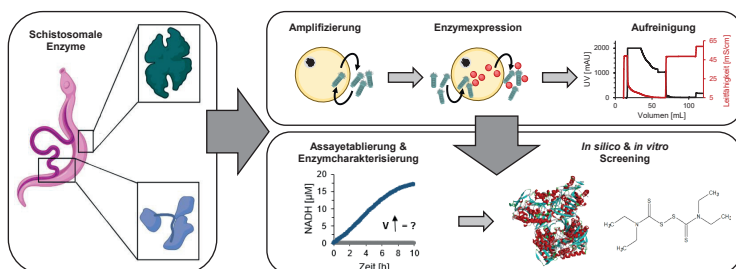


Julie Harnischfeger

Rekombinante Expression schistosomaler Enzyme
zum Aufbau einer Screeningplattform gegen
die parasitäre Art *Schistosoma mansoni*



Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische
Technologie | Band 23

Herausgeber: Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

**Rekombinante Expression schistosomaler
Enzyme zum Aufbau einer Screeningplattform
gegen die parasitäre Art *Schistosoma mansoni***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium – Dr. rer. nat.

Am Fachbereich Chemie und Biologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von:

Julie Harnischfeger

geboren in Aschaffenburg

Gießen, September 2021

Diese Veröffentlichung ist Teil meiner Promotion zum Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat) durch den Fachbereich Biologie und Chemie der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland.

Dekan:

Prof. Dr. Thomas Wilke

Erstgutachter:

Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak

Technische Hochschule Mittelhessen,
Fachbereich Life Science Engineering
Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie

Justus-Liebig-Universität Gießen
Fachbereich Biologie und Chemie

Zweitgutachter:

Prof. Dr. Christoph G. Greveling

Justus-Liebig-Universität-Gießen
Biomedizinisches Forschungszentrum Seltersberg
Institut für Parasitologie

Schriftenreihe des Institutes für Bioverfahrenstechnik und
Pharmazeutische Technologie

Band 23

Julie Harnischfeger

**Rekombinante Expression schistosomaler Enzyme
zum Aufbau einer Screeningplattform gegen die
parasitäre Art *Schistosoma mansoni***

D 26 (Diss. Universität Giessen)

Shaker Verlag
Düren 2022

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Giessen, Univ., Diss., 2022

Copyright Shaker Verlag 2022

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8440-8618-8

ISSN 2198-5731

Shaker Verlag GmbH • Am Langen Graben 15a • 52353 Düren

Telefon: 02421 / 99 0 11 - 0 • Telefax: 02421 / 99 0 11 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Zusammenfassung

Die durch die parasitäre Klasse der Trematoden, speziell durch die Gattung *Schistosoma* ausgelöste Tropenparasitose Schistosomiasis zählt zu den wichtigsten tropischen Infektionskrankheiten. Zur Prävention und Therapie steht jedoch nur ein zugelassenes Medikament zur Verfügung, das seit den 1970er Jahren eingesetzt wird und dessen Wirksamkeit in den vergangenen Jahren nachgelassen hat. Die reelle Gefahr einer Resistenzentwicklung erfordert zwingend die Identifizierung neuer Wirkstoffe. Ein parasiten-basiertes Screening ist aufgrund des komplexen Lebenszyklus weniger geeignet. Eine effiziente Alternative stellt ein *drug target*-basiertes Wirkstoffscreening von lebenswichtigen Enzymen des Parasiten dar. Ein zielgerichtetes Screening ermöglicht zudem die Etablierung einer Plattformtechnologie, wodurch auch ähnliche Schlüsselenzyme anderer Parasiten gescreent werden können. Zur Realisierung einer Screeningplattform wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei Enzyme aus *Schistosoma mansoni* ausgewählt und rekombinant mittels Baculovirus-Expressionssystem hergestellt. In diesem Zuge wurde ein Medienscreening durchgeführt und der Produktionsprozess hinsichtlich kritischer Prozessparameter optimiert. Der optimierte Produktionsprozess wurde anschließend auf einen 1 L Bioreaktor-Maßstab übertragen. Für die Integration in enzymatische Aktivitätstests wurden beide Enzyme chromatographisch aufgereinigt. Für eines der Enzyme wurde im Anschluss der Aktivitätstest ausgelegt. Vorab erfolgte über eine Gelfiltration ein Pufferaustausch in einen geeigneten Assaypuffer. Da das Enzym keine biologische Aktivität aufwies, wurde zunächst eine geeignete Konzentration des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) bestimmt. Danach erfolgte die Ermittlung einer geeigneten Enzymkonzentration. Zur Steigerung der Enzymaktivität wurde der Effekt von bivalenten Kationen getestet, optimale Umgebungsbedingungen unter Verwendung eines statistischen Versuchsplans untersucht und die kinetischen Konstanten $v_{\max}$, K_m und k_{cat} bestimmt. Für die Integration in einen Aktivitätstest wurde zunächst eine Methode zur Eliminierung von DTT unter Erhalt der biologischen Aktivität entwickelt. Parallel dazu wurde ein *in silico* Screening von potentiellen Molekülen der Pathogen Box durchgeführt, um eine Aussage über mögliche Bindungsaffinitäten zwischen den potentiellen Inhibitoren und dem Enzym zu treffen. Mit einem abschließenden *in vitro* Screening konnten drei vielversprechende Substanzen ermittelt werden, die einen inhibitorischen Effekt zwischen 80-100 % und IC_{50} Werte zwischen 7,4-21,8 μM erreichten.

Abstract

The tropical disease Schistosomiasis, caused by the parasitic class of trematodes, especially the genus *Schistosoma*, is one of the most important tropical infectious disease. However, only one approved drug is available for prevention and therapy, which has been used since the 1970s and whose effectiveness has declined in recent years. The real risk of resistance development urgently calls for the identification of new active compounds. Parasite-based screenings are less suitable due to the complex life cycle. An efficient alternative is a drug target-based screening of vital enzymes of the parasite. A targeted screening also allows the establishment of a platform technology, whereby similar key enzymes of other parasites can be screened. To realize a screening platform, two key enzymes from *Schistosoma mansoni* were selected and recombinantly produced using baculovirus expression system. In this course, a media screening was performed, and the production process was optimized with respect to critical process parameters. The optimized production process was then transferred to a 1 L bioreactor scale. For integration into enzymatic activity assays, both enzymes were chromatographically purified. The activity assay was then construed for one of the enzymes. Preliminary buffer exchange into a suitable assay buffer was carried out via gel filtration. Since the enzyme showed no biological activity, a suitable concentration of the reducing agent dithiothreitol (DTT) was determined first. Subsequently, a suitable enzyme concentration was determined. To increase enzyme activity, the effect of bivalent cations was tested, optimal kinetic properties were investigated using design of experiment and the kinetic constants $v_{\max}$, K_m and k_{cat} were determined. For integration into an activity assay, a method for elimination of DTT while maintaining biological activity was developed first. At the same time, *in silico* screening of potential molecules of the pathogenic box was carried out in order to obtain information about possible binding affinities between the potential inhibitors and the enzyme. With final *in vitro* screening three promising compounds could be identified, which achieved an inhibitory effect between 80-100 % and IC_{50} values between 7.4-21.8 μM .

Veröffentlichungen

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen Juni 2017 und April 2021 am Institut für Bioverfahrenstechnik und Pharmazeutische Technologie der Technischen Hochschule Mittelhessen angefertigt. Ein Teil dieser Dissertation wurde vorab in englischer Sprache verfasst und veröffentlicht. Die Daten wurden für die Verwendung in dieser Dissertation freigegeben.

Publikationen

Buchkapitel

Harnischfeger J., Käßer L., Zitzmann J., Salzig D., Czermak P. (2021) **Bioreactor-Based Antigen Production Process Using the Baculovirus Expression Vector System**. In: Pfeifer B.A., Hill A. (eds) *Vaccine Delivery Technology*. Methods in Molecular Biology, vol 2183. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0795-4_8

Eilts F., Harnischfeger J., Loewe D., Wolff M.W., Salzig D., Czermak P. (2021) **Production of Baculovirus and Stem Cells for Baculovirus-Mediated Gene Transfer into Human Mesenchymal Stem Cells**. In: Pfeifer B.A., Hill A. (eds) *Vaccine Delivery Technology*. Methods in Molecular Biology, vol 2183. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0795-4_19

Paper

Harnischfeger J, Beutler M, Salzig D, Rahlfs S, Becker K, Grevelding C G, Czermak P (2021). **Biochemical characterization of the recombinant schistosome tegumental protein SmALDH_312 produced in *E. coli* and baculovirus expression vector system**. *Electronic Journal of Biotechnology* 54, 26-36. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2021.08.002>

Submitted under revision (Manuscript number: EJBT-21-00198): Käßer L., Harnischfeger J., Salzig D., Czermak P. (2021): **The Effect of Different Insect Cell Culture Media on the Efficiency of Protein Production by *Spodoptera frugiperda* cells**. In *Electronic Journal of Biotechnology*

Ready for Submission: Harnischfeger J., Ueberall M. E., Salzig D., Grevelding C. G., Czermak P.: **Protein–ligand docking and *in vitro* screening using a schistosomal aldehyde dehydrogenase to identify novel drug candidates for the prevention and treatment of schistosomiasis**

Tagungsbeiträge

Vorträge

J. Harnischfeger, M. Beutler., S. Häberlein, D. Salzig, C. G. Greveling, P. Czermak (2019): **Comparison of the production of schistosomal enzymes using *E. coli* and BEVS**, 2nd DRUID Retreat, Rauschholzhausen (Germany).

J. Harnischfeger, S. Häberlein, C. G. Grevelding, D. Salzig, P. Czermak (2021): **Establishment of an *in vitro* high-throughput screening platform for testing candidate compounds against *Schistosoma mansoni***, 29th Annual Meeting of German Society for Parasitology, Berlin (Germany).

Posterbeiträge

J. Harnischfeger, T. Weidner, C.G. Grevelding, P. Czermak (2018): **Establishment of a screening platform for testing compounds against *Schistosoma mansoni* *in vitro***, 28th Annual Meeting of German Society for Parasitology, Berlin (Germany).

J. Harnischfeger, T. Weidner, S. Häberlein, C.G. Grevelding, D. Salzig, P. Czermak (2018): **Design of an *in vitro* screening platform against *Schistosoma mansoni* for identify potential drug compounds**, Tagung der DVG-Fachgruppe "Parasitologie und parasitäre Krankheiten", Giessen (Germany).

J. Harnischfeger, D. Salzig, S. Häberlein, J. Zitzmann, C.G. Grevelding, P. Czermak (2018): **Development of an *in vitro* screening platform for testing compounds against *Schistosoma mansoni***, 1st DRUID Retreat, Rauschholzhausen (Germany).

J. Harnischfeger, D. Salzig, S. Häberlein, J. Zitzmann, C.G. Grevelding, P. Czermak (2019): **Development of an enzyme-based *in vitro* screening platform for testing compounds against *Schistosoma mansoni***, Tagung der DVG-Fachgruppe "Parasitologie und parasitäre Krankheiten", Leipzig (Germany).

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bezeichnung
Abl2	Abelson Protein-Tyrosin Kinase 2
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> multicapsid nucleopolyhedrovirus
ACM	<i>Animal Component-Free Medium</i>
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
Amp ^R	Ampicillin-Resistenz
ATP	Adenosintriphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
BEVS	Baculovirus-Expressions-Vektorsystems
Bp	Basenpaare
BV	<i>Budded virus</i>
CCI	Zellkonzentration zum Zeitpunkt der Infektion
CDM	<i>Chemically Defined Medium</i>
d	Tage
DIPS	<i>defective interfering particles</i>
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FPLC	<i>Fast performance liquid chromatography</i>
Gent ^R	Gentamycin-Resistenz
GMQE	<i>Global Model Quality Estimation</i>
GP64	Signalsequenz des <i>Envelope glycoprotein</i> 64 Sekretionssignals
h p.i.	Stunden nach der Infektion (lat. <i>post infectionem</i>)
HCl	Salzsäure
His ₆ -Tag	Polyhistidin-Tag
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)

Abkürzungsverzeichnis

huALDH2	humane mitochondriale ALDH2
ICM	<i>Insect Cell Medium</i>
IMAC	Immobilisierte-Metallionen-Chromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IC ₅₀	Mittlere inhibierende Konzentration
Kan ^R	Kanamycin-Resistenz
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
L	Ligand
MOI	Multiplizität der Infektion
MMFF	<i>Merck Molecular Force Field</i>
M _w	Molekulargewicht
NaCl	Natriumhydrochlorid
NAD ⁺	Nicotinamadenindinukleotid, reduzierte Form
NADH	Nicotinamadenindinukleotid, oxidierte Form
NTDs	Vernachlässigte tropische Erkrankungen
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
ODV	<i>Occluded-derived virus</i>
OV	<i>Occluded virus</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	<i>Potentia hydrogenii</i>
pI	Isoelektrischer Punkt
pfu	<i>Plaque forming units</i>
<i>Polh</i> -Promoter	Polyhedrin-Promoter
PTMs	Posttranslational Modifikationen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PZQ	Praziquantel
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RNA	Ribonukleinsäure

rpm	Umdrehungen pro Minute
QMEAN	<i>Qualitative Model Energy Analysis</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Sf-9	Zelllinie aus <i>Spodoptera frugiperda</i>
SFM	Serumfreies Medium
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
SH	<i>Src-Homology Domäne</i>
SmAbl2-TK	Tyrosinkinase-Domäne der Abl2 aus <i>Schistosoma mansoni</i>
SmALDH_312	Aldehyd-Dehydrogenase aus <i>Schistosoma mansoni</i>
SV	Säulenvolumen
SV40 poly A	<i>Simian Virus 40 polyadenylation signal</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCEP	Tri(2-carboxyethyl)phosphin
Thr _C	Thrombin-Schnittstelle
TOH	Erntezeitpunkt
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Vol.	Volumenanteil
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

Abkürzungsverzeichnis

Symbol	Bezeichnung	Einheit
p (n)	Wahrscheinlichkeit der Infektion mit Baculoviren (n)	[-]
$Re_{SK, \text{Reaktor}}$	Reynolds-Zahl	[-]
Ne'	Modifizierte Newton-Zahl (Schüttelkolben)	[-]
Ne_R	Newton-Zahl des Rührers	[-]
ρ	Dichte	$kg \cdot m^{-3}$
$n_{SK, R}$	Schüttelfrequenz; Rührerdrehzahl	s^{-1}
$d_{SK, R}$	Durchmesser des Schüttelkolbens; Rührers	m
η	Dynamische Viskosität	$kg \cdot ms^{-1}$
V	Volumen	m^3
P	Leistungseintrag	W
P/V	Volumenspezifischer Leistungseintrag	$W \cdot m^{-3}$
ε	Energiedissipation	$W \cdot kg^{-1}$
ε_{max}	Maximale Energiedissipation	$W \cdot kg^{-1}$
λ	Mikrowirbelmaßstab	μm
$\dot{\gamma}$	Scherrate	$1 \cdot s^{-1}$
v	Reaktionsgeschwindigkeit	$\mu mol \cdot min^{-1}$
v_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit	$\mu mol \cdot min^{-1}$
K_M	Michaelis-Menten-Konstante	$mol \cdot L^{-1}$
k_{cat}	Katalytische Konstante	s^{-1}
k_{cat}/K_m	Maß der katalytischen Effizienz	$mol \cdot s^{-1}$
U	Units; Enzymaktivität	$nmol \cdot min^{-1}$
$U \cdot mg^{-1}$	Spezifische Enzymaktivität	$nmol \cdot min^{-1} \cdot mg^{-1}$
ΔG	Bindungsaffinität	$kcal \cdot mol^{-1}$
k_{max}	Bindungskonstante	[-]
μ	Wachstumsrate	$1 \cdot h^{-1}$
t_D	Verdopplungszeit	h
$Y_{X/S}$	Ausbeutekoeffizient	$Zellen \cdot g_{Substrat}^{-1}$
q_G	Glukoseverbrauchsrate	$nmol \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot h^{-1})$
q_L	Laktatbildungsrate	$nmol \cdot (10^6 \text{ Zellen} \cdot h^{-1})$

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
	IX

3.3.2	Einfluss kritischer Prozessparameter auf die Protein- produktion.....	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 <i>Sf</i> -9 Insektenzellen	52
4.4.2	Kryokonservierung der TriEx™ <i>Sf</i> -9 Insektenzellen	52
4.4.3	Kultivierung der TriEx™ <i>Sf</i> -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™ <i>Sf</i> -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	Enzymbaufreinigung 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