

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Abstract.....	II
Veröffentlichungen.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Inhaltsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung	1
2 Motivation der Arbeit	3
3 Theoretische Grundlagen	6
3.1 Die Tropenparasitose Schistosomiasis.....	6
3.1.1 Entwicklungszyklus von <i>S. mansoni</i>	6
3.1.2 Krankheitsverlauf und Pathogenese.....	7
3.1.3 Therapie und alternative Behandlungsmöglichkeiten	8
3.2 Schistosomale Enzyme als potentielle <i>Drug-Targets</i>	9
3.2.1 Abelson Protein-Tyrosinkinase 2 als mögliches zytosolisches <i>Target</i>	10
3.2.1.1 Aufbau und Aktivierung von Abl-Kinasen	10
3.2.1.2 Einsatz bekannter Abl2 Inhibitoren als potentielle Leitsubstanzen	12
3.2.2 Aldehyd-Dehydrogenase als mögliches <i>Target</i> im Tegument ..	14
3.2.2.1 Lokalisation der schistosomalen ALDH_312.....	14
3.2.2.2 Humanmedizinische ALDH-Inhibitoren als potentielle Wirkstoffe	15
3.2.3 Screening von Substanzbibliotheken	16
3.3 Heterologe Expression schistosomaler Enzyme	17
3.3.1 Baculovirus-vermittelte Proteinexpression	18
3.3.1.1 Baculoviren und deren Replikationszyklus.....	19
3.3.1.2 Etablierte Insektenzelllinien.....	20
3.3.1.3 Rekombinante Proteinexpression	22
3.3.1.4 Aufreinigung rekombinanter Proteine.....	24

3.3.2	Einfluss kritischer Prozessparameter auf die Proteinproduktion.....	25
3.3.3	Proteinproduktion im <i>Batch</i> -Betrieb.....	26
3.4	Etablierung eines enzymkinetischen Aktivitätstests	32
3.4.1	Theoretische Betrachtung der Enzymkinetik	34
3.4.1.1	Ermittlung kinetischer Konstanten.....	35
3.4.2	Enzyminhibierung.....	36
3.4.2.1	Ermittlung der IC ₅₀ -Werte.....	38
4	Material und Methoden.....	39
4.1	Material.....	39
4.1.1	Insektenzellen	39
4.1.2	Bakterienstämme	39
4.1.3	Medien	39
4.1.3.1	Insektenzellen	39
4.1.3.2	Bakterienstämme	40
4.1.4	Vektoren und Plasmide	40
4.1.5	Oligonukleotide.....	41
4.1.6	Enzyme und Antikörper	42
4.1.7	Kitsysteme und Puffer	42
4.1.8	Gerätesoftwares, Bioinformationstools und Datenbanken.....	43
4.1.9	Geräteliste	45
4.2	Mikrobiologische Methoden.....	46
4.2.1	Kultivierung der Bakterienstämme.....	46
4.2.2	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen mit DNA	47
4.2.2.1	Transformation chemisch kompetenter NEB 10-beta ..	47
4.2.2.2	Transformation chemisch kompetenter DH10Bac.....	47
4.3	Molekularbiologische Methoden	48
4.3.1	Präparation von Plasmid-DNA und Bestimmung der DNA-Konzentration.....	48
4.3.2	Generierung baculoviraler Bacmid-DNA	48
4.3.3	Kolonie-PCR mit M13-Primern	49
4.3.4	Integritätsüberprüfung der <i>Inserts</i> mittels Restriktionsverdau ...	50
4.3.5	Sequenzierung	51

4.3.6	Agarose-Gelelektrophorese	51
4.3.7	Plasmid-Präparation	51
4.3.8	Messung der Bacmid-DNA-Konzentration und Bestimmung der Reinheit	52
4.4	Zellbiologische Methoden	52
4.4.1	Revitalisierung der Sf-9 Insektenzellen	52
4.4.2	Kryokonservierung der TriEx™ Sf-9 Insektenzellen	52
4.4.3	Kultivierung der TriEx™ Sf-9 Insektenzellen	53
4.4.4	Ermittlung der Zellzahl und Vitalität	53
4.4.5	Bestimmung wachstumsspezifischer Parameter	53
4.4.6	Transfektion der TriEx™ Sf-9 Insektenzellen	55
4.5	Virologische Methoden	56
4.5.1	Amplifizierung der rekombinanten Baculoviren	56
4.5.2	Virustitration	56
4.5.2.1	Isolierung baculoviraler DNA und Titration mittels qPCR	56
4.5.2.2	Bestimmung der infektiösen Virentiter mittels TCID ₅₀ ..	58
4.6	Etablierung des Expressionsprozesses	59
4.6.1	Rekombinante Proteinexpression im Schüttelkolben	59
4.6.2	Ernte der rekombinanten Enzyme	59
4.6.3	Produktionskinetik der SmAbl2-TK und SmALDH_312	60
4.6.4	Optimierung der rekombinanten Enzymexpression	60
4.6.5	Medienscreening	60
4.6.6	Optimierung der Prozessparameter MOI, CCI und TOH	61
4.7	Enzymproduktion im Bioreaktor	62
4.8	Proteinbiochemische Methoden	62
4.8.1	SDS-PAGE und densitometrische Auswertung	62
4.8.2	Nachweis der Enzyme über Western Blot	63
4.8.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	64
4.8.3.1	BCA-Assay	64
4.8.3.2	His-ELISA	64
4.9	Etablierung des Aufreinigungsprozesses	65

4.9.1	Immobilisierte-Metallionen-Chromatographie	65
4.9.2	Umpufferung der Enzymlösung über Gelfiltration.....	66
4.10	Photometrische Enzymassays der SmALDH_312.....	66
4.10.1	Etablierung des Aktivitätstests.....	66
4.10.2	Charakterisierung der SmALDH_312	67
4.10.2.1	Einfluss bivalenter Kationen.....	67
4.10.2.2	Optimierung der spezifischen Umgebungs- bedingungen	67
4.10.3	Ermittlung der kinetischen Konstanten	68
4.11	Inhibitoren-Screening der SmALDH_312	68
4.11.1	Virtuelles Protein-Ligand-Docking	68
4.11.1.1	Set-up des Dockings	69
4.11.1.2	Homologiemodellierung und Docking der SmALDH_312	70
4.11.2	Experimentelles <i>in vitro</i> Screening	71
4.11.2.1	Zweistufige Diafiltration und Aufbau des Screeningassays.....	71
4.11.2.2	Inhibitor Screening	72
4.11.2.3	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte	72
5	Ergebnisse und Diskussion.....	73
5.1	Übersicht des Gesamtprojekts	73
5.2	Nachweis <i>Insert</i> -positiver Klone	74
5.3	Amplifizierung und Titration rekombinanter P2 Virenstocks	75
5.4	Nachweis der schistosomalen Abl2-TK und ALDH.....	77
5.5	Optimierung des Expressionsprozesses der SmALDH_312	81
5.5.1	Medienscreening.....	81
5.5.1.1	Biochemische Zusammensetzung der eingesetzten Medien	81
5.5.1.2	Wachstumskinetiken der <i>Sf</i> -9 Zellen.....	82
5.5.1.3	Metabolische Analyse infizierter <i>Sf</i> -9 Zellen	85
5.5.1.4	Expressionsvermögen der <i>Sf</i> -9 Zellen in unterschiedlichen Medien	89

5.5.2	Optimierung kritischer Prozessparameter	89
5.6	Proteinproduktion im Bioreaktor	93
5.7	Enzymbereinigung und Umpufferung	95
5.7.1	Aufreinigung mittels Standard-IMAC Protokoll	95
5.7.2	Optimierung des IMAC Protokolls	96
5.7.3	Gelfiltration zum Pufferaustausch.....	98
5.8	Etablierung und Validierung des SmALDH_312-Assays	99
5.8.1	Aufbau des Testverfahrens	99
5.8.2	Validierung	102
5.9	Charakterisierung der SmALDH_312	105
5.9.1	Effekt bivalenter Kationen	105
5.9.2	Optimierung kinetischer Umgebungsbedingungen.....	106
5.9.3	Bestimmung enzymkinetischer Konstanten.....	108
5.10	Inhibitor-Screening der SmALDH_312	109
5.10.1	Virtuelles Protein-Ligand-Docking	109
5.10.1.1	Aufbau und Validierung des Dockingmodells der huALDH2	109
5.10.1.2	Homologiemodellierung	110
5.10.1.3	Vergleichendes <i>in silico</i> Screening der SmALDH_312 und huALDH2.....	111
5.10.2	<i>In vitro</i> Inhibitor-Screening der SmALDH	114
5.10.2.1	Aufbau des Screeningassays.....	114
5.10.2.2	Screening der potentiellen Inhibitoren.....	115
5.10.2.3	Ermittlung des IC ₅₀	116
5.10.2.4	Bewertung der Screeningverfahren	117
6	Fazit und Ausblick	120
7	Literaturverzeichnis.....	124
8	Abbildungsverzeichnis.....	145
9	Tabellenverzeichnis.....	150
10	Anhang	152
	Danksagung.....	156
		XIII