induktion erfolgte mit 0,5 mM IPTG.

Nach 3 Stunden Schüttelinkubation wurden die Zellen bei 4 °C und 5.000 rpm 15 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellpellets wurden in einem Gesamtvolumen von 300 ml eisgekühlten TE-Puffers resuspendiert und wiederholt 30 Min (6.000 rpm, 4 °C) zentrifugiert. Für den Aufschluss der Zellen wurden die Pellets in einem Gesamtvolumen von 80 ml eisgekühltem TE-Puffer resuspendiert und unter Kühlung im Eisbad 5 Min mit gepulstem Ultraschall im Intervalltakt von 15 Sek behandelt. Die Suspension wurde bei 4 °C und 15.000 rpm 30 Min zentrifugiert. Die Beschallung und nachfolgende Zentrifugation wurden auf gleiche Weise wiederholt. Die Pellets wurden zur Reinigung in einem Gesamtvolumen von 40 ml eisgekühltem TE-Puffer resuspendiert und bei 4 °C und 13.000 rpm 30 Min zentrifugiert. Das Pellet wurde bei - 20 °C gelagert.

II.2.3.2. Vorreinigen und Lösen

Da das Falcipain in Form von „Inclusion Bodies“ vorlag, mußte es für die Reinigung und Rückfaltung gelöst werden. Alle Wasch-Puffer wurden steril gefiltert.

Die Pellets mit den „Inclusion Bodies“ wurden je zweimal in 20 ml der beiden Waschpuffer resuspendiert. Nach jedem Schritt wurde bei 4 °C und 13.000 rpm 30 Min zentrifugiert. 1/3 des letzten Pellet wurden in 9 ml des „Lösen-Puffers“ gelöst und bei Raumtemperatur unter leichtem Rühren 60 Min inkubiert. Anschließend wurden bei 4 °C und 13.000 rpm 45 Min unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. Der Überstand mit dem FPc285a wurde für die sofortige Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie eingesetzt.

Da das Protein in Form von „Inclusion Bodies“ stabiler war als in gelöstem Zustand, wurde nicht verarbeitetes Protein in dieser Form bei - 20 °C gelagert.

II.2.3.3. Säulenchromatographische Reinigung

Metallchelat-Affinitätschromatographie

Proteine mit mehreren Histidinresten (His-Tag) können aus einem Proteingemisch mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie isoliert werden.

Die an das Säulenmaterial kovalent angebundene Chelatgruppe Nitrilotriessigsäure wird mit Nickelionen beladen, an welche über freie Bindemöglichkeiten die Histidinreste des zu isolierenden Proteins binden. Nachdem die Proteine mit niedriger Nickel-Affinität

ausgewaschen wurden, können die hochaffin gebundenen Proteine mit imidazolhaltigem Puffer eluiert werden.

Um das Zusetzen der Säule zu verhindern, wurden alle Lösungen, auch das gelöste FPc285a, durch 0,2 µm-Filter filtriert.

Die verwendete Nickel-NTA-Säule mit einem Säulenvolumen von 15 ml wurde mit 5 Volumen des Equilibrierungs-Puffers equilibriert. Die Proteinlösung wurde auf die Säule aufgetragen und mit drei 3 Volumen verschiedener Puffer („Säulenpuffer 1-3“) gewaschen. Anschließend wurde mit dem Elutionspuffer eluiert. Die Durchflussrate betrug 1,0 ml/Min bei einem Fraktionsvolumen von 1 ml. Die einzelnen Fraktionen wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE (15 %iges Gel) entsprechend der Bandenintensität und -Reinheit vereinigt.

Entsalzung mittels HiTrapTMDesalting-Säule

Hierbei wurde die Gelfiltrations-Chromatographie zur Trennung des FPc285a von Pufferionen verwendet.

Das rückgefaltete FPc285a wurde 5 Min bei 4 °C und 13.000 rpm zentrifugiert und auf die mit 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 equilibrierte HiTrapTMDesaltingssäule aufgetragen. Anschliessend wurde mit dem gleichen Puffer mit einer Durchflussrate von 1,5 ml/Min eluiert. Für die Entsalzung des aktiven FP-2 musste der Inhibitor Jodacetamid zugesetzt werden, um die Autoproteolyse des Proteins zu verhindern.

Ionenaustauschchromatographie (Poros 20HQ-Säule)

An der Oberfläche des Trägermaterials befinden sich positiv geladene chemische Gruppen (Anionen-Austausch), die über elektrostatische Wechselwirkungen das gewünschte negativ geladene Protein binden. Die Elution erfolgt hierbei durch eine Erhöhung der Ionenstärke. Das entsalzte Protein wurde zunächst bei 13.000 rpm und 4 °C 10 Min zentrifugiert, um die Präzipitate zu entfernen. Die Poros 20HQ-Säule wurde mit 20 mM Tris/HCl, pH 7,5 equilibriert. Die Elution der an die Säule gebundenen Proteine erfolgte mit einem NaCl-Gradienten von 0-500 mM.

II.2.3.4. Protein-Rückfaltung

Die vereinigten Fraktionen von der Affinitätssäule (siehe II.2.3.3.) wurden zunächst auf eine Proteinkonzentration von 6 mg/ml aufkonzentriert. Das Protein wurde mit 10 mM DTT bei 37 °C im Wasserbad für 60 Min reduziert. Unter leichtem Rühren wurde dieser Ansatz mit kaltem Faltungspuffer (4 °C) 50-fach verdünnt. Das Falcipain lag somit in einer Konzentration von 0,12 mg/ml vor, und der Harnstoff des Elutionspuffers wurde so weit verdünnt, dass eine obere Grenze von 160 mM nicht überschritten wurde. Dieser Faltungsansatz wurde bei 4 °C 20 h inkubiert.

Um ausgefallenes Protein zu entfernen, wurde der Ansatz nach der Inkubation durch einen 0,2 µm Sterilfilter filtriert. Das Filtrat wurde bis auf 25 ml aufkonzentriert, unter mäßigem Gießen und Rühren mit kaltem sterilem Wasser 10-fach verdünnt und erneut aufkonzentriert. Bei einem Volumen von 25 ml wurde der pH-Wert tropfenweise mit 3,55 M Natriumacetat (pH 2,6) auf 6,0 abgesenkt. Da sich nach diesem Schritt die Ultrafiltrations-Membran regelmäßig zusetzte, wurde ein Zentrifugations-Schritt eingeführt. Ausgefallenes Protein wurde bei 4 °C und 6.000 rpm 20 Min pelletiert. Der Überstand wurde weiter auf ca. 1 ml eingengt. Ein Teil davon wurde zur Charakterisierung von FP-2 (siehe II.4.) eingesetzt.

II.2.3.5. Konzentrieren von Proteinlösungen

Proteinlösungen wurden in einer Membranfiltrationszelle unter Verwendung von Membranen mit einer Porengröße von 10 kD konzentriert.

II.3. Analytische Methoden

II.3.1. Agarose-Gelelektrophorese

Diese Form der Gelelektrophorese wird zur Auftrennung von DNA-Fragmenten durchgeführt.

Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern bei Anlegen eines elektrischen Feldes durch das Netzwerk des Agarose-Gels und werden dabei nach Größe aufgetrennt.

Agarose-Suspensionen mit Konzentrationen von 0,8-1,5 % (w/v) in TAE-Puffer wurden in der Mikrowelle aufgekocht, auf 60 °C abgekühlt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (EtBr) versetzt. Mit dieser Lösung wurde das Gel gegossen.

Die DNA-Proben wurden mit dem Beladepuffer versetzt. Als Längen-Standard dienten 10 µl des „*Mass RulerTM DNA Ladder Mix*“.

Die Elektrophorese erfolgte mit TAE-Puffer als Laufpuffer bei 35 mA für ca. 1,5 h.

Unter dem UV-Transilluminator wurde die mit EtBr interkalierte DNA sichtbar gemacht.

II.3.2. SDS-PAGE (Laemmli)

Zur Auftrennung, Quantifizierung, und zur Bestimmung der Reinheit von Proteinen wurde die SDS-PAGE nach Laemmli durchgeführt.

Sodium Dodecyl Sulfat (SDS) als negativ geladenes Detergenz denaturiert die Proteine und maskiert deren Eigenladung. Die so negativ geladenen Proteine werden bei der elektrophoretischen Wanderung durch ein Polyacrylamidgel nach Größe aufgetrennt.

Es wurden Trenn- und Sammelgele mit Acrylamidkonzentration von 10-15 % bzw.

6 % (w/v) verwendet. Die Protein-Proben wurden mit Beladepuffer versetzt und für fünf Min auf 95 °C im Heizblock erhitzt. Als Längen-Standard wurde der „*Protein Molecular Weight Marker*“ benutzt.

Die Stromstärke wurde auf 25 mA begrenzt.

Zur Färbung der Gele wurde Coomassie Brilliant Blue R, zur Entfärbung 40 % (w/v) Methanol und 10 % (w/v) Eisessig benutzt.

II.3.3. Semi-Dry Western-Blot

Mit Hilfe eines Western-Blots lassen sich spezifische Proteine in einem Proteingemisch detektieren. Die Auftrennung der Proteine erfolgt in einer SDS-PAGE. Die Banden werden elektrophoretisch auf eine Membran transferiert. Auf dieser Membran bindet ein spezifischer Erstantikörper an das gesuchte Protein, der wiederum durch einen Zweitantikörper, an den ein Enzym für eine Farbreaktion gekoppelt ist, sichtbar gemacht wird.

Protein-Übertragung auf eine Nitrozellulose-Membran: Der Transfer erfolgte in einer Semi-Dry Blotapparatur. Drei Lagen von Blot-Puffer-getränktem Blotpapier wurden auf den Boden des Gerätes- und darauf wiederum die zuvor mit Blotpuffer equilibrierte

Nitrozellulose-Membran gelegt. Das SDS-Gel wurde nun vorsichtig auf die Membran aufgebracht und mit weiteren drei Lagen des feuchten Blotpapiers bedeckt. Dieses „Sandwich“ wurde auf eine Plastikmaske des Blotgerätes gelegt und mit Puffer durchtränkt.

In dem nun angelegten elektrischen Feld von 100 V wanderten die negativ geladenen Proteine bei einer Stromstärke von 35 mA aus der Gelmatrix zum positiven Pol hin auf die Nitrozellulose-Membran. Die Transferzeit betrug eine Stunde.

Zur Überprüfung der Proteinübertragung wurde die Membran 5 Min mit Ponceau S angefärbt und mit Wasser wieder entfärbt. Als Längenstandard wurde der die Marker-Banden enthaltende Streifen der Membran abgeschnitten und mit Coomassie Blue gefärbt.

Antikörper-Bindung und Entwicklung: Die Nitrozellulose-Membran wurde zwei Mal 10 Min in TBS-Puffer gewaschen. Dann wurden verbleibende freie Proteinbindungsplätze durch einstündige Inkubation unter Schütteln in BSA-haltigem Blocking-Puffer abgesättigt. Dies sollte eine unspezifische Anbindung der zur Detektion verwendeten Antikörper an die Membran verhindern.

Die Nitrozellulose-Membran wurde zwei Mal 10 Min in TBS-Tween/Triton-Puffer und 10 weitere Min in TBS-Puffer gewaschen.

Die spezifische Bindung des primären Antikörpers „Anti-Tetra-His-Ak“ an das His-Tag-tragende Protein erfolgte in einer Über-Nacht-Inkubation unter Schütteln. Dazu wurde der Antikörper auf 1:5.000 mit Blocking-Puffer verdünnt und auf die Membran gegeben.

Am nächsten Morgen wurden die freien Antikörper wie oben beschrieben mit TBS-Tween/Triton- und TBS-Puffer entfernt. Anschließend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper „Anti-Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase“ in einer 1:1.000-Verdünnung mit Blocking-Puffer eine Stunde lang unter Schütteln inkubiert.

Nach vier Waschgängen mit TBS-Tween/Triton-Puffer wurde die Membran mit dem Blot-Farbreagenz entwickelt. Bei Erscheinen erkennbarer Banden nach wenigen Min wurde die Reaktion mit reichlich Wasser gestoppt.

II.3.4. Protein-Konzentrationsbestimmung

Routinemäßig wurde zur Protein-Konzentrationsbestimmung der „*BioRad RC DC Protein Assay*“, basierend auf dem „Lowry Protocol“ [46], unter Verwendung einer BSA-Standard-Eichreihe genutzt.

Da die verwendeten Puffer teilweise Störfaktoren enthielten, die eine zu hohe Proteinkonzentration vortäuschten, wurden stets Puffer-Leerwerte gemessen. Sofern es sich um durch Ultrafiltration gewonnene Proteinkonzentrate handelte, wurde das Ultrafiltrat als Leerwert verwendet.

Der Großteil der Konzentrationsbestimmungen wurde aufgrund der oben genannten Fehlerquellen jedoch durch den Vergleich der Bandenintensitäten mit BSA-Banden bekannter Proteinmenge durchgeführt.

II.4. Charakterisierung von Falcipain-2

II.4.1. Aktivitätstests

Zur Untersuchung der proteolytischen Aktivität des aktiven, rekombinanten Falcipain-2 wurden verschiedene Substrate (humanes Hb, chromogene Substrate, die verschieden geladene Bindungspartner repräsentieren und der inaktive, verkürzte

Falcipain-2-Präkursor (FPc285a)) unter Variation des pH-Wertes verwendet.

Des Weiteren wurde die Inaktivität von FPc285a mit Hb, mit chromogenen Substraten sowie in einem Western-Blot untersucht.

Das aktive FP-2 wurde von dem biochemischen Institut der Universität Lübeck zur Verfügung gestellt.

II.4.1.1. Aktivitätstests mit chromogenen Substraten

Es wurden verschiedene Peptidanaloga mit einer Nitroanilid-Gruppe verwendet, um die Proteaseaktivität des aktiven, rekombinanten Falcipain-2 bzw. der Mutante FPc285a photometrisch nachzuweisen. Bei der spezifischen Spaltung wird die Nitroanilid-Gruppe freigesetzt, was in einer Extinktionsänderung bei 405 nm resultiert.

Chromogene Substrate:

- 1.) Z-Phe-Arg-p-Nitroanilid
- 2.) Z-Tyr-Val-Ala-Asp-p-Nitroanilid
- 3.) Glycin-p-Nitroanilid

Diese drei Substrate repräsentieren verschieden geladene Bindungspartner für die Substrat-Bindestelle P1 des Enzyms (3.) neutrale, 1.) positiv- und 2.) negativ geladene Aminosäure an dieser Position).

Die Ansätze enthielten 60 µg/ml des jeweiligen Enzyms (aktives, rekombinantes Falcipain-2 bzw. den verkürzten, inaktiven Präkursor FPc285a), 50 µM Substrat, 10 mM DTT und 100 mM Natriumacetat (pH 5,5) in einem Endvolumen von 700 µl. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur inkubiert, und die Absorption wurde bei 405 nm gegen Kontrollansätze ohne Enzym alle 2 Min gemessen. Um zu überprüfen, ob es sich bei einer beobachteten Reaktion um eine enzymkatalysierte Reaktion, oder um eine spontane Hydrolyse handelte, wurde die Hemmbarkeit durch Addition von 100 µM E-64 zu je einem der Ansätze getestet.

II.4.1.2. Hämoglobinase-Assay

Um die Hämoglobin-Abbau-Aktivität zu ermitteln, wurden 17 µg/ml des jeweiligen Enzyms (aktives, rekombinantes FP-2 bzw. der verkürzte, inaktive Präkursor FPc285a) mit dem natürlichen Substrat des Falcipain-2, dem humanen Hämoglobin (0,2 mg/ml), inkubiert. Das Reaktionsmedium mit einem Endvolumen von 150 µl beinhaltete 100 mM Natriumacetat (pH 5,5), 10 mM DTT und in einem Ansatz zusätzlich die Inhibitorsubstanz E-64 (200 µM). Als Kontrollen dienten Ansätze ohne Substrat bzw. ohne Enzym. Die Ansätze wurden bei 37 °C für 0-120 Min inkubiert. 15 µl-Aliquots wurden zu festgelegten Zeitpunkten entnommen und sofort für die anschließende Analyse in einer SDS-PAGE (15 %iges Gel) vorbereitet. Die Hämoglobinase-Aktivität wurde anhand der Abnahme der Hämoglobin-Bandenstärke auf dem SDS-Gel gezeigt.

II.4.1.3. pH-Abhängigkeit der Aktivität

Um die pH-Abhängigkeit der Hämoglobin-Degradation sowie der Hydrolyse der chromogenen Substrate durch aktives, rekombinantes Falcipain-2 zu untersuchen, wurde das Natriumacetat in den Versuchen II.4.1.1. und -2. durch Bis-Tris-Propan/HCl (100 µM) in gewünschtem pH-Wert (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 und 8,5) ersetzt.

II.4.1.4. Western-Blot von FPc285a

In einem Western-Blot wurde untersucht, ob das gefaltete, inaktive FPc285a keine Prozessierung erfahren hatte und somit die Prosequenz und den His-Tag noch besaß. Hierfür wurden das gefaltete Protein und als Positiv-Kontrolle ungefaltetes FPc285a mit His-Tag nebeneinander analysiert.

II.4.1.5. Selbstprozessierungs-Assay

Um zu untersuchen, ob die Falcipain-2-Prozessierung autohydrolytisch erfolgt, wurde dem rekombinanten, aktiven Falcipain-2 der inaktive, verkürzte Falcipain-2-Präkursor (FPc285a) als Substrat angeboten. Dieser stellt ein Falcipain-2-Analogon dar, welches sich nicht selbst prozessieren kann und daher seine Leader-Sequenz noch besitzt.

Die Reaktion wurde bei sechs verschiedenen pH-Werten (pH 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0 und 8,5) untersucht. Es wurden 0,01 mg/ml aktives Falcipain-2 zu einer Mischung aus 0,4 mg/ml FPc285a, 10 mM DTT, 100 mM Bis-Tris-Propan/HCl im gewünschten pH-Wert und in einem Ansatz zusätzlich 200 µM E-64 pipettiert und für 5-120 Min bei 37 °C inkubiert. Als Negativ-Kontrolle diente ein Ansatz, der nur das Substrat enthielt. Die Probenentnahme von 10 µl-Aliquots erfolgte nach definierten Inkubationszeiten. Mit den Proben wurde wie im Hämoglobinase-Assay verfahren.

II.4.2. Inhibitorstudien mit N-(4-Bromophenyl)maleimid (N-4-BM)

Ein Problem der Auflösung von Proteinkristallstrukturen in der Kristallographie ist das so genannte Phasenproblem. Mittels Film oder Flächenzähler, mit denen die von einem Kristall gebeugten Röntgenstrahlen in Form aufgezeichneter Punkte detektiert werden, kann lediglich die Amplitude bestimmt werden, über die Phase ist hiermit keine Aussage möglich. Da in den gebeugten Strahlen die gesamte Information über die Anordnung der Atome im Proteinkristall enthalten ist, ist jedoch die Kenntnis aller drei Größen der aufgefundenen elektromagnetischen Wellen (Amplitude, Wellenlänge und Phase) von Bedeutung.

Um die Phase bestimmen zu können, wurde die Methode des isomorphen Ersatzes entwickelt (MIR). Dabei werden Schwermetallsalze oder -verbindungen in die Kristalllösung eingebracht, um in den Kristall zu diffundieren und eine Bindung mit dem

Protein einzugehen. Aufgrund der größeren Zahl an Elektronen streuen die Schweratome stärker als die Atome der Aminosäureseitenketten. Mittels der Intensitätsunterschiede der Reflexe kann die relative Lage der Schweratome im Kristall berechnet werden. Mit dieser Information kann im Vergleich zu den Proteinen ohne Schweratome die Phase konstruiert werden.

N-(4-Bromophenyl)maleimid sollte als Kristallisationszusatz gleichzeitig den Selbstverdau von FP-2 hemmen und mittels des Bromatoms in der Verbindung das Lösen des Phasenproblems erleichtern.

In diesem Experiment wurde es auf seine Inhibitorwirkung auf Falcipain-2 untersucht. Um die Inhibition quantifizieren zu können, wurde N-4-BM in enzymatisch-optischen Tests mit dem chromogenen Substrat Z-Phe-Arg-p-Nitroanilid getestet.

In Vorversuchen wurde ermittelt, bei welcher Konzentration N-(4-Bromophenyl)maleimid das Reaktionsmedium (Wasser und Natriumacetat) durch Präzipitation eintrübt und die Absorption in störendem Maße beeinflusst. Das Vorgehen des eigentlichen Experiments entsprach zunächst dem im Aktivitätstest II.4.1.1., wobei das Endvolumen auf 1 ml erhöht wurde. Nach 9 Min wurden die Ansätze mit verschiedenen Mengen von

N-(4-Bromophenyl)maleimid (1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,1 mM, 50 μ M, 25 μ M, 12,5 μ M, 6,25 μ M und 3,1 μ M) bzw. mit 100 μ M E-64 (Positiv-Kontrolle) versetzt. In einem Ansatz fand die Hydrolyse ungehemmt statt.

Zur photometrischen Doppelbestimmung wurde jede Versuchsreihe zweifach angesetzt.

III. Ergebnisse

III.1. Konstruktion inaktiver Falcipain-2-Mutanten

Ausgangspunkt für die Herstellung von Konstrukten für inaktive FP-2-Mutanten war das von Prof. T. Schirmeister (Würzburg) zur Verfügung gestellte Konstrukt pQ-35FP-2, ein pQE-30-Plasmid, welches die für Aminosäuren 211-484 des Falcipain-2-Präkursors sowie die für einen N-terminalem His-Tag kodierenden Sequenzen beinhaltet. Zur Vervielfältigung wurde es in *NovaBlue SinglesTM kompetente Zellen* transformiert. Der Erfolg der anschließenden Plasmidpräparation wurde in einer Restriktionsanalyse mit dem Enzym HindIII bestätigt.

pQ-FPc285a und pET-FPc285a

Für die Expression einer inaktiven Form des verkürzten Falcipain-2-Präkursors mit der Aminosäure Alanin anstelle von Cystein im aktiven Zentrum (Cys285Ala) wurde zunächst eine PCR-Mutagenese mit dem Ausgangsplasmid durchgeführt. Mit den beiden Primern FPsen und FPantiA wurde das gesamte Plasmid amplifiziert und das Falcipain-2-Gen lediglich in dem für Cystein kodierenden Basentriplett mutiert. Bei 30 PCR-Zyklen erwiesen sich eine Magnesium-Konzentration von 5,5 mM, eine DNA-Endkonzentration von 31,3 ng/ml und eine Annealing-Temperatur von 67 °C als optimale Bedingungen. Das entstandene Gen sowie das darin kodierte Protein wurden mit „FPc285a“ bezeichnet.

Nach einer Chlorophorm-Extraktion, Entsalzung und End-Konversion wurde das lineare PCR-Produkt durch Ligation geschlossen und zur Amplifikation in *Nova Blue SinglesTM kompetente Zellen* transformiert. Das Konstrukt wurde als „pQ-FPc285a“ bezeichnet.

Die in der anschließenden Plasmid-Präparation gewonnene DNA wurde durch Restriktionsspaltung mit MvaI analysiert. Diese ergab zunächst für 5 Klone (#1-#5) das erwartete Bandenmuster (Abb. 3). Die nachfolgende DNA-Sequenzierung bestätigte, dass ein Klon (#2) das gewünschte Plasmid enthielt. Dieses wurde zur Expression in *MI5(pREP4)*-Zellen transformiert.

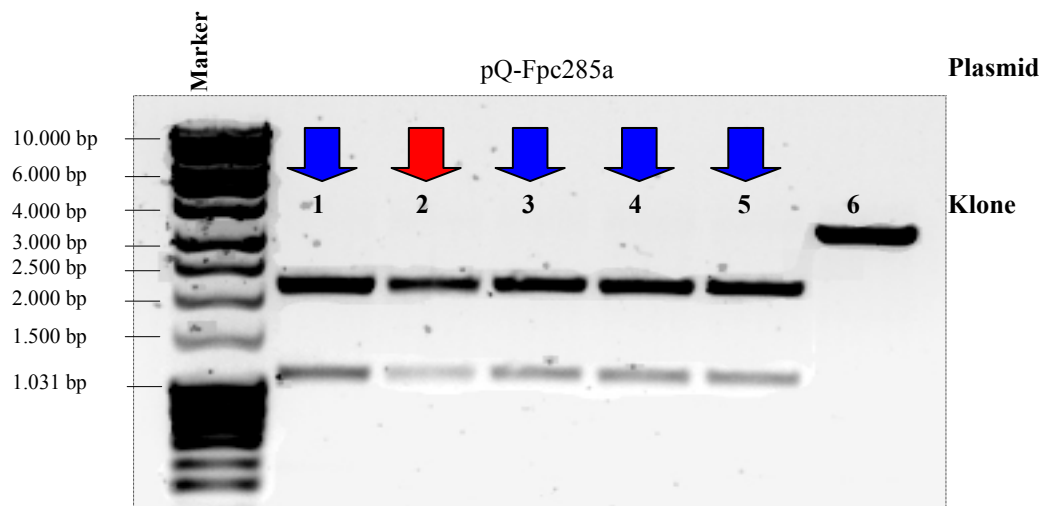


Abb. 3: Restriktionsspaltung von pQ-FPc285a durch MvaI

Die erwarteten Spaltprodukte waren bei den markierten Klonen zu finden. Nur der Klon, aus dem das rot gekennzeichnete Plasmid isoliert worden war, wurde nach der anschließenden DNA-Sequenzierung weiter verwendet. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte auf einem 0,8 % igen Agarose-Gel.

Zur Expression von *FPc285a* in *Origami(DE3)*-Zellen wurde das Gen in den kompatiblen Vektor pETBlue-1 kloniert.

In einer PCR mit den Primern P_mutA_Ht und P_mutA_anti wurden das FPc285a-Gen sowie der für den N-terminalen His-Tag kodierende Sequenzabschnitt aus dem Plasmid pQ-FPc285a amplifiziert. Eine Magnesium-Konzentration von 3,5 mM, eine DNA-Endkonzentration von 124 ng/ml und eine Annealing-Temperatur von 61 °C stellten sich dafür als optimal heraus.

Die PCR-Produkte wurden mit Chloroform extrahiert, entsalzt und phosphoryliert, bevor sie in den Vektor pETBlue-1 ligiert wurden. Das Ligationsprodukt, bezeichnet als „pET-FPc285a“, wurde zur Plasmidpräparation in *Nova Blue SinglesTM kompetente Zellen* transformiert. Die anschließende Analyse der isolierten Plasmide durch Restriktionsspaltung mit EcoRI und Sequenzierung ergab, dass ein Klon (#2) das Insert in richtiger Orientierung enthielt (Abb. 4). Es folgte die Transformation des Plasmids #2, sowie des inkorrekten pET-FPc285a#4 als Negativ-Kontrolle in den Expressionsstamm *Origami(DE3)*.

pET-FPc285aM

Die Konstruktion des Expressions-Plasmids für die Gewinnung von maturem, inaktivem Falcipain-2, mit „pET-FPc285aM“ benannt, entsprach im Wesentlichen der von pET-FPc285a. Abweichend davon wurde die für Aminosäure 245-484 von FPc285a kodierende DNA-Sequenz mit den Primern P_mutA und P_mutA_anti vervielfältigt. Nach den beschriebenen Arbeitsschritten wurden die Plasmide der Klone #1 und #6 in einer Restriktionsanalyse mit SspI (Abb. 4) sowie einer nachfolgenden Sequenzierung als korrekt bestätigt und in *Origami(DE3)*-Zellen transformiert.

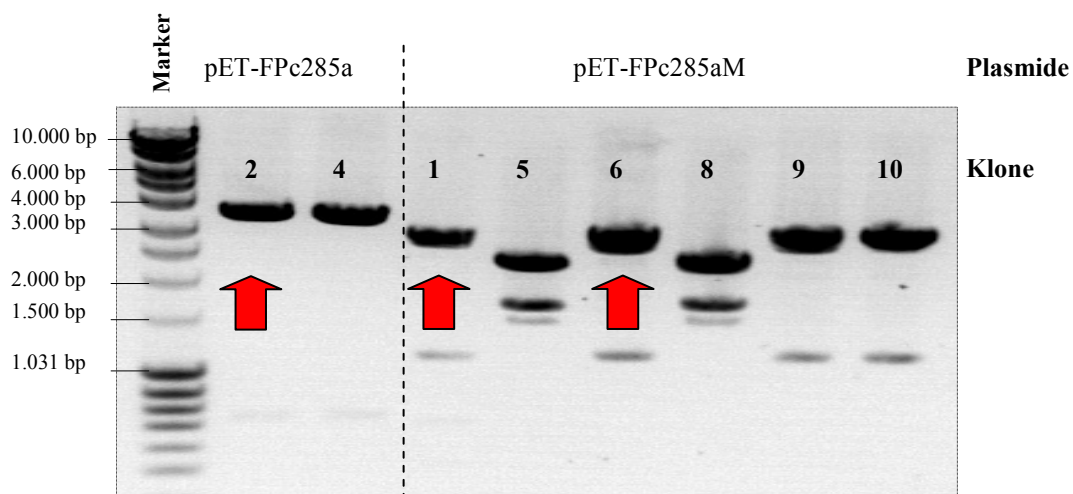


Abb. 4: Restriktionsanalyse von pET-FPc285a bzw. pET-FPc285aM durch EcoRI bzw. SspI

Die erwarteten Fragmente für pET-FPc285a (3595 bp und 757 bp) bzw. für pET-FPc285aM (3045 bp und 1160 bp) zeigten sich bei den markierten Plasmiden. Die Analyse erfolgte auf einem 1 % igen Agarosegel.

III.2. Expression der mutierten Falcipain-Gene

III.2.1. Expression von *FPc285a*

In der Testexpression mit *M15(pREP4)*-Zellen konnte das mutierte *FPc285a*-Gen exprimiert werden, was in einer SDS-PAGE (Abb. 5) nachgewiesen wurde. Es ließ sich eine optimale Expressionszeit von 3 h ermitteln. Wie das aktive Protein wurde die Cys285Ala-Mutante in Form von unlöslichen „Inclusion Bodies“ exprimiert.

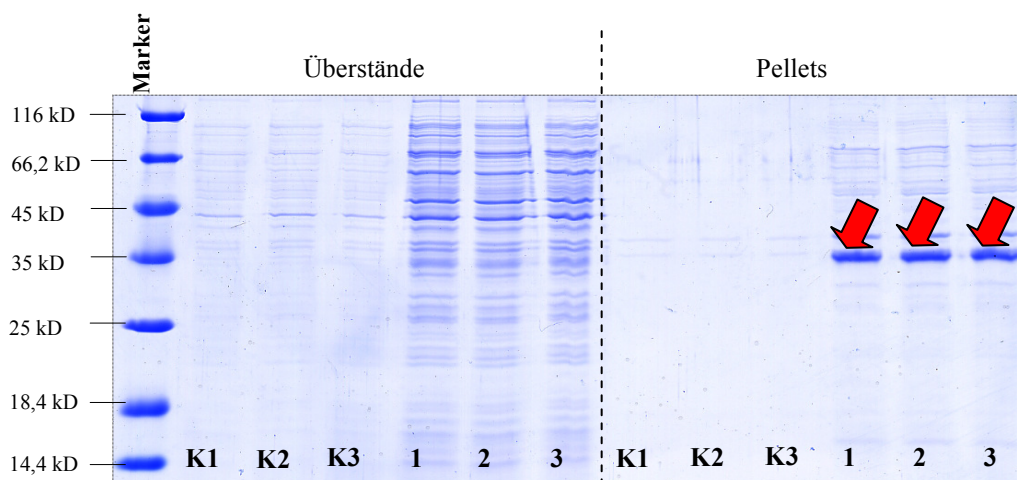


Abb. 5: Testexpression der *FPc285a*-Mutante in *M15(pREP4)*-Zellen

Alle Transformanten (1-3) exprimierten das *FPc285a* (ca. 30 kD), welches ausschließlich in der unlöslichen Fraktion zu finden war. K1-K3 stellen die nicht-induzierten Negativ-Kontrollen dar. Die Proben wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE nach Laemmli (15 % Acrylamid) analysiert.

Auch über die Variation der Expressionsbedingungen (siehe II.2.2.) konnte in *M15(pREP4)*-Zellen die Faltung des synthetisierten Proteins nicht sichtbar verbessert werden (nicht gezeigt).

Nach Expression in großem Maßstab wurden die „Inclusion Bodies“ wie beschrieben (Abschnitt II.2.3.) von Zellbestandteilen gereinigt, in Puffer gelöst und über eine Nickel-NTA-Säule affinitätschromatographisch aufgereinigt (Abb. 6). Fraktionen, die das Protein in ausreichender Reinheit und Konzentration enthielten wurden vereinigt, aufkonzentriert und in die Rückfaltung eingesetzt.

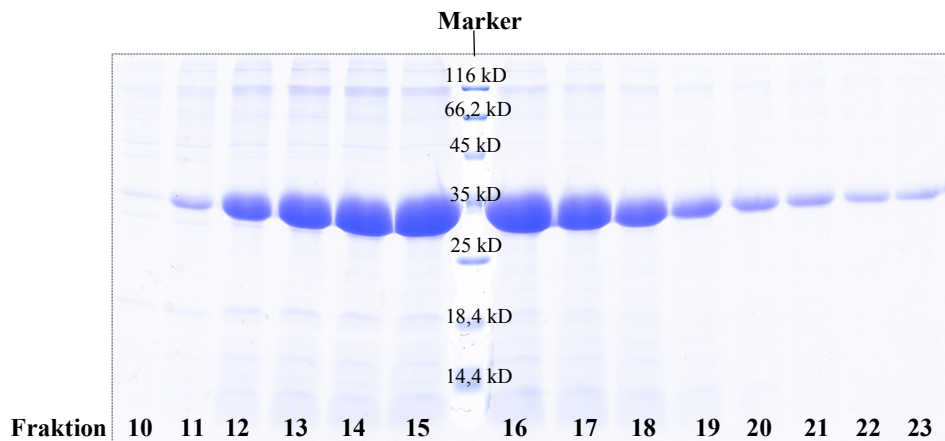


Abb. 6: Fraktionen des FpC285a-Proteins nach Elution von der Nickel-NTA-Säule

Die Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE nach Laemmli (15 % Acrylamid) analysiert.

In der letzten Phase der Rückfaltung, während der Ansäuerung der Proteinlösung mit der Natrium-Acetat-Lösung traten regelmäßig starke Verluste durch Bildung von Proteinpräzipitaten auf. Diese Verluste konnten durch eine sehr langsame Zugabe des Puffers etwas reduziert werden. Eine noch langsamere Einstellung des pH-Wertes ergab jedoch keine weitere Verbesserung.

Da das aktive Falcipain-2 nach Verdünnung mit Wasser weniger stabil war, als im Faltungspuffer, musste es nach abschließender Konzentration eingefroren werden. Bei FpC285a führte dies jedoch zu einer praktisch vollständigen Präzipitation. Daher wurde es im Kühlschrank bei 4 °C gelagert, was für ca. 1,5 Wochen ein Ausfallen des Proteins verhindern konnte.

Im Gegensatz zum nativen Protein ließ sich die FpC285a-Mutante nicht weiter über eine Ionenaustauschersäule (Poros20HQ) aufreinigen, ohne vollständig zu präzipitieren.

Die Expression in *Origami(DE3)*-Zellen (Abb. 7) ergab keine verbesserte Löslichkeit des Proteins im Vergleich zur Expression in *MI5(pREP4)*-Zellen.

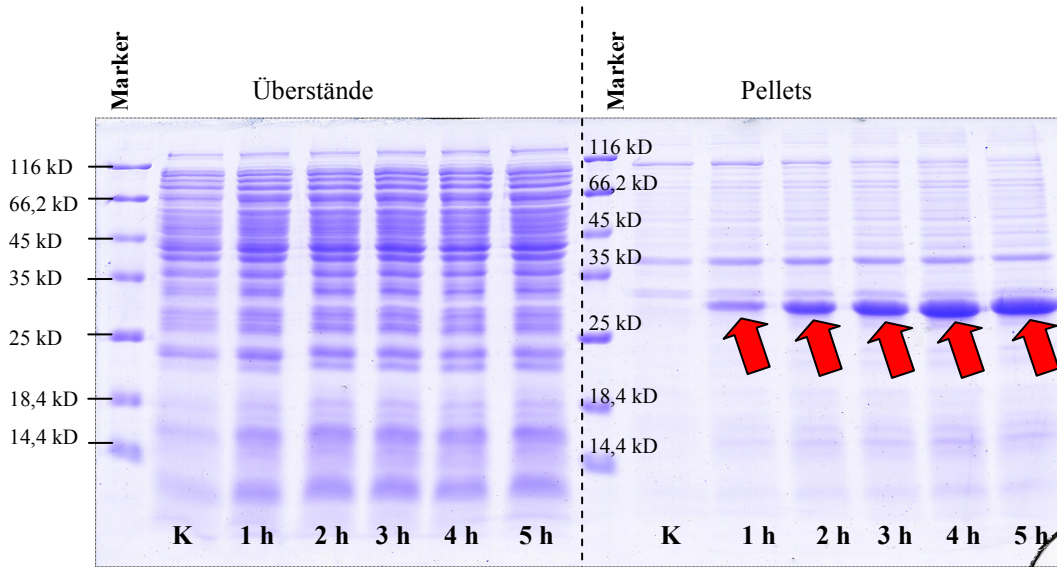


Abb. 7: Testexpression der FPc285a-Mutante in *Origami(DE3)*-Zellen

Auch nach der Expression mit *Origami(DE3)*-Zellen lag das FPc285a-Protein ausschließlich in unlöslicher Form vor. Nach 3 h nahm die Menge des FPc285a-Proteins nicht weiter nennenswert zu. K= nicht-induzierte Kontrolle, die 5 h inkubiert wurde. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE (15 % Acrylamid).

Nach der Expression bei 20 °C (siehe II.2.2.2.) war eine schwache Proteinbande des Molekulargewichtes von Falcipain-2 mit verkürzter Prosequenz (ca. 30 kD) in der löslichen Fraktion sichtbar (nicht gezeigt). Nach Wiederholung des Versuches mit einer weiteren Temperatursenkung auf 15 °C konnte das lösliche FPc285a mittels Western-Blot in geringer Menge nachgewiesen werden (Abb. 8).

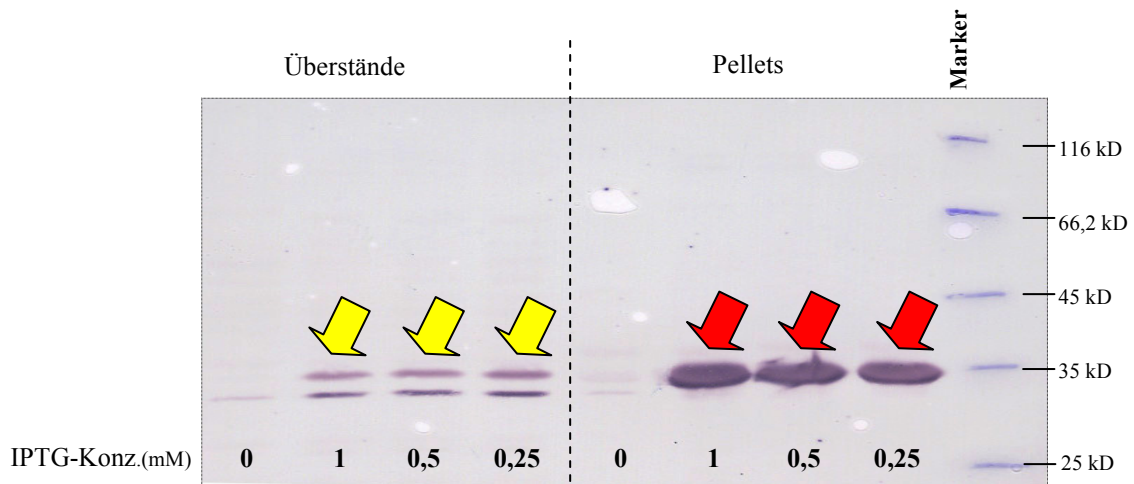


Abb. 8: FPc285a-Expression in *Origami(DE3)*-Zellen bei 15 °C

In diesem Experiment wurden die Zellen bei einer Temperatur von 15 °C sowie mit drei verschiedenen IPTG-Konzentrationen (1 mM, 0,5 mM und 0,25 mM) inkubiert. Die synthetisierten Proteine wurden anschließend in einem Western-Blot durch spezifische Bindung an das His-Tag analysiert. Die Proteinbanden des löslichen FPc285a, markiert mit gelben Pfeilen, zeigten sich bei allen getesteten IPTG-Konzentrationen.

III.2.2. Expression von FPc285aM

Das mature Falcipain-2 (FPc285aM) konnte erfolgreich in *Origami(DE3)*-Zellen exprimiert werden (Abb. 9). Die Testexpression ergab die gleichen Ergebnisse wie für die Expression von FPc285a in *MI5(pREP4)*-Zellen beschrieben.

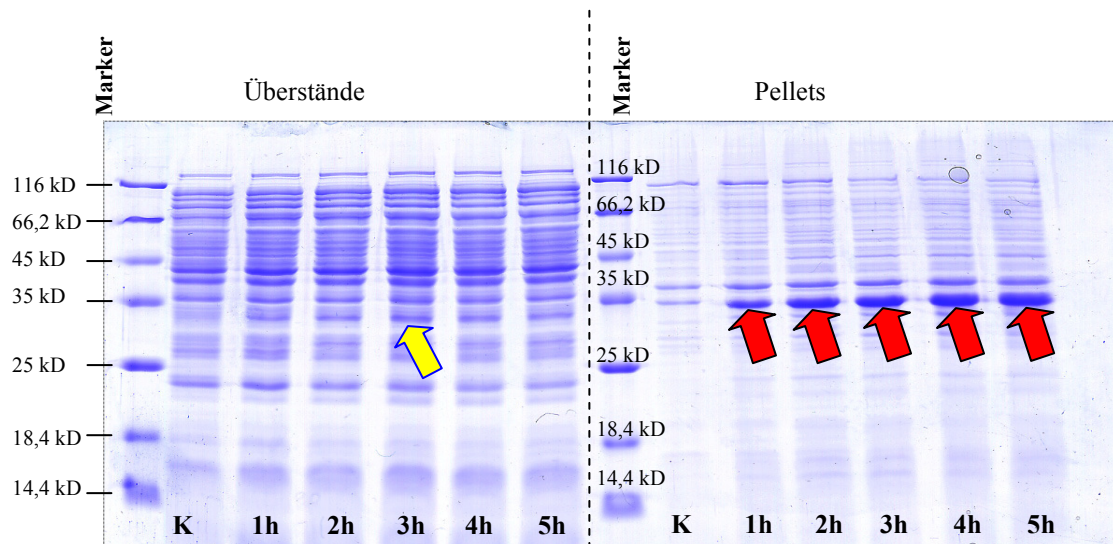


Abb. 9: Testexpression von FPc285aM in *Origami(DE3)*-Zellen

Das mature Falcipain-2 (FPc285aM, ca. 27 kD) lag vorwiegend in unlöslicher Form (rote Pfeile) und geringfügig auch in der löslichen Fraktion (gelber Pfeil) vor. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE (15 % Acrylamid) analysiert.

Unter Hitzeeinwirkung während der Expression produzierten die *Origami(DE3)*-Zellen in relativ geringer Menge ein lösliches Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 27 kD, welches sich in der SDS-PAGE als dünne Bande darstellte (geringfügig war dies bereits nach der Expression bei 37 °C zu sehen (Abb. 9)). Da das Protein kein His-Tag besaß, konnte eine genauere Analyse mittels Western-Blot nicht durchgeführt werden.

Die **Expression in großem Maßstab, die Reinigung und Rückfaltung von FPc285aM** wurden später von dem biochemischen Institut der Universität Lübeck durchgeführt. Das Protein wurde in **Bindestudien mit Hämoglobin** eingesetzt. Dabei ergab sich eine pH-abhängige Bindung von Hämoglobin an FPc285aM, die mit steigendem Umgebungs-pH-Wert abnahm [32].

III.3. Charakterisierung von Falcipain-2

III.3.1. Aktivitätstests

Mit chromogenen Substraten

Bei der Inkubation der FPc285a-Mutante mit dem chromogenen Substrat Z-Phe-Arg-pNA war während des gesamten Versuchs keine Absorptionsänderung messbar (Abb. 10). Dies ließ sich in mehreren Wiederholungsversuchen reproduzieren und bestätigte die proteolytische Inaktivität von FPc285a.

Die Hydrolyse von Z-Phe-Arg-pNA durch das aktive, rekombinante Falcipain-2 zeigte eine schnelle Absorptionszunahme, sowie eine spezifische Hemmbarkeit durch den Inhibitor E-64 (Abb. 10). Die Untersuchung dieser Reaktion bei verschiedenen pH-Werten ergab ein Aktivitätsplateau zwischen pH 6,0 und 7,5. Über pH 7,5 sank die Aktivität um ca. 30 % (Abb. 11).

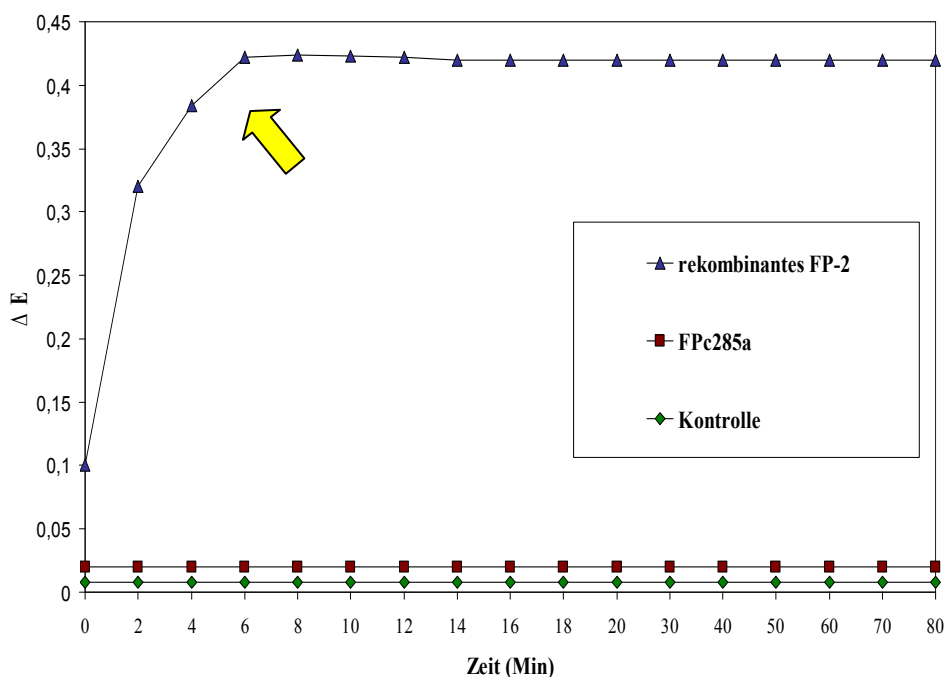


Abb. 10: Spaltung von Z-Phe-Arg-pNA durch FP-2 und FPc285a

Dargestellt ist die Absorption bei 405 nm als Funktion der Inkubationszeit.

Bei dem FPc285a war keine Aktivität messbar, während das aktive FP-2 bereits in den ersten Minuten eine starke Absorptionszunahme zeigte. Durch Zugabe von E-64 nach 5 Minuten (gelber Pfeil) konnte die Reaktion von FP-2 vollständig gehemmt werden. Alle drei Ansätze enthielten 0,1 M NaAc (pH 5,5), 10 mM DTT und 50 μ M Z-Phe-Arg-pNA, zwei der Ansätze enthielten zusätzlich 60 μ g/ml des jeweiligen Falcipains.

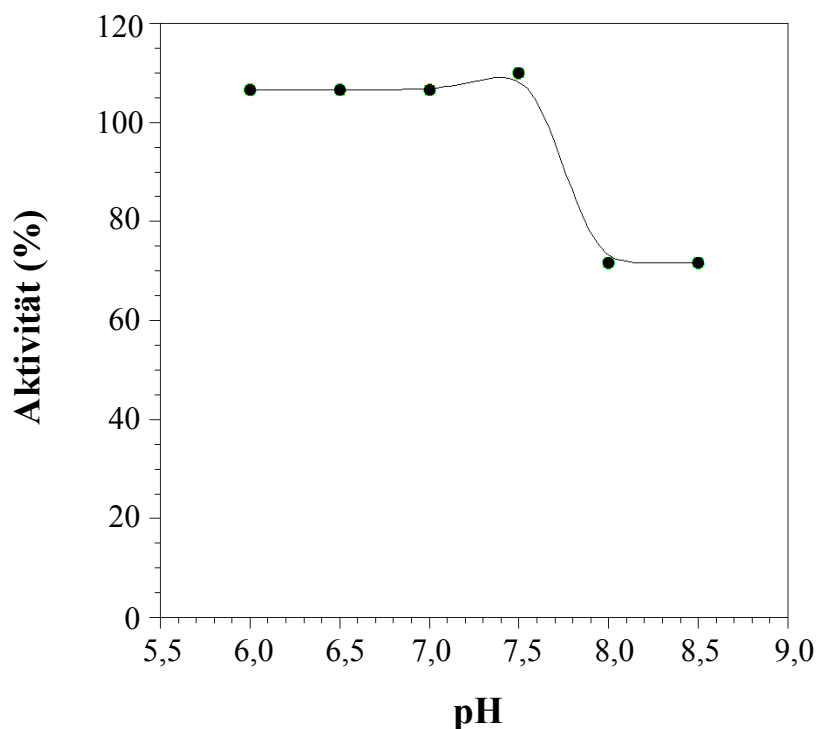


Abb. 11: pH-Abhängigkeit der Z-Phe-Arg-pNA-Hydrolyse durch aktives, rekombinantes FP-2

Das chromogene Substrat wurde über den gesamten getesteten pH-Bereich (pH 6,0 bis pH 8,5) mit relativ hoher Aktivität durch FP-2 hydrolysiert. Das pH-Optimum war ebenfalls recht breit und lag zwischen pH 6,0 und pH 7,5. Die Inkubation erfolgte mit 60 μ M aktiven Falcipains-2, 50 μ M Z-Phe-Arg-pNA, 100 μ M Bis-Tris-Propane im jeweiligen pH-Wert und 10 mM DTT bei Raumtemperatur. Die spontane Hydrolyse des Substrates in Abwesenheit des Enzyms wurde für jeden pH-Wert separat bestimmt und von den Messwerten subtrahiert.

Weder bei der Inkubation des aktiven, rekombinanten Falcipain-2 mit Z-Phe-Val-Ala-Asp-pNA, noch mit Glycin-pNA (siehe II.4.1.1.) war eine Extinktionszunahme messbar (nicht gezeigt).

Hämoglobinase-Assay

Das natürliche Substrat des FP-2, humanes Hämoglobin, wurde in diesem Experiment mit dem aktiven, rekombinanten FP-2 sowie mit der Mutante FPc285a inkubiert.

Das aktive Enzym hatte das Hämoglobin bereits nach kurzer Zeit vollständig hydrolysiert, während das FPc285a den gesamten Zeitraum über keine Spaltungsaktivität zeigte (Abb. 12). Auch diese Reaktion war spezifisch durch E-64 hemmbar.

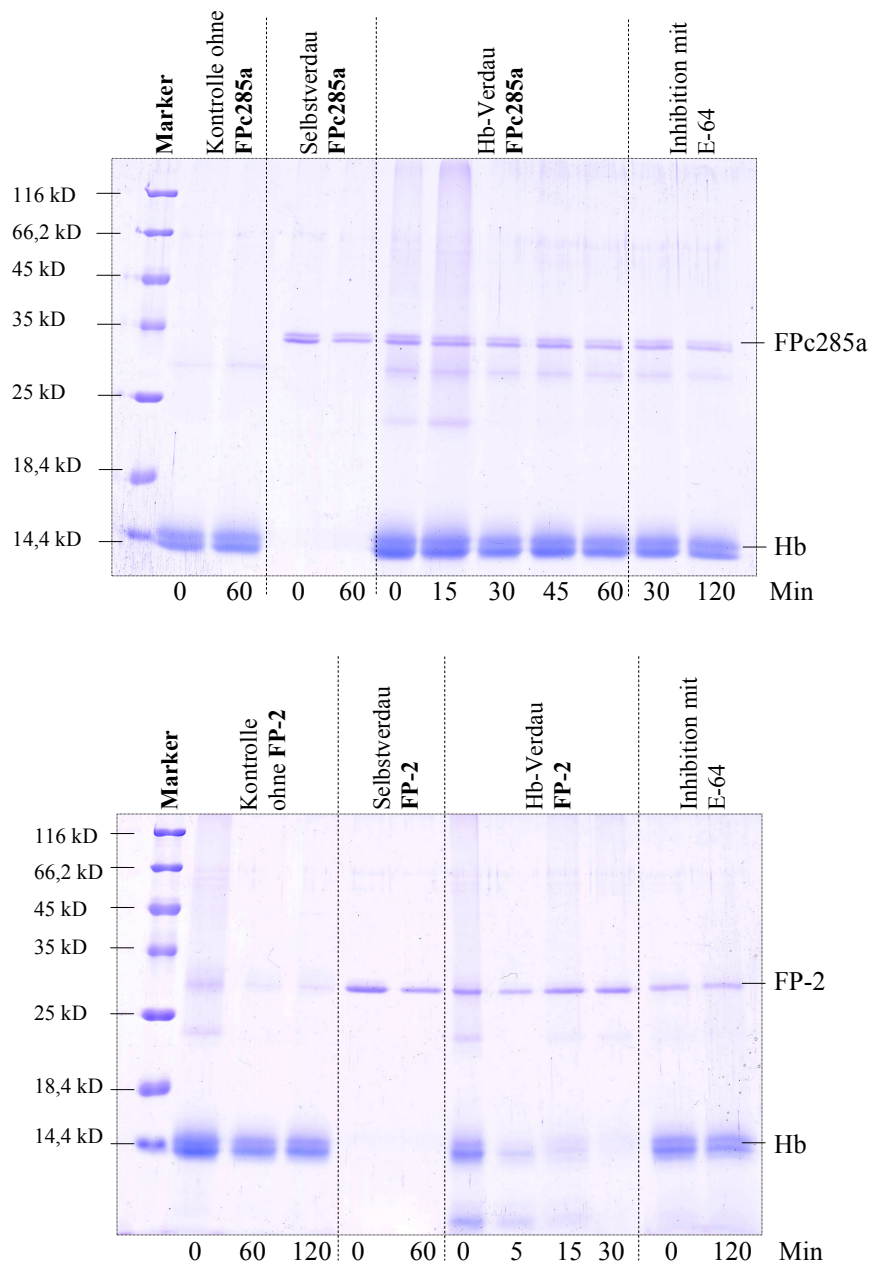


Abb. 12: Hämoglobinsase-Aktivität von FPc285a und aktivem, rekombinantem FP-2

Das FPc285a (oberes Gel) zeigte über den gesamten Messzeitraum keine Spaltungsaktivität. Das aktive FP-2 (unten) hatte das Hämoglobin schon nach kurzer Zeit verdaut und ließ sich in einem separaten Ansatz vollständig durch E-64 hemmen. Es wurden 17 µg/ml des jeweiligen Enzyms mit 0,2 mg/ml humanen Hämoglobins (Hb), 0,1 M NaAc (pH 5,5), 10 mM DTT und in einem Ansatz mit 200 µM E-64 bei 37 °C für definierte Zeiten inkubiert. In zwei Kontroll-Ansätzen fehlte das Enzym bzw. das Hb. Die Ansätze wurden durch SDS-PAGE (15 % Acrylamid) analysiert.

Bei der Durchführung des Versuches mit aktivem FP-2 bei verschiedenen pH-Werten zeigte sich ein klar definiertes pH-Optimum im sauren Bereich. Bei pH 6,0 war das Hb bereits nach 30 Min verdaut (Abb. 13). Bei pH-Werten über 7,0 war lediglich eine minimale bis keine Spaltung sichtbar.

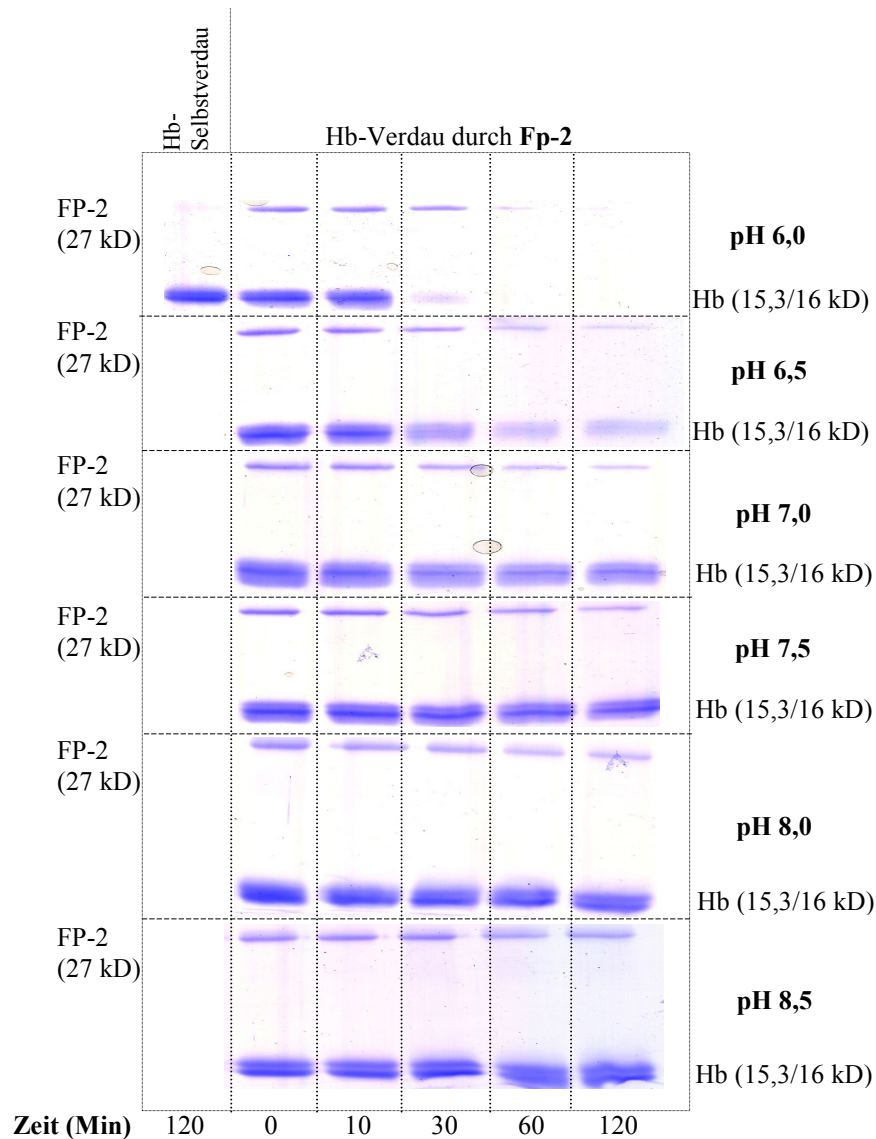


Abb. 13: pH-Abhängigkeit der Hämoglobinase-Aktivität von aktivem, rekombinantem FP-2

Bei der Spaltung von Hb zeigte das aktive, rekombinante FP-2 eine pH-Abhängigkeit mit engem pH-Optimum im sauren pH-Bereich. Bei pH 6,0 war das Hämoglobin am schnellsten hydrolysiert, bis pH 7,0 war allenfalls ein leichter Hb-Abbau sichtbar.

Die Inkubation erfolgte wie in Abb. 12 beschrieben, wobei anstelle von NaAc Bis-Tris-Propane/HCl, eingestellt auf den jeweiligen pH-Wert, als Puffersubstanz diente.

FP-2= rekombinantes FP-2. Die Ansätze wurden durch SDS-PAGE (15 % Acrylamid) analysiert.

Western Blot

Bei der Analyse mit einem Western Blot zeigte sich, dass das gefaltete FPc285a, im Gegensatz zum aktiven Protein, noch den His-Tag enthält und dadurch die gleiche Größe wie das ungefaltete Protein aufweist (Abb. 14).

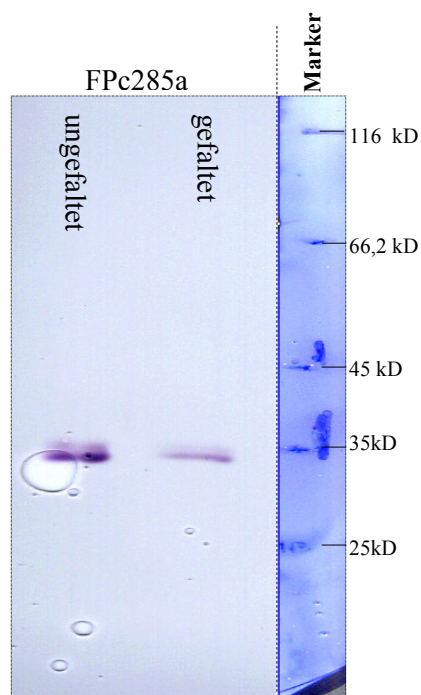


Abb. 14: Western Blot von gefaltetem- und ungefaltetem FPc285a

Western Blot des FPc285a vor- und nach der Faltung. Die Auftrennung erfolgte auf einem Laemmli-Gel (15 % Acrylamid). Die Proteine wurden mit Hilfe eines Anti-His-Tag-Antikörpers sichtbar gemacht.

Selbstprozessierungs-Assay

In diesem Experiment wurde die gefaltete, inaktive Falcipain-Mutante FPc285a mit aktivem, rekombinantem Falcipain inkubiert. Es zeigte sich, dass das aktive Falcipain-2 den inaktiven, verkürzten Präkursor *in trans* prozessieren kann. Die Prozessierungs-Aktivität war über den gesamten pH-Bereich (pH 6,0 bis pH 8,5) mit einem Maximum bei pH 8,0 bis 8,5 messbar (Abb. 15). Die Reaktion war spezifisch durch E-64 hemmbar. Die N-terminale Sequenzierung des Prozessierungsproduktes ergab, dass die proteolytische Spaltung spezifisch an derselben Position wie *in vivo* [81] erfolgte (nicht gezeigt).

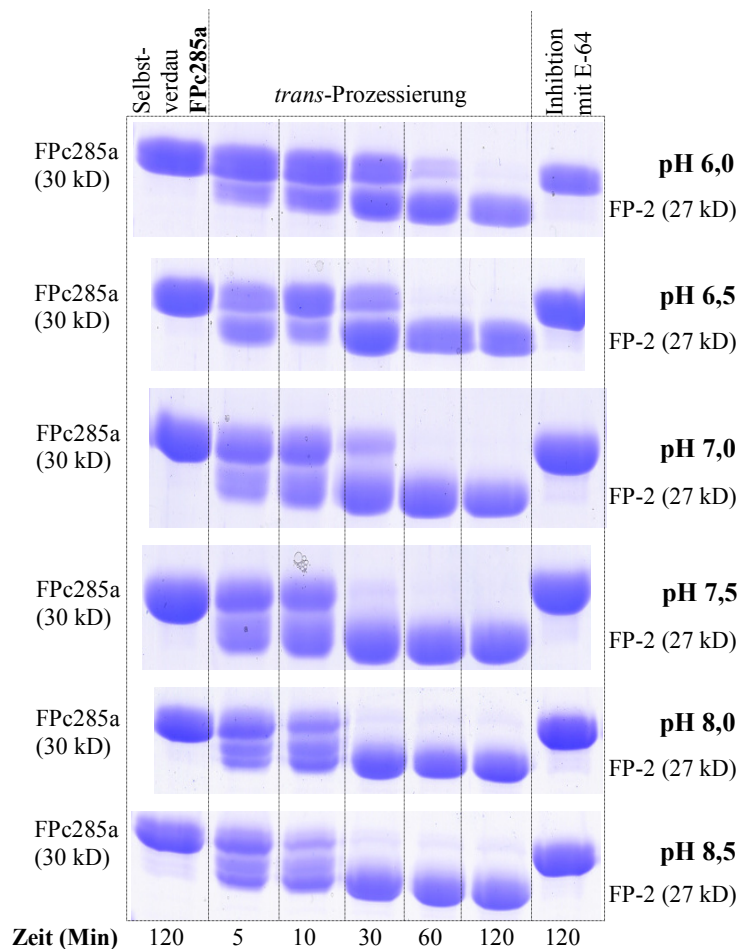


Abb. 15: Trans-Prozessierungs-Aktivität von FP-2

Es wurden 0,01 mg/ml aktives FP-2 mit 0,4 mg/ml FPc285a, 10 mM DTT, 100 mM Bis-Tris-Propane/HCl (eingestellt auf den jeweiligen pH-Wert) und in einem Ansatz 200 μ M E-64 bei 37 °C für definierte Zeiten inkubiert. In jeweils einem Ansatz wurde FPc285a ohne FP-2 inkubiert, um eine Kontamination durch *E. coli*-Proteasen während der Präparation auszuschließen. Die Ansätze wurden in einer SDS-PAGE (15 % Polyacrylamid) analysiert.

III.3.2. Inhibitorstudien mit N-(4-Bromophenyl)maleimid

Bei dem Vergleich von N-4-BM mit dem Cystein-Proteasen-Inhibitor E-64 erwiesen sich 1 mM N-4-BM als ebenso wirksam wie 0,1 mM E-64 (nicht gezeigt).

In mehreren Wiederholungsversuchen wurde die minimale Hemmkonzentration des potentiellen Kristallisationszusatzes ermittelt, indem schrittweise die N-4-BM-Menge reduziert wurde. Die kleinste eingesetzte Konzentration betrug 3,1 μM . Jede Versuchsreihe wurde zur photometrischen Doppelbestimmung zweifach angesetzt.

Durch Auftragen der Aktivitäten gegen die Inhibitor-Konzentration ließ sich eine 50 %ige Hemmung (I_{50}) mit 25 μM N-4-BM bestimmen (Abb. 16).

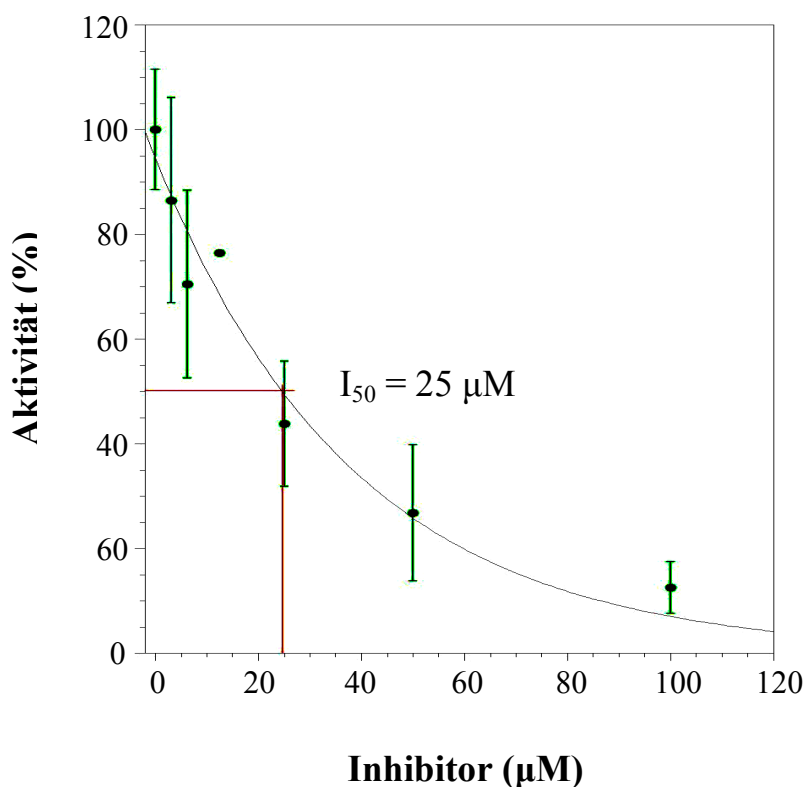


Abb. 16: Inhibition von aktivem FP-2 durch N-4-BM

Die prozentuale Enzymaktivität von rückgefaltetem aktiven, rekombinanten FP-2 ist gegen die Konzentration des eingesetzten N-4-BM aufgetragen. Bei einer Hemmstoff-Konzentration von 25 μM war eine 50 %ige Inhibition („ I_{50} “) des FP-2 zu verzeichnen.

Das Versuchs-Design entsprach dem Aktivitätstest mit chromogenen Substraten. Die Ansätze mit aktivem FP-2 und dem Z-Phe-Arg-pNA wurden hier nach 9 Min mit verschiedenen Konzentrationen des N-4-BM (1 mM, 0,5 mM, 0,25 mM, 0,1 mM, 50 μM , 25 μM , 12,5 μM , 6,25 μM und 3,1 μM) versetzt.

IV. Diskussion

IV.1. Expression von *FPc285a* und *FPc285aM*

Es gelang, beide mutierte FP-2-Gene nach Vorlage von S. Sijwali und Mitarbeitern zu exprimieren [83]. Das Molekulargewicht des FPc285a betrug ca. 30 kD (Abb. 5). Dies entspricht dem Gewicht des unprozessierten Vorläuferproteins von FP-2 mit verkürzter Prodomäne. Das FPc285M wies ein Molekulargewicht von ca. 27 kD auf, entsprechend dem Gewicht des maturen FP-2 [83].

Beide Proteine lagen, wie auch für das aktive FP-2 beschrieben [81,83], in fehlgefalteten Aggregaten als so genannte „*Inclusion Bodies*“ vor. Da bei un- und fehlgefalteten Proteinen ein Teil der hydrophoben Aminosäureseitenketten dem Medium zugewandt sind, neigen diese Proteine zur Aggregation und finden sich nach Zentrifugation des Zellaufschlusses im unlöslichen Pellet.

Die Renaturierung der fehlgefalteten Proteine ist ein aufwändiger Prozess der Lösung, Reinigung, vollständigen Denaturierung und Rückfaltung. Aus diesem Grund ist eine direkte Gewinnung löslichen, korrekt gefalteten Enzyms aus dem Expressionsstamm anzustreben. Im Folgenden sind mögliche Faktoren dargestellt, die während der praktischen Laborarbeit zu Fehlfaltung geführt haben könnten.

Die Fehlfaltung ist ein häufiges Phänomen der heterologen Expression von Genen, welche in dieser Arbeit angewandt wurde: Das FP-2-Gen aus dem Eukaryoten *Plasmodium falciparum* wurde hier von dem Expressionsapparat von *E. coli*, einem Prokaryoten, exprimiert. Des Weiteren besitzt FP-2 vier Disulfidbrücken zur Ausbildung und Stabilisierung der Tertiärstruktur [32]. Da der verwendete Expressionsstamm *M15(pREP4)* keine besonderen Fähigkeiten zur Ausbildung von Disulfidbrücken aufweist, ist eine inkorrekte Faltung des rekombinanten Proteins recht wahrscheinlich.

Außerdem könnte der N-terminal anhängende His-Tag für die Faltung einen Störfaktor darstellen. Da die Histidinsequenz eine Reihe schwach positiv geladener, hydrophiler Aminosäuren darstellt, kann sie die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen der Proteine negativ beeinflussen. Besonders die lokale Nähe zum für die Faltung essentiellen N-Terminus des Proteins [63,88] könnte sich störend auswirken.

Die verkürzte Länge der Prodomäne ist als Ursache unwahrscheinlich, da diese Domäne bei der Faltung von FP-2 keine Bedeutung zu haben scheint [63,88].

Die Expression in präparativem Maßstab, die Reinigung und Rückfaltung von *FPc285aM* wurde der Arbeitsgruppe von PD C. Schmidt am biochemischen Institut der Universität Lübeck übergeben, um es zunächst für Bindestudien mit Hämoglobin zu nutzen [32].

Es sind mehrere Methoden bekannt, um den löslichen Anteil an heterolog exprimierten Proteinen im Zytoplasma zu erhöhen. Hierzu gehören das Senken der Wachstumstemperatur, die Expression bei höheren Temperaturen und der Einfluss osmotischen Stresses auf die Zellen. Erstere reduziert hydrophobe Proteininteraktionen. Außerdem verbleibt dadurch eine größere Zeitspanne, in welcher die Proteine in die native Konformation übergehen können. Hitzestress führt zu vermehrter Expression von Chaperonen, die die Proteinfaltung unterstützen, und das osmotisch wirksame Betain stabilisiert die neu synthetisierten Proteine.

In dieser Arbeit konnte durch Variation der Expressionsbedingungen lediglich eine geringe Menge an korrekt gefaltetem *FPc285a* gewonnen werden. Nach Inkubation der Zellen bei 15 °C wurde eine schmale Bande löslichen Proteins in der Zytosol-Fraktion detektiert. Dieser Effekt war lediglich mit *Origami(DE3)*-Zellen zu sehen, erklärlich durch die verbesserte zytoplasmatische Disulfidbrückenbildung durch diesen *E. coli*-Stamm [15]. Eine stärkere Absenkung der Wachstumstemperatur wurde nicht getestet, da diese das Wachstum des Expressionsstammes zu sehr verlangsamt hätte.

Die provozierte Hochregulation von Chaperoninen durch Hitzestress sowie der stabilisierende Effekt des Betains auf die Proteine zeigten keinen sichtbaren Effekt.

Die Ausbeute an löslichem *FPc285a* mittels veränderten Expressionsbedingungen war für eine Kristallisation und für die Funktionsuntersuchungen zu gering. Ähnliches gilt für die *FPc285aM*-Mutante. Dieses Protein wurde zwar nachweislich in löslicher Form synthetisiert, jedoch nicht in ausreichender Menge, um eine effektive Reinigung in Abwesenheit eines Affinitäts-Tags zu ermöglichen. Daher wurde die Gewinnung von korrekt gefaltetem *FPc285a* in dieser Arbeit sowie von aktivem *FP-2* und *FPc285aM* im biochemischen Institut der Universität Lübeck weiterhin nach der Methode von Sijwali und Mitarbeitern durchgeführt [83].

IV.2. Reinigung und Rückfaltung von *FPc285a*

Die Arbeitsschritte zur *In-vitro*-Renaturierung von *FPc285a* wurden nach Vorlage von Sijwali und Mitarbeitern durchgeführt [83]. Es traten jedoch unerwartet große

Proteinverluste bei Ansäuerung des Faltungsansatzes, bei Einfrieren und massiv bei der Ionenaustauschchromatographie auf. Letztere wurde daher nicht mehr durchgeführt, und das Protein wurde bei 4 °C gelagert. Dennoch war es lediglich für ca. eineinhalb Wochen stabil. Pro 6 l Zellkultur konnte lediglich 1 g von gefaltetem FPc285a gewonnen werden, während Sijwali und Mitarbeiter mit gleicher Methode 12 g des rekombinanten, aktiven FP-2 ernteten [83].

Für die Instabilität des gefalteten FPc285a sind verschiedene Erklärungen denkbar: Der His-Tag könnte nicht nur eine korrekte Faltung stören, sondern die gefalteten Proteine aufgrund der beschriebenen Einflüsse auf die intra- und intermolekularen Wechselwirkungen destabilisieren. Des Weiteren könnte die Mutation des FP-2 trotz Austausches einer einzelnen Aminosäure im Endprotein ebenfalls die Wechselwirkungen beeinträchtigen, da die polare, hydrophile Aminosäure Cystein gegen die neutrale, hydrophobe Aminosäure Alanin ausgetauscht wurde. Auch wenn dieser Austausch theoretisch nur minimale Auswirkungen auf die Stabilität der Proteinstruktur zeigen sollte, ist doch ein Beitrag zu einer Destabilisierung des Proteins denkbar.

Ein weiterer Erklärungsansatz ergibt sich aus der Beobachtung, dass das rekombinante Wildtyp-FP-2 nach erfolgter Rückfaltung ausschließlich in seiner prozessierten Form vorlag. Wie in Abschnitt IV.3. diskutiert, erfolgt die Prozessierung des aktiven FP-2 durch einen autohydrolytischen Mechanismus. Da die FPc285a-Mutante auch nach der Rückfaltung keine Aktivität aufwies, fand diese Selbstprozessierung nicht statt (siehe Abb. 14), so dass die am gefalteten Protein verbliebene Prodomäne ebenfalls zur Destabilisierung des Proteins beigetragen haben könnte.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mittels der Methodik von Sijwali und Mitarbeitern sowie der durchgeführten Abwandlungen lediglich instabiles, relativ unreines FPc285a gewonnen werden konnte. Die Vulnerabilität und mangelnde Reinheit der Mutante sowie die geringe Proteinmenge stellen erschwerte Bedingungen für eine Kristallisation dar.

IV.3. Charakterisierung von Falcipain-2

Inaktivität von FPc285a

Die Inaktivität von FPc285a ließ sich in Aktivitätstests mit den FP-2-Substraten Hämoglobin und Z-Phe-Arg-pNA bestätigen (Abb. 10, 12). Damit hatte die Mutation des Cysteins im vorhergesagten aktiven Zentrum (Cys285 im Vorläuferprotein) die erwartete Wirkung.

Autohydrolytische Prozessierung von FP-2

Der Western Blot zeigt, dass im inaktiven FPc285a nach der *In-vitro*-Rückfaltung, im Gegensatz zum aktiven FP-2, die Histidin-Sequenz und folglich die verkürzte Prodomäne noch vorhanden sind und das Protein die gleiche Größe wie vor der Faltung aufweist (Abb. 14). Folglich hat die Mutante während der Faltung keine Prozessierung erfahren, was auf einen autoproteolytischen Mechanismus der FP-2-Prozessierung hindeutet. Im Selbstprozessierungs-Assay konnte diese Annahme bewiesen werden. Darin prozessierte aktives, rekombinantes FP-2 den FP-2-Präkursor mit verkürzter Prosequenz (FPc285a) *in trans* zu maturem FPc285a. Die proteolytische Spaltung erfolgte dabei an derselben Position wie für FP-2 *in vivo* beobachtet [81].

Diese Reaktion war, ebenso wie die Hämoglobinase-Aktivität durch den spezifischen Cystein-Protease-Inhibitor E-64 hemmbar.

Dahl und Rosenthal fanden eine spontane Prozessierung von FP-2 nach Faltung bei neutralem pH-Wert vor dem Transport in die Nahrungsvakuole [18], während Shenai und Mitarbeiter dies bei leicht alkalischem pH des Faltungspuffers beobachteten [81].

Mit Hilfe des Selbstprozessierungs-Assays konnte das pH-Optimum der Reaktion genauer ermittelt werden. Die FPc285a-Selbstprozessierung erfolgte zwischen pH 7,5 und pH 8,5 am effizientesten und zeigte in Übereinstimmung mit den Beobachtungen von Dahl und Rosenthal [18] sowie von Shenai et al. [81] ein breites pH-Optimum im neutralen bis leicht alkalischen Bereich.

Da die Reaktion im gesamten getesteten pH-Bereich (pH 6-8,5) ablief, also auch in leicht saurem Milieu, könnte FP-2 an der Prozessierung weiterer plasmodialer Enzyme in der Nahrungsvakuole beteiligt sein, nach dem es selbst bereits zur aktiven Form prozessiert wurde. An der Plasmepsin-Prozessierung scheint es jedoch nicht beteiligt zu sein, da diese nicht durch E-64 hemmbar ist [11,24].

pH-Abhängigkeit der FP-2-Aktivität

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Aktivitätstests verdeutlichen, dass die Aktivität von aktivem, rekombinantem FP-2 verschiedene pH-Profile abhängig vom angebotenen Substrat zeigt. Wie beschrieben [81], lag der optimale pH-Wert der Hämoglobinase-Aktivität auch in unseren Versuchen im sauren Bereich. Die Hydrolyse von Hämoglobin wies ein enges pH-Optimum bei pH 6 auf, und die Aktivität war nur im Bereich von pH 6-7 messbar. Allerdings war in unseren Versuchsreihen pH 6 der niedrigste getestete pH-Wert. Da der Hb-Verdau jedoch in der Nahrungsvakuole zwischen

pH 5 und 5,4 stattfindet [39,98] und natives FP-2 eine Hb-Spaltungsaktivität bis pH 4,5 aufwies [81], ist auch für das rekombinante Enzym von einer Aktivität über eine breitere pH-Spanne im sauren Bereich auszugehen.

Dagegen waren die Hydrolysen des chromogenen Substrates Z-Phe-Arg-pNA sowie des verkürzten Präkursors FPc285a über den gesamten getesteten pH-Bereich (pH 6-8,5) messbar und wiesen mit pH 6-7,5 (Z-Phe-Arg-pNA) und pH 7,5-8,5 (FPc285a) pH-Optima im eher neutralen bis schwach alkalischen Bereich auf. Dua und Mitarbeiter fanden auch für die Spaltung der Membranskelett-Proteine Ankyrin und Protein 4,1 ein pH-Optimum zwischen pH 7 und 7,5, welches dem neutralen pH des Erythrozyten-Zytoplasmas entspricht [21].

Shenai und Mitarbeiter ermittelten bei der Spaltung von Z-Phe-Arg-AMC, dem AMC(Amino-4-Methyl-Coumarin)-Analogon unseres chromogenen Substrates, ein von der Z-Phe-Arg-pNA-Hydrolyse abweichendes pH-Profil. Das enge pH-Optimum bei pH 6 und die Inaktivität ab pH 8 [81] lassen darauf schließen, dass schon kleinste Variationen der Substratstruktur ein abweichendes pH-Profil bewirken.

Die Zusammenschau unserer Daten mit den Ergebnissen der erwähnten Forschungsgruppen weist darauf hin, dass FP-2 grundsätzlich über einen weiten pH-Bereich zwischen pH 4,5 und 8,5 aktiv ist. Die unterschiedlichen pH-Profile der einzelnen Substrate sind möglicherweise durch eine pH-kontrollierte Bindung zwischen Enzym und Substrat erklärlich. Für die Hb-Bindung konnte dies in Bindestudien mit dem in der vorliegenden Arbeit konstruierten FPc285aM (matures, inaktives FP-2) bereits bestätigt werden. Mittels Oberflächenplasmonresonanz zeigte sich eine klare pH-Abhängigkeit der Bindung zwischen FPc285aM und Hb mit festerer Bindung bei saurem pH-Wert [32].

Für diese Hypothese spräche auch der Kurvenverlauf der pH/Aktivitäts-Graphik des Aktivitätstests mit Z-Phe-Arg-pNA (Abb. 11): Über pH 7,5 erfuhr das FP-2 einen abrupten Aktivitätsabfall von circa 30 %. Dies könnte auf das Vorliegen einer protonierbaren Gruppe in der Substratbindungsstelle mit pK-Wert zwischen pH 7,5 und 8 hindeuten, die an der Bindung zwischen Substrat und Enzym beteiligt ist. Die Deprotonierung einer solchen Gruppe bei einem pH-Wert oberhalb von pH 7,5 könnte infolge erschwerter Anbindung des Substrates eine reduzierte Aktivität des Enzyms bewirken.

Die pH-kontrollierte Substrat-Bindung könnte einen Mechanismus zur Steuerung der FP-2-Enzymaktivität darstellen. So könnten die zahlreichen Funktionen des Enzyms (Selbstprozessierung, Hb-Degradation und Hydrolyse der Membranskelett-Proteine) bei

unterschiedlichen pH-Werten in verschiedenen Stadien des plasmodialen Lebenszyklus gesteuert werden.

FP-2 spaltet keine Peptide mit hydrophober/ negativ geladener Aminosäure in P1-Position

Die in dieser Arbeit getesteten chromogenen Substrate Glycin-pNA und Z-Phe-Val-Ala-Asp-pNA konnten von rekombinantem FP-2 nicht hydrolysiert werden.

Bei Ersterem befindet sich Glycin an der P1-Position. Dies ist eine kleine, aliphatische Aminosäure. Sie könnte einerseits zu klein sein, um ausreichende Wechselwirkungen mit den Gruppen der Substratbindungsstelle einzugehen. Andererseits könnte das Fehlen einer Aminosäure in der P2-Position ursächlich für die nicht erfolgte Hydrolyse sein, da die entsprechende Subsite „S2“ des Enzyms wichtig für die Hydrolysespezifität ist [16].

Bei Z-Phe-Val-Ala-Asp-pNA ist Aspartat als negativ geladene, hydrophile Aminosäure an der P1-Position. An der noch wichtigeren P2-Position befindet sich Alanin, eine aliphatische Aminosäure. Da FP-2 eine Präferenz für hydrophobe AS in dieser Position besitzt [81], ist die Inaktivität gegenüber diesem Substrat folglich eher durch Störwirkung der Aminosäure in P1-Position zu erklären. Ginge man bei der FP-2-Subsite „S1“ von einer darin enthaltenen protonierbaren Gruppe aus, die im gesamten getesteten pH-Bereich deprotoniert und damit negativ geladen wäre, könnte Z-Phe-Val-Ala-Asp-pNA nicht anbinden und folglich nicht hydrolysiert werden. Damit ergäbe sich eine zusätzliche Erklärung für die Inaktivität gegenüber Glycin-pNA: Da die Subsite aufgrund ihrer Polarität und damit des hydrophilen Charakters vermutlich von Wassermolekülen besetzt wäre, könnte die kleine, nonpolare Aminosäure nur schlecht binden. Mit dieser These in Einklang ist auch die Beobachtung von Shenai und Mitarbeitern, dass vornehmlich Substrate mit Arginin und Lysin an der P1-Position, beides positiv geladene Aminosäuren, von FP-2 effizient gespalten werden [81].

Eine protonierbare Gruppe in der S1-Bindetasche würde die diskutierte pH-Abhängigkeit der Substrat-Bindung an FP-2 unterstützen.

Die Versuchsergebnisse könnten folglich darauf hindeuten, dass Peptide mit hydrophober sowie negativ geladener Aminosäure an der P1-Position nicht gespalten werden können, möglicherweise mangels Anbindung an die S1-Bindungstasche von FP-2.

Einschränkend muss jedoch festgestellt werden, dass diese Überlegungen nicht für die Bindung des Falcipain-2-Präkursors an das aktive FP-2 zu gelten scheinen, da sich in diesem Fall ein Aspartat-Rest an der Position P1 befindet. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre die Existenz eines speziellen Bindungsmodus für die Selbstprozessierungsreaktion.

IV.4. N-(4-Bromophenyl)maleimid als Kristallisationszusatz für FP-2

N-(4-Bromophenyl)maleimid (N-4-BM) soll als alternativer Kristallisationszusatz zu dem im biochemischen Institut der Universität Lübeck verwendeten Inhibitor Jodacetamid dienen. Analog zum Jodacetamid soll diese Substanz das aktive FP-2 hemmen. Gleichzeitig soll mit dem Bromatom ein Schweratom an definierter Stelle eingeführt werden.

Maleimid reagiert leicht mit Thiolen und wird daher häufig für Polymerisierungsreaktionen eingesetzt. In N-4-BM reagiert das Maleimid entsprechend mit dem Sulfhydrylrest des Cysteins im aktiven Zentrum (Cys 42 im maturen Enzym) und bildet dabei irreversibel einen stabilen Thioether. Die Substanz stellt folglich einen irreversiblen Hemmstoff dar.

In Inhibitorstudien mit aktivem, rekombinantem FP-2 wurde für N-4-BM eine mittlere Inhibitorkonzentration (I_{50}) von 25 μM ermittelt. Dies entspricht einer relativ niedrigen wirksamen Konzentration und verspricht eine geringe Störwirkung auf die Kristallisationsvorgänge. Mittels N-4-BM könnten im Vergleich zu Jodacetamid geringere Hemmstoffkonzentrationen eingesetzt werden. Hierdurch ließen sich unerwünschte Nebenreaktionen, wie beispielsweise die Modifikation von Tyrosin- und Histidin-Resten minimieren und damit möglicherweise die Kristallisierbarkeit des Proteins verbessern. Die Anwesenheit eines Schweratoms könnte für die Lösung der Kristallstruktur hilfreich sein.

IV.5. Ausblick

Falcipain-2 besitzt mehrere wichtige Funktionen im Lebenszyklus von *Plasmodium falciparum*. Daher stellt das Enzym ein attraktives Ziel für die Entwicklung neuer Antimalariamittel dar. Große Schritte konnten im Jahr 2006 durch die Aufklärung der dreidimensionalen FP-2-Struktur, welche die essentielle Grundlage für gezieltes Wirkstoffdesign darstellt, mittels Röntgenstrukturanalyse bereits getan werden [32,96]. Bisher gelang dies mit noch eingeschränkter Auflösung von maximal 2,7 Å [96].

Eine Kokristallisation von FP-2 mit Schweratomverbindungen, wie das in der vorliegenden Arbeit getestete N-4-BM, könnte die Auflösung der Kristallstruktur mittels multiplen isomorphen Ersatzes verbessern.

Inhibitoren, die eine Ausbildung des Hb-FP-2-Komplexes verhindern, stellen mögliche Ausgangsstoffe für zukünftige Medikamente dar. Zur genauen Erfassung der Interaktion zwischen Hämoglobin und dem kürzlich aufgeklärten Hb-Bindemotiv [32,96] könnte inaktives FP-2 mit dem Substrat kokristallisiert werden. Dazu eigneten sich die in dieser Arbeit konstruierten Mutanten. Aufgrund der besseren Stabilität bietet sich hierfür besonders die FPc285aM-Mutante (matures, inaktives FP-2) [32] an.

Zusätzliche Bindestudien von FPc285aM mit weiteren natürlichen sowie synthetischen FP-2-Substraten könnten zum genaueren Verständnis der Bindeverhältnisse von FP-2 beitragen.

Die Überlappung von Funktionen der verschiedenen Falcipaine (siehe 1.2.2.1.) erfordert die Entwicklung von Medikamenten mit breiter Wirksamkeit gegen die FP-2-Subfamilie. Die Homologie der Falcipaine [80], vor allem der FP-2-Isoenzyme [92], könnte dies vereinfachen.

V. Zusammenfassung

Malaria, eine der häufigsten Krankheiten weltweit, wird durch Infektion mit Protozoen der Gattung *Plasmodium* hervorgerufen. *P. falciparum* ist für die schwerste Krankheitsausprägung, die *Malaria tropica*, verantwortlich. Der medikamentösen Behandlung sind aufgrund verbreiteter Erreger-Resistenzen gegen die erhältlichen Wirkstoffe enge Grenzen gesetzt. Folglich ist die Entwicklung neuer Antimalaria-Mittel ein Ziel der gegenwärtigen Forschung. Die Cystein-Protease Falcipain-2 aus *P. falciparum* erfüllt mehrere Aufgaben im plasmodialen Lebenszyklus, allen voran der Hämoglobin-Abbau im infizierten Erythrozyten. Daher ist Falcipain-2 ein attraktiver Ansatzpunkt für die Medikamenten-Entwicklung. Eine Voraussetzung hierfür ist die genaue Kenntnis von Struktur und Funktion des Enzyms.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei inaktive Mutanten von Falcipain-2 konstruiert, ein verkürztes Vorläuferprotein (FP285a) sowie eine dem prozessierten Enzym, wie es in der Nahrungsvakuole vorkommt, entsprechende Form (FPc285aM). Die Proteine wurden unter Verwendung der etablierten Methode [83] hergestellt, da sich trotz ausgedehnter Experimente keine Bedingungen finden ließen, unter denen das rekombinante Protein in *E. coli* in löslicher Form synthetisiert wurde.

Mit Hilfe von Aktivitätstests konnten weitere Eigenschaften des Falcipains-2 ermittelt werden: Die bisher nur vermutete Fähigkeit zur Selbstprozessierung [81,83] konnte nachgewiesen werden. Falcipain-2 prozessierte sein eigenes Vorläuferprotein (FPc285a) bei neutralem bis leicht alkalischem pH-Wert *in trans*. Weiter zeigte sich, dass Falcipain-2 Hämoglobin, ein peptidisches Substrat sowie sein Vorläuferprotein mit verschiedenen pH-Optima spaltet.

Aufgrund der beobachteten pH-Abhängigkeit der Aktivität von der Art des angebotenen Substrates kann vermutet werden, dass der Umgebungs-pH-Wert eine wichtige Rolle bei der Steuerung der vielfältigen Funktionen von Falcipain-2 im Verlauf der plasmodialen Lebensstadien spielt.

In Hinblick auf die geplante Kristallisierung konnte N-(4-Bromophenyl)maleimid als neuer Inhibitor und potentieller Kristallisationszusatz charakterisiert werden. Die Substanz könnte geeignet sein, aktives Falcipain-2 während der Kristallisation zu stabilisieren und mit Hilfe des Brom-Atoms das Lösen der Struktur zu erleichtern.

Die Ko-Kristallisationen und weitere Bindestudien von inaktiven Falcipain-2-Mutanten mit verschiedenen Substraten könnten künftig mehr Aufschluss über die Bindeverhältnisse

zwischen Falcipain-2 und seinen Substraten geben, deren Hemmung ein möglicher Angriffspunkt für Medikamente sein könnte.

VI. Literaturverzeichnis

1. http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/MalariaRiskAreas_2005.png
(Tag des Zugriffs: 29.09.2007).
2. <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/Malaria.htm> (Tag des Zugriffs: 27.09.2007).
3. <http://www.dtg.org/2.html> (Tag des Zugriffs: 27.09.2007).
4. <http://www.dtg.org/7.html> (Tag des Zugriffs: 27.09.2007).
5. <http://www.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf> (Tag des Zugriffs: 25.09.2007).
6. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/index.html> (Tag des Zugriffs: 27.09.2007).
7. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2006/pr02/en/index.html> (Tag des Zugriffs: 28.09.2007).
8. Adjuik M., Babiker A., Garner P., Olliaro P., Taylor W., White N. (2004). Artesunate combinations for treatment of malaria: meta-analysis. *Lancet* **363**, 9-17.
9. Baird J. K. (2005). Effectiveness of antimalarial drugs. *N Engl J Med* **352**, 1565-1577.
10. Baird J. K., Wiady I., Sutanihardja A., Suradi, Purnomo, Basri H., Sekartuti, Ayomi E., Fryauff D. J., Hoffman S. L. (2002). Short report: therapeutic efficacy of chloroquine combined with primaquine against *Plasmodium falciparum* in northeastern Papua, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* **66**, 659-660.
11. Banerjee R., Francis S. E., Goldberg D. E. (2003). Food vacuole plasmepsins are processed at a conserved site by an acidic convertase activity in *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **129**, 157-165.

12. Banerjee R., Liu J., Beatty W., Pelosof L., Klemba M., Goldberg D. E. (2002). Four plasmepsins are active in the *Plasmodium falciparum* food vacuole, including a protease with an active-site histidine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 990-995.

13. Barat L. M., Bloland P. B. (1997). Drug resistance among malaria and other parasites. *Infect Dis Clin North Am* **11**, 969-987.

14. Barsoum R. S. (2000). Malarial acute renal failure. *J Am Soc Nephrol* **11**, 2147-2154.

15. Bessette P. H., Aslund F., Beckwith J., Georgiou G. (1999). Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13703-13708.

16. Bode W., Huber R. (2000). Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. *Biochim Biophys Acta* **1477**, 241-252.

17. Chandre F., Darrier F., Manga L., Akogbeto M., Faye O., Mouchet J., Guillet P. (1999). Status of pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* sensu lato. *Bull World Health Organ* **77**, 230-234.

18. Dahl E. L., Rosenthal P. J. (2005). Biosynthesis, localization, and processing of falcipain cysteine proteases of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **139**, 205-212.

19. Dasaradhi P. V., Korde R., Thompson J. K., Tanwar C., Nag T. C., Chauhan V. S., Cowman A. F., Mohammed A., Malhotra P. (2007). Food vacuole targeting and trafficking of falcipain-2, an important cysteine protease of human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **156**, 12-23.

20. Dasaradhi P. V., Mohammed A., Kumar A., Hossain M. J., Bhatnagar R. K., Chauhan V. S., Malhotra P. (2005). A role of falcipain-2, principal cysteine proteases of *Plasmodium falciparum* in merozoite egression. *Biochem Biophys Res Commun* **336**, 1062-1068.

21. Dua M., Raphael P., Sijwali P. S., Rosenthal P. J., Hanspal M. (2001). Recombinant falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane ankyrin and protein 4.1. *Mol Biochem Parasitol* **116**, 95-99.
22. Eksi S., Czesny B., Greenbaum D. C., Bogyo M., Williamson K. C. (2004). Targeted disruption of Plasmodium falciparum cysteine protease, falcipain 1, reduces oocyst production, not erythrocytic stage growth. *Mol Microbiol* **53**, 243-250.
23. Filler S., Causer L. M., Newman R. D., Barber A. M., Roberts J. M., MacArthur J., Parise M. E., Steketee R. W. (2003). Malaria surveillance--United States, 2001. *MMWR Surveill Summ* **52**, 1-14.
24. Francis S. E., Banerjee R., Goldberg D. E. (1997). Biosynthesis and maturation of the malaria aspartic hemoglobins plasmepsins I and II. *J Biol Chem* **272**, 14961-14968.
25. Francis S. E., Sullivan D. J., Jr., Goldberg D. E. (1997). Hemoglobin metabolism in the malaria parasite Plasmodium falciparum. *Annu Rev Microbiol* **51**, 97-123.
26. Fryauff D. J., Tuti S., Mardi A., Masbar S., Patipelohi R., Leksana B., Kain K. C., Bangs M. J., Richie T. L., Baird J. K. (1998). Chloroquine-resistant Plasmodium vivax in transmigration settlements of West Kalimantan, Indonesia. *Am J Trop Med Hyg* **59**, 513-518.
27. Goh L. L., Sim T. S. (2005). Characterization of amino acid variation at strategic positions in parasite and human proteases for selective inhibition of falcipains in Plasmodium falciparum. *Biochem Biophys Res Commun* **335**, 762-770.
28. Greenbaum D. C., Baruch A., Grainger M., Bozdech Z., Medzihradzsky K. F., Engel J., DeRisi J., Holder A. A., Bogyo M. (2002). A role for the protease falcipain 1 in host cell invasion by the human malaria parasite. *Science* **298**, 2002-2006.
29. Greenwood B., Mutabingwa T. (2002). Malaria in 2002. *Nature* **415**, 670-672.
30. Greenwood B. M., Bojang K., Whitty C. J., Targett G. A. (2005). Malaria. *Lancet* **365**, 1487-1498.

31. Hanspal M., Dua M., Takakuwa Y., Chishti A. H., Mizuno A. (2002). Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-2 cleaves erythrocyte membrane skeletal proteins at late stages of parasite development. *Blood* **100**, 1048-1054.

32. Hogg T., Nagarajan K., Herzberg S., Chen L., Shen X., Jiang H., Wecke M., Blohmke C., Hilgenfeld R., Schmidt C. L. (2006). Structural and functional characterization of Falcipain-2, a hemoglobinase from the malarial parasite Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* **281**, 25425-25437.

33. Ibezim* E. C., Odo U. (2008). Current trends in malarial chemotherapy. *African Journal of Biotechnology* **7**, 349–356.

34. Inoue H., Nojima H., Okayama H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

35. Jambou R., Legrand E., Niang M., Khim N., Lim P., Volney B., Ekala M. T., Bouchier C., Esterre P., Fandeur T., Mercereau-Puijalon O. (2005). Resistance of Plasmodium falciparum field isolates to in-vitro artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* **366**, 1960-1963.

36. Kain K. C., Keystone J. S. (1998). Malaria in travelers. Epidemiology, disease, and prevention. *Infect Dis Clin North Am* **12**, 267-284.

37. Kesavulu M. M., Prakasha Gowda A. S., Ramya T. N., Surolia N., Suguna K. (2005). Plasmepsin inhibitors: design, synthesis, inhibitory studies and crystal structure analysis. *J Pept Res* **66**, 211-219.

38. Krogstad D. J., Gluzman I. Y., Kyle D. E., Oduola A. M., Martin S. K., Milhous W. K., Schlesinger P. H. (1987). Efflux of chloroquine from Plasmodium falciparum: mechanism of chloroquine resistance. *Science* **238**, 1283-1285.

39. Krogstad D. J., Schlesinger P. H., Gluzman I. Y. (1985). Antimalarials increase vesicle pH in Plasmodium falciparum. *J Cell Biol* **101**, 2302-2309.

40. Krugliak M., Zhang J., Ginsburg H. (2002). Intraerythrocytic Plasmodium falciparum utilizes only a fraction of the amino acids derived from the digestion of host cell cytosol for the biosynthesis of its proteins. *Mol Biochem Parasitol* **119**, 249-256.

41. Lang W. (2002). Malaria. In: Tropenmedizin in Klinik und Praxis, Vol. **1**, Lang W., Löscher T., eds. (Georg Thieme Verlag, Stuttgart), pp. 10-33.

42. Lew V. L., Tiffert T., Ginsburg H. (2003). Excess hemoglobin digestion and the osmotic stability of Plasmodium falciparum-infected red blood cells. *Blood* **101**, 4189-4194.

43. Liu J., Istvan E. S., Gluzman I. Y., Gross J., Goldberg D. E. (2006). Plasmodium falciparum ensures its amino acid supply with multiple acquisition pathways and redundant proteolytic enzyme systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8840-8845.

44. Looareesuwan S., Buchachart K., Wilairatana P., Chalermrut K., Rattanapong Y., Amradee S., Siripiphat S., Chullawichit S., Thimasan K., Ittiverakul M., Triampon A., Walsh D. S. (1997). Primaquine-tolerant vivax malaria in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol* **91**, 939-943.

45. Loria P., Miller S., Foley M., Tilley L. (1999). Inhibition of the peroxidative degradation of haem as the basis of action of chloroquine and other quinoline antimalarials. *Biochem J* **339** (Pt 2), 363-370.

46. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.

47. Lucius R., Loos-Frank B. (1997). Parasitische Protozoen. In: Parasitologie, Vol **1**, Lucius R., Loos-Frank B., eds. (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg), pp. 25-141.

48. Meshnick S. R. (2002). Artemisinin: Mechanisms of action, resistance and toxicity. *Int J Parasitol* **32**, 1655-1660.

49. Meyer C. G. (2007). Protozoeninfektionen. In: Tropenmedizin- Infektionskrankheiten, Vol **1**, Meyer C. G., ed. (ecomed Medizin, Verlagsgruppe Hüthig Jehle Rehm GmbH, Landsberg), pp. 197-251.

50. Mockenhaupt F. P. (1995). Mefloquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* **11**, 248-253.
51. Mouchet J. (2000). Airport malaria : a rare disease still poorly understood. *Euro Surveill* **5**, 75-76.
52. Muentener P., Schlagenhauf P., Steffen R. (1999). Imported malaria (1985-95): trends and perspectives. *Bull World Health Organ* **77**, 560-566.
53. Murata C. E., Goldberg D. E. (2003). *Plasmodium falciparum* falcilysin: a metalloprotease with dual specificity. *J Biol Chem* **278**, 38022-38028.
54. Murata C. E., Goldberg D. E. (2003). *Plasmodium falciparum* falcilysin: an unprocessed food vacuole enzyme. *Mol Biochem Parasitol* **129**, 123-126.
55. Mutabingwa T., Nzila A., Mberu E., Nduati E., Winstanley P., Hills E., Watkins W. (2001). Chlorproguanil-dapsone for treatment of drug-resistant *falciparum* malaria in Tanzania. *Lancet* **358**, 1218-1223.
56. Newbold C., Craig A., Kyes S., Rowe A., Fernandez-Reyes D., Fagan T. (1999). Cytoadherence, pathogenesis and the infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* **29**, 927-937.
57. Nosten F., Luxemburger C., ter Kuile F. O., Woodrow C., Eh J. P., Chongsuphajaisiddhi T., White N. J. (1994). Treatment of multidrug-resistant *Plasmodium falciparum* malaria with 3-day artesunate-mefloquine combination. *J Infect Dis* **170**, 971-977.
58. Nosten F., ter Kuile F., Chongsuphajaisiddhi T., Luxemburger C., Webster H. K., Edstein M., Phaipun L., Thew K. L., White N. J. (1991). Mefloquine-resistant *falciparum* malaria on the Thai-Burmese border. *Lancet* **337**, 1140-1143.
59. Nosten F., van Vugt M., Price R., Luxemburger C., Thway K. L., Brockman A., McGready R., ter Kuile F., Looareesuwan S., White N. J. (2000). Effects of artesunate-mefloquine combination on incidence of *Plasmodium falciparum* malaria and mefloquine resistance in western Thailand: a prospective study. *Lancet* **356**, 297-302.

60. Oh S. S., Chishti A. H., Palek J., Liu S. C. (1997). Erythrocyte membrane alterations in *Plasmodium falciparum* malaria sequestration. *Curr Opin Hematol* **4**, 148-154.
61. Olliaro P., Cattani J., Wirth D. (1996). Malaria, the submerged disease. *Jama* **275**, 230-233.
62. Olson J. E., Lee G. K., Semenov A., Rosenthal P. J. (1999). Antimalarial effects in mice of orally administered peptidyl cysteine protease inhibitors. *Bioorg Med Chem* **7**, 633-638.
63. Pandey K. C., Sijwali P. S., Singh A., Na B. K., Rosenthal P. J. (2004). Independent intramolecular mediators of folding, activity, and inhibition for the *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2. *J Biol Chem* **279**, 3484-3491.
64. Pandey K. C., Wang S. X., Sijwali P. S., Lau A. L., McKerrow J. H., Rosenthal P. J. (2005). The *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2 captures its substrate, hemoglobin, via a unique motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9138-9143.
65. Panosian C. B. (2005). Economic access to effective drugs for *falciparum* malaria. *Clin Infect Dis* **40**, 713-717.
66. Picot S., Peyron F., Vuillez J. P., Polack B., Ambroise-Thomas P. (1991). Chloroquine inhibits tumor necrosis factor production by human macrophages in vitro. *J Infect Dis* **164**, 830.
67. Podobnik M., Kuhelj R., Turk V., Turk D. (1997). Crystal structure of the wild-type human procathepsin B at 2.5 Å resolution reveals the native active site of a papain-like cysteine protease zymogen. *J Mol Biol* **271**, 774-788.
68. Ramharter M., Oyakhirome S., Klouwenberg P. K., Adegnika A. A., Agnandji S. T., Missinou M. A., Matsiegui P. B., Mordmuller B., Borrmann S., Kun J. F., Lell B., Krishna S., Graninger W., Issifou S., Kremsner P. G. (2005). Artesunate-clindamycin versus quinine-clindamycin in the treatment of *Plasmodium falciparum* malaria: a randomized controlled trial. *Clin Infect Dis* **40**, 1777-1784.

69. Raphael P., Takakuwa Y., Manno S., Liu S. C., Chishti A. H., Hanspal M. (2000). A cysteine protease activity from *Plasmodium falciparum* cleaves human erythrocyte ankyrin. *Mol Biochem Parasitol* **110**, 259-272.
70. Rawlings N. D., Barrett A. J. (1999). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **27**, 325-331.
71. Rosenthal P. J. (2004). Cysteine proteases of malaria parasites. *Int J Parasitol* **34**, 1489-1499.
72. Rosenthal P. J., Kim K., McKerrow J. H., Leech J. H. (1987). Identification of three stage-specific proteinases of *Plasmodium falciparum*. *J Exp Med* **166**, 816-821.
73. Rosenthal P. J., Lee G. K., Smith R. E. (1993). Inhibition of a *Plasmodium vinckei* cysteine proteinase cures murine malaria. *J Clin Invest* **91**, 1052-1056.
74. Rosenthal P. J., McKerrow J. H., Aikawa M., Nagasawa H., Leech J. H. (1988). A malarial cysteine proteinase is necessary for hemoglobin degradation by *Plasmodium falciparum*. *J Clin Invest* **82**, 1560-1566.
75. Rosenthal P. J., Wollish W. S., Palmer J. T., Rasnick D. (1991). Antimalarial effects of peptide inhibitors of a *Plasmodium falciparum* cysteine proteinase. *J Clin Invest* **88**, 1467-1472.
76. Rowe J. A., Moulds J. M., Newbold C. I., Miller L. H. (1997). *P. falciparum* rosetting mediated by a parasite-variant erythrocyte membrane protein and complement-receptor 1. *Nature* **388**, 292-295.
77. Sachs J., Malaney P. (2002). The economic and social burden of malaria. *Nature* **415**, 680-685.
78. Schechter I., Berger A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* **27**, 157-162.
79. Semenov A., Olson J. E., Rosenthal P. J. (1998). Antimalarial synergy of cysteine and aspartic protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* **42**, 2254-2258.

80. Shenai B. R., Lee B. J., Alvarez-Hernandez A., Chong P. Y., Emal C. D., Neitz R. J., Roush W. R., Rosenthal P. J. (2003). Structure-activity relationships for inhibition of cysteine protease activity and development of *Plasmodium falciparum* by peptidyl vinyl sulfones. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 154-160.
81. Shenai B. R., Sijwali P. S., Singh A., Rosenthal P. J. (2000). Characterization of native and recombinant falcipain-2, a principal trophozoite cysteine protease and essential hemoglobinase of *Plasmodium falciparum*. *J Biol Chem* **275**, 29000-29010.
82. Sherman I. W. (1977). Amino acid metabolism and protein synthesis in malarial parasites. *Bull World Health Organ* **55**, 265-276.
83. Sijwali P. S., Brinen L. S., Rosenthal P. J. (2001). Systematic optimization of expression and refolding of the *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-2. *Protein Expr Purif* **22**, 128-134.
84. Sijwali P. S., Kato K., Seydel K. B., Gut J., Lehman J., Klemba M., Goldberg D. E., Miller L. H., Rosenthal P. J. (2004). *Plasmodium falciparum* cysteine protease falcipain-1 is not essential in erythrocytic stage malaria parasites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8721-8726.
85. Sijwali P. S., Koo J., Singh N., Rosenthal P. J. (2006). Gene disruptions demonstrate independent roles for the four falcipain cysteine proteases of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* **150**, 96-106.
86. Sijwali P. S., Rosenthal P. J. (2004). Gene disruption confirms a critical role for the cysteine protease falcipain-2 in hemoglobin hydrolysis by *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4384-4389.
87. Sijwali P. S., Shenai B. R., Gut J., Singh A., Rosenthal P. J. (2001). Expression and characterization of the *Plasmodium falciparum* haemoglobinase falcipain-3. *Biochem J* **360**, 481-489.

88. Sijwali P. S., Shenai B. R., Rosenthal P. J. (2002). Folding of the Plasmodium falciparum cysteine protease falcipain-2 is mediated by a chaperone-like peptide and not the prodomain. *J Biol Chem* **277**, 14910-14915.
89. Silva A. M., Lee A. Y., Gulnik S. V., Maier P., Collins J., Bhat T. N., Collins P. J., Cachau R. E., Luker K. E., Gluzman I. Y., Francis S. E., Oksman A., Goldberg D. E., Erickson J. W. (1996). Structure and inhibition of plasmepsin II, a hemoglobin-degrading enzyme from Plasmodium falciparum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 10034-10039.
90. Sinden R. E., Gilles H. M. (2002). The malaria parasites. In Essential Malarology, Vol 1, D.A. W., H.M. G., eds. (Arnold, A member of the Hodder Headline Group, London), pp. 8-34.
91. Singh B., Kim Sung L., Matusop A., Radhakrishnan A., Shamsul S. S., Cox-Singh J., Thomas A., Conway D. J. (2004). A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet* **363**, 1017-1024.
92. Singh N., Sijwali P. S., Pandey K. C., Rosenthal P. J. (2006). Plasmodium falciparum: biochemical characterization of the cysteine protease falcipain-2'. *Exp Parasitol* **112**, 187-192.
93. Smith S. M., Gottesman M. M. (1989). Activity and deletion analysis of recombinant human cathepsin L expressed in Escherichia coli. *J Biol Chem* **264**, 20487-20495.
94. Stanley J. (1997). Malaria. *Emerg Med Clin North Am* **15**, 113-155.
95. Turk V., Turk B., Turk D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *Embo J* **20**, 4629-4633.
96. Wang S. X., Pandey K. C., Somoza J. R., Sijwali P. S., Kortemme T., Brinen L. S., Fletterick R. J., Rosenthal P. J., McKerrow J. H. (2006). Structural basis for unique mechanisms of folding and hemoglobin binding by a malarial protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 11503-11508.

97. WHO (2000). Severe falciparum malaria. World Health Organization, Communicable Diseases Cluster. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94 Suppl 1**, S1-90.
98. Yayon A., Cabantchik Z. I., Ginsburg H. (1984). Identification of the acidic compartment of Plasmodium falciparum-infected human erythrocytes as the target of the antimalarial drug chloroquine. *Embo J* **3**, 2695-2700.

Eigene Veröffentlichungen

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits im Rahmen der Publikation „Hogg T., Nagarajan K., Herzberg S., Chen L., Shen X., Jiang H., Wecke M., Blohmke C., Hilgenfeld R., Schmidt C. L. (2006). Structural and functional characterization of Falcipain-2, a hemoglobinase from the malarial parasite Plasmodium falciparum. *J Biol Chem* **281**, 25425-25437“ veröffentlicht. Der Abstract ist nachfolgend wiedergegeben.

Structural and functional characterization of falcipain-2, a hemoglobinase from the malarial parasite plasmodium falciparum

Tanis Hogg, Krishna Nagarajan, Saskia Herzberg, Lili Chen, Xu Shen, Hualiang Jiang, Maria Wecke, Christoph J. Blohmke, Rolf Hilgenfeld, and Christian L. Schmidt

Institute of Biochemistry, University of Luebeck, Luebeck 23538

Malaria is caused by protozoan erythrocytic parasites of the Plasmodium genus, with *P. falciparum* being the most dangerous and widespread disease-causing species. Falcipain-2 (FP-2) of *P. falciparum* is a papain-family (C1A) cysteine protease that plays an important role in the parasite life-cycle by degrading erythrocyte proteins, most notably hemoglobin. Inhibition of FP-2 and its paralogues prevents parasite maturation, suggesting these proteins may be valuable targets for the design of novel antimalarial drugs, but lack of structural knowledge has impeded progress towards the rational discovery of potent, selective and efficacious inhibitors. As a first step towards this goal, we present here the crystal structure of mature FP-2 at 3.1 Å resolution, revealing novel structural features of the FP-2 subfamily proteases including a dynamic beta-hairpin hemoglobin-binding motif, a flexible amino-terminal alpha-helical extension, and a unique active-site cleft. We also demonstrate by biochemical methods that mature FP-2 can proteolytically process its own precursor *in trans* at neutral to weakly alkaline pH, that the binding of hemoglobin to FP-2

is strictly pH-dependent, and that FP-2 preferentially binds methemoglobin over hemoglobin. Since the specificity and proteolytic activity of FP-2 towards its multiple targets appears to be pH-dependent, we suggest that environmental pH may play an important role in orchestrating FP-2 function over the different life stages of the parasite. Moreover, it appears that selectivity of FP-2 for methemoglobin may represent an evolutionary adaptation to oxidative stress conditions within the host cell.

VII. Anhang

VII.1. Primer

Primer	Sequenz (5' → 3')	T _m (°C)	Firma
FPsen	TGGGCCTTTAGTAGTATAGGTTC	63	MWG-Biotech
FPantiA	GGCAGATCCACAATTTTTTTTGATCCTTT	63	MWG-Biotech
P_mutA_Ht	ATGAGAGGATCGCATCACCAT	57,9	MWG-Biotech
P_mutA	ATGAATTATGAAGAAGTTATAAAAAAA TATAGA	55,8	MWG-Biotech
P_mutA_anti	ATTAGCTTATTCAATTAATGGAATGAA	54,3	MWG-Biotech

VII.2. Chemikalien, Proteine, Chromogene Substrate und Enzyme

Chemikalien	Firma
Acrylamid	Roth
Agar-Agar	Gerbu
Agarose	Serva
APS	Merck
β-Mercaptoethanol	Merck
BCIP	Gerbu
Betain-HCl	Calbiochem
Bis-Tris-Propan	Sigma

Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck
Carbenicillin	Gerbu
Chloroform	Merck
Coomassie Brilliant Blau R 150	Merck
DMF	Serva
dNTP's	Boehringer
D-Sorbit	Biomol
E-64	Biomol
EDTA	Gerbu
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Roth
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Merck
Glucose	Merck
Glycerin	Merck
Glycin	Gerbu
Glycogen	Roche
GSH	Sigma-Aldrich
GSSG	Sigma
Guanidin-HCl	Sigma
Harnstoff	Gerbu
Hefeextrakt	Difco
Imidazol	Merck
IPTG	Fluka
Kanamycin	Gerbu
KCl	Merck
L-Arginin	Serva
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck
MassRuler DNA Ladder Mix	Fermentas
MES	Gerbu
Methylalkohol (MeOH)	Roth
N-(4-Bromophenyl)maleimid	Acros Organics

Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck
Natriumhydroxyd (NaOH)	J. T. Baker
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	Merck
Natriumacetat	Merck
NBT	Gerbu
NCS	Seromed
Phenol	Merck
Ponceau S	Serva
Saccharose	Gerbu
Salzsäure (HCl)	Merck
SDS	Serva
TEMED	Serva
Trichloressigsäure	Roth
Tricin (N-(Tris-(hydroxymethyl)-methyl)-glycin	Gerbu
Tris	Gerbu
Triton X-100	Serva
Trypton	Difco
Tween	Serva

Proteine und Chromogene Substrate	Firma
Anti-Tetra-His-Ak	Qiagen
Anti-Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase	Sigma
BSA	Serva
Glycin-p-Nitroanilid	Sigma
Humanes Hämoglobin	Sigma
Protein Molecular Weight Marker	Fermentas
Z-Phe-Arg-p-Nitroanilid	Bachem
Z-Tyr-Val-Ala-Asp-p-Nitroanilid	Bachem

Enzyme	Firma
BamHI	Boehringer
EcoRI	Fermentas
EcoRII/ MvaI	Fermentas
HindIII	Boehringer
High Fidelity PCR Enzyme Mix	Fermentas
Pwo DNA Polymerase	Roche
SspI	Fermentas
T4 DNA-Ligase	Novagen

VII.3. Puffer

Elektrophorese-Puffer für SDS-PAGE (Laemmli):

Tris	3,0 g, pH 8,3
Glycin	14,4 g
SDS	1,0 g
ad 1 l H ₂ O	

Faltungs-Puffer:

Tris-HCl	0,1 M, pH 9,0 (1 M HCl)
EDTA	1 mM
Glycerin	30 % (w/v)
L-Arginin	0,25 M
GSH	1 mM
GSSG	1 mM

Gelbeladepuffer (Agarose-Gelelektrophorese):

Bromphenolblau	0,25 % (w/v)
Ficoll (Pharmacia, Typ 400)	15 % (w/v)
in H ₂ O	

Gelbeladepuffer (3x) für SDS-PAGE (Laemmli):

H ₂ O	0,5 ml
Tris-HCl (0,5 M, pH 6,8)	1,5 ml
Glycerin (100 % (w/v))	2,4 ml
SDS (100 % (w/v))	2,4 ml
β-Mercaptoethanol	0,6 ml
Bromophenolblau (0,27 % in Ethanol)	0,6 ml

„Lösen“-Puffer für „Inclusion Bodies“ (entspricht Equilibrierungs-Puffer für Ni-NTA-Säule)

Guanidin-HCl	6 M
Tris-HCl	20 mM, pH 8,0
NaCl	0,5 M
Imidazol	10 mM

PCR-Puffer (Roche):

Tris-HCl	100 mM, pH 8,85
KCl	250 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	50 mM
MgSO ₄	20 mM

Puffer für Sammelgel (Laemmli):

Tris-HCl	3 g, pH 6,8
ad 50 ml H ₂ O	

Puffer für Trenngel (Laemmli):

Tris-HCl	18,15 g, pH 8,8
ad 100 ml H ₂ O	

Zusammensetzung Laemmli-Gel (15 % SDS):

Chemikalien	Sammelgel (6%)	Trenngel (15%)
H ₂ O	560 µl	1,6 ml
Acryamid-Lösung (30 % (w/v))	160 µl	2,0 ml
Puffer Trenngel	---	1,25 ml
Puffer Sammelgel	250 µl	---
10 % (w/v) SDS	10 µl	50 µl
10 % (w/v) APS	10 µl	50 µl
TEMED	1 µl	5 µl
0,25 % (w/v) Bromphenolblau	1 µl	---

TAE-Puffer:

Tris-Aceat	40 mM, pH 8,5
EDTA	1 mM
pH8,5	

TE-Puffer:

Tris	50 mM, pH 7,5
EDTA	1 mM

Puffer für die Ni-NTA-Säule:**Equilibrations-Puffer (siehe „Lösen-Puffer“)****„Säulenpuffer 1“:**

Guanidin-HCl	6 M
Tris-HCl	20 mM, pH 8,0
NaCl	0,5 M

„Säulenpuffer 2“:

Harnstoff	8 M
Tris-HCl	20 mM, pH 8,0
NaCl	0,5 M

„Säulenpuffer 3“:

Harnstoff	8 M
Tris-HCl	20 mM, pH 8,0
Imidazol	30 mM

Elutionspuffer:

Harnstoff	8 M
Tris-HCl	20 mM, pH 8,0
Imidazol	1 M

Puffer für Semi-Dry Western-Blot:

Blotpuffer (2×):

Glycin	28,8 g
Tris	6,0 g
SDS	0,75 g
ad 1l H ₂ O	

Benutzungs-Verdünnung Blotpuffer:

Blotpuffer (2x)	100 ml
MeOH	40 ml
H ₂ O	60 ml

TBS (Tris buffered saline):

Tris-HCl	10 mM, pH 7,5
NaCl	150 mM

Blocking-Puffer:

BSA	1,8 g
ad 60 ml TBS	

TBS-Tween/ Triton-Puffer:

Tris-HCl	20 mM, pH 7,5
NaCl	500 mM
Tween-20	0,05 % (w/v)
Triton-X-100	0,2 % (w/v)

Puffer A:

Tris-HCl	100 mM, pH 9,5
NaCl	100 mM
MgCl ₂	5 mM

Waschpuffer für Inclusion Bodies:
„Wasch-Puffer 1“:

Harnstoff	2 M
Tris-HCl	20 mM, pH 8,0
Triton X-100	2,5 % (w/v)

„Wasch-Puffer 2“:

Saccharose	20 % (w/v)
Tris-HCl	20 mM, pH 8,0

VII.4. Medien, Lösungen und Färbelösungen

Medien:
LB-Agarplatten (Luria-Bertani) pro 0,5 l :

Trypton	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
NaCl	5 g
Agar	7,5 g
ad 500 ml mit H ₂ O dest., pH 7,0 (NaOH)	

LB-Medium (Luria-Bertani) pro 0,5 l:

Trypton	5 g
Hefeextrakt	2,5 g
NaCl	5 g
ad 500 ml mit H ₂ O dest., pH 7,0 (NaOH)	

Lösungen:

Antikörperlösungen:

Anti-Tetra-His-Ak 1:5.000 in Blocking-Puffer

Anti-Maus-IgG-Alkalische-Phosphatase 1:1.000 in Blocking-Puffer

BCIP-Stammlösung:

BCIP	50 mg
DMF (100% (w/v))	1 ml

Betain-Lösung:

Betaine-HCl	1 M
in H ₂ O, steril filtriert	

NBT-Stammlösung:

NBT	75 mg
DMF (70 % (w/v))	1 ml

Reagenz für die Blot-Entwicklung:

Puffer A	10 ml
NBT-Stammlösung	44 µl
BCIP-Stammlösung	33 µl

Sorbit-Lösung:

D-Sorbit 97 % (w/v)	2 M
in H ₂ O, steril filtriert	

Färbelösungen:

Coomassie Brilliant Blue R-Färbelösung:

Methanol	50 % (w/v)
Coomassie R150	0,1 % (w/v)
Essigsäure	10 % (w/v)

Entfärb-Lösung (für Coomassie Brilliant Blue):

Methanol	40 % (w/v)
Essigsäure	10 % (w/v)

Ponceau S-Lösung:

Ponceau S	0,2 % (w/v)
Trichloressigsäure	3 % (w/v)

VII.5. Geräte und Chromatographiesäulen

Geräte	Firma
Agarosegelkammern	BioRad; Hybaid; Eigenbau
Autoklaven	Sterico, Vaopclav 500 D; Varioclav, Dampfsterilisator
Blotapparatur	Hoefer, Semi-Phor TM
Eismaschine	Scotsman, AF 20
Elektrophoresekammern	Hoefer
Geltrockner	SLAB, Gel Dryer SGD 3545
Glaspipetten	Brand
Gradient-Pumpe	BioRad, EconoPump
Heizblock	Eppendorf, Thermomixer 5436; Thermostat 5320
Inkubatoren	Hereaus; Bachofer
Magnetrührer	Heidolph, MR 2002

Membranfiltrationszelle	Millipore
Mikrowelle	Siemens
Minischüttler	Heidolph, Vortexer REAX 1 DR
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Protran®
PCR-Thermocycler	Biometra, TGradient
pH-Meter	Schott, Titrator TR 156
Photometer	BioChrom Ltd, Photometer Ultrospec 3100 pro
Pipetten	Labsystems Finnpipetten; Gilson
Scanner	Epson, GT-9600
Schüttelinkubator	GFL, Incubator 3032; New Brunswick Scientific, Innova 4230
SDS-PAGE-Gelkammer	Amersham Biosciences, Hoefer
Spannungsversorger	Desaga, Sesatronic 3000/200; LKB, Typ 2197; Gibco BRL, PS 3002; MWG-Biotech, PPS 200
Spektrometer	Varian, Cary 50
Ultrafiltrationsmembran	Millipore
Ultraschallstab	Branson, Branson Sonifier Cell DisruptorB15
Ultraschall-Wasserbad	Bandelin electronic, Sonorex RK 102H
UV-Transluminator	Biostep
Waage	Sartorius, 1265 MP
Wasserbad	Julabo, U3
Zentrifugen	Heraeus, Biofuge 13; Heraeus, DigiFuge ^{GL} ; Sigma, Centrifuge 3-18K; Sorvall, Refrigerated Superspeed Centrifuge RC-3B; RC-5B

Chromatographie-Säulen	Firma
HiTrap™Desalting-Säule	Amersham Biosciences
MonoQ	Pharmacia Biotech
Ni-NTA-Säule	Amersham Biosciences
Superdex™-200	Pharmacia Biotech

VII.6. Labor-Kits, Bakterien-Stämme und Plasmide

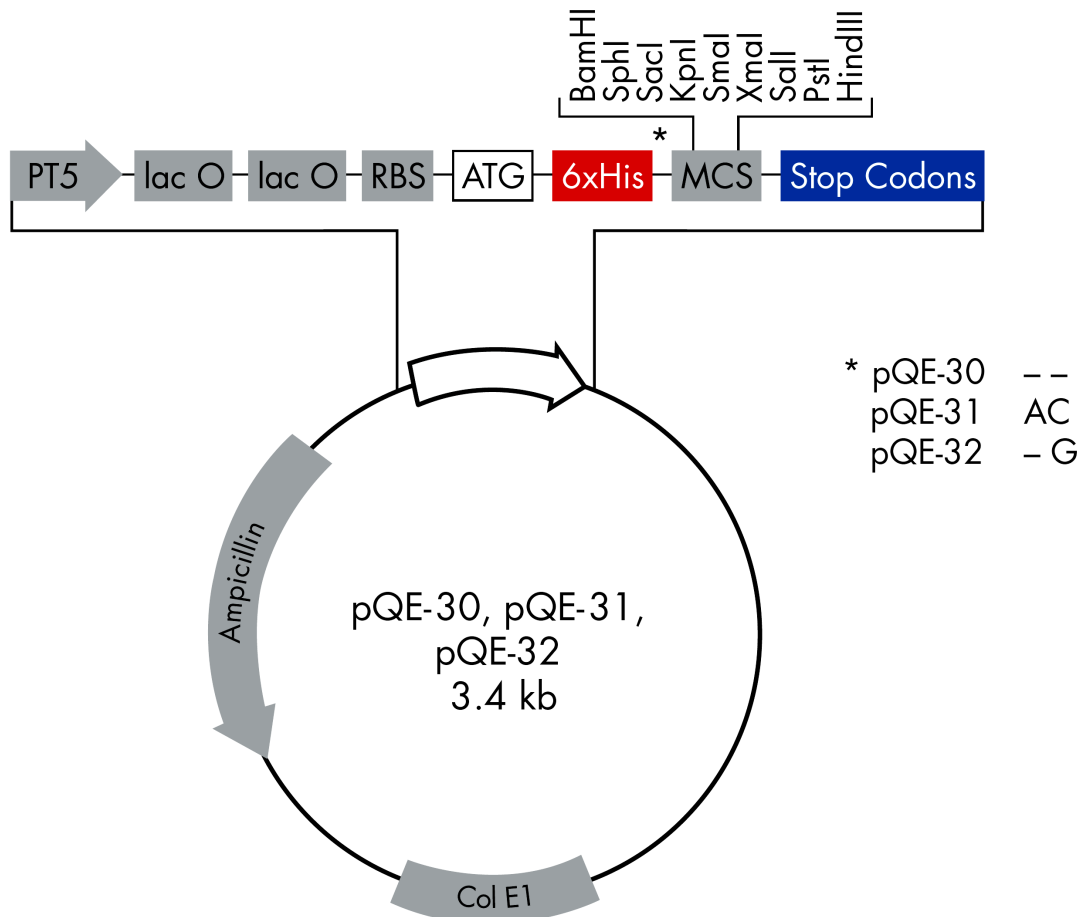
Kits	Firma
Perfectly Blunt® Cloning Kit	Novagen
Qiaprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Plasmid Midi Kit	Qiagen
Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices	Millipore
Transformaid-Kit	Fermentas

Bakterien-Stämme und Plasmide	Firma
NovaBlue Singles™ Competent Cells	Novagen
<i>M15(pREP4)</i> -Zellen	Novagen
<i>Origami(DE3)</i> -Zellen	Novagen
pQ-35FP2 (fertiges Konstrukt)	Prof. T. Schirmeister (Würzburg)
pETBlue-1	Novagen

Vektorkarten:

Vektorkarte von pQE-30:

(modifiziert nach <http://www1.qiagen.com/literature/pqesequences/pqe3x.pdf>, Tag des Zugriffs 01.11.2007)



pQE-30



VIII. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen herzlich danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank geht an folgende Personen:

Herrn Prof. Dr. Rolf Hilgenfeld danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der guten Infrastruktur sowie der materiellen Unterstützung.

Frau Prof. Dr. Gabriele Gillessen-Kaesbach aus dem Institut für Humangenetik möchte ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit danken.

Meinem Mitbetreuer, Herrn PD Dr. Christian L. Schmidt, möchte ich besonders herzlich für die Unterstützung in allen Phasen dieser Arbeit danken. Mit Hilfe seiner geduldigen theoretischen und praktischen Erklärungen, der vielen Ratschläge und nicht zuletzt seiner Flexibilität bezüglich der Zeiteinteilung konnte die Arbeit schnell vorangetrieben werden. Ich weiß die gute Betreuung sehr zu schätzen.

Herrn Prof. T. Schirmeister gilt der Dank für die Bereitstellung des Ausgangs-Expressionskonstruktes „pQ-35FP2“.

Herrn/Frau aus der medizinischen Fakultät, der/die freundlicherweise das Zweitreferat der Dissertation übernahm.

Frau Doris Mutschall, Frau Sybille Siedler, Susanne Zoske für die zuverlässige technische Assistenz, ihre stets freundlichen Hilfestellungen und die gute Zusammenarbeit.

Herrn Walter Verheyen, Herrn Ralf Moll, Frau Silke Schmidtke und allen übrigen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie danke ich für die Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima.

Meiner Familie und meinen engen Freunden möchte ich für die ideelle Unterstützung und für ihre unerschütterliche Geduld danken.

IX. Lebenslauf

Person

<i>Name</i>	Herzberg
<i>Vorname</i>	Saskia
<i>Geburtstag</i>	23. August 1980
<i>Geburtsort</i>	Hannover
<i>Nationalität</i>	Deutsch
<i>Familienstatus</i>	Ledig

Schul Ausbildung

<i>1987-1991</i>	Grundschule Godshorn
<i>1991-1993</i>	Orientierungsstufe Godshorn
<i>1993-2000</i>	Gymnasium Langenhagen, Abschluss: Abitur im Juni 2000

Berufsausbildung

<i>2000- 2001</i>	Immatrikulation an der Universität Hannover im Fach Biologie und Chemie für höheres Lehramt
<i>seit 2001</i>	Immatrikulation an der Universität zu Lübeck im Fach Humanmedizin; 08/2003: Physikum
<i>Juli 2004-August 2005</i>	Anfertigung der Dissertation „Konstruktion, Synthese und Rückfaltung zweier inaktiver Falcipain-2-Mutanten und funktionelle Charakterisierung von Falcipain-2, einer malarialen Hämoglobinasen von <i>Plasmodium falciparum</i> “ im Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck bei Frau Prof. Dr. Gabriele Gillessen-Kaesbach in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie der Universität zu Lübeck
<i>Juli 2008</i>	Antritt der Stelle als Assistenzärztin in der neurologischen Abteilung des AKH Celle